

仙灵骨葆微波辅助提取物抗大鼠骨质疏松症

赵海平^{1,2}, 罗云¹, 张婧¹, 李敏¹, 廖正根^{1,*}, 杨明¹

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨采用微波辅助提取技术(MAE)与传统提取工艺(TE)所得仙灵骨葆提取物的抗骨质疏松作用差异,为 MAE 的进一步推广及仙灵骨葆的临床应用提供资料。**方法:**健康 SD 大鼠,随机分为正常对照组、模型组、福善美组、仙灵骨葆传统提取物中剂量组(1.0 g·kg⁻¹),微波辅助提取物低、中、高剂量组(0.33,1.0,3.0 g·kg⁻¹)。上午除正常对照组外,各组采用维甲酸灌胃造模(80 mg·kg⁻¹),1 次/d,共 2 周,同时下午除正常对照组与模型组外,各给药组灌胃给药,1 次/d,共 4 周。给药结束后测定大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎的骨密度(BMD)。**结果:**模型组与正常对照组比较,大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD(0.267 5 ± 0.011 9), (0.228 9 ± 0.015 2), (0.247 1 ± 0.012 6) g·cm⁻²,水平显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与仙灵骨葆 TE 中剂量组(0.272 7 ± 0.013 3) g·cm⁻²比较,仙灵骨葆 MAE 中剂量组大鼠胫骨干骺端 BMD(0.283 3 ± 0.020 0) g·cm⁻²水平明显升高($P < 0.05$);与福善美组比较,仅 MAE 高剂量组胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD(0.290 1 ± 0.014 3), (0.251 5 ± 0.006 7), (0.261 7 ± 0.007 9) g·cm⁻²水平与之未有明显差异。**结论:**采用 MAE 所得的仙灵骨葆提取物抗骨质疏松作用明确,且具剂量依赖性;较之同等剂量的传统提取物,MAE 提取物的抗骨质疏松作用呈增强趋势,今后应注重 MAE 在提升药物疗效与安全性等领域的研究。

[关键词] 仙灵骨葆;微波辅助提取;传统提取;骨质疏松

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0183-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120921.1555.006.html>

[网络出版时间] 2012-09-26 15:55

[收稿日期] 20120415(003)

[基金项目] “863 计划”中药生产创新工艺及装备研发项目(2009AA043202)

[第一作者] 赵海平,博士,从事中药药理及药效学研究,Tel:0791-87118985,E-mail:cdzhp3690098@163.com

[通讯作者] *廖正根,教授,博士,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:0791-87119011,E-mail:lyzlyg@163.com

- [5] 管珂,陈筱清,王强,等. 南蛇藤茎的化学成分研究[J]. 中草药,2007,38(10):1455.
- [6] Hua H, Li M J, Luo T, et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(7):3853.
- [7] Jeon Hoon. Anti-metastatic effects of *Celastrus orbiculatus* extract in B16F10 melanoma cells [J]. Natural Product Sciences, 2011, 17(2):135.
- [8] Yang H L, Kuo Y H, Tsai C T, et al. Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(1):290.
- [9] Bush S, Renaud S J, Schleussner E, et al. mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3 [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(10):1724.
- [10] Lee C H, Hong C H, Yu H S, et al. Transforming growth factor- β enhances matrix metalloproteinase-2 expression and activity through AKT in fibroblasts derived from angiofibromas in patients with tuberous sclerosis from angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex [J]. Br J Dermatol, 2010, 163(6):1238.
- [11] Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production [J]. FASEB J, 2001, 15(11):1953.

[责任编辑 聂淑琴]

Therapeutic Effects of Microwave-assisted Extract of Xianling Gubao on Experimental Osteoporosis in Rats

ZHAO Hai-ping^{1,2}, LUO Yun¹, ZHANG Jing¹, LI Min¹, LIAO Zheng-gen^{1*}, YANG Ming¹

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To compare the therapeutic effects of Xianling Gubao (XLGB) extracts by microwave-assisted extraction (MAE) and traditional extraction (TE) on osteoporosis, and to provide data for the further generalization of MAE and clinical application of XLGB. **Method:** Healthy SD rats were randomly divided into 7 groups: normal control group, osteoporosis model group, Fosamax group, middle-dose of XLGB by TE group ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low-dose of XLGB by MAE group ($0.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle-dose of XLGB by MAE group ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose of XLGB by MAE group ($3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). In the morning all the rats except the normal control group were given retinoic acid ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) through intragastric administration for 2 weeks, at the same time in the afternoon all the rats except the normal control group and the osteoporosis model group were given corresponding drugs once per day for 4 weeks. After that, bone density (BMD) of tibial metaphysis, femoral metaphysis and lumbar were determined. **Result:** Compared with the normal control group, the BMD of tibial metaphysis (0.2675 ± 0.0119) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, femoral metaphysis (0.2289 ± 0.0152) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and lumbar (0.2471 ± 0.0126) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ of the osteoporosis model group were obviously decreased ($P < 0.01$); compared with the osteoporosis model group, the BMD of tibial metaphysis, femoral metaphysis and lumbar of all the administration group were obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with middle-dose of XLGB by TE group (0.2727 ± 0.0133) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, the BMD of tibial metaphysis of middle-dose of XLGB by MAE group (0.2833 ± 0.0200) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ were obviously increased ($P < 0.05$); only did the BMD of tibial metaphysis (0.2901 ± 0.0143) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, femoral metaphysis (0.2515 ± 0.0067) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and lumbar (0.2617 ± 0.0079) $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ of the high-dose of XLGB by MAE group have no obvious differences with Fosamax group. **Conclusion:** The therapeutic effect of XLGB by MAE on osteoporosis was exact and dose dependent. The effect of XLGB by MAE was better than that by TE. It is suggested that more attention should be paid to the therapeutic effect and safety of MAE.

[Key words] Xianling Gubao; microwave-assisted extract; traditional extract; osteoporosis

骨质疏松症(osteoporosis)是一种多因素所致的骨骼系统疾病,以单位体积内骨量减少和骨的微细结构破坏为特征,致使骨脆性增加,骨折的危险性增大,严重影响了患者的生活质量,属中医“骨痿”、“骨枯”的范畴^[1]。仙灵骨葆胶囊(由淫羊藿、续断、丹参、知母、补骨脂、地黄等组成)是临床治疗骨质疏松症的常用药物,效果明显^[2]。

目前,微波辅助提取技术(MAE)以其操作简便、省时、节能及选择性好等独特优势,已被具有创新意识者应用于中药材有效物质的提取,是替代传统提取工艺方法的现代高新技术手段^[3-4]。本研究小组已对MAE在仙灵骨葆有效物质提取应用中的工艺条件进行过优化考察。本实验旨在通过建立维

甲酸诱导的大鼠继发性骨质疏松症模型,探讨采用MAE与传统提取工艺(TE)所得提取物的抗骨质疏松作用差异,为该技术的推广及仙灵骨葆的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠,雄性,56只,体重(350 ± 12)g,由中国科学院上海实验动物中心提供,合格证号SCXK(沪)2009-004,于同等条件下分笼饲养,自由进食标准饲料与饮用蒸馏水。

1.2 药物 由江西中医学院现代制剂教育部重点实验室,分别参照前期考察工艺及药典方法制备仙灵骨葆微波辅助提取物与传统提取物,并低温干燥保存。

1.3 试剂 维甲酸片(山东良福制药有限公司,批号110901),福善美片(Merck sharp & Dohme Italia SPA,批号100608),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号F20040419)。

1.4 仪器 Hologic QDR-4500A型扇形束双能X射线吸收法(DXA)骨密度仪(美国,Hologic公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 健康SD大鼠,适应性饲养2周后,随机分为7组,即:正常对照组、模型组、福善美组、仙灵骨葆传统提取物(TE)中剂量组、仙灵骨葆微波辅助提取物(MAE)低、中、高剂量组,8只/组。参照相关文献^[5-6],除正常对照组外,各组大鼠上午均灌胃给予造模药物维甲酸 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,溶媒为0.5% CMC-Na(正常对照组给与等量的0.5% CMC-Na),1次/d,共2周。同时下午按指定剂量灌胃给予各治疗药物的CMC-Na溶液(模型组和正常对照组给与等量的0.5% CMC-Na),1次/d,共4周;福善美组 $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,TE组 $1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,MAE低、中、高剂量组 $0.33, 1.0, 3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 取材 所有动物末次给药前禁食不禁水16 h,给药后1 h断头处死,取大鼠右侧胫骨与股骨,以及第4,5,6节腰椎(保留椎体和棘突),小心除净附在骨上的肌肉和软组织。将所取标本以生理盐水浸泡的纱布包裹后放入标记的自封袋中, $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 体重及生长情况观察 实验期间密切观察大鼠生活情况(包括摄食、饮水、活动、皮肤色泽等),实验前、实验开始后每周用天平测量大鼠体质量,观察其变化。

2.4 骨密度测定 取出保存的骨标本,采用骨密度仪及所附小动物骨密度(BMD)软件,测量并自动记录骨面积、骨矿含量及骨密度等数据^[7]。

2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,利用SPSS 13.0软件包进行多组间比较的方差分析及 t 检验进行分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状况 在维甲酸造模完成时,正常对照组大鼠活动主动、灵活,毛色光感无异常,而模型组大鼠活动明显减少,体重减轻,食量减少,反应迟钝,体毛乍起枯疏,出现拱背等表现,个别动物解剖时发现肢体骨折现象;4周时模型组大鼠上述现象有所好转,而各剂量组与模型对照组比较,活动较多,毛色较好,体重显著性增加,与空白对照组无

明显差异。

3.2 对骨质疏松症大鼠BMD的影响

3.2.1 对大鼠骨质疏松大鼠右侧胫骨干骺端BMD的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠胫骨干骺端BMD显著下降($P<0.01$);与模型组比较,TE剂量组、MAE低剂量组大鼠胫骨干骺端BMD明显升高($P<0.05$),MAE中、高剂量组显著升高($P<0.01$);与TE剂量组比较,MAE中剂量组大鼠胫骨干骺端BMD明显升高($P<0.05$),MAE高剂量组显著升高($P<0.01$);与福善美组比较,只有MAE高剂量组大鼠胫骨干骺端BMD升高与之未有明显差异。见表1。

表1 仙灵骨葆2种提取物对大鼠右侧胫骨干骺端BMD的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	BMD/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
正常对照	-	0.2802 ± 0.0096
模型	-	$0.2675\pm 0.0119^{1)}$
福善美	1.00	$0.3063\pm 0.0128^{3)}$
仙灵骨葆(TE)	1.00	$0.2731\pm 0.0216^{2)}$
仙灵骨葆(MAE)	0.33	$0.2727\pm 0.0133^{2)}$
	1.00	$0.2833\pm 0.0200^{3)}$
	3.00	$0.2901\pm 0.0143^{3,4)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与仙灵骨葆(TE) $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较⁴⁾ $P<0.01$ (表2~3同)。

3.2.2 对大鼠骨质疏松大鼠右侧股骨干骺端骨密度的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠股骨干骺端BMD显著下降($P<0.01$);与模型组比较,TE剂量组、MAE低剂量组大鼠股骨干骺端BMD明显升高($P<0.05$),MAE中、高剂量组显著升高($P<0.01$);与TE剂量组比较,MAE剂量组大鼠股骨干骺端BMD未有明显差异,MAE高剂量组大鼠股骨干骺端BMD明显升高($P<0.05$);与福善美组比较,MAE中、高剂量组股骨干骺端BMD升高与之未有明显差异。见表2。

3.2.3 对大鼠骨质疏松大鼠第4,5,6腰椎BMD的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠腰椎骨BMD明显下降($P<0.05$);与模型组比较,TE剂量组、MAE低、中剂量组大鼠腰椎骨BMD明显升高($P<0.05$),MAE高剂量组显著升高($P<0.01$);与TE剂量组比较,MAE中剂量组大鼠腰椎骨BMD未有明显差异,MAE高剂量组明显升高($P<0.05$);与福善美组比较,只有MAE高剂量组大鼠腰椎BMD升高与之未有明显差异。见表3。

表 2 仙灵骨葆 2 种提取物对大鼠右侧
股骨干骺端 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/g·cm ⁻²
正常对照	-	0.243 0 ± 0.012 6
模型	-	0.228 9 ± 0.015 2 ¹⁾
福善美	1.00	0.250 7 ± 0.010 1 ³⁾
仙灵骨葆 TE	1.00	0.245 9 ± 0.016 5 ²⁾
仙灵骨葆 MAE	0.33	0.245 5 ± 0.006 1 ²⁾
	1.00	0.250 2 ± 0.012 3 ³⁾
	3.00	0.251 5 ± 0.006 7 ³⁾

表 3 仙灵骨葆 2 种提取物
对大鼠第 4,5,6 腰椎 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/g·cm ⁻²
对照	-	0.259 5 ± 0.006 4
模型	-	0.247 1 ± 0.012 6 ¹⁾
福善美	1.00	0.264 4 ± 0.010 7 ³⁾
仙灵骨葆 TE	1.00	0.257 8 ± 0.006 9 ²⁾
仙灵骨葆 MAE	0.33	0.253 8 ± 0.008 6 ²⁾
	1.00	0.259 6 ± 0.013 8 ²⁾
	3.00	0.261 7 ± 0.007 9 ³⁾

4 讨论

骨质疏松是骨代谢异常的疾病,即骨吸收与骨形成的动态平衡受到破坏,使骨脆性增加。已知骨组织的强度有 75% ~ 85% 与骨密度(BMD)有关,目前 BMD 仍为诊断骨质疏松症的金标准。维甲酸临床上常用于治疗皮肤病和白血病,但有致骨质疏松的不良反应,其骨质疏松症模型在发病方面与人类有较大的相似性,且周期短,骨质疏松明确,易于重复^[8-11]。

MAE 在 20 世纪 90 年代就已经在医药组分提取领域得到应用。目前,国内已将之广泛应用于中药有效成分的提取研究领域^[12-13]。本实验基于前期研究,通过建立骨质疏松症模型,对分别采用 MAE 与传统提取工艺所得的仙灵骨葆提取物,进行了抗骨质疏松的药效学比较研究。结果显示,采用 MAE 所得的仙灵骨葆提取物,能够显著改善骨质疏松症大鼠胫骨与股骨干骺端、以及第 4,5,6 腰椎的 BMD 下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随剂量增加改善作用增强,具有剂量依赖性,但与福善美相比,只有高剂量(临床常用剂量的 3 倍)的抗骨质疏松作用与之接近;在同等剂量下,与传统提取工艺所得提取物相比,采用 MAE 所得提取物的抗骨质疏松优势

不明显,但整体而言有抗骨质疏松作用增强的趋势。

综上所述,本实验中采用 MAE 所得的仙灵骨葆提取物,虽然抗骨质疏松作用明确,但与传统提取工艺所得提取物相比作用优势并不是很突出。由此提示该技术作为具有替代传统提取工艺方法潜力的现代高新技术,目前研究不仅要关注其省时、节能及选择性等优点,更要注重如何提升疗效,甚至于安全性评价等领域的研究。

[参考文献]

[1] 张岩,吴春福. 中药制剂仙灵骨葆防治骨质疏松症研究进展[J]. 中医药信息,2007,24(3):16.

[2] 唐卡毅,仙灵骨葆防治骨质疏松症的研究进展[J]. 重庆医学,2009,38(12):1535.

[3] 郭景强. 微波辅助提取技术及其在中药提取中的应用[J]. 天津药学,2010,22(4):63.

[4] 梁新丽,王春柳,王光发,等. 响应曲面法优化微波辅助提取淫羊藿中淫羊藿苷工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):11.

[5] 王劲松,胡锡,琴糕君,等. 仙灵骨葆对卵巢大鼠骨密度和骨代谢的影响[J]. 陕西中医学院学报,2010,33(3):64.

[6] 杨如会,柏帅,彭佼,等. 健骨固本胶囊对维甲酸所致实验性骨质疏松大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2008,23(11):1009.

[7] 刘石平,廖二元,伍贤平,等. 复方尼尔雌醇片抗大鼠骨质疏松的研究[J]. 中南大学学报:医学版,2004,29(4):405.

[8] 吕琳,庞声航,曾翠琼,等. 骨疏宁颗粒对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响[J]. 广西中医学院学报,2008,11(1):3.

[9] 吴波,徐冰,黄添友,等. 维甲酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究[J]. 药科学报,1996,31(4):316.

[10] 李素萍. 骨质疏松动物模型的研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(20):3767.

[11] 许碧莲,吴铁,陈文双,等. 仙珍骨宝对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(8):1371.

[12] 张国庆. 微波辅助提取黄酮和多糖类成分的新进展[J]. 天津药学,2007,19(1):66.

[13] 黎海彬,王邕,李俊芳,等. 微波辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 现代食品科技,2005,21(3):148.

[责任编辑 聂淑琴]