

人参皂苷 Rh2 通过 OPG/RANKL 信号通路介导对老年大鼠骨量流失的保护作用

朱恒杰* 陈扬平 姚江凌

海南医学院第一附属医院急诊创伤科,海南 海口 570103

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 10-1446-05

摘要: **目的** 观察人参皂苷 Rh2 对老年大鼠骨强度和骨量的影响,并探索可能的机制。**方法** 30 只雌性 Sprague Dawley 大鼠随机分为 3 组:对照组(Con, 10 只 3 月龄大鼠);模型组(Mod, 10 只 24 月龄老年大鼠)及老年大鼠+人参皂苷 Rh2 治疗组(Rszg, 大鼠每天接受 300 mg/kg 人参皂苷 Rh2 治疗 12 周)。12 周后取双侧股骨进行微型计算机断层扫描(Micro-CT)、组织病理切片、骨生物力学以及蛋白质印迹(WB)检测。**结果** Mod 组大鼠的骨密度(BMD)、骨显微结构和最大载荷和弹性模量等指标均明显低于 Con 组($P < 0.05$)。人参皂苷 Rh2 治疗后骨密度、骨显微结构、最大载荷和弹性模量等指标均有明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。WB 检测显示 Mod 组 OPG 和 Runx2 表达水平较 Con 组明显下调,而 RANKL 表达水平明显上调($P < 0.05$)。Rszg 组 OPG 和 Runx2 表达水平较 Mod 组明显上调,而 RANKL 表达水平显著下调。**结论** 人参皂苷 Rh2 治疗可以显著改善老年大鼠股骨骨强度和骨量,而这种疗效可能通过 OPG/RANKL 信号通路来介导。

关键词: 骨生物力学;老年大鼠;人参皂苷 Rh2;Micro-CT;骨密度

Protective effect of ginsenoside Rh2 on bone loss in aged rats mediated by OPG/RANKL signaling pathway

ZHU Hengjie*, CHEN Yangping, YAO Jiangling

Department of Emergency Trauma, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570103, China

* Corresponding author: ZHU Hengjie, Email: 1215775436@qq.com

Abstract: Objective To observe the effect of ginsenoside Rh2 on bone strength and bone mass in aged rats and explore possible mechanisms. **Methods** Thirty female Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups: control group (Con, 10 3-month-old rats); model group (Mod, 10 24-month-old aged rats) and aged rats + ginsenoside Rh2 Group (Rszg, rats received 300 mg/kg ginsenoside Rh2 treatment for 12 weeks). After 12 weeks, bilateral femurs were taken and analyzed by micro-CT (Micro-CT), histopathological sections, bone biomechanics, and Western blot (WB) detection. **Results** The bone density (BMD), bone microstructure, maximum load and elastic modulus of the Mod group rats were significantly lower than those of the Con group ($P < 0.05$). After treatment with ginsenoside Rh2, bone mineral density, bone microstructure, maximum load, and elastic modulus were significantly improved, which was statistically significant ($P < 0.05$). WB detection showed that the expression levels of OPG and Runx2 in Mod group were significantly lower than those in Con group, while the expression levels of RANKL were significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of OPG and Runx2 in the Rszg group were significantly increased compared with the Mod group, while the expression levels of RANKL were significantly decreased. **Conclusion** Ginsenoside Rh2 treatment can significantly improve femoral bone strength and bone mass in aged rats, and this effect may be mediated by the OPG/RANKL signaling pathway.

Key words: bone biomechanics; aged rats; ginsenoside Rh2; micro-CT; bone mineral density

骨质疏松症已经成为一个严重的医学问题,它是一种以骨组织微结构退行性改变和骨量减少为特

征的疾病,可导致骨质脆性增加,骨折发生率增加^[1]。根据病因可分为原发性骨质疏松症和继发性骨质疏松症,原发性骨质疏松症包括老年性和绝经后骨质疏松症,继发性骨质疏松症所占比例很小。去卵巢大鼠模型是目前最常用的绝经后骨质疏松动

* 通信作者: 朱恒杰, Email: 1215775436@qq.com

物模型。在年轻和老年大鼠与人类中,同样的机制调控着骨量的增加和丢失^[2]。骨质疏松症最危险的结果是骨折,即使是轻微的创伤或日常活动也可能导致骨折,无论是在脊柱、髌部和前臂远端这样的常见部位也是如此^[3-4]。目前,治疗骨质疏松症最常用的药物如双膦酸盐、甲状旁腺素片段、RANK 配体抑制剂等。然而,这些药物耐受性较差和长期不良反应的限制^[5-6]。因此急需新的药物来改善这类情况。人参具有多种潜在作用,包括免疫作用、抗癌作用、性功能增强作用等。但是,很少有研究评估其抗骨质疏松作用^[7]。本研究观察人参提取物人参皂苷 Rh2 对老年大鼠骨量流失的影响并探索可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验分组和治疗

在本实验中使用雌性 SD 大鼠(其中 10 只为 3 月龄大鼠记为(Con 组),10 只为 24 个月龄老年大鼠使用生理盐水治疗记为(Mod 组),10 只为 24 个月龄大鼠每天接受人参皂苷 Rh2(购于浙江亚克药业有限公司,每 100 g 粉末中含有 16.2 g 人参皂苷 Rh2)给药 300 mg/(kg·d),持续治疗 12 周记为(Rszg 组)。大鼠可以自由摄取实验室提供标准的颗粒饮食和水。将实验动物饲养在温度 23±2℃,恒定湿度(45%~50%),12 h/12 h 暗光照循环的空调房间中。通过每周称重大鼠并调整人参皂苷 Rh2 的剂量。治疗 12 周后取出双侧股骨,用 10%中性缓冲福尔马林固定 24 h,进行微型计算机断层扫描检查(Micro-CT)和生物力学检测。将右股骨切片并在液氮中冷冻以用于 Western 印迹(WB)分析。

1.2 Micro-CT 成像与组织形态学分析

左侧股骨通过 Micro-CT 测量(μ CT80, Sanco Medical, Brüttisellen, Switzerland),并通过相关分析软件(μ CT80 Evaluation Program v6.51, Sanco Medical, Switzerland)进行评估。扫描后,选择股骨远端高于生长板 2 mm 的松质骨作为 VOI,该 VOI 仅限于股骨内部区域,其中通过使用 CT 分析器软件绘制自由形式等高线来提取小梁和皮质骨。使用标准化技术勾勒松质骨的微观结构,通过多平面重组获得三维(3D)图像;以确定骨体积分数(BV/TV, %)、骨小梁厚度(Tb.Th, μ m)、骨小梁数目(Tb.N, mm⁻¹)、骨小梁间隙(Tb.Sp, μ m)和骨密度(BMD, mg/cm³)。

1.3 HE 染色组织切片检测

将每个标本纵向切成 5 μ m 厚的切片,并选择中心部分进行每个标本组织的分析。选择股骨组织切片,并用苏木精和曙红(HE)(上海新宇生物技术有限公司)染色进行常规形态学分析。

1.4 生物力学评估

右侧股骨(每组 $n=5$)使用 Instron 4302 系统进行三点弯曲实验评估。将股骨放在材料检测机支架上,测试区域定义为股骨的最中央部分。以 2 mm/min 的速度施压载荷直至骨折。通过连接的计算机监控骨折时的最大载荷(N)和弹性模量(mm²)的数据。

1.5 WB 检测

左侧股骨在液氮中粉碎后,用 IP 裂解缓冲液从骨组织中提取总蛋白。用 BCA 蛋白试剂盒定量测定蛋白浓度。将蛋白与加载缓冲液混合,在 100℃煮沸 5 min,使其变性。用 15% SDS-PAGE 分离 50 μ g 总蛋白,转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。用 5%的脱脂奶粉在室温下封闭 1 h 后,将膜分别与 OPG、Runx2 和 RANKL 一抗在 4℃孵育过夜,然后与辣根过氧化物偶联的二抗在室温下孵育 1 h。用 ECL 试剂(美国 Thermo Scientific)显影印迹。使用 GAPDH 进行归一化。用 Image J 软件测量各蛋白条带的总和密度。

1.6 统计学处理

统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),然后进行 t 检验。结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 P 值<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 结果分析

股骨干骺端骨小梁三维重建图像如图 1 A 所示。股骨干骺端的微观参数如图 1B~F 所示。Mod 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较 Con 组明显降低,而 Tb.Sp 则明显升高($P<0.05$)。Rszg 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 均明显高于 Mod 组($P<0.05$),而 Tb.Sp 则明显低于 Mod 组($P<0.05$)。

2.2 股骨组织病理学

股骨干骺端骨小梁 HE 染色如图 2 所示,Con 组织显示股骨干骺端骨小梁致密,骨小梁网状结构正常。Mod 组组织表现为疏松均匀的骨小梁变薄,导致骨小梁间隙变宽。Rszg 组骨小梁数量和连接增加明显,表现出明显的结构恢复。

2.3 股骨的生物力学变化

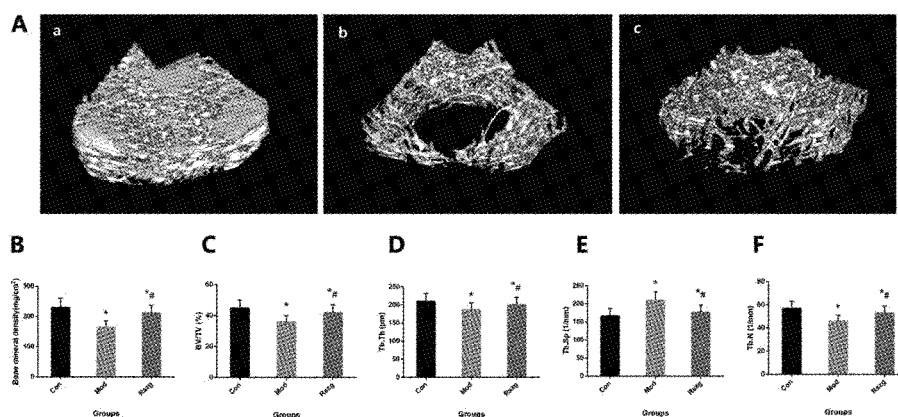


图 1 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

注: a Con, b Mod, c Rszg; 与 Con 组相比, * $P < 0.05$; 与 Mod 组相比, # $P < 0.05$ 。

Fig.1 Results of Micro-CT in the femoral metaphysis of three groups of rats

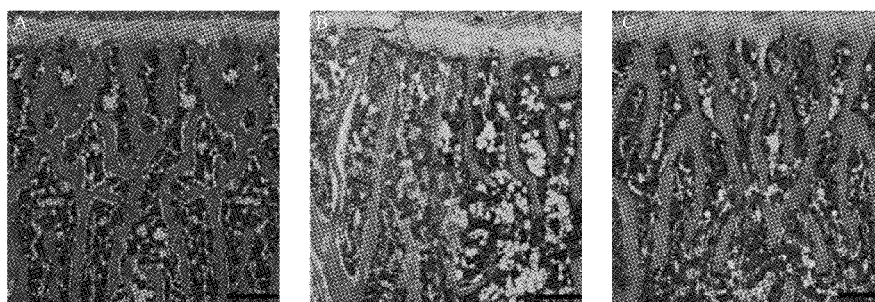


图 2 三组股骨的组织病理学

注: A Con, B Mod, C Rszg; 苏木精-伊红染色 (10×)。

Fig.2 Histopathology of femurs in the three groups

股骨三点弯曲试验表明, Con 组的最大载荷和弹性模量均高于 Mod 组, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Rszg 组的最大载荷和弹性模量均高于 Mod 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 WB 分析

和 Con 组比较, Mod 组 OPG 和 Runx2 表达水平

明显下调, 而 RANKL 表达水平明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。和 Mod 组比较, Rszg 组 OPG 和 Runx2 表达水平明显上调, 而 RANKL 表达水平显著下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

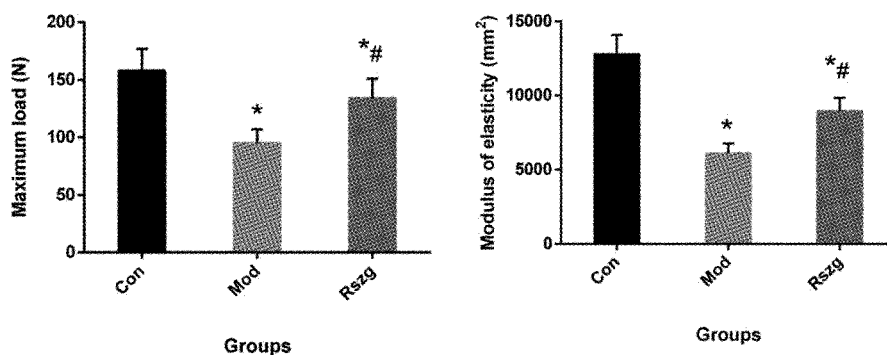


图 3 右股骨的三点弯曲试验结果

注: 与 Con 组相比, * $P < 0.05$; 与 Mod 组相比, # $P < 0.05$ 。

Fig.3 Three-point bending test results of the right femur of rats

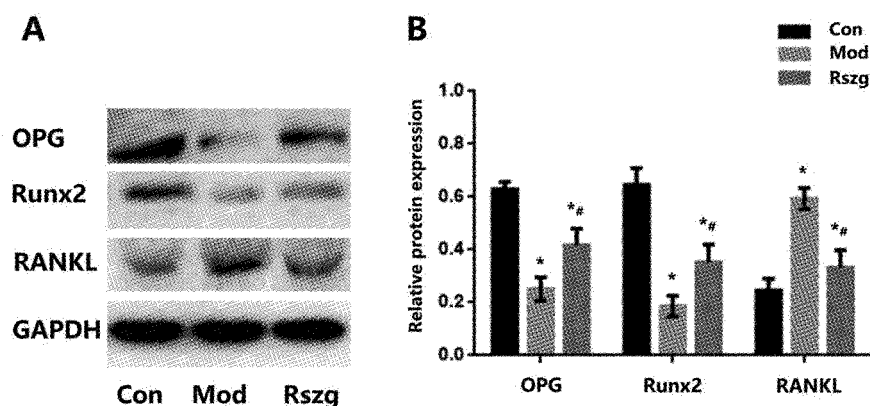


图4 使用 WB 检测 OPG、Runx2、RANKL 和 GAPDH 的相对表达

注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$; 与 Mod 组相比, # $P < 0.05$ 。

Fig.4 Relative expression of OPG、Runx2、RANKL to GAPDH using Western blotting

3 讨论

人参是世界上最受欢迎的草药之一,人参皂甙 Rh2 是其主要成分之一。据报道,在实验模型中,人参皂甙 Rh2 具有多种生物活性,包括抗炎、抗肿瘤和抗糖尿病^[8]。此外,人参皂甙 Rh2 抑制了骨碎屑的形成而没有任何细胞毒性^[9]。因此,人参皂甙 Rh2 生物活性物质可能对预防老年骨量流失有用。然而,人参皂甙 Rh2 对老年骨量流失作用和机制仍是未知的。基于上述数据,本研究的目的是评估人参皂甙 Rh2 对老年雌性 SD 大鼠骨骼的影响。

在本研究中,从实验开始到治疗第 12 周,老年大鼠股骨干骺端骨小梁微观结构和骨密度发生显著改变。人参皂甙 Rh2 的使用显著增加了老年大鼠骨量和骨密度,股骨干骺端 Micro-CT 和 HE 切片观察的结果已经清晰表明。在这项研究观察到的人参皂甙 Rh2 的有益作用可能不仅是由于其促进成骨的效果,而且还因为其抑制骨吸收的作用。此外,在 2018 年一项研究^[10]中,有学者已经指出人参可以下调实验动物模型中 NF- κ B 刺激的炎症反应,并通过抑制 NF- κ B 介导的炎症基因表达来抑制炎症。破骨细胞的形成需要核因子 κ B (NF- κ B) 信号传导。因此,抑制该信号分子可能会降低破骨细胞的增殖、分化和活性,并减慢骨吸收,这很好解释了本研究中人参皂甙 Rh2 的骨保护作用的影像学和组织学切片观察的结果。

由于骨强度直接影响到骨骼抗骨折能力,是骨密度和骨微观结构外反映治疗效果最直接指标^[11]。本研究观察人参皂甙 Rh2 对大鼠股骨骨强度的影响,发现老年大鼠的最大载荷和弹性模量较年轻大

鼠显著降低,而经过人参皂甙 Rh2 治疗 12 周,最大载荷和弹性模量较 Mod 组显著升高,这表明人参皂甙 Rh2 能改善老年大鼠股骨骨强度。骨骼稳态主要通过成骨细胞和破骨细胞的合作来维持^[12]。骨保护素(OPG)是一种具有破骨细胞潜在抑制活性的蛋白,在成骨细胞/基质细胞中自然表达^[13]。由成骨细胞/基质细胞产生的 RANKL 是可与 RANK 结合的跨膜配体。RANK 和 RANKL 相互作用可以启动基因表达和信号传导级联,从而导致破骨细胞前体细胞分化为成熟的破骨细胞。Runx2 对于成骨细胞的发育和骨形成至关重要。作为转录因子 Runt 域家族的成员,Runx2 结合特定的 DNA 序列来调节众多基因的转录,从而控制成骨细胞从间充质干细胞向成骨细胞的发育和成熟^[14]。这项研究的结果表明,人参皂甙 Rh2 可以调节 OPG/RANKL 比率并抑制破骨细胞的发生,同时促进 Runx2 表达。这些结果支持人参皂甙 Rh2 可以通过刺激 OPG 和 Runx2 表达和抑制 RANKL 表达来调节破骨细胞的分化和功能,这表明人参皂甙 Rh2 具有可以预防绝经后骨质疏松症的可能机制。

本研究有其不足之处,首先研究模型限制了研究结果进一步推广;其次剂量选取的原因只能证实本研究选取的剂量对老年骨骼流失保护作用,是否适合其他类型的骨质疏松症就不得而知了;由于没有进一步研究该药物对细胞的影响,因此需要进一步进行体外研究验证其对成骨细胞和破骨细胞的影响。

总之,人参皂甙 Rh2 治疗对老年大鼠骨量流失起到保护作用,而这种效果可能通过介导 OPG/RANKL 信号通路和促进 Runx2 表达来实现的。

【参 考 文 献】

- [1] 周皖舒, 陶周善. 阿司匹林联合辛伐他汀对成骨细胞增殖及分化的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 170-173, 195.
- [2] Shimizu T, Tanaka T, Kobayashi T, et al. Sequential treatment with zoledronic acid followed by teriparatide or vice versa increases bone mineral density and bone strength in ovariectomized rats [J]. Bone Rep, 2017, 7: 70-82.
- [3] Karen Beattie, Jonathan Adachi, George Ioannidis, et al. Estimating osteoporotic fracture risk following a wrist fracture: a tale of two systems [J]. Arch Osteoporos, 2015, 10: 13.
- [4] Bliuc D, Center JR. Determinants of mortality risk following osteoporotic fractures [J]. Curr Opin Rheumatol, 2016, 28(4): 413-419.
- [5] Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating bone resorption and bone formation in opposite directions in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Drugs, 2015, 75(10): 1049-1058.
- [6] 袁志峰, 刘会文. 唑来膦酸、伊班膦酸钠及阿伦膦酸钠防治绝经后骨质疏松症的疗效对比研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 249-252, 269.
- [7] Kropotov AV, Kolodnyak OL, Koldaev VM. Effects of siberian ginseng extract and ipriflavone on the development of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Bull Exp Biol Med, 2002, 133(3): 252-254.
- [8] Long He, Junwon Lee, Jae Hyuk Jang, et al. Ginsenoside Rh2 inhibits osteoclastogenesis through down-regulation of NF- κ B, NFATc1 and c-Fos [J]. Bone, 2012, 50(6): 1207-1213.
- [9] Jie Liu, Jun Shiono, Kuniyoshi Shimizu, et al. 20(R)-ginsenoside Rh2, not 20(S), is a selective osteoclastogenesis inhibitor without any cytotoxicity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(12): 3320-3323.
- [10] Hak-Jae Kim, Kyeong-Hun Park, Dong-Hwi Kim, et al. Panax ginseng In vitro assessments of bone microcomputed tomography in an aged male rat model supplemented with [J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(6): 1135-1139.
- [11] Chandler H, Brooks DJ, Hattersley G, et al. Abaloparatide increases bone mineral density and bone strength in ovariectomized rabbits with glucocorticoid-induced osteopenia [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(8): 1607-1616.
- [12] Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption [J]. Biogerontol, 2002, 3(1-2): 79-83.
- [13] Aubin JE, Bonnelly E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption [J]. Osteoporos Int, 2000, 11(11): 905-913.
- [14] Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75(3): 213-225.
- (收稿日期: 2020-02-11; 修回日期: 2020-02-24)
-
- (上接第 1430 页)
- [4] Hu JP, Nishishita K, Yoshida H, et al. Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- κ B and Akt pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 580(1): 70-79.
- [5] Hyun Woo L, Jung Hee S, Hyun-Nam K, et al. Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK [J]. J Bone Miner Res, 2010, 23(8): 1227-1237.
- [6] Dong S, Zhang M, Niu H, et al. Upregulation of UDP-glucuronosyltransferases 1a1 and 1a7 are involved in altered puerarin pharmacokinetics in type II diabetic rats [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1487.
- [7] Wang T, Cai L, Wang Y, et al. The protective effects of silibinin in the treatment of streptozotocin-induced diabetic osteoporosis in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 681.
- [8] Ullah S, Li Z, Hasan Z, et al. Malathion induced oxidative stress leads to histopathological and biochemical toxicity in the liver of rohu (Labeo rohita, Hamilton) at acute concentration [J]. Ecotoxicol Environment Safety, 2018, 161: 270-280.
- [9] Chen YF, Lin CS, Wang KA, et al. Design of a Clinical Decision Support System for Fracture Prediction Using Imbalanced Dataset [J]. J Healthcare Eng, 2018, (2018-3-22), 2018, 2018: 1-13.
- [10] Chen DL, Yang KY. Berberine alleviates oxidative stress in islets of diabetic mice by inhibiting miR-106b expression and up-regulating SIRT1 [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12): 4349-4357.
- [11] Islam M, Islam MS, Zannah S, et al. Momordica charantia (Bitter melon) in combination with metformin potentiates hypoglycemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats [J]. Banglad Pharmaceut J, 2018, 21(2): 109-117.
- [12] Zhou J, Zhou S, Tang J, et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1): 262-268.
- [13] Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. Diabetes, 2006, 55(8): 2256-2264.
- [14] Bai X, Lu D, Bai J, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. Biochem. Biophys [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(1): 197-207.
- [15] Franceschi RT, Ge C, Xiao G, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1116: 196-207.
- (收稿日期: 2019-12-17; 修回日期: 2020-02-15)