

· 论 著 ·

阿司匹林联合雷奈酸锶治疗对成骨细胞以及去卵巢大鼠骨密度和骨量的影响

周皖舒¹ 陶周善² 顾长斌^{1*}

1.皖南医学院第二附属医院老年医学科,安徽 芜湖 241000

2.皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)创伤骨科,安徽 芜湖 241000

中图分类号: R965;R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 01-0044-06

摘要: 目的 探讨阿司匹林(aspirin, ASP)联合雷奈酸锶(strontium ranelate, SR)治疗对成骨细胞及去卵巢大鼠骨密度和骨量的影响,并探索可能的机制。方法 首先观察 ASP、SR 以及 SR+ASP 治疗对 MC3T3-E1 细胞 ALP 染色和茜素红染色的影响;然后通过双侧去卵巢建立绝经后骨质疏松症模型;随后去卵巢大鼠随机分为去卵巢组(OVX)、ASP 组、SR 组以及 SR+ASP 组;其中 ASP 组和 SR 组以及 SR+ASP 组大鼠分别接受阿司匹林、雷奈酸锶以及两者联合治疗 12 周;待治疗结束后使用 Micro-CT、HE 染色切片以及蛋白质印迹观察治疗效果以及可能的机制。结果 成骨细胞实验表明,ASP、SR 以及 SR+ASP 均能促进成骨细胞 ALP 生成以及矿化;而 SR+ASP 对成骨细胞 ALP 生成以及矿化最为显著($P<0.05$)。治疗 12 周后,与 ASP 组和 SR 组相比,SR+ASP 组的大鼠骨小梁数量和骨密度得到明显改善。SR+ASP 组大鼠 BMD、TV/BV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 较 SR 组及 ASP 组明显改善($P<0.05$)。和 ASP 组和 SR 组比较,SR+ASP 组的大鼠 Notch 信号通路被激活,Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 水平显著上调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 SR 联合 ASP 可以改善成骨细胞功能和对去卵巢大鼠骨量保护作用,且这种疗效可能通过 Notch 信号通路介导。

关键词: 阿司匹林;去卵巢;雷奈酸锶;骨密度;大鼠;成骨细胞

Effect of aspirin combined with strontium ranelate on osteoblasts and bone mineral density and bone mass in ovariectomized rats

ZHOU Wanshu¹, TAO Zhoushan², GU Changbin^{1*}

1.Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000

2.Department of Orthopaedic Trauma, Yijishan Hospital, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

* Corresponding author: GU Changbin, Email: tzs19900327@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of aspirin (ASP) combined with strontium ranelate (SR) on osteoblasts and bone mineral density and bone mass in ovariectomized rats, and to explore the possible mechanism. **Methods** Firstly, the effect of ASP, SR and SR + ASP on ALP staining and Alizarin red staining of MC3T3-E1 cells were observed. Then the model of postmenopausal osteoporosis was established using bilateral ovariectomy. The ovariectomized rats were randomly divided into OVX group, ASP group, SR group, and SR+ASP group. The rats in ASP group, SR group and SR+ASP group received aspirin, strontium ranelate, or the combination, respectively, for 12 weeks. After the treatment, micro-CT, HE staining, and Western blotting were used to observe the therapeutic effect and possible mechanism. **Results** Osteoblast experiment showed that ASP, SR, and SR+ASP promoted ALP production and mineralization of osteoblasts. SR+ASP had the most significant effect on ALP production and mineralization of osteoblasts. After 12 weeks of treatment, compared with those in ASP group and SR group, the number of bone trabeculae and bone mineral density in SR+ASP group significantly improved. The levels of BMD, TV/BV, Tb.N, Tb.Th, and Tb.Sp in SR+ASP group were significantly better than those in SR group and ASP group. Compared with that in ASP

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金(WK2018F39);弋矶山医院高峰基金项目及攀峰团队基金项目(GF2019G04, PF2019005);安徽省教育厅重点科研基金(KJ2017A266)

* 通信作者: 顾长斌, Email: tzs19900327@126.com

group and SR group, Notch signal pathway was activated and the levels of Notch-1, CBF-1, and Jagged-1 were significantly up-regulated in SR+ASP group. **Conclusion** ASP combined with SR can improve the function of osteoblasts and protect bone mass in ovariectomized rats. This effect may be mediated by Notch signal pathway.

Key words: aspirin; ovariectomized; strontium ranelate; bone mineral density; rat; osteoblasts

骨质疏松症是一种与年龄相关的全身性疾病,以进行性骨量丢失、骨强度降低和骨折风险增加为特征^[1]。绝经后的妇女特别容易受到这种骨代谢紊乱的影响。在育龄期间,雌激素通过刺激成骨细胞活动来帮助维持女性的骨量。绝经后妇女雌激素水平降低导致成骨细胞骨形成速率降低,导致骨吸收净增加^[2]。此外,绝经后妇女成骨细胞增殖减少,导致破骨细胞分化增强和过度活跃,进而骨质丢失。有学者报道阿司匹林(aspirin, ASP)^[3]可能具有抑制骨吸收作用,随后的流行病学报告还发现,经常使用小剂量的 ASP 或其他非甾体抗炎药经常与骨密度增加相关^[4]。已经有基础研究报道 ASP 具有保护去卵巢大鼠骨量和骨密度的作用^[5]。雷奈酸锶(strontium ranelate, SR)是雷尼酸的一种锶盐,目前正被用作治疗骨质疏松症的抗吸收药物。锶在骨重建中起着特殊的作用,锶通过抑制破骨细胞活性减少骨吸收,通过刺激成骨细胞活性促进骨形成^[6-7]。鉴于阿司匹林和雷奈酸锶均有抗骨质疏松症的效果,本研究观察阿司匹林联合雷奈酸锶使用对成骨细胞以及对去卵巢大鼠骨量和骨密度的影响,两者联合治疗骨质疏松症的可行性。

1 资料和方法

1.1 细胞培养和成骨细胞实验

来源于新生小鼠颅骨的 MC3T3-E1 细胞购自中国科学院(上海)典型培养委员会细胞库,α-MEM 培养基中含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 链霉素青霉素(100 U/mL)。将 MC3T3-E1 细胞接种于成骨分化培养基中,24 h 后不加入任何药物(Con 组),或者分别加入 5 mmol/L 的 SR(SR 组)、加入 2 mmol/L 的 ASP(ASP 组)及同时加入 5 mmol/L 的 SR 和 2 mmol/L 的 ASP(SR+ASP 组),共培养 14 d 后,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(Beyotime, 中国上海)进行碱性磷酸酶染色。碱性磷酸酶检测试剂盒(Beyotime, 中国,上海)根据制造商的说明测定 ALP 活性,并用微量分光光度计在 405 nm 处读出活性量。茜素红 S 染色 30 min,对矿化结节进行可视化。为了定量评价,本研究用 10% 的十六烷基氯化吡啶去细胞 15

min,上清液在 540 nm 处读数。

1.2 去卵巢模型建立和指标检测

3 个月大的雌性 SD 大鼠从弋矶山医院中心实验室获取,并在控制温度(22℃~24℃)和湿度(50%~60%)的条件下,保持 12 h 明暗周期。自由获取标准实验室啮齿动物饮食和水。实验前所有大鼠适应性饲养 7 d。根据 FDA 指南对动物进行背侧双侧切除卵巢手术 OVX 或假手术。12 周后,随机选择 20 只大鼠(每组 10 只)以通过测试骨密度(BMD)验证成功的建模。然后将大鼠分为 4 组,每组 10 只:OVX(OVX 大鼠+生理盐水),ASP[OVX+ASP, 9 mg/(kg·d)],SR[OVX+SR, 300 mg/(kg·d)],SR+ASP[OVX+ASP, 9 mg/(kg·d)+SR, 300 mg/(kg·d)]。大鼠的 ASP 或 SR 的剂量参考发表的文献[8-9]。治疗 12 周后,取出左股骨,在 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 24 h,随后进行 Micro-CT 检查和组织切片 HE 染色检测。将右股骨切片并在液氮中冷冻,用于蛋白质印迹(WB)分析。

Micro-CT 检查:左股骨通过锥形束台式 Micro-CT(μCT80, Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland)测量,并通过相关分析软件进行评估(μCT80 Evaluation Program v6.5.1, Scanco Medical, Switzerland)。扫描后,选择生长板上方 1 mm 处股骨远端的松质骨作为 VOI,将其限制在股骨内部区域,通过 CT 分析仪软件绘制自由形状的轮廓来提取骨小梁和皮质骨。使用标准化技术表征松质骨的微结构,以确定相对骨体积(BV/TV, %),骨小梁厚度(Tb.Th, mm),骨小梁数目(Tb.N, 1/mm),骨小梁分离度(Tb.Sp, mm)和骨密度(BMD, g/cm³);通过多平面重整获得三维(3D)图像。

随后左股骨进行病理学检测,用乙二胺四乙酸溶液(EDTA)(Servicebio, G1105)将固定的左股骨脱钙 4~6 周。样品用标准分级的酒精溶液脱水并包埋在石蜡中。将石蜡中的骨组织纵向切成 4 μm 的薄片。载玻片用于苏木精和曙红(HE)染色。

接下来对右侧股骨进行蛋白印迹(western blot, WB)检测,在液氮中粉碎后用 IP 裂解缓冲液从骨组织中提取总蛋白。通过 BCA 蛋白质试剂盒定量测量蛋白质的浓度。将蛋白质与上样缓冲液混合,并

在 100℃ 下煮沸 5 min 以使其变性。将 50 μg 总蛋白通过 10% 和 15% SDS-PAGE 分离,并转移到 0.45 m 的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜中。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,将膜分别与购于 Abcam 的 Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 一抗在 4 ℃ 下孵育过夜,然后在室温下与缀有辣根过氧化物的二抗一起孵育 1 h。印迹用 ECL 试剂(Thermo Scientific,美国)显影。 β -actin 蛋白用于标准化。通过 Image J 软件测量每个蛋白条带的总密度。

1.3 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差(SD)表示,使用 Leven 检验方差的同质性。通过单向方差分析(ANOVA)和最小显著差异(LSD)检验确定特定组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有数据均使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 ALP 染色和茜素红染色结果分析

如图 1 所示,ALP 阳性细胞染色后呈蓝紫色,其中以 SR+ASP 组 ALP 阳性细胞最多。茜素红阳性细胞染色后呈红色,其中以 SR+ASP 组茜素红阳性

细胞最多。根据 ALP 和茜素红染色的平均光密度的统计分析(图 1),SR+ASP 组的 ALP 阳性细胞和茜素红阳性细胞的平均光密度与 SR 组和 ASP 组相比明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);SR 组和 ASP 组之间,ALP 阳性细胞和茜素红阳性细胞的平均光密度也发现有显著差异($P < 0.05$)。结果表明 SR+ASP 组成骨细胞活性和矿化功能更强。

2.2 Micro-CT 分析

Micro-CT 更好地显示了股骨干骺端骨小梁的总体改变情况,骨小梁的微观参数如图 2 所示。ASP 组、SR 组、SR+ASP 组左侧股骨干骺端骨小梁 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 较 OVX 组明显升高,而 Tb.Sp 较 OVX 组明显降低($P < 0.05$);而 SR+ASP 组 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 较 ASP 组和 SR 组明显升高,而 Tb.Sp 较 ASP 组和 SR 组明显降低(P 均 < 0.05)。

2.3 大鼠组织学变化

HE 结果表明,SR 联合 ASP 治疗能更好地保护去卵巢大鼠骨量的流失。如图 3 所示,与 OVX 组相比,ASP、SR 及 SR+ASP 组的大鼠骨小梁数量和密度得到明显的改善,而在 SR+ASP 组表现的最为明显。

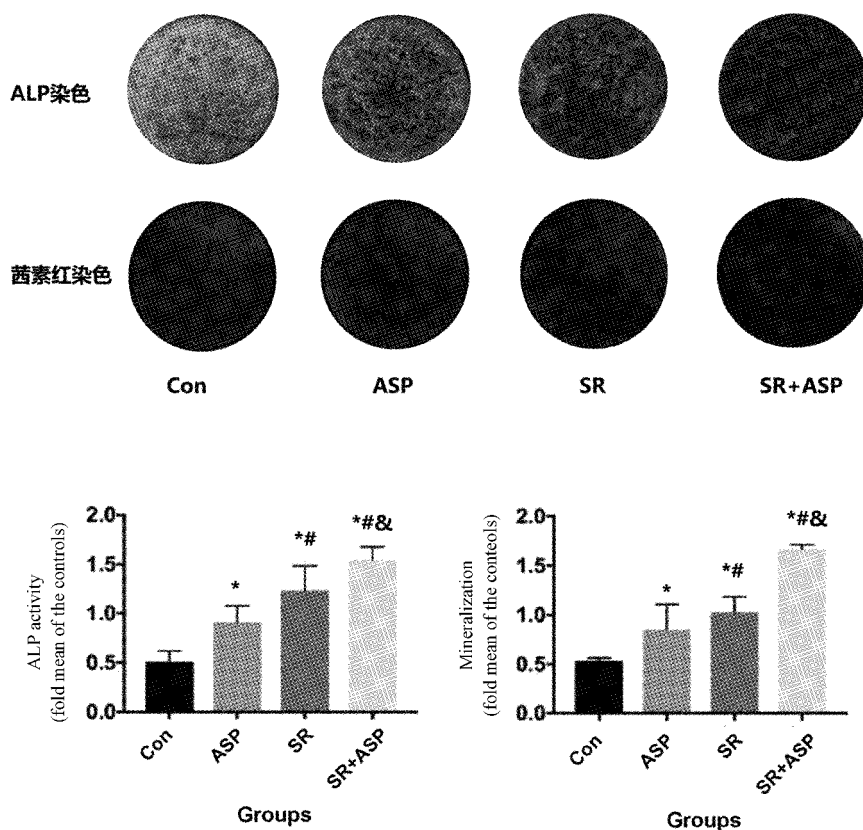


图 1 每组大鼠中 ALP 和茜素红染色以及平均光密度

Fig.1 Average optical density of ALP and Alizarin red staining in each group

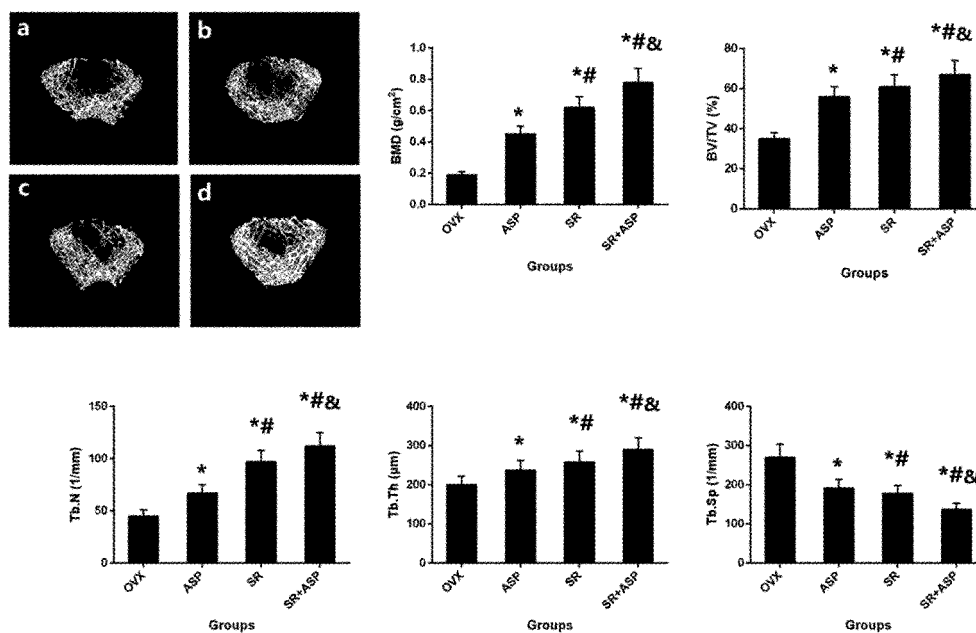


图 2 4 组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

Fig.2 Results of micro-CT in the femoral metaphysis of rats in the four groups

注: OVX 组(a)、ASP 组(b)、SR 组(c)及 SR+ASP 组(d);与 OVX 组相比, * $P < 0.05$;与 ASP 组相比, # $P < 0.05$;与 SR 组相比, & $P < 0.05$ 。

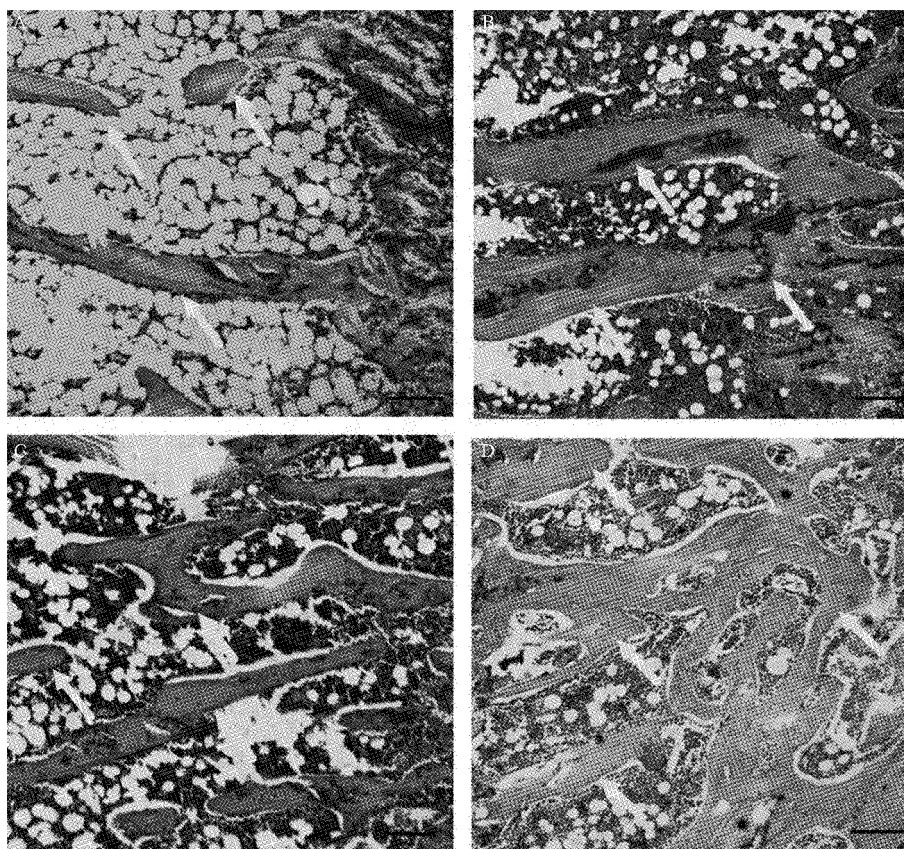


图 3 4 组大鼠股骨干骺端 HE 切片检测结果

Fig.3 Results of HE slices in the femoral metaphysis of rats in the four groups

注: OVX 组(A)、ASP 组(B)、SR 组(C)及 SR+ASP 组(D) (×20)。

2.4 Notch 信号通路改变

和 OVX 组比较,ASP 组、SR 组及 SR+ASP 组的大鼠 Notch 信号通路被激活;Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 表达上调,组间比较差异有统计学意义($P <$

0.05)。和 ASP 组和 SR 组比较,SR+ASP 组 Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 表达水平显著升高,差异比较有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

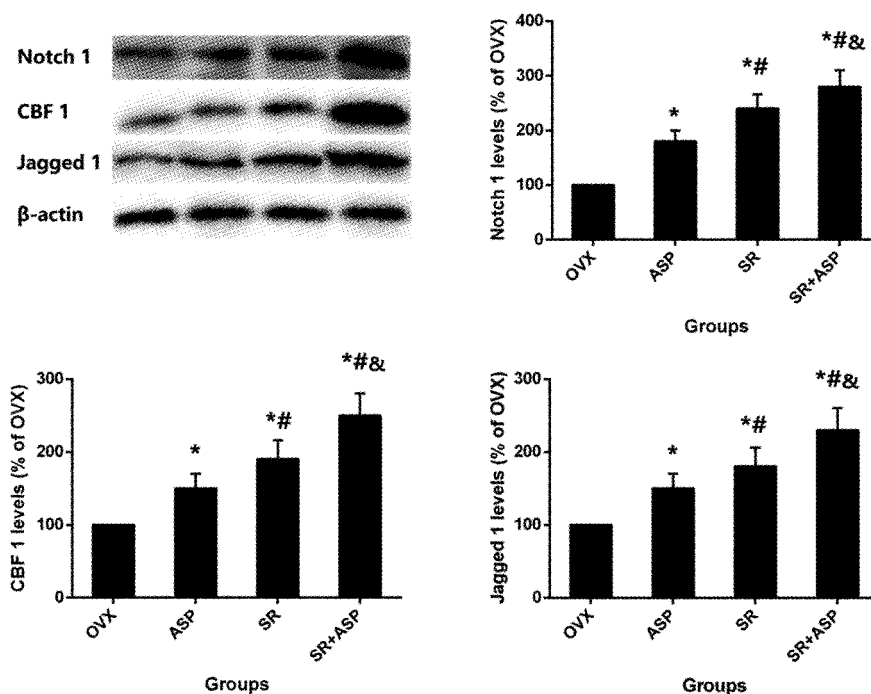


图 4 使用 WB 检测 Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 和 β-actin 的相对表达

Fig.4 Relative expression of Notch 1, CBF 1, and Jagged 1 to β-actin using Western blotting

注:与 OVX 组相比,* $P < 0.05$;与 ASP 组相比,# $P < 0.05$;与 SR 组相比,& $P < 0.05$ 。

3 讨论

以前有报道称,一旦雌性大鼠被切除卵巢,观察到的骨质疏松症的主要表现是破骨细胞数量增加,溶骨作用增强和高骨转换,骨吸收超过骨形成。在人类绝经后骨质疏松症中观察到的骨代谢变化与卵巢切除(OVX)大鼠的骨代谢变化之间有许多相似之处,因此,OVX 大鼠被认为是绝经后妇女骨质疏松症的有效动物模型^[10]。因此本研究选取去卵巢大鼠作为研究模型探讨使用 SR 和 ASP 联合疗法防治雌激素缺乏大鼠的骨质流失。OVX 大鼠用 SR 和 ASP 联合治疗 12 周。Micro-CT 和 HE 染色切片结果显示,SR 组和 ASP 组股骨骨密度较 OVX 组明显增加,骨小梁的结构得到了显著改善;而 SR+ASP 组骨密度以及骨小梁微观结构较 SR 组和 ASP 组均匀明显改善。

本研究发现 SR+ASP 组取得较好的疗效可能和每种药物单独作用机制有关。以前的研究表明 ASP 通过作用于 Fas/FasL 信号通路,抑制 T 淋巴细胞对

骨髓间充质细胞的凋亡作用,促进成骨分化,抑制破骨细胞分化,从而干预骨坏死的发生发展^[3,11]。另外,环氧合酶-2(COX-2)可能通过改变基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和白细胞介素(IL)-6(21)的表达来促进骨吸收。ASP 是 COX-2 的有效抑制剂,也可能降低 COX-2,从而抑制骨质疏松时骨吸收的发展^[12]。SR 是为数不多的针对骨质疏松的药物之一,它既能刺激成骨细胞,从而促进骨形成,又能抑制破骨细胞(减少骨吸收)^[6-7],从而减少脊椎和非脊椎骨折^[13]。由于 SR 和 ASP 均具有促进成骨和抑制破骨作用,SR+ASP 组取得较好的疗效可能和两者作用机制叠加有关。

在哺乳动物中,Notch 家族有 4 个受体 Notch1-4 和 5 个受体结合配体 Jagged1/2 和 8 样 1/3/4^[14]。当同源配体与 Notch 受体结合时,Notch 信号被激活,导致 γ 分泌酶的一系列蛋白水解和 Notch 胞内信号的释放^[15]。先前的研究表明,Notch 信号通路是骨形成的调节因子,Notch 信号激活可以促进成骨细胞的分化和矿化^[16]。由于 Notch 信号通路在

骨形成中的重要作用,本研究进一步探索了各组大鼠骨组织中 Notch 信号通路改变,结果发现,较 Con 组,ASP 组、SR 组以及 SR+ASP 组 Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 表达明显上调,而 SR+ASP 组 Notch 1、CBF 1 和 Jagged 1 表达上调最为显著,这表明 SR 联合 ASP 治疗可能通过激活 Notch 信号通路来实现;由于 Notch 信号通路对成骨细胞分化及增殖的重要作用,因此可以解释 SR+ASP 组更高的骨量和骨密度,说明两者联合使用对骨形成刺激作用更强。

总的来说,本研究初步使用雷奈酸锶联合阿司匹林干预去卵巢诱导骨质疏松症,结果表明联合使用较单独使用效果更佳,而这种疗效可能通过 Notch 信号通路介导。由于本研究使用的模型以及样本量有限,因此有必要进一步探索这种治疗方案的优势;而且本研究选取药物剂量也是参考文献,是否是最佳剂量还需要进一步研究。

【 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] Ja R, Su K, Jwe D, et al. Moderate intake of aspartame and sucralose with meals, but not fructose, does not exacerbate energy and glucose metabolism in estrogen-deficient rats[J]. J Clin Biochemistry and Nutrition, 2019,65(3):223-231.
- [3] Zer T, Wu Z, Xu W, et al. Local administration of aspirin improves osseointegration of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats through activation of the Notch signaling pathway[J]. J Biomaterials Applications, 2020,34(7):1009-1018.
- [4] Vestergaard P, Hermann P, Jensen JEB, et al. Effects of paracetamol, non-steroidal anti-inflammatory drugs, acetylsalicylic acid, and opioids on bone mineral density and risk of fracture: results of the danish osteoporosis prevention study (DOPS) [J]. Osteoporosis International, 2012, 23(4):1255-1265.
- [5] He L, Wu L, Yu L, et al. Co-administration of aspirin and allogeneic adipose-derived stromal cells attenuates bone loss in ovariectomized rats through the anti-inflammatory and chemotactic abilities of aspirin [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2015, 6:200.
- [6] 陶周善,周皖舒,江云云,等.骨形成蛋白联合雷奈酸锶对成骨细胞增殖和分化的影响[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(2):165-169.
- [7] 陶周善,周皖舒,江云云,等.负载 BMP-2 掺铈磷酸钙复合材料对成骨细胞增殖及功能的影响[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(7):888-892.
- [8] 王建超.阿司匹林预防去势大鼠骨质疏松的实验研究[D].西安:第四军医大学,2012.
- [9] Agh M, Jef C, Meda J, et al. Different doses of strontium ranelate and mechanical vibration modulate distinct responses in the articular cartilage of ovariectomized rats [J]. Osteoarthritis and cartilage, 2017,25(7):1179-1188.
- [10] De H, Ma MM, Mi C, et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer[J]. Nature Communications, 2010(1):3.
- [11] Tu Y, Yu M, Ye B, et al. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents[J]. PLoS One, 2008,3(7):e2615.
- [12] Ide C, Fa T, Jah C, et al. Association between bone mineral density and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin: impact of cyclooxygenase selectivity[J]. J Bone Mineral Research, 2003,18(10):1795-1802.
- [13] Pu M, Cu R, Edra S, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis[J]. The New England J Med, 2004, 350(5):459-468.
- [14] Ru K, Mxcl I. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism[J]. Cell, 2009,137(2):216-233.
- [15] Zu X, Jia Z, Xu P, et al. The notch γ -secretase inhibitor ameliorates kidney fibrosis via inhibition of TGF- β /Smad2/3 signaling pathway activation[J]. The International J Biochemistry & Cell Biology, 2014,55:65-71.
- [16] Ye J, Yu K, Su G. Intermittent activation of notch signaling promotes bone formation[J]. American J Translational Research, 2017,9(6):2933-2944.

(收稿日期:2020-02-07;修回日期:2020-05-03)