

· 药理实验与临床观察 ·

葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨矿密度和骨强度的影响

郑高利¹, 张信岳¹, 方晓林², 彭小英¹, 龚维桂¹, 郑筱祥^{3*}(1. 浙江省医学科学院药物研究所, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江省老年医学研究所, 浙江 杭州 310013;
3. 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 浙江 杭州 310027)

摘要: 目的 研究葛根总异黄酮 (TIP) 对雌激素缺乏引起的骨质疏松症的防治作用。方法 10月龄 SD大鼠, 手术切除双侧卵巢后 7d, 每天 ig TIP 100和 20 mg/kg, 并设假手术组 (Sham)、模型对照组 (OVX) 和尼尔雌醇阳性组 (E₃)。在给药 4和 7个月时, 测定大鼠全身骨矿总量 (BMC) 和骨矿密度 (BMD) 及骨生物力学强度等。结果 (1) 和 OVX 组相比, TIP 大剂量组在给药 4个月时 BMC 和 BMD 分别提高 14.6% 和 12.1%, 7个月时分别提高 6.8% 和 14.2%; 小剂量组 4个月时分别提高 7.8% 和 6.9%, 7个月时分别提高 8.6% 和 14.9%。(2) TIP 大、小剂量组股骨相对体积质量分别提高 3.8% 和 3.4%; 胫骨相对体积质量分别提高 6.8% 和 6.3%; 股骨 Ca 盐密度均提高 15% 以上。(3) TIP 大、小剂量组股骨最大负荷分别提高 16.1% 和 9.1%; 结构强度分别提高 19.4% 和 12.5%。(4) TIP 使大鼠子宫重量明显增加。结论 TIP 对去卵巢引起的大鼠骨质疏松症具有明显的防治作用, 这种作用可能和它的弱雌激素样活性有关。

关键词: 葛根; 异黄酮; 骨质疏松症; 雌激素样作用; 骨矿密度

中图分类号: 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)05-0422-04

Effects of total isoflavones of *Pueraria* DC. on bone mineral density and bone strength in ovariectomized rats

ZHENG Gao-li¹, ZHANG Xin-yue¹, FANG Xiao-lin², PENG Xiao-ying¹,
GONG Wei-gui¹, ZHENG Xiao-xiang³

(1. Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou Zhejiang 310013, China; 2. Zhejiang Geriatric Institute, Hangzhou Zhejiang 310013, China; 3. College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China)

Abstract **Object** To observe the protective effect of total isoflavones of *pueraria* DC. (TIP) on osteoporosis induced by estrogen-deficient rat. **Methods** 42 10-month old female SD rats were bilaterally ovariectomized and 10 animals were made sham-operation (Sham) under anesthesia. After 7 d, the ovariectomized rats were divided into 4 groups: untreated control (OVX) group ($n=12$); 2 treated groups ($n=10$ each), one with 100 mg/kg TIP ig and the other with 20 mg/kg TIP ig, and a nylestrol group (E₃) ($n=10$). The total body bone mineral content (BMC), and bone mineral density (BMD) and bone biodynamics were detected at 4th and 7th month. **Results** 1. Compared with OVX group, BMC and BMD in TIP 100 mg/kg group were increased by 14.6% and 12.1% at 4th month, by 6.8% and 14.2% at 7th month, while in TIP 20 mg/kg group by 7.8% and 6.9% at 4th month, by 8.6% and 14.9% at 7th month. 2. The densities of femur in TIP 100 and 20 mg/kg groups were respectively increased by 3.8% and 3.4%, while those of tibia by 6.8% and 6.3% than that of OVX control group. The Ca contents were increased by more than 15% in the TIP treated groups. 3. The maximum load and structural strength of femur were increased by 16.1% and 19.4% in TIP 100 mg/kg group and 9.1% and 12.5% in TIP 20 mg/kg group than OVX control group. These parameters in tibia were also improved. 4. Uterine weights both in TIP 100 and 20 mg/kg groups were almost increased by one-fold than OVX group. **Conclusion** TIP can protect osteoporosis induced by ovariectomized rats and these effect may be attributable to its weak estrogen-like action.

Key words *Pueraria lobata* L.; isoflavone; osteoporosis; estrogen-like action; bone mineral density

* 收稿日期: 2000-12-04

基金项目: 浙江省自然科学基金 No. 399037

作者简介: 郑高利 (1963-), 男, 浙江人。1987年毕业于原上海医科大学药学院, 1997年获原浙江医科大学医学硕士学位, 现为浙江省医学科学院药物研究所副研究员, 并在浙江大学生物医学工程与仪器科学学院攻读博士学位 (在职)。主要从事骨代谢相关的药理学研究和新药开发。Tel (0571) 8076765

(BMD)

绝经后骨质疏松症(OP)可能和遗传、饮食习惯、户外活动减少及内分泌改变等有关,但最根本的原因是雌激素水平下降^[1],临床上也以雌激素替代疗法(ERT)的疗效最肯定,但由于ERT有增加生殖系统肿瘤和血栓形成等危险而难以被广泛接受,即使和孕激素合用也不能完全消除这种危险^[2]。近年研究发现一些植物雌激素有着和天然雌激素相似的抗OP作用,但没有肿瘤和血栓之虞,其中主要的食物异黄酮——大豆异黄酮在防治OP上已积累了大量资料,得到了肯定的结果^[3~5]。但大豆中异黄酮含量甚微(0.1%~0.3%),而中药葛根总异黄酮含量可达到8%以上,是大豆的几十甚至上百倍^[6],提取和纯化十分方便,但它对OP的防治作用迄今未见任何报道。本研究以去卵巢大鼠模拟人绝经后OP,观察葛根总异黄酮(TIP)对雌激素缺乏引起OP的防治作用。

1 材料

1.1 葛根异黄酮(TIP):野葛,购自浙江省药材公司,85%乙醇冷浸提取,大孔树脂纯化,紫外分光光度法测定含总异黄酮630 mg/g干重。使用时以0.5%CMC配成10和2 mg/mL(以总异黄酮计)的混悬液。

1.2 尼尔雌醇(E₃):片剂,北京四环制药厂生产,批号:960528,在碾钵中碾细后以0.5%CMC溶液配制成0.05 mg/mL的混悬液。

1.3 动物:SD大鼠,雌性,10月龄,体重320~380 g,由浙江省实验动物中心提供。动物饲养合格证:浙实验动物准字(96)002

1.4 饲料:标准大鼠颗粒饲料,含蛋白质20%,含钙0.6%,由浙江省实验动物中心提供

1.5 双能骨密度仪(DEXA):美国LUNAR公司生产,型号:EXPERT-XL

1.6 电子万能试验机:型号CSS-44100,精度1 N,长春试验机厂生产。

2 实验方法

2.1 分组及给药:52只大鼠,其中42只ip 40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉后,按常规方法切除双侧卵巢,余10只大鼠做相同的手术操作,但不切除卵巢,作为假手术组(Sham)。将切除卵巢的大鼠分为4组,在手术后1周开始ig给药,Sham和OVX组每天给予0.5%CMC溶液;E₃组给予尼尔雌醇0.5 mg/kg,每周2次(周一和周四),TIP大、小剂量组分别

每天ig TIP 100和20 mg/kg,给药体积均为1.0 mL/100 g体重,连续7个月。饲养室温度20℃~26℃,湿度50%~70%,喂以普通饲料,自由饮水。每周称一次体重并按新体重调整给药体积

2.2 骨密度测定:于给药4和7个月时,大鼠35 mg/kg戊巴比妥钠ip麻醉后,在DEXA上以前臂骨密度测量软件测定大鼠全身骨矿含量(BMC)和全身骨矿密度(BMD)。仪器参数:134 kV,1.0 mA,扫描长度26 cm,宽度14.4 cm

2.3 股骨相对体积质量测定:最后一次给药1 d后,处死大鼠,分离一侧股骨和胫骨,剔尽附着的肌肉和结缔组织,于电子天平上称湿重后,在自制的排水法体积测定装置上测定其体积,计算其湿相对体积质量

2.4 骨生物力学性能测定:采用电子万能试验机做股骨和胫骨的三点弯曲试验,仪器参数:加载速度6 mm/min,最大负荷200 N,跨距20 mm,描记负荷-变形曲线,计算最大负荷及结构强度(引起1 mm变形需要的负荷,相当于曲线上的斜率)

2.5 股骨灰相对体积质量:测定力学指标后,收集残断的股骨,马弗炉灰化后称灰重,灰重和体积之比即股骨灰相对体积质量

2.6 股骨钙含量和钙盐密度测定:将骨灰溶解在40 mL(6 mol/L)盐酸中,并以EDTA络合滴定法,钙红作指示剂,测定钙含量,并计算出单位体积Ca含量(钙盐密度)。

2.7 子宫重量系数测定:解剖取出子宫,轻挤出子宫腔内的液体,于电子天平上称重,它和体重之比即为子宫重量系数。

2.8 统计方法:所有计量结果均表示为 $\bar{x} \pm s$,并进行组间 t 检验。

3 实验结果

3.1 TIP对去卵巢大鼠BMC和BMD的影响:大鼠在切除卵巢后4和7个月全身BMC和BMD显著降低,尤以BMD为甚。TIP 100和20 mg/kg连续ig 4和7个月,显著提高BMC和BMD。4个月时,TIP 100 mg/kg组BMC和BMD分别提高14.6%和12.1%,TIP 20 mg/kg组分别提高7.8%和6.9%;在7个月时,TIP 100 mg/kg组分别提高6.8%和14.2%,TIP 20 mg/kg组分别提高8.6%和14.9%。而E₃组BMD在4和7个月时均显著提高,BMC仅在4个月时显著提高,但在7个月时没

有明显改善(表 1)

3. 2 TIP对大鼠股骨相对体积质量及钙盐密度的影响

表 1 TIP对去卵巢大鼠 BMC和 BMD的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	4个月		7个月	
			BM C(g)	BMD(g /cm ²)	BM C(g)	BMD(g /cm ²)
Sham	-	10	5. 32± 0. 51	0. 278 2± 0. 014 9	5. 68± 0. 45	0. 281 6± 0. 017 6
OVX	-	12	4. 90± 0. 29 ^a	0. 249 5± 0. 016 8 ^{a #}	5. 37± 0. 24	0. 256 9± 0. 008 8 ^{a #}
E ₃	1. 0	10	5. 32± 0. 40 ^a	0. 270 0± 0. 022 1 ^a	5. 21± 0. 37	0. 269 9± 0. 016 8 ^a
TIP	100	10	5. 62± 0. 77	0. 279 7± 0. 026 7 ^{a *}	5. 73± 0. 52 ^a	0. 293 1± 0. 016 4 ^{a *}
	20	10	5. 28± 0. 59	0. 266 7± 0. 018 3 ^a	5. 83± 0. 43 ^{a *}	0. 295 4± 0. 015 6 ^{a *}

与 OVX组比较: * P<0. 05 ** P<0. 01; 与 Sham组比较: # P<0. 05 ## P<0. 01

影响: 和 Sham组相比,去卵巢后大鼠股骨相对体积质量降低了 4. 49%,而钙元素含量降低更多(- 11. 3%)。TIP大、小剂量组使股骨相对体积质量分别增加 3. 8%和 3. 4%,骨灰相对体积质量分别增加 11. 1%和 7. 8%。同时,股骨钙盐密度得到完全恢复,甚至比 Sham组还高。E₃组有类似作用,但增加的幅度比 TIP大剂量组略小(表 2)。

3. 3 TIP对去卵巢大鼠股骨和胫骨生物力学性能的影响: 切除卵巢 7个月后,大鼠股骨的生物力学性能显著下降,股骨的最大负荷和结构强度分别下降了 15. 0%和 17. 3%,胫骨的最大负荷也下降了 13. 5%。TIP显著改善骨生物力学指标,大剂量组股骨最大负荷与强度分别提高 16. 1%和 19. 4%,小剂

量组分别提高 9. 1%和 12. 5%。胫骨的力学指标也得到恢复,结构强度甚至超过 Sham组。E₃组在最大负荷没有得到改善,但结构强度明显提高(表 3)。

表 2 TIP对去卵巢大鼠股骨、骨灰和钙盐相对体积质量的影响 (mg/mm³)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	相对体积质量		
			股骨	骨灰	钙盐
Sham	-	10	1 560± 41	720± 43	256± 16
OVX	-	12	1 490± 32 ^{a #}	655± 46 ^{a #}	227± 14 ^{a #}
E ₃	1. 0	10	1 543± 26 ^{a *}	686± 46	259± 15 ^{a *}
TIP	100	10	1 547± 57 ^{a *}	728± 50	261± 23 ^{a *}
	20	10	1 541± 35 ^{a *}	706± 36	264± 10 ^{a *}

和 OVX组比较: * P<0. 05 ** P<0. 01

和 Sham组比较: # P<0. 05 ## P<0. 01

表 3 TIP对去卵巢大鼠股骨和胫骨生物力学性能的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	股骨最大负荷 (N)	股骨结构强度 (N/mm)	胫骨最大负荷 (N)	胫骨结构强度 (N/mm)
Sham	-	10	112. 9± 13. 3	300± 24	76. 5± 3. 8	118. 1± 26. 6
OVX	-	12	95. 9± 10. 7 ^{a #}	248± 15 ^{a #}	66. 2± 10. 3 ^a	107. 9± 22. 4
E ₃	1. 0	10	98. 9± 18. 1	284± 26 ^{a *}	66. 1± 19. 4	123. 8± 25. 3
TIP	100	10	111. 3± 14. 3 ^{a *}	296± 28 ^{a *}	74. 8± 14. 7	134. 0± 28. 0
	20	10	104. 6± 11. 3 ^a	279± 25 ^{a *}	71. 7± 11. 9	134. 4± 28. 3 ^{a *}

与 OVX组比较: * P<0. 05 ** P<0. 01; 与 Sham组比较: # P<0. 05 ## P<0. 01

3. 4 TIP对大鼠体重和子宫重量的影响: TIP大剂量组和雌激素一样引起大鼠体重明显下降,小剂量组不影响体重。切除卵巢后大鼠子宫明显萎缩,重量显著减轻,仅为 Sham组的 1/3左右。E₃组则能使子

宫重量完全恢复至 Sham组水平。TIP也能显著增加子宫重量,大、小剂量组使子宫重量系数均提高 1 倍左右,但比 E₃组低得多(表 4)。

4 讨论

表 4 TIP对去卵巢大鼠体重和子宫重量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	实验开始体重 (g)	实验结束体重 (g)	子宫重量 (mg)	子宫重量系数 (mg/g)
Sham	-	10	345± 28	405± 46	566± 129	1. 42± 0. 34
OVX	-	12	347± 29	413± 41	176± 40 ^{a #}	0. 42± 0. 08 ^{a #}
E ₃	1. 0	10	347± 32	349± 27 ^{a *}	487± 168	1. 40± 0. 47 ^{a *}
TIP	100	10	344± 38	365± 50	293± 67 ^{a *}	0. 82± 0. 24 ^{a *}
	20	10	348± 47	409± 50	310± 170 ^{a *}	0. 78± 0. 47

与 OVX组比较: * P<0. 05 ** P<0. 01; 与 Sham组比较: # P<0. 05 ## P<0. 01

传统中医认为葛根属解表药,功能解肌退热、生津止渴、升阳止泻等。其主要有效成分异黄酮具有活血化瘀作用,能扩张血管、抑制血小板聚集和降低血

压等^[7,8]。TIP包括葛根素、大豆苷、金雀异黄素、拟雌内酯(coumestrol)和芒柄花黄素等,又以前二者为主^[9]。文献报道大豆苷或苷元具有弱的雌激素样

作用,我们的研究也表明葛根素能增加幼年和去卵巢小鼠子宫重量,表现一定的雌激素样活性(另文报道)

许多具雌激素样活性的异黄酮在体内和体外均能改善骨质代谢。口服大豆苷和金雀异黄素能增加去卵巢大鼠股骨 BMD 抗压强度、灰重和钙、磷含量;减少尿钙、磷排泄^[3]。大豆苷元在体外能增强成骨样细胞碱性磷酸酶活力^[10]。金雀异黄素在体外能抑制破骨细胞功能^[11];使大鼠骨骺组织的碱性磷酸酶活性、DNA 和钙含量增加,表明能增加成骨细胞的增殖和功能,促进矿盐沉积^[12]。

本研究所用剂量的 TIP 对子宫的刺激作用比 E₃ 弱得多。E₃ 组大鼠有 3 只乳腺增生明显,但 TIP 组未见任何形式的乳腺增生现象。但它对骨代谢的保护作用比 E₃ 组强许多,其原因可能是:(1) TIP 有明显的活血化瘀作用。OP 在中医属骨痿,血瘀是发病原因之一,研究发现活血化瘀方治疗有部分疗效^[13];(2) TIP 对雌激素受体(ER)可能有一定选择性作用,如和 1 β E₂ 相比,拟雌内酯、金雀异黄素和大豆苷元与 ER β 的亲合力分别是 ER α (主要存在于子宫和乳腺等)的 7, 22 和 5 倍^[14],文献报道在大鼠骨骼^[15]和人成骨样细胞^[16]中 ER β 占多数。尚不清楚葛根素是否也有类似的选择性作用。

本研究提示雌激素样作用可能是 TIP 防治 OP 的主要作用机制,但其确切机制还不清楚,如能否促进 OVX 大鼠胃肠对钙、磷的吸收,是通过抑制骨吸收还是增加骨形成,对骨代谢相关因子如 IL-6 和降钙素的分泌有无影响等还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵燕玲,朱传荣,丁桂芝,等.原发性骨质疏松症的发病机理[J].中国骨质疏松症杂志,1998,4(4): 73-77.

- [2] Beresford S A A, Weiss N S, Viogt L F, *et al.* Risk of endometrial cancer in relation to use of estrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women [J]. Lancet, 1997, 349: 458-461.
- [3] Ishida H, Hesugi T, Hirai K, *et al.* Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistein on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(1): 62-66.
- [4] Gallagher J C. The effect of soy isoflavone intake on bone metabolism in postmenopausal women. The abstract of the second International symposium on the role of soy in preventing and treating chronic diseases [M]. Brussels Belgium, 1996.
- [5] 李芳芳,李恩,佟晓旭,等.补肾、健脾和活血化瘀方药对去卵巢大鼠骨质疏松症的比较性研究[J].中国骨质疏松症杂志,1998,4(1): 5-9.
- [6] 郭建平,孙其荣,周全,等.葛根总黄酮不同提取工艺探讨[J].中草药,1995,26(10): 522-523.
- [7] 宋雪鹏,陈平平,柴象枢.葛根素对自发性高血压大鼠的降压作用及对血浆肾素活性的影响[J].中国药理学报,1988,(1): 55-58.
- [8] 王丽华,秦川秋,于田,等.葛根治疗冠心病高粘、高凝血症[J].山东医药,1990,30(4): 5-6.
- [9] Jun-*ei* K, Jun-*ichi* F, Jun-*ko* B, *et al.* Studies on the constituents of *Pueraria lobata* III: isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stem [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35 (12): 4846-4850.
- [10] Anderson J, Ohue T, Daenzer M, *et al.* Effects of Estrogens, phytoestrogens and antiestrogens in ROS and ROS-SMER cell [J]. Bone, 1998, 22(3): S2.
- [11] Yamaguchi M and Ying Huagao. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55 (1): 71-76.
- [12] Yamaguchi M, Ying Huagao. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. [J]. Mol-Cell-Biochem, 1998, 178 (1-2): 377-382.
- [13] 魏之玉,张洪,翟青.原发性骨质疏松症的中医研究近况[J].中国骨质疏松症杂志,1997,3(1): 83-85.
- [14] Kuiper G G J M, Lemmen J G, Carlsson B, *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta [J]. Endocrinology, 1998, 139 (10): 4252-4263.
- [15] Yoshiko O, Chisato M, Hiroaki O, *et al.* Expression of estrogen receptor β in rat bone [J]. Endocrinology, 1997, 138 (10): 4509-4512.
- [16] Toesca A, Pagnotta A, Specchia N, *et al.* Evidence of type II estrogen receptor in human osteoblast-like cells [J]. Cell-Biol-Int, 2000, 24 (50): 303-309.

九江专修学院本科、专科及中专招生

本院是国家教育部备案的高等教育学历文凭考试院校,环境幽雅,设施齐全,师资雄厚,常年面向社会招收应往届初、高中毕业生及在职人员,年龄、地区不限。层次分本科、大专、中专及初中起点的大专预科班。学习形式分两种,业余函授和全日制住校脱产学习。

1. 学院开设医院、理工、文科等 30 多个专业,专业设置:临床医学、中西医结合、中医、针灸、口腔、药学、护理、医影像、医检验、计算机应用及管理、经管、法律、英语、公文文秘、市场营销、会计、旅游、装潢设计、工民建、服装、电子、国贸、金融、行管、机电、广告、小学教育、中文、教育管理、幼师、工商管理、新闻等。

2. 教学、发证及学费:①函授生在职自学,考试成绩合格,发给省教委验印,国家承认学历的本科、大专、中专毕业证书②另类函授生在职自学,考核合格学院发加盖钢印的本科、大专学业毕业证书,可申请提前毕业,学院建立学籍档案,可向有关人事部门寄发。本科学费 800 元、专科 700 元,免试入学随报随读③全日制住校生免试入学,考试成绩合格发国家承认学历的本科、专科、中专毕业证,并推荐安置就业,可签订就业保障协议及办理农转非户口。秋季班 9 月上旬开学,春季班 3 月上旬开学,可随时接收插班生,每年学费 3 000 元。

3. 报名方法及地址:邮汇报名费 6 元,即寄报名登记表、详细招生简章。汇款时请用正楷写清详细地址、邮编,并在汇单上写明学习专业,不必另外再来信。

汇款及来函请寄:江西九江市老马渡 88 号付 A 48 号九江学院招办孙武平老师收 邮编: 332000 咨询电话: 0792-8130039 手机: 013507066206 传真: 0792-8130269 此广告长年有效,欢迎来校参观考察

另:本院欲在全国各地设招生代办点,待遇优,也接洽有关人员及单位搞联合办学,有意者来函来电洽谈。

广告审批文号:赣教社广字[2001]第 023 号 许可证号:赣教社证字(98)036 号