染料木黄酮对去势大鼠骨组织形态计量学参数的影响

张月红 金宏 许志勤 南文考 王先远 薛长勇 高兰兴

摘要:目的 研究染料木黄酮对去势大鼠股骨远端形态计量学参数的影响,为染料木黄酮防治骨质疏松提供理论依据。方法 雌性 Wistar 大鼠 47 只,按体重随机分为 6 组:假手术组、去势对照组、去势 + 雌激素组(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)、去势 + 染料木黄酮组(染料木黄酮剂量分别为 25、50、100 mg/kg 体重)。饲养 3 个月后处死,测定股骨形态计量学参数。结果 去势组与假手术组比较,骨小梁体积、平均骨小梁板密度和厚度减少,平均骨小梁板间隙和类骨质宽度增加,矿化延迟时间和类骨质成熟时间延长,且差异均具有显著性($P < 0.05$)。染料木黄酮各组与去势组比较,骨小梁体积和平均骨小梁板厚度增加,平均骨小梁板间隙变窄,矿化延迟时间和类骨质成熟时间缩短,且差异均有显著性($P < 0.05$)。结论 染料木黄酮有促进骨形成,减少切除卵巢后骨量丢失的作用。

关键词: 染料木黄酮; 骨质疏松; 去除卵巢大鼠; 骨组织形态计量学

Effects of genistein on bone histomorphometric parameters in ovariectomized rats ZHANG Yuehong, JIN Hong, XU Zhiqin, et al. Department of Nutrition, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To study the effects of genistein on bone histomorphometric parameters of femoral distal diaphysis in ovariectomized rats. **Methods** Wistar female rats were randomly allocated to six groups: the sham-operated, the OVX + estrogen (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ weight), the OVX + genistein (25, 50, 100 mg/kg weight, separately), and OVX group. Having been fed for 13 weeks, the rats were sacrificed, and histomorphometric and dynamic parameters of the rats were analysed. **Results** The trabecular bone volume, the mean trabecular plate density and mean trabecular plate thickness of OVX rats significantly decreased, but their mean trabecular plate space and mean osteoid surface width increased significantly, and mineralization lag time and osteoid maturation period were significantly prolonged, compared with sham-operated group. After three months of genistein supplementation to ovariectomized rats, the trabecular bone volume, mean osteoid surface width, mineralization lag time, and osteoid maturation period were significantly improved. **Conclusions** Genistein reduces bone loss in ovariectomized rats.

Key words: Genistein; Osteoporosis; Ovariectomized rats; Bone histomorphometry

骨质疏松症主要见于绝经后妇女,雌激素替代疗法是首选方案。大豆异黄酮的结构与雌激素相似,提示大豆异黄酮可能预防骨质疏松骨量的减少。染料木黄酮是大豆异黄酮的主要成分^[1],故本实验通过给去除卵巢大鼠补充不同剂量的染料木黄酮,并运用骨组织形态计量学方法研究染料木黄酮对去势大鼠的作用,为染料木黄酮预防骨质疏松提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组与饲养

10 周龄雌性 Wistar 大鼠 47 只(本所实验动物中心提供),体重(170 $\pm$ 20)g。饲正常饲料 6 周后,饲自配正常 AIN-93 合成饲料 5 d^[2],按体重随机分为 2 组:去势组(40 只)和假手术组(7 只)。去势组手术切除大鼠双侧卵巢,假手术组只做腹部切开术,术后恢复 5 d,将去势组按体重随机分为 5 组:去势对照组、雌激素组(己烯雌酚 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重 $\cdot \text{d}^{-1}$),染料木黄酮 I、II、III 组(剂量分别为 25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重 $\cdot \text{d}^{-1}$),每组 8 只。所有动物均饲低钙、低磷和低维生素 D 饲料(AIN-93M-MX 中钙、磷和维生素 D 按

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院(张月红、薛长勇);卫生学环境医学研究所(金宏、许志勤、南文考、王先远、高兰兴)

通讯作者:张月红,Email:zhangyh680@sohu.com

30%给予),雌激素组自由进食和蒸馏水,其余各组与雌激素组对喂,饲养3个月。

1.2 骨组织形态计量学参数^[3]

1.2.1 四环素双标记:于处死前第15天进行第1次标记,方法为:四环素 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重分两次灌胃,连续2d;9d后进行第2次标记,方法同前。在第2次标记后3d眼眶取血后断头处死,取右侧股骨备用。

1.2.2 不脱钙骨切片的制备:将留取的右侧股骨远端1/3固定后逐级脱水,浸入3:7甲基丙烯酸丁(甲)酯中24h(真空负压650 mm Hg),以半聚合的甲基丙烯酸丁(甲)酯包埋。将每个标本用Jung K重型切骨机连续切4张 $7\text{ }\mu\text{m}$ 厚的不脱钙切片,分别进行von Kossa及Gemisa染色,在普通光学显微镜及荧光显微镜下进行观察和测量。

1.2.3 骨组织形态计量学参数的测量和计算:

MPIAS-500彩色病理图象分析仪(同济医科大学清平影像公司)测量股骨骺端生长板下5 mm范围内骨切片的形态学和动态学参数。

1.3 统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 去势大鼠股骨形态学参数的变化:去势后骨小梁体积和平均骨小梁板密度减少,而平均骨小梁板间隙增加;与假手术组比较均差异具有显著性($P < 0.05$),说明去除卵巢后骨量减少,骨小梁离散程度增加,连接性减弱。补充染料木黄酮后各组大鼠骨小梁体积、平均骨小梁板厚度和密度增加,而平均骨小梁板间隙有降低的趋势。这一结果说明补充染料木黄酮后可减少去除卵巢后骨量的丢失,使骨小梁离散度减弱,连接性增强,结果见表1。

表1 大鼠股骨形态计量学参数($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	骨小梁体积(%)	平均骨小梁板厚度(μm)	平均骨小梁板密度(mm^2)	平均骨小梁板间隙(μm)
假手术组	6	20.27 ± 4.54	190.20 ± 40.54	1.26 ± 0.14	612.77 ± 95.40
去势对照组	6	$9.50 \pm 2.06^*$	171.34 ± 27.43	$0.66 \pm 0.12^*$	$1396.61 \pm 278.92^*$
雌激素组	6	$16.42 \pm 0.60^{\#}$	$240.48 \pm 20.66^{\#}$	$0.81 \pm 0.08^{\#}$	$1006.35 \pm 108.54^{\#}$
染料木黄酮I	6	$14.28 \pm 2.61^{\#}$	$221.46 \pm 30.15^{\#}$	0.76 ± 0.10	1115.19 ± 177.17
染料木黄酮II	6	$14.60 \pm 3.61^{\#}$	$236.23 \pm 32.60^{\#}$	0.73 ± 0.14	1172.74 ± 225.92
染料木黄酮III	6	$15.60 \pm 2.23^{\#}$	$242.90 \pm 12.86^{\#}$	0.76 ± 0.14	1111.70 ± 263.40

注:与假手术组比较* $P < 0.05$;与去势组比较 $^{\#} P < 0.05$

2.2 大鼠股骨动态学参数的变化:去势后大鼠类骨质宽度增加,矿化延迟时间和类骨质成熟时间延长,与假手术组比较差异均具有显著性($P < 0.05$),说明去势后骨矿化延迟。补充染料木黄酮后各组大鼠类骨质宽度减小,矿化延迟时间和类骨质成熟时间缩短,与去势组比较差异具有显著性($P < 0.05$),说明染料木黄酮通过促进骨矿化,减少去除卵巢后骨量的丢失,结果见表2。

表2 去势大鼠动态学参数($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	类骨质宽度(μm)	矿化延迟时间(d)	类骨质成熟时间(d)
假手术组	6	2.34 ± 0.26	1.67 ± 0.35	13.49 ± 4.09
去势对照组	6	$7.04 \pm 0.32^*$	$4.96 \pm 0.99^*$	$26.99 \pm 7.70^*$
雌激素组	6	$5.07 \pm 0.69^{\#}$	$3.28 \pm 0.60^{\#}$	$16.46 \pm 4.34^{\#}$
染料木黄酮I	6	$5.18 \pm 0.64^{\#}$	$3.35 \pm 0.41^{\#}$	$15.61 \pm 3.36^{\#}$
染料木黄酮II	6	$4.87 \pm 0.77^{\#}$	$3.18 \pm 0.69^{\#}$	$14.53 \pm 3.84^{\#}$
染料木黄酮III	6	$5.17 \pm 0.20^{\#}$	$3.21 \pm 0.26^{\#}$	$14.18 \pm 2.19^{\#}$

注:与假手术组比较* $P < 0.05$;与去势组比较 $^{\#} P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松是一种常见病,它以骨量减少、骨组织微细结构破坏、骨脆性和骨折危险性增加为特征。流行病学调查结果显示,以豆类食品为主的东方女性中骨质疏松和骨折发病率明显低于食用脂肪和肉类的西方女性^[4,6];排除人种、遗传、锻炼、体型等因素,豆类制品中的异黄酮与骨质疏松的关系成为目前研究热点。染料木黄酮是大豆异黄酮的主要成分,故本实验从骨组织形态计量学角度研究不同剂量的染料木黄酮对骨质疏松大鼠的作用。

骨组织形态计量学是一种应用数学和几何学的方法,研究骨骼组织的质(骨结构)和量(骨量)等形态学静态特性的测量技术。由于荧光标记剂的应用和细胞染色技术的发展,骨组织形态计量学还被用来测量骨组织形态细胞水平的动态特性,例如骨矿化延迟时间和类骨质成熟时间等重要参数,这些参数都能反映骨的重建过程^[7,8]。骨重建过程包括骨

吸收和骨形成两部分,在正常情况下骨吸收和骨形成处于动态平衡中,骨量可维持在正常范围内。去除卵巢后体内雌激素骤减导致骨转换加速,骨吸收与骨形成之间出现失衡,骨吸收大于骨形成导致骨量丢失。骨重建是一系列发生在骨表面的细胞间相互作用的结果。虽然小梁骨只占整个骨体积很少的一部分,但与皮质骨比较,小梁骨可以提供更多的骨表面。骨重建过程也多发生于小梁骨,所以去势后骨质疏松骨量的丢失主要表现为小梁骨的丢失。在实验中,我们观察到去势大鼠股骨骺端骨小梁体积占全部骨组织体积的百分比显著减少,骨小梁的空间结构指标平均骨小梁板的密度减少,而平均骨小梁板间隙增大。说明去势大鼠股骨骺端骨量减少,而且骨小梁空间结构也发生了变化,主要表现为骨小梁连接性降低,离散程度增加。去势后大鼠动力学指标如平均类骨质宽度增大,骨矿化延迟时间和类骨质成熟时间延长,这些结果提示大鼠去势后骨矿化延迟。骨矿化是骨形成过程中的重要阶段,骨形成过程包括了类骨质的合成分泌和类骨质矿化两个阶段。类骨质矿化延迟,从而使一定时间内骨形成的总量相对减少,导致骨吸收超过骨形成,造成骨量丢失。

实验结果显示,补充不同剂量的染料木黄酮后能明显增加去势后大鼠骨小梁体积,增大去势后大鼠平均骨小梁板厚度和平均骨小梁板的密度,减少了平均骨小梁板间隙。这些实验结果提示,染料木黄酮不但可以逆转去势后大鼠骨量的减少,而且通过增加骨小梁板的厚度,降低骨小梁的离散度,增加连接性,改善了去势后大鼠骨小梁的空间结构。动力学结果进一步显示,染料木黄酮可减少平均类骨

质宽度,缩短骨矿化延迟时间和类骨质成熟时间,提示染料木黄酮通过促进骨矿化,从而使一定时间内骨形成的相对量增加,骨形成超过骨吸收,阻止了去势后骨质疏松骨量的减少,其具体机制仍需进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety crop year and location. *J Agric Food Chem*, 1994, 43: 1674-1679.
- [2] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 1993, 123: 1939.
- [3] 叶伟强,于顺禄,马宝通,等. 辛伐他汀间断给药对去除卵巢大鼠成骨作用的初步实验观察. *中华骨科杂志*, 2001, 21: 428-432.
- [4] Ross PD, Norimatsu H, Davis TW, et al. A comparison of hip fracture incidence in native Japanese, Japanese Americans, and American Caucasians. *Am J Epidemiol*, 1991, 133: 801-809.
- [5] Fujita T, Fukase M. Comparison of osteoporosis and calcium intake between Japan and the United States. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992, 200: 149-152.
- [6] Kin K, Lee JH, Kushika K, et al. Bone density and body composition on the Pacific Rim: a comparison between Japan-born and the US-born Japanese-American women. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 861-869.
- [7] Li XJ, Jee WS, Li YL, et al. Transient effects of subcutaneously administered prostaglandin E₂ on cancellous and cortical bone in young adult dogs. *Bone*, 1990, 11: 353-364.
- [8] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Reports of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Min Res*, 1987, 2: 595-611.