

九里香叶对去卵巢大鼠体积骨密度、血钙、血磷、碱性磷酸酶、骨组织形态学的影响

文 娱¹ 李晓晖² 尤文质¹ 郑启忠³ 高 海⁴ 张秋萍² 彭清华¹

(1 厦门市中医院药学部, 厦门, 361009; 2 厦门市中医 GC 办公室, 厦门, 361009; 3 厦门市中医院病理科, 厦门, 361009; 4 厦门市中医院科教科, 厦门, 361009)

摘要 目的: 观察九里香叶对去卵巢大鼠体积骨密度、血钙、血磷、碱性磷酸酶、骨组织形态学的影响。方法: 取 60 只 SPF 级 SD 雌性大鼠, 通过切除双侧卵巢复制骨质疏松模型。术后 7 d 分组给药。模型组: 生理盐水(0.4 mg/kg · d); 对照组: 生理盐水(0.4 mg/kg · d); 戊酸雌二醇组: 0.4 mg/kg · d; 九里香高剂量组: 200 mg/kg · d; 九里香中剂量组: 100 mg/kg · d; 九里香低剂量组: 50 mg/kg · d。连续给药 90 d。给药结束后, 测定大鼠体积骨密度, 采用电极法测定血钙; 速率法测定血磷、碱性磷酸酶。大鼠右侧股骨 HE 染色, 计量骨小梁平均宽度、骨小梁面积百分率。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠体积骨密度明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组大鼠血钙、碱性磷酸酶明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 血磷无差异; 模型组大鼠骨小梁平均宽度及骨小梁面积百分率明显降低, 差异有统计学意义。与模型组比较, 九里香叶高剂量组大鼠体积骨密度明显增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 九里香叶高剂量组大鼠血钙明显增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 血磷无统计学意义; 九里香叶低剂量组大鼠碱性磷酸酶明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 九里香叶高剂量组骨小梁平均宽度及骨小梁面积百分率明显增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 九里香叶影响去卵巢大鼠骨质疏松体积骨密度、血钙、碱性磷酸酶、骨小梁平均宽度及骨小梁面积百分率变化, 具有抗骨质疏松作用。

关键词 九里香; 骨密度; 血钙; 血磷; 碱性磷酸酶; 骨组织形态学

Effects of *Murraya Paniculata* Leaf on Volumetric Bone Mineral Density, Blood calcium, Blood Phosphorus, Alkaline phosphatase, bone Histomorphology in Ovari-ectomized Rats

Wen Yu¹, Li Xiaohui², You Wenzhi¹, Zheng Qizhong³, Gao Hai⁴, Zhang Qiuping², Peng Qinghua¹

(1 Pharmacy Department, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, China; 2 Drug Clinical Trial Institution, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, China; 3 Department of Pathology, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, China; 4 Department of Science and Education, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, China)

Abstract Objective: To observe the effect of *Murraya Paniculata* leaf on volumetric bone mineral density, blood calcium, blood phosphorus, Alkaline phosphatase, bone histomorphology in ovari-ectomized rats. **Methods:** A total of 60 SPF SD female rats were taken as models by removing bilateral ovaries. After 7 days of operation, all rats were divided into six groups: model group (normal saline, 0.4 mg/kg · d), control operation group (normal saline, 0.4 mg/kg · d), Estradiol Valerate group (0.4 mg/kg · d), *Murraya Paniculata* leaf high dose group (200 mg/kg · d), *Murraya Paniculata* leaf middle dose group (100 mg/kg · d) and *Murraya Paniculata* leaf low dose group (50 mg/kg · d). Drugs were given once a day for 90 days. Using electrode analysis to measure volumetric bone mineral density of rats and velocity method to measure blood calcium and blood phosphorus and alkaline phosphatase. Use HE staining on the right side of the femur of rats, then measured the average width and trabecular bone area percentage. **Results:** Compared with the control group, volumetric bone mineral density of model group rats were reduced ($P < 0.05$), blood phosphorus and Alkaline phosphatase of model group rats were lower, and the difference is significant ($P < 0.05$), also, the average width and trabecular bone area percentage of model group rats were lower ($P < 0.05$). No difference was found in blood phosphorus. Compared with model group, volumetric bone mineral density and blood calcium and the average width and trabecular bone area percentage were higher in *Murraya Paniculata* leaf high dose group ($P < 0.05$). No difference was found in blood phosphorus. Also, alkaline phosphatase in *Murraya Paniculata* leaf low dose group was lower with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Murraya Paniculata* leaf could influence volumetric bone mineral density, blood calcium, blood phosphorus, alkaline phosphatase, the average width and trabecular bone area percentage in ovari-ectomized rats. It has anti-osteoporosis effect.

Key Words *Murraya Paniculata*; Bone mineral density; Blood calcium; Blood phosphorus; Alkaline phosphatase; Bone histomor-

phology

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.038

九里香为芸香科九里香属植物, 主要分布在我国福建、广东、广西、海南、台湾等省区, 全年均可采收, 其气香, 味苦、辛, 有麻舌感^[1]。早在多年前, 我国南方地区就已经将九里香作为一种民间用药, 其疗效得到广泛认可^[2]。它具有行气活血、散瘀止痛、解毒消肿等功效^[3]。实验证实, 黄酮是九里香的主要活性成分之一, 尤以叶子中的含量最高^[4], 九里香叶作为药用部位合理^[5]。研究证实, 黄酮类化合物具有明确的抗骨质疏松作用^[6]。九里香叶天然存在的生物黄酮分子量小, 能被人体迅速吸收。因此本课题通过切除SD大鼠双侧卵巢复制骨质疏松模型, 观察九里香叶对去卵巢大鼠体积骨密度、血钙、血磷、碱性磷酸酶、骨组织形态学的影响, 从而明确九里香叶是否具有抗骨质疏松作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD大鼠, 2月龄, 体重(250 ± 20)g, SPF级实验动物, 由厦门大学实验动物中心提供, 合格证号SYXK(闽)2013-0006。

1.1.2 药物 戊酸雌二醇片: 拜耳医药保健有限公司广州分公司分包装, 批号: 203A2, 规格: 1mg × 21片; 九里香叶由厦门市中医院制剂室主任尤文质副主任中药师鉴定。

1.1.3 试剂与仪器 碱性磷酸酶检测试剂: 美国贝克曼库尔特有限公司, 批号: Z510231, 规格: 2 × 400T; 磷(PHOSm)检测试剂: 美国贝克曼库尔特有限公司, 批号: Z509208, 规格: R1: 2 × 200 mL, R2: 2 × 1800 mL; 电子天平: HXW-II(恒协电子有限公司); 全自动生化分析系统: unicel dxc800(美国贝克曼库尔特有限公司); 半自动石蜡切片机: RM2245(德国莱卡仪器公司); 生物显微镜: BX43(奥林巴斯有限公司); BI-2000医学图像分析系统: 成都泰盟有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 取SPF级SD雌性大鼠(2月龄)60只, 大鼠予以2%戊巴比妥钠(0.0002 mL/g)腹腔注射麻醉, 术前腹腔注射青霉素(5万U/kg), 预防感染。无菌条件下摘除双侧卵巢, 关闭腹腔, 对照组动物同法切除卵巢旁同样大小的脂肪组织。造模7d后, 分组及给药。实验动物随机分为6个组, 各组均为10只动物。

1.2.2 给药方法 灌胃给药, 1次/d, 连续90d。模型组(OVX): 生理盐水(0.4 mg/kg · d); 对照组: 生理盐水(0.4 mg/kg · d); 戊酸雌二醇组: 0.4 mg/kg · d, (戊酸雌二醇用0.5%的羧甲基纤维素钠溶液配制成40 mg/L的混悬液); 九里香高剂量组: 200 mg/kg · d; 九里香中剂量组: 100 mg/kg · d; 九里香低剂量组: 50 mg/kg · d。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 体积骨密度测定 实体股骨标本及其不同骨段骨密度值测量: 以电子天平测量实体股骨标本及其不同骨段的重量, 以“溢出法”测量股骨及其不同骨段的体积。

1.2.3.2 血钙、血磷、碱性磷酸酶的测定 末次给药后次日, 断头取血5 mL置入无抗凝剂的试管中。3000 r/min, 离心15 min, 分离血清。采用电极法测定血钙, 速率法测定血磷、碱性磷酸酶。

1.2.3.3 骨组织形态学观察 取约1.5 cm长, 含股骨头的右侧股骨浸于10%中性福尔马林中固定, PBS液充分漂洗, 再经过10% EDTA、PBS(PH 7.4)4℃下脱钙3~4周, 隔天换液1次; 脱钙完成, 蒸馏水冲洗, 70%, 80%, 90%, 95%, 无水乙醇梯度脱水各4h; 二甲苯透明12h, 浸透液浸透, 石蜡包埋, 纵向连续切片, 厚4 μm。每个标本取一张切片进行HE染色, 作组织学检查。光镜下观察骨组织病理学改变, 用BI-2000医学图像分析系统进行骨组织形态学分析, 每个标本随机选取5个视野, 取其均值, 计量: 1) 骨小梁平均宽度; 2) 骨小梁面积百分率(%) = 骨小梁面积/总组织面积 × 100%。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析, 统计学处理数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 九里香叶对去卵巢大鼠体积骨密度的影响 与对照组比较, 模型组大鼠体积骨密度明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 戊酸雌二醇组、九里香叶高剂量组大鼠体积骨密度明显增高, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。见表1。

2.2 九里香叶对去卵巢大鼠血钙、血磷、碱性磷酸酶的影响 与对照组比较, 模型组大鼠血钙、碱性磷酸酶明显降低, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。与模型组比较, 九里香叶高剂量组大鼠血钙明显增高, 差

异有统计学意义, $P < 0.05$; 与模型组比较, 九里香叶低剂量组大鼠碱性磷酸酶明显降低, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。见表 2。

表 1 九里香叶对大鼠体积骨密度的影响

组别	例数	骨密度 (g/cm^3)
对照组	10	1.39 ± 0.07
模型组	10	$1.32 \pm 0.02^*$
戊酸雌二醇组	10	$1.38 \pm 0.05^\Delta$
九里香叶高剂量组	9	$1.36 \pm 0.03^\Delta$
九里香叶中剂量组	10	1.29 ± 0.06
九里香叶低剂量组	10	1.28 ± 0.09

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$, $^\Delta P < 0.01$, 与模型组比较 $^\Delta P < 0.05$

表 2 九里香叶对大鼠血钙、血磷、碱性磷酸酶的影响

组别	例数	血钙 (mmol/L)	血磷 (mmol/L)	碱性磷酸酶 (IU/L)
对照组	10	2.63 ± 0.05	2.04 ± 0.31	108.00 ± 24.82
模型组	10	$2.47 \pm 0.07^*$	2.18 ± 0.20	$154.20 \pm 64.50^*$
戊酸雌二醇组	10	2.46 ± 0.08	2.04 ± 0.26	126.50 ± 50.68
九里香叶高剂量组	9	$2.55 \pm 0.09^\Delta$	2.26 ± 0.12	158.33 ± 25.43
九里香叶中剂量组	10	2.48 ± 0.09	2.25 ± 0.23	136.90 ± 31.69
九里香叶低剂量组	10	2.45 ± 0.11	2.41 ± 0.15	$105.60 \pm 24.27^\Delta$

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$, $^\Delta P < 0.01$, 与模型组比较 $^\Delta P < 0.05$

2.3 九里香叶对去卵巢大鼠骨组织形态学的影响

2.3.1 光镜下观察骨小梁 对照组: 骨小梁密集、排列整齐、结构呈网状、连接紧密、骨髓腔较小; 模型组: 骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱、大部分不能连接成网状、骨髓腔明显扩大; 戊酸雌二醇组: 骨小梁排列紧密、连接成网状、骨髓腔较小; 九里香叶高剂量组: 骨小梁明显增粗、连接成网状; 九里香叶中剂量组: 骨小梁较粗、骨髓腔较小; 九里香叶低剂量组: 骨小梁较粗、有断裂、骨髓腔较小。见图 1 至图 6。

2.3.2 与对照组比较, 模型组骨小梁平均宽度及骨小梁面积百分率明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 九里香叶高剂量组骨小梁平均宽度及骨小梁面积百分率明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

植物性雌激素可模拟雌激素作用, 目前已成为国内外雌激素天然替代品研发的热点。曾发挥^[7]等学者证实九里香可能通过雌激素样作用发挥保护软骨作用。本研究切除大鼠双侧卵巢, 使雌激素水平降低, 诱发女性绝经后相似的骨量丢失和骨结构改变, 建立骨质疏松症的实验模型^[8-9]。探讨九里香叶预防骨质疏松作用。

体积骨密度是由骨量和骨大小双重因素决定的, 骨体积对骨密度的高低起着重要的作用, 体积骨密度更加符合骨力学强度变化的骨质疏松诊断指

标^[10]。实验结果表明, 大鼠去卵巢后, 体积骨密度明显降低, 九里香叶高剂量组明显提高大鼠体积骨密度, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明九里香叶高剂量给药可改善骨力学指标变化, 对骨质疏松有一定的防治作用。

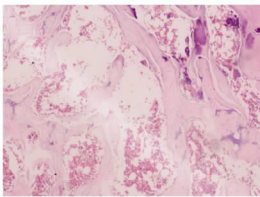


图 1 模型组 HE $\times 100$

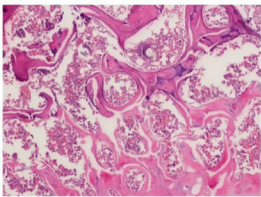


图 2 对照组 HE $\times 100$

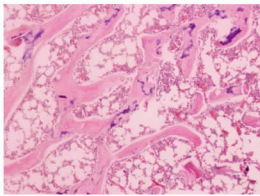


图 3 戊酸雌二醇组
HE $\times 100$

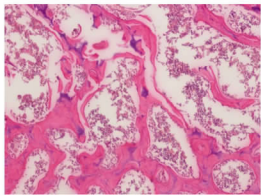


图 4 九里香叶高剂量组
HE $\times 100$

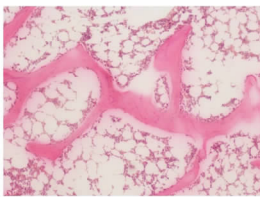


图 5 九里香叶中剂量组
HE $\times 100$

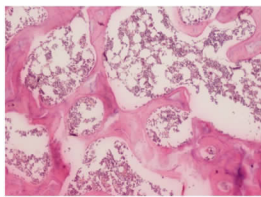


图 6 九里香叶低剂量组
HE $\times 100$

表 3 九里香叶对大鼠骨组织形态学的影响

组别	骨小梁平均宽度/ μm	骨小梁面积百分率/%
对照组	44.75 ± 1.90	21.54 ± 1.36
模型组	$41.02 \pm 1.08^\Delta$	$19.16 \pm 1.61^*$
戊酸雌二醇组	$42.68 \pm 1.09^\Delta$	$20.86 \pm 1.02^\Delta$
九里香叶高剂量组	$42.39 \pm 1.16^\Delta$	$20.90 \pm 1.01^\Delta$
九里香叶中剂量组	41.02 ± 1.40	19.13 ± 1.19
九里香叶低剂量组	40.66 ± 1.04	19.89 ± 0.82

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$, $^\Delta P < 0.01$, 与模型组比较 $^\Delta P < 0.05$

骨无机质主要含有钙(Ca)、磷(P)等矿盐, 是构成骨的硬度的主要成分, 血清中 Ca、P 的检测可间接反映骨矿物质变化情况。本研究中, 九里香叶高剂量组血清 Ca 含量较模型组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 钙是维持骨量的基本物质^[11], 提示九里香叶可影响骨矿代谢^[12]。P 含量各组之间比较差异均无统计学意义。血磷水平的稳定是骨生长和矿化的必要条件之一^[13]。本实验结果提示九里香叶对血磷水平无调节作用。碱性磷酸酶 (ALP) 主要存在于成骨细胞^[14], 骨代谢速率增加的代谢性骨病

血清 ALP 显著升高^[15]。本研究中,九里香叶中、低剂量组血清 ALP 含量较模型组显著降低,其中九里香叶低剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),提示九里香叶可影响骨代谢,没有剂量依赖性。其机制可能与九里香叶具有雌激素样活性,降低骨转换率,间接减少骨吸收有关。ALP 是反映成骨细胞的重要标志^[16],提示九里香叶可能也增加成骨细胞活性。

骨组织形态计量学可将二维图像展示的骨组织和细胞结构进行定量分析,为骨结构、骨形成及骨吸收提供客观数据^[17]。可用以分辨骨质疏松的程度和性质^[18]。本实验结果显示,去势后小鼠骨小梁平均宽度、骨小梁面积百分率有明显下降,九里香叶高剂量使去势后小鼠骨小梁平均宽度、骨小梁面积百分率均明显提高,说明骨的内部结构得到很好的恢复,对骨质疏松程度有明显的改善作用。

综上所述,九里香叶对去卵巢大鼠体积骨密度有改善作用、影响骨矿物质的代谢、对血液生化指标有一定的改善作用、可明显影响骨组织形态学,但不呈剂量相关性。表明九里香叶具有预防骨质疏松作用,但具体作用机制还需进一步探讨。

参考文献

- [1]郭培,柳航,朱怀军,等.九里香化学成分和药理作用的研究进展[J].现代药物与临床,2015,30(9):1172-1178.
- [2]李林福,肖海,胡海波,等.九里香叶中的化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(7):50-53.
- [3]单晶,王晓中,马彦冬,等.九里香叶黄酮类成分的研究(I)[J].中国药学杂志,2010,45(24):1910-1912.
- [4]黄锁义,阳文辉,李卫彬,等.超声波提取九里香总黄酮及其鉴别[J].时珍国医国药,2006,17(3):395-396.
- [5]刘冰语,章宸,吕海宁,等.HPLC 方法同时测定九里香中的三个

主要成分[J].Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2015,24(2):88-94.

- [6]曹伟国,刘志勤,邵云,等.黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [7]曾发挥,刘海清,李林福,等.九里香雌激素样作用及其对关节保护作用初步研究[J].安徽农业科学,2013,52(24):9948-9950.
- [8]陶若奇,张建东,顾九君,等.大豆异黄酮对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响[J].临床骨科杂志,2015,18(1):110-113.
- [9]解秀兰,孙晓丽,李丽娟,等.壮骨伸筋胶囊对去势大鼠骨密度及骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(14):121-124.
- [10]刘文军,廖进民,谭小云,等.椎体骨密度、体积骨密度与生物力学强度的比较[J].中国临床康复,2004,8(5):880-881.
- [11]李远栋,王平,王为民,等.荣筋片治疗肾虚血瘀型原发性骨质疏松症的临床疗效观察[J].世界中医药,2013,8(10):1162-1163.
- [12]龙梓,刘丹霞,廖华卫,等.健骨片对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢骨微结构及骨强度的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(9):163-168.
- [13]李烨,童杰,周衍晶,等.补肾壮骨中药抗骨质疏松有效成分及其药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(6):1038-1043.
- [14]刘万军.注射用鼠神经生长因子治疗骶骨骨折合并神经损伤的疗效观察[J].中国医药,2012,7(10):1275-1276.
- [15]张洋,杨少峰,卜淑敏.全身垂直振动对去卵巢骨质疏松大鼠血清和骨组织碱性磷酸酶水平的影响[J].中国运动医学杂志,2013,32(1):41-44.
- [16]刘庆利,权铁刚,唐广志,等.中药治疗对去卵巢大鼠骨质疏松动物模型血钙、血磷、碱性磷酸酶与骨密度的影响[J].中国老年学杂志,2008,28(15):1527-1528.
- [17]荣杰生,陶天遵,陶树清.N-脱硫酸肝素对 ICR 雌性小鼠骨形态计量学的影响[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(6):620-622.
- [18]Jimi E,Nakamura I,Amano H,et al.Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact[J].Endocrinology,1996,137(8):2187-2190.

(2016-09-01 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 2426 页)

- [14]杨莹.天然中药抗肿瘤机制的研究进展[J].医学综述,2010,16(3):363-365.
- [15]林晓兰,陈菲,连增林.活血益气方 KLW 对神经胶质瘤细胞抑制作用的实验研究[J].北京中医药,2011,30(5):396-397.
- [16]陈菲,林晓兰,连增林,等.MTT 法测定中药益气活血方 KLW₁对神经胶质瘤细胞 U87-MG 细胞增殖的抑制作用[J].北京中医药,2012,6(9):466-467.

- [17]张鹏,冯英楠,王海征,等.中药复方抗瘤丸治疗神经胶质瘤作用机制的实验研究[J].北京中医药,2017,36(2):135-1387.
- [18]《中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南》编写组.中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)[J].中华医学杂志,2016,96(7):485.
- [19]王卫东.Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-396.

(2016-06-13 收稿 责任编辑:张文婷)