

· 论 著 ·

ERK5 在小鼠骨质疏松性骨折愈合过程中作用的实验研究

盛晓赞^{1△} 郭来威^{1,2△} 闫亮² 万浪² 姜金¹ 夏亚一^{1,2*}

1. 兰州大学第二医院关节外科, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0856-10

摘要: **目的** 通过构建小鼠骨质疏松骨折模型, 研究 ERK5 在骨质疏松性骨折愈合过程中的作用。 **方法** 将 108 只 6 周龄雌性昆明小鼠随机分成 4 组, 通过手术切除小鼠双侧卵巢及小鼠股骨离断分别构建骨质疏松 (OVX) 和骨折模型 (Fracture), 然后给实验组小鼠每日腹腔注射 ERK5 特异性阻断剂 XMD8-92, 于 1 w、2 w、4 w 后分别处死一定数量的小鼠, 取术侧股骨标本, 行 X 线片检查、股骨骨痂 Micro-CT、HE 染色及免疫组织化学染色检查, 观察骨折端骨小梁生长情况, 骨痂内成骨相关蛋白及 ERK5 表达情况。 **结果** 给予实验小鼠注射 XMD8-92 后第 2 周及第 4 周, Fracture 组小鼠骨痂生长较快, 骨小梁数目较多, 厚度较大, 成骨相关蛋白 ALP、Runx2 的表达相对较多 ($P < 0.05$), 而 Fracture + XMD8-92 组小鼠骨痂生长则相对缓慢, 骨小梁稀少且菲薄, 结构相对较乱, 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、Runx2 表达较少 ($P < 0.05$); 且 OVX + Fracture + XMD8-92 组小鼠与 OVX + Fracture 组小鼠相比, 骨小梁生成更少且紊乱, 骨痂生长明显延迟, ALP、Runx2 表达量显著减少 ($P < 0.05$)。 **结论** ERK5 影响骨折端骨痂形成的速度和质量, 在促进骨质疏松性骨折愈合过程中起着十分重要的生理作用。

关键词: ERK5; 骨质疏松; 骨折; 成骨相关蛋白; 动物实验

Study of ERK5 in the healing process of osteoporotic fracture in mice

SHENG Xiaoyun¹, GUO Laiwei^{1,2}, YAN Liang², WAN Lang², JIANG Jin¹, XIA Yayi^{1,2*}

1. Department of Orthopaedic Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Orthopaedics Key Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

△: SHENG Xiaoyun and GUO Laiwei contributed equally to this work and are joint first author.

* Corresponding author: XIA Yayi, Email: xiayayilzu@126.com

Abstract: **Objective** To study the role of ERK5 in the healing process of osteoporotic fractures by establishing osteoporotic fracture model in mice. **Methods** 108 6-week-old female mice were randomly divided into 4 groups. Osteoporosis and fracture models were established by surgically resecting the bilateral ovaries and cutting off the femur. Then the experimental mice were injected with ERK5-specific blocker XMD8-92 intraperitoneally, and a certain number of mice were sacrificed at the 1st, 2nd and 4th week. X-ray examination, Micro-CT, HE staining and immunohistochemically staining of bone callus were performed to observe the growth of trabecular bone, and the expression of osteogenesis-related proteins and ERK5. **Results** The experimental mice were injected with XMD8-92 at the 2nd week and the 4th week. In the fracture group, the callus of mice grew faster, there were more and thicker trabecular bone, and the expression of the osteogenesis-related proteins ALP and Runx-2 was higher ($P < 0.05$). The callus grew much slower with less and thinner trabecular bone, and the expression of the osteogenesis-related proteins ALP and Runx-2 was lower in the fracture + XMD8-92 group ($P < 0.05$). Compared with the osteoporotic fracture group, the osteoporotic fracture + XMD8-92 group showed less and more disordered trabecular bone formation, significant delay in the growth of callus, and significantly lower ALP and Runx-2 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** ERK5 affects the rate and quality of callus formation in the area of fracture and plays an important physiological role in the process of osteoporotic fracture healing.

Key words: ERK5; Osteoporosis; Fracture; Osteogenesis-related protein; Animal experimentation

基金项目: 国家自然科学基金 (81672207); 兰州大学第二医院博士科研基金 (ynbskyjj2015-2-9)

* 通讯作者: 夏亚一, Email: xiayayilzu@126.com

△: 盛晓赞与郭来威具有同等贡献, 为并列第一作者

骨骼是人体内具有生物活性的重要组织器官,它具有负重、参与运动、支撑、保护内脏器官及存储矿物质等众多生理功能,并与身体力学特性密切相关。骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以全身骨含量减少,骨的微结构破坏,骨组织相关蛋白种类及含量改变,从而导致骨组织缺乏、骨密度(bone mineral density, BMD)减低、骨骼脆性增加,进而引起骨痛、骨折风险增高的一种慢性代谢性骨病^[1-2]。OP 及其引起的病理性骨折已发展为世界上患病率最高、医疗费用消耗最大的慢性基础性疾病之一^[3]。

ERK5 是 MAPK 信号通路家族的重要成员,可被各种应激刺激(高渗刺激、低氧刺激、应力刺激等)所激活^[4],从而使磷酸化 ERK5 高表达,进而促进骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、成骨相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)等成骨相关蛋白活性及表达增加;而 ERK5 的活性被抑制剂阻断后,成骨细胞 ALP 活性、OCN、OPN 和 Runx2 表达明显被抑制^[5]。而由于目前尚无特异性 ERK5 体内激动剂,因此通过 ERK5 特异性阻断剂 XMD8-92 在体研究 ERK5 与成骨细胞增殖和分化及骨骼组织的成骨作用,对于探索新的措施预防和治疗骨质疏松及骨质疏松性骨折的发生具有重要意义^[6]。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康成年昆明系雌性小鼠,6 周龄,SPF 级别,体重(20±2)g,购于甘肃省中医药大学实验动物中心,实验单位使用许可证号:SYXK(甘)2015-0005。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组:将 108 只小鼠采用随机数字表法将其随机分为 4 组:正常单纯股骨骨折组(Fracture 组)、正常骨折+腹腔注射 XMD8-92 组(Fracture + XMD8-92 组)、骨质疏松+骨折组(OVX + Fracture 组)、骨质疏松+骨折+腹腔注射 XMD8-92 组(OVX + Fracture + XMD8-92 组),每组各 27 只小鼠。

1.2.2 模型建立:(1)骨质疏松模型构建。通过切除小鼠双侧卵巢,并定期检测小鼠 BMD 值来构建骨质疏松动物模型。(2)股骨骨折模型构建。OVX 组小鼠 BMD 值下降达到要求后,使用 2% 戊巴比妥钠溶液,5 mL/kg 麻醉各组小鼠,麻醉满意后于超净工作手术台上,小鼠取仰卧位固定四肢,常规备皮、消

毒,于小鼠右股骨外侧行 0.5 cm 纵行切口,暴露股骨中段,用剪刀剪断造成股骨中段横行骨折,然后自髌骨旁内侧小切口,暴露股骨髁,由髌间窝处将 14 号尖针逆行植入髓腔,作为髓内固定针固定骨折断端,检查骨折断端固定良好后缝合切口。

1.2.3 实验处理及术后护理:小鼠股骨骨折术后室温(22℃~24℃)苏醒恢复活动后,XMD8-92 处理组小鼠腹腔注射 ERK5 特异性阻断剂 XMD8-92,50 mg/kg^[7-8],连续注射 4 w,其余两组小鼠以同法于腹腔注射同等量生理盐水,清洁环境下单笼饲养;术后 3 d 自由给水及饮食,并定时对手术切口局部注射青霉素钠预防伤口感染,3 d 后适度限制饮食控制体重。

1.3 实验标本采集

实验小鼠自建立股骨骨折模型术后第 1、2、4 周后分别随机选取该组实验小鼠总数的 1/3,并颈椎脱臼法处死,用于后续实验结果检测。

1.4 检测方法

1.4.1 X 线检查:各实验组小鼠分别随机选取 3 只,行术侧股骨 X 线片拍片检查,观察股骨骨折断端骨折愈合及骨折端骨痂生长情况。

1.4.2 微计算机断层扫描(micro computed tomography, micro-CT)检查:各组分别随机选取 3 只小鼠,将术侧股骨标本小心取下,对术侧股骨标本行 micro-CT 扫描及 3D 重建检查,比较股骨骨折水平骨折愈合及骨痂中骨小梁的微结构差异。

1.4.3 HE 染色检查:各组分别随机选取 3 只小鼠,将术侧股骨标本小心取下,剔除股骨上附着的肌肉组织,置于 4% 的多聚甲醛中固定。然后使用 10% 中性福尔马林溶液 100 mL 加 EDTA 5.5 g 配置的溶液浸泡标本进行脱钙,以尖针扎入股骨标本的难易度定期检查脱钙是否完成。脱钙完成后使用浓度梯度酒精对标本脱水,然后用二甲苯溶液透明处理。透明完成后将股骨骨痂标本组织块置于溶化的石蜡中充分包埋并凝固成块,专用切片机进行切片,厚度约 6 μm。然后用二甲苯脱蜡、水化,染色,最后用中性树胶封片,显微镜下观察。

1.4.4 免疫组织化学染色检查:各组分别随机选取 3 只小鼠,将术侧股骨标本小心取下,股骨骨痂石蜡切片,60℃烤箱烘烤约 120 min,然后用二甲苯、梯度酒精、PBS 及蒸馏水脱蜡至水,高压处理抗原修复,PBS 液漂洗 10 min×3 次,3% H₂O₂ 室温孵育 30 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,再次用 PBS 漂洗 10 min×3 次,5%~10% 正常山羊血清封闭,

室温孵育 30 min, 分别加 ALP、Runx2、ERK5 一抗工作液, 放于 4 ℃ 冰箱过夜处理, 再次 PBS 漂洗 10 min × 3 次, 滴加适量辣根酶工作液, 室温孵育约 2 h, PBS 漂洗 10 min × 3 次, DAB 显色 3 ~ 10 min, 自来水冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察。

1.5 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差表示, 结果使用 SPSS 19.0 软件行统计学分析, 各时间点的组间数据比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨质疏松模型建立结果

小鼠骨质疏松模型建立前股骨 BMD 值平均为 $(0.11 \pm 0.01) \text{ g/cm}^2$, 此后每间隔一周复测一次 BMD, 至 12 w 时测得小鼠股骨 BMD 降至 $(0.08 \pm 0.00) \text{ g/cm}^2$, 降低了约 27.3% ($P < 0.05$), 证明小鼠骨质疏松模型建立成功。

2.2 X 线检查结果

小鼠股骨骨折术后第 1 周, 单纯 Fracture 组、Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组股骨骨折处水平无明显骨痂生长, 骨折端比较锐利, 骨折线较明显, 仍清晰可见 (图 1 A)。

小鼠股骨骨折术后第 2 周, 单纯 Fracture 组股骨骨折线水平可见骨痂生长, 包绕骨折断端周围, 骨折线较模糊, Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折断端仍无明显骨痂生长, 骨折断端仍较明显, 骨折线仍清晰可见 (图 1 B)。

小鼠股骨骨折术后第 4 周, 单纯 Fracture 组股骨骨折线水平见骨痂进一步增多, 包绕骨折断端周围及骨皮质, 骨折线消失或模糊不清; 而 Fracture + XMD 组和 OVX + Fracture 组骨折断端可见少量骨痂, 骨折线较模糊, OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折断端骨痂生长更少, 骨折断端略模糊或仍可见明

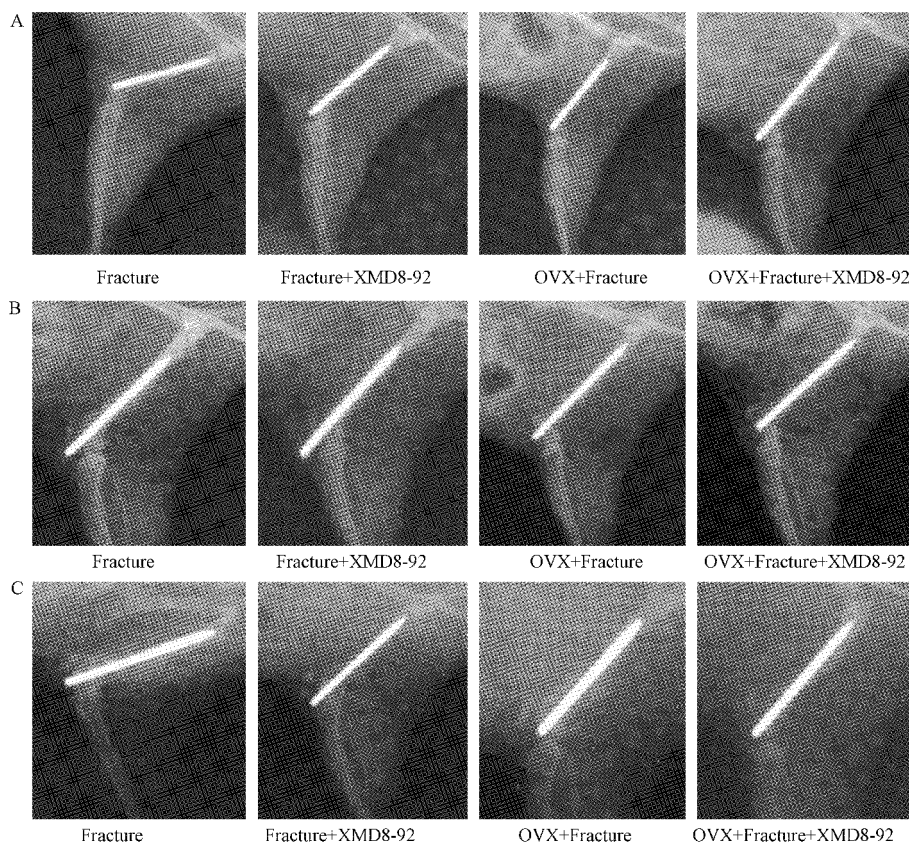


图 1 术后小鼠股骨 X 线片。A: 小鼠骨折术后第 1 周各组股骨 X 线片结果; B: 小鼠骨折术后第 2 周各组股骨 X 线片结果; C: 小鼠骨折术后第 4 周各组股骨 X 线片结果

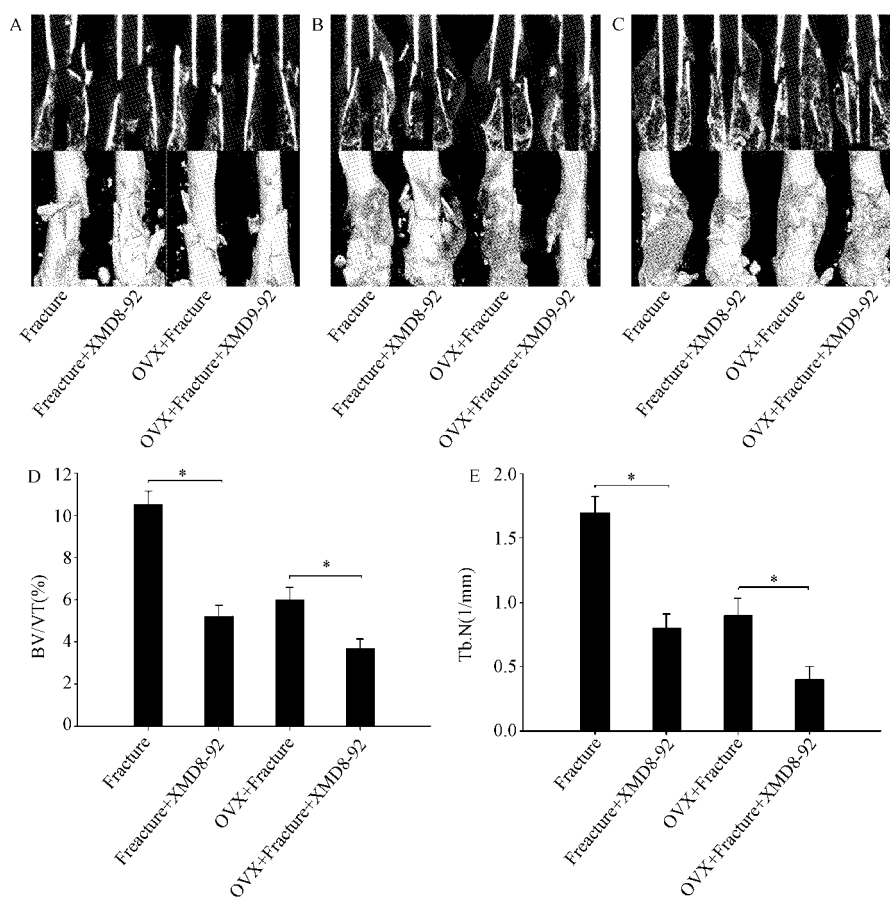
Fig. 1 Femoral X-ray in postoperative mice. A: The results of femoral X-ray in each group after 1 week of fracture; B: The results of femoral X-ray in each group after 2 weeks of fracture; C: The results of femoral X-ray in each group after 4 weeks of fracture.

显骨折线(图 1C)。

2.3 micro-CT 检查结果

小鼠股骨骨痂的 Micro-CT 扫描三维立体结构可以看出,XMD8-92 处理会影响小鼠股骨骨折的骨痂生长,影响骨折断端的愈合,使骨痂结构变得疏松,尤其在骨折愈合的第 2 和第 4 周较明显(图 2 A ~ C)。第 1 周时,各组均无明显骨痂生长,骨折端清晰可见,为避免增加系统误差影响实验的可靠性,未行骨痂 BMD 及骨微结构参数统计。第 2 周时,单纯 Fracture 组骨痂开始生长,包绕骨折断端,骨折线开始模糊。而 Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折处仍无明显骨痂生长或仅有少量骨痂,骨折线仍较清晰,OVX + Fracture + XMD8-92 组更为显著;与单纯 Fracture 组相比,Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组的骨痂区 BMD 分别减少了约 11.0%、13.7% 和 24.7%,而骨组织参数骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)分别减少了约 50.5%、42.9% 和 64.5%,骨小梁数目(number of trabecular bone, Tb. N)分别减少了约 52.9%、47.1% 和 76.5%,骨小梁厚度(thickness of trabecular bone, Tb. Th)分别减少了约 52.9%、

35.3% 和 70.6%,而骨小梁间隙(space of trabecular bone, Tb. Sp)分别增高了约 150.0%、90.0% 和 250.0%(图 2D ~ G)。第 4 周时,单纯 Fracture 组骨痂进一步增多,包裹骨折断端及其周围骨皮质,骨折线消失,骨痂骨小梁变得致密;Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组骨折断端骨痂较少,骨折断端较模糊,骨痂骨小梁较少而疏;而 OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折端骨痂则更少,骨折线较清晰,骨痂骨小梁更为稀少且疏松。与单纯 Fracture 组相比,XMD8-92 处理后的 Fracture + XMD 组 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 分别降低了约 29.8%、30.3%、39.3% 和 30.8%,而 Tb. Sb 增高了约 162.5%。由此表明,腹腔注射 XMD8-92 可以抑制小鼠骨折愈合过程中骨痂生长,减低骨痂 BMD 值及骨小梁数目。另外,OVX + Fracture + XMD8-92 组与 OVX + Fracture 组相比,则具有更低的 BMD(-13.9%, $P < 0.05$)、BV/TV(-38.3%, $P < 0.05$)、Tb. N(-55.6%, $P < 0.05$)、Tb. Th(-54.5%, $P < 0.05$),具有更高的 Tb. Sb(82.4%, $P < 0.05$)(图 2H ~ K)。这表明 XMD8-92 能够影响小鼠骨质疏松性骨折的愈合过程,抑制骨痂生长,降低骨小梁厚度及数目,使骨痂微结构变得更为疏松。



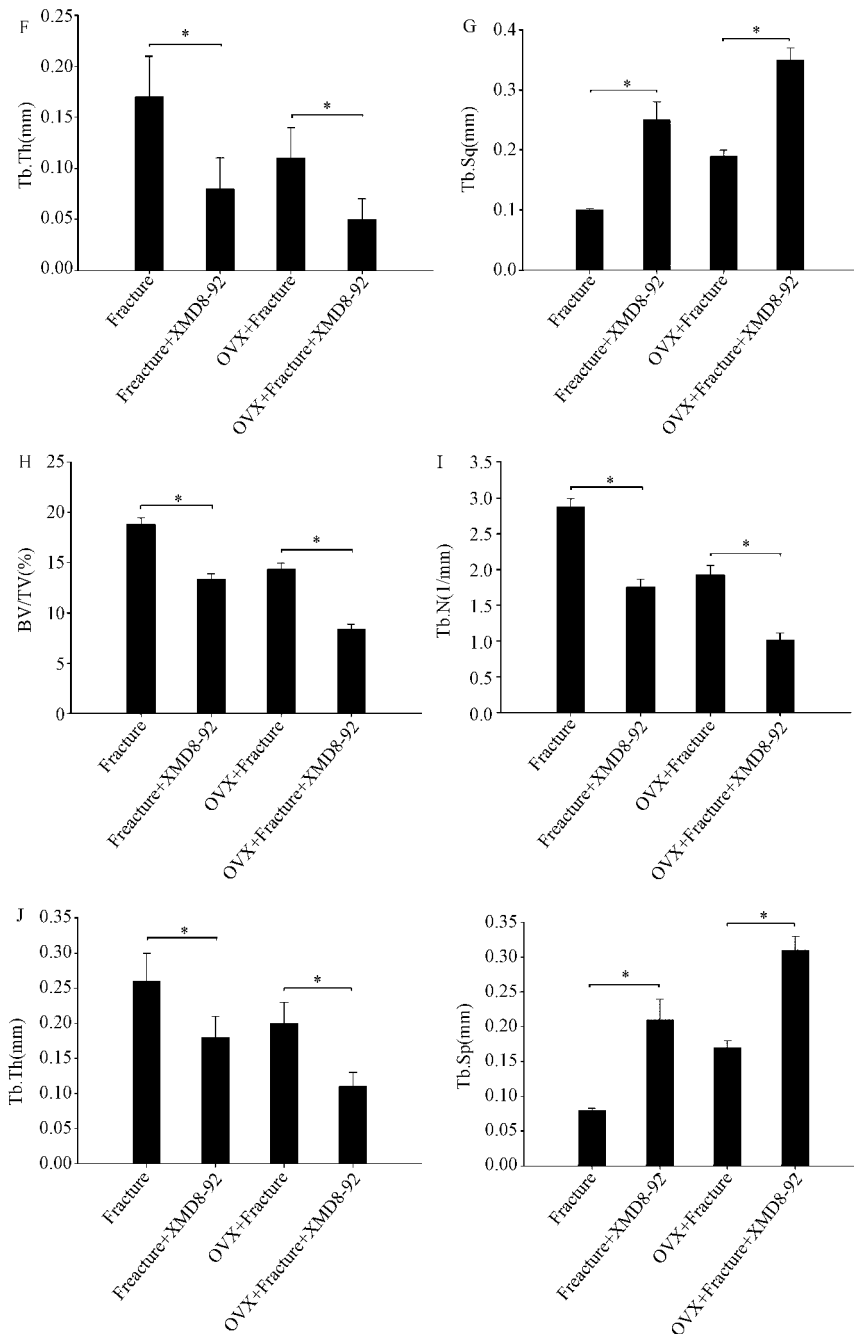


图 2 术后小鼠股骨骨痂的 Micro-CT 扫描及 3D 重建结果。A ~ C: 小鼠股骨冠状层面及重建扫描结果 (A、B、C 分别为第 1、2、4 周结果); D ~ K: 骨痂骨小梁各指标定量分析结果 (D ~ G 为第 2 周结果; H ~ K 为第 4 周结果)。BV/TV: 骨体积分数, Tb. N: 骨小梁数目, Tb. Th: 骨小梁厚度, Tb. Sp: 骨小梁间隙。* 表示两者间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$)

Fig. 2 Micro-CT scan and 3D reconstruction of femoral callus in postoperative mice. A-C: The femoral coronal plane scan and reconstruction results in mice at the 1st (A), 2nd (B), and 4th (C) week; D-K: Quantitative analysis of trabecular bone in the bone callus (D-G: the results of the 2nd week; H-K: the results of the 4th week). BV/TV: bone volume fraction, Tb. N: number of trabecular bone, Tb. Th: thickness of trabecular bone, Tb. Sp: space of trabecular bone. * Indicates a statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05, n = 3$).

2.4 HE 染色结果

第 1 周各组骨折处骨痂骨量较少且骨小梁生长

无明显差异。第 2 周可见单纯 Fracture 组骨痂量及骨小梁较其他 3 组增多, 而 OVX + Fracture 组与

OVX + Fracture + XMD8-92 组相比,骨小梁生长均较少且差异不明显。第 4 周可见 Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折端骨痂的量及骨小梁较单纯 Fracture 组少,

骨小梁菲薄;且与 OVX + Fracture 组相比,OVX + Fracture + XMD8-92 组骨痂的量及骨小梁数日则更为稀少且菲薄(图 3)。

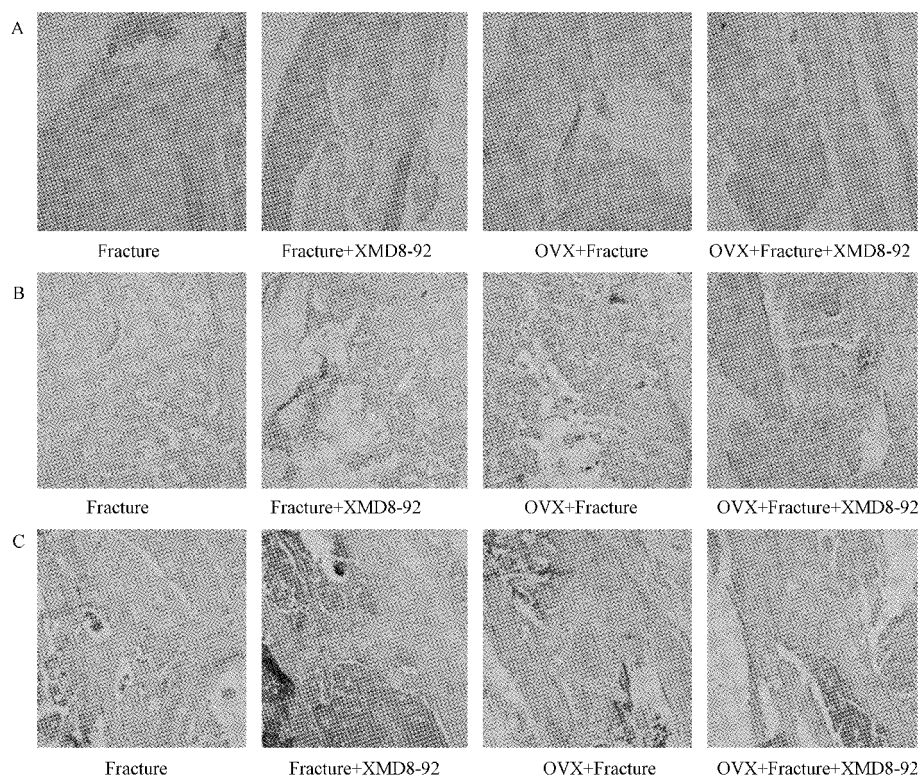


图 3 术后小鼠股骨骨痂的 HE 染色结果。A:第 1 周各组骨痂及骨小梁的结果;B:第 2 周各组骨痂及骨小梁的结果;C:第 4 周各组骨痂及骨小梁的结果

Fig. 3 HE results of postoperative femoral callus in mice. A: The results of callus and trabecular bone in the first week; B: The results of callus and trabecular bone in the second week; C: The results of callus and trabecular bone in the fourth week.

2.5 免疫组织化学染色结果

第 1 周各组骨痂标本中 ALP 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), 但 ERK5、Runx2 的表达 OVX + Fracture + XMD8-92 组却低于其他 3 组 ($P < 0.05$) (图 4 A、D)。第 2 周可见单纯 Fracture + XMD 组的 ERK5、ALP、Runx2 表达较其他 3 组高 ($P < 0.05$), 且 OVX + Fracture 组各蛋白表达均高于 OVX + Fracture + XMD8-92 组 ($P < 0.05$) (图 4 B、E)。第 4 周可见 Fracture + XMD 组、OVX + Fracture 组及 OVX + Fracture + XMD8-92 组骨折端骨痂中 ERK5、ALP、Runx2 表达较单纯 Fracture 组少 ($P < 0.05$); 且与 OVX + Fracture 组相比,OVX + Fracture + XMD8-92 组 ERK5、ALP、Runx2 表达则更少 ($P < 0.05$, 图 4 C、F)。

3 讨论

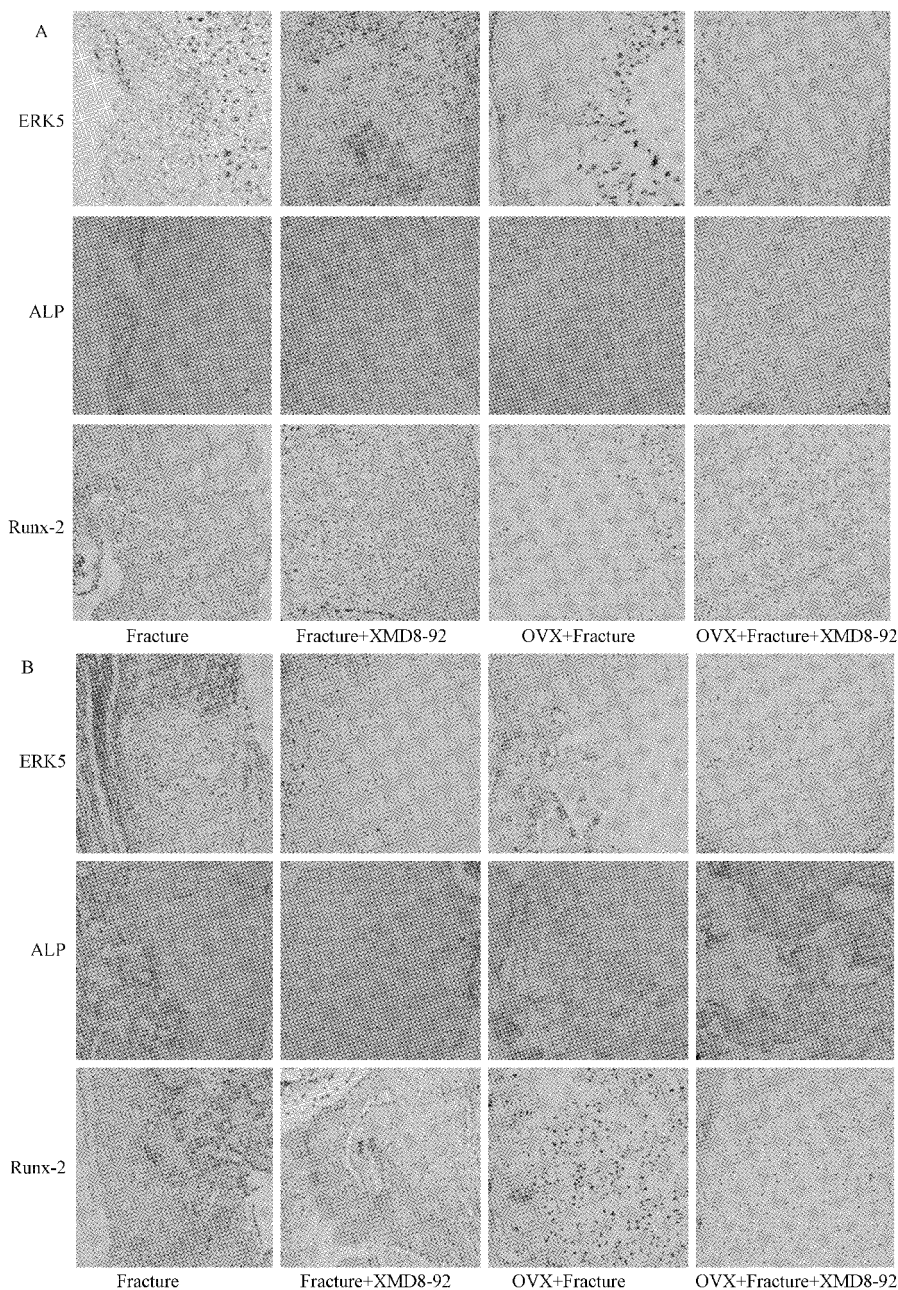
骨质疏松症与高血压、糖尿病、肿瘤及动脉粥样硬化共同被称作是当前的 5 大严重慢性疾病。BMD 检查是目前医疗界诊断 OP 的“金标准”,并可以通过该检查预测骨质疏松性骨折发生风险的高低,可以作为 OP 病程检测及治疗药物疗效评价的简单而准确的定量指标^[9-10]。骨的强度大小与 BMD 和骨含量有关,而骨强度的大小约 70% 是由 BMD 决定的^[11-13],当 BMD 值降低 1 个标准差时,骨强度的降低引起骨折风险将增加 1.5 ~ 2.6 倍^[14]。OP 患者的骨组织显微结构显示成骨细胞功能明显减弱,而破骨细胞数量增多,功能活跃,进而导致骨丢失增多,骨的形成明显减少,骨小梁数目减少,厚度变薄,骨小梁间距增宽,其抗应力能力下降,因而极易导致

微骨折的发生。

ERK5 是 MAPK 信号通路家族的重要成员^[15], 可被各种应激刺激(高渗刺激、低氧刺激、应力刺激等)所激活^[4], 激活后的 ERK5 可进一步刺激下游多种转录因子信号的表达, 其中最常作用于肌细胞增强因子(myocyte enhancer factor, MEF)家族中的 MEF2A, C, D 位点^[16-18], 进而参与细胞相应的信号转导及调控。而 ERK5 的这些上下游信号通路可被多种抑制剂如 BIX02188、BIX02189 以及 ERK5 特异性抑制剂 XMD8-92 所干扰阻断^[8,19-20], 因而提供了 ERK5 信号转到通路上特定的可控作用靶点。

ALP 是成骨细胞早期活性指标, 属于早期的成骨相关性蛋白, 可在成骨细胞增殖及分化早期检测

到^[21-24]。Runx2 是成骨分化过程中一个非常重要的转录因子, 可调节 ALP、OCN、OPN 等基因转录和表达^[25], 进而发挥成骨作用。实验研究显示, 流体剪切力(fluid shear stress, FSS)可以刺激并激活成骨细胞 ERK5 信号通路, 使磷酸化 ERK5 高表达, 进而调节成骨细胞增殖与分化功能, 参与成骨作用^[19,26-28]。间歇性的 FSS 施于成骨细胞后, 刺激 ERK5 高表达并发生磷酸化, 增强 ALP、OCN、OPN 活性及表达增加; 而 ERK5 的活性被抑制剂阻断后, 成骨细胞 ALP 活性、OCN、OPN 和 Runx2 表达明显被抑制^[5]。由此可见, ERK5 与成骨细胞增殖和分化及骨骼组织的成骨作用密切相关。



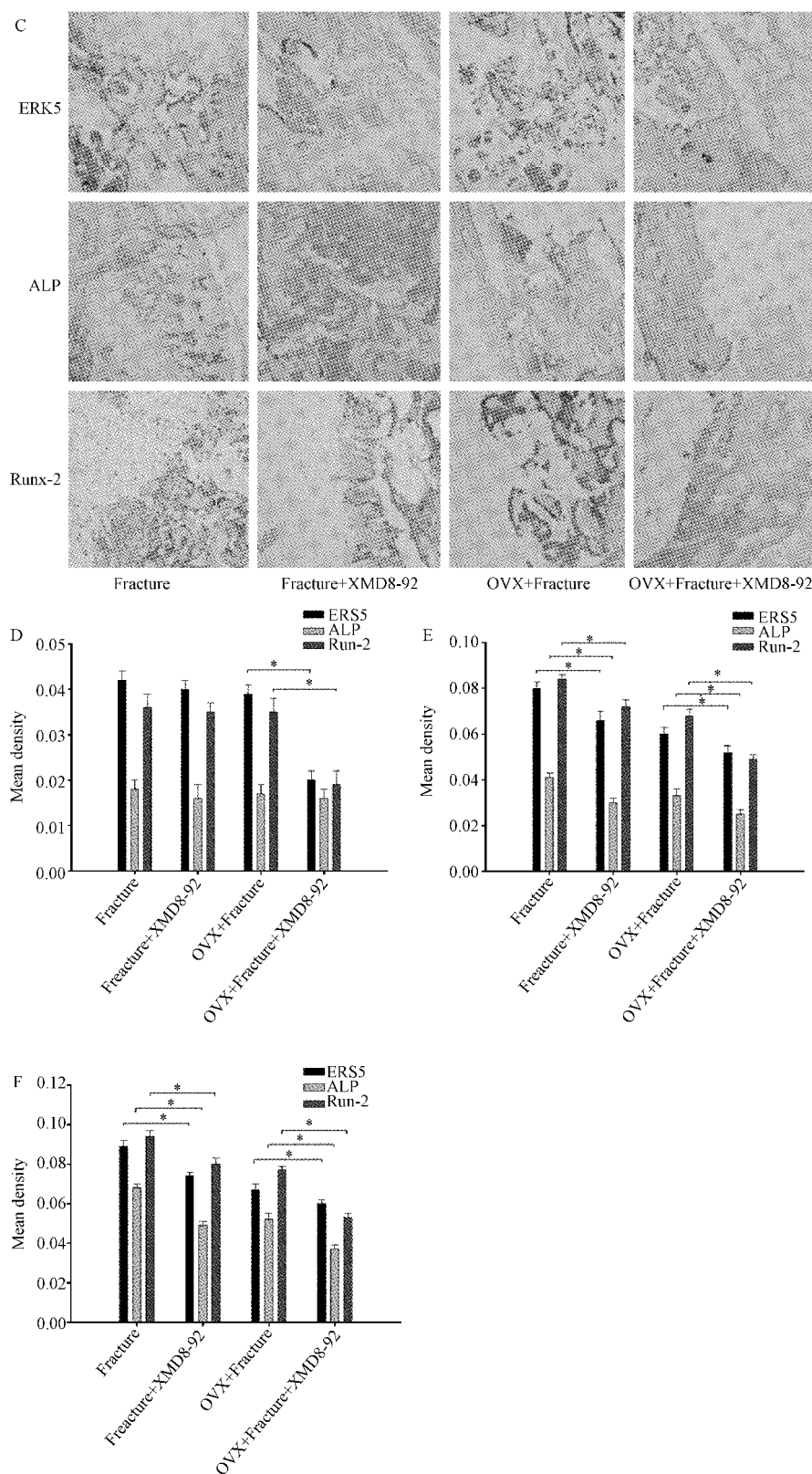


图4 术后小鼠股骨骨痂的免疫组织化学染色结果。A~C:分别为第1、2、4周小鼠骨痂免疫组化染色中ERK5、ALP、Runx2的表达结果;D~F:分别为第1、2、4周小鼠骨痂免疫组化染色中ERK5、ALP、Runx2的表达量以光密度转换为具体数值行定量分析的结果。*表示两者间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $n = 3$)

Fig. 4 Immunohistochemical staining results of postoperative femoral callus in mice. A-C: Immunohistochemical staining of the expression of ERK5, ALP and Runx-2 in callus at the 1st, 2nd and 4th week, respectively; D-F: Quantitative analysis of the expression of ERK5, ALP and Runx-2 in callus. * Indicates a statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05$, $n = 3$).

本实验将通过切除小鼠双侧卵巢(OVX)来构建骨质疏松动物模型,通过 OVX 术前测量 BMD 值作为骨密度的起始值,行 OVX 术后 12 w 小鼠股骨 BMD 值较术前降低明显,差异有统计学意义,证明通过切除小鼠双侧卵巢构建绝经后骨质疏松动物模型是可行的。然后分别构建小鼠正常股骨骨折模型、骨质疏松股骨骨折模型,并通过给小鼠腹腔注射 ERK5 特异性阻断剂 XMD8-92,可以发现 XMD8-92 使正常骨折骨痂形成速度减慢,且通过 Micro-CT 及 HE 染色结果可以观察到,腹腔注射 XMD8-92 组小鼠,股骨骨折端骨痂变薄疏松,骨小梁数目减少,骨小梁较纤细且紊乱,这与 X 线片显示的注射 XMD8-92 组小鼠股骨骨折端愈合差于单纯骨折组相一致。另外,骨质疏松性骨折模型组小鼠骨痂形成则更为缓慢,同样通过 Micro-CT 及 HE 染色结果可以看到,腹腔注射 XMD8-92 的骨质疏松组小鼠,股骨骨折端骨痂更加稀少菲薄,骨小梁数目极少,骨小梁细长且极其紊乱;而且通过 X 线片结果也可更直观地看到骨质疏松性骨折加腹腔注射 XMD8-92 组小鼠股骨骨折愈合相比其他各组明显减慢且愈合明显较差。可见,XMD8-92 的阻断抑制作用可进一步抑制骨质疏松性骨折的成骨过程,影响骨折愈合。另外,通过小鼠股骨痂标本免疫组织化学染色,结果显示 XMD8-92 处理组 ERK5 活性及表达减低,ERK5 下游多种转录因子信号的合成及表达受阻,进而使成骨相关蛋白产物 ALP、Runx-2 的表达量也随之减低;且骨质疏松性骨折 + XMD8-92 组与单纯骨质疏松 + 骨折组相比,ERK5 活性及 ALP、Runx-2 表达更低,进而严重阻滞了小鼠股骨骨折端成骨过程,使骨小梁的正常爬行生长秩序被打乱,骨小梁形成受阻,从而表现为骨折端骨痂生成的质和量明显受限。可见,阻断 ERK5 后,骨质疏松性骨折成骨相关蛋白表达受阻,骨小梁生成障碍,骨痂生长的速度和质量减低,从而阻碍了骨折愈合的宏观过程。

由此可见,ERK5 参与骨折愈合过程成骨相关蛋白的合成表达,影响骨痂形成的速度和质量,参与调控小鼠股骨骨折的早期愈合。因此,ERK5 在促进骨质疏松性的骨折愈合过程中起着十分重要的生理作用,但 ERK5 具体通过何种方式、何种信号通路调控骨质疏松性骨折的愈合过程,以及 ERK5 与成骨形成过程中其他信号通路间是否具有协同或相互制约关系,并达到怎样的平衡来共同调节成骨及骨质疏松骨折愈合,有待进一步的探索及实验研究来证实。

【参 考 文 献】

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [2] Klein-Nulend J, van Oers RF, Bakker AD, et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *J Biomech*, 2015, 48(5): 855-865.
- [3] Vondracek SF, Linnebur SA. Diagnosis and management of osteoporosis in the older senior. *Clin Interv Aging*, 2009, 4(1): 121-136.
- [4] Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, et al. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem*, 1996, 271(28): 16586-16590.
- [5] Zhao LG, Chen SL, Teng YJ, et al. The MEK5/ERK5 pathway mediates fluid shear stress promoted osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(2): 96-102.
- [6] 张红白, 葛虹, 贾艳芳, 等. 围绝经期与绝经后期女性骨密度及其影响因素的比较分析. *山西医药杂志*, 2014, 43(8): 889-891.
Zhang HB, Ge H, Jia YF, et al. Comparative analysis of bone mineral density and its influencing factors in postmenopausal menopause and postmenopausal women. *Shanxi Medical Journal*, 2014, 43(8): 889-891. (in Chinese)
- [7] Yang Q, Lee JD. Targeting the BMK1 MAP kinase pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): 3527-3532.
- [8] Yang Q, Deng X, Lu B, et al. Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell*, 2010, 18(3): 258-267.
- [9] 张清学, 邱健全, 王文军, 等. 绝经后妇女骨质疏松危险因素的临床分析. *新医学*, 2001, 32(1): 23-25.
Zhang QX, Kuang JQ, Wang WJ, et al. Clinical analysis of risk factors for postmenopausal osteoporosis in women. *New Medicine*, 2001, 32(1): 23-25. (in Chinese)
- [10] Curtis EM, Moon RJ, Harvey NC, et al. The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. *Handbook of the Psychology of Aging*, 2017, 26(3): 289-313.
- [11] Dalle CL, Giannini S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2004, 27(1): 99.
- [12] Atkinson PJ. Variation in trabecular structure of vertebrae with age. *Calcif Tissue Res*, 1967, 1(1): 24-32.
- [13] Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int*, 2003, 14(Suppl 3): 13-18.
- [14] Christiansen C. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1993, 94(6): 646-650.
- [15] Jong PRD, Taniguchi K, Harris AR, et al. ERK5 signalling rescues intestinal epithelial turnover and tumour cell proliferation upon ERK1/2 abrogation. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 1-15.

目前研究骨质疏松症的发病机理虽然较多,但是基于 PI3-K/AKT 信号通路,从破骨细胞凋亡作为研究的切入点,探索中医药对破骨细胞凋亡的影响及机制的相关研究较少。因此,本研究对于中医药临床防治糖皮质激素性骨质疏松症有一定的意义。

【参 考 文 献】

- [1] Shi J, Wang L, Zhang H, et al. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. *Bone*, 2015, 79: 222-232.
 - [2] 王志超,李志毅. 鹿角胶丸对骨质疏松模型大鼠影响的实验研究. *中医正骨*, 2003, 15(11): 16-17.
Wang ZC, Li ZY. Experimental study on the effect of Lu jiao jiao pill on osteoporosis in rats. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2003, 15(11): 16-17.
 - [3] 侯晨艳,高继光,付尔康. 鹿角胶钙颗粒剂对大鼠实验性骨质疏松症的研究. *中国现代应用药学*, 2000, 17(1): 66-68.
Hou CY, Gao JG, Fu EK. Study on experimental osteoporosis of rats treated with calcium granule of Lu jiao jiao pill. *Chinese Modern Pharmacy*, 2000, 17(1): 66-68.
 - [4] Beavan S, Horner A, Bord S, et al. Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1496-1504.
 - [5] Yu DD, Mu S, Zhao DY, et al. Puerarin attenuates glucocorticoid-induced apoptosis of hFOB1.19 cells through the JNK- and Akt-mediated mitochondrial apoptotic pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015 (36): 345-354.
 - [6] Lee EJ, Kim JL, Kim YH. Phloretin promotes osteoclast apoptosis in murine macrophages and inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis in mice. *Phytomedicine*, 2014, 21(10): 1208-1215.
 - [7] Li F, Sun X, Ma J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 629-635.
 - [8] Yue L, Haroun S, Parent JL, et al. Prostaglandin D(2) induces apoptosis of human osteoclasts through ERK1/2 and Akt signaling pathways. *Bone*, 2014, 60: 112-121.
 - [9] Wang Y, Han R, Liang ZQ, et al. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy*, 2008, 4(2): 214-226.
(收稿日期: 2017-11-25; 修回日期: 2018-03-09)
-
- (上接第 864 页)
- [16] Kato Y, Zhao M, Morikawa A, et al. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 18534-18540.
 - [17] Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, et al. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(20): 4771-4777.
 - [18] Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, et al. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J*, 1997, 16(23): 7054-7066.
 - [19] Li P, Ma YC, Sheng XY, et al. Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 321-327.
 - [20] Tusa I, Cheloni G, Gray N, et al. Abstract 3904: Inhibition of the ERK5 pathway as a novel approach to target human chronic myeloid leukemia stem cells. *Cancer Research*, 2017, 77(113): 3904.
 - [21] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*, 1990, 4(13): 3111-3123.
 - [22] Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, et al. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 8631-8634.
 - [23] Leong ML, Maiyar AC, Kim B, et al. Expression of the serum and glucocorticoid-inducible protein kinase, sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5871-5882.
 - [24] Oliveira FA, Matos AA, Matsuda SS, et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2017, 169(1): 35.
 - [25] Hayashi M, Kim SW, Imanaka-Yoshida K, et al. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest*, 2004, 113(8): 1138-1148.
 - [26] Li P, Ma YC, Shen HL, et al. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells. *Cell Biol Int*, 2012, 36(3): 229-236.
 - [27] Delaine-Smith RM, Sittichokechaiwut A, Reilly GC. Primary cilia respond to fluid shear stress and mediate flow-induced calcium deposition in osteoblasts. *FASEB J*, 2014, 28(1): 430-439.
 - [28] Basso N, Heersche JN. Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models. *Bone*, 2002, 30(2): 347-351.
(收稿日期: 2017-07-29; 修回日期: 2017-10-31)