

大豆甙元抑制去卵巢大鼠骨矿丢失和 相关元素关系的研究

吕 伶¹, 金邦荃^{2,*}, 周耀民², 詹 巍²

(1. 南京市妇幼保健院, 江苏 南京 210004; 2. 南京市师范大学, 江苏 南京 210097)

摘 要: 目的: 研究大豆甙元对去卵巢引起的骨质疏松大鼠骨矿物质和相关元素含量的影响。方法: 实验用 40 只三月龄雌性清洁级大鼠, 分为 4 组。其中去卵巢 + 己烯雌酚组 (OVX-E)、去卵巢 + 大豆甙元组 (OVX-D) 大鼠每日分别灌胃己烯雌酚或大豆甙元, 另二组大鼠仅灌胃等量蒸馏水。饲喂三个月后 (90d) 处死, 收集血和骨样, 分别测定钙 (Ca)、磷 (P)、锌 (Zn)、镁 (Mg)、锰 (Mn) 和碱性磷酸酶 (ALP) 等指标。结果 去卵巢后雌性大鼠血清 Ca、P、Zn、Mg 含量无明显变化, 但灌胃己烯雌酚或大豆甙元的去卵巢大鼠血清 P、Zn、Mg 含量则较假手术组 (Sham) 和去卵巢组 (OVX) 大鼠显著降低 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。与 OVX 组相比, OVX-E 和 OVX-D 组大鼠骨骼 Ca、Zn 含量得到改善; 血清和胫骨钙磷比 (Ca:P) 的显著升高, 分别为增加 36.4% 和 48.6% ($p < 0.01$), 接近 Sham 组。结论: 研究进一步证实大豆甙元在改善骨密度的机理之一是, 通过减少血清 P、Zn、Mg 吸收, 提高 Ca 的吸收利用率, 有利于 Ca 和 Zn 在胫骨中沉积, 而增强骨密度。但血清碱性磷酸酶的表达主要与内源性雌激素水平有关。
关键词: 大豆甙元; 钙; 锌; 去卵巢大鼠

Effects of Daidzein on the Relationship among Ca, P, Zn, Mg, Mn and Bone Loss
in Ovariectomized Female Rats

LÜ Ling¹, JIN Bang-quan^{2,*}, ZHOU Yao-min², ZHAN Wei²

(1. Nanjing Maternal and Child Health Hospital, Nanjing 210004, China

2. Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Objective: This study was designed to research the effects of daidzein on bone calcium metabolism in ovariectomized rats. Methods: Forty 90-day old female Sprague Dawley rats were randomly divided into four groups. 10 rats were operated with ovary as Sham group for the control (Sham). Other 30 rats were ovariectomized for OVX, OVX-E (Drenched 100 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ bw. d Diethylstilbestrol, DES) and OVX-D group (Drenched 100mg/kg·d bw Daidzein, Da), 10 in each one. After feeding 90 days, all of rats were killed to collect the blood and bone samples. The content of Ca, P, Mg, Zn, Mn in serum and bone were assayed. Results The results showed that the content of Ca, P, Mg, Zn in serum in OVX group were similar to those in Sham group, while P, Mg, Zn were decreased significantly in OVX-E and OVX-D groups compared to Sham groups ($p < 0.01$, $p < 0.05$). The content of bone Ca and Zn in OVX-E and OVX-D groups were increased, compared with OVX group, accessing the normal lever. And then the ratio of Ca: P in serum and bone was increased by 36.4% or 48.6% ($p < 0.01^{**}$). Conclusion: The Ca utilization and deposition in bone were increased because the higher ratio of Ca:P and lower level of P, Mg, Zn in serum were controlled by Da or DES. However, ALP in serum has relation with endogenous estrogen.

收稿日期 2006-03-13

*通讯作者

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2002025); 南京市市级医学科技发展专项资金 (YKK0277)

作者简介: 吕伶 (1981-), 女, 硕士, 研究方向为营养与功能因子。

⑧ 郭德荣. 良性前列腺增生的分子机制[J]. 中国老年医学杂志, 2000, 20(5): 319.

⑨ 夏术阶, 许纯孝, 杜得利, 等. 细胞凋亡和性激素环境与前列腺增生

的关系[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20 (5): 299-301.

⑩ 候士良, 崔瑛, 马爱莲, 等. 三妙胶囊治疗前列腺增生药理研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (2): 110-114.

Key words: daidzein; Ca; Zn; ovariectomized female rats

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0317-04

随着老龄化时代的来临, 老龄人群骨质疏松(osteoporosis, OP)或骨密度(BMD)降低已引起社会和科学家广泛的关注。中老年人伴随年龄增长表现出性腺功能衰退, 引发骨质丢失加快。尤其是女性, 卵巢功能衰退和雌激素的逐渐缺失, OP 或低BMD临床症状明显高于男性^[1-5]。尽管早在上世纪三、四十年代, 人们临床上已采用雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)以缓解女性更年期综合征; 但近年发现长期服用雌激素, 存在一定的副作用^[2, 6], 人们希望寻找更安全的替代品。上世纪90年代美国流行病学调查注意到, 有食用大豆的习惯的日本人, 进入老年后骨质丢失明显少于欧美人群, 经过进一步研究发现大豆异黄酮是主要的功能成分^[3-5, 7]。

大豆异黄酮(isoflavones)是一种重要的多酚类物质, 其主要成分有大豆甾元(daidzein, Da)、染料木素(genistein)和黄豆黄素(glycetein)等^[4-5]。近年化学和医学研究表明, 大豆异黄酮具有微弱的雌激素效应; 进入体内后, 参与对雌激素受体(ER)的竞争性结合, 表现出雌激素活性和抗雌激素活性的双重性, 可能介入机体钙磷代谢^[7-9]。但目前对研究主要集中于染料木素, 大豆甾元是否也有同样效应有待进一步研究, 本研究重点研究Da对体内Zn、Mg、Mn代谢影响与Ca、P代谢之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型建立

40只3月龄清洁级SD雌性成年大鼠(动物合格证号: SYXK(沪)20020010), 随机分为4组, 入试体重为240~310g($p > 0.05$)。采用背驮式手术法切除30只大鼠双侧卵巢, 分别为去卵巢组(OVX)、去卵巢+己烯雌酚组(OVX-E)和去卵巢+大豆甾元组(OVX-D); 而假手术组(Sham)大鼠仅去除卵巢周围少量脂肪组织^[10]。

1.2 饲料与饲养

参照国家大鼠配合饲料标准^[11]设计无大豆颗粒饲料, 术后大鼠于SPF实验室喂养90d^[12], 保持20~25℃室温和70%~75%相对湿度; 自由饮水和摄食。

1.3 实验材料与灌胃剂量

Da含量98%, 白色结晶粉末, 宣化化工厂; 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES): 0.5mg/片, 合肥九联制药有限公司生产, 批号为000195。使用时用蒸馏水将Da和DES分别配制为100μg/kg bw和100mg/kg bw悬浮液。

OVX-E和OVX-D组大鼠每日分别灌胃给予100μg/

kg bw DES或100mg/kg bw Da; 另二组灌胃给予同体积蒸馏水, 以示对照。每周称量体重, 调整灌胃剂量。

1.4 样品收集与分析

1.4.1 血样和骨样预处理

90d后, 实验大鼠空腹称重后直接股动脉放血处死。收集血液, 分离血清(4℃, 4000r/min, 15min); 分离右侧股骨和胫骨, 剔除骨上软组织后, 用生理盐水浸泡的湿纱布包裹和密封; 置于-20℃冰箱待测^[13]。

1.4.2 骨密度的测定

取右侧股骨, 通过股骨骨干端暴露的骨髓腔将骨髓抽出; 烘至恒重, 称量干骨重量。烘干的股骨样品放入Sartorius LA120s固体密度测定仪上部的测量杯里进行测定, 得出股骨在空气中的重量(A), 再将股骨样品放入仪器下部盛水的测量杯中, 平衡后得到股骨在水中的浮力(P), 按下式求出股骨密度(Q_1):

$$Q_1 (\text{g/cm}^3) = \frac{\text{骨干重}(A)}{\text{浮力}(P)} \times Q_0$$

式中, Q_0 为水的密度。

1.4.3 骨灰分分析

取大鼠右侧胫骨, 烘至恒重后并称量; 电炉上炭化至无烟, 之后放入550℃马福炉内灰化6~8h, 称量灰重; 计算股骨矿物质含量(灰重/干重×100%)^[14-15]。

1.4.4 血清Ca、P和骨P分析

用AU640-Olympus全自动生化分析仪分别测定Ca含量(偶氮肿III法)、P含量(钼兰比色法)^[16]。

1.4.5 血清和骨Ca、Mg、Zn、Mn分析

将血清稀释后直接用Avanta-GBC原子吸收分光光度计分别测定血清Mg和Zn^[17]; 骨灰化后再用1:1盐酸溶液消化并稀释, 及测定Ca、Mg、Zn、Mn^[18]。

1.4.6 血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)分析

用AU640-Olympus全自动生化分析仪测定^[16]。

1.5 实验数据采集与统计处理

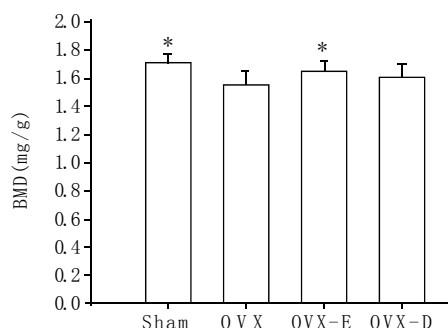
实验数据采集后, 用SPSS10.0软件进行单因素方差分析。图表中参数用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 显著性用*表示($p < 0.05$), 非常显著用**表示($p < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 股骨BMD变化

本研究观测到去卵巢后, 大鼠股骨BMD显著低

于Sham组大鼠；而服用Da或DES的去卵巢大鼠BMD较OVX组提高，其中DES组BMD提高显著($p < 0.05$ ，图1)。



与OVX组相比差异有显著性 * : $p < 0.05$ 。

图1 各组骨密度
Fig.1 Femoral BMD

2.2 血清和胫骨Ca、P含量及Ca:P比变化

服用90d DES或Da后，OVX-E和OVX-D组大鼠除血清Ca外，P含量均较Sham和OVX组显著降低；且Ca:P比达到(1.5~1.6):1，显著高于Sham和OVX组($p < 0.01$ ，表1)。

实验进一步发现，90d后OVX组胫骨中Ca沉积显著低于其它三组，仅(128.8 ± 5.0)mg/g，骨Ca:P比为0.7:1，出现明显异常($p < 0.01$)；而服用DES或Da的去卵巢大鼠骨Ca沉积与Sham组近似，均为1.4:1，恢复正常(表2)。

2.3 血清和胫骨Zn、Mg和Mn含量的变化

与OVX组相比，Sham组大鼠血清Mg含量显著下降($p < 0.05$)；而OVX-E和OVX-D组Mg、Zn含量显著下降($p < 0.01$)；结果胫骨中未见到Mg含量的变化，但OVX-E和OVX-D组Zn含量显著回升($p < 0.01$ ， $p < 0.05$)，与正常组无显著差异(表1、2)。

2.4 血清ALP变化

Sham组ALP处于较低水平，而去卵巢后无论是否补充外源性DES或Da，ALP均处于较高水平($p < 0.01$ ，表1)。

3 讨论

3.1 Da和DES对BMD的影响

中老年人尤其是女性，随着年龄增长和更年期的到来，卵巢功能逐渐衰退并伴随体内雌激素水平下降，引发肠Ca吸收减少和骨Ca的重吸收增高，而导致骨量丢失和BMD降低^[1-3]。骨矿含量和骨密度是量化骨量的重要指标。本实验发现，外源性DES可以明显抑制去卵巢引起的BMD下降，虽然Da效用不及DES，但是也在一定程度上改善了去卵巢大鼠的BMD。但本实验未发现各处理BMC有显著差异，这有待于进一步的研究。

3.2 Da和DES对机体Ca、P代谢的直接影响

体内Ca、P代谢除受维生素D(VD)、甲状旁腺素(PTH)、降钙素(CT)调控外，更年期妇女还与雌激素水平降低有关^[1-3]。近年研究发现，大豆异黄酮可改善更年期女性体内Ca、P代谢^[3-5, 7, 19]。本实验发现，虽然OVX-E和OVX-D组大鼠血Ca含量稳定在(112.7 ± 5.0)~(116.4 ± 4.1)mg/g，但血P含量会显著降低至(76.8 ± 8.8)~(80.5 ± 11.1)mg/g，从而导致Ca:P比显著升高($p < 0.01$)，提示在Da或DES的调节下，提高Ca:P比有利于血Ca向骨骼中的转运，导致骨Ca和BMD增加。

3.3 Da和DES对Zn、Mg和Mn影响与Ca代谢的关系

Zn、Mg和Mn都是骨骼灰分中的主要成分，但人们并不十分清楚它们对BMD的影响。本研究观察到，长期服用Da或DES可直接降低去卵巢大鼠血清中Zn和Mg含量，导致骨骼中Ca和Zn含量升高，BMD

表1 各组大鼠血清Ca、P、Mg、Zn含量($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Contents of Ca, P, Mg and Zn in serum ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ca($\mu\text{g/ml}$)	P($\mu\text{g/ml}$)	Ca:P	Mg($\mu\text{g/ml}$)	Zn($\mu\text{g/ml}$)	ALP(U/L)
Sham	10	116.2 ± 6.9	106.1 ± 9.1	1.1 ± 0.1	25.6 ± 5.0*	1.1 ± 0.2	48.0 ± 22.0**
OVX	10	113.4 ± 5.3	102.6 ± 19.1	1.1 ± 0.3	29.6 ± 4.0	1.3 ± 0.1	76.8 ± 26.0
OVX -E	10	116.4 ± 4.1	80.5 ± 11.1**	1.5 ± 0.2**	16.1 ± 3.4**	0.6 ± 0.1**	81.6 ± 27.7
OVX -D	10	112.7 ± 5.0	76.8 ± 8.8**	1.5 ± 0.1**	21.7 ± 4.9**	0.3 ± 0.1**	83.7 ± 27.5

注：与OVX组相比差异有显著性 * : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$ 。

表2 各组大鼠胫骨Ca、Mg、Mg、Zn含量($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Contents of Ca, P, Mg, Zn and Mn in tibia ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	股骨矿物质含量(%)	Ca(mg/g)	P(mg/g)	Ca:P	Mg(mg/g)	Zn(mg/g)	Mn($\mu\text{g/g}$)
Sham	10	60 ± 2	239.2 ± 8.6**	167.5 ± 24.4	1.5 ± 0.3**	4.9 ± 1.0	1.2 ± 0.4**	6.0 ± 1.6
OVX	10	58 ± 1	128.8 ± 5.0	174.4 ± 19.8	0.7 ± 0.1	4.9 ± 1.7	0.5 ± 0.3	6.6 ± 2.0
OVX -E	10	59 ± 4	235.9 ± 24.8**	168.3 ± 19.7	1.4 ± 0.1**	4.6 ± 0.5	1.0 ± 0.6**	4.5 ± 1.7
OVX -D	10	60 ± 2	206.9 ± 26.5**	154.7 ± 20.2	1.4 ± 0.3**	4.6 ± 1.1	0.7 ± 0.4*	6.2 ± 2.0

注：与OVX组相比差异有显著性 * : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$ 。

恢复正常。值得注意的是血清 Mg 含量变化可能是影响 Ca 和 Zn 在骨骼中沉积的重要因素之一。

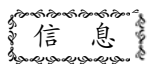
3.4 Da 和 DES 对 ALP 的影响

在反映骨形成的代谢指标中, 血清中骨碱性磷酸酶 (BALP) 是 ALP 同工酶之一, 血清中约 50% 的 ALP 来源于骨, 另一半来源于肝, 极少量的 ALP 来源于小肠和胎盘。本实验发现, 卵巢功能正常大鼠 (Sham 组) 血清 ALP 水平较低, 而卵巢去除后, 无论是否补充外源性 DES 或 Da, 大鼠 ALP 均保持较高水平 ($p < 0.01$, 表 1)。这是由于卵巢去除后内源性雌激素分泌随之减少, ALP 升高提示因为体内雌激素下降, 伴随着骨吸收的亢进而出现的代偿性骨形成增加引起的^[20], 推测 ALP 表达主要与内源性雌激素水平有关, 外源性 DES 或 Da 不能逆转 ALP 表达。

综上所述, 给去卵巢成年大鼠长期灌胃一定剂量的 Da, 可以获得 ERT 的临床效果。Da 通过降低循环血液中 P、Zn、Mg 水平, 提高血清 Ca:P 比, 有效改善 Ca 的利用率和骨 Ca 积累, 提高 BMD。

参考文献:

- [1] RIGGS B L, MCLYON L J. Involutional osteoporosis[J]. N Eng J Med, 1992, 326: 357-362.
- [2] LACEY J V, MINK P J, LUBIN J H, et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer[J]. JAMA, 2002, 288: 334-341.
- [3] YOSHIAI S, MIKI C, TOMKO I, et al. Soy intake related to menopausal symptoms, serum Lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women[J]. Soy Products and Bone Mass, 2001, 97(1): 109-115.
- [4] ALEKEL D L, GERMAIN A S, PETERSON C T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in lumbar spine of postmenopausal women[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(3): 844-852.
- [5] ANDERSON J B, GARNER C. The effects of phytoestrogens on bone[J]. Nutrition Research, 1997, 17(10): 1617-1632.
- [6] GOODMAN M T, WILKENS L R, HANKIN J H, et al. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer[J]. Am J Epidemiol, 1997, 146: 294-306.
- [7] POTTER S M, BAUM J A, TENG H, et al. Soy protein and isoflavone: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women[J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(Suppl): 1375-1379.
- [8] 田玉慧, 张光军, 李万里. 大豆异黄酮和钙对去卵巢大鼠骨密度及微量元素的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(5): 1-4.
- [9] 张月红, 金宏, 许志勤, 等. 染料木黄酮对去势大鼠骨骼矿化的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(1): 86-89.
- [10] 刘康, 季晖, 李绍平, 等. 三种大鼠骨质疏松模型的比较研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(4): 13-18.
- [11] GB14924.3-2001 实验动物小鼠大鼠配合饲料[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003, 114.
- [13] ARJMANI B H, KHALIL D A, HOLLIS B W. Soy protein: its effect on intestinal Ca transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-1 in various ovariectomized rats[J]. J Calcif Tissue Int, 2002, 70: 483-487.
- [14] GB/T 6438-1992. 饲料中粗灰分的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.
- [15] 崔洪斌, 那晓琳, 刘颖. 大豆异黄酮对大鼠骨密度及骨代谢生化指标的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 162-164.
- [16] 张秀明, 李健斋, 魏明竟, 等. 现代临床生化检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.
- [17] 刘献新. 火焰原子吸收法测定微量全血中铜铁锌镁钙[J]. 理化检验: 化学分册, 1998, 34(2): 75-77.
- [18] GB/T13885-2003 动物饲料中钙, 铜, 铁, 镁, 锰, 钾, 钠和锌含量的测定原子吸收光谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [19] MORABITO N, CRISAFULLI A, VERGARA C, et al. Effect of genistein and hormone replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17: 1904-1912.
- [20] 盖晓丹. 卵巢切除后长期补充雌激素女性腰椎骨密度及总碱性磷酸酶观察[J]. 中国临床康复, 2003, 7(5): 180.



信息

尿蛋白可预测糖尿病性肾病

最新的研究发现, 通过观察尿液中的各种蛋白质, 医生可以在糖尿病性肾病发病前有效地预测正常蛋白尿 II 型糖尿病患者是否会发生这种疾病。

来自美国马萨诸塞州总医院 (Massachusetts General Hospital) 的拉维·沙德汉尼 (Ravi Thadhani) 博士说。糖尿病性肾病是一种严重且复杂的肾病, 患者的肾脏会逐渐失去原有的功能。

沙德汉尼和他的同事比较了印度巴马人部落 62 名受试者的尿白蛋白样本。这些受试者患有 II 型糖尿病但肾功能正常。沙德汉尼对他们的糖尿病性肾病的发生情况进行了 10 年的随访研究。

研究人员证实, 通过识别蛋白“信号”, 我们可以有效地预测糖尿病性肾病的发生。