

大豆苷元磺酸钠对维甲酸诱导大鼠骨质疏松的保护作用

任萍 季晖 陈秀英 韩景超 邵卿 濮祖茂

摘要：目的 研究大豆苷元磺酸钠对维甲酸诱导大鼠骨质疏松的保护作用。方法 以 70 mg/kg 维甲酸诱导大鼠形成骨质疏松模型。自实验开始当天下午各组大鼠依次经口给予以下药物：阴性对照组 (Control)、病理模型组 (Model) 0.5% CMC-Na 溶液 5 ml/kg；骨质疏松组 (Gsk) 4 g/kg；大豆苷元磺酸钠高、中、低剂量组 (H-SDS 300 mg/kg；M-SDS 150 mg/kg；L-SDS 75 mg/kg)。连续给药 5 周。结果 大豆苷元磺酸钠连续给药 5 周后，高、中剂量组骨钙素 (s-BGP) 均与对照组水平相当，并且可明显增加股骨骨密度，高剂量组灰重系数和骨钙含量均较模型组显著增加。高、中、低 3 个剂量组骨小梁形态结构趋于完整，骨髓腔呈圆形或卵圆形且腔隙较小；骨小梁面积 (TS%) 和平均骨小梁宽度 (MTT) 明显增加；骨表面平整光滑。结论 大豆苷元磺酸钠对维甲酸诱导的骨质疏松大鼠的骨小梁具有保护作用，能防治维甲酸诱导的大鼠骨质疏松症。

关键词：大豆苷元磺酸钠；维甲酸；骨小梁；骨质疏松

Protective effect of sodium daidzein sulfonate on osteoporosis induced by retinoic acid in rats REN Ping, JI Hui, CHEN Xiuying, et al. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To study the protective effects of Sodium Daidzein Sulfonate (SDS) on osteoporosis induced by retinoic acid (RA) in rats. **Methods** The osteoporosis model of rats was induced by administration of retinoic acid at the dose of 70 mg/kg for 15 days. The rats were treated for 35 days with nothing (the negative control), vehicle (the model group: 5 ml/kg), Gushukang (Gsk: 4 g/kg), or SDS at high, medium and low dose (H-SDS: 300 mg/kg, M-SDS: 150 mg/kg, L-SDS: 75 mg/kg). **Results** The serum levels of osteocalcin in the H-SDS and M-SDS groups were comparable with that of the control after 35 days of medication. Both Wash/Wfemur and femoral BMD were significantly increased in H-SDS and M-SDS group compared to the model group. Administration of SDS prevented the change of trabecular bone microarchitecture induced by RA, increased the trabecular bone area and trabecular thickness, while decreased the trabecular separation. **Conclusions** SDS administration prevents BMD decrease induced by RA, and exhibits a moderate protective effect on microarchitecture of trabecular bone.

Key words: Sodium daidzein sulfonate; Retinoic acid; Trabecular bone; Osteoporosis

绝经后骨质疏松的主要病因为内分泌失调，雌激素水平下降，骨吸收大于骨形成，导致骨量丢失，骨小梁结构破坏^[1]。雌激素替代疗法 (HRT) 为治疗妇女绝经后骨质疏松的常用方法，但长期服用会出现子宫出血、乳腺癌、子宫内膜癌发病率增加等副作用^[2,3]。这一缺点限制了 HRT 的临床应用，同时也促进了对选择性雌激素受体调节剂及植物雌激素的

研究。其中，大豆苷元和染料木黄酮是大豆异黄酮的两个主要成分，已有实验证实大豆苷元在预防去卵巢大鼠骨质疏松的同时对生殖器官无雌激素样作用，且其防治骨质疏松作用较染料木黄酮强^[4,5]。大豆苷元磺酸钠是利用磺化反应对大豆苷元进行结构修饰和改造而合成出的强水溶性异黄酮新化合物。本文主要研究大豆苷元磺酸钠对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的防治作用，并重点探讨大豆苷元磺酸钠对骨小梁结构的影响，以促进骨质疏松发病机制及其治疗的研究。

1 材料和方法

1.1 药材与试剂

大豆苷元磺酸钠(SDS):批号 20040322,含量 16.7%,由常州方圆制药有限公司提供。维甲酸(RA,上海南翔试剂有限公司);骨疏康(Gsk,东港市康辰制药有限公司,批号 200402);骨钙素(BGP)放免试剂盒(批号:200407,中国原子能科学研究院);血清钙(s-Ca)及血清磷(s-P)试剂盒均为南京建成生物技术有限公司产品。

1.2 主要仪器

EXPERT-XL 型双能 X 射线骨密度测量仪,美国 Lunar;SN-682 型放免 γ 计数器,上海核福光电仪器有限公司;SX-40 扫描电镜,H 66005,日本明石制作所;牙科金刚石锯;Ion COATER,IB 3,EikoCMIAS-98A 型图像分析仪,北京航空航天大学;SPJX 型高温电炉(马福炉),上海浦东荣丰科学仪器有限公司;BS 110 S 型电子天平,德国 sartorius;722 型光栅分光光度仪,上海第三分析仪器厂。

1.3 动物

Sprague-Dawley 大鼠,雄性,6 月龄,购自江宁县青龙山动物繁殖场,动物质量合格证号:SCXK(苏)2002-0018,本室饲养 1 周后使用。

1.4 方法

1.4.1 动物分组与给药:取健康 6 月龄雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为 6 组,每组 8 只。实验开始后 15 d 内每天上午阴性对照组灌胃给予 0.5% CMCNa 溶液,其余各组给予 70 mg/kg RA。自实验开始当天下午各组大鼠依次经口给予以下药物:阴性对照组(Control)、病理模型组(Model) 0.5% CMC-Na 溶液 5 ml/kg/d;骨疏康组(Gsk)4 g/kg/d;大豆苷元磺酸钠高(H-SDS)、中(M-SDS)、低(L-SDS)剂量组分别为 300 mg/kg/d,150 mg/kg/d,75 mg/kg/d。连续给药 5 周。

1.4.2 骨密度测定 实验结束前 2 天大鼠在乙醚麻醉下对腰椎和股骨进行双能 X 线骨密度测试分析。

1.4.3 血清生化指标测定 实验结束时大鼠股动脉取血,分离血清,测定血清钙(s-Ca)、磷(s-P)和骨钙素(s-BGP)含量。

1.4.4 骨矿含量测定 剥离右侧股骨,于 110℃烘箱中干燥 1 h,测定骨长(L)、骨短径(s-D)、骨长径(l-D)和股骨干重(W_{femur})。将干燥股骨炭化后置于马福炉中 600℃灰化 8 h,取出后测定股骨灰重(W_{ash}),计算灰重系数($W_{\text{ash}}/W_{\text{femur}}$)。再将骨灰溶于 6 mol/L HCl 溶液中,测定骨钙(b-Ca)、骨磷(b-P)含量。

1.4.5 骨形态计量学测定:将股骨头端用固定液(25% 电镜专用戊二醛水溶液 16 ml,PBS 缓冲液 84 ml)浸泡固定,用牙科金刚石锯(砂轮)将股骨头矢面锯开,取其中 1 块,清洗,10% 次氯酸钠溶液浸泡 6 h,超声清洗 15 min,乙醇梯度脱水,乙醚浸泡,然后在空气中自然干燥,离子溅射镀膜。在扫描电镜下观察,加速电压 20 千伏。用 SEM 拍摄的照片结合北京航空航天大学制作的 CMIAS-98 A 型图像分析仪进行骨小梁表面百分比(TS)及骨小梁平均宽度(MTT)测量。

1.5 统计学处理

采用双侧 *t*-test 进行组间显著性检验和单因素方差分析,采用 SPSS 11.0 软件包进行处理。

2 结果

2.1 对血清学指标的影响

各组血清钙(s-Ca)和磷(s-P)无明显差异;与对照组相比较,模型组大鼠血清骨钙素(s-BGP)呈下降趋势,但差异无显著性意义。给予大豆苷元磺酸钠 5 周后,3 个剂量组均能防止维甲酸所引起的 s-BGP 下降,使其维持在与对照组相当的水平,较之对照组,H-SDS 甚至增高了血清骨钙素的水平。见表 1。

Table 1 Effects of sodium daidzein sulfonateon on s-Ca, s-P and s-BGP of osteoporotic rats induced by RA($n = 8, \bar{x} \pm s$)

项目	s-Ca(mmol/L)	s-P(mmol/L)	s-BGP (ng/ml)
Control	2.356 ± 0.234	2.824 ± 1.299	0.600 ± 0.161
Model	2.284 ± 0.216	2.670 ± 0.509	0.533 ± 0.090
H-SDS	2.515 ± 0.323	4.019 ± 1.492	0.704 ± 0.220
M-SDS	2.609 ± 0.412	4.035 ± 1.539	0.612 ± 0.155
L-SDS	2.486 ± 0.228	2.781 ± 0.181	0.604 ± 0.225
Gsk	2.371 ± 0.626	2.981 ± 0.315	0.592 ± 0.208

2.2 对骨矿含量的影响

各组股骨骨长、骨径均无明显差异(数据未列出)。与阴性对照组相比较,模型组股骨灰重系数显著降低;大豆苷元磺酸钠连续给药 5 周,高、中两个剂量组可明显增加股骨的灰重系数($W_{\text{ash}}/W_{\text{femur}}$),高剂量组可明显增加骨钙(b-Ca)含量,骨磷(b-P)含量无显著变化。见表 2。

Table 2 Effects of sodium daidzein sulfonateon on $W_{\text{ash}}/W_{\text{femur}}$, b-Ca and b-P of osteoporotic rats induced by RA($n = 8, \bar{x} \pm s$)

项目	$W_{\text{ash}}/W_{\text{femur}}$ (g/g)	b-Ca (g/g)	b-P(g/g)
Control	0.637 ± 0.028 *	16.86 ± 1.98	17.49 ± 2.69
Model	0.606 ± 0.019	16.79 ± 1.22	16.75 ± 1.52
H-SDS	0.641 ± 0.012**	18.20 ± 1.42 *	17.54 ± 1.04
M-SDS	0.644 ± 0.012**	17.59 ± 1.79	17.04 ± 2.10
L-SDS	0.627 ± 0.020	17.15 ± 1.65	17.50 ± 2.05
Gsk	0.633 ± 0.012	18.46 ± 1.82 *	18.06 ± 0.16

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs Model

2.3 对骨矿密度和骨形态计量学的影响

DEXA 测试分析结果表明,模型组大鼠股骨骨矿密度明显降低,大豆苷元磺酸钠高、中两个剂量组可明显提高股骨骨矿密度,腰椎骨矿密度也有升高趋势,见表 3。骨形态计量学指标表明,与对照组比较,模型组大鼠股骨头端骨小梁明显变细,甚至部分骨小梁中断而逐渐被吸收,空洞多而大;TS% 和 MTT 显著降低,滑小梁表面粗糙不平,三维网架结构遭到破坏。大鼠连续给予大豆苷元磺酸钠 5 周后,骨小梁形态结构趋于完整,TS% 和 MTT 明显增加,

见表 3、图 1。

Table 3 Effects of sodium daidzein sulfonate on BMD (n = 8), TS and MTT (n = 6) of osteoporotic rats induced by RA ($\bar{x} \pm s$)

项目	BMD of Lumber(g/cm ²)	BMD of Femur(g/cm ²)	TS (%)	MTT (μm)
Control	0.307 ± 0.024	0.514 ± 0.050 *	0.840 ± 0.033***	139.98 ± 8.28**
Model	0.291 ± 0.036	0.457 ± 0.041	0.701 ± 0.064	86.43 ± 4.84
H-SI	0.311 ± 0.021	0.520 ± 0.053 *	0.848 ± 0.027***	142.5 ± 8.54***
M-SI	0.305 ± 0.026	0.528 ± 0.038**	0.861 ± 0.005***	140.34 ± 5.22***
L-SI	0.294 ± 0.014	0.479 ± 0.043	0.816 ± 0.033**	119.72 ± 7.5**
Gsk	0.303 ± 0.034	0.511 ± 0.026 *	0.842 ± 0.027***	141.72 ± 5.27***

注: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs Model

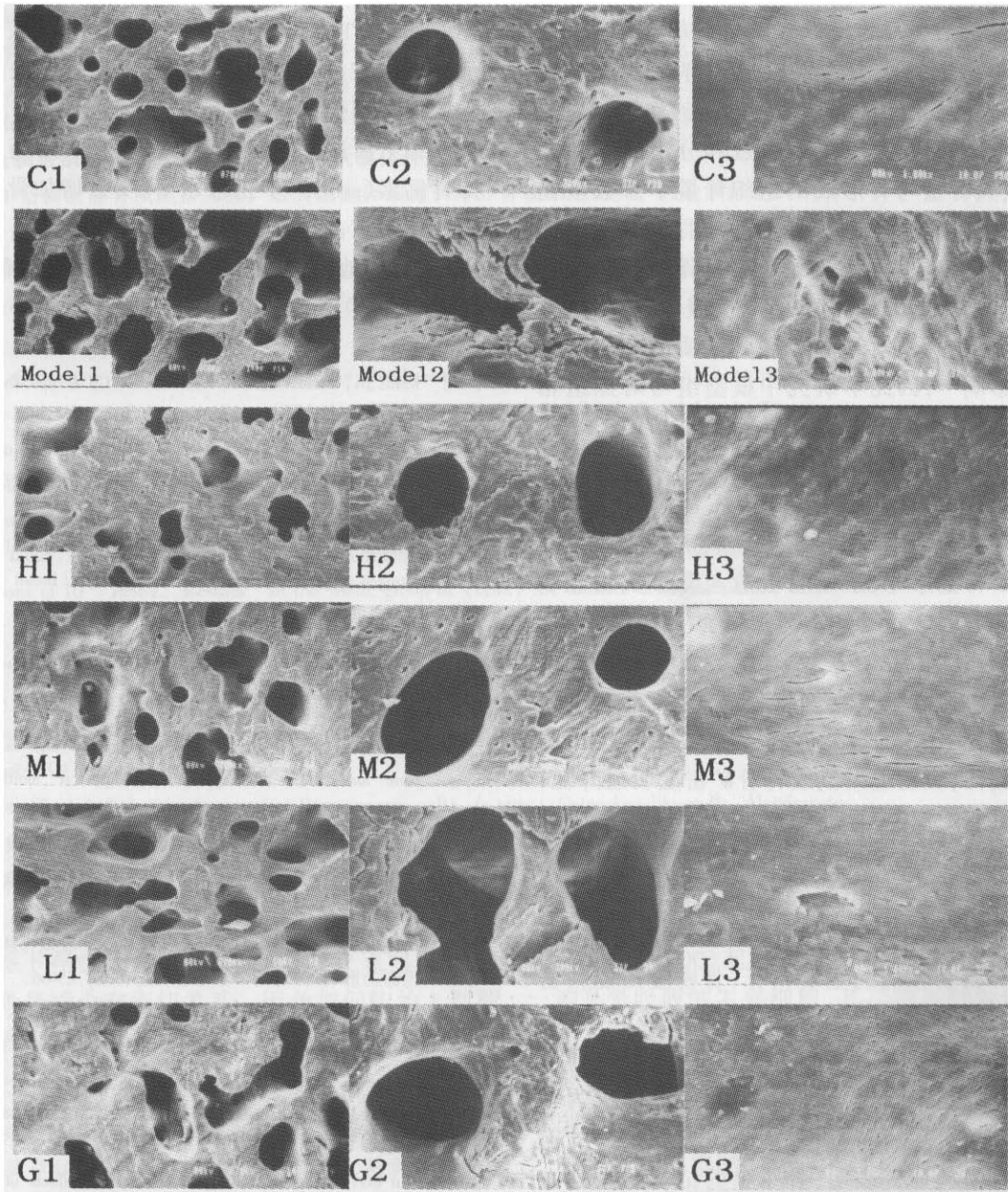


Fig.1 Microphotographs of trabecular bone of femoral head in osteoporotic rats induced by RA. (n = 6).

C : Control ; Model : Model ; H : H-SDS ; M : M-SDS ; L : L-SDS ; G : Gsk.

- 1 : the section plane of femoral head (magnification, × 80) ;
- 2 : the structure of trabecular bone of femoral head (magnification, × 300) ;
- 3 : the surface of a trabecular bone (magnification, × 1000) .

3 讨论

维甲酸(Retinoic Acid)是维生素 A 的衍生物,主要用于皮肤科银屑病、痤疮、皮肤角化过度、皮肤肿瘤等疾病的治疗,伴有骨质疏松的副作用。多篇文献^[6,7]报道每日灌服维甲酸 70 mg/kg,连续 2 周,可造成大鼠骨质疏松模型。维甲酸诱导的大鼠骨质疏松模型虽然在病因上与人类骨质疏松不同,但此模型在发病症状、组织形态学表现和对雌激素的骨反应等方面与人类有较好的相似性,因此本试验以维甲酸诱导的大鼠骨质疏松模型作为研究对象。

血清学指标的检测结果可部分解释 SDS 对维甲酸诱导骨质疏松大鼠骨量丢失的防治作用。血清骨钙素(s-BGP)是由成骨细胞合成和分泌的一种非胶原蛋白,其含量与骨形成的组织计量学参数呈显著正相关,是较 ALP 灵敏和特异的成骨细胞活性指标。有研究指出,维甲酸诱导形成的骨质疏松模型的发生机理为激活破骨细胞,促进骨吸收,但对成骨细胞活性影响不大,对骨形成和骨基质的矿化过程也无明显影响^[8],因此本研究中模型组与对照组相比,s-BGP 虽呈下降趋势,但差异无显著意义。而 H-SDS 能升高血清骨钙素的水平,则提示其具有增强成骨细胞活性、促进骨形成的作用。

骨密度是判断骨质量的依据,精确定量测定骨密度能判断骨量水平,了解骨吸收与骨形成功能状态,是研究骨质疏松和评价药效的重要检测手段。双能 X 线吸收测量法是一种对骨矿和骨结构进行分析的非侵入性方法且精确度很高,是目前测量人体及实验动物 BMD 的最好方法^[9]。本文研究发现:与对照组相比,模型组大鼠股骨骨矿密度明显降低,大豆苷元磺酸钠高、中两个剂量组可明显提高股骨骨矿密度 腰椎骨矿密度也有升高趋势。这与骨矿含量的研究结果一致,说明 SDS 能防止维甲酸诱导骨质疏松大鼠骨量的丢失。

作为评价骨性能的主要指标,骨密度虽能精密定量骨量,但其测定值仅反映骨矿物盐的含量,而不能反映形态学的差异。众所周知,骨小梁呈立体网状结构,其结构特征与工程上的多孔泡沫体极为相似,这种合理的三维结构使骨承受压力和拉力的能力均增强。实验研究表明,骨小梁的结构和排列在骨生物力学性能中起着非常重要的作用,骨的几何形态决定了骨的力学特性,骨小梁的微细变化就可使骨的强度明显下降^[10]。因此,在综合评价骨性能时,还需要引入骨形态计量学这一手段。骨形态计

量学研究具有直观、形象的优点,能对松质骨进行客观的定量分析,并能借以反映骨的力学性能变化。本研究采用扫描电镜对股骨头的小梁结构进行分析,结果显示,与对照组比较模型组大鼠股骨头端骨小梁明显变细,骨髓腔直径增大,部分骨小梁甚至逐渐被吸收而中断或完全消失,致使 2 个及以上的骨髓腔融合,形成长梭形或不规则形的空洞;TS% 和 MTT 显著降低 滑小梁表面粗糙不平,三维网架结构遭到破坏。大鼠连续给予 SDS 5 周后,骨小梁形态结构趋于完整,骨髓腔呈圆形或卵圆形且腔隙较小;TS% 和 MTT 明显增加 滑表面较平整,较光滑。提示 SDS 在维持骨量的同时,能有效保护松质骨骨小梁的三维网架结构。

综上所述,大豆苷元磺酸钠连续给药 5 周能维持骨钙素(s-BGP)于正常水平 明显增加骨矿含量和股骨骨密度 对骨小梁的三维网架结构具有保护作用 能有效地防治维甲酸诱导的大鼠骨质疏松症。

【参考文献】

- [1] Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res, 1994, 9: 1137-1141.
- [2] Collaborative group on hormonal factors in breast cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy. Lancet, 1997, 350: 1047-1059.
- [3] Schairer C, Lubin J, Troisi R, et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. JAMA, 2000, 283: 485-491.
- [4] Fujioka M, Uehara M, Wu J, et al. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. J Nutr, 2004, 134(10): 2623-2627.
- [5] Fonseca D, Ward WE. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. Bone, 2004, 35(2): 489-497.
- [6] 季晖,刘康,李绍平,等.淫羊藿总黄酮对维 A 酸诱导大鼠骨质疏松症的防治作用.中国药科大学学报, 2000, 31(3): 222-225.
- [7] 代晓霞,熊咏民,郭雄,等.雌激素对维甲酸致骨质疏松大鼠骨代谢的影响.西北药学杂志, 2001, 16(2): 65-66.
- [8] 吴波,徐冰,黄添友,等.维 A 酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究.药学报, 1996, 31(4): 241-245.
- [9] Delmas PD, Charles P, Melsen F, et al. Serum bone gla protein compared to bone histomorphometry in endocrine disease. Bone, 1985, 6: 329.
- [10] Paul EG, Shangle Qi, Angela M, et al. Effects of the Steroidal Aromatase Inhibitor Exemestane and the Nonsteroidal Aromatase Inhibitor Letrozole on Bone and Lipid Metabolism in Ovariectomized Rats. Clinical Cancer Research, 2004, 10: 5717-5723.

(收稿日期:2006-03-29)