

# 不同骨密度测量方法在补钙剂评价中的应用

张 朋, 沈 洁, 刘福康, 王婷婷, 印 虹, 孙桂菊\*

(东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009)

**摘 要:** 目的: 评价某补钙为主保健食品增加大鼠骨密度的功效, 比较双能 X 线吸收法(DEXA)与阿基米德定律法在骨密度测量中的应用。方法: 参照《保健食品检验与技术评价规范》(2003 版)“增加骨密度功能检验方法”方案一, 将 45 只断乳 Sprague-Dawley 大鼠按体重随机分为碳酸钙对照组、低钙对照组和保健品低、中、高剂量组(0.17、0.33、1.00g/kg), 对某保健食品进行评价。结果: 保健品高剂量组及碳酸钙对照组大鼠在钙表观吸收率、质量增加量、骨密度及骨钙含量上明显高于低钙对照组( $P < 0.05$ )。除骨密度外, 保健品高剂量组同碳酸钙对照组相比各指标差异不显著; DEXA 法与阿基米德定律法所测骨密度结果相关性较好。结论: 该保健食品对大鼠有增加骨密度作用; DEXA 法与阿基米德定律法均可用于动物实验中骨密度的测定。

**关键词:** 大鼠; 骨密度; X 线吸收法; 阿基米德定律

## Application of Different Bone Mineral Density Measurements in the Assessment of Calcium Supplement

ZHANG Peng, SHEN Jie, LIU Fu-kang, WANG Ting-ting, YIN Hong, SUN Gui-ju\*

(School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Objective: To assess the enhancing effect of a commercially available calcium supplement on bone mineral density in rats and to compare the application of dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) and Archimedes' principle bone mineral density. Methods: According to Protocol 1 from "Method for Testing the Function of Increasing Bone Density" 2003 *Technical Standards for Testing and Assessing of Health Food*, 45 weaned SD rats were divided at random into calcium carbonate control group, low calcium control group, and high-dose, medium-dose and low-dose calcium supplement groups (administered at doses of 1.00, 0.33 g/kg and 0.17 g/kg, respectively). Results: The high-dose group showed a significant increase in apparent calcium absorption rate, body weight gain, and bone mineral density and calcium content when compared with the low-dose group ( $P < 0.05$ ). All indexes investigated except bone mineral density indicated no significant difference between the high-dose and calcium carbonate control groups. There was a good correlation between the results of bone mineral density determination by the DEXA method and Archimedes' principle. Conclusions: The calcium supplement has an enhancing effect on bone mineral density in rats. Moreover, the DEXA method and Archimedes' principle are both applicable for the determination of bone mineral density.

**Key words:** rats; bone mineral density (BMD); dual energy X-ray absorptiometry (DEXA); Archimedes' principle  
中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)05-0272-03

随着经济发展和社会进步, 人们的健康状况不断改善, 健康意识也不断增强。尽管如此, 公众在饮食习惯上仍存在着不合理之处。在钙摄入方面, 绝大部分人达不到《中国居民膳食营养素参考摄入量》中推荐量(800mg/d)的要求<sup>[1-2]</sup>。对婴幼儿、孕妇、绝经期妇女及中老年人等特殊人群而言, 钙是比较容易缺乏的营养素之一, 摄入足量的钙对促进骨骼发育、增加骨密度及改善骨质疏松症状具有重要的作用<sup>[3-6]</sup>。在这种情况下, 具有增加骨密度功能的保健食品越来越受到人们的青睐。

目前我国用于对这类保健食品功效评价的标准为《保健食品检验与评价技术规范》中“增加骨密度功

能检验方法”, 在实际应用中发现这一方案存在些许不妥之处, 现以某以补钙为主的保健食品为受试物验证并评价该方法中方案一部分, 并比较双能 X 线吸收法(dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA)法与阿基米德定律法在骨密度检测中的应用效能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

某保健食品(含碳酸钙 25%, 其余为 D- 盐酸氨基葡萄糖、VK<sub>1</sub>、骨碎补提取物等) 哈药集团制药六厂, 批

收稿日期: 2011-09-07

作者简介: 张朋(1985—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品毒理与食品功效研究。E-mail: zp109324215@163.com

\* 通信作者: 孙桂菊(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品毒理与食品功效研究。E-mail: gjsun@seu.edu.cn

号为20100105; 钙标准溶液 环境保护部标准样品研究所, 批号101505。

QDR-4000型骨密度仪 美国Hologic公司; LA型固体骨密度仪 德国Sartorius公司; 9602A型火焰原子吸收分光光度计 沈阳华光精密仪器有限公司。

## 1.2 方法

按照文献[7]中“增加骨密度功能检验方法”中方案一进行。

### 1.2.1 实验动物

清洁级雌性SD大鼠45只, 体质量73~93g, 购于浙江省实验动物中心, 许可证号: SCXK(浙)2008-0033, 动物使用许可证号: SYXK(苏)2008-0003。

### 1.2.2 钙吸收实验

实验进行3周后进行3d钙代谢实验。记录3d内饲料的摄入量与粪便、尿液的排泄量。使用原子吸收分光光度法测定饲料、粪样和尿样中钙含量, 计算钙表观吸收率和钙保留率。

$$\text{钙表观吸收率}/\% = \frac{\text{摄入钙含量} - \text{粪钙含量}}{\text{摄入钙含量}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{钙保留率}/\% = \frac{\text{摄入钙含量} - \text{粪钙含量} - \text{尿钙含量}}{\text{摄入钙含量} - \text{粪钙含量}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.2.3 骨密度实验

大鼠适应环境3d后, 按体质量随机分为低钙对照组, 保健品低、中、高剂量组和碳酸钙对照组。其中, 低钙对照组使用去离子水灌胃干预90d, 保健品低、中、高3个剂量组依次给予剂量为0.17、0.33g/kg和1.00g/kg的保健品去离子水溶液进行干预, 此干预剂量相当于该保健食品的5、10倍和30倍的人体推荐摄入量。碳酸钙对照组使用钙含量与保健品高剂量组相同的去离子水溶液灌胃干预。

每周测体质量1次, 干预90d后处死大鼠。取左侧股骨经105℃烘干至质量恒定, 分别使用骨密度仪(DEXA法)及固体骨密度仪(阿基米德定律法)测股骨密度; 以湿硝化法硝化股骨, 使用原子吸收分光光度法测定骨钙含量。

## 1.3 统计分析

使用SPSS13.0进行方差分析, 不符合方差分析条件的先进行数据转换, 否则使用秩和检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 保健品样品对大鼠钙吸收的影响

由表1可见, 不同组别大鼠在钙的吸收上存在一定差别。碳酸钙对照组、保健品高剂量组及中剂量组大鼠钙表观吸收率, 其差异显著高于低钙对照组

( $P < 0.05$ ); 而各组别大鼠的钙保留率上看则相差不大, 差异没有显著性。

表1 保健品样品对大鼠钙吸收的影响

Table 1 Comparisons of apparent calcium absorption rate, calcium retention rate among different rat groups

| 组别      | 钙表观吸收率/%    | 钙保留率/%     |
|---------|-------------|------------|
| 低钙对照组   | 64.2 ± 4.6  | 99.1 ± 0.6 |
| 保健品低剂量组 | 66.1 ± 5.5  | 99.3 ± 0.4 |
| 保健品中剂量组 | 74.6 ± 5.5* | 98.9 ± 0.7 |
| 保健品高剂量组 | 76.1 ± 5.5* | 99.2 ± 0.4 |
| 碳酸钙对照组  | 76.0 ± 5.8* | 99.1 ± 0.9 |

注: \*, 同低钙对照组相比, 有显著性差异( $P < 0.05$ )。下同。

### 2.2 保健品样品对大鼠体质量的影响

表2 保健品样品对大鼠体质量的影响

Table 2 Comparison of body weight gain among different rat groups

| 组别      | 体质量/g      |               | 体质量增加量/g      |
|---------|------------|---------------|---------------|
|         | 实验初        | 实验末           |               |
| 低钙对照组   | 82.6 ± 4.2 | 261.0 ± 7.2   | 178.4 ± 5.7   |
| 保健品低剂量组 | 82.0 ± 4.6 | 267.0 ± 14.1  | 185.0 ± 12.4  |
| 保健品中剂量组 | 82.9 ± 4.9 | 272.5 ± 15.9  | 189.7 ± 16.4  |
| 保健品高剂量组 | 81.2 ± 4.6 | 277.5 ± 15.1  | 196.3 ± 14.5* |
| 碳酸钙对照组  | 82.4 ± 3.5 | 280.1 ± 12.7* | 197.7 ± 14.1* |

由表2可见, 实验初, 各组大鼠体质量之间差异不显著, 实验结束后, 在体质量方面, 碳酸钙对照组大鼠同低钙对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ); 碳酸钙对照组及保健品高剂量组大鼠在体质量增加量上同低钙对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.3 保健品样品对大鼠骨密度及骨钙含量的影响

表3 保健品样品对大鼠骨密度的影响

Table 3 Comparison of bone mineral density among different rat groups

| 组别          | 阿基米德定律法骨密度/(g/cm <sup>3</sup> ) | DEXA法骨密度/(g/cm <sup>2</sup> ) |                    |                    |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
|             |                                 | 股骨远心端                         | 股骨中点               | 整根股骨               |
| 低钙对照组       | 0.819 ± 0.034                   | 0.065 ± 0.006                 | 0.052 ± 0.006      | 0.056 ± 0.005      |
| 保健品低剂量组     | 0.873 ± 0.038*                  | 0.077 ± 0.007*                | 0.065 ± 0.007*     | 0.068 ± 0.007*     |
| 保健品中剂量组     | 0.919 ± 0.076*                  | 0.081 ± 0.013*                | 0.069 ± 0.009*     | 0.070 ± 0.010*     |
| 保健品高剂量组     | 1.089 ± 0.037*                  | 0.098 ± 0.008*                | 0.080 ± 0.010*     | 0.085 ± 0.005*     |
| 碳酸钙对照组      | 1.062 ± 0.039*                  | 0.088 ± 0.017*                | 0.071 ± 0.009*     | 0.076 ± 0.009*     |
| Pearson相关系数 | 1 <sup>b</sup>                  | 0.784 <sup>b</sup>            | 0.833 <sup>b</sup> | 0.865 <sup>b</sup> |

注: a. 同一列中碳酸钙对照组同保健品高剂量组相比, 有显著性差异( $P < 0.05$ ); b. 以固体密度仪法结果为基准, 同固体密度仪法、DEXA法所测股骨远心端、中点、整根股骨骨密度相关系数对应P值均为0.000。

由表3可见, 由骨密度结果来看, 低钙对照组骨密度均显著低于其余各组( $P < 0.05$ )。碳酸钙对照组同保健品高剂量组相比尽管给予的钙含量相同, 但骨密度均值相对较小。碳酸钙组的股骨中点密度及整根股骨密度显著低于保健品高剂量组( $P < 0.05$ )。

将两种方法所测骨密度数据做Pearson相关, 并定义 $P < 0.01$ 时为有效, 所得结果见表3。结合P值可以判定, 固体密度仪法与DEXA法所测结果的相关系数有统计学意义。

表4 保健品样品对大鼠骨钙含量的影响

Table 4 Comparison of bone calcium content among different rat groups

| 组别      | 骨钙含量/(mg/g)   |
|---------|---------------|
| 低钙对照组   | 185.9 ± 14.6  |
| 保健品低剂量组 | 187.3 ± 39.7  |
| 保健品中剂量组 | 197.7 ± 13.1  |
| 保健品高剂量组 | 221.7 ± 26.3* |
| 碳酸钙对照组  | 219.8 ± 20.9* |

由表4可见, 碳酸钙对照组、保健品高剂量组大鼠骨钙含量同低钙对照组相比显著升高( $P < 0.05$ ), 其中高剂量保健品组大鼠骨钙含量高于碳酸钙对照组, 但两组间差异在统计学上没有显著性。

### 3 讨 论

《保健食品检验与技术评价规范》(2003版)“增加骨密度功能检验”方案一中规定, 骨钙含量或骨密度显著高于低钙对照组且不低于相应剂量碳酸钙对照组, 钙的吸收率不低于碳酸钙对照组, 可判定受试物具有增加骨密度功能的作用。根据本实验中钙代谢实验、体质量、骨密度结果和骨钙含量结果可以判定, 受试物具有增加骨密度功能。

在对钙的代谢情况上看, 原方法仅考虑的表观吸收率, 并未考虑保留率的情况。钙保留率体现了机体对钙的消化吸收的情况, 考虑了经口摄入机体的钙经过一系列代谢转化后经过尿液排泄的情况。在钙保留率的基础上探讨钙吸收率的差异, 结果更可信。以低钙饲料饲喂生长发育期大鼠时, 钙缺失导致的营养不良会直接影响其体格的增长; 而在补钙的同时补充其他有益骨代谢的物质, 可以促进大鼠生长发育<sup>[8]</sup>。本实验结果显示, 在实验末, 碳酸钙对照组和保健品高剂量组大鼠体质量的增加明显大于低钙对照组, 且保健品高剂量组的钙吸收率和保留率与碳酸钙组比较差异无统计学意义; 就骨密度结果而言, 碳酸钙对照组同保健品高剂量组相比尽管给予的钙的量相同, 但碳酸钙对照组骨密度均值相对较小, 可能是因为多种功效成分的复合作用促进了钙的吸收。

文献[7]中规定, 测定骨密度时可使用单光子骨密度仪、双能X线骨密度仪或相关仪器。而临床上测骨密度诊断骨质疏松的“金标准”是DEXA<sup>[9-10]</sup>。DEXA法是非创伤性测量手段, 主要利用骨组织对能量吸收的差异, 推算骨组织的密度值, 以单位面积上骨矿物质含量作为骨密度。此法扫描速度快, 精密度与准确度高, 但受骨几何尺寸影响<sup>[11]</sup>, 且仪器体积大, 携带不便, 价钱昂贵, 具有放射性污染, 只能固定在有防护装置的实验室使用。固体密度测量仪测定骨密度的原理是基于阿基米德定律。利用股骨的排水量计算体积, 结合质量求出骨密度。这样得到的骨密度为真正意义的物

理密度。除此以外, 固体密度仪还具有快速、经济、便携、无放射性污染、操作过程简单等优点。

在国外, 应用阿基米德定律测定骨密度是测定小动物骨密度的标准方法, 后来有学者经研究验证DEXA法所测骨密度与阿基米德定律测定结果具有高度相关性才将其应用于小动物实验中<sup>[12]</sup>。McClure等<sup>[13]</sup>以马身上不同部位的骨骼作为研究对象, 以阿基米德定律法作为标准, 也进行过类似的研究。此外, 还有一些学者在研究中应用过阿基米德定律测量骨密度<sup>[14-18]</sup>。

在本实验中, 尽管骨密度测量方法与数据结果单位不同, 但从数值上看, 随着灌胃剂量的变化不同方法测得的骨密度均呈现出一致的变化趋势。从Pearson相关系数来看, 相关系数 $r$ 值均大于0.5, 属于显著相关, 说明这两种方法的相关性较好, 即两种方法均能有效区分不同组别间的统计学差异, 对人而言, 人们无法测定其真实骨密度, 只能采用DEXA法或其他方法; 在动物实验中, 完全可以采用阿基米德定律的办法, 提供更加直接和准确的骨密度数据。因此, 这两种方法均可应用于增加骨密度功能保健食品的功效检验中。

### 参考文献:

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量[J]. 营养学报, 2001, 23(3): 193-196.
- [2] 何宇纳, 翟凤英, 王志宏, 等. 中国居民膳食钙的摄入状况[J]. 卫生研究, 2007, 36(5): 600-602.
- [3] REID I R, MASON B, HORNE A, et al. Randomized controlled trial of calcium in healthy older women[J]. Am J Med, 2006, 119(9): 777-785.
- [4] HUNCHAREK M, MUSCAT J, KUPELNICK B. Impact of dairy products and dietary calcium on bone-mineral content in children: results of a meta-analysis[J]. Bone, 2008, 43(2): 312-321.
- [5] REGINSTER J Y. Calcium and vitamin D for osteoporotic fracture risk[J]. Lancet, 2007, 370: 632-634.
- [6] LEE W T K, JIANG J, LAI X J, et al. Calcium absorption from calcium fortified soymilk and cow's milk in postmenopausal Chinese women with suboptimal serum 25-hydroxyvitamin D status[J]. Bone, 2008, 43: 31-32.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 卫生部卫生法制与监督司, 2003: 111-118.
- [8] 戴伟, 孙宇立, 郑勇英, 等. 增加骨密度类保健食品功能评价方案联合应用的探讨[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(6): 360-362; 365.
- [9] 唐海, 李永刚, 陈浩. 骨密度测量技术的临床应用及评价[J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 2(4): 9-11.
- [10] 牟永忠, 严世贵. 骨质疏松性骨折的风险评估[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2009, 24(9): 859-861.
- [11] 刘礼金, 许永武. 骨密度测定对预测老年人骨质疏松骨折价值的相关研究[J]. 江西医药, 2008, 43(3): 248-250.
- [12] KEENAN M J, HEGSTED M, JONES K L, et al. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(11): 1903-1907.
- [13] McCLURE S R, GLICKMAN L T, GLICKMAN N W, et al. Evaluation of dual energy X-ray absorptiometry for in situ measurement of bone mineral density of equine metacarpal[J]. Am J Vet Res, 2001, 62(5): 752-756.
- [14] MIHALACHE G, MIHALACHE G D, INDREIL L, et al. Phytoestrogens role in bone functional structure protection in the ovariectomized rat[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2002, 106(1): 89-92.
- [15] DEYHIM F, STOECKER B J, BRUSEXITZ G H, et al. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats[J]. Nutrition Research, 2003, 23(1): 123-130.
- [16] GIESEN E B, DING M, DALSTRA M, et al. Reduced mechanical load decreases the density, stiffness, and strength of cancellous bone of the mandibular condyle[J]. Clin Biomech, 2003, 18(4): 358-363.
- [17] GIESEN E B, DING M, DALSTRA M, et al. Mechanical properties of cancellous bone in the human mandibular condyle are anisotropic[J]. J Biomech, 2001, 34(6): 799-803.
- [18] 高建军, 周轶, 顾淑珠, 等. 大鼠骨生物学指标的月龄特征[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2): 143-146.