

# 水飞蓟宾通过 PI3K/AKT/FoxO1 通路改善骨质疏松大鼠骨代谢和骨量

付涛\* 吴晓东 阿力·艾拜

新疆生产建设兵团医院关节脊柱科,新疆 乌鲁木齐 830002

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 10-01416-05

**摘要:** **目的** 探讨水飞蓟宾对糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)大鼠骨量影响以及对PI3K/AKT/FoxO1通路影响。**方法** 将30只12周龄雄性Sprague Dawley大鼠随机分为3组:对照组( $n=10$ );地塞米松组( $n=10$ )及地塞米松+水飞蓟宾组( $n=10$ ),对应给予地塞米松及水飞蓟宾治疗。12周后取双侧股骨进行微型计算机断层扫描(Micro-CT)和骨生物力学检测。同时检测抗酒石酸性磷酸酶(TRACP)、I型胶原交联羧基末端肽(CTX-I)、碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素(OC)。蛋白印迹分析大蒜素对PI3K/AKT/FoxO1通路影响。**结果** 地塞米松组大鼠的骨密度(BMD)、骨微观结构和骨生物力学指标均明显低于对照组( $P<0.05$ )。骨吸收指标(TRACP和CTX-I)升高,骨形成指标(ALP和OC)降低。水飞蓟宾治疗后骨密度、骨微观结构、骨生物力学指标均有明显改善。与地塞米松组相比,地塞米松+水飞蓟宾组的TRACP和CTX-I显著降低,ALP和OC显著升高。进一步研究表明水飞蓟宾可以通过抑制地塞米松介导PI3K/AKT/FoxO1信号通路上调来调控骨代谢。**结论** 水飞蓟宾可以通过PI3K/AKT/FoxO1信号通路调控骨代谢,提高GIOP大鼠骨密度、骨微观结构和骨强度。

**关键词:** 骨生物力学;糖皮质激素性骨质疏松;水飞蓟宾;Micro-CT

## Silibinin improves bone metabolism and bone mass in osteoporosis rats through PI3K/AKT/FoxO1 pathway

FU Tao\*, WU Xiaodong, ALI Aibai

Department of Joint and Spine, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi 830002, China

\* Corresponding author; FU Tao, Email: 2105677292@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Silibinin on the bone mass of rat models with glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP). **Methods** Thirty male Sprague Dawley rats aged 12 weeks were randomly divided into three groups: the control group ( $n=10$ ) was intramuscularly injected with an equal volume of 0.9% sodium chloride; the dexamethasone group ( $n=10$ ) was intramuscularly injected with dexamethasone at 1 mg/kg (twice a week) to induce GIOP; the dexamethasone plus Garlic extract group ( $n=10$ ) was subcutaneously gavaged with Silibinin, simultaneously. The bilateral femurs were collected after 12 weeks to perform micro-computed tomography and bone biomechanical examinations. Also, tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP), cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I), alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin (OC) were tested. Western blot analysis of the effect of allicin on PI3K/AKT/FoxO1 pathway. **Results** The bone mineral density (BMD), bone microstructure, and bone biomechanical markers reduced significantly in the dexamethasone group compared with the control group ( $P<0.05$ ). The bone resorption indicators (TRACP and CTX-I) increased, while the bone formation indicators (ALP and OC) decreased. After Silibinin treatment, BMD, bone microstructure, and bone biomechanical markers improved significantly. Moreover, TRACP and CTX-I decreased significantly, while ALP and OC increased compared with the dexamethasone group. Further studies have shown that Silibinin can regulate bone metabolism by inhibiting dexamethasone-mediated up-regulation of PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway. **Conclusion** Silibinin can regulate bone metabolism through PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway, and improve bone mineral density, bone microstructure and bone strength in GIOP rats.

**Key words:** bone biomechanics; glucocorticoid-induced osteoporosis; Silibinin; micro-CT

\* 通信作者: 付涛, Email: 2105677292@qq.com

骨质疏松是一种以骨量减少、骨微结构受损、骨脆性增加、骨折风险增加为特征的代谢性骨病。据

估计,在全世界老年妇女中,与骨质疏松有关的骨折发病率约为40%,在男子中约为13%<sup>[1]</sup>。糖皮质激素由于其抗炎和免疫抑制作用,在临床上得到了广泛的应用。激素治疗期间骨保护素与核因子受体激活剂 $\kappa$ B配体比值的变化导致前3~6个月骨吸收增加,出现骨质疏松的不良反应,骨折风险也明显增加<sup>[2]</sup>。糖皮质激素引起的骨质疏松(GIOP)在继发性骨质疏松中居首位。有一些证据显示氧化应激与绝经后骨密度丧失之间的相关性;绝经期雌激素缺乏会增加氧化应激和骨量流失<sup>[3]</sup>。水飞蓟素(Silibinin, SIL)是一种抗氧化剂,具有保肝、抗癌、神经保护和心脏保护作用<sup>[4]</sup>。此外,据报道,水飞蓟宾通过抑制鼠MC3T3-E1中的破骨细胞生成并增强成骨细胞的生成,有可能在体外预防骨量丢失<sup>[5]</sup>。此外,有研究发现水飞蓟宾可通过刺激骨髓干细胞(hBMSCs)中碱性磷酸酶、I型胶原和骨钙素表达的成骨生物标志物来增强成骨作用<sup>[4]</sup>。由于氧化应激在OP中发挥重要作用,水飞蓟素具有抗氧化作用,然而,其对GIOP的研究目前有限。因此,本研究旨在探讨水飞蓟素对GIOP大鼠骨量和骨代谢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和试剂

12周龄雌性Sprague Dawley(SD)大鼠30只,体重(230±15)g,购自上海实验动物中心。水飞蓟素[Silymarin capsules (Ligalong),批号:20190021]、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、I型胶原交联羧基末端肽(CTX-I)、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒和骨钙素(OC)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒购自中国上海源业生物技术有限公司。

### 1.2 实验分组和治疗

动物分组造模,自适应喂养雄性SD大鼠1周,测定空腹血糖(FBG)。将大鼠随机分为3组,每组10只:对照组(CON组),肌肉注射生理盐水0.1 mL;地塞米松组(DEX组)10只,肌肉注射地塞米松溶液0.1 mL,1 mg/kg(每周2次);连续干预3个月建立GIOP大鼠模型<sup>[6]</sup>。地塞米松+水飞蓟素组(SIL组)10例,给予地塞米松溶液0.1 mL,每周2次;同时给予水飞蓟素100 mg/(d·kg)灌胃,直至实验结束。处死前集外周血清和双侧股骨。双侧股骨用生理盐水纱布包裹,置于-20℃的冰箱中备用。

### 1.3 检测指标

将左侧股骨在室温下解冻并固定在样品架中,

使用SCANCOuCT80进行微计算机断层扫描(micro computed tomography, Micro-CT)扫描。该扫描仪的电压为50 kVp,电流为200  $\mu$ A,分辨率为15  $\mu$ m/像素。骨微结构参数包括骨密度(BMD)、组织骨密度(TMD)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨体积/总体积(BV/TV)、相对骨表面(BS/TV)、骨小梁分离度(TBsp)和连接密度(Conn.D),通过使用内置软件进行定量分析来确定连接密度(connection density, Conn.D)。

待影像学检测完毕后,进行三点弯曲实验。在进行测试时,股骨水平放置在机器的表面上,探头慢慢地放下。加载方向垂直于实验台,作用在骨的中心轴上,加载速度为2 mm/min。通过与试验机连接的计算机专用软件自动记录载荷-位移曲线,得到最大载荷和弹性模量。

使用试剂盒检测大鼠血清TRACP、CTX-I、ALP和OC水平,并严格按照生产厂家试剂盒上的说明进行操作。ELISA试剂盒检测血清TRACP、CTX-I、ALP和OC水平。

随后对大鼠股骨进行蛋白印迹分析。取自右侧股骨的骨标本放入RIPA缓冲液中溶解。在4℃下以12 000 r/min离心20 min后收集上清液,并用改进的Bradford法(Bio-Rad Laboratory Inc., Hercules, CA, USA)测量蛋白质浓度。裂解物(20~30 g)用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,并转移到硝酸纤维素印迹膜上。在室温下用5%脱脂牛奶(用牛血清白蛋白检测磷酸化蛋白)封闭1 h后,用抗 $\beta$ -肌动蛋白(1:5 000; ab6276)、抗akt(1:500; ab28422)、抗p-akt(1:500; ab8932)、抗foxO1(1:1 000; ab52857)孵育膜和抗p-FoxO1(1:500; ab131339)抗体(均来自英国剑桥的Abcam)在4℃过夜,然后与二抗(1:1 000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)在37℃孵育1 h。用Image J软件测量各蛋白条带的总和密度。

### 1.4 统计学处理

统计分析采用SPSS 17.0,检测结果使用均数±标准( $\bar{x}\pm s$ )差表示。所有数据行正态分布检验和方差齐性检验,采用秩和检验对非正态分布数据进行分析;使用方差检验对正态分布数据进行分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠体重比较

治疗 12 周后,大鼠的体重发生变化,DEX 组大鼠体重明显低于 CON 组 ( $P < 0.05$ );而 SIL 组与 CON 组相比,体重无显著变化 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

其中 CON 组 2 只大鼠死亡,而 SIL 组与 DEX 组各有 3 只大鼠死亡。

表 1 大鼠的体重变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The changes of body weight of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CON 组 ( $n=8$ )	DEX 组 ( $n=7$ )	SIL 组 ( $n=7$ )	F 值	P 值
体重/g	356.44±8.98	436.11±7.87 <sup>*</sup>	371.29±8.66	23.56	<0.001

注:与 CON 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.2 Micro-CT 分析结果

股骨干骺端三维重建结果如图 1 所示。股骨的微观参数如表 2 所示。DEX 组左侧股骨 BMD、

TMD、Conn.D、Tb.N、Tb.Th、Tb.p、BS/TV 较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ );SIL 组左侧股骨 BMD、Conn.D、Tb.Th 均明显高于 DEX 组 ( $P < 0.05$ )。

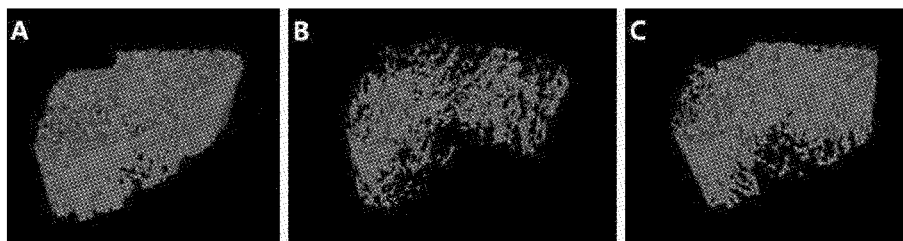


图 1 各组大鼠治疗 12 周后左股骨干骺端三维重建结果

Fig.1 Three-dimensional reconstruction of the left femoral metaphysis after 12 weeks of treatment in each group of rats

表 2 大鼠左股骨的 Micro-CT 检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Micro-CT results of the left femur of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

参数	CON 组 ( $n=8$ )	DEX 组 ( $n=7$ )	SIL 组 ( $n=7$ )	F 值	P 值
BMD/(mg HA/cm <sup>3</sup> )	279.23±34.33	185.52±36.34 <sup>*</sup>	246.45±32.34 <sup>#</sup>	4.22	0.020
TMD/(mg HA/cm <sup>3</sup> )	798.78±78.98	734.54±66.33 <sup>*</sup>	787.87±65.77	5.09	0.003
BV/TV/(%)	0.33±0.07	0.21±0.09 <sup>*</sup>	0.28±0.06	4.56	0.040
Conn.D/(1/mm <sup>3</sup> )	131.44±17.22	69.34±12.78 <sup>S*</sup>	111.15±19.44 <sup>#</sup>	18.05	0.001
Tb.N/(1/mm)	4.78±0.19	3.35±0.21 <sup>*</sup>	4.23±0.17	6.67	0.006
Tb.Th/(mm)	0.22±0.07	0.08±0.03 <sup>*</sup>	0.18±0.06 <sup>#</sup>	10.44	0.010
Tb.Sp/(mm)	0.21±0.02	0.32±0.03 <sup>*</sup>	0.26±0.07	4.86	0.030
BS/TV/(1/mm)	32.48±6.12	37.55±6.21	33.14±5.55	0.57	0.001

注:与 CON 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 DEX 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.3 股骨的生物力学变化

股骨三点弯曲试验表明,SIL 组的最大载荷和

弹性模量均高于 DEX 组,两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 右股骨的三点弯曲试验结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Three-point bending test results of the right femur of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CON 组 ( $n=8$ )	DEX 组 ( $n=7$ )	SIL 组 ( $n=7$ )	F 值	P 值
弯曲载荷(N)	168.55±22.55	103.12±13.56 <sup>*</sup>	143.44±17.44 <sup>#</sup>	10.55	0.003
弹性模量(MPa)	7342.1±86.44	4324.5±57.55 <sup>*</sup>	6143.6±65.45 <sup>#</sup>	14.76	0.001

注:与 CON 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 DEX 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.4 血清 ALP、OCTRACP 和 CTX-I 的变化

与 CON 组比较,DEX 组血清骨形成指标(ALP、OC)显著降低 ( $P < 0.05$ ),骨吸收指标 TRACP、CTX-

I 显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 DEX 组比较,SIL 组血清骨形成指标 ALP 和 OC 显著升高 ( $P < 0.05$ ),骨吸收指标 TRACP 和 CTX-I 显著降低 ( $P < 0.05$ )。详见

表 4。

表 4 大鼠的 ALP, CTX-1, OC 和 ACP 的结果 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4 Results of ALP, CTX-I, OC, and ACP of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CON 组 (n=8)	DEX 组 (n=7)	SIL 组 (n=7)	F 值	P 值
ALP/(ng/mL)	59.97±6.45	41.44±5.12*	56.44±6.55#	144.23	<0.001
ACP/(μmol/L)	44.44±4.46	53.54±5.13*	46.67±4.98#	130.66	<0.001
CTX-1/(pg/mL)	12.45±2.56	26.54±3.34*	22.09±3.23#	134.55	<0.001
OC/(pg/mL)	344.33±37.55	242.34±29.24*	323.44±32.34#	123.55	<0.001

注:与 CON 组比较,\*P<0.05;与 DEX 组比较,#P<0.05。

2.5 SIL 对 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路影响

通过蛋白质印迹检测 AKT、磷酸化的 AKT (p-AKT)、FoxO1 和 p-FoxO1 水平。与 CON 组相比,地塞米松提高了 p-AKT/AKT 的比例和 p-FoxO1 的蛋白质含量,但 FoxO1 的蛋白质水平却有降低 (P<0.05 和 P<0.01) (图 2)。根据这些结果,地塞米松

抑制了 FoxO1 的转录活性。用大蒜素处理后,部分消除了地塞米松的上述作用 (P<0.05 和 P<0.01)。这些数据表明,大蒜素通过抑制 PI3K/AKT 信号通路能够上调 FoxO1 转录活性。总的来说大蒜素上调 FoxO1 转录活性调控骨代谢。

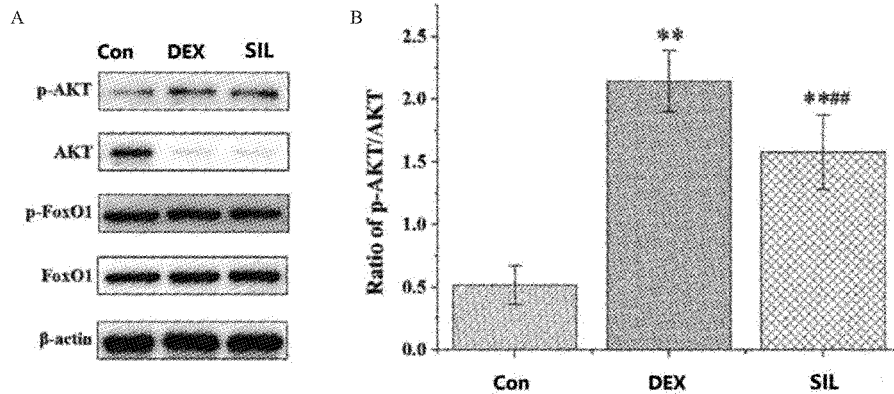


图 2 SIL 促进 FoxO1 蛋白质表达

注:A 通过蛋白质印迹分析确定 p-AKT, AKT, p-FoxO1 和 FoxO1 的蛋白质水平;B 和 DEX 组相比, SIL 组显著降低组织中 p-AKT/AKT 的比率。与 CON 组比较,\*\*P<0.01;与 DEX 组比较,##P<0.01。

Fig.2 FoxO1 protein expression promoted by SIL

3 讨论

在本研究中,使用 Micro-CT 发现 DEX 组大鼠股骨的骨密度显著下降,表明建模是成功的。用 SIL 治疗 GIOP 大鼠后, BV/TV、Tb. N、Tb. Th 和 Conn.D 与 DEX 组相比呈增加趋势,表明骨小梁的微观结构得到改善。

骨质疏松症是一种发病率较高的骨代谢性疾病。GIOP 在继发性骨质疏松中占首位。研究表明,糖皮质激素治疗开始 3 个月内,脊椎骨折的风险显著增加,12 个月时达到高峰。在连续接受糖皮质激素治疗的患者中,骨折风险与每日口服糖皮质激素剂量密切相关<sup>[7]</sup>。因此,骨质疏松症越来越受到研究者的关注。Milic 等<sup>[8]</sup>总结了水飞蓟宾的作用,并

暗示水飞蓟宾可能是预防或治疗癌症、动脉粥样硬化、肝炎和肝硬化有潜力药物。此外,研究发现水飞蓟宾可通过抗氧化作用和 PI3K/Akt 途径的调节来减轻高糖介导的 hBMSCs 功能障碍<sup>[4]</sup>。这些结果表明水飞蓟素具有治疗骨质疏松的潜力。

作为重要的抗氧化应激蛋白, FoxO 调节抗氧化酶的表达,其中 FoxO1 是 FoxO 家族的主要成员。通过细胞特异性缺失和分子分析,在 4 种 FoxO 蛋白中, FoxO1 是成骨细胞增殖和氧化还原平衡所需的唯一因子,因此 FoxO1 控制骨形成<sup>[9]</sup>。FoxO1 主要通过 PI3K/AKT 信号途径进行调节, FoxO1 蛋白通过 PI3K/AKT 途径磷酸化,导致 FoxO1 依赖的转录抑制和 DNA 结合能力受损<sup>[10]</sup>。AKT 已被证明直接磷酸化并使 FoxO1 失活,从而导致细胞质保留、失

活和抑制 FoxO1 调节基因的表达水平,这些基因控制各种过程,如代谢、细胞周期、细胞死亡和氧化应激<sup>[11]</sup>。相反,抑制 PI3K/AKT 途径诱导活性 FoxO1 的去磷酸化和核转位,然后这些过程增强 FoxO1 的转录活性,导致细胞周期阻滞和凋亡<sup>[12]</sup>。这一系列研究表明,FoxO1 是破骨细胞生成和骨吸收的主要控制节点,无论在生理还是病理条件下都是如此。本研究通过蛋白质印迹检测 AKT、磷酸化的 AKT (p-AKT)、FoxO1 和 p-FoxO1 水平。发现地塞米松提高了 p-AKT/AKT 的比例和 p-FoxO1 的蛋白质含量,但 FoxO1 的蛋白质水平却有下降;用 SIL 处理后,AKT、磷酸化的 AKT (p-AKT)、FoxO1 和 p-FoxO1 改善明显。这些结果表明 SIL 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路能够上调 FoxO1 转录活性来调控骨代谢。

骨生物学中的骨结构力学指标测试是了解骨质疏松性骨折风险的最直接方法。它也是骨强度、骨骼结构和骨量的综合表现。然而,观察骨组织形态学和单独测量骨密度不能完全反映骨质量。使用机械性质的干预效果的评估是治疗骨质疏松症的其他方法不可替代的。在本研究中,三点弯曲试验表明,DEX 组的最大载荷和弹性模量显著低于 CON 组,SIL 治疗可显著提高大鼠骨组织的抗折强度。血清 CTX-I 是骨骼中 I 型胶原的降解产物。检测血清 CTX-I 水平可以特异性地反映破骨细胞的吸收活性。TRACP 主要由破骨细胞释放的非胶原蛋白产生,破骨细胞与胶原代谢物一起分泌在细胞外。因此,TRACP 和 CTX-1 水平与骨吸收呈正相关。成骨细胞可以分泌骨特异性 ALP,ALP 是总 ALP 的重要组成部分,可以反映骨形成的状态。OC 是骨基质中最丰富的标志物,其由成骨细胞释放到细胞外,反映骨形成的状态。此外,骨形成标志物,包括 OC、ALP 和胶原蛋白 1 的表达,也显著增加。本研究的结果表明 SIL 可增加成骨细胞活性和抑制破骨活性来促进 GIOP 大鼠的骨形成来保护骨组织。但是本研究有其不足之处如实验动物较少且研究时间较短,需要进一步探索。

总之,水飞蓟素可以通过 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路调控骨代谢来改善骨密度、骨微观结构和骨

强度以及治疗 GIOP。

#### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Drake MT, Clarke BL, Lewiecki EM. The pathophysiology and treatment of osteoporosis [J]. *Clin Therapeut*, 2015, 37(8): 1837-1850.
- [ 2 ] Colangelo L, Biamonte F, Pepe J, et al. Understanding and managing secondary osteoporosis [J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2019, 14(2): 111-122.
- [ 3 ] Coban E, Kucuktag S, Basyigit S. Platelet activation in subjects with impaired glucose tolerance [J]. *Platelets*, 2007, 18(8): 591.
- [ 4 ] Ying XZ, Chen XW, Liu HX, et al. Silibinin alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells via antioxidant effect and PI3K/AKT signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765: 394-401.
- [ 5 ] Kavitha CV, Deep G, Gangar SC, et al. Silibinin inhibits prostate cancer cells-and RANKL-induced osteoclastogenesis by targeting NFATc1, NF- $\kappa$ B, and AP-1 activation in RAW264.7 cells [J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(3): 169-180.
- [ 6 ] 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学的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(4): 461-464, 471.
- [ 7 ] Frank DV, Madelon B, Leufkens HCM, et al. Fracture risk with intermittent high-dose oral glucocorticoid therapy [J]. *Arthritis Rheumat*, 2014, 56(1): 208-214.
- [ 8 ] Milic N, Milosevic N, Suvajdzic L, et al. New therapeutic potentials of milk thistle (silybum marianum) [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(12): 1801-1810.
- [ 9 ] Bartell SM, Kim HN, Ambrogini E, et al. FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(4): 3773.
- [ 10 ] Heide LP, Van Der Hoekman MFM, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation [J]. *Biochem J*, 2004, 380(2): 297.
- [ 11 ] Shahab U, Hussain AR, Siraj AK, et al. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival [J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4178-4186.
- [ 12 ] Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, et al. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(23): 8969-8982.

(收稿日期: 2019-11-13;修回日期: 2020-01-15)