

- 卫生出版社, 1998
- [8] 王兴旺, 胥 杉. 抗癌药物筛选模型与筛选方法的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 1997(1): 39-43
- [9] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112
- [10] 黄银久, 宋宝安, 金林红, 等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究 [J]. 生物学杂志, 2009(4): 13-16
- [11] 王 斌, 姜登钊, 李国强, 等. 怪柳抗肿瘤粘类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 697-701
- [12] 于垂亮, 罗春林, 张惠平, 等. 固定小鼠的装置 [P]. 中国: 2010201453364 2010-03-30

卷柏提取物对去卵巢大鼠骨代谢的影响

郑晓珂^{1,2}, 陈克宇², 侯庆伟², 王小兰², 张 鑫², 李冬梅^{2*}

(1 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 研究卷柏提取部位 (A、B、C、D) 对去卵巢大鼠血清雌二醇水平及骨代谢生化指标的影响, 并初步探讨其作用机制。方法 采用 6 月龄雌性 Wistar 大鼠 70 只, 按体质量随机分为假手术组、模型组、阳性对照组和 4 个卷柏不同提取部位用药组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组切除双侧卵巢建立模型。手术 1 周后开始给药, 连续给药 26 周后处死大鼠。用放射免疫法检测雌二醇 (E₂)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清骨钙素 (BGP)、降钙素 (CT) 水平, 用常规生化法检测血清碱性磷酸酶 (ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性。结果 大鼠去除卵巢以后, E₂/CT 水平明显降低, ALP/TRAP/BGP/TNF- α 水平明显升高。给药 26 周后, 用药组 ALP/TRAP/BGP/TNF- α 水平比模型组明显降低 ($P < 0.01$); E₂/CT 水平明显升高 ($P < 0.01$)。结论 卷柏提取物对去卵巢大鼠骨代谢有一定的调节作用, 能够提高血清雌激素水平, 提示卷柏提取物对骨质疏松症有一定预防和治疗作用。

关键词: 卷柏; 去卵巢; 雌二醇; 骨代谢; 骨质疏松症

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1686-04

卷柏为蕨类卷柏科 (Selaginellaceae) 植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的全草, 为多年生草本植物, 又名长生不死草、九死还魂草、石莲花、万年青^[1]。卷柏为传统中药, 早在《本经》中已有记载, 将其列为上品, 述其“主治五脏邪气, 女子阴中寒热痛, 癥瘕血闭绝子。”卷柏和垫状卷柏 *S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim. 一直被《中国药典》(一部) 收载, 作为卷柏的药材使用。

本实验室前期对卷柏化学成分进行了全面系统的研究, 从中分离得到大量的黄酮类、木脂素类、核苷类和其他多酚类化合物成分^[2-8], 并对其药理活性进行了初步的研究。在前期实验中发现, 卷柏提取物能增加性未成熟小鼠子宫系数, 可使小鼠子宫质量增加, 具有雌激素样作用^[9-10]。去卵巢大鼠所引起的生物学上的变化与妇女绝经后生理上改变相似, 主要是由于体内雌激素水平下降而引起骨质疏松^[11]。本实验选用去卵巢大鼠模型, 探讨卷柏提取物长期作用对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响, 为卷柏抗骨质疏松有效成分的活性筛选及其机制的研究

提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 雌性 Wistar 大鼠 70 只, 6 月龄, 平均体质量 200~220 g (郑州大学河南省动物实验中心, 合格证号: 豫 2008-0013), 实验期间在二级动物房喂养, 环境温度为 (25±1) °C。

1.2 药物制备: 卷柏购自本草国药堂责任有限公司 (批号 20080321), 经河南中医学院陈随清教授、董诚明教授鉴定为卷柏属植物卷柏 *S. tamariscina* (Beauv.) Spring。卷柏干燥全草 8.98 kg, 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 减压干燥, 得到 A (350.1 g, 总部位), 然后上聚酰胺柱, 用水和不同体积分数乙醇梯度洗脱, 得到 B (100.8 g, 水部位)、C (66.34 g, 50% 乙醇部位)、D (86.06 g, 80% 乙醇部位) 4 个部位。

1.3 主要试剂和仪器: 尼尔雌醇片 (Tabellae Nilestrioli), 1 mg/片 (上海华联, 批号 071103); 碱性磷酸酶 (ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所生产); 雌二醇

(E₂) 试剂盒 (北京科美东雅生物技术有限公司); 骨钙素 (BGP)、降钙素 (CT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 放免试剂盒 (北京普尔伟业生物科技有限公司)。

奥林巴斯 AU400 全自动生化分析仪, 放射免疫分析仪, 可见紫外分光光度计 (岛津 UV-2201), 电热恒温水浴箱, KDC-160 HR 高速低温冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司), 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司产品), 超低温冰箱等。

1.4 动物造模、分组及给药: 70 只大鼠适应性喂养 3 d, 随机分为假手术组, 模型组, 阳性对照 (尼尔雌醇片, 1 mg/kg) 组, 卷柏提取物 A (300 mg/kg)、B (85 mg/kg)、C (56.84 mg/kg)、D (73.74 mg/kg) 组, 每组 10 只。参考文献方法^[12], 将大鼠用 3.5% 水合氯醛 (1 mL/100 g) ip 麻醉, 俯卧于手术台上, 四肢固定, 背部正中 (肋弓下缘) 处备皮, 络合碘消毒, 切开皮肤, 于脊柱旁 1 cm, 距肋弓下缘 1 cm, 依次切开肌肉, 剪开腹膜进入腹腔, 可见乳白色组织, 轻轻将之提出腹腔, 即可见被包裹的粉红色黄豆大小“桑堪样”卵巢, 分离后钳夹、结扎、剪去卵巢。其中假手术组大鼠进入腹腔后取一小部分脂肪, 检查有无渗血, 分层缝合皮肤, 给予庆大霉素切口外擦, 保温待麻醉苏醒。各组大鼠自由摄取标准鼠料, 自由饮水, 室温 (20~22) °C。造模完成后, 适应性喂养 1 周开始给药, 每日 1 次; 假手术组和模型组 ig 蒸馏水, 每日 1 次。卷柏各组用量均按临床用药量的 20 倍换算, 所有大鼠喂养期间均自由进食饮水。连续给药 26 周后处死。

1.5 标本采集和指标测定: 每周各组大鼠称体质量 1 次, 实验结束前一天禁食, 眼球取血后脱颈处死。以 3 500 r/min 离心 20 min, 分离血清, 置 -80 °C 冰箱冷藏待测。用放射免疫法检测血清 E₂、BGP、CT、TNF- α 水平, 常规生化法检测血清 ALP、

TRAP 的浓度。各指标测定参照试剂盒方法操作。

1.6 数据分析: 使用 SPSS13.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 卷柏提取物对血清 E₂、BGP、CT、TNF- α 水平的影响: 给药 26 周后, 模型组大鼠 E₂、CT 水平明显下降, 与假手术组比较有非常显著差异 ($P < 0.01$)。阳性对照组血清 E₂、CT 水平明显升高, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01, 0.05$)。卷柏各用药组 E₂、CT 水平明显高于模型组, 与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。其中 A 组和 D 组升高较明显 (表 1)。

给药 26 周以后, 模型组 TNF- α 、BGP 水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$)。阳性对照组 TNF- α 、BGP 水平有所降低, 与模型组比较 TNF- α 无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 BGP 有非常显著差异 ($P < 0.01$)。卷柏提取物 A 组和 D 组 TNF- α 水平低于模型组, A 组与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 但 D 组与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); B 组和 C 组 TNF- α 水平高于模型组, B 组与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), C 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); 卷柏各用药组 BGP 水平明显低于模型组, 与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。其中 A 组和 D 组升高较明显 (表 1)。

2.2 卷柏提取物对血清 ALP、TRAP 水平的影响: 给药 26 周以后, 模型组 ALP、TRAP 活性明显高于假手术组 ($P < 0.01$)。阳性对照组 ALP 活性有降低趋势, 与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 TRAP 活性明显降低, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

卷柏各用药组 ALP、TRAP 活性均低于模型组, A、C、D 组 ALP 活性与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$), B 组与模型组比较有显著性差

表 1 卷柏提取物对去卵巢大鼠血清 E₂、BGP、CT、TNF- α 、ALP、TRAP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *S. tamariscina* extracts on levels of serum E₂, BGP, CT, TNF- α , ALP, and TRAP of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	CT/(ng·mL ⁻¹)	BGP/(ng·mL ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TRAP/(U·L ⁻¹)
假手术	9	23.30±2.584	0.997±0.1032	339.6±19.73	1.813±0.2616	48.420±5.740	9.465±1.414
模型	9	14.25±1.126**	1.725±0.1525**	228.2±18.82**	3.377±0.4075**	62.500±7.231**	12.410±2.272*
尼尔雌醇	8	18.70±1.469△△	1.653±0.1089	266.6±26.04△	2.782±0.2751△△	54.330±14.730	10.590±1.696△
卷柏提取物 A	9	25.66±1.850△△	1.002±0.0976△△	430.9±31.07△△	2.166±0.3067△△	44.660±5.046△△	9.199±1.269△△
卷柏提取物 B	8	19.84±1.311△△	1.787±0.1395	404.6±11.00△△	2.281±0.3407△△	49.660±3.076△	10.170±1.413△
卷柏提取物 C	8	16.71±1.607△△	1.875±0.0994△	345.5±32.76△△	2.413±0.1312△△	52.660±3.881△△	9.550±1.485△△
卷柏提取物 D	9	23.69±1.449△△	1.618±0.0823	408.8±30.90△△	2.230±0.1464△△	48.200±5.263△△	11.79±1.935

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

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

异 ($P < 0.05$), 其中 A 组和 D 组下降较明显; A、C 组 TRAP 活性与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$), B 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), D 组与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 其中 A 组下降较明显 (表 1)。

3 讨论

本实验采用的是去卵巢大鼠动物模型, 即诱发卵巢功能缺陷而形成的活体动物模型, 卵巢摘除以后, 雌激素水平下降, 导致骨形成和骨吸收失去平衡, 这种模型可以较好地模拟绝经后骨质疏松症的骨代谢特点及产生的结果。

骨质疏松症是以骨量减少为特征, 骨组织显微结构改变、骨折危险频度增加的一种系统性骨骼疾病。前期实验表明卷柏有雌激素样作用, 而雌激素可通过各种途径参与骨代谢, 在维持骨量平衡、稳定中具有重要作用。大量研究表明, 绝经或切除卵巢后雌激素缺乏导致骨吸收增加, 骨量下降; 而雌激素替代疗法则抑制骨吸收, 减少骨丢失^[13]。

TNF- α 是一种具有炎症介导活性的细胞因子, 主要作用于破骨细胞形成的早期阶段, 其作用依赖基质成骨细胞的存在, 可抑制骨形成、促进骨吸收^[14], 同时还可抑制基质成骨细胞的功能, 减少骨矿量, 抑制骨胶原合成, 以及骨形成和钙化^[15]。本实验结果显示, 模型组大鼠血清 E_2 水平明显降低, 这是由于大鼠卵巢分泌 E_2 功能丧失, 导致体内 E_2 水平下降; 大鼠血清中骨吸收刺激因子 TNF- α 量有所升高, 表明在正常情况下 E_2 对 TNF- α 有一定的抑制作用, 当 E_2 水平下降时, 解除或降低了这种抑制作用, 从而使 TNF- α 水平增加, 这与文献报道一致^[16]。实验结果显示, 卷柏提取物连续 ig 26 周以后, 使血清 E_2 保持较高水平, 提示卷柏提取物能刺激体内雌激素分泌, 具有雌激素样作用; 血清 TNF- α 水平下降, 表明卷柏提取物对 TNF- α 有下调作用, 提示卷柏可能具有促进骨形成、抑制骨吸收的作用。

CT 是一种重要的钙调节激素, 对维持钙的平衡起重要作用, 通过受体介导作用能抑制破骨细胞的活性, 抑制骨吸收^[17]。本实验结果显示, 大鼠去卵巢以后, CT 水平明显降低, 表明雌激素水平下降, 降低了甲状腺滤泡旁细胞对 Ca^{2+} 的敏感性, 从而减少 CT 的分泌, 降低了对骨吸收的控制能力。给药后 CT 有所上升, 其中卷柏提取物 A 组和 D 组升高较明显, 提示 A 组和 D 组有较强的雌激素样作用, 增加了 CT 的分泌, 升高了对骨吸收的控制能力, 从而抑制了骨吸收。BGP 是由成骨细胞合成和

分泌的非胶原蛋白, 其主要功能是维持骨的正常矿化速率, 抑制异常的磷灰石晶体形成, 抑制生长软骨矿化的速度; 它能够较准确地反映成骨细胞的活性, 是衡量骨代谢状况的特异性生化指标^[18]。ALP 是一种细胞内酶, 在骨代谢的研究中被广泛应用, 定量检测细胞内的 ALP 活性具有重要意义, 是评价机体的成骨活性和骨组织钙化能力相对特异性的指标^[19]。TRAP 主要由破骨细胞释放, 是反映骨吸收的特征性酶, 在骨吸收活跃的部位 TRAP 升高, 由破骨细胞产生的 TRAP 可进入血液循环。本实验中去卵巢大鼠由于雌激素减少或缺乏使其对破骨细胞的抑制作用解除, 骨吸收显著增加, 随之骨形成也增加, 使得 ALP、TRAP、BGP 水平升高, 骨偶联过程失衡, 破骨细胞性骨吸收作用超过了成骨细胞性骨形成作用, 导致净骨量减少, 产生骨质疏松症, 即高转换型骨质疏松, 结果与以往文献一致^[20]。连续 ig 卷柏提取物 26 周以后, ALP、TRAP、BGP 水平降低, 其中 A 组和 D 组作用较明显, 提示卷柏既有降低骨转换速率的作用, 又有抑制骨吸收的作用, 以保持适度的骨转换, 使骨代谢趋于平衡。

以上实验结果显示, 卵巢摘除后 ALP、TRAP、BGP 明显升高, 表明在正常情况下 E_2 对 ALP、TRAP、BGP 有一定的抑制作用, 当卵巢摘除 E_2 水平下降时, 解除或降低了这种抑制作用, 从而使 ALP、TRAP、BGP 量增加, 活性增强, 促进骨吸收, 抑制骨形成, 导致骨质疏松症的发生。给予卷柏提取物 26 周后, E_2 水平显著上升, 对机体骨代谢有一定的调节作用, 有效缓解了骨质疏松的症状。

综上所述, 卷柏具有雌激素样作用, 主要是通过调节体内雌激素水平对骨代谢产生影响, 对去卵巢大鼠模型骨质疏松症有一定的预防和治疗作用。卷柏提取物 A 组和 D 组作用比较明显, 且 D 组用药量明显低于 A 组, 是 A 组用药量的 1/4, 提示 D 可能是其活性部位, 为卷柏抗骨质疏松有效成分的活性筛选及作用机制的研究提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1985
- [2] 郑晓珂, 赵献敏, 冯卫生, 等. 卷柏调血脂活性部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1712-1715
- [3] 郑晓珂, 史社坡, 毕跃峰, 等. 卷柏中一个新木脂素苷的分离与鉴定 [J]. 药学报, 2004, 39(9): 719-721
- [4] 郑晓珂, 史社坡, 毕跃峰, 等. 卷柏中黄酮类成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 742-743
- [5] 郑晓珂, 毕跃峰, 冯卫生, 等. 卷柏化学成分研究 [J]. 药学报, 2004, 39(14): 266-268
- [6] 毕跃峰, 郑晓珂, 冯卫生, 等. 卷柏中化学成分的分离与结

- 构鉴定 [J]. 药学报, 2004, 39(1): 41-45
- [7] Zheng X K, Li K K, Wang Y Z, *et al.* A new dihydrobenzofuran lignanoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(1): 79-88.
- [8] Wang Y Z, Chen H, Zheng X K, *et al.* A new sesquiterpene from *Selaginella sinensis* (Desv.) Spring [J]. *Chin Chem Lett*, 2007, 18(10): 1224-1226
- [9] 郑晓珂, 裴素娟, 冯卫生. 不同产地、种属十种卷柏雌激素活性筛选的实验研究 [C]. 中医药生物化学与分子生物学通讯, 2008
- [10] 郑晓珂, 吕鹏飞, 王玲巧, 等. 卷柏等 5 种中药植物激素活性筛选的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15): 1254
- [11] Luckey M, Kagan R, Greenspan S, *et al.* Once weekly alendronate 70 mg and raloxifene 60 mg daily in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Menopause*, 2004, 11(4): 405
- [12] 李恩, 薛延, 王洪复, 等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005
- [13] 周振雷, 侯加法. 雌激素对骨代谢的调节作用 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(14): 2714-2718
- [14] Burgess T L, Qian Y, Kaufman S, *et al.* The ligand for osteoprotegerin (OPG) directly activates mature osteoclasts [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145: 527
- [15] Pacifici R. Estrogen cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(8): 1043-1051
- [16] Waki Y, Nomura M, Kasugi S, *et al.* Walker 256/s carcinoma causes osteoporosis-like changes through ectopical secretion of hormone [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(6): 1219-1224
- [17] 苗懿德, 刘杰, 刘忠厚. 老年男性骨密度与相关影响因素的关系 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(3): 221-223
- [18] 孟昭亨. 骨钙素及其临床意义 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 1992, 8(1): 41
- [19] Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, *et al.* The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D (3) [J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(3): 273-280
- [20] 鞠大宏, 吴萍, 贾红伟, 等. 左归丸对卵巢切除所致骨质疏松大鼠骨钙素和降钙素含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(1): 16-17

中西医结合治疗小儿阑尾脓肿的疗效分析

赵 镭, 楼毅, 蒋国平, 何瑾, 何彧, 彭学慧*

(浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310003)

摘要:目的 观察中西医结合治疗小儿阑尾脓肿的临床疗效。方法 将 150 例患者随机分为治疗组和对照组, 治疗组 75 例采用中西医结合治疗, 对照组采用西医治疗。对两组患者治疗后主要症状、体征消退的平均时间、平均住院时间及辅助检查 (白细胞、CRP、腹部 B 超) 结果进行比较。结果 治疗组的症状、体征消退时间和住院时间明显短于对照组, 治疗组不同时间点 CRP 和白细胞数恢复正常的病例数明显多于对照组。结论 中西医结合治疗小儿阑尾脓肿能明显提高疗效, 缩短住院时间。

关键词: 中西医结合; 小儿阑尾脓肿; 疗效分析

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1689-03

小儿阑尾炎是儿童最常见的急腹症之一, 由于小儿阑尾炎尤其是婴幼儿阑尾炎诊断较为困难, 容易延误治疗, 使小儿阑尾脓肿的发病率偏高。因手术治疗阑尾脓肿的并发症多, 目前常采用保守治疗, 而单纯西医治疗其缺点是病程长, 复发率高。近 3 年来本院采用中西医结合方法治疗小儿阑尾脓肿, 与单纯西医治疗进行临床观察比较, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料: 将 150 例小儿阑尾脓肿患者 (均为本院患者) 随机分为治疗组和对照组。治疗组 75 例, 男性 43 例, 女性 32 例; 年龄 3~15.1 岁, 平均

6.2 岁; 病程 3~15 d, 体温 37.0~40.5℃, 白细胞计数 $(8.8 \sim 29.4) \times 10^9/L$, 以腹痛、腹部不适为首发症状的 59 例, 以腹胀、恶心、呕吐为首发症状的 11 例, 以发热为首发症状的 4 例, 以腹泻为首发症状的 1 例。对照组 75 例, 男性 44 例, 女性 31 例; 年龄 3.1~15.8 岁, 平均 6.4 岁; 病程 3~12 d, 体温 37.4~41℃, 白细胞计数 $(8.5 \sim 28.7) \times 10^9/L$, 以腹痛、腹部不适为首发症状的 52 例, 以腹胀、恶心、呕吐为首发症状的 15 例, 以发热为首发症状的 7 例, 以腹泻为首发症状的 1 例。两组性别、年龄、病程经统计学处理, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

①收稿日期: 2009-12-25

基金项目: 浙江省中医药科研基金资助项目 (491040-W50612)

作者简介: 赵镭 (1980-), 女, 浙江省杭州市人, 主管技师, 学士, 研究方向为小儿腹部及心脏的超声诊断。

Tel: (0571) 87061007-52421 E-mail: fishle_zl@yahoo.com.cn