

· 基础研究 ·

人参花蕾黄芪合剂对 D- 半乳糖模型雄性大鼠
骨质疏松骨量的影响叶冠希¹ 肖 茜¹ 吴 铁² 戴娟秀^{3, 4}

摘要 **目的** 观察人参花蕾黄芪合剂对雄性大鼠衰老时出现的原发性骨质疏松的预防作用。**方法** 将 3 月龄 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 对照组 (NC 组)、D- 半乳糖模型组 (DG 组)、复方司坦唑醇 (司坦唑醇 + 吡拉西坦) 阳性对照组 (SP 组)、仙灵骨葆中药对照组 (GB 组)、人参花蕾黄芪合剂低剂量组 (GFRAL 组) 及人参花蕾黄芪合剂高剂量组 (GFRAH 组), 每组 10 只; 连续给药 3 个月后, 处死大鼠后取左胫骨进行骨形态计量学检测, 取右股骨进行生物力学性能测定, 取左股骨进行骨钙、磷酸、羟脯氨酸 (Hyp) 浓度测定。**结果** 与 NC 组比较, DG 组胫骨上段静态参数中骨小梁百分率 (%Tb.Ar)、骨小梁数目 (Tb.N) 降低, 骨小梁分离度 (Tb.Sp) 增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 胫骨上段动态参数单位骨小梁面积破骨细胞数 (Oc.N)、破骨细胞周长百分数 (%Oc.Pm) 增加 ($P < 0.01$), 矿化沉积率 (MAR)、骨表面水平骨形成率 (BFR/BS)、骨面积水平骨形成率 (BFR/BV)、骨组织面积水平骨形成率 (BFR/TV) 下降 ($P < 0.05$), 股骨 Hyp 下降 ($P < 0.01$)。与 DG 组比较, GFRAH、GFRAL 组胫骨上段静态参数中的 %Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N 增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), Tb.Sp 减少 ($P < 0.05$); GFRAL 组的股骨 Hyp 降低 ($P < 0.05$)。**结论** 人参花蕾黄芪合剂与复方司坦唑醇和仙灵骨葆胶囊的预防效果相似, 可有效预防 D- 半乳糖导致雄性大鼠的骨质疏松改变。

关键词 人参花蕾黄芪合剂; D- 半乳糖; 雄性大鼠; 骨质疏松; 中成药

Effect of the Compound of Ginseng Flower Bud And Astragalus on Osteoporosis Bone Mass in D-galactose Model Male Rats YE Guan-xi¹, XIAO Qian¹, WU Tie², and DAI Juan-xiu^{3, 4} ¹ School of Public Health of Guangdong Medical University, Guangdong (523808); ² School of Pharmacy of Guangdong Medical University, Guangdong (523808); ³ Department of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Guangdong Medical University, Guangdong (523808); ⁴ Dongguan Key Laboratory of Experimental Animal Resources Development and Application Research of Biomedical Industry, Guangdong (523808)

ABSTRACT **Objective** To investigate the preventive effect of the compound of Ginseng flower bud and Astragalus on primary osteoporosis in aging male rats. **Methods** Sixty male SD rats, with 3 months old were randomly divided into 6 groups: the control group (NC group), D-galactose model group (DG group), positive control group (SP group, Stanazol + Piracetam), Chinese medicine control group (GB group, Xianling Gubao Capsule), the low-dose group of the compound of Ginseng Flower Bud and Astragalus (GFRAL group), and the high dose group of the compound of Ginseng Flower Bud and Astragalus (GFRAH group), 10 in each group. After 3 months of continuous administration, all the rats were sacrificed. Then the left tibias were taken for bone histophiometry, the right femurs were used to detect biomechanical properties, and the left femurs were taken to measure bone calcium, phosphate and hydroxyproline (Hyp) concentrations. **Results** Compared with NC group, the static parameters of percent trabecular area (%Tb.Ar) and trabecular number (Tb.N) in upper tibia of DG group decreased, and the degree of trabecular spacing (Tb.Sp)

作者单位: 1. 广东医科大学公共卫生学院 (广东 523808); 2. 广东医科大学药学院 (广东 523808); 3. 广东医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫系 (广东 523808); 4. 东莞市生物医药产业实验动物资源开发与应用研究重点实验室 (广东 523808)

通讯作者: 戴娟秀, Tel: 0769-22896573, E-mail: daijuanxiu@gdmu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20230925.090

increased ($P<0.05$, $P<0.01$). While osteoclasts number (Oc.N) and osteoclast perimeter/ Tb.Pm $\times 100$ (%Oc.Pm) per trabecular area of the dynamic parameters of upper tibia segment increased ($P<0.01$), mineral apposition rate (MAR), bone formation rate of bone surface (BFR/BS), bone formation rate (BFR/BV), bone formation rate of trabecular volume (BFR/TV) decreased ($P<0.05$), and femoral Hyp decreased ($P<0.01$). Compared with DG group, the static parameters of %Tb.Ar, Tb.Th and Tb.N in upper tibia in GFRAH and GFRAL groups increased ($P<0.01$, $P<0.05$), and Tb.Sp decreased ($P<0.05$), respectively. The Hyp of femur in GFRAL group decreased ($P<0.05$). **Conclusions** The compound of Ginseng flower bud and Astragalus has similar preventive effect with compound Stanazol and Xianling Gubao Capsule. It can effectively prevent osteoporosis in male rats caused by D-galactose, and it is suitable for the elderly to use in daily life. could effectively prevent from osteoporosis caused by D-galactose in male aging rats, and the compound may have the potential to become an ideal anti-osteoporosis drug.

KEYWORDS compound of Ginseng flower bud and Astragalus; D-galactose; male rats; osteoporosis; Chinese herbal compound

原发性骨质疏松症本质上是衰老的体现,可分为绝经后骨质疏松(I型)和老年性骨质疏松(II型)。在中国,40岁以上人群中13.2%患骨质疏松症,而50岁以后患骨质疏松症的概率更高^[1]。一旦患有骨质疏松症,老年人发生脊椎、髋部骨折率增高,且并发症严重时需长期卧床,甚至失去生活能力。由此可见,预防老年人群发生骨质疏松显得十分重要。目前防治骨质疏松症的药物以西药为主,长期服用会造成一些不良反应。因此,寻找疗效肯定,无不良反应的中药是当前研究预防骨质疏松症的热点之一。

本课题组前期研究发现人参花蕾能有效对抗D-半乳糖所致雄性大鼠的骨丢失^[2]。此外,越来越多的研究表明黄芪能预防多种因素,如去卵巢、激素等,导致的骨质疏松症^[3,4]。然而,目前黄芪对老年男性骨质疏松症的防治作用研究得较少。D-半乳糖使雄性大鼠的骨丢失,在病理生理上与老年男性骨质疏松有诸多的相似之处^[5]。此外,人参和黄芪都是公认的补气补血药,两者可相辅相成,联合应用对老年男性骨质疏松的预防作用是否优于单味用药同样值得进一步探索。

材料与方法

1 动物 3月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,采用双盲法进行实验。实验动物由广东省医学实验动物中心提供[生产许可证号:SYXK(粤)2018-0002],体重(213 ± 12)g。实验由广东医科大学实验动物伦理委员会审查通过(No. GDY2104037)。

2 药物、试剂及仪器 药物有人参花蕾黄芪合剂浸膏(人参花蕾和黄芪按1:1比例进行熬制,广东东莞广发药业有限公司,批号:210130)、D-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20211025)、脑复康(广州康奇力药业有限公司,批号:211002)、

康力龙(广西南宁白会药业集团有限公司,批号:210101)、仙灵骨葆胶囊(贵州仙灵药业股份有限公司,批号:210702)。

试剂有盐酸四环素(上海新亚制药厂,批号:20210416)、钙黄绿素(Sigma Chemical Co. USA,批号:20210915)。仪器有电子天平(梅特勒-托利多仪器公司上海分公司,AE240)、硬组织切片机(德国LEICA公司,LEICA2155)、生物显微镜(广西梧州市光学仪器厂,XSZ-0800)、荧光显微镜(Nikon Japan, Y-FL型)、台式离心机(上海安亭科学仪器厂,JI-80-2B)、荧光显微镜及显微照相机(德国LEICA公司,LEICA MP30)、IDG 离子性发射光谱仪(美国 IJA 公司,IRIS/AP型)、材料测试系统(MTS, USA, 858 Mini Bionix型)。

3 动物分组、造模及处理方法 60只3月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,适应性饲养7天后,按体重对等原则随机分为正常对照组(NC组)、D-半乳糖模型组(DG组)、复方司坦唑醇阳性对照组(SP组)、仙灵骨葆中药对照组(GB组)、人参花蕾黄芪合剂低剂量组(GFRAL组)和人参花蕾黄芪合剂高剂量组(GFRAH组),每组各10只。NC组:给予0.9%生理盐水[5 mL/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予5 mL/kg生理盐水灌胃。DG组:给予D-半乳糖[100 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予5 mL/kg生理盐水灌胃。SP组:给予D-半乳糖[100 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予0.54 mg/kg司坦唑醇及432 mg/kg吡拉西坦灌胃,灌胃体积为1 mL/100 g,相当于临床成人用量。GB组:给予D-半乳糖[100 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予270 mg/kg仙灵骨葆灌胃,灌胃体积为1 mL/100 g,相当于临床成

人用量^[6]。GFRAL组:给予D-半乳糖[100 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予486 mg/kg人参花蕾黄芪合剂灌胃,灌胃体积为1 mL/100 g,相当于临床成人用量的5倍^[7]。GFRALH组:给予D-半乳糖[100 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射给药,同时每天给予2 430 mg/kg人参花蕾黄芪合剂灌胃,灌胃体积为1 mL/100 g,相当于临床成人用量25倍^[7]。每组给药持续时间均为90天。与NC组比较,DG组骨密度下降($P<0.05$),参照参考文献[8],可判定造模成功,成功率为100%。在饲养过程中,由于灌胃疏忽导致GFRAL组死亡大鼠1只,故最终该组实验大鼠数目为9只。实验期间,每周称量一次大鼠体重,称重前一天禁食不禁水,第二天给药前称重,并根据体重变化调整下一周的给药量。在实验结束前的13、14天,以25 mg/kg的剂量给所有大鼠皮下注射盐酸四环素各1次,实验结束前3、4两天以5 mg/kg的剂量皮下注射钙黄绿素各一次,两荧光标记间隔10天。实验结束当天,用3%戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)行腹腔注射麻醉后右心室彻底抽血处死所有实验大鼠,取出左侧胫骨、左侧股骨、右侧股骨。

4 骨标本制备、检测指标及方法

4.1 骨组织形态计量学检测 根据《骨质疏松

药理学—动物实验与图谱》^[9]中的方法,将实验各组大鼠的左侧胫骨上段制成5 μm 不脱钙骨切片、中段骨制成40 μm 不脱钙骨磨片,进行骨组织形态计量学检测,通过计算获得动态和静态各参数指标,具体参数指标情况见表1。

4.2 骨有机质及矿物质检测 将左侧股骨烘干、消化,分成两份,一份使用电感耦合等离子体质谱仪(inductively coupled plasma mass spectrometer, ICP-MS)测定骨钙、磷含量,另一份用羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)试剂盒测定Hyp含量。

4.3 大鼠股骨生物力学性能检测 用858 Mini Bionix 型材料测试系统分析右侧股骨(三点弯曲实验)的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷、刚度和断裂能量吸收等生物力学指标。

5 统计学方法 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 20.0软件。小鼠体重、骨形态计量学指标的数据先进行正态性检验,如符合正态分布的数据进行组间比较时采用单因素方差分析,方差齐采用LSD检验;方差不齐则采用Tamhane's T^2 检验;如数据是偏态分布则用Kruskal-Wallis秩和检验后,再进一步用Conover's t 检验比较两组间差别。不同时间点的小鼠体重用配对 t 检验比较两组间差别。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 骨组织形态计量学参数指标情况

样本来源	形态计量学参数	参数指标	参数意义
胫骨上段松质骨	静态	骨小梁百分率(percent Trabecular area, %Tb.Ar)	反映骨量多少和骨小梁的形态结构
		骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)	
		骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)	
		骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb.Sp)	
	动态	破骨细胞周长百分数(osteoclast perimeter/ Tb.Pm $\times$ 100, %Oc.Pm)	反映骨吸收和骨形成情况
		单位骨小梁面积破骨细胞数(osteoclast number, Oc.N)	
		荧光标记百分率(percent labeled perimeter, %L.Pm)	
		矿化沉积率(mineral apposition rate, MAR)	
		骨面积水平骨形成率(bone formation rate, BFR/BV)	
		骨表面水平骨形成率(bone formation rate of bone surface, BFR/BS)	
胫骨中段皮质骨	静态	皮质骨面积(cortical area, Ct.Ar)	反映骨量多少
		皮质骨面积百分数(percent cortical area, %Ct.Ar)	
		骨髓腔面积百分数(percent marrow area, %Ma.Ar)	
	动态	骨外膜的骨外膜荧光周长百分数(percent periosteal surface-labeled perimeter, %P-L.Pm)	反映骨形成情况
		骨外膜骨矿化沉积率(periosteal surface-mineral apposition rate, P-MAR)	
		骨外膜骨形成率(periosteal surface-bone formation rate, P-BFR/BS)	
		骨内膜的骨内膜荧光周长百分数(percent endocortical surface-labeled perimeter, %E-L.Pm)	
		骨内膜骨矿化沉积率(endocortical surface-mineral apposition rate, E-MAR)	
		骨内膜骨形成率(endocortical surface-bone formation rate, EBFR/BS)	

结 果

1 各组大鼠体重结果比较(表 2) 给药至 60 天时,与 NC 组比较,DG 组大鼠体重升高($P<0.05$)。与 DG 组比较,只有 SP 组大鼠在给药 60、90 天时体重下降($P<0.05$)。

2 各组大鼠胫骨松质骨形态计量学比较

2.1 各组大鼠胫骨松质骨静态参数结果比较(图 1、表 3) 从图 1 中可知,与 NC 组比较,DG 模型组的骨小梁结构明显稀疏、细小,出现大片无骨小梁骨髓区。与 DG 组比较,SP 组、GB 组、GBRAL 组、GBRAH 组的骨小梁明显增多、增粗,连续性良好。与 NC 组比较,DG 组 %Tb.Ar、Tb.N 降低,Tb.Sp 增加($P<0.05$, $P<0.01$),Tb.Th 虽降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与 DG 组比较,除 SP 组的 Tb.Th 和 GFRAH 组的 Tb.N 和 Tb.Sp 外,其余各组 %Tb.Ar、Tb.Th、Tb.N 均显著增加,Tb.Sp 则显著下降($P<0.05$, $P<0.01$)。GBRAL 组和 GBRAH 组分别与 SP 组和 GB 组比较,%Tb.Ar、Tb.N、Tb.Sp 和 Tb.Th 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠胫骨松质骨动态参数结果比较(表 4) 与 NC 组比较,DG 组的 Oc.N、%Oc.Pm 增加($P<0.01$),MAR、BFR/BS、BFR/BV、BFR/TV 下降($P<0.05$),%L.Pm 虽降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与 DG 组比较,SP 组、GB 组、GBRAL 组、GBRAH 组的 Oc.N 和 %Oc.Pm 均明显降低($P<0.01$)。除 SP 组外,其他 3 个预防用药组

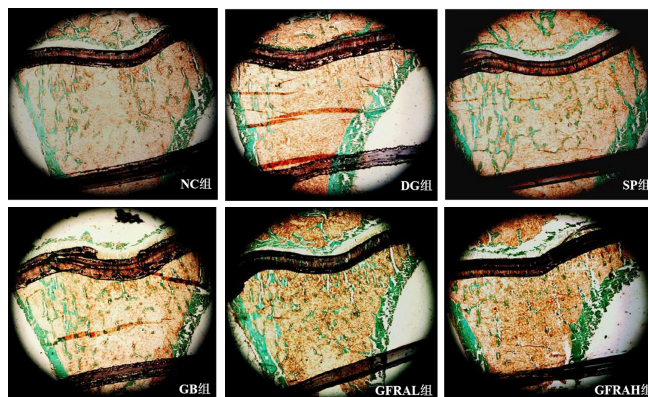


图 1 各组大鼠胫骨松质骨组织形态学结果
(Masson-Goldner Trichrome 染色, $\times 10$)

的 MAR 均较 DG 组明显增加($P<0.05$)同时,SP 组 %L.Pm 降低($P<0.01$)。

3 各组大鼠胫骨皮质骨形态计量学比较

3.1 各组大鼠胫骨皮质骨形态及静态参数结果比较(表 5) 与 NC 组比较,DG 组的 %Ct.Ar 降低,%Ma.Ar 增加,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。与 DG 组比较,GB 组、GFRAL 与 GFRAH 组的 %Ct.Ar 均增加,%Ma.Ar 均下降,但差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

3.2 各组大鼠胫骨皮质骨动态参数结果比较(图 2、表 6) DG 组的皮质骨外围的双荧光间距与 NC 组无明显差异。SP 组、GFRAL 组、GFRAH 组动物的双荧光间距均较模型组无明显差异。GB 组的双荧光间距较模型组窄。

与 NC 组比较,DG 组的动态参数 P-MAR 和

表 2 各组大鼠体重结果比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 天	30 天	60 天	90 天
NC	10	216.8 $\pm$ 20.0	238.2 $\pm$ 26.0	319.1 $\pm$ 39.0	373.6 $\pm$ 30.0
DG	10	205.8 $\pm$ 21.0	247.3 $\pm$ 29.0	369.3 $\pm$ 20.0**	420.6 $\pm$ 50.0*
SP	10	218.7 $\pm$ 12.0	241.4 $\pm$ 11.0	350.3 $\pm$ 23.0 Δ	384.6 $\pm$ 23.0 Δ
GB	10	216.6 $\pm$ 18.0	264.5 $\pm$ 21.0	367.0 $\pm$ 33.0	419.1 $\pm$ 35.0
GFRAL	9	219.3 $\pm$ 16.0	250.2 $\pm$ 21.0	373.0 $\pm$ 31.0	421.3 $\pm$ 32.0
GFRAH	10	219.3 $\pm$ 17.0	239.3 $\pm$ 26.0	353.7 $\pm$ 30.0	391.0 $\pm$ 35.0

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 DG 组比较, Δ $P<0.05$

表 3 各组大鼠胫骨松质骨静态参数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	%Tb.Ar (%)	Tb.Th (μ m)	Tb.N (mm^{-1})	Tb.Sp (μ m)
NC	10	11.60 $\pm$ 2.82	51.70 $\pm$ 6.30	2.22 $\pm$ 0.41	416.00 $\pm$ 110.00
DG	10	9.70 $\pm$ 2.55*	48.00 $\pm$ 6.70	1.90 $\pm$ 0.39**	473.00 $\pm$ 195.00*
SP	10	15.60 $\pm$ 3.43 $\Delta\Delta$	54.40 $\pm$ 6.30	2.84 $\pm$ 0.45 $\Delta\Delta$	305.60 $\pm$ 62.00 $\Delta\Delta$
GB	10	15.50 $\pm$ 3.30 $\Delta\Delta$	66.00 $\pm$ 7.40 $\Delta\Delta$	2.33 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$	370.00 $\pm$ 60.00 $\Delta\Delta$
GFRAL	9	15.60 $\pm$ 5.92 $\Delta\Delta$	64.70 $\pm$ 8.20 $\Delta\Delta$	2.37 $\pm$ 0.70 $\Delta\Delta$	383.00 $\pm$ 110.00 Δ
GFRAH	10	12.70 $\pm$ 3.73 $\Delta\Delta$	61.90 $\pm$ 7.60 $\Delta\Delta$	2.02 $\pm$ 0.50	466.00 $\pm$ 181.00

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 DG 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

表 4 各组胫骨松质骨动态参数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Oc.N (N/mm)	%Oc.Pm (%)	%L.Pm (%)	MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)	BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)	BFR/BV (%/year)	BFR/TV (%/year)
NC	10	24.41 $\pm$ 9.60	1.86 $\pm$ 0.50	22.41 $\pm$ 9.50	1.18 $\pm$ 0.36	9.75 $\pm$ 4.60	315.60 $\pm$ 145.00	37.04 $\pm$ 21.30
DG	10	51.70 $\pm$ 10.80**	3.34 $\pm$ 0.80**	13.88 $\pm$ 8.70	0.77 $\pm$ 0.44*	4.97 $\pm$ 5.40*	163.80 $\pm$ 163.00*	14.75 $\pm$ 17.40*
SP	10	14.01 $\pm$ 4.00 $\Delta\Delta$	0.95 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$	2.43 $\pm$ 1.70 $\Delta\Delta$	1.18 $\pm$ 0.81	1.14 $\pm$ 1.00	33.30 $\pm$ 27.00	5.48 $\pm$ 4.40
GB	10	13.24 $\pm$ 5.80 $\Delta\Delta$	1.22 $\pm$ 0.40 $\Delta\Delta$	13.60 $\pm$ 3.30	1.20 $\pm$ 0.17 Δ	5.89 $\pm$ 1.40	150.80 $\pm$ 40.00	22.70 $\pm$ 5.20
GFRAL	9	11.94 $\pm$ 4.00 $\Delta\Delta$	1.27 $\pm$ 0.50 $\Delta\Delta$	16.30 $\pm$ 6.30	1.21 $\pm$ 0.27 Δ	6.96 $\pm$ 2.50	178.80 $\pm$ 52.00	28.30 $\pm$ 16.80
GFAH	10	14.35 $\pm$ 7.20 $\Delta\Delta$	1.31 $\pm$ 0.40 $\Delta\Delta$	15.00 $\pm$ 4.40	1.16 $\pm$ 0.28 Δ	6.63 $\pm$ 3.00	178.50 $\pm$ 81.00	22.80 $\pm$ 12.20

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DG 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 5 各组大鼠胫骨皮质骨静态参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ct.Ar (mm^2)	%Ct.Ar (%)	%Ma.Ar (%)
NC	10	4.73 $\pm$ 0.30	79.70 $\pm$ 2.90	20.30 $\pm$ 2.90
DG	10	4.83 $\pm$ 0.50	77.20 $\pm$ 3.20	22.80 $\pm$ 3.20
SP	10	4.79 $\pm$ 0.40	77.00 $\pm$ 3.00	23.00 $\pm$ 3.00
GB	10	5.02 $\pm$ 0.70	78.60 $\pm$ 3.10	21.40 $\pm$ 3.10
GFRAL	9	5.28 $\pm$ 0.90	79.70 $\pm$ 2.30	20.30 $\pm$ 2.30
GFAH	10	4.98 $\pm$ 0.50	79.80 $\pm$ 2.20	20.20 $\pm$ 2.20

P-BFR/BS 分别降低了 30.7% 和 53.7%, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 DG 组比较, GB 组的 P-MAR 下降了 18.6% ($P < 0.05$)。

4 各组大鼠股骨 Hyp、 Ca^{2+} 、 P^{3+} 结果比较 (表 7) 与 NC 组比较, DG 组的 Hyp 下降 ($P < 0.01$)、 Ca^{2+} 、 P^{3+} 虽下降但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 DG 组比较, GB、GFRAL、GFAH 组的 Hyp 减少 ($P < 0.05$), 四个预防用药物组的 Ca^{2+} 和 P^{3+} 变化不明显 ($P > 0.05$)。

5 各组大鼠股骨生物力学性能结果比较 (表 8)

表 7 各组大鼠股骨 Hyp、 Ca^{2+} 、 P^{3+} 结果比较 (mg/g , $\bar{x} \pm s$)

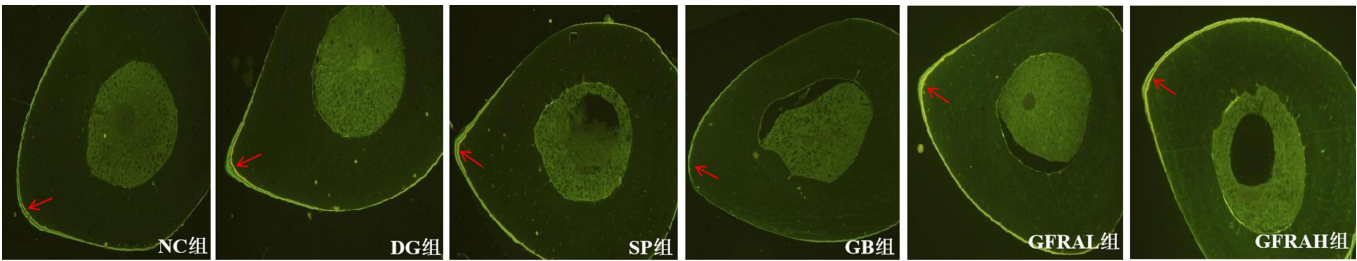
组别	n	Hyp	Ca^{2+}	P^{3+}
NC	10	1.47 $\pm$ 0.26	128.00 $\pm$ 47.50	2.25 $\pm$ 0.61
DG	10	1.21 $\pm$ 0.16*	52.60 $\pm$ 72.70	1.80 $\pm$ 1.09
SP	10	1.11 $\pm$ 0.20	112.40 $\pm$ 49.50	1.92 $\pm$ 0.66
GB	10	0.99 $\pm$ 0.21 Δ	160.20 $\pm$ 91.90	2.70 $\pm$ 0.69
GFRAL	9	0.94 $\pm$ 0.26 Δ	94.20 $\pm$ 44.40	1.97 $\pm$ 0.72
GFAH	10	1.08 $\pm$ 0.20 Δ	151.00 $\pm$ 74.10	2.91 $\pm$ 1.25

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.01$; 与 DG 组比较, $\Delta P < 0.05$

DG 组的股骨的弹性载荷、最大载荷、断裂载荷、刚度和断裂能量吸收等指标与 NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 DG 组比较, 各项指标亦差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

本实验通过给予雄性大鼠 D- 半乳糖进行造模, 发现 D- 半乳糖不仅对破骨细胞有促进作用, 还可抑制骨矿化和骨形成, 降低骨转换率, 最终使骨呈现出



注: 红色箭头所指为双荧光间距

图 2 各组大鼠胫骨皮质骨的比较 ($\times 10$)

表 6 各组大鼠胫骨皮质骨动态参数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	%P-L.Pm (%)	P-MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	P-BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)	%E-L.Pm (%)	E-MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	E-BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)
NC	10	46.50 $\pm$ 15.70	1.24 $\pm$ 0.30	665.50 $\pm$ 297.50	4.30 $\pm$ 4.10	0.12 $\pm$ 0.20	8.40 $\pm$ 16.80
DG	10	42.10 $\pm$ 7.20	1.20 $\pm$ 0.20	497.50 $\pm$ 185.60	8.00 $\pm$ 6.80	0.15 $\pm$ 0.40	40.40 $\pm$ 98.50
SP	10	38.00 $\pm$ 12.30	1.35 $\pm$ 0.40	540.40 $\pm$ 200.40	5.20 $\pm$ 4.40	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
GB	10	35.50 $\pm$ 12.60	0.98 $\pm$ 0.20*	351.40 $\pm$ 175.00	6.80 $\pm$ 4.50	0.11 $\pm$ 0.30	51.40 $\pm$ 162.60
GFRAL	9	37.40 $\pm$ 14.90	1.60 $\pm$ 0.60	553.20 $\pm$ 218.10	8.20 $\pm$ 5.30	0.16 $\pm$ 0.30	57.60 $\pm$ 119.80
GFAH	10	38.70 $\pm$ 9.20	1.15 $\pm$ 0.10	457.10 $\pm$ 137.80	8.70 $\pm$ 5.60	0.24 $\pm$ 0.40	70.60 $\pm$ 129.40

注: 与 DG 组比较, * $P < 0.05$

表 8 人参花蕾黄芪合剂对 D- 半乳糖雄性大鼠股骨生物力学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	弹性载荷 (N)	最大载荷 (N)	断裂载荷 (N)	刚度 (N×mm ²)	断裂能量吸收 (N×mm)
NC	10	154.0 ± 17.8	171.9 ± 20.2	148.6 ± 21.4	471.0 ± 98.0	148.5 ± 44.3
DG	10	153.2 ± 28.9	176.7 ± 28.4	148.0 ± 32.6	481.0 ± 124.0	139.4 ± 31.7
SP	10	126.7 ± 28.5	173.8 ± 20.8	159.7 ± 24.4	512.0 ± 47.0	143.4 ± 34.2
GB	10	147.4 ± 25.4	172.1 ± 18.7	136.3 ± 41.7	503.0 ± 113.0	130.3 ± 43.3
GFRAL	9	144.0 ± 18.3	171.4 ± 14.3	154.9 ± 19.3	546.0 ± 69.0	131.9 ± 30.5
GFRAH	10	146.1 ± 23.2	166.5 ± 21.9	140.8 ± 31.1	520.0 ± 99.0	120.4 ± 29.5

骨质疏松的状态。而人参花蕾黄芪合剂高低剂量组均能通过抑制骨吸收明显改善 D- 半乳糖大鼠松质骨骨质疏松参数变化。

气血是人体一切组织器官生理活动必需的物质基础。中医学上认为血瘀是骨质疏松症的重要促进因素, 骨骼必须得依靠经脉中的气血营养, 如果气血瘀滞, 会严重影响到骨骼对血液的营养物质和钙的吸收, 影响到骨组织间营养物质的吸收以及正常代谢, 使得骨骼失养以及脆性增加, 最终引起骨质疏松^[10]。

人参和黄芪均为补气补血的传统中药, 两者合理运用可相辅相成达到事半功倍的效果^[11]。本实验虽未单独设置黄芪用药组, 但通过与张新乐等^[2]的研究结果比较, 发现人参花蕾黄芪合剂预防骨质疏松的效果明显高于单独使用人参花蕾。因此, 笔者推测单独使用黄芪对 D- 半乳糖致雄性大鼠骨质疏松同样有明显的预防作用。

随着现代科技的飞速发展, 治疗和预防手段也是不断地丰富起来, 相关研究者已经通过直接提取中药中的有效成分来实现治疗和预防, 并且效果显著^[12]。目前人参花蕾黄芪合剂预防老年性骨质疏松的机制尚不清楚, 笔者推测可能与人参花蕾和黄芪中的有效活性成分发挥的抗炎^[13]、调节免疫力^[14]、调控多种信号通路^[15]等方面相关。

人参花蕾的主要成分为人参皂苷, 目前已分离得到 20 (R) - 人参皂苷 Rh1、Rg1、20 (S) - 人参皂苷 Rg2、Rb1、Rc、 β 2 谷甾醇、绞股蓝皂苷 X VII、三七皂苷 2 E 等诸多有效活性成分^[16, 17]。已知人参皂苷 Rg1 具有消除疲劳、活化细胞、兴奋中枢神经系统等功效^[18]。而人参花蕾中特有的花蕾 9 肽和 11 肽类物质能维持细胞稳态^[16], 活化各组织细胞, 降低衰老时继发性骨质疏松的发生概率, 促进细胞增殖和动物生长发育的作用^[19]。

人参花蕾提取物具有抗氧化作用, 帮助消除体内自由基^[20]、增强机体免疫力^[21], 减少细胞老化、延缓衰老^[22]。破骨细胞除了吞噬老死的骨细胞外, 还能分泌细胞炎性因子, 这是骨质疏松症导致炎症存在

的原因。在衰老过程中促炎环境强弱与氧化应激水平呈正相关, 提示抑制炎症能够有效减少细胞的氧化损伤, 从而减弱破骨细胞对骨的吸收作用^[23]。而每日服用 0.5~6.0 g/kg 的人参花蕾提取物, 能明显降低组织丙二醛含量, 并提高谷胱甘肽过氧化物酶活力^[16], 说明人参花蕾提取物具有抗氧化作用。此外, 人参皂苷 Rg1 可防止超氧化物歧化酶活性减弱、脂褐素沉积以及脂质过氧化, 从而降低自由基对细胞的损伤而延缓衰老过程来对 D- 半乳糖诱导的衰老和骨质疏松^[24, 25]。而人参花蕾中 β - 七叶素 (一种三萜皂苷) 可通过抑制一种负责释放炎症介质前体的磷脂酶 A2 的活性、阻断 Toll 样受体 2 的表达、降低促炎细胞因子白细胞介素 -1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和脂多糖诱导的 IL-6 来发挥其抗炎作用^[26]。提示人参花蕾含 β - 七叶素能够达到抗炎效果, 使骨内外环境稳定, 进而维持正常的骨代谢功能。

黄芪甲苷作为黄芪的含量居高的有效成分之一, 已证明黄芪甲苷通过加强淋巴细胞的增生和促进抗体的生成, 抑制细胞因子 IL-1 和 TNF- α 的产生^[27], 进而提高机体免疫力^[28]、抗氧化应激等作用^[29]。目前有研究证实黄芪甲苷可提高小鼠股骨骨密度、骨微结构及钙、磷含量^[30], 可能与 PI3 K-Akt、FoxO 和 MAPK 通路有关^[31], 而基因 SRC、AKT1 和 PIK3 CA 可与黄芪甲苷稳定结合, 可能是治疗骨质疏松的关键^[27]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是一种具有生物活性的水溶性多糖。研究发现 APS 与大鼠骨形态发生蛋白 -2 (bone morphogenetic protein, BMP-2) 表达呈剂量反应关系, 已知 BMP-2 是最主要的骨形成调控因子之一, 并且能够通过一系列信号转导途径发挥对骨形成的诱导作用, 提示 APS 发挥促成骨细胞增殖、分化的作用与其增强 BMP-2 的表达水平密切相关^[32]。此外, APS 还具备增强单核巨噬细胞活性及抑制炎症反应发生的作用^[33]。

本次研究的结果提示人参花蕾黄芪合剂可预防

D-半乳糖致雄性大鼠的骨质疏松症,为老年男性在早期预防骨质疏松的发生发展而采取的日常保健思路提供理论依据,但其发挥的机制还有待进一步开展试验研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 韩亚军,帖小佳,伊力哈木·托合提.中国中老年人骨质疏松症患病率的 Meta 分析[J].中国组织工程研究,2014,18(7):1129-1134.
- [2] 张新乐,巫旭娜,陈文双,等.人参花蕾对 D-半乳糖大鼠骨代谢的影响[J].中国药理学通报,2017,33(8):1152-1158.
- [3] 云彩麟,浩岩.黄芪复方制剂对氢化可的松所致大鼠与小鼠骨质疏松的影响[J].中国现代应用药学,1998,15(3):3-4.
- [4] 陈华庭,王虎,郑菁,等.黄芪总黄酮提取物对维甲酸所致大鼠骨质疏松的影响[J].中国药师,2005,8(11):895-897.
- [5] 董文彦,刘辉.D-半乳糖致衰老小鼠血清钙、磷及骨密度等指标的变化[J].中国老年学杂志,2003,23(1):45-46.
- [6] 郑海群.仙灵骨葆治疗原发性骨质疏松症的临床疗效观察[J].中国处方药,2016,14(11):83-84.
- [7] 屈强.人参黄芪的临床运用[J].光明中医,2013,28(3):616.
- [8] 戴娟秀,吴铁.仙灵骨葆对 D-半乳糖致雄性大鼠骨质疏松骨量的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2008,16(8):32-34.
- [9] 崔燎,吴铁主编.骨质疏松药理学—动物实验与图谱[M].北京:科学出版社,2011:152-187.
- [10] 吴结枝,鄢然,刘湘琳,等.骨质疏松病因病机的研究进展[J].实用中医内科杂志,2021,35(8):8-11.
- [11] 何珊,彭维兵,葛雨,等.黄芪人参配伍应用的研究进展[J].山东化工,2017,46(21):79-80,82.
- [12] 杨琴,周涛,王友华.白藜芦醇防治脑梗死的作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2023,38(9):1-7.
- [13] 郭泽,邹娟,张贤,等.黄芪总黄酮小鼠体内抗炎作用研究[J].动物医学进展,2015,36(9):64-66.
- [14] 王晓林,戴鹏莹,邸松,等.刺芪参胶囊对小鼠免疫功能的影响[J].现代食品,2020,5:162-166.
- [15] 韩林静,吴克亮,王宏波,等.基于网络药理学探讨黄芪治疗骨质疏松症的分子机制[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(8):1119-1125.
- [16] 杨慧洁,杨世海,庞立杰.人参花蕾研究进展[J].人参研究,2013,25(1):56-57.
- [17] 白钰,张益恺,徐芳菲,等.人参花化学成分研究进展[J].人参研究,2021,35(5):54-58.
- [18] 张喻,肇玉明,王晓良,等.干细胞治疗阿尔茨海默病的研究进展及挑战[J].中国药理学通报,2015,31(7):889-894.
- [19] 蒋日琼.人参花蕾提取液清除羟基自由基作用分析[J].中国化工贸易,2021,13(26):163-165.
- [20] 乔巨慧,赵大庆,刘美辰,等.人参总皂苷对 D-半乳糖致 PC12 细胞衰老的改善作用及其机制研究[J].中国药房,2020,31(24):2993-2999.
- [21] 刘鲲,刘娜,刘蕊川,等.人参免疫和保护作用研究进展[J].光明中医,2016,31(10):1503-1505.
- [22] 李红蓉,张世雄,李雅文,等.人参抗衰老研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20230647.
- [23] 罗湘杭,周若珂.骨质疏松的病因及发病机制研究进展[J].山东大学学报(医学版),2021,59(6):10-15.
- [24] 张进,王顺和,汪兰,等.人参皂苷 Rg1 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬延缓小鼠脑衰老的研究[J].中国药理学通报,2022,38(7):987-993.
- [25] 吴倩,郑秀花,刘亚丽.人参皂苷 Rb1 介导 TLR3/TRIF 信号通路对哮喘大鼠的抗炎作用机制[J].中国老年学杂志,2022,42(2):391-395.
- [26] 汤晓晨,俞峰,孙书龙,等.黄芪甲苷对人膝关节炎退变关节软骨 IL-1 β 表达的影响[J].南京中医药大学学报,2013,29(1):48-52.
- [27] Ou L, Kang W, Zhang J, et al. Network pharmacology-based investigation on the anti-osteoporosis mechanism of Astragaloside IV [J]. Natural Product Communications, 2021, 16(7):1-10.
- [28] 孟丹丹,李宗新,贾瑞雪,等.黄芪甲苷抗肿瘤作用机制研究进展[J].中草药,2023,54(3):1002-1009.
- [29] 沈三英,谈小琴.黄芪甲苷对慢性阻塞性肺疾病氧化应激的作用及其机制研究[J].中药材,2022,45(12):2976-2982.
- [30] 张小钰,陈慧,马敬祖,等.黄芪多糖治疗对去卵巢诱导骨质疏松大鼠骨密度、骨量和骨代谢的影响[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(1):21-25.
- [31] Chai Y, Pu X, Wu Y, et al. Inhibitory effect of *Astragalus Membranaceus* on osteoporosis in SAMP6 mice by regulating vitaminD/FGF23/Klotho signaling pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):4464-4474.
- [32] 张小钰,陈慧,马敬祖,等.黄芪多糖治疗对去卵巢诱导骨质疏松大鼠骨密度、骨量和骨代谢的影响[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(1):21-25.
- [33] 吴梅,谭睿.黄芪多糖研究进展[J].川北医学院学报,2013,28(1):17-22.

(收稿:2023-01-06 在线:2023-10-30)

责任编辑:汤 静