

红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响

卢建华¹ 卢烨超^{2△} 金红婷² 徐孝平² 沈家峰² 任洁³ 周桦³

[摘要] 目的:明确红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响。方法:取 12 周龄 Wistar 雌性大鼠 40 只,随机分为结合雌激素组、红曲组、模型组、假手术组,每组 10 只。前三组行完整双侧卵巢摘除术,假手术组仅打开腹腔,不切除卵巢。灌胃 12 周后,处死各组动物,采用多光谱成像系统检测骨密度,用 ELISA 法测定各组大鼠血清中 ALP 及 TRAP,用 Image Pro Plus 对免疫组化染色图像结果进行定量分析。结果:红曲组 TNF- α 免疫组化表达水平低于模型组 ($P < 0.05$),红曲组 RANK 免疫组化表达水平低于模型组 ($P < 0.05$)。结论:红曲可以提高血清 ALP 表达水平,降低血清 TRAP 表达水平,能够通过降低 TNF- α 水平及 RANK 水平来提高去卵巢大鼠骨密度,其机理与雌激素类似,可能与成骨细胞及破骨细胞活跃程度有关。

[关键词] 红曲;免疫组化;骨质疏松;去卵巢大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)09-0005-04

Effect of Red Yeast Rice on the Expression of Serum ALP and TRAP, TNF- α and RANK of Bone Tissue in Ovariectomized Osteoporosis Rats

LU Jianhua¹ LU Yechao^{2△} JIN Hongting² XU Xiaoping²
SHEN Jiafeng² REN Jie³ ZHOU Hua³

¹The First Hospital, Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China;

²Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

³Traditional Chinese Medicine in Xiaoshan District of Hangzhou, Hangzhou 311201, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of red yeast rice on the expression of serum ALP and TRAP, TNF- α and RANK of bone tissue in ovariectomized osteoporosis rats. **Methods:** Forty female Wistar rats of 12 weeks old were randomly divided into the combination estrogen group, the red yeast rice group, the model group and the sham-operation group, with 10 rats in each group. The first three groups were treated with completely bilateral ovariectomy, while the sham-operation group were only treated to open the abdominal cavity without removing the ovaries. After 12 weeks of gavage administration, the animals of each group were sacrificed. The bone mineral density was measured by multi-spectral imaging system, the serum ALP and TRAP of rats in each group were measured by ELISA method, and the results of immunohistochemically staining image were quantitatively analyzed by Image Pro Plus. **Results:** The immunohistochemically expression level of TNF- α and RANK in the red yeast rice group were lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Red yeast rice can improve the expression of serum ALP and reduce the expression of serum TRAP. It can improve the bone density of ovariectomized rats by reducing TNF- α and RANK levels. The mechanism is similar to that of estrogen, which may be related to the osteoblast and osteoclast activity.

Keywords: red yeast rice; immunohistochemistry; osteoporosis; ovariectomized rats

红曲作为一种具有与他汀类药物相似功用的调脂中药,有增加骨密度、增强骨强度的功效,可用于提高血清激素水平^[1]。RANK 是 RANKL 的唯一受体,两

者结合能够促进破骨细胞的形成与成熟^[2,3]。肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 通过前列腺素 E2 (Prostaglandin E2, PGE2) 诱导 RANKL 的表达并降低 OPG 的表达,从而促进破骨细胞生成、分化和成熟。雌性大鼠在行卵巢切除术后,骨吸收大于骨形成,松质骨的骨转化加快、骨量减少、骨强度下降,这种骨代谢的变化与早期绝经后妇女类似^[4,5]。因此,选择去卵巢大鼠骨质疏松模型作为实验对象,并选

¹ 浙江中医药大学附属第一医院(杭州,310006)

² 浙江中医药大学

³ 杭州市萧山区中医院

[△]通信作者 E-mail:247615880@qq.com

择红曲作为中药干预药物来观察骨密度、TNF- α 、RANK 免疫组化及血清激素水平的变化,现总结报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

12 周龄健康雌性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 250 ~ 300 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,使用许可证 SYXK(浙)2013-0184。

1.2 试剂与仪器

红曲(浙江桐君堂中药饮片有限公司提供),结合雌激素(红丽来,新疆新姿源生物制药有限责任公司,生产批号 20141201),动物血清检验试剂盒(购于杭州诚维生物公司),Anti-TNF alpha 抗体[TNF706 + P/T2](英国,Abcam),RANK/TNFRSF11A Antibody (9A725)(美国,NOVUS),istostain-Plus IHC Kit, DAB,broad spectrum(中国,Solarbio),EDTA Na²(中国,Solarbio),4%多聚甲醛(中国,Solarbio),多光谱成像系统 4 000 mm pro(美国,Carestream),恒温生化培养箱(中国,博迅),冷冻高速离心机(美国,Thermo),多功能酶标仪(美国,Thermo),洗板机(美国,Bio-Rad),移液器(德国,Eppendorf),倒置显微镜(日本,Olympus),普通光学显微镜(日本,Olympus),脱水机(德国,莱卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物制备 红曲水提液(浙江中医药大学附属第一医院制剂室提供),浓度为 1.25 g/mL;结合雌激素水溶液(由蒸馏水和结合雌激素配制),水溶液浓度为 6.25 μ g/mL。

1.3.2 分组及造模 将 40 只大鼠随机分成 4 组,每组 10 只,分别为红曲组、雌激素组、模型组和假手术组。其中红曲组、雌激素组、模型组分别腹腔注射氯氨酮(5 mg/100 g)麻醉条件下打开腹腔去除双侧卵巢,逐层缝合,假手术组仅打开腹腔,不切除卵巢。对每组大鼠称重,以 10 mL/kg 分别予红曲提取物(红曲组)、结合雌激素水溶液(雌激素组)及蒸馏水灌胃(模型组和假手术组)。实验期间每周称重 1 次,调节用量。

1.3.3 检测实验指标 12 周后,处死各组动物,摘眼球取血,离心取血清检测生化指标。分别取 L₅ 椎体及右侧胫骨进行骨密度检测,取右侧股骨进行免疫组化检测,具体操作方法如下。1)血生化指标:摘眼球取血,离心(3 000 r/min,10 min)后分离血清,分装于小塑料管中,-70 $^{\circ}$ C 冷冻保存备用。检测前将血清标本置于室温复融。用 ELISA 法测定各组大鼠血清中碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase,ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate Resistant Acid Phosphatase,TRAP)。2)骨密度测定:每组大鼠取 L₅ 椎体及右侧

胫骨,使用多光谱成像系统检测骨密度(Bone Mineral Density, BMD)。3)取右侧股骨进行 TNF- α 及 RANK 免疫组化染色观察。取右侧股骨置于 4%的多聚甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 环境下固定 48 h,再放入 15% EDTA 溶液中脱钙 4 周,每 3 d 更换 1 次脱钙液,脱钙完成后,标本经梯度酒精逐级脱水,石蜡包埋、切片,切片厚度为 4 μ m,用免疫组化试剂盒进行免疫组化染色,图像结果采集后使用 Image Pro Plus 对图像采用集分光密度法进行数据化测量分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较用 LSD 法统计,检验水准 $\alpha = 0.05$,取双侧。

2 结果

2.1 骨密度测定结果

统计结果见表 1,胫骨骨密度,模型组与假手术组相比骨密度下降,差异有统计学意义($P = 0.009$),说明造模成功;红曲组与结合雌激素组骨密度均高于模型组,差异有统计学意义($P = 0.022, 0.007$)。腰椎骨密度,模型组与假手术组相比骨密度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明造模成功;红曲组与结合雌激素组骨密度均高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.001, P = 0.001$),说明红曲组与结合雌激素组有治疗意义。

表 1 各组大鼠骨密度(BMD 值)比较($\bar{x} \pm s, g/cm^3$)

组别	<i>n</i>	胫骨骨密度	腰椎骨密度
结合雌激素组	10	4.507 7 \pm 0.634 5	2.925 2 \pm 0.399 6
红曲组	10	4.390 4 \pm 0.540 6	2.702 2 \pm 0.142 4
模型组	10	3.817 2 \pm 0.316 9	2.167 1 \pm 0.244 3
假手术组	10	4.479 0 \pm 0.589 1	3.178 9 \pm 0.389 7
<i>F</i>		3.694	18.927
<i>P</i>		0.020	<0.001

2.2 血清碱性磷酸酶(ALP)测定结果

统计结果见表 2,模型组与假手术组相比表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);红曲组与结合雌激素组表达水平平均高于模型组,差异有统计学意义($P = 0.023, 0.011$)。

表 2 各组大鼠血清 ALP(OD 值)比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清 ALP 表达水平
结合雌激素组	10	2 641.434 0 \pm 122.810 3
红曲组	10	2 623.605 1 \pm 99.104 3
模型组	10	2 491.754 7 \pm 59.812 0
假手术组	10	2 755.461 5 \pm 183.274 5
<i>F</i>		7.520
<i>P</i>		<0.001

2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)测定结果

统计结果见表 3,模型组与假手术组相比表达水平上升,差异有统计学意义($P<0.05$);红曲组与结合雌激素组表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P=0.045,P<0.001$)。

表 3 各组大鼠血清 TRAP(OD 值)比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血清 TRAP 表达水平
结合雌激素组	10	61.099 6±5.666 0
红曲组	10	65.366 5±4.064 7
模型组	10	69.951 4±4.383 4
假手术组	10	52.718 1±5.464 8
F		21.997
P		<0.001

2.4 胫骨上端 TNF-α 免疫组化表达测定结果

统计结果见表 4,模型组与假手术组相比表达水平上升,差异有统计学意义($P<0.05$);红曲组与结合雌激素组表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P=0.002,P<0.000$)。

表 4 各组大鼠 TNF-α 免疫组化表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胫骨上端 TNF-α 免疫组化表达
结合雌激素组	10	0.229 8±0.048 3
红曲组	10	0.250 6±0.055 4
模型组	10	0.323 5±0.049 0
假手术组	10	0.171 2±0.042 0
F		16.561
P		<0.001

2.5 胫骨上端组织 RANK 免疫组化测定结果

统计结果见表 5,模型组与假手术组相比表达水平上升,差异有统计学意义($P=0.001$);红曲组与结合雌激素组表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P=0.035,0.022$)。

表 5 各组大鼠 RANK 免疫组化表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胫骨上端组织 RANK 免疫组化表达
结合雌激素组	10	104.553 1±26.308 8
红曲组	10	106.892 5±17.539 2
模型组	10	131.300 2±29.879 1
假手术组	10	90.783 2±24.283 0
F		4.576
P		<0.001

3 讨论

随着人口的老龄化,近年来骨质疏松症(Osteoporosis,OP)已成为社会主要健康问题之一,据推算全世界约 3 亿人有骨质疏松的危险,在世界常见病中发病率已经跃居第 7 位^[6],在浙江省 OP 亦成为骨伤科临床的常见病和多发病。去卵巢(Ovariectomized,OVX)模型被认为是评价药品或饮食干预绝经后骨质疏松症的黄金标准^[7,8]。而雌性大鼠在进行卵巢切除术后,骨吸收大于骨形成,松质骨的骨转化加快、骨量减

少、骨强度下降,这种骨代谢的变化与早期绝经后妇女类似^[4,5]。因此,对实验大鼠骨密度的测量成为判断本次造模是否成功的一个重要标准。本实验采用多光谱成像系统对实验大鼠胫骨及 L₅ 进行图像采集及数据分析得出骨密度值,通过数据分析发现,经过 12 周喂养后的雌性大鼠,模型组与假手术组相比骨密度下降明显($P<0.05$),说明切除卵巢可明显降低雌性大鼠的骨密度,这一结果与国内外同类实验结果一致^[4,5]。同时也说明大鼠去卵巢模型对雌激素减少所引起的骨密度下降敏感,该模型可用于红曲治疗骨质疏松症的实验研究。

红曲是传统中药材,以大米为原料,经红曲霉发酵而成,具有活血化瘀、健脾消食、降血脂、抗骨质疏松等作用^[1],在我国有一千多年的使用历史。研究发现,红曲中含有 12 种他汀类成分,主要为强效的血脂调节剂 HMG-CoA 还原酶抑制剂-洛伐他汀,其降脂作用已通过实验和临床得到证实^[9]。作为一种具有与他汀类药物相似功用的调脂中药有增加骨密度、增强骨强度的功效,能提高血清激素水平。红曲可以提高去势大鼠的骨密度值,改善骨的生物力学性能,改善骨组织形态^[10]。本实验旨在分子水平对红曲的抗骨质疏松作用机理进行研究。红曲组骨密度高于模型组($P<0.05$),与结合雌激素组差异无统计学意义($P>0.05$),由此可见红曲能够提高去卵巢大鼠模型骨密度,其作用效果与雌激素类似,其机理需要进一步探究。

研究表明通过钙、镁及磷等元素含量变化可推测骨代谢情况,同时能得到反映骨转化的生化指标,有助于判断骨质疏松的形成及治疗疗效^[11],因此本实验选用大鼠血清中碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶这两个指标来反映骨的转化状况。碱性磷酸酶是成骨细胞成熟和具有活性的标志,可反映成骨细胞的活动^[12,13]。该指标越高,表明成骨细胞越活跃,可以在一定程度上说明骨量增加。抗酒石酸酸性磷酸酶是了解骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物^[14],骨质疏松症患者可表现出抗酒石酸酸性磷酸酶升高。同时,大量研究表明 RANKL/RANK/OPG 系统作用于骨重建的骨吸收过程中,肿瘤坏死因子-α(Tumor Necrosis Factor-α,TNF-α)作为上游因子能够通过前列腺素 E2 诱导 RANKL 的表达并降低 OPG 的表达,从而促进破骨细胞生成、分化和成熟。另有研究提示 TNF-α 水平的升高与绝经后骨丢失密切相关^[15],这与本实验中模型组大鼠 TNF-α 免疫组化表达高于假手术组这一结果符合。有不少研究表明,雌激素减少可以通过影响 RANKL/RANK/OPG 及相关因子的表达,引起骨质疏松^[16]。

本实验采用红曲作为干预措施,干预去卵巢大鼠骨质疏松模型,对骨密度、血清 ALP, TRAP 及 TNF- α , RANK 免疫组化等指标进行了观察检测,结果显示红曲能够明显提高去卵巢大鼠模型骨密度,降低血清 TRAP 水平,提高血清 ALP,降低 RANK 与 TNF- α 的免疫组化水平。在实验中发现模型组与假手术组相比血清 ALP 表达水平下降($P < 0.05$),说明该模型对血清 ALP 敏感,模型组相比较于假手术组成骨细胞活性下降;红曲组与结合雌激素组血清 ALP 表达水平均高于模型组($P < 0.05$),说明结合雌激素与红曲均能在一定程度上提高成骨细胞活性。在本实验中,模型组与假手术组相比血清 TRAP 表达水平上升($P < 0.05$),说明该模型对血清 TRAP 敏感,模型组破骨细胞较假手术组频繁;红曲组与结合雌激素组血清 TRAP 表达水平均低于模型组($P < 0.05$),说明红曲组与结合雌激素组破骨细胞活性较模型组低,红曲与结合雌激素一样具有降低破骨细胞活性的作用。在本实验中红曲组与结合雌激素组的 TNF- α 免疫组化表达水平均低于模型组,说明红曲与雌激素一样,能抑制或减少 TNF- α 表达。在 RANKL/RANK/OPG 系统中 RANKL 与膜受体 RANK 结合后能够刺激前破骨细胞的成熟、分化,形成破骨细胞,引起骨吸收,降低骨量及骨质。因此,RANK 的免疫组化表达水平能够从一定程度上反映破骨细胞的成熟水平。在本实验中模型组与假手术组相比表达水平上升($P < 0.05$),说明模型组破骨细胞活动更为频繁;红曲组与结合雌激素组骨表达水平均低于模型组($P < 0.05$),说明红曲与结合雌激素均具有抑制 RANK 表达的作用,能够降低破骨细胞的成熟程度。红曲具有抗骨质疏松作用,其作用机理与 RANKL/RANK/OPG 信号通路密切相关,与成骨细胞和破骨细胞的活跃程度均有联系,但其具体有效作用成分仍需进一步研究探明。本研究同时验证了去卵巢大鼠骨质疏松模型较适合 RANKL/RANK/OPG 研究,可为其他研究者 RANKL/RANK/OPG 研究提供参考。

参考文献

- [1] Kasliwal RR, Bansal M, Gupta R, et al. ESSENS dyslipidemia: a placebo-controlled, randomized study of a nutritional supplement containing red yeast rice in subjects with newly diagnosed dyslipidemia [J]. Nutrition, 2016, 32(7-8):767-776.
- [2] 王国文,赵红宇. RANK/RANKL/OPG 信号通路介导神

- 经母细胞瘤骨侵袭/转移机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(5):813-816.
- [3] 王振,张晓刚,宋敏,等. OPG/RANK/RANKL 系统与原发性骨质疏松症的关联性及补肾活血法的调节作用研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12):1601-1605.
- [4] 范怀玲,纪峰,林莺,等. 电针“关元”穴对绝经后骨质疏松症大鼠 Wnt 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(2):87-93.
- [5] 吕音,杨玉彬. 绝经后骨质疏松大鼠模型文献回顾及实验初探[J]. 现代医院, 2010, 10(5):21-22.
- [6] Leslie WD, O'Donnell S, Jean S, et al. Trends in hip fracture rates in Canada [J]. JAMA, 2009, 30(2):883-889.
- [7] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss [J]. Bone Miner, 1991, 15(3):175-191.
- [8] Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats [J]. J Bone Miner Res, 1987, 2(2):115-122.
- [9] Patel S. Functional food red yeast rice(RYR)for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(5):87.
- [10] 吕思敏,于琼,司徒永立,等. 含辅酶 Q10 和洛伐他汀的红曲提取物对大鼠胫骨形态的骨计量学观察[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(11):1469-1475.
- [11] Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis[J]. Ann Lab Med, 2012, 32(2):105-112.
- [12] 曾高峰,宗少晖,邹斌,等. 黄精多糖对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中 ALP 和 BGP 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(7):779-783.
- [13] Priyanka Kushwaha, Vikram Khedgikar, Saikat Haldar, et al. Azadirachta indica triterpenoids promote osteoblast differentiation and mineralization in vitro and in vivo[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(15):3719-3724.
- [14] 杨瑞霞,马蔡昀,凌芸. 骨代谢标志物与骨质疏松症关系的研究[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(19):2526-2527.
- [15] 赵玉玺,张彬,湛梅圣. 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.
- [16] 任洁,卢建华. RANKL/RANK/OPG 系统与绝经后骨质疏松模型的研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(9):892-895.

(收稿日期:2017-03-03)