

大豆异黄酮减缓去卵巢大鼠骨量丢失的实验研究

叶艳彬 苏宜香 卓淑雨 方仕 卢味

摘要: 目的 研究大豆异黄酮对雌激素缺失状态下大鼠骨量丢失及骨转换的影响。方法 12 月龄雌性 SD 大鼠 40 只随机分为 4 组, 除假手术组大鼠行卵巢切除假手术外, 其余均切除卵巢建立雌激素缺失模型。分组设计为: 实验组〔大豆异黄酮类 40 mg/(kg·d)〕及元素钙 250 mg/(kg·d), 假手术组〔蒸馏水〕、实验对照组〔元素钙 250 mg/(kg·d)〕及雌激素组〔雌二醇 30 μg/100 (g·3d) 及元素钙 250 mg/(kg·d)〕, 除雌二醇皮下注射给予外, 其余灌胃给予。28 d 实验期满后处死大鼠, 取股骨测定骨密度、股骨钙含量、股骨形态计量学相关指标, 并测定血清碱性磷酸酶 (AKP) 活性及血清骨钙素 (OC) 水平。结果 实验组股骨骨密度、股骨钙含量稍高于假手术组和实验对照组, 但未呈显著性差异 ($P>0.05$); 实验组骨小梁面积与假手术组无显著差异 ($P>0.05$); 各组动物 AKP 活性无显著差异 ($P>0.05$); 实验组和雌激素组 OC 水平显著高于假手术组 ($P<0.01$)。结论 大豆异黄酮具有弱雌激素样作用, 可能通过促进成骨形成而减少雌激素缺失状态下的骨丢失, 维持骨健康, 预防绝经后骨质疏松。

关键词: 大豆异黄酮; 卵巢切除; 大鼠; 骨丢失

Effects of soy isoflavones on bone loss in ovariectomized rats YE Yanbin, SU Yixiang, ZHUO Shuyu, et al. Nutrition Department of the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To study the effects of soy isoflavones on preventing bone loss and bone exchange in ovariectomized rats. **Methods** Forty female SD rats of 12-month-old were randomly assigned into four groups. All rats were ovariectomized except those in the sham group. The experimental group were fed by isoflavones 40mg/kg·d aglycones and calcium 250mg/kg·d, the sham group by distilled water with the same dose of the experimental group, the experimental control group by calcium 250mg/kg·d, and the estrogen control group by injection of 17β-estradiol 30μg/100 g. bw. 3 d and fed by calcium 250 mg/kg·d. All rats were sacrificed on the 28th day and the following indices were observed: calcium content of femur, femur histomorphometric indices, serum alkaline phosphates (AKP) activities and osteocalcin (OC) concentration. **Results** The OC level in the experimental and estrogen groups was higher than that of the sham group ($P<0.01$). No other significant difference was found in other indices among different groups. ($P>0.05$) **Conclusions** Soy isoflavones can attenuate the bone loss and prevent osteoporosis after menopause due to its slight estrogen-like effect. **Key words:** Soy isoflavones; Ovariectomy; Bone loss; Rats

大豆及其制品是中国和东南亚地区的传统食品, 多项研究证明具有降胆固醇、血压, 改善糖尿病, 预防肿瘤等多种作用。这主要与其中含有的一类植物活性物质——大豆异黄酮类化合物有关。大豆

异黄酮属异喹啉类化合物, 结构与雌激素相似, 具弱雌激素样作用和抗氧化功能, 其中起主要作用的是金雀异黄素 (Genistein) 和大豆素 (Daidzein)。国外的动物和人体的试验资料及流行病学资料报道大豆异黄酮可减少骨量丢失^[1-4], 预防绝经后骨质疏松症, 本实验室的有关大豆异黄酮类的动物实验结果表明, 大豆或大豆分离蛋白预防骨质丢失作用的有效成分是其中的大豆异黄酮而不是蛋白质本身^[5,6]。Fanti 等^[7]的研究发现 Genistein 可使去卵巢大鼠的骨密度丢失显著低于对照组。体外细胞培养

基金项目: 市科技局立项课题 (2002J1-C0081)

作者单位: 510080 广州, 中山大学附属第一医院营养科 (叶艳彬、卓淑雨、方仕、卢味); 中山大学公共卫生学院营养系 (苏宜香)

通讯作者: 苏宜香 Tel: 020-87333166, Email: suyx@gz-sums.edu.cn

发现单一的大豆甙元 (Daidzein) 可促进成骨 MCT3T3-E1 细胞的生长^[8]。但 Hus 等^[9]报道 150 mg/d 大豆异黄酮类提取物不能使绝经后妇女跟骨骨密度明显升高, 且有关大豆异黄酮防止骨丢失的机制报道结果也很不一致, 可能与其采用的受试物形式、剂量、试验的时间等因素有关。本研究以大豆异黄酮类提取物为受试物, 以去卵巢老年雌鼠为研究对象, 设多种对照处理, 观察大豆异黄酮对去卵巢老年雌鼠骨丢失的影响, 并探讨可能的作用机制, 为进一步进行人体临床试验提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

12 月龄、SD 雌性大鼠 40 只, 由西安医科大学动物中心提供。

1.1.2 受试物

大豆异黄酮类提取物, 由大连绿峰天然生物制品公司提供。总异黄酮含量为 22%, 其中 Daidzin 9.5%, Daidzein 1.5%, Genistin 10.3%, Genistein 0.7%, 除去配糖体, 其总有效成分为 14.4%。动物实验用剂量参考徐叔云“药理实验方法”计算。

1.1.3 饲料配方

以酪蛋白取代传统饲料配方中的大豆粉, 并调整至营养素构成不变。

1.1.4 实验试剂

OC 试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供, AKP 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.1.5 实验仪器

722 型光栅分光光度计, AEL-200 分析天平, 美国 Hologic-2000 双能 X 线骨密度仪, 德国 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像分析系统。

1.2 试验方法及内容

1.2.1 动物分组及饲养

实验动物, 实验室单笼饲养适应 1w 后随机分为 4 组, 每组 10 只。假手术组行卵巢摘除假手术, 其余 3 组按常规卵巢摘除术切除双侧卵巢后进入实验期, 按实验设计给予不同的处理。

实验期共 4 w, 期间自由摄食饮水去离子水, 每周称体重、饲料 2 次, 并记录饲料消耗量。

进入实验期的第 3~5 天, 按阴道涂片法涂片置显微镜下进行阴道细胞学检查, 3 次未见大量角化

上皮细胞示卵巢切除手术成功。

试验的第 28 天, 末次给药后 12 h, 股动脉取血后, 脱颈椎处死动物, 分离血清用于作 OC、AKP 的测定; 分离双侧股骨, 左侧股骨用美国 Hologic-2000 双能 X 线骨密度仪测定骨密度及股骨钙含量; 右侧股骨用于骨组织形态学及计量学分析。

1.2.2 受试物给予方式

实验组灌胃给予大豆异黄酮类配方, 按灌胃量为 1 ml/150 g. bw/d 配制, 并配以元素钙 250 mg/kg. bw/d, 实验对照组给予等量钙剂, 假手术组灌等量去离子水, 雌激素对照组以皮下注射方式给予雌二醇 30 μ g/100 g. bw/3 d 及灌胃给予等量钙剂。

1.2.3 测定指标及方法

①骨转换: 以血清 AKP 活性、血清 OC 为指标, 按放免试剂盒的要求操作。

②股骨骨密度: 双能 X 线骨密度仪 (dual energy X-ray absorptiometry, DEXA) 测定左侧股骨骨密度。

③股骨钙量: EDTA 滴定法测左侧股骨钙含量。

④骨形态计量学分析: 取右侧股骨, 按常规病理学方法固定、脱钙制作股骨切片, 苏木素-伊红染色^[10] (HE 染色法), 以德国 Zeiss 公司的 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像分析系统做骨组织形态计量学测定^[11], 测骨小梁面积百分比 (Tb. ar%)、骨小梁数目 (Tb. n)、骨小梁间隔 (Tb. sp)。

1.2.4 数据处理与统计

所有数据以 SPSS10.0 软件: 包建库并计算各组各指标的平均值, 统计方法采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

实验期第 3 天, 实验对照组及实验组各有 1 只动物因感染死亡。

2.2 大豆异黄酮类对去卵巢雌性大鼠骨代谢的影响

2.2.1 大豆异黄酮类对去卵巢雌性大鼠骨量的影响见表 1。

大豆异黄酮类实验组股骨骨密度及股骨钙含量有高于实验对照组和假手术组的倾向, 股骨骨密度与假手术组及雌激素对照组无显著性差异, 而雌激素组股骨骨密度显著高于实验对照组 ($P < 0.05$), 且其股骨钙含量显著高于其他 3 组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠股骨骨密度及股骨钙含量 (x±s)

组别	例数	骨密度 (g/cm ²)	股骨钙 (mmol)
假手术组	10	0.1061±0.0278	3.199±0.399
实验对照组	9	0.0904±0.0103	3.060±0.190
雌激素对照组	10	0.116±0.0248 ^b	3.885±0.224 ^{ac}
实验组	9	0.109±0.0292	3.296±0.716 ^d

注: ^a 与假手术组比, $P<0.01$; ^d 与实验对照组比, $P<0.05$; ^c 与实验对照组比, $P<0.01$; ^d 与雌激素对照组比, $P<0.01$

2.2.2 大豆异黄酮类对去卵巢雌性大鼠骨转换的影响 见表 2。

组血清骨钙素水平极显著高于假手术组 ($P<0.01$), 假手术组的 OC 与其他三组无显著性差异 ($P>0.05$)。

各组动物血清碱性磷酸酶活性无显著性差异 ($P>0.05$), 而雌激素对照组和大豆异黄酮类实验

表 2 各组大鼠血清 AKP 活性及 OC 含量 (x±s)

组别	例数	AKP (TU/100ml)	OC (μg/ml)
假手术组	10	45.790±20.393	1.510±0.452
实验对照组	9	52.538±20.633	2.469±0.844
雌激素对照组	10	48.996±15.134	2.615±0.470 ^a
实验组	9	51.791±18.561	2.830±1.500 ^a

注: ^a 与假手术组比, $P<0.01$

2.2.3 大豆异黄酮类对去卵巢雌性大鼠股骨远端松质骨形态计量学的影响 见表 3。

实验对照组骨小梁面积显著低于假手术组和雌激素对照组 ($P<0.01$), 实验组骨小梁面积低于雌

激素组 ($P<0.05$), 但大豆异黄酮类实验组骨小梁面积与正常对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。骨小梁数目、骨小梁间隔各组差异无显著意义。

表 3 各组大鼠股骨远端松质骨形态学参数 (x±s)

组别	例数	Tb. ar% (%)	Tb. n (2/mm)	Tb. sp (μm)
假手术组	10	43.78±4.28 ^a	6.34±1.28	91.19±16.57
实验对照组	9	33.99±2.06	6.41±1.67	111.74±40.82
雌激素对照组	10	44.84±3.70 ^a	6.80±0.40	88.38±8.53
实验组	9	36.54±8.51 ^b	6.29±1.13	104.61±23.22

注: ^a 与实验对照组比, $P<0.1$; ^b 与雌激素对照组比, $P<0.05$

3 讨论

大豆异黄酮是存在于大豆中的一类与雌激素相似结构相似的化合物, 可与雌激素受体 ER 结合, 发挥弱的雌激素样效应^[12]。雌激素是女性特征的标志物, 它不但维持女性生殖系统的完整和性功能的正常, 而且对维持心血管、骨质的健康有重要的作用。

女性和雌性动物在雌激素缺失状态下, 骨代谢呈现高形成及高吸收的高转换状态, 其中骨吸收大于骨形成, 导致骨钙的流失而引起绝经后骨质疏松症^[13]。本实验采用测定大鼠股骨骨密度及股骨钙含量, 同时采用骨组织计量学方法观察大豆异黄酮对

大鼠骨量和骨形态的影响。结果发现, 大豆异黄酮组股骨骨密度及股骨钙含量有高于实验对照组的倾向, 但与假手术组差异无显著性, 雌激素组股骨骨密度及股骨钙含量最高, 另外骨组织计量学结果只发现实验对照组, 骨小梁面积显著低于假手术组和雌激素对照组, 而大豆异黄酮组骨小梁面积与假手术组差异无显著性。上述结果提示, 在大豆异黄酮组与实验对照组的比较中, 除去钙的因素后, 大豆异黄酮与雌激素类似, 对去卵巢大鼠的骨钙流失有一定的抑制作用, 但作用较雌激素弱, 文献报道^[14]其雌激素效应约为雌二醇的 1/1000 ~ 1/10000。另有文献报道^[6] 喂饲含大豆异黄酮的大豆蛋白 10 w 后, 去卵巢雌鼠骨密度、骨钙含量和骨小梁面积、数目均显著高于喂饲不含异黄酮的大豆蛋白的大鼠

和喂饲酪蛋白的大鼠,此结果与本实验相似,可能由于实验时间较短或剂量问题,大豆异黄酮的处理未显示出显著性差异,如实验时间延长或剂量加大,效果可能更显著。

有关大豆异黄酮防止骨量丢失的机制报道不多,有关其促进骨的形成,或抑制骨的转换,或既促进形成、又抑制吸收等几方面的机制都有报道^[15-19],结果不一致。本实验中各组动物血清碱性磷酸酶活性差异无显著性。卵巢摘除后的三组大鼠的血清骨钙素水平趋向于比假手术组高,此与卵巢摘除后(绝经后)骨的转换率升高有关^[13],而其中雌激素对照组和大豆异黄酮组血清 OC 水平极显著高于假手术组,此与 Scheiber 等^[17]的人体实验结果一致。另外本实验室的体外成骨细胞培养实验^[20]也发现大豆异黄酮可促进成骨细胞 OC 的表达。骨钙素是成骨细胞分泌的活性物质,是成骨细胞形成的重要标志,具特异性,而总碱性磷酸酶特异性较差。有关研究已报道^[21]单独补充钙元素并不能减少雌激素缺失导致的骨质流失及促进骨的形成,所以可忽略补充钙质对骨代谢的影响。

本实验提示大豆异黄酮类及雌激素可能具促进成骨细胞的形成,维持去卵巢大鼠的骨密度值于相对稳定水平,并能轻度增加去卵巢大鼠的骨密度值和骨钙含量的作用,可通过促进成骨细胞的形成而维持雌激素缺失状态下骨密度和骨量的稳定,预防绝经期骨丢失。鉴于本动物实验的时间和剂量,应进一步进行临床的前瞻性研究以确定其效应。

【参 考 文 献】

- [1] Mukies AL, Lombard C, Strauss BJ, et al. Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flashes: effects of soy and wheat. *Maturitas*, 1995, 21: 189-195.
- [2] Dalais FS, Rice GE, Bell RJ. Dietary soy supplementation increases vaginal cytology maturation index and bone mineral content in postmenopausal women (abstract). *Am J Clin Nutr*, 1998, 58 (Suppl): 1518s.
- [3] Cecchini MG, Fleisch H, Muhibauert, RC. Ipriflavone inhibits bone resorption in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61 (Suppl): s9-s11.
- [4] Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B. Effects of combined low dose of isoflavone derivative ipriflavone and estrogen replacement on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women. *Maturitas*, 1997, 28: 75-81.
- [5] 史琳娜, 苏宜香. 大豆预防骨质疏松的实验研究. *食品科学*, 1999, (7): 42-45.
- [6] 史琳娜, 苏宜香. 大豆异黄酮类对去卵巢大鼠骨丢失的影响. *营养学报*, 2000, 22: 113-118.
- [7] Fanti P, Monierc Faugere MC, Geng Z, et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos, Int*, 1998, 8: 274-281.
- [8] Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 471-475.
- [9] Hsu CS, ShEN WW, Hsueh YM, et al. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. Effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. *J Reprod Med*, 2001, 46: 221-226.
- [10] 易家农. 骨组织脱钙、切片和染色. *组织学和组织化学技术*. 湖南医学院. 1986. 109.
- [11] 李春南, 梁念慈, 吴铁, 等. 蛇床子总香豆素对去卵巢大鼠骨骼的影响. *中国药理学报*, 1994, 15: 528-532.
- [12] Shutt DA. Cox steroid and phyto-estrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *J Endocr*, 1972, 52: 299-310.
- [13] Ross PD, Knowlton W. Rapid bone loss is associated with increased level of biochemical markers. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 297-302.
- [14] Mayr U, Butsch A, Schneider S. Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearlenone phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology*, 1992, 74: 135-149.
- [15] Fanti O, Faugere MC, Gang Z, et al. Systematic administration of genistein partially prevents bone loss in ovariectomized rats in a nonestrogen-like mechanism. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68 (Suppl): 1517s-1518s.
- [16] Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, et al. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoblastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 1996, 61: 629-637.
- [17] Scheiber MD, Liu JH, Subbiah MT, et al. Dietary inclusion of whole soy food results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis & cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause*, 2001, 8: 384-392.
- [18] Picherit C, Bennetau Pelissero C, Chanteranne B, et al. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*, 2001, 131: 723-728.
- [19] Wangen KE, Duncan AM, Merz Demlow BE, et al. Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol-Metab*, 2000, 85: 3043-3048.
- [20] 邹海滨, 苏宜香. 大豆异黄酮类对体外培养大鼠成骨细胞的影响. *营养学报*, 2002, 24: 260-264.
- [21] Gala J, Diaz Curiel M, dela-Piedra C, et al. Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. *Br J Nutr*, 2001, 86: 521-527.

(收稿日期: 2004-08-01)