

· 论著 ·

## 积雪草酸对高血脂小鼠骨量丢失的保护作用

吴少科<sup>1</sup> 陈晓驹<sup>2</sup> 孙欣<sup>1</sup> 陈海聪<sup>1</sup> 林柏云<sup>1</sup> 钟环<sup>1</sup> 胡资兵<sup>1\*</sup> 魏波<sup>1</sup> 孙文皋<sup>1</sup>

1. 广东医科大学附属骨外科, 广东 湛江 524023

2. 广东医科大学附属医院 VIP 病区, 广东 湛江 524023

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 03-0281-09

**摘要:** 目的 探讨积雪草酸对高血脂小鼠骨量丢失的保护作用。方法 60 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 J 小鼠按体重随机分为 6 组, 每组 10 只: 空白对照组[ CON, 生理盐水: 5 mL/(kg·d) ]、高脂饲料组[ HFD, 生理盐水: 5 mL/(kg·d) ]、高脂饲料 + 低剂量积雪草酸组[ HFD + AA-L: 5 mg/(kg·d) ]、高脂饲料 + 中剂量积雪草酸组[ HFD + AA-M: 10 mg/(kg·d) ]、高脂饲料 + 高剂量积雪草酸组[ HFD + AA-H: 20 mg/(kg·d) ]、高脂饲料 + 辛伐他汀组[ HFD + SIM: 20 mg/(kg·d) ]。除空白组之外, 其他组别采用高脂饲料连续喂养 16 周并同时给药进行干预。实验结束后, 经眼眶采血收集血清、两侧股骨和胫骨。结果 高脂饲料引起小鼠血清胆固醇(TC)、丙二醛(MDA)和 I 型胶原 C 末端肽(CTX-I)水平升高, 超氧化物歧化酶(SOD)和 I 型前胶原氨基端前肽(PINP)水平下降(均  $P < 0.05$ ), 且胫骨近端骨密度下降, 骨微结构受损, 骨形成率下降, 其股骨生物力学指标降低。HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组均可明显降低小鼠血清 TC、MDA、CTX-I 水平, 升高 SOD 和 PINP 水平(均  $P < 0.05$ ), 增加骨密度和改善骨微结构, 提高骨生物力学指标, HFD + AA-H 组效果稍优于 HFD + AA-M, 但逊于 HFD + SIM 组。HFD + AA-L 组小鼠血指标、骨密度、骨微结构和骨生物力学均无明显改善( $P > 0.05$ )。结论 积雪草酸[ 10、20 mg/(kg·d) ]灌胃给药可预防高血脂小鼠的骨量丢失, 其机制可能通过促进骨形成, 抑制骨吸收, 增加机体的抗氧化能力。

**关键词:** 积雪草酸; 高血脂; 骨量丢失; 氧化应激

### The protective effect of asiatic acid on bone loss in mice with hyperlipidemia

WU Shaokel<sup>1</sup>, CHEN Xiaos<sup>2</sup>, SUN Xin<sup>1</sup>, CHEN Haicong<sup>1</sup>, LIN Baiyun<sup>1</sup>, ZHONG Huan<sup>1</sup>, HU Zibing<sup>1\*</sup>, WEI Bo<sup>1</sup>, SUN Wengao<sup>1</sup>

1. Department of Orthopedic Surgery, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

2. Department of VIP Ward, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

\* Corresponding author: HU Zibing, E-mail: zibinghu@gdmu.edu.cn

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of asiatic acid on bone loss in mice with hyperlipidemia. **Methods** Sixty 8-week-old male SPF C57 BL/6 J mice were randomly divided into 6 groups, with 10 mice per group: CON group (saline: 5 ml/kg/d), HFD group (saline: 5 ml/kg/d), HFD + AA-L group (AA: 5 ml/kg/d), HFD + AA-M group (AA: 10 ml/kg/d), HFD + AA-H group (AA: 20 ml/kg/d), and HFD + SIM group (SIM: 20 ml/kg/d). Mice in each group were fed with high-fat diet for 16 weeks except in CON group. Meanwhile, asiatic acid and simvastatin were orally administered for intervention. At the end of the experiment, the serum, bilateral femurs and tibias were collected. **Results** After feeding with high-fat diet, the serum levels of cholesterol (TC), malondialdehyde (MDA), and C-telopeptide of type I collagen (CTX-I) increased, and the serum levels of superoxide dismutase (SOD) and propeptide of type I procollagen (PINP) decreased. Bone mineral density decreased, bone microstructure was destroyed in the proximal tibias, and the value of biomechanical parameters of the femur decreased. The levels of TC, MDA, and CTX-I decreased in HFD + AA-M, HFD + AA-H, and HFD + SIM group ( $P < 0.05$ ), but the levels of SOD and PINP increased ( $P < 0.05$ ). Bone mineral density increased, bone microstructure improved, and the biomechanical indexes increased. The effect in HFD + AA-H group was slightly better than in HFD + AA-M group, but slightly less than in HFD + SIM group. The serum parameters, bone mineral density, bone microstructure, and bone biomechanical indexes were not changed in HFD + AA-L group. **Conclusion** Oral administration of asiatic acid (10, 20 mg/kg/d) prevents bone loss via promoting bone

formation, inhibiting bone absorption, and increasing the antioxidant capacity in mice with hyperlipidemia.

**Key words:** Asiatic acid; Hyperlipidemia; Bone loss; Oxidative stress

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨代谢性疾病,其特征是低骨量、骨强度下降、骨折风险性增加。高脂血症是指一种发病隐匿的、进行性和全身性疾病,表现为总胆固醇过高、甘油三酯过高或两者兼有,在中国成年人的人群里,其发病率约为 41.9%<sup>[1]</sup>。有研究表明,骨量丢失或骨质疏松的患者常常伴随着高血脂<sup>[2]</sup>,去卵巢的大鼠或绝经后的妇女出现骨量的丢失,随之血脂水平也升高<sup>[3]</sup>,并且降血脂的药物也能明显减缓高血脂所致的骨量丢失<sup>[4]</sup>,因此,高血脂在 OP 的发生与发展中起到重要作用。

积雪草酸是伞形科植物积雪草中的一种重要的五环三萜酸类化合物,化学结构如图 1,积雪草广泛分布于我国长江流域以南的阴湿地区。传统医学用积雪草外用及内服治病已有两千多年历史,近年来,随中药的研究发展,人们发现积雪草酸具有广泛的生物学活性,如抗炎、抗糖尿病、抗肿瘤和促进伤口愈合等多种作用<sup>[5]</sup>。国内外已有不少关于积雪草酸在抗氧化和降血脂方面的报道<sup>[6]</sup>,并且近年来,有研究发现积雪草酸具有抑制骨髓基质干细胞向脂肪细胞分化的能力<sup>[7]</sup>。因此,本研究猜测积雪草酸有可能减缓高血脂导致的骨量丢失,另外,目前在国内外还未见有关积雪草酸在防治高脂性骨质疏松症方面的研究报道。所以,本文通过动物实验评价积雪草酸对高血脂大鼠骨量丢失的保护作用,初步阐明其作用机制,为进一步开发治疗高脂性骨质疏松症的新药提供理论依据。

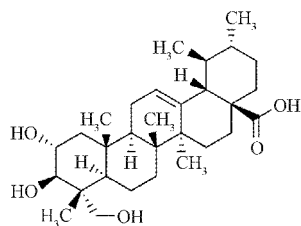


图 1 积雪草酸的化学结构图

Fig. 1 The chemical structure of the asiatic acid

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

积雪草酸 (Asiatic acid, AA, 纯度  $\geq 95\%$ , UP-LC/UV) 采购于广西昌洲天然产物开发有限公司

(批号:160102),辛伐他汀片生产于上海信谊万象药业股份有限公司 (Simvastatin, SIM, 批号:国药准字 H19980055),普通饲料 (含 64% 碳水化合物, 10% 脂肪和 26% 蛋白质) 和高脂饲料 (含 28% 碳水化合物, 60% 脂肪和 12% 蛋白质) 采购于南通特洛菲饲料科技有限公司。低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 检测试剂盒、I 型胶原 C 末端肽 (C-terminal telopeptides of type I collagen, CTX-I) Elisa 试剂盒、I 型前胶原氨基端前肽 (N-terminal propeptide of type I procollagen, PINP) Elisa 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒购于南京建成生物工程有限公司。

### 1.2 动物分组、造模及给药

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 J 小鼠 60 只,  $28.0 \pm 4.7$  g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK(沪)2012-0002。饲养于室温  $24 \sim 28^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 55% ~ 65%, 每天 12 h 照明, 12 h 黑暗, 自由饮用自来水。所有实验过程对动物的处置符合科技部《关于善待动物的指导性意见》要求。小鼠按体重随机分成 6 组, 每组 10 只: ①空白对照组 [CON, 生理盐水: 5 mL/(kg·d)], ②高脂饲料组 [HFD, 生理盐水: 5 mL/(kg·d)], ③高脂饲料 + 低剂量积雪草酸组 [HFD + AA-L: 5 mg/(kg·d)], ④高脂饲料 + 中剂量积雪草酸组 [HFD + AA-M: 10 mg/(kg·d)], ⑤高脂饲料 + 高剂量积雪草酸组 [HFD + AA-H: 20 mg/(kg·d)], ⑥高脂饲料 + 辛伐他汀组 [HFD + SIM: 20 mg/(kg·d)]。

除了 CON 组给予小鼠普通饲料喂养, 其他组别均给予小鼠高脂饲料喂养, 自由摄食饲料。采用高脂饲料连续喂养 16 周建立小鼠骨量丢失模型<sup>[8]</sup>, 并同时采用积雪草酸水溶液和辛伐他汀水溶液灌胃给药进行干预, 每 2 周称量小鼠体重 1 次, 并根据体重变化调整给药剂量。在实验结束前第 14、13、4 天和 3 天对全部小鼠的颈部皮下避光注射钙黄绿素 (5 mg/kg), 在小鼠骨组织中骨小梁表面形成绿色双荧光标记, 两次荧光标记间隔时间为 10 d。在荧光显微镜下, 沉积在骨表面的钙黄绿素呈绿色荧光。实验进行 16 周后处死小鼠。收集血清、内脏及双侧胫骨和股骨。

### 1.3 血清中血脂指标、氧化活性指标检测和肝肾毒性检测

采用分光光度计检测小鼠血清 TC、TG、LDL、SOD 和 MDA 水平,操作按说明书进行。

### 1.4 血清中骨转换代谢指标检测

用试剂盒检测小鼠血清 CTX-I 和 PINP 水平,操作按说明书进行。

### 1.5 Micro-CT 测量骨组织骨微结构

将左胫骨表面的肌肉剔除干净后,于左胫骨中间处锯断,将胫骨上段垂直固定于特定的样品固定器内,行 Micro-CT 三维扫描,扫描完成后,三维重建区域定位均在距左胫骨生长板远端 0.5 mm、层厚 2 mm 骨组织为松质骨感兴趣区域,选取具体参数如下:X 线能量 70kVp,114 $\mu$ A;扫描模式 BH:ALU;扫描分辨率 0.038 mm,2048 $\times$ 2048,曝光时间 200 ms,以最低阈值为 220 提取图像信息,获取重建图像后,使用 Micro-CT 自带的软件进行定量分析。松质骨的定量参数包括:骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁数日(trabecular number, Tb. N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)。定性 3D 图包括:分段图像(segmented image, SEG image)、分离图(separation image, SP image)和厚度图(thickness image, TH image)。

### 1.6 骨组织形态计量学检测

分离小鼠胫骨,右胫骨用低速锯锯开取胫骨上段,用甲基丙烯酸甲脂包埋做不脱钙骨切片,4  $\mu$ m 切片进行甲苯胺蓝染色,测定成骨细胞表面百分比和破骨细胞表面百分比(Ob. S/BS 和 Oc. S/BS)。8  $\mu$ m 切片直接在显微镜观察其骨组织荧光,测定骨组织动态参数,包括矿化沉积率(mineral apposition rate, MAR)、骨表面骨形成率(bone surface bone formation rate, BFR/BS)、新生骨小梁面积和骨小梁总面积比值(BFR/BV)。

### 1.7 股骨生物力学检测

分离小鼠左股骨,将左股骨表面的肌肉剔除干净后,放进装有 50% 乙醇-生理盐水的 10 mL EP 管里。样本包装好送往上海生物力学研究所进行骨生物力学检测,检测仪器:生物力学测试仪器 QW-W600。仪器将及时记录出每个时刻点的载荷和挠度变化值,绘制出载荷-位移曲线,然后读取最大载荷(maximum load)、断裂载荷(fracture load)和弹性载荷(elastic load),并计算刚度(stiffness)。

### 1.8 统计学处理

统计数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析处理。所有资料进行正态性和方差齐性检验,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时采用 LSD 检验;方差不齐时采用 Dunnett 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠体重的变化

在喂养 16 周过程里,HFD 组小鼠的体重增速高于 CON 组小鼠,在 12~16 周中,与 CON 组小鼠相比,HFD 组小鼠的体重明显增加( $P < 0.05$ ),而各浓度的治疗组小鼠体重变化无显著差异( $P > 0.05$ )。结果见图 2。

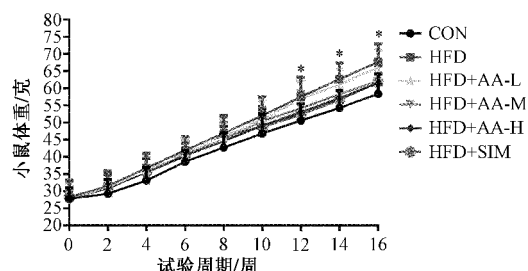


图 2 不同组别小鼠体重变化的比较

注:与 CON 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 HFD 组相比,# $P < 0.05$

Fig. 2 Comparison of the body weight of mice among different groups

Note: \* $P < 0.05$  vs CON; # $P < 0.05$  vs HFD

### 2.2 各组小鼠血清血脂指标

HFD 组小鼠血清中 TC 水平明显高于 CON 组( $P < 0.05$ ),而 TG 和 LDL 水平差异并无统计学意义( $P > 0.05$ )。除 HFD + AA-L 组之外,HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组小鼠血清中 TC 水平比 HFD 组显著降低( $P < 0.05$ ),且这三者的效果相当( $P > 0.05$ ),而各浓度治疗组小鼠血清 TG 和 LDL 水平比 HFD 组则差异均未见统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见图 3。

### 2.3 各组小鼠血清抗氧化指标

与 CON 组小鼠相比,HFD 组小鼠血清 SOD 水平明显下降( $P < 0.05$ ),MDA 水平明显升高( $P < 0.05$ )。与 HFD 组小鼠相比,除了 HFD + AA-L 组小鼠之外,HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组小鼠血清 SOD 水平显著升高( $P < 0.05$ ),而 MDA 水平显著降低( $P < 0.05$ )。结果见图 4。

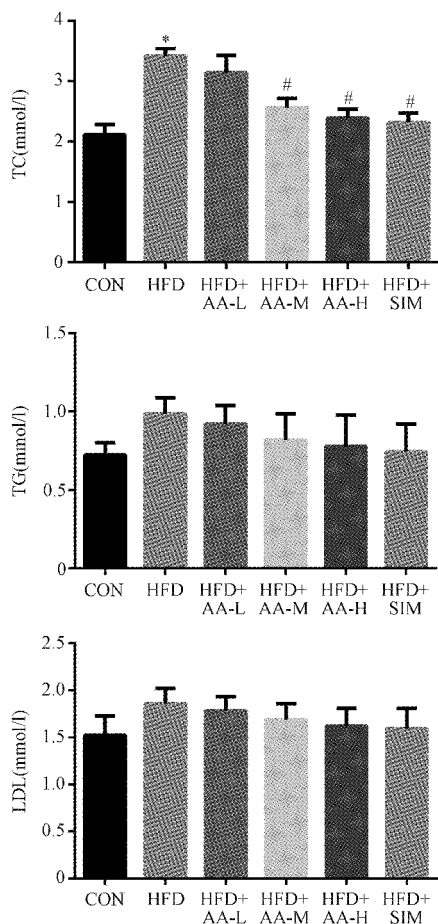


图3 不同组别小鼠血清胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$

Fig. 3 Comparison of the concentrations of TC, TG, and LDL in the serum of mice among different groups

Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

#### 2.4 各组小鼠血清骨转换代谢指标

与 CON 组小鼠相比, HFD 小鼠血清骨形成指标 PINP 水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 骨吸收指标 CTX-I 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。除了 HFD + AA-L 组小鼠之外, HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组小鼠血清 PINP 水平均比 HFD 组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而血清 CTX-I 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见图 5。

#### 2.5 各组小鼠胫骨近端松质骨的 micro-CT 3D 图

micro-CT 的 3D 图能说明不同组别小鼠胫骨近端松质骨的形态变化情况。

从 SEG 图可见: CON 组小鼠骨小梁数目多, 厚度较厚, 排列紧密, 性状规则; HFD 组小鼠骨小梁数目减少, 厚度变薄, 骨微结构受损, 完整的微观构筑受到破坏; HFD + AA-L 组小鼠骨微结构改善不明

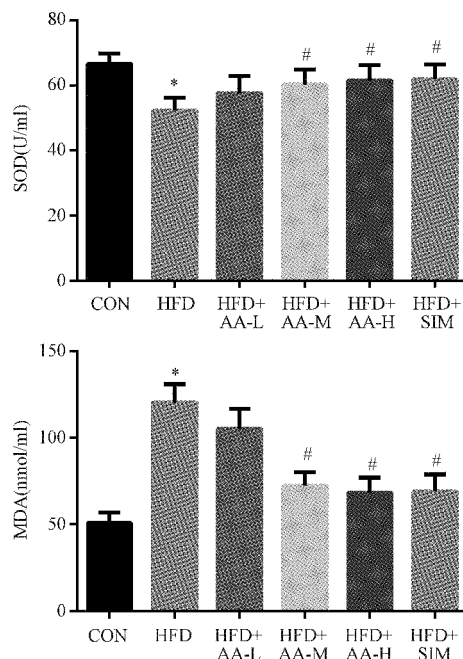


图4 不同组别小鼠血清 SOD 和 MDA 的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$

Fig. 4 Comparison of the levels of SOD and MDA in the serum of mice among different groups

Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

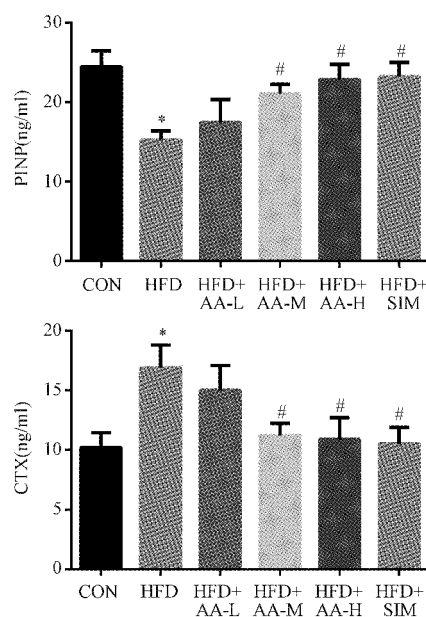


图5 不同组别小鼠血清 PINP 和 CTX-I 的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$

Fig. 5 Comparison of the levels of PINP and CTX-I in the serum of mice among different groups

Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

显, 有部分空洞; HFD + AA-M 组小鼠骨小梁数目较



HFD 组增多,排列较均匀,骨微结构有明显改善;HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组小鼠骨小梁数日较 HFD 组增多,厚度增厚,排列紧密,骨微结构有明显改善。

从 SP 图可见:CON 组小鼠松质骨上段骨小梁红色、橙色和黄色区域分布较少,由于骨小梁分离度颜色从蓝黑色、绿色、黄色、橙色到红色,代表分离度越来越大,CON 组松质骨上段骨小梁绝大部分是蓝绿色和绿色,提示 CON 组小鼠骨小梁分离度较低,骨小梁排列紧密。HFD 组小鼠松质骨上段骨小梁红色、橙色和黄色区域分布增多,特别红色和橙色区域分布面积增加最明显,提示 HFD 组小鼠骨小梁分离度增加,骨微结构存在空洞。HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组小鼠松质骨上段骨小梁红色、橙色和黄色区域分布较少,提示其骨小梁分离度较低,排列较紧密,间隙较窄,HFD + AA-L 组小鼠松质骨上段骨小梁红色、橙色和黄色区域面积分布一定程度有减少趋势,但是改善的程度并无 HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组明显。

从 TH 图可见:CON 组小鼠松质骨上段骨小梁绿色区域分布较多,由于骨小梁厚度颜色从从蓝黑色、绿色、黄色、橙色到红色,代表厚度越来越薄,这提示 CON 组小鼠骨小梁厚度较大;HFD 组小鼠松质骨上段骨小梁红色和橙色区域分布多,提示 HFD 组小鼠骨小梁厚度变薄;与 HFD 组相比,除 HFD + AA-L 组之外,其余各组小鼠绿色和黄色区域分布均有所增加,提示其骨小梁厚度有增加,结果见图 6。

## 2.6 各组别小鼠胫骨近端松质骨的骨微结构参数

与 CON 组相比,HFD 组小鼠胫骨近端松质骨骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数日 (trabecular number, Tb. N) 和骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th) 均显著下降 ( $P < 0.05$ ),骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb. Sp) 升高 ( $P < 0.05$ )。与 HFD 组相比,HFD + AA-L 组 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 和 Tb. Sp 无明显变化 ( $P > 0.05$ );HFD + AA-M 组 BMD、BV/TV 和 Tb. N 均增加 ( $P < 0.05$ ),Tb. Sp 下降 ( $P < 0.05$ ),但 Tb. Th 无明显变化 ( $P > 0.05$ );HFD + AA-H 组 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 均增加 ( $P < 0.05$ ),但 Tb. Sp 有下降趋势,但是差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。HFD + SIM 组 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 均显著升高 ( $P < 0.05$ ),Tb. Sp 下降 ( $P < 0.05$ )。结果见图 7。

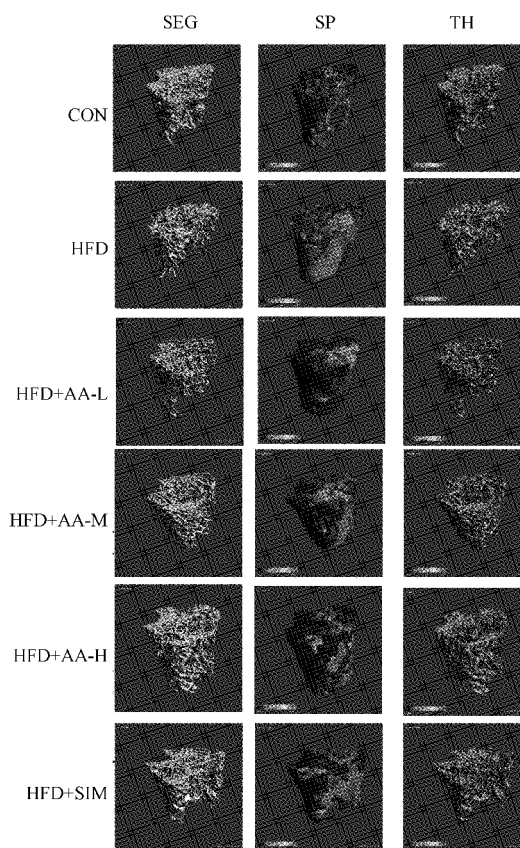


图 6 不同组别小鼠胫骨近端松质骨的 micro-CT 3D 图

Fig. 6 3D images of micro-CT of the trabecular bone in the proximal tibia in mice among different groups

## 2.7 各组别小鼠骨组织形态学和形态计量学的变化

在荧光显微镜下,CON 组骨组织荧光强、多且清晰,双荧光标记的间距较宽,而 HFD 组的荧光标志稀少,荧光强度显著减弱。HFD + AA-L 组较 HFD 组荧光标志稍多,荧光强度有所增强但是不明显;HFD + AA-M 组荧光标志明显增多,荧光强度增强;HFD + AA-H 和 HFD + AA-SIM 组荧光标志显著增多,双荧光标志的间距较宽,荧光强度明显增强。结果见图 8。

与 CON 组相比,HFD 组的骨小梁 Ob. S/BS、MAR、BFR/BS 和 BFR/BV 均显著下降 ( $P < 0.05$ ),Oc. S/BS 升高 ( $P < 0.05$ )。与 HFD 组相比,HFD + AA-L 组 Ob. S/BS、Oc. S/BS、MAR、BFR/BS 和 BFR/BV 无明显变化 ( $P > 0.05$ );HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组 Ob. S/BS、Oc. S/BS、MAR、BFR/BS 和 BFR/BV 有明显变化,其差异均具有统计学意义。结果见图 9。

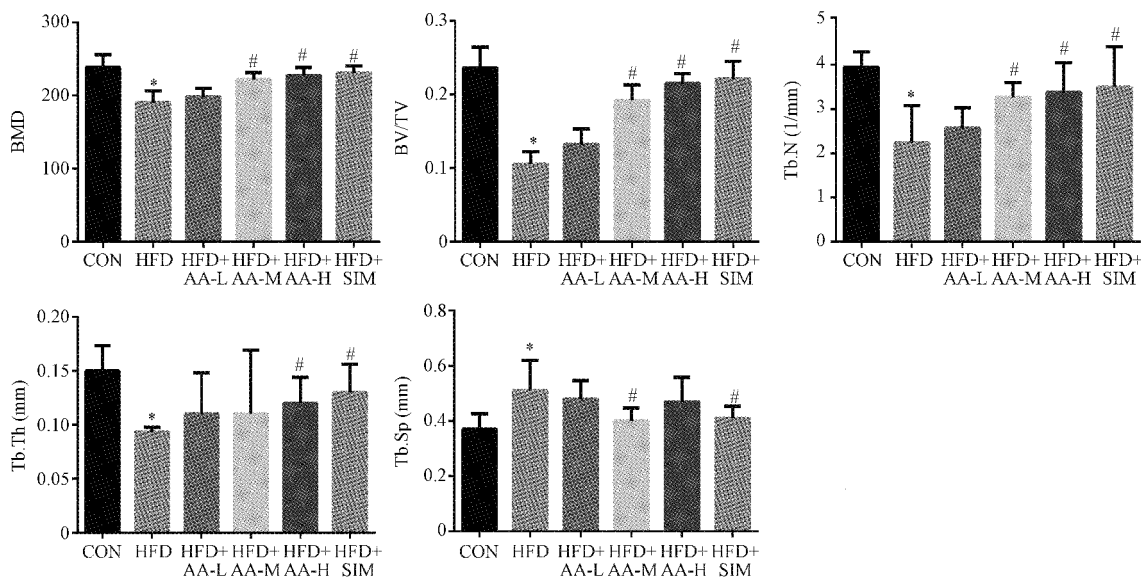


图 7 不同组别小鼠血清胫骨近端松质骨的骨微结构参数的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$

Fig. 7 Comparison of the parameters of trabecular bone microstructure of the proximal tibiae in mice among different groups

Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

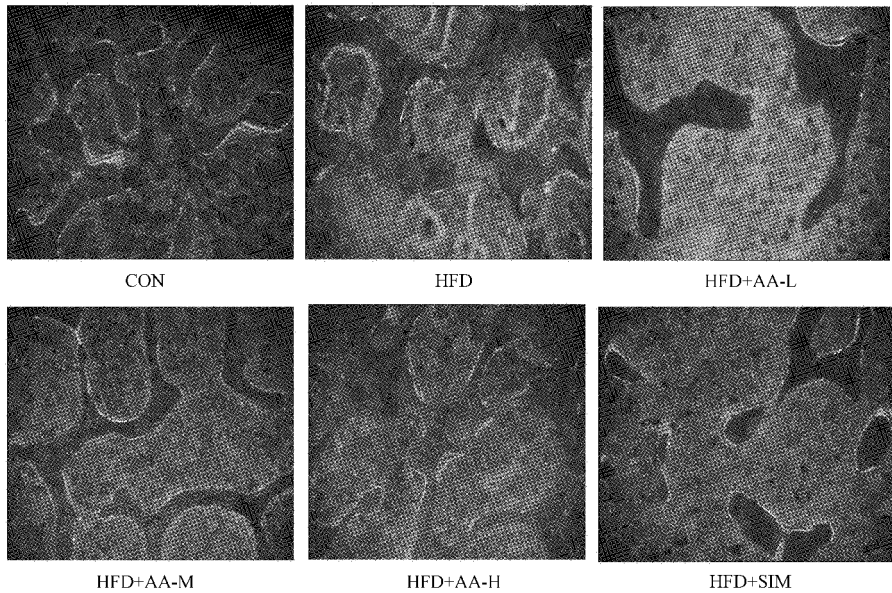


图 8 不同组别小鼠胫骨上段荧光图 (×100)

Fig. 8 Fluorescence images of the proximal tibia of mice among different groups (×100)

2.8 各组别小鼠股骨骨生物力学检测

与 CON 组相比, HFD 组股骨骨生物力学 maximum load、elastic load、fracture load 和 stiffness 均显著下降 ( $P < 0.05$ )。与 HFD 组相比, HFD + AA-L 组 maximum load、elastic load、fracture load 和 stiffness 均无明显变化, 其差异无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。HFD + AA-M、HFD + AA-H 和 HFD + SIM 组

maximum load、elastic load、fracture load 和 stiffness 均显著提高 ( $P < 0.05$ )。结果见图 10。

3 讨论

高脂血症与骨质疏松症是我国老龄化社会的多发病和常见病, 它们之间存在密切的关系。有研究发现, 骨质疏松常常会伴发血脂代谢异常<sup>[9]</sup>, 而治



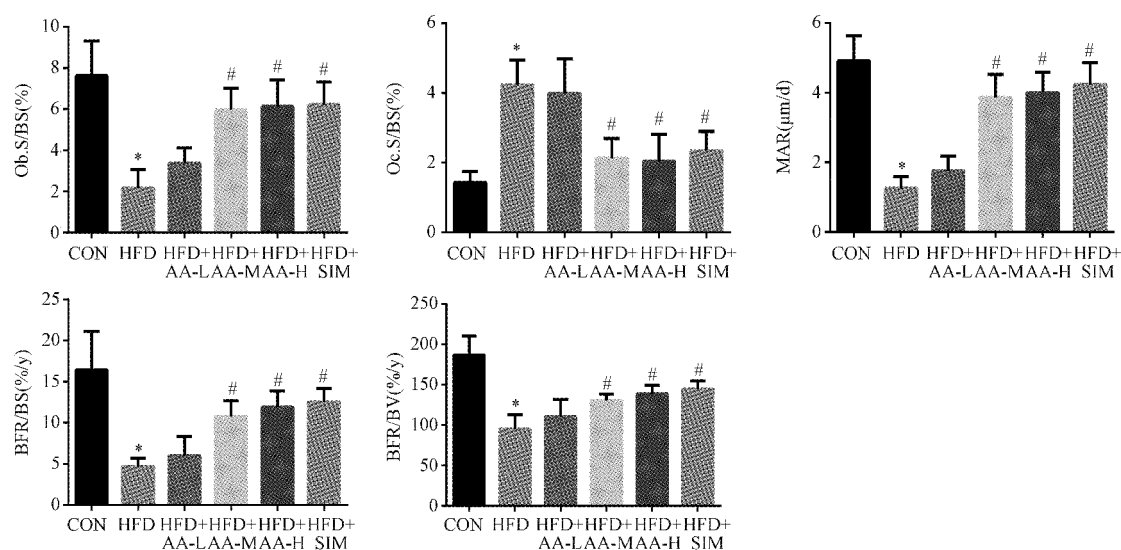


图9 不同组别小鼠胫骨近端松质骨的骨形态计量学参数参数的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$ 

Fig. 9 Comparison of histomorphometry parameters of trabecular bone of the proximal tibia in mice among different groups

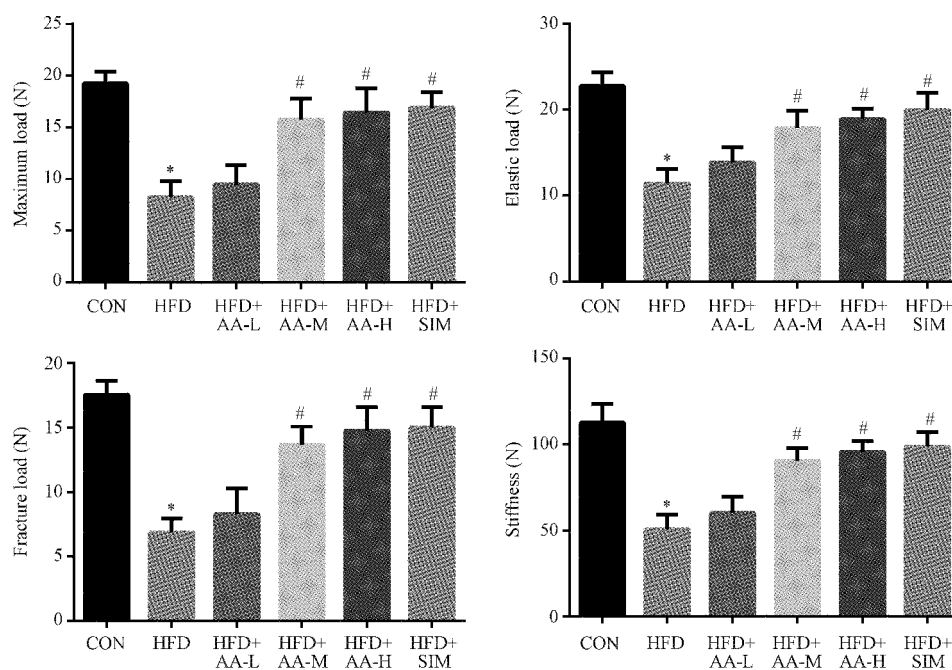
Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

图10 不同组别小鼠股骨生物力学的比较

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HFD 组相比, #  $P < 0.05$ 

Fig. 10 Comparison of the value of biomechanical indexes of the femur in mice among different groups

Note: \*  $P < 0.05$  vs CON; #  $P < 0.05$  vs HFD

疗骨质疏松的期间,血脂代谢异常往往也得以改善和逆转<sup>[10]</sup>,当脂质代谢紊乱时又会进一步加重骨质疏松症的发生<sup>[11]</sup>,虽然血脂代谢异常影响骨量的机制尚未清楚,但是大多数研究报道显示,高血脂患者

体内骨髓基质细胞向脂肪细胞分化增多,而导致成骨细胞分化减少,其机制可能是骨髓基质细胞的PPAR $\gamma$ 基因表达过多<sup>[12]</sup>,另外,也可能高血脂抑制骨髓基质细胞的骨形态发生蛋白和骨钙素基因表

达,从而使骨髓基质细胞向成骨细胞分化降低,造成骨质疏松症<sup>[8,13]</sup>。另一方面,骨质疏松症的发生与高脂血症机体里抗氧化机制的失调关系十分密切,因为血脂代谢紊乱会造成机体氧化应激的发生,从而刺激破骨细胞数目增加,下调 Wnt 通路的相关成骨分化的基因表达来减少成骨细胞数量<sup>[14,15]</sup>,导致骨量丢失,进一步促进骨质疏松症的发展。

本实验结果显示,给予高脂饲料喂养可致小鼠表现为体重增加、血清 TC 水平明显升高,该研究结果与国外文献报道具有一致<sup>[8,16]</sup>,提示高脂饲料造成小鼠出现单纯性高 TC 血症。大多数研究报道,高脂饮食会引起小鼠骨量丢失,尤其松质骨的丢失显得更明显<sup>[17,18]</sup>,本实验的 Micro-CT 结果也证实了给予高脂饲料会造成小鼠的松质骨骨密度下降和骨小梁骨微结构受损,然而其相关发病机制,有研究者发现高脂饮食对小鼠的成骨细胞或破骨细胞功能具有不同的影响,其中,Cao 等<sup>[18]</sup>发现给予高脂饮食后,小鼠出现骨量丢失,并且其成骨细胞和破骨细胞的分化能力均增强,同样也有研究<sup>[19]</sup>报道,经高脂饮食后,小鼠的骨髓细胞里的成骨细胞和破骨细胞数目明显增加。与其产生不一致的结果的是,Patsch 等<sup>[20]</sup>发现给予高脂饮食喂养可致小鼠血清骨吸收指标水平升高,骨形成指标水平无明显变化。因此,出现以上的矛盾结果可能与不同的动物类型、不同的造模方法和时间,尤其是不同的评价成骨细胞和破骨细胞功能的方法有密切关系。本研究通过给予含有 60% 脂肪的高脂饲料喂养小鼠,造模时间为 16 周,血清结果显示,该小鼠血清骨吸收指标 CTX-I 水平明显增高,骨形成指标 PINP 水平明显降低,这与骨形态计量学结果变化具有一致性,因为其破骨细胞数目增多,成骨细胞数目减少,骨形成率下降,提示了该高脂饲料造成小鼠出现高脂血症,因此这可能导致小鼠的骨形成下降和骨吸收增强。与此同时,有研究<sup>[8]</sup>报道也出现一致的结果,高脂饲料会造成小鼠成骨细胞功能下降和破骨细胞功能活跃,其原因需要进一步探讨。

有研究<sup>[8]</sup>报道,同样采用含有 60% 脂肪的高脂饲料喂养小鼠,其喂养时间为 8 周,虽然小鼠骨密度均降低,但是其骨微结构变化与本研究的結果不一致,本研究 Micro-CT 结果显示,HFD 组小鼠骨微结构明显受到破坏,这可能与喂养时间不同有密切关系,这提示长期给予高脂饲料,不但造成高脂血症,而且会逐渐影响骨微结构。因此,本实验结果也显示,HFD 组小鼠的骨生物力学性能明显下降,提示

高脂血症导致骨强度下降。

积雪草酸作为常用中药,在降血脂和抗氧化方面具有显著效果,最近,也有研究发现积雪草酸具有抑制骨髓基质干细胞向脂肪细胞分化功能。所以,从这一角度出发,本文通过观察了不同剂量积雪草酸对血脂、骨转换代谢、抗氧化指标、骨密度和骨微结构的影响,评价其对高脂血症小鼠骨量丢失的保护作用。实验结果表明,中剂量和高剂量的积雪草酸和辛伐他汀可明显下降高脂血症小鼠 TC 水平,高剂量积雪草酸和辛伐他汀对小鼠高脂血症的治疗效果相当,但是低剂量积雪草酸并未发挥降血脂的作用,这说明积雪草酸在适当剂量范围内具有明显的降血脂能力,与给药浓度呈一定的正相关。在高脂血症病理状态下,HFD 组小鼠抗氧化机制受到破坏,这与 Xiao 等<sup>[21]</sup>的研究结果具有一致性,即是高脂血症会造成机体抗氧化能力降低。除了低剂量的积雪草酸之外,中剂量和高剂量的积雪草酸和辛伐他汀治疗组的小鼠 SOD 水平明显升高,MDA 水平明显下降,这提示中剂量和高剂量的积雪草酸和辛伐他汀治疗组抗氧化能力得到显著改善。原因可能是中剂量和高剂量的积雪草酸具有降血脂作用,并且具有对抗脂质氧化的能力<sup>[22]</sup>,这会提升机体抗氧化的能力,从而在减缓高血脂导致骨组织受损程度,因此起到保护骨组织的重要作用。

本文的骨密度、骨微结构和骨生物力学结果显示,中剂量和高剂量的积雪草酸和辛伐他汀对高血脂导致的骨量丢失和骨结构受损有明显的保护作用,并且提高骨强度,但是低剂量积雪草酸并未发挥该作用,这主要由于中剂量和高剂量的积雪草酸治疗组能明显促进骨形成和抑制骨吸收,因为血液骨转换代谢指标和骨形态计量学结果可以解释以上结论,也有可能中剂量和高剂量的积雪草酸和辛伐他汀可以抑制骨髓基质干细胞向脂肪细胞分化,促进其成骨细胞分化<sup>[7]</sup>,并且也与中剂量和高剂量的积雪草酸具有提升机体抗氧化的能力有密切的联系。除低剂量积雪草酸之外,中剂量和高剂量的积雪草酸具有抗骨量丢失的作用,且高剂量积雪草酸效果稍优于中剂量,这提示积雪草酸在适当剂量范围内能促进骨形成和抑制骨吸收,高剂量积雪草酸组未见不良反应,因此,关于积雪草酸在保护高血脂小鼠骨量丢失的最佳的药物剂量需要进一步探讨。

综上所述,体内脂质代谢紊乱和氧化应激反应会造成或加重机体骨量丢失。本研究表明适当剂量的积雪草酸具有保护骨量丢失作用,其作用产生主



要是促进骨形成和抑制骨吸收,也可能与积雪草酸能通过对抗脂质氧化来抑制机体氧化应激反应,从而抑制破骨细胞的生长和成骨细胞分化,缓解骨量丢失。另外,也可能与积雪草酸降低血脂,从而抑制骨髓基质干细胞向脂肪细胞分化,促进其成骨细胞分化,防止骨量丢失。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Huang YX, Gao L, Xie XP, et al. Epidemiology of dyslipidemia in Chinese adults: meta-analysis of prevalence, awareness, treatment, and control. *Population Health Metrics*, 2014, 12:28.
- [ 2 ] Tintut Y, Morony S, Demer LL. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2):e6-10.
- [ 3 ] Tarakida A, Lino K, Abe K. Hypercholesterolemia accelerates bone loss in postmenopausal women. *Climacteric*, 2011, 14(1): 105-111.
- [ 4 ] Lim DW, Kim JG, Kim YT. Effect of dietary isoflavones from puerariae radix on lipid and bone metabolism in ovariectomized rats. *Nutrients*, 2013, 5(7):2734-2746.
- [ 5 ] 冯旭,郭飞飞,赵龙,等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展. *中草药*, 2014, 45(7):1037-1042.  
Feng X, Guo FF, Zhao L, et al. Research progress on pharmacological effects of Asiatic acid and its structural modification. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(7):1037-1042. (in Chinese)
- [ 6 ] Ramachandran V, Saravanan R, Senthilraja P. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Asiatic acid in diabetic rats, role of HMG CoA; in vivo and in silico approaches. *Phytomedicine*, 2014, 21(3):225-232.
- [ 7 ] Li ZW, Piao CD, Sun HH, et al. Asiatic acid inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68:437-442.
- [ 8 ] Chen X, Wang CY, Zhang K, et al. Reduced femoral bone mass in both diet-induced and genetic hyperlipidemia mice. *Bone*, 2016, 93:104-112.
- [ 9 ] Chen GF, Zhang LH, Chen ZJ, et al. The relativity research on osteocalcin and lipids of serum in osteoporosis patients. *Journal of Radioimmunology*, 2009, 22(5):489-490.
- [ 10 ] Guney E, Kisakol G, Ozgen AG, et al. Effect of bisphosphonates on lipid metabolism. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(2):252-255.
- [ 11 ] Sage AP, Lu JX, Atti E, et al. Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, 26(6):1197-1206.
- [ 12 ] Gao F, Yang J, Shi TY, et al. Study on relationship between serum lipid and bone mineral. *Journal of Medical Science in Central South China*, 2012, 40(5):480-483.
- [ 13 ] Poggi A, Zocchi MR. Modulating mesenchymal stromal cell function with cholesterol synthesis inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18(34):5196-5205.
- [ 14 ] Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:569563.
- [ 15 ] Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas*, 2014, 78(3):233-237.
- [ 16 ] Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JA, et al. Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30(4):419-425.
- [ 17 ] Pirith F, Lu J, Ye F, et al. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2):309-318.
- [ 18 ] Cao JJ, Gregoire BR, Gao H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone*, 2009, 44(6):1097-1104.
- [ 19 ] Shu L, Beier E, Sheu T, et al. High-fat diet causes bone loss in young mice by promoting osteoclastogenesis through alteration of the bone marrow environment. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96(4): 313-323.
- [ 20 ] Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism*, 2011, 60(2): 243-249.
- [ 21 ] Xiao Y, Cui J, Li YX, et al. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition*, 2011, 27(2):214-220.
- [ 22 ] Soo LY, Jin DQ, Beak SM, et al. Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes. *Eur J Pharmacol*, 2003, 476(3): 173-178.

(收稿日期: 2017-08-06;修回日期: 2017-08-31)