

鹿茸血处理前后去势大鼠股骨的 SRXRF 分析

杨建虹^{1,2} 费聿荣² 曹毅^{2,3} 王瑞林² 黄宇营⁴ 何伟⁴ 刘兢¹

1 (中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230026)

2 (中国科学院研究生院生物系 北京 100049)

3 (吉林大学生命科学学院 长春 130000)

4 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

摘要 运用同步辐射 X 射线荧光 (Synchrotron radiation X-ray fluorescence, SRXRF) 技术分析鹿茸血处理前后的去势大鼠股骨元素含量及与骨密度 (Bone mineral density, BMD) 的关系。分别取出假手术组、去势组和去势后经鹿茸血处理组的雌性 Wistar 大鼠的左股骨, 经 SRXRF 分析, 结果显示: 元素 Ca、P、Zn 和 Sr 之间有非常好的正相关性。与假手术组相比, 去势大鼠股骨元素 Ca、P、Zn 和 Sr 的相对强度均有降低, 其中元素 Ca、P 的相对强度明显降低 ($p < 0.05$), 其 BMD 也显著降低 ($p < 0.05$), 说明由于 Ca 和 P 元素的大量丢失, 导致骨质疏松。用鹿茸血处理后, 去势大鼠股骨元素 Ca、P、Zn 的相对强度都有不同程度的升高, 因而其 BMD 也显著升高 ($p < 0.05$), 骨质疏松得到显著恢复。结果表明: 鹿茸血有助于维持骨组织中微量元素 Zn 的含量, 进而保持骨 Ca 和 P 的含量, 从而提高 BMD, 减少骨质疏松的发生。

关键词 元素分析, 骨质疏松, 股骨, 骨密度, 同步辐射 X 射线荧光

中图分类号 O657.34

同步辐射 X 射线荧光 (Synchrotron radiation X-ray fluorescence, SRXRF) 技术具有检出极限小、可检测元素范围大、韧致辐射小、背景低、信噪比高、对样品损伤小、多元素分析等特点, 广泛应用于材料科学、生命科学、医学以及环境科学研究^[1]。Zhang 等^[2]用 SRXRF 分析了骨质疏松病人股骨头切片的元素分布, 发现骨质疏松症样品中的 Ca 和 P 元素明显降低, 且 Ca 和 P、Zn、Sr、K 具有明显的相关性。但是, 很少有人研究经治疗后的去势大鼠股骨元素的含量及与骨密度 (Bone mineral density, BMD) 的关系。

鹿茸血是传统的名贵中药, 具有抗衰老、抗疲劳、抗辐射和提高机体免疫功能等作用。我们的研究还发现鹿茸血具有抗骨质疏松的作用。本文报道了运用 SRXRF 技术分析鹿茸血处理前后去势大鼠的股骨元素含量及与 BMD 的关系。

1 材料和方法

1.1 样品制备

15 只 10–12 周龄的雌性 Wistar 大鼠, 每只重 (200±20)g, 购于北京 Vital River 实验动物技术公司。随机分为三组, 第一组为对照组, 实施假手术; 第二、三组实施去势手术。手术 4 周后, 第三组每天接受鹿茸血 (4000 μL/kg daily) 灌胃处理。70d 后, 处死大鼠, 取出左股骨并剔除软组织, 浸泡在 10% 福尔马林溶液中备用。

1.2 骨密度测定

从福尔马林溶液中取出左股骨, 室温干燥 30min。用双能 X 射线吸收仪 (Dual energy X-ray absorptiometry, DXA; Excellplus, Norland Co. USA) 分析骨密度。

中国科学院研究生院院长基金资助 (编号: Y1016) 项目

第一作者: 杨建虹, 女, 1963 年出生, 1996 年于中国科学技术大学获硕士学位, 从事骨质疏松机理研究, 中国科学院研究生院副教授

通讯作者: 刘兢

收稿日期: 2006-09-30, 修回日期: 2007-03-30

1.3 元素分析

SRXRF 实验在北京同步辐射装置荧光试验站进行。束流能量为 2.2GeV，流强为 45–90mA，X 射线能量范围约为 3.5–22.9keV。入射 X 射线照射面积由放置在光束线前端窗口处的可调节狭缝调节，实验中固定为 20μm×20μm，狭缝距离样品约为 4cm。

样品置于 Si (Li) 探测器前 3–10cm，探测方向与同步辐射入射方向成 90°，以减小本底。探测器能量分辨率为 165eV (Mn K_{α} , FWHM)。用 2048 道脉冲幅度分析器 (MCA) 记录 XRF 谱。实验采用连续谱 X 射线。

用光学显微镜校准样品的位置，以使 X 射线能准确地照射于选定的样品区域。实验前将样本固定在样品框架上，每组取出两根左股骨，每根股骨检测 5 个位点，前后两位点相距约 0.6mm。样品照射有效时间为 100s。

用 ^{55}Fe 源的 Mn K_{α} 和 K_{β} 标定探测器，用 AXIL 软件拟合确定各道的能量值。谱峰拟合采用最小二乘法原理，根据峰高、峰位、峰半高宽和已知元素等参数，进行 2–6 次拟合，直到前后 2 次残差的变化小于 1%。最终确定峰强的对应元素。

由于实验过程中束流变化，每个样品的实际辐照量并不相同。样品–探测器距的变化等因素也会对特征 X 射线峰的强度产生影响。Ar 峰来自样品辐照区附近的空气。为对不同样品的 XRF 谱进行比较，采用 Ar 峰进行归一化处理。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 软件 (10.0 版) 对数据进行统计学处理。

2 结果和讨论

2.1 骨密度

图 1 为股骨骨密度，第一组为假手术组；第二组为去势组；第三组为鹿茸血治疗组。去势组股骨的骨密度明显低于假手术组 ($p<0.05$)，说明去势后的大鼠由于雌激素的降低导致骨质疏松症。与去势组相比，鹿茸血治疗组大鼠股骨的骨密度明显上升 ($p<0.05$)，表明鹿茸血具有抗骨质疏松的效应。

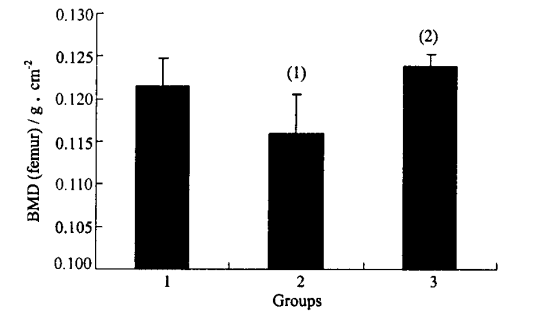


图 1 股骨骨矿密度

Fig.1 Bone mineral density of femur samples
(1) $p<0.05$, (2) $p<0.05$

2.2 股骨中元素 Ca、P、Zn 和 Sr 的相对强度

表 1 为 SRXRF 分析得到的三组大鼠股骨的 Ca、P、Zn 和 Sr 等元素峰的相对强度，系每根股骨上 10 个检测位点的平均值。实验结果表明：与假手术组相比，去势组的股骨元素 Ca、P、Zn 和 Sr 的相对强度都有降低，其中元素 Ca、P 的相对强度明显降低 ($p<0.05$)，说明由于 Ca 和 P 元素的大量丢失，可引起骨质疏松，导致 BMD 的显著降低 ($p<0.05$)。而用鹿茸血处理后，其股骨元素 Ca、P、Zn 的相对强度都有不同程度的升高，因而，BMD 也显著升高 ($p<0.05$)，骨质疏松得到显著恢复。

表 1 股骨中元素 Ca、P、Zn 和 Sr 的相对强度
Table 1 Relative intensity of the Ca, P, Zn and Sr XRF peaks from femur samples

组别 Sample group	Ca	P	Zn	Sr
假手术组 (N = 10) Sham-operated group	1072.2 ±337.2	10.32±3.12	46.93±19.30	82.32±39.61
去势组 (N = 10) Ovariectomized group	591.4±265.3 ⁽¹⁾	5.21±1.91 ⁽¹⁾	38.55±13.79	74.75±21.84
去势+鹿茸血治疗组 (N = 10) Hemo-treated ovariectomized group	850.4±317.2	6.75±2.90	51.12±15.94	70.02±10.52

第一组为假手术组；第二组为去势组 (⁽¹⁾ $p<0.05$)；第三组为鹿茸血治疗组。N 为 10 个检测位点
Group 1 is SHAM. Group 2 is OVX (⁽¹⁾ $p<0.05$, vs Group1). Group 3 is OVX fed with antler hemo. N is 10 points scanned on femur

2.3 Ca、P、Zn 和 Sr 元素的相关性分析

表 2 显示了假手术组股骨元素 Ca、P、Zn 和 Sr 之间的相关性。统计学分析表明：股骨元素 Ca 和 P、P 和 Sr、Ca 和 Zn、Ca 和 Sr 以及 Zn 和 Sr 之间有显著的正相关性，说明微量元素 Zn 和 Sr 的高低直接影响 Ca 和 P 元素的高低，从而影响骨组织的钙化过程，通过改变羟基磷灰石晶体的结构，导致 BMD 的改变，引起骨质疏松。

众所周知，骨骼是由大量元素 Ca 和 P 形成的羟基磷灰石晶体沉积在成骨细胞分泌的胶原蛋白等有机基质中形成的，而微量元素通过影响胶原蛋白的合成、骨矿物晶体结构的大小、密度和可溶性等影响骨重塑过程^[3,4]。体内外研究均报道：元素 Zn

具有刺激骨形成和抑制骨吸收的作用^[5,6]，它通过增加碱性磷酸酶等蛋白酶的活性，促进骨蛋白的合成，从而促进骨形成作用^[7]，此外，Zn 元素通过调节甲状腺分泌降钙素来影响骨转换过程^[8]。因而，缺乏元素 Zn 将导致胶原蛋白和硫酸软骨素合成的减少，碱性磷酸酶活性以及成骨细胞活性的降低^[9,10]。目前，已有实验表明：饮食中添加适量 Zn 元素，将有助于人类长骨的生长^[11,12]。我们在实验中也发现，Ca 和 Zn 具有显著的正相关性 ($p<0.05$)，而且，经过鹿茸血处理后，使 Zn 元素的含量得到提高的同时，Ca 元素的含量也随之提高，从而使 BMD 显著升高，骨质疏松得到相应改善。

表 2 Ca、P、Zn 和 Sr 元素的相关性
Table 2 Correlations among P, Ca, Zn and Sr in femur of Group 1

相关性 Correlation	P	Ca	Zn	Sr
P	1	0.985 ⁽²⁾	0.819	0.899 ⁽¹⁾
Ca	0.985 ⁽²⁾	1	0.887 ⁽¹⁾	0.936 ⁽¹⁾
Zn	0.819	0.887 ⁽¹⁾	1	0.982 ⁽¹⁾
Sr	0.899 ⁽¹⁾	0.936 ⁽¹⁾	0.982 ⁽²⁾	1

相关性显著⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$
⁽¹⁾Correlation is significant at the 0.05 level, ⁽²⁾Correlation is significant at the 0.01 level

3 结论

运用 SRXRF 技术分析去势大鼠股骨元素的含量，结果发现：元素 Ca、P、Zn 和 Sr 之间有非常好的正相关性。当大鼠去势后导致骨质疏松时，其股骨的 BMD 明显降低 ($p<0.05$)，同时，股骨元素 Ca、P、Zn 和 Sr 的相对强度都有降低，而元素 Ca、P 的相对强度明显降低 ($p<0.05$)，说明由于 Ca 和 P 元素的大量丢失，可引起骨质疏松。另外，由于 Ca 和 P 与 Zn 和 Sr 之间有明显的正相关性，所以，经过鹿茸血治疗后的去势大鼠，当其骨组织中微量元素 Zn 得到维持时，其股骨元素 Ca 和 P 的相对强度都有不同程度的升高，因而，BMD 也显著升高 ($p<0.05$)，骨质疏松得到显著恢复，说明鹿茸血可以通过改善骨组织 Zn 元素的含量达到抗骨质疏松的作用。

参考文献

1 Kang S X, Sun X J, Huang Y Y, *et al.* Nucl Instrum Methods Phys Res, 2002, **192**: 365-369
2 Zhang Y X, Cheng F, Li D, *et al.* Biol Trace Elem Res,

2005, **103**(2): 177-185
3 Bronner F. Disorder of mineral metabolism. New York: Academic Press, 1981. 55-58
4 Saltman P D, Strause L G. J Am Coll Nutr, 1993, **12**(4): 384-389
5 Kishi S, Segawa Y, Yamaquchi M. Biol Pharm Bull, 1994, **17**(6): 862-865
6 Kishi S, Yamaquchi M. Biochem Pharmacol, 1994, **48**(6): 1225-1230
7 Yamaquchi M, Yamaquchi R. Biochem Pharmacol, 1986, **35**(5): 773-777
8 Itani O, Tsang R C. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. London: Mosby, 1996. 524-528
9 Calhoun N R, Smith J C, Becker K L. Clin Orthop Relat Res, 1974, **103**: 212-234
10 Westmoreland N. Fed Proc, 1971, **30**(3): 1001-1010
11 Diaz-Gomez N M, Domenech E, Barroso F, *et al.* Pediatrics, 2003, **111**(5pt1): 1002-1009
12 Merialdi M, Caulfield L E, Zavaleta N, *et al.* Am J Clin Nutr, 2004, **79**(5): 826-830

Comparative element analysis on femur of antler hemo-treated ovariectomized Wistar rats by SRXRF

YANG Jianhong^{1,2} FEI Yurong² CAO Yi^{2,3} WANG Ruilin² HUANG Yuying⁴ HE Wei⁴ LIU Jing¹

1 (The School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

2 (Department of Biology, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

3 (The School of Life Science, Jiling University, Changchun 130000)

4 (Institute of High Energy Physics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract To investigate the relationship between bone element contents and bone mineral density (BMD), left femur of sham-operated rats (SHAM, $n=5$), ovariectomized rats (OVX, $n=5$) and antler hemo-treated ovariectomized rats (OVX+ antler hemo, $n=5$) were analyzed by synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) microprobe. The results showed that there were very good positive correlations among contents of Ca, P, Zn and Sr. In comparison to the SHAM group, decreased relative intensities of Ca, P, Zn and Sr (especially Ca and P, $p<0.05$) were observed in femur of the OVX group, which showed significant decrease ($p<0.05$) of the BMD. The results indicate that loss of Ca and P in bone will cause osteoporosis. On the other hand, increased relative intensities of Ca, P and Zn in femur, and the BMD ($p<0.05$), of the antler hemo-treated OVX group were found, in comparison to the OVX group. This suggests that antler hemo may help cure osteoporosis through maintaining bone contents of Zn, Ca and P, and increasing the BMD.

Key words Element analysis, Osteoporosis, Femur, Bone mineral density, Synchrotron radiation X-ray fluorescence
CLC O657.34