文章编号: 1001-0580(2007)03-0297-03　中图分类号: R 151.1　文献标志码: A　【论　著】

虾青素对 D- 半乳糖老龄大鼠骨质影响*

裴凌鹏[1], 董福慧[1], 惠伯棣[2]

摘　要: 目的　研究虾青素对 D- 半乳糖致衰老大鼠骨质的影响。方法　用 D- 半乳糖注射 Wistar 雄性大鼠 5 个月, 建立衰老模型, 测定青年对照组、致衰老模型组、虾青素组和正常老龄对照组骨常规参数并进行比较分析。结果　致衰老模型组骨密度、骨结构力学参数、生物力学参数、骨钙、镁、锰及羟脯氨酸含量与青年对照组比较有所降低, 差异有统计学意义($P<0.01$); 而骨磷含量、骨和血清碱性磷酸转移酶与青年对照组比较有所升高, 差异有统计学意义($P<0.01$); 这些变化与正常老龄对照组的变化趋势一致, 并比后者变化得更显著。相比之下, 虾青素组在上述参数指标与致衰老模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。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, 而虾青素可以预防或降低此类致衰老骨质变化的发生。

关键词: 骨质疏松; 骨密度; 羟脯氨酸; 虾青素

Effect of astaxanthin on osseous changes in D- galactose- induced aged rats　*PEI Ling-peng, DONG Fu-hui, HUI Bo-di. China Academy of Chinese Medicine Science (Beijing 100700, China)*

Abstract: Objective　To study the effect of astaxanthin osseous changes in D- galactose- induced rats. **Methods**　To cause aging, Wistar rats were injected with D- galactose for five months. They were randomly divided into four groups, including young control group, model group, astaxanthin group and old control group, whose osseous routine parameters were tested and compared. **Results**　Compared with young group, bone density, structural power parameters of bone, biological power parameters of bone, bone calcium, manganese, magnesium and the content of hydroxyproline in the model group, decreased and had statistical significance ($P<0.01$). However, the content of bone phosphorus, the activity of bone and serum ALP had statistical significance and increased ($P<0.01$). Those changes of the model group were the same as those of the old control group, but those changes of astaxanthin group significantly differed from the model group. **Conclusion**　The high- does D- galactose can cause aging and osteoporsis at the same time, but astaxanthin can prevent osseous changes induced by D- galactose.

Key words: osteoporsis; bone density; hydroxyproline; astaxanthin

D- 半乳糖衰老机制是指在一定时间内, 给动物连续注射大剂量的 D- 半乳糖, 使机体细胞内半乳糖浓度增高。在醛糖还原酶的催化下, 还原成半乳糖, 该物质不能被细胞进一步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老年性骨质疏松症发病机制具有一定的研究价值。虾青素是一种非维生素 A 原的羟酮式类胡萝卜素, 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明显[2]。本实验旨在通过虾青素对骨质常参数如骨密度、骨结构力学参数、生物力学参数、主要骨矿物质(钙、镁、锰、磷)、血清磷钙、羟脯氨酸含量及碱性磷酸酶活性等来研究此类化合物对 D- 半乳糖致衰老大鼠骨质的影响。

1　材料与方法

1.1　主要仪器和试剂　Labconco 冰冻真空干燥仪(法国乐高公司); 752 分光光度计、AE100 电子天平(中国伯乐公司); 电热三用水箱、KA- 1000 型台式离心机(中国杭州华亭公司); 960 型荧光分光光度计、J2- SH 高速冰冻离心机、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) 高效液相色谱(HPLC) (Waters 600 E 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) 测定度剂盒(南京建成生物工程研究所); 虾青素乳化剂(瑞士罗氏公司); 乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE) (美国迪马公司); 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　乳化剂破乳制备虾青素

1.2.1　虾青素萃取　称取 10 g 乳化颗粒, 加入 300 ml 丙酮- 正己烷萃取。将脂溶性相收集, 再进行浓缩处理。

1.2.2　虾青素提取液柱色谱纯化　(1) 装柱: 将活化好的氧化铝装填于玻璃层析柱中, 用正己烷润湿。(2) 洗脱: 分别取 2 ml 虾青素提取液上柱, 用 50 ml 正己烷- 丙酮淋洗, 收集洗脱液。将洗脱液用氮气吹干制粉备用。

1.3　虾青素鉴定　根据其高效液相色谱(HPLC) 中保留时间和紫外可见吸收光谱的特征峰与标准品对照进行鉴定。

1.4　动物实验

1.4.1　D- 半乳糖致衰老动物骨质疏松症模型的建立　6 周龄 Wistar 雄性大鼠 45 只随机分为 3 组, 即致衰老模型组、青年对照组和虾青素组, 每组 15 只, 另购 16 月龄同品系大鼠 15 只作为正常老龄对照组。致衰老模型组和虾青素组每天用 1.5 g/(kg·bw) 的 D- 半乳糖颈背部皮下注射, 剂量为 0.1 ml/10 g, 其中虾青素组每天每只以 0.2 ml 灌喂 20 mg/(kg·bw), 所用虾青素由本实验室提供。青年对照组注射等量的生理盐水, 每天 1 次, 连续注射 5 个月, 自由进食进水。实验结束时称量鼠的体重并取各组大鼠, 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、血清钙、血清磷、

* 基金项目: 国家自然科学基金(30171169); 北京市自然科学基金对外合作项目(SZ200511417020); 北京市生物活性物质与功能食品重点实验室开放课题(WS- 01)

作者单位: 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

作者简介: 裴凌鹏(1976-), 男, 湖南常德人, 博士在读, 研究方向: 营养与骨折愈合。

中国公共卫生 CPH

血清碱性磷酸酶(ALP),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。

1.4.2 生化指标测定 MDA 含量测定硫代巴比妥酸(TBA)比色法;SOD 活性测定采用亚硝酸盐法。

1.4.3 其他测定指标 血清 ALP 活性采用氨基氨替比啉测酚法测定;血清钙用乙二胺四乙酸(EDTA)滴定法;血清磷采用孔雀绿微量比色法;骨中 ALP 采用化学免疫法试剂盒测定(中国科学院生物物理所中生公司)。

1.4.4 股骨骨密度测定 取股骨解冻后置于骨密度测定仪上,分近段、骨中段、远段 3 部分测其骨密度。近段和远段代表松质骨骨密度,骨中段代表皮质骨骨密度。测定参数:扫描宽度 20 nm,扫描速度 7 mm/s。

1.4.5 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。

1.4.6 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。

1.4.7 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,用钼蓝显色定磷法于 660 nm 波长下测定。

1.4.8 骨中羟脯氨酸的含量 取大鼠右侧股骨上端称重,研碎。用 3 ml 氯仿-甲醇处理 2 h,过滤。再用乙醇水和丙酮冲洗 1 次,放入烤箱 2 h。取出后放入 1 ml 12 mol/l 的 HCl 水解 2 h,取出后处理用氯胺 T 法于 560 nm 波长下测定。

1.5 统计分析 采用 SPSS 11.0 统计软件进行齐性检验并作方差分析。

2 结 果

2.1 虾青素提取与鉴定 有机试剂的反复提取后,通过柱层析洗脱后可以得到高纯度的虾青素提取物,经 HPLC 及其光谱特征峰鉴定为反式虾青素单体。

2.2 D-半乳糖大鼠衰老模型建立(表 1) 与青年对照相比,致衰老模型组血清 MDA 含量升高,而血液 SOD 活性均有所降低,与正常老龄对照组变化趋势一致,说明 D-半乳糖大鼠衰老模型建立成功。而虾青素组与致衰老模型组比较,血清 MDA 含量升高,血液 SOD 活性降低,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。

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

组 别	MDA(nmol/ml)	SOD(NU/mgpro)
青年对照组	6.72±0.52	121.32±5.21
致衰老模型组	14.52±0.49[b]	94.42±4.16[b]
正常老龄对照组	10.43±0.12[b]	103.62±4.01[b]
虾青素组	7.19±0.27[c]	112.42±4.01[c]

注:各组与青年对照组比较,a $P < 0.05$,b $P < 0.01$;与致衰老模型组比较,c $P < 0.01$

2.3 股骨结构力学、生物力学指标测定(表 2) 与青年对照组比较,正常老龄对照组在股骨重量、长度明显增加,而致衰老模型组 2 项指标明显减少。而在股骨密度、结构力学和生物力学指标方面表明,正常老龄对照组和致衰老模型组与青年对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常情况下随年龄的增长,大鼠股骨长度和重量都会相应增加,同时由于各种内外因素其股骨的结构力学和生物力学将呈现下降趋势。实验结果表明,注射 D-半乳糖 5 个月可以达到改变股骨结构力学和生物力学的指标,且作用与正常老龄大鼠变化趋势一致,证明在建立 D-半乳糖致衰老模型的同时,也可以导致老年性骨质疏松症的可能。而虾青素组与致衰老模型组比较,骨密度、结构力学和生物力学参数指标均有所升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 股骨结构力学、生物力学指标($x \pm s$, $n = 15$)

指 标	青年对照组	致衰老模型组	正常老龄对照组	虾青素组
骨长度(cm)	3.57±1.10[c]	3.60±0.12[a]	3.73±0.10[b]	3.62±0.11[c]
骨重量(g)	0.32±0.12[c]	0.35±0.12[a]	0.39±0.14[b]	0.33±0.12[c]
近段骨密度(g/cm^2)	0.172±0.012[d]	0.107±0.010[b]	0.137±0.010[b]	0.140±0.013[c]
中段骨密度(g/cm^2)	0.151±0.010[d]	0.095±0.010[b]	0.115±0.010[b]	0.124±0.011[c]
远段骨密度(g/cm^2)	0.139±0.021[d]	0.081±0.016[b]	0.095±0.016[b]	0.103±0.011[c]
弹性挠度(mm)	0.43±0.11[c]	0.60±0.14[a]	0.67±0.13[b]	0.53±0.12[c]
弹性载荷(g)	0.35±0.10[c]	0.50±0.11[a]	0.55±0.14[b]	0.42±0.10[c]
最大挠度(mm)	0.39±0.11[c]	0.52±0.10[a]	0.58±0.12[b]	0.44±0.13[c]
最大载荷(g)	0.35±0.12[c]	0.49±0.12[a]	0.53±0.16[a]	0.44±0.12[c]
最大应力(N/mm^2)	22043±2111[c]	21135±0.0041[a]	21639±2325[a]	21361±2210[c]
最大应变(mm)	0.0232±0.0032[c]	0.0195±2210[a]	0.0209±0.0024[a]	0.0202±0.0012[c]
弹性应力(N/mm^2)	20967±2113[c]	16755±2116[a]	17775±2112[a]	17200±2122[c]
弹性应变(mm)	0.0182±0.0016[c]	0.0155±0.0011[a]	0.0164±0.0014[a]	0.0162±0.0012[c]
张应力(N/mm^2)	25618±3173[c]	27121±3221[a]	26209±3251[a]	26342±3209[c]
刚性系数(kg/mm^2)	5525618±423121[c]	5327257±413286[a]	5386209±423661[a]	5360210±422752[c]
弹性模量(N/mm^2)	1225098±143261[c]	1177227±148571[a]	1156221±141121[a]	1162210±143500[c]
韧性系数(mm/kg)	1.2212±0.7031[c]	1.4105±0.7011[a]	1.3266±0.7020[a]	1.3701±0.7017[c]
应变位能	120029±23209[c]	103327±22011[a]	108397±22789[a]	106101±22117[c]

注:各组与青年对照组比较,a $P < 0.05$,b $P < 0.01$;与致衰老模型组比较,c $P < 0.05$,d $P < 0.01$

2.4 骨矿物质含量、血钙磷及 ALP 活性(表 3) 与青年对照组比较,致衰老模型组和正常老龄对照组骨钙、锰、镁及血磷含量均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明注射 D-半乳糖的大鼠骨中几种重要的矿物质含量比同龄正常大鼠有所降低,而与正常老龄对照组的骨矿物质含量变化趋势一致。再次证明长期服用 D-半乳糖可以导致老年性骨质疏松症的可能。而虾青素组与致衰老模型组相比,骨钙、锰、鲜及血磷含量均明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。与青年对照组比较,致衰老模型组和正常老龄对照组骨中羟脯氨酸含量均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。致衰老模型组血清 ALP 和骨 ALP 活性与青年对照组比较显著升高;致衰老模型组与正常老龄对照组血清 ALP 活性比较也有所升高,2 组变化趋势一致。而虾青素组与致衰老模型组比较,羟脯氨酸含量明显升高,血清 ALP 和骨 ALP 活性较明显降低,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。

中国公共卫生 CPH

表 3　骨矿物质含量、血钙磷及 ALP 活性测定($x \pm s$, n= 15)

指　标	青年对照组	致衰老模型组	正常老龄对照组	虾青素组
骨钙(μg)	812.12±110.10[d]	592.15±120.09[b]	668.42±107.01[b]	608.23±102.14[c]
骨磷(μg)	172.23±21.12[d]	321.21±20.10[b]	261.18±23.21[b]	270.43±20.21[c]
骨镁(μg)	6.07±0.72[d]	3.12±0.71[b]	5.02±0.52[b]	3.90±0.33[c]
骨锰(μg)	7.87±0.50[d]	2.96±0.56[b]	4.76±0.42[b]	3.57±0.21[c]
血钙(mmol/L)	2.76±0.13[c]	3.07±0.11[a]	2.97±0.12[a]	3.04±0.11[c]
血磷(mmol/L)	2.76±0.11[c]	2.62±0.15[a]	2.68±0.17[a]	2.71±0.11[c]
羟脯氨酸(μg)	3212.51±512.10[d]	865.12±432.20[b]	2351.21±471.12[b]	1820.71±430.11[c]
骨 ALP(U/L)	173.52±0.62[c]	195.21±0.70[a]	188.32±0.63[a]	190.21±0.53[c]
血清 ALP(U/L)	5.07±0.12[d]	7.12±0.11[b]	5.63±0.15[b]	6.55±0.17[c]

注: 各级与青年对照组比较, a P< 0.05, b P< 0.01; 与致衰老模型组比较, c P< 0.01, d P< 0.01

3　讨　论

研究表明, 大量的活性氧摄入会从整体、细胞和基因不同水平层次上影响骨的代谢过程[3,4]。当大量进食 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形成, 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性能力, 提高了发生骨折的机率。研究发现, 虾青素可以有效地缓解增强成骨细胞增殖和分化, 同时对局部细胞因子(如 ALP 酶、iv型胶原蛋白等) 具有上调作用, 表明虾青素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 活性低于致衰老模型组和正常老龄对照组, 而致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。综上所述, 本实验通过有关骨质疏松症的相关指标检验, 证实 D- 半乳糖诱导衰老大鼠过程的同时, 可能诱发致衰老性骨质疏松。而虾青素可有效地缓解此类致衰老性骨质变化。

参考文献

〔1〕 Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycosylation and products stimulate interleukin- 6 production by human bone-derived cells[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(3): 439- 446.
〔2〕 谢虹, 张慧碧, 何国平, 等. 高效液相色谱法测定虾青素的含量[J]. 粮食与饲料工程, 2003, 1: 46- 49.
〔3〕 马静波. 骨质疏松症的治疗和预防概述[J]. 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[J]. 生物工程进展, 2001, 21(3): 54- 5.
〔5〕 朱洁, 岳珍. 骨关节病软骨细胞 DNA 氧化性损伤[J]. 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[J]. 骨外医学: 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]. J Pineal Rea, 1995, 18: 1- 11.
〔8〕 Jacobson A. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(1): 162- 167.

收稿日期: 2006-06-12　　(文涛编校)

文章编号: 1001-0580(2007)03-0299-02　　中图分类号: R 183.3+　　文献标志码: A

【论　　著】

体质指数与膝关节骨性关节炎关系*

史冬泉, 戴进, 刘澄, 朴成吉, 蒋青

摘　要: 目的　探讨体质指数和膝关节骨性关节炎的发病及影像学 Kellgren/Lawrence(K/L) 评分的相关性。方法　临床选择膝关节骨性关节炎患者 223 例, 年龄匹配对照组 416 例。患者行影像学 K/L 评分。测量患者和志愿者的身高、体重, 求出体质指数(BMI), 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析, 计算 BMI 在正常人群及骨性关节炎组分布; 计算肥胖人群 BMI 在正常人群与骨性关节炎患者中的相对危险度(OR) 及 OR 95%CI。结果　223 例患者经 K/L 评分分为 iv~ ⑤级, 分别为 iv级 11 例、⑤级 69 例、④级 58 倒、⑤级 84 例。正常对照组、骨性关节炎组 BMI(kg/m^2) 分别为 23.4±3.8, 25.3±3.64, 两者比较差异有统计学意义(P< 0.0001)。BMI 和骨性关节炎影像学进展相关性回归得 Pearson 相关系数为 0.222, P< 0.01; 肥胖是骨性关节炎发病的高危因素(OR= 2.63, 95%CI= 1.876~ 3.688, χ^2= 31.5, P< 10^{-7})。结论　肥胖是骨性关节炎的高危因素, 且与骨性关节炎的严重程度相关。控制或减轻体重是预防和治疗膝关节骨性关节炎的有效措施之一。

关键词: 体质指数; 膝骨性关节炎; 肥胖

Relationship between body mass index and knee osteoarthritis　*SHI Dong-quan, DAI Jin, LIU Cheng, et al. Center of Diagnosis and Treatment for Joint Disease, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University (Nanjing 210093, China)*

Abstract: Objective　To analyse the relationship between body mass index (BMI) and the incidence and radiographic progression of osteoarthritis (Kellgren/Lawrence score, K/L score). **Methods**　Cross- sectional and longitudinal studies were conducted to analyse the relationship between BMI and the incidence and radiographic progression of osteoarthritis. The knee osteoarthritis analyses included 223 participants aged 30 years and older. 416 controllers participated in the trial. Radiographic

* 基金项目: 国家自然科学基金(30571874)
作者单位: 南京大学医学院附属鼓楼医院关节中心, 南京 210008
作者简介: 史冬泉(1980-), 男, 江苏海门人, 硕士, 研究方向: 关节外科的基础和临床研究。
通讯作者: 蒋青