

金雀异黄酮对去势大鼠骨质疏松的影响

冯英 涂平生 湛海伦 邵雄杰

摘要：目的 观察金雀异黄酮对实验性骨质疏松大鼠骨密度(bone mineral density, BMD)和血清骨代谢生化指标的影响。方法 切除 SD 雌性大鼠双侧卵巢建立骨质疏松动物模型,给予金雀异黄酮皮下注射,治疗 8 w 后监测大鼠腰椎及股骨的骨密度,检测血清骨碱性磷酸酶(ALP)、血清钙(Ca)、血清磷(P)等骨代谢生化指标。结果 去势后的大鼠腰椎及股骨的骨密度降低;采用金雀异黄酮治疗后骨密度明显升高,与阴性对照组的比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),与假手术组比较无显著性差异。假手术组和金雀异黄酮组血清 ALP 活性低于阴性对照组。结论 金雀异黄酮可调节骨代谢,显著提高骨质疏松大鼠的骨密度。

关键词：雌激素;金雀异黄酮;骨质疏松

The effect of genistein on the osteoporosis mice FENG Ying, TU Pingsheng, ZHAN Hailun, et al. Teaching and Research Group of Histology and Embryology, Basic Medicine School, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China

Abstract : **Objective** To investigate the impact of genistein on bone mineral density and biochemical indicator of bone metabolism in ovariectomized mice. **Methods** Reproduce the osteoporosis model of ovariectomized rats and receive estrogen therapy. After 8 weeks therapy, bone mineral density and biochemical indicator including serum alkaline phosphatase, calcium, phosphonium were measured. **Results** The bone mineral density of ovariectomized mice decreased significantly ($P < 0.05$), and it increased after 8 weeks therapy using genistein, and there were no significant difference between genistein and sham group. The level of serum alkaline phosphatase in genistein is higher than that in negative control group. **Conclusions** Genistein can improve and increase the bone mineral density in ovariectomized mice, having similar effect on nilestriol group.

Key words : Estradiol; Genistein; Osteoporosis

原发性骨质疏松症是全身性的老年性骨骼疾病,尤其是绝经后妇女,表现为骨量减少,轻微地损伤即可导致骨折,研究表明雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)是防治骨质疏松、减少骨折发生的有效措施。但雌激素因其严重副作用(子宫内膜癌、乳腺癌等)而使其应用受到限制。因此,人们想方设法寻找一种具有雌激素活性而又没有雌激素副作用的替代物。金雀异黄酮(genistein, Gs)是一种植物性雌激素,是具有较强雌激素活性的选择性雌激素受体调节剂,但目前尚缺乏其对骨质疏松预防治疗的实验依据。本实验通过

体内试验观察金雀异黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松性模型的骨密度和血清钙、磷、碱性磷酸酶的影响,探讨其对骨质疏松的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

3 月龄健康雌性 SD 大鼠,体重 200 ~ 250 g,由中山大学实验动物中心提供。Gs 购于上海市元吉化工有限公司,纯度 99.3%。

1.2 动物分组

将 60 只雌性大鼠随机分成假手术组、阴性对照组(Ni 组)、金雀异黄酮组(Gs 组),每组动物 10 只,各组动物间体重差异无显著性($P > 0.05$)。各组大鼠均以 1% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 腹腔注射麻醉后,假手术组行假性手术摘除卵巢周围约 1 g 的脂肪组织, Ni 组及 Gs 组均切除双侧卵巢。术后继续室温下饲养 8 w,均采用标准颗粒饮食。假手术组给予

基金项目:广州市科技计划项目资助课题(2003J1-C0151)

作者单位:510080 广州,中山大学基础医学院组织胚胎学教研室(冯英),广州市番禺区中医院(涂平生),中山大学附属第三医院外科(湛海伦、雄杰)

通讯作者:涂平生, Email: fengying824@sina.com

蒸馏水 6 mL/kg 皮下注射 ,阴性对照组给予蒸馏水 ,Gs 组给予金雀异黄酮 6 mg/kg 皮下注射 ,浓度为 0.2 mL/kg ,隔天 1 次。其中金雀异黄酮的配制采用二甲基亚砷 100 mL 加入金雀异黄酮 0.2 g 配制成 0.2% 溶液。所有大鼠均在同等条件下喂养 ,自由摄水 ,控制食量。所有大鼠均用药 2 个月。

1.3 骨密度的测定

10%水合氯醛腹腔内麻醉(7.5 mL/kg) ,采用美国 Hologic 公司的双能 X 线骨矿含量测定仪(DEXA) (广州中医药大学骨伤科专科医院)测定腰椎和双侧股骨颈 BMD。

1.4 血清 ALP、Ca、P 含量测定

在灌胃治疗 8 w 后抽血查血清骨碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ,ALP) ,血清钙(Ca) ,血清磷(P) 的含量。血清 ALP、Ca、P 含量测定用 Olympus AU 2800 全自动生化分析仪测定。

1.5 统计学处理

所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析 ,计算结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示 ,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度的比较(表 1)

本实验的 Ni 组在切除卵巢后 8 w ,可见腰椎及股骨的骨密度明显降低 ,与切除卵巢前骨密度相比较 ,差异有具有统计学意义($P < 0.05$)。

本实验的 Gs 组经过药物治疗 2 个月后 ,腰椎及股骨的骨密度可见明显升高 ,但与正常组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 手术 8 w 后正常对照组、Ni 组和 Gs 组
腰椎及股骨骨密度比较(g/cm)

部位	假手术组	Ni 组	Gs 组
腰椎	0.230 ± 0.015	0.197 ± 0.015 *	0.227 ± 0.019
股骨	0.254 ± 0.017	0.239 ± 0.022 *	0.261 ± 0.020

注 :其他组与正常对照组比较 * $P < 0.05$

2.2 骨代谢生化指标(表 2)

表 2 手术 8 w 后正常对照组、Ni 组和 Gs 组
血清 Ca(mmol/L) ,P(mmol/L) 和 ALP(U/L) 的比较

项目	假手术组	Ni 组	Gs 组
血 Ca	2.41 ± 0.27	2.49 ± 0.16	2.45 ± 0.24
血 P	2.27 ± 0.50	2.23 ± 0.45	2.28 ± 0.14
血 ALP	74.8 ± 11.4	133.2 ± 12.7	67.0 ± 9.3

注 :其他组与正常对照组比较 * $P < 0.05$

治疗 8 w 后的各组大鼠血清 Ca 含量及血磷含量组间比较差异均无显著性($P > 0.05$) ,而 Ni 组和

Gs 组血清 ALP 活性高于正常对照组 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

绝经后妇女的卵巢功能衰退 ,血中雌激素水平降低。本实验将 SD 雌性大鼠去卵巢后使其体内雌激素水平明显下降 ,实验观察到术后 8 w 大鼠的腰椎和股骨的骨密度明显降低 ,成功复制骨质疏松模型 ,这种去势造模方法是目前骨质疏松症研究的主要方法 ,为研究老年骨质疏松提供了较好的动物模型。同时也说明了雌激素水平的降低是骨质疏松重要原因之一 ,补充雌激素是预防治疗老年妇女骨质疏松的重要手段。

骨密度是评价骨强度判断的指标 ,是确定骨质疏松症最基本的依据。本实验结果显示 ,Ni 组及 Gs 组大鼠在去卵巢后骨密度均显著低于正常对照组 ,表现为骨强度下降 ;摄取金雀异黄酮及尼尔雌醇后的大鼠的骨密度比阴性对照组显著升高 ,说明金雀异黄酮增加骨强度。余增丽等^[1]体外实验证实 Gs 可促进人成骨细胞增殖及细胞合成和分泌胶原蛋白 ,并提高成骨细胞 AKP 活性 ,这提示在激素缺乏的条件下 ,Gs 对成骨细胞来说具有雌激素效应 ,可刺激成骨细胞的增殖及分化作用 ,这效应可被雌激素受体拮抗剂 TAM 所抑制。Yamaguchi 等^[2]也通过体外骨细胞培养实验证实了金雀异黄酮可提高碱性磷酸酶活性、脱氧核糖核酸(DNA)和降钙素含量 ,表现出类雌激素作用。

但目前对金雀异黄酮预防治疗骨质疏松的机制尚不清楚。研究表明 ,破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞中均存在雌激素受体^[3,4] ,雌激素与成骨细胞上的雌激素受体结合后可促进其活性 ,使骨合成增强 ;而与破骨细胞上的雌激素受体结合后 ,可加速破骨细胞的凋亡。通过这两种机制 ,雌激素直接干预调整骨代谢。Bain^[5]及 Chow 等^[6]认为对去卵巢小鼠使用高剂量雌激素 ,雌激素不但抑制骨吸收 ,而且刺激骨形成 ,但有文献^[7]指出 ,雌激素并不增加生长期大鼠的骨形成 ,这可能与各自所用的方法或使用的动物及采用的模型不同有关。而金雀异黄酮是植物雌激素中具有较强雌激素活性的选择性雌激素受体调节剂 ,文献报道其主要是通过结合骨组织中雌激素 β 受体 ,抑制破骨细胞活性和骨吸收过程 ,从而有效地防止骨质疏松。但也有报道植物雌激素对骨的保护作用与雌激素不同 ,认为它是通过刺激骨形成而非抑制骨的再吸收。为此 ,Fanti 等^[8]对 SD 大鼠行

去卵巢术后补充 G_s ,结果显示 ,与对照组相比 , G_s 可明显保护去卵巢鼠骨量丢失 组织形态学显示 ,显著增加骨密度 ,增加成骨细胞数目 ,提高骨形成率。血清和尿液的生化测定显示 ,补充 G_s 血清中骨钙素及总脱氧吡啶酚(Dpd)含量均显著高于对照组 ,尿液中骨钙素与 Dpd 略高于对照组 ,同时 , G_s 还可减少去卵巢大鼠外周血单核细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的合成。这表明 ,植物雌激素对骨的保护作用与雌激素不同 ,它主要通过细胞因子的调控及对骨形成的刺激作用 ,而非抑制骨的再吸收。血清 ALP 约 40% ~ 75% 由成骨细胞产生 ,其活性可反映成骨细胞功能的强弱。本实验中 G_s 组血清 ALP 活性低于阴性对照组 ,也证实金雀异黄酮对骨形成有刺激作用。

目前认为植物雌激素可以避免雌激素替代疗法可能增加乳腺癌、子宫内膜癌等疾病的危险性。Ishimi 等^[9]以摘除卵巢的小鼠为对象 ,通过皮下注射不同剂量的金雀异黄酮 ,发现低剂量的金雀异黄酮就可抑制小鼠股骨骨小梁的减少 ,同时该剂量对子宫以及子宫内膜细胞几乎没有影响 ,这为老年妇女预防和治疗骨质疏松提供了一种安全可靠的药物选择。

【 参 考 文 献 】

[1] 余增丽 ,李文杰 ,张立实.金雀异黄酮对成人成骨细胞增殖及分

化的影响.卫生研究 2004 ,33(5) :569-571.

- [2] Gao YH , Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts : apoptosis is induced through Ca^{2+} signaling. Biol Pharm Bull , 1999 , 22(8) :805-809 .
- [3] Komm BS , Terpening CM , Benz DJ. Estrogen binding receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like cells. Science , 1988 , 241 (4861) :81-84 .
- [4] Oursler MJ , Osoloby P , Pufferoen J. Avian osteoclast at estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci USA , 1991 , 88(15) :6613-6617 .
- [5] Bain SD , Bailey MC , Celino DL. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in ovariectomized mouse. J Bone Miner Res , 1993 , 8(4) :435-442 .
- [6] Chow J , Tobias JH , Colston KW. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. J Clin In , 1992 , 89(1) :74 .
- [7] Westerlind KC , Wakley GK , Evans GL , et al. Estrogen does not increase bone formation in growing rats. Endocrinology , 1993 , 133 (6) :2924 .
- [8] Fanti P , Monier2Faugere MC , Geng Z , et al. The phytoestrogen Genistein Reduces Bone loss in short term ovariectomized rats. Osteoporos Int , 1998 , 8(3) :274-281 .
- [9] Ishiki Y , Arai N , Wang XX , et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun 2000 , 274 :697-701 .

(收稿日期 :2006-05-18)