

淫羊藿不同提取物对去势大鼠 PINP、NTx 影响的实验研究

蒋宜伟^{1,2} 刘宗权^{2*} 宋敏² 雷斌²

1. 甘肃中医学院附属医院, 兰州 730020

2. 甘肃中医学院, 兰州 730000

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 02-0142-04

摘要: **目的** 通过 PINP、NTx 指标的变化研究淫羊藿抗骨质疏松的作用机制。**方法** 采用去卵巢方法诱发大鼠骨质疏松模型, 淫羊藿不同提取物进行灌胃, 检测 PINP、NTx 等相关指标的变化, 评价淫羊藿抗骨质疏松的疗效。**结果** 与空白对照组相比, 模型组 E₂、PINP 含量明显降低 ($P < 0.001$), NTx 水平升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 淫羊藿不同提取物各剂量组均可提高去势大鼠 E₂ 水平 ($P < 0.05$), 提高 PINP 水平 ($P < 0.05$), 降低 NTx 水平 ($P < 0.05$); 淫羊藿水煎液各组 PINP 和 NTx 含量高于其他各组, 差异具有统计学意义。**结论** 淫羊藿具有雌激素样作用, 淫羊藿不同提取物均可改善去势大鼠骨质疏松症。

关键词: 淫羊藿; 淫羊藿苷; 淫羊藿总黄酮; PINP; NTx

Experimental study of the effect of different extracts of epimedium on PINP and NTx in ovariectomized rats

JIANG Yiwei^{1,2}, LIU Zongquan², SONG Min², LEI Bin²

1. The Affiliated Hospital of Gansu College of Traditional Chinese Medicines, Lanzhou 730020, China

2. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: LIU Zongquan, Email: yuqianfan010@163.com

Abstract: **Objective** Through the observation of changes of PINP and NTx, to study the anti-osteoporosis mechanism of epimedium. **Methods** The osteoporosis rat model was established using ovariectomy. Rats were gavaged with different extracts of epimedium. Then, the changes of PINP, NTx, and other related indexes were detected, in order to evaluate the efficacy of epimedium on anti-osteoporosis. **Results** Compared with that in the control group, the contents of E₂ and PINP in model group decreased significantly ($P < 0.001$), while the levels of NTx elevated ($P < 0.001$). Compared with that in model group, the levels of E₂ in ovariectomized rats in groups with different dosage of the extracts of epimedium improved significantly ($P < 0.05$), the levels of PINP also increased ($P < 0.05$), while the levels of NTx reduced ($P < 0.05$). The content of PINP and NTx in groups with epimedium decoction was higher than that in the other groups, and the difference was statistically significant. **Conclusion** Epimedium has estrogen-like effect. Different extracts of epimedium can improve osteoporosis in ovariectomized rats.

Key words: Epimedium; Icarin; Epimedium flavonoids; PINP; NTx

淫羊藿 (Epimedium) 为小檗科淫羊藿属植物, 是传统的补肾壮阳中药, 始载于《神农本草经》, 被列为中品, 性温, 味辛、甘, 归肝、肾经。具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效。其抗骨质疏松作用通过基础和临床应用基础研究, 取得了令人瞩目的成就。现代

药理实验研究表明, 生物碱和黄酮类成分为淫羊藿的主要成分, 其中淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷抗骨质疏松的疗效明显。本实验通过淫羊藿不同提取物对去势大鼠 I 型前胶原氨基末端肽 (PINP)、I 型胶原交联氨基末端肽 (NTx) 指标的影响, 研究淫羊藿抗骨质疏松症的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 2010 年甘肃省自然科学基金计划 (1010RJZA160)

* 通讯作者: 刘宗权, Email: yuqianfan010@163.com

1.1.1 动物与饲料:8 月龄 SD 雌性大鼠 120 只,体重(300g±20)g,SPF 级,饲料为标准大小鼠专用饲料。动物和饲料均由甘肃中医学院科研实验动物中心提供(动物许可证号:SCXK(甘)2011-0001)。

1.1.2 药品与试剂:仙灵骨葆(购自惠仁堂,由贵州同济堂制药有限公司生产,批号:1112089 国药准字 Z20025337),淫羊藿苷(由西安昊轩生物科技有限公司提供,纯度 98.2%,批号:YYH-120318),淫羊藿总黄酮(由西安昊轩生物科技有限公司提供,纯度 60.4%,批号:YYHHT-120415),淫羊藿生药(购自惠仁堂,经鉴定为柔毛淫羊藿)。Elisa 试剂盒由上海拜沃生物科技有限公司提供。

1.1.3 主要仪器:酶标仪 Benchmark Plus (BIORAD 美国);电动离心机 80-I (恒丰仪器厂 江苏金坛);超低温冰箱(海尔 中国);数显恒温水浴锅 HH-4(杜甫仪器厂 河南郑州)。

1.2 方法

1.2.1 分组:将大鼠按照体重进行编号,按照随机数字表法将大鼠随机分为假手术组 10 只,其余 110 只采用进行造模,术后 3 d 按照同样方法将大鼠随机分为:模型组,仙灵葆组,淫羊藿水煎液低、中、高剂量组,淫羊藿总黄酮低、中、高剂量组,淫羊藿苷低、中、高剂量组。

1.2.2 造模方法:采用公认的成年雌性大鼠去卵巢法制造骨质疏松症模型。用戊巴比妥钠(8 mg/mL)按照 40 mg/kg 体重进行腹腔麻醉,麻醉成功后,将大鼠仰卧位固定,术区剪毛备皮,局部碘伏消毒。定位:以两侧腹股沟上缘连线中点作一垂线,该交点为手术切口的下缘,从交点沿垂线向上延伸 2 cm,此段为手术切口。依次切开皮肤、皮下组织、肌层,打开腹腔,可见两侧子宫与阴道汇合处,沿子宫向上寻

找,可见子宫角上大量淡黄白色脂肪组织,在脂肪组织中可见一黄豆大小鲜红色团块组织,即为卵巢,其下方有一韧带与子宫角相连。将其仔细剥离结扎,予以切除。再以同样方法切除另一侧卵巢。逐层关闭腹腔。独笼喂养。假手术组仅在卵巢两侧切除部分脂肪组织。术后给予腹腔注射硫酸庆大霉素,每只 2.5 万 U。术后 1w 拆线。

1.2.3 给药方法:各组均从拆线后给药,每周灌胃 5 次,连续 12 w。假手术组与模型组灌胃相应体积的去离子水,仙灵骨葆灌胃剂量为 0.5 g/kg,淫羊藿水煎液低中高剂量组灌胃量分别为:1.5、3、6 g/kg,淫羊藿总黄酮低中高剂量组灌胃量分别为:70、140、280 mg/kg,淫羊藿苷低中高剂量组灌胃量分别为:2.5、5、10 mg/kg。各药物剂量按照人鼠体表面积法进行折算。

1.2.4 标本采集:血清标本采集灌胃结束后,所有大鼠腹腔麻醉,进行腹主动脉取血法进行取血,取血 6 mL,静置 2 h,2000 r/min 离心 20 min,取血清,放置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 指标检测:血清标本检测:E2、BAP、PINP、NTx、PTH 等生化指标,生化指标采用 Elisa 方法检测。以上检测方法严格按照说明进行操作。

1.3 统计学处理

数据处理采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,两样本之间均数比较采用独立样本 *t* 检验,成组设计采用单因素方差分析。实验数据计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验效能 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 模型组与空白对照组生化指标检测结果比较

表 1 模型组与空白对照组生化检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of biochemical results between the model group and the control group ($\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	E ₂ (pg/mL)	BLP (U/L)	PTH (pg/mL)	PINP (ng/mL)	NTx (nmol/L)
空白对照组	10	44.19 ± 14.56	31.21 ± 7.81	256.68 ± 102.23	4.26 ± 1.72	9.59 ± 1.34
模型组	10	13.91 ± 6.26	25.98 ± 5.08	173.56 ± 48.93	1.05 ± 0.71	12.98 ± 1.27
<i>t</i> 值		5.763	1.776	2.319	5.134	5.800
<i>P</i> 值		<0.001	>0.05	<0.05	<0.001	<0.001

由表 1 可知,空白对照组与模型组相比较,E2 水平明显降低($P < 0.001$),同时伴随 PINP、PTH 水平降低,NTx 水平升高($P < 0.05$),差异具有统计学意义。

2.2 淫羊藿不同提取物对去势大鼠生化指标的影响

3 讨论

I 型胶原占人体内骨基质的 90%,I 型原骨胶原有 N-(氨基)和 C-(羧基)延长端,在前胶原转化为胶原纤维质同时,它们被特异的蛋白酶去除,之后

表 2 淫羊藿不同提取物对去势大鼠各项生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of different extracts of epimedium on the biochemical indexes in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	E ₂ (pg/mL)	BLP (U/L)	PTH (pg/mL)	PINP (ng/mL)	NTx (nmol/L)
模型组	13.91 ± 6.26	25.98 ± 5.08	173.56 ± 48.93	1.05 ± 0.71	12.98 ± 1.27
阳性药物组	31.01 ± 10.73 *	37.15 ± 7.92 *	199.87 ± 54.42	3.09 ± 0.61 *	11.31 ± 1.61 *
水煎液低剂量组	46.13 ± 14.07 [○]	41.96 ± 10.69 *	90.39 ± 52.11 [○]	4.02 ± 0.80 [○]	9.31 ± 1.84 [○]
水煎液中剂量组	75.07 ± 13.21 ^{○△}	52.31 ± 9.10 ^{○△}	203.54 ± 55.66 [△]	3.76 ± 1.10 [△]	9.22 ± 2.15 [○]
水煎液高剂量组	44.02 ± 13.04 ^{○△▲}	41.94 ± 10.29 [▲]	296.07 ± 70.03 ^{○△▲}	5.86 ± 0.97 ^{○△▲}	9.43 ± 1.55 [○]
总黄酮低剂量组	35.31 ± 7.88 ^{**}	46.26 ± 5.89 [○]	246.82 ± 93.55 ^{**}	2.28 ± 0.80 ^{○☆}	1.77 ± 1.16 ^{○☆}
总黄酮中剂量组	39.44 ± 12.53 [◇]	33.34 ± 4.34 ^{△◇}	256.28 ± 60.09 *	2.38 ± 0.95 [◇]	2.33 ± 1.13 ^{○◇}
总黄酮高剂量组	53.55 ± 12.15 ^{○△▲}	39.46 ± 7.65 *	338.36 ± 89.46 ^{○△▲}	2.63 ± 0.81 [▽]	1.92 ± 1.21 ^{○▽}
苷低剂量组	47.25 ± 9.92 ^{○★}	33.67 ± 7.78 ^{**★}	244.88 ± 49.12 ^{**}	2.60 ± 0.58 ^{**}	5.57 ± 2.14 ^{○**★}
苷中剂量组	44.56 ± 8.17 ^{○◇}	45.71 ± 8.83 ^{○△◆}	258.76 ± 62.33 [○]	3.02 ± 0.80 *	4.06 ± 2.94 ^{○◇}
苷高剂量组	36.71 ± 11.37 ^{△▽}	44.41 ± 9.41 ^{○△}	366.75 ± 70.70 ^{○△▲▽}	4.41 ± 1.00 ^{○△▲▽▽}	8.69 ± 1.10 ^{○△▲▽}

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,与阳性药物组比较,[○] $P < 0.05$;组内比较:与低剂量组比较,[△] $P < 0.05$,与中剂量组比较,[▲] $P < 0.05$;组间比较:与水煎液低剂量组比较,[☆] $P < 0.05$,与水煎液中剂量组比较,[◇] $P < 0.05$,与水煎液高剂量组比较,[▽] $P < 0.05$;与总黄酮低剂量组比较,[★] $P < 0.05$,与总黄酮中剂量组比较,[◆] $P < 0.05$,与总黄酮高剂量组比较,[▽] $P < 0.05$

形成骨基质。每合成 1 个胶原分子,就会有 1 个 PINP 分子产生,因此 PINP 成了 I 型胶原质沉积的特异性标志物。在 I 型纤维原细胞构造期间,PINP 进入细胞内部,但最终进入血液,其在血循环中的含量主要反映 I 型胶原的合成速率及骨转换情况,升高提示 I 型胶原合成速率加快,骨转换活跃。而 β-Crosslaps 是由 I 型胶原降解后释放入血的片段,从肾脏中排出。近来研究显示,较之 BGP 和 PICP,PINP 是新骨形成更为特异和敏感的指标^[1]。邢学农^[2]的研究结果表明,骨质疏松性骨痛组及非重力骨折组 PINP 均明显高于骨龄健康者,在此二组中,取年龄 ≥ 55 岁患者以及性别均为女性时分别进行统计,仍得到同样结果,显示出 PINP 的血液循环中的稳定性以及在同类疾病中所表现的一致性。而刘刚^[3]的研究表明,在绝经后老年妇女骨质疏松的诊断中,β-Crosslaps 的诊断准确性高于 PINP;但是由于该研究样本量较小,最佳临界值需待后期扩大样本量,作进一步的分析来确定。另外 PINP 还可用于骨转移瘤的早期诊断,而且具有明显特异性^[4]。

NTx 是 I 型胶原纤维分子间交联物质。I 型胶原占骨有机物质的 90%,NTx 是骨胶原纤维在骨质吸收过程中降解产生的,同时被释放入血,其包含的定位于 α-交联 N-端的独特氨基酸序列,是骨胶原区分其他组织 I 型胶原的重要特征,可作为骨吸收的特异性指标,能客观的反映患者骨破坏的情况^[5]。Clines^[6]也把它作为诊断骨吸收破坏特异性最高的指标。因此在肺癌患者早期有无骨转移方面可以做较为准确的判断,具有有较高的临床价值^[7,8]。徐涛^[9]认为 NTx 也可应用于系统性红斑狼疮患者早期骨质破坏的诊断。其研究表明血中 NTx 水平

升高反映系统性红斑狼疮患者骨吸收能力增强。

骨代谢过程中产生的相关生化指标改变早于影像学检查,可更快速、敏感的反映骨质的变化,并且检测骨代谢生化指标更方便、易行、低廉,对骨质疏松的检测具有重要的意义。刘俊恒^[10]通过对骨质疏松症患者部分骨代谢指标进行检测再经 BMD 检测证实血清 NTx 可作为骨吸收的特异性指标,对骨质疏松患者的诊断和疗效评估均具有重要意义。

本实验采用去卵巢法制造骨质疏松大鼠模型,通过与空白对照组比较,模型组 E₂、PTH、PINP 水平明显降低,骨吸收指标 NTx 明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。证明去卵巢大鼠骨质疏松模型复制成功。淫羊藿提取物各组均能升高 ALP、PINP 等骨形成指标,降低 NTx 骨吸收指标,改善骨密度,促进骨矿沉积,证明淫羊藿提取物各组均可促进骨形成,抑制骨吸收,改善骨质疏松症状,对去势大鼠骨质疏松症有治疗作用。

从血清 PINP、NTx 含量比较,淫羊藿水煎液组 PINP 含量高于淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷组(低 $P < 0.05$,中、高 $P > 0.05$),血清 NTx 含量淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷组均低于淫羊藿水煎液组($P < 0.05$),淫羊藿水煎液组骨组织处于高代谢状态,可能具有促进成骨细胞活性作用,在促进骨形成方面具有很好的优势;淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷组骨组织处于低代谢状态,其作用机理可能与抑制破骨细胞的活性有关,淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷在抑制骨吸收方面发挥主要作用。淫羊藿中可能含有不属于黄酮类成分在抗骨质疏松症中起到辅助作用,有待于进一步研究验证。

(下转第 188 页)

【 参 考 文 献 】

[1] Liu ZH, Yang DZ. Chinese people diagnostic criteria for primary osteoporosis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999, 5 (1) : 1-3.

[2] Li J, Chang M, Wu JK. Osteoporotic clinical type of back pain treatment [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2007, 13 (11) : 794-796.

[3] Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral Disease Branch of Osteoporosis Treatment Guidelines (2011) [J]. China Osteoporosis and Bone Mineral Diseases, 2011, 4 (1) : 1 -17.

[4] Ding Y, Liu SL, Huang DS. Calcitonin joint Caltrate D treatment of osteoporotic back pain short-term efficacy evaluation [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2005, 14 (10) : 1224-1226.

[5] Wang HW. An observation salmon calcitonin treatment of senile osteoporosis study [J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2003, 22 (6) : 345-347.

[6] Liu X. Aclasta —— whole new generation bisphosphonate drugs. China Osteoporosis and Bone Mineral Diseases, 2008, 12 : 160.

[7] Zhao F, Cong BH, Song F. Aclasta treatment of women with postmenopausal and senile osteoporosis efficacy analysis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2011, 17 (10) : 915-917.

[8] Deeks ED, Perry CM. Zoledronic acid: a review of its use in the theatment of osteoperosis [J]. Drugs Aging, 2008, 25 (11) : 963-986.

[9] Guo SZ, Zhao B, Xie ZH. Zoledronic acid treatment of primary osteoporosis efficacy [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Surgery, 2012, 27 (11) : 1037-1038.

[10] Reid IR. Zoledronate: efficacy and safety [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21 : 83-87.

[11] Delmas PD, Munoz F, Black DM, et al. Effects of yearly zoledronic acid 5 mg on bone turnover markers and relation of PINP with fracture reduction in postmenopausal women with osteoprosis [J]. J bone Miner Res, 2009, 24 (9) : 1544-1551.

(收稿日期: 2013-01-14; 修回日期: 2013-08-10)

(上接第 144 页)

【 参 考 文 献 】

[1] Dominguez CC, Sosa HM, Traba ML, et al. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis [J]. Osteoporosis Int, 1998, 8 : 147-151.

[2] 邢学农, 任安, 杨静, 等. PINP 在诊断骨质疏松症中的应用 [J]. 临床中老年保健医学, 1999, 2 (3) : 121-124.

Xing XN Ren A, Yang J, et al. Application of PINP in the Diagnosis of Osteoporosis [J]. Clin Healthcare, 1999, 2 (3) : 121-124. (in Chinese)

[3] 刘刚, 卢光琇. β -Crosslaps 和 PINP 在绝经后妇女骨质疏松诊断中的效能评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31 (8) : 801-802.

Liu G, Lu GX. Diagnostic efficacy of serum β -Crosslaps and amino terminal procollagen extension propeptide (PINP) measurements for identifying postmenopausal women with osteoporosis [J]. Int Lab Med, 2010, 31 (8) : 801-802. (in Chinese)

[4] 王抒, 张军宁, 乔田奎. 血清 I 型前胶原氨基端前肽、I 型前胶原羧基端前肽、I 型胶原羧基端肽在骨转移性癌诊断中的应用 [J]. 中国临床医学, 2011, 18 (4) : 456-458.

Wang, Zhang JN, Qiao TK. Diagnostic Clinical Value of Serum PINP, PICP and ICTP Contents in Cancer Patients with Bone Metastases [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2011, 18 (4) : 456-458. (in Chinese)

[5] 肖静, 丛琳, 张文娟, 等. 多发性骨髓瘤治疗前后血清 NTX-I 和 BALP 及 OPG 变化临床意义分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19 (14) : 1112-1114.

Xiao J, Cong L, Zhang Wen-juan, et al. Expressions and

clinical significance of NTX-I, OPG and BALP in serum of MM patients [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2012, 19 (14) : 1112-1114. (in Chinese)

[6] Clines GA, Guise TA. Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone [J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12 (3) : 549-583.

[7] Jae Ho Chung, Moo Suk Park, Young Sam Kim, et al. Usefulness of bone metabolic markers in the diagnosis of bone metastasis from lung cancer [J]. Yonsei Med J, 2005, 46 (3) : 388-393.

[8] Zhao YY, Xue C, Hou X, et al. Changes of bone resorption marker (NTx) in chemotherapy plus zoledronic acid versus chemotherapy alone for nasopharyngeal cancer patients with bone metastases [J]. Eur J Cancer, 2011, 47 (6) : 848-853.

[9] 徐涛, 张振强. SLE 患者血清 B-ALP、PINP、NTX、CTX 水平的研究 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3 (20) : 42-43.

Xu T, Zhang ZQ. The research of the serum level of B-ALP、PINP、NTX、CTX in patients with system ic lupus erythem atosus [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2009, 3 (20) : 42-43. (in Chinese)

[10] 刘俊恒, 潘继承, 倪黎刚, 等. 骨质疏松患者部分骨代谢指标测定的临床意义 [J]. 实用老年医学, 2012, 26 (3) : 213-214.

Liu JH, Pan JC, Ni LG, et al. Clinical value of the determination of bone metabolism parameters in patients with osteoporosis [J]. Practical Geriatrics, 2012, 26 (3) : 213-214. (in Chinese)

(收稿日期: 2013-07-26)

淫羊藿不同提取物对去势大鼠 PINP、NTx 影响的实验研究



作者: 蒋宜伟, 刘宗权, 宋敏, 雷斌, [JIANG Yiwei](#), [LIU Zongquan](#), [SONG Min](#), [LEI Bin](#)
作者单位: 蒋宜伟, [JIANG Yiwei](#)(甘肃中医学院附属医院, 兰州 730020; 甘肃中医学院, 兰州 730000), 刘宗权, 宋敏, 雷斌, [LIU Zongquan](#), [SONG Min](#), [LEI Bin](#)(甘肃中医学院, 兰州, 730000)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2014(2)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201402007.aspx