

· 论 著 ·

# 红景天苷激活 PI3K/AKT 通路改善绝经后骨质疏松症实验研究

黄永湘<sup>1</sup> 李强<sup>2</sup> 李宝林<sup>1\*</sup> 陶永亮<sup>1</sup>

1.儋州市人民医院骨科,海南 儋州 571700

2.海南医学院附属医院骨科,海南 海口 570216

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 08-1135-06

**摘要:** **目的** 探讨红景天苷激活 PI3K/AKT 通路改善绝经后骨质疏松症的作用。**方法** 建立绝经后骨质疏松症大鼠模型,随机分为模型组、LY294002(PI3K/Akt 通路抑制剂)组、红景天苷组、红景天苷+LY294002 组,每组 12 只,另取 12 只设为假手术组。分组处理后,通过骨科生物力学测试仪测定大鼠股骨生物力学指标弹性模量、最大载荷、屈服载荷;测定大鼠股骨骨矿盐含量;运用苏木精-伊红(HE)染色检测各组大鼠骨组织病理变化;通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平;运用蛋白免疫印迹法检测脑组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达情况。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠骨组织呈现骨小梁稀疏断裂、数目明显减少,有较多空隙、不能连接成网等病理损伤,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平均显著升高( $P<0.05$ ),股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量、骨组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平均显著降低( $P<0.05$ );与模型组相比,红景天苷组大鼠骨组织病理损伤减轻,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ),股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量、骨组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平升高( $P<0.05$ );LY294002 组大鼠骨组织病理损伤加重,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ),股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量、骨组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平降低( $P<0.05$ )。与 LY294002 组相比,红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织病理损伤减轻,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ ),股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量、骨组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平升高( $P<0.05$ )。与红景天苷组相比,红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织病理损伤加重,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ ),股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量、骨组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平降低( $P<0.05$ )。**结论** 红景天苷可能通过激活 PI3K/Akt 通路改善绝经后骨质疏松症。

**关键词:** 红景天苷;PI3K/Akt 通路;大鼠;绝经后骨质疏松症

## Salidroside improves postmenopausal osteoporosis by activating PI3K/Akt pathway

HUANG Yongxiang<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>2</sup>, LI Baolin<sup>1\*</sup>, TAO Yongliang<sup>1</sup>

1. Department of Orthopedics of Danzhou People's Hospital, Danzhou 571700

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570216, China

\* Corresponding author: LI Baolin, Email: libaolin852@126.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of salidroside on postmenopausal osteoporosis by activating PI3K/Akt pathway. **Methods** The rat model of postmenopausal osteoporosis was established and randomly divided into model group, LY294002 (PI3K/Akt pathway inhibitor) group, salidroside group and salidroside + LY294002 group, with 12 in each group, another 12 were set as sham operation group. After treatment, the elastic modulus, the maximum load and the yield load of the biomechanical index of the femur of the rats were measured with the orthopedic biomechanical tester; the mineral salt content of femur was measured; hematoxylin eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of bone tissue; the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and the expression of PI3K/Akt pathway related proteins was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the bone tissue of the model group showed sparsely broken trabeculae, the number of trabeculae was significantly reduced, and there were many spaces, unable to connect into nets and other pathological damages, the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  increased significantly ( $P<0.05$ ), while the elastic modulus,

基金项目: 海南省自然科学基金项目(817326)

\* 通信作者: 李宝林, Email: libaolin852@126.com

maximum load, yield load of femur, mineral salt content of bone, and levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in bone tissue decreased significantly ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the pathological injury of bone tissue in salidroside group was reduced, the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  decreased ( $P < 0.05$ ), while the elastic modulus, maximum load, yield load of femur, mineral salt content of bone, and levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in bone tissue increased significantly ( $P < 0.05$ ); in LY294002 group, the pathological injury of bone tissue was aggravated, the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the elastic modulus, maximum load, yield load of femur, mineral salt content of bone, and levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in bone tissue decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with LY294002 group, the pathological injury of bone tissue in salidroside + LY294002 group was reduced, the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the elastic modulus, maximum load, yield load of femur, mineral salt content of bone, and levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in bone tissue increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with salidroside group, the pathological injury of bone tissue in salidroside + LY294002 group was aggravated, the levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the elastic modulus, maximum load, yield load of femur, mineral salt content of bone, and levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in bone tissue decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Salidroside may improve postmenopausal osteoporosis by activating PI3K/Akt pathway.

**Key words:** salidroside; PI3K/Akt pathway; rats; postmenopausal osteoporosis

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是女性绝经后常见的原发性骨质疏松症<sup>[1]</sup>, 对患者身心健康造成极大影响<sup>[2-3]</sup>。红景天苷是中药红景天的主要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、促进血管形成的作用, 可抑制低氧环境诱导的成骨细胞凋亡<sup>[4]</sup>, 并可减轻去卵巢导致的 PMOP 大鼠骨吸收, 提高骨密度, 改善其骨丢失症状<sup>[5]</sup>, 但其作用机制目前并未阐释清楚。炎症在 PMOP 患者发病过程中发挥重要的调节作用, PMOP 患者血清中促炎因子水平显著升高, 抑制炎症是治疗 PMOP 的一个有效手段<sup>[6]</sup>。PI3K/Akt 是调控机体炎症的主要信号通路, 并参与介导 PMOP 的发生发展, 抑制 PI3K/Akt 通路激活, 可抑制血管形成, 进而加重 PMOP 的骨丢失症状, 因而 PI3K/Akt 通路是 PMOP 的一个治疗靶点。但激活 PI3K/Akt 信号、抑制炎症发生发展是否是红景天苷治疗 PMOP 的药理机制目前并不清楚。为此, 本研究将通过建立 PMOP 大鼠模型进一步开展相关探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 64 只 SD 雌性大鼠购自广州相观生物科技有限公司, 生产许可证号 SCXK(粤)2018-0043, SPF 清洁级, 体重 (240 $\pm$ 20) g。所有大鼠均在海南医学院基础医学动物实验室动物房中饲养, 温度为 22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 50%~60%, 大鼠自由进食、饮水, 12 h/12 h 间断照明, 定期添加饲料及饮用水, 经常更换垫料, 清洁鼠笼, 使动物房环境清洁、安静、通风良好。

**1.1.2 主要试剂及仪器:** 红景天苷购自成都普菲德生物技术有限公司, 货号 JOT-10012; LY294002 购自美国 MCE 公司, 货号 HY-10108; 大鼠 IL-6 及 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒、羊抗兔二抗兔源抗 GAPDH、PI3K、p-PI3K、AKT 及 p-AKT 一抗购自美国 Abcam 公司, 货号为 ab100772、ab100785、ab150077、ab181602、ab151549、ab138364、ab179463、ab38449; BCA 试剂盒、HE 染色试剂盒、RIPA 裂解液购自上海碧云天公司, 货号为 P0011、C0105、P0013K 等。CM3050 S 切片机购自德国徕卡公司; SMZ745 光学显微镜购自日本尼康公司; F30400-60 灰化炉购自赛默飞世尔科技公司; MX-0580-骨科生物力学测试仪购自江苏摩信工业系统有限公司; XELx800 酶标仪购自美国 Perkin Elmer 公司; 1659001 蛋白电泳仪及 Trans-Blot Turbo 转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司; Centrifuge 5424R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 股份公司; GIS-500 凝胶成像仪购自 Miulab 公司等。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制备及分组给药:** 参考文献[9], 以腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠溶液的方法麻醉 SD 大鼠, 剂量为 45 mg/kg, 将麻醉后的大鼠俯卧固定于鼠板, 消毒、备皮后, 经背部正中切开口腹腔, 分离移除双侧卵巢, 接着止血、缝合后消毒, 术后肌肉注射青霉素预防感染, 每天一次, 连续 3 d。3 个月后, 检测骨组织形态学变化, 出现骨小梁稀疏断裂、数目明显减少, 有较多空隙、不能连接成网等病理损伤, 表明模型制备成功。共建模 52 只, 成功 48 只, 随机分为模型组、LY294002 (PI3K/Akt 通路抑制剂) 组、红景天苷组、红景天苷+LY294002 组, 每组 12 只, 另

取 12 只仅做切口后缝合处理,设为假手术组。红景天苷组大鼠以  $25 \text{ mg/kg}^{[10]}$  的剂量肌肉注射红景天苷,同时以  $0.3 \text{ mg/kg}^{[11]}$  的剂量尾静脉注射生理盐水;LY294002 组大鼠以  $0.3 \text{ mg/kg}$  的剂量尾静脉注射 LY294002,同时以  $25 \text{ mg/kg}$  的剂量肌肉注射生理盐水;红景天苷+LY294002 组大鼠以  $25 \text{ mg/kg}$  的剂量肌肉注射红景天苷,同时以  $0.3 \text{ mg/kg}$  的剂量尾静脉注射 LY294002;假手术组与模型组大鼠以  $0.3 \text{ mg/kg}$  的剂量进行尾静脉注射生理盐水,同时以  $25 \text{ mg/kg}$  的剂量进行肌肉注射生理盐水,每天一次,持续 21 d。

**1.2.2 大鼠骨组织形态学检测和标本收集:**给药结束 24 h 后,以 5 mL 注射器从尾静脉取血 2 mL,静置 10 min,离心得到血清,于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中储存备用;麻醉后处死大鼠,取出大鼠两侧股骨,去除附着组织,以生理盐水漂洗干净,将右侧股骨备用;将左侧股骨截断后,以刮匙刮取断面处骨组织约  $0.5 \text{ g}$  于液氮中储存备用。然后以 4% 多聚甲醛溶液固定左侧股骨远端组织,并将其依次置于梯度乙醇(从低浓度到高浓度)中脱水,再经二甲苯透明、石蜡包埋后进行切片,得到不脱钙骨组织常规病理切片,选取完好典型的切片,做脱蜡、高浓度到低浓度乙醇浸泡处理,参照试剂盒说明书的操作步骤进行 HE 染色,再一次做脱水、透明处理后封片,采用普通光学显微镜观察骨组织形态,任选 5 个视野采集图像。

**1.2.3 大鼠右侧股骨骨生物力学检测:**通过骨科生物力学测试仪测定右侧股骨骨生物力学,将股骨水平放置在测试仪的两个支撑点上,跨度为  $20 \text{ mm}$ ,下压探头至股骨中段直至其断裂,加载速率为  $10 \text{ mm/min}$ ,同时避开股骨上微小的裂缝,以仪器自带的软件记录并分析数据,得出骨生物力学指标弹性模量、最大载荷、屈服载荷的数值。

**1.2.4 大鼠骨矿盐含量检测:**将之前取得的股骨置于烤箱烘烤至恒重,称量得出干重,然后转移至灰化炉中灰化 36 h,温度为  $650^\circ\text{C}$ ,取出灰分称量得到灰分重量,骨矿盐含量=灰分重量/干重。

**1.2.5 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平检测:**将储存备用的血清提前放置在  $4^\circ\text{C}$  冰箱解冻,以大鼠 ELISA 试剂盒检测其中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,具体步骤参照说明书进行。

**1.2.6 大鼠骨组织 PI3K/Akt 通路蛋白表达检测:**将储存备用的骨组织经剪碎后置于蛋白裂解液中,冰水浴中匀浆,获得匀浆液,离心提取总蛋白并测定其浓度,具体步骤参照 BCA 试剂盒说明书。加入蛋

白上样缓冲液,煮沸 5 min,进行变性,取含相同质量的各组总蛋白样品液上样,110 V 恒压电泳,分离蛋白,110 V 恒压湿转,转移全部蛋白至 PVDF 膜,使用 5% 脱脂奶粉室温孵育 2 h,做封闭处理,然后根据分子量截取目的蛋白条带,置于小盒中并做好标记,以稀释比均为 1:1 500 的兔源抗鼠 GAPDH、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 一抗在  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, TBST 溶液漂洗 3 次,将条带置于稀释比为 1:2 000 的羊抗兔二抗溶液中,在摇床上室温孵育 2 h, TBST 溶液漂洗 3 次,经增强化学发光法显色,以凝胶成像系统拍照,采集蛋白条带的图像并以 Quantity One 软件进行分析,得出蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件统计分析数据,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$ ,表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠骨组织形态学变化

对照组大鼠骨组织形态正常,模型组大鼠骨组织呈现骨小梁稀疏断裂、数目明显减少,有较多空隙、不能连接成网等病理损伤。与模型组相比,红景天苷组大鼠骨组织病理损伤减轻,LY294002 组大鼠骨组织病理损伤加重。与 LY294002 组相比,红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织病理损伤减轻。与红景天苷组相比,红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织病理损伤加重。见图 1。

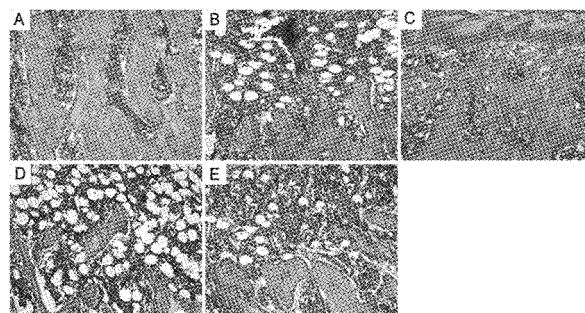


图 1 HE 染色检测各组大鼠骨组织形态学

**Fig.1** The bone histomorphology was detected by HE staining  
注:A:假手术组;B:模型组;C:红景天苷组;D:LY294002 组;E:红景天苷+LY294002 组。

### 2.2 各组大鼠骨生物力学比较

与假手术组相比,模型组大鼠股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比,红景天苷组大鼠股骨弹性模量、最大载荷、屈服

载荷升高 ( $P < 0.05$ ), LY294002 组大鼠股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷降低 ( $P < 0.05$ )。与 LY294002 组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷升高 ( $P < 0.05$ )。与红景天苷组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠骨生物力学指标 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Biomechanical indexes of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别              | 弹性模量/EM                       | 最大载荷/N                   | 屈服载荷/N                   |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组            | 3 123.68±301.16               | 36.54±2.29               | 63.53±5.26               |
| 模型组             | 2 428.17±238.36 <sup>a</sup>  | 20.03±2.15 <sup>a</sup>  | 42.04±4.34 <sup>a</sup>  |
| 红景天苷组           | 3 114.73±290.98 <sup>b</sup>  | 35.97±3.82 <sup>b</sup>  | 62.73±5.38 <sup>b</sup>  |
| LY294002 组      | 1 876.21±243.35 <sup>b</sup>  | 9.12±1.83 <sup>b</sup>   | 35.28±5.03 <sup>b</sup>  |
| 红景天苷+LY294002 组 | 2 421.82±240.03 <sup>cd</sup> | 19.82±2.04 <sup>cd</sup> | 41.72±4.68 <sup>cd</sup> |

注: 与假手术组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与红景天苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LY294002 组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 各组大鼠骨矿盐含量比较

与假手术组相比, 模型组大鼠骨矿盐含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 红景天苷组大鼠骨矿盐含量升高 ( $P < 0.05$ ), LY294002 组大鼠骨矿盐含量降低 ( $P < 0.05$ )。与 LY294002 组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠骨矿盐含量升高 ( $P < 0.05$ )。与红景天苷组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠骨矿盐含量降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠骨矿盐含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Bone mineral content of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别              | 骨矿盐含量                   |
|-----------------|-------------------------|
| 假手术组            | 0.38±0.07               |
| 模型组             | 0.21±0.05 <sup>a</sup>  |
| 红景天苷组           | 0.37±0.08 <sup>b</sup>  |
| LY294002 组      | 0.12±0.03 <sup>b</sup>  |
| 红景天苷+LY294002 组 | 0.20±0.06 <sup>cd</sup> |

注: 与假手术组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与红景天苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LY294002 组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.4 各组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 水平比较

与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 红景天苷组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低 ( $P < 0.05$ ), LY294002 组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 LY294002 组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低 ( $P < 0.05$ )。与红景天苷组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Serum IL-6, TNF- $\alpha$  levels of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别              | IL-6/(pg/mL)             | TNF- $\alpha$ /(pg/mL)   |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组            | 33.93±2.07               | 36.93±2.13               |
| 模型组             | 77.65±4.82 <sup>a</sup>  | 82.52±5.07 <sup>a</sup>  |
| 红景天苷组           | 35.57±2.23 <sup>b</sup>  | 38.12±2.43 <sup>b</sup>  |
| LY294002 组      | 108.86±6.98 <sup>b</sup> | 118.67±6.41 <sup>b</sup> |
| 红景天苷+LY294002 组 | 78.89±5.45 <sup>cd</sup> | 83.73±5.97 <sup>cd</sup> |

注: 与假手术组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与红景天苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LY294002 组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.5 各组大鼠骨组织 PI3K/Akt 通路蛋白表达比较

与假手术组相比, 模型组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 红景天苷组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 升高 ( $P < 0.05$ ), LY294002 组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 降低 ( $P < 0.05$ )。与 LY294002 组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 升高 ( $P < 0.05$ )。与红景天苷组相比, 红景天苷+LY294002 组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt ( $P < 0.05$ )。见图 2、表 4。

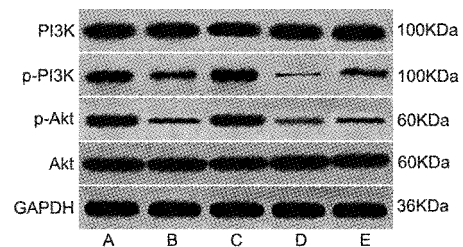


图 2 各组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白免疫印迹检测结果

Fig.2 Western blotting results of PI3K/Akt pathway protein in bone tissue of rats in each group

注: A: 假手术组; B: 模型组; C: 红景天苷组; D: LY294002 组; E: 红景天苷+LY294002 组。

表 4 各组大鼠骨组织中 PI3K/Akt 通路蛋白相对表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 The relative expression of PI3K/Akt pathway protein in bone tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别              | p-PI3K/PI3K             | p-Akt/Akt               |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组            | 0.83±0.12               | 0.74±0.11               |
| 模型组             | 0.36±0.06 <sup>a</sup>  | 0.35±0.08 <sup>a</sup>  |
| 红景天苷组           | 0.81±0.13 <sup>b</sup>  | 0.72±0.14 <sup>b</sup>  |
| LY294002 组      | 0.09±0.02 <sup>b</sup>  | 0.16±0.04 <sup>b</sup>  |
| 红景天苷+LY294002 组 | 0.34±0.07 <sup>cd</sup> | 0.36±0.10 <sup>cd</sup> |

注: 与假手术组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与红景天苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 LY294002 组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。



### 3 讨论

中国 PMOP 的发病率逐年递增,严重危害妇女的身心健康,给患者家庭及社会造成极大负担,因而对 PMOP 的防治具有重要的临床意义<sup>[13-14]</sup>。本研究通过摘除卵巢建立 PMOP 大鼠模型,结果显示,建模大鼠骨组织呈现骨小梁稀疏断裂、数目明显减少,有较多空隙、不能连接成网等病理损伤,血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平显著升高,股骨弹性模量、最大载荷、屈服载荷、骨矿盐含量均显著降低,表明去除大鼠卵巢可促使炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6<sup>[15]</sup> 大量合成释放,引起炎症反应,使骨矿化降低,破坏骨生物学,损伤骨组织,揭示模型建立成功。

临床防治 PMOP 的常用药物为雌激素及孕激素,两者单独或联合使用能恢复骨代谢平衡,提高骨密度,改善骨质疏松症状,但长期使用可能导致子宫内膜增生、乳腺癌、肺栓塞、冠心病等副作用,因而寻找较为安全的中药是治疗 PMOP 的新思路<sup>[16]</sup>。中医理论认为,女性进入绝经期后,脾肾亏虚功能渐衰,进而导致骨量丢失,防治 PMOP 应以益气健脾、补肾壮骨为主<sup>[10]</sup>。红景天是补益脾肾药中上品,可理气补肾,补诸不足,其活性成分红景天苷能显著促进人成骨样 MG-63 细胞增殖及成骨分化,并可促进骨形成,抑制骨吸收,缓解糖尿病性骨质疏松大鼠牙槽骨丢失,对包括 PMOP 在内的各种骨质疏松均有较好的疗效<sup>[5,17-18]</sup>,但其药理机制目前还未研究清楚。PI3K/Akt 通路可调控细胞代谢、凋亡及分化、炎症、血管形成等多种生理病理过程,对骨代谢平衡也具有关键的调控作用,激活 PI3K/AKT 信号可诱导成骨细胞表达 VEGF,促使血管生成,并可促进成骨前体细胞增殖及成骨分化,增强骨形成,提高骨密度,进而改善骨质疏松症状<sup>[19-20]</sup>,因此推测红景天苷可能通过调控 PI3K/Akt 通路改善 PMOP 的临床症状。本研究结果表明,红景天苷可激活 PI3K/Akt 信号,减轻 PMOP 大鼠骨组织病理损伤,降低血清炎症因子水平,提高骨矿盐含量,改善骨生物学。以 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 及红景天苷联合处理 PMOP 大鼠后,结果显示,大鼠骨组织病理损伤比单独应用红景天苷重,但比单独应用 LY294002 轻;血清 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平比单独应用红景天苷高,但比单独应用 LY294002 低;骨生物学指标弹性模量、最大载荷及屈服载荷、骨矿盐含量比单独应用红景天苷低,但比单独应用 LY294002 高,表明红景天苷对 PMOP 大鼠骨组织病理损伤、

炎症、骨矿化水平低及骨生物力学低等临床症状的改善作用,可被 PI3K/Akt 通路抑制剂阻断。揭示激活 PI3K/Akt 通路,进而抑制炎症反应,可能是红景天苷改善 PMOP 临床症状的药理机制之一。

综上所述,红景天苷可能通过上调 PI3K/Akt 通路活化,阻止炎症发生发展,促使骨矿化,提高骨生物学,减轻 PMOP 大鼠骨组织损伤,改善其临床症状,对 PMOP 的临床治疗具有一定的参考价值。红景天苷及 PI3K/Akt 信号不仅可调控炎症的发生发展,也可介导血管新生、成骨分化等过程,但本研究未对此进行详细探讨,且对其药物毒副作用等情况也未进行相关评价,存在一定不足。因而,关于红景天苷防治 PMOP 准确完整的药理机制和对其毒副作用的探讨还有待后续深入研究。

### 【参 考 文 献】

- [1] Sulekha A, Dharmendra C, Naseer A, et al. Dried and free flowing granules of *Spinacia oleracea* accelerate bone regeneration and alleviate postmenopausal osteoporosis [J]. *Menopause*, 2017, 24(6):686-698.
- [2] Fei Q, Bai XD, Lin JH, et al. Identification of aberrantly expressed long non-coding RNAs in postmenopausal osteoporosis [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(6):3537-3550.
- [3] Torre C, Guerreiro J, Mendes Z, et al. Low persistence with oral bisphosphonate treatment in postmenopausal osteoporosis [J]. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 2019, 44(2):114-125.
- [4] 沈新升, 陈鸥, 赖宽良, 等. 红景天苷对诱导的成骨细胞在低氧环境中的保护作用 [J]. *温州医科大学学报*, 2018, 49(3):179-183.
- [5] 杨浩侠, 杨洋, 薛鹏, 等. 龟鹿胶、淫羊藿及红景天对骨质疏松大鼠骨密度及破骨细胞的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(15):2669-2676.
- [6] Al-Daghri NM, Aziz I, Yakout S, et al. Inflammation as a contributing factor among postmenopausal Saudi women with osteoporosis [J]. *Medicine*, 2017, 96(4):e5780-e5785.
- [7] Pan S, Wan L, Shao W, et al. Huangjiao granules ameliorate brain injury in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury by stimulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2017, 33(12):1635-1639.
- [8] 谢丽华, 陈娟, 谢冰颖, 等. miRNA 在绝经后骨质疏松症肾阴虚证中的表达谱特征及生物信息学分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(6):37-42.
- [9] Liu X, Tu Y, Zhang L, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors protect from the bone loss in ovariectomy rats by increasing bone vascularity [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 69(1):141-149.

(下转第 1146 页)

- [12] 何培亮,李爱国,彭涛,等.中国南方与北方地区 2013-2018 年骨质疏松流行病学对比分析[J].中华老年病研究电子杂志, 2020,7(1):31-35.
- [13] 张景岳.景岳全书[M].太原:山西科学技术出版社,2006:203.
- [14] 彭锐,李静,李佳,等.温针灸对膝关节大鼠软骨组织 ROCK/LIMK1/Cofilin 通路的影响[J].针刺研究,2020,45(2):105-110.
- [15] 窦报敏,章明星,李鑫举,等.基于数据挖掘的电针治疗骨质疏松症腧穴谱及刺激参数研究[J].时珍国医国药,2020,31(8):2037-2039.
- [16] 魏科祥,张璇,曹华.电针肾俞、足三里联合滋肾强骨汤对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织和血清 GH/IGF-1 系统的影响[J].针灸临床杂志,2019,35(11):74-77.
- [17] 张楚穹,石娜,欧阳钢.针刺对去卵巢大鼠骨密度及肠黏膜跨膜钙转运相关受体表达的影响[J].针刺研究,2020,45(9):702-707.
- [18] 原淳淳,艾尔扎提·艾尔宝,赵英侠,等.去卵巢大鼠全身肌肉、脂肪和雌二醇含量与骨密度的相关性及补肾健脾穴位针刺的调节作用[J].中华中医药杂志,2020,35(1):434-436.
- [19] 金俊健.电针刺激后大鼠血清对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 及其蛋白表达的影响[J].上海针灸杂志,2019,38(7):798-802.
- [20] 张鹏,罗伟.从虚瘀论治对骨质疏松骨代谢指标 PINP、CTX 影响的研究[J].吉林中医药,2018,38(9):1024-1026.
- [21] 陈宇宁,魏鹏,丁怡,等.唑来膦酸联合碳酸钙 D3 及阿法骨化醇对老年高血压合并骨质疏松患者血清 CTX、PINP、OC 及炎症因子的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(15):3703-3706.
- [22] 潘小燕,王鸿度,岳荣超,等.电针足少阳经穴对去卵巢大鼠骨质疏松症骨组织 OPG、RANKL 及 CBF $\alpha$ 1 mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(11):5132-5134.
- [23] 刘宇彤,金侠,贾丹宁,等.绝经后女性维生素 D 和骨钙素水平与代谢综合征的关系[J].新疆医科大学学报,2020,43(2):187-192.
- [24] 王亚军,张来举,浪万英,等.电针对去卵巢大鼠 Wnt3a 和  $\beta$ -catenin 的基因及蛋白表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(1):6-11.
- [25] 邵雨薇,舒晴,刘若兰,等.基于组蛋白去乙酰化酶 2 介导的成骨细胞分化通路探讨电针治疗骨质疏松症的效应机制[J].针刺研究,2020,45(6):438-445.
- [26] Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, et al. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. [J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 2009, 19(2):109-124.
- [27] Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, et al. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR $\gamma$  and adiponectin [J]. Journal of Cellular Physiology, 2010, 225(3):837-845.
- [28] Hoshida T, Kawazoe N, Chen G. The balance of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by matrices that mimic stepwise tissue development [J]. Biomaterials, 2012, 33(7):2025-2031.
- [29] Ostrowska Z, Ziora K, O? wicimska J, et al. TGF- $\beta$ 1, bone metabolism, osteoprotegerin, and soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in girls with anorexia nervosa [J]. Endokrynologia Polska, 2016, 67(5):493-500.
- [30] Sun X, Liu J, Zhuang C, et al. Aluminum trichloride induces bone impairment through TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway [J]. Toxicology, 2016:49-57.

(收稿日期:2021-03-08;修回日期:2021-03-28)

## (上接第 1139 页)

- [10] 董万涛,巩彦龙,宋敏,等.固本增骨方对卵巢切除模型大鼠骨代谢和骨微结构的影响[J].四川大学学报(医学版), 2019, 50(5):679-683.
- [11] 凌卓彦,吴蕾,史高龙,等.红景天苷对骨折愈合 Runt 相关转录因子 2 调控机制研究[J].中华实验外科杂志,2016,33(5):1292-1294.
- [12] 胡洪凭,张洪凯,吴滨.丙泊酚通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对脑外伤大鼠的神经保护作用[J].中国药师,2019,22(7):1215-1219.
- [13] Danielle LM, Thomas JK, Kristina GB, et al. Reduced bone loss in a murine model of postmenopausal osteoporosis lacking complement component 3 [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2017, 36(1):118-128.
- [14] Yilmaz H, Uyun M, Yilmaz TS, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio may be superior to C-reactive protein for predicting the occurrence of postmenopausal osteoporosis [J]. Endocrine Regulations, 2014, 48(1):25-33.
- [15] Xu H, Qin W, Hu X, et al. Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1):83-99.
- [16] Sheng Y, Tang J, Ren K, et al. Integrative computational approach to evaluate risk genes for postmenopausal osteoporosis [J]. IET Systems Biology, 2018, 12(3):118-122.
- [17] 梅国华,郭小芹,陈京京,等.红景天苷对成骨细胞的作用及相关分子机制研究[J].口腔医学研究,2017,33(9):9-12.
- [18] 郑红星,黄洁茹,祁珊珊,等.红景天提取物对糖尿病大鼠牙槽骨丢失的保护作用[J].中国药理学通报,2019,35(6):115-118.
- [19] Liu XD, Cai F, Liu L, et al. microRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation [J]. Biological Chemistry, 2015, 396(4):339-347.
- [20] Zhou RP, Lin SJ, Wan WB, et al. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt pathway in ovariectomized rats [J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0166751-e0166769.

(收稿日期:2020-09-09;修回日期:2020-11-12)