

钙螯合胶原多肽与雌激素对去卵巢大鼠骨质改善作用的比较

高文伟¹, 申勇涛¹, 程稚玲², 韩克光¹, 霍乃蕊^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西省农业科技信息中心, 太原 030000)

【摘要】 目的 将钙螯合胶原多肽(CPCC)的骨质改善效果与雌激素进行比较,为安全的骨质疏松(osteoporosis, OP)防治药物的研发奠定基础。**方法** 切除大鼠双侧卵巢,设置切卵巢组(OVX)、假手术组(sham)、 17β -雌二醇(OVX + E_2)注射组与CPCC灌胃组(OVX + CPCC),9周后比较各组的骨骼指标和血液生化指标。**结果** OVX组股骨密度显著低于sham组($P < 0.01$),说明OP发生。和激素一样,CPCC可有效抑制所测指标的异常变化,并使其维持在sham组水平($P > 0.05$)。然而在抑制体重增加方面, E_2 组在第8、9周体重显著低于sham组($P < 0.01$);在阻止骨矿和骨有机质流失方面, E_2 组的Mg、Ca水平显著低于CPCC的中、高剂量组,Cu水平与sham组无差异,而CPCC(中、低剂量)则显著高于sham组。 E_2 组的Mn、Zn及羟脯氨酸水平显著低于sham组,而CPCC则可维持在sham组水平。对血液中BGP和StrACP水平升高的抑制作用, E_2 组与OVX组相比差异无显著性,CPCC组则可显著低于OVX组。抑制血钙水平下降时, E_2 组与OVX组相比差异无显著性,而CPCC组显著高于OVX组。**结论** 在改善去卵巢大鼠骨质方面,钙螯合胶原多肽比雌激素更为有效。

【关键词】 钙螯合胶原多肽; 17β -雌二醇; 去卵巢大鼠; 骨质疏松

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0258-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.005

Comparison of the ameliorating effect of collagen peptide chelated calcium and estrogen on the bone quality in ovariectomized rats

GAO Wen-wei¹, SHEN Yong-tao¹, CHENG Zhi-ling²,
HAN Ke-guang¹, HUO Nai-rui^{1*}

(1. College of Animal Science And Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
2. Shanxi Agricultural Technology Information Center, Taiyuan 030000)

【Abstract】 Objective To compare the ameliorating effect of collagen peptide chelated calcium (CPCC) and estrogen on the bone quality in ovariectomized rats in order to serve the development of safe drugs for prevention of osteoporosis (OP). **Methods** Bilateral ovariectomized rats were divided into ovariectomized group (OVX), sham group, 17β -estradiol injection group (OVX + E_2) and CPCC gavage group (OVX + CPCC). Bone and serum indices of these groups were assessed and compared at 9 weeks after treatment. **Results** Bone density of the OVX group was significantly lower than the sham group ($P < 0.01$), indicating that the rat OP model was successfully established. Like estrogen, CPCC inhibited the abnormal changes of all indices and maintain similar levels with those of the sham group ($P > 0.05$), while the body weight gain of the E_2 group at weeks 8 and 9 was significantly lower than those of the sham group ($P < 0.01$). As regarding the prevention of bone loss, the Mg and Ca levels of the E_2 group were significantly lower than those of the moderate and high dose CPCC groups. The Cu level was not significantly different compared with the sham group, while those in the moderate and low dose CPCC groups were significantly higher than the sham group. The Mn, Zn and hydroxyproline levels of

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:31201347);山西省回国留学人员项目(编号:2014-042)。

【作者简介】 高文伟(1970—),女,副教授,研究方向:动物疾病诊断与防治。Email: sxndgaowenwei@163.com

【通讯作者】 霍乃蕊(1972—),女,教授,研究方向:兽医公共卫生与食品安全。Email: tgnrhuo@163.com

the E₂ group were significantly lower than those of the sham group, while the CPCC group maintained levels similar to that of the sham group. In regarding to the inhibiting effect on the increased blood BGP and StrACP, the E₂ group was still maintained at levels similar to that of the OVX group, while those of the CPCC group were significantly lower than the OVX group. As regarding the decreased blood Ca, the E₂ group was not significantly different with that of the OVX group, while that of the CPCC group was significantly higher than the OVX group. **Conclusions** CPCC is more effective than estrogen in ameliorating the bone quality of ovariectomized rats.

[Key words] Collagen peptide chelated calcium; 17 β -estradiol; Osteoporosis; Ovariectomized rats

Corresponding author: HUO Nai-rui. E-mail: tgnrhuo@163.com

骨质疏松(osteoporosis, OP)逐渐成为一个世界性公众健康问题^[1]。我国的 OP 发病率逐年增加,其中 80% 患者为绝经后女性。研究绝经后 OP 最常用的造模方法是双侧卵巢去势法,该法可较好地模拟绝经后 OP 的病理生理状态,造模成功率高、具有稳定性和重复性^[2]。人们利用去卵巢大鼠模型筛选出了许多治疗绝经后 OP 的有效药物,包括雌激素、雌激素受体调节剂、双磷酸盐、降钙素、合成类固醇^[3]。其中,雌激素替代疗法临床上最常用,但雌激素增加了患子宫内膜癌的风险,并容易引起中风和脑血栓,其使用风险远远高于人们所预想^[4]。因此安全、有效、无毒副作用、可长期使用的 OP 防治药物的开发具有尤为迫切的现实意义。骨质疏松的发生与低钙摄入有关^[5],而钙质缺乏是全球性问题,从膳食结构分析,我国尤为严重^[6],肽钙螯合物可直接被肠道黏膜吸收,不会被胃酸和碱性物质破坏,也不会受到食物中植酸、草酸的影响,其生物利用度高、吸收快,是钙制剂发展和研究的方向。课题组前期研究结果证明了骨胶原肽和钙螯合胶原多肽对雌激素缺乏引起的 OP 的有效防治作用^[7-8]。

本研究以分子量小于 1000 的胶原肽制备钙螯合胶原多肽(collagen peptide chelated calcium, CPCC),探讨其对骨质疏松大鼠的骨质改善作用,并将其效果同雌激素比较,为以后安全、高效的补钙制剂和骨质疏松防治药物的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用 10 周龄雌性清洁级雌性未孕 SD 大鼠 48 只,体重(203 $\pm$ 20)g,由山西医科大学动物实验中心【SCXK(晋)2015-0001】提供,适应性饲喂 2 周后,切除双侧卵巢。大鼠饲养于山西农业大学动物医学国家级实验教学示范中心动物房内,无菌手术在该中心动物医院【晋太谷动诊证[2014]第 01 号】完成,术后伤口用碘伏每日消毒一次,康复 1 周后,

分组试验。研究期内保持大鼠环境温度为(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,日照 12 h,黑夜 12 h,控制其他环境条件使其符合国家标准 GB14923-2001,饲喂啮齿类动物标准颗粒饲料(山西医科大学动物实验中心提供)和自由饮水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

研究分为 6 组,每组 8 只。假手术组(sham)不切除卵巢,只切除卵巢附近等重量的脂肪;模型组(OVX)切除卵巢;雌激素组(E₂)切除卵巢后皮下注射 17 β -雌二醇(0.08 mg/mL),注射剂量为 1 mL/(0.1 kg $\cdot$ d);CPCC 组切除卵巢后按 10 mL/(kg $\cdot$ d)的剂量进行灌胃,先用蒸馏水将 CPCC 配成 500、300、100 mg/mL 的溶液,分别灌胃给高、中、低剂量组。饲养结束后,用乙醚麻醉大鼠,摘除眼球采血,脱颈处死,采集各组织样本。本实验所有操作均按照中华人民共和国《实验动物管理条例》规范执行。

1.2 主要试剂与仪器

血清钙、血清磷、碱性磷酸酶(AKP)、抗酒石酸性磷酸酶(StrACP)、骨钙素(BGP)、羟脯氨酸测试盒购自南京建成生物工程研究所;17 β -雌二醇购自北京索莱宝科技有限公司。

原子吸收光谱仪(北京东西分析仪器有限公司);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices);SX-12-10 型箱式电阻炉(上海实验电炉厂)等。

1.3 肽钙螯合物的制备

羊骨胶原肽由内蒙古锡盟肽好生物制品有限责任公司生产;以干基计,蛋白 98.78%,分子量 $\leq$ 1000 Da 的肽占 90.78%,羟脯氨酸 6.89%。螯合工艺为胶原短肽浓度 89.28 mg/mL,钙源为 CaCl₂,肽钙质量比 2:1,pH 8.1,40 $^{\circ}$ C 反应 30 min,加入 8 倍体积乙醇进行沉淀(乙醇质量分数>95%,静置 3 h),8000 r/min 离心 10 min,沉淀再经真空冷冻干燥(-26 $^{\circ}$ C 预冻,工作压力 90~100 Pa,升华温度 45~55 $^{\circ}$ C)制得钙螯合胶原多肽(CPCC),经测定其中短肽含量为 68.16%,钙含量为 10.01%,水分 6.44%。

1.4 指标测定

1.4.1 体重和子宫指数

每周定期对大鼠进行称重一次,直至第 9 周实验结束。大鼠处死后,取子宫,去除周围结缔组织并立即称重,计算子宫指数。

1.4.2 股骨长度、直径、骨干重和骨密度的测定

用游标卡尺测量左侧股骨的长度与直径;然后在 60℃ 烘箱中烘干至恒重(10 h),测骨干重。按 M/V 计算骨密度,体积用排水法测定。

1.4.3 骨矿物质和羟脯氨酸含量的测定

准确称取风干至恒重的粉末状大鼠股骨于瓷坩埚中,放入马弗炉 300℃ 预灰化 1 h,温度调至 550℃ 灰化 3 h,关掉电阻炉,待温度降至 110℃ 以下,取出坩埚,样品灰白色即可,若有黑色,则加 1~2 滴硝酸继续消化 1 h,直至出现白色结晶。将灰分用 2 mL 盐酸(1:5)溶解,在坩埚中再加入 18 mL 去离子水,混匀,测定铜、锰、锌含量。从处理好的铜待测液中取 4 mL,用去离子水定容至 50 mL,测定镁含量。取定容好的镁待测液 10 mL,加 5% 氯化锶溶液 0.2 mL,然后用原子吸收光谱仪进行钙含量的测定。羟脯氨酸含量的测定按照羟脯氨酸测试盒说明书操作。

1.4.4 血液生化指标

大鼠宰杀前,断食 12 h,眼球取血,收集血样进行离心(3000 r/min,10 min),分装血清,置 -20℃ 保存。血清碱性磷酸酶(AKP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(StrACP)活性、血清骨钙素(BGP)、血清钙(Ca)、血清磷(P)含量的测定按试剂盒说明书操作。

1.4.5 统计方法

所有实验数据用平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,运用 Statistix 8.1 软件对各试验组数据进行方差分析。分别以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 作为差异显著和差异极显著的标准。

2 结果

2.1 大鼠体重的变化

由表 1 可知,在前 2 周,各组大鼠体重差异无显著性,从第 3 周开始,OVX 组体重显著高于 sham 组,且从第 6 周开始达到极显著水平($P < 0.01$)。整个试验期内,除低剂量组在第 4 周外,各剂量组的体重始终与 sham 组差异无显著性($P > 0.05$)。而 E₂ 组,在第 3 周极显著高于 sham 组,在第 8、9 周却又极显著低于 sham 组。

表 1 17β-雌二醇和钙整合胶原多肽对去卵巢大鼠体重增加的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 Inhibition role of 17β-estradiol and collagen peptide chelated calcium on the body weight gain of ovariectomized rats						
周数 Weeks	假手术组 Sham	去卵巢组 OVX	雌激素组 E ₂	高剂量组 High dose	中剂量组 Moderate dose	低剂量组 Low dose
1	198.15 ± 7.66 ^A	207.65 ± 39.93 ^A	216.39 ± 9.26 ^A	204.58 ± 19.94 ^A	207.00 ± 21.00 ^A	203.56 ± 28.58 ^A
2	200.55 ± 9.47	210.53 ± 33.39	212.29 ± 15.25	207.20 ± 25.13	207.00 ± 21.00	214.76 ± 19.78
3	208.46 ± 11.30 ^{Cb}	236.02 ± 32.41 ^{AB ab}	245.68 ± 17.71 ^{Aa}	227.76 ± 25.61 ^{ABCab}	229.85 ± 25.64 ^{ABCab}	217.61 ± 35.76 ^{BCab}
4	215.45 ± 14.93 ^C	249.2 ± 27.47 ^A	220.84 ± 22.98 ^{BC}	234.15 ± 27.10 ^{ABC}	232.31 ± 24.18 ^{ABC}	244.90 ± 16.92 ^{AB}
5	230.04 ± 11.35 ^B	261.60 ± 28.50 ^A	231.73 ± 29.61 ^B	229.22 ± 10.73 ^{AB}	233.89 ± 23.18 ^{AB}	253.25 ± 3.69 ^{AB}
6	234.88 ± 27.82 ^{BCbc}	274.67 ± 25.48 ^{Aa}	225.62 ± 19.19 ^{Cc}	248.22 ± 17.95 ^{ABCab}	246.67 ± 23.84 ^{ABCabc}	263.24 ± 18.16 ^{ABa}
7	242.98 ± 16.37 ^{Bb}	277.87 ± 24.55 ^{Aa}	230.55 ± 19.00 ^{Bb}	240.68 ± 18.51 ^{Bb}	236.75 ± 23.73 ^{Bb}	252.58 ± 13.97 ^{ABab}
8	234.54 ± 15.0 ^{Bbc}	271.13 ± 23.18 ^{Aa}	218.68 ± 15.28 ^{Cc}	237.87 ± 19.83 ^{Bbc}	237.52 ± 14.16 ^{Bbc}	241.90 ± 21.09 ^{Bb}
9	247.86 ± 18.35 ^{Bb}	284.26 ± 26.81 ^{Aa}	212.46 ± 25.30 ^{Cc}	240.71 ± 24.56 ^{Bbc}	241.90 ± 21.09 ^{Bbc}	249.76 ± 20.45 ^{Bab}

注:大写字母 ABCD 表示列内数据在 $P < 0.05$ 水平处比较;小写字母 abcd 表示在 $P < 0.01$ 水平处比较。标有相同字母表示差异无显著性,不同字母表示差异有显著性。下表和下图同。

Note. Uppercase letters A B C D and lowercase letters a b c d represent significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively. The same letter means non-significant and different letter means significant difference. The following tables and figures are the same.

2.2 左侧股骨物理指标的测定

由表 2 可知,卵巢摘除对大鼠股骨的长度、直径和湿重没有显著影响,但低剂量组的长度和雌激素组的直径显著低于其他各组($P < 0.05$)。卵巢摘除可引起干重和骨密度极显著降低($P < 0.01$)。各剂量组均未使干重回复到假手术组水平。中、高剂量组和 E₂ 组的骨密度差异无显著性,均显著高于 OVX 组,且与 Sham 组差异无显著性。

2.3 骨矿物质含量

由表 3 可知,与 sham 组相比,OVX 组股骨中的 Cu、Mn、Zn、Mg 水平均显著下降。E₂ 组可使 Cu 水平上升至 sham 组水平,而中、低剂量组则显著高于 sham 组。E₂ 组的 Mn 虽有升高,但仍显著低于 sham 组,而中、低剂量组则上升至 sham 组水平。除 E₂ 组外,各剂量组 Zn 水平均回复至 sham 组水平。E₂ 组的 Mg 水平虽然也恢复至正常水平,但其数值显著

低于中、高剂量组。对于 Ca, OVX 组含量最低, E₂ 组的 Ca 水平虽有上升, 但显著低于中、高剂量组, 中剂量组甚至显著高于假手术组 ($P < 0.05$)。所以整体上讲, 卵巢摘除可引起大鼠股骨中的骨矿物质流失, 雌激素和钙螯合胶原多肽可阻止这种流失, 钙螯合胶原多肽效果优于雌激素。

表 2 各组大鼠左侧股骨各种物理指标的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Determination results of various physical indexes of the left femurs of rats in each group					
组别 Groups	长度/mm Length	直径/mm Diameter	湿重/g Wet weight	干重/g Dry weight	骨密度/g/cm ³ Bone density
SHAM	33.31 ± 1.5 ^{ABa}	3.060 ± 0.043 ^{ABa}	0.7832 ± 0.058 ^A	0.5636 ± 0.012 ^{Aa}	2.283 ± 0.47 ^{Aa}
OVX	32.91 ± 0.98 ^{Aa}	3.093 ± 0.042 ^{ABa}	0.7604 ± 0.024 ^A	0.5035 ± 0.048 ^{BCb}	1.767 ± 0.031 ^{Cb}
E ₂	33.57 ± 0.20 ^{ABab}	2.987 ± 0.13 ^{Cb}	0.7624 ± 0.025 ^A	0.5257 ± 0.012 ^{Bab}	2.144 ± 0.24 ^{ABab}
高剂量 High dose	32.87 ± 0.87 ^{BCab}	3.032 ± 0.083 ^{Ba}	0.7741 ± 0.069 ^A	0.4883 ± 0.0069 ^{Cb}	2.074 ± 0.18 ^{ABab}
中剂量 Moderate dose	33.40 ± 1.00 ^{ABab}	3.120 ± 0.16 ^{ABa}	0.7773 ± 0.049 ^A	0.5160 ± 0.032 ^{BCab}	2.246 ± 0.098 ^{Aa}
低剂量 Low dose	32.06 ± 0.73 ^{Cb}	3.140 ± 0.22 ^{Aa}	0.7430 ± 0.034 ^A	0.4975 ± 0.015 ^{BCb}	1.914 ± 0.11 ^{BCab}

表 3 各组大鼠股骨中的矿物元素含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 3 Mineral content of the femurs of rats in each group					
组别 Groups	Cu/μg/g	Mn/μg/g	Zn/μg/g	Ca/mg/g	Mg/mg/g
SHAM	2.27 ± 0.10 ^{Bbc}	1.94 ± 0.29 ^A	33.78 ± 0.43 ^{ABabc}	12.59 ± 2.78 ^{BCab}	0.49 ± 0.098 ^{ABab}
OVX	1.94 ± 0.038 ^{Cc}	1.47 ± 0.24 ^C	30.48 ± 1.48 ^{Cc}	9.73 ± 0.14 ^{Cb}	0.37 ± 0.012 ^{Cb}
E ₂	2.11 ± 0.19 ^{BCc}	1.59 ± 0.14 ^{BC}	30.45 ± 0.99 ^{Cc}	11.04 ± 1.31 ^{Cab}	0.43 ± 0.050 ^{BCab}
高剂量 High dose	1.87 ± 0.04 ^{Cc}	1.58 ± 0.0019 ^{BC}	35.28 ± 1.88 ^{Aab}	15.71 ± 0.93 ^{ABa}	0.59 ± 0.035 ^{Aa}
中剂量 Moderate dose	2.85 ± 0.055 ^{Aa}	2.12 ± 0.28 ^{AB}	36.45 ± 0.86 ^{Aa}	15.92 ± 0.056 ^{Aa}	0.60 ± 0.023 ^{Aa}
低剂量 Low dose	2.63 ± 0.2 ^{Aab}	2.11 ± 0.41 ^{ABC}	31.48 ± 0.14 ^{BCbc}	12.01 ± 0.63 ^{Cab}	0.46 ± 0.031 ^{BCab}

2.4 骨羟脯氨酸含量

经测定和统计学分析, sham 组 (2.258 ± 0.22^{Aa}) 与 OVX 组 (1.922 ± 0.12^{Cb}) 大鼠股骨中的羟脯氨酸含量差异有显著性 ($P < 0.01$), E₂ 组 (2.061 ± 0.090^{BCab}) 虽有所提高, 但仍与 OVX 组差异无显著性, 而 CPCC 的高 (2.092 ± 0.094^B)、中 (2.110 ± 0.12^{AB})、低 (2.095 ± 0.18) 各剂量组均显著高于 OVX 组, 且中剂量组与 sham 组差异无显著性。可见在防止骨质有机质流失方面, 钙螯合胶原多肽效果优于雌激素。

2.5 子宫的重量及形态变化

雌激素的水平和变化对于子宫的形态和功能起着至关重要的作用。人体内, 子宫随雌激素水平的增高而保持饱满, 随雌激素水平的下降, 子宫开始萎缩, 甚至可缩小到拇指般大, 因而子宫的形态和功能也可以反映体内雌激素的水平。

由图 1 可以看出, 切卵巢组的子宫系数极显著低于假手术组 ($P < 0.01$), 和雌激素一样, CPCC 的各剂量组均可使子宫系数恢复到正常水平, 表明 CPCC 对大鼠有雌激素样作用。在形态上 (图 2), sham 组大鼠的子宫形态饱满, 子宫角粗大且颜色红润; 切卵巢组大鼠子宫明显萎缩、色泽泛白; 17β-雌二醇组子宫异常膨大, 颜色泛黄, 内有黄色粘液。而 CPCC 组子宫颜色比假手术组红润, 形态饱满。

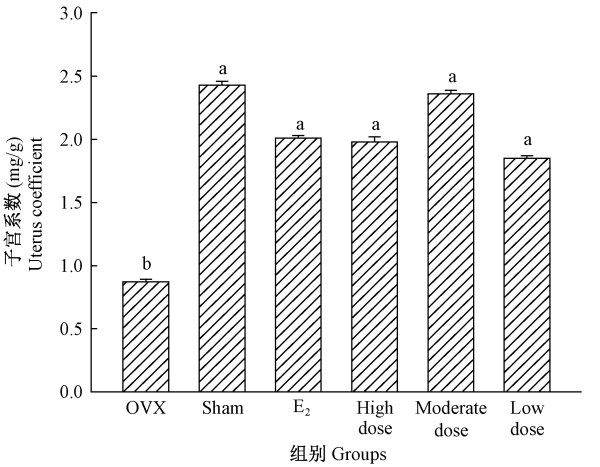


图 1 卵巢摘除后雌激素和钙螯合胶原多肽对子宫系数的影响

Fig. 1 Effect of estrogen and collagen peptide chelated calcium on the uterine coefficient of ovariectomized rats

2.6 血碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶、骨钙素活力的测定

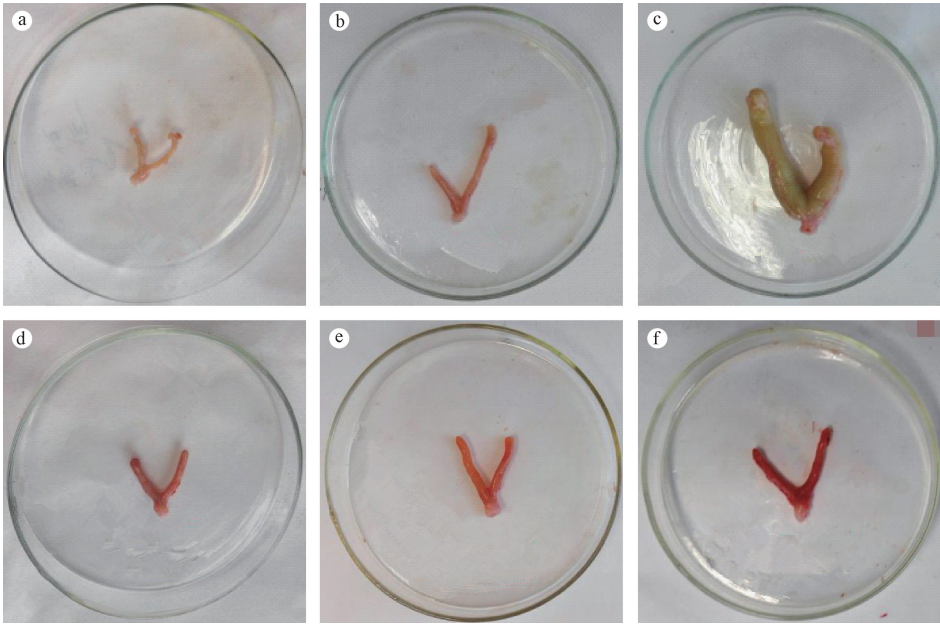
血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 是由成骨细胞合成并释放的评价骨形成和骨转换的一个重要骨代谢指标^[9]。高骨转换率的骨质疏松时, AKP 由肝和骨释入血清, 使其含量增高。血中的抗酒石酸酸性磷酸酶 (StrACP) 主要来源于破骨细胞。切卵巢以后, 内源性雌激素分泌减

少,骨吸收大于骨形成,血清 StrACP 显著增高,所以 StrACP 可作为原发性骨质疏松症的诊断治疗监测指标^[10]。

骨钙素 (bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP) 是由成骨细胞分泌的一种活性多肽,在调节骨钙代谢中起着重要作用,其较

AKP 更灵敏,特异性更高,所以 BGP 可作为新的检测指标。

制作骨钙素标准曲线(图略),求得 $A_{450}(Y)$ 与骨钙素浓度 (X) 之间的回归方程为 $Y = 0.014X + 0.11574 (R^2 = 0.9902)$,将测得的 A 值代入方程式,计算各组的骨钙素浓度。



注:a. 模型组; b. 假手术组; c. 雌激素组; d. 高剂量 CPCC 组; e. 中剂量 CPCC 组; f. 低剂量 CPCC 组。

图 2 各组大鼠子宫形态

Note. a. OVX; b. sham; c. E₂; d. High dose CPCC; e. Moderate dose CPCC; f. low dose CPCC.

Fig. 2 Gross appearance of the uterine of rats in each group

表 4 血清 AKP、StrACP 和 BGP 水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 4 Results of serum level of AKP, StrACP and BGP in the rats

组别 Groups	AKP 金氏单位 U/100 mL	StrACP U/L	BGP pg/mL
SHAM	18.38 ± 1.93 ^{Bb}	40.08 ± 4.11 ^{Bb}	156.57 ± 7.40 ^{Bab}
OVX	23.71 ± 0.57 ^{Aa}	49.17 ± 3.55 ^{Aa}	168.53 ± 1.54 ^{Aa}
E ₂	18.54 ± 2.74 ^{Bb}	40.25 ± 6.9 ^{ABab}	159.63 ± 4.76 ^{ABab}
高剂量组 High dose	18.45 ± 0.88 ^{Bb}	35.81 ± 5.83 ^{Bab}	151.46 ± 7.63 ^{Bb}
中剂量组 Moderate dose	18.11 ± 1.57 ^{Bb}	32.07 ± 3.21 ^{Bb}	149.76 ± 9.69 ^{Bb}
低剂量组 Low dose	18.86 ± 0.89 ^{Bb}	33.3 ± 0.54 ^{Bb}	158.27 ± 2.73 ^{ABab}

与假手术组相比,切卵巢组大鼠 AKP ($P < 0.01$)、BGP ($P < 0.05$) 以及 StrACP 水平均显著升高。说明雌激素缺乏,骨质疏松发生时,骨转换加快,破骨作用增强,引起代成骨细胞代偿性分化,即骨形成与骨吸收功能均增强,骨代谢处于高转换状态^[9]。而雌激素组和钙螯合胶原多肽组均可使其降低至与假手术组无显著差异的水平。但雌激素组

的 BGP 和 StrACP 水平仍与切卵巢组差异无显著性,而各剂量组的 StrACP 水平,中高剂量组的 BGP 水平则显著或极显著低于 OVX 组。

2.7 血清中钙、磷含量的测定

与骨矿化有关的生化指标主要为血钙和血磷。钙是生物体内含量最多的离子,磷含量仅次于钙,其中约 70% ~ 80% 沉积于骨骼^[11]。

表 5 各组大鼠血钙、血磷水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 5 Levels of Ca and P in the rat serum of each group

组别 Groups	Ca mmol/L	P mmol/L	钙磷比 Ca/P ratio
SHAM	2. 593 ± 0. 093 ^{Aab}	3. 107 ± 0. 13 ^{AB}	0. 8346 ^{BCbc}
OVX	2. 504 ± 0. 025 ^{Bb}	2. 994 ± 0. 090 ^{AB}	0. 8363 ^{BCabc}
E ₂	2. 547 ± 0. 048 ^{ABab}	2. 991 ± 0. 032 ^B	0. 8516 ^{ABab}
高剂量组 High dose group	2. 614 ± 0. 018 ^{Aab}	3. 048 ± 0. 13 ^{AB}	0. 8576 ^{Aab}
中剂量组 Moderate dose group	2. 622 ± 0. 0084 ^{Aa}	3. 159 ± 0. 060 ^A	0. 8300 ^{Cc}
低剂量组 Low dose group	2. 620 ± 0. 011 ^{aAa}	3. 054 ± 0. 027 ^{AB}	0. 8579 ^{Aa}

由表 5 可知,切除卵巢可显著降低血钙水平($P < 0.05$),E2 组和 CPCC 组均可使其回升到假手术组水平,但 E2 组仍与 OVX 组差异无显著性,而各剂量组的血钙水平则显著高于 OVX 组。

除中剂量组的血磷水平显著高于雌激素组外,其余各组大鼠的血磷水平差异无显著性,但切除卵巢也使血液中的血磷水平有所下降,各剂量组在数值上均比雌激素组高。

钙磷的比值在 0.831 ~ 0.875 之间,属于正常范围,说明 CPCC 不会影响血液中的钙磷平衡^[12]。可见切除卵巢主要影响血钙水平,而对血磷和钙磷比无显著影响。

3 讨论

骨质疏松症是一种复杂的,由营养、环境、生活方式、遗传、免疫、激素调控等多种因素引起的以骨量减少,骨微观结构退化,脆性增加以及易于发生骨折为特征的一种非特异性骨代谢障碍疾病^[12,13]。在中年期,骨吸收大于骨形成,骨量持续丢失,妇女在绝经后的 5 ~ 15 年由于雌激素分泌停止,骨量减少尤为突出^[12]。包括美国在内的许多国家,骨质疏松已达到了流行的比例^[14]。雌激素替代疗法可有效防治绝经后骨质疏松,但其副作用日益受到人们的关注。

与假手术组相比,切除卵巢后大鼠的股骨密度极显著降低,说明骨质疏松造模成功。除骨密度降低外,骨质疏松发生时,大鼠的体重显著增加,韩天雨等^[9]的研究结果也表明去除卵巢 3 周后,OVX 组的体重便显著增加,但达到极显著水平在第 12 周,本研究则在第 6 周。骨质疏松发生时,去卵巢大鼠的子宫发生严重萎缩,该结果与戴哲浩等^[15]的研究结果一致。本研究测定结果还表明骨质疏松引起大鼠股骨中的 Cu、Mn、Zn、Ca、Mg 等骨矿物质流失,且反应胶原含量的羟脯氨酸的含量也显著下降;血 Ca 也水平显著下降,血液中的 AKP、BGP、以及 StrACP

水平均显著升高。刘昊等^[16]的研究在证实雌性大鼠卵巢切除后 20 周发生明显的骨量丢失、微观结构退变和生物力学性能下降。韩天雨^[9]、于志锋^[17]等对去卵巢大鼠的血清 ALP 水平进行动态监测的研究结果表明,ALP 水平的升高发生在骨质疏松的前期,24 周下降至最低水平,此后便保持水平恒定。以上研究提示在骨质疏松发生的前期,骨转换加快,破骨分化加剧,代偿性地引起成骨分化加剧,骨骼中的 ALP 释放到血液导致血清 ALP 显著上升,在骨质疏松发生的后期,ALP 较前期又显著下降,说明大鼠骨骼的成骨分化减弱,已产生大规模的骨量丢失,骨质疏松症完全形成^[17]。本研究指标测定时切除卵巢后 10 周,说明尽管骨质疏松发生了,ALP 水平仍很高,但仍然处于前期阶段。

大鼠切除双侧卵巢后,注射 17β - 雌二醇或灌胃所制备的钙整合胶原多肽,结果表明钙整合胶原多肽具有雌激素样作用,实验结束时使上述各指标与假手术组相比差异无显著性,即和雌激素具有一样的效果,可抑制体重增加和子宫萎缩,可扭转上述其他各种指标的升高或降低。

与雌激素组相比,钙整合胶原多肽对骨质疏松的防治效果更好。在抑制体重增加方面,钙整合胶原多肽与假手术组在整个实验期间差异无显著性,而雌激素组在第 8 周和第 9 周体重极显著低于 Sham 组。雌激素组的股骨直径显著低于其他各组。在阻止骨矿物质流失方面,雌激素组可使 Cu 水平上升至假手术组水平,而整合物的中、低剂量组则显著高于假手术组。雌激素组的 Mn、Zn 水平仍显著低于假手术组,而整合物则可使其上升至假手术组水平。雌激素组的 Mg、Ca 水平虽然也恢复至正常水平,但其数值显著低于中、高剂量组。雌激素组的股骨中的羟脯氨酸含量仍未回到正常水平,而钙整合胶原多肽的中剂量组则可。雌激素组外周血中的 BGP 和 StrACP 水平仍与切卵巢组差异无显著性,而各剂量组的 StrACP 水平,中高剂量组的 BGP

水平则显著或极显著低于 OVX 组。

雌激素还可引起子宫的极度膨大,内部黏液增加,颜色灰变等病理变化,郭盖等^[18]的研究结果也表明雌激素具有使 OVX 大鼠子宫重量和子宫直径显著增加的副作用,所以综上所述,钙螯合胶原多肽比雌激素更有效,更安全。

参 考 文 献

- [1] International Osteoporosis Foundation. Osteoporosis facts and statistics. (2015). [OL]. <https://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics/index.html> 11-5-2013
- [2] 王运林,匡德宣,马朝霞,等. 去卵巢法骨质疏松树鼯模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 562-566.
- [3] Nishida A, Ito M, Uetani M, et al. Effects of etidronate on three-dimensional trabecular structure in ovariectomized or sciatic neuretomized rats [J]. J Bone Miner Metab. 2004, 22: 335-340.
- [4] Rossouw J, Anderson G, Prentice R, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial [J]. JAMA, 2002, 288(3):321-333.
- [5] Nicklas TA. Calcium intake trends and health consequences from childhood through adulthood [J]. J Am Coll Nutr, 2003, 22(5): 340-356.
- [6] 田惠光,张兵. 保健食品实用指南 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002, 19-25.
- [7] 霍乃蕊,马俪珍,忻欣,等. SBEF-Ca 对骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J],中国实验动物学报,2010, 18(3): 216-220.
- [8] 霍乃蕊,马俪珍,甄润英,沈钧,张子悦. 羊骨胶原肽对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用 [J]. 营养学报,2009,31(3): 234-237.
- [9] 韩天雨,卜淑敏. 去卵巢大鼠血清和骨髓细胞碱性磷酸酶水平变化的动态观察 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 37-40.
- [10] 曾芳馨,熊中云. 抗酒石酸酸性磷酸酶与骨代谢 [J]. 华西医学, 2005, 20(3): 545.
- [11] 张杰. 骨素精粉的制备及其补钙效果的研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2011.
- [12] Ilich JZ, Kerstetter JE. Nutrition in bone health revisited: A story beyond calcium [J]. J Am Coll Nutr. 2000, 19(6):715-737.
- [13] Jabbar S, Drury J, Fordham JN, et al. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Pathol, 2011, 64: 354-357.
- [14] Looker AC, Orwoll ES, Johnston Jr CC, et al. Prevalence of low femoral bone density in older U. S. adults from NHANES III [J]. J Bone Miner Res, 1997, 12: 1761-1768.
- [15] 戴哲浩. 糖皮质激素、降钙素对雌性去卵巢大鼠骨强度影响的实验研究 [D]. 湖南: 中南大学, 2010.
- [16] 刘昊,张岩,张国彬,等. 辛伐他汀不同干预方案对骨质疏松大鼠骨质量的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 43-47.
- [17] 于志锋,顾淑珠,高建军,等. 去势大鼠血清 ALP 动态及骨髓细胞骨形成相关基因表达研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2): 152-154.
- [18] 郭盖,卜淑敏,韩天雨. 不同干预方法对去卵巢骨质疏松大鼠子宫 GSK-3 β 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 53-58.

[收稿日期] 2016-10-13