

碳酸钙复合胶囊的增强骨密度功能作用及安全性评价

张裕¹, 孙连冰², 赵璠³, 伊扬磊^{1*}

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100) (2. 陕西华州医药生物工程有限公司, 陕西西安 710054) (3. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 该研究旨在评价一种碳酸钙复合胶囊 (Calcium Carbonate Compound Capsule, Ca-CC) 增强骨密度功能作用和安全性。经口给予 60 只雌性大鼠低 (0.18 g/kg·bw)、中 (0.35 g/kg·bw)、高 (1.05 g/kg·bw) 三个剂量的 Ca-CC 90 d 的干预。通过测定雌性大鼠生长发育指标、股骨骨密度、骨钙含量在评估增强骨密度功能作用。结果显示: 高剂量组 Ca-CC (1.05 g/kg·bw) 增强大鼠的股骨远心端、股骨中心骨密度分别为 7.39% ($P<0.05$)、8.29% ($P<0.01$), 增强骨钙含量为 29.70% ($P<0.01$)。通过给予昆明种小鼠 20.00 g/kg·bw 剂量的 Ca-CC 进行安全性评价。在受试剂量范围内, Ca-CC 无诱发菌株突变、精子畸变、解剖及组织学检查异常等现象。在 30 d 观察期, 以 0.88、1.75、3.50 g/kg·bw 为剂量的低、中、高三个剂量组中, Ca-CC 对试验小鼠各项生理指标均无影响。以上结果表明, Ca-CC 具有增强骨密度功能作用且安全性良好。

关键词: 复合胶囊; 碳酸钙; 淫羊藿苷; 硫酸软骨素; 骨质疏松; 去卵巢雌性老鼠; 增强骨密度功能; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2023)10-17-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1283

Bone Mineral Density Enhancement and Safety Evaluation of a Calcium Carbonate Compound Capsule

ZHANG Yu¹, SUN Lianbing², ZHAO Fan³, YI Yanglei^{1*}

(1.College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

(2.Shaanxi Huazhou Medical Biological Engineering Co. Ltd., Xi'an 710054, China)

(3.College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The enhancement of bone mineral density function and safety of a calcium carbonate compound capsule (Ca-CC) were evaluated in vivo. Sixty female rats were administered 0.18, 0.35, or 1.05 g/kg·bw Ca-CC daily via oral gavage for 90 days. The growth and development index, femur weight, femur bone density, and bone calcium content were determined to assess the bone mineral density enhancing effect of the capsule. Compared to the control group, the group treated with 1.05 g/kg·bw Ca-CC demonstrated an increase in the bone mineral densities of the distal and central femur by 7.39% ($P<0.05$) and 8.29% ($P<0.01$), respectively, and an increase in calcium content by 29.70% ($P<0.01$). To assess the safety of the capsule, Kunming mice were administered 20.00 g/kg·bw of Ca-CC. Within the tested doses, no significant strain mutation, sperm abnormality, nor anatomical or histological abnormalities were observed. During the 30-day observation period, the low (0.88 g/kg·bw), medium (1.75 g/kg·bw), and high (3.50 g/kg·bw) doses of Ca-CC had no effects on various physiological indices. Thus, Ca-CC significantly enhances the bone mineral density function in rats and is safe for consumption.

Key words: compound capsule; calcium carbonate; icariin; chondroitin sulfate; osteoporosis; ovariectomized female rat; bone mineral density enhancement; safety evaluation

引文格式:

张裕,孙连冰,赵璠,等.碳酸钙复合胶囊的增强骨密度功能作用及安全性评价[J].现代食品科技,2023,39(10):17-24

ZHANG Yu, SUN Lianbing, ZHAO Fan, et al. Bone mineral density enhancement and safety evaluation of a calcium carbonate compound capsule [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 17-24

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (2021JQ-138)

作者简介: 张裕 (1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: zhangyu97@nwfau.edu.cn

通讯作者: 伊扬磊 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物代谢调控和分子机制, E-mail: yyi@nwfau.edu.cn

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是一种代谢性骨病, 其典型特征为骨密度降低和骨脆性增加^[1], 典型表现为骨骼疼痛, 易骨折^[2], 常见于中老年人中, 尤以女性居多^[3]。骨密度可以反映骨质疏松程度^[4]。OP 患病率随着年龄的增加而急剧增加, 据调查 40~49 岁人群患病率仅为 3.20%, 而 50 岁以上和 65 岁以上分别为 19.2%, 32%^[5]。这是因为女性在 50 岁以后会因体内雌激素大量、急剧的流失使骨密度迅速降低^[2]。另外, 长期钙的摄入不足也会引起人体骨密度降低^[6]。

在具有增强骨密度的中西药原料中, 碳酸钙具有增强骨矿含量、骨密度^[7]、吸收率高的特点, 常作为首选钙补充剂^[8]。淫羊藿是一味补阳药^[9], 其含有的淫羊藿苷是一种黄酮类化合物的衍生物^[10], 既具有雌激素的作用, 又没有雌激素的副作用, 是良好的雌激素替代物^[11], 具有提高骨密度^[12]、促进骨骼形成^[13]、缓解类风湿性关节炎^[14]等生物活性。硫酸软骨素是分布于人和动物的软骨中的一种酸性黏多糖^[15], 可提高骨基质合成、分解和代谢能力^[16], 因具有增强骨密度^[17]、缓解骨关节疼痛^[18]、抗炎症^[19]等功能常作为保健食品和抗骨关节药品在世界范围内使用^[20]。杜仲中含有的黄酮类、环烯醚萜类等物质可缓解 OP^[21]。骨碎补具有补肾坚骨、促进钙质吸收、活血止痛的作用^[22]。

研究表明, 单纯补钙有引发肾结石、心血管和胃肠道疾病等风险^[23,24], 市面上也很少有以单一原料制备的增强骨密度的保健食品。而且两种或者两种以上原料配伍使用不仅增强骨密度的有效性更好而且更具有科学性^[25]。例如, 唐祝奇等^[26]验证了碳酸钙和阿法骨化醇联合后具有协同作用。王权等^[27]的研究表明钙联合淫羊藿及女贞子对改善低骨密度小鼠的效果比碳酸钙分别联合淫羊藿和女贞子的效果好。因此本研究选择以碳酸钙为原料的增加骨密度保健食品中使用频数 ≥ 10 的 5 种原料 (淫羊藿、杜仲、骨碎补、硫酸软骨素钠和骨胶原蛋白)^[28], 制备出主成分为钙质、硫酸软骨素和淫羊藿苷的一款保健食品-碳酸钙复合胶囊 (Ca-CC)。参照《保健食品检验与评价技术规范》^[29]的要求, 对 Ca-CC 进行增强骨密度功能研究、安全性评价, 为该类型保健产品的合理应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料

自制 Ca-CC 标志性成分及含量为: 钙 8.60%、硫酸软骨素 8.50%、淫羊藿苷 0.35% (由西安宏福生物医药科技有限公司确认)。实验前, 先将实验样品研碎,

以 1% (V/V) 的羧甲基纤维素为溶剂溶解样品, 随配随用。人体每日推荐剂量为 2.1 g, 体质量按照 60 kg 计算, 折合剂量 0.035 g/kg bw。人体每日推荐剂量为 2.1 g, 体质量按照 60 kg 计算, 折合剂量 0.035 g/kg bw。

1.1.2 实验动物

老鼠 (140 只 SPF 级 SD 大鼠、75 只昆明种小鼠) 和饲料购自长沙市天勤生物技术有限公司。小鼠动物生产许可证: SYXK (湘) 2015-0012。试验条件为屏障环境, 温度: SD 大鼠: 22~26 °C, 昆明种小鼠: 22~24 °C。实验环境湿度: SD 大鼠: 50%~60%, 昆明种小鼠: 湿度 54%~58%。

1.1.3 主要菌株

鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102 (组氨酸缺陷型), 购自上海北诺生物科技有限公司。

1.1.4 主要试剂

所有生化试验试剂盒由上海复星长征医学科学有限公司提供, 如谷甘油三酯 (TG)、丙转氨酶 (ALT) 等。

1.2 方法

1.2.1 试验样品准备

将淫羊藿、骨碎补、杜仲依次净制, 在检验合格后加入 70% (V/V) 乙醇回流提取 2 次。提取, 滤过, 合并滤液, 浓缩滤液, 形成浸膏。将浸膏减压干燥、粉碎, 并形成干膏粉。同时将检验合格的碳酸钙、骨胶原蛋白、硫酸软骨素钠制成干膏粉。将两钟干粉膏均匀混合 20 min, 用 85% (V/V) 乙醇制成软材, 然后用 16 目筛制粒, 在 55~60 °C 下干燥, 用 14 目筛整粒。用 0 号胶囊每 0.35 g/粒将颗粒和粉末包装。最后抛光胶囊, 分别添加内、外包装即得成品。

1.2.2 增强骨密度功能试验

在骨密度增强试验中: 雌性大鼠 (60 只, 300 g 左右) 随机分成六个小组。第一组设置为假手术组 (1% (V/V) 羧甲基纤维素), 第二组设置为卵巢切除+溶剂对照组 [1% (V/V) 羧甲基纤维素], 第三组设置为卵巢切除+碳酸钙对照组 (0.30 g/kg·bw 的碳酸钙), 第四组设置为卵巢切除+样品低剂量组 (0.18 g/kg·bw), 第五组设置为卵巢切除+样品中剂量组 (0.35 g/kg·bw 样品), 第六组设置为卵巢切除+样品高剂量组 (1.05 g/kg·bw)。低、中、高剂量组为人体推荐口服量的 5、10、30 倍。每日一次灌胃 (1.0 mL/100 g·bw)。试验全程使用去离子水, 每组动物单笼饲养, 共 90 d。卵巢切除试验: 麻醉大鼠, 将双侧卵巢切除, 术后连续 3 d 肌肉注射青霉素。假手术组切除 0.5 g 左右的脂肪, 术后 5 d 剔除卵巢切除不完全的大鼠并取大鼠阴道涂片。每周测量动物体质量。试验结束后, 处死大

鼠,为测量骨密度(股骨中点处和远心端)将右股骨剥离并烘烤至恒重。称取股骨的总质量,用原子吸收分光光度法测量股钙含量。

1.2.3 安全性评价试验

小鼠急性毒性试验:选20只昆明种小鼠(雌雄各半),采用最大耐受剂量(20.00 g/kg·bw)进行试验。称取Ca-CC内容物20.00 g加1% (V/V) 羧甲基纤维素至40 mL,达最大容许灌胃浓度。0.2 mL/10 g·bw剂量每日灌胃2次(间隔4 h)。第一次灌需要胃禁食16 h,往后每天记录老鼠生理和死亡状态。Ames试验:设溶剂对照组、阳性突变剂对照组和自发回变组。用多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝微粒体酶(S-9),试验分别五个剂量组(5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验:选昆明种小鼠(50只,雌雄各半)随机分5组。间隔24 h两次灌胃法进行试验。设置试验组为高(10.00 g/kg·bw)、中(5.00 g/kg·bw)、低(2.50 g/kg·bw)剂量组。另设阴性对照[1% (V/V) 羧甲基纤维素],阳性对照(0.04 g/kg·bw 环磷酰胺)。处死小鼠,取胸骨骨髓,制片。计嗜多染红细胞数,计算嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)。小鼠精子畸形试验:选昆明种小鼠(25只,雄性)随机分5组。设置Ca-CC低(2.50 g/kg·bw)、中(5.00 g/kg·bw)、高(10.00 g/kg·bw)剂量实验组,设阳性对照组(0.04 g/kg·bw 环磷酰胺),阴性对照组:1% (V/V) 羧甲基纤维素。连续5 d灌胃,末次灌胃(第30天)处死动物,取双侧辜并制片,计畸形数(选1 000个结构完整的精子)和畸形类型。30 d喂养试验:SD大鼠(80只,雌雄各半)随机分四组。设Ca-CC低(0.88 g/kg·bw)、中(1.75 g/kg·bw)、高(3.50 g/kg·bw)剂量三个剂量(人体推荐剂量的25、50、100倍)。对照组:1% (V/V) 羧甲基纤维素,每日一次,连续30 d。观察动物的活动和生长情况,计算进食量和食物利用率(每日、每周),30 d后禁食

16 h采血。处死动物,解剖观察内脏,称重,制片(肝、肾、脾和辜丸),计算脏/体比值。

1.3 数据处理与结果预测

用Excel、SPSS软件进行统计分析。用方差分析、Dunnett法、秩和检验和Tamhane's T2等进行数据分析。使用GraphPad Prism软件进行作图。

2 结果与讨论

2.1 碳酸钙复合胶囊增加骨密度试验影响

2.1.1 碳酸钙复合胶囊对大鼠体质量的影响

去卵巢雌性老鼠模型可以较准确的模拟中老年妇女绝经后骨丢失的状态,是最常用的研究骨密度变化的动物模型^[30]。雌激素分泌减少后,老鼠血液中载脂蛋白AI(apoA1)的含量随之减少,进而血清总胆固醇(TC)浓度降低,最终导致脂代谢紊乱使老鼠体质量不正常增加^[31]。在关于骨密度模型的研究中,常用老鼠的体质量变化来初步判断动物模型构建的情况和评价受试物对骨密度低下模型的影响。碳酸钙复合胶囊对大鼠体质量的影响结果如图1所示。实验前各组大鼠的起始体质量均处于同一水平,差异没有显著性($P>0.05$) (图1a)。喂养期间,各组大鼠体质量迅速增长,与假手术组相比,溶剂对照组、样品低、中、高剂量组、碳酸钙对照组的大鼠体质量均不正常增加。溶剂对照组8周末体质量、末期体质量以及增重分别为394.20、419.20和125.30 g,均显著高于假手术组(374.90、394.70和100.10 g) ($P<0.05$) (图1);此外,与溶剂对照组的大鼠增重(125.30 g)相比,随着样品剂量的增加(低中高剂量组增重分别为:115.40、109.60、117.40 g),大鼠的增重差距逐渐越小。这说明样品可以有效缓解去卵巢大鼠体质量不正常增加。

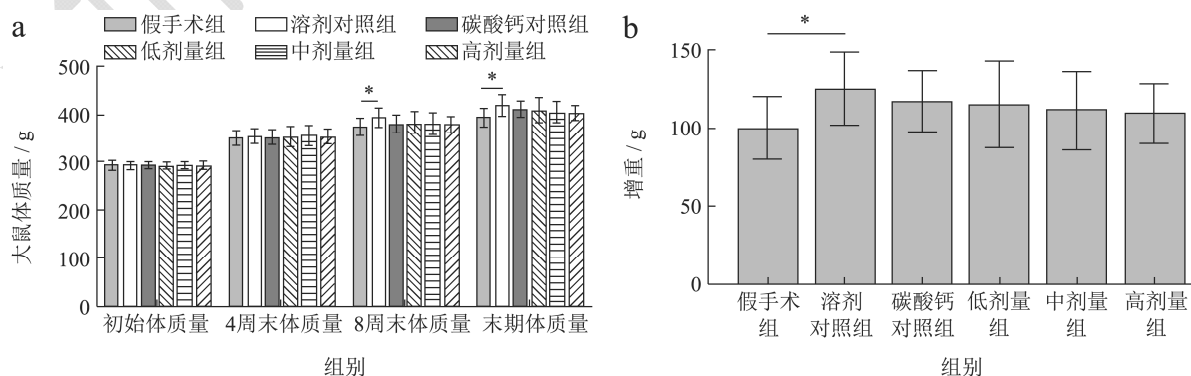


图1 Ca-CC对大鼠体质量(a)、增重(b)的影响

Fig.1 The effects of Ca-CC on body weight (a) and body weight gain (b) of rats

2.1.2 碳酸钙复合胶囊对大鼠股骨长度、股骨质量、骨密度和骨钙含量的影响

股骨长度、股骨质量、骨密度和股钙含量是评价动物骨骼状态的重要指标,也是临床判断骨质疏松的最基本依据^[32]。去卵巢雌性老鼠雌激素减少后会引起来破骨细胞的增加而使钙质无法沉积在骨骼上导致骨钙含量降低,在雌激素长时间分泌不足的情况下,老鼠的骨密度则会降低^[33]。图2为Ca-CC对大鼠股骨长度、质量和骨密度的影响结果。各组大鼠的股骨长度、质量变化相比对照组无统计学意义($P>0.05$) (图2a、2b);溶剂对照组大鼠股骨中心骨密度和远心端骨密度、股钙含量与假手术组相比显著降低($P<0.01$) (图2c、2d),这提示去卵巢雌性大鼠骨密度低下模型建模成功;溶剂对照组的股骨远心端骨密度和股骨中心骨密度分别为0.23和0.20,高剂量大鼠股骨远心端骨密度和股骨中心骨密度分别为0.222和0.247,相比之下,股骨远心端骨密度显著增强($P<0.05$) (图2c),股骨中心骨密度极显著增强($P<0.01$) (图2d),增强效果分别为7.39%、8.29%,这与Liu等^[34]的研究结果一致。此外,高剂量组大鼠股钙含量为203.80 mg/g,与溶剂对照组(157.90 mg/g)相比,股钙含量增加效果具有显著性($P<0.01$) (图2e),增加了29.70%。这说明高剂量组可以有效缓解去卵巢大鼠骨密度降低、增加股钙含量。而且随着样品剂量的增加,这三个指标(大鼠股骨中心骨密度、股骨远心端骨密度、股钙含量)也越接近假手术组,这与唐祝奇等^[26]的研究一致。因此Ca-CC能增强小鼠的骨密度并且提高小鼠骨钙含量。

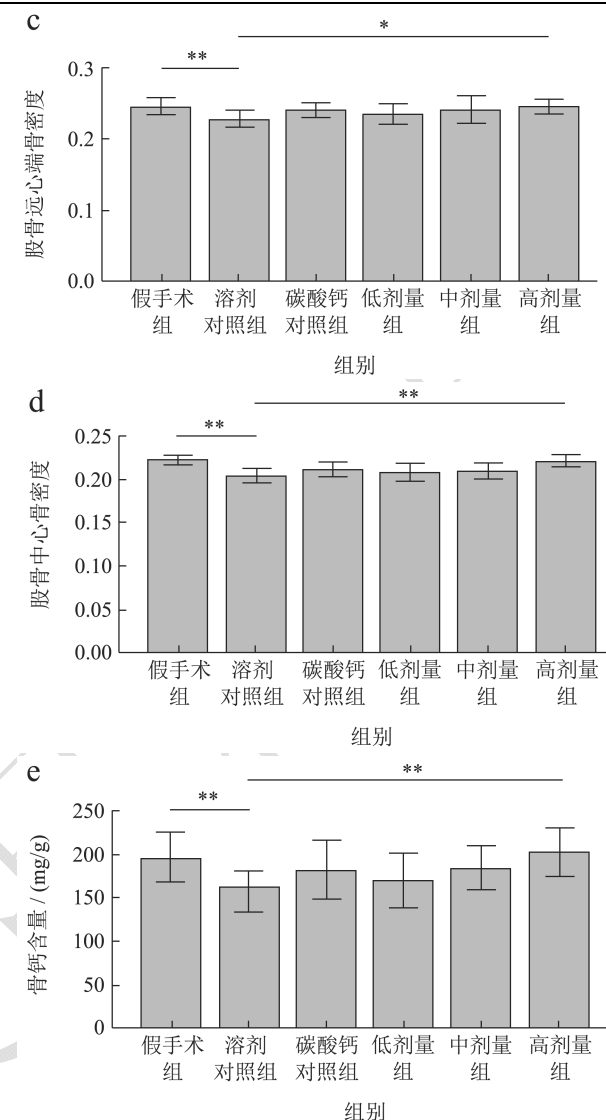
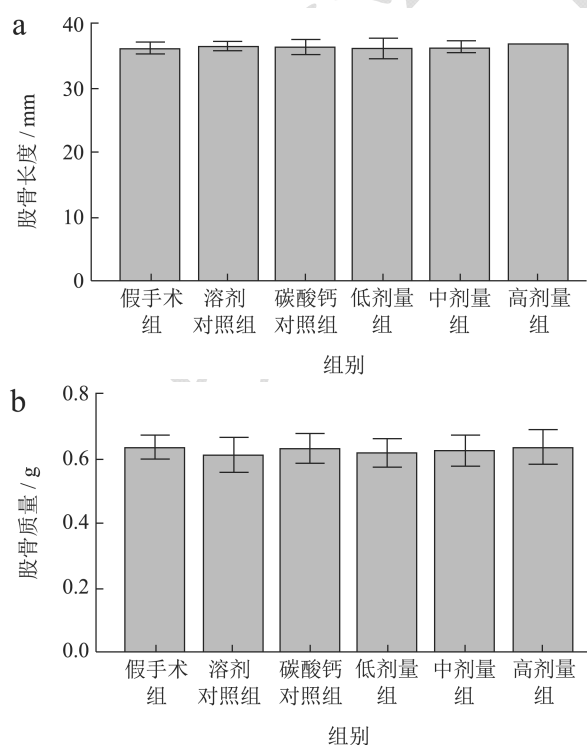


图2 Ca-CC对大鼠股骨长度(a)、质量(b)、远心端骨密度(c)、中心骨密度(d)和骨钙(e)含量的影响

Fig.2 The effects of Ca-CC on femoral length (a), femoral weight (b), distal femoral bone mineral density (c), central femoral bone mineral density (d) and bone calcium content (e) in rats

2.2 复方胶囊安全性评价结果

2.2.1 小鼠急性毒性试验结果

保健品或者药品对人类是否安全通常通过对动物的急性毒性试验来初步评估。以20.00 g/kg·bw剂量Ca-CC对大鼠进行试验。14 d内雌雄小鼠均没有中毒症状和死亡情况。体质量逐渐增长且变化结果如表1所示。在体质量增长方面,雌、雄大鼠在第7天体质量增长率分别为32.86%和30.47%,第14天体质量增长率分别达58.39%和51.79%。上述结果说明雌、雄小鼠的MTD均大于20.00 g/kg·bw。牛红妹^[35]采用最大给药量法(28.80 g/kg)给小鼠灌胃以探究淫羊藿苷

急性毒性试验以初步评价其用药安全性,结果显示,淫羊藿苷的口服毒性小,28.80 g/kg 相当于临床成人日用量(0.11 g/kg)的 253.19 倍,本研究中 Ca-CC 推荐量中淫羊藿苷的含量(0.09 g/kg)未高于推荐的成人日用量,具有安全性。30 d 观察期过后解剖大鼠,检查其主要脏器,结果显示大鼠的主要脏器均没有出现明显异常。另外,参照《保健食品检验与评价技术规

范》^[29]可知 Ca-CC 属无毒级。

2.2.2 遗传毒性试验

Ames 试验即受试物的遗传毒性效应。结果如表 2 所示,Ca-CC 各剂量组在有、无 S-9 存在的条件下,回变菌落数均未超过自发回变菌落数的两倍,同时不存在剂量-反应关系,这表明 Ca-CC 没有诱发菌株突变的能力。

表 1 急性经口毒性试验小鼠体重质量结果

Table 1 Results of the body weight of acute toxicity test in mice

性别	动物数 /只	途径	初始体质量 /($\bar{x}\pm s$, g)	一周末体质量 /($\bar{x}\pm s$, g)	二周末体质量 /($\bar{x}\pm s$, g)	剂量 /(g/kg·bw)	死亡数 /只	MTD /(g/kg·bw)
雌	10	经口	20.35±1.23	26.55±1.78	30.89±2.10	20.00	0	>20.00
雄	10	经口	20.45±1.32	27.17±1.68	32.39±1.75	20.00	0	>20.00

表 2 Ames 试验结果

Table 2 Result of Ames test ($\bar{x}\pm s$)

剂量 /(μg/皿)	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
5 000	137.3±14.2	138.7±13.6	38.7±3.8	37.3±4.7	173.3±13.6	167.3±15.6	280.0±23.6	290.0±16.7
1 000	135.0±12.5	145.7±14.0	41.3±3.2	37.0±3.6	168.3±17.1	170.3±14.0	273.3±21.6	273.7±15.3
200	147.3±13.2	134.7±11.9	39.0±4.4	39.7±3.5	151.7±13.1	160.3±16.5	279.3±18.0	268.0±20.0
40	139.3±14.0	133.0±11.5	39.3±4.5	36.3±4.9	152.3±11.0	166.3±13.4	278.7±13.1	268.7±14.0
8	137.0±15.4	139.7±14.6	38.3±6.7	38.0±5.3	175.3±14.4	174.0±14.0	261.0±15.6	282.7±18.9
自发回变	136.0±12.8	133.7±23.7	34.3±6.7	40.7±3.1	171.0±13.5	168.7±10.5	276.0±16.5	267.7±10.3
溶剂对照	149.7±15.5	149.3±15.8	37.7±4.0	36.0±5.6	167.7±12.3	169.0±15.1	277.0±27.5	263.7±26.3
阳性对照	1 218.7±152.8	1 198.7±78.3	2 628.0±169.1	2 211.3±161.7	2 260.7±104.9	2 339.3±111.5	1 046.7±102.8	244.0±192.6
	2-AF	9-苊酮	2-AF	9-苊酮	2-AF	NaN3	1,8-二羟蒽醌	MMC
	10.0 μg/皿	0.2 μg/皿	10.0 μg/皿	0.2 μg/皿	10.0 μg/皿	1.5 μg/皿	50.0 μg/皿	0.5 μg/皿

注: 以上结果为 3 个平皿的均值±标准差。

表 3 小鼠骨髓微核发生率的影响

Table 3 The effects of micronucleus test in mouse bone marrow cell ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数 /只	受检 PCE 数 /个	含微量 PCE 数 /个	微核率 /%	受检 PCE 数 /个	NCE 数 /个	PCE/NCE ($\bar{x}\pm s$)
雄	高剂量组	5	5 000	6	1.2±1.1	1 000	898	1.117±0.066
	中剂量组	5	5 000	5	1.0±1.0	1 000	879	1.141±0.067
	低剂量组	5	5 000	4	0.8±0.4	1 000	890	1.127±0.069
	阴性对照	5	5 000	5	1.0±0.7	1 000	883	1.134±0.053
	阳性对照	5	5 000	105	21.0±2.2*	1 000	941	1.063±0.023
雌	高剂量组	5	5 000	7	1.4±1.1	1 000	867	1.157±0.072
	中剂量组	5	5 000	6	1.2±0.4	1 000	880	1.137±0.022
	低剂量组	5	5 000	8	1.6±0.5	1 000	904	1.109±0.065
	阴性对照	5	5 000	4	0.8±0.8	1 000	873	1.147±0.046
	阳性对照	5	5 000	128	25.6±3.2 *	1 000	960	1.043±0.036

注: *与阴性对照组比较, $P<0.01$ 。下表同。

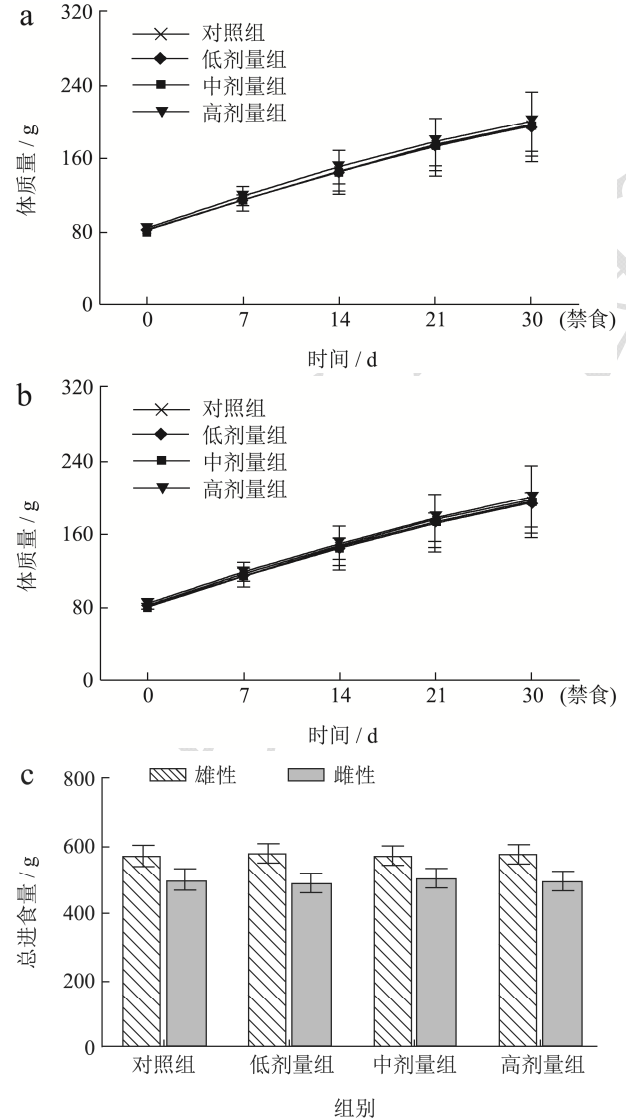
2.2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

表 3 为小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果，各剂量组小鼠的骨髓细胞微核率范围在 0.80 至 1.20，样品各剂量组微核率变化均无统计学意义 ($P>0.05$)；阳性对照组与阴性对照组比较差异极显著 ($P<0.01$)。样品各剂量组 PCE/NCE 比值均在正常值范围内且不少于阴性对照组的 20%，与阴性对照组相比无统计学意义。这表明该 Ca-CC 对小鼠骨髓细胞没有毒性影响。

表 4 Ca-CC 对小鼠精子畸形发生率的影响

组别	动物数/只	受检精子数/个	各类精子畸形的构成比/%							畸形总数/个	畸形率/%
			无钩	香蕉形	胖头	无定形	尾折叠	双头	双尾		
高剂量组	5	5 000	30.3	11.0	19.3	39.4	0.0	0.0	0.0	109	2.18±0.29
中剂量组	5	5 000	28.3	13.3	18.6	39.8	0.0	0.0	0.0	113	2.26±0.34
低剂量组	5	5 000	31.7	11.5	18.3	38.5	0.0	0.0	0.0	104	2.08±0.43
阴性对照	5	5 000	22.8	13.8	22.0	41.5	0.0	0.0	0.0	123	2.46±0.23
阳性对照	5	5 000	25.6	17.2	19.1	36.8	0.0	0.3	1.0	383	7.66±0.43*

2.2.5 30 d 喂养试验



2.2.4 小鼠精子畸形试验

表 4 为小鼠精子畸形试验结果。各剂量组与阴性对照组 (2.46%) 相比无统计学意义 ($P>0.05$)。样品低、中、高剂量组小鼠精子畸形发生率分别为 2.08%、2.26%、2.18%。而阳性对照组 (7.66%) 相比于阴性对照组差异极显著 ($P<0.01$)。试验中精子畸形主要表现为无钩、香蕉形、胖头和无定形四种形态。说明 Ca-CC 没有精子致畸性。

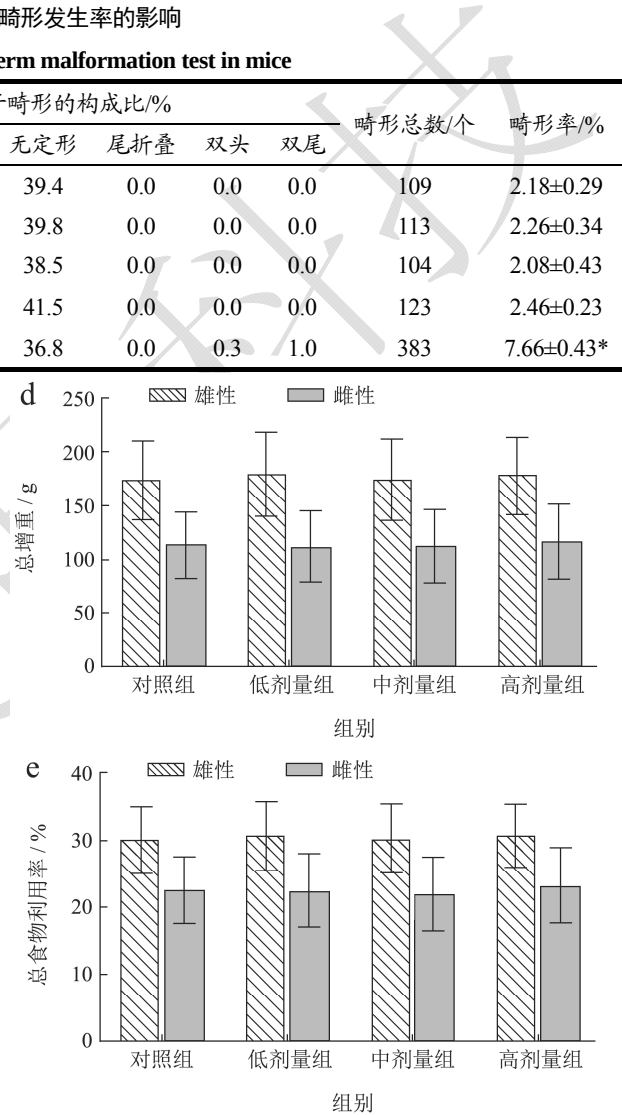


图 3 Ca-CC 对大鼠体重 (a: 雄性, b: 雌性)、总进食量 (c)、总增重 (d) 及总食物利用率 (e) 的影响

Fig.3 The effects of Ca-CC on body weight (a: male, b: female), total food intake (c), total weight gain (d) and total food utilization (e) of rats

30 d 观察期内，小鼠没有任何中毒症状。体重无异常变化并且与对照组水平相当。图 3 为各剂量组雌、雄鼠各时点体重 (图 3a、3b)、总进食量 (图 3c)、总增重 (图 3d)、总食物利用率 (图 3e) 结果，各剂量组雄性大鼠的总增重范围为在 174.50~119.50 g，雌性

大鼠的总增重范围是 111.80~116.50 g, 与雌雄对照组 (112.30 g、174.20 g) 相比, 差异无显著性 ($P>0.05$)。并且与对照组相比, 低、中、高剂量组大鼠的体质量及食物利用率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。由此说明 Ca-CC 对小鼠生理指标无明显影响。

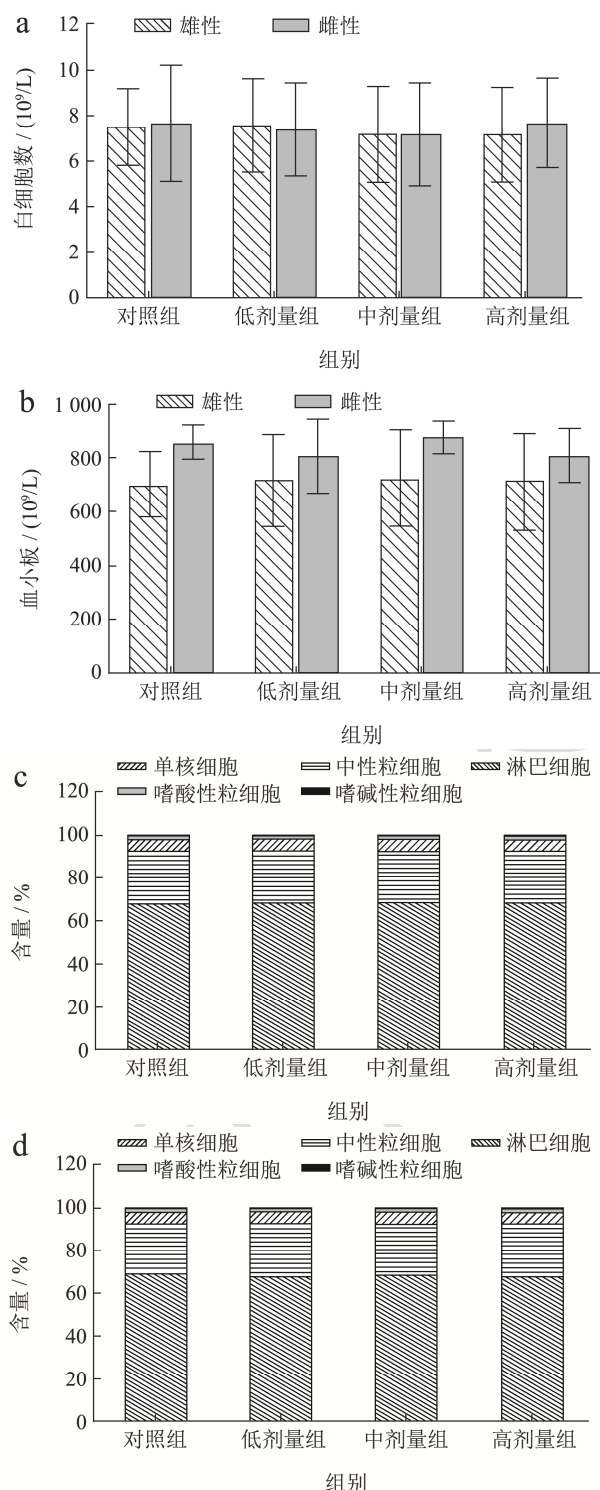


图4 Ca-CC 对大鼠血液中白细胞数量 (a)、血小板数量 (b)、大鼠骨髓细胞各组分 (c、d) 的影响

Fig.4 The effects of Ca-CC on the number of white blood cells (a), platelet (b) and bone marrow cell components (c, d) of rats

图4为Ca-CC对小鼠血液生化指标的影响。与对照组相比, 各剂量组雌、雄小鼠的白细胞总数、血小板数均无统计学意义 ($P>0.05$)。在骨髓细胞组成比例方面, 各剂量组小鼠的中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、嗜酸(碱)性粒细胞含量与对照组相比差异也不显著 ($P>0.05$) (图4)。由此表明, Ca-CC 对小鼠的各项血液生化指标没有明显影响。

此外, 30 d 观察期间, 小鼠各项指标正常。在大体解剖检查中, 雌、雄小鼠的主要脏器的在大小、色泽、形态结构等方面均无明显异常; 组织学检查中, 雌、雄小鼠除了对照组雄鼠1只肝细胞可见点状坏死。高剂量组雄鼠中只有1只小鼠肝间质有少量炎性细胞浸润, 其它组小鼠主要脏器没有明显异常。

3 结论

对碳酸钙复合胶囊的骨密度功能进行了评价。相比对照组, Ca-CC 高剂量组增强股骨远心端和股骨中心骨密度的效果分别增强了 7.39% ($P<0.01$)、8.29% ($P<0.01$), 说明 Ca-CC 能够提升老鼠的骨密度; 高剂量组骨钙含量增加效果为 29.70% ($P<0.01$), 说明 Ca-CC 可以提升骨钙含量。综上, Ca-CC 具有增强骨密度功能的作用, 这一结论为开发增强骨密度功能方面的保健食品提供了可靠依据。

对碳酸钙复合胶囊进行了安全性评价。Ca-CC 对雌、雄大鼠的 MTD 均大于 20.00 g/kg·bw, 是人体推荐量的 571.4 倍, 属无毒级。安全性实验中结果 (Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验) 均为阴性, 说明 Ca-CC 无致突变和损害生殖系统作用。且大体解剖检查和组织学检查中没有致突变、损害生殖系统和毒副作用的现象, 表明 Ca-CC 中所有成分的含量均在合理使用范围内, 食用安全性较高。

参考文献

- [1] 蔡科, 刘一平. 骨质疏松症与生活习惯因素的关系探讨[J]. 赣南医学院学报, 2021, 41(12): 1222-1224, 1241.
- [2] Aspray Terry J, Hill Tom R. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2019, 91: 453-476.
- [3] 王海峰. 丹参地黄止痛方联合常规西药治疗老年骨质疏松症临床研究[J]. 河南中医, 2022, 42(8): 1245-1248.
- [4] 王旭东, 赵宏宇, 邸琳, 等. 淫羊藿骨碎补联合骨营养补剂对骨质疏松大鼠的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 276-282.
- [5] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318

- [6] Xingyu Yuan, Xiaolan Bao, Guoxue Feng, et al. Effects of peptide-calcium complexes from sunflower seeds and peanuts on enhancing bone mineral density [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(8): 2942-2953.
- [7] 符芳盈,王隆辉,刘立柱,等.恒古骨康愈合剂联合碳酸钙 D3 和阿法骨化醇对老年骨质疏松患者骨强度及炎症因子的影响[J].中华中医药学刊,2023,41(1):206-209.
- [8] 耿娜,杨娜娜,丁庆明,等.钙联合维生素 D3 预防老年人骨质疏松性骨折有效性和安全性的 Meta 分析[J].中国药物评价,2022,39(4):291-303.
- [9] 罗露,袁志鹰,黄惠勇,等.淫羊藿化学成分及药理研究进展[J].亚太传统医药,2019,15(6):190-194.
- [10] 王俊丽,胡赛赛,赵一蔚.淫羊藿苷对骨代谢病调节机制研究进展[J].黄河科技学院学报,2022,24(8):29-32.
- [11] 王晓栋,魏媚.具有雌激素样作用中药对脂代谢影响[J].泸州医学院学报,2008,2: 217-218.
- [12] Ming Lei-Guo, Chen Ke-Ming, Xian Cory J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling [J]. Journal of Cellular Physiology, 2013, 228(3): 513-521.
- [13] Shailendra, Kapoor. Icariin and its emerging role in the treatment of osteoporosis [J]. Chinese Medical Journal, 2012, 126(2): 400.
- [14] WU Zhiming, XIANG Yanru, ZHU Xiaobo, et al. Icariin represses the inflammatory responses and survival of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating the TRIB1/TLR2/NF- κ B pathway [J]. International Immunopharmacology, 2022, 110: 108991.
- [15] 侯美曼,任丽萍,范慧红.硫酸软骨素质量控制研究进展[J].中国药学杂志,2016,51(12):962-966.
- [16] 孙阔,于博文,刘哲敏,等.白芍提取物与硫酸软骨素混合物增加骨密度的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2018,52(6):510-513.
- [17] Awofiranye Adeola E, Hudson Jon, Tithi Aditi Dey, et al. Chondroitin sulfate and its derivatives: A review of microbial and other production methods [J]. Fermentation, 2022, 8(7): 323.
- [18] Rosita Russo, Valentina Vassallo, Antonietta Stellavato, et al. Differential secretome profiling of human osteoarthritic synoviocytes treated with biotechnological unsulfated and marine sulfated chondroitins [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3746.
- [19] Ustyuzhanina Nadezhda E, Bilan Maria I, Panina Elena G, et al. Structure and anti-inflammatory activity of a new unusual fucosylated chondroitin sulfate from *Cucumaria djakonovi* [J]. Marine Drugs, 2018, 16(10): 389.
- [20] 赵琳,姜雨,兰韬,等.硫酸软骨素钠质量安全标准及关键控制点研究进展[J].食品工业科技,2022,43(19):7-13.
- [21] 靳鸽,冯志海.补肾温阳药抗骨质疏松症研究进展[J].中医临床研究,2021,30:97-100.
- [22] 于大鹏,孙卫强.骨碎补及其提取物应用于骨科疾病的药理作用研究概况[J].环球中医药,2021,14(4):761-766.
- [23] Weaver C M, Dawson-Hughes B, Lappe J M, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the national osteoporosis foundation [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(1): 367-376.
- [24] Joan Lappe, Patrice Watson, Dianne Travers-Gustafson, et al. Effect of vitamin D and calcium supplementation on cancer incidence in older women: A randomized clinical trial [J]. JAMA, 2017, 317(12): 1234-1243.
- [25] 王华坤,陈海博,尹丽.长期服用补钙类保健品应注意的几个问题[J].首都医药,2013,20(4):15-16.
- [26] 唐祝奇,秦宁,刘春,等.碳酸钙联合阿法骨化醇对去卵巢大鼠骨质疏松防治作用[J].交通医学,2013,27(5):439-441.
- [27] 王权,何贡云,杨婉纯,等.钙联合淫羊藿及女贞子增强骨密度作用及机制探索[J].中药材,2020,43(11):2789-2793.
- [28] 萨翼.增加骨密度保健食品配方规律及对监管研发建议[J].食品工业科技,2021,42(4):314-318,336.
- [29] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范 [M].化学工业出版社,2003.
- [30] 宋渊,李盛华,何志军,等.淫羊藿苷对去势雌性大鼠骨质疏松的影响[J].军医进修学院学报,2012,33(4):400-403.
- [31] 陆宽,张洁,刘文炜,等.一种含姜黄食品对去卵巢模型鼠骨组织的影响[J].食品工业科技,2016,38(11):334-339.
- [32] 胡旖耘,杜俊,牟丽秋,等.维骨片对去势骨质疏松模型大鼠的影响[J].中南药学,2015,13(2):132-136.
- [33] 史琳娜,苏宜香.大豆异黄酮类对去卵巢大鼠骨丢失的影响[J].营养学报,2000, 2:113-118.
- [34] LIU Meng, ZHONG Cheng, HE Rongxin, et al. Icariin associated with exercise therapy is an effective treatment for postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Medical Journal, 2012, 125(10): 1784-1789.
- [35] 牛红妹.淫羊藿苷急性毒性试验研[J].神经药理学报,2018,8(2):40-41.