

水解蛋黄粉 Bonepep 对骨代谢的影响

吴 静^{1,2}, 宋兴安³, 堀江健二³, 金武祚³, 刘立明^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122;
3. 日本富尔玛株式会社(PFI), 日本 京都 615-8245)

摘要: 在小鼠和人体预实验水平上, 作者旨在研究源于鸡蛋蛋黄的水解蛋黄粉(Bonepep)对骨质代谢的影响。给 SD 小鼠喂食 10 mg/(kg·d)和 100 mg/(kg·d)的 Bonepep, 使小鼠胫骨伸长提高了 4.5%和 10.3%。SD 小鼠在长时间高剂量喂食后, 其喂食期间各项生理生化指标与对照组比较未发生显著变化。而摄食 Bonepep 的小鼠尿样中脱氧吡啶啉(Dpyr)含量与未喂食的对照组降低了 84.6%, 其大腿端部断面中海绵骨明显减少。女性志愿者连续服用 5 周水解蛋黄粉后, 其尿样中反映骨吸收指标的脱氧吡啶啉(DPD)与、尿中 I 型胶原交联 N 末端肽(NTx)水平无显著变化, 但反映骨形成指标的骨碱性磷酸酶(BALP)活性则提高了 14.6%。上述结果表明, 水解蛋黄粉能够有效地抑制破骨分化和促进成骨生长。

关键词: 水解蛋黄粉; 骨代谢; 破骨分化; 成骨生长

中图分类号: R 915 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)11—1227—05

Effect of Egg Yolk Powder Hydrolysis Bonepep on the Bone Metabolism

WU Jing^{1,2}, SONG Xing-an³, Kenji Horie³, Mujo Kim³, LIU Li-ming^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutics Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Pharma Foods International Co., Ltd, Kyoto 615-8245, Japan)

Abstract: In this manuscript, the effect of the egg yolk powder hydrolysis (Bonepep) on bone metabolism was investigated at rat and human level. When 10 mg/(kg·d) and 100 mg/(kg·d) Bonepep was fed to SD mice led the mice tibia elongation increased by 4.5% and 10.3%, respectively. And the physiological and biochemical indexes of mice were constant when mice were explored to high doses of Bonepep for long time. It was found that Dpyr level in urine was decreased 84.6%, and the thigh bone was significantly reduced when mice was fed Bonepep. For the female volunteers, the level of DPD and NTx, reflect the characters of bone resorption, were not significantly changed, after 5 weeks continuous taking Bonepep. However, the BALP activity, a index for bone formation, was increased by 14.6%. These results demonstrated that the egg yolk powder hydrolysis Bonepep could effectively inhibit osteoclast differentiation but promote bone growth.

Keyword: bonepep, bone metabolism, osteoclast differentiation, bone growth

收稿日期: 2012-12-02

作者简介: 吴 静(1981—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 主要从事功能性成分微生物制造方面的研究。

E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

人们迫切向往和追求高品质的健康生活,而骨质健康是所有健康问题的根本。比如婴幼儿的发育、儿童的成长、以及中老年人的骨质疏松症等都牵涉到骨质健康的问题^[1]。在世界范围内,骨质疏松症引发的健康问题越来越引起人们的重视,世界卫生组织(WHO)将其定义为由骨量减少、骨骼微细结构发生破坏所导致骨骼脆弱而易发生骨折的骨骼系统疾病。骨质疏松症的发病原因主要分为增龄型和雌性激素缺乏型两大类,好发于绝经后女性和中老年人群^[2-3]。随着世界尤其是中国“老龄化”的进程不断加快,骨质疏松症的发病率愈来愈高^[4]。研究如何保持良好的骨质成长平衡、维护骨质健康,成为世界各国研究的热点问题,与此相关的功能性保健食品市场也因此快速成长,规模逐渐扩大。

作者前期研究发现,来源于鸡蛋黄的水解蛋黄粉(Bonepep)有促进骨形成与抑制骨吸收的作用,并对其在细胞水平的生理活性以及作用机理作了深入研究^[5-6]。作者在小鼠和人体预实验水平上研究了源于鸡蛋黄的水解蛋黄粉(Bonepep)对骨质代谢的影响。结果证明,水解蛋黄粉能够有效地抑制破骨细胞分化和促进成骨细胞生长。该研究结果为Bonepep改善骨代谢作用提供详尽的事实依据,并为其推广应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水解蛋黄粉:购自日本富尔玛株式会社(PFI)生产的Bonepep。

1.2 大白鼠胫骨切片制备与胫骨伸长度测定

取3周龄的SD健康小鼠,随机分成3组,每组5只。用普通饲料饲养4周后,以含有10、100 mg/(kg·d)的Bonepep饲料,强行灌喂3 d之后,往腹腔里注射荧光基质-四环素。2 d后解剖并取出胫骨,测定48 h间的胫骨伸长度。胫骨伸长度是将取出的胫骨做成骨切片,对四环素进行免疫荧光染色,计量荧光带和生长板之间的距离来测定2 d间的胫骨伸长度^[6]。

1.3 雌性更年期模型卵巢摘除小鼠(OVX)制备

对体重为180~220 g的雌性SD小鼠20只(苏州大学实验动物中心提供)进行卵巢摘除手术:10%水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠(2.5~3.0 mL/g,在脐与耻骨前缘中点连线沿腹底壁正中线切开皮肤2~3

cm,切开腹白线及腹膜,打开腹腔,用2把镊子在切1:3下方找到子宫体及一侧子宫角,沿子宫角向前导出卵巢,用4号丝线结扎卵巢系膜血管后摘除卵巢,同法摘除另侧卵巢,将子宫复位后关腹^[7]。

1.4 生理生化指标检测

碱性磷酸酶的活性检测:调整细胞密度为 $5 \times 10^8/L$,接种于96孔板,每孔100 μL ,24 h后,换含不同浓度Bonepep的DMEM培养液培养,药物质量浓度分别为0.1、1 mg/mL,对照组为不含Bonepep的DMEM培养液,每组设3个重复孔,继续孵育72 h,于细胞培养终止前每孔加入PBS液冲洗3次,胰酶消化,每孔加入3 mL培养基终止消化,混匀离心,弃上清液,加入5 mL PBS,混匀离心,弃上清液控干,加入80 μL PBS液混匀后存于-20 $^{\circ}C$ 冰箱待检。以正常培养的细胞作对照,每组设3个复孔。

检测之前反复冻融细胞3次,超声裂解,在酶联免疫检测仪上选择405 nm波长测定吸光度值(A),换算求出样本中碱性磷酸酶活性(nkat/L)。取标准牛血清白蛋白,稀释成1 g/L,采用梯度稀释方法,得到25、50、75、100、125、150、175、200 mg/L梯度稀释液,样本取1 μL 稀释100倍,加入显色剂考马斯亮蓝1 mL,测定波长为595 nm处吸光度值,做标准曲线,计算样本总蛋白质质量浓度。最后计算出各实验组中的每毫克蛋白中相对的碱性磷酸酶活性值。

副甲状腺素水平、谷草转氨酶(Glutamic Oxalo Acetic Transaminase, GOT)和谷丙转氨酶(Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT)值检测见文献[8-9]。

1.5 有效剂量推算

采用小鼠ED50(RAT)试验得到的半数有效剂量为9.6 mg/kg(体重),根据美国FDA推荐的计算方法:

$$ED50 \times \text{实验动物换算系数} \times \text{体质量}$$

成人:9.6 mg/kg(体质量) $\times 0.162$ (小鼠指数) $\times 60$ kg(成人体质量)。

推算人体有效剂量结果为:理论计算剂量为93.312 mg/(人·日);实际推荐剂量=100 mg/(人·日);儿童推荐剂量减半=50 mg/(人·日)。

1.6 统计学处理

所有数据均以平均数 \pm 标准差表示。使用SPSS 11.5进行软件处理,采用单因素方差分析处理组间差异, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, $p < 0.01$ 为差异

有显著统计学意义, $p < 0.001$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 水解蛋黄粉对小鼠胫骨生长的影响

给小鼠喂食一定剂量的水解蛋黄粉 (Bonepep), 3 d 后取其胫骨以制备小鼠胫骨切片, 测量荧光带到生长板之间的胫骨生长度, 结果见图 1。其中图 1(a) 为各群小鼠胫骨伸长度测量示意与影像图。与对照组比较, 喂食 10 mg/(kg·d) 的小鼠胫骨伸长提高了 4.5%, 而喂食 100 mg/(kg·d) 的小鼠胫骨伸长则提高了 10.3%。在前期研究中, 已证实小鼠摄取 Ca^{+} 水解蛋黄粉显著促进胫骨的伸长^[5]。这一研究结果表明, 较高的 Bonepep 摄取量更有利于小鼠胫骨细胞增殖, 从而促进胫骨伸长。

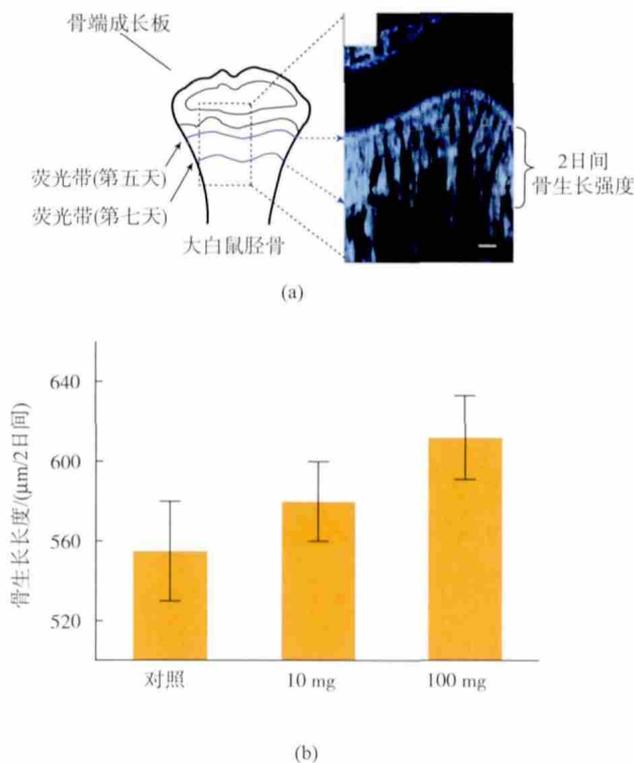


图 1 不同水解蛋黄粉剂量 Bonepep 对小鼠胫骨生长的影响
Fig. 1 Effect of bonepep concentrations on the rat tibial growth

2.2 水解蛋黄粉安全性评价实验

为了评价 Bonepep 的安全性, 在给 SD 小鼠长时间 (90 d) 服用高剂量 Bonepep 条件下监测小鼠副甲状腺素水平、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase) 活性、谷草转氨酶 (Glutamic Oxalo Acetic

Transaminase, GOT) 和谷丙转氨酶 (Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT) 值等生化指标, 结果见图 2。在初始喂食 Bonepep 时 (≤ 10 d), 副甲状腺素平均水平高出对照组 3.2 倍 (图 2A), 但统计学差异不显著表明, 但随着喂食时间的增加, 副甲状腺素水平逐渐与对照组趋于一致; 但平均碱性磷酸酶活性 (图 2B) 在监测期间始终比对照组略低 20% (无显著差异)。而 GOT 和 GPT (图 2C) 则无显著变化 (图 2C)。上述生理指标结果表明, 长时间高剂量进食 Bonepep 无危害性。

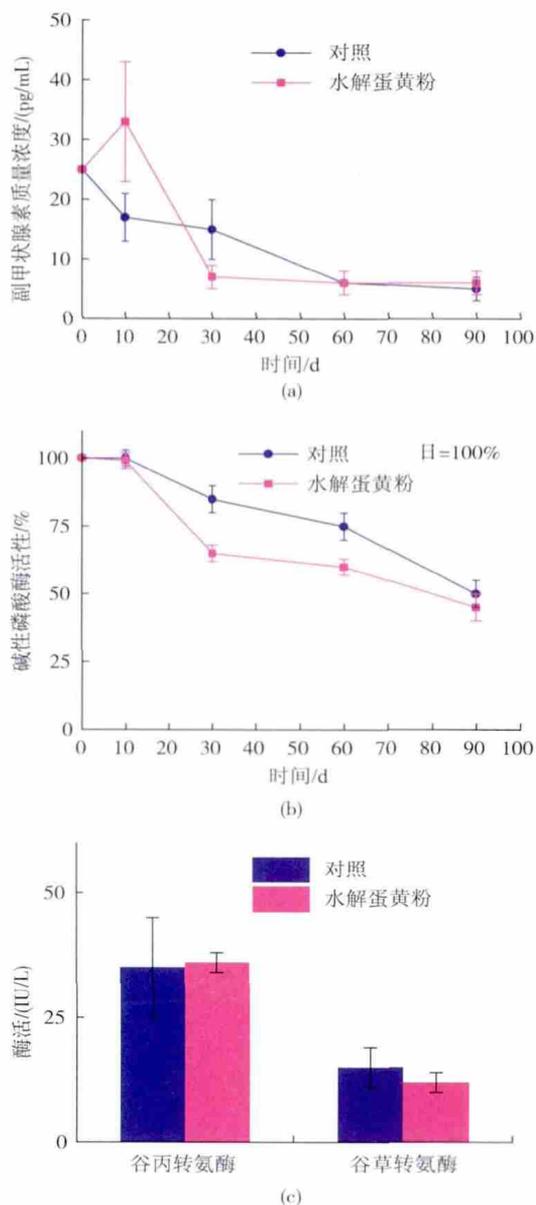


图 2 Bonepep 对小鼠生理生化指标的影响
Fig. 2 Effect of bonepep on physiological and biochemical index of rats

2.3 短期高剂量喂养水解蛋黄粉对 OVX 小鼠骨吸收的影响

将水解蛋黄粉 Bonepep 以 100 mg/(d·kg) 体重的剂量拌入绝经后骨质疏松症模型小鼠 (OVX, 卵巢摘除小鼠) 的饲料中, 采用自由进食的方式连续喂食 4 周后, 检测尿样中脱氧吡啶啉 (Dpyr) 含量, 并采用电镜扫描小鼠大腿端部断面, 结果见图 3。与对照组比较, 摄食一定量水解蛋黄粉 Bonepep 的小鼠尿样中 Dpyr 含量与未喂食的对照组降低了 84.6% (图 3A)。通过电镜扫描, 发现喂食一定量 Bonepep 的小鼠大腿端部断面中海绵骨与未喂食的对照组比较, 明显要少 (图 3B)。这一结果表明, Bonepep 有效地抑制了 OVX 小鼠尿样中 Dpyr 释放, 阻止大腿中海绵骨形成, 从而抑制骨吸收。

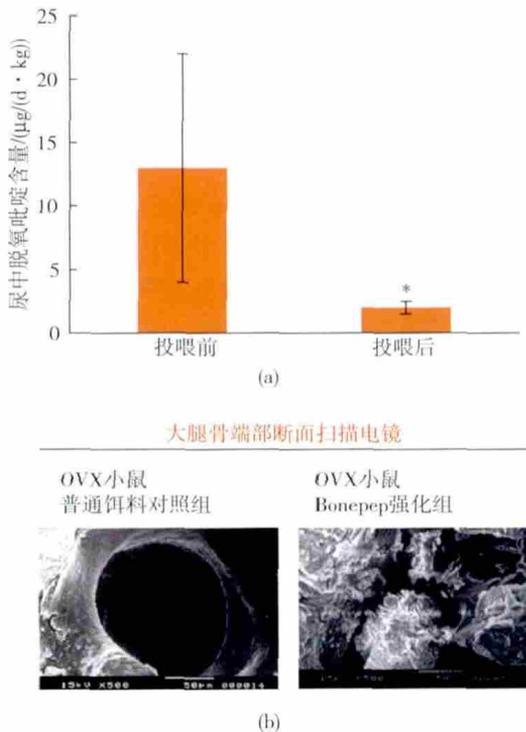


图 3 短期喂养 Bonepep 对 OVX 小鼠骨吸收的影响
Fig. 3 Effect of Bonepep on bone absorption of ovariectomized mouse with short-term feeding ($P<0.01$)

2.4 预备性临床实验研究水解蛋黄粉对人体骨代谢的影响

选取平均年龄 (30.6±1.5) 岁的 14 名健康女性志愿者, 按照随机双盲的原则分成对照组与水解蛋黄粉 (Bonepep) 摄取实验组。实验组每名志愿者起床后服用 250 mg 水解蛋黄粉 (Bonepep), 就寝前再

次服用相同剂量的水解蛋黄粉 (Bonepep), 连续服用 5 周后检测尿样中脱氧吡啶啉 (DPD)、尿中 I 型胶原交联 N 末端肽 (NTx) 和血清中骨碱性磷酸酶 (BALP) 活性等骨代谢特异性指标, 结果见图 4。发现与对照组比较, 反映骨吸收指标的 DPD 与 NTx 水平无显著变化, 但反映骨形成指标的 BALP 活性则提高了 14.6%, 表明水解蛋黄粉 (Bonepep) 能够有效地抑制破骨分化和促进成骨生长。此外, 对志愿者的骨密度进行测定, 结果与骨代谢血液特异指标结果是一致的。表明 Bonepep 能够有效地抑制骨密度减少, 从而改善人体骨质代谢。

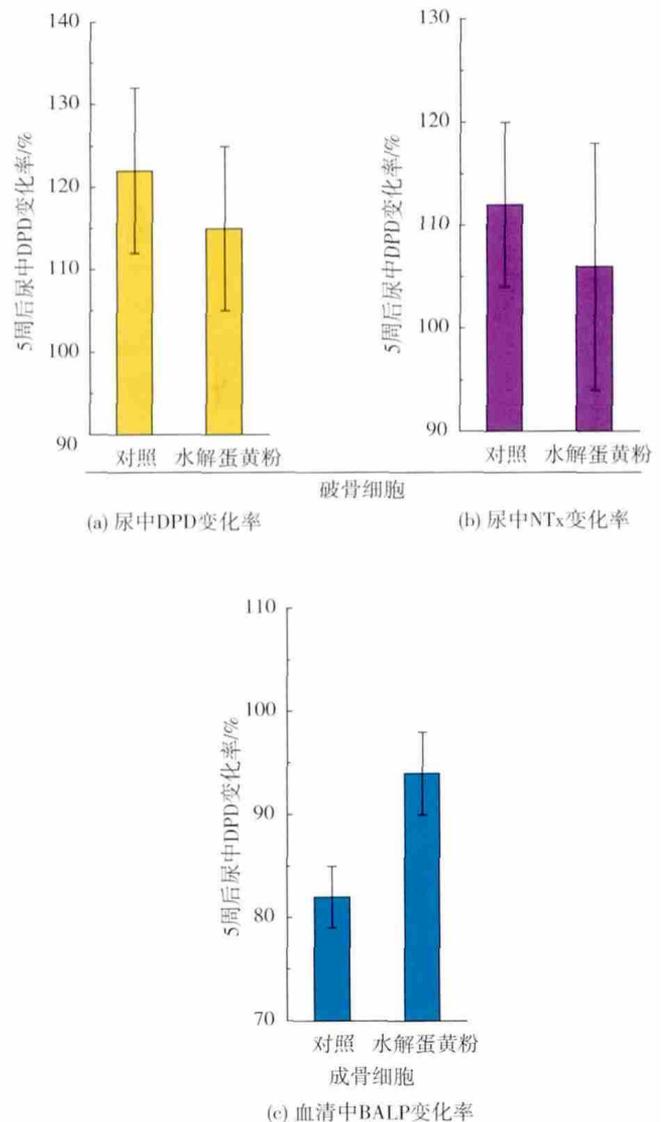


图 4 Bonepep 对人体骨代谢的影响
Fig. 4 Effect of Bonepep on bone metabolism of human body ($*p<0.05$)

3 结 语

作者通过动物实验(SD 小鼠)证实适量的水解蛋黄粉(Bonepep)能够显著促进胫骨伸长,且无副作用,进一步通过短期喂养 OVX 小鼠模拟更年

期妇女发现水解蛋黄粉(Bonepep)显著抑制骨吸收,且能有效改善人体骨质代谢,根据预备性临床实验研究早晚各服用 250 mg 水解蛋黄粉,连续服用 5 周,能够有显著效果。

参考文献:

- [1] 常璟宇. 新资源食品——水解蛋黄粉[J]. 中国食品, 2011, 9: 65.
CHANG Jing-yu. New resources of food-egg yolk powder hydrolysis[J]. **China Food**, 2011, 9: 65. (in Chinese)
- [2] 许超, 肖鲁伟, 童培建, 等. 骨质疏松症与抑郁症关系的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(9): 693-696.
XU Chao, XIAO Lu-wei, TONG Pei-jian, et al. Relationship between osteoporosis and depression [J]. **Chinese Journal of Osteoporosis**, 2009, 15(9): 693-696. (in Chinese)
- [3] 张岩. 预防老年人骨质疏松[J]. 护士进修杂志, 2010, 25(3): 195-197.
ZHANG Yan. Prevent osteoporosis of aged people[J]. **Journal of Nurses Training**, 2010, 25(3): 195-197. (in Chinese)
- [4] 杨文星, 罗炳杰. 36 例外伤性脾破裂的诊治体会[J]. 广西医学, 2000, 22(6): 1349-1350.
YANG Wen-xing, LUO Bing-jie. The experience of treating 36 patients with traumatic rupture of spleen [J]. **Guangxi Medical Journal**, 2000, 22(6): 1349-1350. (in Chinese)
- [5] Leem K H, Kim M G, Kim H M, et al. Effects of egg yolk proteins on the longitudinal bone growth of adolescent male rats[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2004, 68(11): 2388-2390.
- [6] Song M Y, Sauchi Y K, Yun S S, et al. Development of bonepep bone metabolism-improving ingredient derived from egg yolk[J]. **China Food Activities**, 2010, 1: 187-190.
- [7] 杨帆, 王广义, 张海玉, 等. 雌激素对更年期小鼠血压的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9): 1615-1616.
YANG Fan, WANG Guang-yi, ZHANG Hai-yu, et al. The effect of estrogen on blood pressure of climacteric mice [J]. **Chinese Journal of Gerontology**, 2011, 31(9): 1615-1616. (in Chinese)
- [8] Faryal S Mirza, I Desmond Padhi, Lawrence G Raisz, et al. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women[J]. **Clin Endocrinol Metab**, 2010, 95(4): 1991-1997.
- [9] Takahiro Kataoka, Yuichi Nishiyama, Teruaki Toyota, et al. Radon inhalation protects mice from carbon-tetrachloride-induced hepatic and renal damage[J]. **Inflammation**, 2011, 34(6): 559-567.

科 技 信 息

美国 FDA 撤销含砷动物饲料许可

2013 年 9 月 30 日, 美国食品和药物管理局回应了一个食品安全中心请求, 要求尽快撤销绝大多数用于鸡、火鸡、猪的含砷动物饲料许可。美国 FDA 将撤销 101 项含砷动物饲料许可当中的 98 项。

砷属于重金属, 会引起胃痛、手脚麻木以及局部麻痹等症状, 无机砷被列为致癌物质, 与膀胱癌、肺癌、皮肤癌等癌症相关联。砷被添加于饲料中, 用于促进动物快速育肥, 并使得肉品呈现健康的颜色。近期研究发现, 没有致癌性的有机砷在动物组织内会转变成无机砷。砷在 1940 年代的美国被批准作为动物饲料。它从来没有被批准用于欧洲、日本和其他国家。

[信息来源] Linda Larsen. FDA Withdraws Approval of Arsenic in Animal Feed [EB/OL]. (2013-10-2). <http://foodpoisoningbulletin.com/2013/fda-withdraws-approval-of-arsenic-in-animal-feed/>