

· 论 著 ·

防己诺林碱对糖皮质激素诱导雄性骨质疏松大鼠影响的研究

徐志平* 卞龙艳 闻纯

江苏医药职业学院基础教研室, 江苏 盐城 224005

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0323-05

摘要: **目的** 探讨防己诺林碱对骨质疏松症的保护作用并假设可能的作用机制。**方法** 通过对大鼠皮下注射泼尼松龙(2.5 mg/kg)4周诱导形成骨质疏松症。分别对大鼠腹腔注射防己诺林碱 1、3、10 mg/kg,持续一个月时间。通过测量大鼠股骨干骺端组织的微结构参数和骨密度(bone mineral density, BMD)来评估防己诺林碱的保护作用,并检测泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠血清中的生化指标。同时,测量大鼠股骨组织中 Beclin-1、骨形态发生蛋白 2(BMP2)、自噬相关 5(ATG-5)、Runt 相关转录因子 2(RUNX-2)和核因子 κ B 配体受体激活因子(RANKL)的基因表达[通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)蛋白]。**结果** 与泼尼松龙组相比,防己诺林碱治疗组大鼠椎骨组织中 BMD 和微结构参数显著增加($P<0.01$)。同时还发现用防己诺林碱治疗减弱了泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠的 BMP2、Beclin-1、ATG-5、RUNX-2 和 RANKL 蛋白的表达。此外,防己诺林碱治疗和泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠血清中生化参数水平减弱。**结论** 防己诺林碱通过增加自噬来预防泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠骨质流失。

关键词: 自噬;甲基泼尼松龙;骨质疏松症

Effect of fangchinoline on glucocorticoid-induced osteoporosis in male rats

XU Zhiping*, YAN Longyan, WEN Chun

Department of Basic Education, Jiangsu Medical Vocational College, Yancheng 224005, China

* Corresponding author: XU Zhiping, Email:2076640735@qq.com

Abstract: **Objective** The present investigation evaluated the protective effect of fangchinoline against osteoporosis and also postulated the possible mechanism of action. **Methods** Osteoporosis was induced by subcutaneously injecting prednisolone (2.5 mg/kg) for 4 weeks. Fangchinoline 1, 3 and 10 mg/kg was given intraperitoneally for the period. Protective effects of fangchinoline were assessed by estimating microarchitectural parameters and bone mineral density (BMD) of the femoral metaphysis tissues, and biochemical parameters were also determined in the serum of rats with prednisolone-induced osteoporosis. Moreover, gene expression of Beclin-1, bone morphogenetic protein 2 (BMP2), autophagy-related 5 (ATG-5), Runt-related transcription factor 2 (RUNX-2), and receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand (RANKL) protein in the vertebrae tissue were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. **Results** There was a significant ($P<0.01$) increase in the BMD and microarchitectural parameters in the vertebrae tissue of the fangchinoline-treated group compared to the prednisolone group. We also found that treatment with fangchinoline attenuated the altered expressions of BMP2, Beclin-1, ATG-5, RUNX-2 and RANKL protein in the prednisolone-induced osteoporosis rats. Moreover, levels of biochemical parameters were attenuated in the serum of fangchinoline-treated and prednisolone induced osteoporosis rat. Histopathology revealed that the apoptosis of osteoblasts was decreased in the fangchinoline-treated group compared with the prednisolone group of rats. **Conclusion** Fangchinoline protects against bone loss in prednisolone-induced osteoporosis rats by inducing autophagy.

Key words: autophagy; methylprednisolone; osteoporosis

骨质疏松是一种常见的骨骼疾病,影响全球 20 多亿人^[1]。骨质疏松的特征是骨密度降低,骨强度

降低,骨组织结构发生改变^[2]。女性绝经后骨质疏松导致骨折风险增加。在中国,40.1%的 50 岁以上女性患有骨质疏松。骨重建随着成骨细胞骨形成减少和破骨细胞骨吸收增加而改变^[3]。骨密度(bone

* 通信作者: 徐志平, Email:2076640735@qq.com

mineral density, BMD)在骨质疏松筛查中用于评估和诊断^[4]。骨微观结构的改变和骨密度的降低导致机械强度降低,微型计算机断层扫描(Micro-CT)也被用来诊断骨质疏松^[5]。目前已建立了几种骨质疏松动物模型,糖皮质激素诱导的骨质疏松是最常见的骨质疏松模型之一^[6]。文献^[7]表明,糖皮质激素治疗使骨基质形成减少,骨吸收增加,从而减少了骨细胞和成骨细胞的产生。此外,糖皮质激素可减少成骨细胞的自噬并诱导其凋亡^[8]。糖皮质激素通过促进 Bcl-2 的表达和下调 Bcl-xl 的表达而引起细胞凋亡^[9]。在过去的几十年中,替代医学在治疗包括神经性疾病在内的几种疾病方面显示出了潜力。防己诺林碱是一种生物碱,据报道^[10]具有抗炎活性。防己诺林碱还具有很强的自由基清除、降压、抗癌、抗氧化、抗血栓等作用^[11]。因此,本研究将探讨防己诺林碱对骨质疏松和骨丢失的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

12 周龄雄性 Wistar 大鼠,体重 240~280 g,购自上海动物史莱克公司。将动物饲养在湿度(60±5)%和温度(26±2)℃的环境中,具有 12 h 夜间/白天循环。化学品防己诺林碱购自 Sigma Aldrich (CA, USA); TRIzol 试剂和 cDNA 合成试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific (MA, USA); Lowry 蛋白质测定试剂盒购自 Bio-Rad Laboratories (CA, USA); 抗 Bcl-2 抗体(1:400)、抗 caspase-3(1:500)、抗 BMP2(1:800)、抗 Beclin-1(1:600)和抗 RANKL(1:1 000)从 Santa Cruz Biotechnology (TX, USA) 获得;抗 LC3(1:1 000)和抗 GAPDH(1:1 500)来自 Cell Signaling Technology (MA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 研究方案:将所有动物分成 5 个独立研究的组:未治疗的对照组(A组);泼尼松龙治疗组(B组)皮下注射泼尼松龙(2.5 mg/kg);防己诺林碱低剂量组(C组)给予腹腔注射防己诺林碱(1 mg/kg)联合皮下注射泼尼松龙(2.5 mg/kg);防己诺林碱中剂量组(D组)给予腹腔注射防己诺林碱(3 mg/kg)联合皮下注射泼尼松龙(2.5 mg/kg);防己诺林碱高剂量组(E组)给予防己诺林碱(10 mg/kg)联合皮下注射泼尼松龙(2.5 mg/kg)。治疗 1 个月后评估防己诺林碱对骨质疏松症的影响。

1.2.2 检测指标评估:在治疗方案结束时,分离大鼠双侧股骨并在室温下用 1% 甲醛固定过夜,然后

在室温下浸入 70% 乙醇中 2 h。使用微型 CT 仪器 SCANCO 图像处理语言软件。使用双能 X 线 DCS-600 Aloka 骨密度仪测量分离骨样品的 BMD。将动物麻醉后收集血液进行生化参数的评估,2 000 r/min,离心 10 min 分离血清。根据制造商的说明,使用自动分析仪在血清中测定碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的活性以及磷和钙的浓度。ELISA 试剂盒用于测定 I 型片段胶原(CTX)和骨钙蛋白(OC)蛋白的血清浓度。

1.2.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR):在治疗方案结束时,从所有动物中分离胫骨组织,并按照制造商给出的说明使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。根据 cDNA 合成试剂盒制造商的说明,从 RNA 反转录 cDNA。使用 StepOne 实时 PCR 系统进行定量 PCR,并将 GAPDH 用作内部对照。通过在 95℃ 热循环 10 min 进行 PCR,然后在 95℃、45℃、60℃ 下进行 40 个循环 15 s,最后延伸步骤 95℃ 15 s、60℃ 1 min、95℃ 15 s、60℃ 15 s。使用的引物是核因子-κB 配体(RANKL)、自噬蛋白(ATG)5、Runt 相关转录因子(RUNX)2、Beclin-1、骨形态发生蛋白 2(BMP2)和 GAPDH 的受体激活剂。比较 Cq 方法用于测定相对基因表达,GAPDH 用作内部对照。

1.3 统计学处理

所有数据均表示为均数±标准差。使用单向 ANOVA 进行统计分析。通过 Dunnett 的事后检验(GraphPad Prism 6.1, CA, USA)进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 防己诺林碱对微结构参数和 BMD 的影响

显微 CT 分析显示出防己诺林碱对泼尼松龙诱导的骨质疏松大鼠股骨干骺端的骨丢失影响(图 1、表 1)。与对照组相比,在泼尼松龙组中发现的微结构参数如骨表面密度、小梁骨组织体积密度、小梁数和小梁数厚度显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。然而,用防己诺林碱治疗显著减弱了泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠股骨干骺端微结构参数的改变。泼尼松龙组的骨密度 $[(0.128 \pm 0.007) \text{ g/cm}^3]$ 显著低于对照组 $[(0.297 \pm 0.013) \text{ g/cm}^3]$ 。与泼尼松龙组相比,防己诺林碱治疗组的 BMD 显著增加至 $(0.273 \pm 0.017) \text{ g/cm}^3$ 。

2.2 防己诺林碱对大鼠血清生化参数的影响

本研究进一步评估了防己诺林碱对泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠血清生化指标的影响,如图 2 所示。与对照组相比,泼尼松龙组大鼠血清中

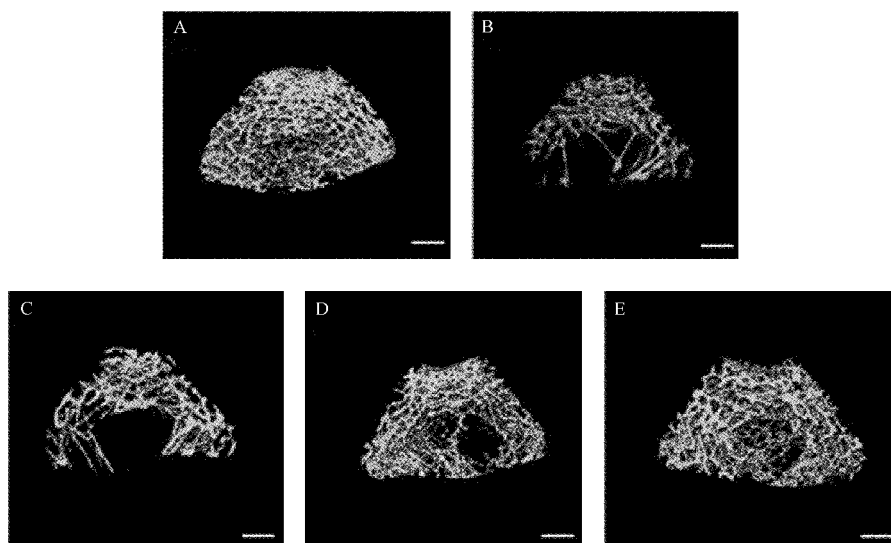


图1 防己诺林碱对泼尼松龙所致骨质疏松大鼠股骨三维重建显微CT图像的影响 A:对照组;B:泼尼松龙治疗组;C:防己诺林碱低剂量组;D:防己诺林碱中剂量组;E:防己诺林碱高剂量组。

Fig.1 Assessment of the effect of fangchinoline on 3D-reconstructed micro-CT images of the femur of the prednisolone-induced osteoporosis rats

表1 防己诺林碱对泼尼松龙所致骨质疏松大鼠微结构参数及骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Assessment of the effect of fangchinoline on microarchitectural parameters and BMD in the prednisolone-induced osteoporosis rat model ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	骨表面小梁密度/mm ⁻¹	骨小梁体积骨密度/%	小梁数目/mm ⁻¹	小梁厚度/mm	骨密度/(g/cm ³)
A组	3.92±0.42	37.21±2.97	1.42±0.036	0.279±0.041	0.297±0.013
B组	2.36±0.28 [#]	22.49±1.42 [#]	0.83±0.028 [#]	0.246±0.017 [#]	0.128±0.007 [#]
C组	2.61±0.33	26.33±1.69	0.94±0.019	0.258±0.023	0.163±0.004 [*]
D组	3.17±0.29 ^{**}	32.84±2.16 ^{**}	1.27±0.023 ^{**}	0.264±0.014 [*]	0.236±0.011 ^{**}
E组	3.72±0.32 ^{**}	36.42±2.46 ^{**}	1.58±0.031 ^{**}	0.283±0.031 [*]	0.273±0.017 ^{**}

注:与对照组相比,[#] $P<0.01$;与泼尼松龙组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

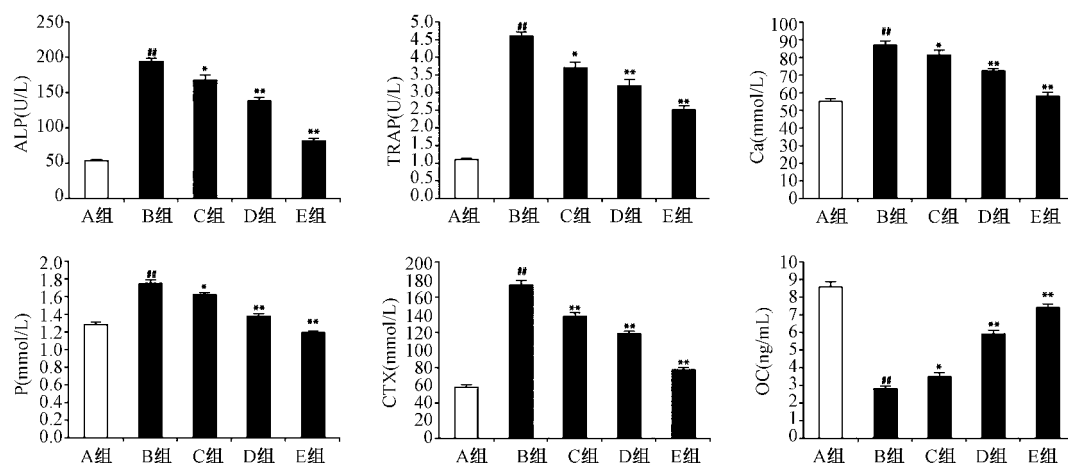


图2 防己诺林碱对泼尼松龙所致骨质疏松大鼠血清生化指标的影响 A:对照组;B:泼尼松龙治疗组;C:防己诺林碱低剂量组;D:防己诺林碱中剂量组;E:防己诺林碱高剂量组。

注:与对照组相比,[#] $P<0.01$;与泼尼松龙组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

Fig.2 Assessment of the effect of fangchinoline on biochemical parameters in the serum of prednisolone-induced osteoporosis rat model

ALP 和 TRAP 活性以及 Ca、P 和 CTX 水平显著增加 ($P < 0.01$)。此外,与对照组相比,泼尼松龙组大鼠血清中 OC 水平显著降低 ($P < 0.01$)。用防己诺林碱治疗改变了泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠血清中的生化参数,例如 ALP 和 TRAP 的活性以及 Ca、P、OC 和 CTX 的水平。

2.3 防己诺林碱对 RANKL、ATG-5、RUNX-2、Beclin-1 基因表达的影响

防己诺林碱对 RANKL、ATG-5、RUNX-2、Beclin-1 基因表达的影响如图 3 所示。泼尼松龙诱导的骨

质疏松症大鼠股骨组织中 BMP2 的水平较对照组显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比,泼尼松龙组股骨组织中 ATG-5、RUNX-2 和 Beclin-1 的基因表达显著降低并且 RANKL 的表达显著增强 ($P < 0.01$)。然而,与泼尼松龙组相比,用防己诺林碱治疗的 C、D 和 E 组显著增强了 ATG-5、RUNX-2、Beclin-1 和 BMP2 的基因表达,并且股骨组织中 RANKL 的表达显著降低 ($P < 0.01$);且上述疗效以剂量依赖的方式出现。

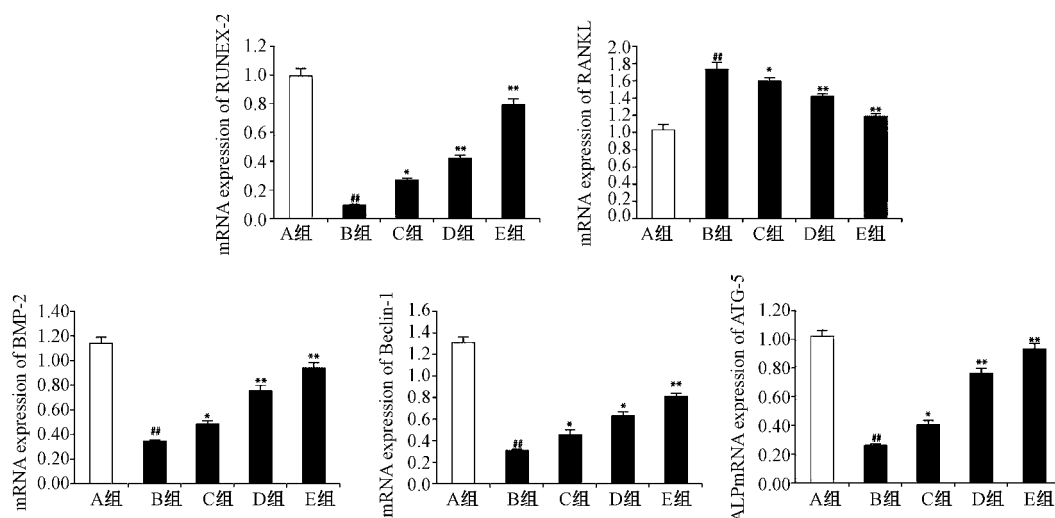


图3 防己诺林碱对泼尼松龙所致骨质疏松大鼠股骨组织 RANKL、ATG-5、RUNX-2、Beclin-1、BMP2 基因表达的影响 A:对照组;B:泼尼松龙治疗组;C:防己诺林碱低剂量组;D:防己诺林碱中剂量组;E:防己诺林碱高剂量组。

注:与对照组相比, # $P < 0.01$; 与泼尼松龙组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig.3 Assessment of the effect of fangchinoline on gene expression of RANKL, ATG-5, RUNX-2, Beclin-1 and BMP2 in the femur tissues of prednisolone-induced osteoporosis rat model

3 讨论

之前的一项研究^[12]表明,泼尼松龙诱导的骨质疏松症是一种成熟的骨质疏松症大鼠模型,因为血清中的生化参数水平发生了改变,BMD 降低。本次研究结果表明防己诺林碱治疗显著减弱了血清中生化参数的改变水平,并且还改善了泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠股骨 BMD。据报道^[13],泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠中,骨的微结构也发生了改变,从而降低了骨强度。使用防己诺林碱治疗会影响泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠股骨干骺端中微观结构的改变。

文献^[14]显示,成骨细胞分泌 BMP2,调节成骨细胞的矿化和增殖。此外据报道^[15],通过 RANK 的表达和 RUNX-2 的表达激活破骨细胞,与骨质疏松

症有关。本次研究表明,使用防己诺林碱治疗可以剂量依赖性地减弱泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠股骨干骺端骨组织中 BMP-2、RANKL 和 RUNX-2 蛋白的表达。自噬也是骨质疏松症发展的机制之一,据报道^[16],一些蛋白质如 ATG-5 和 Beclin-1 是自噬体的调节蛋白,并且使用防己诺林碱治疗改变了这几种蛋白质的水平,如 ATG-5 和 Beclin-1,以剂量依赖的方式在泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠股骨组织中表达。

综上,防己诺林碱可通过诱导自噬来抑制成骨细胞的凋亡并防止泼尼松龙诱导的骨质疏松症大鼠骨质流失,其对骨质疏松症具有很强的活性,可能是一种很有意义的临床研究分子。

【参考文献】

- [1] Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis [J]. Eur J Rheumatol, 2017,4(1): 46-56.
- [2] Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, et al. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis [J]. Injury, 2016,47: S11-S20.
- [3] Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling [J]. Annu Rev Pathol, 2011,6(1): 121-145.
- [4] Berry SD, Samelson EJ, Pencina MJ, et al. Repeat bone mineral density screening and prediction of hip and major osteoporotic fracture [J]. JAMA, 2013,310(12): 1256-1262.
- [5] Nishiyama KK, Shane E. Clinical imaging of bone microarchitecture with hr-pQCT [J]. Curr Osteoporos Rep, 2013,11(2): 147-155.
- [6] 孙平, 虎松艳, 巫培康, 等. 复方贞术调脂胶囊对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血脂和骨转换指标的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(10): 1308-1310, 1314.
- [7] 张家国, 徐晓峰, 李明, 等. 银杏叶提取物对糖皮质激素诱导的骨质疏松症大鼠骨密度和骨生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019,25(4): 461-464, 471.
- [8] Han Y, Zhang L, Xing Y, et al. Autophagy relieves the function inhibition and apoptosis promoting effects on osteoblast induced by glucocorticoid [J]. Int J Mol Med, 2018,41(2): 800-808.
- [9] Qian YH, Xiao QH. Dexamethasone inhibits camptothecin-induced apoptosis in C6-glioma via activation of Stat5/Bcl-xL pathway [J]. Biochim Et Biophys Acta, 2009, 1793(5): 764-771.
- [10] Taiki T, Shinjiro K, Ying LY, et al. Anti-hyperglycemic effect of fangchinoline isolated from *Stephania tetrandra* Radix in streptozotocin-diabetic mice [J]. Biol Pharmaceut Bulletin, 2003,26(3): 313.
- [11] GāLāIn I, Elias R, Gepdiremen A, et al. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2010,25(1): 44-53.
- [12] Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy [J]. Osteoporos Int, 2007,18(10): 1319-1328.
- [13] Wei Y, Zhiqiang C, Aaron P, et al. Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization [J]. Arthritis Rheumatol, 2010, 58(11): 3485-3497.
- [14] Guiqian C, Chuxia D, Yi-Ping L. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. Int J Biol Sci, 2012,8(2): 272-288.
- [15] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling [J]. Arch Biochem Biophys, 2008,473(2): 139-146.
- [16] Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, et al. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy [J]. Proc Japan Acad, 2017, 93(6): 378-385.

(收稿日期: 2019-03-21; 修回日期: 2019-05-06)

(上接第322页)

- [15] Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J, et al. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 95: 19-25.
- [16] Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2010,62(3): 791-801.
- [17] Carames B, Hasegawa A, Taniguchi N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2012,71(4): 575-581.
- [18] 阮丽萍, 刘健, 葛瑶, 等. 骨关节炎大鼠软骨 PI3K/Akt-mTOR 及 Beclin-1 自噬通路的表达及相关性分析 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015,44(4): 429-433, 439.
- [19] Chou YJ, Chuu JJ, Peng YJ, et al. The potent anti-inflammatory effect of *Guilu Erxian* Glue extracts remedy joint pain and ameliorate the progression of osteoarthritis in mice [J]. J Orthop Surg Res, 2018,13(1): 259.
- [20] Liu A, Wang P, Zhang J, et al. Restoration effect and tribological behavior of hyaluronic acid reinforced with graphene oxide in osteoarthritis [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019,19(1): 91-97.

(收稿日期: 2018-10-20; 修回日期: 2019-01-16)