

· 药物研究 ·

野葛叶总黄酮提取物对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用

王翰华^{1*} 陆元勋² 吴庆玲¹

1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

2. 宁波明贝中药业有限公司, 浙江 宁波 315000

中图分类号: R956 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 10-1311-04

摘要: 目的 探讨野葛叶总黄酮提取物对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用。方法 选择 6 月龄 SD 雌性大鼠 60 只, 随机分为假手术组、模型组、己烯雌酚组、野葛叶总黄酮提取物低和高剂量组。观察各组胫骨抗弯力, 右股骨和腰 4 椎体的骨密度和骨生物力学性能, 血清中钙 (Ca)、磷 (P) 和碱性磷酸酶 (ALP) 的变化。结果 野葛叶总黄酮高、低剂量组及己烯雌酚组大鼠胫骨抗弯力, 股骨和腰椎的骨生物力学性能均高于模型组 ($P < 0.05$); 野葛叶总黄酮高剂量组及己烯雌酚组大鼠股骨和腰椎骨密度, ALP 的变化均高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 野葛叶总黄酮提取物通过提高大鼠胫骨抗弯力, 增加股骨和腰椎的骨密度, 改善股骨和腰椎的骨生物力学性能, 提高血清 ALP 含量等因素防治骨质疏松。

关键词: 野葛叶; 总黄酮; 骨质疏松

The therapeutic effect of extracts of Kudzu leaf flavonoids on osteoporosis in ovariectomized rats

WANG Hanhua¹, LU Yuanxun², WU Qinling¹

1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

2. Ningbo Ming Bei China Pharmaceutical Co., Ltd. Ningbo 315100, China

Corresponding author: WANG Hanhua, Email: wanghh@mail.zjpc.net.cn

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of extracts of Kudzu leaf flavonoids (EKLF) on osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** A total of 60 adult female SD rats were randomly assigned to 5 groups: sham operation group, ovariectomized group, diethylstilbestrol group, low dose EKLF group, and high dose EKLF group. The bending force of tibia, bone mineral density of the right femur and the 4th lumbar vertebra and bone biomechanical characteristics were determined. The serum levels of calcium (Ca), phosphorus (P) and alkaline phosphatase (ALP) were also measured. **Results** The bending force of tibia and all the biomechanical parameters in high and low dose EKLF groups and the diethylstilbestrol group were higher than those in the ovariectomized group ($P < 0.05$). Bone mineral density of the lumbar vertebra and the right femur and the serum levels of ALP in the high dose EKLF group and diethylstilbestrol group were significantly higher than those in the ovariectomized group ($P < 0.05$). **Conclusion** EKLF has therapeutic effect on osteoporosis by enhancing the bending force of tibia, increasing bone mineral density of the lumbar vertebrae and the femur, improving bone biomechanical characteristics and raising the serum levels of ALP.

Key words: Kudzu leaf; Total flavonoids; Osteoporosis

葛根是一味传统的药食同源的中药, 其原植物是豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)^[1]。现代药理研究表明, 葛根具有防治骨质疏松, 保护心脏, 降血压, 抗凋亡, 降血糖, 保护神经, 抗氧化和治疗神经病理性疼痛等多种活性。社会人口老龄化使因骨与关节退化引起骨质疏松 (OP) 成

为全世界所面临的重要问题。近年来葛根因含葛根素、大豆苷及大豆苷元等异黄酮类成分, 在防治骨质疏松方面的作用得到广泛关注^[2,3]。但关于野葛叶的相关报道较少。本研究探讨了野葛叶总黄酮提取物对去卵巢 OP 大鼠胫骨抗弯力, 右股骨和腰 4 椎体的骨密度和骨生物力学性能, 血清中钙 (Ca)、磷 (P) 和碱性磷酸酶 (ALP) 的影响, 旨在探讨野葛叶总黄酮防治骨质疏松的活性, 扩大野葛的药用部位, 为野葛叶的进步开发利用提供参考。

基金项目: 2014 年浙江省大学生科技创新活动计划 (2014R433007)

* 通讯作者: 王翰华, Email: wanghh@mail.zjpc.net.cn

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 主要试剂:野葛叶购于安徽省亳州市药材市场,经浙江医药高等专科学校中药学院杨雄志教授鉴定为豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 的叶;戊巴比妥钠(美国 SIGMA 公司);己烯雌酚片(广东华南药业集团有限公司);所用试剂均为化学纯。

1.1.2 主要仪器:1000N 数显推拉力计(上海甘坛测力有限公司);双能 X 线骨密度仪(美国 HOLOGIC 公司);AGS-10KNG 万能材料试验机(日本岛津公司);全自动生化分析仪(美国 BECKMAN COULTER 公司),试剂盒由北京中生生物工程高技术公司提供。

1.1.3 实验动物:6 月龄 SD 雌性大鼠,体重(270 ± 20)g,购于浙江大学实验动物中心,实验动物许可证号:SYXK(浙)2012-0178。

1.2 实验方法

1.2.1 野葛叶总黄酮提取物的制备:参考笔者之前的方法^[4],取野葛叶粉末,置锥形瓶中,加 60% 乙醇,超声 30 min,减压回收溶剂,即得。

1.2.2 分组及模型建立:将大鼠随机分成 5 组,每组 12 只,分为假手术组、模型组、己烯雌酚组、野葛叶总黄酮提取物低和高剂量组。用戊巴比妥钠(35mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,无菌环境下打开腹腔,模型组、己烯雌酚组、野葛叶总黄酮提取物低和高剂量组切除双侧卵巢,假手术组保留卵巢仅切除卵巢周围少量脂肪组织,关闭腹腔并逐层缝合。

1.2.3 给药方法:手术 1 w 后开始给药,大鼠灌胃给药。野葛叶总黄酮提取物低和高剂量组分别灌胃 5 和 10 g/kg;己烯雌酚组灌胃 20 μg/kg;假手术组和模型组灌胃等体积的纯净水。每周称量体重,并根据体重调节给药量,连续给药 10 w。治疗结束后断头处死大鼠。取血,离心后取血清于 -20℃ 保存备测;另取胫骨、右后肢股骨及第 4 腰椎,剔除骨表面软组织,称重,备测。

1.2.4 参数测定:胫骨抗弯力测定:将大鼠胫骨置推拉力计上,由中点处下压,记录胫骨断裂时压力。骨密度和骨生物力学性能:由双能 X 线骨密度仪和万能材料试验机测定。血清中 Ca、P 和 ALP:由全自动生化分析仪,根据试剂盒说明进行测定。

1.3 统计学处理

实验中所有检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS18.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 野葛叶总黄酮提取物对去卵巢大鼠胫骨抗弯力的影响

与假手术组比较,模型组大鼠胫骨抗弯力降低明显($P < 0.05$)。与模型组比较,己烯雌酚组及野葛叶总黄酮低、高剂量组大鼠胫骨抗弯力均显著提高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠胫骨抗弯力比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of bending force of tibia among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	胫骨抗弯力(N)
假手术组	78.41 ± 5.48
模型组	74.96 ± 8.551
己烯雌酚组	83.52 ± 7.322
低剂量组	80.48 ± 8.812
高剂量组	85.23 ± 7.862

注:与假手术组比较,¹ $P < 0.05$;与模型组比较,² $P < 0.01$

2.2 野葛叶总黄酮提取物对去卵巢大鼠股骨、腰椎骨密度的影响

模型组大鼠股骨、腰椎骨密度较假手术组降低明显($P < 0.05$)。己烯雌酚组及野葛叶总黄酮高剂量组大鼠股骨、腰椎骨密度均高于模型组($P < 0.05$)。野葛叶总黄酮低剂量组大鼠股骨、腰椎骨密度与模型组无显著差异,见表 2。

表 2 各组大鼠股骨、腰椎骨密度的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of F-BMD and L-BMD among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	股骨 BMD(g/cm ²)	腰椎 BMD(g/cm ²)
假手术组	0.208 ± 0.009	0.099 ± 0.006
模型组	0.169 ± 0.0101	0.085 ± 0.0051
己烯雌酚组	0.210 ± 0.0072	0.097 ± 0.0032
低剂量组	0.182 ± 0.008	0.088 ± 0.006
高剂量组	0.209 ± 0.0092	0.097 ± 0.0052

注:与假手术组比较,¹ $P < 0.05$;与模型组比较,² $P < 0.05$

2.3 野葛叶总黄酮提取物对大鼠股骨生物力学性能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠股骨弹性模量、刚度、最大应力及最大承载力均明显降低($P < 0.05$)。己烯雌酚组及野葛叶总黄酮低、高剂量组大鼠腰椎上述骨生物力学指标均较模型组升高($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠股骨生物力学性能的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of biomechanical properties of the femur among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	弹性模量 (Mpa)	刚度 (N/mm)	最大应力 (N/mm ²)	最大承载力 (N)
假手术组	8263.81 ± 855.09	223.61 ± 20.34	201.97 ± 19.08	123.87 ± 12.53
模型组	5314.27 ± 678.351	159.27 ± 23.651	143.85 ± 22.721	92.05 ± 10.261
己烯雌酚组	7963.57 ± 531.682	219.17 ± 25.272	197.56 ± 18.362	119.44 ± 9.862
低剂量组	7194.26 ± 783.242	197.82 ± 23.822	180.11 ± 20.732	103.24 ± 10.732
高剂量组	8052.81 ± 673.262	228.39 ± 24.662	206.36 ± 23.572	128.25 ± 14.172

注:与假手术组比较,¹ $P < 0.05$;与模型组比较,² $P < 0.05$

2.4 野葛叶总黄酮提取物对大鼠腰椎生物力学性能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠腰椎弹性模量、刚度、最大应力及最大承载力均明显降低($P < 0.05$)。

己烯雌酚组及野葛叶总黄酮低、高剂量组大鼠腰椎上述骨生物力学指标均较模型组升高($P < 0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠腰椎生物力学性能的比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of biomechanical properties of the lumbar vertebrae among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	弹性模量 (Mpa)	刚度 (N/mm)	最大应力 (N/mm ²)	最大承载力 (N)
假手术组	395.28 ± 68.77	1008.33 ± 148.58	29.94 ± 4.52	328.52 ± 52.59
模型组	288.43 ± 52.691	729.83 ± 139.641	20.15 ± 3.871	251.83 ± 48.771
己烯雌酚组	391.27 ± 49.382	997.27 ± 141.372	28.43 ± 3.982	318.95 ± 33.252
低剂量组	335.37 ± 44.752	801.62 ± 138.842	23.76 ± 2.852	280.21 ± 30.062
高剂量组	389.71 ± 46.272	1001.78 ± 143.942	28.24 ± 4.732	330.28 ± 31.532

注:与假手术组比较,¹ $P < 0.05$;与模型组比较,² $P < 0.05$

2.5 野葛叶总黄酮提取物对去卵巢大鼠血清 Ca、P 及 ALP 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清 Ca 升高明显($P < 0.05$)。与模型组比较,己烯雌酚组血清 Ca 降低明显($P < 0.05$),而野葛叶总黄酮高剂量组血清 ALP 升高明显($P < 0.05$)。各组血清 Ca、P 水平差异无统计学意义,见表 5。

表 5 各组大鼠血清 Ca、P、ALP 含量的比较($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of serum levels of Ca, P, and ALP among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	血 Ca (μmol/L)	血 P (μmol/L)	血 ALP (μmol/L)
假手术组	2.80 ± 0.35	2.69 ± 0.38	129.29 ± 17.68
模型组	3.23 ± 0.231	3.02 ± 0.45	114.36 ± 20.59
己烯雌酚组	2.75 ± 0.292	2.22 ± 0.42	122.62 ± 22.16
低剂量组	3.09 ± 0.19	2.11 ± 0.57	128.33 ± 24.70
高剂量组	2.84 ± 0.28	2.32 ± 0.36	135.45 ± 19.522

注:与假手术组比较,¹ $P < 0.05$;与模型组比较,² $P < 0.05$

3 讨论

去卵巢大鼠已成为绝经后骨质疏松比较经典的模型^[5-8]。大鼠胫骨抗弯力,股骨和腰椎的骨密度和骨生物力学性能,血清中 Ca、P 和 ALP 的变化成为去卵巢大鼠模型中评价抗骨质疏松的主要指标^[6-8]。本实验结果显示:在切除大鼠卵巢 10w 后,模型组

大鼠胫骨抗弯力,腰椎、股骨骨密度明显低于假手术组,说明骨质疏松模型造模成功;在己烯雌酚组及野葛叶总黄酮高、低剂量组中大鼠胫骨抗弯力明显提高,说明野葛叶总黄酮提取物可以提高大鼠胫骨抗弯力进而改善骨的质量;在己烯雌酚组及野葛叶总黄酮高剂量组中大鼠腰椎及股骨骨密度下降均受抑制,说明野葛叶总黄酮提取物具有抑制大鼠骨量丢失的作用;在己烯雌酚组及野葛叶总黄酮高、低剂量组中,大鼠的股骨和腰椎的骨生物力学性能均较模型组明显提高,说明野葛叶总黄酮提取物能抑制大鼠骨生物力学性能下降,降低骨折的风险;在野葛叶总黄酮高剂量组中,大鼠血清 ALP 升高明显,但血清 Ca、P 降低不明显,说明野葛叶总黄酮提取物可提高大鼠 ALP 含量,促进成骨细胞功能活动促进骨的形成,但对抑制骨吸收效果不显著。

目前,对于葛根的研究和开发已经较为深入,但有关野葛叶的报道还较少见。根据已有报道,野葛叶中成分与葛根基本相似,推测可能具有类似的药理作用。对野葛叶的进步开发利用,可以扩大野葛的药用部位,逐渐代替葛根药用,利于药源再生。本实验结果提示野葛叶总黄酮提取物在去卵巢大鼠体内具有防治骨质疏松作用,但其具体作用机制有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 292.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. The People's Republic of China pharmacopoeia (Vol. 1)[S]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015, 292.
- [2] Wacharaporn Tiyasatkulvit, Narattaphol Charoenphandhu, et al. Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19: 1147-1155.
- [3] 吴乃中, 李红丽, 崔淑云. 葛根对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响[J]. *中华医学研究杂志*, 2006, 6(1): 6-9.
- Wu NZ, Li HL, Cui SY. Effects of pueraria on the expression of OPG/RANKL mRNA of osteoblasts [J]. *Chinese Journal of Medical Research*, 2006, 6(1): 6-9.
- [4] 王翰华, 陆元勋, 胡梦月, 等. 分光光度法测定葛根叶中总黄酮的含量[J]. *科技创新与应用*, 2015, 12: 21.
- Wang HH, Lu YX, Hu MY, et al. Spectrophotometric method for determining the content of Kudzu leaf flavonoids [J]. *Technology Innovation and Application*, 2015, 4(12): 21.
- [5] 王海敏, 汤旭磊, 田德增. 叶酸对去卵巢大鼠骨质疏松的保护作用[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27(7): 594-598.
- Wang HM, Tang HM, Tang XL. Protective effect of folic acid on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2011, 27(7): 594-598.
- [6] 李世昌, 李浏, 刘体伟, 等. 不同方式运动对去卵巢大鼠骨密度、骨生物力学及代谢指标的影响[J]. *体育学刊*, 2012, 19(2): 132-137.
- Li SC, Ji L, Liu TW, et al. Effects of different ways of exercising on the bone mineral density and bone biomechanical and metabolic indexes of ovariectomized rats [J]. *Journal of Physical Education*, 2012, 19(2): 132-137.
- [7] 陈立强, 赵文杰, 王振, 等. 杜仲叶醇提物对去卵巢大鼠所致骨质疏松的防治作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(8): 2190-2191.
- Chen LQ, Zhao WJ, Wang Z, et al. The therapeutic effect of ethanol extracts of *Eucommia ulmoides* leaves on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2015, 35(8): 2190-2191.
- [8] 王艳, 周广举, 严宗逊, 等. 川牛膝在去卵巢大鼠体内的骨保护作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(8): 918-921.
- Wang Y, Zhou GJ, Yan ZX, et al. The protective effect of *cyathula officinalis kuan* on bone in ovariectomized rats [J]. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(8): 918-921.
- (收稿日期: 2016-03-25)
-
- (上接第 1310 页)
- [5] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids. *J Intern Med*, 2005, 257(4): 374-384.
- [6] Tian LI, Yu X. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction-interrelated and mutually regulated. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 783-794.
- [7] Hernandez JL, Olmos JM, Romana G, et al. Bone mineral density in statin users: a population-based analysis from a Spanish cohort. *J Bone Miner Metab*, 2014, 32(2): 184-191.
- [8] Li SI, Guo H, Liu Y, Wu F, et al. Relationships of serum lipid profiles and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 82(1): 53-58.
- [9] Garg MK, Marwaha RK, Tandon N, et al. Relationship of lipid parameters with bone mineral density in Indian population. *Indian J Endocrinol Metab*, 2014, 18(3): 325-332.
- [10] XU Chong, XU Guo. Glucocorticoids, Adipose Metabolism and Insulin Resistance [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2009, 40(1): 19-23.
- [11] Tang CP, Jang T, Guo J, et al. The Effect of Fufang Zhenzhu Tiaozhi Capsule on Lipid Metabolism in Atherosclerotic Rabbits. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(8): 1285-1289 (in Chinese).
- [12] Yao HX, Guo J, Tang CP, et al. Liver hypolipidemic protection of Compound Zhenzhu Tiaozhi Capsula on nonalcoholic fatty liver disease in rats and its mechanism. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2011, 42(10): 2074-2077 (in Chinese).
- [13] Chen YF, Guo J, Yao HX, et al. Effect of compound Zhenzhu Tiaozhi capsule on LXR- α and SREBP-1c expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2014, 30(4): 467-471 (in Chinese).
- [14] Wang L, Tao W, Luo D, et al. Potential synergistic effects of Chinese herbal prescription FTZ components detected in blood towards hepatic lipid-modulating targets. *Complement Ther Med*, 2014, 22(5): 887-893.
- [15] Li M, Li Y, Deng W, et al. Chinese bone turnover marker study: reference ranges for C-terminal telopeptide of type I collagen and procollagen I N-terminal Peptide by age and gender. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103841.
- [16] Farahmand P, Marin F, Hawkins F, et al. Early changes in biochemical markers of bone formation during teriparatide therapy correlate with improvements in vertebral strength in men with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2013, 24(12): 2971-2981.
- [17] Liu XH, Lu W, Qian H, et al. The effect of glucocorticoid on bone mineral density and bone turnover makers in patients with glomerular diseases. *Journal of Practical Medicine*, 2014, 30(22): 3583-3586.
- [18] Ren H, Shen GY, Jiang XB, et al. Phasic changes of bone mass, bone turnover markers, and estrogen levels at different time points after glucocorticoid intervention and their correlation in rats. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2015, 29(30): 307-314.
- (收稿日期: 2015-12-07)