

骨碎补总黄酮胶囊对实验性骨质疏松症 和镇痛作用的影响^{*}

刘剑刚¹, 谢雁鸣¹, 赵晋宁¹, 邓文龙², 徐 哲¹

(1 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091; 2 四川省中药研究所, 四川 成都 640016)

摘要: 目的: 应用维甲酸所致大鼠的实验性骨质疏松模型, 观察骨碎补总黄酮对动物骨密度的作用及对血钙、血磷水平的影响。方法: 维甲酸($70\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 给大鼠灌胃 14d, 可导致大鼠的实验性骨质疏松, 然后观察药物对动物骨密度的影响; 化学刺激疼痛试验采用小鼠腹腔注射醋酸所致小鼠扭体现象, 观察各组动物的典型扭体发生次数; 热传导刺激试验采用热板法, 观察该药不同时间点的镇痛作用。结果: 骨碎补总黄酮三个剂量组均可明显提高大鼠骨密度, 提高大鼠血钙水平, 和模型组比较有显著差异($P < 0.05$); 同时骨碎补总黄酮胶囊对化学刺激(醋酸)有抑制作用, 大剂量组和模型组比较有明显差异($P < 0.05$); 对热传导刺激引起的拟痛反应也有明显的拮抗作用, 和模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。结论: 骨碎补总黄酮具有增加动物骨密度作用, 提高血钙含量, 促进骨的形成, 对化学刺激引起的疼痛和对热传导刺激引起的疼痛反应有显著抑制作用。

关键词: 骨碎补总黄酮; 骨质疏松; 骨密度; 镇痛作用; 药理实验

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)05-0031-04

Effects of Capsule Assemble Flavones of Fortune's Drynaria Rhizome on the Experimental Osteoporosis in Rat and Analgesia Action in Mouse

LIU Jian-gang¹, XIE Yan-ming¹, ZHAO Jin-ning¹, DENG Win-long², XU Zhe¹

(1 Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100091, China;

2 Sichuan Institute of traditional medica, Chengdu 640016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of assemble flavones of Fortune's drynaria rhizoma on animal bone mineral density, phasma calcium and phosphorus, and on analgesia action. Methods Wistar rat and Kunming mouse were used as experimental animals. Osteoporosis was induced by orally given retinoic acid($70\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) to the rats for 14 dasy. For evaluation of analgesia action, body-wresting was induced by vinegar id injection in the mice, and hot-plate method(55°C) of mouse was employed. Results Bone mineral density and plasma calcium were significantly increased for the dose groups of Fortune's drynaria zhizoma compared with the control($P < 0.05$). Analgesia action evaluated by vinegar-induced and heat-induced pain was also significant compared with the control($P < 0.05$). Conclusion The assemble flavones of Fortune's drynaria rhizoma have the functions of elevating blood calcium, increasing bone mineral density and analgesia action.

Key words: assemble flavones of fortune's drynaria rhizome; osteoporosis; bone mineral density; analgesic effect; pharmaceutical experiment

骨碎补总黄酮胶囊是经现代工艺研制而成的中药制剂, 临床用于治疗老年骨质疏松, 对患者骨密度的增加、骨生物力学指标的改善, 具有良好的作用; 并可提高患者血中钙的含量、血及骨质中的碱性磷酸酶, 促进骨的生成^[1]。骨碎补是水龙骨科植物槲

蕨(*Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm) 或中华槲蕨(*D. baronii* (Christ) Diels) 的干燥根茎, 性温, 味苦, 归肝、肾经, 具有补肾强骨、续伤止痛的功效, 临床主要用于肾虚腰痛、耳鸣耳聋、筋骨折伤等。本实验进一步观察该药的对动物的骨密度和镇痛作用的影响, 现将实验结果报告如下。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 骨碎补总黄酮, 由中华槲蕨的根茎加工提取, 提取率为 1.1%, 总黄酮含量为 75%

收稿日期: 2003-09-24

基金项目: 国家“九五”科技攻关重大疾病课题资助项目(96-906-09-04)

(每克提取物约含生药 66.67g),由四川省中药研究所提供,批号:961214;维甲酸片:重庆华邦制药有限公司生产,批号:950702;阿斯匹林片:每片含乙酰水杨酸 0.3g,由湖南制药厂生产,批号:980108;骨松宝颗粒剂,每包 10g,由贵州富华药业有限责任公司生产,批号 970628。骨碎补总黄酮、阿斯匹林、骨松宝颗粒剂,用蒸馏水配制一定浓度溶液,灌胃备用。乙酸:北京化工厂生产,批号:95021022。血钙、血磷测定试剂盒:北京中生生物工程高技术公司生产,批号:9712。

1.2 动物 Wistar 大鼠 60 只,雌性,16 周龄,体重 220~240g,购自中国军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号:(医动字)第 01-3039 号。昆明种小鼠 144 只,雌雄兼用,体重 18~22g,购买于中国医学院实验动物研究所,许可证:(京动字)第 01-3008 号;

1.3 实验仪器 双能 X 线骨密度检测测量仪:美国 Nodand 公司生产,仪器型号:XR-26。

2 实验方法^[2]

2.1 大鼠实验性骨质疏松症实验 各组大鼠分笼饲养于不锈钢金属笼内,每笼 5 只,室温调节在 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度控制在 40%~70%,自由饮食和饮水。动物称重,采用分层随机法将大鼠 60 只分为 6 组,即空白对照组:0.9% 氯化钠注射液(10mL/Kg);模型对照组:0.9% 氯化钠注射液(10mL/Kg);骨碎补总黄酮胶囊:大剂量组(180mg 生药/Kg);骨碎补总黄酮胶囊:中剂量组(90mg 生药/Kg);骨碎补总黄酮胶囊:小剂量组(45mg 生药/Kg);治疗骨质疏松药物对照组:骨松宝颗粒剂(2.7g/Kg)。

实验过程中每组称重一次,根据大鼠体重调节给药量。空白组在整个实验过程中只给等量生理盐水,模型组、骨松宝颗粒剂组、骨碎补总黄酮胶囊各剂量组于实验第 1~15 天均给予维甲酸($70\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,同时骨松宝颗粒组加服骨松宝颗粒,骨碎补总黄酮组加服骨碎补总黄酮各相应的剂量,14d 后各组停用维甲酸,空白组、模型组给予等量生理盐水,给药组继续给予所试药物,剂量不变,第 29 天,麻醉动物并腹主动脉取血,分离血清用全自动生化仪测定血钙、血磷,处死动物,分离了两侧完整的股骨、第 2~4 腰椎进行骨密度的检测。

2.2 小鼠化学刺激法引起拟痛反应(扭体法)实验

将小鼠 72 只,随机分为 6 组,每组 12 只。即 ①生理盐水对照组:0.9% 氯化钠注射液(10mL/Kg); ②止

痛药物对照组:阿斯匹林(351mg/Kg); ③骨碎补总黄酮胶囊:大剂量组(312mg 生药/Kg); ④骨碎补总黄酮胶囊:中剂量组(156mg 生药/Kg); ⑤骨碎补总黄酮胶囊:小剂量组(78mg 生药/Kg); ⑥治疗骨质疏松药物对照组:骨松宝颗粒剂(3.9g/Kg)。

实验动物饲养塑料笼中,饲养条件同上,自由摄食与饮水。各给药组灌胃给药,对照组给予等体积生理盐水,每日 1 次,连续 5d,于最后一次给药后 30min 后,腹腔注射 0.6% 醋酸,0.2mL/只,向小鼠腹腔注入化学刺激物可引起深部的、大面积而持久的疼痛刺激,致使小鼠出现扭体现象,如腹部内凹、躯干扭曲、后腿伸张、臀部抬高等。观察 30min 内各组动物由醋酸诱发典型的扭体发生数。

2.3 热传导引起小鼠拟痛反应(热板法)实验 将小鼠放在 55°C 的热板上,以横温水箱控制水温,小鼠自放在热板上至出现舔后足所需要时间(s)作为该鼠的痛阈值。凡舔后足时间小于 5s 或大于 30s 或跳跃者弃之不用。将合格雌性小鼠 72 只,重复测其正常痛阈值,作为该鼠的基础痛阈值(给药前痛阈值)。

依据基础痛阈,将小鼠 72 只,随机分为 6 组,每组 12 只。分组情况同 2.2。小鼠灌胃 5d,第 5 天给药 30min 后,观察 15、30、60min 时各组动物的镇痛作用时间。用药后潜伏期超过 60s 其痛阈以 60s 计算。

2.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计分析,组间处理 q 检验,数据结果用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 试验结果

3.1 骨碎补总黄酮对大鼠骨密度的影响 骨碎补总黄酮高、中剂量组对实验性大鼠骨质疏松症导致的骨密度降低有明显抑制作用,可升高大鼠股骨和腰椎骨密度的作用($P < 0.05 \sim 0.01$),骨松宝也有升高大鼠股骨和腰椎骨密度的作用($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 骨碎补总黄酮胶囊对大鼠骨密度变化的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	股骨骨密度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	腰椎骨密度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
空白对照组	10mL/Kg	$0.14 \pm 0.008^{1)}$	$0.13 \pm 0.008^{1)}$
模型对照组		0.10 ± 0.006	$0.10 \pm 0.007^{1)}$
骨松宝组	2.7g/Kg	$0.12 \pm 0.008^{1)}$	$0.13 \pm 0.010^{1)}$
骨碎补总黄酮组	180mg/Kg	$0.14 \pm 0.009^{1)}$	$0.14 \pm 0.008^{2)}$
骨碎补总黄酮组	90mg/Kg	$0.12 \pm 0.007^{1)}$	0.13 ± 0.008
骨碎补总黄酮组	45mg/Kg	0.11 ± 0.006	$0.12 \pm 0.004^{1)}$

注:与模型对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 骨碎补总黄酮对大鼠血钙、血磷的影响 骨碎补总黄酮三个剂量组对维甲酸性导致骨质疏松症大鼠的血钙水平有明显升高作用,和模型组比较有显著差异($P < 0.05$),骨松宝也有升高大鼠血钙、血磷的作用($P < 0.05$)。骨碎补总黄酮对大鼠血磷无明显作用。结果见表 2。

表 2 骨碎补总黄酮胶囊对大鼠血钙、血磷的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	血钙 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	血磷 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白对照组	10mL/Kg	116.9 $\pm$ 2.9 ¹⁾	45.1 $\pm$ 6.1
模型对照组		99.9 $\pm$ 5.3	41.1 $\pm$ 6.7
骨松宝组	2.7g/Kg	108.1 $\pm$ 7.6 ¹⁾	48.2 $\pm$ 5.6 ¹⁾
骨碎补总黄酮组	180mg/Kg	108.3 $\pm$ 6.0 ¹⁾	45.9 $\pm$ 4.2
骨碎补总黄酮组	90mg/Kg	107.0 $\pm$ 9.6 ¹⁾	46.9 $\pm$ 5.8
骨碎补总黄酮组	45mg/Kg	109.7 $\pm$ 10.6 ¹⁾	44.2 $\pm$ 5.3

3.3 骨碎补总黄酮胶囊对化学刺激法引起小鼠拟痛反应(扭体法)的影响 结果见表 3,试验结果表明骨碎补总黄酮胶囊大剂量组对小鼠注射醋酸后首次出现扭体的时间显著延长,扭体次数显著减少,和生理盐水时间比较有显著差异($P < 0.01$),骨碎补总黄酮胶囊中、小剂量对小鼠注射醋酸后首次出现扭体的时间显著延长,和生理盐水时间比较有显著差异($P < 0.05$),表明骨碎补总黄酮胶囊对醋酸刺激引

起小鼠的拟痛反应(扭体法)有抑制作用。

表 3 骨碎补总黄酮胶囊对醋酸引起小鼠拟痛反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	出现扭体时间 (min)	扭体次数 (次/30min)
生理盐水对照组	10mL/Kg	7.39 $\pm$ 1.98	14.2 $\pm$ 3.40
阿斯匹林组	351mg/Kg	17.3 $\pm$ 3.64 ³⁾	5.58 $\pm$ 2.11 ³⁾
骨松宝组	3.9g/Kg	11.8 $\pm$ 2.64 ³⁾	7.83 $\pm$ 2.72 ³⁾
骨碎补总黄酮组	324mg/Kg	15.3 $\pm$ 3.26 ³⁾	8.17 $\pm$ 2.51 ³⁾
骨碎补总黄酮组	162mg/Kg	9.69 $\pm$ 2.46 ⁴⁾	11.7 $\pm$ 3.28
骨碎补总黄酮组	81mg/Kg	9.39 $\pm$ 1.89 ⁴⁾	11.7 $\pm$ 3.78

与生理盐水对照组比较: ⁴⁾ $P < 0.05$ ³⁾ $P < 0.01$

3.4 骨碎补总黄酮胶囊对热传导引起小鼠拟痛反应(热板法)的影响 试验结果表明,骨碎补总黄酮胶囊中、大剂量组在 0.5h 能够明显抑制热传导引起的拟痛反应,时间持续到 1.5 3.4h 时间点均有显著作用,和生理盐水比较有明显差异($P < 0.01$);表明骨碎补总黄酮能提高小鼠的痛阈值,给药后观察,1.5~ 3.0h 之间镇痛作用最强,镇痛时间可持续 3~ 4h。结果见表 4。

表 4 骨碎补总黄酮胶囊对热传导引起小鼠拟痛反应(热板法)的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	基础痛阈	给药后痛阈值(h)			
			0.5	1.5	3.0	4.0
生理盐水对照组	10mL/Kg	18.7 $\pm$ 2.54	20.7 $\pm$ 4.71	19.6 $\pm$ 3.91	21.6 $\pm$ 2.87	21.6 $\pm$ 3.05
阿斯匹林组	351mg/Kg	19.5 $\pm$ 3.20	27.9 $\pm$ 4.78 ³⁾	28.3 $\pm$ 6.68 ³⁾	36.6 $\pm$ 6.25 ³⁾	38.3 $\pm$ 3.16 ³⁾
骨松宝组	3.9g/Kg	19.4 $\pm$ 3.97	24.3 $\pm$ 5.07	32.3 $\pm$ 4.76 ³⁾	35.7 $\pm$ 5.16 ³⁾	38.0 $\pm$ 4.29 ³⁾
骨碎补总黄酮组	324mg/Kg	18.5 $\pm$ 2.62	28.0 $\pm$ 4.32 ³⁾	29.2 $\pm$ 4.39 ³⁾	33.9 $\pm$ 7.47 ³⁾	33.2 $\pm$ 5.09 ³⁾
骨碎补总黄酮组	162mg/Kg	18.5 $\pm$ 2.63	27.9 $\pm$ 3.86 ³⁾	30.1 $\pm$ 4.20 ³⁾	33.7 $\pm$ 4.60 ³⁾	32.7 $\pm$ 5.19 ³⁾
骨碎补总黄酮组	81mg/Kg	19.6 $\pm$ 2.42	20.9 $\pm$ 3.06	21.1 $\pm$ 2.85	21.3 $\pm$ 2.25	25.0 $\pm$ 2.85 ³⁾

4 讨论

骨碎补,主治肾虚腰脊疼痛、跌扑损伤、骨折等证,始载于《雷公炮炙论》,具有补肝肾、强筋骨、止痛通络的功效,现代研究表明:骨碎补根茎主要含柚皮甙物质和总黄酮,前者对动物的脂质代谢有一定改善作用,后者总黄酮对小鼠具有镇痛、止痛作用^[3]。本实验研究表明,骨碎补总黄酮对实验性大鼠骨质疏松症导致的骨密度下降有明显抑制作用,对化学刺激引起的拟痛反应(扭体法)和对热传导引起的拟痛反应(热板法),具有镇痛作用,并呈现良好的量效相关性。

维甲酸是维生素 A 的衍生物,临床应用具有导致骨质疏松症的副作用,实验利用维甲酸这一特性所致大鼠的骨质疏松模型。骨密度是指单位骨组织体积的骨量,常被用于评定骨脆性和对骨折危险性进行预测^[4],实验结果表明骨碎补总黄酮具有增加大鼠骨密度的作用。常用的致痛实验分为物理性和化学性的方法,物理性的如热、电等,化学性的如 H⁺ 缓激肽类等,在伤害性刺激作用下,机体组织释放缓激肽类致痛因子,在神经末端引起冲动至高级神经中枢引起痛觉,阻断其病理过程的环节,可以产生镇痛作用。骨碎补总黄酮对致痛因子诱发的神经

疼痛有明显抑制作用。为骨碎补总黄酮的临床应用提供了药理学依据,其作用机制有待于进一步深入研究。

骨质疏松(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的、致使骨的脆性增加的全身性的骨骼疾病。中医学认为骨质疏松症病机为肾虚精亏,髓虚脉痹,肾主骨,肾水既涸,则诸骨皆枯,导致肾虚腰脊疼痛、下肢痿弱、耳鸣耳聋等症。祖国医学理论认为肌肉、筋骨的痛、酸或红肿、肿大是由于风寒、是湿、瘀等因素交错而致,现代医学认为免疫因素是这类疾病的始发因素,通过激活或启动炎症介导参与。实验表明,骨碎补总黄酮具有增加骨密度作用,提高血钙含量,升高血钙水平同时提高骨密度,说明骨碎补胶囊促进了骨对钙的吸收,有利于

骨矿盐的形成,同时对化学刺激引起的拟痛反应(扭体法)和对热传导引起的拟痛反应(热板法),具有镇痛作用,为骨碎补胶囊治疗老年性骨质疏松病证提供了药理学基础。

参考文献:

- [1] 谢雁鸣,赵晋宁,张文军,等.骨碎补胶囊抗维甲酸所致大鼠骨质疏松症的实验研究[J].中药新药与临床药理,1998,(9)4:217-219.
- [2] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994.361-377.
- [3] 梅全喜,毕焕新.现代中药药理手册[M].北京:中国中医药出版社,1998.423.
- [4] 朱汉民.老年骨质疏松症的发生率及其有关因素的调查[J].中华医学杂志,1990,70(5):251.