

金雀异黄素、己烯雌酚对去势雄性大鼠骨结构的影响

谭文甫 褚加成 李剑 欧阳玲莉

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)05-0368-03

摘要:目的 探讨金雀异黄素、己烯雌酚对雄性大鼠骨结构的影响。方法 3~4 月龄雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组:假去势组(Sham)8 只、去势组(Orch)8 只、去势+己烯雌酚组(Orch+DES, 5g/d)8 只、去势+金雀异黄素组(Orch+Gen I 1 mg/d, Orch+Gen II 2 mg/d)16 只,去势后低钙饲料喂养 16 周处死,剥离干净右肱骨留行 3 点弯曲疲劳试验后观测微损伤及骨组织细胞情况。结果 肱骨疲劳损伤后每组均可见微损伤,以微破裂多见,微破裂平均长度和微破裂面积密度在 Orch 组显著高 Sham 组。成骨细胞(osteoblast)数及密度由高到低分别为 Orch+DES 组、Sham 组、Orch+Gen II 组、Orch+Gen I 组、Orch 组,其中 Orch+DES 组和 Sham 组均显著高于其他 3 组($P < 0.05$)。结论 本次实验表明大鼠肱骨微损伤可作为药物治疗骨质疏松症疗效的评价指标。乙烯雌酚对雄性骨质疏松大鼠作用肯定,能改善骨的结构和性能,金雀异黄素能对雄性骨质疏松大鼠有一定的作用,但不能证实其优于乙烯雌酚,有待进一步研究。

关键词: 金雀异黄素; 己烯雌酚; 去势雄性大鼠; 疲劳; 微损伤

Effects of genistein and diethylstilbestrol on bone architecture in orchidectomized rats TAN Wenfu, CHU Jiacheng, LI Jian, et al. The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of genistein and diethylstilbestrol on bone architecture in orchidectomized rats. **Methods** 40 male Sprague-dawley rats, 3 to 4 months old, were randomly allocated into five groups: sham-operated (Sham), orchidectomized (Orch), orchidectomized supplied diethylstilbestrol (DES, 5 μ g/d) and genistein (Gen I 1 mg/d, Gen II 2 mg/d). All rats were killed after 16 weeks with low calcium forage feeding, the right humerus were used for bone fatigue-induced microdamages, then the microdamages and cells of bone tissue were observed by microscope. **Results** Microdamage could be observed in each group, there was Significant difference in average length, area density of microcrack between Sham and Orch group. The number and density of Bone cell increase gradually from Orch, Orch+Gen I, Orch+Gen II, Sham to Orch+DES. Orch+DES and Sham have significant difference with the other three groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The research shows that the microdamage in the humerus can be used as bone biomechanical marker to evaluate the effectiveness of anti-osteoporotics. Diethylstilbestrol can improve the structure and performance of bone. Genistein has certain effect to osteoporosis in male, but not better than Diethylstilbestrol, more research needed to conform it.

Key words: Genistein; Diethylstilbestrol; Orchidectomized; Fatigue test; microdamage

男性骨质疏松症是多种病因导致的骨代谢疾病,雄激素的缺乏被认为是其首要因素,但是近年来,越来越多的证据表明,雌激素对男性骨骼的生长

发育和骨量的保持发挥重要的作用,男性体内仅有正常水平的雄激素及其作用体系,并不是骨量获得和维持的充分条件。在男性和女性骨组织中均发现雌激素受体,雌激素通过受体介导及各种细胞活性因子的影响对骨代谢(bone metabolism)发挥作用。植物雌激素金雀异黄素对骨组织有类似雌激素样的作用,它和骨质疏松的关系已成为目前的研究热点。

基金项目:广西科学基金资助项目(桂科自 0447042),广西教育厅资助项目

作者单位:4210010 衡阳,南华大学附属第二医院骨科(谭文甫),广西医科大学第一附属医院(褚加成、李剑、欧阳玲莉)

通讯作者:欧阳玲莉,Email: luyangli@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

动物 3~4 月龄雄性 SD 大鼠 40 只 , 体重 (180 ± 20) g , 由广西医科大学动物实验中心提供。主要仪器 : ISOMET 慢速锯 (美国 BUEHLER 公司) , PLD-5010 微机控制电子式疲劳试验机 (长春科新实验仪器有限公司) , DMR + Q550 型病理图像分析仪 (德国 Leica 公司) 。

1.2 方法

40 只大鼠随机分为假去势组 (Sham) , 去势组 (Orch) , 去势 + 己烯雌酚组 (Orch + DES , 5 g/d) , 去势 + 金雀异黄素组 (Orch + Gen I 1 mg/d , Orch + Gen II 2 mg/d) , 每组 8 只 , 全部适应性喂养 2 周后开始实验^[1]。后 4 组大鼠在乙醚麻醉下 , 碘酒、乙醇消毒阴囊皮肤 , 纵隔正中切开一纵行切口 , 剪开鞘膜后 , 分别将双侧睾丸和附睾分离并均切除睾丸 , 然后把附睾放回阴囊 , 缝合切口。Sham 组则找出双侧睾丸 , 然后与附睾分离 , 但不切除睾丸 , 然后放回阴囊。术后 Orch + DES 组采用己烯雌酚注射液按 5 g/d 皮下注射 ; Orch + Gen 组采用金雀异黄素 , 按 1 mg/d , 2 mg/d 两个剂量分别皮下注射共 16 周。Orch 组和 Sham 组无任何处理。术后 16 周各组动物统一用颈椎脱臼法处死 , 留取右肱骨在电子疲劳试验机上进行 3 点弯曲疲劳损伤 , 碱性品红染色后常规包埋 , 损伤后的模片制作 (在疲劳 3 点沿横截面连续制作 3 片) 及图像采集过程见文献^[2]。

1.3 观察指标

镜下对染色骨组织观察 , 包括 : ①微破裂观测微破裂平均长度 (CrLe) = 微破裂长度之和 / 微破裂数目之和 ; 微破裂面积密度 (CrSDn) = 微破裂总长度 / 同个体皮质骨面积 ; 微破裂密度 (CrDn) = 微破裂总数目 / 同个体皮质骨面积。②骨组织细胞的观察 各

组每个标本选 2 张磨片 , 在 ZEISS S100TV 荧光显微镜下观察 , 在每张磨片成骨细胞 (Osteoblast , OB) 较为密集的区域选择 1 个视野 , 用 CCD 头摄取图像输入电脑储存 , 采用画图工具数出所选视野的成骨细胞数 (OB Nov.) , 表现为单核、双核、多核和无核的不算在其中 , 将每个标本的 2 个视野汇总 , 计算成骨细胞密度 (OBDn) = 成骨细胞数 / 横截面积 , 并大致观察每个视野其他的细胞。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析 , 3 组 (或更多组) 的正态分布计量资料方差齐用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) , 组间比较用 LSD 法 , 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示 , 检验水准 $\alpha = 0.05$, 双侧检验。

2 结果

至实验结束时 , Orch + Gen I , Orch + Gen II , Sham , Orch + DES , Orch 组分别为 5、8、8、6 和 5 只 , 共 32 只。各组均出现微损伤 , 以微破裂 (microcrack) 多见 , 少数可见染色性交叉岔折 (cross-hatch staining) 及染色性弥散性损伤 (diffusing staining) 。 5 组大鼠各项指标见表 1 , 微破裂平均长度和微破裂面积密度 Orch 组均显著高于 Sham 组 ($P < 0.05$) 。 5 组大鼠肱骨横截面积大小相互比较差异无统计学意义 , 骨细胞数和骨密度 5 组比较差异有统计学意义 ($P = 0.000$) , 由高到低依次为 Orch + DES 组、Sham 组、Orch + Gen II 组、Orch + Gen I 组、Orch 组 , 其中 Orch + DES 组、Sham 组和 Orch + Gen II 组均显著高于 Orch 组 ($P < 0.05$) , Orch + Gen II 组和 Orch + Gen I 组均显著低于 Orch + DES 组、Sham 组 ($P < 0.05$) ; 骨细胞密度显示出相同的结果。此外 , 在显微镜下发现于 Orch 组可见大量核已经消失或者双核的成骨细胞。

表 1 5 组大鼠各项指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CrLe (μm)	CrSDn ($10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	CrDn ($10^{-4} \#/\mu\text{m}^2$)	OB Nov	OBDn ($10^{-3} \#/\mu\text{m}^2$)
Sham	183.1 ± 42.7	5.53 ± 1.22	0.40 ± 0.19	56.8 ± 6.82 ^c	1.64 ± 0.19 ^c
Orch	325.0 ± 75.4 ^a	9.95 ± 2.90 ^a	0.41 ± 0.21	35.7 ± 6.43 ^{ab}	1.10 ± 0.21 ^{ab}
DES	266.1 ± 90.0	7.65 ± 2.65	0.72 ± 0.47	61.5 ± 5.39 ^c	1.84 ± 0.21 ^c
Gen I	237.2 ± 58.0	6.79 ± 1.27	0.73 ± 0.13	42.6 ± 8.68 ^{ab}	1.28 ± 0.32 ^{ab}
Gen II	291.2 ± 73.0	8.65 ± 2.40	0.49 ± 0.29	45.1 ± 6.77 ^{abc}	1.32 ± 0.18 ^{ab}

注 : 与 Sham 组比较^a $P < 0.05$; 与 DES 组比较^b $P < 0.05$; 与 Orch 组比较^c $P < 0.05$

3 讨论

骨微损伤是影响骨脆性的一个重要因素^[3] , 对于骨质疏松性骨折研究有重要意义。王运林等^[4]利

用去势大鼠的椎体骨微损伤得出金雀异黄素早期应用可使骨结构性能提高 , 长期应用能防止骨量丢失并改善骨结构。戴如春等^[5]研究发现微损伤与松质骨含量较多的胫骨上端部位骨密度相关 ; 与椎骨弹

性模量、椎骨最大应力存在负相关关系,并与多个骨形态计量学指标(骨小梁间隔、骨小梁数目、骨小梁厚度、标记百分率和骨形成率)相关。微损伤与松质骨关系密切,与密质骨关系目前研究甚少。本实验结果表明微破裂平均长度和微破裂面积密度在 Sham 组均显著低于 Orch 组,由此表明微损伤与皮质骨关系同样密切,大鼠肱骨微损伤也可以作为药物治疗骨质疏松疗效的评价指标。

骨组织细胞失衡(成骨细胞减少,破骨细胞增加)与骨质疏松的发生有着密切的关系^[6-7]。根据此机制,可通过观察骨组织细胞情况了解药物治疗骨质疏松症的疗效。雌激素主要通过抑制成骨细胞的凋亡和促进破骨细胞的凋亡参与骨组织的代谢^[8-12],能增加骨密度,提高骨量,维持骨的完整性^[13]。本实验中各组大鼠肱骨横截面积相互比较无统计学差异,表明组间具有可比性,去势大鼠补充雌激素后骨细胞数及密度在 DES 组显著高于 Orch 组,且超过 Sham 组,证明雌激素对雄性骨质疏松大鼠症疗效肯定,这与我们前期的实验结果一致^[1]。

植物雌激素与骨质疏松的关系存在很大的分歧,流行病学研究^[14]表明,植物雌激素可延缓骨质疏松的发生,Turck^[15]称植物雌激素能损害免疫系统,含有一些有害成分,不应被广泛使用,Ward 等^[16]以 CD-1 雄性和雌性大鼠为研究对象,报道胚胎时期就给予植物雌激素进行干预,生后乃至成年时期骨密度和性能并不能得到提高,Piekarz 等^[17-18]则报道生后前 5 天给予雄性大鼠植物雌激素,仅对脊柱骨有正面作用。Bahr 等^[19-20]的研究发现大豆异黄酮对去势大鼠的骨影响微弱。作为植物雌激素的一种,有报道金雀异黄素生物活性强,低浓度可刺激雌激素基因表达和细胞生长,可降低骨转换率,抑制骨量丢失。本实验试图了解金雀异黄素对男性骨质疏松的疗效,结果表明 2mg/d 皮下注射 16 周后成骨细胞数及密度显著高于 Orch 组,低于 DES 组和 Sham 组,表明其对雄性骨质疏松大鼠有一定的作用,但并不优于雌激素。因此,植物雌激素是否适合用于男性骨质疏松症有待进一步研究。

本实验不足之处在于选用微损伤作为观察指标时各治疗组和对照组差异无统计学意义,且数据之间无一定的趋势可循,仅 Orch 组和 Sham 组之间差异有统计学意义,可能与样本量小及皮质骨的抵抗性能远较松质骨强,本实验所选择的疲劳实验参数也不足。本实验采用皮质骨微损伤评价药物对骨质疏松症的疗效仅是初步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 原春玲,欧阳玲莉,梁晓,等.金雀异黄素、己烯雌酚对去势雄性大鼠骨代谢的影响.中国骨质疏松杂志,2008,14(9):635-637.
- [2] 戴如春,廖二元.17 β -雌二醇对去卵巢 SD 大鼠离体骨组织微损伤的影响.中国康复,2003,18(1):6-9.
- [3] Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, et al. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporosis and stress fractures. J Bone Miner Res, 1997, 12: 6-15.
- [4] 王运林,刘晓晴,夏秦,等.金雀异黄素对去势大鼠的骨组织微损伤的影响.中国康复,2006,21(1):9-11.
- [5] 戴如春,廖二元,杨川,等.应用多元线性回归分析探讨骨微损伤的间接判定方法.中国骨质疏松杂志,2003,9(4):299-303.
- [6] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling: Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. New Engl J Med, 1995, 332: 305-311.
- [7] 李龙鹤,白殿卿,王岩,等.去卵巢大鼠模型成骨细胞破骨细胞平衡的实验研究.中国比较医学杂志,2005,15(4):213-217.
- [8] Kousteni S, Han L, Chen JR, et al. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. J Clin Invest, 2003, 111: 1651-1664.
- [9] Lorenzo J. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. J Clin Invest, 2003, 111: 1641-1643.
- [10] Piva R, Penolazzi L, Lambertini E, et al. Induction of apoptosis of human primary osteoclasts treated with a transcription factor decoy mimicking a promoter region of estrogen receptor alpha. Apoptosis, 2005, 10: 1079-1094.
- [11] Chandar N, Logan D, Szajkovic A, et al. Gene expression changes accompanying p53 activity during estrogen treatment of osteoblasts. Life Sciences, 2004, 75: 2045-2055.
- [12] Luo XH, Liao EY. Recombinant matrix metalloproteinase-14 catalytic domain induces apoptosis in human osteoblastic SaOS-2 cells. J Endocrinol Invest, 2003, 26: 1111-1116.
- [13] 李晓红,任辉,唐卫峰.雌激素及钙剂对去势大鼠种植体界面骨愈合影响的相关研究.中国口腔种植学杂志,2006,11(4):151-154.
- [14] Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, et al. Effects of Genistein and Hormone-replacement Therapy on Bone Loss in Early Postmenopausal Women; A Randomized Double-blind Placebo-controlled Study. J Bone Miner Res, 2002, 17(10): 1904-1912.
- [15] Turck D. Soy protein for infant feeding: what do we know? Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007, 10(3): 360-365.
- [16] Ward WE, Piekarz AV. Effect of Prenatal Exposure to Isoflavones on Bone Metabolism in Mice at Adulthood. Pediatric Research, 2007, 61(4): 438-443.
- [17] Piekarz AV, Ward WE. Effect of Neonatal Exposure to Genistein on Bone Metabolism in Mice at Adulthood. Pediatric Research, 2007, 61(1): 48-53.
- [18] Breitman PL, Fonseca D, Ward WE, et al. Combination of soy protein and high dietary calcium on bone biomechanics and bone mineral density in ovariectomized rats. Menopause, 2005, 12(4): 428-435.
- [19] Bahr JM, Rivera A, Nakai M, et al. Dietary soy protein and isoflavones: minimal beneficial effects on bone and no effect on the reproductive tract of sexually mature ovariectomized Sprague-Dawley rats. Menopause, 2005, 12(2): 165-173.
- [20] Gallagher JC, Satpathy R, Rafferty K, et al. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. Menopause, 2004, 11(3): 290-298.

(收稿日期:2008-12-24)