

· 论著 ·

熊果酸通过 BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路介导对去卵巢大鼠骨量流失的保护作用李洁¹ 孙雅楠² 解光越³ 李斯^{4*}

1.唐山市工人医院妇产科,河北 唐山 063000

2.唐山市工人医院内分泌科,河北 唐山 063000

3.唐山市工人医院骨科,河北 唐山 063000

4.唐山市工人医院心内科,河北 唐山 063000

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020)12-1810-05

摘要: **目的** 探讨熊果酸(XGS)对去卵巢大鼠骨量流失的影响,并探索可能的机制。**方法** 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)以及熊果酸组(XGS),每组 10 只;其中 XGS 组大鼠接受熊果酸(100 mg/kg)治疗 12 周;待治疗检测股骨骨量、骨密度(BMD)、骨矿物质含量(BMC)、骨代谢指标以及 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 表达。**结果** 治疗 12 周后,与 OVX 组相比,Micro-CT 和双能 X 线结果显示 XGS 组的大鼠骨小梁微观参数、骨密度和骨矿物质含量得到明显改善。XGS 组大鼠 BMD、BMC、TV/BV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 较 OVX 组明显改善($P<0.05$)。血清检测结果显示 XGS 组的最大载荷和弹性模量均高于 OVX 组($P<0.05$);XGS 组大鼠血清 ALP、OPD 和 OCN 水平较 OVX 组明显降低,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。WB 检测显示,和 OVX 组比较,XGS 组 BMP-2、Smad4、Wnt1 和 β -catenin 表达水平明显上调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 熊果酸可以通过 BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路介导对去卵巢大鼠骨量流失保护作用。

关键词: 熊果酸;绝经后骨质疏松症;骨代谢指标;骨密度;BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路

Ursolic acid mediates the protective effect of ursolic acid on bone mass loss in ovariectomized rats through BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin signal pathway

LI Jie¹, SUN Yanan², XIE Guangyue³, LI Si^{4*}

1.Department of Obstetrics and Gynecology, Worker's Hospital of Tangshan City, Tangshan 063000

2.Department of Endocrinology, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000

3.Department of Orthopedics, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000

4.Department of Cardiology, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, China

* Corresponding author: LI Si, Email: 2598151647@qq.com.

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ursolic acid (XGS) on bone mass loss in ovariectomized rats and to explore the possible mechanism. **Methods** The osteoporotic rat model was established by bilateral ovariectomy. Then the rats were randomly divided into sham operation group ($n=10$), ovariectomized group (OVX), and XGS group ($n=10$). The rats in XGS group received XGS (100 mg/kg) for 12 weeks. Bone mass, bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone metabolic index, and the expression of BMP-2, Smad4, Wnt-1, and β -catenin were measured. **Results** After 12 weeks of treatment, the result of micro-CT and dual energy X-ray showed that the trabecular microscopic parameters, BMD, and BMC in XGS group were significantly improved compared to those in OVX group. BMD, BMC, TV/BV, Tb.N, Tb.Th, and Tb.Sp in XGS group were significantly better than those in OVX group. The result of serum test and biomechanical test showed that the maximum load and elastic modulus in XGS group were higher than those in OVX group ($P<0.05$). The levels of serum ALP, OPD, and OCN in XGS group were significantly lower than those in OVX group. Western blotting detection showed that the expression levels of BMP-2, Smad4, Wnt-1, and β -catenin in XGS group were significantly higher than those in OVX group. **Conclusion** XGS mediates the protective effect on bone mass loss in ovariectomized rats through BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin

* 通信作者: 李斯, Email: 2598151647@qq.com

signal pathway.

Key words: ursolic acid; postmenopausal osteoporosis; bone metabolic index; bone mineral density; BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin signal pathway

绝经后骨质疏松症是由于雌激素缺乏导致破骨细胞吸收与成骨细胞形成之间的不平衡,已成为衰老发展过程中全球主要的健康问题之一^[1]。减少骨吸收或增加骨形成成为治疗骨质疏松症的合适策略,旨在恢复骨骼重塑的正常平衡。目前,临床上最常用的抗骨质疏松药物是抗重吸收药,如双膦酸盐、地诺单抗等^[2]。此外,仅抑制骨吸收显然是不够的,特别是对于那些已经出现严重骨量减少的人。因此,非常需要开发新的治疗药物来治疗绝经后骨质疏松症。大量的研究报道了许多来自植物的天然化合物可预防骨质疏松大鼠的骨质流失。熊果酸(XGS)是药材中普遍存在的三萜类化合物之一,是人类饮食中不可或缺的一部分。XGS的药理作用包括抗癌、抗肝损伤、促分化、抗病毒、抗白血病、抗菌和抗侵袭活性^[3]。富含XGS的中草药对啮齿动物的骨质流失具有保护作用^[4]。但是,XGS对去卵巢引起的骨质疏松症的药理作用仍然未知。这项研究旨在评估XGS对去卵巢引起的骨质疏松症影响及探索可能机制。

1 材料和方法

1.1 研究方案和药物治疗

30只3月龄雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重200~240 g,批准号:SCXK2007-007。购于北京实验动物中心。大鼠饲养在(21±2)℃,湿度为60%~70%,光照/黑暗周期为12 h,可自由接触食物和水。适应性喂养一周后,对大鼠进行双侧去卵巢以建立绝经后骨质疏松症模型。将动物分为3组($n=10$):假手术组(Sham),去卵巢组(OVX),去卵巢+熊果酸治疗组(XGS);其中XGS组接受100 mg/kg剂量XGS(分子式: $C_{30}H_{48}O_3$,批号201912,南京迪尔格医疗技术有限公司)治疗。其中XGS组从术后第3天开始每天通过管饲熊果酸治疗,为期12周。

禁食过夜后采集尿液样本并通过腹主动脉穿刺采集血液,离心(2 000 r/min,20 min)收集血清。收集的尿液和血清样本在-80℃冰箱保存直至使用。过量麻醉处死大鼠。解剖出双侧股骨在生理盐水中解剖固定,-20℃保存,采用双能X线骨密度仪(DEXA)测定骨密度,Micro-CT测定骨小梁微结构,三点弯曲试验检测骨强度变化以及蛋白印记检测目

标蛋白的表达。

1.2 骨代谢指标检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Quidel, San Diego, USA)测定血清碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)和尿脱氧吡啶啉(DPD)水平。

1.3 骨密度、骨矿物质含量和Micro-CT检测

采用美国GE Healthcare(GE Healthcare)公司的Lunar Prodigy Advance扫描右侧股骨并使用配备的小型实验动物软件分析和评估骨密度(BMD, g/cm²)和骨矿物质含量(BMC, g)。采用美国GE Healthcare公司的Explore Locus SP型号Micro-CT测量各组右侧股骨远端的形态计量学参数。使用15 μ m³的各向同性体素大小,70 kVp的X射线管峰值电势,114 mAs的管电流和200 ms的积分时间进行扫描,并进行高斯滤波和分段。该区域包括使用1024×1024矩阵从每个股骨获得的350个图像,导致各向同性体素分辨率为22 μ m³。将感兴趣体积(VOI)选为距股骨近端生长板25~125片的区域。采集股骨的三维(3D)图像数据,体素大小为12 μ m,所有特殊方向。根据二值化VOI直接测定骨体积/总体积(BV/TV)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁间距(Tb.Sp)和骨小梁厚度(Tb.Th)。

1.4 生物力学检测

采用858 Mini Bionix材料试验机(MTS, Eden Prairie, Minnesota, USA)对离体右股骨进行三点弯曲试验。股骨水平放置在机器两侧支架上面,两侧支架距离为23 mm,加载方向垂直于骨的中心轴上,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。

1.5 蛋白质印迹分析

使用RIPA缓冲液从股骨远端组织中分离出总蛋白。用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)测定蛋白质浓度,将20 μ g蛋白通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移至PVDF膜(Millipore Corporation, Billerica, MA)上。将膜在室温下用5%脱脂牛奶PBS-T缓冲液封闭1 h,然后与第一抗体以1:1 000的稀释度孵育2 h,但 β -肌动蛋白(1:5 000)除外。然后将膜与辣根

过氧化物酶连接的二抗孵育 1 h,并用 ChemiImager 5500 成像系统 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) 进行电化学发光。Image J 软件用于评估蛋白表达情况。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 17.0 进行所有统计分析。数据用均数 $\pm$ 标准差表示。组间差异分析采用单因素方差分析,然后进行最低显著性差异多因素检验。 $P<0.05$

表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMD 和 BMC 改变比较

各组大鼠股骨 BMD 和 BMC 检测结果如图 1 所示,OVX 组的 BMD 和 BMC 均低于 Sham 组,两组间差异有统计学意义($P<0.05$);XGS 组的 BMD 和 BMC 均高于 OVX 组($P<0.05$)。

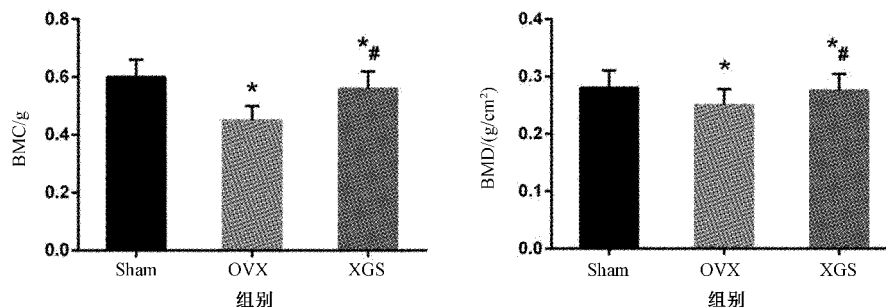


图 1 各组大鼠 BMD 和 BMC 改变

Fig.1 BMD and BMC changes in each group

注:与 Sham 组相比,* $P<0.05$;与 OVX 组相比,# $P<0.05$ 。

2.2 Micro-CT 结果分析

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 组左侧股骨 BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较 Sham 组明显

降低,而 Tb.Sp 则明显升高($P<0.05$)。XGS 组左侧股骨 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($P<0.05$)。

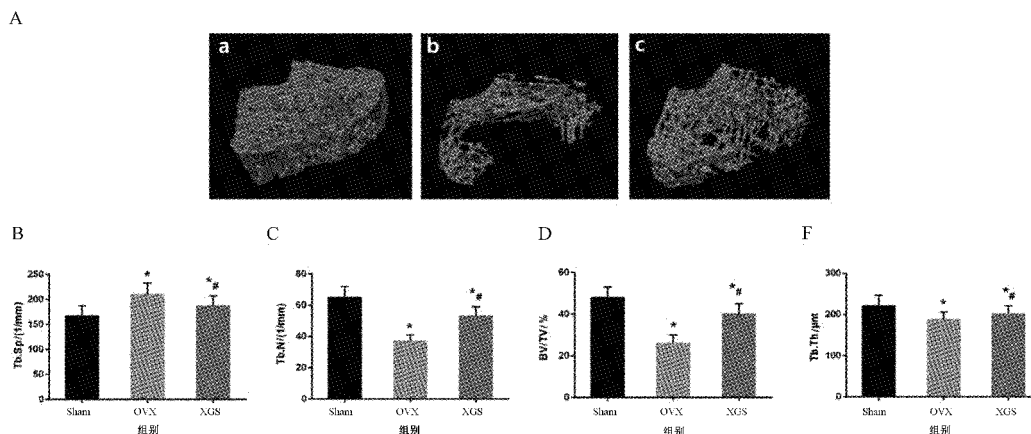


图 2 各组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

Fig.2 Micro-CT test results of the metaphysis of the femur in the three groups of rats

注:Sham 组(a)、OVX 组(b)和 XGS 组(c);与 Sham 组相比,* $P<0.05$;与 OVX 组相比,# $P<0.05$ 。

2.3 股骨的生物力学变化

股骨三点弯曲试验表明,OVX 组的最大载荷和弹性模量均低于 Sham 组,两组间差异有统计学意义($P<0.05$),XGS 治疗 12 周的大鼠股骨的最大载荷和弹性模量均高于 OVX 组($P<0.05$)。见图 3。

2.4 骨形成和吸收指标改变

治疗 12 周时,OVX 组 ALP、OPD 和 OCN 水平明显升高($P<0.05$);而 XGS 治疗后大鼠的 ALP、OPD 和 OCN 水平低于 OVX 组($P<0.05$)。见图 4。

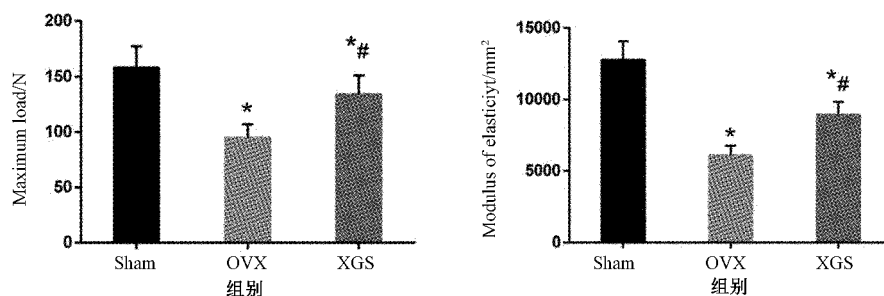


图3 各组大鼠股骨的三点弯曲试验结果

Fig.3 Results of the three-point bending test of the femur

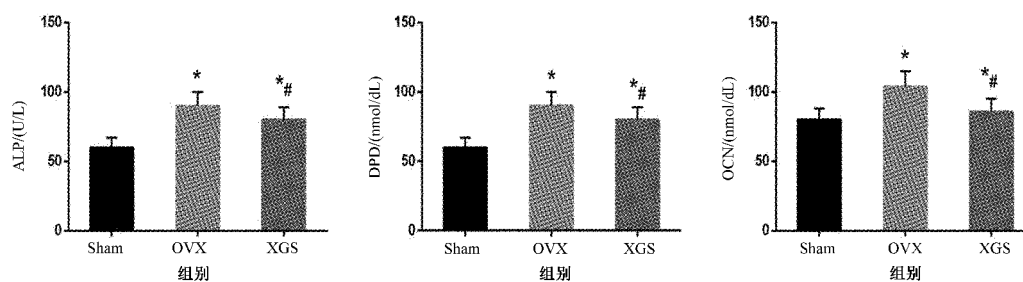
注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 OVX 组相比, # $P < 0.05$ 。

图4 XGS 治疗对骨代谢指标的影响

Fig.4 Effect of XGS treatment on bone metabolism indexes

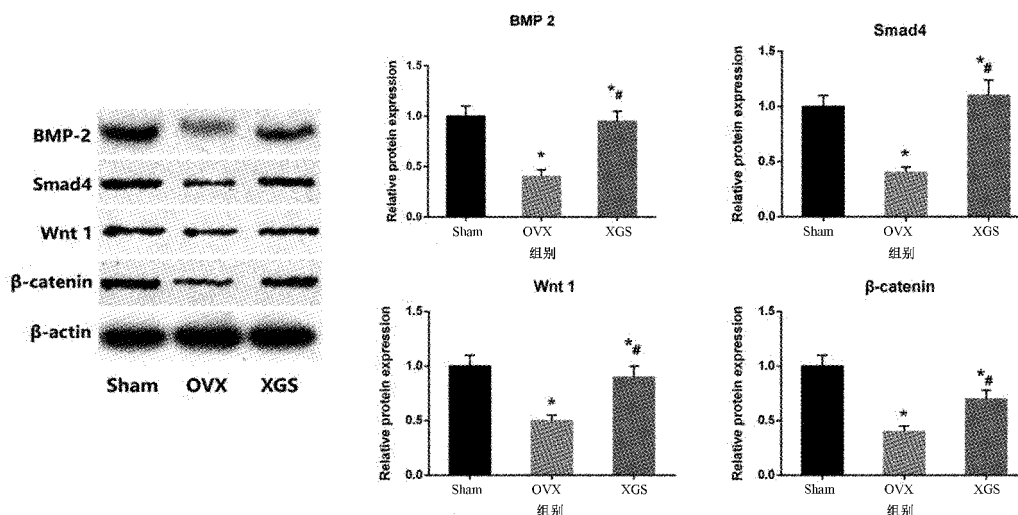
注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 OVX 组相比, # $P < 0.05$ 。

2.5 WB 检测结果

和 Sham 组比较, OVX 组 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 表达水平明显下调, 比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。和 OVX 组比较, XGS 组 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 表达水平明显上调, 比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

在本研究中, XGS 治疗可以显著改善由于去卵巢对大鼠骨密度、骨量、骨强度以及骨代谢指标影响。在这项研究中, 通过大鼠双侧卵巢切除术作为骨质疏松动物模型。该模型模仿人类绝经后的骨质疏松症, 可以诱导骨质疏松症的表现^[5]。植物化合物具有用

图5 使用 WB 检测 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 的相对表达Fig.5 Relative expressions of BMP-2, Smad4, Wnt 1, and β -catenin using Western blotting注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 OVX 组相比, # $P < 0.05$ 。

于治疗或预防以骨吸收过度为特征的几种骨疾病的药理学应用和治疗价值^[6]。有研究表明,XGS 通过促进骨骼形成,抑制骨骼吸收和调节骨骼代谢,对小鼠骨质疏松症具有一定的预防作用^[7]。本研究表明,基于 3D 骨组织形态分析,XGS 可以刺激骨形成,这表明 XGS 可能是骨质疏松症的潜在治疗剂。

有研究表明,XGS 能够预防去卵巢引起的钙和磷降低,并降低钙和磷排泄的增加速率,这可能是由于钙和磷的肠吸收和肾脏分泌增加所致^[8]。DPD 在监测骨吸收中起着重要作用。ALP 和 OCN 是骨形成的生物标志物,从成骨细胞释放到血清中并反映了成骨细胞的活性^[9]。这项研究表明,XGS 治疗 12 周可显著降低雌激素缺乏引起的骨质疏松大鼠骨转换标记 ALP、OCN 和 DPD 水平。如预期的那样,双侧去卵巢 12 周导致股骨的 BMD 明显降低。同时,去卵巢手术 12 周股骨干骺端骨小梁 Tb.N、Tb.Th 和 TV/BV 显著降低,而 Tb.Sp 明显升高,这是松质骨丢失的典型变化。尽管 XGS 治疗可以显著改善上述变化,但无法完全恢复骨小梁的结构和形态。

骨质流失伴随着骨骼重塑的显著增加,这由骨转换标记物 ALP、OCN 和 DPD 的水平升高所证明。XGS 的治疗可防止 BMD 的下降,这与血清 ALP、OCN 和尿 DPD 比例的下降有关。本研究进一步使用三点弯曲测试来观察各组大鼠的骨骼的生物力学性能变化。在测试各组大鼠股骨的生物力学性能指标,包括最大负荷和弹性模量。其中,弹性模量是骨骼的内在特性的指标,而最大载荷是骨骼的外在特性的指标^[10]。与 Sham 组相比,OVX 组大鼠导致骨骼生物力学性能下降。与 OVX 组相比,XGS 治疗可大大增强其生物力学性能,这可能是由于维持了小梁的骨骼结构所致。总之,这项研究清楚地证明,去卵巢引起的骨质疏松大鼠接受 XGS 治疗 12 周可以预防骨质流失和骨小梁微结构的恶化,从而维持骨骼的生物力学能力。

属于 TGF- β 超家族成员的 BMP 在成骨细胞分化中具有重要作用^[11]。在许多 BMPs 家族成员中,BMP-2 是关键信号,并且在激活后会募集磷酸化的 Smad1/5/8 与 Smad4 形成复合物,然后将其转入细胞核以激活 Runx2 的转录^[12]。此外,经典的 Wnt/ β -catenin 信号传导在动物模型中通过增加骨量在调节成骨中具有公认的作用。当被激活时,Wnts 引起一系列下游事件的级联反应,从而导致 β -catenin 易位进入细胞核,从而启动许多靶基因的转录^[13]。BMP 在成骨调节过程中以多种机制促进 Wnt/ β -

catenin 信号传导^[14]。本研究中 OVX 组的 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 表达显著降低,而 XGS 治疗后可以显著上调 BMP-2、Smad4、Wnt 1 和 β -catenin 表达,这表明 XGS 可以激活 BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路来保护去卵巢大鼠骨量。这些结果表明,XGS 可能是去卵巢诱发的骨质疏松症的潜在疗法。这种作用的分子机制可能与 BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。

【参 考 文 献】

- [1] 吴信举,陶周善,陆汉力,等. 维生素 K2 对去卵巢大鼠股骨干骨折愈合影响的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2): 186-190.
- [2] 姚洁,欧国峰,董博,等. 抗疏强骨合剂结合基础抗骨质疏松药物治疗原发性骨质疏松症的疗效分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1): 79-84.
- [3] Hj C, Mt P, Hy C, et al. Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells[J]. *Oncogene*, 1998, 16(6): 771-778.
- [4] Rh L, Xu K, Lp X, et al. Effects of the combined extracts of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on bone mineral content and bone turnover in osteoporotic rats[J]. *BMC Complementary and Alternative Med*, 2015, 15: 112.
- [5] 许闫严,张克良,魏忠民,等. 雌激素对去势骨质疏松症大鼠骨密度和骨代谢影响的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(6): 356-357.
- [6] Yj L, The K, Hb K, et al. Chloroform extract of deer antler inhibits osteoclast differentiation and bone resorption [J]. *J Ethnopharmacology*, 2007, 113(2): 191-198.
- [7] Su L, Sj P, Hb K, et al. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo[J]. *Pharmacological Res*, 2008, 58: 290-296.
- [8] Yu Z, Pce L, Cto C, et al. Improvement of bone properties and enhancement of mineralization by ethanol extract of Fructus Ligustri Lucidi [J]. *The British J Nutrition*, 2008, 99(3): 494-502.
- [9] Su B, Age N, Gva B, et al. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women [J]. *Osteoporosis Int*, 2009, 20(9): 1603-1611.
- [10] Ag E, Cpd S, Jh Q, et al. Effect of 16 months of treatment with tibolone on bone mass, turnover, and biomechanical quality in mature ovariectomized rats[J]. *J Bone Mineral Res*, 2001, 16(9): 1674-1681.
- [11] Vs S, Lw G, Vea R. BMP signalling in skeletal development, disease and repair [J]. *Nature reviews Endocrinology*, 2016, 12(4): 203-221.
- [12] Vergh R. BMP2 signaling in bone development and repair[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20: 475-480.
- [13] Sue A, Rta M. Proximal events in Wnt signal transduction[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(7): 468-477.
- [14] Mu W, Gu C, Ypo L. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease[J]. *Bone Res*, 2016, 4: 16009.

(收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-04-10)