

• 实验研究 •

淫羊藿总黄酮和黄芪多糖配伍对骨质疏松大鼠的保护作用

孔令岩¹ 柴仪^{1△} 李倩² 常波伦¹ 刘烁炜¹ 暴凯¹ 麻丛丛³

[摘要] 目的:观察淫羊藿总黄酮和黄芪多糖配伍对去势骨质疏松大鼠的保护作用。方法:采用双侧卵巢切除术复制大鼠骨质疏松(OP)模型,将50只SD大鼠随机分为正常组、模型组、淫羊藿总黄酮组、黄芪多糖组和淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组(各10只),分别给予相应药物灌胃,正常组和模型组给予等体积生理盐水。12周后处死大鼠,取血测定血钙(Ca)、血磷(P)、骨钙素(BGP),取左侧股骨,测定骨干质量、骨灰质量、骨Ca及骨P的含量。结果:淫羊藿总黄酮组、黄芪多糖组及淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组均能改善血Ca、血P和BGP水平,增加骨干重、骨灰重、骨Ca及骨P的含量,差异有统计学意义($P < 0.05$);与单味药组相比,淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组的作用尤为显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:淫羊藿总黄酮和黄芪多糖配伍可有效改善去卵巢大鼠的骨质疏松,为补肾健脾法的临床应用提供了实验依据。

[关键词] 淫羊藿总黄酮;黄芪多糖;大鼠;骨质疏松症;补肾健脾

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)04-0024-03

Protective Effect of the Compatibility of Epimedium Flavonoids and Astragalus Polysaccharides on Osteoporosis Rats

KONG Lingyan¹ CHAI Yi^{1△} LI Qian² CHANG Bolun¹LIU Shuwei¹ BAO Kai¹ MA Congcong³

¹ Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China;

² Hebei Friendship Hospital, Shijiazhuang 050031, China;

³ Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei China.

Abstract Objective: To study the protective effects of epimedium flavonoids and astragalus polysaccharides on osteoporosis rats. **Methods:** 50 SD rats were randomly divided into normal group ($n=10$), model group ($n=10$), epimedium flavonoids group ($n=10$), astragalus polysaccharides group ($n=10$) and epimedium flavonoids + astragalus polysaccharides group ($n=10$). Each group was given corresponding drugs by gavage, and the normal group and model group were given equal volume of normal saline. After 12 weeks, all the rats were killed. The blood calcium (Ca), blood phosphorus (P) and Osteocalcin (BGP) were measured. The left femur was taken to measure the bone weight, bone ash weight, bone Ca and bone P content. **Results:** The levels of blood Ca, P and BGP were improved, and the contents of bone Ca, bone ash, bone Ca and bone P were increased in the group of epimedium flavonoids, astragalus polysaccharide and epimedium flavonoids + astragalus polysaccharides group ($P < 0.05$). The effect of epimedium flavonoids + astragalus polysaccharide group was more significant than the single drug group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combination of epimedium flavonoids and astragalus polysaccharides can effectively improve osteoporosis in ovariectomized rats, which provides experimental basis for the clinical application of tonifying the kidney and strengthening the spleen.

Keywords: epimedium flavonoids; astragalus polysaccharides; rats; osteoporosis; tonifying the kidney and strengthening the spleen

基金项目:河北省中医药管理局资助项目(219001)

¹ 河北省中医院(石家庄,050011)

² 河北友爱医院

³ 承德医学院

△通信作者 E-mail:290507602@qq.com

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种因骨量低下,骨的纤维结构破坏导致脆性增加,从而引起骨折发生危险性升高的一种全身性疾病^[1]。OP患者既可

以没有任何临床症状,也可以表现为四肢、关节、脊柱等全身骨痛,脊柱发生病变易导致脆性骨折等^[2]。因此,OP 已成为医学领域亟待解决的重要问题之一。传统医学认为淫羊藿具有补肾壮阳、强筋健骨之功效,临床上常用于治疗腰腿疼,且有利于骨折愈合。淫羊藿的有效成分是淫羊藿总黄酮,具有促进成骨细胞分化和抑制破骨细胞骨吸收的作用^[3]。黄芪具有补气健脾、托疮生肌之功效,其化学成分主要是黄芪多糖,能够通过拮抗细胞凋亡及促进成骨细胞的增殖分化来控制骨代谢^[4]。因此,本研究将淫羊藿总黄酮和黄芪多糖配伍,旨在观察补肾健脾法对去势 OP 大鼠的保护作用,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

研究所用雄性 SD 大鼠 50 只(体质量 80~110 g),中位数 95 g,由河北医科大学实验动物中心所提供,动物许可证号为 SCXK(冀)2018-1-004。

1.2 实验药物及试剂

淫羊藿总黄酮(Epmedium Flavonoid, EF)、黄芪多糖(Astragalus Polysaccharide, APS)均为实验室自制,制备方法参见文献^[5-6]。Ca 试剂盒、P 试剂盒、BGP 试剂盒(南京建成)。

1.3 方法

1.3.1 造模方法 大鼠在实验室内适应饲养 7 d 后,进行双侧卵巢切除手术,按照(0.4 mL/100 g)剂量注射 1%戊巴比妥钠溶液行腹腔麻醉,手术操作均在无菌的实验环境下进行。正常组大鼠切除卵巢周围等量的脂肪组织,但不切除卵巢,其余操作均与造模组相同。术后,所有大鼠给予青霉素肌内注射,以预防切口感染,连续注射 3 d。最后将大鼠放入单笼中饲养,并放置烤灯烘烤。

1.3.2 分组方法 造模成功后,将大鼠随机分为 5 组:正常组、模型组、淫羊藿总黄酮组、黄芪多糖组和淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组(各 10 只)。

1.3.3 干预方法 淫羊藿总黄酮组给予淫羊藿总黄酮 90 mg/(kg·d),黄芪多糖组给予黄芪多糖

600 mg/(kg·d),淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组给予含有淫羊藿总黄酮和黄芪多糖混悬液 690 mg/(kg·d),正常组和模型组给与等体积生理盐水。连续给药 12 周,每周测大鼠体质量。

本次实验中大鼠的使用和处理均参照美国国家卫生研究院制定的《实验动物护理和使用指南》执行,所有的动物实验程序均通过河北医科大学实验动物伦理委员会审查和批准。

1.3.4 样本的采集和制备 各组大鼠给以戊巴比妥钠(0.4 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉,麻醉成功后,下腔静脉插管取血,将血液样本放置 2 h 后,3 000 r/min 离心 20 min,提取血清,储存于-20℃冰箱中。去左侧全段股骨,刮除肌肉组织,蒸馏水冲洗,放入锡纸包裹,标记,并放于-80℃冰箱保存。按照试剂盒说明书进行操作,测定血 Ca、血 P 和 BGP 含量。

1.4 指标测定

按照试剂盒说明书进行操作,测定血 Ca、血 P 和 BGP 含量。将股骨标本置于三氯甲烷-甲醇混合液中,脱脂 72 h,再放入 120℃烤箱,烘烤 60 min,称重。将称重后的标本放于 800℃马弗炉,12 h 后呈白色灰状,称重,并溶解于 HNO₃:H₂O 中,测定骨 Ca 及骨 P 的含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血 Ca、血 P 和 BGP 水平

与正常组大鼠相比较,模型组大鼠血 Ca、血 P 和 BGP 水平明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),表明卵巢切除导致大鼠出现一定程度的骨质疏松症状;与模型组大鼠相比较,各给药组大鼠血 Ca、血 P 和 BGP 水平均明显升高,差异有统计学意义(P<0.05),表明淫羊藿总黄酮和黄芪多糖单用或者配伍均能改善 OP 大鼠的骨质疏松症状;对于 BGP 水平,淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组效果优于单药组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 各组大鼠血 Ca、血 P 和 BGP 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Ca/(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)	BGP/(ng·mL ⁻¹)
正常组	10	2.412±0.159	2.403±0.039	1.976±0.104
模型组	10	2.054±0.891 ¹⁾	2.057±0.097 ¹⁾	1.243±0.059 ¹⁾
淫羊藿总黄酮组	10	2.309±0.133 ¹⁾²⁾	2.384±0.052 ²⁾	1.371±0.061 ¹⁾²⁾
黄芪多糖组	10	2.274±0.129 ¹⁾²⁾	2.376±0.045 ²⁾	1.361±0.064 ¹⁾²⁾
淫羊藿+黄芪组	10	2.361±0.074 ²⁾	2.429±0.124 ²⁾	1.737±0.069 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:1) P<0.05,与正常组比;2) P<0.05,与模型组比;3) P<0.015,与淫羊藿总黄酮组比;4) P<0.05,与黄芪多糖组比。

2.2 骨干质量、骨灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量

与正常组大鼠相比较,模型组大鼠骨干质量、骨

灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),表明 OP 大鼠骨量减少;与模型

组大鼠相比较,各给药组大鼠骨干质量、骨灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),表明淫羊藿总黄酮和黄芪多糖单用或者

配伍均能使 OP 大鼠的骨量增加;此外,淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组效果优于单药组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠骨干质量、骨灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	骨干质量/g	骨灰质量/g	骨 Ca 含量/(mg·g ⁻¹)	骨 P 含量/(mg·g ⁻¹)
正常组	10	1.382±0.021	0.768±0.011	386.124±6.669	205.376±8.164
模型组	10	1.144±0.052 ¹⁾	0.671±0.016 ¹⁾	318.564±7.582 ¹⁾	155.272±7.847 ¹⁾
淫羊藿总黄酮组	10	1.254±0.052 ¹⁾²⁾	0.713±0.006 ¹⁾²⁾	347.504±6.596 ¹⁾²⁾	179.489±7.553 ¹⁾²⁾
黄芪多糖组	10	1.259±0.049 ¹⁾²⁾	0.714±0.005 ¹⁾²⁾	348.250±7.471 ¹⁾²⁾	177.195±9.019 ¹⁾²⁾
淫羊藿+黄芪组	10	1.318±0.056 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.739±0.005 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	378.186±5.693 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	193.195±5.244 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:1) $P<0.05$,与正常组比;2) $P<0.05$,与模型组比;3) $P<0.015$,与淫羊藿总黄酮组比;4) $P<0.05$,与黄芪多糖组比。

3 讨论

OP 是一种由多因素诱发的骨强度下降、骨微结构被破坏的综合性代谢性疾病,骨折是其最严重也是最常见的并发症^[7]。OP 与年龄密切相关,绝经期妇女由于雌激素水平下降易出现骨质疏松症状^[8],表现为骨小梁变小、骨皮质变薄及骨密度(BMD)下降等特征^[9]。目前临床上治疗 OP 主要以抑制骨吸收的二磷酸盐为主,但易出现下颌骨坏死、非典型性骨折等并发症^[10]。因此,研究防治 OP 的新药具有十分重要的意义。

传统的补肾中药淫羊藿是小檗科草本茎叶,首载于《神农本草经》,味辛甘性温,归肝肾二经,是补肾壮阳、强筋健骨的要药^[11]。有研究表明,淫羊藿主要成分为黄酮类物质,而酮类物质被证明具有类雌激素样作用,因此,淫羊藿具有抗 OP、调节雄性发育、调节免疫系统、抗衰老、抑制肿瘤等作用^[12]。冯云波等^[13]探讨淫羊藿总黄酮对 OP 大鼠的保护作用,将 45 只 3 个月龄大鼠按体质量随机分为三组:正常组($n=15$)、模型组($n=15$)、淫羊藿总黄酮组($n=15$),结果发现淫羊藿总黄酮组大鼠骨皮质较完整,骨量分布较均匀,骨髓内小梁结构较清晰。罗静华等^[14]通过实验研究,认为淫羊藿黄酮化合物早期通过促进骨质疏松性骨折端血管重建的速度和数量,促使成骨细胞的分化、趋化与成熟和多种修复性生理因子的聚集,增进钙盐吸收、沉着,并在骨折塑性期激活破骨细胞加速骨痂改建,进而改善骨痂内矿化组织分布和显微结构的连接性使骨折恢复原有外形和强度。黄芪首载于东汉时期的《神农本草经》,已有两千多年的用药史^[15],具有补气健脾、托疮生肌、升阳举陷、利水消肿等功效。黄芪的主要化学成分是黄芪多糖,现代研究表明黄芪多糖具有抗 OP、抗肿瘤、调节神经系统等活性,且能改善骨细胞代谢^[4]。张宏波等^[16]研究黄芪多糖对去势 OP 大鼠的影响,结果发现黄芪多糖具有抑制骨吸收和促进骨形成的作用,对 OP 具有预防作用。OP 与脾、肾两脏密切相关,肾主骨生髓,脾为生化之源,若脾肾亏虚,气血、筋骨失养,易导致 OP 的发生。因此,在临床上依

据 OP 的发病机理,可运用补肾健脾的方法作为治疗 OP 的重要原则。有研究表明,补肾健脾中药能够明显改善 OP 大鼠的骨代谢状态,具有抑制骨吸收、促进骨形成的作用^[17]。刘振东等^[18]研究发现补肾健脾汤能够明显降低 OP 患者的骨保护素(OPG)水平,增加胰岛素样生长因子(IGFs)水平,改善患者的临床症状。

本研究结果显示,各给药组大鼠血 Ca、血 P 和 BGP 水平均明显升高,提示淫羊藿总黄酮和黄芪多糖单用或者配伍均能改善 OP 大鼠的骨质疏松症状。BGP 的变化可代表骨代谢的变化,因此临床上将 BGP 作为骨形成的生化参考指标。对于 BGP 水平,淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组效果优于单药组,表明两药配伍可能存现协同效果。此外,各给药组大鼠骨干质量、骨灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量均明显升高,表明淫羊藿总黄酮和黄芪多糖单用或者配伍均能使 OP 大鼠的骨量增加,且淫羊藿总黄酮+黄芪多糖组效果更显著。本实验结果表明对于 OP 的防治,用补肾壮骨的淫羊藿配伍健脾益气的黄芪,以达到健脾补肾的功效,与祖国医学的整体观念和辨证论治相一致。

综上所述,淫羊藿总黄酮和黄芪多糖单用或者配伍对去势 OP 大鼠均具有一定的治疗作用,且配伍组的疗效更优,不仅能够提高血 Ca、血 P 和 BGP 水平,增加骨干质量、骨灰质量、骨 Ca 及骨 P 的含量,降低骨折的风险。因此,开展淫羊藿总黄酮配伍黄芪多糖防治 OP 具有潜在的研究价值,可为补肾健脾法的临床应用提供实验依据。

参考文献

[1] 王宥涵,孔令擘,贺宝荣.淫羊藿苷调控破骨细胞分化治疗骨质疏松症的机制研究进展[J].中华创伤杂志,2020,36(4):377-382.
[2] 葛继荣,郑洪新,万小明,等.中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(9):1023-1028.