

番茄红素对糖尿病大鼠骨质的影响

裴凌鹏

(中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

[摘要] 研究番茄红素对小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素所致糖尿病大鼠骨质的影响. 用链脲佐菌素以 30 mg/kg 注射 Wister 雄性大鼠 6 周, 成功建立糖尿病模型; 对正常对照组、糖尿病模型组、番茄红素组和胰岛素治疗组进行骨常规参数进行测定及比较. 糖尿病模型组骨密度、骨结构力学参数、生物力学参数、骨钙、镁、锰及羟脯氨酸含量均比青年组有显著降低 ($P < 0.01$), 而骨磷含量、骨和血清碱性磷酸转移酶均比正常对照组有显著升高 ($P < 0.01$); 相比之下, 番茄红素组在上述参数指标方面均与糖尿病模型组呈现显著差异 ($P < 0.01$), 与胰岛素治疗组呈现相同作用趋势, 但效果不如后者. 研究表明长期摄入番茄红素可减少小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素大鼠糖尿病的发病率, 进而影响糖尿病大鼠骨质变化的发生.

[关键词] 糖尿病, 骨质疏松, 骨密度, 番茄红素

[中图分类号] Q54 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)04-0114-05

Influence on Osseous Changes of Diabetic Rat by Lycopene

Pei Lingpeng

(Institute of Chinese Traditional Minority Medicine, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

Abstract Evaluation of the effects of lycopene on osseous change of diabetic rats induced by streptozotocin (STZ) injected at several low dosages were made. Injections of STZ for six weeks to set mode of the diabetic rats. They were randomly divided in four groups including control group, diabetic model group, lycopene group and insulin-treated diabetic group, whose osseous routine parameters were tested and compared. Compared with control group, the bone mineral density (BMD), structural power parameters of bone, biological power parameters of bone, bone calcium, manganese, magnesium and the content of hydroxyproline in the diabetic model group were significantly decreased ($P < 0.01$). And the content of bone phosphorus, the activity of bone and serum alkaline phosphatase (ALP) were significantly raised ($P < 0.01$). Moreover, it is significantly different between lycopene group and diabetic model group in these parameters ($P < 0.01$). But the cured effect of insulin-treated diabetic group was better than the lycopene group. Lycopene can reduce the incidence of diabetes in rats induced by streptozotocin at several low dosages and reform the osseous change of diabetic rat.

Key words diabetes, osteoporosis, bone mineral density (BMD), lycopene

1875 年从番茄中获得番茄红素的粗提物, 当时命名为 Solanorubin. 1903 年 Schunck 发现番茄中红色素的吸收光谱与类胡萝卜素不同, 遂将这种红色素更名为 Lycopene. 番茄红素在自然界中广泛存在于番茄、西瓜、葡萄柚等中. 近几年研究发现番茄红素具有多种生物学活性, 其中尤以抗氧化、弱雌性激素活性、提高免疫力和抗癌作用突出, 此外在防止骨质疏松症, 改善妇女更年期障碍, 防止心血管疾病等方面均有一定的作用^[1-4].

本实验通过番茄红素对骨质的骨密度、骨结构力学参数、生物力学参数、主要骨矿物质 (钙、镁、锰、磷)、血清磷钙、羟脯氨酸含量及碱性磷酸酶活性等参数的测量, 来研究此类化合物对链脲佐菌素诱发糖尿病大鼠骨质的影响.

收稿日期: 2007-11-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30171169) 资助项目.

通讯联系人: 裴凌鹏, 医学博士, 讲师, 研究方向: 天然药物化学与骨营养. E-mail: lppc@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Labconco冰冻真空干燥仪, 752分光光度计, 960型荧光分光光度计, J2-SH高速冰冻离心机, Lunar-XR型双能X线骨密度测定仪, 岛津万能实验机, 火焰原子吸收分光光度计, C30柱(YMC Carotenoid S-5 Waters), HPLC(Waters 600E溶剂输送系统, PDA-2996二极管阵列检测器), 血糖和胰岛素测定试剂盒(中原生物科技公司), 番茄红素乳化剂(新疆红帆生物科技公司), 乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)(迪马公司), 无水乙醇、链脲佐菌素(北京化学试剂公司), 大孔吸附树脂(天津农业股份公司).

1.2 乳化剂破乳制备番茄红素

(1) 称取10 g乳化颗粒加入少许水, 超声波促溶后, 加入300 mL丙酮-正己烷($V:V=3:2$)萃取. 静置2 h后, 将脂溶性相收集(反复萃取直至水相成无色). 再利用减压旋转蒸发仪进行提取液浓缩处理.

(2) 番茄红素提取液柱色谱的纯化.

①装柱. 将活化好的氧化铝装填于玻璃层析柱中, 装填高度为12 cm, 用正己烷润湿.

②洗脱. 取2 mL番茄红素提取液上柱, 用50 mL正己烷-丙酮淋洗, 收集洗脱液. 将洗脱液用氮气吹干制粉, 装入充满氮气的玻璃瓶内, -70°C 储存备用.

1.3 番茄红素的鉴定

根据其HPLC中保留时间和紫外可见吸收光谱的特征峰与标准品对照进行鉴定. 得到的番茄红素提取液经过过滤后用高效液相色谱分离.

色谱条件如下:

色谱柱: Waters YMC Carotenoid S-5 (4.6×250 mm).

流动相 A: 乙腈-甲醇(75:25); 流动相 B: MTBE. 流动相 A 与 B 中分别加入 0.05% 三乙胺作为改性剂防止番茄红素降解.

线性梯度洗脱: B在8 min内由0%增加至55%; 8~35 min B维持55%; 35~40 min B由55%减至0%.

流速: 1.0 mL/min.

检测波长: 475 nm; 波长范围 260~700 nm.

进样量: 20 μL .

收集后观察其光谱特征峰行为.

1.4 动物实验

1.4.1 链脲佐菌素致糖尿病模型的建立

6周龄Wistar雄性大鼠40只(均由中国医学科学院实验动物中心提供), 体重150~170 g随机分为正常对照组(A)、糖尿病模型组(B)、番茄红素+STZ组(C)和STZ+胰岛素治疗组(D).

糖尿病模型组(B)、番茄红素+STZ组(C)和STZ+胰岛素治疗组(D)每天用30 mg/kg链脲佐菌素腹腔注射, 其中番茄红素组每天每只以20 mg/kg番茄红素提取物灌喂, 而胰岛素治疗组则以每天每只2.0~2.3 U腹腔注射.

与此同时正常对照组每天每只注射等量的生理盐水. 分笼正常喂养, 自由进食, 期间每隔3 d测量血糖与胰岛素指数, 造模6周后进行葡萄糖耐糖实验.

实验结束时称量鼠的体重, 称重后乙醚麻醉, 暴露腹部, 下腔静脉取血, 待测血清钙、血清磷、血清碱性磷酸酶(ALP)活性; 分离各组大鼠的双侧股骨, 测定骨长度、骨质量、骨密度、骨结构及生物力学指标; 骨中钙、磷、锰、镁、羟脯氨酸含量和骨中ALP活性.

1.4.2 血清ALP活性用氨基萘比淋测酚法的测定

血清钙用EDTA滴定法; 血清磷采用孔雀绿微量比色法; 骨ALP用化学免疫法试剂盒测定(由中国科学院生物物理所中生公司提供).

1.4.3 股骨骨密度测定

取股骨解冻后于LunarXR型双能X线骨密度测定仪上, 分近段、骨中段、远段3部分测其骨密度. 测定位置为前后位, 测试标本置于塑料盘内, 内盛适量生理盐水淹没标本, 对整个标本扫描后, 选定测定区域

得出各骨密度值. 近段和远段代表松质骨骨密度, 骨中段代表皮质骨骨密度.

测定参数: 扫描宽度 20 mm, 扫描速度 7 mm / s

1. 4. 4 骨结构力学和生物力学的测定

取大鼠左股骨, 除去附着的肌肉和软组织, 用千分尺测量股骨的长度; 用分析天平称量两侧股骨的重量; 将股骨标本在岛津万能实验机上进行三点弯曲实验, 得到载荷 - 挠度曲线. 由此曲线可直接得出大鼠骨的结构力学参数 (最大载荷、最大挠度、弹性载荷、弹性挠度). 测定时仪器设置条件为: 下压速度 10mm / m in; 下压幅度 4 mm; 保持时间 5 s; 跨度 22mm. 断骨后, 取股骨中部作径向切片, 在显微镜下用显微尺测量股骨的最大外径 A、最小外径 B、最大内径 a、最小内径 b.

1. 4. 5 骨中钙、锰、镁含量的测定

取大鼠右侧股骨近端称重, 研碎. 然后进行灰化 2 h 取出骨灰, 硝酸溶解. 经处理后, 火焰原子吸收分光光度计测定钙、锰、镁的含量.

1. 4. 6 骨中磷含量的测定

取大鼠右侧股骨近端称重, 研碎. 然后进行灰化 2 h 取出骨灰, 硫酸溶解. 经处理后, 用钼蓝显色定磷法 660 nm 波长下测定.

1. 4. 7 骨中羟脯氨酸含量的测定

取大鼠右侧股骨上端称重, 研碎. 用 3mL 氯仿 - 甲醇处理 2 h 过滤. 再用乙醇水和丙酮冲洗一次, 放入烤箱 2 h 取出后放入 1mL 12mol/L 的 HCl 高温水解 2 h 取出后处理用氯胺 T 法于 560 nm 波长下测定.

1. 5 统计方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计处理方法为 t 检验.

2 结果与分析

2. 1 番茄红素的提取与鉴定

有机溶剂的反复提取后, 通过柱层析可以得到高纯度的番茄红素提取物, 经 HPLC 及其光谱特征峰进行定性.

2. 2 糖尿病大鼠模型的建立

从表 1 可知, 与正常对照组比较, 糖尿病模型组、番茄红素组空腹和服糖后 2 h 血糖均明显升高, 有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而番茄红素组空腹、服糖后 2 h 血糖均较糖尿病模型组明显降低, 且有统计学意义 ($P < 0. 01$). 胰岛素治疗组空腹血糖与正常对照组比较, 无明显升高. 结果表明番茄红素可以降低链脲佐菌素所致糖尿病大鼠空腹和服糖后 2 h 血糖, 对小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素所致糖尿病大鼠有一定的保护作用.

表 1 各组葡萄糖耐糖实验的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Glucose tolerance test in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	A 组	B 组	C 组	D 组
0 h 血糖 (mmol/L)	4.12 ± 0.22	11.17 ± 0.72 ^{* *}	8.27 ± 0.33 ^{* *}	4.87 ± 0.31
2 h 血糖 (mmol/L)	4.24 ± 0.21	23.02 ± 1.02 ^{* *}	15.76 ± 0.52 ^{* *}	5.15 ± 0.29
0 h 胰岛素 (IU/L)	16.09 ± 0.65	7.13 ± 0.35 ^{* *}	10.11 ± 0.21 ^{* *}	15.12 ± 0.59
2 h 胰岛素 (IU/L)	18.21 ± 0.77	7.58 ± 0.33 ^{* *}	12.01 ± 0.29 ^{* *}	16.33 ± 0.54

注: 上述表格所设组依次顺序为: A 为正常对照组, B 为糖尿病模型组, C 为番茄红素组; D 为胰岛素治疗组.

各组与正常对照组比较: ^{*} $p < 0. 05$ ^{**} $p < 0. 01$ 与糖尿病模型组比较: $p < 0. 01$.

表 2 股骨密度的测量 ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The density of thighbone ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	A 组	B 组	C 组	D 组
骨近段	0.172 ± 0.012	0.095 ± 0.011 ^{* *}	0.132 ± 0.014 ^{* *}	0.155 ± 0.011
骨中段	0.151 ± 0.010	0.090 ± 0.008 ^{* *}	0.122 ± 0.012 ^{* *}	0.137 ± 0.014
骨远段	0.139 ± 0.021	0.074 ± 0.012 ^{* *}	0.086 ± 0.011 ^{* *}	0.119 ± 0.012

注: 上述表格所设组依次顺序为: A 为正常对照组, B 为糖尿病模型组, C 为番茄红素组, D 为胰岛素治疗组.

各组与正常对照组比较: ^{*} $p < 0. 05$ ^{**} $p < 0. 01$ 与糖尿病模型组比较: $p < 0. 01$.

2.3 股骨骨密度指标的测定

从表 2 可知, 糖尿病模型组大鼠骨密度与正常对照组、胰岛素治疗组有显著差异 ($P < 0.01$), 在连续注射 6 周链脲佐菌素期间加速骨密度降低的程度, 表明用此类化合物诱发的糖尿病可造成大鼠股骨骨密度的明显降低. 而番茄红素组与糖尿病模型组相比, 松质骨和皮质骨骨密度均有所升高, 且呈显著差异 ($P < 0.05$).

2.4 骨结构力学和生物力学的测定

从表 3 可知, 与正常对照组比较, 糖尿病模型组无论是股骨重量、股骨长度, 还是股骨结构力学和生物力学指标方面均明显减少 ($P < 0.01$). 表明在建立链脲佐菌素诱发糖尿病的同时, 也有导致骨质疏松症的可能. 而番茄红素组与糖尿病模型组相比, 骨结构力学和生物力学参数指标均有所升高, 且呈现差异 ($P < 0.05$).

表 3 左股骨结构力学、生物力学指标 ($x \pm s$ $n = 10$)

Table 3 The structure power and piblogical power pacam etens of left thighbone ($x \pm s$ $n = 10$)

指标参数	A 组	B 组	C 组	D 组
弹性挠度 /mm	0.43 ± 0.11	0.30 ± 0.11 ^{* *}	0.33 ± 0.12	0.37 ± 0.14 [*]
弹性载荷 /g	10032 ± 1012	8925 ± 1011 ^{* *}	9356 ± 1001 [*]	9452 ± 1015
最大挠度 /mm	0.67 ± 0.13	0.52 ± 0.14 ^{* *}	0.59 ± 0.14 [*]	0.56 ± 0.16 [*]
最大载荷 /g	11232 ± 1031	9321 ± 1019 ^{* *}	10072 ± 1211 [*]	10302 ± 1044 [*]
最大应力 /(N/mm ²)	22043 ± 2111	18211 ± 2210 ^{* *}	20032 ± 2126 [*]	21376 ± 2216
最大应变 /mm	0.023 ± 0.0032	0.017 ± 0.0025 ^{* *}	0.020 ± 0.0014 [*]	0.020 ± 0.0028
弹性应力 /(N/mm ²)	20967 ± 2113	14321 ± 1890 ^{* *}	16905 ± 2321 [*]	17206 ± 2131 [*]
弹性应变 /mm	0.018 ± 0.0016	0.012 ± 0.0016 ^{* *}	0.015 ± 0.0012 [*]	0.016 ± 0.0011 [*]
张应力 /(N/mm ²)	25618 ± 3173	29431 ± 3090 ^{* *}	26769 ± 3211 [*]	26378 ± 3218
刚性系数 /(kg•mm ²)	5525618 ± 423121	5022147 ± 401016 ^{* *}	5380009 ± 423121 [*]	5360224 ± 422876
弹性模量 /(N/mm ²)	1225098 ± 143261	1129221 ± 131501 ^{* *}	1162121 ± 131001 [*]	1162213 ± 143503
韧性系数 /(mm/kg)	1.221 ± 0.7031	1.510 ± 0.5521 ^{* *}	1.309 ± 0.7800 [*]	1.371 ± 0.7031
应变位能	120029 ± 23209	100012 ± 21721 ^{* *}	106317 ± 22021 [*]	106001 ± 22179

注: 上述表格所设组依次顺序为: A 为正常对照组, B 为糖尿病模型组, C 为番茄红素组, D 为胰岛素治疗组.

各组与正常对照组比较: ^{*} $p < 0.05$ ^{*} $p < 0.01$, 与糖尿病模型组比较: $p < 0.05$

2.5 骨矿物质的含量、骨羟脯氨酸、血钙磷及 ALP 的活性

从表 4 可知, 与正常对照组比较, 糖尿病模型组骨钙、锰、镁、骨羟脯氨酸及血磷含量均明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 而番茄红素组与糖尿病模型组相比, 骨钙、锰、镁及血磷含量均明显升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 糖尿病模型组血清 ALP 和骨 ALP 活性与正常对照组比较显著升高; 而番茄红素组与糖尿病模型组相比, 羟脯氨酸含量明显升高, 血清 ALP 和骨 ALP 活性较明显降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

表 4 骨矿物质的含量、血钙磷、骨羟脯氨酸及 ALP 活性的测定 ($x \pm s$ $n = 10$)

Table 4 The content of bone mineral serum calcium, serum phosphorus bone hydn xypoline and ALP activity ($x \pm s$ $n = 10$)

指标参数	A 组	B 组	C 组	D 组
骨钙 (μg)	812.12 ± 110.10	462.21 ± 101.21 ^{* *}	657.25 ± 105.72 [*]	786.11 ± 104.01 [*]
骨磷 (μg)	172.23 ± 21.12	349.36 ± 21.40 ^{* *}	255.24 ± 21.01 [*]	222.71 ± 19.14 ^{* *}
骨镁 (μg)	6.07 ± 0.72	3.03 ± 0.69 ^{* *}	4.84 ± 0.49 [*]	4.90 ± 0.29 [*]
骨锰 (μg)	7.87 ± 0.50	2.90 ± 0.52 ^{* *}	4.70 ± 0.35 [*]	5.92 ± 0.27 [*]
血钙 (mmol/L)	2.76 ± 0.13	3.25 ± 0.14 ^{* *}	2.98 ± 0.12 [*]	2.90 ± 0.15
血磷 (mmol/L)	2.76 ± 0.11	2.40 ± 0.12 [*]	2.63 ± 0.13 [*]	2.69 ± 0.14
羟脯氨酸 (μg)	3212.51 ± 512.10	1802.42 ± 402.15 ^{* *}	2221.15 ± 471.12 [*]	2826.90 ± 398.25
骨 ALP (U/L)	173.52 ± 0.62	201.01 ± 0.73 ^{* *}	183.77 ± 0.59 [*]	191.27 ± 0.50 [*]
血清 ALP (U/L)	5.07 ± 0.12	7.40 ± 0.19 ^{* *}	5.60 ± 0.22 [*]	5.44 ± 0.20

注: 上述表格所设组依次顺序为: A 为正常对照组, B 为糖尿病模型组, C 为番茄红素组, D 为胰岛素治疗组.

各组与正常对照组比较: ^{*} $p < 0.05$ ^{*} $p < 0.01$ 与糖尿病模型组比较: $p < 0.05$

3 讨论

正常骨代谢过程是一种骨吸收和骨形成的动态平衡过程, 在这一过程受到体内外许多因素的调控, 如

年龄、性别、营养状况、生活习惯、疾病等^[5]。一旦这些方面出现问题,均会导致骨代谢受阻,引发相关疾病。糖尿病已成为人类主要的慢性疾病之一,而由此引发的骨质疏松症已成为人们关注的焦点,由于其成因较为复杂,所以致病机理尚未搞清^[6]。当多次小剂量进食链脲佐菌素时可破坏胰岛细胞,使其丧失胰岛素分泌能力,造成血糖失控,导致糖尿病。由于体内血糖代谢紊乱,会产生大量的自由基,而在骨重建中,胶原蛋白是骨构成过程中重要的组成部分,自由基可以破坏其形成,导致骨中矿物质沉积减少,从而造成钙、磷、镁、锰等元素的流失,影响骨密度,抑制骨的形成,造成骨质疏松^[7,8]。同时胶原蛋白加速分解生成羟脯氨酸并随血、尿流失,使得骨中两者的含量均相应减少。另外由于骨基质结构建成受阻,同时矿物质含量下降,从而使骨的结构力学和生物力学受到了影响,大大降低了骨的抗变能力,提高了发生骨折的机率。番茄红素是良好的活性氧淬灭剂,可有效地淬灭多种自由基。近年来研究发现在体外可以有效地缓解增强成骨细胞增殖和分化,同时有效地对局部细胞因子(如 ALP 酶、I 型胶原蛋白等)进行上调^[9-11]。此外,糖尿病患者体内蛋白生成晚期糖化终末产物(AGEs),随 AGEs 浓度增加,AGEs 在骨胶原上大量沉积直接影响成骨细胞的增殖与分化,结果使成骨细胞数量减少,活性降低,导致骨形成降低。同时 AGEs 还可以和细胞膜上的特异受体结合,促使该细胞合成和释放细胞因子和生长因子,如白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)等,从而改变细胞间信息传递,影响破骨细胞的增殖与分化,导致骨吸收增加。再加之对骨基质的破坏,最终导致骨质疏松症的发生^[12]。本实验中正常对照组血清 ALP 活性低于糖尿病模型组,这正是由于 AGEs 浓度增加,使破骨过程显著增强,成骨过程继发增加,骨代谢处于一种高转变状态,成骨细胞的活跃造成血 ALP 活性增加。但骨代谢仍处于一种负钙平衡状态,从而造成机体的骨盐流失。综合而言,本实验为大鼠多次小剂量注射链脲佐菌素达 6 周,其引发的糖尿病进而导致大鼠骨质的变化。通过有关骨质疏松症的指标检验,如:骨密度、骨结构力学、生物力学、主要骨矿物质及羟脯氨酸含量、血清钙、血清磷含量、血清 ALP 和 ALP 活性,证实通过链脲佐菌素诱发大鼠形成糖尿病过程的同时,会诱发骨质疏松。而番茄红素可有效地缓解此类骨质的变化。

[参考文献]

- [1] 惠伯棣,裴凌鹏.类胡萝卜素化学与生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005:121-138
- [2] 李京,惠伯棣,裴凌鹏.番茄红素-被关注的功能因子[J].食品科学,2005,26(8):461.
- [3] 裴凌鹏.番茄红素对 D-半乳糖大鼠骨质影响[J].中央民族大学学报,2007,2:149-153
- [4] 黄玥,沈新南,刘艳妮.番茄红素预防大鼠高血糖及其作用机制[J].营养学报,2006,21(3):52-55
- [5] 马静波.骨质疏松症的治疗和预防概述[J].医师进修杂志,2005,28(5):9-11.
- [6] 戴斌,苏文凌.维生素 D 对糖尿病大鼠骨代谢保护作用[J].中国临床康复,2006,10(44):66-68
- [7] 王欣荣.骨质疏松症的发病机理及治疗[J].生物工程进展,2001,21(3):54-56
- [8] 方允中,郑荣梁.自由基生物学的理论与应用[M].北京:科学出版社,2002:882-897.
- [9] 张海光,陈晓亮.氧化应激在原发性骨质疏松症发病中的作用[J].国外医学:骨科学分册,2005,26(4):223-233
- [10] 张海光,陈晓亮,王德青.番茄红素对与氧化应激后成骨细胞的影响[J].中国骨质疏松杂志,2007,17(2):10-15.
- [11] 黄玥,沈新南,李永廷.2 型糖尿病患者血清番茄红素与体内氧化应激反应的关系[J].复旦学报:医学版,2007,12(5):21-25.
- [12] Kumeda Y, Inaba M, Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment in diabetes mellitus[J]. Nippon Rinsho, 1998, 56(6):1579-1582

[责任编辑:孙德泉]