

射干提取物抗雌激素缺乏大鼠骨质疏松的研究

冯汉林, 严启新*

深圳市海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518057

摘要: 目的 观察射干不同提取物对卵巢切除致大鼠骨质疏松症的影响, 筛选活性部位。方法 96只雌性SD大鼠随机分为8组, 第1组切除腹腔中少量脂肪作为假手术组; 第2至8组均切除双侧卵巢, 第2组作为模型组, 第3至8组作为给药组。6个给药组中, 2组分别ig射干总黄酮100、20 mg/kg, 2组ig射干乙醇提取物197、40 mg/kg, 2组ig射干苷15.30、3.06 mg/kg, 连给4个月, 测定骨矿密度(BMD), 骨矿含量(BMC), 血清钙、磷的水平和AKP活性。结果 射干总黄酮、射干醇提取物能明显改善大鼠因雌激素缺乏引起的骨矿丢失, 提高BMD和BMC, 改善骨骼力学性能。结论 射干总黄酮提取物具有良好的抗骨质疏松症的效果。

关键词: 射干; 总黄酮; 雌激素缺乏; 骨质疏松; 骨矿密度; 骨矿含量

中图分类号: R285.5; R286.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2012)03-0209-05

Anti-osteoporosis of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* in estrogen deficiency rats

FENG Han-lin, YAN Qi-xin

Shenzhen Neptunus Bioengineering Holdings Co., Ltd., Shenzhen 518057, China

Abstract: Objective To investigate the effects of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on osteoporosis in rats after ovariectomy (OVX). **Methods** Ninety-six SD female rats were randomly divided into eight groups. The control group had a sham-operation by cutting adipose tissue. The model group had OVX, while the rest six groups received bilateral OVX as drug groups. Animals in drug groups were respectively ig administrated with different extracts from *Belamcandae Rhizoma* for four months: two groups of the total flavone extract (100 and 20 mg/kg), two groups of the ethanol extract (197 and 40 mg/kg), and two groups of the tectoridin (15.30 and 3.06 mg/kg). The levels of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), calcium and phosphorus in serum, and the activation of AKP were observed in each group. **Results** Compared with the model group, the total flavone extract and the ethanol extract of *Belamcandae Rhizoma* could significantly improve the loss of bone mineral induced by estrogen deficiency, increasing BMD and BMC, and promote the skeleton mechanical property. **Conclusion** The total flavone extract from *Belamcandae Rhizoma* has a distinct and preventive effect on osteoporosis rats.

Key words: *Belamcandae Rhizoma*; total flavone; estrogen deficiency; osteoporosis; bone mineral density (BMD); bone mineral content (BMC)

射干为鸢尾科射干属植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC.的干燥根茎, 味苦、寒, 入肝、肺经, 具有清热解毒、利咽消痰、散血消肿的功效, 主要用于咽喉肿痛、痰咳气喘等症, 为治疗喉痹咽喉痛之要药^[1]。现代研究表明, 射干主要含异黄酮类化合物, 目前已报道的异黄酮类化合物约20个, 分别是野鸢尾黄素、鸢尾黄素、德鸢尾素、染料木素、二甲基鸢尾苷元、次野鸢尾苷元等^[2-4]。药理学研究显示射干具有显著的抗炎、抗肿瘤、清除自由基、抗氧化及抗肝脏毒性、雌激素样作用等^[1, 5]。为进

一步开发该植物资源, 笔者建立卵巢切除致大鼠骨质疏松症模型, 综合考察和筛选了的射干总黄酮、射干乙醇提取物及射干苷抗骨质疏松活性。

1 材料

1.1 药材与试剂

射干药材, 采自湖北省团风县, 经中国科学院昆明植物研究所李锡文教授鉴定为射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC.的根茎。

乙二胺四乙酸(EDTA)、盐酸、硫酸、氢氧化钠、乙醇、磷酸和氨奈磺酸等均为商品分析纯;

收稿日期: 2011-11-11

作者简介: 冯汉林(1966—), 男, 高级工程师, 研究方向为天然药物新药研发。Tel: (0755)26013363 E-mail: henryf@tom.com

* 通讯作者 严启新 Tel: (0755)26013492 E-mail: yanqixin2005@126.com

生化试剂：血脂水平和碱性磷酸酶（AKP）测定试剂盒均为宁波慈城生化试剂公司生产。

1.2 动物

SD 大鼠，雌性，3 月龄，体质量 250~280 g，由浙江省实验动物中心提供。动物饲养合格证号：浙实验动物准字（96）002。

1.3 仪器

AA—670 型原子吸收分光光度计（日本岛津公司）；Piximustm 型双能骨密度仪（美国 Lunar 公司）；WD1000 型电子万能试验机（长春试验机厂）；815A 半自动生化分析仪（上海三科分析仪器有限公司）；电子分析天平（日本安达电子仪器公司）；UV—754 紫外—可见分光光度计（上海第三分析仪器厂）。

2 方法

2.1 提取物的制备

射干药材 50 kg，先用 70%乙醇加热提取，得乙醇提取液，减压浓缩到一定体积，得乙醇提取物，含总黄酮 31.66%。取部分乙醇提取物加水稀释，过 D-101 大孔树脂柱，用 70%乙醇洗脱液，洗脱液浓缩、干燥，得射干总黄酮，含总黄酮 62.39%。另取一部分射干乙醇提取物，用硅胶 G 柱色谱分离，氯仿、甲醇反复洗脱，得质量分数最高的黄酮类单体化合物射干苷，样品质量分数大于 95%。

2.2 动物分组及给药

96 只健康大鼠，随机分成 8 组，每组 12 只。其中 1 组摘除卵巢旁小块脂肪组织，不切除卵巢，作为假手术组，常规抗菌；其余 7 组 ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后，行双侧卵巢切除术，手术后经病理学证实为大鼠卵巢组织，且包膜完整，其中 1 组作为模型组，其余 6 组为给药组。

在手术后 1 周开始 ig 给药，假手术和模型组每天给予 0.5% CMC 溶液；射干总黄酮提取物大、小剂量组每天分别给予 100、20 mg/kg；射干乙醇提取物大、小剂量组分别给予 197、40 mg/kg；射干苷大、小剂量组分别给予 15.30、3.06 mg/kg；给药体积均为 1.0 mL/100 g 体质量，连续 4 个月；饲养室温度 20~26 °C，湿度 50~70%，喂以普通颗粒饲料，自由饮水。每 1~2 周称 1 次体质量，并按新的体质量调整给药体积。

2.3 骨密度和骨矿含量的检测

分别于给药 2 个月和 4 个月时，给大鼠 ip 戊巴比妥钠 35 mg/kg 麻醉后，俯卧于骨密度仪测试板上，扫描后半身，并分析一侧股骨和胫骨的骨矿密

度（BMD）和骨矿含量（BMC）。

2.4 相关指标检测^[6-9]

2.4.1 骨钙含量和钙盐密度测定 分离大鼠股骨，剥净软组织，放入干燥箱内，110 °C 烘 2 h 后分析天平称干质量，放入电炉碳化后，置于马弗炉中 800 °C 灰化 2 h，冷却至室温。取骨灰称质量后加入 6 mol/L 盐酸 10 mL 溶解骨灰，取 5 mL 并以 EDTA 络合滴定法，钙红作指示剂，测定骨钙（Ca）含量，并计算单位体积 Ca 含量（钙盐密度）。

$$\text{Ca 含量} = 2 \times (S - Y) \times T / Z$$

S 为 5 mL 样品消化液所消耗的 EDTA 溶液用量，Y 为 5 mL 空白消化液所消耗的 EDTA 溶液体积，T 为 EDTA 溶液的滴定度；Z 为骨灰质量。

2.4.2 骨磷含量测定 紫外分光光度法测定磷含量，708 nm 为磷的最大吸收波长，钼酸比色法建立标准曲线及直线回归方程，取 1 mL 骨灰盐酸溶解液，加水稀释至 10 mL，测定磷浓度及计算骨磷（P）含量。

$$\text{P 含量} = 10 \times (A - 0.03652) / (0.45072 \times Z)$$

A 为 708 nm 处样品吸光度，Z 为骨灰的质量。

2.4.3 血清钙、磷、血脂水平及 AKP 活性测定 大鼠处死前眼眶取血，离心后取血清。比色法测定血清 Ca、血清 P，酶法测定血脂水平及 AKP 活性。

2.5 统计学方法

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素随机方差检验，并用 Dunnett 法比较各组间测定指标差异的显著性。

3 结果

3.1 对股骨、胫骨和腰椎骨矿密度的影响

与假手术组相比，射干总黄酮大剂量、射干醇提取物大剂组均具有明显提高大鼠腰椎 BMD 水平，小剂量组也有明显增加；射干苷大、小剂量组对腰椎 BMD 有影响，但作用强度弱于射干总黄酮和乙醇提取物；射干总黄酮、射干乙醇提取物明显增加胫骨 BMD 的水平。射干苷大、小剂量组对腰椎 BMD 有一定的作用影响，见表 1、2。

3.2 对股骨、胫骨和腰椎 BMC 的影响

与假手术组相比，给药 2 个月和 4 个月后，射干总黄酮和乙醇提取物可显著提高大鼠股骨、胫骨和腰椎的 BMC 水平，尤其是总黄酮和乙醇提取物大剂量组的作用更明显；射干苷 2 个剂量组对股骨、胫骨和腰椎 BMC 水平的作用则弱于总黄酮和乙醇提取物。见表 3。

表 1 射干不同提取物 2 个月和 4 个月时对股骨和胫骨 BMD 的影响

Table 1 Effects of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on BMD of femur and tibia after two and four months

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	股骨 BMD/(g·cm ⁻²)		胫骨 BMD/(g·cm ⁻²)	
		2 个月	4 个月	2 个月	4 个月
假手术	—	198±22	218±15	176±8	194±14
模型	—	188±13	199±12 ^{##}	169±9 [#]	185±14
射干总黄酮	100	201±12 ^{**}	210±12 ^{**}	201±15 ^{**}	202±13 ^{**}
	20	195±20 ^{**}	205±11 [*]	194±9 [*]	185±9
射干乙醇提取物	197	199±8 ^{**}	208±11 ^{**}	199±11 ^{**}	199±11 ^{**}
	40	193±15 ^{**}	198±13 [*]	195±12 [*]	198±14 ^{**}
射干苷	15.3	189±11	205±12 [*]	179±9 [*]	189±14
	3.06	193±10	203±8	174±5	187±7

与假手术组比较: [#]P<0.05 ^{##}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01, 下表同

[#]P<0.05 ^{##}P<0.01 vs Sham group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group, same as below

表 2 射干不同提取物 2 个月和 4 个月时对腰椎 BMD 的影响

Table 2 Effects of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on BMD of lumbar vertebrae after two and four months

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	腰椎 4 BMD/(g·cm ⁻²)		腰椎 5 BMD/(g·cm ⁻²)		腰椎 6 BMD/(g·cm ⁻²)		腰椎 4+5+6 BMD/(g·cm ⁻²)	
		2 个月	4 个月	2 个月	4 个月	2 个月	4 个月	2 个月	4 个月
假手术	—	199±27	203±20	188±18	205±29	189±16	206±19	192±18	205±20
模型	—	165±16 ^{##}	170±21 ^{##}	159±16 ^{##}	164±20 ^{##}	162±12 ^{##}	172±17 ^{##}	164±12 ^{##}	169±17 ^{##}
总黄酮	100	190±20 ^{**}	181±20 ^{**}	181±12 ^{**}	180±15 ^{**}	174±8 [*]	187±16 ^{**}	181±8.02 ^{**}	182±3.76 ^{**}
	20	169±27	182±18 ^{**}	172±33 [*]	175±18	174±24 [*]	183±15 [*]	171.66±7.51 [*]	180±4.35 [*]
乙醇提取物	197	188±17 ^{**}	179±23	184±18 ^{**}	184±25 ^{**}	173±20 [*]	187±22 ^{**}	181.66±7.76 ^{**}	183±4.04
	40	166±26	182±21	174±18 [*]	164±16	173±15 [*]	172±14	171±4.35 [*]	172±9.01
射干苷	15.3	174±28	177±21 [*]	177±24 [*]	176±14 [*]	170±18 [*]	169±22	168±19	169±14
	3.06	179±31	169±13	162±21	164±15	163±18	170±20	169±17	166±14

表 3 射干不同提取物 2 个月和 4 个月时对股骨、胫骨和腰椎 BMC 的影响

Table 3 Effects of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on BMC of femu, tibia, and lumbar vertebrae after two and four months

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	股骨 BMC/(g·m ⁻¹)		胫骨 BMC/(g·m ⁻¹)	
		2 个月	4 个月	2 个月	4 个月
假手术	—	436±72	473±61	334±65	394±52
模型	—	421±45	446±50	348±42	394±48
射干总黄酮	100	458±49 ^{**}	488±47 ^{**}	364±70 ^{**}	436±64 ^{**}
	20	437±28 [*]	472±35 [*]	351±30 [*]	420±62 [*]
射干乙醇提取物	197	453±38 ^{**}	484±44 ^{**}	367±71 ^{**}	435±60 ^{**}
	40	436±36	470±57	350±32	419±61 [*]
射干苷	15.3	436±34 [*]	461±50	341±29	394±54 [*]
	3.06	426±39	456±41	328±34	384±36

组别	腰椎 4 BMC/(g·m ⁻¹)		腰椎 5 BMC/(g·m ⁻¹)		腰椎 6 BMC/(g·m ⁻¹)	
	2 个月	4 个月	2 个月	4 个月	2 个月	4 个月
假手术	140±28	140±25	129±25	149±37	113±22	133±21
模型	121±20 [#]	119±21 [#]	116±13	115±21 [#]	104±15	106±14 [#]
射干总黄酮	137±25 ^{**}	128±22 ^{**}	130±20 ^{**}	133±27 ^{**}	118±10 [*]	124±24 ^{**}
	116±21	129±21 ^{**}	117±23	127±15 [*]	116±24 [*]	117±13 [*]
射干乙醇提取物	139±20 [*]	127±22 [*]	125±30	125±32	118±29	117±23 [*]
	106±22	126±25	120±20	125±21	119±18	119±21
射干苷	130±29 [*]	127±10 [*]	107±19	119±13	92±12	121±17 [*]
	119±32	118±17	102±21	111±12	96±17	104±13

3.3 对去卵巢大鼠钙、磷含量的影响

与假手术组相比, 给药 4 个月后, 各组大鼠去卵巢后股骨、胫骨及腰椎中的钙 (Ca)、无机磷 (P) 含量、钙/无机磷比值 (Ca/P), 以及对股骨、胫骨和腰椎单位体积钙含量等均无明显影响。见表 4。

3.4 对血清钙、磷、血脂水平及 AKP 活性的影响

与假手术组相比, 给药 4 个月时, 大鼠去卵巢后血清 AKP 活性和钙、无机磷含量及钙/无机磷比

值等均无明显变化。射干总黄酮大剂量组的血清无机磷含量明显提高、钙/磷比值明显降低, 射干乙醇提取物小剂量组、射干苷大、小剂量组的血清钙含量均明显增加。其他各组的各项指标均无明显影响。

大鼠去卵巢后血清总胆固醇 (TC) 水平无明显影响, 但三酰甘油 (TG) 水平明显下降。射干乙醇提取物小剂量组的 TC 水平显著下降, 其他各组动物的血脂水平均无明显影响。见表 5。

表 4 射干不同提取物 4 个月时对股骨、胫骨和腰椎的钙、磷含量及单位体积钙含量的影响

Table 4 Effect of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on calcium and phosphorus of femur, tibia, and lumbar vertebrae after four months

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	总钙/(mmol·L ⁻¹)			磷/(mmol·L ⁻¹)		
		股骨	胫骨	腰椎	股骨	胫骨	腰椎
假手术	—	148.2±13.7	105.1±6.6	99.9±11.3	148.2±13.7	105.1±6.6	43.4±3.5
模型	—	142.8±13.2	103.2±13.8	88.7±8.6 [#]	142.8±13.2	103.2±13.8	40.5±4.6
射干总黄酮	100	146.2±9.2	110.0±9.4	92.4±12.6	146.2±9.2	110.0±9.4	40.6±4.7
	20	144.1±10.7	108.9±6.17	91.5±10.8	144.1±10.7	108.9±6.17	40.5±4.7
射干乙醇 提取物	197	141.4±14.7	110.0±13.8	93.9±13.2	141.4±14.7	110.0±13.8	41.3±5.7
	40	137.6±10.7	99.6±12.0	86.9±10.6	137.6±10.7	99.6±12.0	38.0±4.4
射干苷	15.3	142.8±13.8	112.8±10.8 [*]	91.0±8.1	142.8±13.8	112.8±10.8 [*]	38.8±3.4
	3.06	143.4±8.3	110.1±9.3	88.0±6.4	143.4±8.3	110.1±9.3	37.8±2.9

组别	钙/磷			单位体积钙含量/mmol		
	股骨	胫骨	腰椎	股骨	胫骨	腰椎
假手术	1.86±0.04	2.03±0.09	2.29±0.09	0.279±0.012	0.279±0.015	0.203±0.016
模型	1.87±0.04	2.11±0.19	2.23±0.19	0.251±0.015 ^{###}	0.259±0.017 ^{###}	0.164±0.015 ^{###}
射干总黄酮	1.88±0.06	2.08±0.04	2.27±0.04	0.248±0.014	0.262±0.010	0.169±0.013
	1.91±0.05	1.92±0.11	2.26±0.11	0.252±0.019	0.263±0.016	0.169±0.015
射干乙醇 提取物	1.90±0.05	1.97±0.20	2.27±0.20	0.244±0.012	0.275±0.015 [*]	0.161±0.010
	1.98±0.23	2.12±0.07	2.45±0.07 [*]	0.243±0.001	0.263±0.011	0.158±0.014
射干苷	1.92±0.04 [*]	2.17±0.05	2.34±0.05	0.236±0.017	0.263±0.012	0.164±0.015
	1.95±0.18	2.14±0.08	2.32±0.08	0.259±0.015	0.273±0.013 [*]	0.160±0.012

表 5 射干不同提取物 4 个月对骨代谢相关血清生化指标的影响

Table 5 Effects of different extracts from *Belamcandae Rhizoma* on biochemical serum of bone metabolism after four months

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	AKP/(U·L ⁻¹)	Ca/(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)	Ca/P	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
假手术	—	155±33	2.99±0.34	2.35±0.17	1.28±0.23	2.49±0.35	1.71±0.56
模型	—	168±46	2.86±0.30	2.47±0.42	1.19±0.21	2.67±0.32	1.13±0.43 [#]
射干总黄酮	100	174±56	2.66±0.18	2.88±0.36 [*]	0.94±0.14 [*]	2.71±0.23	0.98±0.28
	20	157±46	2.82±0.27	2.66±0.33	1.08±0.17	2.53±0.54	1.32±0.54
射干乙醇提 取物	197	132±41	3.10±0.39	2.37±0.48	1.35±0.31	2.86±0.39	1.01±0.29
	40	166±58	3.30±0.47 [*]	2.36±0.52	1.55±0.55	2.18±0.49 [*]	0.91±0.36
射干苷	15.3	136±40	3.20±0.24 [*]	2.49±0.51	1.34±0.31	2.98±0.39	1.07±0.59
	3.06	136±39	3.13±0.29 [*]	2.54±0.25	1.25±0.18	2.94±0.37	1.39±0.67

4 讨论

本实验结果表明射干总黄酮提取物和射干醇提取物对雌激素缺乏诱导的大鼠骨质疏松症有一定的保护作用,说明射干总黄酮类成分为其抗骨质疏松作用的活性部位;射干苷作用稍弱,说明了其药效作用不仅仅是某单一黄酮类成分,而且还包含了其他黄酮类成分,且单一黄酮类成分经过纯化后,反而效果降低。射干总黄酮质量分数大于 55%,其含量高,能最大限度的富积总黄酮成分,体现了该提取工艺的相对合理性。通过比较研究发现通过大孔树脂制备的射干总黄酮部位为本课题组优选的活性有效部位。同时,在进行下一步更加系统的药理学试验时,将进行阳性对照药的比较研究。

日本的 Keiko 等^[7]等研究了异黄酮类成分的基因表达方式:鸢尾苷元、美皂异黄酮、5-甲氧基-染料木素、刺芒柄花素可以显著地和人类雌激素素(hER) β 受体结合,鸢尾苷元、5-甲氧基染料木素、刺芒柄花素也可以和植物雌激素 hER- α 受体结合,鸢尾苷元可以诱导 hER- α , β 受体基因转录。与成骨细胞内的雌激素受体结合后,加强成骨细胞的活性,促进骨基质的产生、分泌和骨矿化的过程,可预防骨质疏松的发生。本实验通过制备高含量的射干总黄酮提取物,进一步验证了该方面的疗效,提示射干的黄酮部位可作为潜在的抗骨质疏松药物的开发。

参考文献

- [1] 刘建英,金 丽. 射干化学成分及药理活性研究进展 [J]. 药学服务与研究, 2008, 8(5): 358-361.
- [2] 钟 鸣,关旭俊,黄炳生,等. 中药射干的现代研究进展 [J]. 中药材, 2001, 12(24): 904-907.
- [3] 李和标. 大豆异黄酮对运动去卵巢大鼠骨质疏松的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 623-628.
- [4] 李国信,王光函,姜 鸿,等. 射干提取物在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2052-2053.
- [5] 李国信,姜 鸿,邸子真. 射干抗炎药效物质基础研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 383-387.
- [6] 周延萌,宋立群,马晓茜,等. 红车轴草异黄酮对维甲酸致小鼠骨质疏松的预防作用 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1658-1651.
- [7] 黄海玲,李 海,王金花,等. 雌激素与不同剂量的葛根素联合对去卵巢大鼠骨质疏松的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(33): 5228-5231.
- [8] 王智勇,吕 斌,王 霞. 长期多代饮奶近交 BALB/C 小鼠的骨代谢模型 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(2): 244-247.
- [9] 冯汉林,赵文娟,殷 明,等. 骨新康对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 14-17.
- [10] Kaiko M, Tohru A, Toshiharu H, *et al.* Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(1): 48-52.