

补骨脂酚对去势导致雄性小鼠骨质疏松的治疗*

张盼阳¹ 王昭昕¹ 袁晓美¹ 毕亚男¹ 张 玥^{1,2} 周 昆^{1,2}

(1.天津中医药大学中医药研究院,天津 300193)(2.天津中医药大学方剂学教育部重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 观察补骨脂酚对去势导致的雄性小鼠骨质疏松的治疗作用。方法 ICR 雄性小鼠随机分为5组,分别为对照组、去势模型组、阳性药组、补骨脂酚 10 mg/kg 和 20 mg/kg 体质量组,对照组做假手术,其余组均切除小鼠睾丸。造模成功6周后,小鼠给药8周取材,检测血清生化指标,取各组右腿胫骨进行 MicroCT 扫描,取各组小鼠股骨进行骨生物力学测定。结果 对照组、模型组、B10 和 B20 mg/kg 组的骨钙素 OC 值分别为(177.69±45.13), (220.35±25.08), (167.48±74.11)和(108.76±38.17);对照组、模型组、阳性药组、B10 和 B20 mg/kg 组的 Tb.N 分别为(3.53±0.49)、(1.71±0.16)、(2.51±0.35)、(2.14±0.23)和(2.45±0.42)。结论 补骨脂酚对去势导致雄性小鼠骨质疏松有治疗作用。

关键词:骨质疏松;补骨脂酚;雄性小鼠;去势

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.001

补骨脂,复方制剂壮骨关节丸中的一味组方中药材,系豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实,始载于《雷公炮炙论》,又名破故纸。其性温,味辛、苦,用于补肾助阳,纳气平喘,温脾止泻。补骨脂中的主要活性成分有香豆素类、香豆酮苷、黄酮类化合物和单萜类^[1-2]。补骨脂酚在补骨脂中含量达3%以上,研究表明其具有抗癌、抗抑郁、降糖降血脂等多种药理活性^[3-5],补骨脂酚具有显著的雌激素样作用^[6],其在骨质疏松、围绝经期综合征等疾病的治疗具有良好的应用前景^[7],刘颖等^[8]实验表明补骨脂药渣对骨质疏松有良好的治疗效果,且优于补骨脂生药和水提物。但未见关于补骨脂酚对雄性骨质疏松疗效的研究,故本文就补骨脂中含量较高成分的补骨脂酚对雄性小鼠抗骨质疏松效果进行研究。

1 材料与方法

1.1 受试药

补骨脂酚,经 HPLC 检测纯度大于95%,购于天津月牙湖科技有限公司。

1.2 动物

雄性 ICR 小鼠,56只,SPF级,体质量20~22g,

6周龄,购自于北京华阜康生物科技股份有限公司(许可证号 SCXK(京)2014-0004),饲养于天津中医药大学实验动物中心。自由摄食和饮水,饲料来自于北京科澳协力饲料有限公司,饲养环境:温度20~25℃,湿度40%~60%。

1.3 试剂

阿仑膦酸钠片,批号:J20130085,Merck Sharp & Dohme Italia Spa;

试剂盒:骨钙素(OC)ELSIA,批号:L150401078, CUSABIO;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)试剂盒,批号:P032G-4,碧云天生物技术研究所;碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒批号:140721,中生北控生物科技股份有限公司;注射用青霉素钠,批号:017140656,中诺药业(石家庄)有限公司产品;氯化钠注射液,批号:141128,安徽双鹤药业责任有限公司产品;75%酒精,批号:141002,德州格利洁消毒制品有限公司产品;无水乙醇,批号:20150131,天津市科密欧化学试剂有限公司产品;水合氯醛,批号:20130705,天津市光复精细化工研究所产品;甲醛溶液,批号:20141204,天津市风船化学试剂科技有限公司产品。

收稿日期:2018-10-26

* 基金项目:国家自然科学基金(No.81202991,81673826),国家中医药管理局行业专项(No.201507004)

作者简介:张盼阳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理毒理研究.E-mail:zhangpanyang_l@163.com

通信作者:张 玥(1984—),女,博士,实验师,研究方向:中药药理毒理研究.E-mail:zhangyue@tjutcm.edu.cn

1.4 仪器

JA1003 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); VivaCT40 小动物活体断层扫描仪(瑞士, SCANCO MEDICAL); YLS-16A 小动物骨骼强度测定仪(济南益延科技发展有限公司); 7020 全自动生化仪(日本, Hitachi); EnSpire 多模式微孔板检测仪(美国, PerkinElmer); Legend Micro 17 微量台式离心机(Thermo); RM2135 转轮切片机(德国, LEICA); EG1150H 包埋机(德国, LEICA); CV5030 全自动封片机(德国, LEICA); ST5010 全自动染色机(德国, LEICA)。

1.5 方法

1.5.1 造模: 小鼠进行适应性饲养 2 周后进行手术, 术前 12 h 禁食, 给药组和模型组动物进行手术去势, 建立性激素缺乏的骨质疏松模型。腹腔注射 5% 水合氯醛(350 mg/kg 体质量)进行麻醉, 置仰卧式平铺于手术台, 将小鼠睾丸从腹腔推入阴囊中, 在阴囊部切约为 1 cm 的切口, 把睾丸结扎并剪去, 之后缝合伤口; 对照组做剪去睾丸周围一块脂肪的假实验。手术后, 小鼠腹腔注射青霉素注射液 5 万单位/只, 连续 3 d。

1.5.2 分组及给药: 56 只 ICR 小鼠随机分为对照组 Con(假手术)、去势模型组 Mod、阳性药组 AS(阿仑膦酸钠 20 mg/kg)和补骨脂酚组 B10、B20(10 mg/kg 和 20 mg/kg), 对照、模型和阳性药组与“壮骨关节丸对小鼠骨质疏松的治疗”实验^[9]共用。造模成功后饲养 6 周后给药, 补骨脂酚使用注射用油配制, 腹腔注射给药; 阿仑膦酸钠灌胃给药, 依据动物体质量给予药物体积 0.2 mL/10 g, 每天给药一次, 连续 8 周, 对照组和模型组灌胃给予等体积的生理盐水。

1.5.3 动物样本处理: 给药 8 周后, 取材。取材前 12 h 禁食不禁水, 眼内眦取血, 血样放置离心管中, 1 h 后离心 10 min, 转速 3 000 r/min, 吸取上清, 贮存于 -20 ℃ 冰箱中待测; 取各组小鼠右腿胫骨, 置于

75% 乙醇中 3 d, 每天换液, 于第 4 天置于无水乙醇中保存用于骨密度检测; 取各组小鼠左腿胫骨放置于甲醛中保存待测; 取各组小鼠双腿股骨用于骨生物力学测定。

1.5.4 血清生化指标的检测: 血清中 TRACP 按照试剂盒说明书进行检测; Osteocalcin 采用酶联免疫双抗夹心法进行检测; ALP 由全自动生化仪检测而来。

1.5.5 骨密度指标的检测: 使用 VivaCT 40 扫描右腿胫骨, 进行三维骨密度分析。从胫骨近心端的骨垢线消失处开始、向远心端进行扫描, 每张厚度 10.6 μm, 取 70 张进行分析。指标为骨体积分数 BV/TV、骨小梁数目 Tb.N、骨小梁厚度 Tb.Th、骨小梁分离度 Tb.Sp 和 DA。

1.5.6 骨最大荷载的检测: 小鼠股骨的最大荷载由 YLS-16 A 小动物骨骼强度测定仪检测, 最大荷载用 Mode 1 折断模式检测。

1.5.7 病理学观察: 取左腿胫骨固定于 10% 甲醛溶液中, 甲醛液固定的膝关节, 经过 8% 的盐酸和 8% 的甲酸混合液脱钙后用 LEICA EG1150H 包埋机石蜡包埋, 用 RM2135 转轮切片机进行 5 nm 切片, H & E 染色, 光镜下对骨关节进行病理组织学评价。

1.6 统计方法

实验数据使用软件 SPSS19.0 进行统计分析, 采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 具有统计学差异。

2 结果

2.1 对血清生化指标的影响

与对照组相比, 模型组骨钙素 OC 值显著升高, B10、B20 剂量组与模型组相比显著下降; 小鼠的 ALP、TRACP 和 ALP/TRACP 各组间的值无显著性差异性, 见表 1。

表 1 给药 8 周去势小鼠血清生化指标($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum biochemical indicators of castrated mice at 8 weeks of administration($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	<i>n</i>	ALP/(U/L)	TRACP/(U/L)	ALP/ TRACP	Osteocalcin/(pg/mL)
对照	—	10	27.30± 9.10	19.87± 7.22	1.46±0.57	177.69±45.13
模型	—	12	30.92± 8.98	21.96± 7.28	1.53±0.63	220.35±25.08 [#]
阿仑膦酸钠	20	12	35.17±11.19	23.58± 6.88	1.54±0.48	245.75±28.82
补骨脂酚	10	11	27.58± 9.62	26.86±12.22	1.14±0.55	167.48±74.11 [*]
补骨脂酚	20	11	35.50±18.67	23.21± 8.33	1.68±0.93	108.76±38.17 ^{**}

注: 与对照组相比, [#]*P* < 0.05; 与模型组相比, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01
Note: compared with control group, [#]*P* < 0.05; compared with model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

2.2 对骨密度相关指标的影响

CT 扫描的 3D 结构显示,模型组动物的骨小梁

明显减少、断裂较多、间隙较大,而经过给药治疗之后骨小梁数量有了明显增加,见图 1。

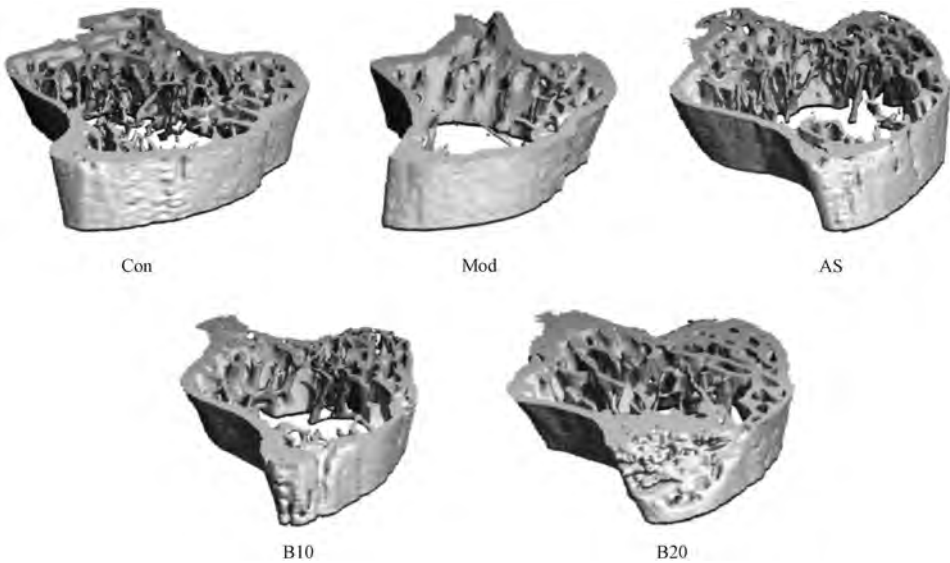


图 1 小鼠骨 CT 扫描典型图片
注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组

Fig.1 Typical picture of mouse bone CT scan

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups

相比对照组,小鼠模型组相对骨体积和骨小梁数量显著性降低,骨小梁厚度和分离度显著升高;给药后,各给药组与模型组相比骨小梁数量显著升高,

阳性药组和 B20 组骨小梁分离度和各向异性的程度显著降低,阳性药组骨小梁厚度显著性降低,见表 2。

表 2 给药 8 周去势小鼠骨密度相关指标 (x±s)

Table 2 Correlation index of bone mineral density in ovariectomized mice at 8 weeks(x±s)

组别	剂量/(mg/kg)	n/只	BV/TV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	DA
对照	—	10	0.34±0.06	3.53±0.49	0.10±0.02	0.19±0.03	1.82±0.29
模型	—	12	0.26±0.07 [#]	1.71±0.16 ^{###}	0.15±0.04 ^{##}	0.44±0.06 ^{###}	1.98±0.14
阿仑膦酸钠	20	12	0.28±0.03	2.51±0.35 ^{***}	0.11±0.02 ^{**}	0.29±0.05 ^{***}	1.72±0.21 ^{**}
补骨脂酚	10	11	0.26±0.03	2.14±0.23 ^{***}	0.12±0.02	0.42±0.22	1.90±0.17
补骨脂酚	20	11	0.29±0.04	2.45±0.42 ^{***}	0.12±0.03	0.30±0.05 ^{***}	1.78±0.15 [*]

注:与对照组相比,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01,^{###}*P*<0.001;与模型组相比,^{*}*P*<0.05,^{**}*P*<0.01,^{***}*P*<0.001
Note: compared with control group,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01,^{###}*P*<0.001; compared with model group,^{*}*P*<0.05,^{**}*P*<0.01,^{***}*P*<0.001

2.3 对骨最大荷载的影响

与对照组相比,模型组小鼠胫骨的最大荷载能力明显降低(*P*<0.01)。经过 8 周给药治疗后,各给药组较模型组相比,胫骨最大荷载均显著增高,见图 2。

2.4 骨组织学检测

如图 3,对照组动物胫骨上端骺板软骨细胞柱状排列整齐,无软骨细胞坏死区存在,骨小梁形成较

多,粗壮、饱满,壁较厚,形态结构完整,排列紧密有序呈网状,密度、面积正常,间隙较小。模型组动物骨小梁数目明显减少,呈团块状,骨小梁间隙增大,关节面骺板下过渡骨小梁数目减少,其余未见明显变化。给药后,阳性药补骨脂酚治疗组与模型组相比,各组骨小梁数目均有所增多,膜下生骨增多,骨小梁间隙减小。

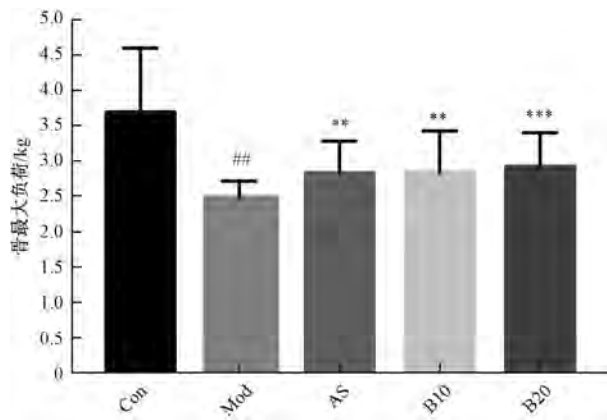


图 2 给药后雄小鼠的骨最大荷载

注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组, 与对照组相比, ## $P<0.01$; 与模型组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig.2 Maximum bone load of male mice after administration

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups. compared with control group, ## $P<0.01$; compared with model group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

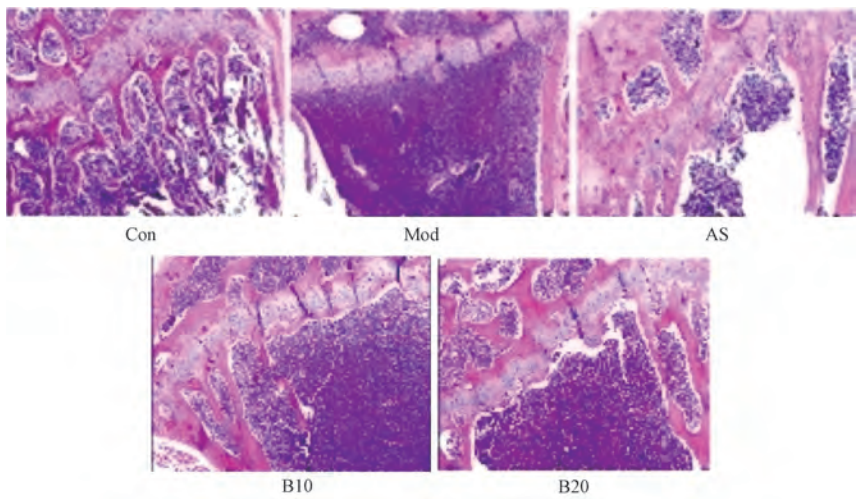


图 3 雄性小鼠典型胫骨病理图片

注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组

Fig.3 Typical tibia pathology pictures of male mice

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups.

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量低下、骨微结构破坏、导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病。目前大多使用雌性动物进行骨质疏松研究,忽视了男性骨质疏松的研究,但是随着人口老龄化,男性性腺功能减退,雄激素分泌减少,65 岁以上的男性普遍存在程度不等的骨质疏松,病情的严重性和骨折

后死亡率高于女性。骨组织对性激素很敏感,男性体内的睾酮主要来自于睾丸,故本实验采用将睾丸切除,建立雄性小鼠骨质疏松模型^[10]。双磷酸盐类是临床上应用广泛的抗骨质疏松症药物,但随着双磷酸盐类药物抑制破骨细胞时间的延长,造骨细胞也会受到影响,可能导致下颌骨坏死、肾脏毒性等副作用。而中药有着多年的临床应用,相对安全性较好,因此从中药中寻找抗骨质疏松有效成分是一个可行的途径。研究表明,补骨脂

酚对于去势导致的雄性小鼠骨质疏松有较好治疗作用,提示其可以作为男性骨质疏松治疗的潜在有效化合物,进而作为候选化合物进行后续优化和开发研究。

参 考 文 献

[1] Lim S H, Ha T Y, Kim S R, *et al.* Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats [J]. *Br J Nutr*, 2009, **101**(7): 1031-1039.

[2] 杨荣平, 寿清耀, 涂永勤, 等. 补骨脂提取物对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, **18**(1): 32-34.

[3] 林汉钦, 丁秀玉, 张温良, 等. 包含补骨脂酚的用于治疗妇女乳腺癌的医药组合物. 中国: 200510051551 [P]. 2006-09-06.

[4] 郭礼和, 赵刚, 王雪松. 补骨脂酚类化合物的应用. 中国:

CN101088498A [P]. 2007-12-19.

[5] Kim Y C, Oh H, Kim B S, *et al.* In vitro protein tyrosine phosphatase 1 B inhibitory phenols from the seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *PLanta Med*, 2005, **71**(1): 87-89.

[6] Xin D, Wang H, Yang J, *et al.* Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity [J]. *Phytomedicine*, 2010, **17**(2): 126-131.

[7] Tsai M H, Huang G S, Hung Y C, *et al.* *Psoralea corylifolia* extract ameliorate experimental osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Am J Chin Med*, 2007, **35**(4): 669-680.

[8] 刘颖, 袁晓美, 毕亚男, 等. 补骨脂对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的治疗 [J]. *实验动物科学*, 2018, **35**(1): 44-47.

[9] Yuan X M, Bi Y N, Yan Z M, *et al.* The Osteoprotective Effect of Zhuanggu-Guanjie Pill in Orchidectomized Mice [P]. *International Conference on Biomedical and Biological Engineering*, 2016.

[10] Antonia Sophocleous and Aymen I Idris. Rodent models of osteoporosis [R]. *BoneKEy Reports*, 2014, **614** (3): 1-9.

The Therapeutic Effect of Bakuchiol on Osteoporosis in Male Mice

ZHANG Panyang¹, WANG Zhaoxin¹, YUAN Xiaomei¹, BI Yanan¹, ZHANG Yue^{1,2}, ZHOU Kun^{1,2}

(1. *Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China*)

(2. *Key Laboratory of Prescriptions, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China*)

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of bakuchiol on osteoporosis in male mice caused by castration. **Method** ICR male mice were randomly divided into five groups: control group, castration model group, positive drug group, bakuchiol 10 mg/kg and 20 mg/kg group. The control group was sham operated, and the other groups were resected small mice testicles. After 6 weeks of successful modeling, the mice were administered for eight weeks, serum biochemical parameters were measured, and the right leg tibia of each group was taken for MicroCT scanning. The femur of each group was used for bone biomechanical determination. **Result** The osteocalcin OC values of the control group, model group, B10 and B20 mg/kg group were (177. 69±45. 13), (220. 35±25. 08), (167. 48±74. 11) and (108. 76±38. 17); The Tb.N values of the control group, model group, positive drug group, B10 and B20 mg/kg group were (3. 53±0. 49), (1. 71±0. 16), (2. 51±0. 35), (2. 14±0. 23), and (2. 45±0. 42). **Conclusion** Bakuchiol has a therapeutic effect on ovariectomy leading to osteoporosis in male mice.

Key words: Osteoporosis; Bakuchiol; male mice; castration