

· 论 著 ·

牛蒡苷元通过 OPG/RANKL 信号通路介导对去卵巢大鼠骨量流失的保护作用

陈丽英* 郭远学 陈洪娇 袁伟 王玉芸

海南医学院第一附属医院,海南 海口 570102

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 10-1450-06

摘要: **目的** 探讨牛蒡苷元 (AGN) 对去卵巢大鼠骨强度和骨量的影响,并探索可能的机制。**方法** 本研究中通过双侧去卵巢建立骨质疏松大鼠模型;随后随机分为假手术组 (Sham)、去卵巢组 (OVX) 以及牛蒡苷元组 (AGN),每组 10 只;其中牛蒡苷元组大鼠接受牛蒡苷元 [40 mg/(kg·d)] 治疗 12 周;待治疗结束后使用 Micro-CT、Masson 染色切片、骨代谢指标、骨生物力学检测以及蛋白质印迹观察治疗效果以及可能的机制。**结果** 治疗 12 周后,与 OVX 组相比, Micro-CT 和 Masson 染色切片结果显示 AGN 组的大鼠骨小梁数量和骨密度得到明显改善。AGN 组大鼠 BMD、TV/BV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 较 OVX 组明显改善 ($P<0.05$)。治疗 12 周时, AGN 组极限载荷和刚度较 OVX 组显著增加 ($P<0.05$), 而 AGN 组骨代谢指标 AKP 和 TRACP 水平显著降低 ($P<0.05$), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。和 OVX 组比较, AGN 组 OPG 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 ($P<0.05$)。表明 AGN 组的大鼠 OPG/RANKL 信号通路被激活。**结论** 牛蒡苷元可以通过 OPG/RANKL 信号通路介导对去卵巢大鼠骨骼的保护作用。

关键词: 牛蒡苷元;绝经后骨质疏松症;骨强度;骨密度;OPG/RANKL 信号通路

Protection of Arctiin through OPG/RANKL signaling pathway on bone loss in ovariectomized rats

CHEN Liying*, GUO Yuanxue, CHEN Hongjiao, YUAN Wei, WANG Yuyun

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

* Corresponding author: CHEN Liying, Email: 2321723508@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of arctiin (AGN) on bone strength and bone mass in ovariectomized rats and explore possible mechanisms. **Methods** In this study, osteoporosis rat models were established by bilateral ovariectomy; then they were randomly divided into sham operation group (Sham), ovariectomized group (OVX), and arctiin group (AGN), each group with 10 rats. The arctiin group rats were treated with arctiin (40 mg/kg/day) for 12 weeks; after treatment, Micro-CT, Masson stained sections, bone metabolism indicators, bone biomechanical testing and Western blot were used to observe the treatment effect and possible Mechanisms. **Results** After 12 weeks of treatment, compared with the OVX group, the number of bone trabeculae and bone density in the AGN group were significantly improved. BMD, TV/BV, Tb.N, Tb.Th and Tb.Sp of rats in AGN group were significantly improved compared with those in OVX group ($P<0.05$). At 12 weeks of treatment, the limit load and stiffness of the AGN group were significantly increased compared to the OVX group ($P<0.05$), while the levels of bone metabolism indicators AKP and TRACP in the AGN group were significantly reduced ($P<0.05$), which was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the OVX group, the expression level of OPG in the AGN group was significantly increased, while the expression level of RANKL was significantly decreased, and there was a statistical difference ($P<0.05$). This indicates that the OPG/RANKL signaling pathway in the AGN group was activated. **Conclusion** Arctiin can mediate the protective effect on the bones of ovariectomized rats through the activation of OPG/RANKL signaling pathway.

Key words: Arctiin; postmenopausal osteoporosis; bone strength; bone density; OPG/RANKL signaling pathway

骨质疏松症是一种在绝经后妇女和老年人中常见的代谢性疾病。这种疾病的特点是无症状情况下

出现骨量丢失,导致骨折风险明显增加,严重影响患者的生活质量^[1-2]。迄今为止,用于预防或治疗骨质疏松症的药物虽然表现出一定临床疗效,但是一些药物严重的不良反应,包括使用雌激素可增加乳

* 通信作者: 陈丽英, Email: 2321723508@qq.com

腺癌的风险,以及长期使用双膦酸盐药物引起下颌骨坏死和胃肠道反应限制临床疗效提高^[3]。因此,骨质疏松症的预防和治疗所需药物亟待开发或者改进。植物雌激素是一类分子结构类似于 17-雌二醇的化合物,与雌激素受体结合,发挥部分雌激素作用。由于植物雌激素可以抑制雌激素信号,因此已成为治疗绝经后骨质疏松症的潜在治疗热点^[4]。根据化学结构,植物雌激素可分为异黄酮和木质素。牛蒡苷元(Aretingenin, AGN)是一种木质素植物雌激素,具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗纤维化^[7]和抗肿瘤^[8]等功效。鉴于 AGN 类雌激素特性以及具有抗炎抗氧化作用,我们假设 AGN 具有抗绝经后骨质疏松作用。研究旨在探讨 AGN 对去卵巢大鼠模型抗骨质疏松作用,并揭示其作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 模型建立和药物治疗

3 月龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠购买于上海实验动物中心,并饲养在 12 h 光暗循环,温度控制在(22±2)℃和湿度控制在 50%~60%且可以自由接触食物和水的环境中。大鼠适应性饲养 7 d 后进行背侧双侧去卵巢术(OVX)或假手术(Sham)^[9],并将大鼠在正常条件下饲养。然后将大鼠分成 3 组,每组 10 只:Sham 组、OVX 组、AGN 组[OVX 大鼠术后第 3 天开始给予牛蒡苷元 40 mg/(kg·d)治疗,牛蒡苷元购于 Sigma-St. Louis, MO, USA]。药物干预治疗 12 周后,过量麻醉药物处死大鼠,解剖出双侧股骨和收集血液样本用于检测。

1.2 血清骨代谢指标检测

用南京建成生物工程研究所生产的 AKP(A059-1)试剂盒测定血清中碱性磷酸酶(AKP, A059-1)。抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP, R052-2)检测采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(R&D Systems Inc., 美国)。所有检测均按厂家说明书进行。

1.3 Micro-CT 检测

使用 SCAN-CO Medical micro-CT(SCANCO Medical AG, Zurich, Switzerland)扫描大鼠左侧股骨。使用 VG Studio 2.1 V 软件(版本 2.6)对股骨进行扫描,并对 18 μm(像素)管电压为 80 kV 且电流为 60 μA 的 X 射线进行成像。在 180°的范围内总共获取了 450 个投影。使用基于 Feldkamp 算法(Sky Scan)的锥束重建软件重建图像切片。从生长板末端起近 0.3 mm 开始,选择 2 mm 作为目标区

域。通过使用 CT 分析仪软件绘制定制轮廓来提取皮质骨。获得骨密度(BMD)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁骨体积分数(BV/TV)、小梁数(Tb.N)、小梁分离度(Tb.Sp),来形成 Micro-CT 的 3D 渲染图像。3D 参数基于对具有渲染表面的行进立方体类型模型的分析。

1.4 股骨三点弯曲实验

对大鼠股骨进行三点弯曲以确定股骨最大负荷和刚度。简短地说,将左侧股骨放在力学测试装置上。将股骨放在支架的中间位置,以 10 mm/min 的持续测试速度加载直到股骨骨折。记录数据,最后进行分析以获得极限载荷(N)和刚度(N/mm)。

1.5 组织学观察

右股骨在室温下于 4%中性福尔马林缓冲液中固定过夜,并在进行组织学分析前用 10%EDTA 脱钙 28 d。脱钙骨的石蜡切片厚度为 4 μm。进行 Masson 染色以检查骨组织结构的变化。

1.6 WB 检测

右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 μg 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,将膜分别与一抗:OPG 及 RANKL 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。

1.7 统计学处理

实验数据表示为均数±标准差。统计分析用 SPSS 22.0 软件进行。基于方差和 *t* 检验比较两个不同组间差异。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 牛蒡苷元治疗 12 周对骨代谢指标的影响

图 1 显示了 AGN 治疗对骨转换标志物的影响。与 Sham 组相比,OVX 组 AKP 和 TRACP 水平显著升高(*P*<0.05)。与 OVX 组相比,AGN 组骨代谢指标 AKP 和 TRACP 水平显著降低(*P*<0.05)。

2.2 Micro-CT 分析

股骨干骺端骨小梁三维重建图像如图 2 A 所示。股骨干骺端的微观参数如图 2B~F 所示。OVX 组左侧

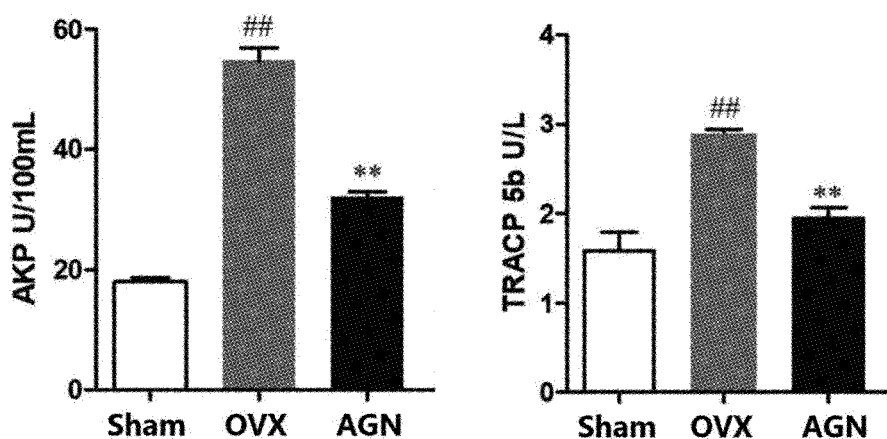


图1 AGN 治疗对骨代谢指标的影响

注:和 Sham 组比较, ^{##} $P<0.05$;和 OVX 组比较, ^{**} $P<0.05$ 。

Fig.1 Effect of AGN treatment on the bone metabolism indexes

股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较 Sham 组明显降低,而 Tb.Sp 则明显升高($P<0.05$)。AGN 组左侧股骨

BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 均明显高于 OVX 组($P<0.05$),而 Tb.Sp 则明显低于 OVX 组($P<0.05$)。

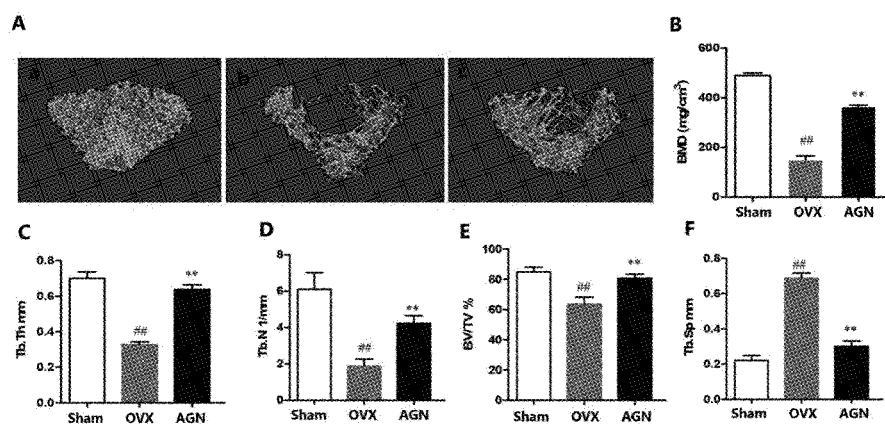


图2 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

注: a Sham 组, b OVX 组, c AGN 组;和 Sham 组比较, ^{##} $P<0.05$;和 OVX 组比较, ^{**} $P<0.05$ 。

Fig.2 Results of Micro-CT in the femoral metaphysis of three groups of rats

2.3 股骨组织病理学

股骨干骺端骨小梁的 Masson 染色如图 3 所示, Sham 组显示股骨干骺端骨小梁网状结构正常。OVX 组表现为疏松均匀的骨小梁变薄,导致骨小梁间隙变宽。AGN 组骨小梁数量和连接增加明显,表现出明显的结构恢复。

2.4 股骨的生物力学变化

股骨三点弯曲试验表明, Sham 组的极限载荷和刚度均高于 OVX 组,两组间差异有统计学意义($P<0.05$), AGN 组的极限载荷和刚度均高于 Mod 组($P<0.05$),见表 1。

表1 三点弯曲试验结果($\bar{x}\pm s$)Table 1 results of three-point bending test($\bar{x}\pm s$)

参数	Sham	OVX	AGN
极限载荷/(N)	94.66±3.99	63.11±2.69 ^{##}	88.76±1.72 ^{**}
刚度/(N/mm)	247.27±17.20	146.29±12.33 ^{##}	224.02±6.38 ^{**}

注:和 Sham 组比较, ^{##} $P<0.05$;和 OVX 组比较, ^{**} $P<0.05$ 。

2.5 WB 分析

和 Sham 组比较, OVX 组 OPG 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 OVX 组比较, AGN 组 OPG 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。

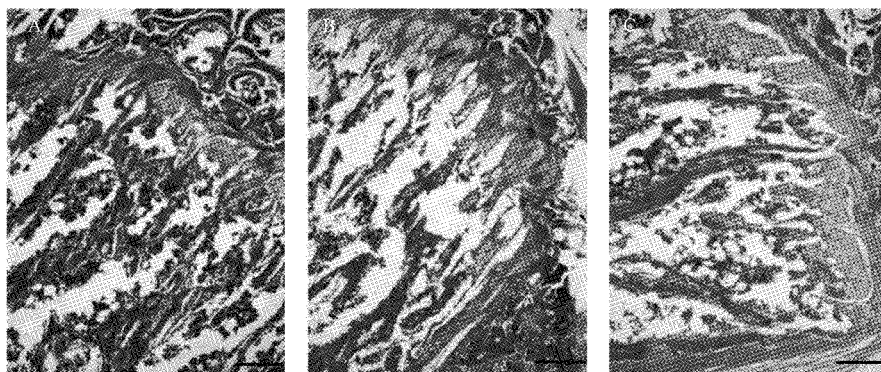


图 3 三组股骨的组织病理学

注: A Sham 组, B OVX 组, C AGN 组; Masson 染色 (10 $\times$)。

Fig.3 Histopathology of femurs from the three groups

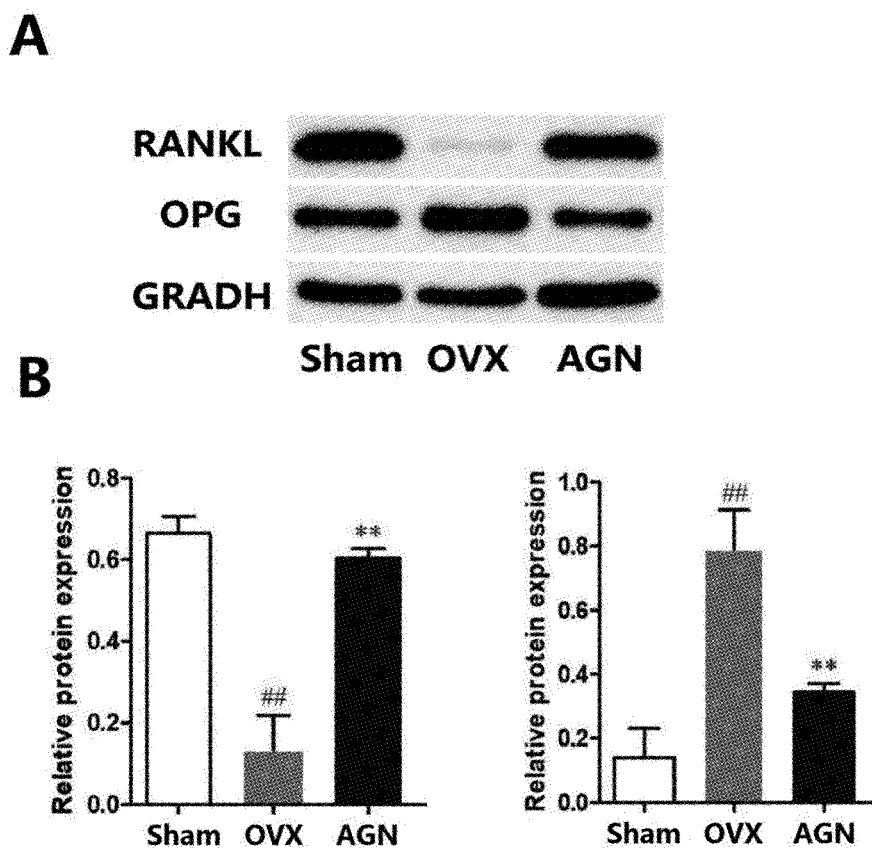


图 4 使用 WB 检测 OPG、RANKL 和 GAPDH 的相对表达

注: 和 Sham 组比较, $^{##}P<0.05$; 和 OVX 组比较, $^{**}P<0.05$ 。

Fig.4 Relative expression of OPG and RANKL to GAPDH use Western blotting

3 讨论

本研究使用去卵巢大鼠模型证实了 AGN 能减少去卵巢大鼠骨量流失,降低骨转换 (AKP 和 TRACP) 水平,提高骨密度和骨强度,提示 AGN 能改善绝经后骨质疏松症。AGN 存在于一系列用于

治疗类风湿性关节炎、炎症性疾病和感染的药用植物中^[5]。体内和体外研究显示 AGN 能抑制破骨细胞分化,这有利于类风湿性关节炎和骨质疏松症的治疗^[10]。有学者进一步研究发现,通过成骨细胞和骨髓细胞的共培养,AGN 显著抑制破骨细胞样细胞的形成^[11]。本研究证实 AGN 可减少去卵巢大鼠骨

量丢失可能是通过改善骨代谢,从而改善绝经后骨质疏松症。

众所周知,雌激素缺乏是原发性骨质疏松症(绝经后骨质疏松症)的主要危险。双侧去卵巢导致子宫湿重、股骨干重、BMD、骨生物力学强度和骨量显著降低,这些变化是由于雌激素缺乏引起的^[12]。在过去的几十年中,去卵巢大鼠被确认为雌激素缺乏诱导的绝经后骨质疏松症的有力动物模型^[13]。由于去卵巢大鼠骨骼发育与人类骨骼发育高度相似,因此被广泛使用^[14]。总之,使用去卵巢大鼠模型可评估 AGN 在治疗原发性骨质疏松症中的作用。更重要的是,本研究采用经典的去卵巢模型,可以更全面地验证分子 AGN 对绝经后骨质疏松症作用和机制。

根据 OVX 大鼠的骨吸收和骨形成指标改变,本研究表明 AGN 能显著降低血清 AKP 和 TRACP 的作用,表明成骨细胞和破骨细胞活性均被降低。但是,本研究更加关注药物在抑制骨吸收方面的功效。为了观察松质骨的骨表面重塑改变,本研究使用 Micro-CT 检测了骨组织形态学以解释 BMD 的变化。BV/TV 是评估重要的骨量和骨质疏松严重程度的指标。Tb.N、Tb.Sp 和 Tb.Th 是评估小梁骨和骨吸收的主要微观结构变化指标。用 AGN 治疗 12 周可降低因 BV/TV、Tb.Th 和 Tb.N 升高以及 Tb.Sp.降低引起的骨质流失。该结果表明 AGN 通过抑制骨吸收改善了小梁骨的微观结构。与假设一致的是,AGN 处理可以显著改善极限载荷和刚度。

OPG/RANKL/RANK 系统在调节骨重建中起关键作用^[15]。RANK 是一种位于破骨细胞表面的受体^[16]。RANK 的配体是 OPG 和 RANKL,它们主要由成骨细胞和骨髓基质细胞合成和分泌^[17]。RANKL 激活 RANK,促进破骨细胞分化和骨吸收。RANKL 的诱饵受体 OPG 阻断了这种相互作用。药物阻断 RANKL 是治疗骨质疏松症的有效方法,证实了 OPG/RANKL/RANK 系统的作用。如果配体与 OPG 结合,阻断了 OPG 与 RANK 的结合,从而减弱了配体对破骨细胞的抑制作用。另一方面,如果配体与 RANKL 联合抑制 RANKL 和 RANK 的结合,从而抑制破骨细胞的分化和增殖,则表现为抑制骨吸收。这项研究的结果表明,AGN 上调 OPG 表达同时下调 RANKL 表达,调控 OPG/RANKL 比率来改善骨形成和骨吸收失衡,最终达到防治绝经后骨质疏松症的疗效。

综上,牛蒡苷元治疗对去卵巢大鼠骨量流失起到保护作用,而这种效果可能通过调控 OPG/RANKL 信号通路来实现的。

【参 考 文 献】

- [1] Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2014,25(10): 2359-2381.
- [2] Zhou-Shan Tao, Xing-Jing Wu, Min Yang, et al. Local administration with silymarin could increase osseointegration of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats [J]. J Biomater Appl, 2019,34(5): 664-672.
- [3] Xin Huang, Shilong Huang, Fengjin Guo, et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro [J]. Mol Med Rep, 2016,13(1): 613-622.
- [4] Rietjens IMCM, Louisse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens [J]. Br J Pharmacol, 2017,174(11): 1263-1280.
- [5] Qiong Gao, Mengbi Yang, Zhong Zuo. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018,39(5): 787-801.
- [6] Ruo-ming Wu, Yan-yan Sun, Ting-ting Zhou, et al. Arctigenin enhances swimming endurance of sedentary rats partially by regulation of antioxidant pathways. [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014,35(10): 1274-1284.
- [7] Ching-Yeh Lin, Pei-Ling Hsieh, Yi-Wen Liao, et al. Arctigenin reduces myofibroblast activities in oral submucous fibrosis by LINC00974 inhibition [J]. Int J Mol Sci, 2019,20(6): 1328.
- [8] Thressi Maxwell, So-Young Chun, Kyu-Shik Lee, et al. The anti-metastatic effects of the phytoestrogen arctigenin on human breast cancer cell lines regardless of the status of ER expression [J]. Int J Oncol, 2017,50(2): 727-735.
- [9] 王晓燕,常时新,李冠武,等. 经方青娥丸对去势大鼠骨质疏松作用机制的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(2): 197-202.
- [10] A-Ram Kim, Hyuk Soon Kim, Jeong Min Lee, et al. Arctigenin suppresses receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)-mediated osteoclast differentiation in bone marrow-derived macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2012,682(1-3): 29-36.
- [11] Teruhito Yamashita, Shunsuke Uehara, Nobuyuki Udagawa, et al. Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85878.
- [12] Willard D, Chen WJ, Barrett G, et al. Expression, purification, and characterization of the human receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) extracellular domain [J]. Protein Expr Purif, 2000,20(1): 48-57.

- (2018)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567.
- [14] Hans D, Baim S. Quantitative ultrasound (QUS) in the management of osteoporosis and assessment of fracture risk[J]. J Clin Densitom, 2017, 20(3): 322-333.
- [15] Babatunde OO, Forsyth JJ. Quantitative ultrasound and bone's response to exercise: A meta analysis[J]. Bone, 2013, 53(1): 311-318.
- [16] McCloskey EV, Kanis JA, Odén A, et al. Predictive ability of heel quantitative ultrasound for incident fractures: an individual-level meta-analysis [J]. Osteoporos Int, 2015, 26(7): 1979-1987.
- [17] 张智海, 刘忠厚, 石少辉, 等. 中国大陆地区以 $-2.5SD$ 为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 1-7.
- [18] 张玲莉, 孙忠广, 邹军. 运动预防骨质疏松的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(3): 368-372.
- [19] Santos L, Elliott-Sale KJ, Sale C. Exercise and bone health across the lifespan[J]. Biogerontology, 2017, 18(6): 931-946.
- [20] 徐超. 运动锻炼对骨质疏松的预防作用[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(24): 6139-6141.
- [21] 聂明剑, 张智海, 冯强, 等. 12 周社区运动干预对绝经后骨质疏松症女性骨密度的影响研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(4): 446-451.
- [22] 陈敏敏, 杜艳萍, 洪维, 等. 上海社区老年人生活方式与跟骨定量超声骨密度的相关性[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2016, 9(2): 166-173.
- [23] Kemmler W, von Stengel S, Kohl M. Exercise frequency and bone mineral density development in exercising postmenopausal osteopenic women. Is there a critical dose of exercise for affecting bone? Results of the erlangen fitness and osteoporosis prevention study[J]. Bone, 2015, 89: 1-6.
- [24] Gonzalo Encabo P, Mcneil J, Boyne DJ, et al. Dose-response effects of exercise on bone mineral density and content in post-menopausal women[J]. Scand J Med Sci Sports. 2019, 29(8): 1121-1129.
- [25] Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, et al. Exercise and Physical Activity for Older Adults [J]. Med Sci Sport Exercise, 2009, 41(7): 1510-1530.
- [26] 赵静, 程亮. 不同方式长期运动对老年女性骨密度的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1): 50-53.
- [27] Kemmler W, Engelke K, von Stengel S. Long-term exercise and bone mineral density changes in postmenopausal women-are there periods of reduced effectiveness? [J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(1): 215-222.
- [28] 郭梁. 运动对绝经后妇女骨密度影响的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(03): 380-384.

(收稿日期: 2020-02-21; 修回日期: 2020-03-13)

(上接第 1455 页)

- [13] Lang I, Füllsack S, Wyzgol A, et al. Binding studies of TNF receptor superfamily (TNFRSF) receptors on intact cells [J]. J Biol Chem, 2016, 291(10): 5022-5037.
- [14] Tao ZS, Zhou WS, Wu XJ, et al. Prevention of ovariectomy-induced osteoporosis in rats: Comparative study of zoledronic acid, parathyroid hormone (1-34) and strontium ranelate [J]. Z Gerontol Geriatr, 2019, 52(2): 139-147.
- [15] Tyrovolas JB. The "mechanostat" principle and the osteoprotegerin-OPG/RANKL/RANK system PART II. the role of the hypothalamic-pituitary axis [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(5): 962.
- [16] Chamoux E, Bisson M, Payet MD, et al. TRPV-5 Mediates a receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand-induced increase in cytosolic Ca in human osteoclasts and down-regulates bone resorption [J]. J Biol Chem, 2010, 285(33): 25354-25362.
- [17] Kohli SS, Kohli V. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2011, 15(3): 175.

(收稿日期: 2020-02-14; 修回日期: 2020-03-24)