

膳食多不饱和脂肪酸(n-6)/(n-3)不同比率对尾悬吊大鼠骨代谢的影响

郑冬梅 白树民 黄纪明 李志霞 朱德兵 石阶平

【摘要】 目的 研究多不饱和脂肪酸(n-6)/(n-3)的不同比率对悬吊大鼠骨代谢和组织脂肪酸成分的影响,为失重骨丢失的防护提供实验依据。**方法** SD 大鼠随机分 5 组,分别为:I 组:(n-6)/(n-3) = 7.79、II 组:(n-6)/(n-3) = 3.75、III 组:(n-6)/(n-3) = 1.47、SC 组:悬吊对照组、FAC 组:自由活动对照组。每天上午 9:00 灌胃,实验期为 21 d。**结果** 与 SC 组相比,III 组大鼠血清骨钙素含量显著增加,股骨生物力学指标明显改善;随着(n-6)/(n-3)PUFA 比率的降低,肝脂中花生四烯酸(AA 20:4 n-6)含量降低,n-3PUFA 含量上升。**结论** 降低膳食(n-6)/(n-3)PUFA 比率可改善尾悬吊大鼠的骨代谢和骨结构,提高骨生物力学性能。

【关键词】 模拟失重; 多不饱和脂肪酸; 前列腺素 E₂; 骨代谢

Effects of different (n-6)/(n-3) ratios of polyunsaturated fatty acids on bone metabolism in tail-suspended rats ZHENG Dongmei, BAI Shumin, HUANG Jiming, et al. Graduate School, Beijing Aviation and Aerospace University, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the effects of different dietary (n-6)/(n-3) ratios of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bone metabolism and tissue fatty acid composition in rats with simulated weightlessness. **Methods** Male SD rats were divided into the following groups: the free active control group (FAC), the tail-suspended control group (SC), and the other three tail-suspended groups which were treated with (n-6)/(n-3) ratios of 7.79 (group I), 3.75 (group II) and 1.47 (group III) of fatty with. The duration of experiment lasted for 3 weeks. The influence of the (n-6)/(n-3) PUFA ratios on the bone biomechanical properties, bone biochemical markers, and the tissue fatty acids composition were investigated. **Results** Group III exhibited significantly higher BGP and better femoral biomechanical properties than group SC. With the decrease in the ratio of (n-6)/(n-3) PUFA, the content of arachidonic acid (20:4 n-6) in liver decreased, and the n-3 PUFA increased. **Conclusion** Decreasing the dietary (n-6)/(n-3) ratio of PUFA improves the bone metabolism and bone structure, and increases bone biomechanical properties.

【Key words】 Simulated weightlessness; Polyunsaturated fatty acids; Prostaglandin E₂; Bone metabolism

空间飞行过程中,航天员处在失重环境下,这将导致机体的骨骼系统发生结构和功能的变化,主要表现为骨量丢失。负荷减少下的骨质丢失实际上是骨骼系统适应减负荷的生理反应^[1],有关失重量骨丢失的防护一直是航天医学研究的重要课题。

很多证据表明脂质对骨骼生物学和骨健康具有重要作用,多不饱和脂肪酸(PUFA)对骨代谢的积极

作用是近年的研究热点,主要研究目标多集中在 PUFA 对前列腺素 E₂(PGE₂)代谢的调控^[2]。PGE₂ 是花生四烯酸(AA)在环氧合酶-2(COX-2)作用下的代谢产物,是来源于骨细胞的前列腺素,对骨的构建和重塑是有效的调节因子。所有骨形成和骨吸收都受 PGE₂ 影响。PGE₂ 对骨的调节是双向性的,在高浓度下,抑制骨基质的形成;低浓度下,可促进 DNA 合成,提高 ALP 活性,刺激骨形成^[3]。因此我们认为通过调节膳食(n-6)/(n-3)PUFA 比率,可以改变体内 AA 浓度和 PGE₂ 的产生,进而影响骨代谢。本实验旨在通过调整大鼠灌胃油脂的(n-6)/(n-3)PUFA 比

作者单位:100083 北京航空航天大学研究生院(郑冬梅);航天医学工程研究所(白树民、黄纪明、李志霞、朱德兵);中国农业大学食品学院(石阶平)

例,探讨 PUFA 比例对模拟失重大鼠骨质的影响,而为航天员骨丢失的防治提供一定的依据。

材料和方法

1. 动物试验

(1)动物分组:Ⅰ组:(n-6):(n-3) = 7.79:1;Ⅱ组:(n-6):(n-3) = 3.75:1;Ⅲ组:(n-6):(n-3) = 1.47:1;SC组:悬吊对照组;FAC组:自由活动对照组(不悬吊)。

(2)动物模型的建立:体重 150 ~ 170 g 雄性 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只。大鼠尾部悬吊,后肢离地,使躯干与水平面成 25 ~ 30°角。大鼠前肢着地,可以自由活动,全部大鼠自由进食常备饲料和纯净水。每天上午 9:00 按体重的 7% 灌胃,灌胃油脂的脂肪酸组成见表 1,对照组灌蒸馏水。每 3 天称重 1 次,根据体重调整灌胃量。试验为期 21 d。

表 1 灌胃油脂的脂肪酸组成

脂肪酸	Ⅰ组	Ⅱ组	Ⅲ组
16:0(palmitic)	6.77	6.22	6.46
18:0(stearic)	2.48	2.15	2.07
18:1(n-9)(oleic)	13.03	10.72	17.64
18:2(n-6)(linoleic)	60.12	42.91	28.81
18:3(n-3)(α -linolenic)	5.88	6.82	4.82
20:4(n-6)(arachidonic)	1.60	1.65	1.52
20:5(n-3)(EPA)	0.63	1.29	2.71
22:6(n-3)(DHA)	1.14	3.77	13.11
(n-3)PUFA	7.92	11.88	20.64
(n-6)PUFA	61.72	44.56	30.33
(n-3)/(n-6)	7.79	3.75	1.47

2. 样本收集

实验结束日,将大鼠称重后断头取血 2 ml 注入试管中待凝固后,分离血清。取肝及左侧股骨放冰箱-30℃保存。

3. 测定指标和方法

(1)骨生物力学指标测定:左侧股骨取材后,去除附着的肌肉和结缔组织。用流变仪(QTS-25,英国)对骨干进行三点弯曲实验。跨距为 15 mm 加载速度 10 mm/min,记录载荷-变形曲线。测得最大载荷、最大挠度、弹性载荷和弹性挠度。

(2)肝脏脂肪的提取:按照氯仿-甲醇法。

氯仿:甲醇按 4:1 的比例混合(简称 C-M 液)。石油醚(分析纯)肝组织磨匀浆。取 C-M 液 100 ml 连同组织匀浆置锥形瓶中,连接好回流装置,70℃水浴 1 h,冷却后旋转蒸发至瓶中所剩液体 2 ml 左右。

取出冷却后加 10 ml 石油醚。充分振摇均匀。将溶液 3000 r/min 离心 5 min。取出后吸取上清液置烤箱 100℃将溶剂蒸发,所剩棕红色粘稠液体即为肝脂。

脂肪经甲酯化处理,用气相色谱仪(HP6890 型,美国)分析。色谱柱,毛细管柱(Φ 0.25 mm $\times$ 30 m,北京分析仪器厂);升温程序:170℃保持 13 min,2℃/min 升至 190℃,保持 10 min,4℃/min 升至 210℃,保持 12 min,共 50 min。

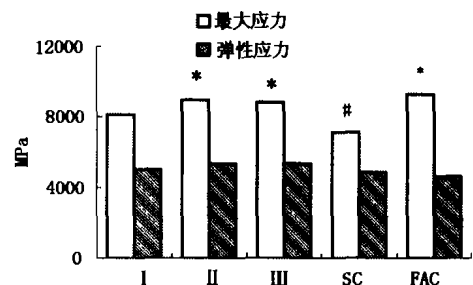
(3)血清骨钙素测定:用北方放射免疫试剂研究所的骨钙素试剂盒测试,测试方法见说明书,批内变异 < 5%,批间变异 < 10%。

4. 数据统计分析方法

数据全部采用 EXCEL 统计软件进行 *t* 检验、*P* 值 < 0.05 为显著水平。

结 果

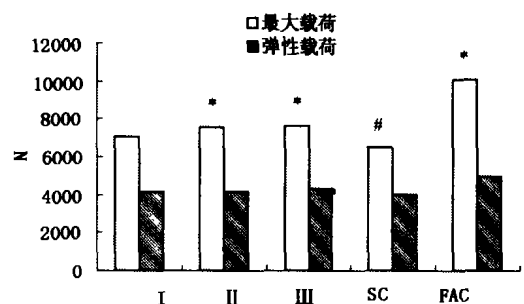
1. PUFA 对股骨生物力学的影响



与 SC 组比 * *P* < 0.05; 与 FAC 组比 * *P* < 0.05

图 1 股骨三点弯曲实验的最大应力和弹性应力

(1)股骨干材料力学参数:由图 1 看出,SC 组的最大应力显著低于 FAC 组,说明悬吊使股骨的材料力学性能强度显著下降。Ⅱ组和Ⅲ组最大应力显著高于悬吊对照组,并且Ⅰ组最大应力也有升高的趋势。可以看出,多不饱和脂肪酸对股骨的材料力学强度有一定的改善作用。



与 SC 组比 * *P* < 0.05; 与 FAC 组比 * *P* < 0.05

图 2 股骨三点弯曲实验的最大载荷和弹性载荷

(2) 股骨干结构力学参数: 由图 2 可以看出, 与 FAC 组相比, SC 组股骨的最大载荷显著下降, 说明大鼠悬吊后股骨的结构强度显著下降。Ⅱ组和Ⅲ组的最大载荷分别为 7520 N 和 7610 N, 显著高于悬吊对照组(6499N), I 组与悬吊对照组无显著差别。大鼠股骨弹性载荷的指标变化有升高的趋势, 但改变不显著。

2. PUFA 对血清骨钙素(BGP)的影响

表 2 大鼠血清骨钙素含量(ml/ng)

项目	I 组	Ⅱ组	Ⅲ组	SC 组	FAC 组
骨钙素含量	37.4*	31.2	37.2*	24.3*	31.2

注: 与 SC 组比较 * $P < 0.05$; 与 FAC 组比 * $P < 0.05$

由表 2 看出, SC 组的骨钙素显著低于 FAC 组, 说明悬吊使大鼠的骨转换速度降低, I 组和Ⅲ组的骨钙素含量显著升高。

3. PUFA 对大鼠肝脂中脂肪酸成分的影响: 大鼠肝组织部分脂肪酸成分, 见表 3。

表 3 大鼠肝组织部分脂肪酸成分

脂肪酸	I	Ⅱ	Ⅲ	SC	FAC
20:4 n-6	23.97	22.08*	20.91*	28.18*	24.38
20:5 n-3	-	2.53*	4.39*	-	-
22:6 n-3	-	0.42*	0.94*	-	-

注: 与 SC 组相比较 * $P < 0.05$

由表 3 看出, 肝脂中脂肪酸组成比例反映了饲喂不同油脂的脂肪酸组成的特性, 花生四烯酸(20:4 n-6)比例以 SC 组最高。长链 n-3 PUFA--二十碳五烯酸(20:5 n-3, EPA)的比例则以Ⅲ组最高, 乃至总 n-3PUFA 的比例以Ⅲ组为最高, Ⅱ组次之, 也表现出随饲料中(n-3)PUFA 添加量的增加而提高的趋势; 随着(n-6)/(n-3)比例的降低, 肝脂中 AA 含量也呈下降的趋势。

讨 论

1. PUFA 对骨质的影响

骨生物力学性能是全面评价骨质量最可靠的指标。最大载荷代表的是在载荷变形曲线最高点处骨标本所承受的外力, 反映整根股骨的强度。最大应力说明在单位面积所能承受的最大载荷, 最大应力越大, 单位面积骨所承受载荷的能力越大。弹性应力代表骨的韧性, 弹性应力越大, 说明骨的韧性越好。本实验测定了悬吊大鼠右侧股骨各项生物力学性能指标, 观察到悬吊后大鼠最大载荷、弹性载荷显著下降, 说明骨结构发生明显改变, 从而降低了骨的

机械性能和承载能力。而 3 组灌胃大鼠的最大载荷、弹性载荷与悬吊对照组比均有不同程度的提高。反映出 PUFA 对改善骨结构、骨有机相和无机相的质量的作用。并且以(n-6)/(n-3)为 3.75 组和 1.47 组作用最显著。

成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞。骨钙素(BGP)是由非增殖期成骨细胞合成和分泌的非胶原蛋白, 占骨有机质的 20%, BGP 是一种维生素 K 依赖性钙结合蛋白, 由成骨细胞合成后, 大部分沉积于骨基质中, 少量直接分泌入血液循环。研究表明, 血清骨钙素的含量与骨形成的组织计量学参数呈显著正相关, 是成骨细胞活性灵敏和特异性指标^[4]。本研究发现, 悬吊 3 周后, 大鼠血清中总骨钙素含量显著下降, 说明悬吊使成骨细胞活性降低, 并引起骨吸收速度降低和骨转换速度下降。而 PUFA 可以提高模拟失重大鼠 BGP 水平。并且以(n-6)/(n-3)为 1.47 组和 3.75 组作用最显著。

2. PUFA 改善骨代谢的机制

本次实验发现, SC 组大鼠肝组织中 AA 含量显著高于Ⅱ组和Ⅲ组, 对于不同膳食(n-6)/(n-3)PUFA 比例的各组大鼠, 肝脂脂肪酸组成反映了膳食(n-6)/(n-3)PUFA 饲喂水平。与饲喂高(n-6)/(n-3)PUFA 的大鼠相比, 随着 n-3PUFA 的增加, 可使大鼠肝组织脂质中的花生四烯酸(AA 20:4 n-6)的比例降低, 取而代之的 EPA 和/或 DHA 等长链(n-3)PUFA 的增加。AA 的降低是(n-3)PUFA 和(n-6)PUFA 对 Δ^6 去饱和酶竞争抑制的结果。尤其是 EPA 阻止亚油酸向 AA 转化。AA 是前列腺素(PGE₂)的前体物质, AA 减少则 PGE₂ 的生成减少。

PGE₂ 在骨形态方面的重要作用是随着 n-6PUFA 导致骨矿重吸收以及培养骨组织中骨释放钙的实验中与被发现的^[5]。PGE₂ 可抑制 1- α 羟化酶的活性, 使 1,25(OH)₂D₃ 的生成减少, 因而导致肠钙结合蛋白合成障碍, 肠钙吸收减少, 尿钙排出增加, 血钙降低, 继发甲状旁腺功能亢进, 骨盐溶解, 最终导致骨质疏松。PGE₂ 对骨的影响是浓度依赖的, 低浓度下促进骨形成; 高浓度抑制骨形成。

与 n-6PUFA 相比, n-3PUFA 可以增加骨形成率。这些有益的影响是由于 PUFA 调节了环氧合酶-2(COX-2)介导的 PGE₂ 的生物合成。EPA 可能作为直接的酶抑制剂, 竞争性地抑制 COX-2 的底物—AA^[7]。本实验发现 3 组灌胃大鼠组织中 AA 含量显著降低, 证明通过调节膳食中(n-3)PUFA 的含量, 可以发挥其对 AA 的竞争性抑制作用, 从而降低 PGE₂

的产生,进而刺激骨形成。

有学者研究认为,调节 PGE_2 的产生的最初步骤是在环氧合酶(COX)水平。 PGE_2 的产生依赖 COX-2——一种诱导酶。在人成骨细胞培养中,甲状旁腺激素诱导 COX-2 表达和 PGE_2 的产生。脂肪酸调节这个关键酶的表达和活性,对骨施加了影响^[8]。例如,给鼠饲喂高(n-3)PUFA 的饲料,和那些饲喂高(n-6)PUFA 的比缺乏 COX-2mRNA。在其他的研究中,鼠饲喂高谷物油(富含 n-6PUFA),可以提高 COX-2 的活性,而喂含高鱼油的(富含 n-3PUFA 饲料)则显示可降低 COX-2 的活性。COX-2 的过量产生与关节炎的炎症反应、骨质疏松的发展和癌症有联系。因此 PUFA 影响 PGE_2 的产生是通过调节 COX-2 酶的活性,从而实现了对骨代谢的调控。

参 考 文 献

1 刘忠厚,主编.骨质疏松症.北京:科学出版社,1998.280-285.

- 2 Marks SC, Jr & Miller SC. Prostaglandins and the Skeleton :the legacy and challenges of two decades of research. J Endocr, 1993, 1:337-344.
- 3 李强,史俊南,等.前列腺素 E_2 对鼠头盖骨钙代谢的作用.牙髓牙体牙周病学杂志,2001,43:193.
- 4 Cui W, Shi ZZ. Relationship between osteocalcin and bone metabolize in weightlessness. Progress in Physiological Science, 1994, 24:281-283.
- 5 Watkins BA, Lippman HE, et al. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. Progress in Lipid Research, 2002, 40:125-148.
- 6 Jee WS, Li S, Chan XJ. Prostaglandin E_2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. Bone, 1990, 11:253-266.
- 7 Bruce A, Watkins, et al. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. J Nutr, 2000, 6:2274-2284.
- 8 Maciel FMB, Serrazin P, et al. Induction of cyclooxygenase-2 by parathyroid hormone in human osteoblasts in culture. J Rheumatic, 1997, 24:2429-2435.

(收稿日期:2004-02-26)

(上接第 262 页)

- 34 陈志信,徐香玖,黄刚,等.甘肃兰州地区 491 例双能 X 线骨密度测定分析.中国骨质疏松杂志,2003,9:71-74.
- 35 黄琪仁,周琦,陆敬辉,等.2111 例上海健康女性骨密度值测定与年龄相关骨丢失的研究.中国骨质疏松杂志,2002,8:191-195.
- 36 廖二元,伍贤平,邓小戈,等.中国长沙地区女性多骨骼部位骨密度参考值横断面调查.中国骨质疏松杂志,2002,8:97-103.
- 37 李晓娟,范宏斌,张晓峰,等.门诊下腰痛患者骨密度评价.第四军医大学学报,2001,22:1048-1050.
- 38 廖二元,伍贤平,邓小戈.对中国长沙地区女性骨密度情况的调查.中华内分泌代谢杂志,2000,16:203-208.
- 39 李金祥,马锦富,吴进,等.成都市 1920 例骨病女性骨密度的研究.现代预防医学,2000,27(1):83-85.
- 40 包丽华,郑茂锭,颜爱霞.绝经后妇女腰椎和髌部骨密度变化的临床研究及意义.实用老年医学,1997,11:219-221.
- 41 秦林林,马海波,张卫,等.中国北方汉族健康人骨密度正常值.中国骨质疏松杂志,2002,8:110-113.
- 42 邓小戈,廖二元,武贤平,等.中国女性股骨颈和 WARD 区骨密度特点.湖南医科大学学报,2000,25:95-98.
- 43 余卫,秦明伟,徐苓,等.正常人股骨近端骨密度变化.中国放射学杂志,1998,32(1):23-26.
- 44 朱玲,尹大庆,李谨,等.1166 例正常人髌部骨密度测量结果分析.中国骨质疏松杂志,2003,9:69-71.
- 45 将磊,陈福康,黄吟华.前臂远端 1/3 和 1-10 部位骨密度测量及

临床意义.现代康复,2001,5:108-109.

- 46 中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿).中国骨质疏松杂志,2000,6(1):1-3.
- 47 朴俊红,庞莲萍,刘忠厚,等.中国人口状况及原发性骨质疏松症诊断标准和发生率.中国骨质疏松杂志,2002,8(1):1-7.
- 48 李景学,蔡跃增.仍需完善的骨质疏松诊断标准.中国骨质疏松杂志,1997,3(3):89-91.
- 49 杨定焯,程静,安珍.建立原发性骨质疏松症诊断标准的原则和方法.中国骨质疏松杂志,1999,59(2):36-40.
- 50 福勇仁夫.骨质疏松诊断标准.中国骨质疏松杂志,1996,2(1):1-6.
- 51 马锦富,李金祥,杨定焯.成都地区 1835 例女性骨密度研究.中国骨质疏松杂志,1999,5(1):63-67.
- 52 余卫, Fan Bo, Jerges M, 等.绝经后妇女腰椎骨密度测量研究.中国医学计算机成像杂志,1997,3:114-117.
- 53 张东,姚安晋,刘陈学,等.正常人股骨颈骨密度变化(附 425 例双能 X 线骨密度仪测量分析.实用放射学杂志,1999,15:676-680.
- 54 姜岩,苗莉,刘忠厚,等.中国女性前臂骨密度正常值与原发性骨质疏松症发生率的研究.中国骨质疏松杂志,2000,6(2):30-31.
- 55 吴胜勇,祁吉,李景学.健康及髌关节骨折老年妇女股骨颈骨密度的比较.中国临床解剖学杂志,2001,19(1):50-51.
- 56 冷文川,张美荣,刘燕,等.腰椎侧位骨密度测定的应用价值研究.中国运动医学杂志,2002,21:235-238.

(收稿日期:2004-02-19)