

· 论著 ·

牛磺酸治疗通过激活自噬介导对老年大鼠骨量和骨强度的保护作用

郑英慧^{1,2*} 卢启贵² 黄东红² 谢平金²

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

2. 深圳市罗湖医院集团罗湖区中医院, 广东 广州 518001

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021)01-0091-06

摘要: **目的** 探讨牛磺酸(NHS)对老年大鼠骨量流失的影响,并探讨可能的机制。**方法** 将 30 只大鼠随机分为对照组(CON)、模型组(MOD)以及牛磺酸组(NHS),每组 10 只;其中 NHS 组大鼠每天接受牛磺酸(2 g/kg)治疗 12 周;待治疗结束后通过 Micro-CT 检测、HE 染色切片、血清指标、蛋白质印迹观察治疗效果,探讨可能的机制。**结果** 治疗 12 周后,与 MOD 组相比,三点弯曲试验、Micro-CT 和 HE 染色切片结果显示 NHS 组大鼠的骨小梁数量、骨强度和骨密度(bone mineral density, BMD)得到明显改善。NHS 组大鼠最大载荷和弹性模量、BMD、TV/BV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 较 OVX 组明显改善($P<0.05$)。和 MOD 组比较,NHS 治疗后大鼠血清 BLAP、P1NP、TRACP-5b 和 β -CTX 水平明显降低,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。和 MOD 组比较,NHS 组 Runx2、BMP2、Beclin-1 和 LC3 II/LC3-I 表达水平明显上调,而 P62 表达水平显著下调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** NHS 可能通过激活自噬,从而对年龄引起的骨量丢失起到保护作用。

关键词: 牛磺酸;骨质疏松症;自噬;骨密度;骨代谢

Protective effects of taurine treatment on bone mass and bone strength in aged rats through activation of autophagy

ZHENG Yinghui^{1,2*}, LU Qigui², HUANG Donghong², XIE Pingjin²

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006

2. Luohu District Hospital of Shenzhen Luohu Hospital Group, Guangzhou 518001

* Corresponding author: ZHENG Yinghui, Email: 2794967513@qq.com

Abstract: Objective To explore the effect of taurine (NHS) on bone loss in aged rats and explore the possible mechanisms.

Methods Thirty rats were randomly divided into control group (CON), model group (MOD) and taurine group (NHS), 10 rats in each group. Of which, the rats in the NHS group received taurine (2 g/kg) daily 12 weeks. After treatment, observe the treatment effect and possible mechanism by Micro-CT detection, HE stained sections, serum indicators, and Western blot. **Results** After 12 weeks of treatment, compared with the MOD group, the result of the three-point bending test, Micro-CT and HE staining showed that the number of trabeculae, bone strength and bone density in the NHS group were significantly improved. The maximum load and elastic modulus, BMD, TV/BV, Tb.N, Tb.Th and Tb.Sp of the NHS group were significantly improved compared with the OVX group ($P<0.05$). Compared with the MOD group, the serum levels of BLAP, P1NP, TRACP-5b, and β -CTX in rats after NHS treatment were significantly reduced, and the differences between the groups were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the MOD group, the expression levels of Runx2, BMP2, Beclin-1, and LC3 II/C3-I in the NHS group were significantly increased, while the expression levels of P62 were significantly decreased, and there was a statistical difference ($P<0.05$). **Conclusion** NHS may protect age-affected bone destruction by activating autophagy.

Key words: taurine; osteoporosis; autophagy; BMD; bone metabolism

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种代谢性疾

病,其特征在于成骨细胞形成与破骨细胞吸收之间的不平衡。它是一种隐秘且不可预测的疾病,直到晚期才出现症状,因此被称为沉默杀手^[1-2]。据估计,全球骨质疏松症的患病人数超过 2 亿,每年的医

* 通信作者: 郑英慧, Email: 2794967513@qq.com

疗费用超过 100 亿美元^[3],骨质疏松症已经成为严重影响人们健康的疾病。日前,治疗骨质疏松症最常用的药物为双膦酸盐、甲状旁腺素片段、RANK 配体抑制剂以及中成药等。在这些治疗方法中,具有抗骨质疏松活性但几乎没有副作用的天然化合物值得探讨^[1]。牛磺酸存在于骨骼中,但其功能尚不完全清楚。早期有研究^[4]表明牛磺酸通过 ERK1/2 激活信号途径刺激成骨细胞的增殖和分化。同时牛磺酸抑制 IL-1 α 、PGE2 和脂多糖诱导的破骨细胞形成^[5]。最新一项研究^[6]表明补充牛磺酸可以预防酒精对去卵巢(OVX)大鼠骨代谢的影响。这些研究表明牛磺酸可能对维持老年大鼠骨量有积极的作用。然而,牛磺酸对老年大鼠骨量丢失的影响尚未见报道,因此本研究将观察牛磺酸对老年大鼠骨量的影响并初步探讨其相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

将 10 只 3 月龄体重(290 ± 10) g 的雌性 Sprague-Dawley (SD)、20 只 24 月龄体重(510 ± 30) g 的雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司)饲养在温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、恒定湿度(45%~50%)、12 h/12 h 暗光照循环的空调房间中,大鼠可以自由接触实验室提供的标准颗粒饮食和水。适应性饲养 1 周后随机分为三组:对照组:3 月龄雌性大鼠(CON 组,10 只);模型组:24 月龄雌性大鼠(MOD,10 只);牛磺酸组:24 月龄雌性大鼠(NHS,10 只),接受 2 g/kg 牛磺酸(购于南京化学试剂股份有限公司,纯度>98%)灌胃治疗;对照组和模型组给予同样剂量的生理盐水治疗,连续干预 12 周后,在最后给药治疗的第二天清晨处死大鼠并收集血液样品,同时解剖其双侧股骨进行进一步检测。

1.2 方法

1.2.1 血清指标测定:收集大鼠动脉血并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 1 200 r/min 离心 10 min。血清骨碱性磷酸酶(BALP, U/L)、1 型前胶原氨基端肽(P1NP, ng/L)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP-5b, U/L)和 β -胶原降解产物(β -CTX, ng/mL)检测采用南京建成市售试剂盒,按生产厂家说明书进行检测血清水平。

1.2.2 组织学分析:大鼠右侧股骨在切片之前使用 10% 的 EDTA 脱钙 4 周。待脱水和石蜡包埋后,右股骨组织切成 4 μm 厚度进行苏木精-伊红(H&E)染色。使用医学影像分析系统(BI-2000)获取股骨

干骺端骨小梁结构图像特征。

1.2.3 Micro-CT 分析:将左侧股骨标本通过 Micro-CT 测量(μCT80 , Sanco Medical, Brüttisellen, Switzerland),并通过相关分析软件(μCT80 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骨小梁。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, μm)、骨小梁数目(Tb.N, mm^{-1})、骨小梁间隙(Tb.Sp, μm)和骨密度(BMD, mg/cm^3)。

1.2.4 生物力学检测:Micro-CT 检测过后,使用 Instron 4302 系统进行三点弯曲实验评估。将左侧股骨放在材料检测机支架上,两个支架之间的距离为 1.5 mm,测试区域定义为股骨的最中央部分。以 2 mm/min 的速度施加压缩载荷直至骨折。通过连接的计算机监控骨折时的最大载荷(N)和弹性模量(mm^2)的数据。

1.2.5 蛋白印记检测:生物力学检测之后将左侧股骨远端骨组织匀浆于 RIPA 缓冲液中(Beyotime, 中国,上海)。采用 BCA 蛋白分析试剂盒(Beyotime)测定蛋白浓度。蛋白质样品用 12 % SDS-PAGE 凝胶分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)上。用 5 % 脱脂牛奶封闭膜,用特异性抗体:抗 P62(1:500, Abcam)、Beclin-1(1:1 000, Cst)、抗 LC3(1:1 000, Cst)、抗 Runx2(1:1 000, Abcam)和抗 BMP2(1:1 000, Abcam)孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。以 GAPDH 作为内对照。用增强化学发光(ECL)试剂(Beyotime)显示蛋白质条带,并用 Image J 软件进行分析。

1.3 统计学分析

数据使用均数 $\pm$ 标准差表示。使用 SPSS 19.0 进行分析,组间比较使用 Tukey 检验,然后用单因素方差分析(ANOVA)分析各组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 结果分析

股骨干骺端骨小梁二维图像如图 1 A 所示。股骨干骺端的微观参数如图 1B~1F 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($P < 0.05$)。NHS 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 ($P<0.05$)。

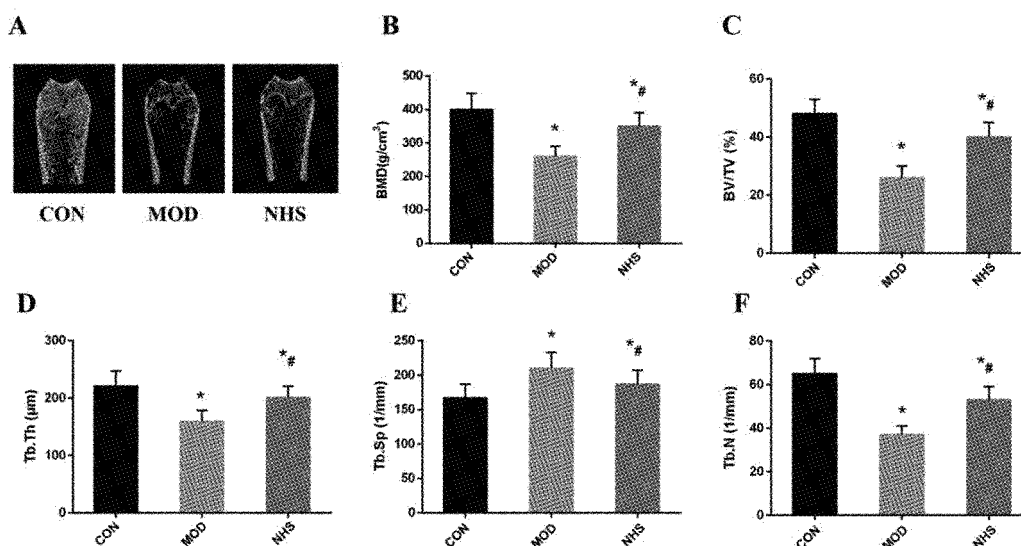


图 1 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

Fig.1 Micro-CT detection results of femoral metaphysis of three groups of rats

注: A: Micro-三维重建结果; B: BMD; C: BV/TV; D: Tb.Th; E: Tb.Sp; F: Tb.N; 与 CON 组相比, * $P<0.05$; 与 MOD 组相比, # $P<0.05$ 。

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。NHS 组骨小梁数量和连接增加明显, 表现出明显的结构恢复。

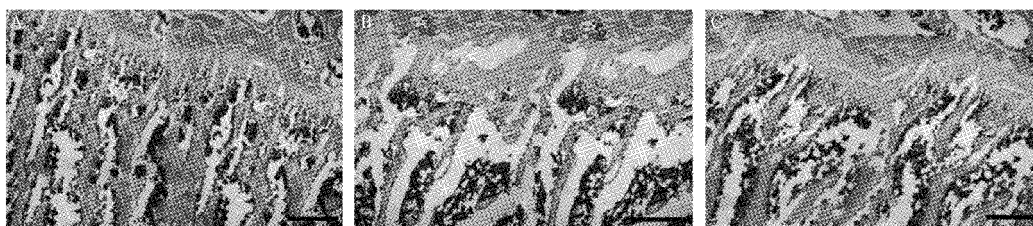


图 2 三组股骨的组织病理学

Fig.2 Histopathology of femurs of the three groups

注: A: CON 组; B: MOD 组; C: NHS 组; 苏木精-伊红染色 (放大倍数, $\times 10$)。

2.3 股骨的生物力学变化

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, 两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), NHS 组的最大载荷和弹性模量均高于 MOD 组 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 血清指标比较

各组大鼠血清骨代谢指标 BALP、TRACP-5b、P1NP 和 β -CTX 水平如图 4 所示。和 CON 组比较, MOD 大鼠血清 BALP、P1NP、TRACP-5b 和 β -CTX 水平明显升高; NHS 治疗后能显著降低 BALP、P1NP、TRACP-5b 和 β -CTX 的水平, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.5 WB 检测结果

和 CON 组比较, MOD 组 Runx2、BMP2、Beclin-1 和 LC3II/LC3-I 表达水平明显下调, 而 P62 表达水平明显上调, 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。和 MOD 组比较, NHS 组 Runx2、BMP2、Beclin-1 和 LC3II/LC3-I 表达水平明显上调, 而 P62 表达水平显著下调, 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

随着人类寿命的延长, 骨质疏松症已成为一个主要的临床问题, 其特征是骨量和强度的丧失, 从而导致脆性骨折^[2]。OP 治疗分为两类, 一类是抑制

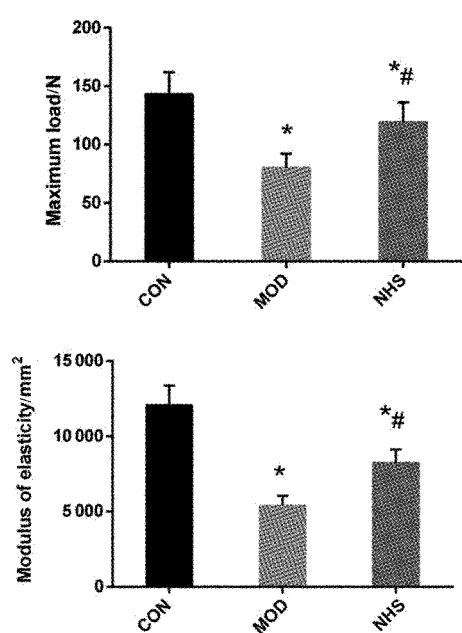


图 3 右股骨的三点弯曲试验结果

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

注: 与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

过度骨吸收的抗吸收药物,另一类是促进骨形成的合成代谢药物^[1]。目前 OP 的治疗药物包括双膦酸盐类化合物、地诺单抗和甲状旁腺素片段(PTH)。然而,触发破骨细胞凋亡的双膦酸盐的作用在大约 3~5 年后达到了瓶颈。此外,据报道^[7]长期使用双膦酸盐与非典型股骨骨折相关。此外,停止使用会导致骨周转迅速增加,导致骨迅速丢失,并可能增加骨折的发生^[8]。PTH 通过激活成骨细胞促进骨形成,通过与 PTH/PTHrP1 型受体结合和刺激 Wnt 信号通路发挥作用;然而,甲状旁腺素的治疗被限制在 2 年内^[9];此外,甲状旁腺素的常见不良反应包括头晕、头痛、恶心和腿部抽筋^[9]。因此需要开发新的具有抗骨质疏松症作用且无副作用的药物用于防治老年骨质疏松症。

本研究表明 12 周牛磺酸治疗能显著提高老年大鼠的 BMD。与本研究相似,有研究^[10]表明在成长中的雄性大鼠中补充牛磺酸具有显著的作用,即在生长早期增加股骨的 BMC 重量。此外,Choi 等^[11]一项研究报告指出,在生长期雌性大鼠中补充牛磺酸后第 9 周,牛磺酸饮食显著增加了股骨 BMD。此外,与对照组相比,在补充精氨酸和牛磺酸的组中,每单位体重的股骨骨矿物含量显著增加^[11]。本研究中三点弯曲试验表明年龄导致大鼠股骨最大载荷和弹性模量显著降低,而牛磺酸治疗

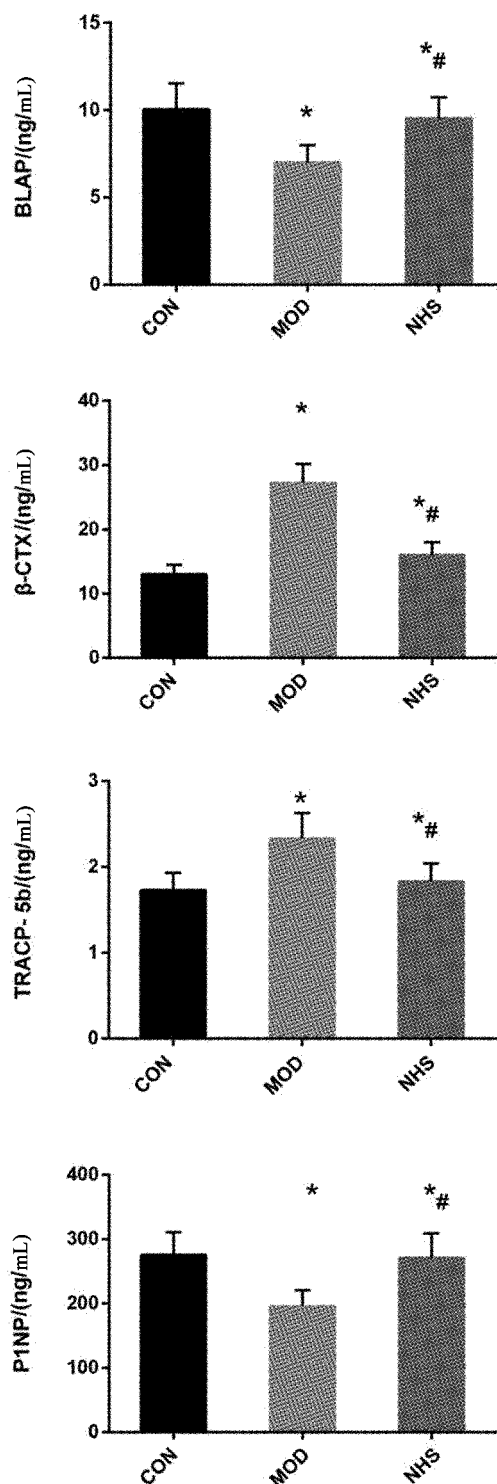


图 4 各组大鼠血清骨代谢指标水平

Fig.4 The bone metabolism index levels in serum of rats in each group

注: 与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

能显著改善股骨的最大载荷和弹性模量。

Micro-CT 和组织切片分析进一步表明,年龄会导致股骨微结构出现严重的破坏,牛磺酸治疗后能

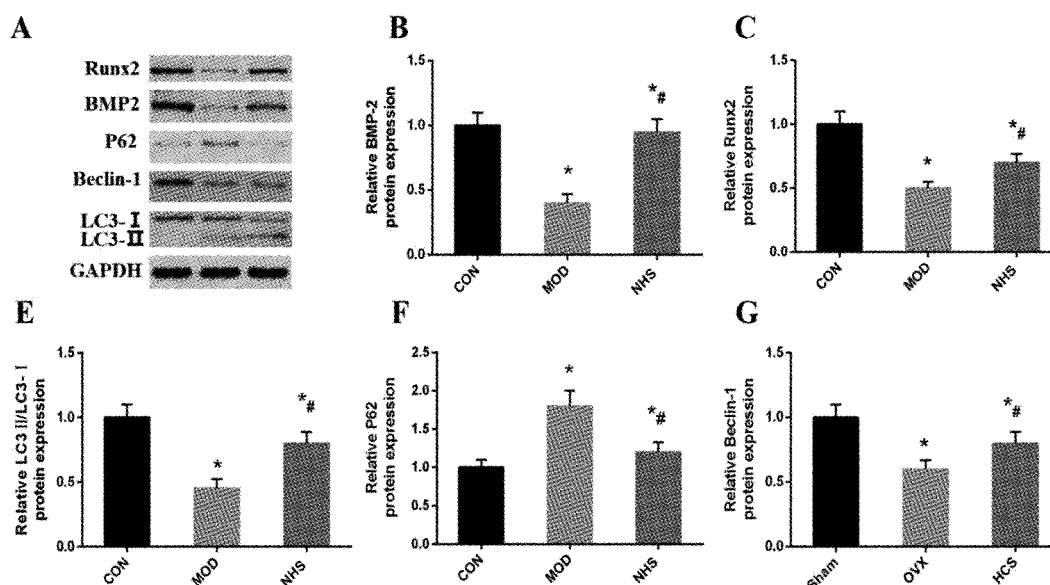


图 5 使用 WB 检测 Runx2、BMP2、P62、Beclin-1 和 LC3 II/LC3-I 的相对表达

Fig.5 Relative expression of Runx2、BMP2、P62、Beclin-1 and LC3 II/LC3-I using Western blotting

注：与 CON 组相比，* $P < 0.05$ ；与 MOD 组相比，# $P < 0.05$ 。

显著改善年龄导致骨量丢失，提示牛磺酸可提高老年大鼠的骨量和强度。本研究同时检测血清指标 BALP、P1NP、TRACP-5b 和 β -CTX 水平改变。P1NP 是一种成骨细胞分化标志物， β -CTX 是胶原的产物^[12]，BALP 是成骨分化早期的重要标志物^[13]，TRACP-5b 是破骨细胞分化过程中过度表达^[14]。本研究结果显示老年大鼠血清 P1NP、BALP、TRACP-5b 和 β -CTX 水平升高；而牛磺酸能降低年龄对骨代谢的影响，显著降低 P1NP、BALP、TRACP-5b 和 β -CTX 水平。本研究结果与先前的结果一致，牛磺酸能改善骨量流失大鼠模型中骨代谢指标^[15]。

在最近的几十年中，人们逐渐意识到自噬在干细胞的自我更新、多能性、发育、分化和静止中起着重要作用^[16]。近年来的研究注意到自噬过程与细胞分化有关。例如，在胚胎干细胞中观察到自噬蛋白的存在，并且自噬蛋白在分化过程中表达增加；原代人骨髓间充质干细胞表现出高水平的自噬蛋白，在这些细胞分化为成骨细胞后，其水平降低^[17]。在本研究中，使用牛磺酸治疗可上调成骨分化、矿化和成骨相关蛋白 RUNX2 和 BMP2 的表达。除此之外，蛋白质印迹分析的结果证实了牛磺酸增加了骨组织的自噬相关蛋白表达。据报道^[18]，自噬缺陷与年龄导致的骨髓间充质干细胞成骨分化受损有关。此外，自噬的激活可以部分逆转骨髓间充质干细胞的老化^[19]。本研究表明自噬可能参与牛磺酸对老年

大鼠介导的保护作用。

总的来说，牛磺酸可以通过自噬的激活保护年龄引起的骨代谢加速，从而改善了老年大鼠的骨量丢失。但是本研究有其不足之处，首先未进一步研究牛磺酸对破骨细胞、成骨细胞的影响，接下来会研究牛磺酸体外表现；其次，本研究仅仅选取一种剂量的牛磺酸来研究药物作用，是否是最合适的剂量却不得而知。接下来会进一步研究牛磺酸对不同原因诱导的骨质疏松的影响。

【参考文献】

- [1] 李晓曦, 陈宇恒, 唐秀凤, 等. 淫羊藿和女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1685-1690.
- [2] 汤贤春, 涂雪芹, 张天霞, 等. 骨质疏松小鼠模型骨髓间充质干细胞特性的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1669-1675.
- [3] Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence [J]. Bone, 2006, 38(2-suppl-S1): 1-9.
- [4] Park S, Kim H, Kim SJ. Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells [J]. Biochemical Pharmacology, 2001, 62(8): 1107-1111.
- [5] Koide M, Okahashi N, Tanaka R, et al. Inhibition of experimental bone resorption and osteoclast formation and survival by 2-aminoethanesulphonic acid [J]. Archives of Oral Biology, 1999, 44(9): 711-719.

(下转第 109 页)

- multiple signaling pathways in osteoblast-like cells [J]. *Endocrine*, 2009, 35(1): 47-56.
- [9] Venkataraman PS, Blick KE, Rao R, et al. Decline in serum calcium, magnesium, and phosphorus values with oral glucose in normal neonates: studies of serum parathyroid hormone and calcitonin[J]. *J Pediatr*, 1986, 108(4): 607-610.
- [10] Al-Jebawi AF, Youssef Agha AH, Al Suwaidi HS, et al. Attenuated PTH responsiveness to vitamin D deficiency among patients with type 2 diabetes and chronic hyperglycemia[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128: 119-126.
- (收稿日期: 2019-12-06; 修回日期: 2020-06-28)
-
- (上接第 95 页)
- [6] Choi MJ, Chang KJ, Lee JW, et al. Beneficial function of taurine on bone metabolism in alcohol-fed OVX rat model [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2017: 1059-1069.
- [7] Sabioni P, Le Foll B. Psychosocial and pharmacological interventions for the treatment of cannabis use disorder [J]. *Focus (American Psychiatric Publishing)*, 2019, 17(2): 163-168.
- [8] Popp AW, Zysset PK, Lippuner K. Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab from clinic and biomechanics [J]. *Osteoporosis International*, 2016, 27(5): 1917-1921.
- [9] 徐伟军, 王明新, 夏文强. 甲状旁腺素联合雌二醇对大鼠骨质疏松的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(2): 260-263, 272.
- [10] Choi MJ, Seo JN. Effect of taurine feeding on bone mineral density and bone markers in rats [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2013, 776: 51-58.
- [11] Choi MJ, Chang KJ. Effect of dietary taurine and arginine supplementation on bone mineral density in growing female rats [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 776: 335-345.
- [12] Liu TT, Liu DM, Xuan Y et al. The association between the baseline bone resorption marker CTX and incident dysglycemia after 4 years [J]. *Bone research*, 2017, 5: 17020.
- [13] Saha MK, Agrawal P, Saha SG, et al. Evaluation of correlation between salivary calcium, alkaline phosphatase and osteoporosis- A prospective, comparative and observational study [J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2017, 11(3): ZC63-ZC66.
- [14] Han Y, Gyung-Ji K, Da S, et al. Calcium supplement derived from gallus gallus domesticus promotes BMP-2/RUNX2/SMAD5 and suppresses TRAP/RANK expression through MAPK signaling activation[J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): 504-512.
- [15] Choi MJ, DiMarco NM. The effects of dietary taurine supplementation on bone mineral density in ovariectomized rats [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2009, 643: 341-349.
- [16] Rodolfo C, Di Bartolomeo S, Cecconi F. Autophagy in stem and progenitor cells [J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2016, 73(3): 475-496.
- [17] Oliver L, Hue E, Priault M, et al. Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(15): 2779-2788.
- [18] Wan Y, Zhuo N, Li Y, et al. Autophagy promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cell derived from osteoporotic vertebrae [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017, 488(1): 46-52.
- [19] Ma Y, Qi M, An Y, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(1): 127-138.
- (收稿日期: 2020-03-20; 修回日期: 2020-04-10)