

巴戟天醇提物对卵巢切除肥胖模型大鼠脂代谢及骨代谢的影响

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2973>

黄朱宋, 林煜, 陈翔, 蓝锦福, 关勇, 高曦

2095-4344.2973

投稿日期: 2019-11-14

送审日期: 2019-11-16

采用日期: 2020-02-12

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R453; R363; R723.14

文章编号:

2095-4344(2021)02-00205-06

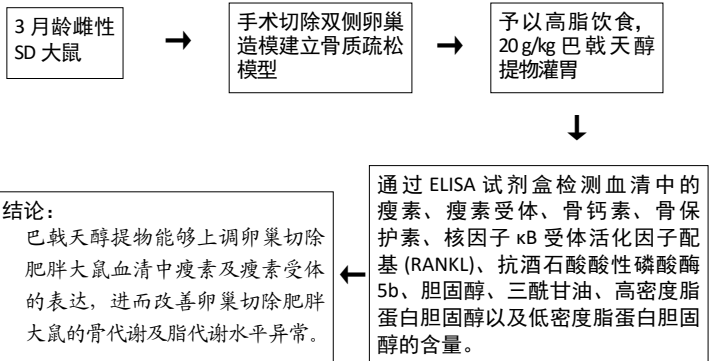
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△瘦素在肥胖和绝经后骨质疏松中承担重要桥梁作用, 巴戟天醇提物可通过提高机体瘦素及瘦素受体的表达来调控脂代谢;

△巴戟天醇提物能够上调去卵巢大鼠血清中瘦素及瘦素受体的表达, 进而改善因卵巢切除后导致的骨代谢及脂代谢水平异常。



文题释义:

巴戟天醇提物: 巴戟天是福建省的道地药材, 具有抗骨质疏松的生物活性。目前研究证实其在治疗绝经后骨质疏松症上有一定的疗效。巴戟天醇提物通过乙醇为介质提取巴戟天中的有效成分, 用于药物研究。

瘦素: 是由脂肪组织分泌的一种蛋白, 也是肥胖基因的表达产物, 并且参与机体能量代谢的调节。具体而言, 瘦素通过控制饮食, 减少能量的摄取; 增强能量的消耗; 抑制脂肪的合成等方式调节机体脂肪的蓄积。另一方面, 瘦素可作用于成骨细胞和破骨细胞进而影响骨代谢。

摘要

背景: 作者所在课题组前期研究发现, 巴戟天醇提物能有效改善卵巢切除肥胖大鼠的骨质量和体质量, 但具体机制尚不明确。该研究以瘦素及瘦素受体为切入点, 探讨巴戟天醇提物对卵巢切除肥胖模型大鼠脂代谢及骨代谢的影响。

目的: 研究巴戟天醇提物对卵巢切除肥胖大鼠脂代谢及骨代谢的影响。

方法: 将雌性SD大鼠160只随机分为骨质疏松组120只、假手术组40只。骨质疏松组通过切除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症模型, 术后骨质疏松组再随机分为: 卵巢切除+正常饮食组、卵巢切除+高脂饮食组以及卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提物组, 各40只。假手术组、卵巢切除+正常饮食组用普通饲料喂养, 卵巢切除+高脂饮食组、卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提物组用高脂饲料喂养。高脂巴戟天醇提物组用20 g/kg巴戟天醇提物灌胃, 1次/d, 余下3组用2 mL生理盐水灌胃。实验于2018年9月经厦门大学附属福州第二医院动物实验伦理委员会批准, 审批号: 20180019。

结果与结论: 与假手术组相比, 卵巢切除大鼠血清中瘦素、瘦素受体、骨保护素以及高密度脂蛋白胆固醇浓度较低($P < 0.05$), 而骨钙素、RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇的浓度较高($P < 0.05$)。与卵巢切除+高脂饮食组相比, 卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提物组大鼠血清瘦素、瘦素受体、骨保护素和高密度脂蛋白胆固醇均有所提高($P < 0.05$), 而骨钙素、RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇出现不同程度下降($P < 0.05$)。提示巴戟天醇提物能够上调卵巢切除肥胖大鼠血清中瘦素及瘦素受体的表达, 进而改善卵巢切除肥胖大鼠的骨代谢及脂代谢水平异常。

关键词: 巴戟天醇提物; 卵巢切除大鼠; 肥胖; 瘦素; 瘦素受体; 脂代谢; 骨代谢; 绝经后骨质疏松

Alcohol extract of *Morinda officinalis* improves lipid metabolism and bone metabolism in ovariectomized obese rats

Huang Zhusong, Lin Yu, Chen Xiang, Lan Jinfu, Guan Yong, Gao Xi

Department of Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Huang Zhusong, Master, Attending physician, Department of Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Corresponding author: Gao Xi, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007

第一作者: 黄朱宋, 男, 1982年生, 福建省永泰县人, 汉族, 2008年福建医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨、关节以及软组织运动损伤方面的研究。**通讯作者:** 高曦, 副主任医师, 厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007<https://orcid.org/0000-0002-7934-9875> (高曦)**基金资助:** 福州市卫生计生中青年科学研究项目(2018-S-wq17), 项目负责人: 高曦**引用本文:** 黄朱宋, 林煜, 陈翔, 蓝锦福, 关勇, 高曦. 巴戟天醇提物对卵巢切除肥胖模型大鼠脂代谢及骨代谢的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):205-210.

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have showed that the alcohol extract of *Morinda officinalis* can effectively improve the bone quality and body mass of obese rats after ovariectomy. However, the exact mechanism is unclear. In this study, leptin and leptin receptor were used as the breakthrough point to investigate the effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on lipid metabolism and bone metabolism in ovariectomized obese rats.

OBJECTIVE: To investigate the effects of alcohol extract of *Morinda officinalis* lipid metabolism and bone metabolism in ovariectomized obese rats.

METHODS: A total of 160 SPF female Sprague-Dawley rats were randomly divided into an osteoporosis group ($n=120$) and a sham operation group ($n=40$). A postmenopausal osteoporosis model was made in the osteoporosis group by removing both ovaries. After modeling, rats in the osteoporosis group were randomly subdivided into a normal diet group, a high-fat diet group and a high-fat diet + *Morinda officinalis* alcohol extract group, with 40 rats in each group. The sham operation group and the normal diet group were fed with ordinary diet, while the high-fat diet group and the high-fat diet + *Morinda officinalis* alcohol extract group were fed with high-fat diet. The high-fat diet + *Morinda officinalis* alcohol extract group was gavaged with 20 g/kg *Morinda officinalis* alcohol extract once a day, and the remaining three groups were gavaged with 2 mL of normal saline. The study protocol was approved by the Animal Ethic Committee of Fuzhou Second Hospital of Xiamen University in September 2018 with an approval No. 20180019.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the sham operation group, serum leptin, leptin receptor, osteoprotegerin and high-density lipoprotein cholesterol levels were significantly lower in ovariectomized rats ($P < 0.05$), whereas osteocalcin, RANKL, tartrate-resistant acid phosphatase 5b, cholesterol, triacylglycerol, and low-density lipoprotein cholesterol levels were significantly higher in ovariectomized rats ($P < 0.05$). Compared with the high-fat diet group, serum leptin, leptin receptor, osteoprotegerin and high-density lipoprotein cholesterol levels were significantly increased in the high-fat diet + *Morinda officinalis* alcohol extract group ($P < 0.05$), whereas osteocalcin, RANKL, tartrate-resistant acid phosphatase 5b, cholesterol, triacylglycerol, and low-density lipoprotein cholesterol levels were decreased to different extents in the high-fat diet + *Morinda officinalis* alcohol extract group ($P < 0.05$). To conclusion, the alcohol extract of *Morinda officinalis* can up-regulate the leptin and leptin receptor expression in serum of ovariectomized obese rats, so as to improve the abnormal bone metabolism and lipid metabolism in ovariectomized obese rats.

Key words: alcohol extract of *Morinda officinalis*; ovariectomized rats; obesity; leptin; leptin receptor; lipid metabolism; bone metabolism; postmenopausal osteoporosis

Funding: Young and Middle-aged Scientific Research Project of Fujian Provincial Health and Family Planning Committee, No. 2018-S-wq17 (to GX)

How to cite this article: HUANG ZS, LIN Y, CHEN X, LAN JF, GUAN Y, GAO X. Alcohol extract of *Morinda officinalis* improves lipid metabolism and bone metabolism in ovariectomized obese rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):205-210.

0 引言 Introduction

绝经后骨质疏松症是一类以绝经后女性为特定发病群体的代谢性骨病,其发病率正逐年提升^[1]。由于老年女性也是肥胖的重要发病人群,有研究证实脂肪堆积会引起骨密度下降,且肥胖也可通过多种机制影响骨代谢^[2-4]。

瘦素可参与脂肪及能量代谢。当瘦素或瘦素受体表达降低时,机体对能量的代谢出现异常,进而引发肥胖相关的症状^[5-7]。研究发现,瘦素可促进人骨髓间质干细胞向成骨细胞分化,减少成骨细胞凋亡促进矿化结节形成,并抑制破骨细胞形成^[8],因而对骨组织存在潜在的保护作用。

巴戟天为中国福建省的道地药材,具有补肾强骨的作用^[9]。作者所在课题组既往研究发现,巴戟天醇提物能有效改善卵巢切除大鼠的骨质量,降低因高脂饮食引起的大鼠体质量的增加^[10],但巴戟天醇提物对于肥胖大鼠骨代谢及脂代谢的调控尚不明确。此次实验希望以瘦素和瘦素受体为切入点,探索巴戟天醇提物对卵巢切除肥胖大鼠脂代谢及骨代谢的影响。

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 实验于2018年10月至2019年11月在福建省中医药研究院比较医学中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康 SPF 级雌性 SD 大鼠 160 只,鼠龄 3 个月,体质量 (200 ± 20) g,由上海克莱实验动物有限公司提供,实验动物许可证号: SCXK(沪)2016-0002,合格证编号: 2007000562039。大鼠于福建省中医药研究院比较医学中心喂养,医学实验动物环境设施为 SPF 级,合格证号: 医动字第 23-016 号。实验于 2018 年 9 月厦门大学附属福州第二医院动物实验伦理委员会批准,审批号: 20180019。

1.3.2 实验药物 巴戟天购自福州回春连锁药店,由安徽省亳州市长生中药饮片有限公司生产。参照文献 [11] 的方法提取巴戟天醇提物,醇提物的质量浓度为 2 kg/L。

1.3.3 实验用主要试剂及仪器 高脂饲料购自上海锐赛生物技术有限公司;瘦素、瘦素受体、骨钙素、骨保护素、核因子 κ B 受体活化因子配基 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇 ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司; ELx800 全自动酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司。

1.4 方法

1.4.1 造模与分组 将大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 2 组:骨质疏松组 ($n=120$) 和假手术组 ($n=40$)。参照文献 [12],建立骨质疏松模型:大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取腹正中线与双侧后腿根部连线交点作纵行切口,长约 1 cm,暴露腹腔,用组织剪彻底剪除卵巢,缝合腹腔。术后参考文献 [13] 予以连续 3 d 肌肉注射青霉素 80 000 U/kg。假手术组大鼠除不切除双侧卵巢外,其余操作同骨质疏松组。

造模后骨质疏松组再随机分为 3 个亚组:卵巢切除 + 正常饮食组、卵巢切除 + 高脂饮食组以及卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组,各 40 只。假手术组以及卵巢切除 + 正常饮食组以普通饲料喂养,卵巢切除 + 高脂饮食组和卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组以高脂饲料喂养。

卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组于造模后第 3 天起灌胃 20 g/kg 巴戟天醇提物,1 次/d,灌胃至取材前 1 d。其余组灌胃 2 mL 生理盐水,1 次/d,灌胃至取材前 1 d。

1.4.2 脂代谢及骨代谢相关指标的检测 各组大鼠于干预前(即造模后第 1 天)、干预 4, 8, 12 周时,分别随机取 10 只进行检查。大鼠以戊巴比妥钠麻醉,暴露腹主动脉,取腹主动脉血,充分静置后以 2 000 r/min 转速离心 20 min,取血,

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	建立绝经后骨质疏松及肥胖大鼠模型
选择动物的条件:	①成年雌性大鼠去卵巢后松质骨的骨量减少,骨转换率增高,与绝经后妇女骨质疏松的骨代谢特点相似; ②饮食性肥胖大鼠的肥胖与人类肥胖具有很好的可比性。该方法造模主要应用于SD大鼠
模型与所研究疾病的关系:	①卵巢切除法被广泛认为是绝经后骨质疏松症造模的金标准,因此以去除卵巢建立绝经后骨质疏松模型; ②高脂饮食大鼠是建立肥胖模型的主要方法之一
动物来源及品系:	由上海克萊实验动物有限公司提供SPF级SD大鼠
造模技术描述:	绝经后骨质疏松模型:大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取腹正中线与双侧后腿根部连线交点作纵行切口,长约1cm,暴露腹腔,用组织剪彻底剪除卵巢,缝合腹腔。术后以连续3d肌肉注射青霉素80000U/kg。 肥胖模型:大鼠日常予以高脂饲料饲养
动物数量及分组方法:	大鼠160只,通过随机数字表法分为2组:骨质疏松组(120只)和假手术组(40只)。骨质疏松组再通过随机数字表法分为4个亚组:卵巢切除+正常饮食组、卵巢切除+高脂饮食组以及卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组,每组各40只
造模成功评价指标:	绝经骨质疏松症模型成功评价指标:通过骨密度检测评价骨质疏松程度 肥胖模型造模成功评价指标:高脂饲料的大鼠其体质量至少超出普通饲料对照组10%以上
造模后观察指标:	瘦素、瘦素受体、骨钙素、骨保护素、 Kb 受体活化因子配基、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇
造模后动物处理:	造模后于SPF级环境饲养,分别于造模后第1天,造模后4,8,12周取材
伦理委员会批准:	实验于2018年9月经厦门大学附属福州第二医院动物实验伦理委员会批准,审批号:20180019

于 -80°C 冻存。

根据ELISA试剂盒说明书对血清中的瘦素、瘦素受体、骨钙素、骨保护素、RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇的含量进行检测。以酶标仪自动分析出样本浓度。

1.5 主要观察指标 血清中脂代谢及骨代谢相关指标水平。

1.6 统计学分析 实验数据运用SPSS 13.0软件包(美国SPSS公司)进行分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。首先比较样本是否呈正态分布并检验方差齐性,组间数据比较采用单因素方差分析。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验过程中所有实验动物情况良好,无意外死亡,均进入结果分析。

2.2 血清胆固醇水平 与假手术组相比,其他组大鼠血清胆固醇水平均显著升高($P < 0.05$);其中卵巢切除+高脂饮食组最高,正常饮食组和卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组次之。与卵巢切除+高脂饮食组相比,卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组和卵巢切除+正常饮食组大鼠血清胆固醇水平显

著降低($P < 0.05$);且卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组与卵巢切除+正常饮食组卵巢切除+胆固醇水平差异无显著性意义,见表1。

2.3 血清三酰甘油水平 与假手术组相比,随着干预时间延长,其他组大鼠血清三酰甘油水平均有不同程度提高;其中卵巢切除+高脂饮食组最高,卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组次之($P < 0.05$)。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组和卵巢切除+正常饮食组大鼠血清三酰甘油水平较卵巢切除+高脂饮食组有明显降低($P < 0.05$),但卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组大鼠血清三酰甘油水平比卵巢切除+正常饮食组有所提高($P < 0.05$),见表2。

2.4 血清高密度脂蛋白胆固醇水平 与假手术组相比,其他组大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇水平均显著降低($P < 0.05$);其中卵巢切除+正常饮食组最高、卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组次之,卵巢切除+高脂饮食+高密度脂蛋白胆固醇最低。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组和卵巢切除+正常饮食组大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇水平较卵巢切除+高脂饮食组有明显提高($P < 0.05$),卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇水平较卵巢切除+正常饮食组有不同程度的降低,尤以第12周最为明显($P < 0.05$),见表3。

2.5 血清低密度脂蛋白胆固醇水平 与假手术组相比,其他组大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平有所升高($P < 0.05$),模型组中卵巢切除+高脂饮食组最高,卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组次之,卵巢切除+正常饮食组最低。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组和卵巢切除+正常饮食组大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平较卵巢切除+高脂饮食组有所降低,以干预后第12周最为明显($P < 0.05$)。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平较卵巢切除+正常饮食组有不同程度的提高,但差异无显著性意义($P > 0.05$),见表4。

2.6 血清瘦素水平 卵巢切除后,大鼠血清瘦素水平比假手术组明显降低($P < 0.05$),其中卵巢切除+高脂饮食组瘦素水平最低。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组及卵巢切除+正常饮食组大鼠血清瘦素水平较卵巢切除+高脂饮食组有所提升,以干预后第8和12周最为明显($P < 0.05$)。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组与卵巢切除+正常饮食组大鼠血清瘦素水平差异无显著性意义($P > 0.05$),见表5。

2.7 血清瘦素受体水平 与假手术组相比,其他组大鼠血清瘦素受体水平有所降低($P < 0.05$),其中卵巢切除+高脂饮食组大鼠血清瘦素受体最低。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组和卵巢切除+正常饮食组大鼠血清瘦素受体水平较卵巢切除+高脂饮食组有不同程度所提升,其中以干预后第4,8周卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组及第8周卵巢切除+正常饮食组改变最明显($P < 0.05$)。卵巢切除+高脂饮食+巴戟天醇提取物组与卵巢切除+正常饮食组大鼠血清瘦素受体水平接近($P > 0.05$),见表6。

表 1 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清胆固醇水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Table 1 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum cholesterol level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	1.336±0.106	1.382±0.117	1.401±0.114	1.322±0.138
干预后 4 周	1.352±0.151 ^{bcd}	1.435±0.135 ^{ac}	1.541±0.128 ^{abd}	1.430±0.163 ^{ac}
干预后 8 周	1.413±0.113 ^{bcd}	1.515±0.121 ^{ac}	1.659±0.118 ^{abd}	1.525±0.132 ^{ac}
干预后 12 周	1.420±0.124 ^{bcd}	1.543±0.162 ^{ac}	1.708±0.126 ^{abd}	1.536±0.154 ^{ac}

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 3 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Table 3 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum high-density lipoprotein cholesterol level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	0.954±0.114	0.934±0.123	0.933±0.110	0.943±0.183
干预后 4 周	0.942±0.083 ^{bcd}	0.873±0.111 ^{ac}	0.718±0.131 ^{abd}	0.803±0.113 ^{ac}
干预后 8 周	0.903±0.113 ^{bcd}	0.731±0.116 ^{ac}	0.659±0.106 ^{abd}	0.725±0.091 ^{ac}
干预后 12 周	0.866±0.128 ^{bcd}	0.723±0.143 ^{acd}	0.538±0.162 ^{abd}	0.683±0.126 ^{abc}

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 5 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清瘦素水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

Table 5 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum leptin level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	14.453±1.451	13.835±1.254	14.342±1.130	13.679±1.232
干预后 4 周	13.878±1.396 ^{bcd}	11.763±1.019 ^b	11.432±0.816 ^b	11.943±1.003 ^b
干预后 8 周	12.403±1.025 ^{bcd}	10.531±0.523 ^{ac}	8.559±0.544 ^{abd}	10.525±0.641 ^{ac}
干预后 12 周	11.342±1.344 ^{bcd}	8.543±1.033 ^{ac}	7.587±0.642 ^{abd}	8.933±0.773 ^{ac}

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

2.8 血清骨保护素水平 与假手术组相比, 其他组大鼠血清骨保护素水平有所降低 ($P < 0.05$), 其中卵巢切除 + 高脂饮食组最低。卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组和卵巢切除 + 正常饮食组大鼠血清骨保护素水平较卵巢切除 + 高脂饮食组均有不同程度提升 ($P < 0.05$), 但卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组与卵巢切除 + 正常饮食组大鼠血清骨保护素水平接近 ($P > 0.05$), 见表 7。

2.9 血清 RANKL 水平 与假手术组相比, 卵巢切除大鼠血清 RANKL 水平有所升高 ($P < 0.05$), 其中卵巢切除 + 高脂饮食组。卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组和卵巢切除 + 正常饮食组大鼠血清 RANKL 水平较卵巢切除 + 高脂饮食组均有不同程度降低 ($P < 0.05$), 且卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组与正常饮食组大鼠血清 RANKL 水平接近 ($P > 0.05$),

表 2 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清三酰甘油水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Table 2 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum triglycerides level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	0.931±0.216	0.982±0.173	0.909±0.210	0.924±0.189
干预后 4 周	1.022±0.201 ^{cd}	1.035±0.193 ^{cd}	1.348±0.189 ^{abd}	1.125±0.213 ^{abc}
干预后 8 周	1.109±0.193 ^{cd}	1.115±0.129 ^{cd}	1.559±0.130 ^{abd}	1.225±0.231 ^{abc}
干预后 12 周	1.120±0.220 ^{cd}	1.143±0.194 ^{cd}	1.638±0.226 ^{abd}	1.263±0.242 ^{abc}

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 4 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Table 4 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum low-density lipoprotein cholesterol level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	0.344±0.044	0.347±0.023	0.339±0.030	0.373±0.036
干预后 4 周	0.392±0.033 ^{bcd}	0.423±0.019 ^b	0.485±0.011 ^b	0.433±0.023 ^{ac}
干预后 8 周	0.403±0.032 ^{bcd}	0.525±0.041 ^a	0.559±0.046 ^a	0.531±0.026 ^a
干预后 12 周	0.461±0.024 ^{bcd}	0.533±0.026 ^{ac}	0.638±0.042 ^{abd}	0.543±0.033 ^{ac}

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 6 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠瘦素受体水平的影响
($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

Table 6 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum leptin receptor level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	3.325±0.401	3.365±0.293	3.425±0.238	3.668±0.339
干预后 4 周	3.478±0.346 ^{bcd}	2.863±0.189 ^b	2.832±0.196 ^{ad}	2.972±0.003 ^{ac}
干预后 8 周	3.408±0.295 ^{bcd}	2.733±0.133 ^{ac}	2.592±0.204 ^{abd}	2.753±0.143 ^{ac}
干预后 12 周	3.320±0.341 ^{bcd}	2.335±0.133 ^a	2.288±0.248 ^a	2.323±0.173 ^a

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

见表 8。

2.10 血清骨钙素水平 卵巢切除大鼠血清骨钙素水平比假手术组有所升高 ($P < 0.05$), 其中卵巢切除 + 高脂饮食组最高。卵巢切除 + 高脂巴戟天醇提物组和卵巢切除 + 正常饮食组大鼠血清骨钙素水平较卵巢切除 + 高脂饮食组均有不同程度降低 ($P < 0.05$)。卵巢切除 + 高脂巴戟天醇提物组大鼠血清骨钙素水平较卵巢切除 + 正常饮食组有所下降, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表 9。

2.11 血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平 卵巢切除大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平比假手术组有所升高 ($P < 0.05$), 其中卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组最低, 卵巢切除 + 正常饮食组次之, 卵巢切除 + 高脂饮食组抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 最高, 见表 10。

表 7 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清骨保护素水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/L}$)

Table 7 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum osteoprotegerin level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	439.15±10.21	443.65±12.94	435.23±10.86	438.63±10.35
干预后 4 周	432.73±20.43 ^{bcd}	382.63±10.85 ^{ac}	363.32±11.96 ^{abd}	388.52±13.03 ^{ac}
干预后 8 周	442.08±14.54 ^{bcd}	369.33±12.73 ^{ac}	342.95±10.204 ^{abd}	366.53±13.44 ^{ac}
干预后 12 周	443.32±12.42 ^{bcd}	334.35±15.33 ^{ac}	322.88±8.23 ^{abd}	334.36±20.53 ^{ac}

表注:与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 9 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清骨钙素水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

Table 9 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum osteocalcin level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	1.437±0.207	1.365±0.194	1.417±0.189	1.357±0.215
干预后 4 周	1.438±0.315 ^{bcd}	1.835±0.225 ^{ac}	1.942±0.199 ^{abd}	1.792±0.201 ^{ac}
干预后 8 周	1.425±0.225 ^{bcd}	1.892±0.218 ^{ac}	1.992±0.287 ^{abd}	1.855±0.194 ^{ac}
干预后 12 周	1.505±0.184 ^{bcd}	1.934±0.313 ^{ac}	2.088±0.235 ^{abd}	1.892±0.193 ^{ac}

表注:与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

3 讨论 Discussion

肥胖是由于机体对摄入的热量多于机体消耗的热量导致脂肪合成的增加或者机体代谢的改变,致使机体脂肪出现过多的积聚的一种慢性代谢性疾病。绝经后骨质疏松是中老年妇女常见的一种代谢性疾病,现代医学认为其发生主要是由于卵巢功能衰退、雌激素水平下降,导致低骨量和骨组织微结构退化性[14]。已知绝经后骨质疏松与肥胖存在密切联系。绝经后女性因雌激素水平的降低引起机体脂代谢功能的紊乱,最终呈现中心性肥胖及高脂血症。有研究证实,通过有选择性的雌激素受体调节剂干预肥胖的小鼠,小鼠脂肪蓄积降低同时脂代谢异常得到改善[15]。反之,高脂饮食可导致卵巢早衰并引起雌激素分泌降低[16]。脂肪因子,如瘦素、趋化素、脂联素以及甘丙肽等可通过多种途径影响骨代谢,参与骨质疏松的发生[2]。其中,瘦素是脂肪组织分泌一种蛋白,主要通过中枢神经系统和外周神经系统共同发挥调节机体能量代谢稳态的作用[2]。而瘦素可促进间充质干细胞向成骨细胞分化,并抑制其向脂肪细胞分化[17]。对于绝经后骨质疏松而言,瘦素可改善绝经后骨质疏松引起的骨量丢失[18-19]。因此可见,瘦素在肥胖和绝经后骨质疏松中承担重要桥梁作用。

对于肥胖而言,脂代谢异常是重要表现形式。实验发现,卵巢切除后,大鼠脂代谢出现紊乱,高脂饮食又致使脂代谢异常加重。而在巴戟天醇提物的干预下,卵巢切除大鼠脂代谢紊乱得到改善。而瘦素是一种肥胖基因的表达产物,参与机体调节能量代谢[20-22]。具体来说,瘦素可以通过控制饮食,

表 8 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清 RANKL 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

Table 8 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum RANKL level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	23.234±3.234	23.254±2.254	22.335±3.026	20.963±3.325
干预后 4 周	21.353±2.435 ^{bcd}	28.297±1.185 ^{ac}	30.124±1.396 ^{abd}	28.352±2.103 ^{ac}
干预后 8 周	22.308±2.314 ^{bcd}	28.432±2.073 ^{ac}	32.242±1.903 ^{abd}	29.256±2.024 ^{ac}
干预后 12 周	21.132±2.142 ^{bcd}	30.325±1.893 ^{ac}	34.188±2.123 ^{abd}	30.132±2.153 ^{ac}

表注:与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

表 10 | 巴戟天醇提物对卵巢切除高脂饮食大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/L}$)

Table 10 | Effect of alcohol extract of *Morinda officinalis* on serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b level in ovariectomized rats with high-fat diet

时间	假手术组	卵巢切除 + 正常饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食组	卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组
干预前	18.357±0.176	18.402±0.214	18.341±0.221	18.422±0.189
干预后 4 周	18.457±0.205 ^{bcd}	24.135±0.186 ^b	25.343±0.210 ^b	23.856±0.195 ^{ac}
干预后 8 周	18.565±0.197 ^{bcd}	23.892±0.218 ^a	24.987±0.216 ^{cd}	23.135±0.168 ^{ac}
干预后 12 周	18.674±0.221 ^{bcd}	23.941±0.238 ^{ad}	24.044±0.193 ^{cd}	22.994±0.201 ^{abc}

表注:与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 正常饮食组相比, ^b $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食组相比, ^c $P < 0.05$; 与卵巢切除 + 高脂饮食 + 巴戟天醇提物组相比, ^d $P < 0.05$

减少能量的摄取;增强能量的消耗;抑制脂肪的合成等方式调节机体脂肪的蓄积。上述结果说明,巴戟天醇提物能提高去卵巢大鼠机体瘦素和瘦素受体的表达;同时由于瘦素参与机体脂代谢的调控,巴戟天醇提物也能提高机体瘦素及瘦素受体的表达来调控脂代谢。

绝经后骨质疏松的发生是机体的骨吸收和骨形成平衡关系改变的结果,这一过程分别需要成骨细胞及破骨细胞的参与。RANKL/RANK/骨保护素系统是将成骨细胞和破骨细胞联系在一起的关键[23]。骨保护素及 RANKL 均可由成骨细胞表达,其中 RANKL 可与 RANK 结合,进而促进破骨细胞活性,加强骨吸收,抑制破骨细胞凋亡,而骨保护素可阻断 RANKL 的上述作用。雌激素可刺激机体对骨保护素的表达,当绝经后骨质疏松发生时,机体雌激素明显下降,因而骨保护素随之减少,骨保护素与 RANKL 的比值发生明显改变,最终导致破骨细胞活性及骨吸收的增强[23]。同时雌激素又可作用于机体直接刺激瘦素的分泌,降低神经肽 Y 的含量,神经肽 Y 具有增肥的作用而瘦素对神经肽 Y 生理效应的发挥有抑制作用,因此当绝经后骨质疏松发生时,机体雌激素分泌减少,进而降低瘦素在体机体中的含量引发脂代谢紊乱而发生肥胖[24]。现有研究证实,瘦素受体存在于骨组织中,瘦素可直接或间接作用于成骨细胞,刺激其成熟和分化,也可间接作用于破骨细胞,抑制其活性;瘦素对于骨重建的调控可通过调节 RANKL/RANK/骨保护素系统来实现[25-27]。另外,抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 是由破骨细胞分泌,能够特异性的反映破骨细

胞活性,是辅助评价绝经后骨质疏松的指标之一^[28]。骨钙素则由成骨细胞分泌,可以很好的评价骨形成能力^[29-31]。实验发现,由于切除卵巢后引起雌激素的直线下降,其刺激机体对骨保护素的表达减弱因此出现骨保护素表达的降低,同时机体对瘦素的分泌减少。瘦素受体表达的减少考虑原因,由于卵巢切除后,机体处于骨质疏松状态,成骨细胞数量减少,因此于成骨细胞上的瘦素受体总数量也相应减少。而卵巢切除后机体处于高转换状态即骨吸收和骨形成能力增强,但骨吸收始终大于骨形成,因此 RANKL、骨钙素及抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 表达均表现为升高趋势。而有研究指出,瘦素与雌激素对于骨的保护机制相似,可通过促进类胰岛素生长因子 1 合成,增加骨保护素的表达,同时瘦素可以抑制骨的高转换引起的骨量丢失^[32]。由此推断巴戟天醇物可通过提高瘦素受体、瘦素一方面可改善机体高转换状态引起骨吸收和骨形成活性的下降,因此出现骨钙素、RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 浓度的降低,另一方面加强骨保护素的表达最终达到调节骨代谢的作用。

综上所述,瘦素受体及瘦素在肥胖和绝经后骨质疏松的发病中扮演重要的角色。巴戟天醇提取物通过改善瘦素受体、瘦素水平一方面可改善因卵巢切除后大鼠的脂代谢异常,另一方面也可改善因卵巢切除后引起的高转换状态导致的骨代谢异常。即巴戟天醇提取物能够上调去卵巢大鼠血清中瘦素及瘦素受体的表达,进而改善因卵巢切除后导致的骨代谢及脂代谢水平异常。

作者贡献: 黄朱宋、高曦负责实验的设计及论文的撰写,林煜、陈翔、蓝锦福辅助数据的收集及统计,关勇负责理论指导和评估。

经费支持: 该文章接受了“福州市卫生计生中青年科学研究项目(2018-S-wq17)”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不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经厦门大学福州第二医院动物实验伦理委员会批准,批准号为 20180019。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。实验动物在戊巴比妥钠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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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] 李凝旭,黄莺,涂艳,等.绝经后女性骨密度与雌激素水平、免疫细胞因子和骨代谢指标的相关性研究[J].中国免疫学杂志,2017,33(8):1201-1204.
- [2] 李方方,李东阳,赵红.肥胖对骨质疏松症分子水平影响的研究进展[J].山东医药,2014,54(29):106-108.
- [3] 鲍晓雪,王娜,李玉坤.肥胖与骨质疏松症关系的研究进展[J].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(14):2749-2753.
- [4] 朱婷,周里钢.肥胖和骨的相关性研究最新进展[J].医学综述,2015,21(8):1351-1353.
- [5] 石卫红,李小林,巫国辉,等.瘦素受体(OB-RGRP)水平对脂肪细胞的影响及其作用机制研究[J].中国美容医学,2019,28(11):90-93.
- [6] PETTA S, GASTALDELLI A, REBELOS E, et al. Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 2016;17(12):2082.
- [7] ÇELO E, KALARI B, TOTI F. A young adult with generalized lipodystrophy and diabetes mellitus (case report). Georgian Med News. 2018(277):27-31.
- [8] 赵永琴,董进.肥胖与骨质疏松症的相关性研究现状[J].中华临床医师杂志(电子版),2017,11(1):136-139.
- [9] 曹光球,叶义全,林思祖,等.福建永定县地道药材巴戟天现状分析及其发展对策[J].中国现代中药,2007(12):38-40.
- [10] 高曦,陈翔,黄朱宋,等.巴戟天醇提取物对卵巢切除大鼠在高脂饮食状态下骨质量的影响[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(9):1226-1230,1243.
- [11] 王凤娟.巴戟天粗提物对微波辐射后下丘脑调控生精功能的影响[D].福州:福建医科大学,2013.
- [12] 许兵,刘慧,金红婷,等.经典骨质疏松症模型大鼠的肾虚证研究[J].中国骨伤,2012,25(9):766-770.
- [13] 王庆彦,郑洪新.补肾益气活血方对去势大鼠 Wnt7b/β-catenin 信号通路的调控机制[J].中华中医药杂志,2019,34(9):4249-4253.
- [14] 周力学.绝经后骨质疏松症[J].新医学,2007,38(9):611-613.
- [15] 朱晶,傅晓华,张岭,等.选择性雌激素受体调节剂对小鼠肥胖及脂代谢的作用[J].浙江医学,2018,40(12):1295-1298.
- [16] 景彦林,杨修昭,白振军,等.高脂饮食诱导肥胖对雌性生育大鼠卵巢功能的影响[J].中国比较医学杂志,2019,29(8):106-110.
- [17] 王雅媛,梁凤霞.热量控制对肥胖大鼠白色脂肪中瘦素及糖脂代谢的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(7):3247-3250.
- [18] 曾春艳,梁秀文,邱珺,等.肥胖对骨质疏松调节机制的研究进展[J].呼伦贝尔学院学报,2016,24(4):78-81.
- [19] 赵鹏,李树锋.瘦素对绝经后骨质疏松病人骨髓间质干细胞定向分化后增殖的影响及相关机制研究[J].安徽医药,2017,21(6):1049-1054.
- [20] 韩龙,万仕炜,王睿,等.脂肪因子与绝经后骨质疏松症关系研究进展[J].生命的化学,2018,38(4):524-528.
- [21] VALLE M, GASCÓN F, MARTOS R, et al. Relationship between high plasma leptin concentrations and metabolic syndrome in obese pre-pubertal children. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27(1):13-18.
- [22] 李兰兰,任建功.瘦素、脂联素与代谢综合征的相关性研究进展[J].中国糖尿病杂志,2019,27(8):632-634.
- [23] 王春花,王敏,刘鸿丽,等.瘦素与代谢综合征相关性的研究进展[J].当代医药论丛,2019,17(13):35-37.
- [24] SUN X, WEI B, PENG Z, et al. Protective effects of Dipsacus asper polysaccharide on osteoporosis in vivo by regulating RANKL/RANK/OPG/VEGF and PI3K/Akt/eNOS pathway. Int J Biol Macromol. 2019;129:579-587.
- [25] 唐小玲,毛绍蓉.更年期雌激素、孕酮、睾酮与肥胖的关系[J].标记免疫分析与临床,2010,17(2):132-133,121.
- [26] 张明发,沈雅琴.女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展[J].药物评价研究,2014,37(6):566-571.
- [27] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等.基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究[J].中国中医骨伤科杂志,2019(9):1-6,10.
- [28] ZHANG Y, LAI WP, LEUNG PC, et al. Improvement of Ca balance by Fructus Ligustri Lucidi extract in aged female rats. Osteoporos Int. 2008;19(2):235-242.
- [29] 潘奇,陈黔,钱黎.绝经后骨质疏松症患者血清 TRACP-5b、Hcy、BAP 水平变化及诊断效能[J].山东医药,2017,57(35):58-60.
- [30] 王俊玲,黄思敏,梁启瑶,等.雌激素的来源及其在骨代谢中的作用[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(6):729-732.
- [31] 孔德策,杨铁毅,邵进.绝经后骨质疏松骨代谢标志物研究进展[J].国际骨科学杂志,2016,37(1):36-41.
- [32] 易伟莲,廖德权,林柏云,等.绝经后骨质疏松症患者性激素、细胞因子及骨代谢指标的变化及关系[J].检验医学,2012,27(4):296-298.