

王旭东, 赵宏宇, 邸琳, 等. 淫羊藿骨碎补联合骨营养补剂对骨质疏松大鼠的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 338-344. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080004

WANG Xudong, ZHAO Hongyu, DI Lin, et al. Effects of Epimedium Rhizoma Drynariae Combined with Bone Nutritional Tonic on Rats with Osteoporosis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 338-344. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080004

· 营养与保健 ·

淫羊藿骨碎补联合骨营养补剂对 骨质疏松大鼠的影响

王旭东¹, 赵宏宇^{2*}, 邸琳², 刘新宇², 张凤清^{1,*}

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012;

2. 吉林省中医药科学院, 吉林长春 130012)

摘要:目的: 研究淫羊藿骨碎补鹿骨粉联合骨营养补剂对去卵巢所致骨质疏松大鼠的影响。方法: 制备去卵巢大鼠, 随机分为模型组、阳性药组 (1.0 mg/kg·bw 戊酸雌二醇片)、中药组 (0.17 g/kg·bw 淫羊藿骨碎补提取物, 0.08 g/kg·bw 鹿骨粉)、营养剂组 (0.17 g/kg·bw 氨基葡萄糖盐酸盐, 0.08 g/kg·bw 硫酸软骨素, 0.17 g/kg·bw 碳酸钙)、复方组 (0.17 g/kg·bw 淫羊藿骨碎补提取物, 0.08 g/kg·bw 鹿骨粉, 0.17 g/kg·bw 氨基葡萄糖盐酸盐, 0.08 g/kg·bw 硫酸软骨素, 0.17 g/kg·bw 碳酸钙), 另设假手术组。以上各组灌胃体积均为 10 mL/kg·bw, 1 次/d, 连续灌胃 12 周, 每周称量体重并按体重调整灌胃量。12 周之后测定各组大鼠股骨密度和骨钙含量并进行骨组织病理学检查。结果: 淫羊藿骨碎补提取物中的主要功效成分为淫羊藿苷和黄酮类物质, 含量分别为 0.78% 和 4.38%。12 周之后, 与模型组相比, 中药组、营养剂组的骨密度和骨钙含量均无显著性差异 ($P>0.05$), 复方组骨密度和骨钙含量均显著高于模型组 ($P<0.05$)。中药组、营养剂组具有减轻骨质疏松的趋势, 但差异不显著 ($P>0.05$), 复方组可以增加骨小梁成分, 减轻骨小梁稀疏, 变细、断裂的程度 ($P<0.01$)。结论: 复方组具有增加大鼠骨密度和骨钙含量的作用, 可以减轻骨质疏松的程度, 增加骨小梁成分, 且复方组比单用中药或营养剂效果明显。

关键词: 鹿骨, 淫羊藿, 骨碎补, 骨密度, 骨钙, 去卵巢, 骨质疏松

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)13-0338-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080004

Effects of Epimedium Rhizoma Drynariae Combined with Bone Nutritional Tonic on Rats with Osteoporosis

WANG Xudong¹, ZHAO Hongyu^{2*}, DI Lin², LIU Xinyu², ZHANG Fengqing^{1,*}

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;

2. Jilin Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China)

Abstract: Objective: To study the effects of Epimedium Rhizoma Drynariae deer bone combined with bone nutritional tonic on osteoporosis rats induced by ovariectomized. Methods: Ovariectomized rats were prepared and randomly divided into model group, positive drug group (1.0 mg/kg·bw Estradiol valerate tablets), traditional Chinese medicine group (0.17 g/kg·bw Epimedium Rhizoma Drynariae extract, 0.08 g/kg·bw Deer bone meal), nutritional supplement group (0.17 g/kg·bw Glucosamine hydrochloride, 0.08 g/kg·bw Chondroitin sulfate, 0.17 g/kg·bw Calcium carbonate), compound group (0.17 g/kg·bw Epimedium Rhizoma Drynariae extract, 0.08 g/kg·bw Deer bone meal, 0.17 g/kg·bw Glucosamine hydrochloride, 0.08 g/kg·bw Chondroitin sulfate, 0.17 g/kg·bw Calcium carbonate) and sham operation group. The gavage volume of the above groups was 10 mL/kg·bw, 1 time/day, for 12 successive weeks, adjusted the gavage volume according

收稿日期: 2020-08-03

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20190304090yy)。

作者简介: 王旭东 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物提取与功能食品研究, E-mail: kongkongxinkong@163.com。

* 通信作者: 赵宏宇 (1987-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理、功能食品功能评价, E-mail: 169080112@qq.com。

张凤清 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物提取与功能食品研发, E-mail: 1044424827@qq.com。

to the weekly weight. After 12 weeks, the femoral bone density and bone calcium content of rats were measured, and the bone histopathological examination was performed. Results: The main functional components in the hydrating extract of Epimedium Rhizoma Drynariae were icariin (0.78%) and total flavonoids(4.38%). Twelve weeks later, compared with the model group, the bone mineral density and bone calcium content of SD rats in the traditional Chinese medicine group and the nutritional supplement group did not change significantly ($P>0.05$). The bone density and bone calcium content of SD rats in the compound group were significantly higher than those of rats in the model group ($P<0.05$). The traditional Chinese medicine group and the nutrient group had a trend to relieve osteoporosis, but it was not significant ($P>0.05$). The compound could increase the bone trabecular components and reduce the sparseness, thinning and fracture of the bone trabecula ($P<0.01$). Conclusion: The compound group has the effect of increasing the bone density and bone calcium content of rats, effectively reducing the degree of osteoporosis, and increasing the bone trabecular components. The compound group is more effective than the traditional Chinese medicine or nutrient alone.

Key words: deer bone; Epimedium; Drynariae rhizoma; bone mineral density; bone calcium; ovariectomy; osteoporosis

骨质疏松是由于骨质流失、骨密度降低、骨组织显微结构退化导致骨的脆性增高及负钙平衡的一种全身骨病^[1]。骨质疏松表现为骨骼疼痛、易于骨折^[2]。骨密度是反映骨质量的一个重要标志,可以反映骨质疏松程度^[3]。中国大陆地区 40 岁以上中老年人群中骨质疏松的患病率约为 24.6%,并且骨质疏松对患者的生命质量影响极大^[4]。因此,研究一款增加骨密度的保健食品具有非常重要的意义。

在中医理论中,鹿骨具有补虚羸,强筋骨等功效^[5]。淫羊藿,性辛甘而温,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿作用^[6]。骨碎补,性温而补,具有补肾强骨、续伤镇痛功效^[7]。现代医学研究表明,氨基葡萄糖盐酸盐具有良好的生物和化学稳定性、提升补钙效果^[8]。硫酸软骨素具有稳定软骨基质,保护软骨作用,促进新的软骨组织的形成,降低软骨面的退变^[9]。碳酸钙可提供骨生长所需的营养物质,减少骨中钙质沉积^[10]。基于这些科学理论,实验室拟开发一种可以增加骨密度的保健食品,将具有增加骨密度的中药材和骨营养剂联合使用,探讨淫羊藿骨碎补鹿骨粉联合骨营养剂对增加骨密度功能的影响,为增加骨密度、改善骨质疏松症功能的保健食品或药品提供了重要的实验依据。

本实验将淫羊藿和骨碎补进行水提,浓缩干燥制成淫羊藿骨碎补提取物,测定淫羊藿骨碎补提取物中主要功效成分的含量。以去卵巢所致骨质疏松大鼠为研究对象,在服用各自受试物 12 周后,测定各组大鼠股骨密度和骨钙含量并进行股骨病理学检查。观测中药组、营养剂组和复方组是否具有增加骨密度、改善骨质疏松的功效,进一步对比复方组与中药组和营养剂组的效果,以期为骨质疏松症相关保健食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF 级 SD 雌性大鼠,体质量 180~220 g,48 只,动物及饲料 长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,实验动物许可证号:SCXK(吉)-2018-0007,由吉林省中医药科学院实验动物伦理委员会审核通过,符合实验动物伦理委员会规定;淫羊藿 安国市安兴中药有限公司,批号:190301;骨碎补 河北国松堂制

药有限公司,批号:318080001;鹿骨粉 长春世鹿鹿业有限公司,批号:20180512;氨基葡萄糖盐酸盐 浙江金壳药业有限公司,批号:M-AT-1904020;硫酸软骨素 嘉兴恒杰生物制药有限公司,批号:HS1904270;碳酸钙 南通励成生物工程有限公司,批号:20190115;芦丁标准品(批号:100080-201811)、淫羊藿苷标准品(批号:110737-201516) 中国食品药品检定研究院;注射用青霉素钠 华北制药股份有限公司,批号:F9027101;戊酸雌二醇片 DELPHARMLilleS.A.S,批号:469A。

HHS 型水浴锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;KFL-400 纯水机 凯弗隆科技有限公司;KP5200DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;UV-5500PC 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;YP10001 大鼠秤 上海佑科仪器仪表有限公司;XTL-340E 体式显微镜 上海长方光学仪器有限公司;Ultra Focus 双能 X 射线小动物骨密度仪 美国 Faxitron 公司产品;1100 型高效液相色谱仪,配有自动进样器、四元泵、柱温箱、脱气机和二极管阵列检测器 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 淫羊藿骨碎补提取物的制备 在预实验中,分别以料液比、提取次数和提取时间为考察因素,设计三因素三水平试验,得出最优工艺为料液比 1:14,提取次数 3 次,提取时间为 1.5 h。取淫羊藿和骨碎补各 900 g,加入 14 倍量的水,25 ℃ 预浸 30 min,水提 3 次,每次提取 1.5 h,合并滤液,浓缩干燥,粉碎,得淫羊藿骨碎补提取物,出膏率为 17.3%。

1.2.2 淫羊藿骨碎补提取物中淫羊藿苷和总黄酮含量测定

1.2.2.1 淫羊藿苷的含量测定 对照品溶液的制备:精密称取淫羊藿苷标品适量,用甲醇溶解并配制成 0.1 mg/mL 的对照品溶液,备用。

样品溶液的制备:取 1.2.1 中的提取物粉末 0.1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 40 mL,称定重量,

超声处理 1 h(温度为 25 ℃),冷却至室温,用稀乙醇补足重量,取续滤液,备用。

样品测定:利用高效液相色谱对淫羊藿苷进行检测,流动相为乙腈:水(30:70),检测波长为 270 nm,柱温为 30 ℃,流速为 1 mL/min,进样量为 10 μ L^[11]。

1.2.2.2 总黄酮的含量测定 芦丁标准溶液的制备:精密称取芦丁标品适量,加甲醇制成每 1 mL 含芦丁 150 μ g 的溶液,备用。

标准曲线绘制:准确吸取芦丁标准溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 相当于芦丁 0、75、150、300、450、600 μ g 移入 10 mL 比色管中,加入 30% 乙醇定容至 5 mL,各加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,振摇后放置 5 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀后放置 6 min,加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,用 30% 乙醇定容至刻度,以零度管为空白,摇匀后用 1 cm 的比色杯,在 510 nm 处测定吸光值,绘制芦丁含量(μ g)与吸光值(A)的标准曲线。

样品处理:称取 1.2.1 中的提取物粉末 1 g,用滤纸包紧,置于平底烧瓶中,加入 100 mL 70% 乙醇溶液,浸润后,在 80 ℃ 水浴下回流 2 h,洗涤滤渣,合并滤液。在 50 ℃ 下减压蒸馏,直至烧瓶内无醇味,倒出溶液,并用热水洗涤烧瓶,合并溶液,以 75 mL 氯仿分 3 次萃取脱脂,待完全分层后,收集各次下层水溶液,于 50 mL 容量瓶定容。吸取上述水溶液 2 mL,沿聚酰胺树脂层析柱慢慢滴入,静置 10 min,待测液被充分吸附后,用 70% 乙醇洗脱,流速为 1 mL/min,至流出液基本无色,收集于 20 mL 容量瓶,定容后用于测定。

样品测定:利用紫外分光光度计测定总黄酮,取 1 mL 待测液按标准曲线制备操作步骤于 510 nm 处进行吸光度的测定^[12]。

1.2.3 动物去势模型制备及分组给药 48 只 SD 雌性大鼠,选 40 只进行双侧卵巢摘除手术,以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,肋骨下沿至骨盆上沿位置除毛备皮,碘伏消毒,在距离肋骨下沿 2 cm,距离脊柱 2 cm 的脊柱两侧,分别切开 1 cm 大小皮肤层切口,从皮肤切口下操作,切开小于 1 cm 的腹腔壁肌肉层切口,切口视野达到腹腔,拉出卵巢脂肪团,结扎卵巢与子宫连接部,摘除双侧卵巢,腹腔壁肌肉层和皮肤层分层缝合,消毒伤口。其余 8 只作为假手术组,大鼠按照去势手术方法处理,但保留双侧卵巢,仅切除部分脂肪。术后及连续 3 d,肌注青霉素(4×10^4 U/kg),以防感染。术后 3 d,将 40 只雌性 SD 大鼠随机分为 5 组:模型组、阳性药组、中药组、营养剂组、复方组。

将各组药物分别灌胃,大鼠的灌胃剂量为人体推荐量的 10 倍(人体质量以 60 kg 计),阳性药组灌胃剂量为戊酸雌二醇片 1.0 mg/kg·bw;中药组的灌胃药物剂量为淫羊藿骨碎补提取物 0.17 g/kg·bw,鹿骨粉 0.08 g/kg·bw;营养剂组灌胃药物剂量为氨基葡萄糖盐酸盐 0.17 g/kg·bw,硫酸软骨素 0.08 g/kg·bw,

碳酸钙 0.17 g/kg·bw;复方组灌胃药物剂量为淫羊藿骨碎补提取物 0.17 g/kg·bw,鹿骨粉 0.08 g/kg·bw,氨基葡萄糖盐酸盐 0.17 g/kg·bw,硫酸软骨素 0.08 g/kg·bw,碳酸钙 0.17 g/kg·bw。假手术组和模型组大鼠经口给予 0.5% 羧甲基纤维素溶液,受试样品均用 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液配制。灌胃溶液的体积均为 10 mL/kg·bw,1 次/d,连续灌胃 12 周,每周称量体重并按体重调整灌胃量。

1.2.4 动物处理及测定指标

1.2.4.1 动物处理 大鼠末次灌胃 1 h 后以 10% 水合氯醛溶液 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉采血后处死大鼠,取出双侧股骨,其中左侧股骨用于骨密度测定,之后于 105 ℃ 干至恒重,精密称重,记录数值,用于骨钙测定,右侧股骨用于骨组织病理学检查。

1.2.4.2 骨密度测定 将左侧股骨摆放在生物学 X 射线小动物骨密度仪的吸收测量平台上,直接扫描左侧股骨骨密度。

1.2.4.3 骨钙测定 大鼠左侧股骨灰化,然后加酸消化,用 EDTA 滴定法测骨钙含量。

1.2.4.4 骨组织病理学检查 病理组织学检查,剥离大鼠右侧股骨迅速放入 10% 福尔马林固定,氯化铝法脱钙,石蜡包埋、切片,HE 染色,茜素红 S 染色光镜观察。

观察指标:HE 观察指标:骨皮质(增厚、变薄、疏松),骨小梁(减少、变细、疏松、断裂),软骨退变及其他改变;茜素红 S 染色观察指标:钙质沉积呈橘红色,其它呈复染色(淡绿)。

评分标准:

a:“0”分表示 HE 染色结果基本正常,或是茜素红 S 染色阴性;

b:“1”分表示 HE 染色结果偶见轻微病变,或是茜素红 S 染色疑似阳性;

c:“2”分表示 HE 染色结果轻度病变,或是茜素红 S 染色弱阳性,范围 $\leq 1/4$ 视野;

d:“3”分表示 HE 染色结果中度病变,或是茜素红 S 染色中等阳性,范围 $\leq 1/2$ 视野;

e:“4”分表示 HE 染色结果重度病变,或是茜素红 S 染色强阳性,病变范围 $\geq 3/4$ 视野;

f:如观察结果在“0~1”之间,则可记为“0.5”分,依次类推。

1.3 数据处理

采用 Origin 8.0 作图,采用 SPSS 20.0 进行数据分析,各数值用均数 $\bar{X} \pm S$ 表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 淫羊藿骨碎补提取物中的淫羊藿苷、总黄酮含量测定结果

经 1.2.2.1 中的方法检测淫羊藿苷的含量,以淫

淫羊藿苷含量(mg/mL)与峰面积的标准曲线为 $y=11389x-37.65$, $R^2=0.9994$, 淫羊藿苷含量为 0.78%, 淫羊藿苷对照品和淫羊藿骨碎补提取物的色谱图如图 1 所示; 经 1.2.2.2 中的方法检测总黄酮的含量, 以芦丁含量(mg/mL)与吸光值(A)的标准曲线为 $y=11.887x+0.0015$, $R^2=0.9993$, 总黄酮的含量为 4.38%。

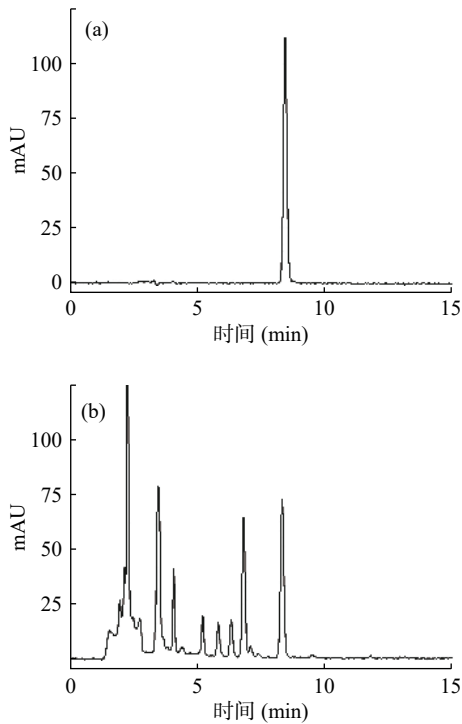


图 1 淫羊藿苷对照品(a)和淫羊藿骨碎补提取物(b)色谱图
Fig.1 Chromatograms of icariin reference substance (a) and Epimedium Rhizoma Drynariae extract (b)

2.2 各组药物对大鼠体重的影响

由表 1 可知, 各组大鼠初始体重差异无统计学意义($P>0.05$), 模型组从第 4 周开始, 体重均显著高于假手术组($P<0.01$), 大鼠体重异常改变的原因可能是由于卵巢被切除后雌激素合成迅速减少, 从而引起激素水平紊乱。雌激素可抑制脂肪的合成代谢, 因此雌激素水平降低后出现脂肪沉积的现象, 进而造成体重增加^[13-16]。与模型组相比, 阳性药组的每周体重和体重增量均显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与模型组相比, 中药组和复方组的体重增量均显著增加($P<0.05$), 表明包含中药材的受试物可能对于大鼠体重增加有一定影响。

2.3 各组药物对大鼠股骨干重/体重、骨密度、骨钙含量的影响

由表 2 可知, 与假手术组相比, 模型组的股骨干重/体重、骨密度、骨钙含量均极显著降低($P<0.01$), 即大鼠骨密度低下模型造模成功; 与模型组相比, 阳性药组的股骨干重/体重极显著增加($P<0.01$), 骨密度和骨钙含量显著增加($P<0.05$), 表示阳性药组药物有效; 与模型组相比, 中药组、营养剂组的骨钙含量和骨密度未见显著性差异($P>0.05$), 复方组中骨钙含量和骨密度值均有显著增加($P<0.05$); 与模型组相比, 其他组的股骨干重、股骨干重/体重均未见明显差异($P>0.05$), 结果表明复方组相较中药组和营养剂组, 效果更加显著。各组大鼠股骨骨密度扫描图片见图 2。

2.4 骨组织病理学观察

股骨病理学检查结果见图 3, 结果显示假手术组骨小梁分布面积较大, 骨小梁连续、完整, 彼此连接,

表 1 各组药物对大鼠体重的影响

Table 1 Effect of each group of drugs on the body weight of rats

组别	初始体重(g)	第4周(g)	第8周(g)	第12周(g)	增重(g)
假手术组	228.88±16.24	286.96±27.59**	303.21±31.46**	312.83±29.54**	83.94±16.66**
模型组	232.40±14.84	341.24±29.37###	366.54±33.04###	385.23±32.27###	152.83±24.40###
阳性药组	232.20±15.88	297.69±17.70**	338.46±24.27*	354.94±30.25*	122.74±22.02**
中药组	232.51±15.14	362.04±21.39*	385.49±29.82	408.86±37.31	176.35±33.40*
营养剂组	232.69±14.63	355.12±26.07	380.58±33.34	399.01±36.88	163.74±35.81
复方组	232.64±15.87	351.63±23.89	386.23±28.34	406.16±32.71	173.02±25.85*

注: 增重表示末次体重和初始体重的差值; 模型组与假手术组组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 表2~表4同。

表 2 各组药物对大鼠股骨的重量、骨钙及骨密度的影响

Table 2 Effect of each group of drugs on the weight, bone calcium, and bone density of rat femur

组别	动物数(只)	股骨干重(g)	股骨干重/体重(%)	骨密度(mg/cm ²)	骨钙含量(%)
假手术组	8	0.71±0.08	0.23±0.01**	236.96±8.90**	25.93±3.17**
模型组	8	0.74±0.04	0.19±0.01###	222.08±5.10###	21.32±1.53###
阳性药组	8	0.74±0.05	0.21±0.02**	238.46±15.15*	22.95±1.93*
中药组	8	0.75±0.06	0.19±0.02	224.98±26.20	21.77±1.24
营养剂组	8	0.77±0.05	0.20±0.02	222.08±14.34	21.17±2.07
复方组	8	0.75±0.06	0.19±0.02	235.48±14.65*	23.02±1.85*

注: 骨钙比表示骨钙和骨干重的比值。

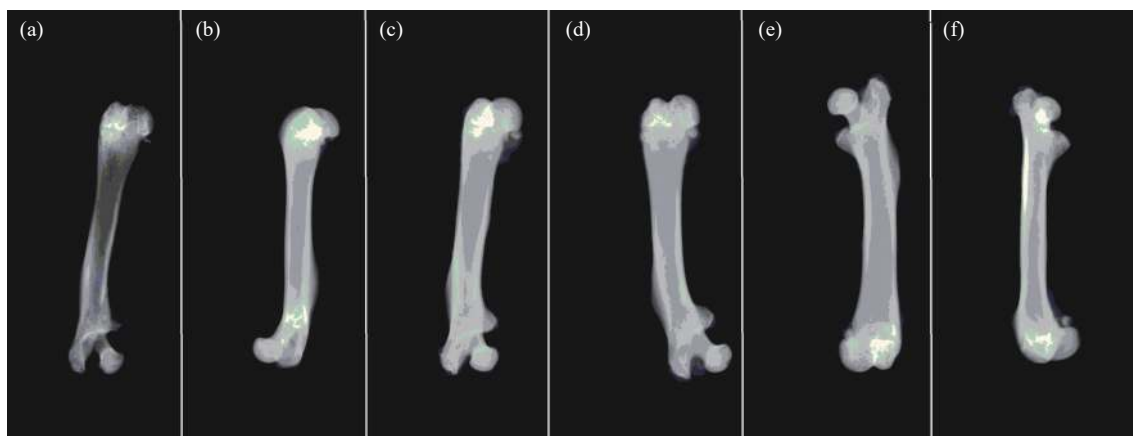


图2 各组大鼠股骨骨密度扫描图片

Fig.2 Scanning pictures of femur bone mineral density of rats in each group

注: a: 假手术组; b: 模型组; c: 阳性药组; d: 中药组; e: 营养剂组; f: 复方组; 图3同。

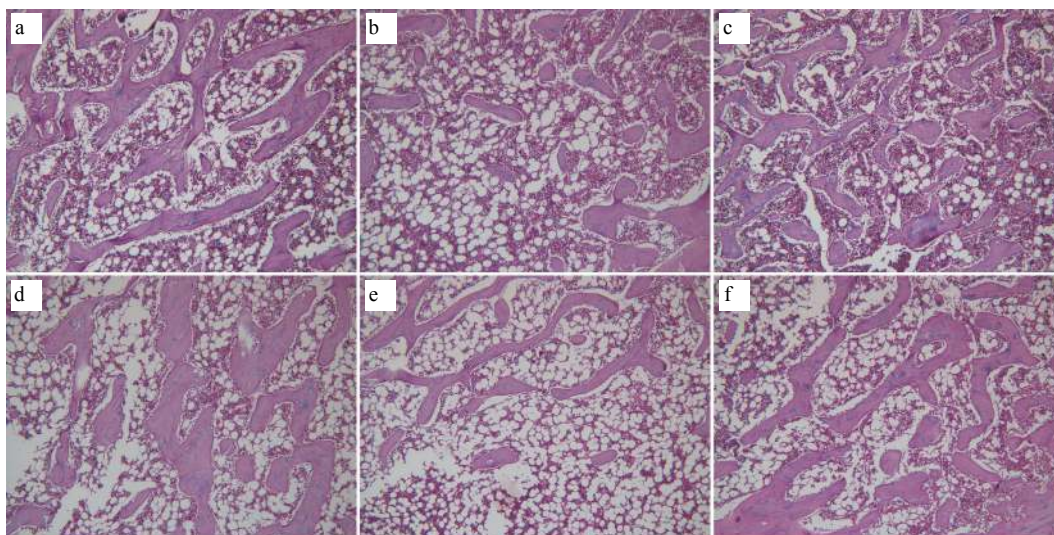


图3 各组药物对假手术大鼠、去卵巢大鼠股骨病理学影响

Fig.3 Effect of each group of drugs on pathology of femur in sham-operated rats and ovariectomized rats

间隔内多见造血组织成分分布, 少见脂肪成分, 骨小梁粗壮, 呈网状分布, 镜下分布数量多(图3a)。模型组骨小梁分布面积减少, 主要集中在股骨干骺段, 多已断裂, 无完整的, 切面较细, 间隔增加, 分布造血组织成分减少, 可见脂肪组织增多(图3b)。与假手术组比较, 模型组骨小梁成分减少, 骨小梁稀疏, 变细、断裂, 结构紊乱, 表明骨质疏松造模成功。阳性药组与模型组比较, 骨小梁成分增加, 骨小梁稀疏, 变细、断裂的程度减轻($P < 0.01$), 有效减轻了骨质疏松的程度, 增加了骨小梁成分(图3c)。中药组与模型组比较, 骨小梁成分有所增加, 骨小梁稀疏, 变细、断裂的程度有所减轻, 可以减轻骨质疏松的程度(图3d)。营养剂组与模型组比较, 骨小梁稀疏, 变细、断裂的程度有所减轻, 缓解了骨质疏松的程度(图3e)。复方组与模型组比较, 骨小梁成分增加, 骨小梁稀疏, 变细、断裂的程度减轻($P < 0.01$), 有效减轻了骨质疏松的程度, 增加了骨小梁成分(图3f)。

茜素红 S 染色观察: 钙质沉积呈橘红色, 其它呈

复染色(淡绿)。依据评分标准, 对股骨染色结果进行评分, 统计结果见表3与表4。

表3 动物股骨组织常规染色观察结果
Table 3 Observation results of routine staining of animal femur tissue

组别	动物数(只)	总分统计	P(与模型组比较)
假手术组	8	0.688±0.843	0.000
模型组	8	12.812±2.738 ^{##}	-
阳性药组	8	6.500±2.803 ^{**}	0.000
中药组	8	10.875±3.171	0.212
营养剂组	8	11.250±2.673	0.267
复方组	8	8.875±1.157 ^{**}	0.002

3 讨论与结论

常见的骨质疏松症为原发性骨质疏松症。主要分为绝经后骨质疏松症(I型)和老年性骨质疏松症(II型)^[17]。其中, 绝经后骨质疏松症主要是由于自然绝经或卵巢切除后导致体内雌激素含量下降而引起骨量丢失的症状。雌激素的抗骨吸收作用可能与其

表 4 动物股骨组织茜素红 S 染色观察结果

Table 4 Observation of alizarin red S staining in animal femur

组别	动物数(只)	总积分统计	P(与模型组比较)
假手术组	8	3.375±0.744	0.000
模型组	8	1.125±1.126 [#]	-
阳性药组	8	3.125±0.641 ^{**}	0.000
中药组	8	2.125±0.991	0.080
营养剂组	8	2.125±1.247	0.114
复方组	8	2.625±1.302 [*]	0.027

抑制成骨细胞凋亡和促进破骨细胞凋亡有关,但其机制尚未完全清楚^[18]。老年性骨质疏松症一般指老人 70 岁后发生的骨质疏松,表现为“低转换”型骨质疏松,主要是由于老年人骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化受抑制,成骨细胞分裂增殖缓慢,骨形成因子合成代谢受阻,活性衰退致骨形成期延长,骨形成率降低,同时破骨细胞对骨的吸收增强,使骨重建处于负平衡,骨量丢失^[19]。

依中医理论,以淫羊藿其补肾阳,益肾精之功而为君药。以鹿骨主治虚劳骨弱之功作为本方中的臣药。以骨碎补其补益肝肾,又可活血祛瘀之功为佐使药。诸药同用,重在补益肾精,温壮肾阳,使精血充盈,髓海充盈,骨髓得养,而使筋骨强健。同时,又发挥其活血祛瘀之能,使之补而不滞,补力更强。科学研究表明,淫羊藿苷是通过促进成骨细胞的生成和活化^[20-21],抑制破骨细胞的形成来缓解骨质疏松^[22]。淫羊藿总黄酮是通过促进骨组织中 OPG mRNA 的表达来抑制破骨细胞的分化与成熟,从而治疗骨质疏松^[23]。鹿骨中含有骨胶原、蛋白质、软骨素、磷脂质和磷蛋白,利于促进骨形成,促进体内胶原蛋白及弹性蛋白的更新,抑制骨吸收,促进软骨内骨化等过程^[24]。骨碎补总黄酮通过改善骨质疏松的超微结构及脯氨酸羟化程度,从而为骨质疏松的防治研究提供思路^[25]。

氨基葡萄糖可以通过刺激黏多糖的合成来增加骨钙的摄取量,提高骨与软骨组织的吸收和代谢,亦能改善滑膜液的粘稠度。氨基葡萄糖也是蛋白多糖合成的基本物质,可以作用于关节软骨,恢复软骨细胞的代谢功能,刺激软骨细胞产生蛋白多糖,也可抑制损伤软骨的酶如胶原蛋白酶和磷脂酶 A2 的活性^[26-27]。硫酸软骨素通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 p38MAPK 和信号调节激酶 ERK1/2 的活性,降低核转录因子 kappa B 的核易位,降低蛋白水解酶、炎症诱导酶以及促炎细胞因子的合成来发挥作用^[28]。氨基葡萄糖和硫酸软骨素联合作用能促进人关节软骨细胞中 II 型胶原蛋白的合成,降低软骨细胞死亡,保持软骨细胞外基质的合成与分解的代谢平衡^[29]。据报道,硫酸软骨素、碳酸钙也具有补充和促进骨钙吸收的作用^[30-31]。因此,通过上述一系列作用机理,氨基葡萄糖和硫酸软骨素可以保护关节软骨细胞,控制骨质疏松症增加骨密度。

本实验将具有增加骨密度功效的中药材和骨营养剂联合使用,探讨淫羊藿骨碎补鹿骨粉联合骨营养剂对增加骨密度功能的影响。是以中医理论为指导,选用益肾精、补肾、强筋骨中药:鹿骨、淫羊藿、骨碎补为根本,配合其他营养物质(氨基葡萄糖盐酸盐、碳酸钙),及保护软骨的硫酸软骨素组成,起到既治标又治本,促进钙吸收的组方思路。实验结果表明,复方组具有增加大鼠骨密度和骨钙含量的作用,与模型组相比,复方组可以增加骨小梁成分,减轻骨小梁稀疏,变细、断裂的程度,有效减轻骨质疏松的程度,增加骨小梁成分。并且,与复方组相比,中药组和营养剂组对于骨小梁成分同样有所增加,骨小梁稀疏,变细、断裂的程度同样有所减轻,但是增加骨密度和骨钙效果并不显著,实验结果证明复方组比单用中药或营养剂效果更加显著。本研究为增加骨密度、改善骨质疏松症功能的保健食品或药品提供了重要的理论基础,并且建议多关注中医理论和现代医学的结合。但本实验所用药材提取物为粗提物,复方的具体作用机制还有待于今后从分子水平、体外实验等进一步阐明。

参考文献

- [1] 张倩,王花欣,王媛,等. 中药防治绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(7): 1083-1088.
- [2] 钱一飞,王颖,王旭. 血塞通片联合特立帕肽治疗老年骨质疏松症的临床研究[J]. 药物评价研究,2020,43(7): 1347-1350.
- [3] 侯建明. 糖尿病和骨质疏松关系的研究进展[J]. 福建医药杂志,2016(S1): 5-11.
- [4] Zhu J, Guo F, Zhang J, et al. Relationship of calcification in the carotid or coronary arteries and osteoporosis in the elderly[J]. *Minerva Medica*, 2018.
- [5] 冯印,刘艳,陈海燕. 鹿骨的功效益用价值及深入开发研究[J]. *农业与技术*,2013,33(12): 173.
- [6] 尹利端,彭坚,尹利昂,等. 淫羊藿补骨脂复合胶囊毒理学研究[J]. *食品工业科技*,2016,37(7): 350-354.
- [7] 欧阳露,汪选斌. 中药骨碎补调节骨代谢作用及机制研究进展[J]. *湖北医药学院学报*,2013,32(2): 187-190.
- [8] 张露勇,刘婷,刘师卜. 两种增加骨密度功能保健食品的功效益用研究[J]. *海军医学杂志*,2016,37(6): 526-531.
- [9] 丁晓光,李予东,梁双武,等. 氨糖软骨素钙片对膝关节骨关节炎的作用研究[J]. *中华创伤骨科杂志*,2018,20(5): 443-446.
- [10] 桂秀. 碳酸钙联合阿法骨化醇、西格列汀对 2 型糖尿病合并骨质疏松症患者糖代谢及骨密度的影响[J]. *现代诊断与治疗*,2019,30(16): 2782-2784.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015: 249.
- [12] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国中医药出版社,2011: 276.
- [13] 邓婷,颜玲. 雌激素对脂肪的影响研究进展[J]. *中国临床解剖学杂志*,2015,33(2): 236-238.
- [14] Salpeter S R, Walsh J M E, Ormiston T M, et al. Meta-analysis: Effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women[J]. *Diabetes*

- Obesity & Metabolism, 2010, 8(5): 538-554.
- [15] Arjmandi B H, Alekel L, Hollis B W, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126(1): 161-167.
- [16] Hofmann S L, Goldstein J L, Hammer R E. Overexpression of human low density lipoprotein receptors leads to accelerated catabolism of Lp(a) lipoprotein in transgenic mice[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1990, 85(5): 1542-1547.
- [17] 马远征, 王以朋, 刘强, 等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南(2018)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(12): 1541-1567.
- [18] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(32): 3963-3982.
- [19] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2019)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(10): 1357-1372.
- [20] Wei Q S, Zhang J, Hong G J, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by activating the $\text{era-wnt}/\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 931-939.
- [21] Wu Y, Xia L, Zhou Y, et al. Icariin induces osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in a MAPK-dependent manner[J]. *Cell Proliferation*, 2015, 48(3): 375-384.
- [22] Huang J, Zhang J C, Zhang T L, et al. Icariin suppresses bone resorption activity of rabbit osteoclasts *in vitro*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(7): 890-895.
- [23] 陈柏龄, 谢登辉, 王宗伟, 等. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPGL mRNA 表达的影响[J]. *中国骨伤*, 2009, 22(4): 271-273.
- [24] 安丽萍, 任广凯, 石力强, 等. 鹿骨多肽对地塞米松诱导的骨质疏松大鼠骨微结构的影响[J]. *中草药*, 2016, 47(22): 4030-4034.
- [25] 伍海昭, 陈海啸, 朱敏. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨超微结构及脯氨酸羟化程度的影响[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(1): 48-50.
- [26] 郭建利. 金天格胶囊对老年绝经后膝关节炎患者血清 OPN、MMP-3、IL-1 β 及 TGF- β 1 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(3): 635-637.
- [27] 陈德生, 张志刚, 曹靖, 等. 盐酸氨基葡萄糖对兔膝骨性关节炎的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(3): 287-291.
- [28] He Z X, Jin Y, Zhang T M. Structure of chondroitin sulfate and its application in osteoarthritis therapy[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2012, 47(5): 387-391.
- [29] 薛延, 吴树勋, 黄任, 等. 骨膳食营养补充剂研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(3): 25-30.
- [30] 刘汝萃, 张建全, 马良, 等. 氨基糖软骨素钙片增加骨密度功能试验[J]. *食品工业*, 2019, 40(6): 222-224.
- [31] Bruyere D O, Reginster J Y. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis[J]. *Drugs & Aging*, 2007, 24(7): 573.