

葛藤提取物对去卵巢大鼠骨质疏松模型血液生化指标的影响

孙付军 王伟伟 刘逢芹 李贵海

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)05-0361-03

摘要:目的 观察葛藤提取物对去卵巢骨质疏松模型大鼠血液生化学指标的影响,为临床应用提供药效学依据。方法 15 个月龄 Wistar 大鼠,手术切除双侧卵巢 3 d 后,按照体重随机分组,每天灌胃葛藤提取物 200、100 和 50 mg/kg,给药 6 个月后,观察大鼠一般状况,血清生化学指标。结果 葛藤提取物明显改善造模大鼠一般状况,明显降低模型大鼠体重增加程度,对子宫系数的影响 3 个剂量均具有明显的统计学意义,降低模型大鼠血清碱性磷酸酶活性,提高血清雌二醇、骨钙素和降钙素水平。结论 葛藤提取物具有明显改善去卵巢大鼠骨质疏松模型血液生化指标的作用。

关键词: 葛藤提取物; 骨质疏松症; 大鼠; 雌激素

Influence of Kudzuvine extract on blood biochemistry in osteoporosis model of ovariectomized rats SUN

Fujun*, WANG Weiwei, LIU Fengqin, et al. * Shandong academy of chinese medicine, Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** Observation of the blood biochemistry changes of Kudzuvine Extract on osteoporosis model of ovariectomized rat. **Methods** After extirpated two side of ovary in rat three days, stochastic grouping along the weight of Wistar rats and give treatment of different medicine for six months. The general condition, blood biochemistry of rats were measured. **Results** Kudzuvine Extract improve the general condition rats obviously, reduce the degree of gain weight of model rats, and have obvious statistics discrepancy for uterus coefficient in three Kudzuvine Extract groups. Kudzuvine Extract can reduce alkaline phosphatase activity of blood. And it can improve the blood concentration of Estradiol, osteocalcin levels and calcitonin in medol rats. **Conclusion** Kudzuvine Extract has clear ameliorate effect for Osteoporosis model of rat extirpated ovary.

Key words: Kudzuvine Extract; Osteoporosis; Rat; Estrogen

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种代谢性骨病,它是以骨量减少和骨的微观结构退化为特征的一种全身性骨骼疾病^[1]。雌激素替代疗法(HRT)一直是绝经后骨质疏松症的首选方法,但它诱发生殖系统的癌症、引起深静脉血栓等方面的副作用使 HRT 的应用有了广泛争议^[2-3]。异黄酮类化合物又被称为“植物源雌激素”,葛藤提取物具有雌激素样作用^[4],推测葛根异黄酮可能有改善骨质疏松症的生物学活性。本研究以去卵巢大鼠模型来模拟绝经后 OP,观察葛藤提取物对由雌激素缺乏引起 OP 的作用,为进一步开发应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物

葛藤提取物:总黄酮 61.08%,其中葛根素 22.60%、大豆苷元 1.29%、大豆苷 19.97%,由山东省千佛山医院药剂科制备,批号:060411。将 200、100 和 50 mg/kg 剂量的药物,使用前分别配制成 2%、1%、0.5% 的水溶液,以 10 ml/kg 灌胃给药,1 次/d。尼尔雌醇片 2 mg/片,上海医药集团有限公司华联制药厂产品,批号:060901。以 1.5 mg/kg 剂量给药,给药前配制成 0.015% 的水溶液以 10 ml/kg 灌胃,2 次/周。

1.2 动物、环境及饲料

Wistar 雌性大鼠,15 月龄,280 ~ 300 g,80 只,山东大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20030004,合格证编号:0001387。实验在山东省

基金项目 山东省科技发展计划项目(032040101)

作者单位:250014 济南,山东省中医药研究院(孙付军、李贵海) 山东大学第二医院(王伟伟) 山东千佛山医院(刘逢芹)

通讯作者:李贵海,Email:guihai99@163.com

中医药研究院药理实验中心进行,许可证号:SYXK(鲁)20050052。全价营养鼠饲料,山东省实验动物管理中心提供,合格证号:SCXK(鲁)20040014。

1.3 主要仪器

KNOE PRO 型全自动生化分析仪,芬兰康艺仪器公司;GMJ 型全自动放射免疫 γ 计数器,江苏医疗电子研究所;YLS-16A 小动物骨骼强度测定仪,山东省医学科学院设备站产品。

1.4 试剂

碘 $[^{125}\text{I}]$ 骨钙素放射免疫分析药盒、碘 $[^{125}\text{I}]$ 降钙素放射免疫分析药盒,北京市普尔伟业生物科技有限公司产品,批号:20070804,20070824;碘 $[^{125}\text{I}]$ 雌二醇放射免疫分析药盒,北京科美东雅生物技术有限公司,批号:20070925;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒,磷(P)试剂盒,钙(Ca)试剂盒,北京中生北控生物技术股份有限公司产品,批号:070251,070061,070113。

2 方法

2.1 造模

雌性 Wistar 大鼠,40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉后仰位固定,分层剥离,暴露两侧卵巢,结扎后完整切除两侧卵巢,止血后分层缝合。假手术组做相同的手术操作,但不切除卵巢。术后连续 3 d 硫酸庆大霉素抗感染,自由饮水、摄食。

2.2 分组与给药

手术 3 日后剔除状态较差大鼠,按照体重随机分为 6 组:假手术组,去卵巢模型组,阳性对照组,葛藤提取物 200、100 和 50 mg/kg 组,每组 10 只。分组后各给药组给与相应药物,假手术组和模型组给以同体积凉开水,尼尔雌醇组给药 2 次/周(1.5 mg/kg,周一、四给药),连续灌胃 6 个月。每周称取体重,并按新体重调整灌胃剂量。各组大鼠自由饮水、摄食。

2.3 血生化指标

给药 6 个月后,颈外静脉采血,3000 r/min 离心 15 min,分离血清,分别测定血清钙、磷、碱性磷酸酶含量及血清雌二醇、骨钙素、降钙素含量。

2.4 脏器标本

充分暴露并剥离取出子宫,电子天平称重,计算子宫的脏器指数。脏器指数 = (子宫 $\div$ 体重) $\times$ 100%

2.5 统计学处理

所有实验数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 11.0 进行 t 检验分析。

3 结果

3.1 葛藤提取物对去卵巢大鼠体重及脏器系数的影响

连续给药 6 个月后,分别观察各组大鼠体重,结果提示葛藤对造模引起的大鼠体重增加具有明显的降低作用,其中高剂量组与模型组比较差异具有非常显著的统计学意义,中、低剂量作用也较明显;对子宫系数的影响 3 个剂量差异均具有明显的统计学意义,其中高剂量组影响最为明显,3 个剂量呈现较好的量效关系趋势,较尼尔雌醇组较差,见表 1。

表 1 葛藤提取物对去卵巢大鼠体重及脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	给药前体重(g)	6 个月后体重(g)	子宫系数(%)
假手术对照组	10	285.20 $\pm$ 16.98	370.22 $\pm$ 21.34**	0.30 $\pm$ 0.07**
模型对照组	10	280.70 $\pm$ 21.69	442.11 $\pm$ 51.73	0.07 $\pm$ 0.02
尼尔雌醇 1.5 mg/kg 组	10	281.20 $\pm$ 26.17	359.8 $\pm$ 23.31**	0.24 $\pm$ 0.06**
200 mg/kg 组	10	281.40 $\pm$ 26.64	382.3 $\pm$ 54.95**	0.15 $\pm$ 0.11**
100 mg/kg 组	10	282.30 $\pm$ 24.94	419.86 $\pm$ 36.98	0.11 $\pm$ 0.05 *
50 mg/kg 组	10	282.60 $\pm$ 20.31	423.25 $\pm$ 41.51	0.09 $\pm$ 0.02 *

注:与模型对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 葛藤提取物对去卵巢大鼠血清 Ca、P 含量和碱性磷酸酶的影响

葛藤提取物对大鼠血清钙磷含量影响不明显,见表 2。模型组钙磷含量也与对照组比较差异无统计学意义,提示造模对血清钙磷含量无明显影响。但造模引起碱性磷酸酶血清水平的明显升高,与假手术对照组比较差异有显著性统计学意义($P < 0.05$)。葛藤提取物明显降低血清碱性磷酸酶,高剂量组与模型组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$),其余两个剂量组也不同程度的降低其血清水平。

表 2 葛藤提取物对去卵巢大鼠血清 Ca、P 含量,碱性磷酸酶的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	Ca	P	ALP
假手术对照组	10	2.54 $\pm$ 0.09	1.45 $\pm$ 0.11	64.67 $\pm$ 12.59 *
模型对照组	10	2.35 $\pm$ 0.06	1.45 $\pm$ 0.21	84.67 $\pm$ 24.63
尼尔雌醇 1.5 mg/kg 组	10	2.53 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.29	74.50 $\pm$ 23.92
200 mg/kg 组	10	2.22 $\pm$ 0.16	1.29 $\pm$ 0.47	57.57 $\pm$ 15.32**
100 mg/kg 组	10	2.00 $\pm$ 0.07	1.30 $\pm$ 0.16	73.90 $\pm$ 24.96
50 mg/kg 组	10	2.01 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.19 *	67.50 $\pm$ 19.92

注:与模型对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 葛藤提取物对去卵巢大鼠血清 E_2 、骨钙素(BGP)、降钙素(CT)的影响

放射免疫分析大鼠血清雌二醇含量、骨钙素和降钙素水平,结果提示模型组大鼠血清雌二醇含量和血清降钙素水平明显降低,与空白对照组比较差

异具有显著统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),骨钙素水平下降程度不明显,与假手术组比较差异无统计学意义。尼尔雌醇组和葛藤提取物不同剂量组不同程度提高大鼠血清雌二醇浓度,其中葛藤提取物高剂量组作用最为明显,作用较尼尔雌醇更佳,中、低剂量亦不同程度提高模型大鼠的雌二醇浓度;对骨钙素的影响,模型大鼠与空白对照组比较差异无统计学意义,但尼尔雌醇组和葛藤提取物 3 个剂量组不同程度提高骨钙素含量,与模型组比较差异具有统计学意义。模型大鼠的降钙素水平与假手术组比较有明显下降,尼尔雌醇组和葛藤提取物 3 个剂量组不同程度提高降钙素水平,以高、中剂量明显($P < 0.01$),低剂量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 3。

表 3 葛藤提取物对去卵巢大鼠血清 E_2 、BGP、CT 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	E_2 (pg/ml)	BGP(pg/ml)	CT(pg/ml)
假手术对照组	10	$21.53 \pm 5.68^{**}$	1.55 ± 0.31	$0.77 \pm 0.21^*$
模型对照组	10	16.28 ± 2.34	1.52 ± 0.20	0.59 ± 0.17
尼尔雌醇 1.5 mg/kg 组	10	18.69 ± 3.11	$1.84 \pm 0.43^*$	$0.77 \pm 0.11^{**}$
200 mg/kg 组	10	$20.57 \pm 4.29^{**}$	$1.87 \pm 0.19^{**}$	$0.99 \pm 0.64^{**}$
100 mg/kg 组	10	$19.73 \pm 3.89^{**}$	$1.72 \pm 0.23^{**}$	$0.90 \pm 0.22^{**}$
50 mg/kg 组	10	17.21 ± 3.47	$1.72 \pm 0.07^{**}$	0.66 ± 0.17

注:与模型对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 讨论

葛藤为豆科植物野葛 *Pueraria Lobata* (Willd) Onwi 的地上部分干燥茎,作为葛根的非药用部位,其药用价值近年来已受到国内外学者的关注。葛藤主要含有大豆苷(daidziu)、大豆苷元(dadzein)、葛根素(pnerarin)等异黄酮成分。我们前期和国内其他学者的研究结果都证实葛藤和葛根的总黄酮含量相近,但其主要成分比例不同^[5-8]。

本研究在药学研究的基础上,结合骨质疏松发病学基础,选择了应用葛藤提取物治疗卵巢切除致骨质疏松模型大鼠的观察。发现连续给药 6 个月后,葛藤提取物明显改善造模大鼠一般状况,明显降低模型大鼠体重增加程度。对子宫系数的影响 3 个剂量均具有明显的统计学差异,对并且 3 个剂量呈现较好的量效关系趋势。去卵巢后大鼠体重增加可能是由于雌激素缺乏,大鼠活动减少,能量消耗下降及进食增多所致。也有人认为去卵巢动物的体重快速增长现象为机体抵抗去卵巢对骨骼影响的一种自我保护性反应,可以部分地补偿去卵巢大鼠的骨钙丢失,但不能完全阻止其发展^[9-10]。本研究中,应用

葛藤提取物治疗的大鼠体重与卵巢切除组有显著差异,能明显控制大鼠体重。同时葛藤提取物可能具有雌激素样活性,对机体雌激素的缺失起到了重要的补偿作用。

实验结果发现葛藤提取物明显降低去卵巢所致大鼠升高的血清碱性磷酸酶含量,提高模型大鼠血清雌二醇、骨钙素和降钙素水平。推测原因可能是提取物通过类雌激素样作用或通过上调雌激素水平,并作用于破骨细胞上的雌激素受体直接诱导凋亡、直接抑制破骨细胞的骨溶解释放;作用于成骨细胞上的雌激素受体,提高成骨细胞的活性,增加骨的生成^[11]。在一定程度上可以解释葛藤提取物降低碱性磷酸酶活性,提高模型大鼠血清雌二醇、骨钙素和降钙素水平的原因。

通过试验得到的结果可以认为:葛藤提取物通过不断调节血清生化指标,能使去卵巢大鼠的骨密度和骨钙含量得到明显增加;外源性提取物能使血清钙磷比处于较适的骨形成状态;使骨钙素、降钙素处于较活跃的水平,以通过增强骨的合成、抑制骨的重吸收而改善骨钙代谢,因此在内源性雌激素不足的情况下外源性类雌激素样物质可以在一定程度上防治骨质疏松症的发生。

【参 考 文 献】

[1] 郭世绂. 骨质疏松—基础与临床. 天津:天津科学技术出版社,2001.

[2] Marsden J. Hormone replacement therapy and breast cancer. Maturitas,2000, 341 (Suppl 2): 11-24.

[3] Task F. Postmenopausal estrogen replacement and risk forvenous thromboembolism: a systematic review andmeta-analy-sis for the U. S. Preventive Services Ann Intern Med,2002,136(9) 42.

[4] 黄筑艳,赵延涛,李焱. 葛根药理及临床研究进展.光明中医, 2007,22(6) 63-66.

[5] 刘逢芹,董其享,李宏建,等. 野葛根、藤及其提取物中相关异黄酮成分的含量测定. 中国中药杂志,2007,32(14): 1487-1489.

[6] 苏乐群,刘逢芹,韩清叶,等. 野葛藤总黄酮制备工艺研究. 中药材,2007,30(2) 226-228.

[7] 刘逢芹,李宏建,周杨星,等. 不同采集时间野葛不同部位总黄酮和葛根素含量比较. 植物资源与环境学报,2006,15(2): 79-80.

[8] 刘逢芹,董其享,李宏建,等. 野葛根、藤及其提取物中相关异黄酮成分的含量测定. 中国中药杂志,2007,32(13) 57-59.

[9] 陈训华,危剑安,陈燕平,等. 补肾方药对去卵巢雌鼠骨质疏松症防治作用的研究. 中国骨伤,1998,11(2) 12-15.

[10] 刘石平,廖二元,伍汉文,等. 绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价. 湖南医科大学学报,2001,26(2) 111-114.

[11] 王建华,李恩,孔德娟,等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度及骨代谢影响的实验研究. 天然产物研究和开发,2003,15(1) 43-45.

(收稿日期:2008-12-24)