

淫羊藿总黄酮对摘除卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用

季晖 刘康 龚晓健 李绍平 章明放

【摘要】用摘除卵巢法结合低钙饲料建立大鼠骨质疏松模型。淫羊藿总黄酮在 75 ~ 300 mg/kg 剂量范围内连续给药 3 个月,与模型组大鼠比较,能明显提高大鼠股骨表面密度(W/LD)和骨密度(BMD)而不升高子宫系数及血清雌二醇($s-E_2$)水平,并有提高骨 Ca、骨 P 的趋势。高剂量组大鼠血清碱性磷酸酶(s-ALP)降低,股骨骨密度升高。骨形态计量学结果表明,高剂量组大鼠骨小梁吸收表面百分率(TRS%)和形成表面百分率(TFS%)等参数明显降低,骨小梁体积百分率(TBV%)明显提高。

【关键词】 骨质疏松症; 淫羊藿总黄酮; 去卵巢; 骨密度; 骨形态计量学

Effects of *Epimedium koreanum* flavoids on osteoporosis in ovariectomized rats Ji Hui, Liu Kang, GONG Xiaojian, et al. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Ovariectomized rat models fed with low calcium diet were used to evaluate the effects of total flavoids of *Epimedium koreanum* Nakai (EKF) on osteoporosis. Three doses of EKF (75, 150 and 300 mg/kg) were given orally for three months. Compared with control model group, EKF could increase femur W/LD ($P < 0.05$) without raising the uterus index and serum estradiol level. 300 mg/kg EKF decreased serum ALP in rats ($P < 0.05$), and increased femur density ($P < 0.05$). Bone histomorphometry showed that EKF decreased TRS% and TFS% at the dose of 300 mg/kg, but increased TBV%.

【Key words】 Osteoporosis; Total flavonoids; *Epimedium koreanum* Nakai; Ovariectomy; Bone mineral density; Bone histomorphometry

骨质疏松症是中、老年人的常见病、多发病,目前尚未有十分理想的治疗药物。淫羊藿为国内传统补肾中药,在民间沿用已有千年历史,其主要化学成分为黄酮类化合物、多糖、木脂素、生物碱及油脂等,目前研究表明其中有效物质为黄酮与多糖。有报道,淫羊藿具有激素样作用,可使雄性大鼠睾酮分泌增加,使雌性大鼠卵巢、子宫增重^[1-3],其注射液能促进鸡胚股骨生长^[4]。李青南等曾观察了淫羊藿水提取物对去势大鼠骨代谢的影响,发现水提取物能部分抑制去势大鼠的骨高转换率而不减少骨矿化,可以增强成骨细胞功能,对糖皮质激素所致大鼠骨质疏松症也有一定的治疗效果^[5]。本实验观察了淫羊藿总黄酮对摘除卵巢导致大鼠骨质疏松症的防治作用。

材料和方法

1. 动物:SD 大鼠,雌性,6 月龄,体重 250 ~ 300 g,由中国药科大学动物房提供。

2. 淫羊藿总黄酮(EKF)的提取:淫羊藿生药材购自南京市国药商场,产于江苏省盐城地区,显微镜下鉴定为朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)。将药材以数倍量水浸泡后煎煮,重复 2 次,合并滤液浓缩,石油醚萃取,水层再用乙酸乙酯萃取,回收乙酸乙酯,真空干燥,得到淫羊藿总黄酮,收率为 0.592%。以淫羊藿甙(icariin,批号:0737-9508,中国药品生物制品检定所)作标准品,测得提取物中淫羊藿总黄酮含量为 54%。

3. 药品与试剂:戊巴比妥钠(Sodium pentobarbital,批号:860901,佛山市化工实验厂进口分装);尼尔雌醇(E_3 ,批号:970501,上海华联制药有限公司);雌二醇放射免疫分析试剂盒(E_2 ,批号:031098,中国医学科学院放射医学研究所);血清碱性磷酸酶(s-

基金项目:江苏省科委应用基础基金资助项目

作者单位:210009 南京,中国药科大学药理学教研室(季晖、刘康、龚晓健、李绍平);天津医科大学病理学教研室(章明放)

ALP)、血清钙(s-Ca)、血清磷(s-P)及血清镁(s-Mg)试剂盒均为上海荣盛生物技术有限公司产品。

4. 主要仪器: 双能 X 线骨密度测量仪; 马福炉; 752 型可见紫外分光光度计; 游标卡尺; 螺旋测微器; Leitz1516 型切片机。

5. 去卵巢大鼠骨质疏松症模型的制备^[6]: 取健康 6 月龄雌性大鼠 48 只, 随机分为 6 组, 以 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 俯位固定, 在背部脊柱两侧切口, 于无菌条件下摘除双侧卵巢作为模型大鼠, 阴性对照组切除双侧一小块脂肪(假手术组), 3 周后分别经口给予以下药物: 假手术组(对照组): 自来水 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 病理模型组(模型组): 自来水 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 雌激素对照组(E_2): $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; EKF 低剂量组(L-EKF): $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; EKF 中剂量组(M-EKF): $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; EKF 高剂量组(H-EKF): $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

实验过程中以低钙饲料(含钙量约 0.3%)喂养, 严格控制大鼠食耗量。连续给药 3 个月, 各组大鼠(L-EKF 及 M-EKF 组除外)于处死前 8 天和 2 天分别二次腹腔注射盐酸四环素生理盐水溶液(40 mg/kg)进行荧光标记, 停药次日股动脉放血处死大鼠, 取出子宫称重, 计算子宫系数; 分离血清, 测定血清 ALP、Ca、P、Mg 和 E_2 , 取双侧股骨和胫骨, 于 110°C 干燥 1 h, 测定骨重(W)、骨长(L)、骨密度(BMD), 计算骨表观线密度(W/L)和表观面密度(W/LD)^[6], 并用双能 X 线骨密度测量仪测定离体股骨 BMD。将干燥股骨炭化后置于 600°C 马福炉中灰化 6 h, 取出后测定骨灰重(W_{ash}), 将骨灰溶于 6 N HCl 溶液中, 测定骨 Ca、P 含量, 并计算骨灰分的灰分表观线密度(W_{ash}/L)及灰分表观面密度(W_{ash}/LD)。取另一侧股骨的下 1/3, 去除软组织并磨去前后侧部分皮质后固定于 70% 酒精中, 以 Villanueva 染液浸染 72 h, 逐级脱水、脱脂后以甲基丙烯酸乙基包埋。用 Leitz 1516

型切片机制备 $5\mu\text{m}$ 和 $9\mu\text{m}$ 厚纵向不脱钙骨切片, $5\mu\text{m}$ 厚切片经甲苯胺蓝复染, 在普通显微镜和荧光显微镜下计量。计量区域为骺板上距骺板最上端 1.0 mm 以上处, 计量面积为 $12.80 \text{ mm}^{2[7]}$ 。

结 果

1. 对体重、子宫系数及血清雌二醇水平的影响

大鼠体重除 E_2 组下降外, 其余各组无显著性差异。与对照组相比较, 模型组及给药组子宫系数明显降低, 与模型组相比, E_2 组大鼠子宫系数升高; 相对于对照组, 模型组及 EKF 三个剂量组血清 E_2 水平皆显著下降, E_2 组与模型组比较雌二醇水平明显升高, 见表 1。

表 1 EKF 对大鼠体重、子宫系数和血清雌二醇含量的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	子宫系数(g/kg)	s- E_2 (pg/ml)
对照组	316 ± 20	1.552 ± 0.306	65.3 ± 15.0
模型组	308 ± 18	$0.349 \pm 0.053^{***}$	$41.2 \pm 13.0^*$
E_2	$292 \pm 20^*$	$1.102 \pm 0.296^{****}$	$57.9 \pm 8.3^*$
L-EKF	304 ± 19	$0.396 \pm 0.135^{***}$	$38.7 \pm 8.0^*$
M-EKF	303 ± 23	$0.317 \pm 0.047^{***}$	$40.7 \pm 8.1^*$
H-EKF	316 ± 16	$0.342 \pm 0.025^{***}$	$30.1 \pm 11.0^{*#}$

注: 与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2. 对血清学指标的影响

与对照组相比较, 模型组及 L-EKF 组 s-ALP 明显升高, 相对于模型组, E_2 、M-EKF 和 H-EKF 组 s-ALP 降低; M-EKF 及 H-EKF 组 s-Ca 与对照组、模型组相比皆明显升高; 与对照组比较, L-EKF 组大鼠血清 P 升高, L-EKF 组血清 Mg 与对照组、模型组比较皆明显降低。见表 2。

表 2 EKF 对大鼠血清学指标的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	ALP(U)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	Mg(mmol/L)
对照组	82 ± 21	2.734 ± 0.101	2.168 ± 0.123	0.888 ± 0.069
模型组	$129 \pm 21^{***}$	2.661 ± 0.173	2.231 ± 0.168	0.902 ± 0.051
E_2	$101 \pm 20^*$	2.622 ± 0.126	2.058 ± 0.242	0.880 ± 0.040
L-EKF	$129 \pm 16^{***}$	2.682 ± 0.202	$2.421 \pm 0.189^{**}$	$0.790 \pm 0.068^{**}$
M-EKF	$94 \pm 32^*$	$3.039 \pm 0.310^{***}$	2.214 ± 0.240	0.836 ± 0.086
H-EKF	$101 \pm 24^*$	$2.980 \pm 0.250^{***}$	2.258 ± 0.212	0.851 ± 0.036

注: 与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 对骨指数的影响

与对照组比较,各组股骨 W、L 有不同程度下降;M-EKF 组大鼠股骨 D 相对于对照组、模型组明显减小,见表 3。模型组、M-EKF、H-EKF 三组大鼠股骨 W/L 与对照组比较显著下降,模型组 W/LD 减小, E₃ 及 EKF 三组大鼠 W/LD 相对于模型组明显提高,见图 1。

表 3 EKF 对大鼠股骨骨重、骨长和骨直径的影响

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	骨重(g)	骨长(cm)	骨直径(cm)
对照组	0.688 ± 0.019	3.769 ± 0.081	0.393 ± 0.013
模型组	0.624 ± 0.033***	3.641 ± 0.073**	0.392 ± 0.018
E ₃	0.633 ± 0.061*	3.688 ± 0.077	0.381 ± 0.021
L-EKF	0.652 ± 0.025**	3.701 ± 0.048	0.392 ± 0.014
M-EKF	0.606 ± 0.056**	3.661 ± 0.090*	0.363 ± 0.014***
H-EKF	0.634 ± 0.023**	3.716 ± 0.034*	0.385 ± 0.009

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.01;与模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01

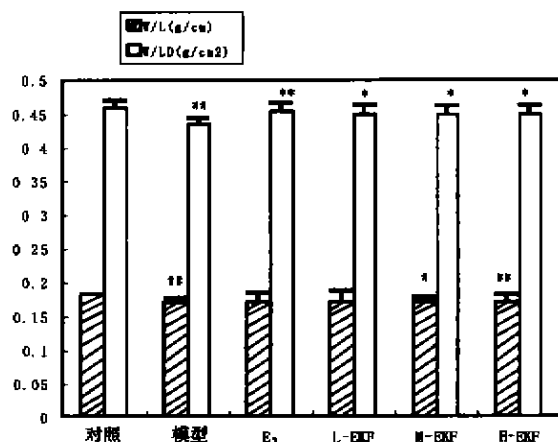


图 1 EKF 对大鼠股骨表观线密度和表观面密度的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01;与模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01

相对于对照组大鼠,各组大鼠股骨 W、L 及 D 均有不同程度下降;模型组 W/L 明显降低,各组大鼠 W/LD 无显著变化,见表 4。

4. 对股骨灰分指数的影响

与对照组相比较,模型组、M-EKF、H-EKF 三组大鼠股骨 W_{ash} 减轻;M-EKF、H-EKF 两组的 W_{ash}/L 与对照组相比明显下降,与模型组比较无明显变化,但 L-EKF 组与模型组比较 W_{ash}/L 增高;模型组、M-EKF 组大鼠的 W_{ash}/LD 相对于对照组明显

下降,而与模型组比较, E₃、L-EKF 两组大鼠的 W_{ash}/LD 显著提高,见表 5。

表 4 EKF 对大鼠股骨骨重、骨长和骨直径的影响

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	骨重(g)	骨长(cm)	骨直径(cm)
对照组	0.512 ± 0.016	4.107 ± 0.063	0.424 ± 0.014
模型组	0.473 ± 0.025**	4.037 ± 0.089	0.404 ± 0.013*
E ₃	0.477 ± 0.038*	4.039 ± 0.075	0.407 ± 0.016*
L-EKF	0.486 ± 0.019*	4.032 ± 0.054*	0.409 ± 0.010*
M-EKF	0.446 ± 0.045**	3.964 ± 0.081**	0.410 ± 0.019
H-EKF	0.482 ± 0.024**	4.037 ± 0.051*	0.413 ± 0.017

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01

表 5 EKF 对大鼠股骨灰分指数的影响

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	灰重(g)	灰分表观线密度(g/cm)	灰分表观面密度(g/cm²)
对照组	0.404 ± 0.032	0.107 ± 0.008	0.280 ± 0.017
模型组	0.355 ± 0.022**	0.097 ± 0.005	0.248 ± 0.007***
E ₃	0.375 ± 0.041	0.102 ± 0.011	0.280 ± 0.023*
L-EKF	0.401 ± 0.041	0.109 ± 0.011*	0.276 ± 0.024*
M-EKF	0.350 ± 0.034**	0.091 ± 0.006**	0.249 ± 0.011*
H-EKF	0.358 ± 0.014**	0.096 ± 0.004**	0.252 ± 0.009

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001;与模型组相比 * P < 0.05

5. 对骨矿含量的影响

与对照组相比较,各组骨 Ca 无明显变化,骨 P 均显著降低,见表 6。

6. 对骨密度的影响

与对照组相比较,模型组大鼠离体股骨密度明显降低,相对于模型组, E₃ 及 H-EKF 组大鼠股骨 BMD 显著增加,见图 2。

表 6 EKF 对股骨骨矿含量的影响

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	Ca(mg/g)	P(mg/g)
对照组	178 ± 16	107 ± 18
模型组	166 ± 20	64 ± 17***
E ₃	177 ± 19	74 ± 29*
L-EKF	178 ± 16	80 ± 10**
M-EKF	182 ± 18	75 ± 20**
H-EKF	175 ± 11	80 ± 16**

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

7. 对骨形态计量学的影响

与模型组大鼠比较,对照组、 E_2 和H-EKF组骨小梁吸收表面百分率(TRS%),骨小梁形成表面百分比(TFS%),骨小梁矿化沉积率(MAR)和骨小梁活性生成表面百分比(AFS%)均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),而骨小梁体积百分比(TBV%)均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),纵向骨生成率(LBGR)各组差异不明显,见表7。

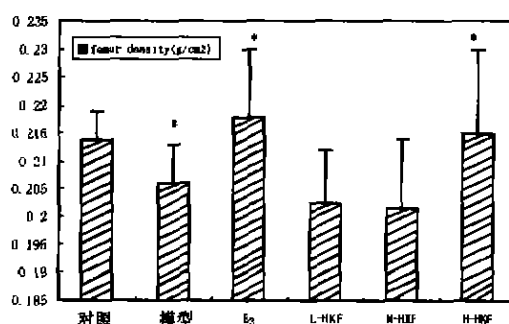


图2 EKF对股骨骨密度的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)
注:与对照组相比* $P < 0.05$;与模型组相比* $P < 0.05$

表7 H-EKF对股骨骨形态计量学的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TBV(%)	TFS(%)	TRS(%)	AFS(%)	MAR(%)	LBGR(%)
对照组	21.86 ± 3.05***	2.99 ± 1.03***	0.71 ± 0.18***	4.69 ± 1.31**	6.56 ± 0.71***	24.00 ± 7.52
模型组	11.68 ± 3.17	8.51 ± 2.29	1.54 ± 0.39	10.00 ± 2.68	11.75 ± 0.73	26.67 ± 10.80
E_2	21.71 ± 3.49***	3.19 ± 1.27***	0.61 ± 0.20***	3.61 ± 0.94***	7.27 ± 1.20***	16.04 ± 2.55*
H-EKF	20.25 ± 3.67**	4.08 ± 1.57**	0.76 ± 0.17**	6.51 ± 1.93*	8.58 ± 1.75**	23.96 ± 10.97

注:与模型组相比* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

讨 论

本实验在采用去势方法诱导大鼠骨质疏松症模型过程中,辅以低钙饲料,主要有下述原因。

1. 在相同造模时间内可形成更明显的骨质疏松症。文献^[8]及我们的前期工作都已发现,低钙饲料与正常钙含量饲料条件下造成的骨质疏松模型相比较,骨量丢失更多,主要表现为骨W/LD降低程度更大。分析其原因可能有以下三方面:第一,低钙饲料使大鼠Ca的绝对摄入量减少;第二,大鼠对摄入钙的吸收率远较人类高^[9],正常大鼠饲料含有丰富的钙,骨质疏松大鼠可能在被诱导骨量丢失的同时,已利用饲料进行一定的钙补充而降低骨量丢失程度;第三,饲料中Ca/P比例与钙的吸收有关,低钙饲料中Ca/P比例不合理(正常饲料Ca含量为0.8~1.8%,P含量为0.6~1.2%,比例约为1.4,低钙饲料含Ca 0.3%,而P含量不变,比例约为0.33),直接影响到Ca的吸收。

2. 目前世界各国包括一些经常食用乳制品及海产品的国家人口普遍缺钙,故各种其他原因引起的骨质疏松症多伴随有缺钙现象,因此,动物模型中佐以低钙饲料,相对而言与人类骨质疏松症更具有-致性。但低钙饲料的应用对于实验结果分析具有一定影响,实验中希望能与正常含钙饲料条件下的模型相比较,从而得出更客观的结论。

骨表观线密度(W/L)、骨表观面密度(W/LD)是两个新引入的骨指数,我们将二者作为判断骨量丢失程度的指标。本实验将离体股骨取出,采用双能X线骨密度测量仪进行BMD测量,将W/LD与BMD值作相关分析并进行回归显著性检验,发现若以每组动物平均值作为分析对象,则 $P < 0.01$,若以每根股骨数据作为分析对象,则 $P < 0.05$,表明以W/LD作为观测指标之一在动物体不仅简便易行,且具有一定的科学性和可信性。

植物黄酮被称为植物性激素,有调节心血管、生殖、免疫系统的作用,此外尚能保肝、抗炎、抗菌等,是重要的植物有效成分之一。本实验结果表明,EKF可以提高大鼠股骨W/LD和BMD,而不升高已降低的子宫系数和 $s-E_2$ 水平,表明EKF不具有雌激素样作用,其对骨质疏松症的防治作用可能是通过其他机制而实现的。各种免疫因子如IL-1、IL-6、TNF等对骨代谢具有重要调节功能,多种炎症因子如PGE₂等皆能影响骨吸收、骨形成。多篇文献报道EKF有免疫调节作用,比如可以促进小鼠抗体生成,促进PHA(植物血凝素)刺激的淋巴细胞转换,淫羊藿甲醇提取液体外能抑制小鼠淋巴细胞对ConA(刀豆蛋白)及LPS(脂多糖)的增殖反应及淋巴细胞反应,对迟发性足垫肿胀有一定抑制作用,皮下注射EKF还可抑制蛋清足肿胀^[10-13]。近两年日本也有报道,淫羊藿提取物对醋酸诱导的小鼠腹腔内色素渗出有明显抑制作用,可减轻角叉菜胶诱导的大

鼠足肿胀,抑制佐剂性关节炎,对胶原及花生四烯酸造成的小鼠凝集致死也有抑制作用,推测淫羊藿中可能存在抗炎成分并能阻断与花生四烯酸代谢有关的环氧酶^[14],这些很可能与 EKF 影响骨代谢有关。骨形态计量学结果表明,EKF 组 TRS%、TFS% 等较模型组明显降低,TBV% 明显提高,提示其能抑制去卵巢大鼠的骨高转换率。详细的作用机理有待进一步证实。

致谢:本文大鼠骨密度承蒙北京中日友好临床医学研究所秦林林医师协助测定,特此致谢

参 考 文 献

- 1 沈烈行,徐瑞军,房广星.淫羊藿药理作用研究进展.中医药信息,1996,(5):22-23.
- 2 熊跃斌,周楚华.淫羊藿及菟丝子提取物对雄性生殖功能的影响.中国药理学杂志,1994,29(2):89-91.
- 3 李青南,吴铁,谢华,等.淫羊藿提取物对去势大鼠骨代谢的影响.中草药,1993,24(12):637-638,658.
- 4 高子范,杨宗智,马克昌,等.淫羊藿注射液对试管内鸡胚股骨生长的促进作用.中西医结合杂志,1985,5:172.
- 5 李青南,廖进民,吴铁,等.淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究.中国药理学杂志,1996,31:467-470.
- 6 刘康,李晖,李绍平,等.三种大鼠骨质疏松模型的比较研究.中国骨质疏松杂志,1998,4(4):13-18.
- 7 章明放,张乃鑫,谭郁彬,等.周期性与连续性给予羟乙膦酸钠对去势大鼠骨质疏松症治疗作用的比较.中国骨质疏松杂志,1995,1:104-107.
- 8 刘和娣,李恩,佟晓旭.钙剂对实验性骨质疏松大鼠多指标的影响.中国骨质疏松杂志,1997,3(3):61-63,88.
- 9 徐贵发,赵长峰,韩玉荣.佳钙宝及其它钙剂中钙吸收利用率的对比研究.中国骨质疏松杂志,1996,2(4):33-35.
- 10 王天然,邢善田,周金黄.淫羊藿总黄酮促进免疫功能的实验.中成药研究,1987,(2):27-28.
- 11 王一冲,何球藻.柔毛淫羊藿提取液对小鼠免疫反应影响的体内观察.上海免疫学杂志,1986,6:6.
- 12 李柏青,黄谷良,林特夫 II.仙灵脾对小鼠迟发性足垫反应的影响.蚌埠医学院学报,1985,10:163.
- 13 朱朝德,徐世明,刘永隆.淫羊藿的研究概况.西北药理学杂志,1990,1(3):41.
- 14 篠原达雄,等.淫羊藿浸膏抗炎作用的药理研究.国外医药植物药分册,1997,12(6):272.