

参考文献

- 1 蔡永敏,杨辰华,王振涛,主编. 糖尿病临床治疗学[M]. 上海:第二军医大学出版社,2006:100-101.
 - 2 徐叔云,卡如濂,陈修,等主编. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:982-990.
 - 3 施新猷. 实验动物用药量的确定及计算方法[A]. 见:施新猷,主编. 实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社,2000:332-333.
 - 4 司博林,王晓明,申瑞芳. 血尿 IV 型胶原对肾组织纤维化的诊断价值[J]. 临床荟萃,2005,20(19):1093-1097.
 - 5 Hofmann M, Schiekofer S, Kanitz M, et al. Insufficient glycaemic control increases NF- κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes, [J]. Diabetes Care, 2001,21(8):1310-1316.
- [收稿日期 2010-05-28][本文编辑 韦挥德 刘京虹]

课题研究 · 论著

淫羊藿黄酮对被动吸烟大鼠骨量与骨代谢生化指标的影响及其相关性研究

雷光华, 刘文和, 高曙光, 徐文硕, 徐迈, 姜未, 李康华

基金项目: 湖南省自然科学基金重点资助项目(编号:09JJ3048); 湖南省博士科研创新资助项目(编号:CX2010B102)

作者单位: 410008 湖南长沙,中南大学湘雅医院骨科(雷光华,高曙光,徐文硕,徐迈,姜未,李康华); 423000 湖南郴州,湘南学院附属医院骨科(刘文和)

作者简介: 雷光华(1970-),男,博士学历,博士学位,教授,博士生导师,研究方向:骨关节炎与骨质疏松。E-mail:lgh9640@sina.com

[摘要] 目的 探讨淫羊藿黄酮干预对被动吸烟大鼠骨量与骨代谢生化指标的影响及其相关性。方法 选用2月龄 Sprague-Dawley (SD)大鼠60只,随机分为6组,每组10只,各组雌雄各半,雌雄分笼饲养。A组:空白对照组,常规方法饲养,不给予被动吸烟;B组:被动吸烟组,不给予灌服药物;C组:被动吸烟+钙组,灌服高效钙($75\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + 维生素 D_3 $21\text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;D组:被动吸烟+低剂量灌服淫羊藿黄酮($75\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);E组:被动吸烟+中剂量灌服淫羊藿黄酮($150\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);F组:被动吸烟+高剂量灌服淫羊藿黄酮($300\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。按“密室熏烟法”给予实验的(B、C、D、E、F组)大鼠被动吸烟4个月。实验动物干预8周和4个月时测定血Ca、血P、血ALP、尿Ca、尿P、血清骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、尿脱氧吡啶啉、股骨和腰椎骨密度,并分析骨密度与骨代谢生化指标之间的相关性。结果 (1)股骨和腰椎骨密度、BGP在第8周和在4个月末时血ALP指标A、C、D、E、F组较B组为高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);D、E、F组随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加,但其相互之间差异无统计学意义($P > 0.05$);其它各组之间相互比较其差异无统计学意义($P > 0.05$)。TRACP的活性、Dpd浓度、在第8周和在4个月末时尿Ca、尿Hop指标A、C、D、E、F组较B组为低,其差异有统计学意义($P < 0.05$);D、E、F组随淫羊藿黄酮剂量的增加而降低,但其相互之间差异无统计学意义($P > 0.05$);其它各组之间相互比较其差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)在第8周及在4个月末时尿Ca、尿Hop和TRACP及Dpd/Cr指标A、C、D、E、F组较B组为低,其差异有统计学意义($P < 0.05$);D、E、F组随淫羊藿黄酮剂量的增加而降低,但其相互之间差异无统计学意义($P > 0.05$);其它各组之间相互比较其差异无统计学意义($P > 0.05$)。股骨和腰椎骨密度与BGP、ALP呈明显正相关($r = 0.784$ 及 0.816 , $P < 0.05$; $r = 0.743$ 及 0.807 , $P < 0.05$)。股骨和腰椎骨密度与TRACP的活性、Dpd浓度、尿Ca、尿Hop呈明显负相关(r 分别 = -0.617 、 -0.608 、 -0.587 、 -0.611 , $P < 0.05$; r 分别 = -0.614 、 -0.621 、 -0.583 、 -0.617 , $P < 0.05$)。结论 淫羊藿黄酮干预可明显改善被动吸烟大鼠的骨密度和骨生化指标,且骨密度与骨生化指标之间存在明显的相关性。

[关键词] 淫羊藿黄酮; 被动吸烟; 骨密度; 骨代谢生化指标

[中图分类号] R 977 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)11-1046-06

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.11.03

Effect of EPF on the bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in the passive smoking rats and the correlations between BMD and biochemical markers

LEI Guang-hua, LIU Wen-he, GAO Shu-guang. Department of Orthopaedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha Hunan 410008, China

[Abstract] **Objective** To explore the pharmacological effects of epimedium pubescens flavonoid (EPF) on the bone mineral density (BMD), the biochemical markers of bone metabolism in the passive smoking rats, and the correlations between BMD and the biochemical markers. **Methods** Sixty Sprague-Dawley (SD) rats (aged 2-month-old) were randomly divided into six groups ($n = 10$), including sham control group (group A), model group (group B), control group (group C), treated 1 group (group D), treated 2 group (group E) and treated 3 group (group F). There were five male rats and five female rats in each group, and the male and female rats had been fed in different cage. All the rats were given the same feedstuff. Meanwhile, group C were given calcium $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ combined with VitD_3 $21 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gastrogavage for 4 months; group D EPF $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; group E EPF $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; group F EPF $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Except the sham control group (group A), the other groups had been exposed daily to passive cigarette smoking for four months basing on the adytum fuming method. The experimental rats' urine in 24 hours had been collected through the metabolize cage means and the vein blood had been collected through to cut off the rats' trail at the end of the eighth weeks and the fourth months. These had been measured i. e. (1) The serum Ca, serum P, serum ALP, urine Ca, urine P, and urine Hop at the end of the eighth week and the fourth month; (2) The Serum BGP, Serum TRACP, Urine Dpd/Cr; (3) the BMD of the femur and lumbar vertebra body. The correlations had been analyzed between the BMD and the biochemical markers of the bone formation and resorption. **Results** (1) The BMD of the femur and lumbar vertebra body, the serum BGP (ng/ml), the serum ALP at the end of the eighth weeks and at the end of the fourth months had increased markedly in group A, group C, group D, group E and group F compared with group B, and the difference between group A, group C, group D, group E, group F and group B had statistical significance ($P < 0.05$). There had dose-dependently increase in group D, group E and group F, and the difference among them had no statistical significance ($P > 0.05$). The difference had no statistical significance ($P > 0.05$) among the other groups. The serum TRACP (U/L) and urine Dpd/Cr (nmol/mmol) had decreased markedly in group A, group C, group D, group E and group F compared with group B, and the difference between group A, group C, group D, group E, group F and group B had statistical significance ($P < 0.05$). There had dose-dependently decreased in group D, group E and group F, and the difference among them had no statistical significance ($P > 0.05$). The difference had no statistical significance ($P > 0.05$) among the other groups; (2) The urine Ca and urine Hop at the end of the fourth months and at the end of the eighth weeks, the serum TRACP and urine Dpd/Cr had decreased markedly in group A, group C, group D, group E and group F compared with group B, and the difference between group A, group C, group D, group E, group F and group B had statistical significance ($P < 0.05$). There had dose-dependently decreased in group D, group E and group F, and the difference among them had no statistical significance ($P > 0.05$). The difference had no statistical significance ($P > 0.05$) among the other groups. The serum ALP had increased markedly in group A, group C, group D, group E and group F compared with group B, and the difference between group A, group C, group D, group E, group F and group B had statistical significance ($P < 0.05$) at the end of the eighth weeks and at the end of the fourth months. There had dose-dependently decreased in group D, group E and group F, and the difference among them had no statistical significance ($P > 0.05$). The difference had no statistical significance ($P > 0.05$) among the other groups. The difference of the other biochemical indices had no statistical significance ($P > 0.05$) among the other groups. A positive correlation was found between the BMD of the femur and lumbar vertebra body and serum BGP, serum ALP ($r = 0.784, 0.816, P < 0.05; r = 0.743, 0.807, P < 0.05$). There were also a negative correlation between the BMD of the femur and lumbar vertebra body and serum TRACP, Urine Dpd/Cr, urine Ca, urine Hop ($r = -0.617, -0.608, -0.587, -0.611, P < 0.05; r = -0.614, -0.621, -0.583, -0.617, P < 0.05$). **Conclusion** The EPF could prevent and treat effectively the decreasing of BMD and the worsening of biochemical markers of bone metabolism resulted from passive smoking in the experimental rats. There are significant correlations between the BMD and the biochemical markers of the bone formation and resorption.

[Key words] Epimedium pubescens flavonoid (EPF); Passive smoking; Bone mineral density (BMD); Biochemical markers of bone metabolism

原发性骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种常见的衰老性疾病,其病因和发病机理非常复杂。吸烟作为一种独立的因素可以加速男女性骨丢失,促进 OP 的发生并增加骨折发生的危险^[1,2]。中医药在防治骨质疏松症方面历史悠久。目前国内外,对大鼠被动吸烟动物实验研究,主要是被动吸烟致肿瘤发生机理的基础研究;对骨质疏松方面的研究主要是进行去势动物实验研究;对淫羊藿的药理作用研究主要是进行补肾壮阳,治疗肾阳虚证方面的研究,而把这几个方面结合起来将淫羊藿黄酮应用于防治被动吸烟诱导骨丢失和骨质疏松的研究,目前国内外尚未见报道,现将我们的研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验选用体重 175.28 ~ 212.64 (201.51 ± 15.32) g, 2 月龄的 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,组间体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$),为一级实验动物,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。鼠料购自中南大学湘雅医学院实验动物部。实验动物购得后,在动物室内适应 1 周。按体重的 10% 饲喂各组饲料,饮水量不限,每周称重 1 次,观察大鼠的生长情况和进食量。随机平均分成 6 组,每组 10 只,各组雌雄各半,雌雄分笼饲养。所有动物在同一条件下(室温 18 ~ 25 °C)用普通鼠料定量饲养,自由摄食、饮水。基础饲料为按美国 AOAC 标准配制的低钙合成饲料。

1.1.2 药物、仪器与试剂 淫羊藿药用的主要有效成分:淫羊藿总黄酮含量为 62.5%,购自湖南省浏阳市生物医药科技园区的九汇制药有限公司。高效钙粉购自中南大学湘雅医院药剂科,每克钙粉含钙 400 mg,配制成一定浓度的药物混悬液置于 4 °C 冰箱中避光保存备用。维生素 D₃、钙尔奇,苏州立达制药有限公司生产。龙山牌香烟(烤烟型,含烟碱 1.0 mg),产自湖南省龙山卷烟厂。大鼠灌胃器多付,购自中南大学湘雅医学院实验动物部。XR-36 双能 X 射线骨密度测定仪。

1.2 方法

1.2.1 研究分组(对比研究) A 组(空白对照组):常规方法饲养,不给予被动吸烟。B 组(被动吸烟组):不给予灌服药物;C 组(被动吸烟 + 钙组):灌服高效钙($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),并给予维生素 D₃ $21 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (钙尔奇,苏州立达制药有限公司);D 组即受试药低剂量组(被动吸烟 + 治疗 1 组):灌服淫羊藿黄酮($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);E 组

即受试药中剂量组(被动吸烟 + 治疗 2 组):灌服淫羊藿黄酮($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);F 组即受试药高剂量组(被动吸烟 + 治疗 3 组):灌服淫羊藿黄酮($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。按“密室熏烟法”^[3-5]给予实验的 B、C、D、E、F 组大鼠被动吸烟,实验时间持续 4 个月。

1.2.2 模型制作 将实验组(B、C、D、E、F 组)大鼠同时移至专供熏烟的实验室(面积 6 m²),关闭门窗,空调通风换气,控制室温 20 °C;每天上、下午各熏烟 1 次,前 2 个月每次同时点燃香烟 220 支,第 3 个月同时点燃 150 支,第 4 个月同时点燃 80 支;每只大鼠合 5 支香烟,每次被动吸烟 1 h。

1.2.3 标本采集及测量 (1)在实验第 8 周时用代谢笼收集 24 h 尿液,断尾尾静脉放血,测定血 Ca、P、ALP 和尿 Ca、P。(2)处死大鼠前一天用代谢笼收集 24 h 尿液,实验进行 4 个月末用 3% 戊巴比妥麻醉处死大鼠,开胸、心脏抽血(用作检测血生化指标),测定血 Ca、P、ALP 和尿 Ca、P。(3)测定血清骨钙素和抗酒石酸酸性磷酸酶及尿脱氧吡啶啉;(4)取出股骨、腰椎,小心去除骨骼表面附着的肌肉、韧带及骨膜,避免损伤骨质,置于装有去离子水(深 2.6 cm)的薄壁有机玻璃盒内,测量腰椎总体骨密度和股骨整体骨密度;用 XR-36 双能 X 射线骨密度测定仪测量大鼠骨标本的骨密度(BMD);条件设定:步距 0.5 mm × 0.5 mm,扫描速度 30 mm/s。(5)分析骨密度与反应骨形成及骨吸收的骨代谢生化指标之间的相关性。尿钙采用邻甲酚酞络合酮法;Dpd 采用 ELISA 方法,结果以每毫摩尔肌酐(Cr)表示,Cr 采用碱性苦味酸法;BCP 采用放免法。

1.3 统计学方法 应用 SPSS12.5 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 时,均数间的两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨标本的骨密度比较 双侧胫骨、股骨、肱骨和全部腰椎骨密度(BMD)中 A、C、D、E、F 组的骨密度较 B 组的骨密度高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);E、F 组的骨密度较 A 组的骨密度高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);C、D 组的骨密度较 A 组的骨密度高,但其差异无统计学意义($P > 0.05$);E、F 组的骨密度较 C 组的骨密度高,但其差异无统计学意义($P > 0.05$);C 组的骨密度较 D 组的骨密度高,但其差异无统计学意义($P > 0.05$);D、E、F 组的骨密度随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加,

但其相互之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 淫羊藿黄酮对大鼠骨密度的影响 [$\text{g}/\text{cm}^2, (\bar{x} \pm s)$]

组 别	股骨	第四腰椎
A 组	0.2132 $\pm$ 0.0012 *	0.2029 $\pm$ 0.0017 *
B 组	0.1776 $\pm$ 0.0028	0.1798 $\pm$ 0.0023
C 组	0.2387 $\pm$ 0.0031 *	0.2391 $\pm$ 0.0025 *
D 组	0.2358 $\pm$ 0.0021	0.2389 $\pm$ 0.0018
E 组	0.2581 $\pm$ 0.0017 **	0.2581 $\pm$ 0.0017 **
F 组	0.2687 $\pm$ 0.0019 **	0.2654 $\pm$ 0.0017 **

注:与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 A 组比较, # $P < 0.05$

2.2 第 8 周时淫羊藿黄酮对各组被动吸烟大鼠血

表 2 第八周时淫羊藿黄酮对各组被动吸烟大鼠血 Ca、P、ALP 及尿 Ca、P、Hop 含量的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	血 Ca (mmol/L)	血 P (mmol/L)	血 ALP (IU/L)	尿 Ca (mmol/L)	尿 P (mmol/L)	尿 Hop ($\mu\text{mol/L}$)
A 组	2.64 $\pm$ 0.35	1.92 $\pm$ 0.21	185.52 $\pm$ 12.11 *	0.85 $\pm$ 0.43 *	1.67 $\pm$ 0.24	90.15 $\pm$ 9.81 *
B 组	2.60 $\pm$ 0.41	1.80 $\pm$ 0.27	150.42 $\pm$ 13.30	2.05 $\pm$ 0.56	1.71 $\pm$ 0.31	136.21 $\pm$ 12.13
C 组	2.70 $\pm$ 0.12	1.90 $\pm$ 0.21	173.63 $\pm$ 14.20 *	0.93 $\pm$ 0.34 *	1.72 $\pm$ 0.37	91.53 $\pm$ 10.31 *
D 组	2.72 $\pm$ 0.32	1.91 $\pm$ 0.27	178.61 $\pm$ 11.50 *	0.93 $\pm$ 0.37 *	1.69 $\pm$ 0.25	91.76 $\pm$ 12.35 *
E 组	2.75 $\pm$ 0.46	1.95 $\pm$ 0.25	182.45 $\pm$ 12.40 *	0.92 $\pm$ 0.46 *	1.70 $\pm$ 0.32	91.47 $\pm$ 11.21 *
F 组	2.78 $\pm$ 0.52	1.97 $\pm$ 0.34	186.23 $\pm$ 10.60 *	0.91 $\pm$ 0.14 *	1.69 $\pm$ 0.13	91.16 $\pm$ 10.34 *

注:与 B 组比较, * $P < 0.05$

2.3 淫羊藿黄酮对实验大鼠骨钙素 (BGP)、尿脱氧吡啶啉 (Dpd) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP) 的影响比较 骨形成生化指标骨钙素在 A、C、D、E、F 组较 B 组的高,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组之间比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。抗酒石酸酸性磷酸酶的活性和尿脱氧吡啶啉浓度在 A、C、D、E、F 组较 B 组的低,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而降低,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组间比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 淫羊藿黄酮对实验大鼠 BGP、Dpd 和 TRACP 的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	血 BGP (ng/ml)	尿 Dpd/Cr (nmol/mmol)	血 TRACP (U/L)
A 组	10	45.40 $\pm$ 4.33 *	18.1 $\pm$ 3.7 *	4.564 $\pm$ 3.215
B 组	10	31.75 $\pm$ 3.87	28.0 $\pm$ 3.0	5.855 $\pm$ 3.238
C 组	10	43.34 $\pm$ 4.28 *	17.6 $\pm$ 2.5 *	4.950 $\pm$ 1.753
D 组	10	50.84 $\pm$ 4.23 *	13.6 $\pm$ 2.5 *	3.938 $\pm$ 1.336 *
E 组	10	51.99 $\pm$ 6.34 *	12.6 $\pm$ 4.0 *	2.564 $\pm$ 1.435 *
F 组	10	52.34 $\pm$ 6.22 *	11.6 $\pm$ 4.0 *	1.938 $\pm$ 1.647 *

注:与 B 组比较, * $P < 0.05$

Ca、P、ALP 及尿 Ca、P、Hop 含量的影响比较 在第 8 周时血 Ca、P、ALP 及尿 Ca、P、Hop 中尿 Ca 和尿 Hop A、C、D、E、F 组较 B 组的低,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而降低,但其相互之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组之间相互比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血 ALP 在 A、C、D、E、F 组较 B 组的高,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而升高,但其相互之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组之间相互比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其它各项指标各组之间相互比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 第 4 个月末时淫羊藿黄酮对被动吸烟大鼠的血 Ca、P、ALP 及尿 Ca、P、Hop 含量的影响比较 在 4 个月末时血 Ca、P、ALP 及尿 Ca、P、Hop 中尿 Ca 和尿 Hop 在 A、C、D、E、F 组较 B 组的低,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而降低,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组间比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血 ALP 在 A、C、D、E、F 组较 B 组的高,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D、E、F 组随淫羊藿黄酮剂量的增加而升高,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组间比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其它各项指标各组间比较其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 BMD 与生化指标的相关性 股骨和腰椎骨密度与 BGP、ALP 呈明显正相关 ($r = 0.784$ 及 0.816 , $P < 0.05$; $r = 0.743$ 及 0.807 , $P < 0.05$)。股骨和腰椎骨密度与 TRACP 的活性、Dpd 浓度、尿 Ca、尿 Hop 呈明显负相关 (r 分别 = -0.617 、 -0.608 、 -0.587 、 -0.611 , $P < 0.05$; r 分别 = -0.614 、 -0.621 、 -0.583 、 -0.617 , $P < 0.05$)。见表 5。

表4 第4个月末时淫羊藿黄酮对被动吸烟大鼠的血Ca、P、ALP及尿Ca、P、Hop含量的影响比较($\bar{x} \pm s$)

组别	血Ca (mmol/L)	血P (mmol/L)	血ALP (IU/L)	尿Ca (mmol/L)	尿P (mmol/L)	尿Hop (μmol/L)
A组	2.64 ± 0.36	1.92 ± 0.24	185.52 ± 12.31 *	0.95 ± 0.33 *	1.77 ± 0.34 *	97.15 ± 11.81 *
B组	2.45 ± 0.43	1.82 ± 0.26	115.34 ± 13.54	1.85 ± 0.53	2.01 ± 0.51	125.46 ± 10.15
C组	2.56 ± 0.27	1.94 ± 0.18	180.53 ± 14.71 *	1.05 ± 0.28 *	1.85 ± 0.38 *	98.13 ± 11.25 *
D组	2.62 ± 0.34	1.91 ± 0.37	181.61 ± 11.57 *	0.93 ± 0.47 *	1.79 ± 0.35 *	95.76 ± 12.31 *
E组	2.65 ± 0.26	1.95 ± 0.34	184.45 ± 12.43 *	0.92 ± 0.36 *	1.75 ± 0.42 *	93.47 ± 11.23 *
F组	2.68 ± 0.36	1.97 ± 0.25	187.21 ± 11.52 *	0.90 ± 0.37 *	1.72 ± 0.24 *	91.10 ± 12.19 *

注:与B组比较,* $P < 0.05$

表5 BMD与生化指标的相关性

骨密度	BGP	ALP	TRACP	Dpd	尿Ca	尿Hop
股骨	0.784	0.743	-0.617	-0.608	-0.587	-0.611
腰椎	0.816	0.807	-0.614	-0.621	-0.583	-0.617

3 讨论

3.1 被动吸烟诱导的大鼠OP病因十分复杂,目前认为被动吸烟诱导骨转换加快,骨吸收大于骨形成,使骨组织产生IL-1、TNF等,进一步促进骨吸收造成骨量大量丢失和骨结构发生改变导致OP产生。在防治方面,淫羊藿黄酮在被动吸烟诱导的大鼠骨质疏松症的防治中倍受关注。中医治疗OP有广阔的前景,最近研究发现一些植物雌激素有着与合成雌激素有相似的抗OP作用,其中主要有大豆异黄酮^[6]、红芪^[7,8]、中药葛根总异黄酮^[9,10]在防治OP中得到了肯定。张天蓝等^[11]发现淫羊藿黄酮苷及其代谢产物对大鼠成骨细胞的增生有明显的刺激作用,并能够促进成骨细胞合成分泌碱性磷酸酶,但对成骨细胞晚期分化指标骨钙素无显著作用。同时,使破骨细胞Actin-ring回缩,从而使骨吸收陷窝面积减少。此外,淫羊藿黄酮苷及其代谢产物通过影响成骨细胞中RANKL和OPG的表达而达到抑制破骨样细胞形成。认为淫羊藿黄酮苷及其代谢产物一方面抑制破骨样细胞形成和成熟的破骨细胞对骨基质的吸收,另一方面还能够通过刺激骨形成来调控骨代谢,其中刺激骨形成的效果较强。

3.2 本实验采用“密室熏烟法”给予实验组大鼠被动吸烟4个月,同时灌服淫羊藿黄酮结果表明A、C、D、E、F组的骨密度较B组的骨密度高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);E、F组的骨密度较A组的骨密度高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);D、E、F组的骨密度随淫羊藿黄酮剂量的增加而增加。表明应用淫羊藿黄酮或钙剂可防治被动吸烟造成大鼠骨量丢失,甚至增加骨量,从而使大鼠骨密度维持于较高水平。

3.3 骨代谢生化指标反映骨转化情况,骨吸收和骨形成两者间紧密偶联,可反映骨重建,预测骨丢失。血清骨代谢生化指标的改变反映出体内骨代谢平衡

的变化,可用来评价骨转换率,客观地反映骨形成和骨吸收的情况,临床上作为骨质疏松症早期诊断的指标之一。Dpd是骨内I型胶原重要组成成分,是骨的特异性标志物,在骨胶原合成过程中参与胶原分子间交叉连接,使分子间形成稳定的共价交联。骨骼更新期间,骨溶解,骨胶原蛋白水解,此时可释放出这些胶原交联键,Dpd以游离状态进入血液,并以原形从肾脏直接排出,是目前反映骨吸收的重要指标之一^[12]。尿钙测定,骨组织中含有大量的钙,骨吸收时钙被释放入血使尿钙增高,可反映骨钙严重丢失和骨吸收状态,对骨矿代谢研究具有重要价值。骨钙素又称为γ-羧基谷氨酸蛋白是一种维生素K依赖性钙结合蛋白,由成骨细胞合成,与骨基质结合部分释放入血,是反映骨形成速率的特异性指标之一^[13]。反映骨形成与骨吸收的生化指标近年来发展迅速,认为测定骨代谢的生化标志物可判断骨的转换情况。本研究中除测定血Ca、P及尿Ca、P含量等指标外,还测定了反映骨形成和骨吸收的生化指标BGP、ALP、Dpd和TRACP的活性,其结果显示给予淫羊藿黄酮干预的各组骨形成生化指标骨钙素与被动吸烟组相比升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);给予淫羊藿黄酮干预的各组骨形成生化指标骨钙素与空白对照组相比有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);给予高淫羊藿黄酮干预组骨吸收生化指标TRACP的活性和Dpd浓度与被动吸烟组相比下降明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明淫羊藿黄酮对骨形成和骨吸收指标的影响较大。

3.4 在整个实验的过程中,各组动物的血钙、血磷浓度基本保持稳定,变化不大,因为血钙、血磷浓度的稳定是机体维持生命活动的必要条件,一般情况下,钙、磷代谢失衡时,机体会通过自身的调节机理维持血钙、血磷浓度的稳定,因而尿钙的变化往往更能反映骨代谢的情况。血清ALP主要由骨和肝脏产生,骨ALP由成骨细胞分泌,其含量代表成骨细胞的活性。虽然血清总ALP受许多因素的影响,缺

乏特异性^[14],但是,在排除了肝病、甲亢等疾病的情况下,血清 ALP 仍然是一个反映成骨细胞活性的重要指标。Hop 是胶原蛋白的分解产物,尿 Hop 约 50% 来源于骨的胶原,因此,尿 Hop 在很大程度上能反映骨吸收分解的状况,可作为反映骨吸收的指标之一。从本实验的结果看,第 8 周被动吸烟组大鼠的各项生化指标已出现明显的异常,第 8 周和第 4 个月末,淫羊藿黄酮干预组的尿 Ca、血清 ALP、尿 Hop 浓度与被动吸烟组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明淫羊藿黄酮可以拮抗被动吸烟引起的异常骨代谢。

3.5 由于淫羊藿富含黄酮类化合物,并已被证明是其药理作用的主要有效成分,大量的试验已证实淫羊藿的抗骨质疏松作用与其所含的黄酮类物质有关。其作用机理主要体现在:(1)具性激素样作用,可防止性腺退化所致的骨质疏松的发生。有学者证实淫羊藿富含黄酮类能提高维甲酸所致 OP 大鼠前列腺和睾丸指数,股骨的干质量、灰质量、骨钙、骨磷和骨密度等明显提高,说明淫羊藿黄酮可通过保护性腺,从而抑制骨吸收和促进骨形成,防止骨量丢失^[15]。(2)直接抑制骨吸收和促进骨形成,使机体代谢处于骨形成大于骨吸收的正平衡状态,抑制骨量丢失。(3)淫羊藿黄酮中存在的抗炎成分可能影响骨代谢。国外有报道淫羊藿黄酮可通过阻断与花生四烯酸代谢有关的环氧化酶,显示抗炎作用^[16]。而多种炎性因子如 PGE2 等皆能影响骨吸收和骨形成,由此推测与淫羊藿黄酮影响骨代谢有关,其详细机理尚待进一步探讨。江永南等^[17]研究证实淫羊藿黄酮磷脂复合物可有效改善骨质疏松症大鼠的骨密度,提高血中 E_2 ,降低 IL-6 水平。

3.6 本研究分析了淫羊藿黄酮对被动吸烟诱导的大鼠骨代谢指标的改变,探讨其防治 OP 的作用。从结果看,给予淫羊藿黄酮干预的各组骨形成生化指标 BGP 与被动吸烟组相比升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);给予淫羊藿黄酮干预的各组骨形成生化指标 BGP 与空白对照组相比有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);给予高淫羊藿黄酮干预组骨吸收生化指标 TRACP 的活性和 Dpd 浓度与被动吸烟组相比下降明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。股骨和腰椎骨密度与 BGP、ALP 呈明显正相关($r = 0.784$ 及 0.816 , $P < 0.05$; $r = 0.743$ 及 0.807 , $P < 0.05$)。股骨和腰椎骨密度与 TRACP 的活性、Dpd 浓度、尿 Ca、尿 Hop 呈明显负相关($r = -0.617$, $r = -0.608$, $r = -0.587$, $r = -0.611$, $P <$

0.05 ; $r = -0.614$, $r = -0.621$, $r = -0.583$, $r = -0.617$, $P < 0.05$)。以上表明淫羊藿黄酮可促进人体对钙的吸收,延缓骨量的丢失,预防被动吸烟诱导的大鼠骨质疏松的发生。

参考文献

- Porter SE, Hanley EN Jr. The musculoskeletal effects of smoking[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2001,9(1):9-17.
- Gerdhem P, Obrant KJ. Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry and ultrasound[J]. Osteoporos Int, 2002,13(12):932-936.
- 雷光华,周江南,李康华. 被动吸烟对大鼠骨密度与骨代谢的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2002,19(2):127-129.
- 雷光华,周江南,李康华. 被动吸烟对大鼠腰椎骨密度和血浆 TNF 水平的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2002,12(10):60-62.
- 雷光华,李康华,李晶,等. 被动吸烟对大鼠骨代谢和血浆 TNF 水平的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005,11(3):314-316.
- 崔洪斌,那晓琳,刘颖. 大豆异黄酮对大鼠骨密度及骨代谢生化指标的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003,9(2):162-164.
- 苏开鑫,林智,王宏芬,等. 红芪对类固醇性骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2005,(4):445-447.
- 黄正良,崔祝梅,任远,等. 红芪多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中草药, 1992,23(9):469-473.
- 郑高利,张信岳,方晓林,等. 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨矿密度和骨强度的影响[J]. 中草药, 2001,32(5):422-425.
- 谈志龙,邢国胜,于顺禄,等. 中药葛根对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003,9(2):108-110.
- 张天蓝,黄健,许善锦,等. 淫羊藿黄酮苷及其代谢产物调控骨代谢的体外实验研究[J]. 首都医科大学学报, 2005,26(1):37-39.
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C, et al. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated[J]. Clin Chem, 1994,40(11):2022-2025.
- Weaver CM, Peacock M, Martin BR, et al. Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females[J]. J Bone Miner Res, 1997,12(10):1714-1720.
- 史伟铭. 骨质疏松症生化诊断进展[J]. 中国骨伤, 1997,10(6):62-63.
- 马慧萍,贾正平,葛欣,等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠试验性骨质疏松作用研究[J]. 华西药理学杂志, 2002,17(3):163-167.
- 原达雄. 淫羊藿浸膏抗炎作用的药理研究[J]. 国外医药·植物药分册, 1997,12(6):272-274.
- 江永南,莫红缨,陈济民. 淫羊藿黄酮磷脂复合物防治去势大鼠骨丢失的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2002,27(3):221-224.

[收稿日期 2010-07-27][本文编辑 谭毅 黄晓红]