

## 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨质疏松的影响

李贵海,宋卫国,孙付军,陆永辉,王春芳\*

(山东省中医药研究院,山东 济南 250014)

**摘要:**目的 通过观察葛藤提取物对去卵巢骨质疏松大鼠模型的影响,阐述其治疗骨质疏松症的作用机制,为临床应用提供药效学依据。方法 Wistar 大鼠,手术切除双侧卵巢 3 d 后,按照体质量随机分组,给药组每天 ig 葛藤提取物 200、100、50 mg/kg,给药 6 个月后,测定大鼠股骨力学性能、骨钙磷量等指标。结果 葛藤提取物明显提高大鼠骨组织抗外力性能,增加骨骼中钙的量,高、中剂量组作用相当,低剂量作用较差。病理诊断提示葛藤提取物不同程度改善骨质疏松模型骨组织病理性改变,增加骨小梁数目。结论 通过多角度不同层次地考察葛藤提取物对去卵巢骨质疏松模型的治疗作用,提示葛藤提取物对骨质疏松具有明显的改善作用。

**关键词:**葛藤提取物;骨质疏松症;生物力学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)09-1450-03

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种代谢性骨病,它是以骨量减少和骨的微观结构退化为特征,导致骨的脆性增加以致于易发生骨折的一种全身性骨骼疾病<sup>[1]</sup>。雌激素替代疗法(HRT)一直是绝经后骨质疏松症的首选方法,但其诱发生殖系统癌症、引起深静脉血栓等方面副作用,使 HRT 的应用有了广泛争议<sup>[2,3]</sup>。

葛藤为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的地上部分干燥茎,作为葛根的非药用部位,其药用价值近年来已受到国内外学者的关注。葛藤主要含有大豆苷、大豆苷元、葛根素等异黄酮成分。现代研究已证实这些成分具有治疗骨质疏松、抗心律失常和抗心脑血管缺血等生物效应<sup>[4,5]</sup>,对于阻止激素水平下降,防治中老年骨质疏松和预防心脑血管病具有肯定的疗效。推测葛藤异黄酮可能有改善骨质疏松症的生物学活性。本研究以去卵巢大鼠模型来模拟绝经后骨质疏松,观察葛藤提取物对由雌激素缺乏引起骨质疏松的作用,并为新药开发提供实验依据。

### 1 材料

1.1 药物:葛藤提取物采用 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次后回收乙醇,大孔树脂柱分离,浓缩干燥后测定提取物的总黄酮质量分数为 61.08%,其中葛根素 22.60%、大豆苷元 1.29%、大豆苷 19.97%,由山东省千佛山医院药剂科制备,批号 060411。尼尔雌醇片,2 mg/片,上海医药集团有限公司华联制

药厂产品,批号 060901。

1.2 动物:Wistar 雌性大鼠,280~300 g,山东大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20030004。

1.3 仪器:梅特勒-托利多 GB-303 电子天平,梅特勒中国公司;YB-6LF 生物组织石蜡包埋机、YT-7F 型生物组织摊烤片机、ZT-12P 生物组织自动脱水机,湖北孝感亚光医用电子技术有限公司;LEICA-RM2135 切片机、LEICA-DM/LS 显微镜,德国 LEICA 公司;SX-5-12 箱式电阻炉、KSW 电炉温度控制器,北京永光明医疗仪器厂;PV-9100X 射线能谱仪,日本飞利浦;S-520 扫描电镜,日本日立;YLS-7A 足趾容积测量仪、YLS-16A 小动物骨骼强度测定仪,山东省医学科学院设备站产品。

### 2 方法

2.1 造模、分组及给药:雌性 Wistar 大鼠,80 只,10% 硫化钠水溶液下腹部下中脱毛约 1.5 cm<sup>2</sup> 左右,40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉后仰位固定,分层剥离,暴露两侧卵巢,结扎后完整切除两侧卵巢,止血后分层缝合<sup>[6-8]</sup>。假手术组(10 只)做相同的手术操作,但不切除卵巢。术后连续 3 d 硫酸庆大霉素抗感染,自由饮水、摄食。

手术 3 d 后剔除状态较差大鼠,按照体质量随机分为假手术组,模型组,阳性对照组,葛藤提取物高、中、低剂(200、100、50 mg/kg)组(使用前分别

\* 收稿日期:2008-12-11

基金项目:山东省科技发展计划项目(032040101)

作者简介:李贵海(1959—),男,山东龙口人,研究员,现承担国家“十五”攻关课题 1 项,国家中医药管理局项目 1 项,省科技计划项目 1 项。研究方向主要为中药抗肿瘤和逆转肿瘤多药耐药性作用的分子机制研究;中药新成分、新部位和复方的药效作用及作用机制的研究。为省中医药学会老年病专业委员会副主任委员、中药学会理事、中药药理专业委员会委员。

Tel: (0531) 82949803 E-mail: guihai99@163.com

配制成 2%、1%、0.5% 的水溶液,以 10 mL/kg ig 给药,每日 1 次)。假手术组和模型组给予同体积凉开水,阳性对照组给予尼尔雌醇 (1.5 mg/kg,给药前配制成 0.015% 的水溶液,以 10 mL/kg ig 给药),每周给药 2 次 (周一、四给药),连续 ig 6 个月。每周称取体质量,并按新体质量调整 ig 剂量。各组大鼠自由饮水、摄食。

2.2 指标测定:最后一次给药后,禁食不禁水 12 h,采血后脱颈处死大鼠,完整分离大鼠的左右两侧股骨,剔除所有附着的肌肉和结缔组织,一只以 10% 甲醛溶液固定,行病理学检查;一只用生理盐水浸泡的湿纱布包裹,-20℃ 密封保存,分别测定股骨的湿质量、体积及生物力学性能。力学测定后收集残骨 200℃ 烘干 8 h,称取干质量,马氟炉 800℃

灰化后称取灰分质量,灰化后标本利用能谱测定骨中钙、磷、氯的质量分数。

2.3 数据分析:所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 进行 *t* 检验分析。

### 3 结果

3.1 葛藤提取的对去卵巢大鼠骨生物力学的影响:大鼠股骨生物力学性能测定结果见表 1。模型组大鼠骨组织抗外力性能明显较假手术对照组差 ( $P < 0.01$ )。葛藤提取物不同剂量均明显提高骨组织抗外力作用,其中以高剂量组作用最为明显,与模型组比较具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

表 1 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨生物力学的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Influence of kudzuvine extract on bone biomechanics of rat extirpated ovary ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 扭力/(N·g <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------|-------------------------|
| 假手术   | -                         | 12.63 ± 1.81 **         |
| 模型    | -                         | 10.18 ± 1.69            |
| 尼尔雌醇  | 1.5                       | 10.97 ± 1.90            |
| 葛藤提取物 | 200                       | 11.45 ± 1.25 *          |
|       | 100                       | 11.18 ± 1.74            |
|       | 50                        | 10.88 ± 1.53            |

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

3.2 葛藤提取物对去卵巢大鼠股质量、体积比值的影响:分别采集大鼠股骨湿质量、干质量和体积值,计算不同质量与体积比值,结果见表 2。模型组湿质量、干质量、灰分质量和体积的比值均明显降低,与假手术组比较具有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ),提示造模明显降低大鼠股骨的钙磷量,降低其骨密度。尼尔雌醇组明显改善模型造成的上述病理性改变,葛藤提取物 3 个剂量组不同程度改善造模引起

表 2 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨质量、体积比值的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Influence of kudzuvine extract on ratio of bone mass to bone cubage of rat extirpated ovary  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 湿质量/体积         | 干质量/体积         | 灰质量/体积         |
|-------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 假手术   | -                         | 1.64 ± 0.15 ** | 0.99 ± 0.11 ** | 0.70 ± 0.08 ** |
| 模型    | -                         | 1.29 ± 0.09    | 0.68 ± 0.06    | 0.59 ± 0.04    |
| 尼尔雌醇  | 1.5                       | 1.45 ± 0.05 ** | 0.86 ± 0.11 ** | 0.60 ± 0.08    |
| 葛藤提取物 | 200                       | 1.43 ± 0.04 ** | 0.87 ± 0.03 ** | 0.68 ± 0.03 ** |
|       | 100                       | 1.42 ± 0.06 ** | 0.85 ± 0.12 ** | 0.66 ± 0.04 ** |
|       | 50                        | 1.40 ± 0.09 ** | 0.83 ± 0.06 ** | 0.67 ± 0.05 ** |

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

的骨质疏松表现,与模型组比较均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),其中高剂量作用最显著。

3.3 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨组织钙、磷、氯的影响:葛藤提取物能明显增加骨骼中钙量,高、中剂量组作用相当,低剂量作用较差,但与模型对照组比较均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ );对磷的影响以中剂量作用最为明显;但 3 个剂量组对骨骼中氯离子的质量分数无明显影响。结果见表 3。

表 3 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨组织钙、磷、氯量的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 3 Influence of kudzuvine extract on content of calcium, phosphorus, and chlorine in osseous tissue of rat extirpated ovary ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 钙/%             | 磷/%             | 氯/%         |
|-------|---------------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| 假手术   | -                         | 60.75 ± 3.82    | 28.75 ± 1.55    | 3.26 ± 1.02 |
| 模型    | -                         | 56.61 ± 7.02    | 27.51 ± 1.97    | 1.44 ± 0.97 |
| 尼尔雌醇  | 1.5                       | 64.51 ± 4.32 ** | 32.16 ± 1.47    | 2.16 ± 1.39 |
| 葛藤提取物 | 200                       | 67.82 ± 3.87 ** | 28.52 ± 2.64    | 1.69 ± 1.04 |
|       | 100                       | 67.32 ± 3.21 ** | 32.67 ± 1.16 ** | 1.23 ± 1.04 |
|       | 50                        | 64.46 ± 4.76 ** | 28.62 ± 1.68    | 1.74 ± 1.10 |

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

3.4 葛藤提取物对去卵巢大鼠骨组织病理学的影响:病理诊断显示,假手术组:股骨骨小梁排列密集,互相连接呈网状结构,骨小梁的厚度大,其间距小。模型组:骨小梁明显变细,数量明显减少,断裂增多,碎裂形成纽扣状碎骨片,骨小梁面积明显减小,髓腔扩大,皮质骨变薄;与假手术组比较,同样倍数下骨小梁的连接中断点明显增多,骨小梁髓腔间距增大。尼尔雌醇组:与模型组比较骨小梁稍规则,数目增多,厚度增加,断裂少,髓腔间隙变小,但骨小梁面积仍小于假手术组;葛藤提取物高剂量组:与模型组比较骨小梁稍规则,数目轻度增多,厚度稍增加,断裂少,髓腔间隙稍变小,骨小梁面积稍高于模型组。中

剂量组:与模型组比较骨小梁稍规则,数目轻度增多,厚度稍增加,断裂少,髓腔间隙稍变小,骨小梁面积稍高于模型组。小剂量组:骨小梁变细,数量减少,断裂增多,碎裂形成纽扣状碎骨片,髓腔扩大,皮质骨变薄;与假手术组比较,同样倍数下骨小梁的连接中断点明显增多,骨小梁髓腔间距增大,病理改变接近模型组。见图 1。

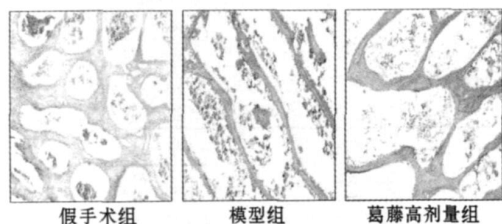


图 1 去卵巢大鼠骨组织病理学

Fig. 1 Pathology of osseous tissue in rat extirpated ovary

#### 4 讨论

前期和国内其他学者的研究结果都证实葛藤和葛根的总黄酮量相近,但其主要成分比例不同。目前,国内均以葛根为原料提取葛根总黄酮,葛藤仍然被视为非药用部位,在葛根采集中被丢弃。因此开展葛藤新药的开发研究具有重要的经济价值。

本研究在药学研究的基础上,结合骨质疏松发病学基础,选择卵巢切除大鼠模型来观察葛藤提取物治

疗骨质疏松的作用,为临床进一步应用提供基础。

连续给药 6 个月后,分别观察各组大鼠所考察指标,葛藤提取物 3 个给药组均明显提高骨组织抗外力作用,增加骨骼中钙的量,不同程度改善造模引起的骨质疏松表现;病理诊断也提示葛藤提取物不同程度改善骨质疏松模型骨组织病理性改变,增加骨小梁数目。葛藤提取物具有明显的干预和治疗雌激素缺乏引起的骨质疏松的药效学作用。

#### 参考文献:

- [1] 郭世祚. 骨质疏松——基础与临床 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 2001.
- [2] Marsden J. Hormone replacement therapy and breast cancer [J]. *Maturitas*, 2000, 341 (S2): 11-24.
- [3] Force T. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the US [J]. *Prevent Serv Ann Intern Med*, 2002, 136(9): 42.
- [4] 汤丹,金邦荃,吕伶,等. 大豆苷元和葛根素对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 40-42.
- [5] 刘薇,王亚利,张式暖,等. 葛根素对慢性缺氧心肌保护作用的实验研究 [J]. 山东医药, 2006, 46(5): 15-16.
- [6] 陈训华,危剑安,陈燕平,等. 补肾方药对去卵巢大鼠骨质疏松症防治作用的研究 [J]. 中国骨伤, 1998(2): 12.
- [7] 刘石平,廖二元,伍汉文,等. 绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(2): 111.
- [8] 韦永中,陶松年,杨国平,等. 依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松作用的初步观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(1): 76-78.

## 黄酮苷元的三维构动关系研究 : Caco-2 细胞渗透性的预测

徐适,陈雕,兰轲\*,蒋学华,王战国

(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

**摘要:**目的 探索应用计算机虚拟筛选技术进行中药与天然药物早期药动学研究的方法,阐明黄酮苷元的结构与其 Caco-2 细胞渗透性的关系。方法 以 Sybyl 7.3 软件包的 CombiLibMaker 模块构建基于黄酮 (flavone) 骨架的虚拟组合化学库,以 Volsurf 模块定性预测黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性。结果 构建的虚拟组合化学库中包含 26 244 个黄酮苷元。黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性与其取代基的种类和数量有关;羟基取代的增多不利于其透过 Caco-2 细胞,羟基的甲基化则可增加其透过 Caco-2 细胞的能力。结论 研究结果与报道的试验数据具有良好的相关性。

**关键词:**黄酮类化合物;构动关系;Caco-2 细胞;吸收

**中图分类号:**R285.61 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)09-1452-04

黄酮类化合物 (flavonoids) 分布广泛,具有多种多样的生物活性。多年来国内外学者致力于其药动学的研究,并取得了一定的进展。截至 1993 年,

已鉴定的天然黄酮类化合物已超过 4 000 个<sup>[1]</sup>,传统的药动学研究方法难以满足研究的通量需求。计算机虚拟筛选技术可利用组合化学原理构建某一

\* 收稿日期:2008-12-19

基金项目:四川大学青年科学研究基金 (校青 07035); 四川大学大学生科研训练计划 (2008—2009 年)

作者简介:徐适,男,四川大学 2006 级本科生。Tel: (028) 85503722

\*通讯作者 兰轲 Tel: (028) 85503722 E-mail: lanwoco@scu.edu.cn, lanwoco@163.com