

# 白藜芦醇对去卵巢骨质疏松大鼠血同型半胱氨酸和氧化应激指标的影响

王海敏 汤旭磊

**【摘要】 目的** 观察白藜芦醇对去卵巢骨质疏松大鼠血同型半胱氨酸(Hcy)和氧化应激指标的影响。**方法** 32 只 3 月龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,按随机数字表法分为 4 组:去卵巢组、乙烯雌酚组、白藜芦醇组和假手术组,每组 8 只。去卵巢组、乙烯雌酚组和白藜芦醇组大鼠行双侧卵巢切除术复制骨质疏松模型。术后 1 周开始灌胃给药,假手术组和去卵巢组大鼠给予蒸馏水(每日一次),其余两组大鼠分别予乙烯雌酚  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和白藜芦醇  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。治疗 10 周后,测定大鼠血浆总 Hcy (tHcy)、总抗氧化能力 (TAC)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和丙二醛水平,取 L<sub>5</sub> 椎体和右股骨进行骨密度测定。**结果** 与假手术组相比,去卵巢组血浆 tHcy 和丙二醛水平升高,TAC 和 GSH-Px 水平下降;与去卵巢组相比,乙烯雌酚组和白藜芦醇组血浆 tHcy 和丙二醛浓度均明显降低,TAC 和 GSH-Px 水平显著升高 ( $F = 19.709, 117.219, 7.020, 20.544, P$  均  $< 0.01$ );白藜芦醇组血浆丙二醛浓度较乙烯雌酚组升高 ( $F = 117.219, P < 0.01$ )。与假手术组相比,去卵巢组腰椎和股骨骨密度均明显降低;与去卵巢组相比,乙烯雌酚组腰椎和股骨骨密度明显升高,接近假手术组水平 ( $P > 0.05$ );白藜芦醇组腰椎和股骨骨密度升高,但仍低于乙烯雌酚组和假手术组 ( $F = 48.518, 43.263, P$  均  $< 0.01$ )。血浆 tHcy 与腰椎和股骨骨密度呈负相关 ( $r = -0.663, P < 0.001; r = -0.520, P = 0.002$ ), TAC 与股骨骨密度呈正相关 ( $r = 0.539, P = 0.001$ )。**结论** 高 Hcy 血症和氧化应激与去卵巢大鼠骨质疏松关系密切。白藜芦醇可能通过降低血浆 tHcy 水平和改善氧化应激,对去卵巢大鼠骨质疏松发挥保护作用。

**【关键词】** 白藜芦醇;骨质疏松;同型半胱氨酸;氧化应激

**Effects of resveratrol on plasma homocysteine and oxidative stress in ovariectomized osteoporotic rats** Wang Haimin, Tang Xulei. Department of Endocrinology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Tang Xulei, Email: xulei\_tang@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of resveratrol on plasma homocysteine and oxidative stress markers in ovariectomized (OVX) osteoporotic rats. **Methods** Thirty-two three-month-old female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups according to the random number table, which were OVX group, diethylstilbestrol group, resveratrol group and sham-operated group, with eight rats in each group. The osteoporotic models were established by bilateral ovariectomy in OVX group, diethylstilbestrol group and resveratrol group. Gastric gavage was started from one week after surgery. Rats in sham-operated group and OVX group were given distilled water once a day. Rats in the other two groups were given diethylstilbestrol ( $0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and resveratrol ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), respectively. After treatment for 10 weeks, levels of total homocysteine (tHcy), total antioxidant capacity (TAC), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) were measured. The 5th lumbar vertebrae and right femur were removed to determine bone mineral density (BMD). **Results** Compared with sham-operated group, plasma levels of tHcy and MDA were significantly increased, whereas levels of TAC and GSH-Px were remarkably decreased in OVX group. Compared with OVX group, plasma levels of tHcy and MDA were significantly decreased, but levels of TAC and GSH-Px were increased ( $F = 19.709, 117.219, 7.020, 20.544$ , all

$P < 0.01$ ) in diethylstilbestrol group and resveratrol group. Plasma level of MDA in resveratrol group was higher than that in diethylstilbestrol group ( $F = 117.219, P < 0.01$ ). Compared with sham-operated group, BMD of lumbar vertebrae and femur were decreased in OVX group. Compared with OVX group, BMD of lumbar vertebrae and femur were remarkably improved in diethylstilbestrol group, which were similar to sham-operated group ( $P > 0.05$ ). BMD of lumbar vertebrae and femur were remarkably increased in resveratrol group, but were still lower than those of diethylstilbestrol group and sham-operated group ( $F = 48.518, 43.263$ , all  $P < 0.01$ ). Plasma tHcy was negatively correlated with BMD of lumbar vertebrae and femur ( $r = -0.663, P < 0.001; r = -0.520, P = 0.002$ ). A positive correlation was observed between plasma TAC and BMD of femur ( $r = 0.539, P = 0.001$ ). **Conclusions** Hyperhomocysteinemia and oxidative stress are closely related to osteoporosis in OVX rats. Resveratrol may protect against osteoporosis by decreasing plasma level of tHcy and improving oxidative stress in OVX rats.

**【Key words】** Resveratrol; Osteoporosis; Homocysteine; Oxidative stress

绝经后骨质疏松是一种以雌激素缺乏为主要病因,以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征,导致脆性增加和易于骨折的代谢性骨病。据报道,绝经后雌激素缺乏与同型半胱氨酸(Hcy)代谢和氧化抗氧化失衡所致的氧化应激具有密切的联系<sup>[1-2]</sup>。白藜芦醇是一种结构类似雌激素乙炔雌酚的天然多酚类化合物,具有雌激素样的调节血脂、抗氧化和抗血小板聚集等多种重要生物学作用<sup>[3]</sup>。Schroeksnadel等<sup>[4]</sup>在体外培养人外周血单核细胞中发现,抗炎性复合物白藜芦醇抑制活化的单核细胞内 Hcy 的形成。但白藜芦醇对去卵巢大鼠血 Hcy 及氧化应激指标的影响尚未见系统报道。为此,本研究拟观察白藜芦醇对去卵巢大鼠骨质疏松模型血浆总 Hcy(tHcy)和氧化应激指标的影响,进一步探讨白藜芦醇抗骨质疏松的作用及机制,为开发抗骨质疏松药物提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组** 3 月龄清洁级(SPF)雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 32 只,体重( $200 \pm 20$ )g,由甘肃中医学院实验动物中心提供,使用许可证号为:SYXK(甘)2004-0006,批号:060510。SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按数字表法随机分成 4 组:假手术组,去卵巢组,乙炔雌酚组(乙炔雌酚  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),白藜芦醇组(白藜芦醇  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),每组 8 只。

**1.2 实验用仪器及试剂** 白藜芦醇由陕西华昌生物工程有限公司生产,纯度为 98.3%;己烯雌酚片剂由合肥久联制药有限公司生产,0.5 mg/片;tHcy ELISA 试剂盒由美国 USCN life science 技术公司生产,产品编号:E0772r;总抗氧化能力(TAC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛测定试剂盒由南京建成生物工程研究所生产;双能 X 线骨密度仪为

美国 LUNAR 公司产品。

**1.3 骨质疏松动物模型制备和干预措施** 各组大鼠在 SPF 环境下,以戊巴比妥钠  $40 \text{ mg/kg}$  体重腹腔注射麻醉后,于下腹部正中切口,切开皮肤、肌肉,进入腹腔,假手术组只切除卵巢周围的与其大小相似的一小脂肪团,保留双侧卵巢,其余 3 组大鼠切除双侧卵巢。所有大鼠在 SPF 环境下常规饲养,术后 1 周开始灌胃给药,白藜芦醇由溶媒、乙炔雌酚片剂由蒸馏水配成相应浓度的混悬液用于灌胃,假手术组和去卵巢组灌服蒸馏水,每天 1 次。每周称体重 1 次调整给药剂量,共给药 10 周。

**1.4 标本采集** 用药 10 周末,心脏采血,置于肝素抗凝管内,于 30 min 内  $3000 \text{ r/min}$  ( $r = 79.407 \text{ cm}$ ),离心 10 min,取上清,置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用;大鼠处死后,快速分离双侧股骨和  $L_5$  椎体,剔除周围附着的肌肉及结缔组织,去除椎体棘突和关节突,用生理盐水纱布包裹并作好标记,用于骨密度检测。

**1.5 血浆 tHcy 及氧化应激指标的测定** 血浆 tHcy 测定采用酶联免疫吸附法,血浆 TAC、GSH-Px 和丙二醛测定采用化学比色法。

**1.6 腰椎和股骨骨密度测定** 使用双能 X 线骨密度仪测定离体的腰椎和股骨骨密度( $\text{g/cm}^2$ ),扫描距离 0.1 mm。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较用 LSD 法检验,腰椎和股骨骨密度与血浆 tHcy 和 TAC 作直线相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血浆 tHcy 和氧化应激指标的变化** 与假手术

组相比,去卵巢组血浆 tHcy 和丙二醛水平明显升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ), TAC 和 GSH-Px 水平均显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ );与去卵巢组相比,乙烯雌酚组和白藜芦醇组血浆 tHcy 和丙二醛水平均明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ), TAC 和 GSH-Px 水平显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ );白藜芦醇组血浆丙二醛水平较乙烯雌酚组升高 ( $P < 0.01$ ),血浆 tHcy、TAC 和 GSH-Px 水平,两组间差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ),见表 1。

2.2 各组大鼠腰椎和股骨骨密度的变化 与假手术组相比,去卵巢组腰椎和股骨骨密度均明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ );与去卵巢组相比,乙烯雌酚组腰椎和股骨骨密度明显升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ),接近假手术组水平 ( $P > 0.05$ );白藜芦醇组腰椎和股骨骨密度升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ),但仍低于乙烯雌酚组和假手术组 ( $P$  均  $< 0.01$ ),见表 2。

2.3 血浆 tHcy、TAC 与腰椎和股骨骨密度的直线相关性 直线相关分析显示,血浆 tHcy 浓度与腰椎和股骨骨密度呈负相关 ( $r = -0.663, P < 0.001$ ;  $r = -0.520, P = 0.002$ );血浆 TAC 与股骨骨密度呈正相关 ( $r = 0.539, P = 0.001$ ),TAC 与腰椎骨密度无关 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

绝经、雌激素缺乏、Hcy 代谢与骨质疏松及骨质疏松性骨折的关系,已成为近年来研究的热点问题。Gjesdal 等<sup>[5]</sup>通过大样本横断面调查发现,中老年女性血浆 tHcy 水平与髌部骨密度呈负相关,提示血浆 tHcy 水平升高可能是女性骨质疏松的一个潜在危险因素。Bahtiri 等<sup>[1]</sup>对 139 名绝经后女性进行的一项横断面研究发现,绝经后妇女血 Hcy 水平与骨密度具有相关性,高水平的血 Hcy 是绝经后骨质疏松的独立危险因素。为进一步探讨 Hcy 与骨质疏松的因果关系,Herrmann 等<sup>[6]</sup>利用富含蛋氨酸和 Hcy 的饮食,诱导高 Hcy 血症大鼠动物模型,研究结果表明,高 Hcy 血症是骨质疏松的发病因素。Koh 等<sup>[7]</sup>

在细胞及分子水平上,通过小鼠骨髓细胞模型研究发现,接近生理浓度的 Hcy 通过增加细胞内活性氧簇的产生,直接刺激破骨细胞的形成和活性,从而增强骨吸收作用,该研究结果也提示,即轻、中度的高 Hcy 血症个体,也可能因破骨细胞增多,骨吸收增强,而发生骨质疏松,补充适量的抗氧化剂,可能会对骨质疏松的发生。

本实验研究结果显示,与假手术组比较,去卵巢组血浆 tHcy 浓度明显升高,腰椎和股骨骨密度显著降低;血浆 tHcy 浓度与腰椎和股骨骨密度呈负相关。乙烯雌酚和白藜芦醇可显著降低去卵巢大鼠血浆 tHcy 浓度,同时增加去卵巢大鼠腰椎和股骨骨密度,不同的是白藜芦醇组腰椎和股骨骨密度低于乙烯雌酚组,而两组大鼠血浆 tHcy 浓度差异无统计学意义。该实验研究结果也印证了 Hcy 与雌激素缺乏及雌激素缺乏相关的骨质疏松有一定的联系。雌激素乙烯雌酚和植物雌激素白藜芦醇抗骨质疏松的作用机制之一,可能与其降低去卵巢大鼠血浆 tHcy 浓度有关。同时也提示植物雌激素白藜芦醇的抗骨质疏松作用略低于雌激素乙烯雌酚。Koz 等<sup>[8]</sup>利用蛋氨酸饮食复制高 Hcy 血症大鼠模型研究发现,白藜芦醇可降低模型大鼠血 Hcy,对抗 Hcy 诱导的大鼠动脉和海马细胞的氧化应激、细胞凋亡,对模型大鼠的血管、神经细胞损伤及认知功能障碍发挥保护作用。本研究首次提出了白藜芦醇抗去卵巢大鼠骨质疏松的机制之一与其降低血 Hcy 水平有关,为白藜芦醇抗骨质疏松的机制探讨提供了一条新思路。

另外,绝经雌激素缺乏所伴发的氧化应激与绝经后骨质疏松的发生密切相关,Sharma 等<sup>[2]</sup>对 95 名 21~65 岁女性进行的一项横断面研究发现,绝经后骨质疏松组较绝经后健康组,血 GSH-Px、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、TAC 明显降低,该项研究结果表明,氧化应激在绝经后骨质疏松的病理过程中发挥着重要的作用。李明等<sup>[9]</sup>研究发现,抗氧化剂维生素 C、维生素 E 及谷胱甘肽显著增加去卵巢骨

表 1 白藜芦醇对去卵巢大鼠血浆 tHcy 和氧化应激指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	tHcy ( $\mu\text{mol/L}$ )	TAC (U/ml)	GSH-Px (U/ml)	MDA (nmol/ml)
假手术组	8	4.450 $\pm$ 2.082	10.953 $\pm$ 5.632	246.180 $\pm$ 35.473	8.504 $\pm$ 0.979
去卵巢组	8	9.422 $\pm$ 2.207 <sup>a</sup>	3.840 $\pm$ 1.022 <sup>a</sup>	136.424 $\pm$ 24.577 <sup>a</sup>	19.425 $\pm$ 1.332 <sup>a</sup>
乙烯雌酚组	8	4.105 $\pm$ 1.467 <sup>c</sup>	8.791 $\pm$ 1.365 <sup>b</sup>	244.689 $\pm$ 31.702 <sup>c</sup>	10.889 $\pm$ 1.116 <sup>ac</sup>
白藜芦醇组	8	3.478 $\pm$ 0.889 <sup>c</sup>	8.554 $\pm$ 2.515 <sup>b</sup>	222.147 $\pm$ 36.234 <sup>c</sup>	14.228 $\pm$ 1.462 <sup>acd</sup>
F 值		19.709	7.020	20.544	117.219
P 值		0.000	0.001	0.000	0.000

注:tHcy:总同型半胱氨酸;TAC:总抗氧化能力;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶;MDA:丙二醛;与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与去卵巢组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与乙烯雌酚组相比,<sup>d</sup> $P < 0.01$

表 2 白藜芦醇对去卵巢大鼠腰椎和股骨骨密度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	腰椎骨密度( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	股骨骨密度( $\text{g}/\text{cm}^2$ )
假手术组	8	$0.087 \pm 0.005$	$0.151 \pm 0.005$
去卵巢组	8	$0.063 \pm 0.004^a$	$0.124 \pm 0.004^a$
乙烯雌酚组	8	$0.083 \pm 0.004^b$	$0.145 \pm 0.006^b$
白藜芦醇组	8	$0.072 \pm 0.004^{abc}$	$0.136 \pm 0.003^{abc}$
F 值		48.518	43.263
P 值		0.000	0.000

注:与假手术组相比, $^aP < 0.01$ ;与去卵巢组相比, $^bP < 0.01$ ;与乙烯雌酚组相比, $^cP < 0.01$

质疏松模型大鼠骨密度,阻止血清抗氧化成分(超氧化物歧化酶、GSH-Px)减少,提高血清抑制  $\text{OH}^-$  能力,降低脂质过氧化物丙二醛水平,提示抗氧化在骨质疏松治疗中可能具有重要作用。

本研究结果显示,去卵巢组大鼠血浆 TAC 和 GSH-Px 活性明显降低,丙二醛浓度显著升高,血浆 TAC 与股骨骨密度呈正相关。提示去卵巢大鼠体内抗氧化酶活性及抗氧化防御能力降低,从而使活性氧簇堆积,导致脂质过氧化物产物丙二醛浓度增加,造成氧化应激。与去卵巢组比较,白藜芦醇组大鼠血浆 TAC 和 GSH-Px 活性明显升高,丙二醛浓度明显降低,腰椎和股骨骨密度显著增加,但仍低于假手术组和乙烯雌酚组。提示白藜芦醇可以提升去卵巢骨质疏松模型大鼠体内的抗氧化酶活性,改善其体内的氧化应激状态,从而对去卵巢大鼠骨质疏松发挥保护作用,与傅松波等<sup>[10]</sup>研究结果相似。

综上所述,高 Hcy 和氧化应激与去卵巢大鼠骨质疏松关系密切;白藜芦醇可能通过降低血浆 tHcy 水平和改善其氧化应激状态,而对去卵巢大鼠骨质疏松发挥保护作用。

参 考 文 献

[1] Bahtiri E, Islami H, Rexhepi S, et al. Relationship of homocysteine levels with lumbar spine and femur neck BMD in postmenopausal women[J]. Acta Reumatol Port, 2015, [Epub ahead of print].

[2] Sharma T, Islam N, Ahmad J, et al. Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2015, 19(4):491-497. DOI: 10.4103/2230-8210.159053.

[3] Chow SE, Hshu YC, Wang JS, et al. Resveratrol attenuates ox-LDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidativefunctional damages [J]. J Appl Physiol (1985), 2007, 102(4):1520-1527.

[4] Schroeksnadel K, Winkler C, Wirleitner B, et al. Anti-inflammatory compound resveratrol suppresses homocysteine formation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(10):1084-1088.

[5] Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study [J]. Arch Intern Med, 2006, 166(1):88-94.

[6] Herrmann M, Wildemann B, Claes L, et al. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats [J]. Clin Chem, 2007, 53(8):1455-1461.

[7] Koh JM, Lee YS, Kim YS, et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(7):1003-1011.

[8] Koz ST, Etem EO, Baydas G, et al. Effects of resveratrol on blood homocysteine level, on homocysteine induced oxidative stress, apoptosis and cognitive dysfunctions in rats [J]. Brain Res, 2012, 1484:29-38. DOI:10.1016/j.brainres.2012.09.026.

[9] 李明, 白晓春, 刘俊, 等. 抗氧化剂对去卵巢大鼠骨密度和血清生化指标的影响 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008, 24(4):368-371. DOI:10.3321/j.issn:1000-6699.2008.04.006.

[10] 傅松波, 汤旭磊, 杨晓梅, 等. 白藜芦醇对糖尿病肾损害大鼠超微结构的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(18):3965-3967. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2012.18.046.

(收稿日期:2015-06-24)

· 消息 ·

2016 年第 2 期部分文题介绍

1. 糖尿病周围神经病变与维生素 D 的相关性研究 2. 尿 L-FABP、KIM-1、NGAL 对早期糖尿病肾病诊断价值的对比研究 3. 2 型糖尿病患者血戊糖素水平与椎体骨折的研究 4. 间歇低氧暴露对大鼠胰岛素抵抗及骨骼肌细胞 GLUT4、AKT2 的影响 5. GDF11 改善 ApoE<sup>-/-</sup> 糖尿病小鼠内皮依赖性血管舒张功能 6. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠核因子  $\kappa\text{B}$  信号通路的影响 7. 七叶皂苷钠抑制人甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株增殖 8. 2 型糖尿病患者幽门螺杆菌感染率的荟萃分析 9. 以胸背痛为表现的胰岛素相关性神经炎一例报道 10. 肠促胰素类降糖药物对体重作用效果的研究进展 11. 维生素 D 结合蛋白的研究进展 12. 糖尿病及其大血管病变的表观遗传学标志物研究进展