

槟榔碱对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的影响

欧琼, 黄余良, 张群锋

(南华大学附属第二医院妇产科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨槟榔碱对去卵巢骨质疏松(OP)大鼠骨代谢的影响。 **方法** 50只健康SD雌性大鼠随机分为对照组、模型组、低、中和高剂量槟榔碱组(1、5、20 mg/kg, 每天灌胃1次)。12周后检测尿钙和尿脱氧吡啶(Dpd)及血清钙、血清磷、血清碱性磷酸酶(ALP)和雌二醇(E_2)水平。采用双能X射线吸收法测量大鼠右侧股骨的骨密度(BMD)。取股骨进行3点弯曲生物力学试验。 **结果** 与对照组比较, 模型组大鼠血清 E_2 水平和BMD显著降低($P < 0.05$), 尿钙、尿Dpd、血清钙、血清磷和ALP水平均显著增加(均 $P < 0.05$), 左侧股骨的生物力学指标包括最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弯曲能量均显著降低(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 中和高剂量槟榔碱组大鼠股骨的BMD显著增加($P < 0.05$), 尿钙、尿Dpd、血清钙、血清磷和ALP水平显著降低(均 $P < 0.05$), 左侧股骨的最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弯曲能量均显著增加(均 $P < 0.05$)。 **结论** 槟榔碱改善了去卵巢OP大鼠的骨代谢, 增强其骨密度, 改善骨生物力学指标。

关键词: 槟榔碱; 去卵巢; 骨质疏松; 骨密度

中图分类号: R71

文献标识码: A

Effect of Arecoline on the Bone Metabolism in Ovariectomized Rats with Osteoporosis

OU Qiong, HUANG Yuliang, ZHANG Qunfeng

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of arecoline on the bone metabolism in ovariectomized rats with osteoporosis. **Methods** The fifty SD female rats were randomly divided into sham control, ovariectomized osteoporosis model, and low, middle and high dose arecoline group. Arecoline (1, 5 and 20 mg/kg) was administered by lavage every day. After 12 weeks, the levels of urine calcium and deoxypyridinoline (Dpd), serum calcium, serum phosphorus, serum alkaline phosphatase (ALP) and estradiol (E_2) were measured. Bone mineral density (BMD) was measured by a dual-energy X-ray absorptiometry. 3 point bend testing of femur was accomplished. **Results** Compared with the sham control group, the levels of E_2 and BMD were significantly decreased (all $P < 0.05$), the levels of urine calcium and Dpd, serum calcium, serum phosphorus and serum ALP were significantly increased (all $P < 0.05$) and the biomechanical indexes including maximum load, maximum deflection, elastic load and bending energy were significantly decreased (all $P < 0.05$) in the ovariectomized osteoporosis model group. Compared with the ovariectomized osteoporosis model group, the level of BMD were significantly increased, the levels of urine calcium and Dpd, serum calcium, serum phosphorus and serum ALP were significantly decreased (all $P < 0.05$) and the maximum load, maximum deflection, elastic load and bending energy were significantly increased (all $P < 0.05$) in the ovariectomized osteoporosis model group. **Conclusion** Arecoline improves the bone metabolism, increases BMD and improves the biomechanical indexes of bone.

Key words: arecoline; ovariectomized; osteoporosis; boneminaral density

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种代谢性骨

骼疾病,以骨量减少、骨代谢活跃、骨强度下降,伴随骨转换增强出现松质骨、骨脆性增加和易发生骨折为特征^[1]。OP好发于60岁以上老年人,在绝经后

的妇女中发病率更高,被称为绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)^[2]。研究发现 PMOP 的发生与绝经后卵巢萎缩导致体内雌激素水平降低有关,目前 PMOP 的治疗主要采用激素替代疗法,但是激素替代疗法存在严重的副作用,如可能会增加乳腺癌和子宫内膜癌等的风险^[3],因此寻找新的防治 PMOP 的途径具有重要的意义。槟榔碱是棕榈科植物槟榔的种子的活性成分,槟榔碱具有杀菌、驱虫、促消化、抗血栓形成、抗衰老和抗动脉粥样硬化等作用^[4-7]。本研究拟采用切除大鼠的卵巢模拟 PMOP,观察槟榔碱对绝经后骨质疏松大鼠骨代谢、骨密度和骨生物力学特征的影响的影响,为槟榔碱的抗骨质疏松作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

槟榔碱(Sigma 公司),脱氧吡啶啉 ELISA 法检测试剂盒(上海亿欣生物科技有限公司),尿钙邻甲酚酞络合酮法检测试剂盒(南京天鼎生物技术研究),雌二醇放免法检测试剂盒(北京东雅生物工程公司)。LUNAR-DPXIC 型骨密度仪(GE 公司),CSS44100 型电子万能试验机(中国长春材料试验机研究所),VI—MRXII 型酶标仪(美国 Dynex 公司),HITACH717 全自动生化分析仪(日本日立公司)和全自动 γ 计数仪(上海第二仪器厂)。

1.2 动物模型制备

成年清洁级雌性健康的未交配 Sprague-Dawley (SD)大鼠 50 只,6 个月龄,体重 250 ± 20 g,购自南华大学实验动物学部。大鼠在适应性喂养 1 周后,禁食过夜,自由饮水,准备去卵巢的大鼠,用 3.6% 水合氯醛(10 mL/kg 体重)通过腹腔注射麻醉,仰面固定,腹部常规消毒,做腹正中切口,先找到子宫,然后沿每侧子宫找到卵巢,分离周围组织,结扎后完整摘除双侧卵巢。大鼠自然清醒,术后用青霉素(4 万单位/只)治疗 3 天。

1.3 实验分组

SD 大鼠通过随机数字表法分为对照组(10 只)和去卵巢组(40 只),对照组大鼠进行假手术,去卵巢组大鼠进行双侧卵巢切除。然后将 40 只去卵巢大鼠随机法分为去卵巢骨质疏松模型组(模型组)、槟榔碱低、中和高剂量组,每组 10 只大鼠。槟榔碱低、中和高剂量组分别按 1、5 和 20 mg/kg 每天灌胃

1 次^[8]。大鼠由专人饲养,每笼 6 只,自由进食和饮水,12 h 光照,温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 。实验时间为 12 周,在实验过程中没有大鼠意外死亡。

1.4 股骨骨密度检测

实验进行 12 周后,3.6% 水合氯醛(10 mL/kg 体重)腹腔注射麻醉,打开胸腔,通过心脏放血,处死大鼠,迅速剔除大鼠的两侧股骨,剔除周围的软组织。右侧股骨用于检测股骨骨密度(bonemineral density, BMD),左侧股骨用于生物力学检测。然后用 LUNAR-DPXIC 型骨密度仪,采用双能 X 射线吸收法和手动椭圆形方式测量大鼠右侧股骨中段的 BMD。

1.5 股骨生物力学 3 点弯曲试验

将大鼠的左侧股骨置于 CSS44100 型电子万能试验机上,将股骨中点作为加力点,支座跨距为 20 mm,加载速度为 5 mm/min,最大载荷为 200 N,加载至骨折,测量股骨内径、外径,采用计算机记录结果,并分析最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弯曲能量。

1.6 骨代谢相关生化指标测定

实验进行 12 周后,3.6% 水合氯醛(10 mL/kg 体重)腹腔注射麻醉,打开胸腔,通过心脏放血处死大鼠。取膀胱中的尿液,采用邻甲酚酞络合酮法测定尿钙水平,ELISA 方法测定尿脱氧吡啶啉(deoxypyridinoline, Dpd)水平,结果以每 mmol 肌酐(creatinine, Cr)表示。取血清,采用全自动生化分析仪测定血清钙、血清磷和血碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平,采用放免法测量血清雌二醇(estradiol, E_2)水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件处理实验结果。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槟榔碱对去卵巢 OP 大鼠 BMD 的影响

双侧卵巢切除后 12 周,取各组大鼠的右侧股骨,用双能 X 线吸收法分别测定各组大鼠右侧股骨中段的 BMD。与对照组比较,对模型组大鼠右侧股骨的 BMD 显著降低($P < 0.05$);与对模型组比较,槟榔碱中、高剂量组大鼠右侧股骨的 BMD 显著增加(均 $P < 0.05$)(见图 1)。

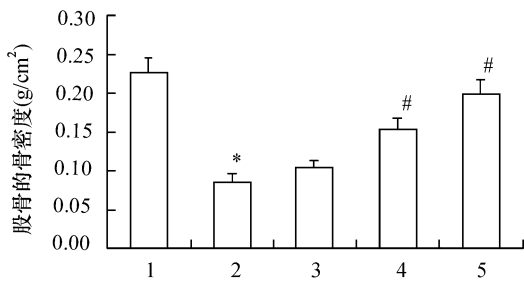


图1 槟榔碱对去卵巢骨质疏松(OP)大鼠骨密度的影响(n=20) 1:对照组;2:模型组;3:1 mg/kg 槟榔碱组;4:5 mg/kg 槟榔碱组;5:20 mg/kg 槟榔碱组. 与对照组比较,* :*P* < 0.05;与模型组比较,#:*P* < 0.05

2.2 槟榔碱对去卵巢 OP 大鼠生物力学特征的影响

与对照组比较,对模型组大鼠左侧股骨最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弯曲能量均显著降低(*P* < 0.05);与对模型组比较,槟榔碱中、高剂量组

大鼠左侧股骨的最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弯曲能量均显著增加(均 *P* < 0.05)(见表1)。

2.3 对去卵巢 OP 大鼠尿钙和尿脱氧吡啶啉水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 E₂ 水平显著降低(*P* < 0.05),槟榔碱没有影响大鼠体内的 E₂ 水平(*P* > 0.05)。与对照组比较,模型组大鼠尿钙和尿 Dpd 水平显著增加(均 *P* < 0.05)。与模型组比较,槟榔碱中、高剂量组大鼠尿钙和尿 Dpd 水平显著降低(均 *P* < 0.05)(见表2)。

2.4 对去卵巢血清钙、血清磷和血碱性磷酸酶水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清磷和 ALP 水平显著增加(均 *P* < 0.05)。与模型组比较,槟榔碱中、高剂量组组大鼠血清磷和 ALP 水平显著降低(均 *P* < 0.05)(见表2)。

表1 槟榔碱对去卵巢 OP 大鼠生物力学特征的影响

组别	最大载荷(N)	弹性载荷(N)	最大挠度(mm)	弯曲能量(N/mm)
对照组	96.42 ± 7.35	65.94 ± 8.19	1.52 ± 0.19	15.72 ± 2.03
模型组	82.71 ± 9.64 ^a	51.93 ± 5.37 ^a	1.21 ± 0.11 ^a	12.39 ± 1.16 ^a
1 mg/kg 槟榔碱组	84.23 ± 8.03	53.74 ± 4.93	1.23 ± 0.17	12.75 ± 1.84
5 mg/kg 槟榔碱组	95.73 ± 6.77 ^b	62.86 ± 8.05 ^b	1.48 ± 0.15 ^b	14.86 ± 1.27 ^b
20 mg/kg 槟榔碱组	98.25 ± 10.25 ^b	69.04 ± 7.66 ^b	1.61 ± 0.13 ^b	17.94 ± 1.91 ^b

与对照组比较,a;*P* < 0.05;与模型组比较,b;*P* < 0.05

表2 槟榔碱对去卵巢 OP 大鼠血清雌二醇、钙、磷和碱性磷酸酶以及尿钙和尿脱氧吡啶啉水平的影响(n=10)

组别	血清雌二醇(pmol/L)	尿钙(mg/L)	尿脱氧吡啶啉/肌酐(nmol/mmol)	血清钙(mmol/L)	血清磷(mmol/L)	碱性磷酸酶(U/L)
对照组	77.53 ± 7.59	0.82 ± 0.06	13.54 ± 1.46	3.18 ± 0.32	2.35 ± 0.27	75.23 ± 6.41
模型组	12.45 ± 1.32 ^a	1.91 ± 0.18 ^a	23.84 ± 2.42 ^a	4.82 ± 0.61 ^a	4.37 ± 0.51 ^a	158.72 ± 16.39 ^a
1 mg/kg 槟榔碱组	11.89 ± 1.24	1.80 ± 0.19	21.78 ± 2.56	4.67 ± 0.84	3.97 ± 0.45	149.38 ± 13.74
5 mg/kg 槟榔碱组	12.81 ± 1.07	1.24 ± 0.11 ^b	17.64 ± 1.82 ^b	3.84 ± 0.34	3.08 ± 0.33 ^b	105.67 ± 11.03 ^b
20 mg/kg 槟榔碱组	13.06 ± 1.28	0.89 ± 0.07 ^b	14.67 ± 1.26 ^b	3.32 ± 0.31	2.49 ± 0.28 ^b	87.61 ± 7.26 ^b

与对照组比较,a;*P* < 0.05;与模型组比较,b;*P* < 0.05

3 讨 论

OP 的主要病理特征是在骨代谢过程中骨形成和骨吸收之间的失衡,导致机体内的钙磷代谢紊乱,最后导致骨质丢失和骨密度降低。OP 多发生于绝经后的老年女性,卵巢切除大鼠是研究 PMOP 的经典动物模型,大鼠切除卵巢后,体内雌激素的水平急剧降低,诱导破骨细胞分化和增殖,使骨形成减少而骨吸收增加,卵巢切除大鼠松质骨的骨量减少,骨小梁数量减少,骨强度下降,伴随骨转换增强出现松质

骨丢失,最终引发 OP^[9]。松质骨丢失是伴随骨转换增强而进行的,卵巢切除大鼠这种特性很好地模仿了女性正常绝经后高转换型骨质疏松发生时的骨丢失状态。雌性大鼠在 6~9 个月骨的生长进入静止期,骨骺开始闭合,10 个月左右达到峰值骨量,骨的代谢进入一个相对稳定的时期^[10]。

骨形成和骨吸收是骨代谢中两个紧密相联的过程。骨组织中含有大量的钙和磷,骨组织被吸收时钙和磷释放入血,使血钙和血磷水平增加,然后钙可从尿液中排出,使尿钙水平增加,因此尿钙、血钙和

血磷水平可反映骨吸收和骨丢失的情况^[11]。Dpd 是骨骼内 I 型胶原的重要组成成分,是骨骼的特异性标志物,参与骨胶原合成过程中胶原分子间的连接。骨组织被吸收时,骨溶解使骨胶原蛋白水解,而释放出 Dpd 进入血液中,最后从肾脏排出。因此尿 Dpd 水平可反映骨吸收的情况^[12]。ALP 是评价骨形成和骨转换最常用的指标。血清中 ALP 大约有 50% 来源于骨骼,ALP 的活性可反映成骨细胞活性和状态,雌激素的减少使其对破骨细胞的抑制作用减弱,骨的吸收增加,随之骨形成也增加,导致高转换型 OP,ALP 水平也相应增加^[13]。本研究中通过切除 6 个月龄的 SD 大鼠的双侧卵巢来模拟 PMOP 的发生,在卵巢切除 12 周后,卵巢切除大鼠与假手术对照组比较,血清 E₂ 水平和 BMD 降低,骨密度显著降低,尿钙、尿 Dpd、血清钙、血清磷和 ALP 水平明显增加,说明骨代谢处于高转换状态,表明 PMOP 模型建立成功。

槟榔是南方尤其是湖南地区比较流行的咀嚼食品,槟榔又是一种中药。槟榔碱是从棕榈科植物槟榔的果子中提取的一种胺类生物碱,也是槟榔种子中含量最为丰富的生物碱之一和主要的药理活性成分。研究显示槟榔碱具有多种药理作用,包括驱虫、促进消化、防治阿尔茨海默病、抗衰老、抗抑郁和抗动脉粥样硬化等药理作用^[14-16]。本实验结果表明槟榔碱增加了模型组大鼠的 BMD,降低了尿钙、尿 Dpd、血清钙、血清磷和 ALP 水平。这些结果表明表明槟榔碱抑制了卵巢切除诱导的 PMOP 发生,参与骨代谢的调节和 PMOP 的发生发展,因此槟榔碱有望成为 PMOP 治疗的新途径和新策略,但其抗 PMOP 的机制还不清楚,有待进一步的研究。

总之,本研究结果表明槟榔碱改善了去卵巢 OP 大鼠的骨代谢,增强骨密度,改善骨生物力学指标。本研究为 PMOP 的防治提供了新的线索和策略。

参考文献:

- [1] Fu SW, Zeng GF, Zong SH, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *Nutr Res*, 2014, 34(6):467-477.
- [2] Scott LJ. Denosumab: a review of its use in postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Drugs Aging*, 2014, 31(7):555-576.
- [3] Yoldemir T, Erenus M, Durmusoglu F. The impact of serum FSH and estradiol on postmenopausal osteoporosis re-

- lated to time since menopause[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(11):884-888.
- [4] 张伟,周寿红,凌红艳,等. 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(4):269-272.
- [5] 开竹青,姚起鑫,王光,等. 槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠胰腺 β 细胞 PDX-1mRNA 表达的影响[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010, 30(1):14-19.
- [6] Zhou J, Sun Q, Yang Z, et al. The hepatotoxicity and testicular toxicity induced by arecoline in mice and protective effects of vitamins C and e[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(2):143-148.
- [7] Ling HY, Wang G, Zhang W, et al. Arecoline improves vascular endothelial function in high fructose-fed rats via increasing cystathionine- γ -lyase expression and activating K(ATP) channels[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(8):1023-1029.
- [8] 陈艳华,蒋丽琴,王柏琦. 槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠凝血功能和血液流变学的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(4):319-322.
- [9] Kessous R, Weintraub AY, Mattan Y, et al. Improving compliance to osteoporosis workup and treatment in postmenopausal patients after a distal radius fracture[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2014, 53(2):206-209.
- [10] Fu SW, Zeng GF, Zong SH, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *Nutr Res*, 2014, 34(6):467-477.
- [11] Abdelazim IA, Abdelrazak KM, Al-Kadi M, et al. Effect of raloxifene hydrochloride on bone mineral density and bone turnover in Kuwaiti postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Arch Osteoporos*, 2014, 9(1):189.
- [12] Kitatani K, Nakatsuka K, Naka H, et al. Clinical usefulness of measurements of urinary deoxypyridinoline (DPD) in patients with postmenopausal osteoporosis receiving intermittent cyclical etidronate: advantage of free form of DPD over total DPD in predicting treatment efficacy[J]. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(4):217-224.
- [13] Lumachi F, Ermani M, Camozzi V, et al. Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1173(1):60-63.
- [14] 山丽梅,张锦超,赵艳玲,等. 槟榔碱抗动脉粥样硬化分子机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(2):146-151.

(上接第 34 页)

- [15] Sadashiva CT, Chandra JN, Kavitha CV, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel N-alkyl/aryl substituted thiazolidinone arecoline analogues as muscarinic receptor 1 agonist in Alzheimer's dementia models [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(12): 4848-4854.
- [16] Iezhitsa IN, Spasov AA, Kharitonova MV, et al. Effect of

magnesium chloride on psychomotor activity, emotional status, and acute behavioural responses to clonidine, d-amphetamine, arecoline, nicotine, apomorphine, and L-5-hydroxytryptophan [J]. Nutr Neurosci, 2011, 14(1): 10-24.

(此文编辑:朱雯霞)