

# 中药葛根对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响

谈志龙 邢国胜 于顺禄 李建兵 郭若霖 白人骁

**【摘要】** 目的 研究中药葛根对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响,探讨葛根治疗骨质疏松症的药理作用。方法 采用去卵巢大鼠模型,分A去势组、B假手术组、C去势服葛根组、D去势服西药组(阳性对照组,程序治疗),去势1个月后C、D组服药50d,放免法测定血清雌二醇( $E_2$ )、邻甲酚酞络合酮法测定尿钙,ELISA法测定尿脱氧吡啶啉(Dpd),放免法测定血清骨钙素(BGP)水平,组间进行比较。结果  $E_2$ 测定B、C、D组高于A组( $P < 0.001$ ),C、D组低于B组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。尿钙测定B、C、D组低于A组( $P < 0.01$ )。Dpd测定B、C、D组低于A组( $P < 0.001$ ),C、D组低于B组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。BGP测定B组低于A组( $P < 0.01$ ),C、D组高于A组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),同时高于B组( $P < 0.001$ )。结论 中药葛根有增加 $E_2$ ,抑制骨吸收,促进骨形成,对骨质疏松症有治疗作用。

**【关键词】** 骨质疏松;中药;骨钙素;钙;雌二醇

**Effects of Pueraria lobata on bone metabolism in ovariectomized rat** TAN Zhilong, XING Guosheng, YU Shunlu, et al. Orthopedic Research Institute of Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the therapeutic mechanism of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi in osteoporosis, and its effects on bone metabolism in ovariectomized rat. **Methods** The female rats were divided into four groups. A was ovariectomized group, B sham operation group, C Pueraria group, D programmed treatment group, or positive control group. One month after ovariectomy, groups C, D were treated with relevant drugs for 50 days, serum estrogen ( $E_2$ ) and osteocalcin (BGP) levels were determined by RIA, urine calcium level was determined by orthocresolphalein complexon (OCPC) method, urine deoxypyridinoline (Dpd) was measured by ELISA. **Results**  $E_2$  levels in groups B, C, D were higher than that in group A ( $P < 0.001$ ), and those in group C, D were lower than in group B ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). Urine calcium levels in groups C and D were lower than that in group A ( $P < 0.01$ ). Dpd levels in groups B, C, D was lower than that in group A ( $P < 0.001$ ), these in groups C, D were lower than that in groups B ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). BGP level in group B was lower than that in group A ( $P < 0.01$ ), those in groups C, D were higher than that in group A ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), and higher than those in groups B ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi increases serum  $E_2$  level, inhibits bone resorption, induces bone formation, so it has therapeutic effect on osteoporosis.

**【Key words】** Osteoporosis; Traditional Chinese medicine; Osteocalcin; Calcium; Estrogen

绝经后引起的骨质疏松症(Osteoporosis, OP)重者造成骨折,是老年妇女健康的严重问题。本实验是以去势雌性大鼠建立绝经后的骨质疏松模型,服用中药葛根<sup>[1]</sup>与同时服用西药为阳性对照组进行骨代谢生化指标测定,探讨葛根对绝经后骨转化率的影响,旨在开发新的治疗OP药物。

## 材料和方法

1. 动物模型的制备与分组:本实验采用3月龄SD雌性大鼠24只,体重( $200 \pm 10$ )g左右(天津市动物实验中心提供),普通饲料喂养1周无异常表现后随机分4组,每组6只,A去势组;B假手术组(只作后背切口,不作卵巢切除);C去势服葛根组;D去势服西药组(阳性对照组,程序治疗<sup>[2]</sup>)。A、C、D组去势方法:用1.5%复方氯胺酮 $0.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,肌肉注射麻醉大鼠,无菌条件下后背部脊柱两侧腹后壁切口,

作者单位:300211 天津医院骨科研究所

切除双侧卵巢,结扎输卵管、血管,缝合伤口。

2. 实验药物与给药方法:切除卵巢1个月后C组服用葛根(天津中药饮片厂,葛根制成粉末与普通饲料制成含药饲料)  $5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,每只大鼠每日吃完全含1g药物的饲料后,再补充普通饲料,连服50d。D组采用程序疗法,先抑制骨吸收(depression)服用二磷酸盐(羟乙酸钠,商品名邦特林,成都菊乐制药有限公司)  $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连服2周。激活成骨阶段(Activation),服用 Simvastatin(辛伐他汀,杭州默沙东制药有限公司)  $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连服2周,实验显示辛伐他汀有刺激骨形成作用<sup>[3]</sup>。加强成骨阶段(strengthening),服用碳酸钙  $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,维生素D<sub>3</sub>  $21\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (钙尔奇D,苏州立达制药有限公司)3周。

3. 骨代谢生化指标测定:在服用药物50d(去势后80d)时,处死大鼠,取尿测定尿钙、脱氧吡啶啉(deoxypyridinoline, Dpd),取血清测定雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)和骨钙素(osteocalcin, BGP)。尿钙采用邻甲酚酞络合酮法,北京中生生物工程高技术公司生产的试剂盒。Dpd采用ELISA方法,美国 Quidel 公司生产的试剂盒,结果以每mmol肌酐(Cr)表示,Cr采用碱性苦味酸法,北京北化精细化学品有限公司生产的试剂盒。BGP采用放免法,北京北方生物技术研究所以生产的试剂盒。测定仪器,美国 Dynex 公司 MRXII 型酶标仪、日本岛津 UV-240 型分光光度计、上海核辐射光电仪器有限公司 SN-695 型智能放免γ测量仪。

4. 统计学处理:各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间进行 *t* 检验分析。

表1 各实验组血清 E<sub>2</sub>、尿 Ca、尿 Dpd、血清 BGP 测定结果 ( $n=6$   $\bar{x} \pm s$ )

组别	E <sub>2</sub> (pg/ml)	Ca(mg/dl)	Dpd/Cr (nmol/mmol)	BGP(ng/ml)
A	1.08 ± 0.38	11.36 ± 1.39	28.0 ± 3.0	42.40 ± 4.33
B	7.50 ± 1.45**	8.35 ± 1.08**	18.1 ± 3.7**	31.75 ± 3.87**
C	4.77 ± 1.31***	8.23 ± 1.11**	13.6 ± 2.5***	50.84 ± 4.28***
D	3.37 ± 0.99***	8.41 ± 1.06**	10.6 ± 4.0***	51.99 ± 6.37***

注:各组与A组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;C组、D组与B组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

## 结 果

各组实验测定结果见表1。血清 E<sub>2</sub> 测定 B、C、D 组高于 A 组 ( $P < 0.01$ ), C、D 组低于 B 组 ( $P < 0.01$ )。尿钙测定 B、C、D 组低于 A 组 ( $P < 0.01$ ); B、C、D 组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。尿 Dpd 测定 B、C、D 组低于 A 组 ( $P < 0.01$ ); C、D 组低于 B 组 ( $P$

$< 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。血 BGP 测定 B 组低于 A 组 ( $P < 0.01$ ); C、D 组高于 A 组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 同时高于 B 组 ( $P < 0.01$ )。C 与 D 组之间各指标对比, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

绝经后的 OP 病因十分复杂, 目前普遍认为绝经后雌激素缺乏, 甲状旁腺激素增加, 骨转换加快, 骨吸收大于骨形成, 使骨组织产生 IL-1、TNF 等, 进一步促进骨吸收造成骨量大量丢失和骨结构发生改变导致 OP 产生。治疗方法, 雌激属于骨吸收抑制剂雌激素替代疗法(ERT)是绝经后骨质疏松症防治中倍受关注且疗效确切的治疗方案。大量实验和临床研究以及流行病学调查证实, 雌激素能防治绝经后骨矿进行性丢失, 减少因骨质疏松症发生骨折的发生, 同时体外培养的成骨细胞上发现雌激素受体也有成骨作用。但长期单独使用雌激素治疗可导致乳房肿痛、阴道出血, 增加乳腺癌和子宫内膜癌的危险性, 因此对其临床应用存在着疑虑。中医治疗 OP 有广阔的前景, 最近研究发现一些植物雌激素有着与合成雌激素有相似的抗 OP 作用, 其中主要有大豆异黄酮在防治 OP 中得到了肯定。而中药葛根总异黄酮含量远远大于大豆。本文研究采用服用中药葛根对去势雌性大鼠骨代谢指标的改变探讨其治疗 OP 的作用。

骨代谢生化指标反映骨转化情况, 骨吸收和骨形成两者间紧密偶联, 可反映骨重建, 预测骨丢失。Dpd 是骨内 I 型胶原重要组成成分, 是骨的特异性标志物, 在骨胶原合成过程中参与胶原分子间交叉连接, 使分子间形成稳定的共价交联。骨骼更新期间, 骨溶解, 骨胶原蛋白水解, 此时可释放出这些胶原交联键, Dpd 以游离状态进入血液, 并以原形从肾脏直接排出, 是目前反映骨吸收的重要指标之一<sup>[4]</sup>。尿钙测定, 骨组织中含有大量的钙, 骨吸收时钙被释放入血使尿钙增高, 可反映骨钙严重丢失和骨吸收状态, 对骨矿代谢研究具有重要价值。骨钙素又称为γ-羧基谷氨酸蛋白(bone γ-carboxyglutamic proptein, BGP)是一种维生素 K 依赖性钙结合蛋白, 由成骨细胞合成, 与骨基质结合部分释放入血, 是反映骨形成速率的特异性指标之一<sup>[5]</sup>。雌二醇是骨质疏松研究的重要指标之一, 妇女绝经后可引起雌激素缺乏。

豆科植物葛根 [*Pueraria lobata* (Willd) Ohwi] 含有异黄酮类衍生物, 因取代基不同主要有大豆黄素(daidzein)、大豆黄甙(daidzin)、葛根素(puerarin)和葛

根黄甙(xylopuerarin)等。临床上常用于解热透疹、止痢,葛根总黄酮有扩张冠状动脉,增加冠脉流量及降低心肌耗氧量等作用。大豆素具有类似罂粟碱的解痉效果。大豆素有雌性激素作用,属于植物性雌激素类。是因为它们与烯雌酚的结构相似的缘故。由泰国产的葛根类似草药 *Pueraria mirifica* 中曾分离出一种有女性激素样生物活性结晶形成分,称为葛雌激素(miroestrol)。雌性大鼠切除双侧卵巢后,由于雌激素缺乏,骨转换加快,导致骨量丢失,目前研究绝经后骨质疏松最常用的动物模型。许多具有雌激素样活性的异黄酮在体内和体外均能改善骨质代谢。国内有报道<sup>[6]</sup>,提取葛根总异黄酮给切除双侧卵巢大鼠服药4个月和7个月后,在全身骨矿含量(BMC)、全身骨矿密度(BMD)、股骨胫骨相对体积质量、股骨最大负荷都有不同程度的增加和提高,证明了葛根素能增加幼年和去卵巢小鼠子宫重量,表现出一定的雌激素样活性。本研究去势大鼠经过生化指标测定  $E_2$  明显减少,尿钙、Dpd、BGP 增加,证明OP动物模型制作是成功的。服用葛根50 d后, $E_2$ 水平明显高于去势组,尿钙、Dpd降低,BGP升高,说

明葛根具有增加雌激素样作用,使其有抗骨吸收、促进骨形成的作用,与西药程序疗法相比差异无显著性,与西药有同样的疗效而且无雌激素样副作用,价格便宜。如果在其治疗上进一步研究,提取有效成分,可以作为防治妇女绝经后引起骨质疏松的有效药物之一。

#### 参 考 文 献

- 1 北京医学院,北京中医学院,主编.黄酮类化合物,中草药成分化学.北京:人民卫生出版社,1981.276-286.
- 2 徐栋粮,李佛保,杨忠汉,等. DASRR 程序治疗原发性骨质疏松症的临床研究. 中国骨质疏松杂志,1998,4:8-10.
- 3 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by Statns. Science, 1999,286:1946-1949.
- 4 Bonde M, Qvist P, Fledelius C, et al. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. Clin Chem, 1994, 40: 2022-2025.
- 5 Weaver CM, Peacock M, Martin BR, et al. Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. J Bone Miner Res, 1997, 12: 1714-1720.
- 6 郑高利,张信岳,方晓林,等. 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨矿密度和骨强度的影响. 中草药,2001,32:422-425.