

藏红花提取液对去卵巢大鼠骨密度及骨代谢生化指标的影响*

曹鹏冲¹ 雷伟^{1△} 高雁翎² 颀强¹ 程欢¹ 刘帅¹

(1 第四军医大学西京医院骨科研究所 陕西 西安 710032 2 西藏军区总医院脑外科 西藏 拉萨 850007)

摘要 目的:研究中药藏红花提取液对去卵巢大鼠股骨骨密度及血清骨代谢生化指标的影响。方法:选用48只4月龄SD雌性大鼠,随机分为6组:假手术组、模型组、戊酸雌二醇组、藏红花低、中、高剂量组。术后4周各组分别给予相应制剂灌胃,术后12周处死,分别测定股骨骨密度、子宫指数、雌二醇、血钙、血磷、碱性磷酸酶。结果:与模型组相比,藏红花各剂量组股骨骨密度明显升高($p<0.01$),雌二醇测定值升高($p<0.01$),碱性磷酸酶显著降低($p<0.01$),血钙及血磷无统计学差异($p>0.05$);与戊酸雌二醇组比较,藏红花各剂量组子宫指数显著降低($p<0.01$)。结论:藏红花提取液有助于抑制去卵巢大鼠骨量的丢失,改善骨代谢,对骨质疏松症具有防治作用。

关键词 藏红花;骨质疏松;骨密度;雌二醇;碱性磷酸酶

中图分类号 Q95-3 R68 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1009-04

Effects of Crocus Sativus Extract on Bone Mineral Density and Biochemistry Markers of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats*

CAO Peng-chong¹, LEI Wei^{1△}, GAO Yan-ling², JIE Qiang¹, CHENG Huan¹, LIU Shuai¹

(1 Orthopedics department of Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of cerebral surgery, General Hospital of Tibet Military district, Lhasa, 850007, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Crocus sativus extraction on bone mineral density (BMD) and biochemistry markers of bone metabolism in ovariectomized rats. **Methods:** Forty-eight female Sprague-dawley rats, four months old, were randomly divided into six groups: the sham-operating group (Sham), the ovariectomized group (OVX), estradiol valerate treated group (E2), low-dose of Crocus sativus treated group (L-Crocus), medium-dose of Crocus sativus treated group (M-Crocus) and high-dose of Crocus sativus treated group (H-Crocus). Four weeks after surgery, the rats of Sham group and OVX group were intra-gastric administrated with distilled water, while the rats of the E2 group received estradiol valerate (0.8mg/kg.d) and rats of other three groups received different dosage of Crocus sativus extract (25, 50, 100mg/kg.d) by gavage for 8 weeks. Then all the rats were executed and their right femoral bones and blood sera were collected. The BMD, index of uterus, serum estrogen levels and serum biochemical markers of bone metabolism were determined. **Results:** The BMD and serum estrogen levels in the rats of three Crocus sativus extract treated groups were significantly higher than that in OVX group ($p<0.01$), while the serum alkaline phosphatase (ALP) level in the former were obviously lower than that in the latter ($p<0.01$). Compared with the E2 group, the index of uterus decreased significantly in three Crocus sativus extract treated groups ($p<0.01$). **Conclusion:** Crocus sativus showed the potential effects on prevention of osteoporosis in ovariectomized rats by inhibiting the bone mineral loss and improving the bone metabolism.

Key words: Crocus sativus; Osteoporosis; BMD; Estrogen; Bone metabolism

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1009-04

前言

骨质疏松(Osteoporosis)是以骨量降低和骨组织显微结构破坏为特征,导致脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。其中,女性由于峰骨量较低及绝经后雌激素水平下降,发病率较男性为高,称绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis)。据统计,绝经后女性骨质疏松所致骨折的发病率随年龄的

增加呈几何级数递增^[2],与骨质疏松性骨折相关的死亡率已经超过乳腺癌、宫颈癌和子宫体癌死亡率的总和^[3]。且随着社会老龄化,人口寿命的延长,女性绝经后生存年限约占一生的1/3,因此绝经后骨质疏松症的预防和治疗已成为一个多学科的、当前研究最活跃的课题之一。

临床上骨质疏松症的诊断主要以骨密度(BMD)为依据,而反应骨转化状态,还需通过骨代谢生化指标来提供信息,如

* 基金项目:国家863基金项目“骨质疏松条件下提高脊柱内固定强度的整体解决方案”(2007AA02Z468)

作者简介:曹鹏冲(1982-)男,医师,硕士研究生,主要研究方向:骨质疏松的治疗,

E-mail: caopengchong@yahoo.cn.手机号码:15829644088

△通讯作者:雷伟,男,教授,主任医师,博士生导师 Email:leiwei@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-03 接受日期:2010-12-28)

血清碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)含量变化与骨钙素呈正相关,与骨矿含量呈负相关^[4],而雌激素水平也是绝经后骨质疏松病理生理过程中非常重要的指标。故本实验主要从骨密度、血清雌二醇及血清骨代谢生化指标几方面来研究并探讨藏红花提取液对去卵巢大鼠骨质疏松的影响,同时通过子宫指数的比较,来评价对生殖系统的影响,旨在开发新的治疗骨质疏松症的药物。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4月龄SPF级未交配Sprague-dawley (SD) 雌性大鼠48只,体重 270 ± 20 g(由第四军医大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(军)2007-007)。

1.2 实验药物

藏红花购自西藏拉萨市药材供应站。每次称取藏红花7.5g,加入1.5L蒸馏水中,煮沸15分钟后过滤两次,滤液继续煮沸浓缩至500ml装瓶,4℃冰箱冷藏;戊酸雌二醇片(补佳乐)由法国DELPHARM Little S.A.S.公司生产,拜耳医药保健有限公司广州分公司分装(国药准字J20080036),每次取戊酸雌二醇片3片(1mg/片),捣碎后放入20ml蒸馏水中,制成悬浊液;戊巴比妥钠由科昊生物工程有限责任公司生产(生产编号DH0602)。

1.3 建模方法及分组

将48只4月龄SD雌性大鼠随机分为6组:假手术组(Sham)、模型组即单纯去势组(OVX)、去势+戊酸雌二醇组(E2)、去势+藏红花低剂量组(L-Crocus)、去势+藏红花中剂量组(M-Crocus)、去势+藏红花高剂量组(H-Crocus),每组8只。将大鼠用2%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉后,采取俯卧位,备皮、消毒、铺单后,距肋后缘下1.5cm、后正中线旁1.5cm处取长约1cm双背侧纵行切口,依次切开皮肤、皮下组织,切开腹膜,进入腹腔,用平镊将卵巢牵出,在输卵管与子宫角交界处结扎,摘除卵巢,检查止血彻底,依次缝合关闭腹膜、皮肤。假手术组仅在暴露卵巢后,切除其周围约1cm³大小脂肪组织,不结扎输卵管,不切除卵巢,余手术操作同上。

1.4 动物给药与喂养

术后4周开始灌胃,共持续8周。其中Sham、OVX组以蒸馏水灌胃(9ml/kg.d),戊酸雌二醇按照人鼠体表面积比率折算剂量^[5]0.8mg/kg.d,藏红花低中高剂量组(L-Crocus、M-Crocus、H-Crocus)分别给予剂量为25mg/kg.d、50mg/kg.d、100mg/kg.d。实验大鼠按清洁级标准、分笼同环境饲养。饲料来源:全价颗粒饲料,由第四军医大学实验动物中心生产,合格证号:SCXK(军)2007-008。饲养条件:光照12h/天,温度23-26℃,相对湿度40-70%,大鼠笼养,自由摄食、饮水。每周称体重1次,并根据体重变化调整药量。

1.5 标本的获取

灌胃8周后,将大鼠用2%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉后,开胸、直视下左心室穿刺取血8ml,分离血清

(3000r/m,10minutes)放入冰箱-20℃冷冻保存,迅速剖腹、完整切除子宫,用电子天平称取湿重,计算出子宫指数:子宫湿重(g)/体重(kg),剖取右侧股骨,剔除周围软组织,用生理盐水纱布包裹,-20℃保存。

1.6 骨密度的测定

将骨标本于测定前12小时常温解冻,送至第四军医大学骨科研究所骨密度室,通过美国HOLOGIC公司双能X线吸收骨密度仪(DEXA)测量,扫描精度1%,ACF=1.037,BCF=1.024,扫描类型:Hi-Res,扫描模式:Discovery Wi(S/N 83860),应用小动物软件分析。

1.7 雌激素及骨代谢生化指标的测定

将血液标本送至第四军医大学西京医院检验科,测定以下指标:血清雌二醇(E2)、血钙(Ca)、血磷(P)、血清碱性磷酸酶(ALP)。

1.8 统计方法

统计采用社会科学统计软件包(Statistical Package for Social Science,SPSS 12.0)进行数据处理,组间多重比较采用单向方差分析(One-Way ANOVA),预先用Levene法进行方差齐性检验,方差齐性则采用最小显著差值法(Least-significant Difference, LSD)检验,方差不齐则采用Welch法。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨骨密度的比较

各组大鼠股骨骨密度情况如表1所示,与模型组比较,藏红花各剂量组股骨BMD值均有显著性提高($P < 0.01$),组间比较无统计学差异($P > 0.05$),未表现出剂量依赖效应。

表1 不同组别大鼠股骨BMD的变化(n=8)

Table1 The change of right femoral bone mineral density in different groups (n=8)

Groups	BMD(g/cm ²)
Sham	0.216±0.013*
OVX	0.166±0.006
E ₂	0.202±0.011*
L-Crocus	0.186±0.010*
M-Crocus	0.190±0.008*
H-Crocus	0.192±0.009*

注:与OVX组比较,* $P < 0.01$

Note: * $P < 0.01$ vs OVX group.

2.2 各组大鼠子宫指数及血清雌二醇的比较

大鼠子宫指数及血清雌二醇情况如表2所示,模型组大鼠子宫指数较假手术组明显减小($P < 0.01$),藏红花各剂量组子宫指数与戊酸雌二醇组比较明显减小($P < 0.01$),但与模型组比较无统计学差异($P > 0.05$),模型组大鼠血清雌二醇水平明显低于假手术组($P < 0.01$),藏红花各剂量组雌二醇水平高于模型组

($P<0.01$) ,低于假手术组和戊酸雌二醇组($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠血清骨代谢生化指标的比较

大鼠血清骨代谢生化指标情况如表 3 所示 ,与假手术组比较 ,其余各组血钙测定值降低($P<0.01$) ,但各组间比较无统计

学差异($P>0.05$) ;各组血磷测定值比较无统计学差异($P>0.05$) ;模型组碱性磷酸酶较假手术组明显增高($P<0.01$) ,与模型组比较 ,藏红花各剂量组及戊酸雌二醇组的碱性磷酸酶测定值显著降低($P<0.01$)。

表 2 不同组别大鼠子宫指数及血清雌二醇的变化($n=8$)

Table2 The change of Index of uterus and serum estrogen levels in different groups ($n=8$)

Groups	Index of uterus(g/Kg)	Estrogen(pg/ml)
Sham	4.02± 0.225	7.83± 0.750
OVX	1.32± 0.202**	4.06± 0.440
E ₂	2.38± 0.264	7.08± 0.872
L-Crocus	1.20± 0.200*	5.70± 0.483***
M-Crocus	1.36± 0.169*	6.01± 0.793***
H-Crocus	1.23± 0.141*	5.87± 0.965***

注 :与 Sham 组比较 ,# $P<0.01$,** $P<0.01$,与 E₂ 组比较 ,* $P<0.01$,## $P<0.01$

Note: # $P<0.01$,** $P<0.01$ vs Sham group; * $P<0.01$,## $P<0.01$ vs E₂ group

表 3 不同组别大鼠骨代谢生化指标的变化($n=8$)

Table3 The change of biochemistry markers of bone metabolism in different groups ($n=8$)

Groups	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	ALP(pg/ml)
Sham	2.66± 0.110	2.48± 0.189	78± 12 **
OVX	2.36± 0.164*	2.34± 0.207#	144± 21
E ₂	2.45± 0.115*	2.32± 0.192#	107± 16**
L-Crocus	2.44± 0.131*	2.49± 0.375#	113± 17**
M-Crocus	2.48± 0.117*	2.35± 0.223#	114± 15**
H-Crocus	2.40± 0.157*	2.30± 0.200#	117± 18**

注 :与 Sham 组比较 ,* $P<0.05$,# $P>0.05$;与 OVX 组比较 ,** $P<0.01$

Note: * $P<0.05$,# $P>0.05$ vs Sham group; ** $P<0.01$ vs OVX group

3 讨论

绝经后骨质疏松病因复杂 ,目前多数学者认为 ,绝经后雌激素缺乏、骨转换加快、骨吸收大于骨形成是其主要病因。大量动物实验、临床研究以及流行病学调查证实 ,雌激素能防治绝经后骨矿进行性丢失 ,减少骨质疏松性骨折的发生率^[6] ,但长期单独使用雌激素治疗可增加罹患乳腺癌和子宫内膜癌等生殖系统肿瘤的风险^[7,8] ,致使雌激素的临床应用受到一定的限制。其他药物 ,如钙剂、氟化物、降钙素、甲状旁腺素、双磷酸盐类等 ,均属替代治疗 ,成本高 ,毒副作用大 ,依从性差 ,远期疗效欠佳 ,难以取得持久的满意的疗效。因此开发新的安全有效的药物成为当务之急。

中药藏红花(Crocus Sativus)是鸢尾科番红花属球根类多年生草本植物 ,自古就有 " 妇科良药 " 之美誉 ,在欧洲和亚洲应用广泛。现代药理学研究认为藏红花主要成分有藏红花酸(crocin)、藏红花素(crocin)约 1.5% (系藏红花酸与二分子龙胆二糖结合而成的酯)、藏红花酸二甲酯(dimetylcrocin)、藏红花

苦素(picrocrocic)、挥发油为 0.4% ~ 1.3% (主要成分为藏红花醛 safranal ,是藏红花苦素的分解产物) ,此外还含有桉脑、蒎烯、多种维生素、核黄素和硫胺素等化合物。

从本实验结果来看 ,藏红花提取液有助于提高去卵巢大鼠的骨密度及血清雌二醇含量 ,降低血清碱性磷酸酶水平 ,而未引起子宫显著增生。推测其作用机制可能包含以下几点 :1、类雌激素作用 ,或调节内分泌作用 ,但研究藏红花的文献尚未见此报道 ;2、抗氧化途径 :藏红花及其提取液可以显著的降低脂质过氧化反应 ,增强谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase ,GSH-Px)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase ,SOD)的活力^[9] ,而另有研究表明 ,活性氧簇(reactive oxygen species ,ROS)与骨质疏松的发生关系密切^[10] ,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine ,NAC)能促进原代培养的小鼠头盖骨成骨细胞分化^[11] ,抗氧化剂维生素 C 及维生素 E 可提高骨密度^[12] ;3、降血脂途径 :藏红花酸可以降低血清中总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白水平^[13] ,大量流行病学调查提示 ,骨密度的差异与血脂水平有关 ,绝经后妇女胆固醇水平越高 ,其脊柱骨密

度越低^[14],他汀类降血脂药物已被证实有增加骨密度的作用^[15]。

4、抗血凝途径:藏红花在中药中素以“活血化瘀”而著称,现代实验研究发现,藏红花能抑制血小板聚集,增加纤维蛋白酶活性,降低血粘度^[16],有助于改善微循环,增加骨营养,但本实验结果并不支持藏红花有明显的调节钙磷代谢的功能。

藏红花对骨质疏松的作用如何,目前国内外未见文献报道,且藏红花成分复杂,获得单体的技术要求及成本很高,因实验条件所限,本实验仅初步探讨了藏红花提取液对骨质疏松的作用,为藏红花应用于骨质疏松的治疗提供了一定的实验依据,但藏红花的具体有效成分和作用机制还需要大量的实验来研究和验证。

参考文献 (References)

- [1] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. (第7版), 北京: 人民卫生出版社, 2008: 835
Lu Zai-ying, Zhong Nan-shan. Internal Medicine [M]. (7th Edition), Peking: People's Medical Publishing House, 2008: 835
- [2] Li NH, Pin Z, Zhu HM, et al. Prevalence rate of osteoporosis in the mid-aged and elderly in selected parts of China [J]. Chin Med J, 2002, 115: 773-775
- [3] Andersson GB, Bostrom MP, Eyre DR, et al. Consensus summary on the diagnosis and treatment of osteoporosis [J]. Spine, 1997, 22(24S): 63-65
- [4] Lee YH, Rho YH, Choi SI, et al. Predictors of bone mineral density and osteoporosis in patients attending a rheumatology outpatient clinic[J]. Rheumatol Int, 2002, 23: 67-69
- [5] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 143-144
Miao Ming-san. Experimental animal and technology of animal studies[M]. Peking: Traditional Chinese Medicine Press, 1997: 143-144
- [6] O'Connell D, Robertson J, Henry D, et al. A systemic review of the skeletal effects of estrogen therapy in postmenopausal women[J]. Climacteric, 1998, 1 (2): 112-123
- [7] Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, et al. Menopausal hormone replacement therapy and the risk of ovarian cancer [J]. JAMA, 2002, 288 (3): 334-341
- [8] Li CI, Malone KE, Porter PL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer[J]. JAMA, 2003, 289 (24): 3254-3263
- [9] Shen XC, Qian ZY. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats [J]. Pharmazie, 2006, 61: 348-352
- [10] Mody N, Parhami F, Sarafian TA, et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells[J]. Free Radical Biomed, 2001, 31: 509-519
- [11] Jun JH, Lee SH, Kwak HB, et al. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells [J]. J Cell Biochem, 2008, 103: 1246-1255
- [12] Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16: 135-140
- [13] He SY, Qian ZY, Wen Z, et al. Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic diet quails[J]. Eur Pharmacol, 2007, 554(2-3): 191-195
- [14] Makovey J, Chen JS, Hayward C, et al. Association between serum cholesterol and bone mineral density[J]. Bone, 2009, 44: 208-213
- [15] Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women [J]. Lancet, 2000, 355: 2218-2219
- [16] 陈琼, 顾仁樾, 周端. 藏红花对冠心病心绞痛患者血流变学的作用 [J]. 辽宁中医杂志, 1997, 24 (8): 372
Chen Qiong, Gu Renyue, Zhou Duan. Effects of crocus sativus on blood rheology of coronary artery disease [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 1997, 24(8): 372