

联合补充大豆异黄酮和钙预防去势大鼠骨质疏松的实验研究

高培君 蔡美琴

摘要：目的 研究联合补充大豆异黄酮和钙对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用。方法 将 50 只 3 月龄 SD 雌性大鼠摘除卵巢后按体重随机分成 5 组：假手术对照组、手术对照组、大豆异黄酮组 (40 mg/kgBW)、钙组 (100 mg/kgBW)、钙 + 大豆异黄酮组 (Ca 100 mg/kgBW + SI 40 mg/kgBW)。连续灌胃饲养 3 个月后测定大鼠血清骨钙素，左侧股骨测定骨密度和骨钙含量、右侧股骨进行骨组织形态学计量分析。结果 Ca + SI 组血清 BGP 水平和股骨骨密度均高于其他去卵巢各组 ($P < 0.05$)，但低于 Sham 组 ($P < 0.05$)；Ca + SI 组大鼠股骨的骨钙含量与 Ca 组、Sham 组差异均无统计学意义。在去卵巢各组大鼠中手术对照组、大豆异黄酮组和钙组大鼠的骨小梁数目和骨小梁厚度显著减少，骨小梁间距明显增宽，与钙 + 大豆异黄酮组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。结论 与单独补充大豆异黄酮或钙相比，大豆异黄酮与钙的联合应用能够更有效地预防去卵巢大鼠骨质疏松的发生。

关键词：大豆异黄酮；钙；卵巢切除；骨质疏松

Effects of soy isoflavones combined with calcium on osteoporosis in ovariectomized rats GAO Peijun, CAI Meiqin. Department of Nutritional Sciences, Faculty of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Abstract : **Objective** To study the preventive effects of soy isoflavones combined with calcium on osteoporosis of ovariectomized rats. **Methods** Fifty SD female rats, 3 months old, were randomized into 5 groups: (1) sham control group; (2) operated control group; (3) soy isoflavone group (ovariectomized, i. g. SI 40 mg/kg); (4) Ca group (ovariectomized, i. g. Ca 100 mg/kg); (5) soy isoflavone + Ca group (ovariectomized, i. g. SI 40 mg/kg and Ca 100 mg/kg). All rats were sacrificed at the 13th week. Femur bone mineral density (BMD), bone calcium, serum osteocalcin and biomechanical properties were measured. **Results** The mean serum osteocalcin level and femur metaphysic BMD of Ca + SI rats were higher than that of the other ovariectomized rats ($P < 0.05$), but lower than that of the sham rats ($P < 0.05$); bone calcium of Ca + SI rats did not show any difference to that of the Ca group, neither with the sham group ($P > 0.05$). Compared with Ca + SI rats, the other ovariectomized rats had less bone trabecula ($P < 0.05$). **Conclusion** Soybean isoflavones in combination with Ca is better in osteoporosis prevention in ovariectomized rats than soybean isoflavone or Calcium supplementation alone.

Key words : Soy isoflavones; Calcium; Ovariectomy; Osteoporosis

尽管雌激素替代疗法 (HRT) 和钙的联合应用能够比单纯补钙更好地防止骨质疏松的发生，但现在有关 HRT 的安全性问题越来越受到关注，使得我们迫切需要通过科学研究来寻找其他能够预防骨质疏松的方法。植物雌激素大豆异黄酮被发现可以预防骨质疏松^[1]，而钙对预防骨质丢失也有一定的辅助作用^[2]，但是大豆异黄酮和钙的联合补充是否能够

更为有效地减少骨质流失和骨密度的下降，联合补充的剂量如何？本研究通过去卵巢动物模型，探讨联合补充大豆异黄酮和钙对去卵巢大鼠骨质疏松的影响，为改善骨质疏松的防治方法提供理论基础和科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组与处理

3 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 50 只，(274 ± 25.2) g，适应性饲养 7 d 后按体重随机分为 5 组 (每组 10

只)假手术对照组(Sham)、手术对照组(OVX)、大豆异黄酮组(SI)、钙组(Ca)、钙+异黄酮组(Ca+SI),各组大鼠经腹腔注射 30 mg/kgBW 的戊巴比妥钠溶液麻醉后,经背部肋骨角切口行双侧卵巢切除术,假手术组大鼠不切除卵巢仅切除卵巢周围部分脂肪。术后 5 d 进行阴道涂片检查,涂片未呈动情反应的为去卵巢大鼠,剔除卵巢切除不完全的大鼠(假手术组除外),建立去卵巢动物模型。隔天以相应的溶液灌胃。

去卵巢大鼠恢复饲养 7 d 后进入实验期。实验期间动物自由进食,饮用去离子水,每天以相应的溶液灌胃。假手术组和手术对照组均灌胃去离子水;大豆异黄酮组按 40 mg 大豆异黄酮/kgBW 灌胃;钙组按 100 mg 元素钙/kgBW 灌胃;钙+大豆异黄酮组按(40 mg 大豆异黄酮+100 mg 元素钙)/kgBW 灌胃。

每月称量并记录大鼠体重。实验第 12 w 末时,大鼠眼眶采血并分离上层血清,测定骨钙素,颈椎脱臼处死大鼠后取左侧股骨测定骨密度和骨钙含量,右侧股骨用于制备骨组织切片。

1.2 检测指标和方法

1.2.1 血清骨钙素(BGP):中国人民解放军总医院放射免疫研究所的 RIA 试剂盒操作, γ 计数器测定结果。

1.2.2 骨密度(BMD):采用美国 HOLOGIC 公司 QDR-4000 型骨密度仪测量大鼠股骨中点及股骨远心端骨密度。

1.2.3 骨钙含量:用原子吸收法(EDTA)测量,上海分析仪器厂 WFX-I 10 型原子吸收分光光度计。

1.2.4 骨组织形态计量学分析:取右侧股骨按常规病理学方法制片,HE 染色。用德国 Zeiss 公司 VIDAS 全自动图像分析系统进行骨组织形态计量学测定,测量骨小梁数目、骨小梁间隔、骨小梁厚度。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠体重变化及摄食量情况(表 1)

各组体重均随时间增长。至实验期第 2 个月末,OVX 组体重明显高于 Sham 组($P < 0.05$)。至实验期末(第 3 个月末)各组间体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。Sham 组的终体重明显低于去卵巢各组($P < 0.05$)。在去卵巢各组中,OVX 组的终体重明显高于其他去卵巢各组($P < 0.05$),SI 组、Ca 组和 Ca +

SI 组的终体重之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重及摄食量($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠体重(g)				摄食量(g/d)
	基础体重	1 个月末	2 个月末	3 个月末	
Sham	274.8 $\pm$ 30.8	282.0 $\pm$ 33.9	290.9 $\pm$ 33.1	301.8 $\pm$ 34.8	15.7 $\pm$ 1.6
OVX	272.5 $\pm$ 26.6	305.7 $\pm$ 17.6	340.2 $\pm$ 21.1 ^a	378.0 $\pm$ 23.3 ^a	16.1 $\pm$ 0.9
SI	274.7 $\pm$ 23.5	287.7 $\pm$ 29.4	312.2 $\pm$ 26.8	334.2 $\pm$ 50.9 ^{ab}	13.2 $\pm$ 1.2
Ca	273.6 $\pm$ 29.6	290.8 $\pm$ 34.1	314.0 $\pm$ 41.9	341.8 $\pm$ 47.3 ^{ab}	14.0 $\pm$ 0.6
Ca + SI	272.9 $\pm$ 22.1	293.6 $\pm$ 23.0	310.8 $\pm$ 34.7	331.4 $\pm$ 48.3 ^{ab}	15.5 $\pm$ 1.1

注:与 sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 OVX 组比较,^b $P < 0.05$;与 SI 组比较,^c $P < 0.05$;与 Ca 组比较,^d $P < 0.05$

实验期间各组大鼠每日摄食量的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清骨钙素(BGP)、股骨骨密度及骨钙含量的变化情况(表 2)

表 2 各组大鼠血清 BGP、股骨骨密度及骨钙含量($\bar{x} \pm s$)

组别	BGP (ng/ml)	股骨干骺端骨密度(mg/cm ²)	骨钙含量(mg/g)
Sham	0.460 $\pm$ 0.138	180 $\pm$ 17	302.82 $\pm$ 33.82
OVX	0.056 $\pm$ 0.025 ^a	153 $\pm$ 10 ^a	248.66 $\pm$ 28.71 ^a
SI	0.147 $\pm$ 0.038 ^{ab}	155 $\pm$ 7 ^a	250.81 $\pm$ 33.70 ^a
Ca	0.169 $\pm$ 0.110 ^{ab}	159 $\pm$ 15 ^a	278.54 $\pm$ 14.36 ^{bc}
Ca + SI	0.335 $\pm$ 0.100 ^{abcd}	164 $\pm$ 13 ^{abcd}	291.31 $\pm$ 30.23 ^{bc}

注:与 sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 OVX 组比较,^b $P < 0.05$;与 SI 组比较,^c $P < 0.05$;与 Ca 组比较,^d $P < 0.05$

Ca + SI 组 BGP 水平明显高于其他去卵巢各组,但与 Sham 组比较明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);Ca 组和 SI 组 BGP 水平低于 Ca + SI 组和 Sham 组,但高于 OVX 组,差异也均有统计学意义($P < 0.05$)。Ca + SI 组骨密度明显高于其他去卵巢各组,但与 Sham 组比较明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);Ca 组、SI 组和 OVX 组骨密度之间差异无统计学意义($P > 0.05$),均明显低于 Ca + SI 组和 Sham 组($P < 0.05$)。Ca + SI 组、Ca 组和 Sham 组骨钙含量明显高于 OVX 组和 SI 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 Ca + SI 组、Ca 组和 Sham 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠股骨干骺端松质骨形态计量学分析(表 3)

表 3 各组大鼠股骨干骺端松质骨形态计量学分析($\bar{x} \pm s$)

组别	骨小梁数目(个/mm)	骨小梁间距(μ m)	骨小梁厚度(μ m)
Sham	5.18 $\pm$ 0.65	135.15 $\pm$ 24.07	862.36 $\pm$ 95.68
OVX	3.11 $\pm$ 0.30 ^a	281.84 $\pm$ 27.85 ^a	456.10 $\pm$ 141.08 ^a
SI	3.25 $\pm$ 0.24 ^a	265.53 $\pm$ 28.36 ^a	515.49 $\pm$ 163.54 ^a
Ca	3.43 $\pm$ 0.29 ^a	252.70 $\pm$ 23.19 ^a	533.74 $\pm$ 79.39 ^a
Ca + SI	4.22 $\pm$ 0.33 ^{abcd}	193.22 $\pm$ 30.21 ^{abcd}	696.48 $\pm$ 133.70 ^{abcd}

注:与 sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 OVX 组比较,^b $P < 0.05$;与 SI 组比较,^b $P < 0.05$;与 Ca 组比较,^d $P < 0.05$

与 Ca + SI 组和 Sham 组相比较,OVX 组、SI 组和

Ca 组的骨小梁数目和骨小梁厚度显著减少,骨小梁间距明显增宽,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但与 Sham 组相比,Ca + SI 组的骨小梁数目、骨小梁厚度显著减少,骨小梁间距增宽,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验过程中,大鼠体重的增加不仅有自身生长的原因,也存在摘除卵巢引起的代偿性增重,可能与体内雌激素减少引起脂代谢异常有关^[3]。实验前各组大鼠体重无差异,实验结束时假手术组大鼠的终体重明显低于去卵巢各组;此外假手术组大鼠的骨密度也明显高于去卵巢大鼠的骨密度。所以实验结果中大鼠体重、骨密度等的改变都肯定了卵巢切除的效果,说明本次的骨质疏松模型成功建立。

当人体处于绝经后骨质疏松状态时,骨量丢失主要发生在松质骨部位。而在卵巢切除所诱发的雌激素缺乏大鼠模型中,骨量丢失也更易发生在以松质骨为主的股骨干骺端等骨组织中。本次实验中大鼠股骨干骺端骨密度以及骨组织形态学检测结果显示,钙和大豆异黄酮虽然能在一定程度上增加卵巢切除大鼠股骨干骺端的骨密度,减少松质骨的骨量丢失,但改善绝经后骨质疏松的效果与假手术对照组相比还是有显著差异,说明大鼠卵巢切除后松质骨部位的骨质丢失较为严重。另一方面与单独补充大豆异黄酮或钙相比,钙和大豆异黄酮的联合补充能够更明显地增加股骨干骺端的骨密度和骨小梁质量,表明两者的联合应用可以有效地抑制由于雌激素缺乏所诱发的骨质丢失,提示了大豆异黄酮和钙的联合补充能够更为有效地减少卵巢切除或绝经后内源性雌激素减少所导致的骨质流失和骨密度下降。

骨钙素(BGP)是骨所特有的小分子蛋白,与成骨细胞功能和骨转换密切相关。它经成骨细胞合成后沉积于骨,部分可弥散入血。由于只有成骨细胞合成 BGP,通过放免检测技术测定血液中新合成的微量水平可以反映成骨细胞的活性。章明放等^[4]的研究发现,雌性大鼠切除双侧卵巢后第 18 w 末血清骨钙素显著降低,提示成骨细胞活性下降、骨形成减少,这是由于在渡过骨量丢失的快速阶段后具代偿意义的骨形成逐渐降低,骨吸收和骨形成的耦联进一步失衡,骨吸收占优势,从而在血清学检测时出现

骨钙素水平的显著低下,反映了成骨细胞的疲惫或失代偿。本次实验的结果与章明放等人的研究结果相类似,假手术对照组大鼠的血清骨钙素水平明显高于去卵巢各组,说明大鼠去卵巢 12 w 后已进入骨量丢失的平缓时相,骨合成水平下降,而在去卵巢各组中,钙 + 大豆异黄酮组血清骨钙素水平又高于其他去卵巢组,显示出钙和大豆异黄酮的联合补充能较明显的改善去卵巢大鼠由于内源性雌激素减少所导致的骨合成低下状况,增强骨质。

本实验中手术对照组和大豆异黄酮组大鼠的骨钙含量显著低于其他各组,这可能主要是由于其灌胃样品中不含钙所造成的,而钙代谢正平衡是保证骨矿化的重要条件。当钙代谢负平衡,不能及时矿化的新骨胶原被水解而引起骨质丢失,而当钙代谢正平衡时,可以使产生的类骨质在填满吸收腔后被完全矿化而保持骨量。大豆异黄酮在影响骨钙含量中的作用尚不明确,史琳娜等^[5]在研究大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨丢失的影响中发现,补充大豆异黄酮的大鼠其粪钙和尿钙的排泄相对减少,能够维持机体钙代谢的正平衡,从而保持骨代谢的平衡。

本次实验提示与单独补充大豆异黄酮或钙相比,联合补充钙和大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度及骨代谢生化指标的改善作用更为显著,对卵巢切除或绝经后内源性雌激素减少所导致的骨质疏松具有潜在的预防作用。但对于钙和大豆异黄酮联合补充影响骨代谢的机制和程度还有待于进一步的研究探讨。

【参考文献】

- [1] Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA, 2002, 288 321-333.
- [2] 徐丹,袁凤易,王新民. 钙与维生素 D 防治骨质疏松的循证医学研究进展. 国外医学内分泌学分册, 2005, 25 338-341.
- [3] 陈彩霞,田玉慧,李万里,等. 大豆异黄酮和钙对去卵巢大鼠血脂和碱性磷酸酶的作用, 2004, 11 50,73.
- [4] 章明放,黄凤歧,谭郁彬,等. 去势大鼠血清骨钙素水平及意义. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(3) 23.
- [5] 叶艳彬,苏宜香,卓淑雨,等. 大豆异黄酮减缓去卵巢大鼠骨量丢失的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11 239-242.

(收稿日期:2006-01-16)