

吡咯喹啉醌通过降低氧化应激和 RANKL/OPG 比率减少去卵巢大鼠骨量流失研究

郑鹏骥 陆杨 张象 胡侦明*

重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 10-1431-06

摘要: **目的** 观察补充吡咯喹啉醌(PQQ)对去卵巢诱导的骨质疏松大鼠骨量和骨强度的影响。**方法** 30只12周龄(225~260 g)雌性SD大鼠随机分为3组(每组n=10),即OVX组、OVX+PQQ组和Sham组;其中OVX组和OVX+PQQ组进行手术切除双侧卵巢,而Sham组进行假手术;OVX+PQQ组术后食物添加4 mg/kg PQQ。治疗12周,在治疗结束收集血液和股骨,分别进行微型计算机断层扫描(Micro-CT)、生物力学检测、组织切片检测、蛋白印迹检测(WB)以及血清指标检测。**结果** Micro-CT和HE切片表明,与Sham组相比,OVX组的股骨骨密度和骨微观参数显著降低($P<0.05$);OVX组的小梁间距显著增加($P<0.05$),而OVX+PQQ上述指标明显优于OVX组($P<0.05$)。生物力学检测表明Sham组具有最高的极限载荷、能量和刚度;与OVX组比较,OVX+PQQ组极限载荷、能量和刚度明显增加($P<0.05$)。血清学表明,与Sham组大鼠相比,OVX大鼠血清CTX-1、TRACP-5b和MDA水平均显著升高,而T-AOC和SOD活性显著降低;PQQ治疗后显著改善($P<0.05$)。WB检测结果表明与Sham组大鼠相比,OVX大鼠RANKL和RANKL/OPG比率均显著升高,而OPG和FOXO1表达显著降低;经过PQQ后得到RANKL和RANKL/OPG比率均显著降低,而OPG和FOXO1表达显著增加($P<0.05$)。**结论** PQQ通过抑制氧化应激和降低RANKL/OPG比率来增加去卵巢大鼠骨量和骨强度。

关键词: 吡咯喹啉醌;去卵巢大鼠;骨密度;骨强度;氧化应激

Pyrroloquinoline quinone reduces oxidative stress and RANKL/OPG ratio to reduce bone loss in ovariectomized rats

ZHENG Pengji, LU Yang, ZHANG Xiang, HU Zhenming*

Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

* Corresponding author; HU Zhenming, Email: 3038433090@qq.com

Abstract: Objective To observe the effect of (PQQ) supplementation on bone mass and bone strength in ovariectomized rats with osteoporosis. **Methods** Thirty 12-week-old (225-260 g) female SD rats were randomly divided into three groups: OVX group, OVX+PQQ group and Sham group. Bilateral ovaries were resected in OVX group and OVX+PQQ group, while sham operation was performed in Sham group. 4 mg/kgPQQ was added to the food after operation in the OVX+PQQ group. Blood and femurs were collected at the end of treatment for 12 weeks. Microcomputer tomography (Micro-CT), biomechanical examination, tissue section examination, Western Blot (WB) and serum index detection were performed respectively. **Results** Micro-CT and HE sections showed that the bone mineral density and bone microscopic parameters of HE group were significantly lower than those of Sham group ($P<0.05$). The trabecular spacing in OVX group was significantly increased, and the above indexes of OVX+PQQ group were significantly better than those in OVX group ($P<0.05$). Biomechanical test showed that the ultimate load, energy and stiffness of Sham group were the highest, and the ultimate load, energy and stiffness of OVX+PQQ group were significantly higher than those of OVX group. Serum CTX-1, TRACP-5b and MDA levels were significantly higher and T-AOC and SOD activities were significantly lower in OVX rats than those in Sham group, but these parameters were improved by supplementation of PQQ. WB test result showed that compared with Sham group rats, the RANKL and RANKL/OPG ratios of OVX rats were significantly increased, while the expressions of OPG and FOXO1 were significantly reduced; after PQQ, RANKL and RANKL/OPG ratios were

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372003)。

* 通信作者: 胡侦明, Email: 3038433090@qq.com。

significantly reduced, while OPG And FOXO1 expression increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** PQQ can improve bone mass and bone strength and inhibit bone strength by inhibiting oxidative stress and bone resorption.

Key words: pyroquinoline quinolone; ovariectomized rats; bone mineral density; bone strength; oxidative stress

绝经后骨质疏松症是最常见的原发性骨质疏松症,其特征是骨质疏松相关脆性骨折的发病率显著增加^[1]。尽管雌激素缺乏是骨质疏松症的主要原因,但由于心血管事件和乳房及子宫癌的风险增加限制通过补充雌激素用来治疗或预防这类疾病^[2]。甲状旁腺素(PTH)是美国食品和药物管理局(FDA)批准的唯一临床试剂,可用于促进骨形成,但是使用期限不能超过2年^[2]。目前的骨质疏松症治疗主要是抗骨吸收剂,但可能出现严重的不良反应,如骨形成的减弱^[3]。因此,有必要寻求具有可长期用于治疗绝经后骨质疏松症的药物。越来越多的研究表明,活性氧(ROS)诱导的氧化应激随着衰老而增加,这与绝经后骨质疏松症的病理生理学有关^[4-5]。过量的ROS可以抑制成骨细胞的分化和增殖、增强破骨细胞的分化,最终导致更多的骨吸收^[6]。吡咯喹啉醌(PQQ)是一种氧化还原循环平面邻醌,最初被鉴定为甲醇脱氢酶的辅酶^[7]。最近,PQQ由于其在自由基清除中的作用而受到越来越多的关注。然而,PQQ对雌激素缺乏引起的骨质疏松症的保护作用尚不清楚。本研究使用OVX大鼠模型评估了PQQ在抗雌激素缺乏诱导的骨质疏松症中的作用和潜在机制。

1 材料和方法

1.1 动物和研究设计

30只12周龄(225~260g)雌性SD大鼠购自上海实验动物中心,适应性饲养1周后进行试验。所有实验期间大鼠均饲养在23℃恒温条件下12h光暗循环的房间中,且所有大鼠都可以自由饮水和接受标准的啮齿动物饮食。大鼠随机分成3组(每组 $n=10$),即OVX组、OVX+PQQ组和Sham组;其中OVX组和OVX+PQQ组进行手术切除双侧卵巢,而Sham组进行假手术,具体手术方案参考已发表的文献[8]。除OVX+PQQ组外的所有大鼠均饲喂标准大鼠饮食。OVX+PQQ组大鼠在标准大鼠食物中加入4mg/kg PQQ。药物治疗12周后,麻醉后通过颈脱位对所有大鼠进行安乐死,收集股骨和血液样本。

1.2 检测指标

骨密度和骨微观结构使用微型计算机断层扫描

(Micro-CT)分析,取出右股骨并保存在10%福尔马林液体中,随后进行Micro-CT平扫。使用随仪器提供的3D Creator软件(SkyScan),对二维图像生成三维渲染。使用软件自动计算以下3D参数,包括骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.th)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、结构模型指数(SMI)。

随后对股骨进行生物力学检测,在CT测量后,对右股骨进行如前所述的3点弯曲试验。使用三点弯曲方法在大鼠安乐死后股骨离体标本进行评估机械骨强度。使用MTS 858 Mini Bionix框架进行测试。将每个股骨放置在两个钝边缘上,其边缘为22mm。通过骨干中轴上的冲孔圆形凹口连续施加垂直载荷直至断裂。位移率设定为1mm/min。测试后,计算机记录载荷-位移曲线,从载荷-变形曲线计算极限载荷(N),能量(J)和刚度(N/mm)。

将股骨于液氮中冷冻并在RIPA缓冲液裂解,然后等份装载(20mg蛋白质),使用SDS-PAGE分离蛋白质。将蛋白质在100V下转移至0.2mm的聚偏二氟乙烯膜上60min。使用以下一抗:OPG(1:2000, Cell Signalling)、RANKL(1:750, Santa Cruz BT)、FOXO1(1:500, Santa Cruz BT)和PPAR γ (1:500, Santa Cruz BT),然后使用合适二抗处理。化学发光HRP底物检测抗原抗体复合物,并使用LICOR C-Digit印迹扫描仪进行可视化,并使用相关的Image Studio 5.2软件进行光密度分析。

随后进行组织学检测,将股骨固定在福尔马林中并在升序乙醇系列中脱水。随后,将股骨嵌入甲基丙烯酸甲酯中并切成4 μ m切片用于染色。切片用苏木精-伊红(HE)染色以评估微结构。用Osteomeasure软件(OsteoMetrics, Decatur, GA, USA)进行组织形态学分析。

1.3 生化分析

使用大鼠特异性试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国南京)检测血清TRACP-5b、I型胶原C-末端交联端肽(CTX-I)、总抗氧化活性(T-AOC)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,检测根据制造商的说明书进行。

1.4 统计学处理

数据使用均数+标准差表示。采用单因素方差

分析进行两组之间的比较。经方差分析后, Bonferroni 检验确定两组之间比较差异是否有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 PQQ 对 OVX 诱导的骨量丢失的影响

手术 12 周时大鼠的股骨 Micro-CT 扫描结果如

图 1 A 所示, 骨密度和股骨微观参数如表 1 中 B~G 所示, 与 Sham 组相比, OVX 组的股骨骨密度和骨微观参数显著降低 ($P < 0.05$); OVX 组的小梁间距显著增加 ($P < 0.05$), 而 OVX + PQQ 上述指标明显优于 OVX 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。骨组织形态计量学参数显示, PQQ 对去卵巢大鼠股骨量和骨密度有保护作用。

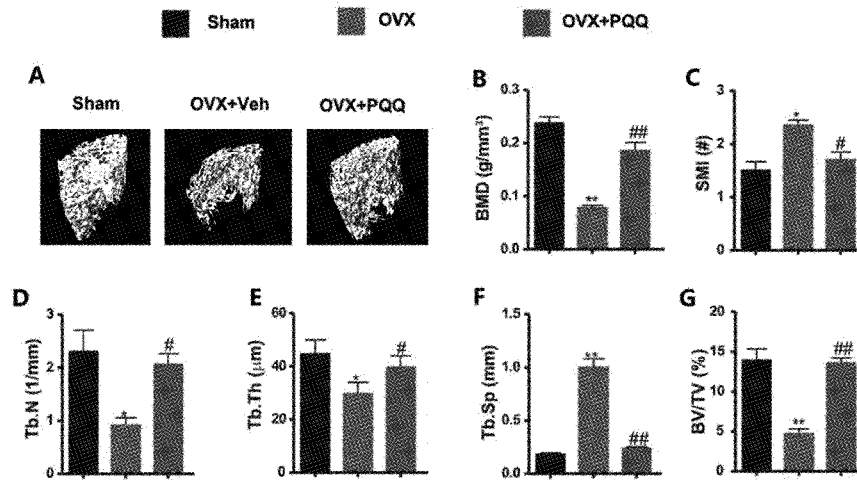


图 1 治疗 12 周大鼠股骨 Micro-CT 扫描结果

注: 与 Sham 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OVX 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Fig.1 Micro-CT scans of femur in rats after 12 weeks treatment

2.2 组织学评估

治疗 12 周时, 三组大鼠股骨干骺端 HE 切片如图 2 所示; 去卵巢 12 周时, 与 Sham 组相比较, OVX 组的股骨干骺端骨小梁的量明显降低, 骨小梁

连接较为稀疏; 经过 12 周 PQQ 干预, OVX + PQQ 组大鼠股骨干骺端骨小梁数量明显增加, 且骨小梁连接更为紧密。

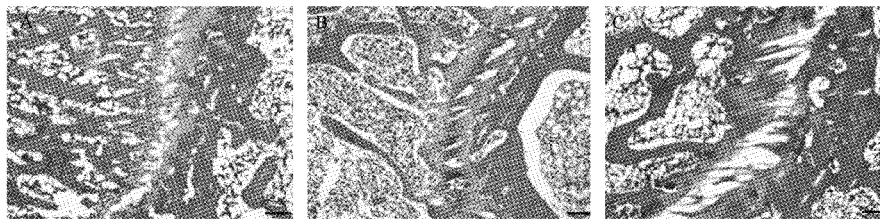


图 2 治疗 12 周大鼠股骨 HE 切片结果

注: A Sham 组; B OVX 组; C OVX + PQQ 组; (10×)。

Fig.2 HE tissue section of femur in rats after 12 weeks treatment

2.3 生物力学性能

生物力学测试获得的数据见图 3, Sham 组具有最高的极限载荷、能量和刚度; 与 OVX 组比较, OVX + PQQ 组极限载荷、能量和刚度明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 治疗后大鼠血清 TRAP-5b、CTX-I、T-AOC、MDA 和 SOD 的影响

与 Sham 组大鼠相比, OVX 大鼠血清 CTX-1、TRACP-5b 和 MDA 水平均显著升高, 而 T-AOC 和 SOD 活性显著降低, 但这些参数通过补充 PQQ 得到改善 ($P < 0.05$)。

2.5 WB 结果分析

与 Sham 组大鼠相比, OVX 大鼠 RANKL 和 RANKL/OPG 比率均显著升高, 而 OPG 和 FOXO1

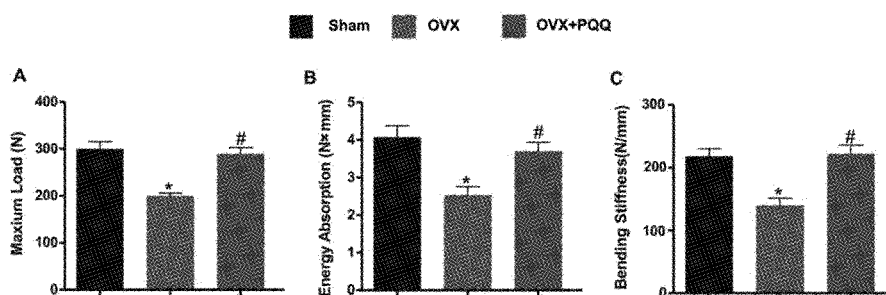


图3 治疗对大鼠股骨生物力学的影响

注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 OVX 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Fig.3 Effects of treatment on femur biomechanics

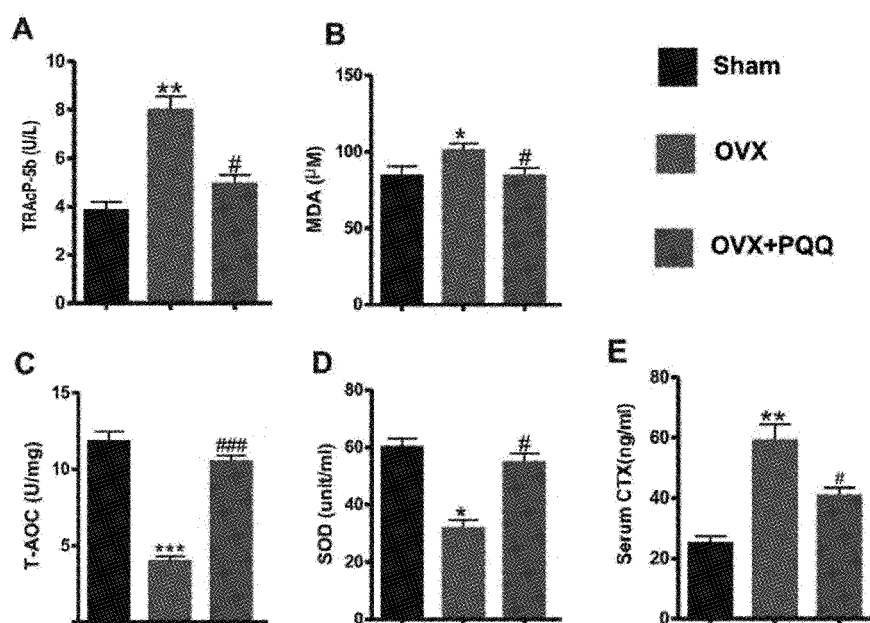


图4 治疗对大鼠生化指标的影响

注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。与 OVX 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Fig.4 Effect of treatment on biochemical indicators in rats

表达显著降低;经过 PQQ 干预后 RANKL 和 RANKL/OPG 比率均显著降低,而 OPG 和 FOXO1 表达显著增加($P < 0.05$)。

3 讨论

OVX 大鼠模型是绝经后骨质疏松症研究中成熟且广泛使用的动物模型^[9]。在我们目前的研究中,我们使用大鼠模型来评估 PQQ 对雌激素缺乏诱导的骨质疏松症的影响。我们证实 OVX 导致雌激素缺乏诱导的大鼠骨质流失。同时,我们证明 PQQ 补充可以显著改善 OVX 诱导的骨质流失。虽然雌激素缺乏的主要结果是骨吸收增加,但雌激素在细胞水平上影响骨量^[10]。本研究中进一步评估了

OVX 大鼠在补充 PQQ 后骨转换等参数的变化。目前的研究表明,OVX 不仅可以诱导破骨细胞骨吸收,还可以减少成骨细胞的骨形成和骨强度。相反,通过补充 PQQ,破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成和骨生物学指标显著改善。我们的研究结果显示,PQQ 在预防雌激素缺乏引起的骨质疏松症中起着显著的作用,它通过抑制破骨细胞骨吸收,刺激成骨细胞骨形成和增强骨强度。

本研究进一步探索补充 PQQ 来预防雌激素缺乏引起的骨质疏松症是否与 OVX 诱导的氧化应激减少有关。最近的研究强烈表明,雌激素缺乏会加速骨骼衰老,并显著损害抗氧化应激的防御机制^[11]。最近的研究表明,雌激素缺乏会导致 Bmi1

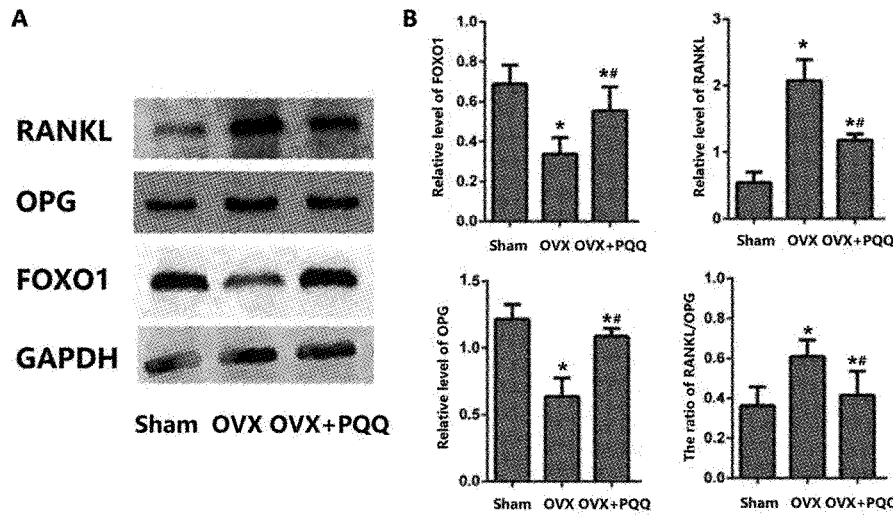


图5 PQQ对OVX大鼠RANKL、OPG、FOXO1、RANKL与OPG的影响

注:与Sham组比较,* $P < 0.05$ 。与OVX组比较,* $P < 0.05$ 。

Fig.5 The effect of PQQ on RANKL, OPG and FOXO1 and the ratio of RANKL to OPG in OVX rats

的下调,从而增加T细胞中ROS,T细胞活化和RANKL的产生,破骨细胞生成和加速骨量丢失;进一步研究发现雌激素缺乏诱导的氧化应激,小鼠骨组织中抗氧化酶水平和活性降低,成骨和成骨细胞骨形成受损^[12]。抗氧化剂使用导致OVX小鼠的成骨和成骨细胞骨形成的强烈改善^[4]。目前的研究证实,雌激素缺乏可以诱导氧化应激,降低抗氧化酶水平和活性,而PQQ补充可以通过增加OVX小鼠的抗氧化酶水平和活性来减少氧化应激。

成骨细胞可以产生RANKL和OPG,以调节破骨细胞的形成和分化。由于OPG抑制破骨细胞生成,而RANKL支持破骨细胞的骨吸收,因此OPG/RANKL的比例是破骨细胞分化和随后骨吸收的关键因素。据报道,氧化应激对RANKL的反应增加,并作为破骨细胞生成的细胞内第二信使,通过RANKL-TRAF6-Rac1氧化酶依赖性途径介导破骨细胞增殖分化^[6]。FOXOs的特征是存在一个称为叉头盒的有翼螺旋DNA结合结构域,代表了针对氧化损伤的关键细胞防御机制^[5]。氧化应激促进FOXOs易位到细胞核内,翻译后修饰包括磷酸化,泛素化和乙酰化。雌激素缺乏通过OPG/RANKL信号传导途径诱导了骨形成的生化标志物显著下降以及破骨细胞生成的增强和FOXO1降低。在本研究中,PQQ显著下调了RANKL的蛋白质表达,增强成骨细胞中OPG和FOXO1的水平。本研究结果表明,PQQ不仅可以有效地阻止雌激素缺乏引起的骨质疏松症,还可以通过防御氧化应激和改善

RANKL/OPG比率。

综上所述,我们目前的研究表明,雌激素缺乏引起的骨量丢失不仅与增加的氧化应激和破骨细胞骨吸收有关,并且与成骨细胞骨形成减少有关。补充PQQ通过抑制氧化应激和改善RANKL/OPG比率,在预防由雌激素缺乏引起的骨质疏松症中起重要的作用。因此,目前的研究表明,PQQ有预防和治疗绝经后骨质疏松症的潜力。

【参考文献】

[1] Kawai M, Mödder UI, Khosla S, et al. Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011,10(2): 141-156.
 [2] Reid IR. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015,11(7): 418.
 [3] Khosla S, Bellido TM, Drezner MK, et al. Forum on aging and skeletal health: Summary of the proceedings of an ASBMR workshop [J]. J Bone Miner Res, 2011,26(11): 2565-2578.
 [4] Shi C, Wu J, Yan Q, et al. Bone marrow ablation demonstrates that estrogen plays an important role in osteogenesis and bone turnover via an antioxidative mechanism [J]. Bone, 2015, 79: 94-104.
 [5] Manolagas CS. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. Endocr Rev, 2010,31(3): 266-300.
 [6] Lee KN. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation [J]. Blood, 2005, 106(3): 852-859.

(下转第1440页)

- supplementation suppressed bone resorption and oxidative stress in postmenopausal osteopenic women; a 12-week randomized double-blinded placebo-controlled trial [J]. *Osteoporos Int*, 2018,29(4): 881-891.
- [2] 彭方亮, 于洪涛, 邵辉, 等. 骨质疏松骨折史和合并症对健康相关生活质量的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(11): 1585-1588.
- [3] 闵竞, 黎洋. 绝经后骨质疏松症与醛固酮/肾素比率相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(11): 1566-1570.
- [4] 苗二芽, 李颖波, 蔡少康, 等. 血浆凝溶胶蛋白与绝经后妇女的腕部骨密度相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(11): 1522-1525,1544.
- [5] 段鹏, 宗允, 涂萍. 不同糖耐量人群骨密度变化及与血清护骨素水平的相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(11): 1576-1579,1605.
- [6] Zawawi MSF, Dharmapatri AASSK, Cantley MD, et al. Regulation of ITAM adaptor molecules and their receptors by inhibition of calcineurin-NFAT signalling during late stage osteoclast differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,427(2): 404-409.
- [7] Kursat Ali K, Fehmi O, Zekai H, et al. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system [J]. *J Food Sci*, 2012,77(11): H224-H230.
- [8] Huong DT, Ide T. Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats [J]. *Br J Nutr*, 2008,100(1): 79-87.
- [9] Nurcan YT. The effect of alpha-lipoic acid in ovariectomy and inflammation-mediated osteoporosis on the skeletal status of rat bone [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013,718(1-3): 469-474.
- [10] Kazuhito S, Satoru T, Reiko T, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo [J]. *J Pineal Res*, 2010,42(3): 231-239.
- [11] Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways [J]. *J Pineal Res*, 2010,49(3): 222-238.
- [12] Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down - regulation of the RANKL - mediated osteoclast formation and activation [J]. *J Bone Miner Res*, 2010,17(7): 1219-1229.
- [13] Park BG, Chong IY, Hui TK, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells [J]. *Toxicology*, 2005,215(1): 115-125.
- [14] Kyung LN, Young Geum C, Youn BJ, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation [J]. *Blood*, 2005,106(3): 852.
- [15] Annia G, Dun Xian T, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination [J]. *J Pineal Res*, 2011,51(1): 1-16.
- [16] Hegazy SK. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010,16(33):4145-4151.
- [17] Iezaki T, Fukasawa K, Park G, et al. The transcriptional modulator Irf1 regulates osteoclast differentiation through enhancing NF- κ B/NFATc1 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2016,36(19):2451-2463.
- (收稿日期: 2019-12-28;修回日期: 2020-01-18)

(上接第 1435 页)

- [7] Akagawa M, Nakano M, Ikemoto K. Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone [J]. *J Agricult Chem Society Japan*, 2015,80(1): 13-22.
- [8] 陶周善, 吕杨训, 崔伟, 等. β -TCP 修复骨质疏松性骨缺损的实验研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(10): 1178-1183.
- [9] Sundeep K, L Joseph M, B Lawrence R. The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 441-451.
- [10] Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton [J]. *Trends Endocrinol Metabol*, 2012,23(11): 576-581.
- [11] Jolly J, Chin KY, Alias E, et al. Protective effects of selected botanical agents on bone [J]. *Int J Environm Res Public Health*, 2018,15(5):963.
- [12] Li J, Wang Q, Yang R, et al. BMI - 1 mediates estrogen - deficiency - induced bone loss by inhibiting reactive oxygen species accumulation and T cell activation [J]. *J Bone Mine Res*, 2016,32(5): 962.
- (收稿日期: 2019-12-17;修回日期: 2020-02-19)