

· 论 著 ·

芦荟素通过激活 ERK1/2-Runx 2 信号通路介导对去卵巢大鼠骨量流失的保护作用

沙仁高娃¹ 陈华^{2*}

1. 青海大学附属医院妇科, 青海 西宁 810000

2. 青海大学附属医院肿瘤妇科, 青海 西宁 810000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 02-0203-05

摘要: 目的 观察芦荟素对去卵巢大鼠骨量的影响,并探讨可能的机制。方法 将 30 只雌性 Sprague Dawley 大鼠随机分为 3 组:假手术组(Sham)、去卵巢组(OVX)及去卵巢大鼠+芦荟素治疗组(LHS,去卵巢大鼠每天接受 50 mg/kg 芦荟素治疗,持续 12 周)。12 周后取双侧股骨进行微型计算机断层扫描(Micro-CT)检测股骨干骺端微观结果,通过组织病理切片观察骨小梁结果变化,通过骨生物力学检测骨强度改变以及运用蛋白质印迹(WB)检测可能的机制。结果 OVX 组大鼠的骨密度(bone mineral density, BMD)、骨显微结构、最大载荷和弹性模量等指标均明显低于 Sham 组($P<0.05$)。芦荟素治疗后大鼠的骨密度、骨显微结构、最大载荷和弹性模量等指标均有明显改善,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。WB 检测显示 OVX 组 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN 表达水平较 Sham 组明显下调($P<0.05$)。LHS 组 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN 表达水平较 OVX 组明显上调。结论 芦荟素可以显著改善去卵巢大鼠股骨骨强度和骨量,这种疗效可能通过激活 ERK1/2-Runx 2 信号通路促进成骨来实现的。

关键词: 骨生物力学;去卵巢大鼠;芦荟素;微型计算机断层扫描;骨量

Aloin protects bone loss in ovariectomized rats by activating ERK1/2-Runx2 signaling pathway

SHAREN Gaowa¹, CHEN Hua^{2*}

1. Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000

2. Department of Oncology and Gynecology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000

* Corresponding author; CHEN Hua, Email: 204578648@qq.com

Abstract: Objective To observe the effect of aloin on the bone mass in ovariectomized rats and explore the possible mechanisms. **Methods** Thirty female Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (Sham); ovariectomized group (OVX) and ovariectomized rats + aloesin treatment group (LHS, ovariectomized rats received 50 mg / kg aloin for 12 weeks). After 12 weeks, the bilateral femurs were taken for micro-CT (Micro-CT), to detect the microscopic result of the femoral metaphysis, the changes in the result of trabecular bone were observed through histopathological sections, the changes in bone strength were detected through bone biomechanics, and the Western blot (WB) was used to detect the possible mechanisms. **Results** The bone mineral density (BMD), bone microstructure, maximum load, and elastic modulus of the OVX group were significantly lower than those of the Sham group ($P<0.05$). After treatment with aloin, the bone 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 p-Erk1 / 2, Erk1 / 2, ALP, RUNX2, OCN and OPN in the OVX group were significantly lower than those in the Sham group ($P<0.05$). The expression levels of p-Erk1 / 2, Erk1 / 2, ALP, RUNX2, OCN and OPN in the LHS group were significantly higher than those in the OVX group. **Conclusion** Aloin can significantly improve the strength and bone mass of femurs in ovariectomized rats, and this effect may be achieved by activating the ERK1/2-Runx2 signaling pathway to promote osteogenesis.

Key words: bone biomechanics; ovariectomized rats; aloin; Micro-CT; bone mass

* 通信作者: 陈华, Email: 204578648@qq.com

骨质疏松症是一种系统性骨骼疾病,其特征是骨量低和骨组织的微结构退化,导致骨骼脆弱和骨

折风险增加^[1]。骨质疏松症的主要原因是骨形成和骨吸收之间的不平衡,这是由成骨细胞的失活和破骨细胞活性的增加所致。目前主要预防和治疗骨质疏松的药物有两种:抗吸收药和促合成代谢药。由于双膦酸盐类药物具有减慢骨吸收的功效,因此它们被广泛用于治疗骨质疏松症,而包括人甲状旁腺素在内的合成代谢药物则可刺激骨形成。然而,长期使用这些药物会具有某些局限性和副作用^[2-3]。芦荟素(LHS)是从常绿多年生植物芦荟中提取的蒽醌糖基化合物^[4],已被证明具有有效的抗肿瘤、抗炎、抗结肠炎和抗氧化活性^[5-6]作用。最近的一项研究^[6]发现,LHS 可以在 MC3T3-E1 细胞中促进成骨分化调节因子的表达,例如 BMP-2(骨形态发生蛋白 2)和 Runx 2(Runt 相关转录因子 2)。然而,尚未有 LHS 对绝经后骨质疏松症疗效的研究。因此,本研究的目的是使用 LHS 干预观察其对去卵巢大鼠骨量的影响,并初步探讨可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

将 30 只 3 月龄的雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠[(250±30) g, 购于北京动物实验中心]适应性饲养一周,随后对 30 只雌性大鼠进行双侧卵巢切除术($n=20$)及假手术($n=10$)。手术后大鼠被随机分为 3 组(每组 10 只):去卵巢组(OVX)、假手术组(Sham)和去卵巢大鼠接受芦荟素治疗组(LHS);其中 LHS 组大鼠每天接受 50 mg/kg 芦荟素(纯度>98%,购于 Sigma-Aldrich)治疗,其余组大鼠接受生理盐水治疗。治疗 12 周后,处死所有动物收集双侧股骨进行检测。

1.2 方法

1.2.1 Micro-CT 检测:使用 SkyScan 1076 型号 Micro-CT(SkyScan, Aartselaar, Belgium)对大鼠左侧股骨远端的松质骨骨小梁进行 3D 分析。Micro-CT 设备包括一个焦点为 9 μm 的微型 X 射线管,可产生由电荷耦合器件阵列和转台检测到的扇形束,并可以沿轴向自动移动。选择能量和强度分别等于 40 kVp 和 250 μA 。在原始 3D 图像上,直接根据感兴趣的区域(VOI)确定形态计量指标,该体积仅限于直径为 1.5 mm 的内圆柱和整个股骨远端松质骨骨小梁,不包括距骺线 2 mm 远端的区域。通过计算以下 3D 形态参数来描述骨骼质量和微观结构:骨密度(BMD, g/cm^3)、骨小梁厚度(Tb.th)、骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁分

离度(Tb.Sp)。

1.2.2 组织学检测:将右侧股骨在中性缓冲的 10 % 甲醛溶液中固定 5 d,并在 10 % 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)中脱钙 1 个月,然后用手术刀从矢状面中段分开并包埋在石蜡中。最后将样品在矢状面切成 5 μm 厚的切片,放在显微镜载玻片上,并用 Van Gieson(VG)染色以进行光学显微镜检查。

1.2.3 生物力学评估:使用 Instron 4302 系统对左侧股骨(每组 $n=5$)进行三点弯曲实验评估。将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。

1.2.4 蛋白印记检测:用 RIPA 缓冲液(Thermo Fisher Science)制备股骨远端骨组织裂解物,然后 12 000 g 离心 15 min 以去除组织碎片。用 BCA 蛋白分析试剂盒(Beyotime)测定蛋白质浓度。在 10 % 或 12 % 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶上分离总蛋白(20 μg),并转移到聚偏氟乙烯膜上。在含有 5 % 脱脂奶粉的 TBS 中封闭 1 h,然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN(购于 Cell Signing Technology)一抗体孵育过夜,最后用 TBST 清洗膜,并与二次抗体孵育 1 h。使用 ECL 试剂(Thermo Fisher Science)检测抗体反应条带,使用 ImageJ 软件定量分析条带强度。

1.3 统计学分析

统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),然后进行 Student' t 检验。结果使用均数±标准差(SD)表示。 $P<0.05$ 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~图 1F 所示。OVX 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较 Sham 组明显降低,而 Tb.Sp 则明显升高($P<0.05$)。LHS 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($P<0.05$)。

2.2 股骨组织病理学

股骨干骺端骨小梁组织切片如图 2 所示,Sham 组大鼠股骨干骺端骨小梁致密,骨小梁网状结构正常;OVX 组大鼠骨小梁疏松变薄,导致骨小梁间隙

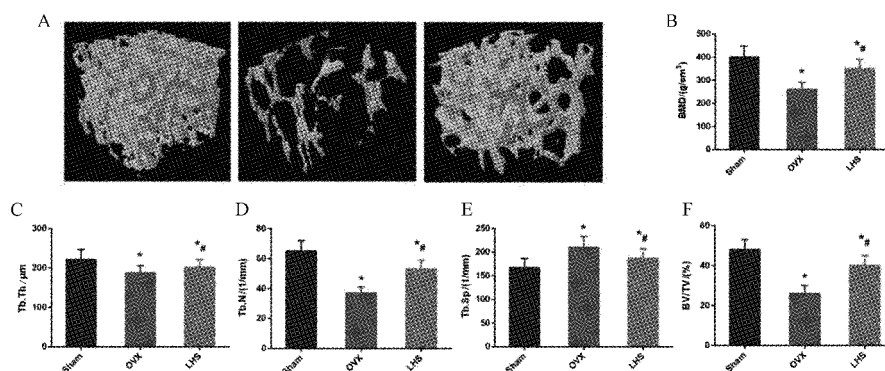


图1 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

A:股骨干骺端骨小梁二维图像;B:骨密度;C:Tb.Th;D:Tb.N;E:Tb.Sp;F:BV/TV。

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

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

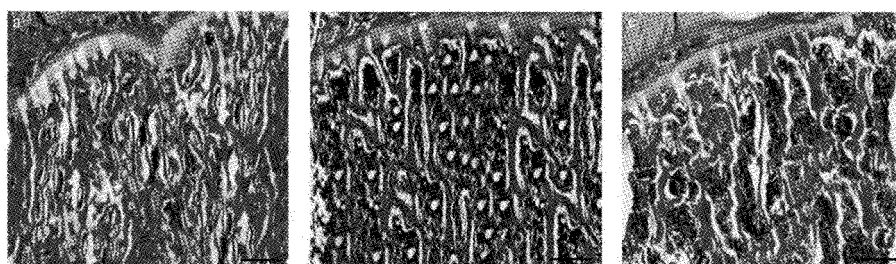


图2 三组股骨的组织病理学

a: Sham 组;b:OVX 组;c:LHS 组。

注:VG 染色(放大倍数,×10)。

Fig.2 Histopathology of femurs in the three groups

变宽;LHS 组大鼠的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

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

2.4 WB 检测结果

和 Sham 组比较,OVX 组 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN 表达水平明显下调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。和 OVX 组比较,LHS 组 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN 表达水平明显上调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

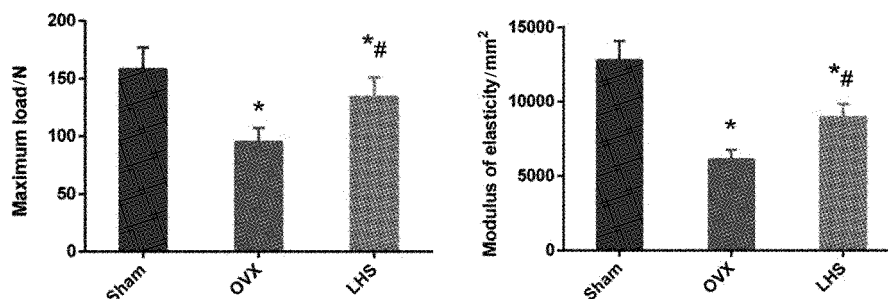


图3 右股骨的三点弯曲试验结果

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

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

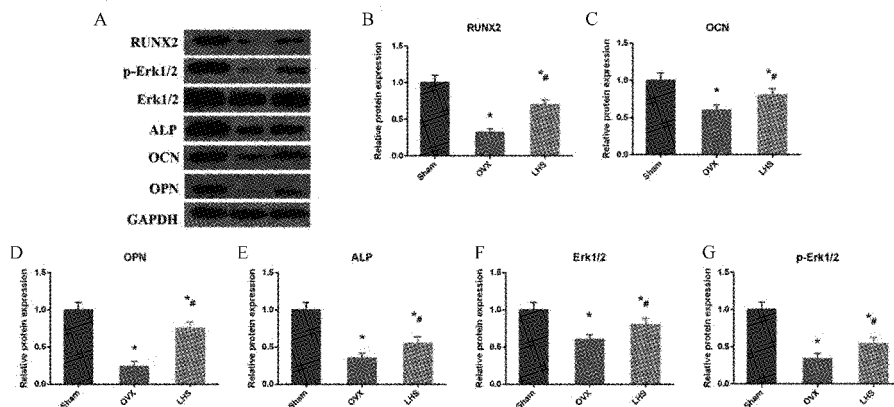


图4 WB检测结果

A: WB 检测各种蛋白的相对表达; B: RUNX 2; C: OCN; D: OPN; E: ALP; F: Erk1/2; G: p-Erk1/2。

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

Fig.4 WB test results

3 讨论

芦荟素不仅具有促进伤口愈合的作用,还具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗过敏作用^[5]。最近的研究^[4]表明,芦荟素是 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞中破骨细胞生成和骨吸收的有效抑制剂,还可以通过 MAPK 和 Wnt 途径增强 MC3T3-E1 细胞的成骨性^[4]。但是,芦荟素对绝经后骨质疏松症的作用目前尚不清楚。本研究的目的是研究芦荟素对去卵巢大鼠股骨骨强度、骨密度和骨小梁微观结构的影响。

Micro-CT 结果显示,OVX 组的 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 最低,而 Tb.Sp 最高。而芦荟素可以显著改善 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp。组织病理结果进一步证实了芦荟素可以改善骨小梁的微观结构。以上结果表明,芦荟素可以显著增加去卵巢雌性大鼠的骨量,并改善其骨小梁的微观结构。三点弯曲试验结果表明,去卵巢诱导的骨质疏松大鼠最大负荷和弹性模量均明显降低,芦荟素可以显著改善上述指标,并可以显著改善股骨的生物力学性能、增强其机械强度。

本研究进一步通过蛋白印记检测骨组织 p-Erk1/2、Erk1/2、ALP、RUNX 2、OCN 和 OPN 表达情况。在一项使用 MC3T3-E1 细胞系的研究^[7]中,芦荟素在初始阶段通过增加 ALP 的产生并在后期阶段通过矿化来刺激成骨细胞的诱导过程。本研究表明芦荟素能促进骨组织中成骨相关基因(ALP、OCN 和 OPN)的表达。RUNX 2 是成骨细胞分化和骨形成的关键调节剂,在骨髓间充质干细胞进入成骨细

胞谱系的过程中起着重要作用;当受到连续的机械刺激或用热激蛋白 70 处理时,间充质干细胞可以被诱导成骨,这依赖于 ERK1/2-Runx 2 信号通路^[8]。据报道,ERK1/2 通路参与成骨的调节,成骨细胞分化过程中 RUNX 2 的稳定需要 ERK1/2 磷酸化^[9]。为了确认 ERK1/2 途径是否参与芦荟素介导对去卵巢大鼠骨量保护作用,本研究进一步观察了芦荟素对骨组织 ERK1/2 表达情况。蛋白质印迹结果表明,在芦荟素干预的情况下,p-ERK1/2 和 RUNX 2 表达水平显著上调。这些数据表明芦荟素能促进 ERK1/2 的磷酸化,进而上调转录因子 RUNX 2 的表达,从而促进成骨作用。

总之,本研究首次证明了芦荟素可以通过 ERK1/2-Runx2 信号通路促进去卵巢大鼠成骨,防止去卵巢大鼠骨量、骨密度和骨强度的降低。芦荟素可能成为治疗绝经后骨质疏松症的潜在药物。

【参考文献】

- [1] You L, Pan L, Chen L, et al. MiR-27a is essential for the shift from osteogenic differentiation to adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis [J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2016,39(1): 253-265.
- [2] Wu Z, Zhang J, Gu X, et al. Effects of the extract of Ginkgo biloba on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. Am J Transl Res, 2016,8(7): 3032-3040.
- [3] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011,377(9773): 1276-1287.
- [4] Pengjam Y, Madhyastha H, Madhyastha R, et al. NF- κ B pathway inhibition by anthrocylic glycoside aloin is key event in preventing osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. Phytomedicine, 2016,23: 417-428.

- [5] Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Dietary aloin, aloein, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model [J]. Life Sci, 2011,88(11-12): 1-492.
- [6] Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of aloe saponaria haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology Biology, 2014,133: 47-54.
- [7] Pengjam Y, Madhyastha H, Madhyastha R, et al. Anthraquinone glycoside aloin induces osteogenic initiation of MC3T3-E1 cells: involvement of MAPK mediated wnt and bmp signaling [J]. Biomolecules & therapeutics, 2016,24(2): 123.
- [8] Zhang P, Wu Y, Jiang Z, et al. Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2012,29(6): 1083-1089.
- [9] Bruderer M, Richards R, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis [J]. Eur Cell Mater, 2014, 28: 269-286.

(收稿日期: 2020-02-27;修回日期: 2020-03-27)

(上接第 197 页)

- [7] Wells GB, O'Connell D, Peterson J, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses [EB/OL]. [http://www.ohri.ca/search.asp?q=The %20Newcastle-Ottawa %20Scale %20 \(NOS\) %20](http://www.ohri.ca/search.asp?q=The%20Newcastle-Ottawa%20Scale%20(NOS)%20).
- [8] Cumpston M, Li T, Page M J, et al. Updated guidance for trusted systematic reviews: a new edition of the cochrane handbook for systematic reviews of interventions [J]. Cochrane Database Of Systematic Reviews, 2019, 10: Ed000142.
- [9] Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis[J]. Statistics In Medicine, 2002,21(11):1539-1558.
- [10] Yen CM, Kuo CL, Lin MC, et al. Sleep disorders increase the risk of osteoporosis: a nationwide population-based cohort study [J]. Sleep Medicine, 2014, 15(11): 1339-1344.
- [11] Yücege M, Dülgeroğlu DE, Fırat H, et al. Can sleep apnea be a secondary cause of osteoporosis in young people? [J]. Sleep and Biological Rhythms, 2015, 13(2): 189-194.
- [12] Aslan SH, Yosunkaya S, Kiyici A, et al. Obstructive sleep apnea syndrome may be a risk factor for the development of osteoporosis in men at an early age? [J]. Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2015, 61(3): 216-222.
- [13] Terzi R, Yilmaz Z. Bone mineral density and changes in bone metabolism in patients with obstructive sleep apnea syndrome[J]. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2016, 34 (4): 475-481.
- [14] Chen DD, Huang JF, Lin QC, et al. Relationship between serum adiponectin and bone mineral density in male patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. Sleep and Breathing, 2017, 21(2): 557-564.
- [15] Qiao Y, Wang B, Yang JJ, et al. Bone metabolic markers in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(16): 1898-1903.
- [16] 柯亭羽, 杜娟, 卢果成, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者骨密度改变[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(5): 61-64.
- [17] 金常娥, 吴迪, 何正强, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与骨质疏松症的相关性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015,21(1): 63-66.
- [18] 谷君, 权玉玲, 宁改君, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者骨密度变化及其意义[J]. 中国临床医生, 2016, 44(7): 25-27.
- [19] 马伟, 殷敏, 关兵. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者骨转换标志物及骨密度的变化[J]. 实用临床医药杂志, 2016,20(9): 147-148.
- [20] 杨栋梁. 骨质疏松症与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的相关性的研究分析[J]. 当代医学, 2017, 23(31): 113-115.
- [21] 陈双杰. 社区老年人群鼾症发病情况及与骨质疏松症的关系研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(4): 322-326.
- [22] 王斌, 蔡新勇, 刘焕兵, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者骨密度及血清 OPC、RANKL 的变化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(9): 1121-1125.
- [23] 张玮, 蔡伟, 朱文艳, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者 IGF-1、OPC、RANKL 及骨密度变化 [J]. 江苏医药, 2019, 45(5): 457-460.
- [24] 郭建梅, 赵季红, 张晶, 等. 绝经后女性阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血脂与骨密度的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(5): 479-482.
- [25] Tomiyama H, Okazaki R, Inoue D, et al. Link between obstructive sleep apnea and increased bone resorption in men[J]. Osteoporosis International, 2008, 19(8): 1185-1192.
- [26] Song L, Liang X, Zhou Y. Estrogen-mimicking isoflavone genistein prevents bone loss in a rat model of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014,7(4):1687-1694.
- [27] Torres M, Montserrat JM, Pavía J, et al. Chronic intermittent hypoxia preserves bone density in a mouse model of sleep apnea [J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2013, 189(3): 646-648.
- [28] Carreras A, Almendros I, Acerbi I, et al. Obstructive apneas induce early release of mesenchymal stem cells into circulating blood[J]. Sleep, 2009,32(1):117-119.

(收稿日期: 2020-04-02;修回日期: 2020-06-11)