文章编号:1000-5404(2007)11-1039-03

论著

新型异黄酮类化合物对去势大鼠股骨生物力学性能影响的实验研究

陈秀明[1],艾国平[2],粟永萍[2],张丽龙[2],陈 诚[1],常 青[1],陈卫军[3] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科;[2]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,烧伤、创伤与复合伤国家重点实验室,[3]基础医学部人体解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨改构后的异黄酮类化合物 F11 对去势大鼠股骨生物力学性能的影响。**方法** 采用去卵巢大鼠模型,分为造模组、假手术组(sham 组)及不同浓度的 F11 组(低、中、高 F11 组),腹腔注射每日 1 次连续用药 10 周后活杀大鼠,取股骨测量生物力学参数和进行股骨组织形态学观察,评价 F11 对去势大鼠股骨生物力学性能的影响。**结果** F11 组大鼠股骨的最大载荷、挠度载荷、弹性模量等指标与造模组比较有显著提高($P<0.05$);骨组织形态学结果显示去势大鼠股骨骺端骨质排列疏松、骨小梁排列紊乱,稀疏;高、中、低剂量 F11 组大鼠股骨骺端骨质排列整齐,骨小梁排列整齐。**结论** 经改构后的新型异黄酮类化合物 F11 可能提高去势大鼠股骨抵抗外力冲击的能力和骨韧性,降低骨折发生的危险性。

关键词:F11;骨质疏松;生物力学;骨组织形态学

中图法分类号:R322.71;R336;R977.12 **文献标识码**:A

Effect of a novel isoflavone compound on femoral biomechanics of ovarectomied rats

CHEN Xiu-ming[1], AI Guo-ping[2], SU Yong-ping[2], ZHANG Li-long[2], CHEN Cheng[1], CHANG Qing[1], CHEN Wei-jun[3] ([1] Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital; [2] State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, [3] Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of a novel isoflavone compound, F11, on femoral biomechanics of ovarectomied rats. **Methods** The ovarectomied rat models were randomly assigned to five groups: control, sham operation, and three experimental groups in which F11 of different concentrations were intraperitoneally injected once a day for ten weeks. Ten weeks later, all rats were killed and the left femurs harvested to determine the bony biomechanic and histology. **Results** The maximal load, flexibility load, and elastic modulus in F11 groups were remarkably enhanced as compared with sham operation group and control group. Osteoporosis at the epiphysis, trabecular alignment derangement and sparseness were seen in ovarectomied rats, but the changes were substantially mild in F11 groups. **Conclusion** F11 can enhance the ability of the femur to resist the impact of external force in ovarectomied rats, improve bony tenacity, and as a result will reduce the dangers of bone fracture.

Key words: F11; osteoporosis; biomechanics; bone tissue morphology

大豆异黄酮是广泛存在于植物中,尤其是在豆类中的一组多酚类的化合物中具有雌激素样活性,对改善绝经期妇女的雌激素水平、降低血脂、软化保护心血管及抗骨质疏松等有一定作用,但因其雌激素活性仅为雌二醇的 1% ~1‰,故又称异黄酮为植物雌激素。我们前期实验中以异黄酮为母体在结构中的不同部位以哌嗪基、甲氧基等基团引入、取代或置换改构合成了 20 余种异黄酮类化合物,通过离体细胞平台筛选到 1 种对肿瘤细胞具有较好抑制作用,同时对正常的子宫内膜细胞又无明显促增殖作用的新型异黄酮化合物,暂命名为 F11。本实验以去势大鼠为动物模型,观察不同浓度的 F11 对去势大鼠股骨生物力学性能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley 大鼠 33 只,雌性,3 月龄,体质量(200 ± 10)g,清洁级,由本校实验动物中心提供。

1.2 实验制剂

F11 由四川大学华西医学部药学院化学合成教研室提供。RGT-5A 微机控制电子万能试验机(深圳市瑞格尔仪器有限公

基金项目:重庆市院士基金(2004BC5006)
Supported by the Academician Foundation of Chongqing(2004BC5006)

作者简介:陈秀明(1966-),女,河北省沧州市人,硕士研究生,医师,主要从事激素替代方面的研究。电话:13062372197, E-mail:xgz090206@163.com

通讯作者:常 青,电话(023)68765399,E-mail:CQLi99@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-12-20;修回日期:2007-02-07

司)。Leica RM2016 石蜡切片(德国)。

1.3 实验造模

SD 大鼠购回后在动物室内适应喂养 1 周。各组大鼠自由摄食进水,1 周后进行去势造模。除 sham 组只切除卵巢旁一小块脂肪组织外,其余各组均切除双侧卵巢。具体操作如下:各大鼠称体质量记录,1% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后俯卧固定,鼠背部皮肤去毛碘伏消毒,取双肾下极与髂棘间正中纵切口,长 1 cm,切开皮肤,分离筋膜,分别从两侧腹部进入腹腔,在一小团脂肪组织中找到卵巢,尽量保留子宫,切除卵巢或其旁少许脂肪组织。术毕逐层缝合,消毒切口,放回饲养笼中待其自然苏醒。所有鼠术后均自由取食和饮水。

1.4 实验分组

造模后 1 周采用完全随机方法将动物分为:①造模组:生理盐水 2 ml/d;② F11 高、中、低 3 个剂量组:分别为 150、50、15 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$;③假手术组(sham 组):生理盐水 2 ml/d。其中 F11 各剂量组 7 只,其余各组 6 只。腹腔注射每日 1 次连续用药 10 周后,股动脉放血处死取样,采集双侧股骨,去除表面软组织,湿生理盐水纱布包裹 -20 ℃冰箱保存备用。

1.5 股骨生物力学测试

在电子万能试验机上进行 3 点弯曲实验和抗压实验,实验温度 25 ℃,湿度 26%,加载点在股骨中段,跨距 35 mm,加载速度 10 mm/min,定挠度为 0.1 mm,压缩比高度 50%,实验条件全部通过计算机控制,实验过程计算机自动描记载荷-变形曲线,并根据选择的测量指标和输入的每个股骨不同的截面积运算出各指标参数。测得弹性模量、最大载荷、挠度强度、弯曲强度、挠度载荷、抗压强度、屈服强度等。

1.6 骨组织形态学观察

大鼠股骨经脱水脱钙包埋、Leica 机切片,组织切片厚度为 5 μm,HE 染色观察其形态学改变(×400)。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠股骨结构力学检测结果

从表 1 可以看出,造模组股骨的最大载荷明显降低,sham 组最大载荷最大,F11 可以增加股骨的最大载荷量,但与造模组比较无显著性差异($P>0.05$)。F11 各组的弹性载荷增加与造模组比较差异显著($P<0.05$),与 sham 组比较无显著性差异($P>0.05$)。造模组股骨的挠度强度明显降低,F11 各组挠度增加与造模组比较有显著性差异($P<0.05$)。F11 组高剂量组可以明显增加股骨的弯曲强度,与造模组比较有显著性差异($P<0.05$),而 F11 中低剂量可改善股骨的弯曲强度,可能 F11 作用与剂量相关(表 1)。

表 1 不同处理因素对大鼠股骨抗弯力学性能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	最大载荷(N)	弹性载荷(N)	挠度强度(MPa)	弯曲强度(MPa)
造模组	39.19 ± 6.57	0.45 ± 0.72	3.44 ± 4.35	51.83 ± 9.58
Sham 组	115.48 ± 24.39[a]	22.61 ± 1.26[a]	159.98 ± 53.98[a]	124.59 ± 37.32
F11-15 组	42.14 ± 8.60	32.02 ± 2.30[a]	66.75 ± 17.83[a]	84.69 ± 12.33
F11-50 组	57.57 ± 9.56	31.36 ± 0.71[a]	71.62 ± 26.54[a]	98.55 ± 23.45
F11-150 组	62.14 ± 4.65	28.48 ± 8.70[a]	68.38 ± 32.63[a]	300.99 ± 8.21[a]

a: $P<0.05$, 与造模组比较

2.2 大鼠股骨材料力学检测结果

从表 2 可以看出,造模组在弹性模量、定压缩强度、屈服强度及抗压强度方面均显示造模组增高,与 sham 组及 F11 各组比较有显著性差异($P<0.05$, 表 2)。

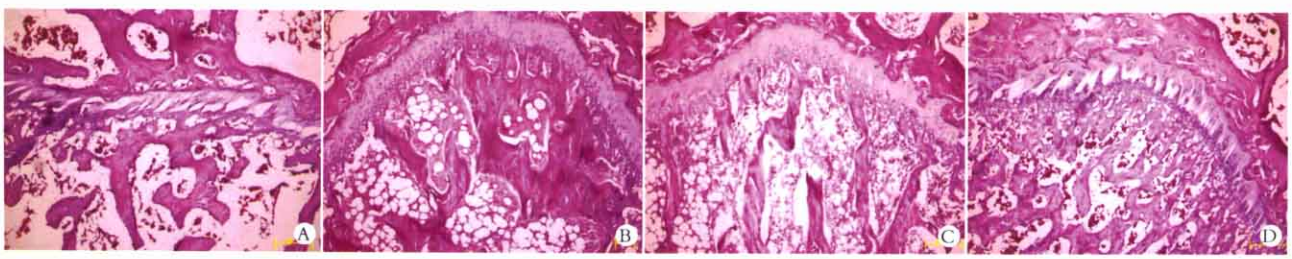
表 2 不同处理因素对大鼠股骨抗压力学性能的影响(MPa, $\bar{x} \pm s$)

组别	弹性模量	定压缩强度	抗压强度	屈服强度
造模组	1 202.17 ± 291.59	37.48 ± 1.41	37.39 ± 3.07	37.23 ± 4.66
Sham 组	766.67 ± 77.12[a]	13.92 ± 0.81[a]	28.45 ± 7.04[a]	22.60 ± 4.95[a]
F11-15 组	365.66 ± 100.45[a]	10.66 ± 2.99[a]	16.77 ± 2.72[a]	16.75 ± 2.94[a]
F11-50 组	671.79 ± 18.44[ab]	3.17 ± 1.80[a]	20.51 ± 2.30[a]	14.50 ± 6.20[ab]
F11-150 组	310.63 ± 216.66[a]	7.90 ± 1.33[a]	15.27 ± 1.36[a]	12.07 ± 3.17[a]

a: $P<0.05$, 与造模组比较; b: $P<0.05$, 与 sham 组比较

2.3 HE 染色组织学观察结果

从骨组织形态学结果看,造模组可见骨小梁明显减少、变细,甚至部分小梁中断而逐渐被吸收;拱桥形结构变薄,骨小梁间隙明显增大,骨髓腔增大。骨小梁表面成骨细胞及破骨细胞均可见增生活跃,从卵圆形变为狭长卵圆形或长梭形,三维网架结构被破坏(图 1A);F11 各组(图 1B、C、D)骨小梁间隙正常,骨小梁的拱桥形结构呈圆形、卵圆形或梭形,细胞排列整齐,大小较均匀,骨小梁较粗大,骨小梁连接点较多,可见较多的成骨细胞排列在骨小梁表面;骨组织形态学改变接近,骨组织板层样结构整齐,细胞排列整齐,大小均匀,骨小梁的拱桥形结构呈圆形、卵圆形或梭形,各细胞排列更加整齐。



A: 造模组; B: F11-15 组; C: F11-50 组; D: F11-150 组

图 1 各大鼠股骨组织形态学观察 (HE ×400)

3　讨论

处于围绝经期和绝经期的妇女，由于卵巢功能的衰退，体内雌激素水平迅速降低，使得对降钙素敏感性降低，从而使骨代谢呈负平衡，骨吸收大于骨形成，骨量逐步丧失，形成高转换型骨质疏松[1]。雌激素替代治疗（estrogen replacement therapy，ERT）的应用可以降低骨质疏松症所致的骨折发生率的 25% ~50%，明显提高绝经期妇女的生活质量和延长寿命。但长期应用雌激素后易产生高血凝状态、高血压、水肿等副反应，并促进乳腺、子宫内膜增生，增加乳腺癌及子宫内膜癌的发病危险性。大豆异黄酮是一种植物雌激素，具有弱的植物雌激素样作用，其显示雌激素活性或抗雌激素活性主要取决于受试对象本身的激素代谢状态。对高雌激素水平者显示抗雌激素活性，对低雌激素水平者，显示雌激素活性[2,3]。去势大鼠由于体内缺乏雌激素，大豆异黄酮主要表现为雌激素活性，抑制破骨细胞数量和活性，抑制骨吸收[4]，其主要与 β 型雌激素受体（ERβ）结合。有研究显示合成植物雌激素可明显提高十二指肠钙的吸收，表现出钙吸收活性的一面[5]。因此我们前期以异黄酮为母体进行结构修饰合成 F11，发现 F11 不但具有较好的抑制肿瘤生长作用，同时对子宫内膜细胞无明显增殖作用[6]。本实验通过去势大鼠模型，发现给予不同剂量的 F11 后可能影响去势大鼠股骨生物力学性能。

骨量减少和骨组织结构改变都直接地影响骨的生物力学性能，使骨的生物力学强度降低。骨的生物力学检测概念是从工程力学借用过来的，其中结构力学与标本的形状及粗细有关，包括最大载荷和挠度强度等指标，其大小反映骨骼在外力负荷作用下的可塑性；骨的材料力学主要反映骨的内在质量，与大小尺寸无关[7]，包括弹性模量和屈服强度等指标，主要反映骨的脆性，如弹性模量越大则刚性越强，脆性越大。由实验可以看出造模组股骨可塑性降低，脆性增加，说明当雌激素下降时，增强的骨转换导致松质骨丢失较早且严重[8]；同时我们在单纯的造模组还可以看到大鼠股骨的部分结构力学性能参数和材料力学性能参数都显著改变，表明去势大鼠骨拮抗变性和抗破坏能力下降，且骨的硬度和韧性发生改变，发生了骨质疏松。而我们合成的 F11 不但具有雌激素样作用，还可以通过拮抗内源性雌激素不足而增加骨密度[9]，拮抗去除卵巢大鼠的骨量丢失，具有抗骨质疏松的作用。虽然 F11 组个别指标与造模组无显著差异，分析可能是与 F11 应用时间不够或与大鼠月龄有关。

有关异黄酮对绝经后骨质疏松症的疗效与机制研究，国内外已开展了大量的工作；动物实验也已证实异黄酮对切除卵巢大鼠骨量有很好的保护作用，并能明显改善其结构和力学特性。细胞学研究也进一步证实，异黄酮可能通过多种机制促进骨形成，抑制骨吸收。本实验以大鼠摘除卵巢后 1 周开始连续用药 10 周活杀大鼠，其骨组织形态学检测显示合成异黄酮类化合物 F11 能有效减少骨量的丢失，增强骨小梁密度，可维持骨吸收和骨形成的动态平衡，减少骨折的发生率，表明其具有良好的防治骨质疏松症的应用前景。可能由于 F11 雌活性较弱，加之骨骼生长周期较长，我们仅观察了 10 周，时间还远远不够，还应进一步延长其观察周期，并对其抗骨质疏松的机制进行研究。

参考文献：

[1] Lane N E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(Suppl 2): 3 -11.

[2] Branca F, Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens[J]. Forum Nutr, 2005, (57): 100 -111.

[3] Morin S. Isoflavones and bone health[J]. Menopause, 2004, 11(3): 239 -241.

[4] Omoni A O, Aluko R E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action[J]. Nutr Rev, 2005, 63(8): 272 -283.

[5] Arjmandi B H, Khalil D A, Hollis B W. Ipriflavone, a synthetic phytoestrogen, enhances intestinal calcium transport *in vitro*[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67(3): 225 -229.

[6] 杨峥嵘，程天民，粟永萍，等. Genistein 对人乳腺癌抑瘤效应及造血辐射防护作用的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志，2002，24(6)：548.

[7] 秦　岭，梁国穗. 骨生物力学在防止骨质疏松药物开发中的应用基础(一)[J]. 中国骨质疏松杂志，2000，6(1)：23 -25，68.

[8] 许碧连，吴　铁，崔　燎，等. 大鼠去卵巢后对不同部位骨骼的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学，2004，9(10)：1175 -1178.

[9] Erlandsson M C, Islander U, Moverare S, *et al*. Estrogenic agonism and antagonism of the soy isoflavone genistein in uterus, bone and lymphopoiesis in mice[J]. APMIS, 2005, 113(5): 317 -323.

（编辑　王　红）