

氨糖养骨片食用安全性和增加骨密度功能的实验研究

周跃会 张云南 汪维春 罗庆红

成都奥达康科技有限公司研究中心 成都 610041

【摘要】目的 将氨基葡萄糖、胶原蛋白、透明质酸钠、维生素 K₂、维生素 D₃ 等营养成分组成不同配伍,开展配方组份功能筛选实验,开发具有增加骨密度功能的氨糖养骨片并考察其安全性。**方法** 采用经口急毒实验、三项遗传毒性实验及大鼠 30d 喂养实验评价食用氨糖养骨片的安全性;将去卵巢骨质疏松大鼠分为氨糖养骨片剂量组(250、500、1000mg/kg.bw)、拆方 I 组(D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 165mg/kg.bw)、拆方 II 组(D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 165mg/kg.bw+维生素 K₂ 粉 3.2mg/kg.bw)、拆方 III 组(维生素 K₂ 粉 3.2mg/kg.bw+维生素 D₃ 粉 0.26mg/kg.bw),另设假手术组与模型对照组,灌胃 90d,评价氨糖养骨片及其组份不同配伍的保健功能。**结果** 经口给药,小鼠最大耐受剂量(MTD) > 10g/kg.bw,提示氨糖养骨片属于实际无毒级;三项遗传毒性实验结果均为阴性,未见氨糖养骨片有致突变作用;大鼠喂养 30d 后,高剂量组(人体推荐量的 100 倍)未见与氨糖养骨片相关的毒副作用。氨糖养骨片各剂量组及各拆方组均能显著增加骨质疏松模型大鼠股骨骨密度(P<0.05 或 P<0.01),氨糖养骨片高剂量组能明显升高大鼠骨钙含量(P<0.05),与各拆方组比较,全配方功效更加显著(P<0.05 或 P<0.01)。**结论** 氨糖养骨片中各营养成分的不同复配组合均能改善骨质疏松,具有协同效益,安全无毒副作用适宜长期食用。

【关键词】 氨糖养骨片;食用安全性;骨密度功能

【中图分类号】 R965

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4596 (2022) 05-009-02

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是最具代表性的全身性骨骼疾病,其主要特征为骨量减少、骨脆性增加、骨组织微结构损坏导致骨折风险升高。一项针对中国大陆与香港、台湾等地区骨质疏松症及骨折患病率的调查结果显示,女性、老年人的患病率高于其他人群,北方居民患病率高于其他区域。骨质疏松性骨折的发病率在香港和台湾虽有所下降,但总体仍呈上升趋势。中国人口众多,医疗资源相对有限,骨质疏松症的诊治及骨折后的处理仍然处于严重不足的状态。骨质疏松症的最终诊断基于骨密度测量结果和/或脆性骨折史^[1]。临床常采用双能量 X 射线骨密度仪通过骨扫描检测骨密度值来诊断骨质疏松症,并判断骨折风险高低。骨折风险随骨密度减少而相应增加。因此,常采用营养、药物、运动等多种措施来增加骨密度,维持骨质量,减缓骨丢失,从而防治骨质疏松症^[2]。本研究将氨基葡萄糖、胶原蛋白、透明质酸钠、维生素 K₂、维生素 D₃ 等营养成分进行复配,开发具有增加骨密度功能的氨糖养骨片,为骨质疏松症的防治提供选择。现将配方功能筛选实验与安全性评价结果报告如下。

1 氨糖养骨片安全性毒理学评价

1.1 材料

氨糖养骨片(YG):每 100g 含 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 50g,胶原蛋白粉 16.5g,透明质酸钠 2.5g,维生素 K₂ 粉 1.0g,维生素 D₃ 粉 0.08g。推荐服用量为 1g/片×3 片/人·d。体重按 60kg 计算,折合剂量 0.05g/kg.bw。配方中 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐以盐酸氨基葡萄糖为起始物经溶解、脱氯、成盐、络合、结晶等主要工艺制成;胶原蛋白粉以冻畜骨为原料经煮制、酶解等主要工艺制成;透明质酸钠含量≥95%;维生素 K₂ 粉含量≥0.2%;维生素 D₃ 粉含量≥0.25%。取氨糖养骨片粉碎成粉末作为受试物。

实验动物:清洁级昆明种小鼠和 SD 大鼠。

仪器设备:超净工作台(苏信)、电子分析天平(十万分之一)、生物显微镜(凤凰)、赛默飞全自动血球计数仪、全自动生化分析仪(BK-400 博科)、其他解剖器械;

试剂:环磷酸胺、丝裂霉素 C。

1.2 评价方法

按保健食品相关评价标准与规范进行经口急毒实验,遗传

毒性实验和大鼠喂养实验(30d)。遗传毒性实验包括小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验(PCE)、Ames 污染物致突变性实验、小鼠精子畸形实验(MSAT)等三项。

1.3 数据统计

软件:SPSS。录入数据后先进行方差齐性检验,如果方差齐性,则进行单因素方差分析,目的为比较总体差异,若发现差异,则将剂量组与对照组均数两两比较。方差不齐则采取数据转换、秩和检验等方法进行分析。以 P<0.05 作为具有统计学意义的标准。

1.4 评价结果

经口急毒实验:本实验所用雌、雄小鼠对氨糖养骨片的最大耐受量(MTD)均>10 g/kg·bw,表明氨糖养骨片为实际无毒类物质。

遗传毒性实验:三项均为阴性,表明氨糖养骨片没有致突变作用。

大鼠喂养实验(30d):剂量组:1.25、2.50、5.00g/kg.bw。方法:大鼠连续 30d 经口按设计剂量给予氨糖养骨片粉末。结果:高剂量(人体推荐量的 100 倍)喂食,大鼠整体健康状况良好,饮水、进食、二便无改变,生理生化检测指标均在正常值范围内,器官组织形态学未发生形态改变。

2 氨糖养骨片及组份增加骨密度功能评价

2.1 材料

受试样品同 1.1,全配方组取氨糖养骨片样品粉碎成粉末后进行实验,各拆方组以相应原料混合物进行实验。

实验动物:SPF 级雌性 SD 大鼠,220-250g。

主要仪器:电子天平、连续光源原子吸收光谱仪(contrAA700)、QDR-4000 型双能 X 线骨密度仪(HOLOGIC)。

2.2 评价方法

按保健食品相关评价标准与规范,按人体推荐量的 5、10、20 倍设全配方三个剂量组,分别给予氨糖养骨片 250、500、1000mg/kg.bw,另设三个拆方给药组,即拆方 I 组(D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 165mg/kg.bw)、拆方 II 组(D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 165mg/kg.bw+维生素 K₂ 粉 3.2mg/kg.bw)、拆方 III 组(维生素 K₂ 粉 3.2mg/kg.bw+维生素 D₃ 粉 0.26mg/kg.bw)。雌性去势大鼠按上述剂量分别灌胃给予相应受试液,假手术

组、模型组灌胃去离子水, 各组大鼠均为 10 只, 给药 90d。

2.3 数据统计

用 SPSS 软件进行方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4 评价结果

2.4.1 对大鼠股骨长度和骨密度的影响

实验结果表明, 氨糖养骨片 5、10、20 倍剂量及三个拆方组大鼠股骨长度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。从大鼠股骨

中心、远心端骨密度指标来看, 模型对照组比假手术组大鼠均显著降低 ($P<0.01$)。与模型对照组相比, 氨糖养骨片各剂量组、拆方 I 组、II 组的股骨中心骨密度明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 各用药组股骨远心端骨密度均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 全配方组的功效强于各拆方组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果如表 1 所示。

表 1: 样品对大鼠股骨长度和骨密度的影响

分组	给药剂量 (mg/kg.bw)	(mm)	股骨中心骨密度	股骨远心端骨密度
假手术组	--	36.93±0.83	0.232±0.015	0.297±0.017
模型对照组	--	37.04±0.91	0.172±0.010 ^{aa}	0.206±0.008 ^{aa}
拆方 I 组	GS 165	37.81±0.69	0.192±0.012 ^b	0.274±0.011 ^b
拆方 II 组	GS 165+VK ₂ 3.2	37.45±0.72	0.201±0.016 ^b	0.271±0.009 ^b
拆方 III 组	VK ₂ 3.2+VD ₃ 0.26	38.06±0.12	0.180±0.011	0.268±0.017 ^b
全方低剂量组	YG 250	37.90±0.76	0.199±0.023 ^{bc}	0.270±0.010 ^b
全方中剂量组	YG 500	37.29±0.96	0.210±0.010 ^{bcdcc}	0.275±0.013 ^b
全方高剂量组	YG 1000	38.02±0.30	0.229±0.013 ^{bcdccc}	0.289±0.016 ^{bcdccc}

注: ^{aa} 相比假手术组 $P<0.01$; ^b 相比模型组比较 $P<0.05$; ^{bb} 相比模型组比较 $P<0.01$; ^c 相比拆方 I 组 $P<0.05$; ^d 相比拆方 II 组 $P<0.05$; ^{dd} 相比拆方 II 组 $P<0.01$; ^e 相比拆方 III 组 $P<0.05$; ^{ee} 相比拆方 III 组 $P<0.01$ 。

2.4.2 对大鼠股骨重量和骨钙含量的影响

实验结果表明, 各组间大鼠股骨重量无显著性差异 ($P>0.05$)。模型对照组与假手术组相比, 模型对照组大鼠骨钙含量明显降低 ($P<0.01$)。氨糖养骨片高剂量组与模型对照组相比, 氨糖养骨片高剂量组骨钙含量明显升高 ($P<0.05$), 与拆方 I 组、III 组相比, 氨糖养骨片高剂量组骨钙含量明显升高 ($P<0.05$)。结果如表 2 所示。

表 2: 样品对大鼠股骨重量和骨钙含量的影响

分组	给药剂量 (mg/kg. bw)	骨钙含量 (g)	骨钙含量 (mg/g)
假手术组	--	0.667±0.050	161.0±39.8
模型对照组	--	0.638±0.043	110.3±21.5 ^{aa}
拆方 I 组	GS 165	0.654±0.032	124.7±23.7
拆方 II 组	GS 165+VK ₂ 3.2	0.638±0.043	135.2±21.0
拆方 III 组	VK ₂ 3.2+VD ₃ 0.26	0.655±0.031	121.4±28.3
全方低剂量组	YG 250	0.649±0.048	120.7±25.0
全方中剂量组	YG 500	0.660±0.039	132.0±36.1
全方高剂量组	YG 1000	0.658±0.057	159.3±28.7 ^{bcc}

注: ^{aa} 相比假手术组 $P<0.01$; ^b 相比模型组 $P<0.05$; ^c 相比拆方 I 组 $P<0.05$; ^e 相比拆方 III 组 $P<0.05$ 。

3 讨论

氨基葡萄糖是人体关节软骨基质和滑液中蛋白多糖的重要成分, 能刺激软骨细胞产生蛋白多糖, 促进软骨基质中胶原蛋白的合成, 维护关节软骨的形态结构^[3]。胶原蛋白在软骨中累积, 有助于增加成骨细胞数量, 促进新骨形成, 调整骨骼构成和骨矿分布以维持骨密度。口服氨基葡萄糖的同时补充胶原蛋白, 能使氨基葡萄糖形成强韧的网状组织, 减少氨基葡萄糖在体内的代谢流失^[4]。透明质酸属酸性粘多糖, 可润滑关节并参与软骨修复。外源性补充透明质酸通常采用关节腔内注射透明质酸钠^[5]。有文献报道, 经口灌胃 1mg/kg 透明质酸能抑制去势大鼠骨质减少^[6]。维生素 K 参与骨代谢, 可促进骨矿化、抑制骨吸收, 常与维生素 D₃ 联合使用^[7]。维

生素 D 主要作用为维持机体钙、磷代谢平衡, 必要时补充维生素 D₃ 可降低维生素 D 缺乏引起的负钙平衡、骨丢失加快、骨质疏松等的风险^[8]。本研究将氨基葡萄糖作为关键成分, 复配胶原蛋白、透明质酸钠、VK₂、VD₃ 等营养成分, 形成既增加骨密度又增加骨钙量的强效配方。研究结果显示, 上述营养成分的不同配伍组合均能使去卵巢骨质疏松大鼠骨密度增加, 整合配伍具有协同效益。

参考文献

- [1] Yu,Fan;Xia,Weibo (2019).The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China. Archives of Osteoporosis, 14(1), 32.
- [2]Lewiecki, E. Michael (2008).Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America, 35(2), 301-315.
- [3] Oegema TJ,Deloria LB,Sandy JD,et al(2002). Efect of oral glu- cosamine on cartilageand meniscus in normal and chymopain-injected knes of young rabbits. Arthritis Rheum,46 (9):2495-2503.
- [4] 杨文凤, 郑芝才. 胶原蛋白与老年人骨骼健康 [C]. “食品加工与安全”学术研讨会暨 2010 年广东省食品学会年会论文集, 2010:260-263.
- [5] 程金生. 100 例透明质酸钠治疗膝关节骨性关节炎的临床分析 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(10):140.
- [6]Ma,J., Granton,P.V., Holdsworth,D.W.,&Turley,E. A. (2013). Oral Administration of Hyaluronan Reduces Bone Turnover in Ovariectomized Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(2), 339-345.
- [7] 郭彬, 胡雪松, 彭方毅. 维生素 K 对骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(7):47-50.
- [8] 宁雯雯, 马瑛. 绝经后骨质疏松症与维生素 D 相关性的研究进展 [J]. 四川医学, 2021, 42(5):520-524.