

大豆异黄酮对肾辐射损伤大鼠骨量和骨结构的影响

吴明玉 朱国英 高林峰 项希桥

摘要:目的 观察大豆异黄酮对肾辐射损伤大鼠骨量、骨生物力学和骨形态计量的影响。方法 应用 ^{137}Cs γ 射线局部照射大鼠双侧肾脏,建立肾损伤引起继发性骨质疏松模型,以假照射组大鼠为对照。术后 7 d 开始用药,给予大豆异黄酮(100 mg/kg·d),以萌格旺(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$)为阳性对照药物,治疗 3 个月后处死大鼠,观察骨量、骨生物力学和骨形态计量学指标改变,综合评价大豆异黄酮对肾辐射损伤性骨质疏松的防治作用。结果 肾辐射损伤大鼠骨量、骨生物力学指标较假照射组显著降低($P < 0.05$),表明肾辐射损伤引起大鼠继发性骨质疏松模型成功;大豆异黄酮治疗能明显增加模型大鼠的腰椎 BMD、股骨干重与灰重,提高股骨三点弯曲最大载荷,增加腰椎骨小梁面积百分比($P < 0.05$)。结论 大豆异黄酮对肾局部辐射损伤诱导骨质疏松模型大鼠的骨量和骨结构有明显改善作用。

关键词:大豆异黄酮;辐射;肾性骨病;骨生物力学;骨组织形态计量学

Effects of soy isoflavones on bone mass and bone structure in rats by radioactive injury to kidney WU Mingyu, ZHU Guoying, GAO Linfeng, et al. Radiology Institute of Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To study the effects of soy isoflavones on bone mineral density, histomorphometry and biomechanics in rats with osteoporosis induced by irradiation of the rat kidney. **Methods** Thirty two 3-month-old male SD rats were randomly assigned into 4 groups evenly, i. e. the radiation group (Rad), the non-radiation group (Non-Rad), the Bon-One group (Bon-One) and the soy isoflavones group (SI). All rats were administrated single ^{137}Cs γ -ray irradiation by exposing double kidneys through operation except those in the Non-Rad group. From 7 days after operation, the SI group were fed by soy isoflavones 100 mg/(kg·d), the Bon-One group by Bon-One 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$, the Rad group and Non-Rad group by same volume of distilled water. 90 days later, all rats were sacrificed and the following indices were observed: BMD of L1-L5, the bone histomorphometry and bone biomechanical properties. **Results** BMD of L1-L5, maximal load of femur and volume and number of bone trabecula decreased significantly in Rad group compared to those in Non-Rad group, which shows the model is successful. Compared with the Rad group, the SI group was characterized with significantly higher BMD of L1-L5 and maximal load of femur ($P < 0.05$), significantly larger volume and number of bone trabecula and smaller space of bone trabecula ($P < 0.05$). **Conclusions** Soy isoflavones can improve BMD, bone histomorphometry and bone biomechanical properties in rat osteoporosis induced by kidney irradiation.

Key words: Soy isoflavones; Radiation; Renal osteodystrophy; Bone biomechanics; Bone histomorphometry

近年来,随着肿瘤尤其是腹部肿瘤发病率的升高,放射治疗应用增加。腹部肿瘤放疗可导致肾损伤,并发性肾性骨病及肾性骨病,严重影响患者的生存质量。目前,对于肾性骨病尚缺乏有效的治疗方

法。维生素 D 制剂、双膦酸盐、降钙素和雌激素等可以一定程度的改善骨质量,但都存在一些不良反应^[1],且价格昂贵,依从性差。大豆异黄酮可用于防治绝经后骨质疏松症,但其对肾性骨病的防治作用及作用机理研究报道甚少。本实验应用大剂量 γ 射线局部照射大鼠双侧肾脏建立肾损伤诱导骨质疏松模型,以萌格旺为对照,观察大豆异黄酮对辐射肾性骨病模型大鼠骨量、骨生物力学和骨形态计量的

基金项目:上海市科委科技攻关项目(034119909)

作者单位:200032 上海,复旦大学放射医学研究所(吴明玉、朱国英、项希桥);上海市疾病预防控制中心(高林峰)

通讯作者:朱国英,Email Zhugy@sh163.net

影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:清洁级健康雄性 SD 大鼠, 3 月龄, 体重 280~310 g, 由复旦大学医学院实验动物科学部提供。许可证号 SCXK(沪)2003-0002。

1.1.2 主要仪器:Gamma cell 40 ^{137}Cs γ 辐射装置, Canada; HOLOGIC QDR 4000 双能量 X 线骨密度仪, USA; AG-20 KNA 岛津万能材料测试仪, Japan; LEICA SP 1600 硬组织切片机, Germany; METTLER TOLEDO XS 105 十万分之一电子天平, 带密度组件; Nikon 80i 荧光显微镜; Pixera 150 CL 荧光显微数码成像系统, 美国 Pixera 公司; Simple PCI 专业图象分析软件, 美国 Compix 公司。

1.1.3 药物:大豆异黄酮粉剂, 华北制药股份有限公司, 批号 20040704, 纯度 90%, 其中 Genistin 5.02%, Genistein 0.42%, Daidzin 53.05%, Daidzein 1.27%, Glycitin 33.47%, Glycitein 0.87%; 萌格旺 (Bon-One) 片 0.5 μg /片, 日本帝人制药株式会社生产, 批号 5909。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 SD 大鼠 32 只, 按体重随机分为 4 组: 辐照组 (Rad), 假照射组 (Non-Rad), 大豆异黄酮治疗组 (SI), 萌格旺治疗组 (Bon-One), 每组 8 只。

1.2.2 模型制备及用药方法:常规麻醉, 消毒, 手术暴露两侧肾脏, 生理盐水纱布覆盖, 将大鼠侧卧位固定于特制模具上, 铅板遮挡肾脏以外的组织, 暴露肾脏放置于 ^{137}Cs γ 射线照射装置中照射, 照射剂量为 15Gy (剂量率为 0.89 Gy/min)。照射后小心回复肾脏, 逐层缝合切口。Non-Rad 组拉出肾脏不照射, 同步放回后缝合刀口。照射后 1 w 开始给药治疗, SI 组给予大豆异黄酮 100 mg/(kg·d), Bon-One 组给予萌格旺 0.1 μg /(kg·d), 溶于 2 mL 蒸馏水, Rad 组和 Non-Rad 组给予同体积蒸馏水, 均灌胃给予, 持续 3 个月后处死大鼠。处死前 14 d, 4 d 两次腹腔注射盐酸四环素进行荧光标记。

1.2.3 检测指标及方法

①骨密度:取腰椎 1~5, 去除周围肌肉, 双能 X 线骨密度仪测量 BMD (g/cm^2)。

②干重和灰重:分离左侧股骨, 120°C 干燥 1 h, 阿基米德法测量体积 (cm^3), 脱脂 (三氯甲烷、甲醇 3:1 混合液) 72 h, 120°C 干燥 1 h, 十万分之一电子天平称量干重 (g/cm^3), 置 800°C 马福炉内灰化 6 h, 取

出称量灰重 (g/cm^3)。

③骨生物力学:分离 L₅ 椎平椎体上下表面, 去除软组织, 连同右侧股骨, 置于万能材料测试仪上, 跨距 20 mm, 速度 2 mm/min 分别进行腰椎压缩实验和股骨三点弯曲实验, 测定最大载荷 (Max Load)。

④骨组织形态计量:10% 中性甲醛固定 L₄, 脱钙后 HE 染色, 光学显微镜下摄片, Simple PCI 图像分析软件测定并计算骨小梁面积 (Tb.Ar%)、骨小梁数目 (Tb.N) 和骨小梁分离度 (Tb.Sp) 等骨量、骨结构参数。取左侧胫骨近端 1/3, Million's 液固定, 乙醇梯度脱水, 甲基丙烯酸甲酯渗透包埋, 硬组织切片机作 20 μm 厚切片, 中性树脂封片后在荧光显微镜下观察四环素荧光, 摄片, Simple PCI 图像分析软件计算矿化沉积率 MAR (MAR = 四环素双标记间距/间隔天数)。

1.2.4 统计学方法:所得数据输入计算机用 SPSS 11.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析, Bonferroni 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异显著性。

2 结果

2.1 肾辐射损伤大鼠骨质疏松模型建立

大鼠双侧肾脏局部照射后 3 个月, 骨干重、灰重、BMD 等骨量指标与股骨三点弯曲载荷和腰椎压缩载荷等指标均较 Non-Rad 组明显降低 (见表 1、表 2)。与 Non-Rad 组比较, Rad 组的腰椎 BMD 下降 9.4% ($P < 0.05$), 股骨干重、灰重分别下降 6.1% ($P < 0.05$) 和 5.7% ($P < 0.05$), 股骨三点弯曲载荷下降 15.5% ($P < 0.05$), 腰椎压缩载荷也有一定程度下降, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$)。此外, Rad 组大鼠骨组织病理出现明显改变, 表现为骨小梁稀疏、断裂, 间距较宽 (见图 1)。Rad 组腰椎骨小梁面积 (Tb.Ar)、骨小梁数目 (Tb.N) 分别较 Non-Rad 组下降 31.5% ($P < 0.05$) 和 40.5% ($P < 0.05$), 骨小梁分离度 (Tb.Sp) 较 Non-Rad 组增加 78.0% ($P < 0.05$), 胫骨 MAR 增加 44.4% ($P < 0.05$) 提示肾辐射损伤大鼠骨转换明显加快 (见表 3、图 2)。以上结果表明肾辐射损伤大鼠在照后 3 个月时出现明显的骨质疏松, 肾辐射损伤诱导大鼠骨质疏松模型成功。

2.2 大豆异黄酮对肾辐射损伤诱导 OP 大鼠骨量的影响

与 Rad 组比较, SI 组和 Bon-One 组大鼠腰椎 BMD 分别增加 4.5% ($P < 0.05$) 和 7.4% ($P < 0.05$), 股骨干重分别增加 4.6% ($P < 0.05$) 和 7.5% ($P < 0.05$), 股骨灰重分别增加 5.6% ($P < 0.05$) 和

表1 各组大鼠腰椎 BMD 及股骨干重灰重($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰椎 BMD(g/cm^2)	股骨干重(g/cm^3)	股骨灰重(g/cm^3)
Non-Rad	8	0.223 ± 0.014	1.189 ± 0.029	0.813 ± 0.026
Rad	8	0.202 ± 0.006 [#]	1.116 ± 0.057 [#]	0.767 ± 0.039 [#]
IS	8	0.211 ± 0.006 [*]	1.167 ± 0.061 [*]	0.810 ± 0.048 [*]
Bon-One	8	0.217 ± 0.004 [*]	1.200 ± 0.037 [*]	0.825 ± 0.027 [*]

注:与 Non-Rad 组比较,[#] $P < 0.05$;与 Rad 组比较,^{*} $P < 0.05$

表2 各组大鼠腰椎及股骨最大载荷($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰椎最大载荷(N)	股骨最大载荷(N)
Non-Rad	8	438.20 ± 73.57	232.48 ± 11.68
Rad	8	350.20 ± 87.64	196.40 ± 14.54 [#]
IS	8	408.20 ± 132.08	231.73 ± 21.26 [*]
Bon-One	8	428.70 ± 100.76	248.48 ± 8.08 [*]

注:与 Non-Rad 组比较,[#] $P < 0.05$;与 Rad 组比较,^{*} $P < 0.05$

7.6%($P < 0.5$)见 表 1)。表明大豆异黄酮能明显

增加肾辐射损伤大鼠的骨量。

2.3 大豆异黄酮对肾辐射损伤诱导 OP 大鼠骨生物力学性能的影响

与 Rad 组比较,IS 组、Bon-One 组股骨三点弯曲最大载荷分别上升 17.9%($P < 0.05$)和 26.5%($P < 0.05$)。腰椎压缩最大载荷也呈现升高趋势,但无显著性意义($P > 0.05$)见 表 2)。表明大豆异黄酮能明显提高肾辐射损伤大鼠的骨生物力学性能。

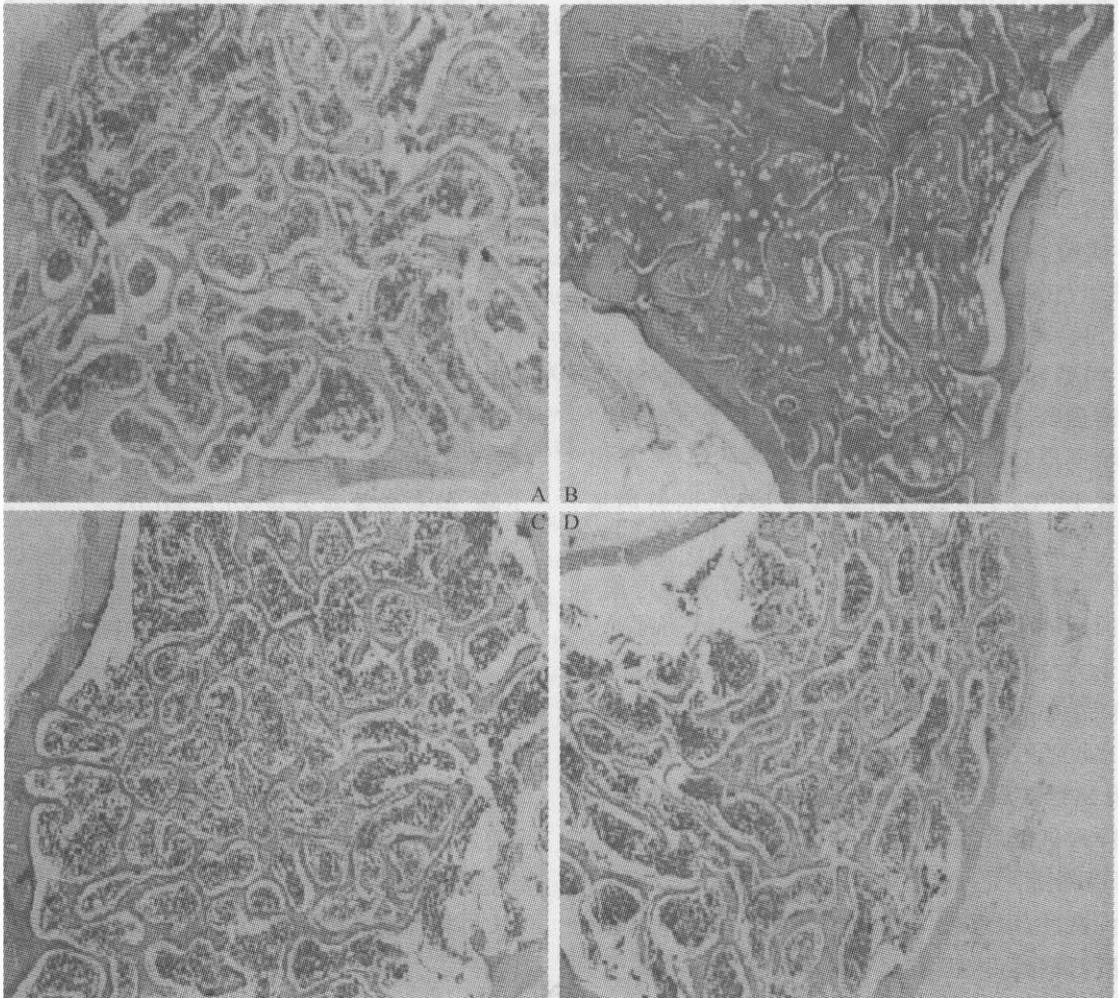


图1 光镜下各组腰椎骨小梁结构改变(HE × 40)

- A 假照射组(Non-rad) 正常对照骨小梁 B 模型组(Model) 骨小梁稀疏、断裂,间距较宽,骨髓腔面积增大
C 大豆异黄酮治疗组(SI) 骨小梁较致密、连续,间距较窄 D 萌格旺治疗组(Bone one) 与 C 组小梁形态相似

表3 各组大鼠骨形态计量学指标($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰椎 Tb. A(%)	腰椎 Tb. N(/mm)	腰椎 Tb. S _q (mm)	胫骨 MAR($\mu\text{m/d}$)
Non-Rad	4	25.65 ± 3.97	5.73 ± 2.20	143.81 ± 49.85	3.13 ± 0.76
Rad	4	17.57 ± 4.18 [#]	3.41 ± 0.88 [#]	255.92 ± 74.52 [#]	4.52 ± 0.57 [#]
IS	4	28.75 ± 2.39 [*]	5.50 ± 0.99 [*]	132.95 ± 26.09 [*]	3.32 ± 0.67 [*]
Bon-One	4	28.45 ± 4.61 [*]	5.71 ± 0.69 [*]	155.54 ± 31.88 [*]	3.20 ± 0.46 [*]

注:与 Non-Rad 组比较,[#] $P < 0.05$;与 Rad 组比较,^{*} $P < 0.05$

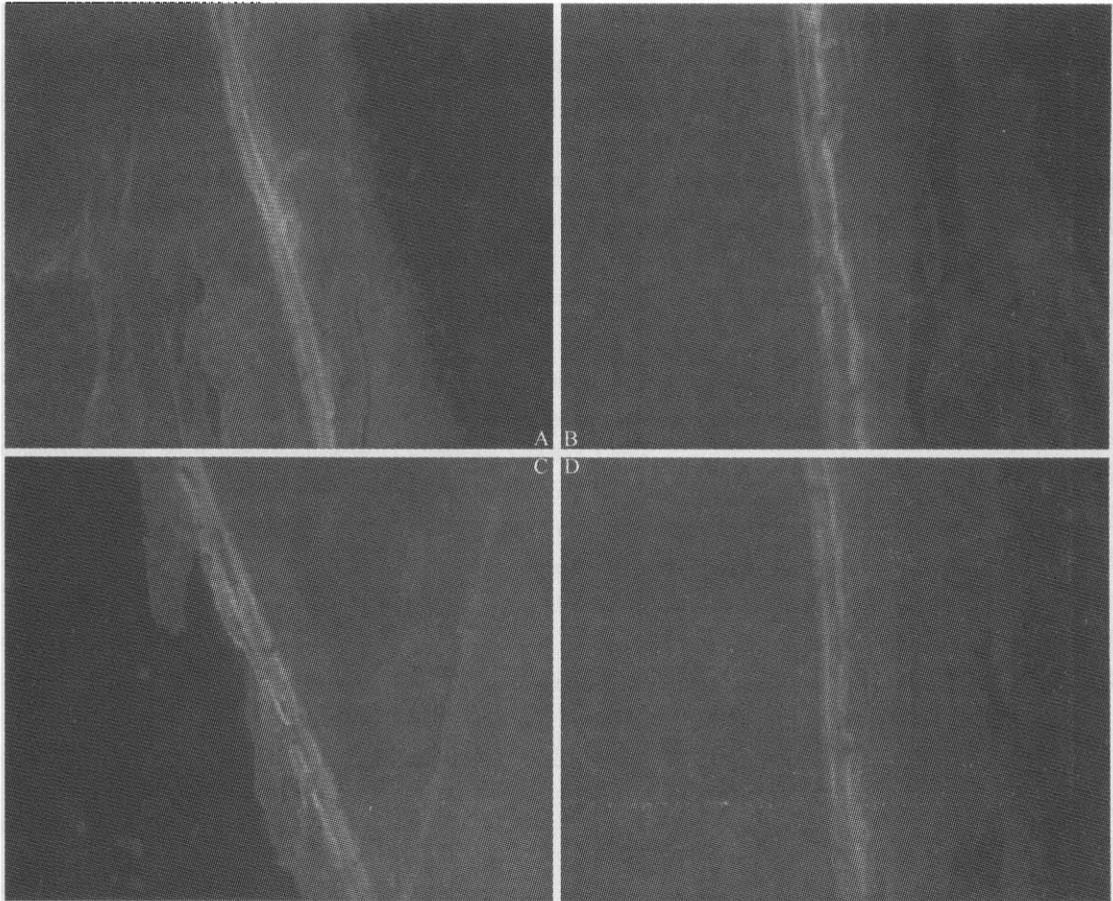


图2 胫骨皮质四环素荧光双标记($\times 100$)

A 假照射组(Non-rad) B 模型组(Model) C 大豆异黄酮治疗组(SI) D 萌格旺治疗组(Bone one)

2.4 大豆异黄酮对肾辐射损伤诱导 OP 大鼠骨形态计量的影响

大豆异黄酮和萌格旺治疗组大鼠腰椎骨小梁较致密、连续,间距较窄(见图1)。与 Rad 组相比,IS 组和 Bon-One 组大鼠腰椎骨小梁面积分别增加 63.6%($P < 0.05$)和 61.9%($P < 0.05$);骨小梁数目分别增加 61.3%($P < 0.05$)和 167.4%($P < 0.05$);骨小梁分离度分别下降 48.1%($P < 0.05$)和 39.2%($P < 0.05$);胫骨 MAR 分别下降 26.5%($P < 0.05$)和 29.2%($P < 0.05$)(见表3、图2)。表明大豆异黄酮能明显改善肾辐射损伤大鼠骨小梁结构,并降低骨转换速度。

3 讨论

肾脏是骨代谢的重要调节器官,肾功能损伤导致的骨代谢障碍称为肾性骨病。肾脏属于辐射较敏感组织,腹部肿瘤放射治疗可导致肾脏损伤,进而引起骨矿代谢的紊乱。肾辐射损伤诱导的骨代谢障碍,与慢性肾功能衰竭所致的肾性骨病一样,常伴有骨质疏松症、纤维性骨炎、静止性骨病、骨软化症等表现,易发骨折,严重影响患者生存质量,临床尚无确切有效的治疗方法。

大豆异黄酮是以大豆为原料提取制成的植物性雌激素,是目前国际上功能性食品成分研究中的一个热点。大量流行病学资料、动物实验以及体外细

胞学研究均证实大豆异黄酮对绝经后骨质疏松症有较好防治作用^[2]。近年来发现大豆异黄酮对肾病患者的肾功能也呈现出一种有益的影响,可能通过降低血脂、利尿等途径保护肾脏功能^[3]。但目前国内外尚无大豆异黄酮防治肾性骨病的研究报道。

本研究应用大剂量 γ 射线局部照射大鼠双侧肾脏,制备辐射肾损伤诱导骨质疏松的动物模型,以萌格旺为对照,观察大豆异黄酮对其骨密度、骨形态计量和骨生物力学的影响。结果表明,大豆异黄酮能显著增加肾辐射损伤大鼠的骨量(腰椎BMD和股骨干灰重),提高其生物力学性能(股骨三点弯曲最大载荷),明显改善骨小梁形态结构(骨小梁面积、数目和分离度),降低骨转换速度(矿化沉积率)。提示大豆异黄酮对肾辐射损伤诱导的骨质疏松有明显改善作用。

大豆异黄酮防治辐射诱发肾性骨病的机制可能表现在以下几个方面:大豆异黄酮可通过清除自由基、提高机体抗氧化能力^[4],进而增强机体抗辐射功能;大豆异黄酮可较好地保护肾单位的损伤,延缓肾衰竭的发展^[5],这可能是大豆异黄酮治疗肾性骨病的重要途径。此外,大豆异黄酮属于植物雌激素,可刺激降钙素的分泌,抑制破骨细胞活性和骨吸收,并可通过降低血钙、升高PTH水平、刺激 $1-\alpha$ 羟化酶活

性、升高D激素水平,减少骨量丢失,发挥类似雌激素^[6]的护骨作用。

总之,大豆异黄酮能明显增加肾辐射损伤诱导骨质疏松大鼠的骨量、提高骨强度、改善骨结构,对辐射诱导的肾性骨病有较好防治作用,但其相关机制需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Teng M, Wolf M, Lowrie E, et al. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med*, 2003, 349(5): 446-456.
- [2] Suzanne Morin. Isoflavones and bone health. *Menopause*, 2004, 11(3): 239-241.
- [3] SU Bo, CAI Donglian. Protective effects of isoflavones on kidney diseases. *Medical Recapitulate* 2003, 10(10): 611-612 (in Chinese).
- [4] Wei H, R. Bowen, S. Barnes, et al. Antioxidant and anticarcinogenic properties of soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, 208: 124-130.
- [5] Sakemi T, Ikeda Y, Shimazu K, et al. Attenuating effect of a semipurified alcohol extract of soy protein on glomerular injury in spontaneous hypercholesterolemic male Imai rats. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37(4): 832-837.
- [6] Adami S, Gatti D, Bertoldo F, et al. The effects of menopause and estrogen replacement therapy on the renal handling of calcium. *Osteop Int*, 1992, 2: 180-185.

(收稿日期:2005-03-09)