

· 论 著 ·

阿魏酸治疗对去卵巢雌性大鼠骨量流失的保护作用机制研究

胡旭峰*

皖南医学院第一附属医院/弋矶山医院, 安徽 芜湖 241000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 02-0229-05

摘要: **目的** 研究阿魏酸(ferulic acid)对去卵巢大鼠骨量流失的影响,并探讨可能的机制。**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)以及阿魏酸组,每组 10 只;其中阿魏酸组大鼠每天给予阿魏酸(20 mg/kg)灌胃治疗;待 12 周治疗结束后使用 Micro-CT、HE 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探讨可能的机制。**结果** 治疗 12 周后,与 OVX 组相比, Micro-CT 和 HE 染色切片结果显示阿魏酸组的大鼠骨小梁数量和骨密度(bone mineral density, BMD)得到明显改善。阿魏酸组大鼠 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,阿魏酸组极限载荷和刚度较 OVX 组显著增加($P<0.05$),而阿魏酸组骨代谢指标 PINP 和 TRACP-5b 水平显著降低($P<0.05$),比较差异有统计学意义($P<0.05$)。和 OVX 组比较,阿魏酸组 BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 表达水平上调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 阿魏酸可以通过 BMP2/Smads 信号通路抑制去卵巢大鼠的骨量流失。

关键词: 阿魏酸;绝经后骨质疏松症;骨强度;骨密度;BMP2/Smads 信号通路

Study on the protective mechanism of ferulic acid treatment on the bone loss in ovariectomized female rats

HU Xufeng*

The First Affiliated Hospital of South Anhui Medical College/Yijishan Hospital, Wuhu 241000, China

* Corresponding author; HU Xufeng, Email: 3514803604@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of Ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats and explore the possible mechanisms. **Methods** In this study, osteoporosis rat models were established by bilateral ovariectomy; they were then randomly divided into sham operation group (Sham), ovary removal group (OVX), and Ferulic acid group, 10 in each group; of which burdock Rats in Ferulic acid group received Ferulic acid [20 mg/(kg · day)] for 12 weeks; after treatment, Micro-CT, HE stained sections, bone metabolism indicators, bone biomechanical testing and Western blot were used to observe the treatment effect and possible mechanism. **Results** After 12 weeks of treatment, compared with the OVX group, the result of Micro-CT and HE staining showed that the number of trabeculae and bone mineral density of the rats in the Ferulic acid group were significantly improved. BMD, TV/BV, Tb.N, Tb.Th, and Tb.Sp in the Ferulic acid group were significantly improved compared with the OVX group ($P<0.05$). At 12 weeks of treatment, the limit load and stiffness of the Ferulic acid group were significantly increased compared with the OVX group ($P<0.05$), while the levels of bone metabolism indicators PINP and TRACP-5b in the Ferulic acid group were significantly reduced ($P<0.05$), which was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the OVX group, the expression levels of BMP-2, Smad1, Smad4, and p-Smad1/5/8 in the Ferulic acid group were up-regulated, and there was a statistical difference ($P<0.05$). **Conclusion** Ferulic acid mediates the protective effect on bone loss in ovariectomized rats through the BMP2/Smads signaling pathway.

Key words: ferulic acid; postmenopausal osteoporosis; bone strength; bone mineral density; BMP2/Smads signaling pathway

骨质疏松症是一种代谢性疾病,其特征是骨量减少和骨折风险增加,严重影响老年人的健康^[1]。骨吸收和骨形成动态失去平衡是骨质疏松

* 通信作者: 胡旭峰, Email: 3514803604@qq.com

症的根本原因。骨重建是一个生理过程,其中成骨细胞形成新的骨骼,而破骨细胞重新吸收原始的骨基质,对维持成人骨骼健康起到关键作用,多种因素参与调节这一过程^[2]。双膦酸盐、雌激素和雷洛昔芬通常用于治疗绝经后骨质疏松症,尽管这些药物可显著增加骨量,但它们具有一些局限性和副作用,包括血栓栓塞和胃肠道刺激^[3]。阿魏酸(ferulic acid)是存在于多种水果中的天然多酚类药物,对高血压和胰岛素抵抗有治疗作用^[4]。据报道^[5-6],阿魏酸不仅具有抗氧化剂活性,还能抑制成熟破骨细胞的融合和凋亡。有学者还报道^[7]了补充阿魏酸可预防链脉佐菌素诱发的糖尿病大鼠脂质过氧化。这些结果显示阿魏酸可能对绝经后骨质疏松症引起的骨丢失有保护作用。因此,本研究使用去卵巢模型初步探索阿魏酸治疗骨质疏松症的可行性,并研究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 30 只体重 220~260 g、3 月龄雌性 SD 大鼠(购自上海实验动物中心)作为实验动物。每 5 只大鼠饲养在一个笼子里,光照时间为 12 h/d,温度为 25 ℃,通风干燥;可以自由饮食,食物是标准大鼠饲料,含有 2.5 % 酪蛋白、0.8 % 磷、1 % 钙、70 %~80 % 碳水化合物和 5 % 脂肪。适应 1 周后,10 只大鼠接受假手术(Sham),其余大鼠行双侧卵巢切除术(OVX)。手术 3 d 后将大鼠分为 3 组(每组 10 只):Sham 组:假手术大鼠,给予生理盐水[(50 mL/(kg·d))]灌胃;OVX 组:去卵巢大鼠,给予生理盐水[(50 mL/(kg·d))]灌胃;阿魏酸组:去卵巢大鼠,给予阿魏酸(20 mg/kg, Sigma-Aldrich)灌胃治疗,1 次/d,共 12 周;药物剂量参考文献^[7]。治疗结束时通过过量水合氯醛麻醉处死大鼠,获取其双侧股骨行进一步检测。并从大鼠左心室收集血液样本(1 mL/只),在 4 ℃ 下以 2 500 r/min 离心 10 min 来分离血清样品,置于 -80 ℃ 下保存,备用。本研究得到皖南医学院第一附属医院伦理委员会的批准(20191211)。

1.2 方法

1.2.1 Micro-CT 检测:应用 Micro-CT CT50 成像系统(Micro-CT CT50, Sanco Medical)评价大鼠左侧股骨远端的微观结构。感兴趣体积(VOI)包括从生长板最高点以下 2.0 mm 到远端 100 层的骨小梁平扫

图片。对 VOI 区三维图像进行定性和定量分析获取骨体积百分比(BV/TV)、平均骨小梁厚度(Tb.Th)、平均骨小梁数目(Tb.N)、平均骨小梁间距(Tb.Sp)和骨密度(bone mineral density, BMD)。待 Micro-CT 扫描后,使用 10 % 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,每周更换 2 次,连续 4 周,然后用分级乙醇系列(70 %~100 %)脱水。随后进行石蜡包埋,长轴平行于基面。切取厚度为 4 mm 的纵向连续切片,固定在涂有聚赖氨酸的显微镜载玻片上,进行 HE 染色。染色方法按照制造商提供的方案进行,并在显微镜(奥林巴斯 DP71 显微镜,奥林巴斯公司)下检查。

1.2.2 血清生化检测:根据制造商提供的方案,使用 ELISA 试剂盒(目录号 F8956 和 F18955; Westang Biological Technology Co., Ltd.)检测之前保存的血清样品,检测项目包括 P1NP 和 TRACP-5b 在内的骨代谢血清标志物。

1.2.3 骨生物力学实验:对大鼠股骨进行三点弯曲以确定股骨最大负荷和刚度。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)和弹性模量(mm²)。

1.2.4 蛋白质印迹检测:将股骨远端在液氮中碎裂,并用放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液裂解。离心后,使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测量上清液中的蛋白质水平。将每种蛋白质样品(60 μg)装入 10 % (0.1 g/mL)的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳中,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。然后,将膜用 5 % (0.05 g/mL)牛血清白蛋白(BSA)溶液封闭 1 h,并与相对应的一抗(BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8、GAPDH)在 4 ℃ 下过夜,然后在室温下放置相应的二抗 1 h,并用 TBST(Tris-HCl 10 mmol/L, 氯化钠 150 mmol/L, Tween-20 0.05 % (v/v); pH=7.5)洗涤 3 次。蛋白质表达信号通过增强的化学发光液可视化,并使用 Tanon 系统捕获图像。印迹的灰度值使用 ImageJ 软件进行检测。

1.3 统计学分析

实验数据表示为均数±标准差。统计分析用 SPSS 22.0 软件进行。基于方差结果的同质性检验,使用 Student's *t* 检验比较两个不同组间差异。以 *P*<0.05 判断差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织切片分析

股骨干骺端骨小梁的 HE 染色如图 1 所示。

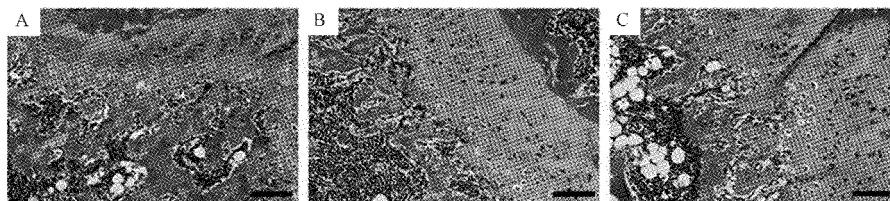


图 1 三组股骨的组织病理学

注:A;Sham 组;B;OVX 组;C;阿魏酸组。HE 染色(放大倍数,×40)。

Fig.1 Histopathology of femurs in the three groups

2.2 阿魏酸治疗对大鼠股骨骨小梁结构影响

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~图 2F 所示。OVX 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较

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;阿魏酸组骨小梁数量和连接增加明显,表现出明显的结构恢复。

Sham 组明显降低,而 Tb.Sp 则明显升高 ($P<0.05$);阿魏酸组左侧股骨 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 ($P<0.05$)。

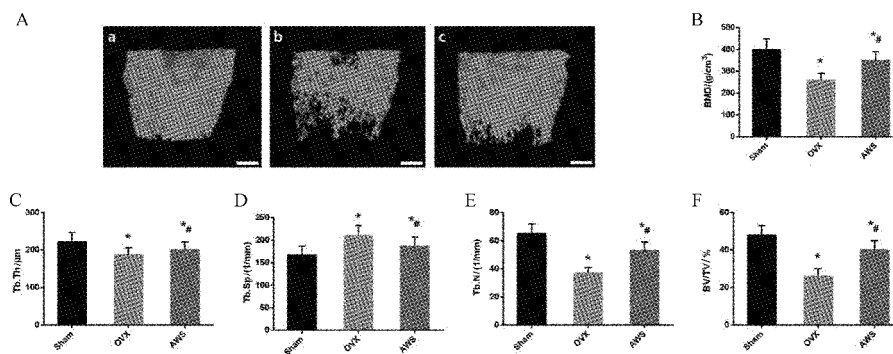


图 2 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

注:A;三组大鼠骨小梁三维重建;B:骨密度;C:Tb.Th;D:Tb.Sp;E:Tb.N;F:BV/TV;a: Sham 组;b: OVX 组;c: 阿魏酸组。与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$ 。

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

2.3 阿魏酸治疗对大鼠骨代谢指标的影响

阿魏酸治疗对骨转换标志物的影响见图 3。与 Sham 组相比,OVX 组 P1NP 和 TRACP-5b 水平显著升高 ($P<0.05$);与 OVX 组相比,阿魏酸组骨代谢指标 P1NP 和 TRACP-5b 水平显著降低 ($P<0.05$)。

2.4 阿魏酸治疗对大鼠股骨生物力学的影响

股骨三点弯曲试验如图 4 所示,OVX 组的极限载荷和弹性模量均显著低于 Sham 组,两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),阿魏酸组的极限载荷和弹性模量较 OVX 组明显升高 ($P<0.05$)。

2.5 阿魏酸治疗对 BMP2/Smads 信号通路的影响

与 Sham 组比较,OVX 组 BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 表达水平明显下调,比较差异

有统计学意义 ($P<0.05$);与 OVX 组比较,阿魏酸组 BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 表达水平上调,比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前临床上用于治疗绝经后骨质疏松症的药物以双膦酸盐、雌激素受体调节剂或者甲状旁腺素 (1-34) 为主^[8]。尽管这些药物都有一定的疗效,但它们也存在不同程度的局限性。骨质疏松症治疗的是恢复骨骼的正常代谢,即增强成骨功能并减少由于骨质疏松症的病理性骨吸收而导致的骨强度降低。OVX 大鼠和绝经后女性的雌激素缺乏相似,均出现 BMD 降低^[9-10]。在本研究中,阿魏酸治疗可显

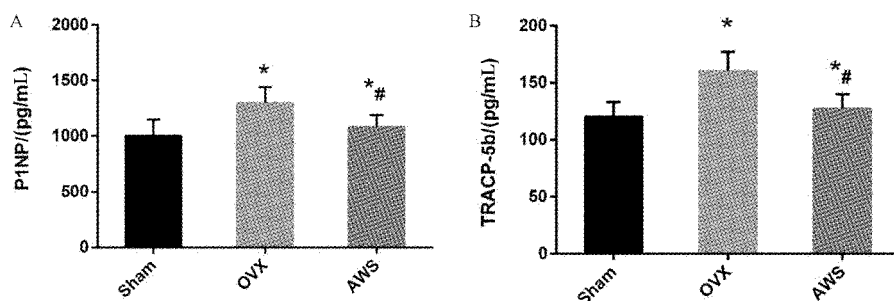


图3 阿魏酸治疗对骨代谢指标的影响

注:A:P1NP;B:TRACP-5b。与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$ 。

Fig.3 Effect of Ferulic acid treatment on the bone metabolism indexes

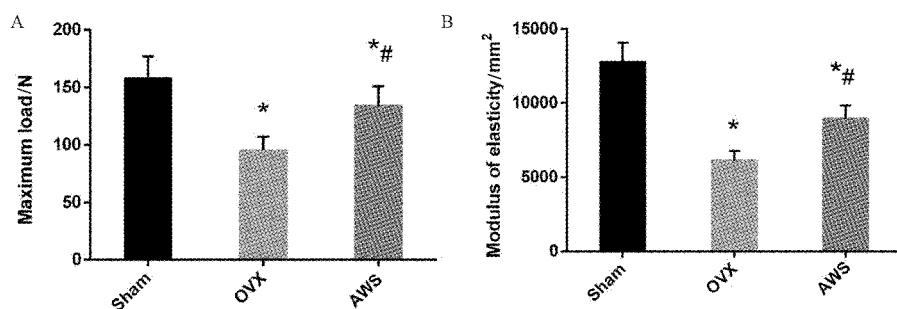


图4 右股骨的三点弯曲试验结果

注:A:极限载荷;B:弹性模量。与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$ 。

Fig.4 Three-point bending test results of the right femur of rats

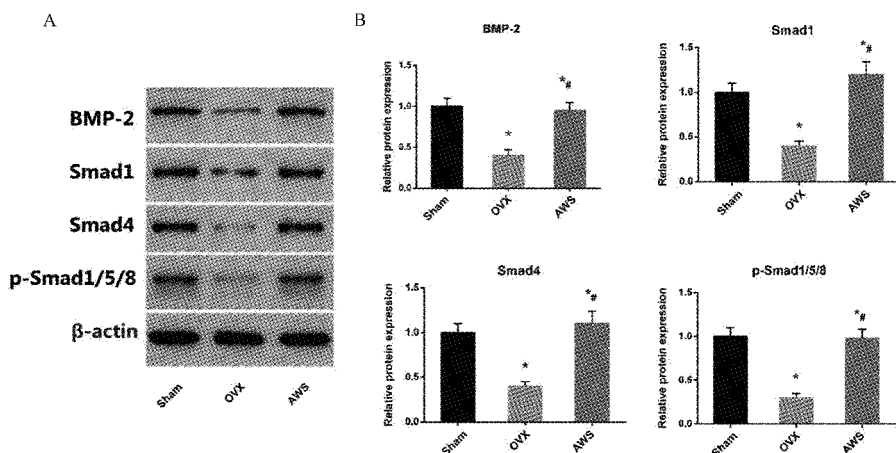


图5 使用 WB 检测 BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 和 GAPDH 的相对表达

注:A:各目标蛋白的表达;B:BMP-2、Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 表达;与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$ 。

Fig.5 Relative expression of BMP-2, Smad1, Smad4, p-Smad1/5/8 to GAPDH using Western blotting

著改善 BMD,并有效防止 OVX 诱导的雌激素缺乏引起的骨量流失。

本研究中的生物力学测试表明,与 Sham 组相比,OVX 组大鼠股骨骨折所需的力量较小。阿魏酸治疗显著改善了去卵巢大鼠股骨生物力学性能。骨

强度与骨密度、结构、连通性和矿化有关^[11]。本研究的结果与以前研究的结果一致,卵巢切除术导致 BMD 降低以及生物力学强度显著降低^[12]。

骨质疏松症的主要原因是骨吸收与骨形成之间的不平衡。健康的骨骼需要保持成骨细胞和破骨细

胞之间的动态平衡,以进行适当的骨骼重塑^[13]。血清骨代谢指标的变化反映了骨骼代谢的平衡。这些变化可用于评估骨转化,并客观地反映骨吸收和骨形成。TRACP-5b 是破骨细胞分泌的细胞因子,在骨重塑中起重要作用。P1NP 被认为是骨转换的标志,由成骨细胞分泌,在成骨细胞分化和骨形成活性中起着重要的作用。本研究结果表明,与 Sham 组大鼠相比,OVX 组大鼠的 P1NP 和 TRAP-5b 水平显著升高。使用阿魏酸治疗 12 周后能显著降低 P1NP 和 TRACP-5b 水平,表明阿魏酸具有纠正骨吸收与骨形成之间不平衡的能力。

BMPs 是转化生长因子 β 超家族的成员。几项研究^[14-15]表明,BMPs 可以激活 Smad 蛋白家族的下流信号分子,刺激间充质细胞分化,并不可逆地诱导骨骼和软骨的形成。BMP-2 可通过经典的 BMP/Smad 途径调节成骨细胞分化。该信号传导途径由 II 型 BMP 受体启动,激活后通过磷酸化 BMP 特异性 Smad1、Smad5 和 Smad8 传播 BMP 信号。然后,p-Smad1/5/8 与 Smad4 结合形成复合物,该复合物易位至细胞核并激活或抑制成骨基因的转录。BMP/Smads 信号通路的激活是调控骨髓间充质干细胞成骨分化和抑制破骨细胞介导的骨吸收在骨重塑中的重要调控机制^[16]。本研究发现 OVX 组的 BMP-2、Smad1、Smad4 和 p-Smad1/5/8 表达水平较 Sham 组显著降低,表明 OVX 组大鼠 BMP/Smads 信号通路的被抑制,而在经过阿魏酸治疗后,BMP-2、Smad1、Smad4 和 p-Smad1/5/8 较 OVX 组显著上调,这表明 BMP/Smads 信号通路已经被激活,最终出现一系列信号传导导致骨代谢失衡纠正,骨量和骨强度增加。

综上所述,本研究表明阿魏酸能够改善去卵巢大鼠的骨量丢失,而这种结果可能是由 BMP/Smads 信号通路激活而介导的。由于骨质疏松症机制复杂,本研究只是初步证实了阿魏酸具有抗骨质疏松症的潜力,需要进一步扩大样本量和研究时间来证实药物的有效性与安全性。

【参 考 文 献】

- [1] 原源,范斌,李晓玉,等.老年髋部骨折患者致伤因素分析[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(1):85-90,117.
- [2] 张悦,李运峰.骨质疏松症动物模型研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(1):152-156.
- [3] Mario M, Giovanni M, Paolo V, et al. Osteonecrosis of the jaw (ONJ) in osteoporosis patients: report of delayed diagnosis of a multisite case and commentary about risks coming from a restricted ONJ definition[J]. Dentistry Journal, 2017, 5(1): 13-19.
- [4] El-Bassossy H, Badawy D, Neamatallah T, et al. Ferulic acid, a natural polyphenol, alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent relaxation[J]. Chem Biol Interact, 2016, 254: 191-197.
- [5] Bami E, Ozakpinar OB, Ozdemir-Kumral ZN, et al. Protective effect of ferulic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2017, 54: 105-111.
- [6] Sagar T, Rantlha M, Kruger MC, et al. Ferulic acid impairs osteoclast fusion and exacerbates survival of mature osteoclasts[J]. Cytotechnology, 2016, 68(5): 1963-1972.
- [7] Balasubashini MS, Rukkumani R, Viswanathan P, et al. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats[J]. Phytother Res, 2004, 18(4): 310-314.
- [8] Tao zs, Zhou WS, Wu xj, et al. Local administration of aspirin improves osseointegration of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats through activation of the Notch signaling pathway[J]. Journal of Biomaterials Applications, 2020, 34(7): 1009-1018.
- [9] Gambacciani M, Levancini M. Featured editorial hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis[J]. Menopausal Review, 2014, 4(13): 213-220.
- [10] Agata U, Park JH, Hattori S, et al. The effect of different amounts of calcium intake on bone metabolism and arterial calcification in ovariectomized rats[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2015, 59(1): 29-36.
- [11] 汤璐璐,邓伟民,苏海容,等.补肾壮骨颗粒对 SAMP6 小鼠股骨宏观结构及生物力学的影响[J].中国骨质疏松杂志,2018, 24(1): 91-97.
- [12] 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]. Ztschrift Für Gerontologie Und Geriatrie, 2019, 52(2): 139-147.
- [13] Kim BH, Oh JH, Lee ANK. The Inactivation of ERK1/2, p38 and NF-kB Is Involved in the Down-Regulation of Osteoclastogenesis and Function by A2B Adenosine Receptor Stimulation[J]. Molecules & Cells, 2017, 40(10): 752-760.
- [14] J Massagué. How cells read TGF-beta signals[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000, 1(3): 169-178.
- [15] Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family[J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(10): 763-773.
- [16] Yuan B, Wu Z. MMP2 silencing reduces the osteogenic transformation of fibroblasts by inhibiting the activation of the BMP/Smad pathway in ankylosing spondylitis[J]. Oncology Letters, 2018, 15(3): 3281-3286.

(收稿日期: 2020-04-17;修回日期: 2020-06-04)