

# 人参皂苷抗糖皮质激素诱发骨质疏松的效应及机制研究

吕祥<sup>1</sup> 杜娟<sup>2</sup> 程彬彬<sup>2</sup> 李柏<sup>2</sup> 李勇<sup>1</sup> 凌昌全<sup>2,3</sup>

(1 上海市中医医院,上海市闸北区芷江中路 274 号,200071; 2 第二军医大学附属长海医院中医科; 3 上海高校内科中医学 E-研究院)

**摘要** 目的:研究人参皂苷(GSS)对糖皮质激素诱发的骨质疏松大鼠骨生物力学及骨密度的改善作用及其机制。方法:将3月龄的雌性Wister大鼠随机分为5组,即正常对照组、模型组(激素组)和人参皂苷高、中、低剂量组(激素+用药组)。皮下注射甲泼尼龙5mg/Kg·d<sup>-1</sup>,建立骨质疏松症模型。人参皂苷组造模后GSS高(100mg/kg)、中(50mg/kg)、低(25mg/kg),每日2次,其他2组给予等量生理盐水,实验期为9w。9w后测定各组大鼠骨密度(BMD)、骨代谢生化指标及骨生物力学指标等。结果:反映骨形成指标BGP、CT及血清Ca水平,模型组显著低于正常组,人参皂苷高剂量组显著高于模型组(P<0.05),反映骨吸收的TRACP酶活性及血清P水平,各组之间无统计学意义(P>0.05);与正常组比较,模型组大鼠腰椎及股骨骨密度、最大载荷及刚度均显著降低(P<0.05),且腰椎骨密度下降更为明显,与模型组比较,人参皂苷高剂量组大鼠腰椎及股骨骨密度、最大载荷及刚度均显著增高(P<0.05)。结论:人参皂苷GSS可通过改善骨代谢生化指标及骨生物力学性能,拮抗糖皮质激素性骨质疏松大鼠的骨丢失,起到防治骨质疏松的作用。

**关键词** 糖皮质激素;骨质疏松;人参皂苷

## Impact and Mechanism of Ginsenoside on anti-glucocorticoid Induced Osteoporosis

Lu Xiang<sup>1</sup>, Du Juan<sup>2</sup>, Cheng Binbin<sup>2</sup>, et al.

(1 Shanghai Hospital of TCM, Add.: No. 274, Zhi Jiang Middle Road, Zhabei District, Shanghai, post code: 200071; 2 TCM department of Changhai Hospital, the 2nd Military Medical University)

**Abstract Objective:**To investigate modifying impact and mechanism of Ginsenoside saponins (GSS) on bone biomechanics and bone density in glucocorticoid induced osteoporosis rats. **Methods:**Three month aged female Wister rats were randomly divided into 5 groups, namely the normal control group, model group (hormone treated) and ginseng saponin in high, low, group plus hormone treatment. Subcutaneous injection of methylprednisolone (5mg/Kg) to establish the osteoporosis model. Ginseng saponins groups were given GSS at respective dosages, i. e. high (100mg/kg), medium (50 mg/kg), low (25 mg/kg), twice a day. The other two groups were given the same amount of normal saline. After 9W, rats' bone mineral density (BMD) and biochemical markers of bone metabolism and bone biomechanics were observed. **Results:**The index of BGP, CT and Ca of the model group were significantly lower than those of the normal group, and of the high dosage GSS group (P<0.05). The difference of RACP and serum P were not significant among groups (P>0.05); Compared with normal group, the rats in the model group showed reduced lumbar and femoral bone mineral density, maximum load and stiffness (P<0.05), and a lumbar bone density decreased more significantly. Compared with the model group, those parameters were significantly higher in high dose group of ginsenosides rats (P<0.05). **Conclusion:**Ginsenoside can prevent and treat osteoporosis by improving biochemical markers of bone metabolism and bone biomechanics and antagonizing bone loss in glucocorticoid reduce osteoporosis.

**Key Words** Glucocorticoid; Osteoporosis; Ginsenoside

糖皮质激素(Glucocorticoid,GC)被广泛用于治疗多种自身免疫性疾病,但大量的临床实践证实,糖皮质激素犹如一把双刃剑,在发挥治疗作用的同时,也会对人体产生巨大的副作用。骨质疏松就是应用GC的主要并发症之一。有研究表明大约90%长期使用GC治疗的患者,有明显的骨量丢失、骨质改变,骨折发生率明显增加<sup>[1]</sup>。目前该病的发病机制尚不明确,防治尚

无有效的治疗方法。本研究通过检测骨密度、骨代谢生化指标及骨生物力学性能,探讨人参皂苷对糖皮质激素诱发骨质疏松大鼠的治疗作用。

### 1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 人参皂苷(纯度>85%)由上海药检所提供,溶解于DMSO备用;甲泼尼龙,500mg/瓶,Pfizer公司,批号:R02069;骨钙素、降钙素试剂盒购于上海时代生物科技有限公司;血清抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所。QDR4500A型双能X线骨密度测定仪(DEXA,美国麻省HOLO GIC公司生产);MTS-858型生物力学材料

基金项目:国家自然科学基金青年项目(NO.81001672);上海市自然科学基金项目(NO.09ZR1439000);上海市卫生局科教处科研项目(NO.2009179);上海市高等学校中医内科学E-研究院建设计划(项目编号:E03008)

试验机(美国)。

1.2 实验动物 3 月龄雌性 Wister 大鼠,50 只,体重 150g 左右,由中国科学院上海实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(沪)2010-0003。

2 方法

2.1 动物造模及分组 动物适应性喂养 7 天后,随机分为 5 组:正常对照组 10 只,模型组(激素组)10 只,人参皂苷治疗组(激素+用药组)30 只(GSS 100mg/kg,50mg/kg,25mg/kg)。参考 Hulley<sup>[2]</sup>等的造模方法,模型组采用甲泼尼龙 5mg/Kg·d<sup>-1</sup>皮下注射每周 5 次;对照组以等量生理盐水 0.75mL/kg 皮下注射;用药组造模后分别给予 GSS 高(100mg/kg)、中(50mg/kg)、低(25mg/kg)。每日 2 次,实验期 9w。所有动物在同条件下饲养,自由摄食和饮水,每周称体重 1 次,根据体质量调节药物剂量。

2.2 体质量测量及生长情况观察 实验期间密切观察大鼠生活情况(包括摄食、饮水、活动、皮肤色泽等),实验前、实验开始后每周用天平测量大鼠体质量,观察其变化。

2.3 骨密度测定 取大鼠第 5 腰椎(保留椎体和棘突)和右侧股骨分别剔尽其附着软组织,用浸透生理盐水纱布包裹,检测时去掉纱布,将标本置于双能 X 线骨密度测定仪上测定,计算机采用小动物梯级标准分析软件,并自动记录骨密度。

2.4 骨生物力学测定 1)压缩实验:应用大鼠第 5 腰椎,去除棘突,只保留椎体,实验试件经切割打磨去除软骨板,并使两面平行,将标本置于钢制平台上,保持椎体上下面水平,加载速度为 2mm/min,压缩以过最大载荷为限,计算机得出载荷位移曲线。2)三点弯曲实验:取右股骨全长,两端用牙托粉浇铸固定后放在试验机上测试,跨距 22mm,标本横截面短轴的方向与加载力方向一致,最大加载速度 2mm/min,计算机得出载荷挠度曲线。

2.5 血清学指标检测 各组大鼠均于末次干预给药后禁食 12h,用 10% 水合氯醛 1mL/kg 麻醉后,腹主动脉采血,血液离心(300r/min,10min)。分离血清,-80℃ 冰箱冻存待测,分别采用全自动生化分析仪测定血清钙、磷,放射免疫法测定血清 BGP、CT 含量,及比色法测定血清 TRACP 酶活性等指标。

2.6 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组之间比较采用单因素方差分析,组间差异用 SNK 法。

3 结果

3.1 大鼠一般生长情况 在激素应用过程中,模型组

大鼠逐渐出现毛被稀疏缺乏光泽、懒动、少食、体质量增长缓慢等,而正常组和人参皂苷高剂量组大鼠活动自由,皮毛光泽。实验过程中有 4 只大鼠因感染和灌胃死亡,被剔除。

3.2 血清学指标测定结果 反映骨形成指标 BGP、CT 及血清 Ca 水平,模型组显著低于正常组,人参皂苷高剂量组显著高于模型组( $P < 0.05$ );反映骨吸收的 TRACP 酶活性及血清 P 水平,各组之间无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1、表 2。

表 1 人参皂苷 GSS 对骨质疏松大鼠骨代谢指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	BGP(ng/mL)	CT(pg/mL)	TRACP(U/L)
正常组	10	1.48 ± 0.41	210.25 ± 31.25	18.15 ± 6.52
模型组	9	0.87 ± 0.32*	168.43 ± 27.58*	23.34 ± 6.72
人参皂苷高剂量组	9	1.36 ± 0.41 <sup>△</sup>	204.52 ± 26.75 <sup>△</sup>	19.43 ± 6.26
人参皂苷中剂量组	9	1.12 ± 0.38*	183.62 ± 27.56*	20.52 ± 5.45
人参皂苷低剂量组	9	0.90 ± 0.35*	169.32 ± 26.53*	23.48 ± 5.67

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 人参皂苷 GSS 对骨质疏松大鼠血清 Ca、P 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)
正常组	10	1.23 ± 0.22	1.78 ± 0.47
模型组	9	0.93 ± 0.15*	1.97 ± 0.43
人参皂苷高剂量组	9	1.22 ± 0.21 <sup>△</sup>	1.87 ± 0.33
人参皂苷中剂量组	9	1.08 ± 0.18*	1.92 ± 0.28
人参皂苷低剂量组	9	0.96 ± 0.15*	1.98 ± 0.36

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 人参皂苷 GSS 对骨质疏松大鼠 BMD 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	股骨 BMD(g/cm <sup>2</sup> )	腰椎 BMD(g/cm <sup>2</sup> )
正常组	10	0.258 ± 0.013	0.254 ± 0.011
模型组	9	0.242 ± 0.011*	0.236 ± 0.012*
人参皂苷高剂量组	9	0.258 ± 0.004 <sup>△</sup>	0.249 ± 0.007 <sup>△</sup>
人参皂苷中剂量组	9	0.252 ± 0.008*	0.249 ± 0.018*
人参皂苷低剂量组	9	0.248 ± 0.015*	0.241 ± 0.013*

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

表 4 股骨三点弯曲及第 5 腰椎压缩实验结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	三点弯曲实验		压缩实验	
		最大载荷(N)	刚度(N/mm)	最大载荷(N)	刚度(N/mm)
正常组	10	147.04 ± 19.78	259.32 ± 68.64	267.78 ± 14.97	321.65 ± 37.58
模型组	9	123.93 ± 15.46*	175.87 ± 35.74*	216.85 ± 21.73	229.69 ± 79.51
人参皂苷高剂量组	9	145.63 ± 13.92 <sup>△</sup>	253.86 ± 54.72 <sup>△</sup>	250.84 ± 18.85 <sup>△</sup>	315.98 ± 70.82 <sup>△</sup>
人参皂苷中剂量组	9	132.32 ± 15.63*	218.45 ± 27.56*	232.33 ± 17.73*	267.52 ± 53.45*
人参皂苷低剂量组	9	127.82 ± 18.06*	180.32 ± 26.53*	223.05 ± 19.49*	242.57 ± 43.76*

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

3.3 骨密度的变化 与正常组比较,模型组大鼠腰椎与股骨骨密度均显著降低( $P < 0.05$ ),且腰椎骨密度下降更为明显,与模型组比较,人参皂苷高剂量组大鼠腰椎及股骨骨密度均显著增高( $P < 0.05$ ),见表 3。

3.4 骨生物力学指标结果 与正常组比较,模型组大鼠腰椎与股骨最大载荷、刚度均显著降低( $P < 0.05$ ),与模型组比较,人参皂苷高剂量组大鼠腰椎及股骨最大载荷、刚度均显著增高( $P < 0.05$ ),见表4。

#### 4 讨论

GC 已广泛用于临床,而长期使用类固醇激素造成的骨质疏松,为继发性骨质疏松症的首要病因。临床上这类患者骨代谢主要表现为骨形成的降低和骨吸收的增加。目前治疗手段有限。骨密度是诊断骨质疏松、评价骨质疏松的程度及疗效的必要手段,DEXA 直接测量实验动物的 BMD,具有较高的精密度和准确度<sup>[3]</sup>,故本实验选用骨密度作为评价模型制备成功的指标。Iwamoto 等<sup>[4]</sup>研究发现 GC 引起骨量丢失是从松骨开始的,且以松质骨含量丰富区明显。实验结果显示:与正常组比较,模型组大鼠股骨、腰椎 BMD 显著下降,且以腰椎 BMD 下降更为明显,表明糖皮质激素骨质疏松模型制备成功,且松质骨骨密度较皮质骨下降更为明显,与 Iwamoto 等的研究结果一致,而临床上骨质疏松骨折也常发生在腰椎及髌骨等部位。

以往研究表明,糖皮质激素可抑制成骨细胞的产生,促使成骨细胞及骨细胞的凋亡,使成骨细胞的数目减少,功能降低,使骨形成减少;同时,成骨细胞不能正常募集到骨侵蚀表面,使破骨细胞吸收的骨面不能被填补而造成骨丢失<sup>[5]</sup>。BGP 又称为  $\gamma$  羟基谷氨酸蛋白(Bone Gla Protein),是成骨细胞合成和分泌的一种激素样多肽,是反映骨更新状态和骨形成的一种特异性指标。血清中 BGP 水平的变化直接反映成骨细胞活性,是成骨细胞功能和骨质矿化的特殊标志物,是衡量骨形成的一个重要指标。CT 是由甲状腺 C 细胞合成和分泌的一种激素,对骨代谢有重要的调节作用,通过受体介导作用能抑制破骨细胞的活性。实验结果表明:骨质疏松大鼠血清 BGP、CT、Ca 含量下降,且均与骨密度结果相符,表明 GC 能抑制钙吸收,抑制成骨细胞活性,影响骨矿物质沉淀及骨形成而导致骨丢失;人参皂苷高剂量组大鼠血清 BGP、CT、Ca 水平显著高于模型组,表明使用高剂量的人参皂苷后,成骨细胞增殖活跃,骨吸收受到抑制,骨量丢失相对减少。提示人参皂苷对糖皮质激素性骨质疏松有治疗作用。

骨生物力学是研究骨组织在外力作用下的力学特性及受力后生物学效应,是骨量、骨结构及骨质量的综合反映。发生骨质疏松后,骨的力学性能下降,抗外力能力降低,骨脆性增加,致使骨折发生率提高。故防治骨质疏松症的药物从生物力学角度应能稳定骨的生物力学性能,改善骨质疏松症患者骨组织结构力学性能,

提高骨的强度和韧性。椎体和股骨的最大载荷和刚度是反映生物力学性质的重要指标;最大载荷反映骨的载荷能力,刚度是指在轴向载荷作用下抵抗变形的能力。骨的最大载荷和刚度与 BMD 呈显著正相关<sup>[6]</sup>,当骨质疏松时,骨密度下降,骨的最大载荷和刚度下降,骨折容易发生。本实验显示骨质疏松模型大鼠第 5 腰椎、股骨的最大载荷与刚度相对正常对照组显著降低,且与 BMD 变化方向一致,而人参皂苷则能维持糖皮质激素大鼠腰椎生物力学性能基本稳定,提示人参皂苷对激素性骨质疏松大鼠椎骨、股骨生物力学性能变化具有的拮抗作用。

综上所述,人参皂苷能提高糖皮质激素诱发骨质疏松大鼠骨密度,改善骨代谢生化指标及骨生物力学性能,从而起到抗骨质疏松作用,但其具体作用环节以及机理有待进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Fujita K, Kasayana S, Hashimoto J. Inhaled corticosteroids reduce bone mineral density in early postmenopausal but not premenopausal asthmatic woman. *J Bone Miner Res*, 2001, 16:782.
- [2] Hully P A, Conrad IE M M, Langeveldt C R, et al. Glucocorticoid - induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. *Bone*, 2002, 31(1):220 - 229.
- [3] Griffin M G, Kimble R, Hopfer W, et al. Dual - energy x - ray - absorptiometry of the rat: accuracy, precision, and measurement of bone loss. *Bone Miner Res*, 1993, 8(7):7952 - 8001.
- [4] Iwamoto J, Seki A, Takeda T, et al. Effects of alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass in rats treated with glucocorticoid: a bone histomorphometry study. *Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2007, 53(3):191 - 197.
- [5] 刘亚伟. 糖皮质激素性骨质疏松的发病机制及治疗进展. *国外医学·泌尿系统分册*, 2004, 24(5):711 - 714.
- [6] 刘文军, 廖进民, 谭小云, 等. 椎体骨密度、体积骨密度与生物力学强度的比较. *中国临床康复*, 2004, 8(5):880 - 881.

(2011 - 08 - 15 收稿)

### 悼念国医大师何任教授

我社第一届编委会顾问, 中国共产党优秀党员, 国医大师, 著名中医教育家、理论家、临床家, 浙江中医药大学终身教授、博士生导师何任先生, 因病医治无效, 于 2012 年 2 月 23 日离我们而去, 享年 93 岁。何任先生医术精湛、医德高尚, 为医家楷模, 令世人敬仰。