

淫羊藿总黄酮胶囊对生长期大鼠骨密度和骨形态计量学的影响

高玉海, 杨芳芳, 蒺慧荣, 李文苑, 甄平, 陈克明

兰州军区兰州总医院全军骨科中心骨科研究所, 甘肃 兰州 730050

[摘要] **目的:**研究淫羊藿总黄酮胶囊(ITFC)对生长期大鼠峰值骨密度和骨形态计量学的影响,探索其抗骨质疏松的作用机制。**方法:**30只雌性SD大鼠按体质量随机分为正常对照组、ITFC-1组及ITFC-2组。其中,ITFC-1组和ITFC-2组分别以 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ITFC和 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ITFC灌胃,正常对照组灌服等体积蒸馏水。在灌胃后4、8、12周测定全身骨密度。12周后处死大鼠检测右侧股骨和腰椎骨骨密度;ELISA法检测血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP 5b)和骨碱性磷酸酶(BALP)水平;右侧胫骨进行骨形态计量学分析。**结果:**与正常对照组比较,ITFC-1组和ITFC-2组大鼠体质量增加减少,但差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。4周和8周时,ITFC-1组和ITFC-2组全身骨密度均有所提高,但与正常对照组差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。12周时,ITFC-1组和ITFC-2组大鼠全身骨密度、离体骨密度及血清BALP和骨小梁面积百分比均高于正常对照组(均 $P<0.05$),骨小梁分离度均低于正常对照组(均 $P<0.05$);ITFC-2组大鼠骨小梁宽度和数量均高于正常对照组,血清TRACP 5b低于正常对照组(均 $P<0.05$);ITFC-2组大鼠离体骨密度、血清BALP、骨小梁数量和面积百分比均高于ITFC-1组,骨小梁分离度和血清TRACP 5b均低于ITFC-1组(均 $P<0.05$)。**结论:**ITFC有可能通过提高骨密度、增加骨形成、降低骨吸收及改善骨组织微结构来预防老年骨质疏松的发生。



[关键词] 黄酮类/投药和剂量;淫羊藿贰/治疗应用;骨质疏松/中药疗法;骨和骨组织/解剖学和组织学;疾病模型,动物;骨密度

[中图分类号] R68; R285 **[文献标志码]** A

Effects of icariin total flavonoids capsule on bone mineral density and bone histomorphometry in growing rats

GAO Yuhai, YANG Fangfang, XI Huirong, LI Wenyuan, ZHEN Ping, CHEN Keming
(Institute of Orthopaedics Center, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

收稿日期:2016-08-08 接受日期:2016-10-31

基金项目:国家自然科学基金(81270963,81471090);甘肃省自然科学基金(1506RJZA307);甘肃省空间辐射生物学重点实验室开放基金(2016GKL002)

第一作者:高玉海(1988—),男,硕士,技师,主要从事骨代谢动物实验研究;E-mail:gyh1389@126.com;<http://orcid.org/0000-0001-7845-3796>

通讯作者:陈克明(1968—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事骨质疏松症的发病机制和防治研究;E-mail:chenkm@lut.cn;<http://orcid.org/0000-0002-9749-8356>

Corresponding author: CHEN Keming, E-mail: chenkm@lut.cn, <http://orcid.org/0000-0002-9749-8356>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of icariin total flavonoids capsules (ITFC) on bone mineral density (BMD) and bone histomorphometry in growing rats and its anti-osteoporosis mechanism. **Methods:** Thirty female SD rats were randomly divided into 3 groups: normal control group, ITFC-1 group and ITFC-2 group. Rats in ITFC-1 group and ITFC-2 group were fed with $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ or $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ITFC, respectively, and those in normal control group were fed with equal volume of distilled water. The whole body BMD was measured after 4, 8 and 12 weeks, and BMDs of the right femur and lumbar vertebrae were measured after 12 weeks. The serum levels of tartaric acid phosphatase 5b (TRACP 5b) and bone alkaline phosphatase (BALP) were measured by ELISA. Bone morphometry was performed on the right tibia. **Results:** There were no significant differences in the body weight increase between normal control group and two ITFC groups (all $P > 0.05$). There were also no significant differences in whole body BMDs after 4 and 8 weeks between normal control group and ITFC groups (all $P > 0.05$). After 12 weeks, the whole body BMD, BMD of bone *in vitro*, serum BALP level and trabecular area in ITFC-1 group and ITFC-2 group were significantly higher, trabecular separation was significantly lower than that in normal control group (all $P < 0.05$); and the trabecular width and the number in ITFC-2 group were also significantly higher, and serum TRACP 5b level was significantly lower than that in normal control group (all $P < 0.05$). The BMD of bone *in vitro*, serum BALP level, trabecular number and area in ITFC-2 group were significantly higher, and serum TRACP 5b level was significantly lower than that in ITFC-1 group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** ITFC can prevent osteoporosis by increasing bone density and bone formation, decreasing bone resorption and improving microstructure of bone.

[Key words] Flavones/administration & dosage; Icariin/therapeutic use; Osteoporosis/traditional Chinese drug therapy; Bone and bones/anatomy & histology; Disease models, animal; Bone density

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(6):581-586.]

骨质疏松症是一种全身性、系统性的骨代谢性疾病,主要发生在老年人群,即绝经后的妇女及50岁以上的男性^[1-2]。治疗不及时骨质疏松症患者易发生骨折,导致瘫痪甚至死亡,给社会、家庭、个人带来沉重经济负担的同时严重威胁着老年人的健康^[3]。骨质疏松的发生主要是由生长期的骨质量和老年时骨丢失决定的,因此提高长期骨质量可有效预防老年时骨质疏松症的发生^[4]。中医认为,淫羊藿具有补肾壮阳、强筋健骨之功效,常用于治疗腰酸疼痛、促进骨折愈合^[5]。淫羊藿中含有丰富的黄酮类化合物及淫羊藿苷,是近年来备受关注的抗骨质疏松新药^[6]。淫羊藿总黄酮胶囊(icariin total flavonoids

capsule, ITFC)中淫羊藿总黄酮提取物含量高达88.29%,具有抗骨质疏松症的潜力,其经过改良和加工做成的制剂更有利于机体的吸收。本研究通过灌胃不同浓度ITFC,探讨其对大鼠骨密度及骨形态计量学的影响,进一步证实其抗骨质疏松作用并对其中机制进行探索。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂), 双能X线骨密度仪(美国GE公司), 酶标仪(美国BioTek公司), SP1600 硬组织切片机(德国Leica公司);ITFC(江苏康缘阳光药业有限公司,

产品批号 150501),抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRACP 5b)试剂盒、骨碱性磷酸酶 (BALP)试剂盒(英国 IDS 公司)。

1.2 实验动物及分组

1月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体质量为 (120 ± 10) g,由中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供,动物检验合格证编号 SCXK(军)2012-0007。饲养温度控制在 (22 ± 5) ℃,湿度为 $(60 \pm 10)\%$,饮用水为自来水,标准大鼠饲料喂养,不限制饮食和饮水。在实验开始前驯化一周,安置在塑料饲养框内。将 30 只 SD 大鼠按体质量随机分为三组,每组 10 只,微调使每组大鼠体质量均值相当。ITFC-1 组和 ITFC-2 组分别用 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 ITFC 灌胃,正常对照组用等体积蒸馏水灌胃。每周测定一次体质量,每周的灌药量根据周一测得的体质量做相应调整。灌胃时间为早上 10:00 至 10:30。

1.3 双能 X 线骨密度仪检测骨密度

分别在灌胃 4、8、12 周后,将大鼠用 10% 水合氯醛以 3 mL/kg 的剂量腹腔注射麻醉后置于双能 X 线骨密度仪测量大鼠全身骨密度;12 周后麻醉测量全身骨密度后处死,分离右股骨和腰椎分别测定离体骨密度。

1.4 ELISA 试剂盒检测血清生物化学指标

大鼠麻醉后,用 10 mL 针管于心脏取血,置于离心机 $3350 \times g$ 离心 15 min,取上清液置于 -80 ℃ 冰箱保存;ELISA 试剂盒测定血清中 TRACP 5b 和 BALP 的水平,按说明书绘制标准曲线,于酶标仪 405 nm 和 450 nm 处测定吸光度值,用公式计算浓度含量。

1.5 大鼠胫骨骨形态计量学指标分析

大鼠处死后分离右侧胫骨保存于 70% 乙醇中用于骨形态学分析,用不脱钙树脂包埋法包埋,硬组织切片机切片,后用 1500~2000 目的砂纸均匀磨片至半透明,后配制品红-苦味酸进行染色,IPP 6.0 软件分析骨小梁相关参数,并观察骨组织形态结构。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 分析软件进行统计分析,正态分布的计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,单因素方差分析采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组体质量增加比较

与正常对照组比较,ITFC-1 组和 ITFC-2 组大鼠体质量增加减少,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 1。说明 ITFC 灌胃对大鼠体质量的增长无明显影响。

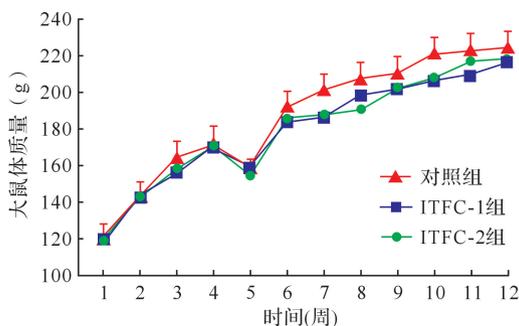


图 1 大鼠体质量测定结果曲线图

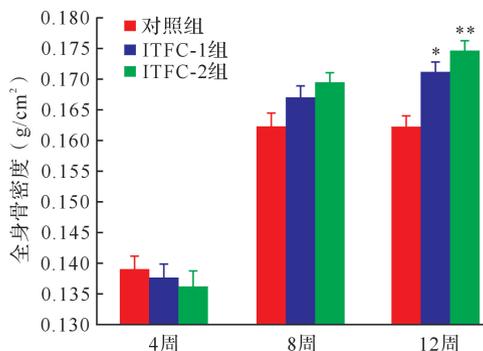
Figure 1 Body weights of rats

2.2 各组大鼠骨密度比较

与正常对照组比较,ITFC-1 组和 ITFC-2 组灌胃 12 周后全身骨密度升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),但 ITFC-1 组与 ITFC-2 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。与正常对照组比较,ITFC-1 组和 ITFC-2 组离体骨密度均升高(均 $P < 0.01$),且 ITFC-2 组升高的幅度大于 ITFC-1 组(均 $P < 0.05$),见图 3。提示 ITFC 能提高大鼠全身和离体骨密度,高浓度的 ITFC 作用效果更为显著。

2.3 各组大鼠血清生物化学指标比较

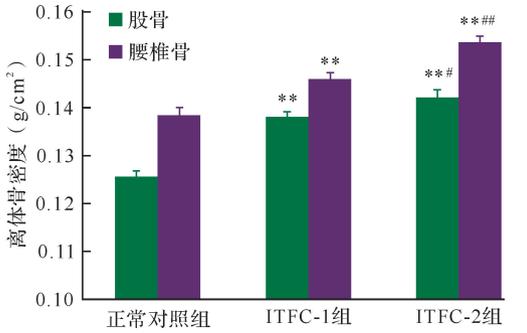
如表 1 所示,与正常对照组比较,ITFC-1 组



与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠全身骨密度比较

Figure 2 Whole body bone mineral density of rats



与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 ITFC-1 组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

图 3 不同浓度淫羊藿总黄酮胶囊作用 12 周后各组离体骨密度比较

Figure 3 Bone mineral density of bone *in vitro* in rats after 12-week's intervention of icariin total flavonoids capsule

和 ITFC-2 组血清 BALP 含量增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 ITFC-2 组血清 BALP 含量增加更显著 ($P < 0.05$); ITFC-1 组血清 TRACP5b 含量与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 ITFC-2 组血清 TRACP 5b 含量比正常对照组减少 ($P < 0.01$)。提示 ITFC 可增加血清中骨形成相关因子 BALP 含量, 高浓度 ITFC 可减少骨吸收相关因子 TRACP 5b 含量, 浓度越高这一作用效果越明显。

2.4 各组大鼠骨形态计量学指标比较

ITFC-1 组和 ITFC-2 组胫骨骨组织中骨小梁数量增加, 骨小梁分离度低于正常对照组; 与 ITFC-1 组比较, ITFC-2 组骨小梁数量较多, 分离度较低, 见图 4。与正常对照组比较, ITFC-1 组和 ITFC-2 组骨小梁分离度均低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 骨小梁面积百分比高于正常对

表 1 不同浓度淫羊藿总黄酮胶囊对大鼠血清 TRACP 5b 和 BALP 含量的影响

Table 1 Serum tartaric acid phosphatase 5b (TRACP 5b) and bone alkaline phosphatase (BALP) levels in rats

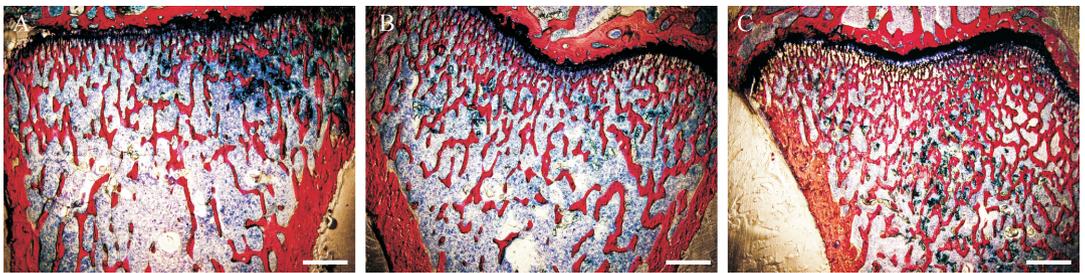
组别	n	TRACP 5b (U/L)	BALP (ng/L)
正常对照组	10	2.893 ± 0.056	0.240 ± 0.013
ITFC-1 组	10	2.361 ± 0.033	0.283 ± 0.009*
ITFC-2 组	10	1.807 ± 0.144***	0.309 ± 0.027***

TRACP 5b: 抗酒石酸性磷酸酶 5b; BALP: 骨碱性磷酸酶。与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ITFC-1 组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

照组 (均 $P < 0.05$); ITFC-1 组骨小梁数量和宽度增加, 但与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); ITFC-2 组骨小梁数量和宽度增加与正常对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 ITFC-1 组比较, ITFC-2 组骨小梁数量、骨小梁面积百分比及骨小梁分离度差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 2。提示 ITFC 可通过增加骨小梁数量、面积、宽度, 降低骨小梁分离度, 改善骨组织形态结构, 且高浓度效果较好。

3 讨论

骨质疏松是老年性骨骼慢性疾病, 易发生于绝经后的妇女, 其特点是骨量减少或受损, 骨强度下降, 骨折的风险增加^[7]。淫羊藿是小蘗科多年生草本植物, 全草供药用, 主治阳痿早泄、腰酸腿痛、四肢麻木、半身不遂、神经衰弱、健忘、耳鸣、目眩等症^[8]。淫羊藿中的主要成分为淫羊藿苷, 是



A: 正常对照组胫骨组织中骨小梁数量稀少、分离度较大, 组织结构稀疏; B: ITFC-1 组骨组织中网状结构稍有增加, 骨小梁宽度增加; C: ITFC-2 组骨组织中骨小梁网状结构致密, 骨小梁数量明显增多。红色表示骨小梁和皮质骨, 蓝色表示骨髓腔, 黑色表示骨骺线。标尺 = 1000 μm。

图 4 各组大鼠胫骨近心干骺端组织形态学变化

Figure 4 Histomorphological changes of proximal tibia proximal metaphysis in rats

表2 各组大鼠胫骨近心干骺端组织计量学静态参数比较

Table 2 Histomorphometric indices in the proximal tibia metaphysis of rats

组别	n	($\bar{x} \pm s$)			
		骨小梁宽度(μm)	骨小梁分离度(μm)	骨小梁数量(/mm)	骨小梁面积(%)
正常对照组	10	51.22 ± 4.17	222.96 ± 9.74	3.92 ± 0.23	25.56 ± 1.57
ITFC-1组	10	52.29 ± 2.68	208.88 ± 7.28*	4.09 ± 0.19	27.58 ± 0.98*
ITFC-2组	10	55.24 ± 3.29*	170.02 ± 9.85***	5.02 ± 0.52***	35.64 ± 1.52***

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与ITFC-1组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

抗骨质疏松的主要成分,具有开发成抗骨质疏松用药的前景^[9]。青年期大鼠骨密度和骨组织微结构的增加有可能预防老年骨质疏松症的发生。本实验主要通过灌胃ITFC,设置两个浓度,研究其对生长期大鼠骨密度和组织形态学的影响,并探索其中的作用机制。其中,大鼠灌胃浓度的选择来源于成人剂量和大鼠之间的换算,降低一半为低浓度药物组。

骨密度是检测骨质量的重要指标,通过骨密度检测,可以初步判定骨折发生的可能性^[10]。全身骨密度检测可以初步判定药物是否对骨代谢有影响。本实验12周时的数据显示,ITFC可显著增加大鼠的全身骨密度和离体骨密度,其中高浓度ITFC的作用效果更为明显。需要注意的是,在灌胃4周和8周时,与正常对照组比较,ITFC组大鼠骨密度均有增高趋势,但差异无统计学意义,提示ITFC作用于机体需要累积作用。

血清生物化学指标能反映骨代谢的本质,是骨形成和骨吸收的直观反映,能客观地评价骨转换效率^[11]。血清中有许多骨形成和骨吸收的相关因子,本研究选择的骨形成相关因子BALP和骨吸收相关因子TRACP 5b是目前骨代谢研究中比较热门的血清骨转换因子。骨形成相关因子增加,骨吸收相关因子降低,是增加骨量最有效的途径。本研究结果显示,ITFC能显著提高大鼠血清中BALP的含量,且高浓度ITFC对TRACP 5b的含量有降低的作用。说明ITFC可促进血清中骨形成相关因子的表达,高浓度ITFC有抑制骨吸收相关因子表达的作用。因此,ITFC抗骨质疏松的作用可能是通过增加骨形成、抑制骨吸收来实现的。

骨形态计量学指标是对骨组织微结构的重要评价指标,反映机体组织形态学方面的变化。本实验观察结果显示,ITFC能显著改善骨组织微细

结构,尤其能够增加骨小梁数量和面积百分比,高浓度的ITFC还能够增加骨小梁宽度,降低骨小梁分离度,说明ITFC也能够通过改善骨组织微结构来增加骨质量。

综上所述,ITFC可以通过提高大鼠骨密度、增加骨形成、降低骨吸收、改善骨组织微结构来预防骨质疏松的发生。

参考文献

- [1] NANES M S, KALLEN C B. Osteoporosis[J]. *Semin Nucl Med*, 2014, 44(6):439-450.
- [2] COSMAN F, DE BEUR S J, LEBOFF M S, et al. Erratum to: clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(7):2045-2047.
- [3] KARNIK A A, Feldt J M V. Osteoporosis in the elderly[J]. *La Presse Médicale*, 2016, 35(10 Pt 2):1547-1556.
- [4] GAUTAM A K, BHARGAVAN B, TYAGI A M, et al. Differential effects of formononetin and cladrin on osteoblast function, peak bone mass achievement and bioavailability in rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(4):318-327.
- [5] 李叶丽,王颖婉,李意奇,等.淫羊藿苷通过降低醛固酮水平减轻自发性高血压大鼠肾间质纤维化[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(4):519-522.
LI Yeli, WANG Yingwan, LI Yiqi, et al. Icaritin attenuates renal interstitial fibrosis by reducing aldosterone in SHR [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(4):519-522. (in Chinese)
- [6] SETCHELL K D, LYDEKING-OLSEN E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. [J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 78(3 Suppl):593S-609S.
- [7] LI Z, PENG S, PAN H, et al. Microarchitecture and nanomechanical properties of trabecular bone after strontium administration in osteoporotic goats[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 145(1):39-46.

[8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,2004:296.
Chinese Academy of Sciences. **Flora of China** [M]. Beijing: Science Press, 2014:296. (in Chinese)

[9] 赵文昌,宋丽军,温凯航,等. 淫羊藿抗骨质疏松症的研究进展[J]. **中国医药导报**,2012,9(25):20-22.
ZHAO Wenchang, SONG Lijun, WEN Kaihang, et al. Research progress of Longspur Epimedium for anti-osteoporosis [J]. **China Medical Herald**, 2012, 9 (25):20-22. (in Chinese)

[10] CUMMINGS S R, BATES D, BLACK D M. Clinical

use of bone densitometry [J]. **JAMA**, 2002, 288 (15):1889-1897.

[11] 高玉海,李 唯,陈克明,等. 正弦交变电磁场提高大鼠峰值骨量存在时间效应[J]. **第三军医大学学报**,2014,36(15):1557-1561.
GAO Yuhai, LI Wei, CHEN Keming, et al. A time effect in sinusoidal alternating electromagnetic field to improve peak bone mass in rats [J]. **Journal of Third Military Medical University**, 2014, 36 (15):1557-1561. (in Chinese)

[本文编辑 李 璐 余 方]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

2016 年本刊常用专业词汇缩写

世界卫生组织 World Health Organization, WHO
 加强监护病房 intensive care unit, ICU
 磁共振成像 magnetic resonance imaging, MRI
 X 线计算机断层扫描术 X-ray computed tomography, CT
 丙氨酸氨基转移酶 alanine aminotransferase, ALT
 天冬氨酸氨基转移酶 aspartate aminotransferase, AST
 自然杀伤细胞 natural killer cell, NK 细胞
 巨细胞病毒 cytomegalovirus, CMV
 人类免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus, HIV
 甲型肝炎病毒 hepatitis A virus, HAV
 乙型肝炎病毒 hepatitis B virus, HBV
 丙型肝炎病毒 hepatitis C virus, HCV
 无特定病原体 specific pathogen free, SPF
 链霉菌抗生素蛋白—过氧化物酶 streptavidin-peroxidase, SP
 苏木精(素)—伊红染色 hematoxylin-eosin staining, HE 染色
 聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR
 逆转录聚合酶链反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

酶联免疫吸附测定 enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA
 胎牛血清 fetal bovine serum, FBS
 磷酸盐缓冲液 phosphate buffer solution, PBS
 辣根过氧化物酶 horseradish peroxidase, HRP
 腺苷三磷酸 adenosine triphosphate, ATP
 二甲基亚砷 dimethyl sulfoxide, DMSO
 碘化丙啶 propidium iodide, PI
 焦碳酸二乙酯 diethyl pyrocarbonate, DEPC
 四甲基偶氮唑盐 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT
 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE
 肿瘤坏死因子 tumor necrosis factor, TNF
 转化生长因子 transforming growth factor, TGF
 白细胞介素 interleukin, IL
 白细胞分化抗原 cluster of differentiation, CD
 人类白细胞抗原 human leukocyte antigen, HLA
 核因子 κB nuclear factor-κB, NF-κB
 可信区间 confidence interval, CI