

鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢所致骨质疏松大鼠的治疗作用

牛放, 赵雨*, 徐云凤, 张鹤, 林艳玲(长春中医药大学, 长春 130117)

摘要: 目的 研究鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用。方法 Wistar 大鼠, ♀, 随机分为 6 组: 假手术组, 模型对照组, 阳性对照组和鹿角脱盘胶原蛋白高、中、低剂量组。采用摘除双侧卵巢法建立骨质疏松模型, 术后 7 d 开始给药, 连续给药 90 d, 检测大鼠骨密度、血清碱性磷酸酶(ALP)活性和羟脯氨酸(Hyp)含量, 骨组织形态计量学参数、骨力学、体重和脏器系数等。结果 与模型对照组比较, 鹿角脱盘胶原蛋白治疗后大鼠骨密度显著增加、血清中 ALP 活性降低、Hyp 含量升高, 骨组织形态计量学参数及骨力学指标显著改善。体重和脏器系数无显著影响。结论 鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢所致的骨质疏松大鼠有一定的治疗作用。

关键词: 鹿角脱盘胶原蛋白; 骨质疏松; 去卵巢大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0093-05

Therapeutic Effects of Collagen of Antler Plate on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

NIU Fang, ZHAO Yu*, XU Yunfeng, ZHANG He, LIN Yanling(*Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study therapeutic effects of collagen of antler plate on osteoporosis in ovariectomized rats. **METHODS** Wister female rats were randomly divided into sham-operated group, osteoporosis model group, positive control

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAI38B06); 吉林省科技支撑计划(20096042)

作者简介: 牛放, 女, 硕士生

Tel: 13674304975

E-mail: niufang.317@163.com

*通信作者: 赵雨, 男, 博士, 教授

Tel: (0431)86172300

E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

group, collagen of antler plate high, medium and low-dose group. Osteoporosis model was established by bilateral ovaries extraction. After 7 days, the rats were treated consecutively for 90 days with collagen of antler plate. The effects of collagen of antler plate on bone mineral density, alkaline phosphatase(ALP) activity and hydroxyproline(Hyp) content, bone histomorphometry, bone mechanics, body weight and organ index were observed. **RESULTS** Compared with osteoporosis model group, after treated by collagen of antler plate, bone mineral density increased significantly, ALP activity decreased and Hyp content increased, bone histomorphometry, and bone mechanics were significantly improved, body weight and organ index had no statistical difference. **CONCLUSION** Collagen of antler plate can treat osteoporosis in ovariectomized rats.

KEY WORDS: collagen of antler plate; osteoporosis; ovariectomized rats

骨质疏松症是绝经后妇女的高发症,与卵巢合成激素的降低有关,可导致骨代谢发生异常,破骨细胞骨吸收活动加速,骨无机盐和有机质丢失增加,而成骨细胞功能则代偿性增强,为高转换型骨代谢,造成骨密度下降,骨组织形态结构被破坏,骨生物力学性能下降,骨折发生率增加。研究表明,摄食胶原蛋白可促进骨形成,增强低钙水平下的骨胶原结构,从而提高骨强度,即达到预防骨质疏松症的作用^[1-2]。鹿角脱盘是鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 已骨化的角或锯茸后翌年春季脱落的角基,分别称“梅花鹿角”、“马鹿角”,具有滋肾补虚、活血消肿等功效^[3-4]。目前对鹿角脱盘的研究主要集中于水溶性蛋白^[5-8],而对其中的胶原蛋白研究甚少。本实验主要研究鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢所致骨质疏松大鼠的治疗作用,为鹿角脱盘的开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 鹿角脱盘胶原蛋白的制备

梅花鹿角脱盘粉(购于吉林省长春市双阳区鹿乡镇)热水浸提,胰蛋白酶酶解,离心,上清冻干,即得鹿角脱盘胶原蛋白,采用 Folin-酚试剂法测定鹿角脱盘胶原蛋白中蛋白含量约为 66%。

1.2 实验动物

Wistar 大鼠,♀,体重(230±20)g,由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK-吉-2007-0003。

1.3 试剂

碱性磷酸酶(ALP)试剂盒、羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(放免法测定)均来源于中生北控生物技术股份有限公司。仙灵骨葆胶囊(批号 091119,0.5 g·粒⁻¹),贵州同济堂制药有限公司。

1.4 仪器

OLYMPUS 2700 型生化分析仪、BX51 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);HH6005 单光电子骨矿物质测定仪(北京核海高技术开发公司);

AG-107A 型自动控制电子万能试验机(日本岛津)。

2 方法

2.1 大鼠造模

Wistar 大鼠用 3%水合氯醛生理盐水溶液麻醉(10 mg·kg⁻¹),常规方法切除双侧卵巢。取 10 只大鼠,分别取出子宫,暴露卵巢,但不切除,再将其放回腹腔,此组为假手术组。所有大鼠术后腹腔注射青霉素(160 万单位·瓶⁻¹青霉素溶至 5 mL),0.2 mL·d⁻¹,连续给药 7 d。

2.2 分组与给药

除假手术组外,其余大鼠于术后第 7 天按体重随机分为模型对照组,阳性对照组,鹿角脱盘胶原蛋白高、中、低剂量组,每组 10 只,鹿角脱盘胶原蛋白高、中、低剂量组分别按 0.8, 0.4, 0.2 g·kg⁻¹ 剂量灌胃给药,阳性对照组按 1 g·kg⁻¹ 剂量灌服仙灵骨葆胶囊,假手术组及模型对照组给予同等剂量的蒸馏水,至第 90 天处死大鼠。

2.3 观测指标

2.3.1 骨密度 取股骨中段至下 1/3 处,采用单光子骨矿物质测定仪测定密度。

2.3.2 血清指标 末次给药结束后,腹主动脉采血分离血清,自动生化分析仪测定血清 ALP 活性和 Hyp 含量。

2.3.3 骨组织形态计量学参数 取右侧股骨,常规固定,脱钙,切片,HE 染色,应用多功能真彩色病理图像分析仪于 100 倍下,在干骺端生长板下 1~4 mm 近皮质处取视野,进行骨组织形态计量学测定,计算骨小梁个数(trabecular number, TN)、平均骨小梁厚度(mean trabecular plate thickness, MTPT)、平均骨小梁间距(mean trabecular plate spacing, MTPS)、骨小梁体积百分比(trabecular bone volume, TBV)及平均骨皮质厚度(mean cortical bone thickness, MCBT)。

2.3.4 骨力学指标 取左股骨进行骨生物力学试验。采用万能力学测定机跨距(L)为 15 mm,加载速度为 1 mm·min⁻¹ 进行三点弯曲实验。测出最大

抗弯曲力 F 。用公式 $\sigma=My/I=(8LF)/(\pi d^3)$ 计算骨应力(σ)。测量最大载荷($P_{\max}$)、最大挠度($L_{\max}$)、最大弯矩($M_{\max}$)、骨应变等生物力学参数。

2.3.5 脏器系数 在最后一次给药后称其体重，处死大鼠，取胸腺、脾、子宫称重，计算脏器系数。

2.4 统计方法

采用 SPSS 统计法对各组大鼠的测量数据进行统计分析，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组均数之间比较进行 LSD 方差分析统计。

3 结果

3.1 骨密度

与假手术组比较，模型对照组骨密度显著降低($P<0.01$)，表明去卵巢引起的大鼠骨质疏松造模成功。与模型对照组比较，鹿角脱盘胶原蛋白高、中、低剂量组的骨密度显著性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，表明鹿角脱盘胶原蛋白能有效防止骨质疏松大鼠的骨密度降低，结果见表 1。

表 1 鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effects of collagen of antler plate on bone mineral density($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	骨密度/g·cm ⁻²	升高率/%
假手术组	—	0.314±0.012	—
模型对照组	—	0.276±0.035 ¹⁾	—
阳性对照组	1	0.308±0.026 ²⁾	11.59
高剂量组	0.8	0.306±0.013 ³⁾	10.86
中剂量组	0.4	0.303±0.015 ³⁾	9.78
低剂量组	0.2	0.303±0.016 ²⁾	9.78

注：与假手术组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型对照组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$
Note: Compared with sham-operated group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

表 3 鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织形态计量学的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effects of collagen of antler plate on bone histomorphometry($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TN/n	MTPT/ μ m	MTPS/ μ m	TVB/%	MBCT/ μ m
假手术组	—	3.82±0.40	8.35±0.16	9.19±0.69	38.18±1.1	12.19±0.13
模型对照组	—	1.82±0.60 ¹⁾	7.91±0.14 ¹⁾	16.91±0.90 ¹⁾	20.31±2.2 ¹⁾	11.36±0.17 ¹⁾
阳性对照组	1.0	3.00±0.47	8.14±0.13 ³⁾	12.54±0.73 ⁴⁾	31.48±2.8	11.84±0.45 ³⁾
高剂量组	0.8	2.36±0.46 ²⁾	8.18±0.34 ²⁾	13.60±0.62 ⁴⁾	33.95±2.2 ⁴⁾	11.37±0.22
中剂量组	0.4	2.60±0.52 ³⁾	7.87±0.30	14.35±0.65 ⁴⁾	30.84±1.0 ⁴⁾	11.39±0.19
低剂量组	0.2	1.50±0.53	7.66±0.29	15.39±1.1 ³⁾	25.88±2.0 ⁴⁾	11.16±0.15

注：与假手术组比较，¹⁾ $P<0.001$ ；与模型对照组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ ，⁴⁾ $P<0.001$
Note: Compared with sham-operated group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$

3.4 骨力学指标

与假手术组比较，模型对照组 $P_{\max}$ 、 $M_{\max}$ 和 σ 均有显著性变化， $L_{\max}$ 和骨应变无统计学差异。与模型对照组比较，鹿角脱盘胶原蛋白各剂量组都

3.2 血清 ALP 活性和 Hyp 含量

与假手术组比较，模型对照组中血清 ALP 活性极显著增加($P<0.001$)，而 Hyp 含量有增加趋势，但没有统计学意义；与模型对照组比较，鹿角脱盘胶原蛋白各剂量组均能显著降低血清 ALP 活性，增加 Hyp 含量，结果见表 2。

表 2 鹿角脱盘胶原蛋白对去卵巢骨质疏松大鼠血清 ALP 和 Hyp 含量的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The effects of collagen of antler plate on ALP and Hyp in serum($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	Hyp/ μ g·L ⁻¹
假手术组	—	99.93±23	27.87±4.0
模型对照组	—	173.08±49 ¹⁾	29.65±3.3
阳性对照组	1.0	104.11±36 ³⁾	31.14±1.7
高剂量组	0.8	100.76±25 ⁴⁾	35.93±4.0 ³⁾
中剂量组	0.4	117.49±29 ³⁾	38.66±3.5 ⁴⁾
低剂量组	0.2	123.82±29 ²⁾	33.33±2.6 ²⁾

注：与假手术组比较，¹⁾ $P<0.001$ ；与模型对照组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ ，⁴⁾ $P<0.001$
Note: Compared with sham-operated group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$

3.3 骨组织形态计量学

模型对照组与假手术组比较，TN、MTPT、MTPS、TBV 和 MCBT 均有极显著性差异($P<0.001$)。与模型对照组比较，鹿角脱盘胶原蛋白各剂量组骨组织形态计量学均有显著性差异：TN 增加，MTPT 增厚，MTPS 减少，TBV 增大，而 MCBT 没有差异，结果见表 3。表明鹿角脱盘胶原蛋白能增加骨形成参数，减少骨吸收参数，能有效防止骨量丢失。

能显著提高 $P_{\max}$ 、 $M_{\max}$ 、 σ 和骨应变($P<0.05$)等骨力学指标，结果见表 4。表明鹿角脱盘胶原蛋白可以抑制骨质疏松大鼠骨脆性的增加，降低骨折的发生率。

表 4 鹿角盘胶原蛋白对去卵巢骨质疏松大鼠骨力学指标的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The effects of collagen of antler plate on bone mechanics($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$P_{\max}/\text{N}$	$L_{\max}/\text{mm}$	$M_{\max}/\text{N}$	$\sigma/\text{N} \cdot \text{mm}^{-2}$	骨应变/%
假手术组	—	107.10 $\pm$ 8.1	0.91 $\pm$ 0.28	535.50 $\pm$ 40	107.22 $\pm$ 15	4.58 $\pm$ 1.3
模型对照组	—	90.60 $\pm$ 6.4 ²⁾	0.90 $\pm$ 0.27	453.00 $\pm$ 32 ²⁾	89.85 $\pm$ 11 ¹⁾	4.52 $\pm$ 1.3
阳性对照组	1.0	99.50 $\pm$ 8.4 ³⁾	1.06 $\pm$ 0.10	497.50 $\pm$ 42 ³⁾	110.23 $\pm$ 23 ³⁾	5.29 $\pm$ 0.51
高剂量组	0.8	102.90 $\pm$ 11 ³⁾	1.12 $\pm$ 0.07 ³⁾	514.50 $\pm$ 59 ³⁾	95.87 $\pm$ 8.1	5.61 $\pm$ 0.33 ³⁾
中剂量组	0.4	99.10 $\pm$ 7.0 ³⁾	1.12 $\pm$ 0.06 ³⁾	495.50 $\pm$ 35 ³⁾	106.28 $\pm$ 21 ³⁾	5.60 $\pm$ 0.31 ³⁾
低剂量组	0.2	103.80 $\pm$ 12 ³⁾	1.16 $\pm$ 0.10 ³⁾	519.00 $\pm$ 62 ³⁾	108.56 $\pm$ 18 ³⁾	5.82 $\pm$ 0.50 ³⁾

注：与假手术组比较 ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$, 与模型对照组比较, ³⁾ $P<0.05$

Note: Compared with sham-operated group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$

3.5 体重和脏器系数

与假手术组比较, 模型对照组大鼠的体重极显著的增加($P<0.001$), 子宫系数极显著降低($P<0.001$), 结果见表 5。与模型对照组比较, 鹿角脱盘胶原蛋白各剂量组均无统计学意义。

表 5 鹿角盘胶原蛋白对去卵巢骨质疏松大鼠体重及脏器系数的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 5 The effects of collagen of antler plate on body weight and organ index($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g	子宫系数/ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$
假手术组	—	257.1 $\pm$ 18.85	0.305 6 $\pm$ 0.144 2
模型对照组	—	304.4 $\pm$ 27.64 ¹⁾	0.039 7 $\pm$ 0.008 9 ¹⁾
阳性对照组	1.0	299.0 $\pm$ 26.31	0.052 7 $\pm$ 0.043 3
高剂量组	0.8	316.4 $\pm$ 15.92	0.042 4 $\pm$ 0.007 0
中剂量组	0.4	303.2 $\pm$ 30.61	0.039 6 $\pm$ 0.006 6
低剂量组	0.2	300.7 $\pm$ 25.16	0.036 9 $\pm$ 0.011 1

注：与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.001$

Note: Compared with the sham-operated group, ¹⁾ $P<0.001$

4 讨论

4.1 去卵巢所致大鼠骨质疏松模型的建立

大鼠卵巢切除后雌激素水平降低形成的骨质疏松和妇女绝经后骨丢失有很多相似之处^[9], 是研究绝经后骨质疏松的发病机制和观察药物疗效的经典动物模型^[10]。本研究显示, 与假手术组比较, 模型对照组具有以下特点: ①股骨骨密度显著性降低; ②血清中 ALP 和 Hyp 增加, 揭示骨吸收与骨形成都有所增强, 但骨吸收远远超过骨形成; ③股骨骨松质骨小梁稀疏、变窄, 骨小梁间隙增大, 股骨中段皮质骨厚度变薄; ④股骨的骨生物力学性能降低; ⑤大鼠的体重极显著增加^[11], 子宫显著萎缩。以上结果表明, 去卵巢所致大鼠骨质疏松模型建立成功。

4.2 鹿角脱盘胶原蛋白对模型大鼠骨密度、体重及脏器系数的影响

骨密度是判断骨质量的重要依据, 是研究骨质疏松和评价药效的重要检测手段^[9, 12]。鹿角脱盘胶原蛋白能显著提高骨质疏松大鼠的骨密度, 表明鹿角脱盘胶原蛋白对于骨质疏松症有一定的预防及治疗作用, 但对由于雌激素减少所导致的大鼠体重增加和子宫萎缩无明显影响, 提示其作用机理可能不是通过雌激素样作用或调节下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能。

4.3 鹿角脱盘胶原蛋白对模型大鼠血清 ALP 活性和 Hyp 含量的影响

血清 ALP 活性和 Hyp 含量是常用的评价骨形成、骨转换的指标。血清中 ALP 有 50%来自于成骨细胞分泌。一般认为 ALP 的升高是伴随着骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增强引起的^[13]。Hyp 是胶原蛋白中的特殊氨基酸, 约占 10%~13%^[14]。鹿角脱盘胶原蛋白显著降低血清 ALP 活性, 改善去卵巢所致骨的高转换状态。值得注意的是, 本研究中鹿角脱盘胶原蛋白 3 个剂量组血清中 Hyp 含量均显著增加, 可能系鹿角脱盘胶原蛋白中的 Hyp 被吸收入血所致。

4.4 鹿角脱盘胶原蛋白对骨组织形态学和骨力学的影响

骨组织显微结构的改变是导致骨质疏松及并发骨折的重要病理环节, 骨组织形态计量学参数是直接反应骨形成与骨吸收的重要指标^[15]。骨力学是研究骨组织在外力作用下的力学特征和骨受力后的生物效应, 是对骨质量进行评定的一种可靠办法, 也是评价各种对抗骨丢失措施的最佳方法之一^[16]。鹿角脱盘胶原蛋白能提高骨组织形态学参数和骨力学指标, 表明鹿角脱盘胶原蛋白能防止骨微结构改变、骨韧性降低和骨脆性增加, 增强抵抗外力冲击的能力, 从而减少骨折的发生率。

本研究结果提示, 鹿角脱盘胶原蛋白能有效控

制去卵巢所致骨质疏松模型大鼠的骨重丢失,抑制骨吸收,促进骨形成,改善骨代谢的负平衡状态,对去卵巢导致的骨质疏松症具有良好的治疗作用,研究结果为鹿角脱盘产品开发提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] ZHANG H, ZHAO Y, LI Y Q, et al. Effects of deer tendons collagen on osteoporosis rats induced by retinoic acid [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2010, 33(3): 411-413.
- [2] LI Y C, CHENG B Z, JIN L Q, et al. The application of collagen [J]. Leather Chem(皮革化工), 2001, 19(3): 11-41.
- [3] QIU M M. Antlers (Velvet) research progress [J]. Guangxi Med J(广西医学), 2009, 31(7): 1015-1017.
- [4] ZHANG B X, JIN C A, ZHAO Y P. The chemical composition and development of antler plate [J]. Special Economic Animal and Plant(特种经济动植物), 2005(12): 7-8.
- [5] SU F Y, LI H P, WANG Y M, et al. Protein component exaction and its bioactivity determination of antler plate [J]. Animal Science and Veterinary Medicine(动物科学与动物医学), 2001, 18(2): 18-20.
- [6] QIU F P, MA B, WANG Z B, et al. Study on the purification and activity of antler plate protein [J]. J Changchun Univ Techonol(长春工业大学学报), 2007, 28(3): 144-147.
- [7] WANG L H, GAO Z G. The pharmacology activities and the clinical applied in the water soluble coronet composition [J]. Journal of Economic Animal(经济动物学报), 1999, 3(3): 18-22.
- [8] CHEN Y S, WANG Z Y, WANG B X. The research of treatment of breast hyperplasia of antler plate injection [J]. J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 1987(2): 12-15.
- [9] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological experiments methodology(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [10] ZENG W X, SHEN P Y, SHU Y Y, et al. Compound traditional Chinese medicine versus hormone replacement therapy for serum cytokine level in post menopausal osteoporosis patients [J]. J Clin Rehabil Tiss Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11(27): 5421-5423.
- [11] SHIM J G, YEOM S H, KIM H J, et al. Bone loss preventing effect of Sophorae Fructus on ovariectomized rats [J]. Arch Pham Res, 2005, 28(1): 106-110.
- [12] XIE Z, LI Q H, MENG P, et al. Characteristics of osteoporosis models in ovariectomized rats [J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床康复), 2006, 10(28): 79-81.
- [13] PANG S H, ZENG C Q, LAI X L. The research of osteoporosis treatment of granules of bone thinning [J]. Guangxi Tradit Chin Med(广西中医药), 2008, 31(2): 54-56.
- [14] JIANG T D, ZHANG C P. Collagen(胶原蛋白) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 3.
- [15] NIU L Y, WANG X G, LI Q, et al. The effect of Bak Foong Pill on ovariectomized osteoporosis rats parameters of bone histomorphometry [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2009, 31(4): 527-529.
- [16] CHEN P, TANG G Z, MA H S, et al. The experimental study on biomechanics for osteoporosis animal model remedied by some kinds of cure methods [J]. Beijing Biomed Eng(北京生物医学工程), 2008, 27(2): 200-201.

收稿日期: 2011-03-14