

· 药理 ·

鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松症大鼠 骨组织的作用及其机制

龚伟^{1,2}, 郑洪新^{1*}, 杨鹤祥^{2*}, 李峰¹, 曲雷鸣², 刘威¹

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:** 考察鹿茸不同组分对去卵巢所致骨质疏松症大鼠骨组织的影响及作用机制, 明确鹿茸健骨作用的主要物质基础, 并探讨其健骨作用的机制。**方法:** 雌性 SD 大鼠 56 只, 随机分为 7 组, 分别为正常组, 模型组, 仙灵骨葆组 (468 mg·kg⁻¹), 补佳乐组 (80 mg·kg⁻¹), 鹿茸多糖组 (50 mg·kg⁻¹), 鹿茸多肽组 (175 mg·kg⁻¹), 鹿茸多糖多肽组 (50 mg·kg⁻¹ + 175 mg·kg⁻¹)。采用切除大鼠双侧卵巢的方法复制骨质疏松症模型, 连续给药 12 周后, 采用骨密度仪检测大鼠骨密度, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测各组大鼠骨组织中骨源性碱性磷酸酶 (BALP), 骨钙素 (OT), 骨形成蛋白-2 (BMP-2), Smad1, Smad5, Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 等指标活性; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 及蛋白的表达水平。苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠骨组织进行形态学变化。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠骨密度明显降低 ($P < 0.05$), 骨组织中 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 活性明显降低 ($P < 0.05$), 骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 及蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 骨组织结构破坏; 与模型组比较, 鹿茸多糖组、鹿茸多肽组、鹿茸多糖多肽组可明显提高去卵巢大鼠骨密度 ($P < 0.05$), 促进骨组织中 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 活性 ($P < 0.05$); 上调骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05$), 预防骨组织破坏。**结论:** 鹿茸不同组分对去卵巢所致的大鼠骨质疏松症均有治疗作用, 其作用可能是与上调 BMP-2/Smad1, Smad5/Runx2 信号通路有关。

[关键词] 鹿茸多糖; 鹿茸多肽; 骨质疏松

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0036-07

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20192003

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190705.1305.004.html>

[网络出版时间] 2019-07-08 09:28

Effect and Mechanism of Pilose Antler Different Components on Bone Tissue of Ovariectomized Osteoporosis Model Rats

GONG Wei^{1,2}, ZHENG Hong-xin^{1*}, YANG Dong-xiang^{2*}, LI Feng¹, QU Lei-ming², LIU Wei¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of pilose antler different components on the bone tissue of ovariectomized osteoporosis model rats and ascertain the material basis of pilose antler. **Method:** fifty-six SD rats were divided randomly into seven groups: normal group, model group, Xianling Gubao group (468 mg·kg⁻¹), Bujiale group (80 mg·kg⁻¹), polysaccharide group (50 mg·kg⁻¹), polypeptides group

[收稿日期] 20190325(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473314);辽宁省自然科学基金项目(20170540606)

[第一作者] 龚伟, 博士, 副主任药师, 从事药材品质研究, E-mail: iamgongwei@163.com

[通信作者] * 郑洪新, 教授, 博士生导师, 博士, 从事中医病因病机机制论研究, E-mail: zhenghx2002@126.com;

* 杨鹤祥, 教授, 硕士生导师, 博士, 从事中医骨伤科学研究, E-mail: 15940228896@163.com

($175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), polysaccharide and polypeptide mixture group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Osteoporosis mode was established through ovary resection of female rats, meanwhile, the rats were given different components of pilose antler for consecutively 12 weeks. Subsequently, using absorptiometry to measure the rats' bone mass density. The activities of bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OT), bone morphogenetic protein2 (BMP-2), Smad1, Smad5, Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). The expression of BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 protein was examined by Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Morphological assay for bone tissue were detected by htoxylin eosin (HE) staining. **Result:** After 12 weeks, Compared with the normal group, the osteoporosis model group showed significantly decrease in bone mineral density ($P < 0.05$), and bone BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 content ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression of BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 in bone were significantly decrease ($P < 0.05$). Bone tissue was destroyed. Compared with the osteoporosis model group, different components of pilose antler could significantly improve the activities of BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 and bone mineral density in bone, and up-regulate the mRNA and protein expression of BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2. Bone structure is repaired. **Conclusion:** Pilose antler different components has therapeutic effect on ovariectomized osteoporosis model rats. The mechanism may be related to up-regulat the expression of BMP-2/Smad1, Smad5/Runx2 signal pathways.

[**Key words**] pilose antler polysaccharides; pilose antler polypeptide; osteoporosis

鹿茸为传统名贵中药,具有“壮肾阳、益精血、强筋骨”等功效,常用于治疗肾阳不足、精血亏虚、阳痿滑精、宫冷不孕、羸瘦、神疲、畏寒、眩晕、耳鸣、耳聋、腰脊冷痛、筋骨痿软、崩漏带下、阴疽不敛等症^[1]。古籍中以鹿茸组方应用也较多,如鹿茸散治漏下不止、茯苓丸治肾虚耳聋或风邪入于筋络、耳内虚鸣、鹿茸酒治疗阳痿、小便频数等^[2]。绝经后骨质疏松多因雌激素缺乏引起的骨代谢紊乱性疾病,表现为骨转换率升高、骨密度降低、骨脆性增加,容易引发骨折。骨质疏松属于中医的“骨痿”“骨痹”“腰痛”等范畴,肾虚是骨质疏松发病的主要原因,防治重在补肾。作为传统补肾健骨中药,鹿茸常用于治疗肾虚骨质疏松症。现代研究表明,鹿茸能显著提高去卵巢大鼠血清中碱性磷酸酶(ALP),骨形成蛋白-2(BMP-2),骨钙素(BGP)含量,提高去卵巢大鼠的骨密度^[3],若能明确鹿茸补肾健骨的药效物质基础,进而提取出有效成分直接用药或加入复方,可以在节约资源的同时取得更好的疗效。本课题以鹿茸具有补肾健骨功效为研究依据,探讨鹿茸中总多肽、总多糖类成分对去卵巢骨质疏松症模型大鼠的影响,明确鹿茸“补肾健骨”的物质基础,为鹿茸药效物质研究提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠56只,雌性,未交配,体质量200~220g,购于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2015-0001。本研究所涉及的

动物相关操作均在辽宁中医药大学动物伦理委员会的批准下进行(批准号2017002)。

1.2 药物及试剂 鹿茸多肽、鹿茸多糖均由辽宁中医药大学李峰教授提供、鉴定,鹿茸多肽、鹿茸多糖均由同批鹿茸药材提取。中药仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号160709)和西药补佳乐(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号287A),大鼠骨源性碱性磷酸酶(BALP),大鼠BMP-2,大鼠骨钙素(OT),大鼠Smad1,大鼠Smad5,大鼠RUNT相关转录因子2(Runx2)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海联硕生物科技有限公司,批号分别为201706,201706,201706,201706,201706,201706);trizol(美国Invitrogen公司,批号47358);PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒,SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus) ROX plus试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为DRR047A,RR820A);一抗BMP-2抗体,Runx2抗体,Smad1抗体,Smad5抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,二抗辣根标记抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国Cell Signaling公司,批号分别为13073,6944,12534,12556,196731,14357);Western一抗稀释液,SDS-PAGE电泳液,BCA蛋白浓度测定试剂盒,Western及IP细胞裂解液,PMSF,SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒,SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6×),ECL Plus超敏ECL化学发光试剂盒,Western转膜液,显影定影试剂盒,Western封闭液,Western洗涤液

(10 ×), Western 二抗稀释液 SDS-PAGE 电泳液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012, P0013, P0012AC, P0014B, P0015F, P0018, P0021B, P0019, P0023B, P0023A, P0023C6, P0023D, FFN02);伊红染色液,苏木素染色液(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 Y13MC2,20121211)。

1.3 仪器 Stratagene Mx3000 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国安捷伦公司);DU640 型蛋白核酸分析仪(美国贝克曼公司);MR1822 型低温高速离心机(法国 Jouan SA 公司);DYY-12 型电泳仪,WD-9405B 型水平摇床,DYCZ-24D 型垂直电泳槽,DYCP-40C 型转移电泳仪(北京市六一仪器厂);XR-36 型双能骨密度仪(美国 North-Land 公司);BL1500 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Infinite M2000 型多功能酶标仪(奥地利 Tecan 公司);CK40-F200 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);RM2235 型石蜡切片机(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 大鼠适应环境 7 d 后,按体质量随机分为 7 组,分别为正常组(蒸馏水)、模型组(去卵巢 + 蒸馏水)、鹿茸多糖组(去卵巢 + 鹿茸多糖)、鹿茸多肽组(去卵巢 + 鹿茸多肽)、鹿茸多肽多糖组(去卵巢 + 鹿茸多肽 + 鹿茸多糖)、仙灵骨葆组(去卵巢 + 仙灵骨葆胶囊)、补佳乐组(去卵巢 + 补佳乐)。大鼠肌肉注射 10% 水合氯醛,3.5 mL·kg⁻¹体质量,麻醉,从腰背部脊柱两侧做纵行切口切开皮肤及肌肉,摘除两侧卵巢,关闭创口,术后肌肉注射青霉素 1.6 mL·kg⁻¹(80 万 U/4 mL 生理盐水),连续注射 3 d^[4],所有大鼠自由摄食饮水。

2.2 给药方法 实验用药分别加水制成溶液,浓度分别为仙灵骨葆胶囊 46.8 g·L⁻¹溶液,补佳乐 8 g·L⁻¹溶液,鹿茸多肽按提取比例制成 17.5 g·L⁻¹溶液,鹿茸多糖按提取比例制成 5 g·L⁻¹溶液、鹿茸多糖多肽溶液均提取比例分别加水制成 17.5 g·L⁻¹ + 5 g·L⁻¹,术后 7 d 开始给药,剂量按大鼠体表面积折算确定,每日上午灌胃 1 次,每 100 g 体质量给药 1 mL,连续给药 12 周,正常组与模型组灌胃等体积蒸馏水。实验期间,各组大鼠每周称质量 1 次,并根据体质量变化调整给药剂量。连续给药 12 周后,腹主动脉采血并解剖取材,取大鼠右后肢全股骨(4 个),生理盐水冲洗后,用浸泡过生理盐水的医用纱布包裹,置冰箱冻存,大鼠左后肢股骨

(4 个)置入 10% 中性甲醛溶液固定;取大鼠左后肢股骨置于无菌离心管中, -70 °C 保存。

2.3 骨代谢生化指标检测 取 -70 °C 保存的大鼠左后肢部分股骨(不含股骨头),将股骨打碎后称重,与一定比例生理盐水共同置组织研磨器中,在冰水浴中进行研磨,制成 10% 的骨组织匀浆液,静止后离心,取上清液, -70 °C 保存。采用 ELISA 对骨组织 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 进行检测,实验步骤按试剂盒说明进行操作。

2.4 骨密度检测 应用 XR-36 型双能骨密度仪及其所附带的“The Small Subject Scout Scan”软件检测,测定大鼠离体股骨的骨密度(BMD),骨密度自动计算。骨密度值采用单位面积内的骨矿物质含量表示(g·cm⁻²)。

2.5 Real-time PCR 检测骨组织中相关基因的表达

取 -70 °C 保存的大鼠左后肢部分股骨 100 mg,剪碎,按 trizol 试剂盒说明书操作,提取总 RNA。使用 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒,按说明书操作将 RNA 反转录成 cDNA(37 °C 15 min,85 °C 5 s)。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus),ROX plus 试剂盒操作进行 DNA 扩增。反应条件为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 1 min 后采集荧光信号,重复 40 个循环;在循环反应后,按以下条件测溶解曲线。95 °C 15 s,55 °C 1 min,95 °C 30 s。在 55 °C 升温至 95 °C 过程中,每升高 0.5 °C 采集 1 次荧光信号)。以 β-actin 为内参,所用引物均委托 TaKaRa(大连)公司根据 Gene Bank 所发布的序列设计并合成,基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
BMP-2	上游 CTGCGGTCTCCTAAAGGTCG	180
	下游 ACTCAAACCTCGCTGAGGACC	
Smad1	上游 GCAGTTGCTTACGAGGAACC	223
	下游 GGTGGACTCCTTTCCCGATG	
Smad5	上游 AGCAGAGATGTTTCAGCCTGT	213
	下游 GCCTGGTGTCTCGATGGTT	
Runx2	上游 GCCTTCAAGGTTGTAGCCCT	178
	下游 TGAAACTCTTGCCCTCGTCCG	
β-actin	上游 CGCGAGTACAACCTTCTTGC	70
	下游 CGTCATCCATGGCGAACTGG	

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织中相关蛋白的表达 取大鼠左后肢股骨(带股骨头部

分) 100 mg, 分别加入 Western 及 IP 细胞裂解液 500 μL 和磷酸酶抑制剂 50 μL 裂解组织。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 提取组织总蛋白, 经 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白 30 μg , 上样到 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(浓缩胶为 80 V, 0.5 h; 分离胶为 120 V, 1 h), 转膜(90 V, 40 min)。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 兔来源 Actb, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 抗体, 加入一抗孵育, 一抗按 1:3 000 稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 过夜。洗膜后孵育辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗, 二抗按 1:5 000 稀释, 室温孵育 1 h。ECL 染色, 胶片曝光 4 min, 显影 2 min, 定影 2 min。胶片扫描后, 使用 Image Pro Plus 6.0 软件测定灰度值(以 β -actin 内参为基准)每个数据测定 3 次, 取平均值。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察骨形态学变化
取大鼠左后肢全股骨(每组 4 个), 置入 10% 中性甲醛溶液固定, 经 10% EDTA-Na 缓冲液(pH7.4, 4 $^{\circ}\text{C}$) 脱钙完全后, 梯度乙醇脱水, 纵向石蜡包埋, 5 μm 连

续切片, HE 染色, 光学显微镜下进行病理观察。

2.8 统计学处理 实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨代谢生化指标的影响 与正常组比较, 模型组大鼠骨组织中 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 水平明显下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 鹿茸多糖能明显升高去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中成骨细胞标志 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 水平($P < 0.05$); 鹿茸多糖能明显升高去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中成骨细胞标志 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 水平($P < 0.05$); 鹿茸多糖多肽能明显升高去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中成骨细胞标志 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 水平($P < 0.05$), 其作用明显优于鹿茸多糖组及鹿茸多肽组。见表 2。

表 2 鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中 BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of pilose antler different components on bone tissue BALP, OT, BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 levels in ovariectomized osteoporosis model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	BALP	OT	BMP-2	Smad1	Smad5	Runx2
正常	-	144.15 \pm 4.45	127.21 \pm 3.39	132.31 \pm 4.66	128.45 \pm 35.62	175.59 \pm 2.09	159.25 \pm 2.19
模型	-	93.26 \pm 5.12 ¹⁾	89.06 \pm 2.22 ¹⁾	73.04 \pm 4.41 ¹⁾	69.79 \pm 20.34 ¹⁾	94.87 \pm 1.59 ¹⁾	83.07 \pm 1.88 ¹⁾
仙灵骨葆	468	125.91 \pm 3.03 ²⁾	115.05 \pm 2.38 ^{1,2)}	132.49 \pm 2.77 ²⁾	106.12 \pm 10.43 ²⁾	126.41 \pm 3.68 ²⁾	110.03 \pm 2.50 ²⁾
补佳乐	80	101.46 \pm 2.95 ²⁾	92.29 \pm 1.13 ²⁾	91.42 \pm 2.18 ²⁾	97.26 \pm 20.61 ²⁾	111.54 \pm 3.99 ²⁾	102.93 \pm 1.98 ²⁾
鹿茸多糖	50	93.07 \pm 5.55	87.56 \pm 2.41	84.85 \pm 1.49 ²⁾	88.81 \pm 9.94 ²⁾	103.37 \pm 3.72 ²⁾	91.75 \pm 4.71 ²⁾
鹿茸多肽	175	104.30 \pm 3.76 ²⁾	96.47 \pm 1.73 ²⁾	91.78 \pm 2.16 ²⁾	99.78 \pm 9.93 ²⁾	115.48 \pm 4.34 ²⁾	87.29 \pm 2.51 ²⁾
鹿茸多糖多肽	50 + 175	123.16 \pm 2.44 ²⁾	115.54 \pm 2.01 ²⁾	115.38 \pm 3.09 ²⁾	142.42 \pm 15.48 ²⁾	165.58 \pm 4.28 ²⁾	151.07 \pm 3.22 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 对去卵巢骨质疏松症模型大鼠股骨 BMD 的影响 与正常组比较, 模型组的 BMD 明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 连续给予大鼠不同鹿茸提取物 12 周后, 鹿茸多糖组、鹿茸多肽组、鹿茸多糖多肽组大鼠 BMD 均明显提高($P < 0.05$), 且多糖多肽共同作用最为明显。见表 3。

3.3 对去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 表达明显下降($P < 0.05$); 与模型组比

较, 鹿茸多肽能明显上调去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 表达, 鹿茸多糖能明显上调去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中 BMP-2, Smad5, Runx2 mRNA 表达($P < 0.05$); 鹿茸多糖多肽组大鼠骨组织 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 表达($P < 0.05$), 与多糖组和多肽组比较, 作用更为明显。见表 4。

3.4 对去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 蛋白的影响 与正常组比较, 模型组骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2

表 3 鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of pilose antler different components on bone mineral density in ovariectomized osteoporosis model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BMD/g·cm ⁻²
正常	-	0.30 ± 0.02
模型	-	0.24 ± 0.07 ¹⁾
仙灵骨葆	468	0.34 ± 0.06 ²⁾
补佳乐	80	0.27 ± 0.08 ²⁾
鹿茸多糖	50	0.34 ± 0.02 ²⁾
鹿茸多肽	175	0.34 ± 0.02 ²⁾
鹿茸多糖多肽	50 + 175	0.37 ± 0.02 ²⁾

表 4 鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of pilose antler different components on BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 mRNA expression in bone tissue of ovariectomized osteoporosis model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BMP-2	Smad1	Smad5	Runx2
正常	-	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
模型	-	0.51 ± 0.05 ¹⁾	0.55 ± 0.07 ¹⁾	0.40 ± 0.03 ¹⁾	0.44 ± 0.05 ¹⁾
仙灵骨葆	468	0.90 ± 0.05 ²⁾	0.72 ± 0.08 ²⁾	0.66 ± 0.04 ²⁾	0.64 ± 0.04 ²⁾
补佳乐	80	0.63 ± 0.05 ²⁾	0.56 ± 0.09	0.54 ± 0.04 ²⁾	0.50 ± 0.02 ²⁾
鹿茸多糖	50	0.62 ± 0.04 ²⁾	0.59 ± 0.07	0.50 ± 0.03 ²⁾	0.53 ± 0.03 ²⁾
鹿茸多肽	175	0.73 ± 0.04 ²⁾	0.74 ± 0.06 ²⁾	0.65 ± 0.03 ²⁾	0.57 ± 0.04 ²⁾
鹿茸多糖多肽	50 + 175	0.93 ± 0.03 ²⁾	0.97 ± 0.11 ²⁾	0.89 ± 0.04 ²⁾	0.91 ± 0.03 ²⁾

表 5 鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of pilose antler different components on BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 protein expression in bone tissue of ovariectomized osteoporosis model rats($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BMP-2/ β -actin	Smad1/ β -actin	Smad5/ β -actin	Runx2/ β -actin
正常	-	1.06 ± 0.06	0.88 ± 0.08	0.84 ± 0.08	0.66 ± 0.05
模型	-	0.40 ± 0.02 ¹⁾	0.26 ± 0.02 ¹⁾	0.26 ± 0.02 ¹⁾	0.21 ± 0.03 ¹⁾
仙灵骨葆	468	0.97 ± 0.06 ²⁾	0.61 ± 0.06 ²⁾	0.61 ± 0.06 ²⁾	0.38 ± 0.08 ²⁾
补佳乐	80	0.65 ± 0.08 ²⁾	0.47 ± 0.08 ²⁾	0.47 ± 0.08 ²⁾	0.33 ± 0.08 ²⁾
鹿茸多糖	50	0.64 ± 0.02 ²⁾	0.34 ± 0.02 ²⁾	0.34 ± 0.02 ²⁾	0.34 ± 0.02 ²⁾
鹿茸多肽	175	0.83 ± 0.07 ²⁾	0.54 ± 0.07 ²⁾	0.60 ± 0.07 ²⁾	0.33 ± 0.07 ²⁾
鹿茸多糖多肽	50 + 175	1.04 ± 0.02 ²⁾	0.79 ± 0.02 ²⁾	0.77 ± 0.02 ²⁾	0.56 ± 0.02 ²⁾

多肽组,可见骨小梁增厚,结构与模型组比较紧密,骨髓腔变小,骨外膜可见骨原细胞。见图 2。

4 讨论

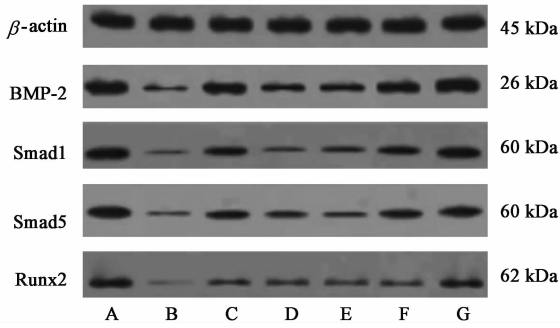
绝经后妇女骨质疏松属于高转化型骨质疏松,去卵巢建立的骨质疏松模型是研究绝经后骨质疏松的经典方法。本实验以雌性大鼠去卵巢复制更年期骨质疏松模型,结果表明模型组骨密度明显降低,造模成功。连续给予不同鹿茸提取物溶液 12 周后,各组去势大鼠骨密度明显升高,表面鹿茸多糖、鹿茸多

蛋白表达明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,鹿茸多糖、鹿茸多肽、鹿茸多糖多肽均能明显促进去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 蛋白表达($P < 0.05$),以鹿茸多糖多肽共同作用最为明显。见表 5,图 1。

3.5 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织病理形态的影响 光镜下观察大鼠股骨头切片可见,正常组骨髓腔较小,骨小梁数量较多且粗壮。形态结构完整,骨小梁有成骨细胞排列,模型组骨髓腔变大,骨小梁出现断裂,骨外膜少见骨原细胞,成骨细胞边界模糊,补佳乐组、仙灵骨葆组、鹿茸多糖组、多肽组、多糖

肽均可上调去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度,鹿茸多肽作用优于鹿茸多糖,可能与鹿茸多肽在药材中含量高于多糖,给药剂量较大有关。

在细胞增殖期,成骨细胞可分泌 BALP, BALP 是反映成骨细胞功能的重要指标^[5]。OT 由成骨细胞合成分泌,比较稳定,骨组织中 OT 水平可以反映成骨细胞状态,尤其是新形成的成骨细胞^[6],鹿茸多糖、多肽均能明显上调骨组织中 BALP, OT 的表达,鹿茸多肽作用优于鹿茸多糖,可能与鹿茸多肽在



A. 正常组; B. 模型组; C. 仙灵骨葆组; D. 补佳乐组; E. 鹿茸多糖组; F. 鹿茸多肽组; G. 鹿茸多糖多肽组(图 2 同)

图 1 各组大鼠骨组织中蛋白的表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of protein expression in different group of ovariectomized osteoporosis model rats

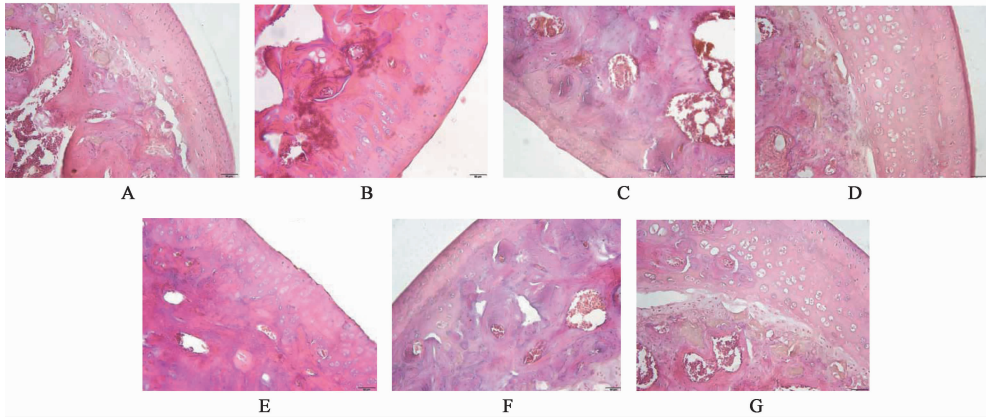


图 2 鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织病理形态的影响(HE, ×200)

Fig.2 Effect of pilose antler different components on bone tissue of pathological structures(HE, ×200)

端 P2 启动子启动 Runx2 基因,而功能性 Runx2 水平决定了骨骼成熟程度及转换率^[10]。

连续给药治疗 12 周后,鹿茸不同组分治疗组骨代谢指标,骨组织中 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 基因及蛋白水平均明显改善,鹿茸多肽对去卵巢骨质疏松症大鼠 BMP-2, Smad1, Smad5 基因及蛋白的影响高于鹿茸多糖对去卵巢骨质疏松症大鼠 BMP-2, Smad1, Smad5 的作用,但鹿茸多糖对去卵巢骨质疏松症大鼠 Runx2 基因及蛋白的作用高于鹿茸多肽对去卵巢骨质疏松症大鼠 Runx2 的作用,鹿茸多糖多肽溶液对 BMP-2, Smad1, Smad5, Runx2 的作用高于鹿茸多糖、多肽单独给药,表明鹿茸多糖、多肽不同指标基因及蛋白的影响不同,两者合用可产生协同增效作用。

鹿茸多肽、鹿茸多糖为鹿茸药材中含有的主要有效成分,刘威等^[11]研究表明,39 种不同品质鹿茸中多肽含量以总氨基酸计最低含量为 36%,鹿茸多

药材中含量高于多糖,给药剂量较大有,鹿茸多糖多肽联合给药的作用优于多肽、多糖单独给药,说明两者合用可产生协同增效作用。

BMP 是 TGF- β 家族的成员之一,与骨形成最密切相关的是 BMP-2。BMP-2 是促进骨形成和诱导成骨细胞分化的最重要细胞外信号分子之一^[7-9]。BMP-2/Smads/Runx2 信号通路是骨组织形成过程中成骨细胞分化及骨细胞外基质合成、分泌所必需的。BMP 属于激酶转导系统,体外成骨细胞过度表达 BMP-2 能够增加细胞的成骨性分化。BMP 配体-受体结合后由 II 型受体磷酸化 I 型受体细胞膜内部的富含苏氨酸-丝氨酸(GS)结构域,激活 Smads,磷酸化的 Smad1, Smad5 通过其远端 P1 启动子和近

糖含量可达 11.3%^[12],本课题基于“中药药效组分群”为研究对象,可将中药多成分的复杂性问题的思路,以鹿茸多糖、鹿茸多肽等药效组分群为研究对象,此两种物质在药材中的含量药确定大鼠的给药量,明确多糖、多肽在鹿茸药材“补肾健骨”中的贡献度,明确“药材-组分量-效”关系,以期准确锁定鹿茸“补肾健骨”药效关键组分,为鹿茸药效物质基础研究提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版,2015: 323.

[2] 王楠,高晓霞,代子彦,等. 鹿茸药效物质基础、药理作用、临床应用及质量控制的研究进展[J]. 中草药, 2017,48(22):4784-4790.

[3] 龚伟,李峰. 以鹿茸对去卵巢骨质疏松症模型大鼠的影响对不同规格鹿茸进行质量评价[J]. 中国中药杂志,2014,39(12): 2326-2329.

- [4] 瞿慧,李可强,尚德阳,等. 单体及复方中的淫羊藿苷在骨质疏松模型大鼠体内代谢及组织分布的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):135-139.
- [5] 曹广海,刘翠华,张小方,等. 健脾补肾法联合强的松对脾虚湿困型小儿肾病综合征骨代谢、尿 β_2 -MG 及 α_1 -MG 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(5):176-181.
- [6] 杨丽珍,张小静,郑杨,等. 梳早颗粒对 *N*-甲基-DL-天冬氨酸诱导性早熟大鼠血清骨钙素水平的影响[J]. 中医药信息,2014,31(2):52-54.
- [7] Poon B, Kha T, Tran S, et al. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls[J]. J Pharm Pharmacol,2016,68(2):139-147.
- [8] DONG M, JIAO G, LIU H, et al. Biological silicon stimulates collagen type 1 and osteocalcin synthesis in human osteoblast-like cells through the BMP-2/Smad/RUNX2 signaling pathway[J]. Biol Trace Elem Res, 2016,173(2): 306-315.
- [9] 肖亚平,曾杰,焦琳娜,等. 补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2018,43(1):21-30.
- [10] 冯尔宥,林煜,张怡元,等. 阿仑膦酸钠对成骨细胞 BMP-2 信号通路的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2014,53(3): 430-435.
- [11] 刘威,龚伟,张嵩,等. 基于多元统计分析的鹿茸品质评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):57-62.
- [12] 刘庆飞,李峰. 鹿茸多糖提取工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(4): 55-56.
- [责任编辑 周冰冰]