

葛根异黄酮抑制去卵巢大鼠胫骨骨矿和微量元素丢失

郑高利 张信岳 金 锋 陈 凯 龚维桂 郑筱祥¹ (杭州 310013 浙江省医学科学院药物研究所;杭州 310027¹ 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院)

摘要 目的:研究葛根总异黄酮(TIP)对去卵巢引起的骨质疏松症大鼠胫骨骨矿和微量元素含量的影响。方法:52只雌性SD大鼠分为假手术、模型、尼尔雌醇(CEE₃)、TIP 100和TIP 20共5组。除假手术组外均切除双侧卵巢,7d后分别灌胃给予0.5%CMC-Na(假手术和模型组)、CEE₃ 1.0 mg·kg⁻¹·wk⁻¹、TIP 100和20 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连续7个月。化学法测定胫骨钙和磷含量,原子吸收分光光度法测定铁、锌、镁、锰、铜、钴、铬和钼等微量元素的含量。结果:大鼠在去卵巢后胫骨的表观密度及灰密度分别下降了5.8%和11.4%,钙、磷、铁、锌和镁等元素的含量也显著减少。经TIP 100和20 mg·kg⁻¹·d⁻¹治疗7个月后,胫骨表观密度增加7.5%和7.1%,灰密度增加9.6%和4.6%;钙密度增加9.8%和6.1%,磷密度增加10.1%和6.2%,对钙磷比值无明显影响。铁、锌和镁含量恢复到接近正常水平,锰和钼含量略高于正常组,而铜比正常组高39%和75%,铬比正常组高313%和265%,钴含量则无明显变化。结论:TIP对雌激素缺乏引起的骨矿和微量元素丢失具有明显的防治作用。

关键词 葛根;异黄酮;骨质疏松;微量元素

Isoflavones from Pueraria lobata Inhibit the Loss of Mineral and Trace Elements in Tibia of OVX Rats

Zheng Gaoli, Zhang Xinyue, Jin Feng, Chen Kai, Gong Weigui, Zheng Xiaoxiang¹ (Institute of Metaria Medica, Zhejaing Academy of Medical Sciences, Hangzhou, 310013; ¹ College of Biomedical Engineering and Instrument Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310027)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** The present investigation was to observe the effects of TIP on the contents of mineral and trace elements of tibia in osteoporosis rats induced by ovariectomized. **METHOD:** 52 female SD rats were allocated into 5 groups: SHAM, OVX, CEE₃, TIP 100 and TIP 20. Except rats in SHAM group which were made sham-operation, the other rats were bilaterally ovariectomized. 7 days after operation, the rats were orally administrated 0.5% CMC-Na (SHAM and OVX), nilestrol (CEE₃) 1.0 mg × kg⁻¹ × wk⁻¹, TIP 100 mg × kg⁻¹ × d⁻¹ (TIP 100) and TIP 20 mg × kg⁻¹ × d⁻¹ (TIP 20) separately for 7 months. The contents of calcium and phosphate in tibias were determined by chemical analysis and the trace elements were detected by atom absorption spectrophotometer. **RESULTS:** The apparent density and ash density of tibia in OVX rats were reduced by 5.8% and 11.4% than those in SHAM. Ca, P, Fe, Zn and Mg were also significantly decreased. The apparent density and ash density of tibia in TIP 100 group were increased by 7.5% and 9.6% than OVX group, while by 7.1% and 4.6% in TIP 20 group. Ca and P contents were increased by 9.8% and 10.1% in TIP 100, while by 6.1% and 6.2% in TIP 20. No markedly change was observed in Ca/P ratios. The contents of Zn, Fe, Mg, Mn and Mu were slightly raised. Moreover Cu and Cr were even increased by 75% and 300% approximately. **CONCLUSION:** TIP can inhibit loss of mineral and trace elements in bone induced by estrogen deficiency. The estrogen-like action of TIP may pay a main role in this protection.

KEY WORDS Pueraria; Isoflavones; Osteoporosis; Trace element

骨质疏松症是一种多因素代谢性骨病,雌激素缺乏是其主要原因。研究表明镁、锌和铜等微量元素在骨细胞功能、基质矿化和骨转换过程中也有重要的作用^[1]。一些抗骨质疏松症药物不仅能促进骨骼钙盐沉积,同时影响微量元素的代谢。前文报道葛根总异黄酮(Total Isoflavones of Pueraria, TIP)能明显抑制去卵巢引起的大鼠骨丢失,提高骨矿密度和骨强度^[2]。本文进一步报道TIP对骨质疏松症大鼠胫骨钙、磷和镁、铁、锌、锰、铜、钴、钼和铬等微量元素丢失的保护作用。

用。

1 材料与仪器

1.1 葛根异黄酮(TIP):醇提后经D101A大孔树脂纯化,含总异黄酮630 mg/g,葛根素313 mg/g。使用时以0.5% CMC-Na配成10 mg/ml和2 mg/ml(以总异黄酮计)的混悬液。

1.2 尼尔雌醇(CEE₃):片剂,北京四环制药厂生产,1 mg/片,批号:960528,在碾钵中碾细后以0.5% CMC-Na溶液配

本课题受浙江省自然科学基金资助 No:399037。¹ 导师

作者简介:郑高利(1963-),男,副研究员,浙江大学生物医学工程与仪器科学学院博士研究生(在职)。工作单位:浙江省医学科学院药物研究所。

制成 0.05 mg/ml 的混悬液。

1.3 动物:SD大鼠,雌性,10月龄,体重320~380g,由浙江省实验动物中心提供。动物饲养合格证:浙实验动物准字(96)002。

1.4 饲料:标准大鼠颗粒饲料,由浙江省实验动物中心提供。含蛋白质20%,Ca和Mg4.5和1.7mg/g,含Fe、Zn、Mn、Cr、Cu和Co分别为369.116.127.126.21和2.6μg/g。

1.5 AA-670型原子吸收分光光度计(日本岛津)。

2 实验方法

2.1 分组及给药 52只大鼠,其中42只戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,按常规方法切除双侧卵巢,余10只大鼠做相同的手术操作,但不切除卵巢,作为假手术组(Sham)。将去卵巢大鼠分为4组,模型对照组(OVX组)12只,其余3组每组10只,分别为CEE₃组和TIP大、小剂量组,在手术后1周开始灌胃给药,Sham和OVX组每天给予0.5%CMC-Na溶液;CEE₃组给予CEE₃0.5mg/kg,每周2次(周一和周四),TIP大剂量和小剂量组分别每天给予TIP100和20mg/kg。连续给药7个月后,处死大鼠分离右侧胫骨,剔尽附着的肌肉和结缔组织,进行如下相关指标的测定。

2.2 胫骨表观密度测定 胫骨称湿重后,在自制的排水法体积测定装置上测定其体积,计算其表观密度(湿重/体积)。

2.3 胫骨灰密度测定 将胫骨置马弗炉中,400℃2h,600℃1h灰化,冷却后称灰重,计算灰密度(灰重/体积)。

表1 TIP对去卵巢大鼠胫骨重量、表观密度和灰重、灰密度的影响

组别	湿重 mg	表观密度 g/cm ³	灰重 mg	灰密度 g/cm ³
Sham(10)	642±29	1.653±0.044	313±16	0.804±0.032
OVX(12)	620±36	1.557±0.036 ^{△△}	283±19 ^{△△}	0.712±0.027 ^{△△}
OVX+CEE ₃ (10)	624±59	1.622±0.038 ^{**}	283±28	0.741±0.026 [*]
OVX+TIP100(10)	673±75 [*]	1.674±0.034 ^{**}	308±23 [*]	0.780±0.041 ^{**}
OVX+TIP20(10)	676±50 [*]	1.667±0.061 ^{**}	304±23 [*]	0.745±0.025 ^{**}

表2 TIP对去卵巢大鼠胫骨钙、磷含量的影响

组别	总钙 (mg)	钙密度 (mg/cm ³)	总磷 (mg)	磷密度 (mg/cm ³)	钙/磷
Sham(10)	107±10	272±19	56.4±4.9	145±12	1.904±0.036
OVX(12)	96±7 ^{△△}	244±15 ^{△△}	50.5±3.7 ^{△△}	129±8 ^{△△}	1.897±0.081
OVX+CEE ₃ (10)	97±7	251±14	50.7±3.5	132±6	1.903±0.082
OVX+TIP100(10)	106±8 ^{**}	268±25 ^{**}	55.0±6.0 [*]	142±14 [*]	1.915±0.061
OVX+TIP20(10)	105±7 ^{**}	259±8 ^{**}	55.7±3.5 ^{**}	137±6 [*]	1.887±0.050

表3 TIP对去卵巢大鼠胫骨微量元素含量的影响(μg/cm³,镁mg/cm³)

	Sham(10)	OVX(12)	OVX+CEE ₃ (10)	OVX+TIP100(10)	OVX+TIP20(10)
铁	80.1±23.4	48.3±15.2 ^{△△}	64.6±16.5	69.7±23.4 [*]	63.5±14.1 [*]
锌	175±20	140±16 ^{△△}	154±14 [*]	153±23	161±13 ^{**}
镁	5.24±0.58	4.23±0.32 ^{△△}	4.71±0.48 [*]	4.98±0.66 ^{**}	4.78±0.34 ^{**}
锰	3.14±0.22	2.99±0.24	2.63±0.19 ^{**}	3.05±0.50	3.34±0.18 ^{**}
铜	5.22±1.04	4.73±1.28	5.19±0.97	7.27±1.92 ^{**}	9.14±2.48 ^{**}
钼	166±26	137±25 [△]	203±26 ^{**}	108±41 ^{**}	182±50 ^{**}
钴	5.98±0.69	5.61±1.39	5.49±0.56	6.17±1.31	5.56±0.83
铬	0.90±0.37	0.73±0.33	1.30±0.37 ^{**}	3.72±0.92 ^{**}	3.29±0.94 ^{**}

2.4 胫骨钙和磷含量测定 将全部胫骨骨灰溶解在40ml6N的盐酸中,EDTA络合滴定法,钙红作指示剂,测定钙含量,磷钼酸显色法测定磷含量,并计算单位体积钙和磷含量。

2.5 胫骨Mg、Zn、Fe、Mn、Cu、Co、Mo和Cr含量测定 原子吸收分光光度法。

2.6 统计方法 结果均表示为 $\bar{x} \pm s$,进行组间t检验。和假手术组比较[△]:P<0.05,^{△△}:P<0.01;和模型组相比^{*}:P<0.05,^{**}:P<0.01。

3 实验结果

3.1 TIP对去卵巢大鼠胫骨重量、表观密度、灰重和灰密度的影响(表1)

切除卵巢7个月后,模型组大鼠胫骨湿重减轻3.4%,而体积反而略有增加,因此表观密度比湿重降低更多(5.8%),灰重和灰密度分别减轻9.6%和11.4%。经TIP治疗,高剂量组胫骨的湿重和表观密度分别增加8.5%和7.5%,总灰重和灰密度提高8.8%和9.5%。低剂量组胫骨的湿重和表观密度分别增加9.0%和7.1%,总灰重和灰密度提高7.4%和4.6%。其中胫骨湿重和表观密度甚至比假手术对照组更高,灰重和灰密度也和假手术组接近。CEE₃组由于体重明显下降,骨骼体积相对较小,胫骨湿重未见明显增重,但表观密度仍明显增加(4.2%);总灰重未增加,但灰密度增加4.1%。

3.2 TIP 对大鼠胫骨钙、磷含量的影响(表-2)

卵巢切除后模型组大鼠胫骨总钙、磷含量均下降10%左右,但钙磷比值基本保持稳定。经TIP 100和20 mg·kg⁻¹治疗7个月后,胫骨钙总量增加10.4%和9.4%,钙密度增加9.8%和6.1%;磷总量增加8.9%和10.3%,磷密度增加10.1%和6.2%;而钙磷的比值均无明显改变。CEE₃组各指标均有部分改善,但均无统计意义。

3.3 TIP 对去卵巢大鼠胫骨铁、锌、镁和锰等元素含量的影响

切除卵巢7个月后,模型组大鼠胫骨铁、锌、镁和钼含量明显下降,锰、铜、钴和铬含量无明显影响。经TIP治疗后,铁、锌和镁含量恢复到接近正常水平,锰和钼含量略高于正常组,而铜和铬则比正常组高出许多,钴含量无明显变化。CEE₃组各微量元素的变化趋势和TIP组相似(表-3)。

4 讨论

一些微量元素能促进骨形成,并在骨胶原合成和调节骨强度等方面发挥一定的影响。研究较多的有锌、铜和镁等。锌是成骨细胞分化标志酶-碱性磷酸酶的辅基,补锌增加ALP活性^[3]。锌能协调细胞因子和雌激素等调节骨细胞的代谢。锌缺乏和妇女绝经后骨质疏松症的发生密切相关。体内、体外研究表明补充锌元素能改善骨质代谢。对绝经后骨质疏松症患者补充雌激素,能减少尿锌排出,并且排出量和骨密度呈明显的负相关^[4]。本文发现去卵巢大鼠胫骨锌元素水平下降20%左右,异黄酮治疗使其基本恢复到正常水平。Yamaguchi M.报道锌在体外和异黄酮有协同作用^[5]。

镁是骨骼中除钙以外的含量最丰富的二价金属元素,镁可以通过调节降钙素分泌和活性VD₃的合成影响骨形成,镁缺乏将导致骨密度和骨力学强度的下降^[6],适量补镁能改善更年期妇女的骨代谢^[7],增加生长期大鼠钙磷在骨骼的沉积^[8]。锰参与粘多糖和(骨)胶原的合成,缺锰可能引起骨化异常,生长发育障碍。本研究结果和报道的皮质激素致骨质疏松^[9]一样,骨骼中镁和锰含量降低,经异黄酮治疗后恢复到接近正常水平。

铁是破骨细胞标志-酶抗酒石酸性磷酸酶的成分之一,但它在骨代谢中作用尚不清楚。高铁可能损害骨代谢,它引起佐剂性关节炎大鼠严重的骨质疏松^[10]。本文结果提示去卵巢大鼠胫骨铁含量下降,和文献报道^[11]酒精性骨质疏松症大鼠胫骨中铁含量升高不一致,这种矛盾的结果是否和造模方法不同有关尚待进一步确证。

铜离子能促进胶原生成,缺铜后胶原蛋白形成不良,骨质中胶原纤维合成受损,骨骼发育受限制,结构疏松,骨生物学性下降^[12]。缺锰使软骨生长障碍,长骨缩短、弯曲甚至畸形,发育停滞,引起侏儒症。本模型中骨骼中铜和锰含量

无明显变化,但异黄酮治疗组的铜水平则显著增加。钴、铬和钼是人工骨骼的主要成分。文献报道钴、铬和钴铬合金高浓度在体外对成骨细胞功能有抑制作用^[13]。在本实验中,经TIP治疗后胫骨中铜和铬含量分别比正常组高75%和3倍,其原因和意义需要进一步探讨。

参考文献

- 1 Saltman PD, Strause LG. The role of trace minerals in osteoporosis. *J Am Coll Nutr*, 1993; 12(4): 384.
- 2 郑高利 张信岳 周彦钢等. 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨矿密度和骨强度的影响. *中草药* 2001; 32(5): 422.
- 3 Peretz A, Papadopoulos T, Willems D. et al. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *J Trace Elem Med Biol* 2001; 15(2-3): 175.
- 4 Herzberg M, Lusky A, Blonder J. et al. The effect of estrogen replacement therapy on zinc in serum and urine. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87(6): 1035.
- 5 Yamaguchi M, Ying Huagao. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 178(1-2): 377.
- 6 Rude RK, Kirchen ME, Gruber HE. et al. Magnesium deficiency-induced osteoporosis in the rat: uncoupling of bone formation and bone resorption. *J Magnes Res* 1999; 12(4): 257.
- 7 鲍善芬, 李珍, 丛涛等. 镁的不同摄入水平对生长期大鼠钙、磷、镁代谢及骨骼的影响. *营养学报* 2000; 22(2): 119.
- 8 Stendig LG, Tepper R, Leichter I. Trabecular bone density in a two year controlled trial of per oral magnesium in osteoporosis. *J. Magnes. Res.* 1993; 6(20): 156.
- 9 孔承琳, 刘春梅, 唐一鹏等. 糖皮质激素诱发的大鼠骨质疏松与骨中微量元素的关系. *中国骨质疏松杂志* 1996; 2(2): 39.
- 10 Dabbagh AJ, Blake DR, Morris CJ. Effect of Iron complexes on adjuvant arthritis in rats. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51(4): 516.
- 11 Preedy VR, Baldwin DR, Keating JW. Bone collagen, mineral and trace elements composition, histomormetry and urinary hydroxyproline excretion in chronically-treated alcohol-fed rats. *Alcohol. Alcohol.* 1991; 26(1): 39.
- 12 Rico H, Roca Botran C, Hernandez ER, et al. The effect of supplemental copper on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Menopause* 2000; 7(6): 413.
- 13 Allen MJ, Myer BJ, Millett PJ, Rushton N. The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80(5): 933.

收稿日期: 2001 - 08 - 08