

# 瑞香素对去卵巢大鼠炎症因子和骨代谢的影响

姬笑颜<sup>1</sup> 李含笑<sup>1</sup> 杨艳妮<sup>1</sup> 张欣怡<sup>1</sup> 苏明莉<sup>2</sup> 刘西纺<sup>1,3△</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨瑞香素对去卵巢大鼠炎症因子和骨代谢指标的影响。**方法:**将 60 只 3 个月龄 SD 雌性大鼠随机分为低、中、高剂量组,对照组、模型组、空白组,每组 10 只。低、中、高剂量组分别予以瑞香素 0.275、0.463、0.668 mg/kg 灌胃,1 次/d;对照组阿仑膦酸钠剂量 0.630 mg/kg,1 次/周;模型组 0.9% 生理盐水 0.668 mg/kg 灌胃;空白组不干预;连续给药 12 周,12 周后生化法检测血清钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(ALP),ELISA 法检测白介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平;治疗前后运用双能 X 线法测全身骨密度(BMD)。**结果:**治疗前空白组大鼠 BMD 高于其他各组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );治疗后高剂量组和对照组大鼠的 BMD 均高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低剂量组、高剂量组和空白组 IL-6 含量均低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );低剂量组、高剂量组和对照组和空白组 TNF- $\alpha$  的含量均低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高剂量组 Ca 含量高于对照组和模型组。低剂量组、高剂量组 P 含量均高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。中剂量组、高剂量组、对照组 ALP 含量均低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**瑞香素高剂量能够提高绝经后骨质疏松大鼠的 BMD,降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平,发挥抗炎作用;提高绝经后骨质疏松大鼠 Ca 和 P 的含量,降低 ALP 的含量,改善骨代谢。瑞香素可改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨痛,增加骨密度和改善骨代谢,对骨质疏松症起治疗作用。

**[关键词]** 瑞香素;骨质疏松症;白介素-6;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;钙;磷;碱性磷酸酶

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)07-0017-04

## Efficacy of Daphnetin on Inflammatory Factors and Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

JI Xiaoyan<sup>1</sup> LI Hanxiao<sup>1</sup> YANG Yanni<sup>1</sup> ZHANG Xinyi<sup>1</sup>  
SU Mingli<sup>2</sup> LIU Xifang<sup>1,3△</sup>

<sup>1</sup>The First Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi China;

<sup>2</sup>Xi'an University of Physical Education, Xi'an 710054, China;

<sup>3</sup>Department of Neurospinal Rehabilitation, Red Society Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, China.

**Abstract Objective:** To investigate the efficacies of daphnetin on inflammatory factors and bone metabolism in ovariectomized rats. **Methods:** 60 three-month-old SD rats were randomly divided into low, medium and high dose groups, control group, model group and blank group, with 10 rats in each group. Low, medium and high dose groups were given daphnetin 0.275, 0.463 and 0.668 mg/kg by gavage, respectively. Once a day. The dose of Allen phosphonic acid sodium in control group was 0.630 mg/kg. Once a week. The model group was given 0.9% saline 0.668 mg/kg by gavage. The blank

group was not intervened. All groups were administered continuously for 12 weeks. After 12 weeks, serum calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (ALP) was detected by the biochemical method to detect. Interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) level were detected by ELISA method. Total bone mass density (BMD) was measured by double energy X method before and after treatment. **Results:** Before treatment, BMD of rats in the blank group

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31670954)

西安市卫生健康委员会一般研究项目(2020yb33)

陕西中医药大学校级课题重点项目(2020CX12)

<sup>1</sup> 陕西中医药大学第一临床医学院(陕西 咸阳, 712046)

<sup>2</sup> 西安体育学院

<sup>3</sup> 西安交通大学附属红会医院神经脊柱康复病区

△通信作者 E-mail: lxfyg2006@126.com

was higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ). After treatment, BMD of rats in each group was higher than that of the model group ( $P < 0.05$ ). After administration, the BMD of rats in the high-dose group and the control group was higher than before administration. The IL-6 content in the low dose, high dose and blank group was lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$  in the low dose, high dose, control group and blank group were all lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). The Ca content in the high-dose group was higher than that in the control group and the model group. The P content in the low dose group and the high dose group was higher than that in the model group ( $P < 0.05$ ). The ALP content of medium dose group, high dose group and control group was lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** High doses of daphnetin can increase BMD in postmenopausal osteoporosis rats, reduce the level of IL-6 and TNF- $\alpha$  to play a role of anti-inflammatory, enhance the content of Ca and P in postmenopausal osteoporosis rats, reduce the content of ALP to improve bone metabolism. Daphnetin can improve bone pain, increase bone density and improve bone metabolism in ovariectomized osteoporosis rats, and play a therapeutic role in osteoporosis.

**Keywords:** daphne; osteoporosis; interleukin 6 (IL-6); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); calcium (Ca); phosphorus (P); alkaline phosphatase (ALP)

骨质疏松症是以骨量减少,骨微组织结构破坏,导致骨骼脆性增加,骨折的发生率增高为特征的全身性骨病<sup>[1]</sup>。骨质疏松症由遗传、营养、性腺功能减退、增龄等多种因素引起,机体免疫功能障碍与全身炎症激活也被证实与骨质疏松症的发病密切相关,因此抗炎和免疫调节成为治疗骨质疏松症的新思路<sup>[2-5]</sup>。瑞香素(Daphnetin, DAP)又名祖师麻甲素,是从长白瑞香等瑞香科属植物中提取出来的香豆类衍生物,是一种具有抗炎作用的天然药物,传统多用于稀痘、乳痈初起等炎症性疾病的治疗<sup>[6]</sup>。瑞香素在骨质疏松症治疗中的作用尚未见报道,本课题组在前期的体外研究中发现瑞香素对骨髓源性巨噬细胞(BMM)来源的破骨细胞形成有明显的抑制作用,而且能抑制 RANKL 诱导的巨噬细胞 NF- $\kappa$ B、Akt/GSK-3 $\beta$  途径的活化,表明瑞香素对 RANKL 诱导的破骨细胞生成具有抑制作用<sup>[7]</sup>,且瑞香素在其他相关疾病的治疗中发挥抗炎、抗氧化、免疫调节等作用<sup>[8-13]</sup>。本研究拟观察瑞香素对绝经后骨质疏松大鼠的炎症因子和骨代谢指标的影响,以进一步研究其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 60 只,雌性,体质量( $220 \pm 20$ )g,西安交通大学实验动物中心提供,实验动物许可证号为 SCXK(陕)2018-001。

### 1.2 实验药物及试剂

瑞香素胶囊购自吉林省西点药业科技发展股份有限公司,国药准字 H22024043,产品批号为 03190101,规格 0.15 g/粒。阿仑膦酸钠片购自杭州默沙东制药有限公司,国药准字 J20130085,生产批号为 S016727,规格 70 mg/粒。羟甲基纤维素钠购自湖北远成赛创科技有限公司。Ca、P、ALP、IL-6、TNF- $\alpha$  检测试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

### 1.3 实验仪器

双能 X 线骨密度仪(ASY-00409),美国 Hologic 公司。Multiskan FC 型酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 造模方法** 除空白组外,均进行去势造模,用 5%水合氯醛进行腹腔注射麻醉,剂量为 0.6 mL/100 g,消毒进行注射,待麻药起效大鼠进入麻醉状态后在无菌条件下行背部单切口入路卵巢切除术。背部备皮消毒,用剪刀在背部正中肋弓下 1 cm 与背部后正中线的交点切开长约 1~2 cm 纵行切口,找到卵巢(肾脏后下方脂肪组织周围粉红色样组织),分离卵巢周围脂肪组织,结扎输卵管及血管后将卵巢切除,后逐层缝合,在伤口处皮下注射青霉素预防感染,右侧手术同左侧,最后检查止血,清点手术器械。造模后 8 周开始进行药物干预。

**1.4.2 分组方法** 实验动物用随机数字表法分为低剂量组、中剂量组、高剂量组、对照组、模型组、空白组 6 个实验组,每组 10 只。按照常规笼养,标准饲料喂养,自由饮水。

**1.4.3 干预方法** 根据设计的药物剂量和体积,称取适量的药粉,用 0.5%的羟甲基纤维素钠悬浮并稀释至合适的浓度,现配现用。低剂量组、中剂量组、高剂量组分别予以瑞香素 0.275、0.463、0.668 mg/kg 灌胃,1 次/d;对照组阿仑膦酸钠剂量 0.630 mg/kg,1 次/周;模型组 0.9%生理盐水 0.668 mg/kg 灌胃;空白组不干预;连续给药 12 周。实验过程中每周称 1 次体质量,根据体质量调整给药剂量。

**1.4.4 实验指标测定** 1)骨密度检测:将大鼠麻醉后,仰卧位测全身骨密度。2)血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、Ca、P、ALP 的表达检测:用 5%水合氯醛,0.6 mL/100 g 将大鼠麻醉,仰卧固定在手术架上,沿腹正中线皮肤切

开腹腔,使腹主动脉清楚暴露。用采血针快速采全血约 5 mL,静置 30 min,4 ℃,3 000 r/min离心 20 min 分离血清,使用生化试剂盒和 ELISA 试剂盒,按照说明书进行检测。

1.5 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件处理,所有计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析法,组间两两比较根据方差齐性检验结果采用LSD-*t*检验(方差齐)或 Tamhane's *T*<sub>2</sub>(方差不齐)检验,治疗前后采用配对 *t* 检验,*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

表 1 治疗前后各组大鼠 BMD 变化(g/cm<sup>2</sup>, $\bar{x} \pm s$ )

组别	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
低剂量组	0.177±0.011 <sup>1)</sup>	0.201±0.007 <sup>2)</sup>	3.133	0.197
中剂量组	0.173±0.007 <sup>1)</sup>	0.202±0.004 <sup>2)</sup>	11.400	0.056
高剂量组	0.178±0.001 <sup>1)</sup>	0.202±0.001 <sup>2)</sup>	15.667	0.041
对照组	0.181±0.002 <sup>1)</sup>	0.208±0.005 <sup>2)</sup>	13.500	0.047
模型组	0.175±0.003 <sup>1)</sup>	0.168±0.008	0.875	0.542
空白组	0.187±0.001	0.196±0.005 <sup>2)</sup>	2.000	0.295

注:1)与空白组相比,*P*<0.05;2)与模型组相比,*P*<0.05。

2.3 瑞香素对各组大鼠炎性因子的影响

低剂量组、高剂量组和空白组 IL-6 含量均低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);低剂量组、中剂量组、高剂量组和模型组的 IL-6 含量均高于空白组和对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。低剂量组、高剂量组、对照组和空白组 TNF-α 的含量均低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);低剂量组、中剂量组和模型组的 TNF-α 含量均高于空白组和对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 2 瑞香素对各组大鼠炎性因子的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF-α/(pg·mL <sup>-1</sup> )
低剂量组	10	16.614±1.256 <sup>1)2)3)</sup>	17.691±0.296 <sup>1)2)3)</sup>
中剂量组	10	35.547±3.600 <sup>1)3)</sup>	19.471±0.742 <sup>1)3)</sup>
高剂量组	10	24.843±3.065 <sup>1)2)3)</sup>	16.440±0.295 <sup>2)</sup>
对照组	10	8.526±1.700	16.336±0.442 <sup>2)</sup>
模型组	10	37.254±0.515 <sup>1)3)</sup>	19.996±0.595 <sup>1)3)</sup>
空白组	10	7.772±1.275 <sup>2)</sup>	15.785±0.042 <sup>2)</sup>

注:1)与空白组相比,*P*<0.05;2)与模型组相比,*P*<0.05;3)与对照组相比,*P*<0.05。

表 3 各组大鼠血清 Ca、P、ALP 表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	Ca/(mmol·L <sup>-1</sup> )	P/(mmol·L <sup>-1</sup> )	ALP/(mg·L <sup>-1</sup> )
低剂量组	10	1.829±0.061 <sup>1)</sup>	2.048±0.174 <sup>1)2)3)</sup>	240.007±10.899 <sup>1)3)</sup>
中剂量组	10	1.839±0.020 <sup>1)</sup>	2.614±0.027 <sup>1)2)3)</sup>	150.035±1.058 <sup>2)</sup>
高剂量组	10	2.015±0.127 <sup>1)2)3)</sup>	2.507±0.214 <sup>1)2)3)</sup>	180.776±1.703 <sup>1)</sup>
对照组	10	1.856±0.035 <sup>1)</sup>	2.948±0.210 <sup>1)2)</sup>	120.328±10.081 <sup>1)2)</sup>
模型组	10	1.807±0.080 <sup>1)</sup>	1.143±0.021 <sup>1)3)</sup>	210.584±10.365 <sup>1)3)</sup>
空白组	10	2.202±0.027 <sup>2)3)</sup>	1.650±0.250 <sup>2)3)</sup>	10.024±1.022 <sup>3)</sup>

注:1)与空白组相比,*P*<0.05;2)与模型组相比,*P*<0.05;3)与对照组相比,*P*<0.05。

2.1 造模前后各组大鼠的一般情况对比

本实验选用去卵巢法模拟绝经后骨质疏松模型,7~12 周即可形成模型<sup>[13]</sup>。造模前各组大鼠体重质量差异无统计学意义(*P*>0.05),造模 8 周后各组大鼠体质量与空白组相比差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 各组大鼠间 BMD 比较

治疗前空白组大鼠 BMD 高于其他各组,差异有统计学意义(*P*<0.05);治疗后各组大鼠的 BMD 均高于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。高剂量组、对照组的 BMD 治疗后均高于治疗前,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

2.4 各组大鼠血清 Ca、P、ALP 表达的比较

高剂量组 Ca 含量高于对照组和模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);低剂量组、高剂量组 P 含量均高于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);中剂量组、高剂量组、对照组 ALP 含量均低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);低剂量组 ALP 含量高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

3 讨论

3.1 骨质疏松症和 BMD

骨质疏松的发生是骨形成和骨吸收之间的失衡,吸收超过形成引起骨量的减少 BMD 降低,BMD 是反映骨骼强度的重要指标<sup>[14]</sup>。本研究发现瑞香素灌胃后各组大鼠的 BMD 均高于模型组(*P*<0.05)。除了模型组,其余各组大鼠的 BMD 治疗后均高于治疗前,瑞香素高剂量组、对照组大鼠的 BMD 治疗后高于治疗前(*P*<0.05),可见高剂量的瑞香素可有效提高大鼠的 BMD,增强骨骼强度,延缓骨质疏松的进程。

### 3.2 炎性因子与骨质疏松症

炎症是疾病发生发展的重要生物学过程,女性绝经后失去雌激素保护,大量的炎性因子积累,如 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12 等,这些炎性细胞因子可调节氧化应激损伤,引起破骨细胞骨吸收增强,导致骨重建失衡<sup>[15-17]</sup>。IL-6 作用于成骨细胞的基质细胞,刺激破骨细胞形成,增加并增强破骨细胞活性,促进骨吸收,进而参与到骨质疏松的形成过程<sup>[18]</sup>。巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)在破骨细胞前体分化为成熟的破骨细胞的过程中发挥重要作用,TNF- $\alpha$  可直接或间接促进 M-CSF 的产生,作用于破骨细胞加速骨吸收,并使成骨的凋亡加快,减少骨的合成,且在骨质疏松性疼痛中发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。代婵等<sup>[21]</sup>发现瑞香素在 TNF- $\alpha$  诱导的 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)中 NF- $\kappa$ B 信号通路活化,降低 NF- $\kappa$ B 信号通路中 P65 的磷酸化水平,调节相关炎症因子的分泌,减少炎症反应。何荣安等<sup>[22]</sup>发现瑞香素可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 p65 的磷酸化,减弱 TNF- $\alpha$  刺激的 HaCaT 角质形成细胞炎症因子的表达。本研究发现在瑞香素干预 12 周以后低剂量组、高剂量组、空白组 IL-6 含量均低于模型组( $P < 0.01$ ),低剂量组、高剂量组、对照组和空白组 TNF- $\alpha$  的含量均低于模型组( $P < 0.05$ ),也进一步证明了瑞香素可缓解绝经后骨质疏松大鼠的炎症反应,改善骨痛,进而对大鼠的骨代谢产生影响。

### 3.3 瑞香素对骨代谢的影响

骨代谢生化指标包括骨转换标志物、钙磷代谢指标、激素与细胞因子,通过骨代谢生化指标可了解骨组织代谢<sup>[23]</sup>。骨组织中钙、磷的含量是维持骨组织强度的基础,血清中钙、磷的含量是反映全身骨组织代谢的重要指标。ALP 是参与骨代谢的重要蛋白,可直接反映成骨细胞的活性和功能状况,亦与钙磷的代谢具有密切关系<sup>[24]</sup>。本研究结果显示瑞香素高剂量组 Ca 含量高于对照组和模型组( $P < 0.05$ )。低剂量组、高剂量组 P 含量均高于模型组( $P < 0.05$ );低剂量组、高剂量组、对照组 P 含量均高于空白组( $P < 0.05$ )。可见瑞香素可在一定程度上提高骨质疏松大鼠骨组织中的钙磷含量,从而增强骨组织的强度。谌红珊等<sup>[25]</sup>研究发现骨质疏松患者的 ALP 水平与 BMD 呈负相关。本研究发现瑞香素中剂量组、高剂量组 ALP 含量均低于模型组( $P < 0.05$ ),说明中、高剂量的瑞香素可降低去卵巢骨质疏松大鼠的 ALP 含量,提高其钙磷含量,改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨代谢水平。

综上所述,瑞香素高剂量可提高绝经后骨质疏松大鼠的全身 BMD,低剂量和高剂量的瑞香素均对 IL-6、TNF- $\alpha$  有明显的抑制作用,高剂量的瑞香素可提高血清 Ca 的含量,中、高剂量的瑞香素可提高血清 P

的含量,中、高剂量可有效降低 ALP 的含量进而可维持骨组织的强度,抑制骨质疏松的严重程度,这对临床上治疗绝经后骨质疏松提供了实验基础,但其具体的作用机制有待进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281-309.
- [2] 常志芳,冯成龙,史晓霞,等.免疫与骨质疏松的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(4):508-513.
- [3] 夏婷,李双庆.炎症相关骨质疏松症的发病机制[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(1):117-120.
- [4] 程千,刘起富,金铭,等.绝经后女性铁蓄积与骨代谢及机体炎症反应的相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(5):649-655.
- [5] FANG H,ZHANG H,WANG Z,et al. Systemic immune-inflammation index acts as a novel diagnostic biomarker for postmenopausal osteoporosis and could predict the risk of osteoporotic fracture[J]. J Clin Lab Anal,2020,34(1):e23016.
- [6] 郑茂,邹玉,傅颖媛.瑞香素药理作用的研究进展[J].中成药,2017,39(4):790-794.
- [7] LIU X,GAO X,LIU Y,et al. Daphnetin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro [J]. J Cell Biochem,2018,doi:10.1002/jcb.27555.
- [8] 申宁,席晓云,李飞,等.瑞香素联合 IGF-1 对大鼠脂肪间充质干细胞成软骨分化的影响[J].中国修复重建外科杂志,2019,33(6):743-749.
- [9] 李静,王东亮,衣蕾,等.瑞香素抑制 c-Jun 氨基末端激酶/核因子  $\kappa$ B(JNK/NF- $\kappa$ B)通路减轻大鼠心肌缺血损伤[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(6):513-519.
- [10] ZHANG L,GU Y,LI H,et al. Daphnetin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting inflammatory and oxidative response [J]. Int Immunopharmacol,2018,65:402-407.
- [11] ZHI J,DUAN B,PEI J,et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury[J]. J Cell Biochem,2019,120(3):4132-4139.
- [12] WANG G,PANG J,HU X,et al. Daphnetin: a novel anti-helicobacter pylori agent[J]. Int J Mol Sci,2019,20(4):850-859.
- [13] GANJI R,MOGHBELI M,SADEGHI R,et al. Prevalence of osteoporosis and osteopenia in men and premenopausal women with celiac disease: a systematic review[J]. Nutr J,2019,18(1):9-15.
- [14] CATALANO A,LODDO S,BELLONE,et al. Pulsed electromagnetic fields modulate bone metabolism via RANKL/OPG and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in women with postmenopausal osteoporosis: a pilot study[J]. Bone,2018,116:42-46.