

# 骨碎补总黄酮对血管内皮细胞功能和去卵巢大鼠血管形成的影响

上官文姬<sup>1</sup> 李展春<sup>2</sup> 程光齐<sup>2</sup> 汤璐敏<sup>1</sup> 李鹤<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:分析骨碎补总黄酮对大鼠血管内皮细胞功能和血管形成的影响。方法:体外培养大鼠血管内皮细胞,用不同浓度(1,10,100 mg/L)的骨碎补总黄酮干预后,MTT 法检测细胞增殖,ELISA 法检测内皮素(ET)和血管内皮生长因子(VEGF),Griess 法检测 NO 的表达;利用去卵巢骨质疏松大鼠模型(36 只,随机分为去卵巢组、假手术组和骨碎补治疗组),骨碎补总黄酮治疗 3 个月后,检测大鼠血清中 ET,VEGF 和 NO 的表达,骨密度和股骨远端微血管密度变化。结果:各浓度的骨碎补总黄酮均能促进血管内皮细胞的增殖,而中、高浓度促增殖效果较好;中、高浓度的骨碎补总黄酮在体内外均可以抑制 ET,同时增强 NO 的表达;股骨远端血管计数结果显示骨碎补治疗组明显多于去卵巢组,并且与骨密度呈正相关;骨碎补总黄酮在体外可以增强内皮细胞 VEGF 的表达,但对去卵巢大鼠血清中 VEGF 的表达无影响。结论:骨碎补总黄酮可促进血管内皮细胞增殖,同时可以调节内皮细胞功能,促进血管形成,从而发挥抗骨质疏松作用。

**[关键词]** 骨碎补总黄酮;血管内皮细胞;血管形成;骨质疏松

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2017)01-0005-04

## Effect of Drynaria Total Flavonoids on the Function of Vascular Endothelial Cells and Angiogenesis in Ovariectomy Rats

SHANGGUAN Wenji<sup>1</sup> LI Zhanchun<sup>2</sup> CHENG Guangqi<sup>2</sup> TANG Lumin<sup>1</sup> LI He<sup>1△</sup>

<sup>1</sup> Department of Traditional Chinese Medicine, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China;

<sup>2</sup> Department of Orthopedics, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of drynaria total flavonoids(DTF)on the function of vascular endothelial cells (VECs)and the angiogenesis in ovariectomy rats. **Methods:** The VECs of rats were cultured in vitro, and intervened with different concentrations(1,10,100 mg/L)of DTF. The proliferation of VECs was examined with MTT method, the levels of endothelin(ET)and VEGF were examined with ELISA method, and the expression of NO was detected with Griess method. The ovariectomized rat model of osteoporosis was used(36 rats were randomly divided into ovariectomized group, sham-operation group and drynaria treatment group). The expression of ET, VEGF and NO in the serum, the change of bone mineral density and micro-vessel density of the distal femur were measured 3 months after treating with DTF. **Results:** All the concentrations of DTF could promote the proliferation of VECs, while the effect of the medium and high concentration was better. The medium and high concentration of DTF could inhibit the expression of ET, while increase the expression of NO at the same time. It was showed that the osteoclast treatment group was significantly more than ovariectomized group in the vascular count of distal femur, and it was positively correlated with bone mineral density. DTF could

enhance the expression of VEGF in endothelial cells, but was not effecting on the expression of VEGF in the serum of ovariectomized rats. **Conclusion:** DTF can promote the proliferation of VECs. Meanwhile, it can regulate the function of VECs, promote the angiogenesis, and thereby plays a role in anti-osteoporosis.

**Keywords:** drynaria total flavonoids; vascular endothelial cell; angiogenesis; osteoporosis

基金项目:国家自然科学基金-青年基金项目(81403443)

上海市卫计委中医药项目(2014JQ014A)

上海市‘杏林新星’资助计划

<sup>1</sup> 上海交通大学医学院附属仁济医院中医科(上海, 200127)

<sup>2</sup> 上海交通大学医学院附属仁济医院骨科

△通信作者 E-mail: lihe1972@hotmail. com

骨质疏松是老年人中相当常见并明显影响老年人生活质量的主要疾患之一,其发病机制十分复杂;近年来,血管内皮细胞及其功能在骨质疏松发病机制中越来越受到重视。多项研究显示血管生成可以引起骨再生和骨修复,从而与绝经后骨质疏松有着密切关系<sup>[1]</sup>。骨碎补是常用补肾中药之一,具有补肾壮骨、续伤止痛的功能,研究显示其主要成分骨碎补总黄酮可以用来治疗骨质疏松症;然而,其作用机制还不是很清楚<sup>[2-4]</sup>。本研究探讨了骨碎补总黄酮对大鼠血管内皮细胞功能和血管形成的影响,为临床应用骨碎补治疗骨质疏松症提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 药物和试剂** 骨碎补总黄酮(北京岐黄制药有限公司);MTT,NO检测试剂盒(江苏碧云天公司);DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(美国BD公司);ET(内皮素)和VEGF(血管内皮生长因子)ELISA试剂盒(美国RD公司)。

**1.1.2 实验动物** 20只1日龄SD新生大鼠和6月龄SD大鼠36只,雌性未孕,体质量265~305 g(上海羲森生物科技有限公司)。所有大鼠均分开饲养在条件相同的鼠笼中。

**1.1.3 实验仪器** 双能X线骨密度检测仪(美国HOLOGIC公司);酶标仪(美国BIO-RAD公司);分光光度计(Biotek)。

### 1.2 体外实验方法

**1.2.1 大鼠血管内皮细胞培养** 取出生1 d的SD新生仔鼠,无菌取出肺组织,用PBS冲洗除去胸膜,剪成约1 mm<sup>3</sup>大小的组织块,加含10%血清低糖DMEM培养基,放入6 cm培养皿中进行组织块培养,37℃,5%CO<sub>2</sub>,约3~5 d细胞爬出,0.25%胰酶消化,过滤,去除组织块,继续培养1周后,消化传代培养;本实验采用第五代细胞。

**1.2.2 细胞增殖实验** MTT法检测骨碎补总黄酮对血管内皮细胞增殖的影响。取第五代血管内皮细胞,按照6×10<sup>3</sup>细胞接种于96孔板,每孔100 μL,培养12 h细胞同步化后,将空白对照组换成新的完全培养基100 μL,实验组分别换成含不同浓度骨碎补(1,10,100 mg/L)的培养基100 μL,每组6孔。继续培养12,24,36,48 h,然后按照说明书加入MTT溶液作用后,放入酶标仪上检测,570 nm处获取吸光度值。

**1.2.3 培养液中ET,NO和VEGF测定** 采用第五代内皮细胞,以5×10<sup>5</sup>个/mL的密度接种于6孔细胞培养板,均加入含10% FBS的DMEM,同步化12 h后,实验组分别换成含不同浓度骨碎补(1,10,100 mg/L;低、中和高浓度)的培养液,在不同的时间点(24和48 h)收集每孔100 μL上清液,离心去除杂质及细胞碎片,之后

进行相关检测。采用ELISA试剂盒对共培养体系中的ET和VEGF表达进行检测,通过试剂盒提供的标准品进行梯度稀释获得标准曲线;在微量滴定板上加样,在450 nm波长光读取数值;ET和VEGF浓度通过标准曲线来推算。NO检测采用Griess法,严格按照说明书操作进行检测;用微量培养板分光光度计(Biotek)测定各样品在540 nm处的吸光度。

### 1.3 体内实验方法

**1.3.1 绝经后骨质疏松大鼠模型分组和造模以及药物处理** 36只大鼠随机分为3组( $n=12$ ):去卵巢组、假手术组和骨碎补治疗组。大鼠采用腹腔内注射氯胺酮(75 mg/kg)麻醉成功后,经腰背部双侧切口进入腹腔,切除两侧卵巢后冲洗缝合伤口。假手术组:在卵巢附近切除和卵巢重量相等的脂肪。去卵巢术后第3天,对治疗组大鼠进行骨碎补总黄酮溶液灌胃处理。去卵巢组和假手术组每日分别以生理盐水(6 mL/kg)灌胃。把碎补总黄酮胶囊(0.25 g/粒)制成溶液。骨碎补治疗组每日按35 mg/kg剂量给予骨碎补总黄酮溶液(6 g/L)灌胃,相当于成人剂量0.75 g/d。所有大鼠治疗3个月后,腹腔内注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后处死取材。

**1.3.2 骨密度测定** 在处理3个月后,分别通过双能X线骨密度检测仪测量第4腰椎骨密度,用自带的软件进行数据分析。

**1.3.3 血清中ET,NO和VEGF测定** 在处死大鼠前,采集腹主动脉血液,离心后收集100 μL血清。利用1.2.3相同的方法检测ET,NO和VEGF表达变化。

**1.3.4 骨髓血管形成测定** 取大鼠股骨远端标本常规脱钙、石蜡包埋。采用CD34作为血管内皮细胞的标记抗原进行免疫组化染色,具体操作步骤按试剂盒说明进行。然后,于显微镜100倍视野下,随机选取3个视野,计数微血管,取平均值;参考文献[5]的骨髓微血管计数方案对每张切片进行微血管计数。任何呈棕黄色阳性的内皮细胞或内皮细胞簇且与邻近血管和骨小梁清楚分开者为1个能够计数的血管,不以是否有管腔或管腔中是否有红细胞为判断标准,骨小梁内或与骨小梁相连的血管被排除在外。

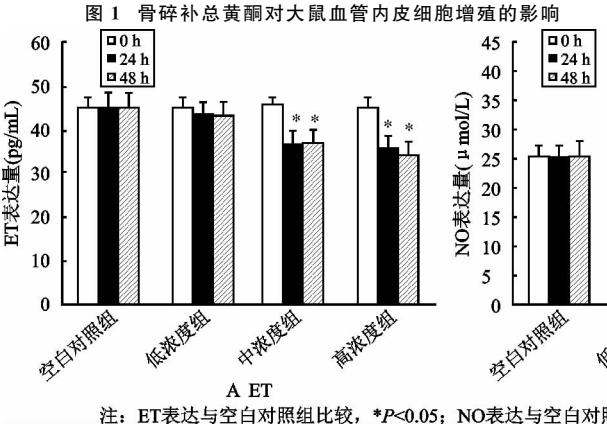
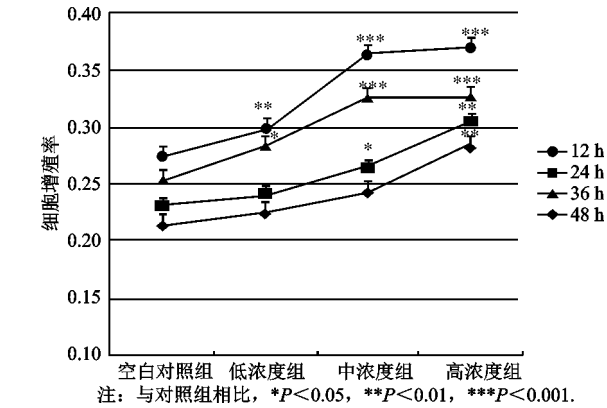
### 1.4 统计学方法

各项测量指标结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件处理数据,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨碎补总黄酮对血管内皮细胞增殖的影响

MTT检测结果显示各含药血清组细胞增殖率明显高于空白组,其中以骨碎补含药血清的中、高浓度促增殖效果较好;但在作用36 h后,两者促增殖效果相似(图1)。

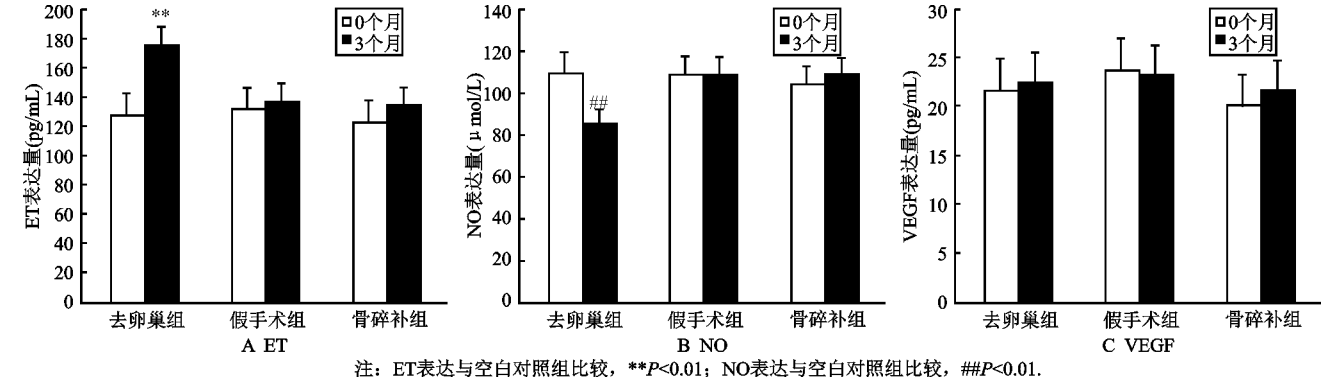


**2.3 骨密度测定结果显示**

去卵巢组大鼠术后 3 个月骨密度明显降低,说明造模成功。骨碎补治疗组和假手术组大鼠骨密度在术后 3 个月均无明显降低;而术后 3 个月时,骨碎补治疗组骨密度与假手术组相比较低,但差异无统计学意义(表 1)。

表 1 3 组大鼠干预后不同时间点腰椎骨密度比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	0 个月	3 个月
去卵巢组	12	0.228 $\pm$ 0.02	0.174 $\pm$ 0.03
假手术组	12	0.222 $\pm$ 0.03	0.238 $\pm$ 0.04
骨碎补组	12	0.226 $\pm$ 0.02	0.215 $\pm$ 0.02



**2.5 大鼠股骨远端微血管计数**

与去卵巢组相比,骨碎补治疗组微血管计数结果(单位:个/100 倍视野)显示微血管显著增多(2.37 $\pm$

**2.2 骨碎补总黄酮对内皮细胞培养液中 ET,NO 和 VEGF 表达的影响**

骨碎补总黄酮中,高和中浓度组 ET 表达量较空白对照组明显降低( $P<0.05$ );低浓度组 ET 表达量有降低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );与对照组相比,高、中浓度组 NO 和 VEGF 的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。各个测量指标 24 h 和 48 h 两个时间点的差异和中、高浓度组之间的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )(图 2)。说明中浓度的骨碎补总黄酮在 24 h 即可达到药效,增加药物浓度和作用时间并不能增强药物的效能。

**2.4 血清中 ET,NO 和 VEGF 测定**

去卵巢大鼠给予骨碎补总黄酮治疗 3 个月后,与对照组相比,ET 的表达量显著减少( $P<0.05$ ),而 NO 的表达量则显著升高( $P<0.05$ );假手术组和骨碎补治疗组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。然而,各组大鼠血清中 VEGF 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 3。

1.03 vs 1.03 $\pm$ 0.95, $P<0.05$ );骨碎补治疗组微血管数低于空白对照组,但差异无统计学意义(2.37 $\pm$ 1.03 vs 2.58 $\pm$ 1.23, $P>0.05$ ),见图 4。

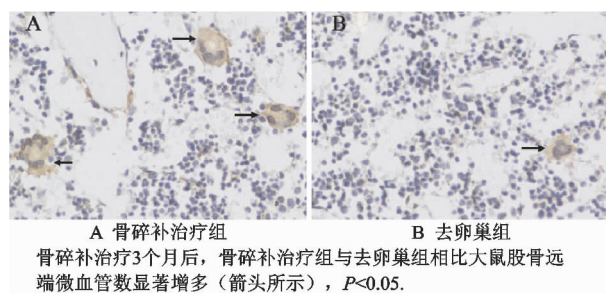


图4 大鼠股骨远端微血管密度变化( $\times 200$ 倍)

### 3 讨论

骨质疏松不仅引起老年人病残和生活质量下降,而且给家庭和社会造成极大的经济负担,已成为当今世界广泛关注的严重社会问题<sup>[6]</sup>。骨碎补总黄酮是中药骨碎补的主要有效成分,初步研究表明骨碎补总黄酮对骨质疏松有治疗作用,但详细的作用机制仍不清楚<sup>[2-4]</sup>。血管是骨形成过程中的重要因素,血管生成在维持骨再生-骨吸收动态平衡过程中有重要作用<sup>[7]</sup>。有研究显示绝经后骨质疏松的发生可能与骨微血管的减少有关,且促进血管生成具有抗骨质疏松作用<sup>[8,9]</sup>。因此,研究骨碎补总黄酮对血管内皮细胞和血管形成的影响,对于阐明骨碎补总黄酮治疗骨质疏松的作用途径和机制有着重要意义。

血管内皮细胞是人体分布最为广泛的细胞类型之一,是血管壁组织和血液之间的第一道通透性屏障。本实验采用分离培养的大鼠血管内皮细胞,在骨碎补总黄酮作用不同时间后,各浓度含药血清均有促进血管内皮细胞增殖的作用,并且其促增殖活性具有时间依赖性和浓度依赖性。结合以往研究结果说明相似浓度的骨碎补总黄酮在促进成骨细胞增殖的同时<sup>[10,11]</sup>,对血管内皮细胞也具有同样的促增殖作用。

内皮细胞结构和功能的完整在维持机体生理功能方面有重要意义。内皮受损后将产生和释放多种血管活性物质,其中最主要的是ET,它具有强大的血管收缩作用。有研究显示去卵巢骨质疏松大鼠血清中ET的表达明显高于空白对照组<sup>[12]</sup>;而Haenggi等的研究发现经雌激素治疗的绝经后骨质疏松患者血清中ET明显降低,说明ET可以影响骨代谢<sup>[13]</sup>。NO是血管内皮舒张因子,具有强大的血管舒张、抑制氧源性自由基产生、防止白细胞粘附于血管壁、抑制血管增生等多种作用。研究认为ET/NO是一对重要的血管收缩/舒张因子,它们之间的平衡受到破坏,将导致微循环血管功能紊乱,从而影响骨代谢<sup>[14]</sup>。近年有研究发现,绝经后骨质疏松症患者雌激素水平下降,导致血管内皮细胞分泌ET和NO异常,直接影响骨微循环,导致血液中的营养不能正常输送到骨组织而影响到骨代谢,这可能是骨质疏松发病机制之一<sup>[9,12]</sup>。体外实验显示中、高浓度的骨碎补总黄酮在抑制内皮细胞分泌ET的同时增强其NO的表达,进而利用去卵巢大鼠骨质疏松模型发现骨碎补总黄酮可以明显降低大鼠血

清中ET/NO的比值,说明骨碎补总黄酮可以在体内、外调节ET和NO的表达,维持其平衡,从而调节血管内皮细胞发挥正常的功能。

局部血管生成对骨质疏松的发病和转归有着重要的影响。有研究发现去卵巢的骨质疏松小鼠骨内部血管分布明显少于对照组,说明骨局部血管形成和骨质疏松有明显的关联<sup>[9,15]</sup>。另外也有研究者从不同角度回顾了骨质疏松和血管的关系,认为老龄化的血管功能障碍可能与骨质疏松症有关,通过控制血管生成可以降低骨质疏松的危险因素,有助于降低骨质疏松相关疾病的发病率和死亡率<sup>[16,17]</sup>。还有研究显示,卵巢切除后,在促进细胞增生、凋亡和骨吸收的同时也抑制了血管生成和骨骼发育<sup>[18]</sup>,间接证实了局部血管生成和骨质疏松的关系。本研究利用去卵巢大鼠给予骨碎补总黄酮治疗3个月后,在股骨远端血管计数显示治疗组明显多于去卵巢组,并且与骨密度呈正相关,初步说明促进血管形成可能是骨碎补总黄酮治疗骨质疏松的机制之一。

VEGF作为一种重要的生长因子,可以促进内皮细胞发挥功能,但其对骨细胞的作用较为复杂,具有成骨和破骨双重效应,详细的作用机制仍不清楚<sup>[19]</sup>。笔者前期研究结果显示骨碎补总黄酮可以增强大鼠成骨细胞血管VEGF的表达<sup>[20]</sup>,本实验中也观察到骨碎补总黄酮在体外可以使内皮细胞VEGF的表达升高,但在去卵巢骨质疏松大鼠血清中VEGF的表达却与对照组无差异。因为本实验在体内试验中只设立了干预3个月这一个观察时间点,所以并不能完全说明骨碎补总黄酮调节VEGF的表达在治疗骨质疏松过程中的作用,需要进一步的研究来证实。

本研究首次发现骨碎补总黄酮具有促进血管内皮细胞增殖的作用,同时有调节内皮细胞的功能,可以通过促进血管形成从而具有抗骨质疏松作用。本研究从血管内皮细胞的功能和血管形成的新视角,阐明了骨碎补治疗骨质疏松的新依据。但由于骨碎补总黄酮是复合物,成分复杂,具体的有效成分和最佳剂量还需要进一步研究明确。

### 参考文献

- [1] Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561:109-117.
- [2] 匡立华,贾庆运,谭国庆,等. 骨碎补防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(8):1000-1004.
- [3] 倪力刚,刘康,史晓林. 不同浓度骨碎补总黄酮对模型大鼠的组织蛋白酶K及骨矿含量的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(3):8-10.
- [4] 李展春,程光齐,臧危平,等. 骨碎补治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(4):9-11.

- [5] Padró T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 95(8): 2637-2644.
- [6] Wang Y, Tao Y, Hyman ME, et al. Osteoporosis in China [J]. *Osteoporos Int*, 2009, 20(10): 1651-1662.
- [7] Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration [J]. *Bone*, 2016, 83: 197-209.
- [8] Liu XD, Cai F, Liu L, et al. MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation [J]. *Biol Chem*, 2015, 396(4): 339-347.
- [9] 朱蕾, 赵小英, 卢兴国. 去卵巢大鼠骨密度变化与骨髓组织血管生成的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(9): 1801-1805.
- [10] 宋渊, 李盛华, 何志军. 骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(2): 125-128.
- [11] 李洋, 康倩, 荣婵, 等. 骨碎补总黄酮对 MLO-Y4 细胞增殖、分化、矿化和凋亡影响的探究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(5): 592-598.
- [12] 刘彦凤, 袁捷, 全世建, 等. 木豆叶对去卵巢大鼠血管内皮细胞功能的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 15(2): 142-152.
- [13] Gulhan I, Kebapcilar L, Alacacioglu A, et al. Postmenopausal women with osteoporosis may be associated with high endothelin-1 [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 25(10): 674-678.
- [14] Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36(5): 212-214.
- [15] Ding WG, Wei ZX, Liu JB. Reduced local blood supply to the tibial metaphysis is associated with ovariectomy-induced osteoporosis in mice [J]. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(1): 25-29.
- [16] 吴海洋, 索欢, 王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(2): 241-244.
- [17] Byon CH, Chen Y. Molecular mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease: the link between bone and the vasculature [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(4): 206-215.
- [18] Orlic I, Borovecki F, Simic P, et al. Gene expression profiling in bone tissue of osteoporotic mice [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2007, 58(1): 3-11.
- [19] 林佳琼, 吴文. 血管内皮生长因子与骨质疏松的关系[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2015, 8(4): 374-378.
- [20] 上官文姬, 李鹤, 汤璐敏. 骨碎补总黄酮对大鼠成骨细胞 VEGF 和 FGF-2 表达的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(8): 38-41.