

鲛鳐鱼骨对去卵巢骨质疏松大鼠的影响

芦红艳¹, 李妍妍², 王 奇¹, 王 霞¹, 苏秀榕^{1,*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 目的: 通过研究鲛鳐鱼骨粉对去卵巢大鼠骨质疏松的作用, 确定鲛鳐鱼加工下脚料的使用价值, 方法: 雌性 SD 大鼠 60 只, 按体质量随机分为 6 组, 即假手术组、模型对照组、阳性对照组(乳酸钙 1000mg/(kg·d))及鱼骨高(6636mg/(kg·d))、中(2100mg/(kg·d))、低(665mg/(kg·d))3 个剂量组。手术后 12d, 持续灌胃 12 周后, 测定股骨长度、股骨质量、子宫形态以及血清中 Ca、P 和碱性磷酸酶(APL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)的水平。结果: 各剂量组大鼠与模型对照相比股骨质量升高, 所有大鼠的股骨长度、血清 Ca 和血清 P 水平差异无显著性, 模型对照组的血清碱性磷酸酶水平 APL、AST、ALT 与假手术组相比明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而各剂量组的 APL、AST、ALT 水平与假手术组差异不显著。同时各剂量组可以促进子宫内膜腺体发育和内膜上皮无纤毛细胞上的微绒毛生长。结论: 鲛鳐鱼骨可改善去卵巢大鼠的血清生化指标, 并促进子宫内膜腺体发育和内膜上皮无纤毛细胞上的微绒毛生长。

关键词: 鲛鳐鱼骨; 去卵巢大鼠; 子宫形态; 生化指标

Effects of *Lophius litulon* Bone in Ovariectomized Rats with Osteoporosis

LU Hong-yan¹, LI Yan-yan², WANG Qi¹, WANG Xia¹, SU Xiu-rong^{1,*}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Purpose: To find out the effect of *Lophius litulon* bone on osteoporosis in ovariectomized rats. Methods: Sixty SD female rats were divided at random into six groups: sham-operation group, model control group, positive control group [1000 mg/(kg·d) calcium lactate] and low-, medium- and high-dose treatment groups [at the doses of 665, 2100 mg/(kg·d) and 6636 mg/(kg·d), respectively]. At 12 days after ovariectomy, the rats were administrated for 12 consecutive weeks and then killed for the determination of femoral length and weight, uterus shape, and the serum levels of Ca, P, APL, AST and ALT. Results: The three treatment groups showed an increase in femoral weight compared with the model control group, but no significant difference in femoral length and the serum levels of P and Ca was observed. The serum levels of APL, AST and ALT in the model control group were significantly higher those of the sham-operation group, but no significant difference existed among the treatment groups and sham-operation group. In addition, each treatment group could promote endometrial gland development and microvillar growth in endometrial gland nonciliated epithelial cells. Conclusion: *Lophius litulon* bone can improve the serum biochemical indices and promote microvillar growth in endometrial gland nonciliated epithelial cells.

Key words: *Lophius litulon* bone; ovariectomized rat; uterus shape; biochemical indices

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0252-04

绝经后骨质疏松与老年性骨质疏松也称为原发性骨质疏松, 是代谢性骨病中最常见的疾病, 常见于 40 岁以上的中年人和老年人, 女性比男性更为常见^[1]。绝经后骨质疏松(post menopausal osteoporosis, PMOP)是由于绝经后

妇女卵巢功能衰退, 雌激素明显减少, 导致骨吸收大于骨形成而产生, 以骨量减少和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨骼脆性增加和易发生骨折的全身性疾病^[2]。

鲛鳐鱼(*Lophius litulon*), 俗称蛤蟆鱼、海蛤蟆,

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 宁波市科技局农业与社发领域重大科技项目(2010C03017-1); 宁波市重点学科资助项目(B01345104900)

作者简介: 芦红艳(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品。E-mail: magiclhy@163.com

* 通信作者: 苏秀榕(1956—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学与工程, 生化与分子生物学。

E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

属软骨鱼类, 鮫鰩目(*Lophiiformes*)、鮫鰩科(*Lophiidae*), 其资源主要分布在我国东海北部、黄海和南海。目前鮫鰩鱼主要用于加工后鱼肉和鱼肝的出口, 同时也会产生近 60% 的下脚料, 而鱼骨约占下脚料的 15%, 如不进行加工处理, 既浪费资源, 又污染环境。由于鮫鰩鱼生活于深海, 其食物由天然环境中取得, 没有受到有害药物等污染, 鱼骨中含有丰富的 Ca 和比例适当的 P, 可作为人类理想的 Ca 源, 鱼骨的 Ca 主要是磷酸钙, 含量约 58%~62%, 其组成很接近人体骨骼, 是制取食品级磷酸氢钙的原料之一。本实验以鮫鰩鱼骨为原料, 研究其对去卵巢大鼠的股骨长度、干质量、以及血清中 Ca、P 和碱性磷酸酶的含量, 借以模拟对人绝经后骨质疏松症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

雌性 SD 大鼠(250 ± 2)g 浙江省医学科学院实验动物中心。

鮫鰩鱼骨, 购于舟山附近海域, 冷藏状态带回实验室, 经高压、粉碎制得粉末后, 制成鮫鰩鱼骨粉, 再用胶体磨将其制成悬浮液。

Ca 试剂盒、P 试剂盒、碱性磷酸酶(APL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒 宁波美康生物科技有限公司。

S-3400N 扫描电镜、7020 全自动生化分析仪 日本日立仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

实验动物按体质量随机分为假手术组和手术组, 手术前禁食 12h。以 30mg/kg 的剂量腹腔注射 2g/100mL 戊巴比妥钠溶液, 麻醉后手术组进行双侧卵巢切除, 假手术组(N 组)只切除卵巢周围相同质量的脂肪。手术后肌肉注射 8 万单位的青霉素, 连续 3d。

1.2.2 分组与给药

卵巢切除 12d 后将手术组随机分为 5 组: 每组各 10 只, 即模型组(M 组)、阳性对照组(Q 组 1000mg/(kg·d) 乳酸钙)、鮫鰩鱼骨高剂量组(C1 组, 6636mg/(kg·d))、中剂量组(C2 组, 2100mg/(kg·d))、低剂量组(C3 组, 665mg/(kg·d)), 实验期间, 各组自由进食水, 室温保持 25℃左右, 光照昼夜间隔 12h。每周称体质量一次, 连续灌胃鱼骨悬浮液及乳酸钙溶液 12 周。

1.2.3 测定指标

子宫内膜形态: 第 90 天, 处死大鼠, 取出子宫称质量, 并固定于 2.5% 戊二醛溶液中, 扫描电镜观察内膜上皮。

$$\text{子宫系数} / \% = \frac{\text{子宫质量}}{\text{体质量}} \times 100$$

血清生化指标: 各组大鼠腹主动脉取血, 3000r/min 离心, 取上层血清, 采用全自动生化分析仪测定血清 Ca、P 含量及 APL、AST 及 ALT 水平。

股骨: 大鼠处死后, 剥离右股骨, 测量股骨长度, 再经 105℃烘烤 8h, 称质量。

1.3 数据分析

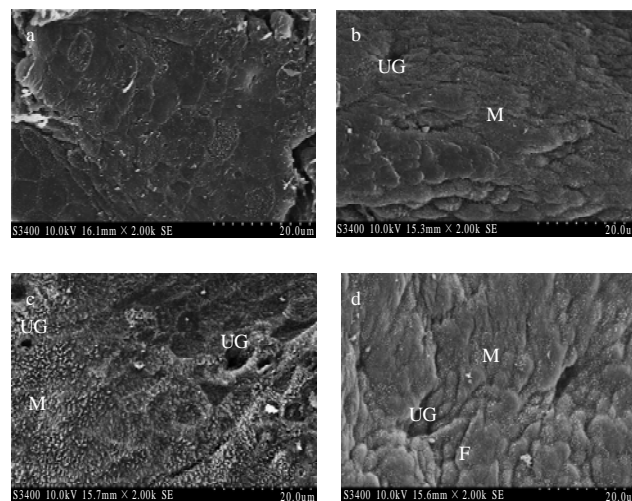
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 SPSS 进行方差分析, 用两组样本均数比较的 *t* 检验比较组间差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 大鼠子宫内膜形态及子宫系数

2.1.1 子宫内膜形态

扫描电镜可见, 与假手术组相比, 模型对照组子宫内膜上皮表面扁平且皱褶不明显, 腺体开口数量明显减少, 无纤毛细胞表面被覆微绒毛极少(图 1a、b)。与模型对照组相比, 摄入阳性药及鮫鰩鱼骨的大鼠, 子宫内膜表面褶皱和腺体开口数量明显增加, 且微绒毛长度和覆盖面积均显著提高(图 1c、d)。



a. 假手术组; b. 模型对照组; c. 阳性对照组; d. 中剂量组。UG. 子宫腺体; M. 微绒毛; F. 褶皱。

图 1 电镜扫描子宫内膜超微结构(×2000)

Fig.1 Effects of *Lophius litulon* bone on uterine luminal surface ultrastructure in rats as observed under scanning electron microscopes(×2000)

2.1.2 子宫系数测定结果

由表 1 可知, 与假手术组相比, 模型对照组子宫的形态明显萎缩, 质量明显减少, 此外, C1、C2、C3 剂量组的子宫质量较模型组明显增大, 其中, C1 组高于阳性对照组, 且趋近于假手术组, 各实验组呈量效关系。

表 1 各组大鼠子宫系数
Table 1 Effect of *Lophius litulon* bone on uterus coefficient in rats

组别	N 组	M 组	Q 组	C1 组	C2 组	C3 组
子宫系数/%	0.1414 ± 0.1421	0.0305 ± 0.0086 ^a	0.0725 ± 0.0844	0.1309 ± 0.0444 ^{bb}	0.0861 ± 0.0876	0.0472 ± 0.0469

注: a.与 N 组相比,有显著性差异($P < 0.05$); a.与 N 组相比,有极显著性差异($P < 0.01$); b.与 M 组相比,有显著性差异($P < 0.05$); bb.与 M 组相比,有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

表 2 大鼠 Ca、P 含量及血清碱性磷酸酶活力
Table 2 Effect of *Lophius litulon* bone on serum levels of Ca, P and ALP in rats

组别	Ca 含量/(mmol/L)	P 含量/(mmol/L)	ALP 活力/(U/L)	ALT 活力/(U/L)	AST 活力/(U/L)
N 组	2.88 ± 0.10	2.10 ± 0.22	50.88 ± 1.64	25.69 ± 4.59	67.80 ± 9.64
M 组	2.85 ± 0.16	2.28 ± 0.32	76.65 ± 15.08 ^{aa}	36.29 ± 3.54 ^{aa}	86.07 ± 5.37 ^{aa}
Q 组	2.87 ± 0.26	2.11 ± 0.46	52.47 ± 12.55 ^b	30.32 ± 4.6 ^b	75.30 ± 7.24 ^{bb}
C1 组	2.87 ± 0.21	2.18 ± 0.59	43.96 ± 6.23 ^b	25.76 ± 7.18 ^{bb}	67.32 ± 8.52 ^{bb}
C2 组	2.78 ± 0.23	2.26 ± 0.58	49.44 ± 9.57 ^b	27.02 ± 9.80 ^b	68.95 ± 14.35 ^b
C3 组	2.87 ± 0.35	2.12 ± 0.41	52.18 ± 7.64 ^b	29.05 ± 6.64 ^b	69.74 ± 8.63 ^b

2.2 大鼠血清生化指标测定结果

由表 2 可见,各组大鼠的血 Ca 和血 P 水平与假手术组相比,差异不显著,卵巢摘除和鲛鳔鱼骨对血 Ca 和血 P 水平没有影响。同时,模型对照组大鼠的 ALP、ALT 与 AST 水平与假手术组相比,有显著性差异($P < 0.01$),灌胃鱼骨粉后,各实验组 ALP、ALT 与 AST 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 C1 组作用最显著,C2 组的水平与模型组相比有降低趋势,并趋近假手术组水平,高剂量组的效果要优于低、中剂量组。

2.3 大鼠股骨的测定

表 3 大鼠股骨长度及质量
Table 3 Effect of *Lophius litulon* bone on femoral length and weight in rats

组别	长度/mm	质量/g
N 组	35.31 ± 0.97	0.7549 ± 0.0308
M 组	35.35 ± 0.44	0.7047 ± 0.0026 ^a
Q 组	35.18 ± 0.65	0.7380 ± 0.0335
C1 组	35.92 ± 0.47	0.7726 ± 0.0338 ^{bb}
C2 组	35.64 ± 0.56	0.7501 ± 0.0476
C3 组	35.64 ± 0.43	0.7423 ± 0.0427

由表 3 可见,摘除卵巢可使大鼠的股骨质量减少,模型组与假手术组相比有显著性差异($P < 0.05$)。各剂量组的股骨质量较模型组升高,且都高于阳性对照组,其中 C1 组与模型组比较有极显著性差异($P < 0.01$),并与 C2、C3 组成量效关系。各组大鼠间股骨长度无显著性差异。

3 讨 论

3.1 骨质疏松动物模型的建立

雌激素主要是由卵巢产生及释放的,其可以使子宫

内膜增生,腺体增多,功能层增厚。妇女绝经后,卵巢功能衰退,雌激素分泌减少,相应的引起生殖道的变化,使子宫萎缩,同时,松质骨的骨量减少,骨强度下降,并伴有骨转换率增加^[3]。Hidaka 等^[4]研究中药对去卵巢大鼠子宫的影响中提到,雌激素直接影响子宫质量,子宫萎缩是卵巢成功摘除的典型标志。本实验采用去卵巢大鼠模拟绝经期妇女骨质疏松症,大鼠摘除卵巢后,模型对照组子宫明显萎缩,子宫质量也明显减小,说明骨质疏松模型构建成功。

3.2 血清生化指标的变化

Ca、P 平衡受甲状旁腺素、降钙素等多种因素的调节和控制。本研究建立了骨质疏松模型并证实了鲛鳔鱼骨对骨质疏松的防治作用,但各组大鼠的血 Ca 和血 P 水平无显著性差异,所以其不能作为反应骨质疏松的特异性指标。

血清中的 ALP 主要来自骨和肝,骨 ALP 与成骨细胞活性有关,ALP 的上升说明了成骨细胞的活性增强^[5],由于去卵巢模型是高转换型骨代谢^[6],骨吸收大于骨形成导致的骨质疏松,本研究中 ALP 的变化符合去卵巢模型的特点。一般认为 ALP 的升高是伴随着骨吸收的亢进而出现的代偿性骨形成增加引起的^[7]。实验中,模型对照组 ALP 水平明显升高,说明骨吸收亢进,骨更新加速,代偿性骨形成增加,给药后,ALP 水平恢复到正常水平,因此,ALP 可以作为骨质疏松的特异性指标。脂肪肝发病一般认为与体内脂肪代谢异常密切相关,同时,脂肪细胞与肝细胞之间脂肪代谢平衡的失调也会增加脂肪肝的发病率^[8-9],ALT、AST 存在于肝细胞的细胞核及线粒体中,肝细胞受损时,ALT、AST 释放入血,导致血清中的含量增加。实验结果表明,去卵巢大鼠摄入鱼骨粉后,与模型对照组比较,ALT、AST 水平显著降低,并与剂量呈正相关性。可见,鲛鳔鱼

骨悬浮液能显著降低去卵巢大鼠血清 ALT、AST 活性。

3.3 鲛鳔鱼骨对子宫的作用

程妍等^[10]研究了牦牛营养粉能显著改善大鼠骨质,且不会对血清生化指标产生不良影响。龚海洋等^[11]对乳酸钙防治骨质疏松进行了研究,并且证明乳酸钙具有抑制骨吸收作用。在本实验中,对去卵巢大鼠灌胃鱼骨悬浮液后,其能使大鼠子宫质量明显增加,并促进子宫内膜腺体发育和内膜上皮无纤毛细胞上的微绒毛生长。其对骨质疏松的防治机理可能是改变了雌激素或雌激素受体的活性^[12]。鲛鳔鱼为软骨鱼类,鱼骨中含有硫酸软骨素,阳春华等^[2]研究了硫酸软骨素加 Ca 对去卵巢切除大鼠骨密度和骨 Ca 含量的影响,发现硫酸软骨素加 Ca 不仅能有效抑制雌激素缺乏所诱发的骨丢失,而且能明显增加骨密度。因此鲛鳔鱼骨可作为一种良好的 Ca 制剂来源。

参考文献:

- [1] 支英杰,谢雁鸣. 中医药对绝经后骨质疏松症的现代研究进展[J]. 中医药杂志, 2010, 51(1): 241-243.
- [2] 阳春华,胡余明,易传祝. 硫酸软骨素加钙对卵巢切除大鼠骨密度和骨钙含量的影响[J]. 实用预防医学, 2008, 15(4): 1053-1054.
- [3] WRONSKI T J, WALSH C C, IGNASZEWSKI L A. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats [J]. Bone, 1986, 7: 119-124.
- [4] HIDAKA S, OKAMOTO Y, NAKAJIMA K, et al. Preventive effects of traditional Chinese (Kampo) medicines on experimental osteoporosis induced by ovariectomy in rats[J]. Calcif Tissue Int, 1997, 61: 239-246.
- [5] 陈新军,霍维玲,李香业,等. 联合检测尿脱氧吡啶啉与骨源性碱性磷酸酶诊断骨质疏松症[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 253-254.
- [6] PEDERSOR L, KREMER M. Evidence of a correlation of estrogenreceptor level and avian osteoclast estrogen responsiveness[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(2): 742-752.
- [7] 霍乃蕊,马俪珍,忻欣,等. 羊骨酶解发酵液螯合物对骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 216-219.
- [8] CHEN Jiaming, SONG Wu, REDINGER R. Effects of dietary cholesterol on hepatic production of lipids and lipoproteins in isolated hamster liver[J]. Hepatology, 1996, 24: 424-434.
- [9] BACHMAN A L, DUBIN M D, MOUKARZEL A A. Choline deficiency, a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reverse with intravenous choline supplementation[J]. Hepatology, 1995, 22: 1399-1403.
- [10] 程妍,余群力,赵莉,等. 牦牛骨营养粉对大鼠骨密度及血清生化指标的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 204-206.
- [11] 龚海洋,李文灿,卢承前,等. 乳酸钙防治实验性骨质疏松的研究[J]. 卫生研究, 1998, 27(6): 402-404.
- [12] CLARK R C, TARTTELIN M F. Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat[J]. Physiol Behav, 1982, 28(6): 963-969.