

· 基础研究 ·

斑蝥黄质对 D-半乳糖老龄大鼠骨质影响

裴凌鹏^{1*}, 惠伯棣², 董福慧¹

(1.中国中医科学院骨伤科研究所,北京 100700;2.北京联合大学应用文理学院)

【摘要】 目的:研究斑蝥黄质对 D-半乳糖致衰老大鼠骨质的影响。**方法:**将 45 只 6 周龄 Wistar 雄性大鼠随机分为 3 组(衰老模型组、斑蝥黄质组、青年对照组),每组 15 只,另设 16 月龄 Wistar 雄性大鼠 15 只作为老龄对照组。其中用 D-半乳糖对衰老模型组、斑蝥黄质组大鼠进行连续 5 个月皮下注射(每日 1 次,每次 20 mg/kg);5 个月后连同青年对照组和 16 月龄老龄对照组一起进行骨常规参数测定并比较组间差异。**结果:**衰老模型组骨密度,骨结构力学参数,生物力学参数,骨钙、镁、锰及羟脯氨酸含量均比青年对照组有显著降低($P<0.01$),而骨磷含量、骨及血清碱性磷酸转移酶均比青年对照组有显著升高($P<0.01$),且这些变化与老龄对照组的变化趋势一致。斑蝥黄质组生物力学参数,骨钙、镁、锰及羟脯氨酸含量,骨磷含量、骨及血清碱性磷酸转移酶等指标均与衰老模型组呈现显著差异($P<0.01$)。**结论:**长期大量摄入 D-半乳糖导致大鼠衰老同时可能诱发其发生骨质变化,而斑蝥黄质可以预防或降低此类致老年性骨质变化的发生。

【关键词】 骨质疏松; 骨密度; 羟脯氨酸; 斑蝥黄质

Influence of canthaxanthin on D-galactose induced osseous changes of rat PEI Ling-peng*, HUI Bo-di, DONG Fu-hui. *
The Research Institution of Orthopaedics, China Academy of Chinese Medicine Science, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective:To study the influence of canthaxanthin on D-galactose induced osseous changes of rat. **Methods:** Forty-five six-week-old Wistar male rats were randomly divided into model group, canthaxanthin group and young control group. In addition, 15 sixteen-month-old Wistar male rats were used as old control group. Model group and canthaxanthin group were given injections of D-galactose for 5 months (20 mg/kg/once per-day) to cause aging of rat. Then routine osseous parameters were tested and compared among the 4 groups. **Results:** Compared with young control group, the BMD, parameters of structural mechanics and biomechanics, bone calcium, manganese, magnesium and the content of hydroxyproline in the model group decreased significantly ($P<0.01$), however, the content of bone phosphorus, the activity of bone and serum ALP increased significantly ($P<0.01$). Those changes of the model group were the same as the old control group, but the changes in the canthaxanthin group significantly differed with the model group ($P<0.01$). **Conclusion:** The high dose of D-galactose intake can cause aging and osteoporosis at the same time in rat, but canthaxanthin can prevent and inhibit D-galactose induced osseous changes.

Key words Osteoporosis; Bone density; Hydroxyproline; Canthaxanthin

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(8):613-616 www.zggszz.com

D-半乳糖致衰老机制是指在一定时间内,大剂量 D-半乳糖还原成半乳糖,后者不能及时被细胞代谢而堆积在细胞内,影响细胞的正常生理代谢,导致机体衰老^[1]。衰老过程常会伴随着老年性骨质疏松症的发生,因此利用致衰老模型探索致衰老性骨质疏松症发病机制具有一定的研究价值。斑蝥黄质是一种非维生素 A 原的酮式类胡萝卜素,广泛存在于自然界的海洋动物体、藻体及少数陆生植物体内并具有多种生物学功能,其中尤以抗氧化、防止心血管疾病、提高免疫力和抗癌作用突出^[2]。本实验旨在通过斑蝥黄质对骨质常规参数[如骨密度、骨结构力学参数、生物力学参数、主要骨矿物质(钙、镁、锰、磷)、血清钙、羟脯氨酸含量及碱性磷酸酶活性等]的研

究,进而探索其对 D-半乳糖致衰老大鼠骨质的影响。

1 材料与方

1.1 主要仪器和试剂 752 分光光度计(中国伯乐公司);960 型荧光分光光度计、Lunar-XR 型双能 X 线骨密度测定仪、岛津万能实验机、火焰原子吸收分光光度计(日本岛津公司);C30 柱(YMC Carotenoid S-5, Waters), HPLC(Waters 600E 溶剂输送系统, PDA-2996 二极管阵列检测器 Waters), 丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);斑蝥黄质乳化颗粒(瑞士罗氏公司);乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)(美国迪马公司);D-半乳糖 100 g/ml、无水乙醇(北京化学试剂公司);大孔吸附树脂(天津农业股份公司)。

1.2 乳化剂破乳制备斑蝥黄质

1.2.1 有机萃取 称取 10 g 乳化颗粒加入 1 ml 水,超声波

通讯作者:董福慧 Tel:010-64014411-2521

*现单位:中央民族大学少数民族传统医学中心

促溶后,加入 300 ml 丙酮-正己烷萃取。静置 2 h 后,将脂溶性相收集,再利用减压旋转蒸发仪进行浓缩处理。

1.2.2 斑蝥黄质提取液柱色谱纯化 ①装柱:将活化好的氧化铝装填于玻璃层析柱中,装填高度为 12 cm,用丙酮-正己烷润湿。②洗脱:分别取 2 ml 斑蝥黄质提取液上柱,用 50 ml 丙酮-正己烷淋洗,收集洗脱液。将洗脱液用氮气吹干制粉,装入充满氮气的玻璃瓶内,-70 °C 储存备用。

1.3 斑蝥黄质鉴定 斑蝥黄质提取液经过滤后用高效液相色谱分离可以得到良好效果,根据其 HPLC 中保留时间和可见吸收光谱的特征峰分析,鉴定提取物为反式斑蝥黄质单体和顺式斑蝥黄质单体复合物。

1.4 分组 6 周龄 Wistar 雄性大鼠 45 只随机分为 3 组,即衰老模型组、青年对照组和斑蝥黄质组,各 15 只。另购 16 月龄同品系大鼠 15 只作为老龄对照组。

1.5 造模及给药方法 衰老模型组和斑蝥黄质组用 D-半乳糖颈部皮下注射,每日 1 次,每次 1.5 g/kg,其中斑蝥黄质组用斑蝥黄质每日灌胃 1 次,每次 20 mg/kg(动物体重)。青年对照组以等量的生理盐水注射,每日 1 次,连续应用 5 个月。称量鼠的体重,称重后乙醚麻醉,暴露腹部,下腔静脉取血,待测血清中 MDA 含量、钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)含量及血中 SOD 活性;分离各组大鼠的双侧股骨,测定骨长度、骨质量、骨密度、骨结构及生物力学指标;骨中钙、磷、锰、镁、羟脯氨酸含量和骨中 ALP 活性。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 血清中 MDA 和 SOD 含量测定 MDA 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法;SOD 采用亚硝酸盐法。

1.6.2 骨密度测定 取股骨解冻后于 Lunar-XR 型双能 X 线骨密度测定仪上,分骨上段、中段、下段 3 部分测其骨密度。测定位置为前后位,测试标本置于塑料盘内,内盛适量生理盐水浸没标本,对整个标本扫描后,选定测定区域得出各骨密度值。上段和下段代表松质骨骨密度,中段代表皮质骨骨密度。测定参数:扫描宽度 20 mm,扫描速度 7 mm/s。

1.6.3 骨结构力学和生物力学的测定 取大鼠左股骨,用千分尺测量右侧股骨的长度;用分析天平称量两侧股骨的重量;将股骨标本进行 3 点弯曲实验,得到载荷-挠度曲线。由此曲线可直接得出大鼠骨的结构力学参数(最大载荷、最大挠度、弹性载荷、弹性挠度)。测定参数为:下压速度 10 mm/min;下压幅度 4 mm;保持时间 5 s;跨度 22 mm。断骨后,取股骨中部作径向切片,在显微镜下用显微尺测量股骨的最大外径 A、最小外径 B、最大内径 a、最小内径 b。并计算出大鼠股骨的各项生物力学指标。

1.6.4 骨中矿物质及血清钙、磷的测定 ①骨中钙、锰、镁的

含量:取大鼠右侧股骨近端称重,研碎。然后进行灰化 2 h。取出骨灰,硝酸溶解。经处理后,火焰原子吸收分光光度计测定钙、锰、镁的含量。②骨中磷的含量:取大鼠右侧股骨近端称重,研碎。然后进行灰化 2 h。取出骨灰,硫酸溶解。经处理后,用钼蓝显色定磷法 660 nm 波长下测定。③血清钙采用乙二胺四乙酸(EDTA)滴定法。④血清磷采用孔雀绿微量比色法。

1.6.5 骨中羟脯氨酸含量、ALP 活性及血中 ALP 活性测定

①骨中羟脯氨酸含量:取大鼠右侧股骨上端称重、研碎。3 ml 氯仿-甲醇处理 2 h,过滤。再用 90%乙醇和丙酮冲洗 1 次,放入烤箱 2 h。取出后放入 12 mol/L HCL 1 ml 高温水解 2 h,取出后用氯胺 T 法于 560 nm 波长下测定。②骨中 ALP 采用化学免疫法试剂盒测定(由中国科学院生物物理所中生公司提供)。③血清 ALP 活性采用氨基萘替比啉测酶法测定。

1.7 统计学处理 所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,组间差异比较用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 差异有统计意义。

2 结果

2.1 各组血清 MDA 和 SOD 含量的比较 与青年对照组相比,衰老模型组血清 MDA 含量升高,而血液 SOD 活性有所降低。与老龄对照组变化趋势一致,而斑蝥黄质组与衰老模型组相比,血清 MDA 含量降低,血液 SOD 活性升高,且差异有统计学意义($P<0.01$)(见表 1)。

2.2 股骨骨密度指标测定结果 老龄对照组和衰老模型组大鼠骨密度都与青年对照组有显著差异($P<0.01$),并且衰老模型组骨密度比老龄对照组显著减少($P<0.01$),说明 D-半乳糖对大鼠骨密度有显著影响,在注射 5 个月中加速其降低的程度远超过正常老龄大鼠。而斑蝥黄质组与衰老模型组相比,松质骨和皮质骨均有所升高,且呈显著差异($P<0.01$)(见表 2)。

2.3 骨结构力学和生物力学测定结果 与青年对照组比较,老龄对照组股骨重量和长度明显增加,而衰老模型组两项指标明显减少($P<0.01$)(见表 3)。而在股骨结构力学和生物力学指标方面表明,老龄对照组和衰老模型组均与青年对照组存在显著降低($P<0.01$)。D-半乳糖对股骨结构力学和生物力学指标影响作用与正常衰老大鼠变化趋势一致,而斑蝥黄质组与衰老模型组相比,骨结构力学和生物力学参数指标均有所升高,且呈显著差异($P<0.05$)(见表 4,5)。

2.4 骨中钙、锰、镁、磷及血钙、磷的含量 与青年对照组比较,衰老模型组骨钙、锰、镁及血磷含量均明显减少($P<0.01$),与老龄对照组的骨矿物质含量变化趋势一致。而斑蝥黄质组与衰老模型组相比,骨钙、锰、镁及血磷含量均明显升高,且呈显著差异($P<0.01$)(见表 6)。

2.5 骨中羟脯氨酸含量、ALP 活性和血清 ALP 活性 与青

表 1 血清 MDA 含量和血液 SOD 活性($\bar{x}\pm s$, rats=15)

Tab.1 The content of serum MDA and activity of SOD ($\bar{x}\pm s$, rats=15)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
MDA(nmol/ml)	6.72±0.52	14.52±0.49**	10.43±0.12**	7.22±0.20▲*
SOD(NU/mgpro)	121.32±5.21	94.42±4.16**	103.62±4.01**	110.55±4.11▲*

注:与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与衰老模型组比较: ▲ $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: ▲ $P<0.01$

年对照组比较衰老模型组和老龄对照组骨中羟脯氨酸含量均明显减少 ($P<0.01$)。衰老模型组血清 ALP 和骨 ALP 活性与青年对照组比较显著升高 ($P<0.01$)；衰老模型组与老龄对照组血清 ALP 活性比较也有所升高, 两组变化趋势一致。而斑蝥黄质组与衰老模型组相比, 羟脯氨酸含量明显升高, 血清

ALP 和骨 ALP 活性明显降低, 且呈显著差异 ($P<0.01$) (见表 7)。

3 讨论

研究表明大量的活性氧的摄入会从整体、细胞和基因不同水平层次上影响骨的代谢过程^[3-4]。大量进食 D-半乳糖会产生过多的自由基, 在骨重建中, 自由基可以破坏胶原蛋白

表 2 股骨各部位骨密度测量 ($g/cm^2, \bar{x} \pm s, rats=15$)
Tab.2 The density of different sites in thighbone ($g/cm^2, \bar{x} \pm s, rats=15$)

部位	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
骨上段	0.172±0.012	0.107±0.010**	0.137±0.010**	0.139±0.014▲**
骨中段	0.151±0.010	0.095±0.010**	0.115±0.010**	0.123±0.012▲**
骨下段	0.139±0.021	0.081±0.016**	0.095±0.016**	0.102±0.017▲**

注: 与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与衰老模型组比较: ▲ $P<0.01$

Note: Compared with young control group: *** $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: ▲ $P<0.01$

表 3 左股骨骨长度、重量及横截面指标 ($\bar{x} \pm s, rats=15$)
Tab.3 The left thighbone length, weight and section ($\bar{x} \pm s, rats=15$)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
骨长度 (cm)	3.57±0.10	3.60±0.12**	3.73±0.10**	3.61±0.15▲*
骨重量 (g)	0.32±0.12	0.35±0.10**	0.39±0.14**	0.34±0.11▲*
最大外径 (mm)	4.03±0.11	4.15±0.11**	4.07±0.10*	4.10±0.11▲*
最小外径 (mm)	2.93±0.12	2.85±0.15**	3.00±0.12*	2.91±0.13▲*
最大内径 (mm)	2.33±0.14	2.55±0.12**	2.37±0.13*	2.41±0.12▲*
最小内径 (mm)	1.53±0.13	1.49±0.12**	1.57±0.10*	1.45±0.13▲*

注: 与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与衰老模型组比较: ▲ $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: ▲ $P<0.01$

表 4 左股骨结构力学指标 ($\bar{x} \pm s, rats=15$)
Tab.4 The structural power parameters of left thighbone ($\bar{x} \pm s, rats=15$)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
弹性挠度 (mm)	0.43±0.11	0.35±0.10**	0.39±0.11*	0.37±0.12▲*
弹性载荷 (g)	10 032±1 012	9 005±1 042**	9 639±1 024**	9 440±1 008▲**
最大挠度 (mm)	0.67±0.13	0.55±0.14**	0.58±0.12**	0.56±0.17▲*
最大载荷 (g)	11 232±1 031	9 995±1 075**	10 572±1 051**	1 085±1 041▲*

注: 与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与衰老模型组比较: ▲ $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: ▲ $P<0.01$

表 5 左股骨生物力学指标 ($\bar{x} \pm s, rats=15$)
Tab.5 The biological power parameters of left thighbone ($\bar{x} \pm s, rats=15$)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
最大应力 (N/mm^2)	22 043±2 111	21 135±2 210**	21 639±2 325**	21 360±2 232▲*
最大应变 (mm)	0.023 2±0.003 2	0.019 5±0.004 1**	0.020 9±0.002 4**	0.020 1±0.001 2▲*
弹性应力 (N/mm^2)	20 967±2 113	16 755±2 116**	17 775±2 112**	17 201±2 123▲**
弹性应变 (mm)	0.018 2±0.001 6	0.015 5±0.001 1**	0.016 4±0.001 4**	0.016 0±0.001 7▲**
张应力 (N/mm^2)	25 618±3 173	27 121±3 221**	26 209±3 251**	26 338±3 211▲*
刚性系数 ($kg \cdot mm^2$)	5 525 618±423 121	5 327 257±413 286**	5 386 209±423 661**	5 360 200±422 722▲*
弹性模量 (N/mm^2)	1 225 098±143 261	1 177 227±148 571**	1 156 221±141 121**	1 162 204±143 512▲**
韧性系数 (mm/kg)	1.221 2±0.703 1	1.410 5±0.701 1**	1.326 6±0.702 0**	1.370 0±0.701 0▲*
应变位能	120 029±23 209	103 327±22 011**	108 397±22 789**	106 100±22 123▲*

注: 与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与衰老模型组比较: ▲ $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: ▲ $P<0.01$

表 6 骨中钙、磷、镁、锰以及血清钙、磷含量($\bar{x}\pm s$, rats=15)

Tab.6 The content of calcium, manganese, magnesium, phosphorus in bone and serum($\bar{x}\pm s$, rats=15)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
骨钙(μg)	812.12 \pm 110.10	592.15 \pm 120.09**	668.42 \pm 107.01**	607.27 \pm 102.10 ^{▲*}
骨磷(μg)	172.23 \pm 21.12	321.21 \pm 20.10**	261.18 \pm 23.21**	269.41 \pm 20.27 ^{▲*}
骨镁(μg)	6.07 \pm 0.72	3.12 \pm 0.71**	5.02 \pm 0.52**	3.89 \pm 0.31 ^{▲**}
骨锰(μg)	7.87 \pm 0.50	2.96 \pm 0.56**	4.76 \pm 0.42**	3.54 \pm 0.29 ^{▲**}
血钙(mmL)	2.76 \pm 0.13	3.07 \pm 0.11**	2.97 \pm 0.12**	3.03 \pm 0.12 ^{▲**}
血磷(mmL)	2.76 \pm 0.11	2.62 \pm 0.15*	2.68 \pm 0.17*	2.70 \pm 0.13 ^{▲*}

注:与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与衰老模型组比较: [▲] $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: [▲] $P<0.01$

表 7 骨羟脯氨酸含量和骨、血清 ALP 活性($\bar{x}\pm s$, rats=15)

Tab.7 The content of bone hydroxyproline and ALP activity of bone and serum($\bar{x}\pm s$, rats=15)

项目	青年对照组	衰老模型组	老龄对照组	斑蝥黄质组
羟脯氨酸(μg)	3 212.51 \pm 512.10	865.12 \pm 432.20**	2 351.21 \pm 471.12**	1 822.29 \pm 430.17 ^{▲**}
骨 ALP(U/L)	173.52 \pm 0.62	195.21 \pm 0.70**	188.32 \pm 0.63**	193.36 \pm 0.58 ^{▲*}
血清 ALP(U/L)	5.07 \pm 0.12	7.12 \pm 0.11**	5.63 \pm 0.15**	6.64 \pm 0.15 ^{▲*}

注:与青年对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与衰老模型组比较: [▲] $P<0.01$

Note: Compared with young control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with model group: [▲] $P<0.01$

成,导致骨中矿物质沉积减少,从而造成钙、磷、镁、锰等元素的流失,影响骨密度,抑制骨的形成,造成老年骨质疏松^[5-6]。同时胶原蛋白加速分解生成羟脯氨酸并随血、尿流失,且随年龄而增加,使得骨中两者的含量均相应减少。另外由于骨基质结构建成受阻,同时矿物质含量下降,从而使骨的结构力学和生物力学受到了影响,大大降低了骨的抗变能力,提高了发生骨折的概率。研究发现斑蝥黄质可以有效地增强成骨细胞增殖和缓解分化,同时对局部细胞因子(如 ALP 酶、I 型胶原蛋白等)具有上调作用,表明斑蝥黄质可能参与骨代谢有关调节活动,再加上其极强的抗氧化能力,或许对致衰老性骨质疏松症具有一定预防或辅助治疗意义^[7-8]。本实验中青年对照组血清 ALP 活性低于 D-半乳糖致衰老模型组和正常老龄对照组,而衰老模型组又高于正常老龄对照组,这可能是由于晚期糖化终末产物(AGEs)浓度增加,使破骨过程显著增强,成骨过程继发增加,骨代谢处于一种高转变状态,成骨细胞的活跃造成血 ALP 活性增加^[9-10]。综合而言,本实验证实 D-半乳糖诱导衰老大鼠过程的同时,降低 SOD 活性和主要骨矿物质含量、增加 MDA 含量、改变骨结构力学和生物力学参数,从而可能诱发致衰老性骨质疏松。而适量摄入斑蝥黄质可有效地缓解此类致衰老性骨质的变化。

参考文献

1 Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycation end-

products stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. J Bone Miner Res, 1997, 12(3): 439-446.

2 惠伯棣, 裴凌鹏. 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京: 中国轻工业出版社, 2005. 155-160.

3 马静波. 骨质疏松症的治疗和预防概述. 医师进修杂志, 2005, 28(5): 9-11.

4 王欣荣. 骨质疏松症的发病机理及治疗. 生物工程进展, 2001, 21(3): 54-56.

5 朱洁, 岳珍. 骨关节病软骨细胞 DNA 氧化性损伤. 湖南医科大学学报, 1998, 23(5): 438-440.

6 张海光, 陈晓亮. 氧化应激在原发性骨质疏松症发病中的作用. 国外医学: 骨科学分册, 2005, 26(4): 230-233.

7 Reiter R. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in human. J Pineal Res, 1995, 18: 1-11.

8 Jacobson A, Johansson S, Branting M, et al. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(1): 162-167.

9 董文彦, 吴丽萍, 李聪, 等. D-半乳糖对小鼠骨矿物质羟脯氨酸含量及最大载荷的影响. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2): 147-149.

10 董文彦, 刘辉, 李聪, 等. D-半乳糖致衰老小鼠血清钙磷及骨密度等指标的变化. 中国老年学杂志, 2003, 23(1): 45-47.

(收稿日期: 2007-09-20 本文编辑: 王宏)