

刺老苞根皮总提取物对去势大鼠骨质疏松的影响

王萌萌¹, 佟磊², 张晓娜¹, 张万强³, 裴凌鹏^{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. 北京电子科技职业学院, 北京 100176

3. 中国中医科学院 骨伤科研究所, 北京 100700

摘要: 目的 研究刺老苞 *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* 根皮总提取物对去势雌性大鼠骨质疏松症的影响。方法 75只SD雌性大鼠随机分成对照组、假手术组、模型组、仙灵骨葆胶囊组和刺老苞根皮总提取物组, 每组15只。经去势手术2周后, 仙灵骨葆胶囊组、刺老苞根皮总提取物组ig相应药物悬液(20 mg/kg), 每天1次, 连续12周。观察大鼠给药前后体质量变化; 试剂盒法检测血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、碱性磷酸酶(ALP)水平; 取右侧股骨检测骨密度、骨微量元素和羟脯氨酸(Hyp)水平; 取左侧股骨进行骨力学测定。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清TC、LDL-C水平均显著升高($P < 0.01$), 血清HDL-C、ALP、骨微量元素(钙、磷、镁、锰)、Hyp水平, 骨密度、骨力学指标均显著下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组TC、LDL-C水平均显著降低($P < 0.05$), 血清HDL-C、ALP、骨微量元素(钙、磷、镁、锰)、Hyp水平, 骨密度、骨力学指标均显著升高($P < 0.05$)。结论 刺老苞根皮总提取物有效改善去势雌性大鼠骨质疏松症的发生。

关键词: 刺老苞根皮; 总提取物; 骨质疏松; 去势大鼠; 仙灵骨葆胶囊

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)02-0216-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.012

Effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on osteoporosis in ovariectomized rats

WANG Meng-meng¹, TONG Lei², ZHANG Xiao-na¹, ZHANG Wan-qiang³, PEI Ling-peng¹

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

2. Beijing Polytechnic, Beijing 100176, China

3. China Academy of Chinese Medical Science, Institute of Orthopaedics and Traumatology, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To study the effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on osteoporosis in ovariectomized rats. **Method** SD rats (75 cases) were randomly divided into five groups, including control group, Sham-operation group, model group, Xiangling Gubao group and *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* total extract group. Two weeks after ovariectomized operation, the rats in Xiangling Gubao group and *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* total extract group were fed respectively by 20 mg/kg dosage once daily for 12 weeks. Rats weight changes were observed; The levels of total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and alkaline phosphatase (ALP) were investigated by related reagent kit; The bone mineral density (BMD), bone trace elements, and hydroxyproline (Hyp) of right femur, and bone mechanics of left femur were measured. **Result** Compared with control group, serum TC and LDL-C levels were increased ($P < 0.01$), but serum HDL-C and ALP levels, bone microelement (Ca/P/Mg/Mn) and Hyp contents, BMD and bone mechanics indexes were decreased in model group ($P < 0.01$). However, compared with model group, serum TC and LDL-C levels were decreased ($P < 0.05$), but serum HDL-C and ALP levels, bone microelement (Ca/P/Mg/Mn) and Hyp contents, BMD and bone mechanics indexes were increased in Xiangling Gubao group and *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* total extract group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* total extract may inhibit effectively osteoporosis of ovariectomized rats.

Key words: *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex*; total extract; osteoporosis; ovariectomized rat; Xiangling Gubao capsule

收稿日期: 2016-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173361、81270051、81473451)

作者简介: 王萌萌, 女, 在读博士研究生。

*通信作者 裴凌鹏(1976—), 男, 医学博士, 副研究员, 研究方向为民族药与临床医学。Tel: 13520801809 E-mail: lpei@hotmail.com

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是一种骨质脆性增加的代谢性疾病, 以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 患者易于骨折。一般情况下, 成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收保持动态平衡, 任何破坏这一平衡的因素均可导致骨质疏松的发生。原发性骨质疏松症正是由于这一平衡的破坏, 骨吸收大于骨形成而产生。临床上将原发性骨质疏松症分为 I 型和 II 型。I 型骨质疏松症为高转换型, 即骨形成与骨吸收均增快, 但骨吸收仍大于骨形成, 患者以女性为主, 病因主要与绝经有关^[1]。近年来随着人们对传统医药 (尤其是民族医药) 的深入整理与挖掘, 治疗骨质疏松症的天然药物的研究工作备受关注。刺老苞为五加科木属植物楸木 *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》^[2]。原植物楸木生于山地林缘、林中或路旁灌木丛中, 药材块片状或槽状, 气微香, 嚼之带黏性, 味辛, 性平。归肝、肾经, 功能滋阴健肾, 祛风湿, 壮筋骨, 散瘀血, 消肿毒, 可用于风湿痹痛、跌打损伤、骨折等^[3-4]。基于课题组多年前期临床研究基础上, 本实验制备去势雌性大鼠模型, 研究民族药刺老苞根皮对大鼠绝经后骨质疏松症的影响及其可能机制, 为后续研究开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

双能 X 线骨密度测量仪 (美国 GE 公司); Labconco 冰冻真空干燥仪 (法国乐高公司); 752 分光光度计、AE100 电子天平 (中国伯乐公司); 电热三用水箱、KA-1000 型台式离心机 (中国杭州华亭公司); 全自动生化分析仪 (奥林巴斯公司); 960 型荧光分光光度计、J2-SH 高速冰冻离心机 (日本岛津公司)。

1.2 药物与试剂

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 *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* 根皮。经索氏提取法制备刺老苞根皮总提取物, 流程如下: 1 000 g 刺老苞晒干后研磨, 60 °C 烘干, 过 60 目筛 → 加药材 10 倍量的 70% 乙醇回流提取 4 h → 离心滤过 → 大孔吸附树脂柱分离 → 水洗脱 → 乙醇洗脱 → 减压浓缩 → 冰冻真空干燥, 制成干粉。主要成分为总黄酮、总皂苷, 质量分数分别为 92.0、12.7 mg/kg。

仙灵骨葆胶囊 (贵州同济堂制药有限公司, 批号 140608); 羟脯氨酸 (Hyp)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C)、碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (北京科海生物科技有限公司); 无水乙醇、大孔吸附树脂柱 (北京化学试剂公司)。

1.3 动物

75 只 15 周龄 SD 雌性大鼠, 体质量 (270 ± 20) g, 购自中国医学科学院实验动物养殖中心, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2013-0002。

2 方法

2.1 大鼠去势模型的制备及分组给药

大鼠按体质量随机分为 5 组: 对照组、假手术组、模型组、仙灵骨葆胶囊 (阳性药) 组及刺老苞根皮总提取物组, 每组 15 只。除对照组不做任何处理外, 其余各组动物经 ip 2% 戊巴比妥 (35 mg/kg) 麻醉后, 沿腹正中线剪开皮肤, 分离肌肉、筋膜及腹腔脏层, 暴露腹腔; 除假手术组切除卵巢附近一小块脂肪组织外, 其余各组结扎及剪断双侧卵巢组织; 分层缝合肌肉, 皮肤。术后每天对大鼠进行阴道涂片检查性周期变化, 雌性大鼠未出现排卵现象, 证明模型复制成功。

取刺老苞根皮总提取物干粉、仙灵骨葆胶囊各 20 mg 溶于 5 mL 蒸馏水中, 术后 2 周称大鼠体质量后, 开始 ig 给药, 给药剂量均为 4 mg/mL (经临床人体推荐服用剂量换算并结合预实验拟定), 给药体积 5 mL/kg, 每天 1 次, 连续 12 周。对照组、假手术组及模型组给予同等体积的蒸馏水。

2.2 指标检测

2.2.1 血清生化指标检测 给药结束后, 称体质量, 心脏取血, 4 000 r/min 离心 5 min 分离血清, HDL-C、LDL-C 和 TC 水平按照相关试剂盒说明书测定, ALP 活性用全自动生化仪测定。

2.2.2 骨微量元素与 Hyp 水平检测 取右侧股骨, 除净附着的肌肉和软组织, 应用双能骨密度仪测量骨密度值。研磨股骨后分为 2 份, 1 份灰化 2 h, 骨灰以硝酸溶解后火焰原子吸收分光光度计测量钙、磷、镁、锰的水平; 另 1 份用 3 mL 氯仿-甲醇处理 2 h 后滤过, 用乙醇水溶液和丙酮冲洗 1 次, 烘烤 2 h 后放入 1 mL 12 mol/L 盐酸中高温水解 2 h, 取出后采用氯胺 T 法检测 Hyp 水平。

2.2.3 骨力学检测 主要观测左侧股骨结构力学与骨力学指标, 方法详见参考文献^[5]。

2.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠用药前后体质量变化情况

用药前各组大鼠体质量差异不显著。用药结束后, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组体质量显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对血清生化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C、ALP 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组 TC、LDL-C 水平显著降低, ALP、

HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 对骨微量元素与 Hyp 水平的影响

与对照组比较, 模型组骨钙、磷、镁、锰以及 Hyp 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组钙、磷、镁、锰以及 Hyp 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.4 对去势雌性大鼠骨密度的影响

与对照组比较, 模型组骨密度显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组骨密度显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 4。

3.5 对去势雌性大鼠骨力学的影响

与对照组比较, 模型组大鼠骨结构力学与功能力学指标均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 刺老苞根皮总提取物组与仙灵骨葆胶囊组骨结构力学与功能力学指标均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 5。

表 1 各组大鼠用药前后体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Weigh changes of SD rats before and after administration ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	用药前体质量/g	用药后体质量/g
对照	—	222.11 ± 12.23	318.10 ± 22.14
假手术	—	222.25 ± 12.12	318.38 ± 22.20
模型	—	222.63 ± 12.09	401.01 ± 29.01 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	222.09 ± 12.11	350.18 ± 22.09 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	222.18 ± 12.21	370.15 ± 23.09 [#]

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下同

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group, same as below

表 2 刺老苞根皮总提取物对大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on rat serum biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	ALP/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	111.73 ± 0.11	33.76 ± 1.12	36.80 ± 1.50	102.85 ± 17.14
假手术	—	113.25 ± 0.11	34.50 ± 1.11	35.61 ± 1.48	100.12 ± 16.87
模型	—	149.12 ± 0.10 ^{▲▲}	49.81 ± 1.14 ^{▲▲}	22.99 ± 1.13 ^{▲▲}	58.07 ± 9.15 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	120.09 ± 0.10 [#]	39.78 ± 1.11 [#]	32.88 ± 1.14 [#]	80.90 ± 0.12 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	125.26 ± 0.11 [#]	41.80 ± 1.12 [#]	30.93 ± 1.11 [#]	71.01 ± 0.12 [#]

表 3 刺老苞根皮总提取物对骨钙、磷、镁、锰及 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on contents of calcium, phosphorus, manganese, magnesium, and Hyp in bone ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	钙/(μg·g ⁻¹)	磷/(μg·g ⁻¹)	镁/(μg·g ⁻¹)	锰/(μg·g ⁻¹)	Hyp/(μg·g ⁻¹)
对照	—	798.32 ± 56.17	169.61 ± 17.08	6.13 ± 0.24	5.11 ± 0.19	115.33 ± 11.02
假手术	—	789.80 ± 54.30	163.28 ± 17.01	6.09 ± 0.23	5.08 ± 0.18	110.93 ± 10.76
模型	—	506.18 ± 40.21 ^{▲▲}	103.90 ± 10.17 ^{▲▲}	3.80 ± 0.20 ^{▲▲}	2.87 ± 0.17 ^{▲▲}	75.61 ± 10.21 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	631.80 ± 52.10 [#]	140.73 ± 15.30 [#]	4.60 ± 0.21 [#]	3.90 ± 0.19 [#]	99.59 ± 10.37 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	615.17 ± 50.22 [#]	131.99 ± 14.11 [#]	4.26 ± 0.22 [#]	3.56 ± 0.17 [#]	89.79 ± 10.12 [#]

表4 刺老苞根皮总提取物对大鼠骨密度水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 4 Effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on rat BMD content ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	骨密度/体质量/ (0.01×mg·cm ⁻¹ ·g ⁻¹)
对照	—	70.10±4.15
假手术	—	68.39±4.02
模型	—	55.40±3.70 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	64.29±4.02 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	62.80±4.05 [#]

表5 刺老苞根皮总提取物对大鼠骨力学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 5 Effect of total extract from *Araliae Echinocaulis Radicis et Cortex* on rat structural power parameters and biological parameters indexes ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	结构力学指标			
		弹性挠度/mm	最大挠度/mm	弹性载荷/kg	最大载荷/kg
对照	—	0.40±0.06	0.62±0.08	9.39±0.15	8.97±0.14
假手术	—	0.40±0.04	0.61±0.08	9.31±0.15	8.88±0.13
模型	—	0.32±0.05 ^{▲▲}	0.40±0.06 ^{▲▲}	7.02±0.11 ^{▲▲}	6.99±0.11 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	0.36±0.06 [#]	0.50±0.07 [#]	8.32±0.13 [#]	7.72±0.12 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	0.35±0.06 [#]	0.48±0.07 [#]	8.07±0.13 [#]	7.40±0.12 [#]

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	生物力学指标			
		最大应力/(N·m ⁻¹)	弹性应力/(N·m ⁻¹)	最大应变/mm	弹性应变/mm
对照	—	20.19±1.98	20.05±1.92	0.020±0.003	0.018±0.003
假手术	—	20.14±1.94	20.02±1.90	0.020±0.003	0.018±0.002
模型	—	17.62±1.73 ^{▲▲}	17.03±1.76 ^{▲▲}	0.015±0.003 ^{▲▲}	0.012±0.002 ^{▲▲}
仙灵骨葆胶囊	20	19.11±1.81 [#]	18.84±1.84 [#]	0.017±0.003 [#]	0.015±0.003 [#]
刺老苞根皮总提取物	20	19.00±1.78 [#]	18.32±1.80 [#]	0.017±0.003 [#]	0.014±0.002 [#]

本课题组前期(2010—2012年间)围绕刺老苞根皮总提取物先后做了30例绝经后女性骨质疏松症患者的小样本临床观察,其总有效率为89.50%而且未发现任何不良胃肠反应。基于已往工作,此次试验主要从脂代谢、骨矿物以及骨力学角度进一步分析刺老苞根皮总提取物对去势雌性大鼠骨质疏松的作用。研究结果初步表明,此类提取物一方面可以调控雌性激素分泌降低引起的脂代谢紊乱状况,有效地升高血清中HDL-C水平、降低LDL-C和TC水平,缓解体质量的异常增加。另一方面可以通过增强成骨细胞ALP活性,促进骨形成,提高雌性大鼠股骨矿物质(钙、磷、镁、锰)水平与骨密度值,提升股骨结构力学与功能力学指标,缓解骨质疏松的病变过程,降低骨丢失程度,加强股骨的承载力,减少骨折发生率^[7-8]。尽管与阳性药仙灵骨葆胶囊比较,在上述方面的药效作用稍逊,但因其药物成本、用药安全性以及临床综合疗效方面的优势,仍显现较好的研究开发价值,而其是否具有类雌样

4 讨论

雌激素直接作用于成骨细胞的受体,提高成骨细胞的功能,使骨量增加;也可通过成骨细胞和破骨细胞的雌激素受体来限制骨转换,以维持骨吸收与骨形成的平衡,因此一旦体内雌激素分泌受阻或减少,则可引发骨质疏松的发生。雌性大鼠的卵巢切除后,雌激素水平降低、骨代谢活跃、骨转换增强、骨量丢失,模仿人正常绝经时高转换型骨质疏松症,是经典模型^[6]。

激素作用以及药效机制尚需深入探讨。

参考文献

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [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] 方志先, 赵晖, 赵敬华. 土家族药物志 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007.
- [4] 裴凌鹏, 尹霞, 李莉, 等. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2279-2282.
- [5] 裴凌鹏, 崔箭, 高兆兰, 等. 玉米黄质对D-半乳糖致衰老大鼠骨质的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2008, (5): 56-59.
- [6] 鞠传广. 雌激素对骨重建过程的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 372.
- [7] 李恩, 闫淑云, 谷丽敏, 等. 原发性骨质疏松发病的相关因素 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(2): 1-3.
- [8] 刘忠厚. 骨骼生长衰老规律和原发性骨质疏松症预防的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 1-7.