·药物研究·

大豆异黄酮对大鼠骨密度及骨代谢生化指标的影响

崔洪斌 那晓琳 刘颖

【摘要】 **目的** 研究植物雌激素-大豆异黄酮对大鼠骨密度及骨代谢生化指标的影响。**方法** 将断乳Wister大鼠按体重随机分为4组,分别给予基础饲料和不同剂量的大豆异黄酮。每周称体重,调整给食量。12周后处死大鼠,取脏器称重,计算脏体比值;剥离股骨,测骨矿物质含量(BMC)、骨密度(BMD)和骨钙、骨磷的含量;对血清中骨形成生化指标碱性磷酸酶、骨钙素和骨吸收生化指标抗酒石酸酸性磷酸酶进行检测,同时测定雌激素-雌二醇(E_2)的含量。**结果** 具有弱雌激素样作用的大豆异黄酮对实验大鼠的子宫、卵巢无刺激作用。与对照组相比,给予大豆异黄酮能提高BMC、BMD及骨钙含量,并随剂量的增加而增大。大豆异黄酮可影响骨代谢,高剂量的大豆异黄酮(41.6 mg/kg)同时抑制骨形成和骨吸收,使骨转化率降低,但对骨吸收的作用大于骨形成。给予大豆异黄酮组血清雌激素水平大于对照组。**结论** 大豆异黄酮通过调整骨代谢生化指标的活性,提高大鼠的骨钙含量和骨密度,可预防骨质疏松的发生。

【关键词】 大豆异黄酮; 骨密度; 骨代谢指标

Influence of soybean isoflavone on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover

CUI Hongbin, NA Xiaolin, LIU Ying. Public Health Colleage, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【**Abstract**】 **Objective** To examine the influence of phytoestrogen-soybean isoflavone on bone mineral density (BMD) and biochemical markers of bone turnover. **Methods** Forty 30-d-old female Wister rats were randomly assigned to four groups and fed basic diet or different dosage of soybean isoflavone. Twelve weeks later, all rats were killed and tissue weights were taken to calculate the ratio of tissue/body. Femoral BMD, bone mineral content (BMC) an bone caclium were measured. Serum alkaline phosphatease (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP), osteocalcin (OC) and 17-β-estradiol (E2) were determined. **Results** Soybean isoflavone as a weak photoestrogen can significantly improve femoral BMD, BMC and bone calcium content without any adverse effects on uterus and ovary. In this study, isoflavone, at the dose of 41.6 mg/kg. bw, inhibited the activity of osteoblasts and osteoclasts and decreased bone turnover in rats. However, it was more effective on bone resorption than bone formation. The serum estrogen levels in experimental groups were high. **Conclusion** Isoflavone can adjust the activity of bone metabolic biochemical markers and increase femoral BMD, BMC and bone calcium content and prevent bone loss in rats. Moreover, has no estrogenic activity on the reproductive tissue.

【**Key words**】 Isoflavone; Bone mineral density; Bone turnover markers

大豆异黄酮是大豆中含有的一类植物雌激素,主要成分有大豆素(daidzein)、金雀异黄素(genistein)和黄豆黄素(glycetein),天然情况下多以β-葡萄糖苷的形式存在[1]。大豆异黄酮是具有多酚羟基的的化合物,化学结构与雌激素相似,能够与雌激素受体结合,表现出雌激素活性和抗雌激素活性,因此又被称作选择性雌激素受体调节剂[2]。

作者单位:150001 哈尔滨医科大学公共卫生学院

妇女绝经后由于卵巢功能下降,雌激素分泌急剧减少,体内骨代谢平衡被破坏,使骨吸收大于骨形成,骨量逐渐减少,形成骨质疏松。一些研究证实,大豆异黄酮具有提高骨密度、预防骨质疏松的作用。Potter等人的研究结果表明,人体摄入含有较高剂量大豆异黄酮的大豆蛋白,可提高受试者腰椎骨的骨密度[3]。

骨质疏松的发生是一个循序渐进的过程,青年时期获得较大的峰值骨量可延缓老年骨质疏松的发

生[4]。为此,我们进行了大豆异黄酮对断乳大鼠骨密度和骨代谢生化指标影响的研究,对大豆异黄酮预防骨质疏松的作用进行了初步探讨。

材料和方法

1. 动物分组及处理

雌性 Wistar 大鼠,购自黑龙江省药品检验所动物室,一级动物,平均体重 66.61 g,依据 TC 值将动物随机分为 4 组,每组 10 只;(1)高剂量大豆异黄酮实验组(基础饲料 + 41.6 mg/kg 的大豆异黄酮);(2)中剂量大豆异黄酮实验组(基础饲料 + 25.0 mg/kg 的大豆异黄酮);(3)低剂量大豆异黄酮实验组(基础饲料 + 12.5 mg/kg 的大豆异黄酮);(4)对照组(基础饲料)。基础饲料为按美国 AOAC 标准配制的低钙合成饲料。

实验动物购得后,在动物室内适应 1 周。按体重的 10% 饲喂各组饲料,饮水量不限,每周称重 1 次,观察大鼠的生长情况和进食量。12 周后断头处死,取动脉血,分离血清 -40℃保存,用于测定骨吸收和骨形成指标及血清雌激素水平。取各脏器、子宫、卵巢称重,用脏体比值表示大豆异黄酮对大鼠生命体征和生殖器官的影响。剥离双侧股骨,去除周围软组织和结缔组织,用于测定骨密度和骨钙含量。

2. 测定指标及方法

(1)骨密度的测定:按照 Arjmandi 的方法测定[5]。

(2)骨矿物质含量的测定:股骨在 105℃烘干至恒重,称量股骨干重;在 700℃灰化 12 h, 冷却后,称量灰重,计算股骨矿物质含量(灰重/干重 × 100%)。

(3)骨钙、骨磷的测定:用原子吸收分光光度法测定骨钙含量,可见分光光度法测定骨磷含量。

(4)骨生化指标及雌激素的测定:用试剂盒测定。其中血清碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶与试剂反应后,用分光光度计测定;骨钙素采用放免试剂盒,用 γ 计数仪测定;雌激素用 ELISA 试剂盒,酶标仪测定。

3. 统计学处理:所有数据均以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 6.1 统计软件进行组间差异的 t 检验。

结 果

1. 大豆异黄酮对实验大鼠体重的影响

各组大鼠体重均随时间增长,从第 8 周开始,高剂量异黄酮组体重与其他组相比略有增加,差异无显著性($P > 0.05$)。

2. 大豆异黄酮对实验大鼠脏/体比值的影响

实验大鼠脏/体比值数据列于表 1。从结果看,异黄酮组动物的肝、脾、肾,尤其是子宫、卵巢与体重的比值与钙对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 实验大鼠脏/体比值(g/100g, $\bar{x} \pm s$)

组别	肝	脾	肾	子宫	卵巢
A	2.696 ± 0.398	0.211 ± 0.037	0.679 ± 0.062	0.158 ± 0.056	0.049 ± 0.016
B	2.686 ± 0.423	0.234 ± 0.040	0.651 ± 0.147	0.149 ± 0.057	0.055 ± 0.020
C	2.658 ± 0.221	0.233 ± 0.057	0.736 ± 0.095	0.145 ± 0.048	0.048 ± 0.018
D	2.867 ± 0.99	0.229 ± 0.042	0.685 ± 0.151	0.157 ± 0.062	0.044 ± 0.007

注:$n = 10$

3. 股骨分析

股骨的重量分析反映了骨量的实际情况,本研究选定骨钙、骨磷含量、骨矿物质含量(BMC)及骨密度(BMD)等指标进行分析,结果见表 2。

表 2 股骨分析情况

检测项目	A	B	C	D
骨钙含量(%)	21.08 ± 1.32*	20.62 ± 0.88*	20.53 ± 0.91	18.30 ± 0.76
骨磷含量(%)	22.15 ± 0.85	21.26 ± 1.33	21.71 ± 0.92	21.93 ± 0.91
骨矿物质含量(%)	61.78 ± 1.14*	61.47 ± 1.36*	58.98 ± 1.36	56.10 ± 1.27
骨密度(g/cm³)	1.33 ± 0.08	1.38 ± 0.107	1.28 ± 0.08	1.29 ± 0.07

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

从以上数据可看出,与对照组相比,高、中剂量大豆异黄酮组骨钙含量、骨矿物质含量均显著提高;骨密度增加 3.8% 和 4.1%;骨磷含量基本不变。

4. 血清骨代谢指标

生化指标的改变反映出体内骨代谢平衡的变化,可用来评价骨转换率,客观地反映骨形成和骨吸收的情况,临床上作为骨质疏松症早期诊断的指标之一。本研究测定骨钙素、碱性磷酸酶(AKP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)的活性,观察大豆异黄酮对骨吸收和骨形成的影响,同时测定血清雌激素(E_2)水平,检验大豆异黄酮和体内雌激素分泌之间的关系。结果见表 3。

表 3 大豆异黄酮对血清检测指标的影响

组别	骨钙素 (ng/mg)	AKP(金氏单位/100ml)	TRACP (U/L)	E_2 (pg/ml)
A	2.317 ± 0.931	13.82 ± 2.98	1.938 ± 1.737*	212.00 ± 17.99*
B	2.233 ± 1.340	12.28 ± 1.47	5.855 ± 3.848	201.71 ± 107.61
C	2.110 ± 0.708	12.63 ± 3.18	4.950 ± 1.750	234.38 ± 168.13
D	2.627 ± 0.879	14.43 ± 2.42	4.564 ± 3.235	170.86 ± 36.99

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

从实验结果看,给予大豆异黄酮的各组骨形成

生化指标骨钙素和碱性磷酸酶的活性与对照组相比有所降低,但无显著变化;给予高剂量大豆异黄酮组骨吸收生化指标抗酒石酸酸性磷酸酶的活性与对照组比显著下降;雌激素水平显著提高。

讨 论

文献报道[5],去除卵巢后实验大鼠体重有所增加,给予 E_2 或含有大豆异黄酮的大豆蛋白后,体重恢复到对照组水平,说明雌激素和具有雌激素样作用的大豆异黄酮与体内的脂代谢有一定相关性。本研究在实验期间,各组大鼠体重均匀增加,高剂量大豆异黄酮组体重略高于其他组,但经统计学分析无显著差异。另外我们在对大豆异黄酮预防动脉粥样硬化的研究中发现,实验组和对照组体重无明显变化。近来,由于植物雌激素包括大豆异黄酮可能引起体内内源性激素失调的问题而引起研究者的注意[6],本研究对实验大鼠的脏体比值,尤其是子宫和卵巢与体重的比值进行比较,发现各组无显著变化,表明该剂量的大豆异黄酮对子宫和卵巢无刺激作用。

从目前发表的文献看,研究大豆异黄酮预防骨质疏松的作用,多是将实验动物摘除卵巢,使体内雌激素水平降低,造成骨质疏松模型。在一定实验期间内,给予不同剂量的大豆异黄酮,观察骨量丢失情况,确定大豆异黄酮的作用效果。如 Arjmandi 等[5,7,8]人进行大豆蛋白预防骨损失的系列研究,证实大豆蛋白中的大豆异黄酮具有减少骨损失的作用,人体实验多以老年绝经妇女为对象进行研究,像本文这样以正常大鼠为研究对象的文献还未见到。本研究的结果表明,大豆异黄酮对体内雌激素水平正常的断乳大鼠可使骨钙和骨矿物质含量增加,并随着大豆异黄酮剂量的增加而增加,表明大豆异黄酮具有促进体内钙吸收,促进骨骼生长的作用。将此研究结果推广到人体,在日常生活中多食用含大豆异黄酮多的大豆制品或将大豆异黄酮添加到食物中,可促进人体对钙的吸收,延缓骨量的丢失,预防骨质疏松的发生。

反映骨形成与骨吸收的生化指标近年来发展迅速,学者们认为测定骨代谢的生化标志物可判断骨的转换情况。实验除测定骨密度及骨钙含量等指标外,还测定了反映骨形成和骨吸收的生化指标骨钙素、碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶的活性,其结果显示高剂量大豆异黄酮组抗酒石酸酸性磷酸酶的活性显著降低,说明大豆异黄酮对骨吸收指标的影响较大。有研究表明对于切除卵巢的动物模型,由于体内雌激素水平的降低,造成骨代谢失衡、骨吸收大于骨形成、骨转换率提高形成的骨质疏松,给予雌激素可同时抑制骨吸收和骨形成,但对骨吸收的作用较大[5],本实验研究结果与此一致。

由于大豆异黄酮的结构与雌激素相似,具有弱雌激素作用,其活性约为雌激素的 $10^{-3} \sim 10^{-5}$,能够与雌激素受体结合,在体内起雌激素作用,预防老年性骨质疏松和减轻更年期综合症;同时大豆异黄酮又具有抗雌激素作用,可抑制乳腺癌的发生[9],所以大豆异黄酮具有双向调节功能。动物实验证实去除卵巢大鼠给予大豆异黄酮能够提高血清雌激素水平[8]。本研究测定结果发现对于正常生长的雌性大鼠,给予大豆异黄酮组的雌激素水平高于对照组,经分析认为可能有两种原因:一是摄入大豆异黄酮使内源性雌激素的分泌发生改变,体内雌激素水平提高,由于缺乏相关的参考资料,这个推断还需进行深入研究加以证实;二是实验大鼠体内雌激素水平低下,摄入大豆异黄酮,显示其弱雌激素作用,使测得的雌激素水平显示较高的数值,这同样需要进一步研究探讨。

参 考 文 献

1 Setchell K, Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy is isoflavones. Am, J, Clin, Nutr, 1998, 68(Suppl): 1333s.

2 Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, et al. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. Endocrinlogy, 1999, 140: 1893.

3 Susan MP, Jo AB, Hongyu T, et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am J Clin Nutr, 1998, 68(Suppl): 1375s.

4 薛延. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 北京:科学出版社, 1999. 27.

5 Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. J Nutr, 1996, 126: 161.

6 Ishimi Y, Arai N, Wang X, et al. Difference in effective dosage of genistein on one and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophy Res Comm, 2000, 274: 697.

7 Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, et al. Bone - sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficiency rats is related to its isoflavone content. Am J Clin Nutr, 1998, 68(Suppl): 1364s.

8 Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal VG, et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone - deficiency in rats. Am J Clin Nitr, 1998, 68(Suppl): 1358s.

9 刘兆平, 卢承前, 刘期成. 大豆异黄酮与女性慢性疾病. 国外医学卫生学分册, 2000, 27: 201-204.

(收稿日期:2003-01-06)