

· 论 著 ·

人工虎骨粉对去卵巢大鼠骨组织中 Sirt1/Runx2 信号通路的影响

邹毅 冷华伟 桂鹏 张均泉 张玉峰 王奎 王明辉 叶茂*

中国贵航集团三〇二医院骨科, 贵州 安顺 561000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 08-1142-05

摘要: **目的** 探讨人工虎骨粉对去卵巢大鼠骨组织中 Sirt1/Runx2 信号通路的影响。**方法** 选取 40 只成年雌性 SD 大鼠, 建立去卵巢大鼠模型, 切除卵巢 2 周后分成人工虎骨粉组与去卵巢组, 人工虎骨粉组给予灌胃人工虎骨粉 0.24 g/(kg·d), 去卵巢组给予灌胃等效剂量的生理盐水。另取 20 只成年雌性 SD 大鼠作为假手术组, 仅切除卵巢周围脂肪组织, 不切除双侧卵巢, 切除卵巢周围脂肪组织 2 周后给予灌胃等效剂量的生理盐水。连续给药 12 周后, 进行股骨骨密度、骨代谢、骨生物力学、股骨组织学与 Western Blot 检测。**结果** 与假手术组比较, 去卵巢组股骨骨密度、最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量及股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达降低, 骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、血钙、血磷及碱性磷酸酶浓度升高, 股骨组织呈现骨质疏松病理改变; 与去卵巢组比较, 人工虎骨粉组股骨骨密度、最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量及股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达升高, 骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、血钙、血磷及碱性磷酸酶浓度均降低, 骨质疏松病理改变显著改善。**结论** 人工虎骨粉可能通过调节 Sirt1/Runx2 信号通路来发挥抗骨质疏松作用。

关键词: 人工虎骨粉; 骨质疏松; 去卵巢; Sirt1/Runx2 信号通路

Effects of artificial tiger bone powder on Sirt1/Runx2 signaling pathway in bone tissue of ovariectomized rats

ZOU Yi, LENG Huawei, GUI Peng, ZHANG Junquan, ZHANG Yufeng, WANG Kui, WANG Minghui, YE Mao*

Department of Orthopedics, No. 302 Hospital of China Guihang Group, Anshun 561000, China

* Corresponding author: YE Mao, Email: nicunianvm282@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of artificial tiger bone powder on Sirt1/Runx2 signaling pathway in bone tissue of ovariectomized rats. **Methods** Forty adult female SD rats were selected to establish ovariectomized rat model. After ovariectomy for 2 weeks, they were divided into artificial tiger bone powder group and ovariectomized group. The artificial tiger bone powder group was given 0.24 g/(kg·d) by gavage, and the ovariectomized group was given equivalent dose of saline by gavage. In addition, 20 adult female SD rats were taken out, only the adipose tissue around ovary was removed, and bilateral ovaries were not removed. After 2 weeks of resection, the adipose tissue around ovary was given the equivalent dose of saline by intragastric administration. After 12 weeks of continuous administration, femoral density, bone metabolism, bone biomechanics, femoral histology and Western Blot were measured. **Results** Compared with the sham-operated group, the femoral density, maximum load, fracture load, maximum stress, elastic modulus and the expressions of Sirt1, Runx2, Foxo1 and Foxo3a protein in femoral tissue of ovariectomized group decreased, while the concentrations of osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase, serum calcium, phosphorus and alkaline phosphatase increased, and the femoral tissue presented osteoporosis. Physical changes; Compared with ovariectomized group, femoral density, maximum load, fracture load, maximum stress, elastic modulus and expressions of Sirt1, Runx2, Foxo1 and Foxo3a in femoral tissue of artificial tiger bone powder group increased, while osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase, serum calcium, phosphorus and alkaline phosphatase decreased, and osteoporosis decreased. Pathological changes were significantly improved. **Conclusion** Artificial tiger bone powder may play an anti-osteoporosis role by regulating Sirt1/Runx2 signaling pathway.

基金项目: 安顺市科技局科技计划项目[安市科合(2016)12号]

* 通信作者: 叶茂, Email: nicunianvm282@126.com

Key words: artificial tiger bone powder; osteoporosis; ovariectomy; Sirt1/Runx2 signaling pathway

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加及临床表现为骨折危险性增加的骨代谢性疾病,报道^[1-2]显示其具有较高的发病率,涉及人群较广,以绝经后女性多见。对骨质疏松症的防治已成为国内外学者探讨和研究的热点话题。目前西药治疗骨质疏松症取得了一定的效果,但是不良反应较多,不宜长期使用^[3-4]。因此,对于中医药防治骨质疏松症的研究需进一步的深入探讨。

人工虎骨粉为新一代的虎骨替代品,含有丰富的骨胶原、骨肽、成骨元素和骨形成所必需的钙、磷,以及微量元素锶、镁、锌、铜、锰等,现代医学已证实其具有显著的抗炎、镇痛及抗骨质疏松作用^[5],但其作用机制仍不是很明确。本研究主要探讨人工虎骨粉对去卵巢大鼠骨组织中 Sirt1/Runx2 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:8月龄健康雌性SD大鼠,体重260~310 g,SPF级,分笼饲养,自由进食。饲养环境:相对湿度55%,温度22℃,12 h明暗周期。实验符合美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南。

1.1.2 主要试剂与仪器:人工虎骨粉(国药准字Z20030079)购自金花企业西安金花制药厂;大鼠骨钙素 ELISA 检测试剂盒(ml002883)、大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 ELISA 检测试剂盒(SBJ-R0426)购自上海酶联生物科技有限公司;戊巴比妥钠购自武汉易泰科技有限公司上海分公司;Sirt1 抗体(ab12193)、Runx2 抗体(ab76956)、Foxo1 抗体(ab52857)、Foxo3a(ab12162)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;InAlyzer 小型动物双能X射线仪购自深圳柏安诺科技有限公司;JIDI-17R 微量高速冷冻离心机购自广州吉迪仪器有限公司;PUZS-600 A 全自动生化分析仪购自北京普朗新技术有限公司;HY-0580 骨科生物力学试验机购自上海衡翼精密仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 建立去卵巢大鼠模型:按照4 mL/kg的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,仰卧位固定大鼠,在腰椎沿背部正中线下做一约2 cm的纵形切口,依次切开皮肤、筋膜与肌肉组织,以手线结扎输

卵管及其周围血管,然后将双侧卵巢切除。将腹膜与肌肉一起缝一针,确认无出血后缝合皮肤。

1.2.2 实验分组:选取60只SD大鼠,随机分为去卵巢组、人工虎骨粉组、假手术组3组,每组20只。人工虎骨粉组建立去卵巢大鼠模型,切除卵巢2周后灌胃给予0.24 g/(kg·d)的人工虎骨粉;去卵巢组建立去卵巢大鼠模型,切除卵巢2周后灌胃给予等效剂量的生理盐水;假手术组仅切除卵巢周围脂肪组织,不切除双侧卵巢,切除卵巢周围脂肪组织2周后灌胃给予等效剂量的生理盐水。连续给药12周。实验过程中将大鼠分笼饲养,自由进食。饲养环境:相对湿度55%,温度22℃,12 h明暗周期。3组大鼠体重比较无统计学差异,饲养条件一致。

1.2.3 检测指标:给药12周后,用1%戊巴比妥钠行腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,置入抗凝管后,4℃,3 000 r/min,离心20 min,取血清,保存于-80℃备用。采集血样后处死大鼠,分离左侧股骨,清除肌肉组织与结缔组织后称重量,一部分固定于多聚甲醛中用于组织学分析,另一部分以生理盐水浸泡的纱布包裹股骨,保存于-80℃环境中用于骨密度、生物力学分析与Western Blot检测。

1.2.4 骨密度检测:常温静置解冻股骨标本,采用双能X射线仪检测骨密度。

1.2.5 骨代谢检测:常温静置解冻血清标本,置于离心机内3 000 r/min离心10 min,利用酶联免疫吸附法检测骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶浓度,严格按照试剂盒说明书操作;利用全自动生化分析仪检测钙、碱性磷酸酶、磷浓度。

1.2.6 组织学观察:股骨标本置于多聚甲醛中固定48 h后,以8%EDTA脱钙液脱钙2周,石蜡包埋,10 μm厚度连续切片,利用电吹风融化切片上的石蜡,常规苏木精-伊红染色,中性树脂封固后显微镜下观察。

1.2.7 骨生物力学:常温静置解冻股骨标本,在材料试验机上进行三点弯实验,检测股骨的最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量等指标,样本跨度为20 mm,为减小测量误差,设置所有股骨标本的放置角度、方向与距离一致,设置加载速度为1 mm/min,垂直于股骨干纵轴方向进行加载,直至股骨断裂。

1.2.8 Western Blot 检测:常温静置解冻股骨标本,利用Western Blot检测Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a蛋白表达。取股骨组织,加入蛋白裂解液4℃研磨

匀浆, 12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清, 利用 BCA 法检测蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白样品→加入 6 μ L 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液充分混合均匀→100 $^{\circ}$ C 水浴加热 3 min 变性蛋白→制备分离胶与浓缩胶→点样、电泳→转膜→洗膜→封闭→孵育一抗 (37 $^{\circ}$ C, 1.5 h)→洗膜→孵育二抗 (37 $^{\circ}$ C, 1.5 h)→洗膜→化学发光底物 (避光反应 5 min)→暗室曝光→显影→定影→图像分析。

1.3 统计学处理

利用统计学软件 22.0 进行统计学处理, 计量数据以均数±标准差为表达格式, 采用单因素方差分析结果, 以 $P<0.05$ 判定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度

去卵巢组大鼠股骨骨密度低于假手术组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 人工虎骨粉组大鼠股骨骨密度高于去卵巢组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 1。

2.2 骨代谢

表 1 各组大鼠骨代谢指标 ($n=20$)

Table 1 Bone metabolic indices of rats in each group ($n=20$)

项目	假手术组	去卵巢组	人工虎骨粉组
骨钙素/(μ g/L)	2239.31±153.67	2516.33±182.33 ^a	2238.19±127.88 ^b
抗酒石酸酸性磷酸酶/(ng/L)	299.37±36.27	376.25±30.19 ^a	315.17±26.63 ^b
钙/(mmol/L)	2.49±0.57	3.46±0.39 ^a	2.72±0.58 ^b
磷/(mmol/L)	1.65±0.21	1.81±0.09 ^a	1.69±0.17 ^b
碱性磷酸酶/(U/L)	96.23±13.41	189.36±20.16 ^a	129.37±15.32 ^b

注: 与假手术组比较, ^a $P<0.05$; 与去卵巢组比较, ^b $P<0.05$ 。

2.3 组织学观察

苏木精-伊红染色显示, 假手术组大鼠骨密质较厚且均匀, 骨细胞排列整齐, 骨小梁结构紧密且连续性好, 钙盐沉积均匀; 去卵巢组大鼠骨密质较假手术组薄, 骨细胞变少且排列紊乱, 骨小梁稀疏、纤细、大片断裂, 钙盐沉积明显减少, 髓腔相对扩大; 与去卵巢组比较, 人工虎骨粉组大鼠骨密质明显增厚, 骨小梁变粗、变密, 横向联接增加。见图 2。

2.4 骨生物力学

与假手术组比较, 去卵巢组最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量显著下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 与去卵巢组比较, 人工虎骨粉组最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量显著升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

与假手术组比较, 去卵巢组骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、血钙、血磷及碱性磷酸酶浓度均明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 与去卵巢组比较, 人工虎骨粉组骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、血钙、血磷及碱性磷酸酶浓度均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

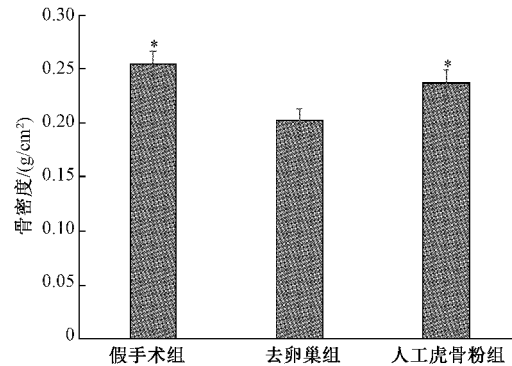


图 1 各组大鼠股骨骨密度

注: 与去卵巢组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

Fig.1 Bone mineral density of femur in rats in each group

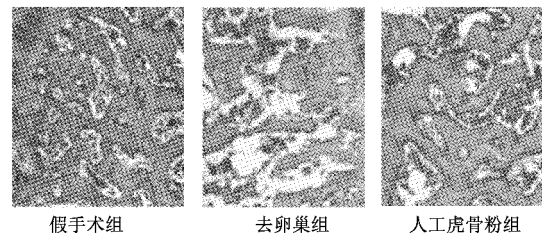


图 2 各组大鼠股骨组织学观察 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Fig.2 Histological observation of femur in rats of each group (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

表 2 各组大鼠股骨生物力学 ($n=20$)

Table 2 Femoral biomechanics of rats in each group ($n=20$)

项目	假手术组	去卵巢组	人工虎骨粉组
最大应力/MPa	11.31±3.27	7.28±2.38 ^a	9.51±2.68 ^b
最大载荷/N	168.36±18.77	125.18±26.11 ^a	159.67±22.13 ^b
断裂载荷/N	162.18±10.22	102.59±17.86 ^a	149.87±18.27 ^b
弹性模量/MPa	159.67±15.41	99.38±21.09 ^a	138.69±25.91 ^b

注: 与假手术组比较, ^a $P<0.05$; 与去卵巢组比较, ^b $P<0.05$ 。

2.5 Western Blot 检测

与假手术组比较,去卵巢组股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达降低,差异具有统计

学意义 ($P < 0.05$);与去卵巢组比较,人工虎骨粉组股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

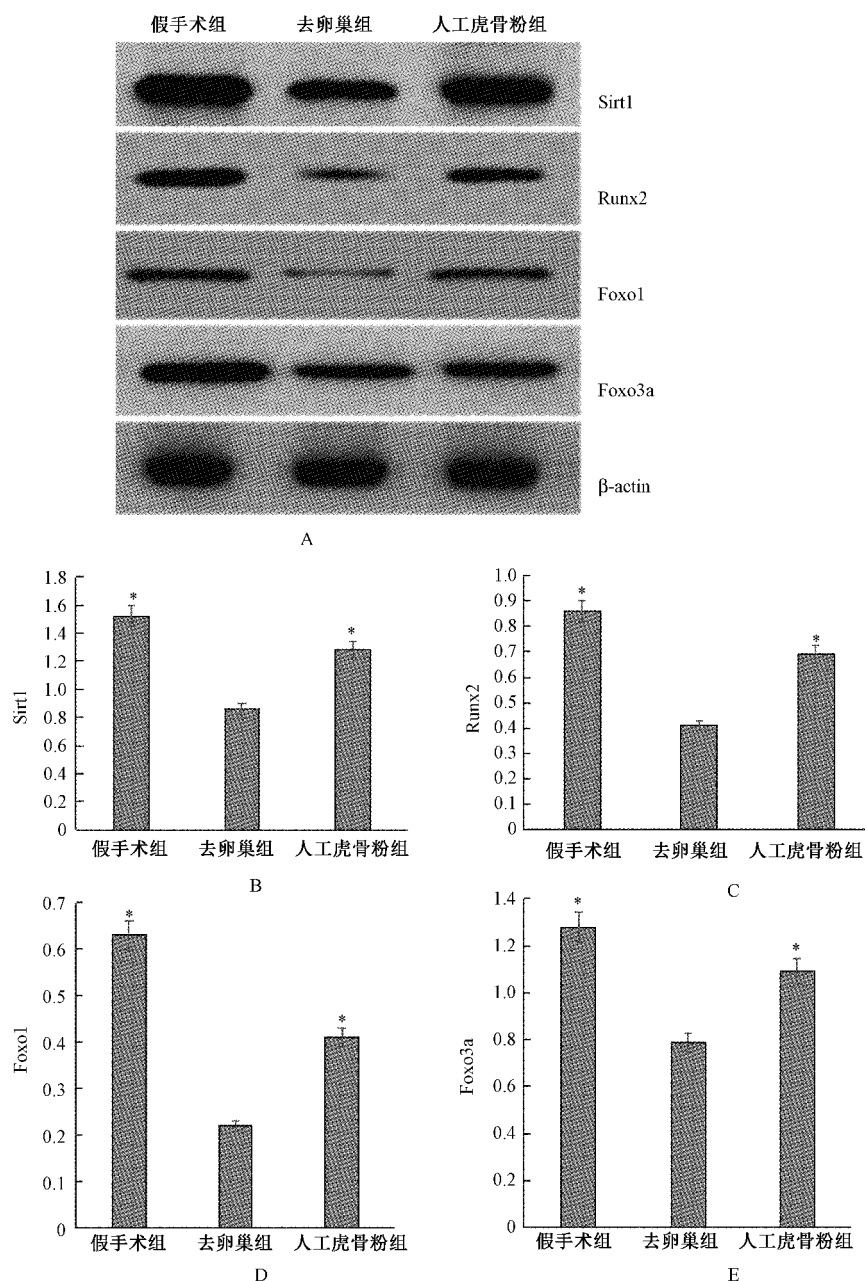


图3 各组大鼠股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达 ($n=20$)

注:A:各组股骨组织内 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达 Western Blot 检测条带;B:各组股骨组织内 Sirt1 蛋白半定量分析结果;C:各组股骨组织内 Runx2 蛋白半定量分析结果;D:各组股骨组织内 Foxo1 蛋白半定量分析结果;E:各组股骨组织内 Foxo3a 蛋白半定量分析结果。与去卵巢组比较, * $P < 0.05$ 。

Fig.3 The expressions of Sirt1, Runx2, Foxo1 and Foxo3a in femoral tissues of rats in each group ($n=20$)

3 讨论

人工虎骨粉具有抗骨质疏松作用。何保玉等^[6]对 160 例原发性骨质疏松症患者分别进行口服

金天格胶囊(观察组)与钙尔奇 D3 片治疗(对照组),发现治疗后两组患者腰背疼痛、腰膝酸软、下肢痿弱、步履艰难等症状评分均较治疗前明显改善 ($P < 0.01$),并且治疗 9 个月后观察组腰椎及股骨

Ward 三角区骨密度较治疗前明显提高 ($P < 0.01$), 而对照组未见明显改善, 认为金天格胶囊用于原发性骨质疏松症患者的治疗, 可以缓解腰背疼痛、腰膝酸软、下肢痿弱、步履艰难等症状, 并能显著增加骨密度, 改善生活质量, 无明显不良反应。但是有学者认为人工虎骨粉并不能有效增加骨密度, 陈志刚等^[7]对 120 例骨量低下与原发性骨质疏松症患者进行口服人工虎骨粉胶囊治疗, 发现治疗 52 周后其可抑制骨密度下降、有效缓解骨质疏松症的主要临床症状, 但未能显著提高腰椎和股骨颈的骨密度。对于人工虎骨粉对骨质疏松症患者骨密度的影响还需要更长期、更大样本的研究去证实。

本研究结果显示切除卵巢 14 周后, 大鼠股骨骨密度下降, 血清骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、钙、磷及碱性磷酸酶浓度均明显升高, 股骨组织呈现骨质疏松病理改变, 股骨最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量显著下降, 说明实验造模成功。而经过人工虎骨粉干预后, 去卵巢大鼠股骨骨密度升高, 血清骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶、钙、磷及碱性磷酸酶浓度均明显下降, 股骨组织骨质疏松病理改变明显改善, 股骨最大载荷、断裂载荷、最大应力、弹性模量显著升高, 证实了人工虎骨粉可抑制骨质丢失, 增强骨的力学强度, 具有抗骨质疏松作用。

多种信号通路参与骨代谢紊乱的调节^[8-9]。Sirt1 是哺乳动物中与酵母沉默信息调节因子 2 同源性最高且具有 NAD⁺ 依赖的蛋白去乙酰化酶活性的多功能调节因子, 与基因转录、细胞衰老及能量代谢等过程的调节相关。大量的研究^[10-11] 已证实 Sirt1 与骨质疏松症的发生及发展密切相关。研究^[12] 发现白葫芦醇可通过促进 Sirt1 与成脂转录因子的结合阻碍骨髓间充质细胞向脂肪细胞的分化, 进而促进骨形成。成脂转录因子也可抑制 Runx2 基因的转录活性及成骨信号通路, 包括 Wnt 与转化生长因子/骨形态发生蛋白等。Runx2 是启动成骨转录程序的早期主要因子, 可诱导成骨细胞特异性基因的表达, 如骨桥蛋白、骨钙素与碱性磷酸酶等。Sirt1/Foxo3A 的过表达或沉默可影响 Runx2 启动子的活性, 沉默 Foxo1 表达也可降低 Runx2 的表达, 抑制骨形成^[13-14]。由此可知 Sirt1 蛋白参与骨形成过程, Foxo1、Foxo3A、成脂转录因子等发挥了重要角色, 而最终的调节目标是 Runx2, 所以笔者认为 Sirt1/Runx2 信号通路可能是未来研究防治骨质疏松症发生的主要研究方向。本研究结果显示切除卵巢 14 周后, 大鼠股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、

Foxo3a 蛋白表达降低, 证实 Sirt1/Runx2 信号通路参与了骨质疏松的发生与发展; 而人工虎骨粉干预后, 去卵巢大鼠股骨组织 Sirt1、Runx2、Foxo1、Foxo3a 蛋白表达升高, 说明 Sirt1/Runx2 信号通路在人工虎骨粉治疗骨质疏松过程中发挥了积极作用。

综上, 人工虎骨粉可能通过调节 Sirt1/Runx2 信号通路发挥抗骨质疏松的作用, 但是骨质疏松症的病理机制较复杂, 涉及的信号通路较多, 因此有关人工虎骨粉防治骨质疏松症的作用机制还有待进一步研究、阐明。

【参 考 文 献】

- [1] Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11): 908-923.
- [2] Chen L, Wang G, Wang Q, et al. N-acetylcysteine prevents orchietomy-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 1(7): 4337-4347.
- [3] Hayashi S, Fukuda K, Maeda T, et al. Denosumab treatment improved health-related quality of life in osteoporosis: a prospective cohort study [J]. *JBMR Plus*, 2019, 3(7): e10191.
- [4] Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142: 155-170.
- [5] 王清玉, 韩大为. 人工虎骨粉的药理作用研究进展 [J]. *中医正骨*, 2006, 18(11): 70-71.
- [6] 何保玉, 滕涛, 刘宝戈, 等. 金天格胶囊治疗原发性骨质疏松症的临床疗效观察 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(2): 168-174.
- [7] 陈志刚, 梁志齐, 崔岩峥, 等. 人工虎骨粉胶囊治疗骨量低下与原发性骨质疏松症的多中心临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(13): 1514-1516, 1524.
- [8] Kristianto J, Johnson MG, Afzal R, et al. Endothelin signaling in bone [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017, 46(1): 51-62.
- [9] Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1649-1657.
- [10] Zainabadi K, Liu CJ, Caldwell ALM, et al. SIRT1 is a positive regulator of in vivo bone mass and a therapeutic target for osteoporosis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185236.
- [11] Kim HN, Han L, Iyer S, et al. Sirtuin1 suppresses osteoclastogenesis by deacetylating FoxOs [J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(10): 1498-1509.
- [12] Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7): 993-1002.
- [13] Liang W, Li X, Li G, et al. Sirt1/Foxo axis plays a crucial role in the mechanisms of therapeutic effects of erzhi pill in ovariectomized rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9210490.
- [14] Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, et al. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(10): 2552-2563.

(收稿日期: 2019-09-07; 修回日期: 2019-10-08)