论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409076

雌马酚对去卵巢后大鼠骨质疏松症的影响

吴 彬[1],张 勇[1],陈明亮[1],吴 瑛[1],倪向敏[1],周 永[1],王 建[2],糜漫天[1] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院营养科[2])

[摘要] **目的** 观察雌马酚对去卵巢后大鼠骨质疏松症的作用。**方法** 雌性SD大鼠去卵巢以建立骨质疏松症模型。健康3月龄雌性SD大鼠分为5组:假手术组(sham)、去卵巢组(ovarietomized, OVX)、OVX + 雌马酚高剂量组[equol, Eq,0.5 mg/(kg · d)]、OVX + 雌马酚低剂量组[equol, Eq, 0.25 mg/(kg · d)]、OVX + 雌二醇阳性对照组(estradiol, E2)。去卵巢8周后,按以上分组继续给药8周后取右侧股骨检测骨密度(bone mineral density, BMD),眼部取血检测血钙、血磷和骨钙素(bone gla protein, BGP)含量;ELISA检测血清雌激素(estrogen,ES)、成骨细胞护骨素(osteoprotegerin, OPG),破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand,RANKL)水平;qRT-PCR法检测OPG和RANKL mRNA的表达。**结果** OVX组与sham组比较,ES值、BMD和血钙水平显著下降($P < 0.05$),分别为sham组的78.1%、84.4%和83.2%。同时,OVX组大鼠血磷和BGP含量明显升高($P < 0.05$),表明去卵巢后骨质疏松症模型造模成功;OVX组大鼠与sham组比较,OPG蛋白和OPG mRNA表达量显著下降,RANKL蛋白和RANKL mRNA表达量明显升高($P < 0.05$),而Eq和E2组处理后能显著增加OPG蛋白和OPG mRNA表达,下调RANKL蛋白和RANKL mRNA表达,同时提高OVX大鼠的BMD和血钙水平,降低血磷和BGP含量($P < 0.05$)。**结论** 雌马酚能有效改善去卵巢后大鼠骨质疏松症,可能与其能上调OPG而抑制RANKL分泌有关。

[关键词] 去卵巢后骨质疏松症;雌马酚;雌激素水平

[中图法分类号] R681.05 ;R711.51 ;R977.12 [文献标志码] A

Equol improves osteoporosis in ovarietomized rats

Wu Bin[1], Zhang Yong[1], Chen Mingliang[1], Wu Ying[1], Ni Xiangmin[1], Zhou Yong[1], Wang Jian[2], Mi Mantian[1] ([1]Department of Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Center of Medical Nutrition, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Nutrition, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of equol (Eq) on osteoporosis in ovarietomized rats. **Methods** Ovariectomized female SD rats were employed to establish a model of osteoporosis. Three-month-old healthy female SD rats were randomly divided into 5 groups, that is, sham-operation group (sham), ovariectomized group (OVX), OVX and high-dose of Eq [0.5 mg/(kg · d)] group, OVX and low-dose of Eq [0.25 mg/(kg · d)] group, OVX + estradiol (E2) positive control group. In 8 weeks after ovariectomization, all rats were treated as described above through intraperitoneal injection for another 8 weeks. The bone mineral density (BMD), blood calcium, phosphorus and osteocalcin content were detected. Moreover, the levels of serum estrogen (ES), osteoprotegerin (OPG), and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) were measured by ELISA. The expression of OPG and RANKL at mRNA level were determined by qRT-PCR. **Results** Compared with the sham group, the levels of ES, BMD and serum

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273058)

[通信作者] 王 建,E-mail: wangjian_1996@aliyun.com
糜漫天,E-mail: mi-mt2009@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1532.101.html(2014-12-03)

calcium were significantly decreased ($P<0.05$) in the OVX group, respectively, which were 78.1%, 84.4% and 83.2% of sham group, respectively. Meanwhile, the levels of serum phosphorus and bone gla protein (BGP) in OVX group were notably increased ($P<0.05$) compared to the sham group, indicating the osteoporosis model was successful. Eq and E2 markedly induced the mRNA and protein expression of OPG and inhibited RANKL protein and mRNA expression, and thereby, enhanced the levels of BMD and serum calcium, and reduced the content of serum phosphorus and BGP in OVX rats ($P<0.05$). **Conclusion** Eq could improve osteoporosis in ovariectomized rats possibly through enhancing OPG secretion and inhibiting RANKL secretion.

[**Key words**] postmenopausal osteoporosis; equol; estrogen

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81273058). Corresponding author: Wang Jian, E-mail: wangjian_1996@aliyun.com; Mi Mantian, E-mail: mi-mt2009@hotmail.com

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是绝经后女性的常见疾病之一,严重危害女性健康。研究证实,雌激素减少引起破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)和成骨细胞护骨素(osteoprotegerin, OPG)分泌失衡,进而导致骨转换增加是PMOP的主要病因[1]。雌激素替代疗法已成为临床上PMOP治疗的首选方案[2]。新近研究发现该治疗方案会显著增加患者罹患乳腺癌和心脑血管疾病等的风险[3]。因而,发现一种能够模拟雌激素作用而又能避免其副作用的治疗手段至关重要。研究表明,通过膳食途径补充植物雌激素类化合物是预防PMOP的新思路[4]。大豆异黄酮(soybean isoflavones, SI)是一类典型的植物雌激素,其分子结构类似雌激素,在机体中能与雌激素受体结合,具有雌激素样作用而无雌激素的副作用。流行病学研究表明,SI能显著降低绝经后妇女心血管疾病、骨质疏松症及激素依赖性肿瘤等疾病的发病风险[5]。进一步研究发现,SI的临床有效性与其肠道代谢产生雌马酚(equol, Eq)密切相关[6]。Eq是SI体内代谢终产物之一,其结构和生物活性均与雌激素非常相似,并在机体内最为稳定,排泄缓慢[7],比其前体物大豆苷元具有更强的生理活性。研究已经证实,女性能够产生高剂量雌马酚者患乳腺癌的风险显著低于产生低剂量雌马酚者[8]。然而,关于Eq对PMOP的作用,国内外研究甚少。本研究拟通过体内实验,切除雌性大鼠卵巢以建立PMOP模型,而后用雌马酚干预,以明确雌马酚对去卵巢后大鼠骨质疏松症的作用,并进一步检测雌马酚对RANKL和OPG分泌的影响,探讨雌马酚对PMOP可能的潜在作用机制。研究结果对于进一步揭示Eq的健康保护效应及机制有重要意义,同时将为PMOP的临床药物开发提供新的策略和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级健康3月龄雌性SD大鼠55只,体质量200~300 g(由第三军医大学实验动物中心提供),大鼠在实验动物中心饲养,室温25 ℃,相对湿度50%~60%,明暗周期12 h,自由饮水和进食。基础饲料由第三军医大学实验动物中心提供(不含大豆成分)。

1.2 主要试剂及模型建立

按照李菲等[9]的方法,切除大鼠卵巢建立骨质疏松症模型。具体方法如下:水合氯醛合剂(第三军医大学西南医院)按照大鼠体质量比例进行注射麻醉,用酒精进行皮肤消毒后,用已灭菌手术刀沿后正中线切开皮肤,切口1.5~2 cm。找到肾脏后下方的脂肪团,将卵巢轻柔提出,结扎双侧卵巢的输卵管、血管,并切除卵巢;假手术组切除卵巢旁边的脂肪。假手术组共9只、去卵巢手术组46只。8周后,假手术组存活9只,去卵巢组存活41只。利用简单随机化的方法随机选取6只去OVX组大鼠处死,利用Lunar Prodigy骨密度仪(第三军医大学大坪医院骨质疏松专科)检测大鼠骨密度,ELISA(R&D美国进口分装)试剂盒检测其雌激素水平,验证模型建立成功。而后将去卵巢组分为4组,每组9只,并按照如下分组进行干预:假手术组(sham组,$n=9$)、去卵巢模型组(OVX组,$n=9$)、OVX+雌马酚高剂量组[Eq 0.5 mg/(kg·d)组,$n=9$]、OVX+雌马酚低剂量组[Eq 0.25 mg/(kg·d)组,$n=9$],OVX+雌二醇阳性对照组(E2组,$n=9$)。sham组和OVX组给予等体积生理盐水,8周后终止干预,各组大鼠均全部存活。Eq(上海大赛璐药物手性技术有限公司,s-Eq,纯度>98%),E2(美国Sigma公司),分别进行腹腔注射并观察大鼠状态和体质量。

1.3 sham组和OVX组形态学检测

去卵巢手术完成后,用4%多聚甲醛固定两组大鼠左侧股骨,取股骨远端1/3处干骺端矢状切面,15% EDTA脱钙处理,石蜡包埋,HE染色,光镜观察。

1.4 骨密度的测定

给药8周后,乙醚麻醉,眼球取血集中处死大鼠,取右侧股骨用Lunar Prodigy双能X射线骨密度测量

仪检测骨股干骺端BMD。

1.5 血钙、血磷、骨钙素的测定

连续给药8周后，乙醚麻醉并集体处死大鼠后眼部取血，静止2 h后离心20 min(2 000～3 000 r/min)收集血清，将血清送到第三军医大学新桥医院检验科，检测血钙、血磷和骨钙素的含量。

1.6 血清雌激素水平的测定

给药8周后，眼球内眦取血，静止2 h，离心20 min(2 000～3 000 r/min)放入4 ℃冰箱，用ELISA试剂盒检测血清ES水平。

1.7 ELISA检测血清中OPG、RANKL分泌含量

给药8周处死大鼠后，眼部取血保存血清，静止2 h后，离心。用ELISA试剂盒测定血清中OPG、RANKL的含量。

1.8 qRT-PCR检测骨髓细胞OPG和RANKL mRNA表达水平

用TRIzol法提取各组大鼠骨髓细胞的RNA，并测其浓度。引物和内参(上海赛百盛基因技术有限公司)设计，GAPDH内参(上游：5′-CCATGTTTGTGATGGGTGTG-3′，下游5′-GGATGCAGGGATGAT-GTTCT-3′，产物长度20 bp)；OPG(上游：5′-TGTTCTGGTGGACAGTTTGC-3′，下游：5′-GCTGGAAAGTTTGCTCTTGC-3′，产物长度20 bp)；RANKL(上游5′-GCTCACCTCACCATCAATGCT-3′，下游：5′-GGTACCAAGAGGACAGACTGACTTTA-3′，产物长度26 bp)按照逆转录试剂盒说明书逆转生成cDNA，PCR反应扩增目的基因。

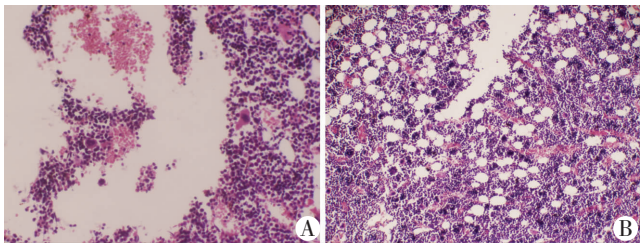
1.9 统计学处理

本研究应用SPSS 13.0统计软件对数据进行单因素方差分析，结果用$\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 sham组和OVX组股骨形态学变化

sham组骨小梁宽而密，股骨干骺骨小梁丰富，而OVX组股骨干骺端骨小梁稀疏，髓腔相对扩大，部分区域小梁消失，说明骨质疏松形成(图1)。



A：sham组；B：OVX组

图1 倒置显微镜观察各组大鼠股骨形态学变化 (HE×100)

2.2 各组大鼠BMD的变化

OVX组大鼠BMD显著低于sham组，而Eq干预后能显著增加OVX大鼠BMD($P<0.05$)；并且可以看出Eq高剂量组的BMD与E2组BMD相似，均接近sham组($P<0.05$，表1)。

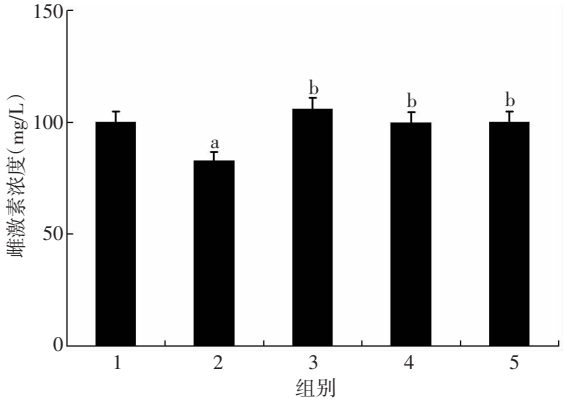
表1 各组大鼠股骨干骺端BMD变化(g/cm^2，$n=5$)

组别	骨股干骺端BMD
sham组	0.166 4±0.005 6
OVX组	0.141 4±0.002 0[a]
OVX+Eq高剂量组	0.180 4±0.003 8[b]
OVX+Eq低剂量组	0.167 0±0.002 8[b]
OVX+E2组	0.167 6±0.001 9[b]

a：$P<0.05$，与sham组比较；b：$P<0.05$，与OVX组比较

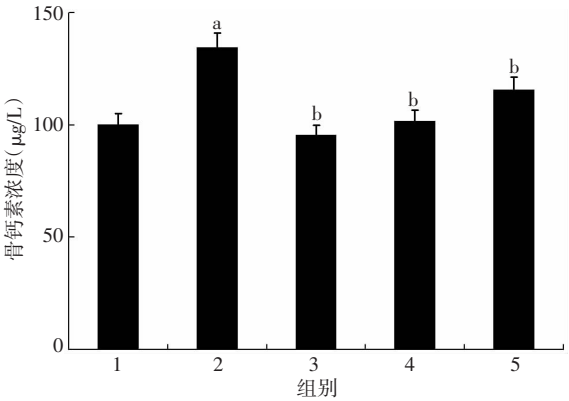
2.3 各组大鼠BGP、血清ES、血钙和血磷指标变化

OVX组与sham组比较，ES值和血钙水平显著下降($P<0.05$)，同时OVX组大鼠血磷和BGP含量明显升高，表明骨质疏松症模型造模成功；而Eq处理后能显著提高OVX大鼠的雌激素和血钙水平，降低血磷和骨钙素含量($P<0.05$)，且与E2组具有相似的作用效果(图2～4)。



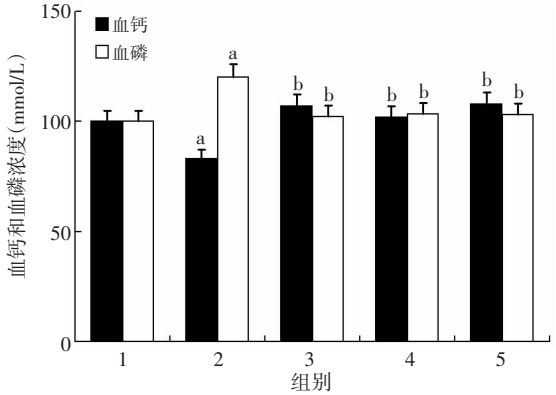
1：sham组；2：OVX组；3：OVX+Eq(0.5 mg/kg)组；4：OVX+Eq(0.25 mg/kg)组；5：E2组 a：$P<0.05$，与sham组比较；b：$P<0.05$，与OVX组比较

图2 ELISA检测各组大鼠血清雌激素水平



1：sham组；2：OVX组；3：OVX+Eq(0.5 mg/kg)组；4：OVX+Eq(0.25 mg/kg)组；5：E2组 a：$P<0.05$，与sham组比较；b：$P<0.05$，与OVX组比较

图3 ELISA检测各组大鼠血清骨钙素值

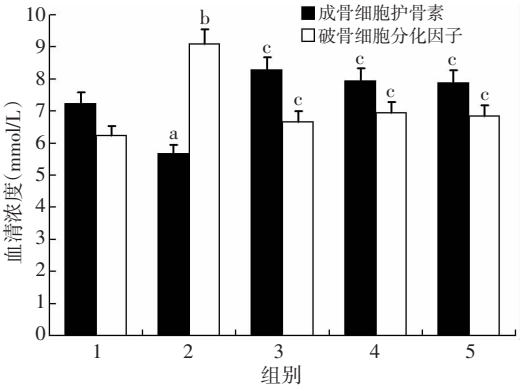


1：sham 组；2：OVX 组；3：OVX + Eq(0.5 mg/kg)组；4：OVX + Eq(0.25 mg/kg)组；5：E2 组　a：$P<0.05$，与 sham 组比较；b：$P<0.05$，与 OVX 组比较

图 4　ELISA 检测各组大鼠血钙和血磷值

2.4　大鼠血清中 OPG、RANKL 分泌水平变化

如图 5 所示，OVX 组大鼠与 sham 组比较，血清 OPG 分泌水平显著下降，而 RANKL 分泌水平明显上调；Eq 处理后能显著增加 OVX 大鼠 OPG 的分泌，同时下调 RANKL 的水平，且与 ES 作用效果相当（$P<0.05$）。



1：sham 组；2：OVX 组；3：OVX + Eq(0.5 mg/kg)组；4：OVX + Eq(0.25 mg/kg)组；5：E2 组　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 sham 组比较；c：$P<0.05$，与 OVX 组比较

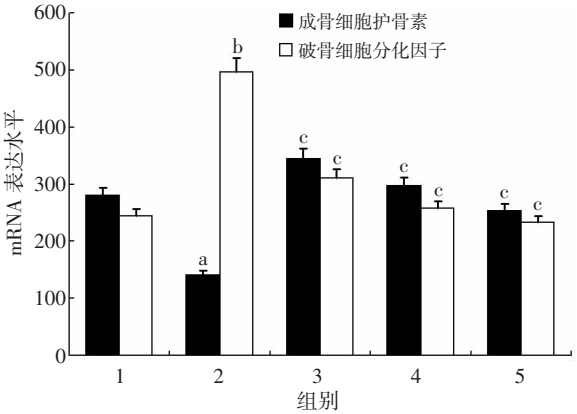
图 5　ELISA 检测各组大鼠血清 OPG、RANKL 分泌水平

2.5　OPG、RANKL mRNA 表达水平的变化

如图 6 所示，OVX 组大鼠与 sham 组比较，OPG mRNA 表达水平显著下降而 RANKL mRNA 表达水平明显上调；Eq 处理后能显著增加 OVX 大鼠 OPG mRNA 表达水平，同时下调 RANKL mRNA 表达水平，且与 ES 作用效果相当（$P<0.05$）。

3　讨论

PMOP 是由于体内卵巢功能降低，雌激素减少，骨偶联过程失衡，骨吸收超过骨形成，从而导致净骨量减少，骨脆性增加，骨强度降低而引起的一种疾病，是绝经后女性骨痛、骨折的主要原因之一[10]。流行病学研



1：sham 组；2：OVX 组；3：OVX + Eq(0.5 mg/kg)组；4：OVX + Eq(0.25 mg/kg)组；5：E2 组　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 sham 组比较；c：$P<0.05$，与 OVX 组比较

图 6　qRT-PCR 检测各组大鼠股骨骨髓细胞 OPG、RANKL mRNA 表达水平

究表明，摄入较多 SI 的女性得骨质疏松症的风险较低，与骨密度呈正相关[11]。最近 10 项 Meta 分析中明确得出了 SI 干预可以显著减少绝经后妇女的骨损失的结论[12]。研究证实 SI 的健康生物学效应与其肠道代谢产生 Eq 密切相关。Eq 是 SI 的终产物之一，具有比 SI 更稳定更强的类雌激素的作用，可显著降低绝经后妇女罹患乳腺癌的风险[13]。本课题组前期实验发现：Eq 干预能显著增加体外培养大鼠成骨细胞增殖作用，再用雌激素受体拮抗剂干预后该作用受到明显抑制；人群干预试验发现：SI 大豆蛋白干预 6 个月后对绝经后妇女骨密度具有显著地改善作用，且代谢表型 EP^+（产生 Eq）者的效果明显优于 EP^-（不能产生 Eq）者（$P<0.05$）[14]。

本实验通过切除雌性大鼠双侧卵巢建立去卵巢后骨质疏松症大鼠模型。OVX 8 周后，大鼠血清 ES 水平明显下降，骨转换增强，骨代谢活跃，骨吸收大于骨形成，并通过 HE 染色的观察，该模型很好地模拟了妇女绝经后骨丢失的症状[15]。Eq 干预后能显著改善大鼠 ES 水平，与 E2 阳性对照组的效果相当，原因可能在于 SI 和 Eq 作为天然植物雌激素，结构上与 E2 极为相似，能选择性与内源性雌激素受体结合而发挥类雌激素样的作用。BMD 检测是预测绝经后骨丢失的灵敏指标之一，是判定骨质疏松症的“金标准”[16]。本实验中，OVX 组股骨骺端的 BMD 与 sham 组比较明显下降，OVX + Eq 组与 OVX 组比较，BMD 显著增高（$P<0.05$），这表明 Eq 可以显著减少去卵巢大鼠的骨丢失。同时，BGP 是反映成骨细胞功能活性，骨形成和骨转化状况的敏感指标。OVX 组大鼠 BGP 明显高于 sham 组，表明去卵巢后大鼠破骨细胞功能显著增强而成骨细胞功能明显减弱，大鼠处于高骨转化状

态[17]；而 Eq 处理后能显著降低 OVX 大鼠 BGP 的水平，提示 Eq 可刺激成骨细胞活性，促进骨的形成与修复，抑制破骨细胞的溶骨作用，以减少骨吸收，抑制骨的高转换状态，从而使骨量增加。

大鼠去卵巢后，RANKL 含量持续上升，而 OPG 含量逐渐下降，RANKL 与 OPG 之间失衡，从而导致大鼠骨形成与骨吸收之间失衡。而 ES 可以上调血清骨保护素的基因表达和蛋白合成[18]。本研究通过构建大鼠体内骨质疏松症模型，模拟了妇女绝经后骨丢失的症状；以 SI 的代谢活性终产物 Eq 为干预因素，发现 Eq 处理后大鼠 OPG 的表达显著增加，而 RANKL 的表达明显降低，这说明 Eq 可能通过维持 RANKL 与 OPG 之间的平衡，实现其对 PMOP 的保护作用，并且作用效果与 E2 相当。经相关性分析发现，Eq 对 PMOP 的改善作用与其调节 OPG 和 RANKL 分泌显著相关（$P < 0.05$）。这些结果表明，Eq 具有显著的类雌激素样作用，可能通过调节 RANKL 与 OPG 的表达，而改善 PMOP。

综上所述，本研究证实了 Eq 具有显著的类雌激素样作用，能明显改善 PMOP，这一作用可能与其能调节 RANKL/OPG 表达有关。与既往研究相比，本研究的创新性主要在于在前期研究的基础上，以 SI 的代谢活性终产物 Eq 而不是 SI 作为研究对象，利用动物实验模型，为 Eq 对 PMOP 的作用提供了直接证据；同时，探讨了 RANKL/OPG 在 Eq 改善 PMOP 中的可能作用。然而，本研究没有特异性地干预 RANKL 或 OPG 的表达，以观察 Eq 对去卵巢后大鼠骨质疏松症的作用；因而，Eq 对 PMOP 的具体分子机制尚不能明确。在后续研究中，我们将利用特异抑制剂或抗体，抑制 RANKL 或 OPG 的作用后，进一步明确 Eq 对 PMOP 保护作用机制。本研究的结果对于进一步揭示 Eq 的健康保护效应及机制有重要意义，对于探索 PMOP 临床防治的新策略具有潜在的应用价值。

参考文献：

[1] de-Matos O, Lopes-da-Silva D J, Martinez-de-Oliveira J, *et al*. Effect of specific exercise training on bone mineral density in women with postmenopausal osteopenia or osteoporosis[J]. Gynecol Endocrinol, 2009, 25(9): 616 - 620.

[2] Al-Anazi A F, Qureshi V F, Javaid K, *et al*. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview [J]. J Nat Sci Biol Med, 2011, 2(2): 154 - 163.

[3] Hoang-Kim A, Gelsomini L, Luciani D, *et al*. Fracture healing and drug therapies in osteoporosis[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2009, 6(2): 136 - 143.

[4] Cauley J A, Robbins J, Chen Z, *et al*. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial[J]. JAMA, 2003, 290(13): 1729 - 1738.

[5] Vitale D C, Piazza C, Melilli B, *et al*. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokine, 2013, 38(1): 15 - 25.

[6] Kolios L, Sehmisch S, Daub F, *et al*. Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats[J]. Planta Med, 2009, 75(5): 459 - 465.

[7] Setchell K D, Brown N M, Summer S, *et al*. Dietary factors influence production of the soy isoflavone metabolite s-(-)equol in healthy adults[J]. J Nutr, 2013, 143(12): 1950 - 1958.

[8] Dong J Y, Qin L Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 125(2): 315 - 323.

[9] 李菲，赵锦程，郭玉琴，等. 骨金散对去卵巢大鼠骨密度，雌激素水平的影响[J]. 黑龙江医药科学，2011，34(3)：6 - 7.

[10] Malairungsakul O, Wiwatanadate P. Factors related to osteoporosis of postmenopausal women in Phayao, Thailand[J]. Arch Osteoporos, 2013, 8(1/2): 154.

[11] Levis S, Strickman-Stein N, Ganjei-Azar P, *et al*. Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms: a randomized, double-blind trial [J]. Arch Intern Med, 2011, 171(15): 1363 - 1369.

[12] Ma D F, Qin L Q, Wang P Y, *et al*. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clin Nutr, 2008, 27(1): 57 - 64.

[13] Wang B, Mi M, Wang J, *et al*. Does the increase of endogenous steroid hormone levels also affect breast cancer risk in Chinese women? A case-control study in Chongqing, China [J]. Int J Cancer, 2009, 124(8): 1892 - 1899.

[14] 王建，徐静，王斌，等. 绝经后妇女膳食结构与骨质疏松症发生的相关性研究[J]. 第三军医大学学报，2011，33(22)：2397 - 2401.

[15] Smith S Y, Jolette J, Turner C H. Skeletal health: primate model of postmenopausal osteoporosis[J]. Am J Primatol, 2009, 71(9): 752 - 765.

[16] Corina M, Vulpoi C, Branisteanu D. Relationship between bone mineral density, weight, and estrogen levels in pre and postmenopausal women[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011, 116(4): 946 - 950.

[17] 谢煜，姚珍薇，杨帆. 雌激素和维生素 K 抗去势成年雌性大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志：电子版，2009，5(3)：226 - 231.

[18] Jabbar S, Drury J, Fordham J N, *et al*. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Pathol, 2011, 64(4): 354 - 357.

（收稿：2014-09-11；修回：2014-10-14）

（编辑　吴培红）