

红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究

陈宇¹, 薛志远¹, 师志强¹, 杨亚飞¹, 杨秀艳¹, 赵良功², 封士兰^{1*}

1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 研究红芪抗骨质疏松药效与 HPLC 指纹图谱的相关性。**方法** 建立去卵巢大鼠所致骨质疏松模型, 红芪(S1)的不同提取部位 ig 给药, 选择红芪抗骨质疏松活性最强的提取部位。采用 HPLC 法建立 10 批不同产地红芪乙醇提取部位指纹图谱, 获取相应的药效数据, 运用偏最小二乘法, 进行相关性分析。将筛选出的活性物质单体作用于成骨细胞, 验证其抗骨质疏松活性。**结果** 红芪乙醇提取部位抗骨质疏松药效最强。经过相关性分析, 该组分指纹图谱共确定 9 个共有峰, 鉴定出的 3 种化合物中, 腺苷、毛蕊异黄酮与药效呈正相关, 芒柄花苷与药效呈负相关。体外验证实验结果表明毛蕊异黄酮可以提高成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性。**结论** 红芪抗骨质疏松作用是其所含各种成分共同作用的结果, 腺苷、毛蕊异黄酮对药效有一定的贡献, 且毛蕊异黄酮有促进成骨细胞分化的作用。

关键词: 红芪; 抗骨质疏松; 偏最小二乘法; 谱效关系; 成骨细胞; 毛蕊异黄酮; 腺苷; 芒柄花苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)01-0160-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.022

Spectrum-effect relationship of active fraction from *Hedysarum polybotrys* on osteoporosis

CHEN Yu¹, XUE Zhi-yuan¹, SHI Zhi-qiang¹, YANG Ya-fei¹, YANG Xiu-yan¹, ZHAO Liang-gong², FENG Shi-lan¹

1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Second Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To study the correlation of anti-osteoporosis effect of *Hedysarum polybotrys* and HPLC fingerprint. **Methods** Osteoporosis model was established through ovary resection of female rats to select the best part after performing ig administration with different extracts of *H. polybotrys*. The fingerprints of ethanol extract of ten batches of *H. polybotrys* from different habitats were established by HPLC. The partial least squares regression (PLSR) analysis was used to explore the correlation between peak areas of HPLC fingerprints and efficacy. Moreover, the effects of active ingredient of *H. polybotrys* on the function of osteoblasts were observed. **Results** The ethanol extract of *H. polybotrys* was the most effective part. Nine common peaks of the active fraction were selected. Adenosine, calycosin and ononin in ethanol extract of *H. polybotrys* have been identified separately, among which adenosine and calycosin were positively correlated with the pharmacodynamic data, and ononin was negatively correlated with the effect of drug. Additionally, calycosin can increase osteoblast ALP activity. **Conclusion** The results indicate that anti-osteoporosis effect of *H. polybotrys* is related to various components, among which adenosine and calycosin have a certain contribution to this effect, and calycosin can also stimulate the differentiation of osteoblasts *in vitro*.

Key words: *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.; anti-osteoporosis effect; partial least squares regression; relationship of fingerprint and efficacy; osteoblast; calycosin; adenosine; ononin

红芪是豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根^[1]。红芪具有补气升阳、生津养血等功效。现今对于红芪的研究多针对于提高免

疫、抗氧化、抗衰老等方面。红芪中含有毛蕊异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素等黄酮类化合物^[2], 黄酮类化合物具有显著的抗骨质疏松作用^[3]。骨质

收稿日期: 2017-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81703664); 兰州市科技计划项目(20163111)

作者简介: 陈宇(1993—), 在读硕士, 女, 从事中药、天然药物化学研究。E-mail: 329320670@qq.com

*通信作者 封士兰(1957—), 博士, 教授, 主要从事中草药及中药制剂中化学成分分离分析研究。E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

疏松主要表现为骨质脆化、骨抗压能力减弱、骨组织结构退化而导致骨折等疾病频发^[4]，绝经后骨质疏松为发病率最高的一种骨质疏松^[5]。现阶段对骨质疏松的治疗方法有激素替代疗法，治疗药物有选择性雌激素受体调节剂、钙剂和维生素 D 等，但化学药物均有不同程度的副作用^[6]。因此，探索中药及中药复方制剂预防和治疗骨质疏松问题成为近年的研究热点。然而，中药及中药复方制剂作为一个多组分、多靶点综合作用的复杂整体，其药效是中药各个化学成分共同作用的结果，“中药谱效关系”可将中药的药效学指标与化学成分相互关联，通过一定的统计学方法，筛选出有效活性成分，这有利于系统分析复杂的中药成分与药效学之间的联系^[7-9]。

本课题组已经针对红芪抗骨质疏松进行了大量研究，其中发现红芪多糖具有促进成骨细胞分化作用^[10]，进一步研究红芪抗骨质疏松活性成分可有效阐明其作用机制。综合考虑，本研究以摘除大鼠卵巢模拟绝经后骨质疏松，将红芪乙醇提取部位的指纹图谱与其药效学结合，使用偏最小二乘回归建立起中药谱-效关系；并将筛选所得活性成分作用于成骨细胞，进一步验证红芪活性成分体外抗骨质疏松作用。

1 材料

1.1 仪器

AG-IS 生物力学万能实验机（日本岛津公司）；LUNAR DPX-NT 双能 X 骨密度仪（美国 GE 公司）；550 型酶联免疫检测仪（美国 Bio-rad 公司）；2695HPLC 色谱仪（美国 Waters 公司）；2996 二极管阵列检测器 DAD（美国 Waters 公司）；BS224S/BP211D 电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；N-1100 旋转蒸发仪（上海爱明仪器有限公司）。

1.2 药物与试剂

10 批药材为自行采购的甘肃不同产地的红芪，经兰州大学药学院马志刚教授鉴定，均为多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根，具体编号及来源见表 1。

碱性磷酸酶（ALP，批号 20150819）、抗酒石酸酸性磷酸酶（TRACP，批号 20150907）、钙（Ca，批号 20150819）、磷（P，批号 20150907）检测试剂盒（均购自南京建成生物工程研究所）；对照品腺苷（批号 110879-200202，质量分数 99.7%）、芒柄花苷（批号 M-013-140730，质量分数 98.8%）均

表 1 红芪药材的来源

Table 1 Sources of *H. polybotrys*

| 编号 | 产地 | 编号 | 产地 |
|----|---------|-----|----------|
| S1 | 甘肃武都甘泉 | S6 | 甘肃宕昌官鹅沟 |
| S2 | 甘肃武都三河 | S7 | 甘肃宕昌将台 |
| S3 | 甘肃武都马街 | S8 | 甘肃宕昌贾河 |
| S4 | 甘肃武都米仓山 | S9 | 甘肃宕昌车拉 |
| S5 | 甘肃宕昌甘江头 | S10 | 甘肃陇南市西和县 |

购自中国食品药品检定研究院；对照品毛蕊异黄酮（批号 III-020-140730-20，质量分数 98.5%）购自上海盛中医药化工有限公司；色谱纯甲醇（山东禹王制药有限公司）和乙腈（德国默克公司）；水为高纯水；戊酸雌二醇片（Delpharm Lille S.A.S）。

1.3 实验动物

4 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠，体质量（240±25）g，SD 大鼠乳鼠，体质量 25~30 g，雌雄不拘，兰州大学实验动物中心提供，动物许可证号 SCXK（甘）2013-0002。

2 方法与结果

2.1 红芪不同提取部位抗骨质疏松作用

2.1.1 红芪药材不同提取部位的制备 称取红芪药材（S1）1.25 kg，按照文献方法^[11]，制备红芪药材不同极性部位，得到红芪总提取部位（出膏率 19.65%）、石油醚部位（出膏率 1.05%）、醋酸乙酯部位（出膏率 1.47%）和乙醇部位（出膏率 10.84%）；红芪粗多糖部位（多糖得率 6.7%）。

2.1.2 红芪不同提取部位对去卵巢大鼠骨质疏松的影响 64 只 SD 大鼠，适应性饲养 1 周，随机分为 8 组，每组 8 只，分别为假手术组、模型组、阳性对照组、红芪不同提取部位（5 个）给药组。除假手术组外，其余 7 组结扎并切除大鼠双侧卵巢，假手术组对卵巢附近脂肪处进行结扎，进行绝经后骨质疏松模型制备^[12]，手术后 5 d 开始给药，红芪不同提取部位给药组（分别按生药 10 g/kg）ig 给药，阳性对照组 ig 给予戊酸雌二醇（0.1 mg/kg），模型组与假手术组 ig 等量生理盐水，每天给药 1 次，连续给药 5 个月。分别于给药的 1.5、3、4、5 个月测定大鼠的全身骨密度（BMD）值，测定的结果见表 2。

结果发现切除卵巢 1.5 个月后，模型组与假手术组比较，大鼠 BMD 呈显著下降（ $P < 0.05$ ），证明大鼠骨质疏松造模成功；3 个月时，各给药组大鼠 BMD 均高于模型组，其中红芪醋酸乙酯部位和

表 2 红芪不同提取部位对骨质疏松大鼠 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of different extract fractions of *H. polybotrys* on BMD of osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 (生药)/(g·kg ⁻¹) | 给药不同时间后大鼠 BMD/(g·cm ⁻²) | | | |
|----------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 1.5 个月 | 3 个月 | 4 个月 | 5 个月 |
| 假手术 | — | 0.162±0.010 | 0.176±0.025 | 0.163±0.007 | 0.161±0.015 |
| 模型 | — | 0.150±0.008 [#] | 0.166±0.007 [#] | 0.149±0.005 ^{##} | 0.143±0.007 [#] |
| 红芪总提取部位 | 10 | 0.153±0.002 | 0.169±0.004 | 0.151±0.006 | 0.147±0.010 |
| 红芪石油醚部位 | 10 | 0.157±0.007 | 0.172±0.008 | 0.156±0.004 [*] | 0.154±0.009 [*] |
| 红芪醋酸乙酯部位 | 10 | 0.158±0.007 | 0.173±0.005 [*] | 0.169±0.008 ^{**} | 0.158±0.007 ^{**} |
| 红芪乙醇部位 | 10 | 0.154±0.010 | 0.173±0.006 [*] | 0.162±0.011 [*] | 0.162±0.009 ^{**} |
| 红芪粗多糖部位 | 10 | 0.152±0.006 | 0.169±0.008 | 0.159±0.011 | 0.155±0.007 [*] |
| 雌二醇 | 0.000 1 | 0.160±0.011 | 0.175±0.009 [*] | 0.162±0.012 [*] | 0.158±0.010 [*] |

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 tables

乙醇部位有显著性差异 (*P*<0.05)。给药 5 个月时, 除红芪总提取部位组大鼠 BMD 较低外, 其余 4 个提取部位组大鼠 BMD 相对模型组均有不同程度的提高, 其中红芪乙醇部位组抗骨质疏松效果最为显著 (*P*<0.01), 故后续实验进行 10 批不同产地红芪药材乙醇部位的谱效关系研究。

2.2 不同产地红芪乙醇提取部位的抗骨质疏松作用

取 10 批不同产地红芪药材, 提取乙醇部位。104 只雌性 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 随机分为假手术组、模型组、阳性对照组、10 批红芪乙醇提取部位给药组, 每组 8 只。按“2.1.2”项方法造模后, 10 批不同产地红芪乙醇提取部位给药组(分别按生药 10 g/kg) ig 给药, 阳性对照组 ig 给予戊酸雌二醇 (0.1 mg/kg), 模型组与假手术组 ig 等量生理盐水, 每天给药 1 次, 连续给药 3 个月。给药结束后, 测大鼠全身 BMD 后, 眼眶采血, 离心后得到血清,

按各试剂盒的要求测定血清中 Ca、P、ALP 和 TRACP 4 项指标, 结果见表 3; 大鼠脱颈椎处死后, 迅速解剖取左右股骨, 测定右股骨 BMD 以及左股骨相关骨力学指标, 结果见表 4。

结果显示, 大鼠去卵巢 3 个月后, 相比于模型组, 各给药组大鼠血清中 Ca、P、ALP 水平均有不同程度的升高, 血清 TRACP 水平均有所下降。其中, 阳性对照组及 S3、S4、S8 红芪乙醇提取部位组 4 个血清指标与模型组比较差异显著 (*P*<0.05、0.01)。各给药组大鼠全身 BMD、右股骨 BMD 均大于模型组, 且大部分给药组均差异显著 (*P*<0.05、0.01), 说明造模成功, 药效显著。经戊酸雌二醇、红芪乙醇提取部位治疗后, 大鼠生物骨力学指标(右股骨弹性模量和最大载荷)相比于模型组, 均有一定提高。其中 S4、S5 红芪乙醇提取部位组的相关骨力学指标均优于模型组 (*P*<0.01), 药效相比其他给药组较为显著。

表 3 10 批不同产地红芪乙醇提取部位对骨质疏松大鼠血清指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of ethanol extract of *H. polybotrys* from 10 different sources on serum indicators of osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 (生药)/(g·kg ⁻¹) | Ca/(mmol·L ⁻¹) | P/(mmol·L ⁻¹) | ALP/(金氏单位·L ⁻¹) | TRACP/(U·L ⁻¹) |
|--------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 假手术 | — | 3.24±0.33 | 3.02±0.31 | 310.7±11.8 | 34.01±2.40 |
| 模型 | — | 2.27±0.26 ^{##} | 1.80±0.15 ^{##} | 236.5±32.6 ^{##} | 43.06±4.91 [#] |
| S1 红芪乙醇提取部位 | 10 | 3.29±0.43 ^{**} | 2.21±0.31 [*] | 267.3±12.9 [*] | 39.20±4.72 |
| S2 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.79±0.38 [*] | 2.35±0.08 ^{**} | 235.0±18.9 | 38.48±1.67 |
| S3 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.92±0.31 [*] | 2.04±0.33 [*] | 284.1±25.3 ^{**} | 36.64±3.07 [*] |
| S4 红芪乙醇提取部位 | 10 | 3.27±0.22 ^{**} | 2.85±0.30 ^{**} | 283.5±22.1 ^{**} | 30.30±3.27 ^{**} |
| S5 红芪乙醇提取部位 | 10 | 3.32±0.32 ^{**} | 2.11±0.35 | 280.7±18.0 ^{**} | 33.62±3.66 ^{**} |
| S6 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.84±0.27 [*] | 2.19±0.28 [*] | 191.8±21.1 | 34.76±4.37 ^{**} |
| S7 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.72±0.18 | 1.94±0.24 [*] | 274.5±22.6 ^{**} | 37.04±4.49 [*] |
| S8 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.92±0.15 [*] | 2.38±0.18 ^{**} | 280.2±20.5 ^{**} | 31.72±3.37 ^{**} |
| S9 红芪乙醇提取部位 | 10 | 3.39±0.29 [*] | 2.17±0.27 [*] | 209.8±14.3 | 38.47±5.02 |
| S10 红芪乙醇提取部位 | 10 | 2.75±0.30 | 1.81±0.19 | 224.7±28.5 | 35.32±3.26 ^{**} |
| 雌二醇 | 0.000 1 | 3.39±0.29 ^{**} | 3.21±0.29 ^{**} | 325.8±14.3 ^{**} | 31.97±3.38 ^{**} |

表 4 10 批不同产地红芪乙醇提取部位对骨质疏松大鼠骨力学参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of ethanol extract of *H. polybotrys* from 10 different sources on biomechanical parameters of osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 (生药)/ (g·kg ⁻¹) | BMD/(g·cm ⁻²) | | 最大载荷/N | 弹性模量/(N·mm ⁻²) |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| | | 全身 | 右股骨 | | |
| 假手术模型 | — | 0.164±0.008 | 0.167±0.008 | 173.26±16.72 | 17 159.39±1 601.79 |
| S1 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.144±0.002 ^{##} | 0.151±0.006 ^{##} | 151.16±11.62 ^{##} | 12 920.59±2 586.41 ^{##} |
| S2 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.159±0.006 [*] | 0.166±0.005 ^{**} | 168.49±13.43 [*] | 16 220.09±1 812.05 [*] |
| S3 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.154±0.007 [*] | 0.166±0.006 ^{**} | 169.04±14.56 [*] | 15 427.16±2 482.10 [*] |
| S4 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.149±0.005 | 0.167±0.010 ^{**} | 167.95±7.67 [*] | 12 823.15±2 482.10 |
| S5 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.164±0.005 ^{**} | 0.174±0.005 ^{**} | 172.79±13.59 ^{**} | 16 812.50±2 003.55 ^{**} |
| S6 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.162±0.006 ^{**} | 0.171±0.010 ^{**} | 175.11±6.80 ^{**} | 16 788.69±2 050.16 ^{**} |
| S7 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.153±0.007 [*] | 0.163±0.003 ^{**} | 161.72±11.64 | 12 656.78±1 410.62 |
| S8 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.153±0.010 [*] | 0.163±0.008 ^{**} | 165.47±15.66 | 15 793.90±3 024.59 [*] |
| S9 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.161±0.011 ^{**} | 0.169±0.006 ^{**} | 170.24±16.91 [*] | 16 054.44±1 605.51 [*] |
| S10 红芪乙醇提取部位 | 10 | 0.147±0.010 | 0.157±0.009 | 165.09±13.82 | 14 978.60±1 665.07 |
| 雌二醇 | 0.000 1 | 0.151±0.007 | 0.161±0.009 [*] | 163.11±9.31 ^{**} | 12 485.86±1 804.65 |
| | | 0.163±0.006 ^{**} | 0.174±0.008 ^{**} | 174.72±10.08 ^{**} | 16 861.03±1 833.31 ^{**} |

2.3 红芪乙醇提取部位的 HPLC 指纹图谱分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Spursil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈和水, 梯度洗脱: 0~40 min, 5%~40% 乙腈; 40~75 min, 40%~60% 乙腈; 检测波长为 260 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL^[13]。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称量腺苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷对照品加甲醇, 分别制成适当质量浓度的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 分别取 10 批红芪药材乙醇提取部位干燥品 0.5 g, 精密称定, 加入甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即为供试品溶液。用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后, 于 -20 °C 冰箱储存待测。

2.3.4 供试品溶液稳定性考察 按“2.3.3”项方法配制供试品溶液, 分为 3 组, 每组 6 个样品。进行冻融循环 3 次、-20 °C 冰箱储存 3 d、-20 °C 冰箱储存 7 d 后按“2.3.1”项条件进样, 记录 HPLC 色谱图各峰峰面积, 分别计算得各峰峰面积减少量均小于 5%, 各峰峰面积 RSD 均小于 3%, 说明供试品在上述条件下存放稳定。

2.3.5 色谱峰的归属 分别将腺苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷的对照品溶液和 10 批红芪供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件进样, 得到 10 批红芪乙醇提取部位指纹图谱, 见图 1, 10 批红芪乙醇提取部位指纹图谱共确定 9 个共有峰, 9 个共有峰的保留时间 (t_R) 和峰面积见表 5。通过与对照品比对,

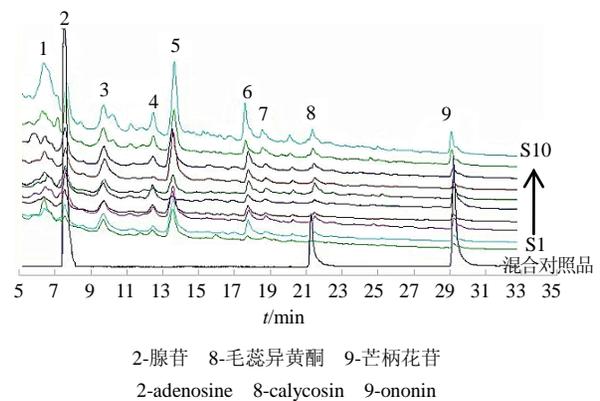


图 1 10 批红芪乙醇提取部位的 HPLC-DAD 指纹图谱
Fig. 1 HPLC-DAD fingerprints of ethanol extract of *H. polybotrys* from 10 different sources

2 号峰为腺苷, 8 号峰为毛蕊异黄酮, 9 号峰为芒柄花苷。

2.4 谱效相关性分析

通过 SIMVA-P 11.5 软件, 将色谱峰峰面积 (X) 与药效数据全身 BMD (Y) 进行关联, 拟合出相关的回归方程: $Y=0.626 0 X_1+0.153 4 X_2+0.217 9 X_3+0.249 4 X_4-0.238 3 X_5-0.467 3 X_6+0.116 3 X_7+0.619 1 X_8-0.302 5 X_9$ 。可以看出, 红芪乙醇提取部位抗骨质疏松药效是多种成分共同作用的结果, 由回归方程可以得到, 峰 1、2、3、4、7、8 所代表的化合物对抗骨质疏松作用有贡献, 其为正相关; 5、6、9 为负相关。2、8 号峰为为已知化合物腺苷和毛蕊异黄酮, 故取这 2 种对照品进一步进行体外抗骨质疏松活性验证。

表 5 10 批红芪乙醇提取部位指纹图谱共有峰的 t_R 和峰面积

Table 5 Peak areas and retention times of common peaks in fingerprints of ethanol extract of *H. polybotrys* from 10 different sources

| 峰号 | t_R /min | 峰面积 | | | | | | | | | |
|----|------------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| 1 | 6.236 | 531 564 | 844 716 | 246 970 | 1 429 428 | 258 028 | 628 069 | 369 583 | 901 849 | 391 610 | 416 959 |
| 2 | 7.491 | 701 185 | 593 653 | 633 615 | 631 867 | 415 927 | 679 726 | 417 937 | 683 666 | 433 157 | 688 957 |
| 3 | 9.597 | 434 914 | 573 334 | 450 315 | 886 153 | 652 295 | 349 106 | 706 669 | 643 714 | 511 895 | 821 372 |
| 4 | 12.406 | 203 080 | 380 965 | 189 592 | 446 344 | 169 334 | 172 757 | 136 354 | 230 181 | 259 841 | 74 818 |
| 5 | 13.578 | 877 636 | 103 828 | 933 369 | 1 667 758 | 810 915 | 955 275 | 101 474 | 938 051 | 798 753 | 1 438 709 |
| 6 | 17.619 | 225 124 | 19 938 | 360 785 | 667 485 | 282 204 | 260 434 | 330 017 | 135 378 | 270 969 | 323 527 |
| 7 | 18.581 | 103 422 | 95 431 | 78 861 | 79 507 | 76 997 | 215 571 | 75 295 | 147 934 | 74 295 | 110 153 |
| 8 | 21.406 | 161 385 | 100 669 | 209 674 | 298 177 | 364 812 | 201 048 | 122 221 | 117 283 | 140 885 | 181 244 |
| 9 | 29.228 | 272 340 | 796 445 | 233 782 | 258 551 | 193 141 | 317 333 | 145 570 | 153 197 | 217 543 | 384 866 |

2.5 红芪有效成分对体外培养成骨细胞的影响

2.5.1 成骨细胞分离培养 取 10 只 SD 大鼠乳鼠，于 75% 乙醇中浸泡后，取颅骨，去除骨膜、血管、结缔组织。PBS 漂洗 2 次后，剪成 1 mm² 小片，加入 0.25% 胰蛋白酶 3 mL，放置 37 °C 水浴中消化 10 min，弃去消化液，重复 1 次。用 0.1% II 型胶原酶 37 °C 水浴消化 4 次，合并上清液，并加入含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基。吹打均匀后，调整细胞密度至 2 × 10⁴/mL，接种于培养皿中，放置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，每 3 天换 1 次新鲜培养液，待细胞贴壁 90% 时，进行传代^[14]。细胞形态见图 2。可见，当成骨细胞分离培养至第 48 小时，细胞呈三角形或纺锤形 (图 2-A)；成骨细胞加入诱导培养基后第 10 天，经 ALP 组织染色后的细胞，在显微镜下可观测到染色斑点，说明成骨细胞诱导成功 (图 2-B)。

2.5.2 药物最佳作用浓度的筛选 将 P1 代细胞调整细胞密度至 3 × 10⁴/mL 接种于 96 孔板中，待细胞贴壁 90% 以上时，更换成骨性诱导培养基 (10 mmol/L β-甘油磷酸钠、0.1 μmol/L 地塞米松和 0.1

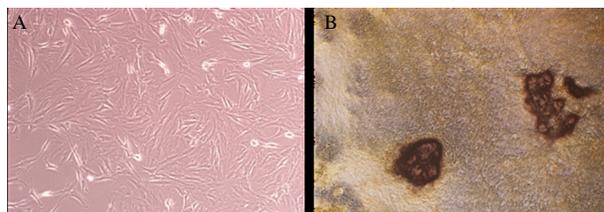
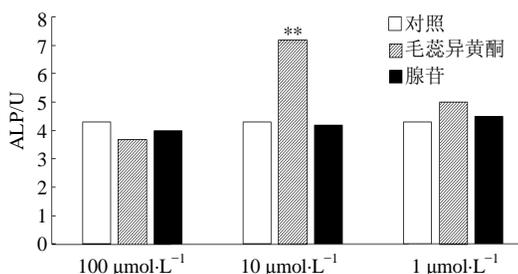


图 2 成骨细胞分离培养第 48 小时 (A) 和成骨细胞加入诱导培养基后第 10 天并经 ALP 染色后 (B) 的细胞形态 (×100)
Fig. 2 Morphology of osteoblast seeded for 48 h (A) and osteoblast cultured with osteogenic induction for 10 d and stained with the ALP (B) (×100)

μmol/L 磷酸维生素 C)。将浓度为 100、10、1 μmol/L 的腺苷和毛蕊异黄酮分别加入培养液中，对照组加入不含药物的溶媒 (DMSO)。每组平行 8 个复孔，诱导 9 d 后，按试剂盒方法进行 ALP 活性 [ALP 活性单位定义为每毫克成骨细胞蛋白在 37 °C 与基质作用每 15 分钟产生酚 (酚为对照品) 的 nmol 数，用 U 表示] 的测定。结果见图 3。可见，腺苷对成骨细胞 ALP 活性影响不大，毛蕊异黄酮的最佳给药浓度为 10 μmol/L，同时发现 100 μmol/L 毛蕊异黄酮对成骨细胞有抑制作用。



与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01, 图 4 同
*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group, same as Fig. 4

图 3 毛蕊异黄酮和腺苷最佳给药浓度的筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 3 The screening optimal concentration of calycosin and adenosine ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.5.3 毛蕊异黄酮对成骨细胞 ALP 活性的影响 将细胞给予 10 μmol/L 毛蕊异黄酮药物干预后，弃去培养基，用 PBS 洗后，按照 ALP 活性检测试剂盒的方法，测定药物干预第 3、6、9、12 天细胞的 ALP 活性。结果见图 4，成骨性诱导后，随着时间递增，ALP 活性逐渐上升，第 12 天时有所下降。第 6 天起，毛蕊异黄酮组 ALP 活性显著高于对照组，(P < 0.05)，第 9 天起，毛蕊异黄酮组 ALP 活性相对于对照组显著提高 (P < 0.01)。

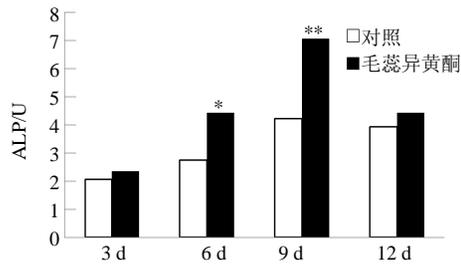


图 4 毛蕊异黄酮对成骨细胞诱导 3、6、9、12 d 后对 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effects of calycosin on ALP activity of ROB for 3, 6, 9, and 12 d ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.5.4 碱性磷酸酶阳性克隆数 (CFU-F_{ALP}) 组织化学染色 在成骨细胞药物干预第 10 天, 进行 CFU-F_{ALP} 组织化学染色。弃培养液, PBS 洗 2 遍, 用 10% 甲醛固定后, 加入基质液 (20 mL 的 Michaelis 巴比妥-HCl 缓冲液中含 α -萘基磷酸钠和固蓝 RR 盐 20 mg), 37 °C 水浴 0.5 h 后出现褐色斑点, 见图 5。可见毛蕊异黄酮组 CFU-F_{ALP} 染色斑点数显著多于对照组。

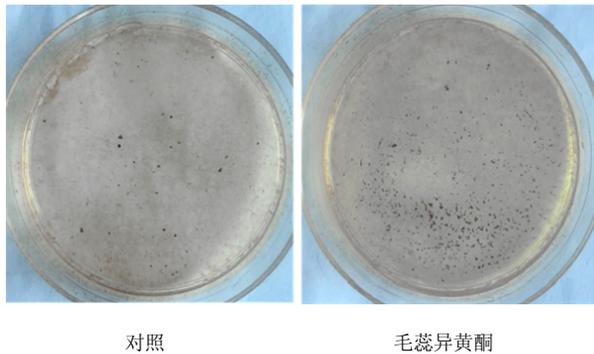


图 5 毛蕊异黄酮对成骨细胞 CFU-F_{ALP} 染色的影响

Fig. 5 Effects of calycosin on CFU-F_{ALP} forming efficiency

3 讨论

动物样本量的估计, 需要考虑其统计学因素和非统计学因素, 理论上样本量越大其检验效能越高, 更容易得出组间差异有统计学意义。但是, 在动物保护组织和动物福利的倡议下, 动物实验主张减少实验动物, 所以需要权衡成本与检验效能, 确定最适样本量^[15]。本实验为两独立组均数比较样本。按照统计学理论^[16]样本数 $n=5$ 符合要求, 以 BMD 为药效指标^[17-18], 考虑到造模存活率、给药时间较长等问题, 本实验最终选择样本量为每组 8 只大鼠。

骨质疏松诊断以双能量 X 线吸收法测定 BMD

为金标准。除此以外本实验测定 Ca、P、ALP 和 TRACP 4 种骨转换生化指标。其中 Ca、P 及二者的结合物都是构成骨矿物质和骨架结构的要素。血液中 Ca、P 的含量一定程度上反映出二者在骨骼中的水平。ALP 可反映成骨细胞的活性, TRACP 为反映破骨细胞活性及骨吸收的特征标志之一。本实验发现红芪乙醇提取部位可提高去卵巢大鼠血清 ALP 活性并降低 TRACP 活性, 提示红芪乙醇提取部位活性成分 (黄酮类化合物) 可能有促进成骨细胞分化的作用。采用“三点弯曲法”测定生物骨力学指标, 最大载荷可反映抗骨折风险的能力, 弹性模量用来反映骨材料抗形变的能力, 其与 BMD 密切相关。实验结果显示红芪乙醇提取部位能有效增加 BMD, 进而提高骨材料抗形变和抗骨折能力。综合评价各指标研究发现, S4 批红芪乙醇提取部位的抗骨质疏松能力最强, S4 产地为武都米仓山, 其为红芪的道地产区, 海拔 1 700~2 000 m 的红土地带最宜红芪生长。

本实验采用偏最小二乘的统计方法研究谱效关系, 通过对主成分分析, 拟合药效与色谱峰面积之间的数理方程, 以具体系数表达各有效成分对抗骨质疏松的重要性。本实验共鉴定出 3 个成分, 其他成分, 有待进一步鉴定。其中, 2 号峰腺苷, 8 号峰毛蕊异黄酮对药效均有贡献作用, 9 号峰芒柄花苷对抗骨质疏松药效呈负相关。由此可见, 中药的药效是由各成分共同作用的。由于中药的成分复杂, 谱效相关性研究可以快速、大批量地分析筛选中药的有效成分, 有利于建立中药合理的质量控制指标, 还有助于中药有效成分结构研究和新药的开发。

骨质疏松的发生机制之一为成骨细胞向骨细胞分化能力减弱, 而向脂肪细胞分化能力增强, 导致分泌细胞外基质减少, 进而矿化为骨基质量减少。所以成骨细胞在骨质疏松症中的作用日益引起重视。ALP 活性为成骨细胞早期成熟分化的重要指标, 研究发现, 毛蕊异黄酮可提高成骨细胞 ALP 活性, 促进成骨细胞分化, 这之前谱效相关筛选出的红芪抗骨质疏松活性成分一致。腺苷对成骨细胞的分化影响没有显著性差异, 此单体化合物可能通过其他机制抗骨质疏松。后续本实验室还将进行红芪活性成分的分离, 研究相关机制与有关的信号通路, 以期更深入地阐述红芪抗骨质疏松的相关疗效和机制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 赵昱波, 陈俊, 许浚, 等. 红芪的化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3434-3440.
- [3] Goel A, Raghuvanshi A, Kumar A, *et al.* 9-demethoxy-medicarpin promotes peak bone mass achievement and has bone conserving effect in ovariectomized mice: Positively regulates osteoblast functions and suppresses osteoclastogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 411: 155-166.
- [4] 崔燎, 吴铁. 骨质疏松药理学实验动物与图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [5] 黄立莉, 洪文, 王立源, 等. 绝经后骨质疏松症的临床治疗进展 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(18): 7-10.
- [6] 傅荣, 韩克. 激素替代治疗与卵巢癌关系的研究进展 [J]. 中国使用妇科与产科杂志, 2010, 26(2): 146.
- [7] Wang B L, Hu J P, Sheng L, *et al.* Chemical-pharmacokinetic-pharmacodynamic fingerprints of *Schisandra chinensis* alcoholic extract [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(5): 734-740.
- [8] 洪妍, 刘小花, 陈亚丽, 等. 多指标综合评价黄芪免疫活性的谱效相关性 [J]. 药学学报, 2017, 52(5): 785-789.
- [9] 许俊洁, 卢金清, 李肖爽, 等. 神农香菊挥发油体外抗氧化活性的谱效关系研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1823-1830.
- [10] Zhao L G, Zhao H, Sheng X Y, *et al.* Structural characterization and stimulating effect on osteoblast differentiation of a purified heteropolysaccharide isolated from *Hedysarum polybotrys* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111: 714-721.
- [11] 崔方, 韩增护, 刘小花, 等. 红芪提高免疫功能活性部位的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 101-105.
- [12] 彭珊, 欧阳厚淦, 赵志东, 等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的制备与评价 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(10): 1327-1329.
- [13] 陈心悦, 柳小亚, 陈亚丽, 等. 红芪药材防治肝纤维化的谱效关系 [J]. 色谱, 2015, 33(4): 413-418.
- [14] 宋鹏, 姚娟, 马慧萍, 等. 脱水淫羊藿素与山柰素对体外培养成骨细胞成熟矿化影响的比较研究 [J]. 药理学报, 2012, 47(7): 890-896.
- [15] 李婵娟, 蒋志伟, 王锐, 等. 随机对照药物临床实验样本量估计 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(10): 1132-1136.
- [16] 颜虹, 徐勇勇. 医学统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [17] 梁德, 唐晶晶, 江晓兵, 等. 泼尼松灌胃与肌内注射对大鼠骨密度、骨生物力学性能及骨代谢的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 85-88.
- [18] 成魁, 葛宝丰, 甄平, 等. 口服淫羊藿苷可提高大鼠的峰值骨密度和骨质量 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 120-124.