

姜黄葛根白芍片对去卵巢大鼠模型骨密度的影响研究

汪玉芳^{1*}, 王昌博¹, 项磊², 黄远英¹, 殷光玲¹

(1. 汤臣倍健股份有限公司, 广州 510663; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

摘要: **目的** 研究姜黄葛根白芍片对去卵巢大鼠模型骨密度的影响, 探讨其增加骨密度的作用。 **方法** 采用去卵巢的方法建立大鼠骨质疏松模型, 用不同浓度的姜黄葛根白芍片灌胃剂量组动物, 12周后检测其骨密度、股骨恒重和骨钙含量, 观察骨组织病理形态, 评价其增加骨密度的作用。 **结果** 与模型组对比, 姜黄葛根白芍片低、中、高剂量组大鼠的骨密度和股骨恒重均显著增加, 中、高剂量组的骨钙含量显著高于模型组, 各剂量组骨组织的病理组织学指标与模型组相比有显著性改善。 **结论** 姜黄葛根白芍片具有增加大鼠骨密度和骨钙含量的作用, 并且能够改善骨组织的病理形态, 对治疗临床绝经后骨质疏松症有一定作用。

关键词: 姜黄葛根白芍片; 去卵巢大鼠模型; 骨密度

Effect of turmeric-*pueraria-paeoniae radix* tablet on bone mineral density in ovariectomized rats

WANG Yu-Fang^{1*}, WANG Chang-Bo¹, XIANG Lei², HUANG Yuan-Ying¹, YIN Guang-Ling¹

(1. *By-Health Co., Ltd., Guangzhou 510663, China*; 2. *College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of turmeric-*pueraria-paeoniae radix* tablet on bone mineral density in ovariectomized rats, and discuss the function for increasing bone mineral density. **Methods** The osteoporosis model was established by removing the ovaries in experimental rats. The rats of dose groups were treated with different concentrations of turmeric-*pueraria-paeoniae radix* tablet through intragastric administration. After 12 weeks, the bone mineral density (BMD), constant weight of femur and calcium content (BCC) of bone were detected, and the observation of pathological morphology of bone tissue was conducted simultaneously, based on which the function for increasing bone mineral density of the tablet was evaluated. **Results** Compared with model group, the levels of bone mineral density and constant weight of femur in rats of low, medium and high dose groups were all increased significantly, and the BCC in rats of medium and high dose groups were higher than that of model group. The histopathological indexes of bone tissue had significant improvement in rats of 3 dose groups. **Conclusion** *Urmeric-*pueraria-paeoniae radix* tablet* has the function of enhancing BMD and BCC in rats, and it can improve the pathological morphology of bone tissue, which has an effect on the treatment of clinical postmenopausal osteoporosis.

KEY WORDS: turmeric-*pueraria-paeoniae radix* tablet; ovariectomized rat model; bone mineral density

*通讯作者: 汪玉芳, 工程师, 主要研究方向为药品与保健食品研发。E-mail: wangyf0515@163.com

*Corresponding author: WANG Yu-Fang, Engineer, By-Health Co., Ltd., Guangzhou 510663, China. E-mail: wangyf0515@163.com

1 引言

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种由于骨量减少、骨组织微结构退化和骨强度降低致使骨的脆性增加而导致人体易骨折发生的全身性疾病^[1]。骨质疏松症是中老年人最常见的疾病之一,据2014年的一项报告指出,目前我国60岁以上的老年人已达2亿,而40岁以上的骨质疏松症患者已达1.12亿^[2]。国际骨质疏松基金会(International Osteoporosis Foundation, IOF)的报告也指出,在2010年,中国50岁及以上的人群中发生了大约230万例骨折,这一数字预计将在2050年上升到600万例^[3]。

中老年人的骨质疏松症多属于原发性骨质疏松,又分为I型和II型。I型骨质疏松症又称为绝经后骨质疏松症,为高转换型,其主要发生原因为雌性激素缺乏;II型骨质疏松症又称为老年性骨质疏松症,为低转换型,主要由年龄增长引起的性激素分泌减少、钙调节激素分泌失调和户外活动减少等引起,一般发生在65岁以上的女性和70岁以上的男性人群中。

I型骨质疏松症在绝经后妇女中表现最为明显,其以骨量减少为主要特征,骨组织的显微结构发生明显改变,骨折发生的概率极大。目前针对I型骨质疏松症的临床治疗药物主要包括:雌激素调节药物、促进骨形成药物如甲状旁腺激素、促进骨矿化药物如钙剂等。尽管这些药物对治疗OP有效,但服用这些药物也会伴随一系列副作用,如激素长期治疗出现的高血压性水肿、血液高凝状态、子宫内膜癌及乳腺癌等。保健食品在治疗OP方面有自身独特的特点,保健食品的原料主要来自药食同源的原料,具有安全性高、副作用小等特点。在中医药理论与药膳食疗理论的基础上形成的保健食品配方更注重整体调节,从补肝肾、强筋骨、补养气血、调整下丘脑-垂体-性腺轴等多个环节作用,在治疗上具有突出优势。

作为保健食品的一种,姜黄葛根白芍片是以姜黄提取物、葛根提取物、白芍提取物、胡椒提取物配以胶原蛋白粉和D-氨基葡萄糖硫酸钾盐等作为主料,同时配以其他辅料经多次混合、压片、包衣制成的片剂,具有增加骨密度和缓解关节疼痛等功效。本研究采用去卵巢的方法建立大鼠骨质疏松模型,用不同浓度的姜黄葛根白芍片对实验动物进行灌胃,并检测其骨密度、股骨恒重和骨钙含量,观察骨组织病理形态,研究姜黄葛根白芍片增加骨密度的效果。

2 实验材料

2.1 样品及试剂

实验用姜黄葛根白芍片样品由汤臣倍健股份有限公司制备提供。

戊巴比妥钠(德国Merck公司);甲醛(广州市中南化学试剂有限公司);补佳乐(戊酸雌二醇片,法国杜芬药厂DELPHARM Lille S.A.S.)。

2.2 主要仪器

Leica EG1160石蜡包埋机、Leica ASP 300全密封自动脱水机(德国Leica公司);Microm HM400平推式切片机(德国MICROM公司);DP71-IPP 6.0高分辨率专业显微数码相机(日本奥林巴斯株式会社);JC 303-4隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂);3-18K型高速冷冻离心机(德国SIGMA公司);ZOOM 2000立体显微镜(上海徕卡系统有限公司);产I'acn型双能X线骨密度仪(意大利);Zeeman-5000原子吸收分光光度计(日本日立公司)。

2.3 实验动物

3月龄SD成年雌性大鼠90只,SPF级,220~250g,由广州中医药大学实验动物中心提供。动物饲养条件:5只/箱,群养,饲养温度:22.3~23.7℃,湿度:55.6%~70%,采用10h:14h昼夜间断照明;饲养室条件始终保持稳定,以保证实验结果的可靠性。模型组和给药组动物自由饮水并给予特殊饲料饲养^[4],伪手术组动物给予常规饲料喂养。

3 实验方法^[4]

3.1 动物造模及分组

将90只成年雌性大鼠适应喂养7天,其中10只摘除卵巢旁1g左右的脂肪组织,不切除卵巢,作为正常对照组(伪手术组);其余80只进行卵巢切除术,卵巢去除成功的动物术后按体重随机分组,剔除体重差异较大的动物后,再按体重随机分为5组,分别为:模型组、阳性对照组(雌二醇组、灌胃补佳乐)、姜黄葛根白芍片高、中、低3个剂量组。

雌性大鼠双侧卵巢摘除术:大鼠经腹腔注射30mg/kg戊巴比妥钠溶液进行麻醉,麻醉后,四肢外展位固定,于肋缘与脊柱交界处向下备皮,常规消毒铺巾,于下腹部正中纵行切开皮肤(约2cm),钝性分离腹部肌肉,切开腹膜,进入腹腔,切口视野见白色脂肪,拨开脂肪层找到子宫,轻轻将一侧子宫角(位置较深)拉出,顺着输卵管,在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢。分离脂肪团,可见粉红色桑葚状的卵巢,用止血钳夹住卵巢,将卵巢下的输卵管(包括脂肪)用0号丝线结扎,剪去卵巢组织,仔细止血后,将子宫角送回腹腔中,同法摘除另一侧卵巢,最后用双氧水和生理盐水冲洗后关闭腹腔,逐层缝合,再次消毒伤口,盖上无菌敷料胶布。术后肌肉注射2万单位的青霉素,连用3天以预防感染。术后第5天开始进行阴道细胞涂片检查,每天1次,持续7天。若阴道上皮角化细胞无周期性变化,证明卵巢去除成功,不成功的进行剔除。

3.2 给药剂量

该产品的成人推荐摄入量为 4 g/d, 按成年人的体重为 60 kg 计算, 根据人体推荐摄入量设定 3 个剂量组的给药剂量分别为 0.67、1.34 和 2.01 g/kg·BW (相当于人体推荐摄入量的 10、20 和 30 倍), 阳性对照组的给药量为 1.0 mg/kg。

3.3 给药方式

给药方式为灌胃, 每天 1 次, 连续给药 12 周, 姜黄葛根白芍片低、中、高 3 个剂量组的给药浓度分别为 0.067、0.134、0.201 g/mL, 阳性对照组的给药浓度为 0.1 mg/mL, 各组动物的灌胃体积为 1 mL/100 g 体重, 模型组和伪手术组给予相同体积的纯水。

3.4 骨密度检测

给药 12 周后, 麻醉大鼠, 腹主动脉采血处死大鼠, 剔除左侧股骨, 剔除周围组织, 用双能 X 线骨密度仪扫描, 测定整根股骨的骨密度值(g/cm²), 扫描速度为 20 mm/s, 宽度为 10 cm。

3.5 股骨恒重及骨钙含量检测

取大鼠左侧股骨在 105 °C 烘箱恒重至两次测定值(间隔 1h)间的重量相差不超过 0.0003 g, 将股骨称重。采用原子吸收法测定骨钙含量^[4]。

3.6 骨组织病理形态学检测

取大鼠右股骨, 经乙二胺四乙酸二钠(EDTA)脱钙后进行 HE 常规染色和茜素红染色(alizarin red staining, ARS), 制成组织切片, 于显微镜下观察骨组织的形态变化。观察指标: 骨板及骨小梁(数量减少/变薄变细/间隙增宽/疏松断裂)、破骨细胞(增多/减少)、成骨细胞(增多/减少)及其他改变。评分: 按照评分标准对各项观察指标进行打分, 每只动物计算各项指标的总分。

3.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析, 所有数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。资料数据方差齐, 或数据经转换后方差齐, 则采用单因素方差分析; 若数据经转换后方差仍不齐, 则采用秩和检验进行统计分析。

4 结果与分析

4.1 体重增加情况

给药 12 周后, 禁食 8 h, 测定大鼠体重, 计算给药前后大鼠的空腹体重增加情况, 结果如表 1 所示。模型组大鼠的体重增加明显大于伪手术组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而雌二醇组、高剂量组和中剂量组的体重增加明显小于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 受试样品对大鼠体重增加的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of test sample on weight gain in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	增重(g)
伪手术组	---	58.40±17.68
模型组	---	77.07±23.61*
雌二醇组	1.0 mg/kg	51.15±24.75 [▲]
高剂量组	2.01 g/kg·BW	45.62±13.23 [▲]
中剂量组	1.34 g/kg·BW	46.23±17.50 [▲]
低剂量组	0.67 g/kg·BW	58.91±25.07

注: *表示与伪手术组比较差异显著($P < 0.05$); [▲]表示与模型组比较差异极显著($P < 0.01$)

4.2 骨密度测定

从表 2 可以看出, 与伪手术组相比, 模型组大鼠的骨密度(bone mineral density, BMD)明显小于伪手术组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而雌二醇组和各剂量组的 BMD 明显大于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 受试样品对大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of test sample on BMD in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	骨密度(g/cm ²)
伪手术组	---	0.39±0.03
模型组	---	0.22±0.05*
雌二醇组	1.0 mg/kg	0.35±0.06 [▲]
高剂量组	2.01 g/kg·BW	0.35±0.07 [▲]
中剂量组	1.34 g/kg·BW	0.33±0.03 [▲]
低剂量组	0.67 g/kg·BW	0.34±0.05 [▲]

注: *表示与伪手术组比较差异显著($P < 0.05$); [▲]表示与模型组比较差异极显著($P < 0.01$)

4.3 左侧股骨恒重及骨钙含量测定

从表 3 可以看出, 模型组大鼠的左侧股骨恒重(bone constant weight, BCW)和骨钙含量(calcium content of bone, BCC)明显小于伪手术组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而雌二醇组和各剂量组的股骨恒重明显大于模型组, 差异有统计学意义; 雌二醇组和高、中剂量组大鼠的骨钙含量也明显大于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4.4 骨组织染色结果

从表 4 可以看出, 模型组大鼠股骨 HE 染色的病理得分明显高于伪手术组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); 雌二醇组和高、中剂量组股骨 HE 染色的病理得分明显低于模型组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); 而低剂量组大鼠股骨 HE 染色的病理得分与模型组相比无显著差异($P > 0.05$)。

表3 受试样品对大鼠骨重及骨钙含量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The effects of test sample on BCW and BCC in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	股骨恒重(mg)	骨钙含量(mg/g)
伪手术组	---	610.50±48.59	264.00±14.02
模型组	---	551.00±60.30*	200.50±12.64*
雌二醇组	1.0 mg/kg	605.75±39.67 [▲]	236.13±18.92 [▲]
高剂量组	2.01 g/kg·BW	604.01±34.97 [▲]	219.75±11.19 [▲]
中剂量组	1.34 g/kg·BW	568.25±34.69 [▲]	216.38±14.00 [▲]
低剂量组	0.67 g/kg·BW	567.13±35.45 [▲]	205.25±20.44

注: *表示与伪手术组比较差异显著($P < 0.05$); [▲]表示与模型组比较差异极显著($P < 0.05$)

表4 受试样品对大鼠骨组织病理组织学评分的影响(HE染色)
($\bar{x} \pm s$)

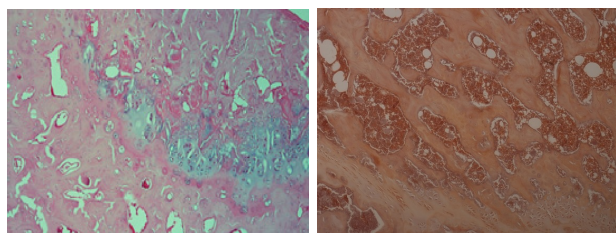
Table 4 The effect of test sample on histopathological score of bone in rats (HE staining) ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	得分
伪手术组	---	1.25±0.46
模型组	---	6.50±1.07*
雌二醇组	1.0 mg/kg	4.63±0.74 [▲]
高剂量组	2.01 g/kg·BW	5.25±0.71 [▲]
中剂量组	1.34 g/kg·BW	5.38±0.92 [▲]
低剂量组	0.67 g/kg·BW	5.88±0.64

注: *表示与伪手术组比较差异显著($P < 0.05$); [▲]表示与模型组比较差异显著($P < 0.05$)

(1)正常对照组

骨板层结构整齐;骨小梁密度正常,数量较多;破骨细胞较少,成骨细胞较多(图1)。



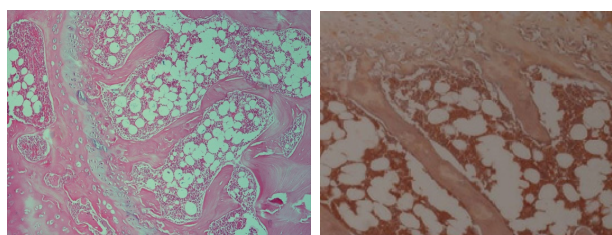
HE染色(10×10) 茜素红染色(10×10)

图1 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(正常对照组)

Fig. 1 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the control group)

(2)模型组

骨板层结构不整齐;骨小梁密度降低、数量减少,且变薄变细,间隙明显增宽,有大量疏松断裂;破骨细胞增多,成骨细胞稀少(图2)。



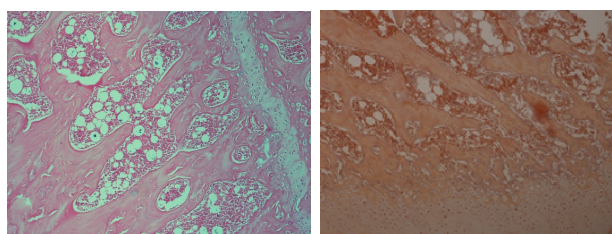
HE染色(10×10) 茜素红染色(10×10)

图2 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(模型组)

Fig. 2 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the model group)

(3)雌二醇组

骨板层结构欠整齐;骨小梁密度稍有降低,数量略有减少,间隙增宽,有少量疏松断裂;破骨细胞增多,成骨细胞减少(图3)。



HE染色(10×10) 茜素红染色(10×10)

图3 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(雌二醇组)

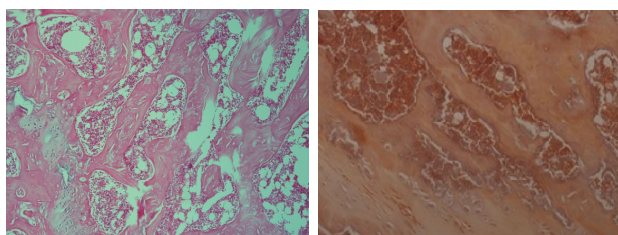
Fig. 3 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the estradiol group)

(4)高剂量组

骨板层结构欠整齐;骨小梁密度稍有降低,数量略减少,间隙增宽不明显,有少量疏松断裂;破骨细胞增多,成骨细胞减少(图4)。

(5)中剂量组

骨板层结构欠整齐;骨小梁密度略降低,数量减少稍有变细,间隙增宽,有少量疏松断裂;破骨细胞减少,成骨细胞明显增加(图5)。

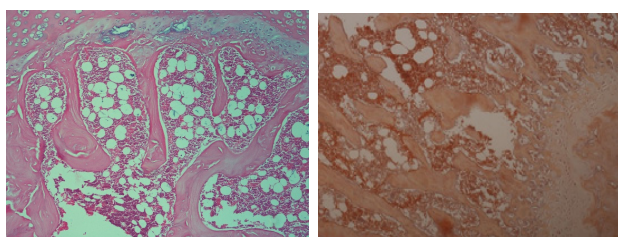


HE 染色(10×10)

茜素红染色(10×10)

图 4 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(高剂量组)

Fig. 4 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the high dose group)



HE 染色(10×10)

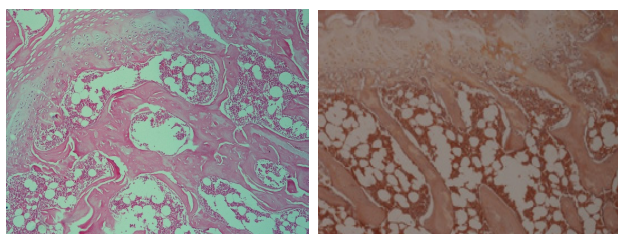
茜素红染色(10×10)

图 5 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(中剂量组)

Fig. 5 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the middle dose group)

(6)低剂量组

骨板层结构欠整齐;骨小梁密度降低,数量减少且变细,间隙增宽,有少量疏松断裂;破骨细胞增多,成骨细胞减少(图 6)。



HE 染色(10×10)

茜素红染色(10×10)

图 6 骨组织 HE 染色和茜素红染色结果(低剂量组)

Fig. 6 Results of HE and ARS staining of bone tissue (the low dose group)

5 讨论与结论

绝经后骨质疏松症是一种与衰老有关的常见病,主要发生在绝经后妇女群体中。由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,使骨脆性增加,使人体容易发生骨折以及由骨折引起的疼痛、骨骼变形、出现并发症乃至死亡等问题,严重影响老年人的身体健康及生活质量。本实验所用姜黄葛根白芍片由葛根提取物、姜黄提取物、白芍

提取物、胡椒提取物配以胶原蛋白粉、D-氨基葡萄糖硫酸钾盐等为主料,配以其它辅料制成。葛根中含有葛根素及黄酮类成分,具有类雌激素作用,已有许多研究表明葛根在骨代谢中具有明显的作用,可减缓骨密度下降,提高骨强度^[5-7]。现代药理研究表明,白芍总苷、姜黄素和胡椒碱均具有抗炎、抗氧化的功效,其中姜黄素和胡椒碱合用能提高姜黄的生物利用率。氨基葡萄糖与胶原蛋白是软骨的组成成分,补充氨基葡萄糖与胶原蛋白可以有效缓解关节软骨损伤,增加软骨强度,达到预防骨质疏松和改善骨关节炎的效果^[8,9]。

采用卵巢切除术建立骨质疏松模型是《保健食品检验与评价技术规范》中规定的研究增加骨密度功能的方法,也是世界卫生组织(WHO)推荐的研究骨质疏松症的最佳方法。大鼠摘除卵巢后,雌激素分泌减少,致使其内分泌失调,骨吸收迅速增加、骨量严重丢失,导致骨质疏松,骨量丢失促使机体以增加体重来代偿性弥补骨量的丢失,造成体重的增加。本研究的结果表明,与伪手术组比较,去卵巢模型组的大鼠股骨干重、骨密度以及骨钙含量均显著低于伪手术组,说明采用卵巢切除术建立的骨质疏松模型成功。实验结果表明,姜黄葛根白芍片能显著提高去卵巢大鼠的骨密度和骨钙含量,改善去卵巢大鼠的骨组织病理形态,对治疗临床绝经后骨质疏松症有指导作用。

参考文献

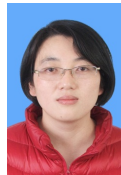
- [1] 中国人群骨质疏松症防治手册 2013 版[Z]. 2013. Handbook of prevention and treatment of osteoporosis in Chinese population(2013 Edition) [Z]. 2013.
- [2] 李旭云. 近十年我国各地区骨质疏松症流行病学状况[Z]. 杭州: 2014. Li XY. Epidemiological status of osteoporosis in various regions of China in recent 10 years [Z]. Hangzhou: 2014.
- [3] 国际骨质疏松基金会. 健康营养,健康骨骼-生命各个阶段的营养因素如何影响肌肉和骨骼健康[R]. 2015. International osteoporosis foundation. Healthy nutrition, healthy bones-How to affect the muscle and bone health by trophic factors at various stages of life [R]. 2015.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 卫生部卫生法制与监督司, 2003. Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical specification for inspection and evaluation of health food [M]. Beijing: Department of Health Law and Supervision, Ministry of Health, 2003.
- [5] 王新祥, 张允岭, 吴坚, 等. 葛根对骨质疏松模型小鼠骨密度和骨组织构造的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(5): 349-354. Wang XX, Zhang YL, Wu J, et al. The effects of puerariae radix on bone mass and bone microarchitecture in ovariectomy mice [J]. Chin J Osteopor, 2008, 14(5): 349-354.
- [6] 黄彤, 金邦荃, 孙桂菊, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨强度的改善[J]. 现代预防医学, 2010, (20): 3894-3896. Huang T, Jin BQ, Sun GJ, et al. Effects of puerarin on osteoporosis of ovariectomized rats [J]. Mod Prev Med, 2010, (20): 3894-3896.
- [7] 陈冠儒. 葛根总黄酮对大鼠骨质疏松的作用及部分机制的研究[D]. 合

- 肥: 安徽医科大学, 2014.
- Chen GR. Effects of total flavones of pueraria lobata on osteoporosis and the possible mechanisms [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014.
- [8] 王大利, 耿成燕, 姜丽平, 等. 关节软骨及骨破坏模型大鼠经盐酸氨基葡萄糖干预的最佳剂量[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28): 5145-5148.
- Wang DL, Geng CY, Jiang LP, *et al.* Minimal effective dose of glucosamine hydrochloride on experimental arthritis in rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2011, 15(28): 5145-5148.
- [9] 高路, 岳婷婷, 卢媛媛, 等. 胶原蛋白对骨质疏松患者关节疼痛的影响[J]. 中国临床研究, 2012, 25(9): 877-878.
- Gao L, Yue TT, Lu YY, *et al.* Effects of the collagen protein on

arthrodynia of patients with osteoporosis [J]. Chin J Clin Res, 2012, 25(9): 877-878.

(责任编辑: 刘 丹)

作者简介



汪玉芳, 工程师, 主要研究方向为药品与保健食品研发。
E-mail: wangyf0515@163.com