

千斤拔混合粉对大鼠骨结构功能的改善作用

郭榕榕^{a, b}, 谢宏晨^{a, b}, 刘力进^{a, b}, 唐萌萌^{a, b}, 黄毅娜^{a, b}

四川大学 a. 华西公共卫生学院 b. 华西第四医院, 四川 成都 610041

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20290

摘要:

[背景] 千斤拔作为常用中药含有丰富的异黄酮类化合物, 有抗骨质疏松的潜力。然而目前对于含千斤拔成分的骨质疏松保健食品的研发甚少。

[目的] 研究一款含千斤拔的新型保健食品改善骨质疏松的效果及机制探讨。

[方法] 根据《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》的限量法进行千斤拔混合配方粉急性经口毒性试验; 采用去势成年雌鼠建立骨质疏松模型, SPF 级成年雌性未孕 SD 大鼠 32 只, 按体重分层后随机均分为假手术组和模型组 (细分为模型对照组、模型+千斤拔混合粉组和模型+面粉混合粉组)。模型对照组给予水, 其余两模型组每日按 10 mL·kg⁻¹ (按体重计) 经口灌胃给予相应剂量的配方受试物 13 周。实验结束时测大鼠股骨密度、股骨干重和骨钙含量, 并对股骨进行病理学检查, 测骨皮质厚度。体外培养乳鼠颅骨成骨细胞, 探究千斤拔提取物对其增殖分化的影响: 超声波辅助提取千斤拔, 以 AB-8 型大孔树脂进行纯化, 分别得到不同梯度甲醇洗脱组分; 在最佳洗脱梯度条件下, 以浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g·L⁻¹ 千斤拔提取液培养 24、48、72 h, 另设 0.4 g·L⁻¹ 淫羊藿苷阳性对照组和 0.1% DMSO 溶剂对照组。用细胞活性检测试剂盒 (CCK-8) 和碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (酶标仪法) 分别测定成骨细胞的增殖率和 ALP 活性。

[结果] 急性经口毒性试验表明千斤拔混合配方粉属实际无毒级别。干预 13 周后, 与模型对照组相比, 千斤拔混合粉组和面粉混合粉组的骨密度、骨皮质厚度均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且千斤拔混合粉组的骨皮质厚度 [(376.01±51.52) μm] 较面粉混合粉组 [(302.87±64.83) μm] 升高 ($P < 0.05$)。病理组织结果显示: 与模型对照组相比, 千斤拔混合粉组骨小梁数目明显增多, 分离度变小, 骨小梁结构变紧密, 且千斤拔混合粉组上述结果也明显优于面粉混合粉组。根据不同甲醇洗脱梯度下的成骨细胞 ALP 活性和总黄酮含量, 选择 60% 作为千斤拔提取物最佳甲醇洗脱梯度。在此梯度下, CCK-8 和 ALP 活性测定试验结果显示: 与溶剂对照相比, 对成骨细胞分别作用 24 h、48 h、72 h 后, 不同浓度千斤拔提取物尽管对细胞有抑制增殖作用, 但均具有增高 ALP 活性的作用 ($P < 0.05$)。

[结论] 含千斤拔的保健品配方具有一定的改善骨功能的作用, 其机制可能与促进成骨细胞的分化有关。

关键词: 千斤拔; 去势大鼠; 骨质疏松; 成骨细胞; 碱性磷酸酶

Effect of *Flemingia macrophylla* mixed powder on improving bone function in rats GUO Lulu^{a, b}, XIE Hongchen^{a, b}, LIU Lijin^{a, b}, TANG Mengmeng^{a, b}, HUANG Yina^{a, b} (a. West China School of Public Health b. West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract:

[Background] As a commonly used traditional Chinese medicine, *Flemingia macrophylla* is rich in isoflavones and has potential therapeutic effects on osteoporosis. However, there is little research and development on it as a health food ingredient targeting the prevention of osteoporosis in China.

[Objective] This experiment investigates the effect and potential mechanism of a new health food containing *Flemingia macrophylla* on the improvement of osteoporosis.

[Methods] According to the limit test protocol in the *National food Safety Standard-Acute Oral Toxicity Test*, an acute oral toxicity test of *Flemingia macrophylla* mixed powder was designed. An osteoporosis model was established through ovariectomy in 32 SPF adult female infertile SD rats which were randomly divided into one sham operation group and three model groups (one model control group, and one model+*Flemingia macrophylla* mixed powder group, and

基金项目

四川大学 2017 年创新创业专题研究项目 (SCUCUCY1753)

作者简介

郭榕榕 (1996—), 男, 硕士生;
E-mail: 1258332347@qq.com

通信作者

黄毅娜, E-mail: dir0932@sina.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-08-11

录用日期 2020-12-30

文章编号 2095-9982(2021)03-0294-09

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

郭榕榕, 谢宏晨, 刘力进, 等. 千斤拔混合粉对大鼠骨结构功能的改善作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (3): 294-302.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20290

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HUANG Yina, E-mail: dir0932@sina.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2020-08-11

Accepted 2020-12-30

►To cite

GUO Lulu, XIE Hongchen, LIU Lijin, et al. Effect of *Flemingia macrophylla* mixed powder on improving bone function in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(3): 294-302.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20290

one model+flour mixed powder group) after stratification according to body weight. The model control group was given water, and the other two model groups were given powder by oral administration at $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (in body weight) every day for 13 weeks. At the end of the experiment, the femoral bone mineral density, femoral dry weight, and bone calcium content were measured, and the pathological changes of femur and the thickness of bone cortex were detected. The effects of *Flemingia macrophylla* extract on the proliferation and differentiation of neonatal rat calvarial osteoblasts were investigated *in vitro*: The *Flemingia macrophylla* was extracted by ultrasound and purified with AB-8 macroporous adsorption resins to obtain different methanol eluates; at the optimal methanol concentration, the osteoblasts were treated with *Flemingia macrophylla* extract ($0.2, 0.4, 0.6, 0.8$, and $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively), icariin ($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, positive control group), and DMSO (0.1% , solvent control group) for 24, 48, and 72 h, respectively; the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) expression of osteoblasts were determined with CCK-8 and ALP kits respectively.

[Results] The acute oral toxicity test results showed that the tested *Flemingia macrophylla* mixed powder belonged to the actual non-toxic grade. After 13 weeks of the designed intervention, compared with the model control group, the bone mineral density and the bone cortex thickness in the *Flemingia macrophylla* mixed powder group and the flour mixed powder group were significantly higher ($P<0.05$); furthermore, compared with the flour mixed powder group [$(302.87\pm64.83)\text{ }\mu\text{m}$], the bone cortex thickness in the *Flemingia macrophylla* mixed powder group [$(376.01\pm51.52)\text{ }\mu\text{m}$] increased ($P<0.05$). The results of pathological examination showed that compared with the model control group, the number of bone trabeculae in the *Flemingia macrophylla* mixed powder group increased significantly, the degree of separation decreased, and the trabecular structure became tighter; in addition, the above indicators of the *Flemingia macrophylla* mixed powder group were significantly better than those of the flour mixed powder group. According to the ALP activity and total flavonoids of osteoblasts at different methanol gradients, 60% methanol was determined to be the optimal elution gradient. Under the optimized gradient, the results of CCK-8 and ALP activity assay showed that compared with the solvent control group, the *Flemingia macrophylla* extract at different concentrations inhibited the proliferation of osteoblasts and increased the activity of ALP after 24 h, 48 h, and 72 h, respectively ($P<0.05$).

[Conclusion] The health food product containing *Flemingia macrophylla* could improve bone function in rats, and its mechanism may be related to promoting the differentiation of osteoblasts.

Keywords: *Flemingia macrophylla*; ovariectomized rats; osteoporosis; osteoblast; alkaline phosphatase

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨脆性增加和易发生骨折为特征的全身性疾病, 为老年人尤其是绝经后老年妇女的一种常见病、多发病^[1]。随着我国人口老龄化的加重, OP 已成为我国将要面临的重要公共卫生问题^[2]。另一方面, OP 病程较长, 具有预防作用的保健食品有着广阔的应用前景。我国保健食品开发的一个最主要特点就是中医药理论与现代研究成果联合应用, 以药食两用的中药为原料, 极具中国特色, 也符合“回归自然, 返璞归真”的世界消费潮流^[3]。大量研究表明, 传统中药淫羊藿、补骨脂能有效改善 OP 患者骨代谢、提高骨密度, 是防治骨质疏松的常用中药配方^[4-8]。千斤拔作为常用中药, 含有丰富的异黄酮类化合物, 具有植物雌激素作用, 并有抗骨质疏松的治疗潜力^[9-10]。然而目前鲜有含千斤拔成分的用于骨质疏松防治的保健食品的研发。

本项目探究性地研制千斤拔配方组合, 初探其安全性, 并利用去势雌鼠骨质疏松模型, 验证其对大鼠骨密度的影响; 另一方面深入研究千斤拔提取物促进体外成骨细胞增殖分化能力, 探讨千斤拔改善骨骼功能的可能机制。本项目为千斤拔作为保健食品成分或药物, 用于防治 OP 提供一定的参考与理论依据。

1 对象与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 千斤拔混合粉配方与原料 依据《本草纲目》等中药理论, 并参考《中华人民共和国药典》《保健食品注册与备案管理办法》、2013 年版《中国居民膳食指南》和 2011 年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》(后简称“指南”)等现代研究成果, 制定各成分组成和用量^[11-14]。设计的千斤拔混合粉组配方为: 千斤拔 110 g , 补骨脂 80 g , 淫羊藿 80 g , 硫酸软骨素 70 g , 维生素 D 10 mg , 生物碳酸钙 160 g 。以指南推荐的老年人维生素 D 摄入量 800 IU 为依据^[11], 设置本配方的人体推荐每日摄入量为 2 g , 其他成分含量均符合标准或指南推荐范围。面粉混合粉组是将千斤拔换成同等质量的面粉, 其他成分组成不变。

千斤拔、补骨脂、淫羊藿原药购于成都荷花池中药材专业市场, 原药经四川大学生命科学院鉴定; 维生素 D (Solarbio, 美国); 生物碳酸钙 (安徽仟顺生物科技有限公司, 中国); 硫酸软骨素 A (上海源叶生物科技有限公司, 中国); 小麦粉 (成都人民食品厂, 中国)。中药材粉碎后与其他成分混合制成粉末, 于 4°C 冷藏保存。

1.1.2 实验动物 SPF级SD大鼠,由成都达硕实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(川)2015-030]。动物饲养于四川大学华西公共卫生学院实验动物房[许可证号:四川省实验动物管理委员会SYXK(川)2018-011]。基础饲料由成都达硕实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(川)2014-028],并经辐照灭菌后密封常温干燥保存。实验期间大鼠自由摄食和饮水,温度20~24℃,相对湿度53%~65%。本研究已经四川大学华西公共卫生学院动物管理委员会评估,批准号:研(审)2019001。

1.1.3 试剂与仪器 淫羊藿苷(上海麦克林生化科技有限公司,中国);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色液(改良Gomori钙钴法)(北京索莱宝科技有限公司,中国);ALP测试盒(酶标仪法)(南京建成生物工程研究所,中国);BCA法蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所,中国);细胞增殖-毒性检测试剂盒CCK-8(东仁试剂,日本);低糖DMEM培养基(Hyclone,美国);II型胶原酶(Sigma,美国)等。

Multiskan GO酶标仪(ThermoFisher Scientific,美国);CKX41SF倒置相差显微镜(OLYMPUS,美国);1736R冷冻高速离心机(SCANSPEED,美国);旋转蒸发仪(上海荣亚生化公司,中国);MCO-15AC型二氧化碳培养箱(上海SANYO,中国);病理取材及切片制作设备(LEICA,美国);原子吸收分光光度计(PerkinElmer,美国);小动物全自动高分辨率X线机(BRUKER,美国)等。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠急性毒性试验 根据GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》,采用限量法,取180~200g SPF级SD大鼠20只(雌雄各半)进行实验。受千斤拔混合粉溶解性的限制,设10g·kg⁻¹(以体重计)为一个剂量组,以20mL·kg⁻¹(以体重计)灌胃2次,间隔4h,观察14d。实验结束时根据中毒和死亡情况,进行毒性分类。

1.2.2 去势大鼠骨结构功能实验 采用去势成年雌鼠建立骨质疏松模型。选择180~220g SPF级成年雌性未孕SD大鼠32只,按体重分层后随机分为4组:假手术组、模型对照组、模型+千斤拔混合粉组和模型+面粉混合粉组,每组8只。大鼠用戊巴比妥钠麻醉后,在背部肋脊角处备皮消毒。除假手术组外其他3组大鼠行双侧卵巢切除手术,假手术组大鼠仅切除少量脂肪。假手术组和模型对照组大鼠予以同等剂量的纯水灌

胃,另两个实验组分别用相应配方按1g·kg⁻¹(以体重计)的剂量(相当于人体推荐量的30倍)以10mL·kg⁻¹(以体重计)灌胃。每天1次,持续13周,每周称重记录。13周后安乐处死大鼠,取左侧股骨用小动物全自动高分辨率X线机测量骨密度后,股骨经脱钙、切片,HE染色观察骨结构变化,并使用软件motic images advanced 3.2测量骨皮质的厚度。右侧股骨烘干至恒重并称重记录股骨干重,经消化后利用原子吸收法进行骨钙质量分数(后称:含量)的测定。

1.2.3 千斤拔提取物的制作与最佳洗脱梯度的筛选 取千斤拔粉末40g,加入1L体积分数75%的甲醇(无水甲醇与纯水配制)磁力搅拌4h,超声辅助提取90min后离心,取上清液进行旋蒸得到浸膏。再使用AB-8型大孔吸附树脂分离纯化千斤拔总黄酮,分别用1L体积分数分别为0%、20%、40%、60%、80%、100%的甲醇依次洗脱层析柱^[15-16],并采用硝酸铝显色法测定千斤拔提取物中总黄酮质量分数(后称:含量)^[17]。

将纯化的各洗脱组分提取物分别与成骨细胞共培养,培养方法见1.2.5,根据细胞培养结果和千斤拔提取物总黄酮含量筛选出效果最佳的洗脱组分进行后续研究。

1.2.4 成骨细胞分离、培养与鉴定 取新生SD大鼠(24~72h)10只,处死后在75%酒精中消毒10min,无菌手术取出颅盖骨并用无菌PBS冲洗至白色,再将头盖骨剪成0.5mm×0.5mm的碎片。加入0.25%胰蛋白酶消化处理,PBS洗涤后静置沉淀,弃上清液。再加0.1%胶原酶溶液于37℃恒温摇床上消化1h,弃去消化液后用适量含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的DMEM培养液重悬细胞,吹匀。以2.0×10⁵个·mL⁻¹的细胞密度接种于培养板上,于37℃含5%CO₂的孵箱培养,用差速贴壁法初步纯化成骨细胞。镜下观察直至细胞完全贴壁后,更换培养液,每3d换液1次并观察细胞生长状况^[18-20]。将第三代细胞接种于24孔板,采用改良Gomori氏钙钴法进行ALP染色,显微镜下观察鉴定并拍照记录^[21-22],成骨细胞核染为蓝紫色,表明同代细胞可用于实验。

1.2.5 成骨细胞CCK-8试验和ALP活性测定 调整细胞密度为4×10⁴个·mL⁻¹接种于96孔板,每孔加入100μL细胞悬液,设3个复孔,培养24h后,分别加入不同洗脱梯度的千斤拔提取液,加样浓度为1、0.5g·L⁻¹,加药后继续培养72h,48h时换液1次。另设0.4g·L⁻¹淫羊藿苷阳性对照组和0.1% DMSO溶剂对照组。每孔加

入10 μL 的CCK-8溶液,根据CCK-8试剂盒说明书,用酶标仪在波长450nm处测定各孔的光密度(D)值,根据 D 值计算细胞增殖率^[23],筛选出最佳洗脱梯度。公式如下:

$$V_{\text{增殖率}} = \frac{D_{\text{实验组}} - D_{\text{对照组}}}{D_{\text{对照组}}} \times 100\%。$$

在最佳洗脱梯度下,同上述方法再分别加入不同浓度(1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的千斤拔提取液,培养24、48、72 h,测定细胞增殖率。

同上述方法加入细胞和千斤拔提取液,根据ALP测试盒(酶标仪法)说明书,用酶标仪在波长520 nm处测定各孔的光密度(D)值,并计算ALP活性^[24-25],公式如下:

$$V_{\text{ALP活性}} = \frac{D_{\text{测定}} - D_{\text{空白}}}{D_{\text{标准}} - D_{\text{空白}}} \times \rho_{\text{标准品}} \times 1000。$$

式中:标准品质量浓度($\rho_{\text{标准品}}$)为0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;酶活性单位定义为1 L血清或液体在37°C与基质作用15 min产生1 mg 酚即为1个金氏单位,简称为U $\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 统计学分析

实验数据用SPSS 20.0软件进行处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间数据比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,用LSD法进行不同组间均数的两两比较。双侧检验水准 $\alpha=0.05$ 。使用Graphpad prism 8软件绘制统计图。

2 结果

2.1 大鼠急性毒性试验结果

10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 千斤拔混合粉经口染毒后,两周内未出现大鼠死亡,也无明显中毒症状,大鼠体重增重在正常范围内,详见表1。对动物进行大体解剖,未见任何异常,千斤拔混合粉对雌、雄性SD大鼠的急性经口 $\text{LD}_{50}>10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,根据GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》,属实际无毒级别。

表1 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 千斤拔混合粉急性染毒后SD大鼠体重变化($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Effect of acute exposure to 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Flemingia
macrophylla mixed powder on body weight of SD rats ($\bar{x}\pm s$)
单位(Unit): g

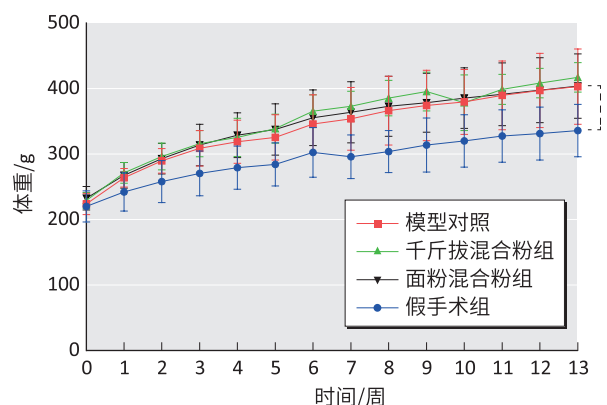
性别	动物数	第0天	第7天	第14天
雄	10	210.5 $\pm$ 7.60	290.5 $\pm$ 10.71	351.1 $\pm$ 18.31
雌	10	197.1 $\pm$ 8.05	235.5 $\pm$ 10.27	252.7 $\pm$ 13.22

2.2 去势大鼠骨结构功能实验结果

2.2.1 大鼠体重

与假手术组相比,模型对照组从第

1周末开始,体重均明显升高($P<0.05$)。与模型对照组相比,千斤拔混合粉组和面粉混合粉组初始体重、实验中和实验末体重差异均无统计学意义($P>0.05$),具体见图1。



[注]*:与假手术组相比, $P<0.05$ 。

图1 干预13周前后实验各组大鼠体重变化($n=8$)

Figure 1 The changes of body weight of rats in each group after 13 weeks of intervention ($n=8$)

2.2.2 大鼠股骨结构改变 与假手术组相比,模型对照组骨钙含量、骨密度和骨皮质厚度降低($P<0.05$)。与模型对照组相比,千斤拔混合粉组和面粉混合粉组的骨密度、骨皮质厚度值均升高($P<0.05$);并且,相比于面粉混合粉组,千斤拔混合粉组的骨皮质厚度升高($P<0.05$),具体见表2。

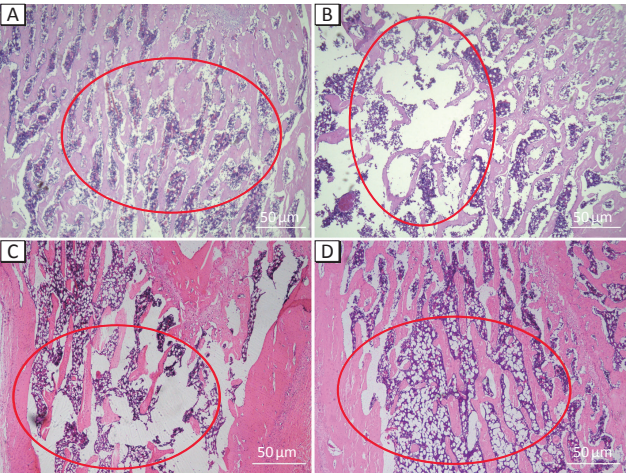
表2 干预13周后实验各组大鼠股骨的干重、骨钙含量、骨密度及骨皮质厚度($n=8, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Effects on dry weight, bone calcium content, bone mineral density, and bone cortical thickness of femur in rats in each group after 13 weeks of intervention ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	左股骨骨密度 / ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$)	右股骨干重/g	右股骨钙 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	左骨皮质厚度 / μm
假手术组	0.65 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.07	234.29 $\pm$ 11.45	525.56 $\pm$ 99.91
模型对照组	0.60 $\pm$ 0.03 [#]	0.74 $\pm$ 0.05 [#]	215.41 $\pm$ 15.79 [#]	237.37 $\pm$ 61.59 [#]
面粉混合粉组	0.64 $\pm$ 0.03 [#]	0.73 $\pm$ 0.07	209.07 $\pm$ 27.58	302.87 $\pm$ 64.83 [#]
千斤拔混合粉组	0.64 $\pm$ 0.02 [#]	0.73 $\pm$ 0.07	219.09 $\pm$ 10.41	376.01 $\pm$ 51.52 [#] ▲

[注]#:与假手术组相比, $P<0.05$;*:与模型对照组相比, $P<0.05$;▲:与面粉混合粉组相比, $P<0.05$ 。

2.2.3 大鼠股骨病理组织 假手术组大鼠的骨小梁结构紧密、数目较多,分离度小,连续性好;与假手术组相比,模型对照组的骨小梁明显变稀疏,数目变少,出现较大的间隙;而与模型对照组相比,千斤拔混合粉组和面粉混合粉组骨小梁数目明显增多,分离度变小,骨小梁结构变紧密,连续性较好,且千斤拔混合粉组骨形态明显优于面粉混合粉组,具体见图2。



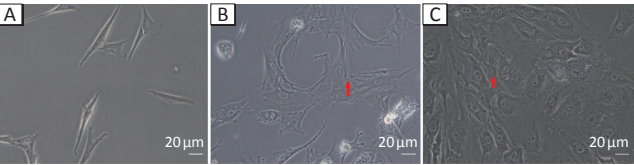
[注] A：假手术组；B：模型对照组；C：面粉混合粉组；D：千斤拔混合粉组。图中红圈表示骨小梁结构致密疏松情况。

图2 干预13周后实验各组大鼠股骨骨小梁的组织病理学情况(HE, ×40)

Figure 2 The histopathological changes of femoral trabeculae of rats in each group after 13 weeks of intervention (HE, ×40)

2.3 大鼠颅骨原代成骨细胞离体培养结果

2.3.1 细胞形态观察 倒置显微镜下观察原代细胞, 前3d为小而圆的细胞, 第3天时, 细胞呈长梭状、三角形、不规则多边形, 见图3A。第5天时, 细胞多为不规则多边形, 并且有数量不等的突触围绕着细胞核生长, 胞质透亮并有少量颗粒, 核圆位于细胞中央且核仁明显, 核内有1~2个核仁, 见图3B。第7天时, 细胞呈现铺路石状, 细胞变短变宽, 胞质内颗粒较多, 细胞核呈现椭圆形, 核内有一个或多个核仁, 见图3C。



[注] A：第3天；B：第5天；C：第7天；箭头所指为胞质内颗粒。

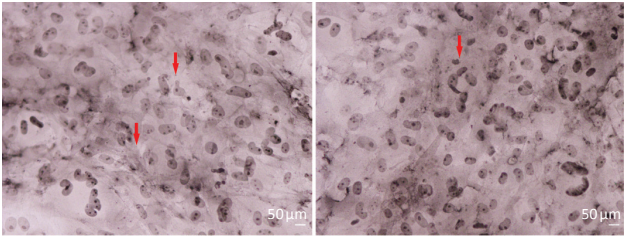
图3 倒置相差显微镜下大鼠颅骨原代成骨细胞第3、5、7天时的生长情况(×200)

Figure 3 Growth of primary calvarial osteoblasts of rats on day 3, 5, and 7 under inverted phase contrast microscope (×200)

2.3.2 细胞染色鉴定结果 改良 Gomori 氏钙钴法进行 ALP 染色, 倒置显微镜下观察成骨细胞形态, 呈铺路石状, 显示细胞内有棕黑色细微颗粒, 培养的成骨细胞能合成 ALP, 可用于后续实验。见图4。

2.4 千斤拔提取物最佳洗脱梯度筛选及其与细胞作用结果

经预试验, 除0% 甲醇洗脱梯度外, 其他洗脱梯度的千斤拔提取物均可提高成骨细胞 ALP 活性, 且40%、



[注] 箭头所指为 ALP 阳性颗粒。

图4 倒置相差显微镜下原代成骨细胞改良 Gomori 氏钙钴法染色情况(×200)

Figure 4 Staining of primary osteoblasts by modified Gomori's calcium-cobalt method under inverted phase contrast microscope (×200)

60% 和 80% 甲醇洗脱梯度效果最明显, 这与所测的相应浓度千斤拔提取物中总黄酮检测结果相一致。60% 甲醇洗脱时, 成骨细胞 ALP 活性较高且该浓度下受试物对细胞增殖抑制效果较弱, 同时总黄酮含量较高, 故选取 60% 作为千斤拔提取物最佳甲醇洗脱梯度。

在最佳洗脱梯度(60% 甲醇)下, 与溶剂对照相比, 0.4 g·L⁻¹ 淫羊藿苷与成骨细胞作用 24 h、48 h 及 72 h 后细胞增殖率均升高, ALP 活性除 72 h 外, 其余时间段均增加, 差异有统计学意义, 表明试验方法可靠。详见表3、4。

表3 不同浓度千斤拔提取物与细胞作用不同时间后细胞增殖率(̄x±s)

Table 3 Cell proliferation at different concentrations of *Flemingia macrophylla* extract for different treatment time (̄x±s)

单位 (Unit) : %				
组别 [剂量 / (g·L ⁻¹)]	24 h	48 h	72 h	
溶剂对照	0.0	0.0	0.0	
淫羊藿苷 (0.4)	34.7*	11.7*	11.8*	
千斤拔提取物 (0.2)	6.8	-9.0*	-4.5	
(0.4)	-3.6	-18.4*	-16.8*	
(0.6)	-9.2	-23.4*	-23.9*	
(0.8)	-10.1	-25.8*	-29.9*	
(1.0)	-12.3	-28.1*	-30.1*	

[注] *：与溶剂对照相比, P<0.05。

表4 不同浓度千斤拔提取物与细胞作用不同时间后 ALP 活性(̄x±s)

Table 4 ALP activity at different concentrations of *Flemingia macrophylla* extract for different treatment time (̄x±s)

单位 (Unit) : U·L ⁻¹				
组别 [剂量 / (g·L ⁻¹)]	24 h	48 h	72 h	
溶剂对照	22.0±1.8	20.4±0.5	28.8±2.1	
淫羊藿苷 (0.4)	28.9±1.1*	23.9±1.4*	23.0±0.3*	
千斤拔提取物 (0.2)	26.5±3.0*	24.2±1.7*	32.4±1.6*	
(0.4)	26.8±0.8*	24.9±1.7*	30.2±3.7	
(0.6)	26.7±0.9*	26.8±0.9*	34.2±2.2*	
(0.8)	28.6±2.1*	27.2±1.1*	35.7±0.0*	
(1.0)	31.9±2.7*	29.8±0.5*	35.7±0.6*	

[注] *：与溶剂对照相比, P<0.05。

与溶剂对照相比,不同浓度千斤拔提取物均具有提高ALP活性的作用,却均呈现出对细胞增殖的抑制作用。随着培养浓度的增加,ALP活性呈上升的趋势,且细胞增殖活性呈下降趋势。与溶剂对照组相比,作用48 h后各剂量组细胞增殖率差异有统计学意义($P<0.05$);作用72 h后除了 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组外,其余剂量组细胞增殖率差异有统计学意义($P<0.05$);作用24 h后对各剂量组细胞增殖活性无影响($P>0.05$)。详见表3。与溶剂对照组相比,作用24、48 h后所有剂量组ALP活性均有提高($P<0.05$);作用72 h后,除了 $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组外,其余剂量组ALP活性也提高($P<0.05$)。详见表4。

3 讨论

饮食调节、运动和药物(钙剂、激素等)治疗等方式是防治骨质疏松的有效措施,但可能引起诸如骨硬化、静脉血栓等不良反应^[26]。近年来,更多的医、药学者致力于采用中药治疗骨质疏松并取得良好的效果^[27-29]。千斤拔这一中药,是我国西南地区的民间用药,有多种确切的药用历史,具有祛除风湿、止痛消炎、强壮筋骨等功效,但对千斤拔与骨质疏松之间的基础医学研究较少。本配方选用千斤拔、淫羊藿、补骨脂等中药材为原料,是专为骨质疏松人群设计的一种具有增加骨密度、改善骨功能的保健食品。本实验对该配方的安全性及其增加骨密度功能进行验证,并对其细胞机制进行初步探究。

急性毒性实验结果表明,千斤拔混合粉组急性毒性属实际无毒级别。另一方面,本研究采用的去势法建模为美国食品与药品监管局和世界卫生组织推荐的骨质疏松症最佳研究方法^[30]。大鼠摘除卵巢后,雌激素分泌大幅下降,通过直接调节、旁分泌通路及相应的免疫功能,继发内分泌失调,骨代谢紊乱,引发骨吸收-骨形成耦联失衡,骨量严重丢失,导致机体体重迅速增加来代偿性弥补骨量丢失,产生“代偿性肥胖”。雌性动物去势后形成的骨质疏松与人类绝经后骨质疏松形成机制相同,故为研究骨质疏松的最佳动物模型。本实验中相较于假手术组,模型对照组的大鼠体重明显升高,而骨钙含量、骨密度和骨皮质厚度明显降低,综合以上指标说明本次去势大鼠骨质疏松模型成功建立^[31]。在成功建模的基础上,发现千斤拔混合粉组骨密度、骨皮质厚度高于模型对照组,且前者骨皮质厚度高于面粉混合粉组。骨组织病理结果显示,与模型对照组相比,千斤拔组骨小梁数目明

显增多,分离度变小,结构变紧密,连续性较好,并且千斤拔组对骨组织的改善情况显著优于面粉混合粉组,Ho等^[32]的研究表明千斤拔在骨骼功能上表现为类雌激素活性,可抑制骨吸收。

淫羊藿为经典增骨药材,其有效化学成分黄酮类化合物可促进成骨细胞增殖分化^[33-34],故进一步以淫羊藿苷为阳性对照,通过细胞实验验证千斤拔的具体作用。本研究采用CCK-8法检测受试物对成骨细胞增殖活性的影响,作为四甲基偶氮唑盐法的替代方法,前者具有简便、快速、灵敏度高等优势^[35]。另一方面,ALP是一种同源二聚体的糖蛋白,作为成骨细胞分化的最早期生化标志,细胞分化时向细胞间质分泌ALP,ALP水解磷酸酯,提供无机磷酸盐给羟基磷灰石,并水解无机焦磷酸酶,抑制其对羟基磷灰石的分解作用,进而促进骨矿化^[36]。成骨细胞富含ALP,具有促进细胞成熟、钙化的作用,其活性可作为评价成骨细胞分化程度的良好指标^[18]。结果表明在最佳洗脱梯度——60%甲醇洗脱下,与溶剂对照相比,不同浓度千斤拔提取物均具有提高ALP活性的作用,却均呈现出对细胞的抑制增殖作用。随着培养时间和浓度的增加,ALP活性呈上升的趋势,且细胞增殖活性呈下降趋势。镜下观察各组别细胞形态并未出现变圆、皱缩、脱落等凋亡状态,说明抑制细胞增殖的方式并非使细胞凋亡,推测可能是细胞分裂周期阻滞导致的^[37],出现这样的情况可能与千斤拔提取物中某些化合物有关。有关千斤拔化学成分的研究表明,千斤拔属植物中含有黄酮类、酚酸类、鞣质类、生物碱类等物质^[38],其中黄酮类和酚酸类物质含量较高。与淫羊藿中富含的公认具有良好增骨作用的黄酮不同,酚酸类物质是具有抑菌活性的成分,中药材中常见的酚酸类物质丹酚酸B可增加成骨细胞ALP活性,有显著的促进成骨细胞分化成熟和矿化的作用,但同时却无促进细胞增殖作用,高浓度下甚至会抑制增殖^[39]。且有文献报道,丹酚酸B对大鼠传代肝贮脂细胞和星状细胞的增殖有抑制作用,其机制可能是丹酚酸B在上游抑制了促进细胞增殖的某些环节^[40]。结合镜下观察的细胞状态,推测在本研究浓度剂量下,千斤拔提取物中的酚酸类物质抑制了成骨细胞的增殖,却以另一种方式促进成骨细胞的分化,使成骨细胞进一步成熟,该特点对改善骨功能有着重要的意义。

综合体内、体外实验结果,千斤拔具有一定的改善骨结构功能的作用,可能是通过改善骨代谢,促进

成骨细胞的分化成熟来实现的^[41]。本项目证明了该增骨配方设计的有效性,且填补了这方面研究的空白,为研发保健食品增骨配伍提供可选材料和理论依据。然千斤拔的提纯工艺有待进一步优化,且其增骨功效和作用机制还需进一步研究,未来可完善骨生物学相关评价指标,更深入地反映千斤拔的改善骨结构功能作用,且需进一步探索成骨细胞分化信号通路相关 mRNA 和蛋白的表达。

参考文献

- [1] RAJPUT R, WAIRKAR S, GAUD R. Nutraceuticals for better management of osteoporosis : an overview [J] . J Funct Foods, 2018, 47 : 480-490.
- [2] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状 [J] . 中国骨质疏松杂志, 2018, 24 (2) : 253-258.
- BAI B H, XIE X W, LI D P, et al. Epidemiological studies on osteoporosis in the past five years in China [J] . Chin J Osteoporos, 2018, 24 (2) : 253-258.
- [3] 高学敏, 张建军, 王景霞, 等. 论我国保健食品的优势及其法律定位 [J] . 中华中医药杂志, 2009, 24 (2) : 121-123.
- GAO X M, ZHANG J J, WANG J X, et al. Discussion on advantages and law location of health food in China [J] . China J Tradit Chin Med Pharm, 2009, 24 (2) : 121-123.
- [4] 刘海燕. 中药淫羊藿治疗骨质疏松症的临床观察 [J] . 内蒙古中医药, 2019, 38 (1) : 16-17.
- LIU H Y. Clinical observation of epimedii herba in the treatment of osteoporosis [J] . Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2019, 38 (1) : 16-17.
- [5] 刘小钰, 宋敏, 蒋林博, 等. 补骨脂活性成分对骨质疏松相关信号通路影响的研究概况 [J] . 中国骨质疏松杂志, 2017, 23 (6) : 831-836.
- LIU X Y, SONG M, JIANG L B, et al. The study of the effect of the active ingredients of fructus psoraleae on the osteoporosis-related signal pathways [J] . Chin J Osteoporos, 2017, 23 (6) : 831-836.
- [6] TAN G, YANG T, MIAO H, et al. Characterization of compounds in *Psoralea corylifolia* using high-performance liquid chromatography diode array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J] . J Chromatogr Sci, 2015, 53 (9) : 1455-1462.
- [7] 刘振海, 刘红, 王少君, 等. 防治骨质疏松症常用单味中药实验研究概况 [J] . 环球中医药, 2013, 6 (6) : 473-479.
- LIU Z H, LIU H, WANG S J, et al. General situation of the prevention and cure osteoporosis commonly used single herb experimental study [J] . Glob Tradit Chin Med, 2013, 6 (6) : 473-479.
- [8] MOK S K, CHEN W F, LAI W P, et al. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells [J] . Br J Pharmacol, 2010, 159 (4) : 939-949.
- [9] 林玲, 沈洁. 千斤拔黄酮的药理研究进展 [J] . 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (90) : 35-36.
- LIN L, SHEN J. Pharmacological research progress of moghania macrophylla flavonoids [J] . World Latest Med Inf, 2019, 19 (90) : 35-36.
- [10] GADGEEL S M, ALI S, PHILIP P A, et al. Retracted : genistein enhances the effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and inhibits nuclear factor kappa B in nonsmall cell lung cancer cell lines [J] . Cancer, 2009, 115 (10) : 2165-2176.
- [11] 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] . 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10 (5) : 413-443.
- CSOABMR. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary osteoporosis [J] . Chin J Osteoporosis Bone Miner Res, 2017, 10 (5) : 413-443.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M] . 北京 : 中国医药科技出版社, 2015 : 354-356.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. People's republic of China pharmacopoeia [M] . Beijing : China Medical Science and Technology Press, 2015 : 354-356.
- [13] 程义勇. 《中国居民膳食营养素参考摄入量》2013 修订版简介 [J] . 营养学报, 2014, 36 (4) : 313-317.
- CHENG Y Y. A brief introduction to the 2013 revised version of *The reference dietary nutrient intake of Chinese residents* [J] . Acta Nutr Sin, 2014, 36 (4) : 313-317.
- [14] 中华中医药学会. 《本草纲目》新校注本 [M] . 3 版. 北京 : 华夏出版社, 2008 : 4-5.
- Chinese Society of Traditional Chinese Medicine. New proofread edition of *The compendium of materia medica*

- [M]. 3rd ed. Beijing: Huaxia Publishing House, 2008: 4-5.
- [15] 闵玉涛, 宋彦显, 陶敬, 等. AB-8型大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的工艺优化 [J]. 食品工业, 2015, 36 (7): 159-162.
- MIN YT, SONG YX, TAO J, et al. Optimized the extraction and partial purification of isoflavone in *Pueraria lobata* tubers by Ab-8 macroporous resin [J]. Food Ind, 2015, 36 (7): 159-162.
- [16] 陈帅, 王慧竹, 姜昆, 等. 大孔吸附树脂分离纯化千斤拔总黄酮的工艺研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2014 (10): 115-119.
- CHEN S, WANG HZ, JIANG K, et al. Study on separation and purification technology of flavonoids from *Moghania philippinensis* by macroporous adsorption resins [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2014 (10): 115-119.
- [17] BOUAYED J, HOFFMANN L, BOHN T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake [J]. Food Chem, 2011, 128 (1): 14-21.
- [18] 武海燕, 张灵莉, 冯雪梅. 锁阳含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖分化及矿化的影响 [J]. 中药与临床, 2019, 10 (1): 23-26.
- WU HY, ZHANG LL, FENG XM. Effects of cynomorium-containing serum on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts MC3T3-E1 cultured in vitro [J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2019, 10 (1): 23-26.
- [19] 刘仪, 徐朱杰, 王瑞, 等. 硫酸乙酰肝素对乳鼠颅骨成骨细胞增殖及分化成熟的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24 (4): 421-428.
- LIU Y, XU Z J, WANG R, et al. Participation of heparin sulfate in fetal rat osteoblast cells proliferation, differentiation and mineralization [J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24 (4): 421-428.
- [20] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠成骨细胞的原代培养和鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15 (6): 990-994.
- LI XF, ZHAO JM, SU W, et al. Primary culture and identification of rat osteoblasts [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2011, 15 (6): 990-994.
- [21] 丁晓伟, 徐媛, 闵泽, 等. 不同浓度厄贝沙坦对前成骨细胞分化和矿化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (4): 499-504.
- DING XW, XU Y, MIN Z, et al. Effects of different concentrations of irbesartan on the differentiation and mineralization of preosteoblasts [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21 (4): 499-504.
- [22] 乔海兵, 邢开宇. 改良碱性磷酸酶染色法 [J]. 实用医技杂志, 2006, 13 (6): 1011-1012.
- QIAO HB, XING KY. Improved alkaline phosphatase staining method [J]. J Pract Med Tech, 2006, 13 (6): 1011-1012.
- [23] 徐钢, 裴启洋, 鞠成国, 等. CCK-8法检测狗脊不同炮制品对成骨细胞的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (24): 4319-4323.
- XU G, PEI QY, JU CG, et al. Detection on effect of different processed *Cibotium barometz* on osteoblasts by CCK-8 [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38 (24): 4319-4323.
- [24] 孙贵才, 徐轶尔, 郑春雨, 等. 骨乐冲剂对成骨细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 25 (2): 73-76.
- SUN GC, XU YE, ZHENG CY, et al. Effect of Gule granules on osteoblast proliferation and alkaline phosphatase activity [J]. Chin J Clin Pharm, 2016, 25 (2): 73-76.
- [25] 王朝元, 易继凌, 宋超, 等. 绿原酸对体外培养成骨细胞活性的影响 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2013, 32 (2): 46-50.
- WANG CY, YI JL, SONG C, et al. Effects of chlorogenic acid on the activity of cultured osteoblasts *in vitro* [J]. J South-Cen Univ Nat (Nat Sci Ed), 2013, 32 (2): 46-50.
- [26] 苏红丽. 骨质疏松症的临床治疗进展 [J]. 医药论坛杂志, 2018, 39 (3): 175-176.
- SU HL. Advances in clinical treatment of osteoporosis [J]. J Med Forum, 2018, 39 (3): 175-176.
- [27] 金瑜. 中医药治疗骨质疏松症的疗效分析 [J]. 临床医药文献杂志, 2019, 6 (20): 72-73.
- JIN Y. Analysis of therapeutic effect of traditional Chinese medicine on osteoporosis [J]. J Clin Med, 2019, 6 (20): 72-73.
- [28] 杨宗德. 中医药治疗骨质疏松症研究进展 [J]. 系统医学, 2019, 4 (4): 193-195.
- YANG ZD. Research progress of TCM in treatment of osteoporosis [J]. Syst Med, 2019, 4 (4): 193-195.
- [29] 程栋, 龙攀, 周海艇. 中医药治疗骨质疏松症研究近况 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9 (1): 86-89.

- CHENG D, LONG P, ZHOU H T. Recent developments in research on treatment of osteoporosis with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Osteoporos, 2003, 9 (1): 86-89.
- [30] 张悦, 李运峰. 骨质疏松症动物模型研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26 (1): 152-156.
- ZHANG Y, LI Y F. The research process in osteoporosis animal modeling [J]. Chin J Osteoporos, 2020, 26 (1): 152-156.
- [31] 戴伟, 孙宇立, 郑勇英, 等. 增加骨密度类保健食品功能评价方案联合应用的探讨 [J]. 环境与职业医学, 2010, 27 (6): 360-362, 365.
- DAI W, SUN Y L, ZHENG Y Y, et al. Selection of assessing protocol of health food specified in increasing bone density [J]. J Environ Occup Med, 2010, 27 (6): 360-362, 365.
- [32] HO H Y, WU J B, LIN W C. *Flemingia macrophylla* extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 752302.
- [33] 谢雁鸣, 秦林林, 于向东, 等. 六种黄酮对成骨细胞体外培养作用的比较研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11 (9): 664-667.
- XIE Y M, QIN L L, YU X D, et al. Comparative study on the effects of six kinds of flavones on osteoblasts and osteoclasts cultured *in vitro* [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2005, 11 (9): 664-667.
- [34] 欧阳慧子, 何俊. 淫羊藿化学成分分析及其药代动力学研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38 (3): 219-227.
- OUYANG H Z, HE J. Research progress on the quantitative analysis of chemical constituents in *Epimedium* herb and its pharmacokinetics [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2019, 38 (3): 219-227.
- [35] 石凉. 细胞增殖的检测方法 [J]. 实验与检验医学, 2012, 30 (2): 153-155, 168.
- SHI C. Detection method of cell proliferation [J]. Exp Lab Med, 2012, 30 (2): 153-155, 168.
- [36] 高毅. 淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响及机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- GAO Y. Effects of icariin on the proliferation and differentiation of osteoblast and its possible mechanism of action *in vitro* [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013.
- [37] 汪洁英, 宁博, 陈钰玮, 等. 双酚A对甲状腺乳头状癌细胞KTC-1增殖的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (7): 712-718.
- WANG J Y, NING B, CHEN Y W, et al. Effects of bisphenol A on proliferation of thyroid papillary carcinoma KTC-1 cells [J]. J Environ Occup Med, 2020, 37 (7): 712-718.
- [38] 李宝强. 云南蕊木、大叶千斤拔化学成分及千斤拔指纹图谱研究 [D]. 西双版纳: 中国科学院西双版纳热带植物园, 2007.
- LI B Q. Research on chemical constituents of *Kopsia officinalis* and *Flemingia macrophylla* and the HPLC fingerprints of *Radix flemingia* [D]. Xishuangbanna: Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS, 2007.
- [39] 范焕琼. 丹酚酸B对体外成骨细胞和骨髓基质干细胞的作用研究 [D]. 湛江: 广东医学院, 2006.
- FAN H Q. Effects of salvianolic acid B on osteoblast and marrow stromal cells *in vitro* [D]. Zhanjiang: Guangdong Medical University, 2006.
- [40] 王晓玲, 崔云华, 胡旭东, 等. 丹酚酸B对大鼠肝星状细胞增殖周期的抑制作用 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24 (1): 59.
- WANG X L, CUI Y H, HU X D, et al. Inhibitory effect of Salvianolic acid B on proliferation cycle of rat hepatic stellate cells [J]. Chin J Dig, 2004, 24 (1): 59.
- [41] 潘思娜. 淫羊藿改善糖皮质激素性骨质疏松症的代谢组学研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- PAN S N. The metabonomic study of *Epimedium* on improving glucocorticoid-induced osteoporosis [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)