

壮骨止痛方抗骨质疏松症组方合理性实验研究

杨岩冰¹, 曾 英^{1*}, 李劲平^{2*}, 雷晓明¹, 王文杰¹, 杨 琳¹, 刘 珊¹, 莫新民¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察壮骨止痛胶囊拆方组治疗去卵巢骨质疏松型大鼠的作用特点, 探讨其组方的合理性。方法 SD 雌性大鼠, 分为假手术组、模型组、壮骨止痛胶囊组、补阴组、补阳组、活血组, 处理 13 周后检测各组大鼠 L₂~L₄ 腰椎, 右侧股骨骨密度, 检测胫骨生物力学变化及血清 E₂ 水平。将 60 只小鼠随机分为正常组、模型组、壮骨止痛胶囊组、补阴组、补阳组、活血组。连续给药 10 天后, 正常组小鼠腹腔注射生理盐水(0.0002L/10g), 其它各组小鼠腹腔注射致痛剂(0.6% 醋酸溶液 0.0002L/10g), 记录疼痛潜伏期(开始扭体的时间)和 15min 内扭体次数。结果 与模型组比较, 壮骨止痛胶囊组、补阴组、补阳组均能改善腰椎及股骨骨密度, 具有显著或非常显著统计学意义(P<0.05 或 P<0.01); 与模型组比较, 壮骨止痛胶囊组及各拆方组均能提高胫骨的最大抗弯强度与最大弹性应力, 改善骨生物力学性能, 具有显著或非常显著统计学意义(P<0.05 或 P<0.01); 与模型组比较, 壮骨止痛胶囊组、补阴组、补阳组均能提高血清中 E₂ 的浓度, 具有非常显著统计学意义(P<0.01); 与模型组小鼠比较, 壮骨止痛胶囊组能显著延长小鼠疼痛潜伏期和降低扭体次数(P<0.05), 方中活血组能显著延长小鼠疼痛潜伏期和降低扭体次数(P<0.05)。结论 壮骨止痛胶囊拆方组各组均有改善去卵巢骨质疏松型大鼠骨生物力学特性的功效, 补阳组及补阴组可增加去卵巢骨质疏松型大鼠骨密度及提高血清中 E₂ 浓度的作用, 补阳组功效优于补阴组。活血组药物对于醋酸扭体疼痛小鼠具有非常显著镇痛作用, 三组药物共奏补益肝肾、壮骨止痛的功效。

关键词: 壮骨止痛方; 骨质疏松症; 组方合理性

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.02.003

中图分类号: R289.5; R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)02-0264-02

壮骨止痛方是治疗骨质疏松症的国家中药六类新药(国药证字[Z20050125])。全方由淫羊藿、补骨脂、枸杞子、女贞子、狗脊、骨碎补、川牛膝等 7 味中药组成, 具有益肾活血、壮骨止痛作用, 对绝经后骨质疏松症具良好防治作用。前期研究已初步阐明壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的有效成分及有效部位^[1-7], 但并未从方剂配伍角度阐明其组成药物治疗绝经后骨质疏松症的作用。骨生物力学和骨密度是评价药物防治骨质疏松的重要指标, 而止痛作用是壮骨止痛方改善骨质疏松病人生活质量的重要内容。本研究将壮骨止痛方分为补肾阳、益肾阴和活血化瘀三个部分, 从骨生物力学、骨密度、血清雌激素水平及止痛作用等方面探讨其组方的合理性。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 72 只(动物质量合格证号 NO.43004700005517), 体重(250±20)g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。场地: 湖南中医药大学动物实验中心[场地许可证号: SCXK(湘)2013-0004]。ICR SPF 级小鼠 60 只[动物质量合格 SCXK(湘)2009-0012], 体重(20±2)g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。实验场地: 中南大学湘雅三医院动物实验中心[场地许可证号: SYXK(湘)2010-0001]。

1.2 药品及试剂 壮骨止痛胶囊(四川美大康药业), 补阴组(女

贞子、枸杞子), 补阳组(淫羊藿、补骨脂), 活血组(骨碎补、川牛膝、狗脊) 药物均由中南大学药学院提供。E₂ 检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司), 水合氯醛(批号: 29130426, 国药集团化学试剂有限公司), 无水乙醇[批号: (津)XK13-011-00013, 天津市恒兴化学试剂有限公司]。

1.3 实验仪器 超低温冰箱, 意大利 LACN 双能 X 线骨密度仪(湖南中医药大学第一附属医院骨密度室提供), JY3002 型电子天平, MITS 万能试验机(中南大学力学实验中心提供), A⁺ 台式离心机(湖南中医药大学中学院提供), 游标卡尺。

2 方法

2.1 抗骨质疏松实验 采用国内外公认的雌性大鼠去卵巢 3 个月造成绝经后骨质疏松症病理模型^[8]。72 只雌性 SD 大鼠, 适应性饲养 1 周, 除 12 只假手术组大鼠摘取双侧卵巢附近等量脂肪外, 其它大鼠摘取双侧卵巢组织。术后连续 3 天大腿肌肉注射青霉素钠(每只大鼠 4 万单位/天), 5 天后拆线, 随机分 6 组: 假手术组、模型组、壮骨止痛胶囊组(生药 6.6g/kg)、补阴组(生药 6.6g/kg)、补阳组(生药 3.7g/kg)、活血组(生药 2.9g/kg), 每组 12 只。手术一周后开始灌胃给药, 灌胃体积为 0.001L/100g, 模型组与假手术组灌胃 0.001L/100g 体积的蒸馏水, 其它各组给予相应药物。连续灌胃 13 周之后所有大鼠腹腔注射 2% 水合氯醛(0.00035L/100g)麻醉, 经腹主动脉采血, 离心(500g)分离出血清, 用 ELISA 试剂盒检测外周血 E₂ 水平。取 SD 大鼠的右后肢股骨, 第 2~4 腰椎测量骨密度。取 SD 大鼠右后肢胫骨, 采用经典三点弯方法, 中间用力, 跨距 16.5mm, 加载速度 5mm/min, 检测 SD 大鼠胫骨最大弹性应力、最大抗弯强度。

2.2 止痛实验 将 60 只小鼠按体重随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。随机分 6 组: 正常组、模型组、壮骨止痛胶囊组(生药 10.6g/kg)、补阴组(生药 6.6g/kg)、补阳组(生药 5.9g/kg)、活血组(生药 4.6g/kg), 每组 10 只。正常组和模型组小鼠灌胃蒸馏水, 其它各组灌胃相应药物, 连续给药 10 天。第 10 天灌胃 1h

收稿日期: 2015-05-14; 修订日期: 2015-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(No.81273816)

作者简介: 杨岩冰(1987-), 男(汉族), 河南洛阳人, 湖南中医药大学在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事骨与关节疾病研究工作。

* 通讯作者简介: 曾 英(1973-), 女(汉族), 湖南长沙人, 湖南中医药大学第一附属医院副主任医师, 博士学位, 主要从事中医药防治老年心血管病工作。

* 通讯作者简介: 李劲平(1969-), 男(汉族), 湖南益阳人, 湖南大学药学院副教授, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事中医药防治老年病工作。

后,正常组小鼠腹腔注射生理盐水(0.0002L/10g),其它各组小鼠腹腔注射致痛剂(0.6%醋酸溶液,0.0002L/10g),记录疼痛潜伏期(开始扭体的时间)和15min内扭体次数。

2.3 统计方法 采用SPSS17.0统计软件,多组计量资料先进行方差齐性检验,如方差齐,则采用方差分析,两两比较采用 q 检验,如果方差不齐,则采用秩和检验。

3 结果

3.1 对去卵巢骨质疏松模型雌鼠腰椎及股骨骨密度的影响与假手术组比较,模型组大鼠的腰椎与股骨骨密度非常显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,壮骨止痛方改善腰椎与股骨骨密度作用非常显著($P < 0.01$)。壮骨止痛方中的补阳药组非常显著改善腰椎与股骨骨密度($P < 0.01$)。其中补阴药组能显著改善腰椎与股骨骨密度($P < 0.05$)。而方中活血药组对于腰椎及股骨骨密度的改善作用无统计学差异($P > 0.05$)。

表1 壮骨止痛方及其拆方组对去卵巢骨质疏松模型雌鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s$) g/cm^2

组别	L ₂ ~ L ₄ 腰椎骨密度	股骨骨密度
假手术组	0.4033 ± 0.0710 ^a	0.3464 ± 0.0149 ^a
模型组	0.3245 ± 0.0272	0.3155 ± 0.0089
壮骨止痛方组	0.3786 ± 0.0253 ^a	0.3566 ± 0.0244 ^a
活血组	0.3371 ± 0.0291	0.3235 ± 0.0095
补阴组	0.3542 ± 0.0261 ^b	0.3322 ± 0.0110 ^b
补阳组	0.3626 ± 0.0311 ^a	0.3361 ± 0.0146 ^a

与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$; $n = 8$

3.2 对去卵巢骨质疏松模型雌鼠右后肢胫骨生物力学的影响与假手术组比较,模型组大鼠的胫骨最大抗弯强度和最大弹性应力非常显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,壮骨止痛方非常显著增强骨质疏松大鼠胫骨最大抗弯强度和最大弹性应力($P < 0.01$)。壮骨止痛方中的补阳药组非常显著改善骨质疏松大鼠胫骨最大抗弯强度和最大弹性应力($P < 0.01$)。其中补阴药组能显著改善骨质疏松大鼠胫骨的骨生物力学($P < 0.05$)。而方中活血药组能显著改善骨质疏松大鼠胫骨最大弹性应力($P < 0.05$)。而对胫骨最大抗弯强度的改善无统计学差异($P > 0.05$)。

表2 壮骨止痛方及其拆方组对去卵巢骨质疏松模型雌鼠骨生物力学的影响($\bar{x} \pm s$) MPa

组别	胫骨最大抗弯强度	胫骨最大弹性应力
假手术组	303.2088 ± 15.4633 ^a	271.6625 ± 17.7906 ^a
模型组	271.3912 ± 12.6491	225.1462 ± 11.9462
壮骨止痛方组	313.2587 ± 15.3651 ^a	286.2787 ± 15.3079 ^a
活血组	279.1650 ± 15.4663	238.8038 ± 13.6664 ^b
补阴组	287.81 ± 17.6399 ^b	257.0213 ± 15.5512 ^b
补阳组	297.045 ± 1.3868 ^a	262.87 ± 14.4352 ^a

与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$; $n = 8$

3.3 对去卵巢骨质疏松模型雌鼠血清E₂水平的影响与假手术组比较,模型组大鼠的血清E₂水平降低非常显著($P < 0.01$)。与模型组比较,壮骨止痛方能非常显著提高骨质疏松模型雌鼠血清E₂水平($P < 0.01$)。壮骨止痛方中的补阳药组和补阴药组非常显著改善提高骨质疏松模型雌鼠血清E₂水平($P < 0.01$)。而方中活血药组虽然能小幅度提高骨质疏松模型雌鼠血清E₂水平,但是该提高作用无统计学差异($P > 0.05$)。

3.4 对醋酸扭体疼痛模型小鼠的影响 假手术组小鼠腹腔注射

生理盐水后没有出现扭体反应。模型组小鼠腹腔注射醋酸后出现明显扭体反应。与模型组小鼠比较,壮骨止痛方能显著延长小鼠腹腔注射醋酸后的疼痛潜伏期和降低扭体次数($P < 0.05$)。壮骨止痛方中的补阳药组和补阴药组小鼠的疼痛潜伏期和扭体次数与模型组相当。方中活血药组能显著延长小鼠腹腔注射醋酸后的疼痛潜伏期和降低扭体次数($P < 0.05$)。其止痛作用与壮骨止痛方全方相当。

表3 壮骨止痛方及其拆方组对去卵巢骨质疏松模型雌鼠血清E₂含量的影响($\bar{x} \pm s$) $ng \cdot L^{-1}$

组别	血清E ₂ 含量
假手术组	7.7832 ± 3.0302 ^a
模型组	5.4942 ± 1.0390
壮骨止痛方组	7.4965 ± 1.7268 ^a
活血组	6.1126 ± 0.9476
补阴组	6.7861 ± 0.9202 ^a
补阳组	7.2436 ± 1.3610 ^a

与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$; $n = 8$

表4 壮骨止痛方及其拆方组对醋酸扭体疼痛模型小鼠的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	疼痛潜伏期	15min
	/min	内扭体次数
正常组	-	-
模型组	4.7 ± 1.5	21.9 ± 4.2
壮骨止痛方组	7.1 ± 1.7 ^b	15.3 ± 4.1 ^b
活血组	6.8 ± 1.6 ^b	15.8 ± 4.8 ^b
补阴组	5.2 ± 1.6	19.2 ± 5.4
补阳组	5.1 ± 1.4	19.5 ± 5.2

与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$; $n = 10$

4 讨论

壮骨止痛方由补骨脂、淫羊藿、枸杞子、女贞子、骨碎补、狗脊和川牛膝等7味药物组成。方中补骨脂、淫羊藿两药配伍着重补肾气、温肾阳,遵循虚则补之的治疗原则。枸杞子与女贞子皆归肝肾二经,两药相伍可补肝肾之阴精,方中与补阳组药物配伍以冀阴中求阳,阴阳互生。活血组骨碎补、狗脊和川牛膝三味中药于补益的同时标本兼顾,补而不滞,通而不伤其正。三组药物配伍具有补益肝肾、壮骨止痛的功效。

壮骨止痛方补阳组药物与补阴组药物可非常显著或显著改善去卵巢骨质疏松型大鼠骨生物力学特性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。非常显著增加骨密度以及非常显著提高血清中E₂水平($P < 0.01$)。非常显著或显著增加去卵巢骨质疏松型雌鼠腰椎及股骨骨密度($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。活血组有提高去卵巢骨质疏松型雌鼠血清中E₂水平及增加骨密度的趋势,与模型组大鼠相比无统计学差异($P > 0.05$)。但是可显著改善骨生物力学的特性($P < 0.05$)。从上述抗骨质疏松作用来看,补阳药和补阴药是壮骨止痛方抗骨质疏松作用的主要药物,活血药在壮骨止痛方抗骨质疏松作用中起从属作用。

活血组药物对于醋酸扭体疼痛小鼠具有非常显著镇痛作用($P < 0.05$)。补阳组药物和补阴组药物没有显示镇痛作用。说明从镇痛作用的角度来看,活血药物是壮骨止痛方止痛作用的重要药物。80%以上的骨质疏松患者伴有疼痛症状,严重影响骨质疏松患者的生活质量^[9]。因此,对于药物的抗骨质疏松作用评价除了骨密度与骨生物力学指标外,尚需评价其镇痛作用。

补阳药、补阴药和活血药在壮骨止痛方防治骨质疏松作用中发挥了不同的作用,补阳药和补阴药主要改善骨密度和骨生物学,而活血药物主要发挥镇痛作用,三类药物共奏补益肝肾、壮骨止痛的功效。该研究也揭示在进行中药复方组方规律研究时,要综合考虑中药复方的作用特点设计有关实验,否则会得到不全面的研究结论。

参考文献:

- [1] 甘国兴,莫新民,李劲平. 壮骨止痛方无水乙醇提取 A 部位对去势雌鼠骨质疏松的疗效及机制研究[J]. 中国实验方剂杂志, 2011, 17(17):147.
- [2] 甘国兴,莫新民,李劲平. 壮骨止痛方石油醚提取 A 部位对去势雌鼠骨质疏松症的疗效及机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(12):1169.
- [3] 范娟娟,莫新民,张国民. 壮骨止痛方提取物对去势骨质疏松模型

- 大鼠血清 PTH、CT 的影响[J]. 中华中医学杂志, 2011, 29(5):1016.
- [4] 范娟娟,莫新民,张国民. 壮骨止痛方提取物对去势骨质疏松症雌鼠血清雌激素、BGP 水平的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(2):166.
- [5] 张国民,黄娟,宁炯杰,等. 壮骨止痛方全方提取物对趋势雌鼠骨保护素的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1):117.
- [6] 张小君,莫新民,刘仕杰,等. 壮骨止痛方 II 号对卵巢大鼠骨密度及血清 E₂ 的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(3):84.
- [7] 张国民,谢静凌,刘慧敏,等. 壮骨止痛方提取物对去势雌鼠骨密度和骨生物学影响[J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(3):17.
- [8] 魏玉芳,王长海,刘针林,等. 补肾法对大鼠绝经后骨质疏松模型的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6):544.
- [9] National Institutes of Health. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy[J]. JAMA, 2001, 283(6):785.

三维荧光二阶校正法测定中药陈皮中辛弗林含量

赵佳佳,刘德龙*,魏永巨

(河北师范大学化学与材料科学学院,河北 石家庄 050024)

摘要: 采用三维荧光光谱技术结合交替三线性分解(ATLD)算法,直接快速测定了中药陈皮中辛弗林的含量。利用该方法的“二阶优势”在陈皮中未知干扰存在下,有效地分辨出辛弗林的激发光谱图和发射光谱图。标准曲线法和二阶标准加入法得到陈皮中辛弗林的含量分别为 0.3741% 和 0.3614%,平均回收率为 95.1%。采用高效液相色谱法对该方法进行了验证,测得辛弗林的含量为 0.3829%,两种方法测得的结果较一致。

关键词: 交替三线性分解算法; 三维荧光; 辛弗林; 高效液相色谱法

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.02.004

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)02-0266-03

Determination of Synephrine in Citrus Using Excitation – Emission Matrix Fluorescence Coupled with Alternating Trilinear Decomposition Method

ZHAO Jia-jia, LIU De-long*, WEI Yong-ju

(Hebei Normal University, College of Chemistry and Materials Science, Shijiazhuang Hebei, 050024, China)

Abstract: A simple and rapid method for direct determination of Synephrine in Citrus by using excitation – emission matrix (EEM) fluorescence coupled with second – order calibration method based on alternating trilinear decomposition (ATLD) algorithm. Owing to the second – order advantage achieved by the proposed method, the method can effectively distinguish excitation spectra and emission spectra of synephrine even in the presence of other uncalibrated interferents. The obtained results showed that the content of Synephrine by standard curve and second – order standard addition method were 0.3741% and 0.3614%, respectively. The average recovery was 95.1%. Besides, the method was also validated by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector, the content of Synephrine was 0.3829%. The results obtained by the two methods were consistent.

Key words: Alternating trilinear decomposition method; Excitation – emission matrix fluorescence; Synephrine; HPLC

陈皮(即橘皮)为芸香科植物橘及其栽培变种的成熟果皮^[1]。陈皮主要含有橙皮苷、辛弗林等成分。其中辛弗林具有

抗氧化、抑菌、收缩血管、升高血压的药理作用^[2],广泛应用于医药、食品行业。文献报道的测定辛弗林含量的方法有高效液相色谱法(HPLC)、薄层扫描法(TLC)、毛细管电泳法(CE)、反相高效液相色谱法(RP-HPLC)等^[3]。研究表明辛弗林具有较强的荧光性质^[4],目前还未见用三维荧光光谱技术结合化学计量学二阶校正方法来测定陈皮中辛弗林含量的文献报道。该方法以“数学分离”代替“化学或物理分离”,解决了复杂体系中未知干扰物与分析物光谱重叠所引起的难分辨问题,实现了陈皮中辛弗林含量的直接快速定量测定,同时采用高效液相色谱法对该方法进行了验证。

收稿日期: 2015-06-26; 修订日期: 2015-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81173496; No. 20975029)

作者简介: 赵佳佳(1989-),女(汉族),河北邯郸人,河北师范大学化学与材料科学学院在读硕士研究生,主要从事药物与生物分析化学研究工作。

* 通讯作者简介: 刘德龙(1964-),男(汉族),河北廊坊人,河北师范大学化学与材料科学学院教授,博士学位,主要从事药物与生物分析化学研究工作。