·论著·

D-半乳糖对小鼠骨矿物质、羟脯氨酸含量及最大载荷的影响

董文彦 吴丽萍 李聪 刘辉

【摘要】 目的 研究D-半乳糖致衰老过程中对骨质的影响。方法 用D-半乳糖注射BALB/c断乳雄性小鼠4个月,建立衰老模型,对青年组、模型组和正常老龄组进行股骨长度、重量、最大载荷和功、骨钙、磷、镁、锰、以及骨羟脯氨酸等指标的检测与比较。结果 模型组最大载荷和功、骨钙、镁、锰及羟脯氨酸含量均比青年组有显著降低($P<0.01$),而骨磷含量比青年组有显著升高($P<0.01$),这些变化与自然衰老组的变化趋势一致,并且自然衰老组改变更为明显。结论 长期大量的使用D-半乳糖可能导致骨质疏松症。

【关键词】 骨质疏松;晚期糖化终末产物;最大载荷;骨钙;羟脯氨酸

Influence of D-galactose on content of bone mineral, hydroxyproline and maximum load in mice *DONG Wenyan, WU Liping, LI Chong, et al. Department of Biochemistry, College of Applied Sciences and Humanities, Beijing United University, Beijing* 100083, China

【**Abstract**】 **Objective** To study the influence of D-galatose on mineral, hydroxyroline and maximum load in aging mice. **Methods** To cause aging, were mine BALB/c given injctions of D-galactose for 4 months. The bone calcium, phosphorus, nagnesium, manganese, hydroxyproline and femur maximum load and works were defermind and compared between mice of young, semile model and natural aging groups. **Results** Compared with young group, the contents of bone calcium, phosphorous, magnesium, manganese, hydroxyproline and femur maximum load and works in the model group were significamtly decreased($P<0.01$ or $P<0.001$), the content of bone the natural aging group had. **Conclusions** D-galactose can cause aging and osteoporosis by producing superoxygen free radical and the advanced glycosylation end products.

【**Key words**】 Osteoporosis; Advanced glycosylation end product; Superoxygen free radical; Bone calcium; Hydrocyproline

D-半乳糖可以使体内超氧自由基含量增加,引发一系列氧化反应。同时由于其不能被机体利用,而在细胞间质中积累,可使细胞肿胀,代谢受损,导致机体衰老。目前对D-半乳糖导致衰老的很多生理生化指标已有较多研究[1],但其对骨质的影响未见报道。此外,现已发现体内糖的醛基或酮基与蛋白质的自由氨基之间会发生一系列非酶糖化反应,最终生成一类具有特征性荧光的晚期糖化终末产物(AGEs)。研究已经证实,AGEs过多,会降低成骨细胞数量与活性,使骨形成作用小于骨吸收作用导致骨质疏松[2]。在体外培养实验中已经证实,D-半乳糖也可以与蛋白质生成晚期糖化终末产物[3]。本实验通过检测骨代谢中的一些生物力学指标,如骨最大载荷和功,以及骨矿物质含量,如骨钙、磷、镁、锰和骨羟脯氨酸等指标来研究D-半乳糖对小鼠骨质的影响。

作者单位:100083 北京联合大学应用文理学院生化系

材料和方法

1. 实验动物

断乳雄性BALB/c小鼠,体重19~20 g,由中国医学科学院实验动物中心提供。将小鼠随机分为2组,分别是青年组和模型组。模型组在喂饲过程中以1.2 g/(kg·d)在颈背部注射D-半乳糖,青年组则注射等量的生理盐水;饲喂4个月,选血清过氧化脂质分解产物丙二醛(MDA)有显著升高者为衰老模型组。另设16月龄同品系小鼠为老龄对照组。3组均为15只,自由进食和饮水。

2. 仪器与试剂

722型光栅分光光度计、YXQ901型蒸汽消毒器、RGM-28-10型马福炉、WDF-Y_2型氢火焰原子吸收分光光度计、QTS25型流变仪(英国Stevens公司);所用试剂为国产或进口分装。MDA试剂盒购自南京建成生物工程公司。

3. 实验方法

(1)血清中丙二醛(MDA)的测定

小鼠注射D-半乳糖4个月后,断头取血,分离血清,用试剂盒测定。

(2)股骨长度、重量以及最大载荷和功的测量

用千分尺测量右侧股骨长度;用分析天平称量双侧股骨的重量;用QTS 25型流变仪测量右侧股骨的最大载荷和功。

(3)骨钙、镁、锰的测定

取小鼠右侧股骨近端称重,磨碎。然后进行灰化,时间为2 h。取出骨灰,用硝酸溶解。经处理后,用火焰原子吸收分光光度计来测定钙、镁、锰含量。

(4)骨磷的测定

取小鼠右侧股骨上段称重,磨碎。然后进行灰化,时间为2 h。取出骨灰,用硫酸溶解。经处理后,用钼蓝显色定磷法660 nm波长下比色测定。

(5)骨中羟脯氨酸的测定

取小鼠右侧股骨上段称量,磨碎。用3 ml的氯仿-甲醇混合液浸泡2 h,然后过滤。再用乙醇水混合液和丙酮一次冲洗。然后放入烤箱中烘烤2 h。取出后放入1 ml 12mol/L的HCl,于高压灭菌锅中水解2 h(121℃,1×10^5 Pa)。取出后经过处理,用氯胺T法于560 nm波长下进行测定[5]。

结 果

1. 小鼠血清MDA含量

表1 小鼠血清MDA含量的比较

组别	n	MDA(nmol/L)
青年组	15	4.63±0.48
老龄对照组	15	5.26±0.39*
模型组	15	5.91±0.24*

注:*与青年组比较差异极显著 $P<0.01$

由表1可见模型组小数血清MDA含量的变化与自然衰老组一致,均比年青组著升高($P<0.01$),说明用D-半乳糖成功建立了小鼠衰老模型。

2. 小鼠股骨长度、重量以及最大载荷和功

由表2可以看出,与青年组比较,老龄对照组股骨长度明显增加,而模型组股骨长度明显减少($P<0.01$)。在骨最大载荷和将股骨折断时所做的功方面,老龄对照组和模型组都比青年组显著降低($P<0.01$)。正常情况下随年龄增加,小鼠股骨的长度和重量都会相应增加。骨最大载荷和功是骨生物力学中常用的测量指标,能直接反映出实验对骨组织结构的力学效应[6]。上述结果表明,注射D-半乳糖4个月可以达到减小骨最大载荷和功的作用,该作用与随增龄的自然衰老是一致的,即衰老模型建立的同时,也导致了老年骨质疏松。

表2 D-半乳糖对小鼠股骨长度、重量以及最大载荷和影响

组别	n	长度(cm)	重量(g)	最大载荷(g)	功(g·mn)
青年组	15	1.569±0.040	0.0157±0.0091	2826±236	3491.27±678.35
老龄对照组	15	1.659±0.040*	0.1080±0.0047*	2539±205*	2647.22±308.67*
模型组	15	1.523±0.046*	0.1013±0.0095*	2527±266*	2606.99±300.55*

注:与青年组相比,*$P<0.01$

3. 小鼠股骨钙、镁、锰含量

表3 D-半乳糖对小鼠股骨钙、镁、锰含量的影响

组别	n	骨钙(μg)	骨镁(μg)	骨锰(μg)
青年组	13	866.06±267.78	6.117±2.424	7.342±2.770
老龄对照组	14	513.85±144.02*	3.113±0.736*	2.728±0.899**
模型组	14	595.02±185.62*	3.235±0.992*	1.809±0.794**

注:与青年组比,*$P<0.01$,与青年组比较,**$P<0.001$

由表3结果可见,与青年组比较,模型组与老龄组骨钙、镁、锰含量均极显著减少($P<0.01$或$P<0.001$),说明注射D-半乳糖的模型组小鼠骨中这几种矿物质含量比同龄正常小鼠明显降低,而与自然衰老的16月龄小鼠的骨矿含量变化趋势一致,提示长期摄入D-半乳糖可造成骨质疏松模型。

4. 小鼠股骨磷和羟脯氨酸含量

结果见表4。老龄组与模型组的骨磷含量均比青年组有明显增加($P<0.01$),而骨羟脯氨酸含量则极显著降低($P<0.001$)。模型组在骨羟脯氨酸含量方面也与正常衰老的老龄组一样极显著减少,这些结果可以说明注射大剂量D-半乳糖有增加小鼠骨磷和减少骨羟脯氨酸含量作用,与前述指标结合在一起可以提示:D-半乳糖致衰老同时,也可以建

立小鼠骨质疏松模型。

表4 小鼠股骨磷和羟脯氨酸含量的变化

组别	n	骨磷含量(μg)	骨羟脯氨酸含量(μg)
青年组	15	164.81 ± 26.16	3621.42 ± 696.21
老龄对照组	15	217.08 ± 29.08*	805.06 ± 181.47**
模型组	13	331.53 ± 11.18**	950.99 ± 208.62**

注：与青年组相比，* $P < 0.01$；** $P < 0.001$

讨 论

关于D-半乳糖会导致体内超氧自由基增多，促进衰老的问题，研究报道很多。机体随年龄的增长，体内自由基的数目增多。自由基不但会破坏细胞膜，也会破坏细胞中的蛋白质，使之交联、变性，还会攻击细胞核，最终导致细胞死亡[7-9]。在骨的形成中，胶原蛋白是一种很重要的物质。有研究表明，胶原分子间的40 nm的间隙与胶原的钙化有关，即骨中胶原分子具有矿物质沉淀的特性。如果自由基大量积累，势必会造成胶原分子的破坏，导致骨中矿物质沉积减少，造成了钙、镁、磷等元素的减少，抑制了骨的形成，造成老年性的骨质疏松。胶原分解后就会释放羟脯氨酸，因此在血和尿内均可发现羟脯氨酸，且随龄会增加，而骨中的羟脯氨酸含量就会相应减少。

D-半乳糖致衰老模型小鼠骨质疏松的另外一个原因就是晚期糖化终末产物(Advanced glycosylation end products, AGEs)在骨中的沉积。AGEs随年龄的增加在骨胶原内的积累也会增多[10-12]。骨胶原是含有较多自由氨基的长寿命蛋白，因此，AGEs很容易在此形成并积累。而胶原蛋白上AGEs的形成则改变了这种蛋白质的生理功能，如细胞对基质蛋白的黏附能力降低，而成骨细胞对骨胶原蛋白的黏附是成骨作用启动的先决条件[11]。因此胶原蛋白的形成受到抑制，同样会导致骨中矿物质沉积减少，从而抑制骨的形成。有效地控制骨质疏松有利于控制骨骼外的钙缺乏性疾病。目前的研究显示，钙的摄入量和钙吸收情况与骨密度呈正相关，它们间接地抑制骨吸收。而钙的排出与骨密度呈负相关，间接地使骨吸收增加。骨密度与骨矿含量呈正相关，同时与骨的最大载荷也呈正相关。最大载荷与功的大小，与骨的强度与骨折发生的危险性呈相关性。骨最大载荷和功的减小，会大大降低骨抗弯力强度，提高骨折的发生率。

机体在衰老之后，随自由基和AGEs的增多，就会导致骨矿物质的沉积减少，引起骨质疏松。实验表明，模型组骨钙、镁、锰及骨羟脯氨酸的含量、骨最大载荷及折断时所做的功均显著降低，骨磷的增加则是由于钙磷的平衡造成的。D-半乳糖会导致体内自由基和AGEs二者含量的增加，因此，提示D-半乳糖会对骨质产生负面的影响，是导致骨质疏松症的原因之一。

参 考 文 献

1 赵鹏，杨玉英．半乳糖制备亚急性衰老动物模型的可行性．中国食品卫生杂志，1991，11(1)：52-53.

2 孔德娟，陈永春，李恩，等．晚期糖化终末产物在老年大鼠骨质疏松发病中的作用．中国骨质疏松杂志，2000，6(3)：23-26.

3 董文彦，刘辉、李聪，等，D-半乳糖致衰老小鼠血浆钙、磷、碱性磷酸酶及骨密度的变化．中国老年学杂志，2003，13(1)：45-46.

4 许志勤，高兰兴．组织羟脯氨酸测定方法的改进．解放军预防医学杂志，1990，8(1)：41-43.

5 秦岭，梁国穗．骨生物力学在防治骨质疏松药物开发中的应用基础．中国骨质疏松杂志，2000，6(2)：73.

6 张石宁，肖红，望伟勇，等．D-半乳糖致衰老小鼠单胺类神经递质的改变．中国老年学杂志，2000，20：366-367.

7 李文彬，韦丰，范明，等．D-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应．中国药理学与病理学杂志，1995，9：93-95.

8 龚国清，徐酸本．小鼠衰老模型研究．中国医科大学学报，1991，22：101-103.

9 James TW. Advanced glycosylation end products, a new disease marker for diabetes and aging. J Clin Lab Analy, 1993, 7: 252-255.

10 Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen, the basis of its central role in the late complications of aging and diabetes. Int U Biochem Cell Biol, 1996, 240: 1279-1310.

11 Munch G, Thome H, Foley P, et al. Advanced glycation end products in aging and Alzheimer's diseases. Brain Res Rev, 1997, 23: 134-143.

(收稿日期：2002-04-30)

(上接第208页)

8 Hreshchyshyn MM, Hopkings A, Zykstra S, et al. Effects of natural menopause, hysterctomy, and oophorectomy on lumbar spine and femoral nelk bone densities. Obstet Gynecol, 1988, 72: 631.

9 Watson NR, Studd JWW, Garnett FT. Bone loss after hysteectomy with ovarian conservation. Obstet Gynecol, 1995, 86: 72-77.

10 Ravn P, Lind C, Nilas L. Lack of influence of simple premenopausal hysterectomy on bone mass and bone metabolism. Am J Obstet Gynecol, 1995, 172: 891-895.

11 Larcos G. Hysterectomy with ovarian conservation: effect on bone mineral density. Aust New Zealand J Obstet Gynecol, 1998, 38: 452-454.

12 Schott AM, Weill-engerer S, Hans D, et al. Ultrasound discriminate patients hip fractures equally well as independentlyof bone mineral density. J Bone Miner Res, 1995, 10: 243-249.

13 Delmas PD. Bone mass measurement: how, where, when, and why? Int Fertil Menopansal Stud, 1993, 38(2): 70-76.

(收稿日期：2003-06-09)