

# 植雌激素防治骨质疏松症的实验研究

张 杰 汪远金 许金林 张晓娟 章天寿 白 玫

**摘要** 目的 观察植雌激素(phytoestrogen)对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用。方法 45 只 3 月龄 Wistar 雌性大鼠,随机分为假手术组、模型组、植雌激素低剂量组(简称低剂量组)、植雌激素高剂量组(简称高剂量组)和雌二醇组,每组 9 只。假手术组仅行假手术,其余 4 组均行卵巢切除术,术后第 31 天开始给药,假手术组和模型组每天灌服生理盐水 2ml,植雌激素高、低剂量组每天分别灌服植雌激素 10mg/kg、5mg/kg,雌二醇组每周肌肉注射 1 次雌二醇 0.1mg/kg。连续用药 90 天后,检测血清生化指标,剥离右股骨测定骨密度,取左股骨做骨小梁病理形态学检测。完整摘取子宫称重,计算子宫指数。结果 不同剂量植雌激素及雌二醇均可增加去卵巢大鼠的血清雌二醇浓度、血磷含量,并能提高子宫重量及子宫系数,降低血清骨钙素、血浆抗酒石酸酸性磷酸酶、血清碱性磷酸酶和白介素-6 含量,与模型组比较差异有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。病理形态学观察发现,模型组骨皮质变薄,骨小梁变细,完整性差,扭曲、断裂、面积减少,而不同剂量植雌激素组及雌二醇组上述变化明显改善。结论 植雌激素对去卵巢大鼠骨质疏松症有防治作用。

**关键词** 植雌激素;骨质疏松症;骨密度

**Experimental Study on Prevention and Treatment of Osteoporosis by Phytoestrogen** ZHANG Jie, WANG Yuan-jin, XU Jin-lin, et al *Outpatient Department of Anhui TCM College, Hefei (230061)*

**Objective** To observe the effect of phytoestrogen (PE) in preventing and treating osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Forty-five Wistar female rats, 3 months old, were randomly divided into the sham-operated group, the model group, low dose and high dose PE groups, and the positive control group, 9 in each group. All rats, except that those in the sham operated group were simultaneously operated, were ovariectomized. The medication started from the 31st days after operation by daily given saline per os to the sham-operated group and the model group, PE per os to the PE groups, and estradiol by intramuscular injection to the positive control group. The animals were sacrificed 90 days later, their sera were collected for determination of biochemical parameters, their right femoral bone was taken to detect the bone mineral density (BMD), left femoral bone to examine pathology of bone trabecula, and whole uterus was weighed to calculate the uterine index. **Results** PE could increase the BMD level, serum estradiol and inorganic phosphorus content, and uterine index, lower serum BGP, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), alkaline phosphatase (AKP) and interleukin-6 levels. Pathological examination showed that in the model group, the cortex of bone thinned, bone trabecula thinned also, with poor integrity, distorted, broken and decreased in size, while in the PE groups, the above-mentioned changes were significantly alleviated. **Conclusion** PE is effective in preventing and treating osteoporosis in ovariectomized rats.

**Key words** phytoestrogen; osteoporosis; bone mineral density

骨质疏松症是严重危害人体健康的常见病,用雌激素治疗绝经期骨质疏松症具有显著效果,但是雌激素替代疗法可能会出现严重的副反应,如生殖系统肿瘤发病率上升、子宫内膜增生、高血凝状态等<sup>[1]</sup>。本研究观察了从中药提取的植雌激素对去卵巢大鼠骨质疏松

症模型影响,现报告如下。

## 材料和方法

1 动物及分组 Wistar 雌性大鼠 45 只,3 月龄,体重 170~230g,由中国科学技术大学实验动物中心提供。鼠饲料由安徽医科大学实验动物中心提供。大鼠随机分 5 组,即假手术组、模型组、植雌激素低剂量组(简称低剂量组,每天给植雌激素 5mg/kg)、植雌激素高剂量组(简称高剂量组,每天给植雌激素 10mg/kg)、雌二醇

基金项目 安徽省科技厅 2002 年重点科研项目(No. 99022008)

作者单位 安徽中医学院门诊部(合肥 230061)

通讯作者 张 杰, Tel 0551-2845006, E-mail: trytsz@sina.com

万方数据

组每周给雌二醇 0.1mg/kg), 每组 9 只。

2 药物 植雌素为从中药葛根、大豆中用乙醇等提取异黄酮部分, 提取物含异黄酮 65.7%, 其中金雀异黄素 (genistein) 占总异黄酮的 63%。用药剂量以总异黄酮计, 使用时以 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配成 0.5mg/ml 和 4mg/ml 的混悬液。苯甲酸雌二醇 (0.1mg/ml): 上海通用药业股份有限公司生产, 批号 01010214。

### 3 试剂及仪器

3.1 试剂 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 和碱性磷酸酶 (AKP) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。骨钙素 (BGP) 和白介素-6 (IL-6) 试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。雌二醇 ( $E_2$ ) 试剂盒购自天津德普生物技术和医学产品有限公司。

3.2 仪器 双能 X 线骨密度测定仪 (CHALCENGER) 法国 DMS 产品。GC-911 $\gamma$ -放射免疫计数器, 中国科技大学创新股份有限公司中佳分公司产品。

### 4 实验方法

4.1 造模制作 大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 切除双侧卵巢, 以庆大霉素每天 200 IU/100g 肌肉注射, 连续 2 天。假手术组大鼠只手术但不切除卵巢。

4.2 给药方法 各组动物均在相同环境中饲养, 自由摄食和饮水, 术后第 31 天开始给药, 假手术组和模型组用生理盐水 2.0ml 灌胃, 每天 1 次; 植雌素高、低剂量组灌胃不同剂量 (分别为 4mg/ml、0.5mg/ml) 的植雌素, 每天 1 次; 雌二醇组用  $E_2$  0.1mg/kg 肌肉注射, 每周 1 次, 连续 90 天后。2% 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 腹主动脉采血分离血浆和血清, 置冰箱保存待测。剥离右股骨做骨密度检测, 左股骨做骨小梁病理形态学检测, 完整摘取子宫称重, 并计算子宫系数。

4.3 观察项目及检测方法 (1) 骨密度用双能 X 线骨密度仪测定。(2) 血生化指标: 血清  $E_2$ 、BGP、IL-6 均用放射免疫分析法测定; 血清钙、磷、AKP、血浆 TRAP 均用比色法测定。(3) 子宫重量及子宫指数: 子宫重量用 TL-02 型链条加码天平 (分度值 10mg), 子宫指数为大鼠子宫重量与大鼠体重的比值。(4) 病理形态学观察: 采用生物显微镜 CH50-213E, 日本奥林

巴斯公司生产。

5 统计学方法 采用  $t$  检验。

## 结 果

1 各组 BMD 比较 见表 1。与假手术组比较, 模型组 BMD 显著降低 ( $P < 0.01$ ), 植雌素高、低剂量组和雌二醇组 BMD 均显著升高, 与模型组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

表 1 各组 BMD 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	BMD ( $g/cm^2$ )
假手术	9	$0.157 \pm 0.017$
模型	9	$0.126 \pm 0.016^{\Delta}$
植雌素低剂量	9	$0.167 \pm 0.023^*$
高剂量	9	$0.188 \pm 0.025^*$
雌二醇	9	$0.175 \pm 0.023^*$

注: 与模型组比较,  $^* P < 0.01$ ; 与假手术组比较,  $^{\Delta} P < 0.01$

2 各组血清生化指标检测结果比较 见表 2。与假手术组比较, 模型组大鼠血清  $E_2$ 、血 P 含量均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而血清 BGP、AKP、IL-6 及血浆 TRAP 升高 ( $P < 0.01$ )。植雌素高、低剂量组及雌二醇组血清  $E_2$  水平、血 P 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。而血清 BGP、血浆 TRAP、AKP 及 IL-6 含量则显著降低, 与模型组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各组血 Ca 水平无明显变化。

3 各组子宫重量和子宫系数比较 见表 3。与假手术组比较, 模型组子宫重量与子宫系数均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而植雌素高、低剂量及雌二醇组与模型组比较, 子宫重量及子宫系数均显著提高 ( $P < 0.01$ ), 但植雌素高、低剂量组提高的程度比雌二醇组低 ( $P < 0.05$ )。

4 病理形态学观察 假手术组: 骨皮质无变薄改变, 骨小梁较粗, 排列整齐并连接成网, 间隙较小, 骨小梁密度、面积无减少。模型组: 骨皮质变薄, 骨小梁变细, 其间连接较少, 并可见骨小梁不连, 小梁间隙增大, 密度及面积减少。植雌素低剂量组: 骨皮质稍变薄, 骨小梁略变细, 排列尚整齐, 并连接成网, 部分区域骨小梁间隙略增大, 骨小梁密度、面积无明显减少。植雌素高剂量组: 骨皮质无明显变薄, 骨小梁无明显变细, 且排列较整齐, 连接成网, 局部区域骨小梁间隙略增大, 骨小梁密度和面积均未见减少。雌二醇组: 骨皮质无

表 2 各组血清生化指标检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	$E_2$ (mg/ml)	BGP (mg/L)	AKP (IU/L)	IL-6 (ng/ml)	TRAP (IU/L)	P (mmol/L)	Ca (mmol/L)
假手术	9	$46.88 \pm 20.00$	$0.22 \pm 0.06$	$217 \pm 54$	$90.05 \pm 44.10$	$4.25 \pm 1.36$	$1.75 \pm 0.51$	$2.76 \pm 0.34$
模型	9	$27.55 \pm 7.90^{\Delta\Delta}$	$0.46 \pm 0.13^{\Delta\Delta}$	$291 \pm 52^{\Delta\Delta}$	$150.93 \pm 57.52^{\Delta\Delta}$	$6.65 \pm 2.30^{\Delta\Delta}$	$1.12 \pm 0.23^{\Delta}$	$2.70 \pm 0.18$
植雌素低剂量	9	$63.89 \pm 14.50^{**}$	$0.31 \pm 0.06^{**}$	$226 \pm 56^*$	$110.30 \pm 37.20^*$	$4.35 \pm 1.26^{**}$	$1.55 \pm 0.38^*$	$2.71 \pm 0.17$
高剂量	9	$61.56 \pm 15.30^{**}$	$0.34 \pm 0.06^{**}$	$223 \pm 54^*$	$119.85 \pm 59.00^*$	$4.58 \pm 1.28^{**}$	$1.74 \pm 0.47^*$	$2.78 \pm 0.22$
雌二醇	9	$57.11 \pm 12.90^{**}$	$0.26 \pm 0.09^{**}$	$264 \pm 61^*$	$112.68 \pm 39.68^*$	$4.55 \pm 1.27^{**}$	$1.69 \pm 0.42^*$	$2.63 \pm 0.25$

注: 与模型组比较,  $^* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ ; 与假手术组比较,  $^{\Delta} P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

表 3 各组子宫重量和子宫系数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	子宫重量( mg )	子宫系数
假手术	9	711±210	3.10±0.99
模型	9	311±240 <sup>△</sup>	1.18±0.77 <sup>△</sup>
植雌素低剂量	9	500±106* <sup>▲</sup>	2.20±0.50* <sup>▲</sup>
高剂量	9	494±117* <sup>▲</sup>	2.00±0.15* <sup>▲</sup>
雌二醇	9	655±140*	2.84±0.16*

注 :与模型组比较 ,\* $P<0.01$  ;与假手术组比较 ,<sup>△</sup> $P<0.01$  ;与雌二醇组比较 ,<sup>▲</sup> $P<0.05$

明显变薄 ,骨小梁稍细 ,排列尚整齐 ,骨小梁面积和密度无明显减少(照片略)。

讨 论

植雌素为从中药葛根、大豆中提取的异黄酮部分 ,主要成分为金雀异黄素。本实验表明 :它能增加去卵巢大鼠股骨骨密度。其作用机理是能增加成骨细胞的增殖和功能 ,促进骨盐沉着<sup>[2]</sup> ,同时又能抑制破骨细胞的功能<sup>[3]</sup> ,减少骨质消溶。血清骨钙素是由成骨细胞产生的特异的非胶原蛋白 ,总量约占骨组织非胶原蛋白的 20% ,血中 BGP 来自新合成的、尚未与骨结合的游离的 ,或来自骨吸收时细胞外基质。因此骨细胞的合成增强或破骨细胞活跃均可造成 BGP 上升 ,骨钙素可作为评估骨转换率及骨形成的特异指标<sup>[4]</sup>。植雌素使血清 BGP 含量则显著降低 ,说明它可以降低骨转换率。本研究还表明 ,植雌素能增加去卵巢大鼠子宫重量 ,表现一定的雌激素样活性 ,但作用强度要弱于 E<sub>2</sub>。由于植雌素和 E<sub>2</sub> 结构相似 ,故可以与雌激素受体结合。

雌激素受体有两种亚型 :ER $\alpha$  和 ER $\beta$  ,ER $\beta$  基因远小于 ER $\alpha$  基因 ,前者约 40Kb ,后者为 140Kb ,主要是内含子长度不同所致。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在体内分布 ,与配体的亲和力 ,促转率活性上均存在差异。在子宫及乳腺组织中 ,以  $\alpha$  型占优势 ,而在人与大鼠骨骼中 ,则以  $\beta$  型占优势<sup>[4]</sup>。实际上 ,雌激素促进骨骼中钙沉积的作用是由 ER $\beta$  介导的。植雌素中的金雀异黄素与 ER $\beta$  的亲和力为与 ER $\alpha$  亲和力的 22 倍 ,因此 ,与雌激素比较起来 ,植雌素对子宫、乳腺的刺激作用要弱得多 ,而对骨代谢的保护作用则要强得多。我们在所用实验剂量条件下 ,植雌素对骨代谢的有关指标的影响与 E<sub>2</sub> 相近似 ,但对子宫的作用明显弱于 E<sub>2</sub>。

切除卵巢导致大鼠雌激素减少 ,雌激素水平降低可导致 IL-6 产生过量 ,血清中 IL-6 水平与血清中雌激素水平呈负相关 ,已被实验所证实<sup>[5]</sup>。体内大量实验证实 ,IL-6 增加破骨细胞形成刺激骨吸收<sup>[6]</sup> ,IL-6 主要作用于破骨细胞形成的早期阶段 ,增加破骨细胞

早期前体的分裂 ,加强破骨细胞对骨质的吸收作用。植雌素可能通过其拟雌激素样作用 ,使去卵巢大鼠血清 IL-6 水平降低 ,从而降低破骨细胞的功能。

血清 AKP 反映成骨细胞活性 ,常作为反映骨形成的生化指标。TRAP 主要由破骨细胞释放 ,血清中的 TRAP 水平可以反映破骨细胞的活性和骨吸收的状态 ,是反映骨吸收的特征性酶。切除卵巢以后 ,血清 AKP 及 TRAP 活性均显著上升 ,说明骨形成与骨吸收均升高 ,骨代谢呈高转换状态。一般认为 ,血清 AKP 水平上升是伴随骨质吸收亢进引起的代偿性骨形成增强。植雌素可降低去卵巢大鼠血清 AKP 及 TRAP 活性 ,即可抑制由于卵巢切除所致的骨代谢高转换状态。

葛根总异黄酮以葛根素及大豆苷为主 ,对防治去卵巢大鼠骨质疏松症也有效<sup>[7]</sup> ,但作用强度较植雌素为弱。本药以金雀异黄素为主 ,推测 5 位羟基对骨代谢可能起重要作用。

参 考 文 献

1 王 莉 ,孔德诚. 雌激素替代疗法的利与弊. 中国骨质疏松杂志 2001 ;7(3):283—284.  
Wang L , Kong DC. Advantages and disadvantages of estrogen replacement therapy. Chin J Osteopor 2001 ;7(3):283—284.

2 Yamaguchi M , Ying Huagao. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats. J Mol Cell Biochem 1998 ;178(1—2):377—382.

3 Yamaguchi M , Ying Huagao. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. Biochem Pharmacol 1998 ;55(1):71—76.

4 Eastell R , Delmas PD , Hodgson SF , et al. Bone formation rate in older normal women : concurrent assessment with bone histomorphometry , calcium kinetics and biochemical markers. J Clin Endocrinol Metab 1988 ;67:741.

5 Papanicolaou DA. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. Ann Intern Med 1998 ;128:127—137.

6 Noriyoshi K , Donald B , Toshio S. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. J Immunol 1990 ;144:4226.

7 郑高利 ,张倍岳 ,方晓林 ,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—425.  
Zheng GL , Zhang BY , Fang XL , et al. Effects of total isoflavones pueraria DC. on bone mineral density and bone strength in ovariectomized rats. Chin Tradit Herbal Drugs 2001 ;32(5):422—425.