

刺芒柄花素对 II 型糖尿病大鼠 骨质疏松的缓解作用

侯 伟, 万 颢

(四川省骨科医院脊柱科, 成都 610041)

[摘要] 目的 探究刺芒柄花素对 II 型糖尿病并发糖尿病骨病大鼠骨质疏松的缓解作用。方法 使用链脲佐菌素(STZ)+ 高脂饲料联合的方式建立 II 型糖尿病大鼠模型, 分别以灌胃方式给予糖尿病模型大鼠高、中、低质量浓度(100 mg/kg、50 mg/kg 和 20 mg/kg)的刺芒柄花素 2 周后, 检测各组大鼠股骨骨密度、血清睾酮(T)和雌二醇(E₂)水平, 以及大鼠股骨骨钙素(OC)、肾脏 CYP24A1 mRNA 表达水平。结果 与正常组相比, II 型糖尿病组的骨密度、血清 T 和 E₂ 水平、股骨 OC 和肾脏 CYP24A1 mRNA 表达均下降; 而刺芒柄花素能逆转上述现象, 并且高浓度组的效果最好。结论 刺芒柄花素对 II 型糖尿病并发糖尿病骨病大鼠的骨质疏松具有缓解作用。
[关键词] 刺芒柄花素; II 型糖尿病; 骨病; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)03-0232-04

II 型糖尿病是一种以代谢失衡为特征的疾病, 常常伴有多种并发症, 其中骨质疏松已被多数学者公认。骨质疏松是一种以骨结构遭到破坏, 导致骨量降低, 使骨组织脆性变强的全身性骨代谢疾病, 以绝经后女性和老年人多见。目前研究^[1]认为, 骨质疏松发病机制主要是由骨吸收与骨形成发生障碍引起, 其病理现象主要是成骨细胞功能的紊乱, 以及破骨细胞吸收的增强。但针对 II 型糖尿病并发骨质疏松尚未找到有效的治疗药物。刺芒柄花素(formononetin)是红车轴草的主要有效成分, 属于异黄酮类成分。研究^[2]证实, 红车轴草中异黄酮类植物成分表现为类雌激素样作用。

刺芒柄花素具有多种药理活性, 如抑制肿瘤、抗氧化、抗高血压及雌激素样作用, 其对骨质疏松有预防治疗的作用, 但其是否对 II 型糖尿病并发糖尿病骨病大鼠的骨质疏松具有缓解作

用, 以及是否对骨组织形态存在影响, 目前尚未有研究证明。因此, 本研究旨在探究刺芒柄花素对 II 型糖尿病并发糖尿病骨病大鼠骨质疏松的缓解作用及骨组织形态的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 270~290 g, 9 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0001], 饲养于四川省骨科医院动物研究所[SYXK(川)2018-058]。动物实验经本单位动物福利伦理委员会批准(批号: 20180506)。

1.2 试剂和仪器

刺芒柄花素粉末(陕西慈缘生物技术有限公司); 睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estradiol, E₂)试剂盒(南京建成生物科技有限公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂(北京艾德莱生物科技有限公司); HiScript 反转录酶(南京诺唯赞生物科技有限公司); 兔多抗 GAPDH(杭州贤至生物有限公

[收稿日期] 2019-10-14

[作者简介] 侯 伟(1982—), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 骨科脊柱方向。E-mail: whyeee@21cn.com

司); 山羊多抗 CYP24A1(美国 Novus 公司); 兔多抗骨钙素(osteocalcin, OC)(北京博奥森生物技术有限公司)。

三诺血糖仪(长沙三诺生物传感技术有限公司); RT-2100C 自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司); MDF-382E 型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司); 1-15K 型冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司); 9700 型 Gene AmpPCR 仪(应用生物系统公司); Discovery-A 型双能 X 线吸收骨密度仪(美国 Hologic 公司)。

1.3 造模及分组

60 只大鼠, 随机取 10 只作为对照组, 普通饲料喂养; 另 50 只大鼠进行 II 型糖尿病造模, 具体方法是用高脂饲料(high fat diet, HFD)喂养。HFD 热量为 21.35 kJ/g, 其中来自脂肪的热量占 61.6%, 蛋白质占 18.1%, 碳水化合物占 20.3% (Test Diet, Richmond, IN, 美国)。HFD 连续喂养 4 周后, 腹腔内注射低剂量的链脲佐菌素(STZ)(35 mg/kg)。继续 HFD 喂养 1 周后, 禁食 12 h, 使用市售的血糖仪测量大鼠空腹血糖水平, 血糖水平 ≥ 16.7 mmol/L 即造模成功^[3]。

50 只大鼠, 造模成功 45 只, 造模成功率为 90%。将造模成功的 45 只大鼠随机抽取 15 只作为糖尿病组; 另 30 只作为给药组, 随机分为刺芒柄花素高、中、低剂量组(100 mg/kg、50 mg/kg、20 mg/kg), 每组 10 只, 每日 1 次给予相应剂量的刺芒柄花素; 对照组及糖尿病组给予相应体积的蒸馏水, 连续灌胃 4 周。

1.4 取材

大鼠经麻醉后股动脉取血, 静置于分离胶促凝管中 30 min 后, 3 000 r/min 4 °C 低温离心 10 min, 收集血清, -80 °C 保存; 处死大鼠后, 摘取大鼠肾脏, 并迅速剔出各组大鼠大腿双侧股骨; 将股

骨周围多余的软组织去除, 左侧病灶区股骨迅速放进液氮中, 3 min 取出; 用生理盐水纱布将右侧股骨包好, 在 -80 °C 冰箱保存备用。

1.5 股骨骨密度(BMD)检测

造模成功 4 周末, 采用双能 X 线吸收法检测各组大鼠股骨 BMD, 扫描软件为小动物软件(版本: 3.9.4), 测量条件: 扫描速度 60 mm/s, 测定面积 0.24 cm²。

1.6 ELISA 检测大鼠血清 T、E₂ 水平

根据试剂盒说明书, 检测大鼠血清 T、E₂ 水平。在 96 孔酶标板内进行操作, 经过显色后在酶标仪内以 450 nm 波长依序测量各孔内吸光度值, 并计算标准曲线的回归方程式, 求得样品浓度。

1.7 PCR 检测

TRIzol 法提取股骨以及肾脏 RNA, 取溶解后的 RNA 2 μ L, 用微量分光光度计测定 A₂₆₀ 与 A₂₈₀ 比值为 1.8~2, 即满足实验要求, 然后计算样品 RNA 浓度。在 RNA 反转录酶及 RNA 酶抑制剂的作用下, 以 Oligo(dT)为引物将总 RNA 反转录为 cDNA, 反转录条件为 25 °C 5 min, 50 °C 15 min, 85 °C 5 min, 4 °C 10 min。反转录完毕后, 将 cDNA 静置于 -80 °C 冰箱备用。以 GAPDH 为内参基因, 进行实时荧光定量 PCR 扩增检测样本中 OC 及 CYP24A1 mRNA 表达。扩增引物由武汉擎科公司合成, 引物序列见表 1。PCR 扩增条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 次循环。每个样品设置 3 个复孔, 绘制溶解曲线。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

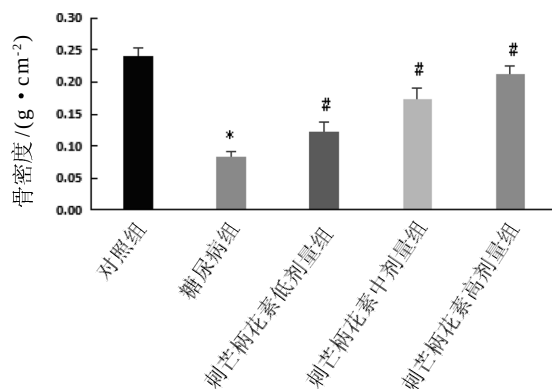
Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列	扩增长度/bp
GAPDH	上游: 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	253
	下游: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'	
OC	上游: 5'-AAGGTGGTCAATAGACTCCC-3'	167
	下游: 5'-GTGCCATAGATGCCCTTGTAG-3'	
CYP24A1	上游: 5'-TTTGGGAAAGATGATCCTCA-3'	111
	下游: 5'-GCAGGGTTTGACTGATTTG-3'	

2 结果

2.1 刺芒柄花素对大鼠股骨 BMD 的影响

与对照组大鼠比较, 糖尿病组大鼠的 BMD 降低($P<0.05$); 与糖尿病组比较, 刺芒柄花素低、中、高剂量组大鼠 BMD 均升高($P<0.05$)(图 1)。



与对照组相比较, * $P<0.05$; 与糖尿病组比较, # $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠骨密度

Figure 1 Bone mineral density of rats in each group

2.2 刺芒柄花素对大鼠血清 T、E₂ 水平的影响

ELISA 结果显示, 与对照组比较, 糖尿病组 T、E₂ 水平明显下降($P<0.05$); 与糖尿病组比较, 刺芒柄花素各组 T、E₂ 水平明显上升($P<0.05$)(表 2)。

2.3 刺芒柄花素对大鼠股骨 OC mRNA、肾脏 CYP24A1 mRNA 表达的影响

结果显示, 与对照组比较, 糖尿病组股骨 OC mRNA、肾脏 CYP24A1 mRNA 表达显著上调($P<0.05$); 与糖尿病组比较, 刺芒柄花素各组 OC mRNA、CYP24A1 mRNA 表达均显著下调($P<0.05$)(表 3)。

表 2 刺芒柄花素对大鼠血清 T、E₂ 水平的影响

Table 2 Effect of formononetin on serum T and E₂ levels in rats

组 别	$(\bar{x} \pm s, n=10)$	
	Tp/(ng · mL ⁻¹)	E ₂ p/(pg · mL ⁻¹)
对照组	0.33 ± 0.07	63.12 ± 0.26
糖尿病组	0.12 ± 0.03*	50.33 ± 0.47*
刺芒柄花素低剂量组	0.16 ± 0.04#	52.72 ± 0.33#
刺芒柄花素中剂量组	0.24 ± 0.06#	55.81 ± 0.29#
刺芒柄花素高剂量组	0.31 ± 0.09#	59.22 ± 0.87#

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与糖尿病组比较, # $P<0.05$ 。

表 3 刺芒柄花素对大鼠股骨 OC mRNA、肾脏 CYP24A1 mRNA 表达的影响

Table 3 Effect of formononetin on the expressions of OC mRNA in femur and CYP24A1 mRNA in kidney of rats

组 别	$(\bar{x} \pm s, n=10)$	
	OC	CYP24A1
对照组	1.03 ± 0.17	1.07 ± 0.15
糖尿病组	3.17 ± 0.22*	2.39 ± 0.19*
刺芒柄花素低剂量组	2.93 ± 0.29#	2.15 ± 0.28#
刺芒柄花素中剂量组	2.18 ± 0.16#	1.88 ± 0.23#
刺芒柄花素高剂量组	1.12 ± 0.21#	1.21 ± 0.13#

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与糖尿病组比较, # $P<0.05$ 。

3 讨论

糖尿病易导致微血管病变和骨并发症, 其骨并发症主要以骨质疏松为主要表现, 易导致骨折, 甚至致死致残, 严重影响患者生活和生存质量。Schwartz 等^[4]研究显示, II 型糖尿病患者中骨质疏松人数占 20%~60%。研究^[5]表明, 维生素 D、性激素和 OC 均与骨质疏松存在密切关联。其中, 人体内维生素 D 代谢的主要限速酶是 25OHD-1 α 羟化酶 D, 它能够加速 1,25(OH)₂D₃ 在体内的代谢过程, 降低机体的维生素 D 水平^[6]。而维生素 D 缺乏会引起雌激素分泌紊乱^[7]。动物实验^[8]表明, 维生素 D 缺乏模型小鼠伴有 T、E₂、促黄体生成素等性激素水平的紊乱。性激素分泌紊乱会影响机体内成骨细胞与破骨细胞间的平衡, 进而诱发骨质疏松症。中医学认为, 骨质疏松症属于“骨萎”、“骨痹”的范畴, 发病原因多与气血津液不足、脾胃运化失调、肾中精气亏虚以及体虚劳倦过度有关^[9]。临床观察^[10]表明, 骨质疏松症肾虚量化评分与血清 E₂ 水平存在明显的负相关。OC 是一种由成骨细胞分泌合成, 具有生物学活性的多肽, 为衡量成骨细胞活跃程度的重要指标之一, 受维生素 D 及维生素 K 水平等因素的调控。有学者^[11]提示, OC 不仅能清晰地反映患者的骨代谢情况, 还能完整地评价药物对骨质疏松症的治疗作用。去势骨质疏松大鼠接受槲皮素治疗 4 个月后, 骨质疏松情况好转, 血清 OC 水平显著下降^[12]。国内另外一项金天格胶囊对绝经后骨质疏松大鼠的研究^[13]也佐证了此观点。

研究^[14]发现, II型糖尿病患者的骨量减少, BMD下降。本实验中, 模型组大鼠BMD显著下降, 而刺芒柄花素能够改善II型糖尿病并发骨质疏松大鼠的BMD, 升高血清T、E₂水平, 抑制骨OC mRNA表达。这可能与当归补血汤降低维生素D限速酶CYP24A1 mRNA的表达水平, 维持机体内维生素D水平有关。

综上, 刺芒柄花素可能是通过影响维生素D限速酶CYP24A1表达, 干预OC及性激素水平, 从而实现对骨质疏松的治疗作用, 但其具体的分子作用机制需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张孟之, 柴艺汇, 管连城, 等. 当归补血汤对维甲酸致大鼠骨质疏松模型CYP24A1和骨钙素表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1):12-16.
- [2] 张翠, 张思琪, 王丹枫, 等. 刺芒柄花素对单侧输尿管梗阻大鼠ASK1、JNK蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2018, 49(19):140-146.
- [3] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Strotmeyer, et al. Diabetes and bone loss at the hip in older black and white adults[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(4):596-603.
- [5] 常睿洁. 骨质疏松症的中西药治疗进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(13):1498-1503.
- [6] 陈伟, 柴艺汇, 管连城, 等. 衰老大鼠肾上腺皮质VDR、CYP24A1、CYP27B1基因mRNA表达变化以及淫羊藿苷的干预作用[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2):351-353.
- [7] 管连城, 高洁, 柴艺汇, 等. 从雌激素生成探讨维生素D轴与“肾藏精, 主生殖”功能的相关性[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(8):1634-1636.
- [8] 陈云志, 杨长福, 秦钟, 等. 维生素D缺乏肾精不足小鼠模型的建立[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(9):2412-2414.
- [9] 杨志鹏, 魏成建, 龚双全. 骨质疏松症的中医治疗研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(11):1381-1384.
- [10] 任之强, 赵志强, 晋大祥, 等. 骨质疏松症肾虚血瘀量化评分与性激素和血细胞参数关系研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(5):560-563.
- [11] Li J, Zhang H, Yang C, et al. An overview of osteocalcin progress[J]. J Bone Miner Metab, 2016, 34(4):367-379.
- [12] 冯建军, 邹浩, 朱海燕, 等. 槲皮素对去卵巢大鼠血清骨钙素和股骨I型胶原蛋白水平的影响[J]. 中医正骨, 2016, 28(7):10-13.
- [13] 赵玉玺, 张彬, 湛梅圣, 等. 金天格胶囊对骨质疏松性骨折大鼠血清IL-2、IL-4和TNF- α 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(7):796-800.
- [14] 冯允健, 胡肇衡. 型糖尿病患者骨密度变化及其相关因素分析[J]. 福建医药杂志, 2004, 26(3):3-6.

Alleviation Effect of Formononetin on Osteoporosis in Type 2 Diabetes Mellitus Complicated with Diabetic Bone Disease

HOU Wei, WAN Dun

(Spine Department, Sichuan Provincial Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate whether the formononetin has a mitigating effect on osteoporosis in type 2 diabetic rats with diabetic bone disease. **Methods** A model of type 2 diabetes mellitus was established by combining Streptozotocin (STZ)+ high-fat diet. High, medium and low dosages (100 mg/kg, 50 mg/kg, 20 mg/kg) of formononetin were administered by intragastric administration for 2 weeks, followed by detection of rats in each group. The bone mineral density, serum testosterone (T) and estradiol (E₂) levels, as well as the mRNA expressions of osteocalcin (OC) in femur and CYP24A1 in kidney of rats were measured. **Results** Compared with the control group, the bone mineral density, serum T and E₂ levels, femoral OC, and renal CYP24A1 mRNA expression decreased in the type 2 diabetes group, while the formononetin could reverse the above phenomenon, and the high dosage group had the most positive effect. **Conclusion** Formononetin can alleviate osteoporosis in type 2 diabetic rats with diabetic bone disease.

[Key words] Formononetin; Type 2 diabetes; Bone disease; Rats