

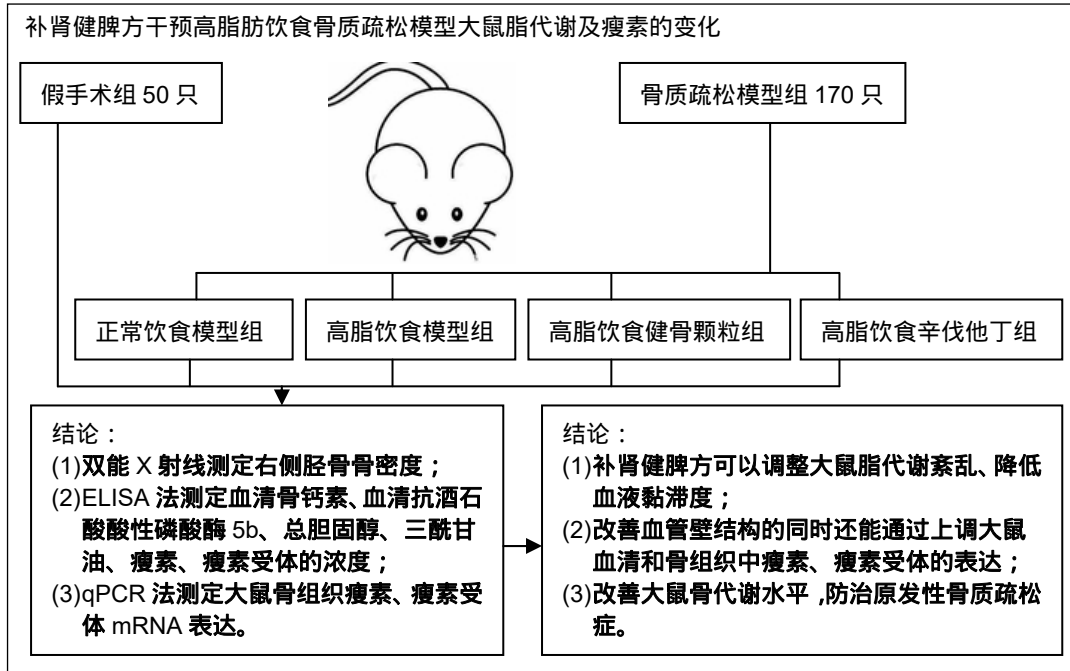
补肾健脾方影响高脂肪饮食骨质疏松模型大鼠脂代谢及瘦素的变化

· 研究原著 ·

李平¹, 林煜¹, 朱曦², 张怡元¹, 肖莉莉¹, 华鹏¹, 林学义¹ (1)厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007; (2)福建中医药大学, 福建省福州市 350102)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0592 ORCID: 0000-0003-4680-2669(李平)

文章快速阅读:



李平, 男, 1974年生, 福建省福州市人, 汉族, 1997年福建中医药大学毕业, 副主任医师, 主要从事中医骨伤临床与基础研究。

通讯作者: 林煜, 博士, 讲师, 厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007

文献标识码: B
稿件接受: 2018-07-23



文题释义:

补肾健脾方: “肾主骨”、“补先后天”理论为组方原则, 是针对“肾亏脾虚”的病机特点, 以煅狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药组方而成, 通过补肾健脾, 达到强筋壮骨之目的方剂。
瘦素脂代谢与骨质疏松: 老年女性, 由于绝经也可导致体内瘦组织与脂肪的成分的改变, 而且现阶段发现骨质疏松在肥胖的老年人中的发生率要大于非肥胖者, 由此推断瘦素可能是骨质疏松症发病机制中的一个重要调节因素。

摘要

背景: 绝经也可导致体内瘦组织与脂肪成分的改变, 现阶段发现骨质疏松在肥胖的老年人中的发生率要大于非肥胖者, 由此推断瘦素可能是骨质疏松症发病机制中的一个重要调节因素。

目的: 探讨补肾健脾方对高脂肪饮食骨质疏松大鼠脂代谢及瘦素的影响。

方法: 将6月龄SPF级雌性SD大鼠220只随机分成模型组170只和假手术组50只。模型组行双侧卵巢结扎切除术, 假手术组除未行卵巢结扎切除外, 其余步骤同模型组。手术后12周, 模型鉴定成功后, 手术组随机分成正常饮食模型组、高脂饮食模型组、高脂饮食健骨颗粒组和高脂饮食辛伐他丁组各40只。各组于术后第13周开始给药, 健骨颗粒组给予健骨颗粒2 g/(kg·d), 生理盐水2 mL溶解后灌胃, 辛伐他丁组给予辛伐他丁100 μg/(kg·d)灌胃, 假手术组和正常饮食模型组以2 mL生理盐水灌胃, 1次/d。于用药2, 6, 12, 24周后测体质量, 取血清、腰椎和股骨近端备用。双能X射线测定右侧胫骨骨密度, ELISA法测定血清骨钙素、血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACT-5b)、总胆固醇、三酰甘油、瘦素、瘦素受体的水平, qPCR法测定大鼠骨组织瘦素、瘦素受体mRNA表达。

结果与结论: 高脂饮食健骨颗粒组大鼠的体质量高于同期正常饮食模型组和高脂饮食模型组, 但低于假手术组和高脂饮食辛伐他丁组, 同时表达的瘦素、瘦素受体、骨钙素水平均高于正常饮食模型组和高脂饮食模型组, TRACT-5b、胆固醇、三酰甘油的浓度均低于正常饮食模型组和高脂饮食模型组, 各组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$); 结果表明, 补肾健脾方可以调整大鼠脂代谢紊乱、降低血液黏滞度、改善血管壁结构的同时还能通过上调大鼠血清和骨组织中瘦素、瘦素受体的表达, 改善大鼠骨代谢水平, 防治原发性骨质疏松症。

关键词:

补肾健脾; 健骨颗粒; 骨质疏松; 脂代谢; 瘦素; 组织构建

主题词:

中草药; 骨质疏松; 瘦素; 受体, 瘦素; 组织工程

中图分类号: R446

Li Ping, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 850007, Fujian Province, China

Corresponding author: Lin Yu, MD, Lecturer, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350102, Fujian Province, China

基金资助：

福建省自然科学基金(2017J01332)，项目负责人：林煜；福州市卫生系统科技项目(2017-S-wq15)，项目负责人：李平

缩略语：

抗酒石酸性磷酸酶 5b：tartrate-resistant acid phosphatase 5b，TRACP-5b

Bushen Jianpi Recipe affects lipid metabolism and leptin expression in rats with osteoporosis receiving a high fat diet

Li Ping¹, Lin Yu¹, Zhu Xi², Zhang Yiyuan¹, Xiao Lili¹, Hua Peng¹, Lin Xueyi¹ (¹Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China; ²Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350102, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Menopause can also lead to changes in lean tissue and fat composition. Osteoporosis is found to be more common in obese elderly than in non-obese people. Thereafter, leptin may be an important regulatory factor in the pathogenesis of osteoporosis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of *Bushen Jianpi* Recipe on lipid metabolism and leptin in high fat diet rats with osteoporosis.

METHODS: Totally 220 SPF Sprague-Dawley rats aged 6 months were randomly divided into model group ($n=170$) and sham group ($n=50$). The model group underwent bilateral ovarian ligation and the sham group received the same intervention as the model group except that ovarian ligation was not performed. At 12 weeks after surgery, the rat models were randomized into normal, high-fat, high-fat plus *Jiangu* Granule (2 g/(kg·d)), and high-fat plus simvastatin (100 μ g/(kg·d)) groups ($n=40$ per group). The administration began at 13 weeks after surgery via gavage. The normal and sham groups were given 2 mL of normal saline, once daily. After 2, 6, 12 and 24 weeks of treatment, the body mass was measured. The serum, lumbar vertebrae and proximal femurs were removed. The bone mineral density of the right tibia was measured by double energy X-ray. The concentration of serum osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP-5b), total cholesterol, triacylglycerol, leptin and leptin receptor were detected by ELISA. The mRNA expression of leptin and leptin receptor in bones was determined by qPCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The rat body mass in the high-fat plus *Jiangu* Granule group was higher than that in the normal and high-fat groups at the same time, but lower than that in the sham and high-fat plus simvastatin groups. The expression levels of leptin and leptin receptor, and osteocalcin level in the high-fat plus *Jiangu* Granule group were significantly higher than those in the normal and high-fat groups, and the contents of TRACP-5b, cholesterol, and triacylglycerol were significantly lower than those in the Leptin and leptin receptor, the BGP concentration were higher than those in the normal diet model group and the high fat diet model group. The concentrations of TRACP-5b, cholesterol, and triglycerides were lower than those in the normal and high-fat groups ($P < 0.05$). These results indicate that *Bushen Jianpi* Recipe can regulate lipid metabolism disturbance, reduce blood viscosity and improve the structure of blood vessel wall. It can also increase the expression of leptin and leptin receptor in serum and bones of rats, improve bone metabolism, and prevent and treat primary osteoporosis.

Subject headings: Drugs, Chinese Herbal; Osteoporosis; Leptin; Receptors, Leptin; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2017J01332 (to LY); the Science and Technology Project of Fuzhou Health Department, No. 2017-S-wq15 (to LP)

0 引言 Introduction

骨质疏松症是以骨量减少、骨质量受损及骨强度降低，致使骨的脆性增加并易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。瘦素是一种蛋白质类的激素^[1]，主要由脂肪合成分泌，骨组织中分布着脂肪组织，并且也参与分泌产生瘦素。瘦素生理功能的发挥需要通过特异性结合瘦素受体来完成，而瘦素受体已证实存在多种的骨细胞之中，说明骨组织也是瘦素作用的靶器官。此外，瘦素可以使机体内的能量消耗增加，人的食欲减退，神经内分泌功能被影响。有研究表明，瘦素水平随着人的肥胖程度的增加而增长。老年人由于体内瘦体组织的减少，内脏脂肪的增加，特别是老年女性，由于绝经也可导致体内瘦组织与脂肪的成分的改变^[2]。有研究发现骨质疏松在肥胖女性老年人中的发生率要大于非肥胖者，由此推断瘦素可能是骨质疏松症发病机制中的一个重要调节因素。

前期研究表明：补肾健脾方——健骨颗粒能显著增加绝经后骨质疏松模型鼠的骨量，并且能够通过促进成骨细胞增殖、分化，促进骨的形成，并减少骨质疏松模型鼠骨钙及胶原蛋白的分解^[3-8]，因此健骨颗粒防治绝经后骨质疏松

的作用，可能与瘦素、瘦素受体及其脂代谢调节系统有关。因此，该研究采用补肾健脾方健骨颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠进行干预，从瘦素、瘦素受体角度进一步探讨补肾健脾方有效调控骨代谢及治疗骨质疏松症的作用机制，为健骨颗粒临床防治绝经后骨质疏松提供有力的实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2016年11月至2017年11月在福建中医药大学福建省中医研究院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6月龄清洁级雌性SD大鼠220只，体质量(180 \pm 20) g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，许可证号：SCXK(沪)2017-0002，合格证编号：2007000562039，2007000562040。实验动物饲养于福建省中医药研究院比较医学中心(合格证号：医动字第23-016号)，实验前适应性喂养1周。

1.3.2 实验用主要药品、试剂和仪器 健骨颗粒：主要成分为淫羊藿、煅狗骨、党参、山药、山茱萸等，制剂由福

建省中医药研究院制备; RIPA蛋白裂解液(强)(碧云天生物技术研究所); PMSF(碧云天生物技术研究所); BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所); SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究所); LEP抗体(美国Abcam公司); 骨钙素、血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b(tartrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP-5b)、总胆固醇、三酰甘油、Lep、Lep-R酶联免疫吸附测试试剂盒(Hiton); TRIZOL(碧云天生物技术研究所); 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ PCR Kit(日本TaKaRa公司)。Discovery Wi 双能X线骨密度仪(美国Hologic公司); Motic 6.0光镜图像分析系统(厦门麦克奥迪公司); ELx800全自动酶标仪(美国BIO-TEK公司); 7500型实时定量PCR仪(美国ABI公司); GEL DOC 2000凝胶成像系统(美国PE公司); MILLI-Q超纯水装置(美国Millipore公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模、模型鉴定、分组、取材 6月龄SPF级雌性SD大鼠220只随机分成模型组170只和假手术组50只。实验大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40 mg/kg), 腹部正中切口, 模型组行双侧卵巢结扎切除术, 假手术组除未行卵巢结扎切除外, 其余步骤同模型组。手术后12周, 模型组和假手术组各取10只进行模型鉴定: 麻醉后活体测定全身骨密度, 取血清测定雌二醇水平, 取腰椎及股骨近端做常规病理观察骨组织形态结构。

模型鉴定成功后, 手术组随机分成正常饮食模型组、高脂饮食模型组、高脂饮食健骨颗粒组和高脂饮食辛伐他丁组各40只。各组于术后第13周开始给药, 健骨颗粒组给予健骨颗粒2 g/(kg·d)^[3], 生理盐水2 mL溶解后灌胃, 辛伐他丁组给予辛伐他丁100 μg/(kg·d)灌胃, 假手术组和正常饮食模型组以2 mL生理盐水灌胃, 1次/d。实验大鼠均在相同条件下自由摄食饮水, 于用药2, 6, 12, 24周后测体质量, 取血清、腰椎和股骨近端备用。

1.4.2 骨密度测定 将右侧胫骨放置在双能X射线4500W骨密度仪探头下进行扫描, 应用动物骨密度测定软件, 计算机自动分析出大鼠胫骨的骨密度。

1.4.3 血清检测 根据酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒说明书对血清中的瘦素、瘦素受体、骨钙素、TRACT-5b、胆固醇、三酰甘油浓度进行检测。通过酶标仪自动分析出样本浓度, 并导出数据。

1.4.4 RT-PCR检测骨组织中瘦素、瘦素受体mRNA的表达 将第2腰椎用液氮充分研磨后, 采用Trizol法提取骨组织中总RNA, 往提取的RNA中加入溴芬蓝试剂, 并通过琼脂糖凝胶电泳在凝胶图像分析系统中对电泳条带进行分析; 在检验确认RNA无降解后, 对RNA进行吸光度值测定, 通过吸光度值结果换算出RNA浓度, 并根据浓度计算出500 ng RNA所需体积。接着根据试剂盒步骤进行反转录, 反转录结束后根据在ABI7500进行mRNA的扩增并获得扩增曲线和CT值。每个样本的每个实验指标需设置3个复孔,

将实验数据取均值。将获得的实验数据通过使用7500 system SDS 软件计算, 进行组间相对量的比较。引物在使用前需要用DEPC水将引物溶解成10 μmol/L浓度的引物溶液。引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度
瘦素	F: 5'TCA CAA CGC AGT CGG TAT C3'	176 bp
	R: 5'GAG GAT GCC GGC AGG TTC T3'	
瘦素受体	F: 5'TTG GGT TAG AAG TCA CAG ATG 3'	155 bp
	R: 5'CAC CTT CCA CTC GTA TGA AGA C3'	
内参 GAPDH	F: 5'GGC ACA GTC GGA ACT GAG AAT G3'	186 bp
	R: 5'ATG GTG GTA GGA ACG CCA GTA 3'	

1.5 主要观察指标 大鼠体质量; 大鼠骨密度; 大鼠血清总胆固醇、三酰甘油、瘦素、瘦素受体、骨钙素和TRACT-5b水平; 大鼠骨组织瘦素、瘦素受体 mRNA表达。

1.6 统计学分析 实验数据运用SPSS 16.0软件包处理分析, 参数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 首先比较样本是否呈正态分布, 并检验方差齐性, 最后组间数据比较采用ONE-WAY ANOVA (单向方差分析)。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 假手术及建模成功大鼠170只, 分为5组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠体质量影响的时序性变化 如表2所示, 随机分组后, 各组大鼠体质量无显著差异; 第4周开始高脂饮食各组体质量均大于正常饮食组, 去势各组大于假手术组, 第12周各组差异最为显著, 高脂饮食模型组最高, 高脂饮食健骨颗粒组次之, 和正常饮食模型组再次之, 假手术组最低, 各组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 不同时间各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, g$)
Table 2 Comparison of rat body mass among groups at different time points

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	232.3±11.09	311.2±11.11 ^{cd}	355.3±14.23 ^{cd}	406.6±12.28 ^{bcd}
正常饮食模型组	227.1±11.02	330.4±13.82 ^{cd}	417.6±12.98 ^{cd}	477.3±8.03 ^{acd}
高脂饮食模型组	225.5 ±13.57	359.4±22.12 ^{ab}	443.6±11.32 ^{ab}	512.9±12.38 ^{abd}
高脂饮食健骨颗粒组	227.4±10.15	347.2±20.12 ^{ab}	437.7±13.37 ^{ab}	503.3±12.28 ^{ab}
高脂饮食辛伐他丁组	225.6±11.03	343.4±12.62 ^{ac}	428.8±14.38 ^a	493.5±14.38 ^{abc}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.3 健骨颗粒对大鼠骨密度的影响 结果显示, 与同期假手术组相比, 各模型组骨密度明显降低($P < 0.05$), 与同期

高脂饮食模型组相比, 各组骨密度均有增加, 高脂饮食辛伐他汀组最高, 高脂饮食健骨颗粒组次之, 正常饮食模型组再次之, 各假手术组之间骨密度相差不大, 见表3。

表3 不同时间各组大鼠骨密度 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{g/cm}^2$)
Table 3 Bone mineral density of rats in each group at different time points

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	0.230±0.011	0.233±0.014 ^{bcd}	0.235±0.021 ^{bcd}	0.244±0.012 ^{bcd}
正常饮食模型组	0.228±0.009	0.208±0.016 ^a	0.204±0.012 ^a	0.202±0.013 ^a
高脂饮食模型组	0.231±0.013	0.205±0.012 ^a	0.194±0.013 ^a	0.193±0.011 ^a
高脂饮食健骨颗粒组	0.229±0.020	0.212±0.009 ^a	0.213±0.012 ^a	0.215±0.015 ^{ab}
高脂饮食辛伐他汀组	0.228±0.016	0.216±0.010	0.217±0.013 ^{ad}	0.222±0.015 ^{abc}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.4 健骨颗粒对大鼠血清总胆固醇的影响 与假手术组相比, 各模型组总胆固醇水平均显著升高($P < 0.05$); 与高脂模型组相比, 健骨颗粒组、辛伐他汀组总胆固醇水平显著降低($P < 0.05$), 正常饮食模型组平均值较高脂饮食模型组低, 但未有统计学差异。各组总胆固醇均随时间变化有所上升, 见表4。

表4 各组大鼠血清总胆固醇比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)
Table 4 Comparison of rat serum total cholesterol level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	1.346±0.104	1.353±0.152 ^{bcd}	1.416±0.116 ^{bcd}	1.424±0.134 ^{bcd}
正常饮食模型组	1.387±0.127	1.436±0.134 ^{ad}	1.514±0.122 ^{ad}	1.545±0.166 ^{ad}
高脂饮食模型组	1.402±0.134	1.542±0.121 ^{ad}	1.653±0.118 ^{ad}	1.703±0.124 ^{ad}
高脂饮食健骨颗粒组	1.362±0.128	1.431±0.166 ^{acd}	1.427±0.134 ^{acd}	1.437±0.158 ^{acd}
高脂饮食辛伐他汀组	1.372±0.122	1.384±0.154 ^{acd}	1.404±0.133 ^{acd}	1.434±0.105 ^{acd}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.5 健骨颗粒对大鼠血清三酰甘油的影响 与假手术组相比, 各模型组三酰甘油水平均显著升高($P < 0.05$); 高脂模型组最高, 正常饮食模型组、高脂饮食健骨颗粒组次之, 辛伐他汀组三酰甘油最低($P < 0.05$), 高脂饮食巴戟天组、正常饮食模型组、高脂饮食辛伐他汀组两两比较未有统计学差异。各组三酰甘油均随时间变化有所上升, 见表5。

2.6 健骨颗粒对大鼠血清瘦素的影响 各模型组瘦素水平与假手术组相比明显降低, 辛伐他汀组中高脂模型组最高, 高脂饮食健骨颗粒组、正常饮食模型组次之, 模型组瘦素最低($P < 0.05$)。各组瘦素均随时间变化有所下降, 见表6。

表5 各组大鼠血清三酰甘油比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)
Table 5 Comparison of rat serum triacylglycerol level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	0.928±0.256	1.025±0.205 ^{bcd}	1.106±0.163 ^{bcd}	1.130±0.210 ^{bcd}
正常饮食模型组	0.942±0.177	1.032±0.133 ^d	1.114±0.149 ^d	1.142±0.184 ^d
高脂饮食模型组	0.959±0.150	1.345±0.169 ^{ad}	1.553±0.134 ^{ad}	1.636±0.223 ^{ad}
高脂饮食健骨颗粒组	0.944±0.179	1.124±0.117 ^{acd}	1.222±0.241 ^{ac}	1.267±0.232 ^{ac}
高脂饮食辛伐他汀组	0.935±0.204	1.013±0.172 ^{cd}	1.114±0.143 ^{cd}	1.138±0.205 ^{ac}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

表6 各组大鼠血清瘦素比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)
Table 6 Comparison of rat serum leptin level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	14.43±1.43	13.90±1.38 ^{bcd}	12.41±1.02 ^{bcd}	11.33±1.30 ^{bcd}
正常饮食模型组	13.80±1.29	11.77±1.04 ^{ad}	10.53±0.53 ^d	8.55±1.03 ^d
高脂饮食模型组	14.14±1.12	11.49±0.82 ^{ad}	8.56±0.55 ^{ad}	7.58±0.64 ^{ad}
高脂饮食健骨颗粒组	13.88±1.28	11.97±1.00 ^{cd}	10.52±0.64 ^c	8.94±0.77 ^{ac}
高脂饮食辛伐他汀组	14.04±1.35	12.11±0.82 ^d	10.96±0.65 ^d	9.49±1.00 ^c

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.7 健骨颗粒对大鼠血清瘦素受体的影响 与假手术组相比, 各去卵巢组大鼠的瘦素受体水平有所降低, 辛伐他汀组中高脂模型组最高, 高脂饮食健骨颗粒组、正常饮食模型组次之, 模型组瘦素受体最低, 组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。各组瘦素受体均随时间变化有所下降, 见表7。

表7 各组大鼠血清瘦素受体比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)
Table 7 Comparison of rat serum leptin receptor level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	3.325±0.401	3.478±0.346 ^{bcd}	3.408±0.295 ^{bcd}	3.320±0.341 ^{bcd}
正常饮食模型组	3.365±0.293	2.863±0.189 ^{ad}	2.733±0.133 ^{ad}	2.335±0.133 ^{ad}
高脂饮食模型组	3.425±0.238	2.832±0.196 ^{ad}	2.592±0.204 ^{ad}	2.288±0.248 ^{ad}
高脂饮食健骨颗粒组	3.668±0.339	2.972±0.003 ^c	2.753±0.143 ^c	2.323±0.173 ^{ac}
高脂饮食辛伐他汀组	3.203±0.386	3.005±0.223 ^{cd}	2.867±0.153 ^{ad}	2.493±0.135 ^c

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常饮食模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂饮食模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂饮食健骨颗粒组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.8 健骨颗粒对大鼠血清骨钙素的影响 各模型组骨钙素水平与假手术组相比有所升高, 其中辛伐他汀组中高脂模型组最低, 高脂饮食健骨颗粒组与正常饮食模型组次之, 模型组骨钙素最高($P < 0.05$)。各组骨钙素均随时间变化有所上升, 见表8。

表 8 各组大鼠血清骨钙素比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/L}$)
Table 8 Comparison of rat serum osteocalcin level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	1.43±0.20	1.43±0.30 ^{bcd}	1.42±0.22 ^{bcd}	1.50±0.19 ^{bcd}
正常饮食模型组	1.38±0.20	1.82±0.23 ^a	1.90±0.22 ^a	1.93±0.21 ^{ad}
高脂饮食模型组	1.42±0.19	1.93±0.19 ^{ad}	1.99±0.28 ^a	2.09±0.26 ^a
高脂饮食健骨颗粒组	1.35±0.21	1.80±0.20 ^c	1.85±0.20 ^c	1.89±0.29 ^{ac}
高脂饮食辛伐他汀组	1.48±0.22	1.42±0.27 ^{bcd}	1.53±0.20 ^{abcd}	1.71±0.24 ^{cb}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与正常饮食模型组比较,^b $P < 0.05$;与高脂饮食模型组比较,^c $P < 0.05$;与高脂饮食健骨颗粒组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.9 健骨颗粒对大鼠血清TRACP5b的影响 各模型组TRACP5b水平与假手术组相比有所升高,其中辛伐他汀组中高脂模型组最低,高脂饮食健骨颗粒组与正常饮食模型组次之,模型组TRACP5b最高($P < 0.05$)。各组TRACP5b 8周后又有所下降,同组不同时段比较无统计学意义($P > 0.05$),见表9。

表 9 各组大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP5b)比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/L}$)
Table 9 Comparison of rat serum tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b level among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	18.35±0.17	18.45±0.20 ^{bcd}	18.56±0.19 ^{bcd}	18.68±0.23 ^{bcd}
正常饮食模型组	18.40±0.21	24.14±0.20 ^a	23.87±0.21 ^a	23.94±0.23 ^{ad}
高脂饮食模型组	18.38±0.23	25.34±0.21 ^{ad}	24.98±0.22 ^a	24.04±0.29 ^a
高脂饮食健骨颗粒组	18.43±0.19	23.85±0.20 ^c	23.13±0.16 ^c	23.00±0.21 ^{ac}
高脂饮食辛伐他汀组	18.38±0.19	21.45±0.17 ^{bcd}	21.32±0.20 ^{abcd}	20.14±0.17 ^{cb}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与正常饮食模型组比较,^b $P < 0.05$;与高脂饮食模型组比较,^c $P < 0.05$;与高脂饮食健骨颗粒组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.10 健骨颗粒对大鼠骨组织瘦素、瘦素受体mRNA表达的影响 实验结果显示,各模型组瘦素、瘦素受体mRNA表达均较假手术组降低,模型组中辛伐他汀组中高脂模型组最高,高脂饮食健骨颗粒组、正常饮食模型组次之,模型组瘦素、瘦素受体最低($P < 0.05$),见表10, 11。

表 10 各组大鼠骨组织瘦素 mRNA 比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 10 Comparison of leptin mRNA expression in rat bones among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	1	1.006±0.014 ^{bcd}	0.974±0.008 ^{bcd}	0.967±0.011 ^{bcd}
正常饮食模型组	1.011±0.012	0.857±0.016 ^a	0.743±0.012 ^{ac}	0.616±0.018 ^a
高脂饮食模型组	0.987±0.013	0.562±0.020 ^{abd}	0.474±0.013 ^{abd}	0.417±0.014 ^{ab}
高脂饮食健骨颗粒组	1.007±0.008	0.785±0.018 ^c	0.698±0.016 ^{cc}	0.593±0.020 ^a
高脂饮食辛伐他汀组	0.982±0.017	0.862±0.010 ^{acd}	0.724±0.018 ^{ac}	0.647±0.019 ^{ccb}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与正常饮食模型组比较,^b $P < 0.05$;与高脂饮食模型组比较,^c $P < 0.05$;与高脂饮食健骨颗粒组比较,^d $P < 0.05$ 。

表 11 各组间骨组织瘦素受体 mRNA 比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 11 Comparison of leptin receptor mRNA expression in rat bones among groups

组别	干预前	4周	8周	12周
假手术组	1.003±0.013	0.954±0.021 ^{bcd}	0.966±0.013 ^{bcd}	0.945±0.020 ^{bcd}
正常饮食模型组	1.013±0.012	0.731±0.014 ^{ad}	0.662±0.021 ^a	0.598±0.008 ^{ad}
高脂饮食 1 模型组		0.644±0.012 ^{ad}	0.575±0.022 ^a	0.545±0.017 ^{abd}
高脂饮食 2 模型组	0.983±0.027	0.695±0.017 ^{cc}	0.654±0.020 ^c	0.603±0.022 ^{abc}
高脂饮食 3 模型组	0.976±0.018	0.802±0.016 ^{abcd}	0.722±0.011 ^{abcd}	0.683±0.018 ^{ccd}

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与正常饮食模型组比较,^b $P < 0.05$;与高脂饮食模型组比较,^c $P < 0.05$;与高脂饮食健骨颗粒组比较,^d $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

肥胖是由于热量摄入多于热量消耗致使脂肪合成增加或者机体代谢的改变导致体内脂肪积聚过多的一种慢性代谢性疾病,或机体代谢的改变导致体内脂肪积聚过多的一种慢性代谢性疾病。而骨质疏松症是一种全身性代谢性骨病,流行病学调查和研究表明:肥胖和骨质疏松症间存在多种重要分子以及细胞信号通路,其中脂肪组织可以通过脂肪细胞的分化和旁分泌作用于骨组织,肥胖导致体内脂代谢紊乱并促使前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞,并调控脂肪细胞分泌瘦素^[9],从而导致刺激成骨细胞活性,抑制破骨细胞活性增强,最终成骨作用减弱^[1]。之前多项研究显示:肥胖与骨密度呈正相关,对骨质疏松症的发生有着一定预防作用,并能减低因骨质疏松症而导致的骨折风险^[10]。但近年研究发现:过度增加脂肪摄入并不能预防骨折的发生^[11-13]。实验结果显示:切除卵巢后去势各组大鼠体质量、胆固醇、三酰甘油均大于假手术组($P < 0.05$),表明切除卵巢后对体内出现脂代谢紊乱、大鼠体质量增加。

瘦素是脂肪组织分泌一种蛋白,并且瘦素受体存在于骨组织中,而瘦素通过直接或间接作用能够抑制骨的生成,这就使得瘦素在脂肪组织与骨组织间起到重要的纽带作用^[14]。通过实验发现,瘦素主要作用于分化完成的成骨细胞,并能促进成骨细胞增殖分化,刺激成骨细胞活性,并且抑制其凋亡,对其前体细胞无明显的影响^[15]。

实验通过ELISA法检测血清中的瘦素、瘦素受体、胆固醇、三酰甘油、骨钙素、TRACT-5b的浓度,qPCR法检测骨组织中瘦素、瘦素受体的mRNA的表达。研究结果发现,随着干预时间增加,假手术组中表达的瘦素、瘦素受体、骨钙素浓度均高于各模型组,TRACT-5b、胆固醇、三酰甘油的浓度均低于各模型组,说明绝经后体内脂代谢改变、过度摄入脂肪方能够降低骨钙素的表达,增加TRACT-5b的表达,从而促进破骨细胞的分化、发育、活

化,使骨的形成收到抑制,骨的吸收得到促进,骨平衡被打破,从而引起骨质疏松。

中医理论认为:肾藏精,生髓主骨;脾主运化,合肌肉,主四肢。肾中精气充盈,骨髓得以温养,而原发性骨质疏松症的病理机制为脾肾亏虚,骨髓、脑髓失养,肌肉痿弱不用,终致骨枯肉却,即所谓“骨肉不相亲”。而原发性骨质疏松患者在中年以后天癸渐竭,肾气由盛转衰,水湿失运,痰瘀渐生,不能化气行水,致使湿浊内聚,而产生肥胖,故脾肾两虚型较多。“肾主骨”、“补先后天”理论为组方原则健骨颗粒是针对“肾亏脾虚”的病机特点,以煨狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药组方而成,通过补肾健脾,达到强筋壮骨之目的^[16]。该实验结果显示:高脂饮食健骨颗粒组的体质量高于与同期正常饮食模型组与高脂饮食模型组,但低于假手术组和高脂饮食辛伐他汀组,同时表达的瘦素、瘦素受体、骨钙素浓度均高于正常饮食模型组与高脂饮食模型组,TRACT-5b、胆固醇、三酰甘油的浓度均低于正常饮食模型组与高脂饮食模型组,各组比较均有统计学意义($P < 0.05$)。说明:健骨颗粒在调整大鼠脂代谢紊乱、降低血液黏滞度、改善血管壁结构的同时还能通过上调大鼠血清和骨组织中瘦素、瘦素受体的表达,改善大鼠骨代谢水平,骨吸收受到抑制,骨形成得到促进,从而发挥防治原发性骨质疏松症的作用。

作者贡献: 实验设计为林煜,李平;实验实施为李平、林煜、朱曦、肖莉莉、华鹏、林学义;实验评估为林煜、张怡元;资料收集为李平、华鹏、林学义;林煜、朱曦、审校;林煜对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“福建省自然科学基金(2017J01332),福州市卫生系统科技项目(2017-S-wq15)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经厦门大学附属福州第二医院实验伦理委员会批准,批准号为201605021。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情

况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Gunaratnam K,Vidal C,Gimble JM,et al.Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in human osteoblasts. *Endocrinol.* 2014;155(1):108-116.
- [2] 林煜,张怡元,黄云梅,等.健骨颗粒对大鼠骨组织端粒酶逆转录酶增龄性变化的干预作用[J].*中华中医药杂志*,2016,31(12):5333-5338.
- [3] 林燕萍,何嘉承,余家炬,等.健骨颗粒对体外破骨细胞整合素 αV 及 $\beta 3$ mRNA表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2012,27(5):1272-1276.
- [4] 林燕萍,李咏高,马建华,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模鼠骨代谢的影响[J].*福建中医学院学报*,2001,11(4):17-19.
- [5] 林煜,卢天祥,吴银生,等.健骨颗粒对成骨细胞分化影响的实验研究[J].*中华中医药杂志*,2012,27(1):162-166.
- [6] 林煜,卢天祥,吴银生,等.健骨颗粒促进成骨细胞增殖的分子机制[J].*中国组织工程研究*,2013,17(15):2677-2684.
- [7] Huang Y, Lin Y, Wu Y, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of jiangou granule-containing serum on RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):8420-8426.
- [8] Moberg L, Nilsson PM, Samsioe G, et al. Low androstenedione/sex hormone binding globulin ratio increases fracture risk in postmenopausal women. The women's health in the lund area study. *Maturitas.* 2013;75(3):270-275.
- [9] Hadj Taieb S, Kallel L, Feki M, et al. Unbalanced bone remodeling in Tunisian patients with inflammatory bowel diseases. *Tunis Med.* 2013;91(4):273-277.
- [10] Thomas T, Burguera B, Melton LJ, et al. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone.* 2001;29(2):114-120.
- [11] De Laet C, Kanis JA, Oden A, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(11):1330-1338.
- [12] Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(1):146-154.
- [13] Blum M, Harris SS, Must A, et al. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2003;73(1):27-32.
- [14] Karsenty G, erron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 2012;481(7381):314-320.
- [15] Karsenty G. Leptin controls bone formation through a hypothalamic Relay. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:401-415.
- [16] 钱小燕,郭宝鸿.单纯性肥胖症的辨证论治探讨[J].*光明中医*,2009,24(2):204-205.