

淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松的影响

刘波^{1*}, 张睿², 徐彭¹, 刘清华³, 谢珍¹, 李斌¹, 徐国良¹, 童文婷¹

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 江西广播电视大学, 南昌 330006;
3. 福建中医药大学, 福州 350108)

[摘要] **目的:**研究淫羊藿防治去卵巢大鼠骨质疏松症的作用及初步机制。**方法:**雌性 7 月龄 SD 大鼠分为正常组, 模型组和淫羊藿高、低剂量组共 4 组 ($n=8$), 除正常组行假手术外, 其余均手术彻底摘除卵巢, 术后进行模型筛选, 1 周后依照正常组、模型组灌胃生理盐水, 淫羊藿高、低剂量组灌胃淫羊藿提取液 (剂量以生药量计为 $50, 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续给药 90 d。给药 45 d 时检测血清钙 (Ca^{2+}), 90 d 时检测血清 Ca^{2+} 、血清磷 (P)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、碱性磷酸酶 (ALP) 活性、血清雌二醇 (E_2) 和睾酮 (T) 含量, 并分离胫骨进行病理切片观察。**结果:**与模型组血清 Ca^{2+} (3.01 ± 0.33) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比, 给药 45 d 后低、高剂量淫羊藿组血清 Ca^{2+} 均下降 [$(2.48 \pm 0.39), (2.86 \pm 0.34) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, ($P < 0.05, P < 0.01$)], 90 d 后高剂量淫羊藿组血清 Ca^{2+} 下降更明显 (1.76 ± 0.53) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淫羊藿能降低血清 MDA (8.4 ± 1.3) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$), 提高血清 P (4.61 ± 0.82) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), SOD 活性 (110 ± 13) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), 碱性磷酸酶活力 (4.4 ± 0.89) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), 雌二醇水平 (25.66 ± 9.38) $\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$) 和睾酮水平 (1.95 ± 1.21) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$)。胫骨病理切片显示高剂量淫羊藿能预防骨小梁断裂, I 级和 II 级病变率占 87.5%, 无 IV 级病变。**结论:**淫羊藿明显提高性激素水平, 清除活性氧, 可能是其防治骨质疏松症的主要机制。

[关键词] 淫羊藿; 骨质疏松症; 卵巢摘除

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0178-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070178

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130123.1531.005.html>

[网络出版时间] 2013-01-23 15:31

Influence of Epimedii Folium on Ovariectomy-induced Osteoporosis in Rats

LIU Bo^{1*}, ZHANG Rui², XU Peng¹, LIU Qing-hua³,
XIE Zhen¹, LI Bin¹, XU Guo-liang¹, TONG Wen-ting¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
2. Jiangxi Engineering Vocational College, Nanchang 330006, China;
3. Fujian University of TCM, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Epimedii Folium on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Method:** The female SD rats were divided into sham operated group (Sham), ovariectomized group (Model), high concentration Epimedii Folium with ovariectomized group (H-EF) and low concentration Epimedii Folium with ovariectomized group (L-EF). The serum Ca^{2+} were examined after administration for 45 days and 90 days. And the serum P, superoxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA), estradiol (E_2), testosterone (T) and alkaline phosphatase (ALP) were examined after 90 days of administration. The tibial slice was also analyzed. **Result:** Compared with the model group, the serum Ca^{2+} was decreased [$(2.48 \pm 0.39) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), $(2.86 \pm 0.34) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)] by epimedium after 45 days of administration, and the serum MDA (8.4 ± 1.3) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$) for 90 days. But the serum ALP (4.4 ± 0.89) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P <$

[收稿日期] 20120917(020)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(973 计划)(2010CB530603);江西省自然科学基金项目(20114BAB205073);江西省卫生厅中医药科研项目(2011A142);江西中医学院省重点学科青年科研资助项目;江西中医学院博士科研启动资金项目

[通讯作者] * 刘波, 博士, 从事分子药理学研究, E-mail: liubozhr@yahoo.com.cn

0.05), $P(4.61 \pm 0.82) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), $E_2(25.66 \pm 9.38) \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), $T(1.95 \pm 1.21) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$) and $\text{SOD}(110 \pm 13) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$) were all increased by high concentration *Epimedii Folium*. **Conclusion:** It may be one of the mechanisms on osteoporosis that *Epimedii Folium* enhance estrogen and decrease ROS.

[**Key words**] *Epimedii Folium*; osteoporosis; ovariectomy

骨质疏松症(osteoporosis)是以全身性骨量减少、骨微细结构退化为特征,表现为腰背疼痛、或畸形、骨折的一种慢性疾病,占全球常见病、多发病的第7位。据估计2020年美国骨量减少或骨质疏松症患者将达6100万^[1],而2006年我国50岁以上的骨质疏松症患者已达6944万,发病率呈上升趋势,伴发骨折是导致患者死亡的主要因素^[2],因此从中医药中寻找有效的治疗药物具有重要意义。中医辨证认为,骨质疏松症多由肾虚,痰瘀痹阻而成,属虚实夹杂之证,所谓“久病及肾,及痰,及瘀”。中药淫羊藿性辛温味甘,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,大量资料显示具有防治骨质疏松症的作用^[3],我们前期也发现淫羊藿能促进成骨细胞的增殖^[4],但淫羊藿对骨质疏松症的防治作用和机制仍不清楚^[5]。本研究从血清钙(Ca^{2+})、磷(P)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、碱性磷酸酶(ALP)及性激素的变化,观察淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松模型的影响,初步阐明淫羊藿防治骨质疏松症与活性氧的变化关系密切。

1 材料

1.1 动物 雌性 Sprague-Dawley 大鼠,7月龄,体重250~270 g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXKC(赣)2009-0012。恒温,恒湿,实验期间自由饮水,实验前12 h禁食。

1.2 药物与试剂 淫羊藿(*Epimedii Folium*)购自南昌帮中药站,由江西中医学院药学院褚小兰教授和付小梅副教授鉴定为箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* Maxim)。血清 Ca^{2+} , P, ALP(批号20000201), SOD(批号20100205), MDA(批号20100201)检测试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。雌二醇(E_2 ,批号20000122),睾酮(T,批号20000125)放射免疫检测试剂盒,均购自卫生部上海生物制品研究所。

1.3 仪器 743微电脑紫外分光光度计(上海生化仪器厂生产),SN-682-500型微电脑放免 γ 计数器(中国科学院上海原子核研究所生产)。

2 方法

2.1 骨质疏松症模型制备 2%戊巴比妥钠40

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,从脊柱肋骨处切开肌肉、腹膜,揭开脂肪层,切除左右两侧卵巢,90 d后即可复制骨质疏松症模型。正常组仅做腹腔切开,将卵巢移出后复位,不做切除,均缝合切口。

2.2 模型动物筛选 根据正常雌性大鼠具有动情周期,而卵巢切除大鼠缺乏动情周期的特点,采取阴道涂片检查法,连续观察1周判断卵巢切除是否彻底,有动情周期的大鼠表明卵巢切除不彻底,弃之不用。

2.3 淫羊藿水提液的制备 取淫羊藿1500 g,加双蒸水过液面2 cm,共煎煮3次,每次30 min。合并滤液,浓缩至300 mL,成为淫羊藿高浓度提取液(含生药 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),同时将部分淫羊藿高浓度提取液成倍稀释为淫羊藿低浓度提取液(含生药 $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.4 分组和给药 实验共分成4组,其中筛选后的24只卵巢切除彻底的雌性大鼠,随机分成3组,即模型组、淫羊藿高、低剂量组(H-淫羊藿组,L-淫羊藿组,按生药量计为50,25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组8只,以未作卵巢切除雌性大鼠(8只)为正常组。实验各组在造模1周后给药,正常组、模型组均ig生理盐水,L-淫羊藿组和H-淫羊藿组分别ig淫羊藿2.5,5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,给药容积均为10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续给药90 d。

2.5 血清 Ca^{2+} , P, SOD, MDA, ALP活力, E_2 , T含量检测 连续给药45 d时,大鼠眼眶取血1 mL,静置2 h,离心取血清,依照试剂盒方法分别检测血清 Ca^{2+} 变化。连续给药90 d后,动物处死前,心脏取血,静置2 h,离心取血清。参照试剂盒方法,分别检测血清 Ca^{2+} , P, SOD, MDA含量及ALP活力,采用放射免疫测定法检测血清 E_2 , T含量。

2.6 胫骨病理切片 连续给药90 d后,处死动物,细心分离胫骨周围组织,将胫骨置于10%甲醛液固定4 h,以钙螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙15 d(以骨针轻轻透过骨质为度),再以不同梯度的乙醇逐渐脱水,以二甲苯透明,常规石蜡包埋、切片,HE染色,通过显微镜, $\times 200$ 镜下观察。根据手术摘除卵巢后骨小梁的粗细、间距、连续性与假手术组之间存在明显差异,因此课题组拟定依据骨小梁的粗细、

间距和连续性,对组织结构破坏程度病理变化分级,标准如下:Ⅰ级,骨小梁较粗,结构紧密,连续性好,无断裂;Ⅱ级,骨小梁较粗,结构较稀疏,有轻微断裂;Ⅲ级,骨小梁变细,间距较宽,有明显断裂;Ⅳ级,骨小梁较细,间距较宽,有连续断裂,甚至形成空洞。Ⅲ、Ⅳ级现象表明骨质结构破坏,提示骨质疏松。实验中根据骨组织结构病理变化Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ级数目分布的差异进行统计分析。

2.7 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计分析软件,组间比较以 *t* 检验进行分析比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清 Ca^{2+} , P 的影响 表 1 显示,大鼠摘除卵巢 45 d 后,血清钙即明显升高,且与摘除卵巢 90 d 后的血清钙基本一致,表明摘除卵巢 45 d 钙离子即被解离并释放至血液,骨形成减少的现象已经出现,属于骨质疏松症的早期现象。从给药组来看,淫羊藿能明显降低血清中钙离子水平,抑制钙离子的解离,促进骨形成, H-淫组的作用尤为明显。而血清磷在摘除卵巢 90 d 后显著下降, L-淫和 H-淫组均能升高血清磷水平。

3.2 对 MDA 含量及 SOD, ALP 活性的影响 表 2 显示,模型组大鼠的血清 SOD 活力与正常组相比有

表 1 淫羊藿对去卵巢大鼠血清钙、磷的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	mmol·L ⁻¹		
		Ca ²⁺		P
		45 d	90 d	90 d
正常	-	2.51 ± 0.26	2.50 ± 0.39	4.70 ± 0.89
模型	-	3.01 ± 0.33	3.19 ± 1.04	2.73 ± 0.67
淫羊藿	25	2.48 ± 0.39 ¹⁾	2.74 ± 0.70 ¹⁾	3.04 ± 0.72 ¹⁾
	50	2.86 ± 0.34 ¹⁾	1.76 ± 0.53 ²⁾	4.61 ± 0.82 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

下降倾向,但血清 MDA 有升高倾向。淫羊藿高剂量组能明显提升血清 SOD 活力;淫羊藿高、低剂量组能明显降低血清 MDA 含量与文献报道相同^[6]。模型组大鼠血清 ALP 活性较正常组明显降低,淫羊藿高、低剂量组均能升高血清碱性磷酸酶水平。

3.3 对性激素分泌的影响 模型组大鼠的血清 E₂ 水平明显低于正常组大鼠,而高、低剂量淫羊藿组均能显著提升血清 E₂ 水平,但仍远低于正常组。雌激素由卵巢所分泌,摘除卵巢 90 d 后血清中仍保留较低的雌激素水平,而且淫羊藿仍能提高血清雌激素水平,说明雌激素可能存在其他的转化途径。另外,模型组血清 T 的浓度呈上升趋势,并无显著性意义,淫羊藿能提高血清睾酮水平,可能与淫羊藿具有性激素样作用有关。见表 2。

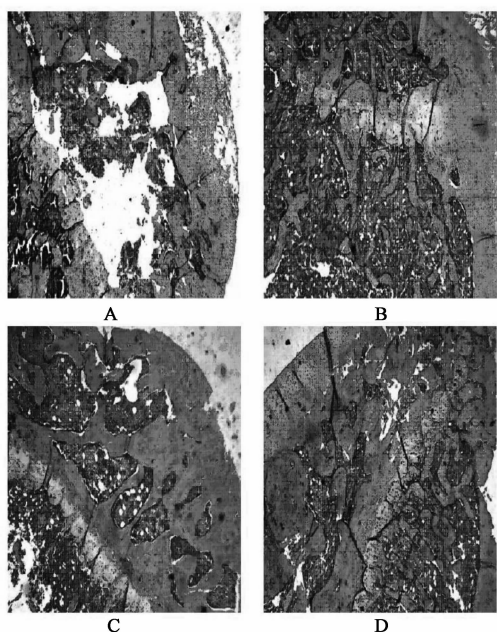
表 2 淫羊藿对去卵巢大鼠血清 SOD, ALP 活力, MDA, E₂, T 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·L ⁻¹	MDA/mmol·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	E ₂ /pg·L ⁻¹	T/ng·L ⁻¹
正常	-	96 ± 9	9.6 ± 1.1	4.94 ± 0.55	53.76 ± 18.86 ¹⁾	0.58 ± 0.25
模型	-	82 ± 11	12.0 ± 1.8	3.72 ± 0.47	15.88 ± 5.08	0.76 ± 0.29
淫羊藿	25	89 ± 10	9.1 ± 0.8 ²⁾	4.47 ± 0.97 ¹⁾	23.89 ± 12.59 ¹⁾	1.10 ± 0.61 ¹⁾
	50	110 ± 13 ²⁾	8.4 ± 1.3 ²⁾	4.4 ± 0.89 ¹⁾	25.66 ± 9.38 ¹⁾	1.95 ± 1.21 ²⁾

3.4 对骨微细结构的影响 胫骨组织切片显示,摘除大鼠卵巢 90 d (即模型组)骨皮质变薄,骨小梁相对稀疏,间距增宽,且明显呈现断裂现象,病理分级Ⅲ,Ⅳ级病变率达 100%,其中Ⅳ级病变率达 75%,而未摘除卵巢大鼠 (即正常组)的骨皮质厚,骨小梁较细,相互交叉紧密,但连续性比较好,没有断裂现象,病理分级均属Ⅰ,Ⅱ级。各淫羊藿治疗组镜下均可见骨皮质较厚,骨小梁较粗,结构比较紧密,低剂量淫羊藿组骨小梁仍较稀疏,大多区域存在断裂现象,Ⅱ,Ⅲ级病变率占 75%,仍有 1 例属Ⅳ级。而高剂量淫羊藿组骨小梁连续性较好,几乎没有断裂现象,仅Ⅰ级和Ⅱ级病变率就占 87.5%,无Ⅳ级病变,见图 1。

4 讨论

骨质疏松症在传统医学多属“骨痿”、“骨痹”、“腰痛”等范畴,如《素问·痿论》“肾者水藏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿”,辨证主要是肾虚^[7]。现代医学认为骨质疏松症的发病与内分泌代谢紊乱、营养结构失调、缺乏锻炼等复杂因素密切相关,采用激素替代等方式进行治疗,取得一定疗效,但副作用比较常见。传统中药在长期用药防治骨质疏松症中存在有利因素^[8],淫羊藿具有补肾、强筋骨、祛风湿的功效,单独或配伍其他中药防治骨质疏松症,均取得良好疗效^[9-10]。近年来也发现淫羊藿苷、黄酮类等都具有防治骨质疏松症的作用^[11-12],进一步说明淫羊藿防治骨质疏松症的作用。



A. 模型组; B. 正常组; C. 淫羊藿 25 g·kg⁻¹组; D. 淫羊藿 50 g·kg⁻¹组

图1 淫羊藿对骨结构的影响(HE染色, ×200)

物质基础。

我们前期研究发现,淫羊藿及其主要成分均能促进成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶,促进骨形成^[4]。碱性磷酸酶表达是进入细胞外基质成熟期的早期标志,与钙盐晶体在细胞外基质中结合,促使基质矿化。本研究发现摘除卵巢45 d,血清钙即明显下降且与卵巢摘除90 d无明显差别,说明钙离子解离一定程度降低了基质矿化,是早期发现骨质疏松症的重要指征,而淫羊藿能明显降低血清钙浓度,说明调节钙离子转运可能防治骨质疏松症。

淫羊藿具有激素样作用^[13],在骨质代谢中发挥重要作用。研究已证实雌激素减少可诱导骨质疏松症产生^[14],研究发现雌性激素减少可诱导体内活性氧产生^[15],是骨质疏松症发生、发展的重要因素^[16],从本研究模型组发现,卵巢摘除能明显降低雌激素、睾酮水平,提高MDA含量。但在淫羊藿防治组我们发现雌激素和睾酮水平明显高于模型组,与赵丕文等^[10]报道存在一定的差异,应该与鼠种、给药时间的不同等因素有关。研究还发现淫羊藿能明显提高SOD水平,降低MDA含量,说明淫羊藿具有很强的抗氧化作用,可能与提高雌激素水平有关,雌激素/活性氧可能是骨代谢疾病发病信号通路的关键调节点。

[参考文献]

- [1] Zayzafoon M. Inhibition of NFAT increases osteoblast differentiation by increasing Fra-2 expression [J]. *J Muscu Neuro Inter*, 2005, 5(4):347.
- [2] 张亚军,刘忠厚,张鹏. 绝经后骨质疏松症流行病学研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 3(16):229.
- [3] 刘友刚,吴剑威,王威,等. 淫羊藿抗骨质疏松症的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2009, 11(3):13.
- [4] 韩立民,刘波,徐彭. 淫羊藿总黄酮对成骨细胞增殖的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2003, 37(6):55.
- [5] 康学,刘仁慧,王秀娟. 淫羊藿、女贞子抗骨质疏松症的应用与机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21):331.
- [6] 李瑾, Francesco Menichini, 蒋建勤. 淫羊藿的自由基清除与抗氧化活性[J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(21):3.
- [7] 韦大文,尚立芝,李沛,等. 补肾方治疗去势雌鼠骨质疏松及其机制的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10):125.
- [8] 郭杨,马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(7):188.
- [9] 曾炎辉. 淫羊藿治疗绝经后骨质疏松症50例[J]. *陕西中医*, 2005, 26(5):405.
- [10] 邓炜,郑民强,黄勇其. 黔产2种淫羊藿抗小鼠骨质疏松药效对比研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(7):939.
- [11] 宋渊,李盛华,何志军,等. 淫羊藿苷对去势雌性大鼠骨质疏松的影响[J]. *军医进修学院学报*, 2012, 33(4):400.
- [12] 明磊国,陈克明,葛宝丰,等. 淫羊藿苷与染料木黄酮对体外培养成骨细胞增殖及矿化成熟影响的对比研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(16):2240.
- [13] 赵丕文,王大伟,王玲巧,等. 用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等10种中药雌激素样作用的实验研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 29(10):686.
- [14] Beck M M, Hansen K K. Role of estrogen in avian osteoporosis[J]. *Poult Sci*, 2004, 83: 200.
- [15] Kang L S, Chen B, Reyes R A. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300: 2105.
- [16] Manolagas S C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. *Endocrine Reviews*, 2010, 31(3):266.

[责任编辑 聂淑琴]