

## 饮食加硼治疗维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果观察

许鹏<sup>1</sup>, 胡万彪<sup>2</sup>, 郭雄<sup>1</sup>, 张银刚<sup>3</sup>, 李幼芬<sup>3</sup>, 姚建锋<sup>1</sup>, 蔡乾坤<sup>1</sup> (西安市红十字会医院骨关节科, 陕西 西安 710054; <sup>2</sup>陕西省横山县红十字会医院, 陕西 西安 710000; <sup>3</sup>西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西 西安 710061)

**摘要:** 目的 观察饮食加硼治疗维甲酸诱导的骨质疏松模型大鼠的效果, 为硼临床治疗骨质疏松症提供实验依据。方法 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常组 ( $n=8$ ) 和骨质疏松模型组 ( $n=24$ )。以维甲酸  $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃 15 d, 诱导骨质疏松模型。模型复制成功后, 骨质疏松模型组又随机分为无措施对照组 ( $n=8$ )、饮食加硼治疗组 ( $n=8$ ) 和雌二醇治疗组 ( $n=8$ )。治疗 30 d 后, 测定大鼠血清钙、磷、硼含量, 及碱性磷酸酶 (AKP) 和酸性磷酸酶 (TRAP) 活性, 测量大鼠全身、腰椎和胫骨骨密度, 并观察大鼠股骨形态计量学变化。结果 四组大鼠血清 Ca 和 P 含量无显著性差异, 而硼含量硼治疗组明显高于其它三组。对照组大鼠血清 AKP 和 TRAP 活性增加, 股骨松质骨和皮质骨骨量减少, 破骨细胞数量增加, 腰椎、胫骨骨密度下降, 呈现骨质疏松变化。饮食加硼和雌激素治疗组大鼠血清 TRAP 活性显著下降, 股骨平均骨小梁数、平均骨小梁宽度、骨小梁面积百分比、皮质骨面积百分比和全身、腰椎、胫骨骨密度等显著增加, 松质骨区破骨细胞数明显减少, 与正常组大鼠骨质无明显差异。硼治疗组大鼠血清 AKP 活性及松质骨区活跃成骨细胞数显著增加。结论 饮食加硼可提高大鼠血清硼含量, 增加骨形成, 减少骨吸收, 对骨质疏松有明显的治疗作用。

**关键词:** 骨质疏松; 骨组织; 硼

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)12-1785-04

## Therapeutic effect of dietary boron supplement on retinoic acid-induced osteoporosis in rats

XU Peng<sup>1</sup>, HU Wan-biao<sup>2</sup>, GUO Xiong<sup>1</sup>, ZHANG Yin-gang<sup>3</sup>, LI You-fen<sup>3</sup>, YAO Jian-feng<sup>1</sup>, CAI Qian-kun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Xi'an Red Cross Hospital, Xi'an 710054, China; <sup>2</sup>Red Cross Hospital of Hengshan County, Hengshan 710000, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Environment and Genes Related Diseases of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

**Abstract: Objective** To observe the therapeutic efficacy of dietary boron supplement on retinoic acid-induced osteoporosis in rats, so as to provide experimental evidence for clinical management of osteoporosis with boron. **Methods** Thirty-two SD rats were randomized into normal control group (8 rats) and osteoporotic group (24 rats), and osteoporosis was induced in rats of the latter group by intragastric retinoic acid administration at the daily dose of  $80 \text{ mg/kg}$  for 15 consecutive days. The osteoporotic rats were subdivided into control group (8 rats) without treatment, boron treatment group (8 rats) and estradiol treatment group (8 rats). After 30 days of treatment, the serum contents of Ca, P, boron and the activities of alkaline phosphatase (AKP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the rats were assayed, the bone mineral density (BMD) of the whole body, lumbar vertebrae and tibia were determined, and the morphological changes of the femurs were observed. **Results** The serum contents of Ca and P in the rats of the 4 groups differed scarcely, but the content of boron in boron treatment group was markedly higher than that in the other three groups. In the osteoporotic control group, the activities of serum AKP and TRAP, the masses of spongy bone and cortical bone of the femurs, and the quantity of the osteoclasts were increased, with the BMD of the lumbar vertebrae and tibia decreased, suggesting osteoporotic conditions. The mean trabecular plate density and thickness, trabecular bone volume and cortical bone volume of the femurs in the osteoporotic rats treated with boron or estradiol were significantly increased, but the active osteoclast quantity in the spongy bone and serum TRAP activities were obviously decreased, and the bone quality was comparable with that of the normal group. In addition, the serum AKP activity and the active osteoblast quantity in the spongy bone were obviously increased in boron treatment group. **Conclusion** The dietary boron supplement can increase the serum content of boron of osteoporotic rats to stimulate bone formation and inhibit bone resorption, producing therefore obvious therapeutic effect against osteoporosis.

**Key words:** osteoporosis; bone; boron; rats

收稿日期: 2006-02-26

基金项目: 西安市科技攻关计划项目 (GG04231)

Supported by Sci-Tech Research Project of Shanxi Province (GG04231)

作者简介: 许鹏 (1970-), 男, 博士, 副主任医师, 电话: 13772090019, 029-82205006, E-mail: soursou369@163.com

通讯作者: 郭雄, 教授, E-mail: guoxiong\_xju@163.net, soursou369@163.com

硼是植物的必需营养元素之一, 具有促进植物中有机质的转运, 参与植物生长素代谢及酶促反应, 影响核酸、蛋白质代谢等重要作用。缺硼会使植物代谢紊乱, 以致病态生长。人和动物体内硼的含量甚微, 至今硼仍未被列入人体必需微量元素。近年来硼在人和动物体中作用的研究越来越多, 已表明硼是人和动物

的重要营养成分,与骨软骨代谢、矿物质代谢、脂质代谢、能量利用和免疫调节等有关<sup>[1-3]</sup>。临床研究发现缺硼对骨形成和骨量的保持不利,被认为是骨质疏松症的病因之一;绝经后妇女,适当地补充硼,能有效地预防骨质疏松症的发生<sup>[4,5]</sup>。硼治疗骨质疏松的实验动物研究极少。本实验拟通过观察饮食加硼对维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的治疗效果,为硼应用治疗骨质疏松症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SD 大鼠 32 只,5-6 月龄,雌性,体质量 220-310 g,由西安交通大学医学院动物中心提供。大鼠随机分为正常组(8 只),骨质疏松模型组(24 只)。以维甲酸 80 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(上海第六制药厂)灌胃 15 d,诱导骨质疏松。骨质疏松模型复制成功后,正常组大鼠继续观察,骨质疏松模型组大鼠随机分为 3 组:对照组(8 只),硼治疗组(8 只),雌激素治疗组(8 只)。正常组、对照组和雌激素治疗组给予常规饲料及蒸馏水;硼治疗组给予加硼饲料(在常规饲料中加入四硼酸钠,含量为 15.38 g/kg 饲料,约占饲料的 1.54%);雌激素治疗组腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液每只 50 μg,每周 3 次。治疗观察期为 30 d。

1.2 血清学测定

治疗 30 d 后,用 20% 乌拉坦按 1.0 ml/100 g 体质量的剂量麻醉各组大鼠,腹腔动脉抽血,分离血清,-20 ℃ 保存待用。血清 Ca 元素含量用原子吸收分光光度法测定,P 元素含量用钼兰比色法测定,B 元素含量用姜黄素法测定,721 分光光度计比色。血清碱性磷酸酶(AKP)用 IFCC 推荐法,日立 7170 全自动生化分析仪检测;血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)用对硝基酚磷酸盐法测定;试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,方法见说明。

1.3 骨组织形态计量学

大鼠处死后取股骨远段 1/3 和中段 1/3,4% 多聚甲醛固定,EDTA 脱钙,逐级酒精、二甲苯脱水,石蜡包埋,制成 5-7 μm 伊红-苏木素染色切片,以 Leica ARISTOPLAN 半自动彩色图像分析仪测量。测量范围以骺板软骨下 1 mm 以外的松质骨区域,每张切片测量 3 个视野(放大倍数 40×,测定面积限定为 274 753 μm<sup>2</sup>),取平均值,测量股骨下端的平均骨小梁密度、平均骨小梁宽度、骨小梁面积百分比、平均骨小梁间距及成骨细胞和破骨细胞数量;测量股骨中段皮质骨面积、皮质骨面积百分比及骨髓腔面积百分比。

1.4 骨密度测定

大鼠处死前 1 d,20% 乌拉坦麻醉,采用美国生产

的 Hologic QDR-2000 型双光能骨密度仪进行扫描、记录,计算机自动分析骨密度(bone mineral density, BMD)。

1.5 统计学分析

所有数据用 SPSS11.5 软件统计分析,组间比较用方差分析,P<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 血清 Ca、P 和 B 含量

表 1 显示,治疗 30 d 后,4 组大鼠血清 Ca 和 P 元素含量无显著性差异(P>0.05),而硼含量硼治疗组明显高于其他 3 组(P<0.05)。

表 1 大鼠血清 Ca、P 和 B 含量

Tab.1 Serum Ca, P and boron contents in the rats(Mean±SD)

Group	n	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	B(mg/L)
N	8	48.70±12.57	5.57±1.21	0.31±0.04
C	8	50.58±13.87	5.01±0.58	0.25±0.05
B	8	53.03±14.30	5.40±1.37	0.56±0.09
E	8	51.50±13.67	6.21±1.40	0.31±0.07

P>0.05 for comparison between data tagged with the same superscript, and P<0.05 otherwise, which also applies for other tables listed in this text without further specification. N: Normal group; C: Control group; B: Boron treatment group; E: Estrogen treatment group

2.2 血清 AKP 和 TRAP 活性检测(表 2)

与正常组比较,对照组血清 AKP 和 TRAP 活性显著升高(P<0.05)。和对照组相比,硼治疗组 AKP 活性显著升高(P<0.05)、TRAP 活性明显下降(P<0.05);雌激素组血清 AKP 活性变化不大(P>0.05),TRAP 活性明显下降(P<0.05)。

表 2 大鼠血清 AKP 和 TRAP 活性比较

Tab.2 Serum AKP and TRAP activities of the rats(Mean±SD)

Group	n	AKP(U/L)	TRAP(U/L)
N	8	149.96±45.62	13.04±4.12
C	8	231.03±75.97	16.79±6.67
B	8	295.12±99.28	13.95±7.92
E	8	238.80±87.20	12.98±5.07

2.3 骨形态计量学指标

表 3 显示,对照组与正常组比较,股骨下端松质骨的平均骨小梁数、骨小梁宽和骨小梁面积百分比均显著减少,骨小梁间隙显著增大(P<0.05)。硼治疗组和雌激素组与对照组比较,股骨下端松质骨的平均骨小梁数、骨小梁宽、骨小梁面积百分比明显增加,而骨小梁间隙明显缩小(P<0.05)。

表 4 表明,对照组与正常组比较,股骨下端松质骨区的柱状成骨细胞数增多,扁平的成骨细胞数明显

表 3 大鼠股骨松质骨形态测量结果

Tab.3 Bone histomorphometry of cancellous bone in femur of rats (Mean±SD)

Group	n	M TPD (n)	M TPT (μm)	M TPS (μm)	TBV (%)
N	8	6.00±1.31 <sup>a</sup>	64.06±9.90 <sup>a</sup>	113.76±42.62 <sup>a</sup>	22.75±6.40 <sup>a</sup>
C	8	4.33±0.82 <sup>b</sup>	41.96±11.69 <sup>b</sup>	201.83±63.04 <sup>b</sup>	16.16±3.03 <sup>b</sup>
B	8	6.10±0.88 <sup>a</sup>	75.74±18.39 <sup>a</sup>	91.18±29.42 <sup>a</sup>	24.01±6.14 <sup>a</sup>
E	8	5.00±0.63 <sup>ab</sup>	81.66±19.30 <sup>a</sup>	125.28±11.99 <sup>a</sup>	24.09±4.88 <sup>a</sup>

M TPD: Mean trabecular plate density; M TPT: Mean trabecular plate thickness; M TPS: Mean trabecular plate separation; TBV: Trabecular bone volume

减少 ( $P < 0.05$ ), 破骨细胞数明显增加 ( $P < 0.01$ )。相比对照组, 硼治疗组股骨下端松质骨区柱状成骨细胞数显著增多 ( $P < 0.05$ ), 破骨细胞数显著减少 ( $P < 0.01$ ); 雌激素组松质骨区破骨细胞数与对照组比较显著下降 ( $P < 0.01$ ), 而柱状成骨细胞数减少, 扁平的成骨细胞数增多 ( $P < 0.05$ )。

表 4 大鼠股骨松质骨细胞计数结果

Tab.4 Number of osteoblast and osteoclast of cancellous bone in the rat femur (Mean±SD)

Group	n	Number of osteoblast		Number of osteoclast
		Active osteoblast	Still osteoblast	
N	8	4.25±1.28	5.50±1.69	0.44±0.49
C	8	4.58±0.90	3.67±1.37	1.17±0.75
B	8	6.65±1.89	2.30±0.63	0.50±0.47
E	6	3.00±2.10	6.67±1.75	0.50±0.55

由表 5 可知, 对照组股骨中段的皮质骨面积、皮质骨面积百分比相比正常组减少, 而骨髓腔面积百分比增加 ( $P < 0.05$ )。硼治疗组和雌激素组与对照组相比, 股骨中段的皮质骨面积、皮质骨面积百分比明显增加, 骨髓腔面积百分比明显减少 ( $P < 0.05$ )。

表 5 大鼠股骨皮质骨组织形态测量结果

Tab.5 Bone histomorphometry of cortical bone in femur of rats (Mean±SD)

Groups	n	CBA (mm <sup>2</sup> )	CBV (%)	M CV (%)
N	8	6.75±0.52	78.73±1.96	21.27±1.96
C	8	5.51±0.38	70.80±4.09	29.20±4.09
B	8	6.28±0.50	80.68±4.97	19.32±4.97
E	8	6.26±0.87	79.62±4.01	20.38±4.01

CBA: Cortical bone area; CBV: Cortical bone volume; M CV: Medullary cavity volume

### 2.4 骨密度测定 (表 6)

对照组大鼠腰椎和胫骨 BMD 相比正常组明显减低 ( $P < 0.05$ ), 全身 BMD 有减低趋势, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。硼治疗组与对照组相比, 大鼠全身、腰椎和胫骨 BMD 均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 且 BMD 超过了正常组 ( $P < 0.05$ )。雌激素组与对照组相比, 大鼠腰

椎和胫骨 BMD 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 达到了正常组水平。

表 6 大鼠骨密度测量结果

Tab.6 Comparison of BMD of the rats in different groups (Mean±SD, g/cm<sup>2</sup>)

Group	n	Whole body	Lumbar vertebrae	Tibia
N	8	0.1289±0.0117	0.1526±0.0146	0.0945±0.0083
C	8	0.1250±0.0105	0.1401±0.0131	0.0820±0.0070
B	8	0.1342±0.0127	0.1680±0.0159	0.1149±0.0103
E	8	0.1274±0.0112	0.1520±0.0149	0.0959±0.0098

### 3 讨论

骨质疏松症是一种骨量降低和骨组织结构改变, 导致骨脆性增加及骨折发生的全身性疾病。骨质疏松大鼠模型主要有维甲酸、去卵巢和糖皮质激素造模 3 种, 其中维甲酸诱导具有操作简单、时间短、成功率高和骨质疏松表现典型等优点而被经常使用<sup>[6]</sup>。本实验对照组大鼠相比正常组大鼠股骨松质骨骨小梁密度降低、稀疏, 小梁面积百分比减少; 骨髓腔扩大, 皮质骨厚度、皮质骨面积百分比降低, 腰椎、胫骨 BMD 下降, 表明松质骨、皮质骨骨量减少, 大鼠骨质疏松模型复制成功。维甲酸诱导骨质疏松可能是由于维甲酸损伤性腺, 造成雌激素降低, 削弱了对破骨细胞的抑制作用而产生的<sup>[6,7]</sup>。

硼和骨软骨代谢关系密切, 食物中硼的变化对人和动物的钙有一定的影响<sup>[8]</sup>。硼缺乏可降低血浆离子化钙和降钙素水平, 升高血浆总钙和尿钙的排泄; 缺硼可导致人和动物骨、肾和脑组织的功能、结构异常, 对骨的作用尤为明显, 被认为是骨质疏松的病因之一<sup>[9]</sup>。长期食用少量的硼、镁等微量元素可减少骨质疏松的发生<sup>[4]</sup>。V olpe 等<sup>[10]</sup>在补充微量元素防治骨质疏松的研究中表明, 补充硼可增加妇女骨矿含量, 硼的作用有可能是与其它微量元素或维生素如钙、镁和维生素 D 相互协同。Wilson 等<sup>[11]</sup>对鸟补硼的研究表明, 32 周龄的鸟补硼 200 mg/kg 到 72 周龄时, 其胫骨和桡骨抗应力骨折的能力增加。Benderdour 等<sup>[2]</sup>对硼和其衍生物的食补研究表明, 硼与钙和骨代谢有关, 补硼或其衍生物能增加血清 17β-雌激素和雄激素的含量。硼有机化合物能有效的抑制小鼠巨噬细胞和人多形核细胞、白细胞溶酶体酶、蛋白水解酶、丝氨酸弹性蛋白酶、前列腺素环氧合酶的活性, 而这些酶对骨基质有降解作用<sup>[12]</sup>。

本实验饮食加硼治疗维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的结果表明, 硼治疗 30 d 后, 骨质疏松大鼠血清硼含量明显增高; 大鼠股骨平均骨小梁数、平均骨小梁宽度、骨小梁面积百分比、皮质骨面积百分比等显著增加, 与正常组大鼠骨质无明显差异; 硼治疗组松

质骨区活跃成骨细胞数显著增加,破骨细胞明显减少,血清 AKP 活性显著升高,TRAP 活性明显下降;大鼠全身、腰椎和胫骨 BMD 显著增加。这些结果表明,饮食加硼对骨质疏松模型大鼠有明显的治疗作用,对松质骨和皮质骨骨量增加的效果和雌激素相似。但硼既可抑制破骨细胞数量,又可增加活跃成骨细胞数量,而雌激素组抑制破骨细胞数量同时,活跃成骨细胞数量有减少,这提示两者治疗骨质疏松的机理可能不同。硼防治骨质疏松的机理可能在于,硼可以减少体内钙的流失,增加镁元素生理作用,促进骨的钙化过程,提高蛋白质的代谢及雌激素水平,促进维生素 D 在体内的蓄积;也可能是硼通过参与维生素及三磷酸腺苷、磷酸肌酸转移酶、血清蛋白酶等作用,影响肾上腺、甲状腺和胰腺的功能,从而改善钙储存,降低骨质疏松发病率<sup>[12-15]</sup>。

饮食加硼能促进成骨细胞的活跃增殖,抑制破骨细胞骨吸收作用,使骨形成明显增加,大于骨吸收,而改善骨质疏松大鼠骨质,其作用机理还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43 (2): 219-31.
- [2] Benderdour M, Bui-Van T, Dicko A, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of boron and boronated compounds [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 1998, 12 (1): 2-7.
- [3] Armstrong TA, Spears JW, Crenshaw TD, et al. Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites [J]. *J Nutr*, 2000, 130 (10): 2575-81.
- [4] Hunt CD, Heibel JL, Nielsen FH. Metabolic responses of postmenopausal women to supplemental dietary boron and aluminum during usual and low magnesium intake: boron, calcium, and magnesium absorption and retention and blood mineral concentrations [J]. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65 (3): 803-13.
- [5] Grajeta H. Nutrition in prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Przegl Lek*, 2003, 60 (10): 649-53.
- [6] Javier RM, Sibilia J, Durckel J, et al. Drug-induced osteopathies [J]. *J Radiol*, 1999, 80 (7): 709-713.
- [7] 许鹏, 郭雄, 姚建锋, 等. 维甲酸诱导雌性大鼠骨质疏松的效果和机理 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8 (10): 995-8.
- [8] Armstrong TA, Flowers WL, Spears JW, et al. Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts [J]. *J Anim Sci*, 2002, 80 (1): 154-61.
- [9] Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1998, 66 (3): 299-317.
- [10] Volpe SL, Taper LJ. The relationship between boron and magnesium status and bone mineral density in the human: a review [J]. *Miner Res*, 1993, 6 (3): 291-6.
- [11] Wilson JH, Ruzsler PL. Long-term effects of boron on layer bone strength and production parameters [J]. *Br Poult Sci*, 1998, 39 (1): 11-15.
- [12] Armstrong TA, Spears JW. Effect of dietary boron on growth performance, calcium and phosphorus metabolism, and bone mechanical properties in growing barrows [J]. *J Anim Sci*, 2001, 79 (12): 3120-7.
- [13] Sheng MH, Taper LJ, Veit H, et al. Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2001, 82 (1-3): 109-23.
- [14] Sheng MH, Taper LJ, Veit H, et al. Dietary boron supplementation enhances the effects of estrogen on bone mineral balance in ovariectomized rats [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2001, 81 (1): 29-45.
- [15] Schaafsma A, de Vries PJ, Saris WH. Delay of natural bone loss by higher intakes of specific minerals and vitamins [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2001, 41 (4): 225-49.