

刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响

裴凌鹏¹, 尹霞², 李莉², 刘伟志¹, 李志勇¹

1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081

2. 中国中医科学院望京医院 骨伤科研究所, 北京 100070

摘要: **目的** 研究刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响。**方法** 将60只大鼠随机分成对照组、模型组、刺老苞根皮黄酮类化合物高、中、低剂量(10、20、30 mg/kg)组和仙灵骨葆胶囊(20 mg/kg)阳性对照组, 每组10只。各组以ig维甲酸70 mg/kg造模后, 各给药组分别ig给予相应药物, 每日1次, 连续8周。取血清检测相关生化指标, 进行骨组织切片检查和骨生化指标检测, 测定股骨长度、宽度及质量。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠股骨质量、尺骨羟脯氨酸(Hyp)和骨钙的量明显降低, 胫骨髓腔中脂肪组织增多($P<0.01$), 血浆胆固醇(TC)水平升高、碱性磷酸酶(ALP)和高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)水平降低($P<0.01$)。与模型组比较, 刺老苞根皮黄酮类化合物各剂量组能有效增加骨质量和提高骨质的量($P<0.01$), 减少骨髓腔中脂肪的量, 升高ALP和HDL-C的量($P<0.01$)。**结论** 刺老苞根皮黄酮类化合物可有效对抗维甲酸引起的大鼠骨生长抑制及骨丢失。

关键词: 刺老苞根皮; 黄酮类化合物; 维甲酸; 骨质疏松; 碱性磷酸酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)11-2279-04

Effect of flavonoids in *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on osteoporosis induced by retinoic acid in rats

PEI Ling-peng¹, YIN Xia², LI Li², LIU Wei-zhi¹, LI Zhi-yong¹

1. Institute of Minority Traditional Medicine Research, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Wangjing Hospital, Institute of Orthopaedics and Traumatology, Beijing 100700, China

Key words: *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* (AERC); flavonoids; retinoic acid; osteoporosis; alkaline phosphatase

骨质疏松是一种代谢性疾病, 基本特征是骨组织中骨量的减少和骨微细结构退化, 由此造成脆性增加, 因而极易发生骨折^[1]。从植物中发掘有效治疗骨质疏松症的物质, 备受人们期待和关注。刺老苞根皮为五加科植物槲木 *Aralia echinocaulis* Hand. Mazz 及其变种白背叶木 *A. echinocaulis* var. *nuda* Nakai 的根皮或茎皮, 始载于《本草拾遗》, 气微香, 嚼之带黏液性, 味辛, 性平。其归胃、肝、肾经, 功能为滋阴健肾、祛风湿、壮筋骨、散瘀血、消肿毒, 可用于治疗风湿痹痛、跌打损伤、骨折等^[2]。土家族传统医学运用刺老苞根皮治疗骨质疏松症历史悠久。现代药理学研究表明刺老苞所含黄酮类化合物可有效调控成骨-破骨细胞的增殖与分化, 延缓骨质疏松病理进程^[3-4], 但对其机制的研究鲜有报

道。本实验通过长期给予维甲酸引发大鼠骨质疏松模型^[5], 研究刺老苞根皮黄酮类化合物对模型可能的治疗作用及其机制, 为其进一步开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Labconco 冰冻真空干燥仪(法国乐高公司); 752 分光光度计(中国伯乐公司); J2-SH 高速冰冻离心机(日本岛津公司); X-512 型显微镜(Leica 公司); 全自动生化分析仪(奥林巴斯公司)。

1.2 药品与试剂

刺老苞根皮购自湖北恩施医药公司, 经北京中医药大学中药学院生药系杨瑶研究员鉴定为棘茎刺老苞根皮。1 000 g 药材晒干后研磨, 60 °C 烘干,

收稿日期: 2011-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30902011)

作者简介: 裴凌鹏(1976—), 男, 北京人, 中国少数民族传统医学研究院副研究员, 医学博士, 研究方向为民族药与临床医学。

Tel: 13520801809 E-mail: lppei@hotmail.com

过 60 目筛, 70%乙醇 60 mL 回流提取 4 h, 离心滤过, 大孔吸附树脂柱分离, 依次以水、乙醇洗脱, 减压浓缩、冰冻真空干燥, 制成干粉。根据其在 HPLC 分析中保留时间和将紫外可见吸收光谱的特征峰与芦丁对照品对照进行鉴定, 刺老苞根皮含黄酮 1.92 mg/g, 提取物中黄酮的质量分数为 95%。

维甲酸粉、钙黄绿素、盐酸四环素、Goldners 染料、芦丁对照品 (美国 Sigma 公司); 仙灵骨葆胶囊 (贵州同济堂制药有限公司产品, 批号 090512); 羟脯氨酸 (Hyp)、胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C)、碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (北京中生物生物工程高技术公司); 无水乙醇 (北京化学试剂公司)。

1.3 动物

SD 大鼠, 购自军事医学科学院实验动物养殖中心, 合格证号 JYKY-20091103D。

1.4 模型建立与分组

将 60 只大鼠随机分成 6 组, 每组 10 只。对照组 ig 生理盐水 5 mL/kg; 维甲酸模型组先给予 70 mg/kg 维甲酸, 1 h 后 ig 生理盐水 5 mL/kg, 连续给药 8 周; 仙灵骨葆胶囊组, 先 ig 给予 70 mg/kg 维甲酸, 1 h 后 ig 给予仙灵骨葆胶囊 (20 mg/kg) 悬液 5 mL/kg; 刺老苞根皮黄酮类化合物高、中、低剂量组, 先给予 70 mg/kg 维甲酸, 1 h 后 ig 给予 30、20、10 mg/kg 生药刺老苞根皮黄酮 5 mL/kg。各给药组每日给药 1 次, 连续 8 周。第 2 周末各组大鼠颈部 sc 盐酸四环素 2.5 mg/kg, 作为第 1 次荧光标记; 在 7 周末注射钙黄绿素 5 mg/kg 作为第 2 次荧光标记, 以在骨表面形成黄色和绿色双荧光标志。

1.5 指标检测

1.5.1 骨物理指标观察 大鼠 ip 戊巴比妥钠溶液麻醉后心脏采血, 处死, 分离血清进行生化指标的测定。取左侧股骨, 除净附着在骨上的肌肉和软组织, 称湿质量后烤干至恒定质量。用游标卡尺测量股骨大转子和股骨颈汇合处最低点到股骨踝窝的距离作为股骨长度, 股骨曲面的第 3 转子下行至股骨干交接处作为股骨宽度。

1.5.2 骨生化指标的检测 取左侧尺骨, 除净附着的肌肉和软组织, 称质量研碎后灰化 2 h。骨灰以硝酸溶解, 用火焰原子吸收分光光度计测钙、磷的量。取大鼠右侧尺骨上端称质量, 研碎, 用 3 mL 氯仿-甲醇处理 2 h, 滤过, 再用乙醇水溶液和丙酮冲洗 1

次, 放置烤箱烘烤 2 h 后放入 12 mol/L 盐酸 1 mL 高温水解 2 h, 取出后处理用氯胺 T 法, 于 560 nm 波长下测定, 计算骨中 Hyp 的量。

1.5.3 骨组织构成观察 采用图像分析仪测定大鼠胫骨上段不脱钙骨的骨髓腔中的脂肪细胞、血窦和红骨髓的面积比, 其中将脂肪组织和血窦面积视为白骨髓面积, 而剩余面积为红骨髓面积, 红骨髓面积与白骨髓面积之和即为骨髓腔面积。

1.5.4 血清生化指标检测 大鼠右心室取血分离血清后, 以分光光度计测定血清中 HDL-C 和 TC 的量, 其中 HDL-C 按聚乙二醇法测定, TC 按甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法测定, 血清钙、磷、ALP 用全自动生化仪测定。

1.6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件进行统计, 组间差异比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 对维甲酸致骨质疏松大鼠股骨物理指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠股骨湿质量、干质量明显降低 ($P < 0.01$), 表明长期使用维甲酸可造成骨质的显著变化, 但股骨长度、宽度无明显改变。与模型组比较, 刺老苞根皮黄酮类化合物高、中、低剂量组大鼠的股骨湿质量、干质量明显增加 ($P < 0.01$), 各剂量组之间无明显差异。结果见表 1。

2.2 对维甲酸致骨质疏松大鼠骨生化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠尺骨质量, 骨中 Hyp、钙、磷的量明显降低 ($P < 0.01$), 表明长期使用维甲酸可造成骨有机质丢失。与模型组比较, 刺老苞根皮黄酮类化合物各剂量均可增加大鼠尺骨的质量及骨中 Hyp、钙、磷的量 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 对维甲酸致骨质疏松大鼠胫骨骨组织构成的影响

与对照组比较, 模型组大鼠胫骨骨髓腔中骨髓面积增加而红骨髓面积减小 ($P < 0.01$), 白骨髓中脂肪组织增多 ($P < 0.01$), 表明长期服用维甲酸可造成大鼠骨髓的脂肪化。与模型组相比, 刺老苞根皮黄酮类化合物各剂量组均可使大鼠胫骨骨髓腔中白骨髓面积减小, 而红骨髓面积增加 ($P < 0.01$), 脂肪组织减少 ($P < 0.01$)、血窦组织增加 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

2.4 对维甲酸致骨质疏松大鼠血清生化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清钙、TC 水平有所升高 ($P<0.01$), 而 HDL-C、血磷、ALP 水平

有所下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 刺老苞根皮黄酮类化合物各剂量组可明显升高血清 HDL-C、磷、ALP 的水平 ($P<0.01$), 降低 TC 水平 ($P<0.01$)。结果见表 4。

表 1 刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致骨质疏松大鼠股骨物理指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of flavonoids in AERC on physical indexes of tighthbone in rats with osteoporosis induced by retinoic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	湿质量/mg	干质量/mg	骨长度/mm	骨宽度/mm
对照	—	901.1±20.1	721.1±18.7	34.2±0.6	4.2±0.3
模型	—	768.3±17.1 ^{▲▲}	548.7±16.0 ^{▲▲}	33.3±0.5	4.1±0.2
刺老苞根皮黄酮类化合物	10	837.8±18.2 ^{###}	650.3±17.1 ^{###}	34.0±0.5	4.2±0.3
	20	867.1±19.1 ^{###}	677.2±16.2 ^{###}	34.1±0.6	4.2±0.3
	30	884.3±19.0 ^{###}	686.1±17.7 ^{###}	34.2±0.5	4.2±0.4
仙灵骨葆胶囊	20	891.5±18.3 ^{###}	702.2±18.1 ^{###}	34.2±0.1	4.2±0.4

与对照组比较: ^{▲▲} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{###} $P<0.01$; 下表同

^{▲▲} $P<0.01$ vs control group; ^{###} $P<0.01$ vs model group; below table are same

表 2 刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致尺骨骨质疏松大鼠骨生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of flavonoids in AERC on biochemical indexes of ulna in rats with osteoporosis induced by retinoic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尺骨质量/mg	Hyp/(μg·mL ⁻¹)	钙/(μg·mL ⁻¹)	磷/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	175.2±18.4	121.4±14.7	634.2±25.6	244.2±22.3
模型	—	139.4±17.3 ^{▲▲}	88.2±13.1 ^{▲▲}	591.1±21.2 ^{▲▲}	202.1±21.7 ^{▲▲}
刺老苞根皮黄酮类化合物	10	144.1±19.0 ^{###}	100.1±13.3 ^{###}	604.4±22.1 ^{###}	211.2±21.1 ^{###}
	20	149.1±18.2 ^{###}	103.7±13.2 ^{###}	611.1±22.1 ^{###}	221.2±21.0 ^{###}
	30	153.2±18.1 ^{###}	112.2±12.8 ^{###}	620.2±23.2 ^{###}	230.8±22.2 ^{###}
仙灵骨葆胶囊	20	160.1±18.1 ^{###}	115.5±14.2 ^{###}	625.8±22.3 ^{###}	238.5±21.8 ^{###}

表 3 刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致骨质疏松大鼠骨髓组织构成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of flavonoids in AERC on percentage of marrow structural area in rats with osteoporosis induced by retinoic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红骨髓/%	白骨髓/%	脂肪组织/%	血窦组织/%
对照	—	75.0±6.2	25.0±3.1	15.1±2.1	14.7±2.7
模型	—	49.0±4.7 ^{▲▲}	47.0±3.2 ^{▲▲}	31.7±3.0 ^{▲▲}	10.3±3.1 ^{▲▲}
刺老苞根皮黄酮类化合物	10	68.0±6.0 ^{###}	31.0±3.0 ^{###}	17.2±2.4 ^{###}	13.5±2.4 ^{###}
	20	72.4±6.1 ^{###}	29.3±3.0 ^{###}	19.4±2.6 ^{###}	13.9±2.2 ^{###}
	30	74.2±6.0 ^{###}	26.7±3.2 ^{###}	19.9±2.4 ^{###}	14.2±2.6 ^{###}
仙灵骨葆胶囊	20	74.5±6.1 ^{###}	26.1±3.0 ^{###}	16.3±2.1 ^{###}	14.4±2.3 ^{###}

3 讨论

研究表明, 长期使用大剂量维甲酸可引起大鼠负重骨的骨质明显丢失, 同时使松质骨结构发生明显变化, 呈现骨质疏松状态, 该作用与维甲酸的剂

量成正相关。维甲酸造成的骨丢失主要以有机质的丢失为主, 进而导致骨的脆性增高、韧性下降, 这可能是长期服用此类药物的患者容易发生骨折的原因。此外, 应用维甲酸后大鼠破骨细胞活性增强,

表4 刺老苞根皮黄酮类化合物对维甲酸致骨质疏松大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effect of flavonoids in AERC on serum biochemical indexes in rats with osteoporosis induced by retinoic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血钙/ (mmol·L ⁻¹)	血磷/ (mmol·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	2.4±0.3	2.5±0.3	115.2±20.1	38.2±1.2	117.2±19.1
模型	—	2.7±0.4 ^{▲▲}	1.8±0.1 ^{▲▲}	71.1±12.7 ^{▲▲}	20.8±1.0 ^{▲▲}	135.1±20.3 ^{▲▲}
刺老苞根皮黄酮类化合物	10	2.7±0.3	2.0±0.2 ^{##}	100.1±15.2 ^{##}	40.7±1.2 ^{##}	132.3±21.3 ^{##}
	20	2.7±0.4	2.3±0.3 ^{##}	104.8±16.1 ^{##}	42.1±1.3 ^{##}	125.1±20.1 ^{##}
	30	2.6±0.2	2.4±0.3 ^{##}	110.6±16.4 ^{##}	43.3±1.3 ^{##}	122.8±19.2 ^{##}
仙灵骨葆胶囊	20	2.6±0.1	2.4±0.6 ^{##}	112.1±17.0 ^{##}	47.1±1.5 ^{##}	102.8±16.8 ^{##}

骨吸收活跃,加速骨质溶解,抑制骨细胞分泌骨质,同时也引起体内脂质代谢紊乱,造成骨髓脂肪细胞增多,引起骨髓腔内压增高而使血流减慢,从而影响了骨内血供而抑制骨代谢^[6-10]。本实验结果表明,刺老苞根皮黄酮类化合物有效改善维甲酸致骨质疏松大鼠的上述症状和指标的变化,缓解骨质疏松症的发生、发展的进程,作用虽稍弱于仙灵骨葆胶囊,但凭借其作为天然产物不良反应少等特点,具有较大的开发价值。其作用机制尚需进一步的研究。

参考文献

- [1] 马亚兵,高海青,刘新春,等.骨质疏松症预防与治疗的循证医学研究[J].药物评价研究,2009,32(2):135-139.
- [2] 邵兴,赵敬华.浅析自然地理环境与土家族医药学的关系[J].中国民族民间医药,2007,11(3):58-60.
- [3] 裴凌鹏,朱嘉.刺老苞根皮黄酮类化合物对破骨细胞分化的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(4):593-594.
- [4] 尹霞,郑玲玲,张万强,等.刺老苞根皮黄酮类化合物抗去势雌性大鼠骨质疏松实验研究[J].上海中医药杂志,2011,45(3):67-69.
- [5] Zhao Q, Shao J, Chen W. Osteoclast differentiation and gene regulation[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 2519-2529.
- [6] 刘忠厚.骨质疏松学[M].北京:科学出版社,1998.
- [7] 崔燎,邹丽宜,刘钰瑜.丹参水提物和丹参素促进成骨细胞活性和防治泼尼松所致大鼠骨质疏松[J].中国药理学通报,2004,20(3):286-291.
- [8] Miyamishi K, Yamamoto T, Irita T. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis[J]. *Bone*, 2002, 30(1): 185-190.
- [9] 王晓,梅其炳,刘莉,等.骨质疏松动物模型的复制与评价[J].中国骨质疏松杂志,2007,13(2):141-145.
- [10] 厉婷,崔燎.脂质代谢紊乱和骨质疏松[J].中国骨质疏松杂志,2008,23(6):67-70.