

相关的酶,如鸟氨酸脱羧酶(ODC)、PKC、环氧合酶、脂氧化酶来实现的,这预示姜黄素这一多方面全方位的抗肿瘤药物具有广阔的发展前景。

References:

- [1] Menon L G, Kuttan R, Kuttan G, et al. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds [J]. *Cancer Lett*, 1995, 55(1-2): 221-225.
- [2] Shen X M, Huang W, Huang J Q. Effects of curcumin on biological behaviors of a high metastatic human lung cancer subline [J]. *J Guangdong Med Coll* (广东医学院学报), 2002, 19(1): 1-3.
- [3] Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, et al. Potential anti-cancer activity of turmeric (*Curcuma longa*) [J]. *Cancer Lett*, 1985, 29(2): 197-202.
- [4] Yuan S J, Han R. The chemoprophylaxis function of curcumin against cancer [J]. *Foreign Med Sci: Cancer Sect* (国外医学:肿瘤学分册), 1997, 24(5): 264-268.
- [5] Lin J K, Pan M H, Lin-shiau S Y. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin [J]. *Biofactors*, 2000, 13(1-4): 153-158.
- [6] Rashod H, Ling Q, Stwen J S. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits all proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway [J]. *Lab Med*, 1997, 130(6): 576-584.
- [7] Korutla L, Cheung J Y, Mendelsohn J, et al. Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin [J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(8): 1741-1745.
- [8] Khafif A, Schantz S P, Chou T C, et al. Quantitation of chemopreventive synergism between epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(3): 419-424.
- [9] Zhang Y J, Xia T, Zhao J B. Effects of matrine on the differentiation of SMMC-7721 cell line [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 1998, 19(3): 340-343.
- [10] Lin J K, Shi C A. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells [J]. *Carcinogenesis*, 1994, 15(8): 1717-1721.

淫羊藿提取物对去卵巢大鼠骨转换率增强的抑制作用

解芳^{1,3},张岩^{1,3},吴春福¹,姚新生²,黄文秀^{3,4}

- (1. 沈阳药科大学药学院药理学系, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院天然药物化学系, 辽宁 沈阳 110016; 3. 国家中药与分子药理重点实验室, 广东 深圳 518057; 4. 香港理工大学应用生物和化学科技学系, 香港 九龙)

摘要:目的 研究淫羊藿提取物对去卵巢大鼠骨转换的影响。方法 取3月龄SD大鼠手术切除双侧卵巢,1个月后ig给予阳性药17 β -雌二醇(2 mg/kg)以及淫羊藿提取物混悬液(110 mg/kg),连续给药3个月。采用全自动生化分析仪测定血清中钙(s-Ca)、磷(s-P)的量和碱性磷酸酶(ALP)的活性及尿中钙(u-Ca)、磷(u-P)和肌酐(Cr)的量。利用ELISA试剂盒测定尿脱氧吡啶酚(DPD)的量。取胫骨近端制成不脱钙骨切片进行骨组织形态计量学分析。结果 与假手术组相比,去卵巢大鼠s-Ca、s-P没有变化,ALP活性增强,u-Ca排出显著升高,尿中DPD与Cr的比值(DPD/Cr)显著增加,子宫萎缩。骨小梁面积百分比降低,骨小梁间隙增加。ig给予雌二醇或淫羊藿提取物3个月,血清ALP活性降低,u-Ca排出量减少,尿中DPD/Cr降低,骨小梁增加,且骨小梁间隙减小。雌二醇组大鼠子宫增生,淫羊藿组大鼠子宫与模型组相比没有变化。结论 淫羊藿提取物能够显著抑制由于雌激素缺乏引发的骨转换增强,调整骨形成和骨吸收的关系,对遏制去卵巢造成的骨质疏松有一定的作用,且长期服用对子宫没有刺激作用。

关键词:淫羊藿;骨质疏松;卵巢切除术

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1667-04

Inhibitory effect of *Herba Epimedii* extract on bone turn-over of ovariectomized rats

XIE Fang^{1,3}, ZHANG Yan^{1,3}, WU Chun-fu¹, YAO Xin-sheng², WONG Man-sau^{3,4}

- (1. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Department of Natural Products Chemistry, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. State Key Laboratory of Chinese Medicine and Molecular Pharmacology, Shenzhen 518057, China; 4. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR)

Abstract: Objective To investigate the effect of *Herba Epimedii* extract on bone turn-over in ovariectomized rats. **Methods** Three-month old female SD rats were ovariectomized and Sham-operated

收稿日期:2005-03-15

基金项目:香港特别行政区大学教育资助委员会资助(AOE/P-10/01)

作者简介:解芳(1977-),女,山东省德州市人,沈阳药科大学药学院药理专业在读博士,主要从事抗骨质疏松药物的研究,包括体内整体实验以及在分子水平探讨药物作用机制。

Tel: (0755) 26737176 Fax: (0755) 26972852 E-mail: jiefangzhi@yahoo.com

respectively. One month after ovariectomy (OVX), the rats were given *Herba Epimedii* extract (110 mg/kg) and 17β -estrogen (2 mg/kg) by ig for three months continuously. Serum contents of Ca (s-Ca), P (s-P), and ALP as well as urine contents of Ca (u-Ca), P (u-P), and creatinine (Cr) were detected. Urine DPD/Cr was analyzed by ELISA kit. The proximal tibia was processed undecalcified sections of 5 μ m for histomorphometric analysis. **Results** There was no change among all groups in the levels of s-Ca, s-P, and u-P. Serum ALP activity significantly increased in OVX rats with metratrophia compared with Sham group, as well as u-Ca and DPD/Cr. OVX group had lower trabecular bone mass with decreased area percentage of trabecular bone mass and increased suturae of trabecular bone mass. Both *Herba Epimedii* extract and 17β -estrogen treatment could make serum ALP activity inhibit, u-Ca and DPD/Cr reduce, trabecular bone mass increase, and suturae of trabecular bone mass constrict in tibia widen. Hysterauxesis was found in 17β -estrogen group, while no change was observed in *Herba Epimedii* extract group compared with model group. **Conclusion** *Herba Epimedii* extract could inhibit the high rate of bone turn-over induced by OVX in rats, without substantial effects on the uterus.

Key words: *Herba Epimedii*; osteoporosis; ovariectomy (OVX)

淫羊藿是很常用的一味补肾中药^[1],用于治疗多种疾病,包括骨质疏松^[2],是治疗骨质疏松的中药复方中使用频率最高的中药之一。研究表明,其可防止去卵巢致骨质疏松大鼠^[3]和老龄骨质疏松大鼠^[4]的骨量丢失。临床实验还证明淫羊藿可以防止绝经后妇女的骨量丢失并提高骨钙素和雌激素水平^[1,5]。本实验采用去卵巢造成大鼠骨质疏松模型,研究淫羊藿提取物对去卵巢骨质疏松大鼠骨转换的影响,为淫羊藿防治骨质疏松提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物:3月龄SD大鼠35只,雌性,体重190~230g,购自广州中医药大学实验动物中心。

1.2 淫羊藿提取物:取小檗科植物箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 的干燥根茎,切成薄片状,5倍体积水加热提取3次,合并提取液,浓缩液经喷雾干燥得到褐色粉末,提取率为10%。按照《中国药典》(2000年版)所载紫外分光光度法检测提取物中含淫羊藿苷(9.6±0.3)%。

1.3 仪器:美国 Abbott Laboratories 公司 ALCY-ON®300i 型全自动生化仪,美国 Bio-Rad550 型酶标仪,意大利 TECNIPLAST 公司大鼠代谢笼,日本产全能 Olympus AH-2 型光学显微镜。

1.4 药品与试剂: 17β -雌二醇, Sigma 公司;钙、磷试剂盒,肌酐试剂盒,碱性磷酸酶检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);脱氧吡啶酚 ELISA 试剂盒,美国 Quidel Corporation;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 分组:健康3月龄雌性SD大鼠35只,随机分

为4组:假手术组(8只)、造模组(8只)、淫羊藿组(9只)、雌二醇组(10只)。

2.2 造模:将动物乙醚麻醉,腰背部两侧剪毛,75%乙醇消毒,在无菌条件下进行手术,假手术组大鼠背部切口,找到卵巢后,只切除少量脂肪组织后缝合;其他各组均从背侧切口摘除双侧卵巢后,缝合伤口,最后涂以红霉素软膏抗感染。

2.3 给药:手术一个月后开始给药。根据淫羊藿在临床上成人每日10g的用量,按照大鼠与人体表面积比率以及药物的提取率计算,最终确定淫羊藿提取物的给药剂量。淫羊藿组大鼠 ig 给予 110 mg/kg 淫羊藿总提取物混悬液,雌二醇组 ig 给予 2 mg/kg 雌二醇混悬液,假手术和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.4 动物饲养:所有动物在同一条件下(室温22~25℃),每笼4~5只大鼠自由饮水,按照假手术组大鼠进食量控制其他3组的摄食,记录每周体重变化,持续给药90d。

2.5 检测方法

2.5.1 尿样的收集与检测:实验结束前1d,用大鼠代谢笼收集大鼠24h尿液,记录尿量。用ELISA法测定尿中脱氧吡啶酚(DPD)的量,用全自动生化分析仪测定尿中钙(u-Ca)、磷(u-P)和肌酐(Cr)的量。

2.5.2 血样的收集与分析:大鼠用乙醚麻醉后,腹主动脉取血,离心,分离血清,用自动生化分析仪测定血清中钙(s-Ca)、磷(s-P)的量和碱性磷酸酶(ALP)的活性。

2.5.3 子宫:取血后,取出大鼠的子宫,迅速称质量,计算子宫脏器系数。

2.5.4 骨组织形态计量学检测:取左侧胫骨,剔除

肌肉与软组织后,取胫骨上段沿胫骨粗隆行额状面切开暴露骨髓腔,置于磷酸-福尔马林缓冲液中固定,乙醇逐级脱水,用甲基丙烯酸甲酯进行不脱钙骨包埋。组织块用超薄切片机切成 5 μm 的骨片,甲苯胺兰染色,透明后封片。用日本产全能 Olympus AH-2 型光学显微镜,德国 Leica QW 550 分析软件,测量距髓线下 1 mm 处至远端 4 mm 处骨组织各参数,所测算参数的含义和计算公式见文献[6]。

2.6 统计方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,假手术组和模型组间比较采用两侧 t 检验,手术各组间比较采用 One-way ANOVA 以及 LSD 检验,全部资料用

SPSS10.0 软件处理。

3 结果

3.1 对去卵巢大鼠体重的影响:见表 1。去卵巢后大鼠体重显著增加,而给予雌二醇 2 周后,增加的体重开始下降,最终与假手术组持平。而给予淫羊藿总提取物 (110 mg/kg) 并未影响去卵巢造成的大鼠体重增加。

3.2 对去卵巢大鼠子宫的影响:见表 1。与假手术组比较,模型组大鼠子宫明显萎缩 ($P < 0.01$),与模型组相比,雌二醇组大鼠子宫质量显著增加 ($P < 0.01$),而淫羊藿组无明显区别。

表 1 淫羊藿提取物对去卵巢大鼠体重及子宫的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *Herba Epimedii* extract on body weight and uterus of OVX rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	体重/g			子宫脏器系数/ (mg · g ⁻¹)
			手术前	术后 1 个月	术后 3 个月	
假手术	—	8	217 ± 3	261 ± 7	301 ± 11	1.87 ± 0.13
模型	—	8	226 ± 2	285 ± 4**	333 ± 8**	0.32 ± 0.01**
雌二醇	2	10	227 ± 4	290 ± 7**	295 ± 8**	1.18 ± 0.05**
淫羊藿提取物	110	9	229 ± 5	282 ± 5**	342 ± 11**	0.31 ± 0.01**

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; ** $P < 0.01$ vs model group

3.3 对去卵巢后大鼠 s-Ca、s-P、u-Ca 和 u-P 的影响:见表 2。各组去卵巢大鼠 s-Ca、s-P、u-P 的量差异不显著 ($P > 0.05$);与假手术组比较,去卵巢后大鼠 u-Ca 排出量明显增加 ($P < 0.05$),给予雌二醇和淫羊藿提取物干预,均能显著降低 u-Ca 的排出 ($P < 0.01$)。

3.4 对去卵巢大鼠血清 ALP 活性和尿中 DPD 与

Cr 比值 (DPD/Cr) 的影响:见表 2。去卵巢后,模型组大鼠血清 ALP 活性及尿中 DPD/Cr 较假手术组显著增加 ($P < 0.05$);雌二醇和淫羊藿提取物均能降低血清 ALP 活性,前者使之降到正常水平以下,而后者则能将 ALP 活性恢复到正常水平。同时雌二醇组和淫羊藿组大鼠尿 DPD/Cr 明显减小 ($P < 0.05$),二者作用类似。

表 2 淫羊藿提取物对去卵巢大鼠血清及尿液各生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *Herba Epimedii* extract on serum and urine biochemical parameters of OVX rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	s-Ca/ (mg · L ⁻¹)	s-P/ (mg · L ⁻¹)	u-Ca/ (mg · mg ⁻¹)	u-P/ (mg · mg ⁻¹)	ALP/ (U · L ⁻¹)	尿 DPD/Cr (mmol · mg ⁻¹)
			(mg · L ⁻¹)	(mg · L ⁻¹)	(mg · mg ⁻¹)	(mg · mg ⁻¹)	(U · L ⁻¹)	(mmol · mg ⁻¹)
假手术	—	8	11.0 ± 0.2	3.18 ± 0.11	0.81 ± 0.13	1.82 ± 0.17	74.0 ± 10.5	4.9 ± 0.6
模型	—	8	10.4 ± 0.1	3.01 ± 0.08	1.35 ± 0.15*	1.68 ± 0.08	101.6 ± 9.8*	8.7 ± 0.8*
雌二醇	2	10	10.8 ± 0.4	3.13 ± 0.16	0.51 ± 0.13**	2.07 ± 0.35	48.8 ± 2.7**	6.3 ± 1.1*
淫羊藿提取物	110	9	10.7 ± 0.2	2.98 ± 0.23	0.45 ± 0.06**	1.83 ± 0.07	79.2 ± 6.9*	5.9 ± 0.9*

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs Sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.5 对去卵巢大鼠骨形态计量学参数的影响:见表 3。去卵巢后,模型组骨量减少,如骨小梁面积百分比明显下降 67% ($P < 0.01$),骨小梁变得稀疏甚至丢失,骨小梁间隙显著增大 217.2%。雌二醇和淫羊藿提取物能够抑制去卵巢造成的骨小梁减少并能减小骨小梁间隙 ($P < 0.05$) (图略)。

4 讨论

绝经后妇女骨质疏松在原发性骨质疏松症中占很大比例。据报道,70 岁以下妇女绝经后骨质疏松

症的发生率为 30% 左右,50~80 岁有 26% 骨矿物质丢失,至 80 岁时 40% 的妇女发生过一侧或双侧髋骨骨折。骨质疏松已经严重危害绝经后妇女的身体健康。研究证明,绝经后妇女卵巢功能减退,雌激素水平降低,骨吸收亢进,反馈性的引发骨形成的增强,骨吸收强于骨形成,造成骨质流失,与年龄造成的低转化型的骨质疏松相比,绝经后妇女骨质疏松属于高转化型的骨质疏松。临床监测发现绝经妇女 ALP 活性升高,u-Ca 排出量增加,尿中 DPD 增

表3 淫羊藿提取物对去卵巢大鼠骨组织形态
计量学参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *Herba Epimedii* extract on tibia histomorphometric parameters of OVX rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/ 只	骨小梁面积 百分比/%	骨小梁 间隙/ μ m	骨小梁 厚度/ μ m
假手术	—	8	40.8±10.1	229.7±28.8	55.8±4.0
模型	—	8	13.8±8.2**	728.5±199.5**	55.3±6.5
雌二醇	2	10	21.0±6.1*	297.9±58.5*	59.8±4.1
淫羊藿提取物	110	9	20.9±5.8*	336.6±41.1*	56.6±8.3

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.01$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

加,提示骨形成和骨吸收的增强^[7]。本实验采用去卵巢骨质疏松大鼠模型模拟绝经后妇女的骨质疏松,考察淫羊藿提取物对去卵巢造成的骨转换率增强的影响。实验结果显示,去卵巢后大鼠 s-Ca、s-P 没有变化,ALP 活性增加。而 u-Ca 排出显著升高,同时尿中 DPD 显著增加,与上述绝经后妇女骨质疏松患者的各项生化指标的变化趋势一致。可见去卵巢4个月,已经造成雌激素缺乏引起的骨转换亢进状态。

本实验模拟传统的煎煮方法,以水为溶剂,回流提取得到淫羊藿提取物,同时参照淫羊藿的临床用量,确定实验的给药剂量。给去卵巢大鼠 ig 淫羊藿提取物 (110 mg/kg) 3个月,血清 ALP 活性显著降低,u-Ca 排出和 DPD 的量降低,与阳性药雌二醇作用相当。显示淫羊藿提取物能够显著抑制由于雌激素缺乏引发的骨转换增强,调整骨形成和骨吸收的平衡,对遏制去卵巢造成的骨质疏松有一定的作用。然而与雌激素相比,长期服用淫羊藿提取物对子宫没有刺激增生的作用。

在我国,淫羊藿自古以来就被用于治疗“骨萎”、“骨痹”之症,有强筋健骨之功效。现代实验研究证实淫羊藿能够防止去卵巢骨质疏松大鼠^[8]、老龄骨质疏松大鼠^[4]及激素造成骨质疏松大鼠^[9]的骨量丢失,促进血清雌激素水平,降低白细胞介素-6 (IL-6) 水平。同时一系列体外实验证实,淫羊藿水提取物抑制骨髓细胞向破骨细胞分化^[10],还可促进原代培养大鼠成骨细胞的增殖和分化^[11]。近年来,美、日、德等国学者先后从豆科植物中提取到了具有抗骨质疏松作用的黄酮类化合物及其衍生物^[12,13],研究表明这些化合物具有雌激素样作用,因而被称为植物雌激素。植物雌激素的特点在于其对雌激素

受体具有选择性,从而可以选择性地作用于骨的雌激素受体,而对其他组织的作用微弱,减少常见的雌激素替代疗法造成的子宫、乳腺各组织发生癌变的副作用。本实验亦证明淫羊藿提取物有与雌激素类似的防治骨质疏松的作用,但对子宫的生长增殖没有影响。目前已公认淫羊藿中所富含的黄酮类化合物是其主要的抗骨质疏松活性成分,可以推测淫羊藿提取物中存在选择性作用于骨的物质,但尚待进一步深入研究。

References:

- [1] An S J. Effect of kidney-tonifying herbs on ovary function and bone mass in postmenopausal women [J]. *Chin J Osteoporosis* (中国骨质疏松杂志), 2000, 6(2): 55-59.
- [2] Wu H, Lien E J, Lien L L. Chemical and pharmacological investigations of *Epimedium* species: a survey [J]. *Prog Drug Res*, 2003, 60: 1-57.
- [3] Yu S. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of a Chinese herb medicine on osteoclastic bone resorption [J]. *Chin J Dent Res*, 1999, 2(1): 7-11.
- [4] Zhang G, Shi W Z, Shi Y Y, et al. Effect of a compound "kidney tonifying" Chinese herbal preparation on femur cortical and trabecular bone loss induced by aging in aged male rats [J]. *Chin J Osteoporosis* (中国骨质疏松杂志), 1999, 5(1): 51-55.
- [5] Deng W M. Clinical effect of kidney-tonifying herbs on postmenopausal osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporosis* (中国骨质疏松杂志), 1997, 3(1): 64-66.
- [6] Guinness M, Orwoll E. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(11): 1734-1744.
- [7] Hou S Q, Xiao Z S. Changes of bone metabolism in menopausal women and effect of estrogen on their bone metabolism [J]. *Chin J Osteoporosis* (中国骨质疏松杂志), 2000, 6(1): 72-73.
- [8] Jiang Y N, Mo H Y, Chen J M, et al. Effects of epimedium total flavonoids phytosomes on prevent and treating bone loss of ovariectomized rats [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(3): 221-224.
- [9] Li Q, Liao J, Wu T, et al. *Epimedium sagittatum* Maxim. preventing hormone-induced osteoporosis in rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1996, 31(8): 467-470.
- [10] Zheng H J, Lu Z H, Hu Y G, et al. Effect of icaritin on osteoclasts cultured *in vitro* [J]. *Chin J Exp Surg* (中国实验外科杂志), 2000, 17(5): 460-461.
- [11] Li Y, Ji H, Li P, et al. Effects of epimedium pubescens flavonoids on osteoblast *in vitro* [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(1): 48-50.
- [12] Alekel D L, Germain A S, Peterson C T, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(3): 844-852.
- [13] Picher C, Chanteranne B, Bennetau-Pelisser C O, et al. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat [J]. *Br J Nutr*, 2001, 85(3): 307-317.