

葛根对骨质疏松模型小鼠骨密度和骨组织构造的作用

王新祥 张允岭 吴坚 千叶大成 山田和彦 石见佳子

中图分类号: R93 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)05-0349-06

摘要:目的 葛根是药食同源的植物,为了全面反映葛根对骨代谢的作用,本研究采用了未经任何提取的葛根,观察了其去卵巢骨质疏松模型小鼠的骨密度和骨组织构造的作用。方法 麻醉下切除小鼠双侧卵巢,制作雌激素缺乏所致的骨质疏松模型后,令各组小鼠每天分别摄取含有葛根低、中和高剂量的饲料,并设正常组、模型组和雌二醇组。4 周后,对小鼠股骨骨密度、骨微细构造以及子宫的作用进行检测。结果 骨密度检测表明,低剂量葛根显著抑制了雌激素缺乏所致股骨骨密度的下降;中剂量葛根完全抑制了这种下降,葛根高剂量组与正常组相比,显著增加了骨密度,其作用强度与雌二醇相当。骨组织形态学分析显示,因雌激素缺乏导致的股骨远端海绵骨的骨量减少、骨小梁宽度的下降以及骨小梁间距的增大,被低剂量葛根显著抑制,被中剂量葛根完全抑制。另外,高剂量葛根显著增加了骨量和骨小梁的宽度。子宫的质量分析显示,小剂量葛根没有明显刺激子宫的作用,中、高剂量葛根轻度抑制了子宫质量的下降,但其强度仅为雌二醇的 1/10。葛根抑制骨量减少的作用机制,可能性与抑制破骨细胞的数量有关。结论 葛根不同于雌二醇显著刺激子宫,而具有与雌二醇相当的抗骨质疏松作用,有可能成为预防和治疗女性闭经后骨质疏松症安全而有效的食品或药物。

关键词: 葛根; 雌二醇; 骨密度; 骨量; 骨质疏松

The effects of puerariae radix on bone mass and bone microarchitecture in ovariectomy mice WANG Xinxiang, ZHANG Yunling, WU Jian, et al. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract: **Objective** Radix Puerariae (RP), the root of Puerariae labata (Willd) Ohwi, a wild creeper leguminous plant, is an important crude edible herb and one of the earliest traditional Chinese medicine for various medicinal purposes. The isoflavonoid derivatives extracted from RP have been found to prevent bone loss, but there are not any reports the overall crude herb of RP in bone metabolism. **Methods** To examine the possible role of RP in bone metabolism, female mice were ovariectomized (OVX), and administration with low, middle and high dose of RP or 17-beta-estradiol for 4 weeks. **Results** The whole femoral bone mineral density (BMD) was significantly reduced by OVX, and the decrease in BMD was significantly inhibited by low dose of RP, completely recovered by middle dose of RP, in a dose-dependent manner. Administration of PR, at high dose, significantly increased the whole femoral BMD compared with the sham, and is similar to E2 on OVX mice. Histological analysis of femoral metaphysis shown that administration with middle dose of RP completely prevented the decrease in trabecular bone volume (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th) and restored the increase in trabecular space (Tb.Sp) in OVX mice. High dose of PR further increased BV/TV and Tb.Th and reduced Tb.Sp compared with the sham. In OVX mice, the uterine weight declined, intake of low dose of PR did not affect uterine weight, and intake of middle and high dose of PR have a little stimulating in uterine weight but significantly different from E2 in OVX mice. **Conclusions** These results suggest that PR may represent a potential alternative medicine for

作者单位: 100078 北京中医药大学东方医院实验中心(王新祥、张允岭); 日本国立健康营养研究所食品科学部(吴坚、千叶大成、山田和彦、石见佳子)

通讯作者: 王新祥, Email: wangxinxiang@yahoo.com.cn

hormone replacement therapy (HRT) in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women.

Key words: Radix Puerariae; 17-beta-estradiol; Bone mineral density; Bone histomorphometry; Hormone replacement therapy

葛根是最为常用的中药之一,在现存最早的药学专著《神农本草经》中记载为“葛根,味甘平。主治消渴,身大热,呕吐,诸痹,起阴气,解诸毒”。现在中医临床一般用于解肌发热、头痛项强、烦热消渴、下利解酒等。最近,葛根黄酮提取物以及葛根素被发现

有改善骨代谢的作用,有可能适用于预防骨质疏松症^[1-5]。

葛根属于药食同源的植物,在我国以及某些国家和地区亦为食品。为了更加贴近葛根在临床或食品使用,全面地反映葛根对骨代谢的作用,本研究采用了仅经过机械粉碎而未经任何提取的葛根粉(Puerarea Lobata Willd Ohwi),观察了对去卵巢骨质疏松症模型小鼠的骨密度和骨组织形态方面的作用。

1 材料与方法

1.1 药物

葛根粉(100 目)购自日本粉末药品(Osaka, Japan)。17β-雌二醇购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。

1.2 动物和治疗干预

8 周的雌性 ddY 系小鼠购于日本静冈动物实验中心。每只小鼠被独立饲养于 24 cm × 15 cm × 15 cm 的鼠笼。12/12 h 明暗周期,环境温度为(22 ± 1)℃。小鼠被分为正常组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和雌二醇组,每组 8 只。除正常组施与假手术外,其余各组都施行卵巢切除手术,制成雌激素缺乏的骨质疏松模型。术后,正常组、模型组和雌二醇组都给予普通饲料,葛根低、中、高剂量组分别给予含有 5%、10% 和 20% 葛根粉的饲料。雌二醇(0.03 μg/d)通过体内的小渗透泵(Alza Corp, Palo Alto, CA, USA),进行自动给药。

普通饲料按 AIN-93G 的配方制成^[5]。葛根饲料组用葛根粉代替饲料中的玉米淀粉,低、中和高剂量组分别含有 5%、10% 和 20% 重量比的葛根粉。葛根富含淀粉,占到葛根干重的 80%,具体的营养成分由日本食品营养分析中心测定,其结果见表 1。

每天给予小鼠 4.0 g 的饲料,允许自由饮水。实验开始 4 周后,小鼠在麻醉下处死,取出子宫进行称量 摘出双侧股骨,分别用于骨密度测定和骨组织

形态学的解析。以上动物研究全部按照日本国立健康营养研究所对实验动物的使用规范进行操作和处理。

表 1 葛根营养成分(葛根粉 100g)

能量	345.00	Kcal
碳水化合物	79.20	g
蛋白	5.80	g
脂肪	0.60	g
水分	8.50	g
灰重	5.90	g
钙	1.31	g
磷	0.06	g

1.3 X 线分析

小鼠的股骨用 X 线摄影装置(SRO-M50; SOFRON,日本东京)进行 X 线成像摄影。骨密度用双能 X 线吸收测定装置进行测定(DCS-600R; Aloka, 日本东京),用单位面积上的骨矿含量进行表示。股骨的 X 线扫描区域被等距离地分为三等份:近端、中端和远端,分析骨密度在不同区域所受的影响。

1.4 组织形态学分析

对股骨远端进行 5 μm 厚非脱灰组织切片,并用酒食酸抵抗性的酸性磷酸酶(TRAP)进行染色。形态学计量用与光学显微镜相连的半自动图像分析仪(Osteoplan II; Carl Zeiss, Thornwood, 美国纽约)对股骨远端二次海绵骨的组织构造,进行定量分析,内容包括海绵骨的骨量/组织量、骨小梁厚度和骨小梁间距,并对酒食酸抵抗性酸性磷酸酶阳性多核破骨细胞的数目进行测定^[7]。

1.5 统计学处理

所有的数据表示为平均值 ± 标准误差。通过单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)判定其差异有无显著性。显著性差异的水平定为 P < 0.05。

2 结果

2.1 体重和卵巢重量

各组小鼠在实验开始时具有相近的平均体重。在实验开始后,各组小鼠的体重都有增加,但由于各组小鼠每天消费等量的饲料,所以每周各组间小鼠的体重差异无显著性(表 2)。

卵巢切除后模型组小鼠子宫质量显著下降。雌

表 2 葛根对不同组别去卵巢小鼠的体重和子宫重量的影响

组别	体重(g)					子宫重量 (mg)
	开始	1 周	2 周	3 周	4 周	
正常组	28.4±0.2	28.8±0.3	30.1±0.4	32.2±0.4	33.8±0.5	181.3±17.9 [‡]
模型组	28.1±0.2	29.3±0.3	30.8±0.5	32.7±0.5	34.3±0.3	27.1± 3.5 [§]
低剂量组	28.2±0.2	28.6±0.4	30.9±0.5	32.6±0.5	33.7±0.3	31.7± 2.1 [§]
中剂量组	28.5±0.4	29.8±0.5	31.1±0.5	33.1±0.6	33.8±0.5	45.6± 3.4 [†]
高剂量组	28.6±0.5	28.6±0.6	29.8±0.7	31.9±0.6	33.4±0.3	42.5± 3.5 [†]
雌二醇组	28.4±0.3	29.1±0.4	30.5±0.5	32.5±0.5	33.8±0.4	176.1±23.1 [‡]

注:组间比较,不同的上标:[‡]、[§]、[†],表示组间差异有显著性, $P\leq0.05$

二醇完全抑制了子宫质量的下降。葛根的小剂量对子宫质量的下降,无明显抑制作用;葛根的中剂量和大剂量对子宫质量的下降,有轻度抑制作用,但远比雌二醇要弱,作用强度仅为雌二醇的 1/10(表 2)。

2.2 骨密度

为了观察葛根对骨质疏松模型小鼠骨矿含量的作用,对股骨进行了 X 线摄影。照片显示,卵巢切除后,模型组股骨全体的骨矿含量显著减少,在股骨远端的干骺端的减少尤为显著。摄取葛根的低、中、高剂量各组用量依存地抑制了股骨骨矿含量的减少,突出表现在股骨的干骺端。雌二醇完全抑制了股骨骨矿含量的减少(图 1)。

葛根对股骨骨矿含量的作用进一步通过对骨密度的测定进行定量分析。卵巢切除导致了模型组股骨整体骨密度下降了 11.6%(图 2D),这种下降被低剂量的葛根显著抑制,被中剂量的葛根完全抑制。高剂量的葛根组的骨密度与模型组相比,不仅高出 19.9%,而且比正常组高出 8.2%;其作用强度与雌激素的雌二醇作用相当。另外,在股骨的近、中和远端的 3 个区域内,卵巢切除引起模型组股骨远端的骨密度的下降幅度为 19.2%(图 2C),与近端的 4.0% 和中段的 11.2%(图 2A, 2B)的下降相比,下降尤为显著。在股骨远端,雌二醇显著增加了去卵巢小鼠的骨密度(图 2C);低剂量葛根对去卵巢小鼠的骨密度下降抑制率接近 50%,中剂量葛根完全

抑制了骨密度的下降。高剂量的葛根,与正常组相比,骨密度有非常显著的提高。

2.3 组织形态分析

为了研究葛根对海绵骨的作用,对股骨远端的干骺端采用非脱灰组织切片和 TRAP 染色,进行组织形态学分析。结果显示,与正常组相比,模型组的股骨干骺端的骨量和骨小梁厚度显著下降,骨小梁间距显著增加(表 3)。中剂量的葛根完全抑制了去卵巢后股骨干骺端的骨量和骨小梁厚度下降,并保持了骨小梁间距。另外,大剂量的葛根与正常组相比,骨量和骨小梁厚度显著增加,骨小梁间距显著缩小。

表 3 葛根对不同组别去卵巢小鼠骨组织构造的影响

组别	骨量/组织量 (%)	骨小梁厚度 (mm)	骨小梁间距 (mm)	破骨细胞数 (个/mm)
正常组	17.6±1.7 [‡]	50.2±2.1 [‡]	0.25±0.03 [‡]	6.1±0.8 [‡]
模型组	8.2±1.7 [§]	32.8±5.2 [§]	0.41±0.06 [§]	11.6±1.8 [§]
低剂量组	12.9±1.6 [†]	39.8±1.5 [†]	0.35±0.05 [†]	8.5±0.5 [†]
中剂量组	16.9±1.9 [‡]	46.5±1.8 [‡]	0.25±0.03 [‡]	6.8±0.5 [‡]
高剂量组	24.8±2.2 [‡]	68.3±6.4 [‡]	0.22±0.03 [‡]	5.5±0.4 [‡]

注:组间比较,不同的上标:[‡]、[§]、[†],表示组间差异有显著性, $P\leq0.05$

对股骨干骺端海绵骨表面存在的破骨细胞的数量分析显示,模型组的酒食酸抵抗性的酸性磷酸酶 (TRAP) 阳性的多核细胞的数目显著增加,葛根各组抑制了破骨细胞数量的增加(表 3)。

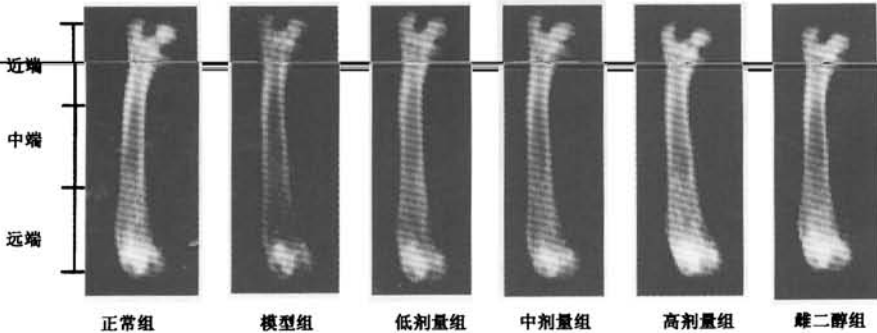


图 1 小鼠股骨 X 线照片

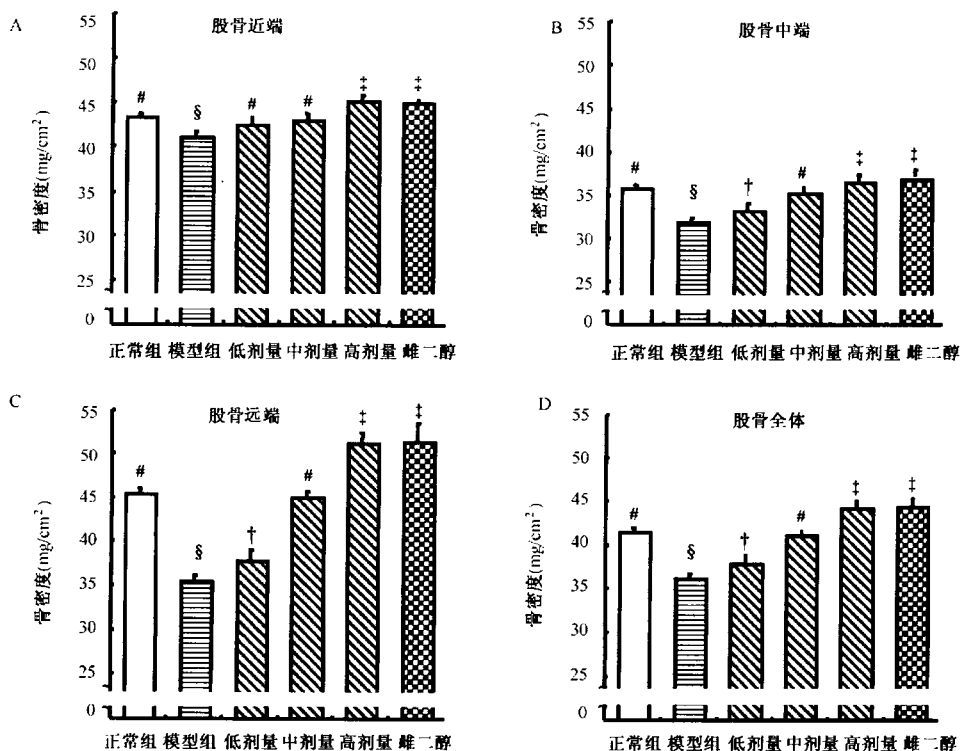


图 2 葛根对不同组别去卵巢小鼠股骨不同部位骨密度的影响

组间比较,不同的上标: #、§、†、‡,表示组间差异有显著性, $P \leq 0.05$

3 讨论

骨质疏松症是最为常见的增龄性疾病,其后果是容易引起骨折,是影响中老年人健康的主要的风险因素之一。闭经引起骨代谢回轮的亢进,骨形成和骨吸收的失衡,最终导致骨矿的流失。基于人和动物试验的研究表明,由雌激素不足引起的骨矿流失主要由于破骨细胞对骨吸收的增加而引起^[8]。最近,大豆食品和大豆异黄酮对于预防骨质疏松的作用受到了广泛的关注^[9-11]。通过本动物研究,我们发现葛根有可能更好地改善骨代谢。葛根在中低剂量时不仅抑制了去卵巢小鼠骨密度和骨量的减少,而且在高剂量时显著增加了骨密度和骨量。

实验显示,去卵巢骨质疏松症模型小鼠由于雌激素不足而导致的股骨整体骨密度的降低,被小剂量的葛根有效地抑制,被中剂量葛根完全抑制(图 2D)。

去卵巢骨质疏松症模型小鼠股骨的骨密度在股骨远端的干骺端的降低最为显著(图 2C),与股骨的中端和近端相比(图 2A, 2B),是由于这个部位包含有更多的海绵骨。股骨远端的干骺端的组织形态分

析显示,中剂量的葛根完全抑制了骨量和骨梁厚度的减少,并保持了骨梁间距(表 3),表明葛根主要通过抑制海绵骨的吸收而达到抑制骨量的减少。

葛根低、中和高剂量用量依存地抑制了去卵巢骨质疏松症模型小鼠的酒精抵抗性酸性磷酸酶阳性多核破骨细胞的数目(表 3),表明葛根抑制骨量减少的作用与抑制破骨细胞的数量有关。

与正常组相比,高剂量的葛根能够显著增加股骨整体的骨密度(图 2D),其中对股骨干骺端的骨密度的增加尤为显著(图 2C),其增加骨量的作用强度与雌激素相当。组织形态学的分析显示,葛根在高剂量时能够增加骨量和骨梁厚度,达到显著高于正常组的水平,表明葛根在高剂量时能够增加骨量(表 3)。

葛根对骨代谢作用的有效成分可能与其高含量的异黄酮有关。我们测得的本研究中使用的葛根中大豆苷元和染料木素的含量分别为 8.03 mg/g 和 1.01 mg/g^[12,13]。已经有较多的研究表明,大豆苷元和染料木素对去卵巢小鼠的骨量减少有一定的预防作用^[14-18]。另外葛根中的其他黄酮成分如芦丁和鹰嘴豆芽素和最主要的葛根素,对去卵巢小鼠骨量减

少的抑制和增加骨量的方面,也可能起到了决定性的作用^[2-5,19-21]。

葛根改善骨质疏松模型小鼠的骨代谢作用的机制,可能与葛根中的异黄酮通过雌激素受体而发挥对骨代谢的调节作用有关。实验显示高剂量的葛根对去卵巢小鼠骨密度和骨量的作用强度与雌二醇相当,而对子宫的作用远比雌二醇弱,仅为雌二醇的 1/10。葛根对骨和子宫作用强度,不同于雌激素,可能是由于异黄酮对不同亚型的雌激素受体选择作用的结果。已经有研究表明,大豆苷元和染料木黄酮对雌激素受体的 ERalpha 和 ERbeta 的亲合力有很大的不同,它们对 ERbeta 的作用比对 ERalpha 的作用更强^[22]。另外,葛根对骨代谢的作用可能独立于异黄酮的雌激素样作用。已有研究表明,体内氧化反应产生的自由基有促进骨吸收的作用^[23]。葛根中异黄酮具有强力的抗氧化活性^[24]。因此,葛根可能通过异黄酮的抗氧化活性而影响骨吸收。

高剂量的葛根对骨密度和骨量的增加明显高出正常对照组的研究结果,是本研究观察到的重要的现象之一,而从已经报道的葛根提取物或葛根素对骨密度的作用来看,仅表明他们能抑制骨密度的下降^[1,2]。使用葛根优于其提取物或单一成分的原因,我们考虑可能与葛根中所包含的异黄酮以外的其他成分如皂苷、多糖或高含量的钙等有关,今后非常有必要对葛根中对骨代谢起作用的有效成分或部位进行深入的研究。

近年葛根的生物活性受到越来越多的关注。已有研究表明 葛根具有抗酒精依赖,抗突变和肿瘤,抗肝脏损伤以及影响肝脏的单胺氧化酶活性等作用^[25-29]。鉴于我国已经使用葛根制剂用于高血压和心脏病的预防和治疗^[30],结合本研究所显示的葛根对骨代谢具有改善作用的结果,葛根或其有效部位或成分完全可以取代雌激素疗法用于预防和治疗骨质疏松和心脏疾患。

综上所述,葛根作为重要的药食同源的中药之一,不仅完全抑制了骨量的减少,而且在高剂量增加骨量的同时,不同于雌激素较强地刺激子宫,有可能成为女性绝经后骨质疏松症的安全、有效而经济的食品或药物。

【参 考 文 献】

- [1] 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 (5):422-425.
- [2] 黄延玲,石凤英. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响. 中国临床康复, 2004, 8 (12):2307-2309.
- [3] 李斌斌,于世凤. 葛根素调控骨代谢的体外实验研究. 北京大学学报(医学版),2003,35 (1):74-77.
- [4] 李灵芝,刘启兵,姜孟臣,等. 葛根素对体外破骨细胞性骨吸收的影响. 第三军医大学学报,2004,26 (20):1830-1833.
- [5] Huh JE, Yang HR, Park DS, et al. Puerariae radix promotes differentiation and mineralization in human osteoblast-like SaOS-2 cells. J Ethnopharmacol, 2006, 104 (3):345-350.
- [6] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, 1993, 123 (11):1939-1951.
- [7] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res, 1987,2(6):595-610.
- [8] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner,1991, 15:175-191.
- [9] Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian deficiency in rats. Am J Clin Nutr, 1998, 68:1358-1363.
- [10] Draper CR, Edell MJ, Dick IM, et al. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. J Nutr, 1997, 127:1795-1799.
- [11] Potter SM, Baum JA, Teng H, et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am J Clin Nutr, 1998, 68:1375-1379.
- [12] Wang X, Wu J, Chiba H, et al. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. J Bone Mineral Metab,2003, 21:268-275.
- [13] Wang X, Wu J, Chiba H, et al. Puerariae radix prevents bone loss in castrated mice. Metabolism: Clinical and Experimental, 2005, 54 (11):1536-1541.
- [14] Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, et al. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. Endocrinology, 1999, 140:1893-1900.
- [15] Ishimi Y, Arai N, Wang X, et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274:697-701.
- [16] Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporos Int, 1998, 8:274-281.
- [17] Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217:345-350.
- [18] Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. J Nutr, 2000, 130:1675-1681.
- [19] Chen G, Zhang J, Jiannong Y. Determination of puerarin, daidzein and rutin in Pueraria lobata (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. J Chromatogr A,

- 2001, 923 255-262.
- [20] Cao X, Tian Y, Zhang T, et al. Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 1999, 855 709-713.
- [21] Wang CY, Huang HY, Kuo KL, et al. Analysis of *Puerariae radix* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1998, 802 225-231.
- [22] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 1998, 139 4252-4263.
- [23] Manach C, Morand C, Crespy V, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*, 1998, 426 331-336.
- [24] Speroni E, Guerra MC, Rossetti A, et al. Anti-oxidant activity of *Pueraria Lobata* (Willd) in the rat. *Phytother Res*, 1996, 10 95-97.
- [25] Lin RC, Guthrie S, Xie CY, et al. Isoflavonoid compounds extracted from *Pueraria lobata* suppress alcohol preference in a pharmacogenetic rat model of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996, 20 659-663.
- [26] Keung WM, Vallee BL. Daidzin and its antidipsotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 2198-2203.
- [27] Miyazawa M, Sakano K, Nakamura S, et al. Antimutagenic activity of isoflavone from *Pueraria lobata*. *J Agric Food Chem*, 2001, 49 : 336-341.
- [28] Lee MK, Cho SY, Jang JY, et al. Effects of *Puerariae Flos* and *Puerariae Radix* extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. *Am J Chin Med*, 2001, 29 343-354.
- [29] Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, et al. Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sci*, 2000, 67 2997-3006.
- [30] Fan LL, O'Keefe DD, Powell WWJ. Pharmacologic studies on radix *puerariae* : effect of puerarin on regional myocardial blood flow and cardiac hemodynamics in dogs with acute myocardial ischemia. *Chin Med J*, 1985, 98 821-832.

(收稿日期 : 2007-12-26)