

# 游离大黄蒽醌对骨质疏松模型大鼠骨密度和骨矿含量的影响<sup>Δ</sup>

邓亦峰\*, 陈 艳, 许碧莲, 刘钰瑜, 廖进民(广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

中图分类号 R285;R587 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3670-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.07

**摘要** 目的:研究游离大黄蒽醌类化合物对骨质疏松模型大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)的影响。方法:灌胃醋酸泼尼松(3.5 mg/kg),每日1次,以复制大鼠骨质疏松模型。4月龄126只雌性SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、游离大黄蒽醌(70 mg/kg)组,每组再分1、3、5、7、9、11、13周7个时间点。上午灌胃游离大黄蒽醌,下午灌胃醋酸泼尼松。在相应时间点,大鼠麻醉后心脏抽血至尽处死,采集四肢骨,以pQCT骨密度仪分别扫描大鼠股骨全骨和股骨远端(2 mm),测定BMD和BMC。结果:与正常对照组比较,复制模型1周后,模型组大鼠股骨远端BMD显著减小;复制模型3周后,模型组大鼠股骨全骨BMD显著减小;复制模型5周后,模型组大鼠股骨远端BMC显著减少( $P<0.05$ )。与模型组比较,在7个时间点上游离大黄蒽醌组大鼠股骨全骨和股骨远端的BMD显著增加( $P<0.05$ )。结论:游离大黄蒽醌可预防醋酸泼尼松所致的股骨BMD的丢失,未观察到大鼠股骨BMC随时间出现显著蓄积的现象。

**关键词** 游离大黄蒽醌;糖皮质激素;骨质疏松;骨密度;骨矿含量;大鼠

## Effects of Free Anthraquinone on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content of Osteoporosis Model Rats

DENG Yi-feng, CHEN Yan, XU Bi-lian, LIU Yu-yu, LIAO Jin-min (Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of free anthraquinone compounds on bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) in osteoporosis model rats. METHODS: Osteoporosis model was induced by intragastrical administration of prednisone acetate (3.5 mg/kg) once a day. 126 female SD rats aged 4 months were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and free anthraquinone group (70 mg/kg). Each group was further subdivided into 7 subgroups according administration period of 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 weeks. They were given relevant medicine intragastrically in the morning and prednisone acetate intragastrically in the afternoon. At corresponding time points, the heart blood of rats was exhausted after anaesthesia and those rats were sacrificed, and bones of limbs were collected. The left femur bone (all) and femur distal part (2 mm) were scanned by peripheral quantitative computed tomography (pQCT) respectively to determine BMD and BMC. RESULTS: Compared with normal control group, the BMD was significantly decreased in model group at femur distal part 1 week after duplicating model. The BMD was significantly decreased in model group at femur bone (all) 3 week after duplicating model. The BMC were significantly decreased in model group at femur distal part 5 week after duplicating model. Compared with model group, the BMD were significantly increased in free anthraquinone group both at femur bone (all) and femur distal part at 7 time points ( $P<0.05$ ); the BMD of femur bone (all) were increased gradually at 1-7 time points. CONCLUSIONS: Free rhubarb anthraquinone can prevent the prednisone-induced bone loss, but there is no BMC accumulation in the femur bone of rats as time.

**KEY WORDS** Free anthraquinone; Glucocorticoid; Osteoporosis; Bone mineral density; Bone mineral content; Rat

大黄蒽醌指蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)的干燥根茎中含有的羟基蒽醌类化合物,包括大黄素(Emodin)、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸等。大黄蒽醌类化合物的母核与四环素结构具有相似性,具有与骨组织中羟磷灰石结合的结构条件<sup>[1]</sup>。羟磷灰石体外吸附试验证实这类化合物具有类似四环素的趋骨性,在体内有可能具有骨靶向或趋骨性<sup>[2]</sup>。本实验室的前期研究表明,大黄素有促进成骨细胞分化的作用<sup>[3]</sup>,大黄素和低剂量己烯雌酚联合应用可预防去卵巢

大鼠骨质疏松<sup>[4]</sup>。已有报道证明,大黄素具有雌激素样作用和抑制破骨细胞的作用<sup>[5]</sup>。由此,大黄蒽醌类化合物潜在的骨靶向-抗骨质疏松药物前景及其在骨组织中的蓄积作用引人关注。目前尚未检索到游离天然大黄蒽醌类化合物在体内的抗骨质疏松活性及其在骨组织中蓄积的研究报道。本研究提取药用大黄中的蒽醌类化合物并将之转化为游离态蒽醌(Free anthraquinones, F-AQ),采用游离大黄蒽醌给药(以避免大黄蒽醌的泻下作用),以骨密度(BMD)为药效学指标,观察股骨全骨和股骨远端在不同给药周期里游离大黄蒽醌对糖皮质激素泼尼松(Pred)所致大鼠骨质疏松的保护作用;同时以骨矿化度为指标,观察股骨全骨和股骨远端骨矿含量(BMC)随游离大

<sup>Δ</sup> 基金项目:东莞市科技计划资助项目(No.DK200911)

\* 高级工程师,硕士研究生导师。研究方向:天然药物研发。电话:0759-2388405。E-mail:dengyfgd@163.com

黄萸醌给药周期的蓄积作用,为天然大黄萸醌的体内骨靶向-抗骨质疏松作用的研究提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

XCT-Research SA+型pQCT骨密度仪(德国Stratec公司); LCMS-8000α型高效液相色谱(HPLC)-质谱(MS)联用仪(日本岛津公司)。

### 1.2 中药饮片

大黄饮片购自亳州市京皖中药饮片厂(批号:100101)。

### 1.3 试剂

大黄素、1,8-二羟基萸醌、大黄酚、芦荟大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110756-200110、0829-9908、110796-200513、0795-9803);醋酸泼尼松(浙江仙璐制药股份有限公司,批号:1007025,规格:5 mg);实验所用试剂均为分析纯。

### 1.4 动物

清洁级4月龄SD大鼠126只,♀,体质量(280±30)g,由广东省医学实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(粤)2008-0002]。

## 2 方法

### 2.1 游离大黄萸醌提取物的制备

参考文献<sup>[6]</sup>方法,采用乙醇提取药用大黄饮片中的萸醌类化合物,减压浓缩,制得提取物浸膏;浸膏经酸水解转化为游离态萸醌;水解产物用氯仿萃取,氯仿层再以碱水反萃取;碱水层经酸化、沉淀、滤过,得游离大黄萸醌提取物。

### 2.2 游离大黄萸醌提取物的HPLC-MS分析

2.2.1 HPLC条件 色谱柱:Dikma C<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm,5 μm);流动相:1%醋酸水溶液-甲醇(25:75, V/V);柱温:35 ℃;流速:0.2 ml/min;检测波长:254 nm;进样量:5 μl。

2.2.2 MS条件 离子源:电喷雾电离(ESI)源;扫描方式:多反应监测模式(MRM);质量扫描范围:50~700 amu;电压:-4.0 kV;曲线脱溶剂装置(CDL)温度:250 ℃;氮气流速:4.5 L/min。

通过与对照品的HPLC-MS图谱对比分析,确定大黄萸醌提取物转化成游离萸醌后其主要成分为芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、1,8-二羟基萸醌。总离子流色谱见图1。

### 2.3 模型的复制与分组、给药

实验分为3组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、游离大黄萸醌(70 mg/kg)组;每个实验组按时

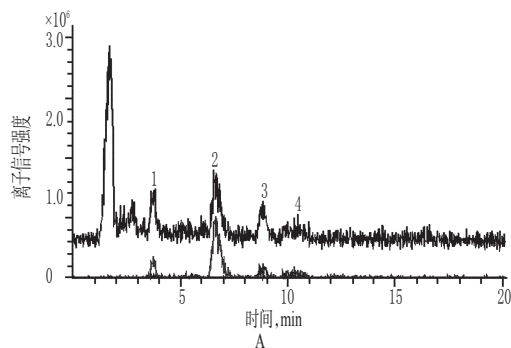


图1 游离大黄萸醌提取物总离子流色谱图

1.芦荟大黄素;2.大黄素;3.大黄酚;4.1,8-二羟基萸醌

Fig 1 TIC of free rhubarb anthraquinones extracts

1. aloe-emodin; 2. emodin; 3. chrysophanol; 4. 1,8-dihydroxyanthraquinone

间随机分成1、3、5、7、9、11、13周7个时间点(每个时间点6只)。每天下午ig醋酸泼尼松(3.5 mg/kg);每天上午ig游离大黄萸醌。连续给药13周,每周称体质量1次,并按体质量变化调整给药量,期间自由摄取标准饲料和水。每个时间点到期大鼠麻醉后心脏抽血至尽处死,采集大鼠四肢骨,用生理盐水纱布包裹后再覆锡纸包裹、标记,置-20 ℃贮藏,备用。

### 2.4 BMD和骨矿化度的测定

剔除软组织后的大鼠右侧股骨,以pQCT骨密度仪分别扫描全骨和股骨远端(2 mm),获得所测部位BMD、面积(Area),并计算出BMC。

### 2.5 统计学方法

数据统计使用SPSS 18软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间以方差分析(Univariate ANOVA)进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

与正常对照组比较,复制模型1周以后模型组大鼠股骨远端BMD显著减小;复制模型3周后模型组大鼠股骨全骨BMD显著减小( $P < 0.05$ );复制模型5周后模型组大鼠股骨远端BMC显著减小( $P < 0.05$ )。与模型组比较,用药1周后游离大黄萸醌组大鼠股骨远端和股骨全骨BMD显著增加( $P < 0.05$ );BMC有增加趋势,但差异无统计学意义。表明游离大黄萸醌可以预防泼尼松所致的股骨BMD和BMC的丢失。游离大黄萸醌对模型大鼠股骨BMD和BMC的影响见表1。

## 4 讨论

表1 游离大黄萸醌对模型大鼠股骨BMD和BMC的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Effects of free rhubarb anthraquinones on BMD and BMC of model rats( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

时间 点,周	股骨远端						股骨全骨					
	正常对照组		模型组		游离大黄萸醌组		正常对照组		模型组		游离大黄萸醌组	
	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g	BMD, g/cm <sup>2</sup>	BMC, g
1	0.144 5±0.025 4	0.022 2±0.002 4	0.132 2±0.003 6 <sup>a</sup>	0.021 6±0.001 2	0.141 1±0.008 0 <sup>a</sup>	0.023 7±0.001 6	0.131 8±0.006 6	0.407 1±0.038 9	0.133 5±0.007 3	0.402 5±0.038 8	0.136 8±0.006 0 <sup>a</sup>	0.434 1±0.036 1
3	0.147 9±0.005 8	0.024 8±0.001 5	0.144 3±0.010 3 <sup>a</sup>	0.024 7±0.002 8	0.182 5±0.007 9 <sup>a</sup>	0.025 2±0.002 3	0.140 0±0.005 5	0.446 6±0.019 5	0.137 4±0.008 3 <sup>a</sup>	0.437 3±0.045 2	0.169 5±0.013 9 <sup>a</sup>	0.422 8±0.053 5
5	0.147 2±0.005 4	0.025 1±0.002 1	0.143 6±0.005 0 <sup>a</sup>	0.024 9±0.001 2 <sup>a</sup>	0.186 0±0.008 7 <sup>a</sup>	0.025 4±0.000 9	0.142 4±0.005 4	0.456 4±0.024 3	0.140 5±0.008 0 <sup>a</sup>	0.4532 ±0.044 4	0.177 3±0.009 2 <sup>a</sup>	0.454 7±0.044 5
7	0.148 0±0.008 2	0.025 6±0.002 0	0.141 9±0.008 5 <sup>a</sup>	0.024 3±0.001 8 <sup>a</sup>	0.173 5±0.009 5 <sup>a</sup>	0.023 6±0.002 5	0.141 3±0.005 9	0.453 5±0.042 1	0.141 7±0.006 7 <sup>a</sup>	0.4620 ±0.054 3	0.170 3±0.007 3 <sup>a</sup>	0.436 7±0.046 4
9	0.142 4±0.008 4	0.024 6±0.001 2	0.136 1±0.013 2 <sup>a</sup>	0.022 4±0.003 0 <sup>a</sup>	0.182 6±0.012 7 <sup>a</sup>	0.024 8±0.002 8	0.138 8±0.008 5	0.445 7±0.040 7	0.138 2±0.010 6 <sup>a</sup>	0.4475 ±0.056 4	0.180 4±0.007 7 <sup>a</sup>	0.455 0±0.034 8
11	0.141 5±0.005 6	0.024 0±0.001 4	0.136 9±0.004 6 <sup>a</sup>	0.022 3±0.000 8 <sup>a</sup>	0.180 1±0.013 3 <sup>a</sup>	0.024 9±0.002 1	0.140 2±0.003 6	0.449 9±0.022 8	0.143 8±0.007 3 <sup>a</sup>	0.4620 ±0.035 9	0.173 1±0.009 9 <sup>a</sup>	0.451 4±0.037 5
13	0.148 4±0.007 0	0.025 6±0.001 8	0.137 5±0.003 1 <sup>a</sup>	0.023 7±0.000 8 <sup>a</sup>	0.193 9±0.006 2 <sup>a</sup>	0.028 2±0.002 3	0.146 3±0.007 7	0.487 5±0.051 7	0.144 8±0.006 3 <sup>a</sup>	0.4923 ±0.039 1	0.185 7±0.003 9 <sup>a</sup>	0.511 3±0.049 4

与正常对照组比较:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较:<sup>a</sup> $P < 0.05$

vs. normal control group: <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; vs. model group: <sup>a</sup> $P < 0.05$

# 荆条花不同提取物抗氧化活性的比较研究

于海平<sup>1\*</sup>,孔祥密<sup>2</sup>,施余杰<sup>2</sup>,康文艺<sup>2#</sup>(1.中国医药科技出版社,北京 100082;2.河南大学中药研究所,河南开封 475004)

中图分类号 R285;Q946 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3672-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.08

**摘要** 目的:研究荆条花不同提取物体外抗氧化活性并进行比较。方法:采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基与铁离子(Fe<sup>3+</sup>)还原(FRAP)等方法对荆条花不同提取物体外抗氧化活性进行评价,并与阳性对照二丁基羟基甲苯(BHT)比较。结果:荆条花不同提取物总的抗氧化活性比较结果为:荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏>荆条花正丁醇提取物>荆条花石油醚提取物。其中,荆条花乙酸乙酯提取物清除DPPH自由基(IC<sub>50</sub>=35.70 μg/ml)、清除ABTS自由基(IC<sub>50</sub>=7.40 μg/ml)与还原Fe<sup>3+</sup>(当量抗氧化能力为1 110.77 μmol/g)的能力最强,但弱于阳性对照药物BHT(上述三值分别为23.00 μg/ml、2.30 μg/ml、1 532.70 μmol/g)。结论:荆条花不同提取物抗氧化活性差异可能与其各个部位中所含抗氧化成分的种类和结构有关。

**关键词** 荆条花;抗氧化活性;二苯代苦味酰基;2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐;铁离子还原能力

## Comparison of Antioxidant Activity of Different Extract of *Vitex negundo* Flower

YU Hai-ping<sup>1</sup>, KONG Xiang-mi<sup>2</sup>, SHI Yu-jie<sup>2</sup>, KANG Wen-yi<sup>2</sup>(1.Chinese Medical Science Publishing House, Beijing 100082, China; 2.Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study and compare antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* flower in vitro. METHODS: DPPH radical scavenging, [2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] (ABTS) radical scavenging and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluate the antioxidant activity of different extract of *V. negundo* with BHT as positive control. RESULTS: The antioxidant activity of different extracts from *V. negundo* flower were in descending order, i.e. ethyl acetate extract>70% ethanol extract>n-butyl alcohol extract>petroleum ether extract. The ethyl acetate extract of *V. Negundo* flower had the best ability for DPPH radical scavenging (IC<sub>50</sub>=35.70 μg/ml), ABTS radical scavenging (IC<sub>50</sub>=7.40 μg/ml) and ferric reducing (TEAC=1 110.77 μmol/g), but it was still weaker than that of positive control BHT (IC<sub>50</sub> and TEAC were 23.00 μg/ml, 2.30 μg/ml and 1 532.70 μmol/g). CONCLUSIONS: The difference of antioxidant activity of different extracts may be associated with the type and structure of antioxidant components in each parts of *V. negundo* flower.

**KEY WORDS** *Vitex negundo* flower; Antioxidant activity; DPPH; 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS); Ferric reducing ability

四环素类和双磷酸盐类骨质疏松症药物与骨骼的非可逆性结合,在发挥抗骨质疏松作用的同时,也会蓄积在骨组织中,阻碍骨骼的自然更新,造成不良反应。本实验室在前期研究的基础上,通过游离大黄蒽醌类化合物对糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松模型的股骨全骨和股骨远端的BMD和BMC及它们随给药时间变化的研究,进一步证实游离大黄蒽醌类化合物在体内可以预防泼尼松所致的股骨BMD的丢失,同时显示大鼠股骨全骨的BMC没有出现随时间显著蓄积的趋势。研究中观察到大鼠股骨远端的BMC在一些给药时间段里有蓄积现象,由于大鼠股骨远端对药物反应敏感,药物可以直达该部位<sup>[1]</sup>,导致这种现象的主要原因可能有两方面:一是连续给药后游离大黄蒽醌在该部位的浓度达到稳态,二是游离大黄蒽醌的骨靶向或趋骨性所致。确切的原因尚需进一步研究。

### 参考文献

[1] Wang Y, Chen H, Wan ZM, et al. Synthesis of a new ser-

ies of bone affinity compounds[J]. *Chin Chem Lett*, 2006, 17(3):310.

[2] 张丽,崔颖,李灵芝.大黄蒽醌类化合物的羟磷灰石吸附性能研究[J].武警医学院学报,2008,17(12):1 048.

[3] 刘钰瑜,崔燎,吴铁,等.大黄素对体外大鼠骨髓基质细胞向脂肪细胞方向分化的影响[J].中国药理学通报,2005, 21(7):842.

[4] 刘钰瑜,崔燎,吴铁,等.大黄素和小剂量雌激素合用对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用[J].中国骨质疏松杂志, 2006,12(1):66.

[5] Huang SS, Yeh SF, Hong CY. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure-activity relationship[J]. *J Nat Prod*, 1995, 58 (9):1 365.

[6] 徐友锋,李灵芝,陈虹.大黄中提取游离蒽醌的工艺改进[J].武警医学院学报,2002,11(12):76.

[7] 李青南,吴铁,李朝阳,等.骨质疏松实验动物研究:骨组织形态计量学[M].成都:四川大学出版社,2001:44-45.

(收稿日期:2012-11-27 修回日期:2013-03-03)

\*副编审。研究方向:中医药理论。电话:010-62253302

#通信作者:教授。研究方向:中药活性成分及新药研发。电话:0378-3880680。E-mail:kangwenyi@hotmail.com