

新疆肉苁蓉提取液对 M-KOOPG 小鼠抗骨质疏松的作用机制

罗德梅, 龙梅, 杜文静, 罗莉*

(新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**探讨新疆肉苁蓉提取液对 M-KOOPG 小鼠抗骨质疏松的作用机制。**方法:**选用 M-KOOPG 雌性小鼠 40 只,随机分成 4 组,即肉苁蓉提取液高、低剂量组($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),福善美组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$),模型组,每组各 10 只。连续 *ig* 给药 30, 60 d 时每组处死 M-KOOPG 小鼠 5 只,苏木素-伊红(HE)染色观察 M-KOOPG 小鼠各组间骨小梁形态及数目变化;免疫组织化学法观察 M-KOOPG 小鼠骨组织中白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的定位及阳性表达。**结果:**连续 *ig* 30, 60 d,肉苁蓉提取物高、低剂量组、福善美组小鼠骨小梁形态及数目均有增加,免疫组化指标 IL- 1β , TNF- α 显示在骨小梁表面的成骨细胞、破骨细胞及骨髓基质细胞的细胞浆表达呈不同程度降低,IL- 1β , TNF- α 阳性表达细胞数与模型组比较均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**新疆肉苁蓉提取液通过降低 M-KOOPG 小鼠中 IL- 1β , TNF- α 的阳性表达,提示具有抗骨质疏松的作用。

[关键词] 新疆肉苁蓉提取液; M-KOOPG 小鼠; 白细胞介素- 1β ; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0138-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100138

Anti-Osteoporosis Mechanism of Xinjiang Cistanches Herba Extract in M-KOOPG Mice

LUO De-mei, LONG Mei, DU Wen-jing, LUO Li*

(The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-osteoporosis mechanisms of Xinjiang Cistanches Herba extract in M-KOOPG mice. **Method:** Totally 40 female M-KOOPG mice were randomly divided into 4 groups, namely the Cistanche extract high dose group and low dose group ($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Fosamax group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{week}^{-1}$), and model group, $n = 10$ in each group. 5 M-KOOPG mice were killed in each group respectively after continuous intragastric administration for 30 d and 60 d. Then the changes in morphology and number of bone trabecular in M-KOOPG mice were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; immunohistochemistry assay was used to observe the positioning and positive expression of interleukin- 1β (IL- 1β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bone tissues of M-KOOPG mice. **Result:** After continuous intragastric administration for 30 d and 60 d, bone trabecular morphology and number were increased in mice of Cistanche extract high dose group, low dose group, Fosamax group, and the immunohistochemical indicators (IL- 1β , TNF- α) showed that the cytoplasm expression levels of osteoblasts, osteoclasts and bone marrow stromal cells on the bone trabecular surface were decreased in different degree. There was significant difference in cells count with IL- 1β , and TNF- α positive expression as compared with the model ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xinjiang Cistanches Herba extract achieves anti-osteoporosis effect in M-KOOPG mice by reducing the positive expression levels of IL- 1β and TNF- α .

[Key words] Xinjiang Cistanches Herba extract; M-KOOPG mice; interleukin- 1β ; tumor necrosis factor- α

[收稿日期] 20150209(016)

[基金项目] 新疆医学动物模型研究重点实验室开放课题(201207)

[第一作者] 罗德梅,副主任检验师,从事风湿免疫病和自身抗体检测及研究, Tel:0991-4366136, E-mail:892006411@qq.com

[通讯作者] * 罗莉,硕士,主任医师,教授,从事风湿免疫病基础与临床研究, Tel:0991-4366297, E-mail:luoli@163.com

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少, 骨组织微观结构退化为特征的, 致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性代谢性骨骼疾病^[1]。该病可见于不同性别和年龄, 但多见于绝经后妇女和老年男性。目前临床上对于 OP 的治疗尚无理想的方法, 西药防治多采用维生素 D、钙剂、雌激素、降钙素和氟制剂等, 虽有一定疗效, 但副作用多、费用昂贵, 中药防治 OP 的研究越来越受重视且充满前景。中医认为, 肾虚是导致 OP 的主要病因, 补肾疗法也历来被作为治疗 OP 的主要疗法, 许多传统的补肾方药防治 OP 有着明显疗效。现代药理研究表明补肾方药可以通过调节下丘脑-垂体多个靶腺轴, 促进成骨细胞增殖分化、抑制破骨细胞增殖分化、促进碱性磷酸酶活性以及影响细胞因子的分泌达到防治骨质疏松的目的^[2]。肉苁蓉是列当科 (Orobanchaceae) 肉苁蓉属 (*Cistanche*) 植物肉苁蓉干燥带鳞叶的肉质茎, 又名地精、金笋、苁蓉、大芸, 主产于我国新疆、内蒙古、甘肃和宁夏一带^[3]。陈亚琼等^[4]发现肉苁蓉药理作用具有补肾、强筋骨的作用, 与骨代谢密切相关, 并在神经系统和内分泌系统的调节作用等方面都显示了一定的活性, 与雌激素增强成骨作用相似; 何伟等^[5]发现肉苁蓉中苯乙醇总苷、麦角甾苷、甜菜碱均具有雄激素样促进蛋白质合成, 促进骨基质增加及钙磷沉积的作用; 曾建春等^[6]发现肉苁蓉含药血清具有促进 BMSCs 增殖和诱导 BMSCs 向成骨分化的作用。目前骨质疏松研究常用的动物为大鼠、山羊等, 最常用的造模方法为切除大鼠双侧卵巢模型^[7-9]。骨保护素 (osteoprotegerin, OPG), 又称为破骨细胞生成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF), 对破骨细胞生成具有重要的调控作用。M-KOOPG 骨质疏松小鼠是在小鼠胚胎干细胞上以同源重组方式造成内源 OPG 基因序列部分缺失, 进而通过胚胎干细胞的囊胚腔注射以及小鼠育种工作获得了 OPG 基因敲除小鼠, OPG 基因敲除小鼠由于破骨细胞生成过多, 具有典型的骨质疏松症, 相对于其他各种诱导因素导致的继发性骨质疏松动物模型, 具有全身骨质疏松发生情况稳定、动物本身未受外界干预等优点, 是一种良好的原发性骨质疏松动物模型, 是在整体动物水平研究骨质疏松症的理想动物模型。本研究采用新疆医学动物模型重点实验室成功引进的 M-KOOPG 骨质疏松小鼠模型, 观察新疆肉苁蓉提取物不同剂量对 M-KOOPG 小鼠的骨组织中白细胞介素-1 (IL-1), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的定位及

表达情况, 探讨新疆肉苁蓉抗骨质疏松作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 40 只雌性 M-KOOPG 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 8 周龄, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (新) 2013-0003。

1.2 药物及试剂 新疆肉苁蓉由新疆名医药与特色方剂学重点实验室的田树革教授鉴定为新疆荒漠肉苁蓉的干燥带鳞叶的肉质茎, 新疆肉苁蓉提取液制备: 取干燥新疆肉苁蓉 1 923 g, 经蒸馏水 3 次干燥浓缩提取, 得肉苁蓉提取物药品质量浓度为 1 000 g·L⁻¹, 福善美 (阿伦磷酸钠片, 美国默沙东公司, 批号 K006700), IL-1 β , TNF- α 一抗、二抗 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 165112, 165112, 165113), 脱钙液, pV 二步法免疫组化检测试剂, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 及抗体稀释液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 1392112, K137723D, ZLI-9062, WP133314A-2)。

1.3 仪器 RM2135 型切片机和 DM3000 型显微照相机 (德国 Leica 公司), YS100 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司), SLI-700 型孵育温箱 (日本 Eyela 公司), BGZ-30 型数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

2 方法

2.1 分组与用药 将 40 只雌性 M-KOOPG 小鼠随机分成 4 组, 每组各 10 只, 分别是肉苁蓉提取液高剂量组, 给予 10 g·kg⁻¹·d⁻¹; 肉苁蓉提取液低剂量组, 给予 5 g·kg⁻¹·d⁻¹; 福善美组, 给予福善美与灭菌纯水混合制成悬浊液每周给药 1 次 10 mg·kg⁻¹; 模型组给予生理盐水。各组均予以每次 ig 给药 0.2 mL, 分别持续 30, 60 d。

2.2 样本收集 各组动物均在同样环境及饮食条件下喂养, 分别于喂药 30, 60 d 各组分别处死 5 只小鼠。处死后取 OPG 小鼠左侧股骨, 放置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 24 h 后置于脱钙液中, 放于 4 °C 恒温冰箱, 每周更换 1 次, 待用手捏骨柔软有弹性, 针可轻易刺入时停止脱钙 (约 30 ~ 35 d)。将脱钙标本以 PBS 充分漂洗, 再进行脱水、石蜡包埋, 制备 4 μ m 切片。

2.3 苏木素-伊红 (HE) 染色 石蜡切片置于干净防脱载玻片上, 60 °C 烤片机烤片过夜; 取出烤片后立即放入二甲苯 I 5 min, 二甲苯 II 10 min, 无水乙醇, 95% 乙醇 I, 95% 乙醇 II, 80% 乙醇各 5 s, 自来水冲洗 1 遍, 蒸馏水冲洗 1 遍; 浸入苏木素染色 5 min, 自来水冲洗 5 min; 伊红染色 5 min, 自来水冲洗 5 min。脱水透明后, 中性树胶封片。

2.4 免疫组化方法 石蜡切片脱蜡、水化;去除内源性过氧化酶,用 PBS 配置新鲜的 3% 双氧水,室温 10 min,蒸馏水,PBS 洗液依次洗 4 min;对组织切片进行预处理,滴加一抗体,置于 4 °C 冰箱过夜后,PBS 洗 4 min × 3 次;滴加二抗,37 °C 温箱孵育 25 min,PBS 洗 4 min × 3 次;新鲜配置 DAB 显色 3 ~ 10 min,显微镜下观察,如有阳性着色,自来水终止显色;苏木素复染 5 min,蒸馏水洗,盐酸乙醇分化,温水中返蓝 1 min;脱水透明后,中性树脂封片。

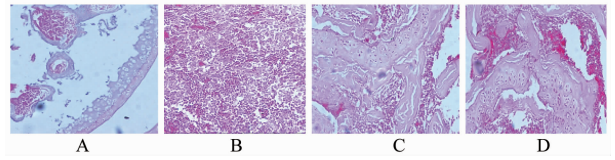
2.5 免疫组化结果观察 实验以已知阳性染色的切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作阴性对照。每张切片计数 5 个高倍镜视野的阳性细胞数,取其均数。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件统计分析处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析方法,组间差异用 SNK 法分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对股骨组织病理学的影响 常规钙病理切片来看,模型组骨皮质薄,骨小梁数量稀疏,骨髓腔中骨髓数量也较少,空白区域较大,骨髓腔因之显得较空旷。给药 30 d 肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组与模型组比较,骨小梁宽度、数目和骨皮质均稍有增加,但改善不显著;给药 60 d 后肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组骨小梁宽度增加、数目增多,骨皮质增厚,网状结构基本完整,与模型组比较改善较明显,且肉苁蓉提取液高剂量组骨小梁分布较广泛,与模型组比较骨微环境有较明显的改善;肉苁蓉提取液低剂量组骨小梁的分布、数量、宽度和骨髓腔中的骨髓细胞改善均不如高剂量组。见图 1。

3.2 对股骨组织中的 IL-1 β , TNF- α 表达的影响



A. 模型组;B. 福善美组;C. 肉苁蓉提取液 10 g·kg⁻¹组;D. 肉苁蓉提取液 5 g·kg⁻¹组

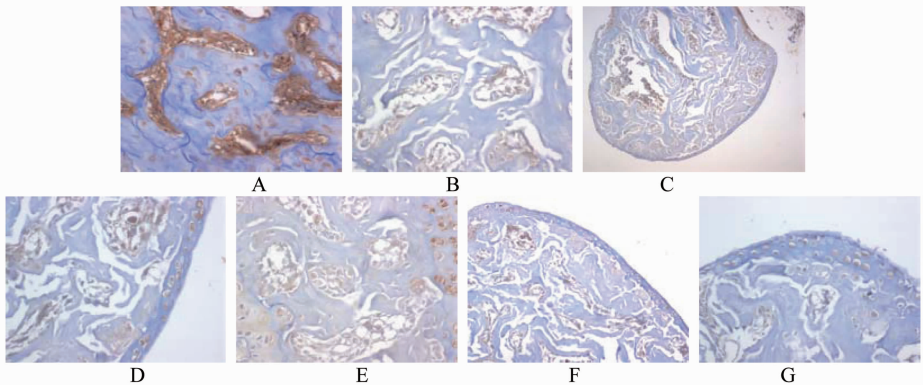
图 1 肉苁蓉提取液对股骨组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effects of Cistanches Herba extracts on bone tissue pathology structures (HE, ×200)

响 IL-1 β , TNF- α 在 M-KOOPG 小鼠的骨小梁及骨髓腔中分布相似,主要位于骨小梁周围的成骨细胞、破骨细胞、骨髓基质细胞的细胞浆中,阳性表达区域呈棕黄色,模型组呈强阳性表达。给药 30 d 后,肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组及模型组 IL-1 β , TNF- α 在骨小梁表面的成骨细胞、破骨细胞及骨髓基质细胞的细胞浆中呈较明显阳性表达,同时 IL-1 β , TNF- α 在该组关节软骨移行带软骨细胞的胞浆、胞核中也有较强的表达。给药 60 d 后,肉苁蓉提取液高、低剂量组和福善美组较模型组中骨小梁周边及骨髓腔中的 IL-1 β , TNF- α 阳性信号细胞数明显减少,且染色较浅淡。见图 2,3。给药 30 d 后,肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组的 IL-1 β , TNF- α 阳性表达均有降低,与模型组比较均无统计学差异;给药 60 d 后,肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组与模型组比较,IL-1 β , TNF- α 阳性表达的细胞数均有明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且肉苁蓉提取液高、低剂量组与福善美组比较,IL-1 β , TNF- α 阳性表达无统计学差异。见表 1。

4 讨论

骨质疏松发病主要是由环境和遗传等多因素所致的骨重建过程中骨吸收和骨形成失衡,即由破骨



A. 模型组;B. 30 d 肉苁蓉提取液 10 g·kg⁻¹组;C. 30 d 肉苁蓉提取液 5 g·kg⁻¹组;D. 30 d 福善美组;E. 60 d 肉苁蓉提取液 10 g·kg⁻¹组;F. 60 d 肉苁蓉提取液 5 g·kg⁻¹组;G. 60 d 福善美组(图 3 同)

图 2 肉苁蓉提取液对股骨组织中的 IL-1 β 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig.2 Effect of Cistanches Herba extract femur tissue IL-1 β expression of protein (IHC, ×200)

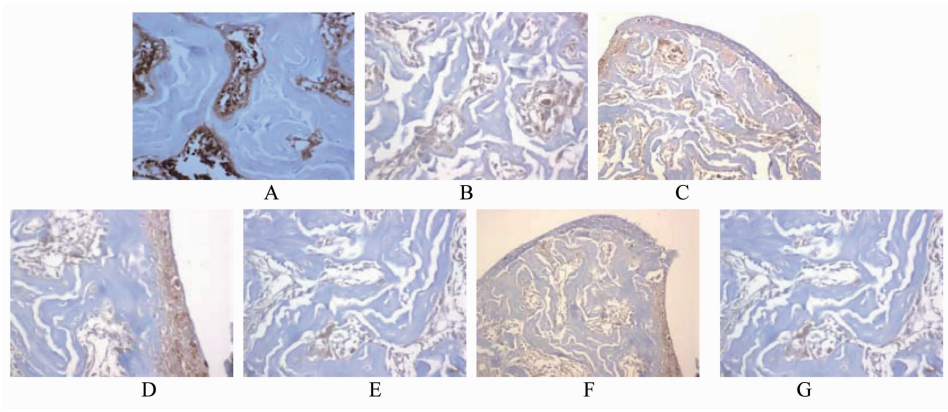


图 3 肉苁蓉提取液对股骨组织中的 TNF- α 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Cistanches Herba extract femur tissue TNF- α expression of protein (IHC, $\times 200$)

表 1 肉苁蓉提取液对股骨组织中的 IL-1 β , TNF- α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Cistanches Herba extract femur tissue IL-1 β , TNF- α expression of protein ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IL-1 β		TNF- α	
		30 d	60 d	30 d	60 d
模型	-	155.47 \pm 2.33	157.54 \pm 2.07	153.79 \pm 2.64	153.69 \pm 2.34
福善美	0.01	151.59 \pm 1.72	144.59 \pm 1.63 ¹⁾	146.49 \pm 1.75	142.59 \pm 1.65 ¹⁾
肉苁蓉提取液	10	145.83 \pm 2.02	141.83 \pm 1.12 ¹⁾	147.83 \pm 1.54	142.84 \pm 1.14 ¹⁾
	5	147.68 \pm 2.42	143.37 \pm 2.01 ¹⁾	149.63 \pm 1.60	142.53 \pm 1.40 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

细胞(OC)和成骨细胞(OB)介导、多种细胞因子和信号分子共同参与的骨吸收与形成紊乱。骨微环境中的多种细胞因子也参与其中,尤以 IL-1, TNF- α 对其作用较强。IL-1, IL-6, TNF- α 等细胞因子直接或间接地作用于 OC 前体,诱导其分化为成熟 OC,促进骨吸收,导致骨质疏松发生^[10-11]。IL-1 是一种促进骨吸收的炎性细胞因子,与骨质疏松、类风湿性关节炎、牙周炎的骨质破坏有关,可以直接诱导 OC 单核前体细胞融合,通过核因子- κ B 受体活化因子配基(RANKL)促进破骨细胞分化,促进骨吸收。研究表明, TNF- α 可以直接诱导破骨细胞分化并刺激其活性从而在骨代谢中发挥重要作用,还能通过影响 OPG/RANKL/RANK 信号系统,以旁分泌形式调节破骨细胞活化,刺激骨吸收,证实 TNF- α 通过多种途径参与骨代谢过程;又是强有力的促进骨吸收的细胞因子^[12-13]。

传统中医认为,肾主骨、生髓,并认识到“肾”与骨存在着密切的内部联系,即所谓的“肾藏精,精生髓,髓藏于骨中,滋养骨骼”。研究表明,补肾中药可能通过启动 Smad3 mRNA 表达而上调 VDR mRNA 表达,从而促进骨形成;补肾中药可以上调骨髓微环境中 Smad 基因表达水平,可能是其促骨形

成、修复骨损伤作用的分子机制之一^[14]。卞琴等^[15]观察 3 种补肾代表中药淫羊藿、补骨脂、女贞子各自有效成分淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸对去卵巢 3 个月大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的调控作用,认为补肾中药可能从增加 BMSCs 细胞外基质、促进生长因子相关信号通路、增加蛋白质合成等方面发挥促进 BMSCs 成骨分化的作用,最终实现治疗骨质疏松的疗效,但其确切的机制还有待深入研究。现代药理研究证实,肉苁蓉药理作用具有补肾、强筋骨的作用,并对神经系统和内分泌系统具有调节作用,与骨代谢密切相关。福善美属于双磷酸盐类药物,主要通过抑制破骨细胞介导的骨吸收达到抗骨质疏松作用,为近年来防治骨质疏松的一线用药,其较好的临床疗效得到了国内外肯定。本研究显示连续给药 60 d,肉苁蓉提取液高、低剂量组、福善美组小鼠 HE 染色显示骨小梁宽度增加、数目增多、断裂减少,骨皮质增厚,与模型组比较有显著性差异;免疫组化指标 IL-1 β , TNF- α 阳性表达细胞数与模型组比较均有显著性差异;IL-1 β , TNF- α 显示在骨小梁表面的成骨细胞、破骨细胞及骨髓基质细胞的细胞浆表达呈不同程度降低,这提示 IL-1 β , TNF- α 通过自分泌及旁分泌的形式作用于骨形成及

骨吸收,这与国内范红斌等^[16]报道一致。肉苁蓉提取液高剂量组与福善美组比较无显著性差异,提示肉苁蓉提取液与福善美具有相似的抗骨质疏松作用。

本研究还发现肉苁蓉提取液的抗骨质疏松作用存在时间依赖性,小鼠喂药30 d后,4组间的骨小梁数目及IL-1 β ,TNF- α 阳性表达细胞数差异无统计学意义;给药60 d后,实验组、对照组与模型组骨小梁及IL-1 β ,TNF- α 阳性表达细胞数差异有统计学意义。病理观察也表明,给药60 d后,肉苁蓉提取物能改善骨小梁结构,高剂量组改善明显。因而,肉苁蓉能改善骨质疏松小鼠的病变。说明肉苁蓉提取液治疗时间至少应超过1个月,而这种连续长时间治疗与福善美也是一致的。新疆肉苁蓉在新疆具有丰富的资源,长期的临床应用中,未见新疆肉苁蓉的不良反应,其有着广阔的药用前景,此次实验为新疆肉苁蓉提取液在今后临床应用提供了理论依据及实验基础。

[参考文献]

[1] Zhao Q, Shao J, Chen W, et al. Osteoclast differentiation and gene regulation [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 2519-2529.

[2] 宋芳婷,李冬梅. 补肾中药抗骨质疏松机理研究进展[J]. *黑龙江中医药*, 2013, 41(1): 55-56.

[3] 雷丽,朱志宏,屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的化学成分研究进展[J]. *中草药*, 2003, 34(5): 473.

[4] 陈亚琼,叶雪清,李桂云,等. 补肾中药对雌性大鼠性腺轴形态和功能的影响[J]. *第四军医大学学报*, 1995, 16(4): 304.

[5] 何伟,宗桂珍,武桂兰,等. 肉苁蓉中雄性激素样作用活性成分的初探[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(9): 564.

[6] 曾建春,樊粤光,刘建仁,等. 肉苁蓉含药血清诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. 中

国骨伤, 2010, 23(8): 606-608.

[7] Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(3): 610-615.

[8] Bucay N, Sarosi I, Dunstan C R, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(9): 1260-1268.

[9] 程少丹,王拥军,唐德志,等. OPG基因敲除小鼠骨质疏松情况的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(1): 16-19.

[10] 孙婵,王凌,李大金. 细胞因子对破骨细胞生物学功能的团块作用[J]. *现代免疫学*, 2008, 28(3): 261-265.

[11] Tanabe N, Maeno M, Suzuki N, et al. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts [J]. *Life Sci*, 2005, 77(6): 615-626.

[12] 孙嗣国,马保安,周勇,等. 肿瘤坏死因子- α 诱导外周单核细胞分化为破骨细胞[J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(5): 1988-1991.

[13] 任莉,裘松波,谭颖徽,等. TNF- α 对人牙周膜成纤维细胞RANKL/OPG mRNA表达的影响[J]. *重庆医学*, 2007, 36(6): 502-504.

[14] 任树军,邢国利,葛明富,等. 补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠小肠中VDR-mRNA表达影响的研究[J]. *中医药信息*, 2013, 30(2): 46-49.

[15] 卞琴,黄建华,杨铸,等. 三种补肾中药有效成分对皮质酮致骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞基因表达谱的作用[J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(2): 179-185.

[16] 范红斌,王全平. 老年骨质疏松症患者腰椎白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 的免疫组化研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2001, 20(4): 259-262.

[责任编辑 周冰冰]