

本文引用:连娟,刘佳贤,暴雪丽,段小华,刘羽桐,吕博含,安甜,姜广建.黄瓜籽复合物对去势大鼠骨质疏松症的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(4):523-527.

## 黄瓜籽复合物对去势大鼠骨质疏松症的影响

连娟<sup>1</sup>,刘佳贤<sup>2</sup>,暴雪丽<sup>3</sup>,段小华<sup>4</sup>,刘羽桐<sup>4</sup>,吕博含<sup>1</sup>,安甜<sup>1</sup>,姜广建<sup>1\*</sup>

(1.北京中医药大学中医学院,北京 100029;2.北京中藜生物科技有限公司,北京 101200;

3.北京中医药大学第三附属医院,北京 100029;4.甘肃纯洁高原农业科技有限公司,甘肃 武威 730000)

**[摘要]** **目的** 研究黄瓜籽复合物对骨质疏松症大鼠的防治作用。**方法** 将24只雌性大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(OVX组)、雌二醇(E<sub>2</sub>)组(EV组)、黄瓜籽复合物组(QCL组)。双侧卵巢切除术建立骨质疏松症模型。术后灌胃给药12周后,用全自动生化仪测血清钙(S-Ca)、血清磷(S-P)水平;ELISA法检测E<sub>2</sub>、碱性磷酸酶(ALP)、I型胶原氨基端前肽(PINP)、I型胶原羧基端肽(CTX-I)、尿脱氧吡啶啉(DPD)水平;Micro-CT分析骨密度;HE染色观察股骨组织形态学改变。**结果** 与Sham组相比,OVX组S-Ca、S-P、E<sub>2</sub>、PINP及骨密度水平降低( $P<0.01$ ),ALP、CTX-I、DPD水平升高( $P<0.01$ );与OVX组相比,QCL组、EV组S-Ca、S-P、E<sub>2</sub>、PINP及骨密度水平升高( $P<0.01$ ),ALP、CTX-I、DPD水平降低( $P<0.01$ , $P<0.05$ );与EV组相比,QCL组S-Ca水平升高,PINP水平降低,DPD水平升高( $P<0.01$ )。与Sham组相比,OVX组骨小梁结构松散不规则,骨髓腔变大;与OVX组相比,EV组和QCL组骨组织形态得到改善。**结论** 黄瓜籽复合物能有效预防骨质疏松症,可能与提高E<sub>2</sub>、S-Ca、S-P水平,降低骨转换有关。

**[关键词]** 黄瓜籽复合物;骨质疏松症;骨代谢;骨密度

**[中图分类号]**R274

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.006

### Effects of Cucumber Seed Compound on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

LIAN Juan<sup>1</sup>, LIU Jiaxian<sup>2</sup>, BAO Xueli<sup>3</sup>, DUAN Xiaohua<sup>4</sup>, LIU Yutong<sup>4</sup>, LV Bohan<sup>1</sup>, AN Tian<sup>1</sup>, JIANG Guangjian<sup>1\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Beijing Zhongli Biological Technology Co., Ltd, Beijing 101200, China; 3. The Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. Gansu Chunjie Plateau Agricultural Science and Technology Co., Ltd, Wuwei, Gansu 730000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of cucumber seed compound on the prevention and treatment of osteoporosis in rats. **Methods** 24 female rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), model group (OVX group), estradiol (E<sub>2</sub>) group (EV group) and cucumber seed compound group (QCL group). Bilateral oophorectomy was performed to establish the osteoporosis model. After 12 weeks of intervention by intragastric administration, serum calcium (S-Ca) and serum phosphorus (S-P) levels were detected by automatic biochemical analyzer; E<sub>2</sub>, alkaline phosphatase (ALP), collagen I amino terminal peptide (PINP), collagen I carboxyl terminal peptide (CTX-I) and deoxypyridinoline (DPD) levels were detected by ELISA; bone mineral density was analyzed with Micro-CT; the morphology of femur was observed by HE staining. **Results** Compared with the Sham group, the levels of S-Ca, S-P, E<sub>2</sub>, PINP and bone mineral density in the OVX group decreased ( $P<0.01$ ), the levels of ALP, CTX-I and DPD increased ( $P<0.01$ ). Compared with the OVX group, the levels of S-Ca, S-P, E<sub>2</sub>, PINP and bone mineral density in the QCL group and EV group increased ( $P<0.01$ ), the levels of ALP, CTX-I and DPD decreased ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). Compared with the EV group, the S-Ca level increased, the PINP level decreased and the DPD level increased in the QCL group ( $P<0.01$ ). Compared with the Sham group, the trabecular bone structure of the OVX group was loose and irregular, the bone marrow

**[收稿日期]**2020-12-24

**[基金项目]**国家自然科学基金项目(81774171);北京中医药大学横向课题(2180071720024)。

**[作者简介]**连娟,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治骨质疏松症。

**[通讯作者]**\*姜广建,女,教授,博士研究生导师,E-mail:guangjianjiang@sina.com。

cavity became larger. Compared with the OVX group, the morphology of the EV group and the QCL group have been significantly improved. **Conclusion** Cucumber seed compound can effectively prevent osteoporosis, which may be related to up-regulate  $E_2$ , S-Ca, S-P levels and down-regulate bone turnover.

[**Keywords**] cucumber seed compound; osteoporosis; bone metabolism; bone density

骨质疏松症是一种非代谢性骨病,其特点是由于骨蛋白和矿物质含量的过度流失而导致骨密度和强度下降<sup>[1]</sup>。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是原发性骨质疏松症中最常见的,而且PMOP的发病率正在迅速增加<sup>[2]</sup>。随着中医学的发展,中药和天然植物活性成分对实验性PMOP显示良好的药效作用<sup>[3]</sup>,因此,寻找一种天然的安全有效的治疗PMOP的手段具有重要意义。

黄瓜籽为葫芦科植物黄瓜的干燥成熟种子。黄瓜籽富含脂肪酸、糖类、苷类、植物甾醇、矿物质元素等丰富的化学成分<sup>[4]</sup>。《中华本草》中记载其具有续筋接骨、祛风、消痰的功效,主治骨折筋伤、风湿痹痛<sup>[5]</sup>。生菜是一种绿色多叶蔬菜,含有丰富的钾、钠、钙、镁等微量元素和其他植物化学物质<sup>[6]</sup>。据《中华本草》中介绍,生菜籽具有通乳汁、利小便、活血行瘀等功效,主治乳汁不通、小便不利、跌打损伤、瘀肿疼痛等<sup>[5]</sup>。藜麦具有“超级谷物”之美称,含有人体所需全部必需氨基酸、膳食纤维、矿物质和维生素,而且具有丰富的酚类、皂苷、三萜、甾醇、甜菜碱、蜕皮激素等次生代谢物质,是一种高蛋白、低热量、活性物质丰富的碱性食物资源<sup>[7-8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>表明藜麦在哺乳动物中表现出广泛的治疗作用,包括抗PMOP。因此,本研究以去卵巢大鼠为研究对象,探讨黄瓜籽复合物(以下简称QCL)对去卵巢大鼠骨量和骨代谢的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物

健康雌性大鼠6~8周龄,体质量(230±10)g,购自北京维通利华动物科技有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。动物饲养在北京中医药大学 SPF 级动物房。该环境有舒适的温度(22±1)℃、合适的湿度55%±5%和12 h:12 h的光/暗循环。在无病原体条件下,给所有大鼠提供标准的啮齿动物饲料和饮水。所有的动物实验和护理均获得了北京中医药大学伦理委员会的批准。

### 1.2 试剂及仪器

雌二醇(estradiol,  $E_2$ )ELISA 试剂盒(批号:

20190417,天津九鼎医学生物工程有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)ELISA 试剂盒(批号:I11038421)、I型胶原氨基端前肽(N-terminal propeptide of type I collagen, PINP)ELISA 试剂盒(批号:F09032025)均购自武汉华美生物科技有限公司;I型胶原羧基端肽(C-terminal propeptide of type I collagen, CTX-I)ELISA 试剂盒(批号:20190423)、尿脱氧吡啶啉(urinary deoxypyridinoline, DPD)ELISA 试剂盒(批号:20190510)均购自北京康佳宏原生物科技有限公司;EDTA 脱钙液(批号:2019072601)、苏木素染色液(批号:20190909)、伊红染色液(批号:20190318)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;日立7600全自动生化仪(日本Hitachi公司);EG 1150H包埋机、EG 1150 C冰冻机、RM 2255轮转式切片器(Leica Biosystems有限公司);Olympus BX53倒置荧光显微镜(Olympus有限公司);Perkin Elmer Quantum GX-micro-CT小动物活体断层扫描仪(美国Perkin Elmer公司)。

### 1.3 主要药物

黄瓜籽(批号:SC11622052330005)、生菜籽(批号:SC11622052330005)购自吉林省金谷生态食品有限公司;藜麦(批号:SC10162062300206)购自甘肃纯洁高原农业有限公司。QCL的制备在北京中医药大学糖尿病研究中心实验室进行。根据黄瓜籽、生菜籽(70 kg)日用量各20 g来设置本实验用量各4.2 g/kg,根据10 h进食量实验测得,体质量300 g大鼠进食量为12 g,计算总进食量为40 g/kg,并得出藜麦用量为31.6 g/kg,最终三者混合物的比例为1:1:7.5。用电动搅拌机将黄瓜籽、生菜籽、藜麦打成粉末混合,制作成标准鼠粮大小的食物,4℃储存。

### 1.4 OVX 大鼠模型制备、分组及给药

在卵巢切除术中,用1%戊巴比妥钠(0.4 mL/100 g)腹腔注射麻醉动物,切除双侧卵巢,建立骨质疏松症模型。同时,假手术组只切除卵巢周围同样大小的白色脂肪组织。手术成功的动物随机分为4组,每组6只。(1)假手术组(Sham组):生理盐水灌胃[0.1 mg/(kg·d)];(2)模型组(OVX组):生理盐水灌

胃[0.1 mg/(kg·d)];(3)雌二醇组(EV组):戊酸雌二醇灌胃[0.1 mg/(kg·d)];(4)QCL组:黄瓜籽、生菜籽、藜麦混合物喂食[40 g/(kg·d)]。连续治疗12周,在处死的前一天,用无菌容器采集尿液、粪便样本,立即在-80℃低温冷冻。腹腔注射1%戊巴比妥钠(0.4 mL/100 g),对所有动物实施安乐死。从腹主动脉血中收集血清,离心20 min(3 000 r/min,离心半径8 cm),收集双侧股骨,固定于4%多聚甲醛中待检测。

### 1.5 生化检测

取血液和尿液样本,用全自动生化分析仪检测血清钙(serum calcium, S-Ca)、血清磷(serum phosphorus, S-P)含量,按照ELISA试剂盒说明书测定E<sub>2</sub>、ALP、PINP、CTX-I、DPD的含量。

### 1.6 骨密度分析

用PerkinElmer Quantum GX-micro-CT对右股骨进行分析。使用软件PerkinElmer Quantum self-software重建数据集,用evaluate analysis 12.0软件对数据进行分析。

### 1.7 股骨HE染色

用10% EDTA(pH 7.0)进行脱钙,每两周更换一次,重复12周。用50%~100%的分级乙醇对脱钙股骨进行脱水,然后石蜡包埋。连续5 μm厚度切片,并进行HE染色,用光镜观察结果。

### 1.8 统计学分析

实验数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,GraphPad Prism 6软件对所得数据进行统计处理,满足正态分布,当方差齐时,采用单因素方差分析(ANOVA);当方差不齐时,使用Dunnnett's T3检验;不满足正态分布时,使用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

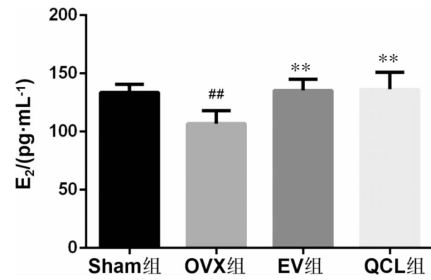
## 2 结果

### 2.1 各组大鼠E<sub>2</sub>水平比较

与Sham组相比,OVX组E<sub>2</sub>水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与OVX组相比,EV组及QCL组E<sub>2</sub>水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与EV组相比,QCL组E<sub>2</sub>水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图1。

### 2.2 各组大鼠钙磷水平比较

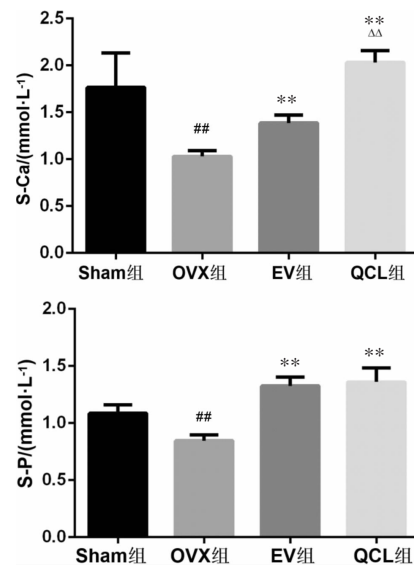
与Sham组相比,OVX组血清中S-Ca和S-P水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与OVX



注:与Sham组比较,## $P < 0.01$ ;与OVX组比较,\*\* $P < 0.01$

图1 各组大鼠E<sub>2</sub>水平比较

组相比,EV组及QCL组S-Ca和S-P水平均有不同程度的升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与EV组相比,QCL组中S-Ca水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),而S-P水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图2。



注:与Sham组比较,## $P < 0.01$ ;与OVX组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与EV组比较,^^ $P < 0.01$

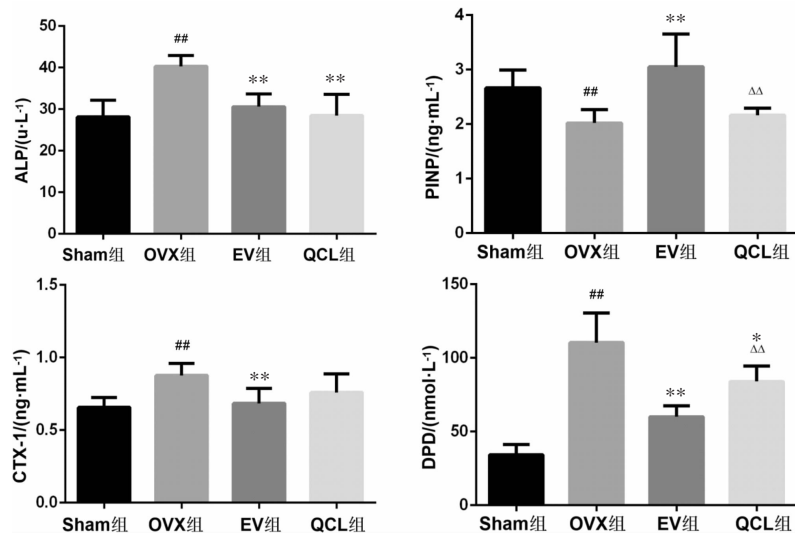
图2 各组大鼠钙磷水平比较

### 2.3 各组大鼠骨转换标志物水平比较

与Sham组相比,OVX组ALP、CTX-1、DPD含量明显升高,PINP含量明显下降,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与OVX组相比,EV组ALP、CTX-1、DPD含量降低,PINP含量升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与OVX组相比,QCL组ALP、DPD降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01, P < 0.05$ ),但CTX-1和PINP含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与EV组相比,QCL组PINP水平降低,DPD水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图3。

### 2.4 各组大鼠骨密度水平比较

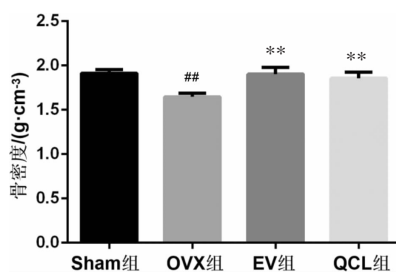
与Sham组相比,OVX组骨密度降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与OVX组相比,EV组及QCL组



注:与 Sham 组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与 OVX 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 EV 组比较,^ $P<0.05$ ,^ $\Delta P<0.01$

图 3 各组大鼠骨转换标志物水平比较

骨密度升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与 EV 组相比,QCL 组骨密度水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 4。



注:与 Sham 组比较,# $P<0.01$ ;与 OVX 组比较,\*\* $P<0.01$

图 4 各组大鼠股骨骨密度水平

## 2.5 大鼠股骨 HE 染色结果

Sham 组股骨小梁排列紧密,结构完整,骨髓腔饱满,大小均一;OVX 组股骨小梁结构松散不规则,细长稀疏,出现断裂,骨髓腔变大且形状大小不均匀;EV 组及 QCL 组股骨小梁增多,排列紧密,骨髓腔较饱满,骨微结构形态得到改善。见图 5。

## 3 讨论

骨质疏松症属中医学“骨痿”的范畴。本病的发

生发展与“肾气”紧密相关。气血津液乃营养皮肉筋骨的物质基础,“经脉者,所以行气血而营阴阳,濡筋骨,利关节者也”。骨痿时,肾虚元气不足,“元气既虚,必不能布于血管,血管无气,必停留而瘀”<sup>[11]</sup>。因此,补肾气、活血化瘀是防治骨痿重要的治疗法则。研究<sup>[12]</sup>表明黄瓜籽和生菜籽具有续筋接骨,活血化瘀的作用。古代有“一谷补一脏”的说法,现代营养学认为藜麦中微量元素、酚类物质、皂苷能够保护骨骼<sup>[13]</sup>。基于此,选择以复合物的形式进行干预,起到协同增效的作用。

去卵巢大鼠模型广泛应用于骨质疏松症研究,可与绝经后妇女的骨质丢失相媲美<sup>[14]</sup>。骨质疏松症药物研究指南规定,预防性用药应观察 2~3 月,治疗性用药应观察需超过 1 个骨重建周期<sup>[15]</sup>,大约 45 d 为 1 个骨重建周期,因此,本实验研究选取 2 个骨重建周期(12 周)。骨密度能够判断骨量的情况,是临床中用于诊断骨质疏松症的金标准<sup>[16]</sup>。骨的病理组织形态学可以直观观察骨组织并客观反应骨质疏松症的病理变化。本实验研究结果表明 OVX 组大鼠骨密度较 Sham 组降低,大鼠骨小梁结

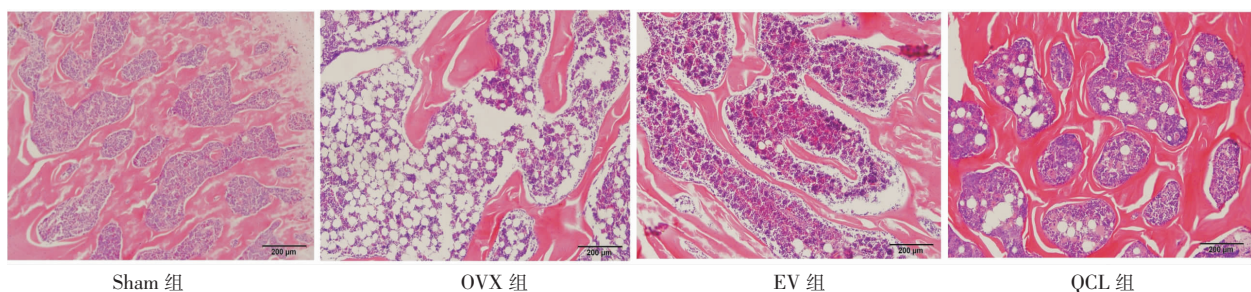


图 5 各组大鼠股骨病理切片 HE 染色( $\times 200$ )

构松散不规则,细长稀疏,出现断裂,骨髓腔变大且形状大小不均匀,说明骨质疏松症模型建立成功。研究结果显示,给与QCL 12周后,大鼠骨密度提高,骨量有所改善,组织形态得到改善。

破骨细胞是雌激素直接的作用靶点,雌激素可分泌诱导破骨细胞的凋亡及抑制破骨细胞的增殖<sup>[17]</sup>,本实验中,QCL逆转了去卵巢大鼠 $E_2$ 的下降趋势,说明QCL通过上调 $E_2$ 水平抑制破骨细胞形成从而减少骨丢失。黄瓜籽和生菜籽含有丰富的钙、镁等微量元素,可以促进骨骼中矿物质的平衡<sup>[4,6]</sup>。钙和磷是骨组织的主要成分,本实验研究表明QCL能显著提高血清钙磷水平。

骨转换生化标志物含量的变化可反映骨转换过程情况,同时可以预测骨折的发生,监测药物治疗效果<sup>[18]</sup>。去卵巢诱发的骨质疏松症是一种高转换状态的骨代谢过程,表现为血清中ALP活性明显增高<sup>[19]</sup>。

骨形成的生化指标是血清PINP,骨吸收的生化指标是血清CTX-I和尿DPD。研究<sup>[20-21]</sup>发现,去卵巢大鼠表现为高骨转换率,骨形成和骨吸收增强,PINP含量降低;CTX-I和DPD含量升高。本实验结果中QCL可以降低ALP、CTX-1、DPD水平,提高PINP水平,从而降低骨转换,促进骨形成,抑制骨吸收。

综上所述,QCL对骨质疏松症具有良好的预防作用,可能是通过改善钙磷代谢、提高雌激素水平、降低骨转换,从而提高骨密度。

## 参考文献

- [1] JAKOB F, GENEST F, BARON G, et al. Regulation des Knochenstoffwechsels Bei Osteoporose[J]. Der Unfallchirurg, 2015, 118(11): 925-932.
- [2] DEL PUENTE A, ESPOSITO A, DEL PUENTE A, et al. Pathophysiology of osteoporosis: From risk factors analysis to treatment.[J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2015, 29(3): 527-531.
- [3] ZHANG N D, HAN T, HUANG B K, et al. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: Implication for antiosteoporotic drug discovery[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 189: 61-80.
- [4] 郝艳娟,高江悦,蔡瑜,等.黄瓜籽的研究进展[J].吉林医药学院学报,2017,38(5):366-368.
- [5] 褚洪光,邓孝廷,田淑琴,等.黄瓜子和生菜子提取物促进骨折愈合的试验研究[J].中国畜牧兽医,2010,37(2):125-128.
- [6] PINTO E, ALMEIDA AA, AGUIAR AA, et al. Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: influence of soil composition[J]. Food Chem. 2014, 152:603-611.
- [7] 许效群,赵文婷,苗玲香,等.藜麦麸皮皂苷的提取纯化工艺研究[J].食品工业科技,2017,38(18):215-220.
- [8] VEGA-GÓLVEZ A, MIRANDA M, VERGARA J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(15): 2541-2547.
- [9] KAPUR P, WUTTKE W, JARRY H, et al. Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats[J]. Phytomedicine, 2010, 17(5): 350-355.
- [10] SEIDLOVA-WUTTKE D, CHRISTEL D, KAPUR P, et al. Beta-Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats[J]. Phytomedicine, 2010, 17(11): 884-889.
- [11] 陈劲柏,酆尧旺.中药防治骨质疏松症的研究概述[J].中国药业, 2004,13(6):76-77.
- [12] 赵佳丽.黄瓜子化学成分与药效学研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [13] 刘月瑶,路飞,高雨晴,等.藜麦的营养价值、功能特性及其制品研究进展[J].包装工程,2020,41(5):56-65.
- [14] WRONSKI T J, DANN L M, SCOTT K S, et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton[J]. Calcified Tissue International, 1989, 45(6): 360-366.
- [15] MCLEAN R R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis[J]. Current Osteoporosis Reports, 2009, 7(4): 134-139.
- [16] GREENSPAN S L, ROSEN H N, PARKER R A. Early changes in serum N-telopeptide and C-telopeptide cross-linked collagen type 1 predict long-term response to alendronate therapy in elderly women[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000, 85(10): 3537-3540.
- [17] WRIGHT I, MOHAMMAD K, GUISE T. Abstract 1808: The anti-estrogen endoxifen altered bone morphology and reduced muscle function in mice[J]. Cancer Research, 2018, 78 (13):1808.
- [18] 阙文君,冯正平.骨转换生化标志物的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(5):575-579.
- [19] KALHOR M, HOROWITZ K, GHAREHDAGHI J, et al. Anatomic variations in femoral head circulation[J]. HIP International, 2012, 22(3): 307-312.
- [20] HUH J E, KIM S J, KANG J W, et al. The standardized BHH10 extract, a combination of *Astragalus membranaceus*, *Cinnamomum cassia*, and *Phellodendron amurense*, reverses bone mass and metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2015, 29(1): 30-39.
- [21] CHOI J S, KIM J W, KIM K Y, et al. Antiosteoporotic effects of Polycan in combination with calcium lactate-gluconate in ovariectomized rats[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2014, 8(3): 957-967.