

补骨脂素对绝经后大鼠骨质疏松及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响^Δ

陈露华^{1*}, 唐宏宇²(1.广州中医药大学第一附属医院药房, 广州 510405; 2.广州中医药大学第一附属医院三骨科, 广州 510405)

中图分类号 R683;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)06-0697-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.06.09

摘要 目的:研究补骨脂素对绝经后大鼠骨质疏松及磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。方法:将60只健康雌性SD大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组(0.09 mg/kg雌二醇)和补骨脂素低、中、高剂量组(22、44、88 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均采用卵巢摘除去势法建立绝经后骨质疏松模型。术后正常饲养2个月,正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,各药物组大鼠灌胃相应药液;灌胃体积均为0.005 mL/g,每天1次,连续98天。末次给药24 h后,测定大鼠右侧下肢股骨和椎骨的骨密度,血清中钙离子、骨钙素、I型前胶原N端前肽(P1NP)含量和骨形态发生蛋白2(BMP2)、血管内皮生长因子(VEGF)水平,以及股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA及蛋白的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠股骨和椎骨的骨密度以及血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量和BMP2、VEGF水平均显著降低,PI3K、Akt、mTOR mRNA及蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,补骨脂素中、高剂量组和阳性对照组大鼠股骨和椎骨的骨密度以及血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量和BMP2(补骨脂素中剂量组除外)、VEGF(补骨脂素中剂量组除外)水平均显著升高,各药物组PI3K、Akt、mTOR mRNA(补骨脂素低剂量组除外)及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且高剂量组股骨骨密度和钙离子、BMP2水平以及PI3K蛋白表达水平均显著高于阳性对照组($P<0.05$),mTOR mRNA表达水平显著低于阳性对照组($P<0.05$)。结论:补骨脂素可改善绝经后大鼠的骨质疏松,其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

关键词 补骨脂素;绝经后骨质疏松症;磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路;大鼠

Effect of Psoralen on Osteoporosis in Postmenopausal Rats and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

CHEN Luhua¹, TANG Hongyu²(1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405; 2. Third Dept. of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effect of psoralen on osteoporosis in postmenopausal rats and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **METHODS:** Totally 60 healthy female SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group (0.09 mg/kg estradiol), psoralen low-dose, medium-dose and high-dose groups (22, 44, 88 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for normal group, the other groups were ovariectomized to establish Postmenopausal osteoporosis model. After 2 months of normal feeding after operation, normal group and model group were given the constant volume of normal saline intragastrically, and administration groups were given the corresponding solution intragastrically; the volume was 0.005 mL/g, once a day, for consecutive 98 days. 24 h after last administration, the BMD of femur and vertebra of right lower extremities in rats was determined. The contents of serum calcium, osteocalcin and P1NP, the serum levels of BMP2 and VEGF were determined; mRNA and protein expression of PI3K, Akt and mTOR in femur tissue were detected. **RESULTS:** Compared with normal group, BMD of femur and vertebra, serum contents of calcium, osteocalcin, P1NP and serum levels of BMP2, VEGF in model group were decreased significantly, while the mRNA and protein expression of PI3K, Akt and mTOR were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, BMD of femur and vertebra, serum levels of calcium, osteocalcin, P1NP and serum levels of BMP2 (except for psoralen medium-dose group), VEGF (except for psoralen medium-dose group) were increased significantly in psoralen medium-dose and high-dose groups, positive control group, while the mRNA expression (except for psoralen low-dose group) and protein expression of PI3K, Akt and mTOR in administration groups were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); BMD of femur, serum levels of calcium, BMP2 and PI3K protein expression in psoralen high-dose group were significantly higher than positive control group ($P<0.05$), and mTOR mRNA expression in psoralen high-dose group was significantly lower than positive control group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** Psoralen can improve osteoporosis in postmenopausal rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774339);广东省中医药管理局项目(No.20191099)

* 药师。研究方向:中药药理学。E-mail:952458566@qq.com

KEYWORDS Psoralen; Postmenopausal osteoporosis; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Rat

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种常发生于绝经后5~10年且以高度脆性和结构破坏为特征的代谢性骨病^[1]。PMOP的发生常归因于绝经后的雌激素缺乏,由于雌激素对破骨细胞的抑制作用减弱,骨吸收功能强于骨形成,造成骨重建失衡,从而导致骨强度下降^[2]。据估计,30%~50%的绝经后妇女患有这种疾病,且随着人口老龄化加剧,PMOP的卫生经济负担成倍增加,已成为一个重要的公共卫生问题^[3-4]。近年来发现,自噬与PMOP的发生发展密切相关:自噬是细胞通过溶酶体将受损的细胞器、错误折叠的蛋白质及其他大分子物质等降解并再利用的自我保护机制,可通过减轻氧化应激所致的细胞损伤来延缓、减轻骨量的丢失^[5-6]。中药补骨脂具有补肾助阳壮骨等功效,其有效成分补骨脂素近年来多被临床报道用于治疗骨质疏松症^[7]。研究发现,激活的磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路可促进细胞存活、生长和增殖,与雌激素通路有多处相交且有相互促进的作用,共同影响骨代谢^[8]。基于此,本文研究了补骨脂素对绝经后大鼠骨质疏松及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响,旨在为阐明其抗骨质疏松作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括IX81型透射电子显微镜(德国Leica公司)、3K15型低温高速离心机(美国Sigma公司)、ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)、AX-II型凝胶成像仪(美国Life Technology公司)、Dexa Pro-1型双能X射线骨密度仪(美国GE公司)和680型全自动酶标仪、PowerPac Basic型电泳仪、BT25S型天平(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

补骨脂素原料药(批号1202133231,纯度98%)购自广东晶欣生物科技有限公司,戊酸雌二醇片(阳性对照,批号20198876,规格2 mg/片)购自廊坊高博京邦制药有限公司,10%水合氯醛(批号20191204)购自天津市大茂化学试剂厂,青霉素注射液(批号2019153651253,规格160万单位/支)购自河南省中农康畜贸易有限公司,血清钙离子、骨钙素、I型前胶原N端前肽(P1NP)、骨形态发生蛋白2(BMP2)、血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、Trizol试剂、RIPA蛋白裂解液(批号ZN2798450、ZN27841224、ZN27629852、ZN27637841、ZN25725730、ZN13613654、ZN45845518)均购自美国Invitrogen公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、PCR试剂盒、BCA蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL试剂盒(批号HGEB45416、HGEB45518、HGEB48760、HGEB76375、HGEB98421)均购自美国Sigma公司,山羊抗大鼠PI3K、Akt、mTOR多克隆抗体(一抗)和辣根过氧

化物酶(HRP)标记山羊抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)抗体(二抗)、逆转录试剂盒(批号GGSKCqwes7758、GGSKCqwes8932、GGSKCqwes5524、GGSKCqwe7643、GGSKCqwes7365)均购自广州欧慕生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级成年SD大鼠60只,雌性,体质量200~280 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2019-0047。本研究方案通过广州中医药大学动物实验中心伦理委员会批准。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

所有大鼠适用性喂养2周后,随机分为正常组、模型组、阳性对照组(0.09 mg/kg雌二醇^[9])和补骨脂素低、中、高剂量组(22、44、88 mg/kg,给药剂量根据前期预实验结果设置),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均采用卵巢摘除去势法建立PMOP模型^[10]。首先将大鼠麻醉(腹腔注射10%水合氯醛溶液),然后在其第4腰椎横突0.5 cm左右处纵深剖离约1.2 cm,切除双侧卵巢,同时腹腔注射青霉素(每天10万单位,每天1次,连续3天)以预防感染。术后大鼠正常饲养2个月,正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,各药物组大鼠灌胃相应药液(均以生理盐水为溶剂),灌胃体积均为0.005 mL/g,每天1次,连续给药98天。

2.2 大鼠股骨、椎骨骨密度的检测

末次给药24 h后,各组大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液麻醉,将其右股骨、椎骨部位放在双能X射线骨密度仪上检测股骨、椎骨骨密度。

2.3 大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量和BMP2、VEGF水平的检测

采用ELISA法进行检测。末次给药2 h后,于大鼠腹主动脉取血3 mL,放置1.5 h后,以4 000 r/min离心12 min,分离上层血清,严格按照试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪检测血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量和BMP2、VEGF水平。

2.4 大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。大鼠取血后处死,取其左侧股骨洗净,取部分骨片,采用Trizol法提取总RNA,按试剂盒说明书方法操作,将总RNA逆转录合成cDNA,行PCR扩增。反应体系(共20 μ L)包括cDNA模板4 μ L,上、下游引物各2 μ L,SYBR荧光染料10 μ L,无核酸酶水2 μ L。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min(共40个循环)。以GAPDH为内参,生成扩增曲线和熔解曲线,使用Image J v1.5.1软件分析并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算PI3K、Akt、mTOR mRNA的表达水平。PI3K、Akt、mTOR的引物序列及产物长度见表1。

表1 PI3K、Akt、mTOR的引物序列及产物长度

Tab 1 PI3K, Akt, mTOR primer sequence and product length

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
PI3K	上游: CAAAGCCGAGAACCTATTGC	220
	下游: TTGAGGGAGTCATTGTGCTG	
Akt	上游: TGGACTACTTGCCTCCGAG	235
	下游: CGCAGAAGCTTTCATGGTG	
mTOR	上游: TGGCTTCTAAGTCTACCACGACAG	221
	下游: GAGGTCCIGACATTCCTGATT	
GAPDH	上游: TCCCTGTCAAGCAGTATCC	321
	下游: TCCTCTGGCTTTGTCTC	

2.5 大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取大鼠股骨组织适量,研磨后,用RIPA蛋白裂解液进行裂解,以12 000 r/min离心12 min,取上清液,使用BCA蛋白含量检测试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白,煮沸10 min变性;取变性后的蛋白适量,行SDS-PAGE后转膜,封闭2 h,洗膜5 min,分别加入山羊抗大鼠PI3K、Akt、mTOR一抗(稀释度均为1:1 000),于4℃下孵育过夜;洗膜5 min,加入二抗(稀释度为1:200),室温孵育1 h;以ECL显色,置于凝胶成像仪上成像并采用Image J v1.5.1软件处理分析,以目标蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带的灰度比值作为目标蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨、椎骨骨密度的影响

与正常组比较,模型组大鼠股骨、椎骨骨密度均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,补骨脂素中、高剂量组和阳性对照组大鼠股骨、椎骨骨密度均显著升高($P < 0.01$)。与补骨脂素低剂量组比较,补骨脂素高剂量组和阳性对照组大鼠股骨、椎骨骨密度均显著升高($P < 0.01$)。与阳性对照组比较,补骨脂素高剂量组大鼠股骨骨密度显著升高($P < 0.05$),而椎骨骨密度差异无统计学意义($P > 0.05$)。补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨、椎骨骨密度的影响见表2。

3.2 补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,补骨脂素中、高剂量组和阳性对照组大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量均显著升高($P < 0.05$)。与补骨脂素低剂量组比较,补骨脂素高剂量组和阳性对照组大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量均显著升高($P < 0.05$)。

表2 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨、椎骨骨密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10, g/cm^3$)

Tab 2 Effects of psoralen on BMD of femur and vertebrae of PMOP model rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10, g/cm^3$)

组别	股骨	椎骨
正常组	0.50 ± 0.04	0.36 ± 0.02
模型组	0.24 ± 0.03**	0.18 ± 0.03**
补骨脂素低剂量组	0.30 ± 0.05	0.32 ± 0.01
补骨脂素中剂量组	0.39 ± 0.05 [#]	0.46 ± 0.01 [#]
补骨脂素高剂量组	0.51 ± 0.04 ^{#ΔΔ}	0.53 ± 0.04 ^{#ΔΔ}
阳性对照组	0.42 ± 0.02 ^{#ΔΔ}	0.54 ± 0.01 ^{#ΔΔ}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与补骨脂素低剂量组比较,^Δ $P < 0.01$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.01$; vs. psoralen low-dose group, ^Δ $P < 0.01$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$

与阳性对照组比较,补骨脂素高剂量组大鼠血清中钙离子含量显著升高($P < 0.05$),而骨钙素、P1NP含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量的影响见表3。

表3 补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中钙离子、骨钙素、P1NP含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Effects of psoralen on serum contents of calcium ion, osteocalcin and P1NP in PMOP model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	钙离子, mmol/L	骨钙素, μg/mL	P1NP, μg/mL
正常组	2.31 ± 0.15	155.64 ± 10.71	332.35 ± 21.21
模型组	0.78 ± 0.22**	113.26 ± 13.50**	222.13 ± 23.41**
补骨脂素低剂量组	0.91 ± 0.29	125.19 ± 18.95	243.54 ± 28.47
补骨脂素中剂量组	1.34 ± 0.45 [#]	136.12 ± 17.64 [#]	313.42 ± 22.35 [#]
补骨脂素高剂量组	2.17 ± 0.37 ^{#Δ}	148.58 ± 16.42 ^{#Δ}	273.76 ± 26.56 ^{#Δ}
阳性对照组	1.89 ± 0.32 ^{#Δ}	143.41 ± 12.98 ^{#Δ}	279.63 ± 25.36 ^{#Δ}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与补骨脂素低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. psoralen low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中BMP2和VEGF水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中BMP2和VEGF水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组和补骨脂素低剂量组比较,补骨脂素高剂量组和阳性对照组大鼠血清中BMP2和VEGF水平均显著升高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,补骨脂素高剂量组大鼠血清中BMP2水平显著升高($P < 0.05$),而VEGF水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中BMP2和VEGF水平的影响见表4。

3.4 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA的表达水平均显著升高($P < 0.01$)。与模

表4 补骨脂素对PMOP模型大鼠血清中BMP2和VEGF水平的影响($\bar{x} \pm s, n=22, \mu\text{g/mL}$)

Tab 4 Effects of psoralen on serum levels of BMP2 and VEGF in PMOP model rats ($\bar{x} \pm s, n=22, \mu\text{g/mL}$)

组别	BMP2	VEGF
正常组	2.86 ± 0.48	2.84 ± 0.45
模型组	1.32 ± 0.18**	1.43 ± 0.17**
补骨脂素低剂量组	1.44 ± 0.24	1.50 ± 0.25
补骨脂素中剂量组	1.57 ± 0.35	1.62 ± 0.34
补骨脂素高剂量组	2.53 ± 0.39 ^{ΔΔ}	2.61 ± 0.37 ^{ΔΔ}
阳性对照组	2.23 ± 0.36 ^Δ	2.59 ± 0.29 ^Δ

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与补骨脂素低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. psoralen low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. positive control group, [▲] $P < 0.05$

型组比较,补骨脂素中、高剂量组和阳性对照组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与补骨脂素低剂量组比较,补骨脂素高剂量组和阳性对照组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,补骨脂素高剂量组大鼠股骨组织中mTOR mRNA的表达水平显著降低($P < 0.05$),而PI3K、Akt mRNA的表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达的影响见表5。

表5 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Effects of psoralen on mRNA expression of PI3K, Akt and mTOR in femur tissue of PMOP model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	PI3K	Akt	mTOR
正常组	0.48 ± 0.05	0.53 ± 0.07	0.76 ± 0.08
模型组	1.25 ± 0.23**	1.31 ± 0.27**	1.36 ± 0.23**
补骨脂素低剂量组	1.13 ± 0.25	1.23 ± 0.25	1.21 ± 0.27
补骨脂素中剂量组	0.99 ± 0.17 [#]	1.21 ± 0.23 [#]	1.03 ± 0.11 [#]
补骨脂素高剂量组	0.74 ± 0.16 ^{ΔΔ}	0.79 ± 0.26 ^{ΔΔ}	0.82 ± 0.16 ^{ΔΔ}
阳性对照组	0.78 ± 0.12 ^Δ	0.82 ± 0.12 ^Δ	1.07 ± 0.12 ^Δ

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与补骨脂素低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. psoralen low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. positive control group, [▲] $P < 0.05$

3.5 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,补骨脂素低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与补骨脂素低剂量组比较,补骨脂素中、高剂量组和阳性对照组大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR

蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,补骨脂素高剂量组大鼠股骨组织中PI3K蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$),而Akt、mTOR蛋白的表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达水平的影响见图1、表6。

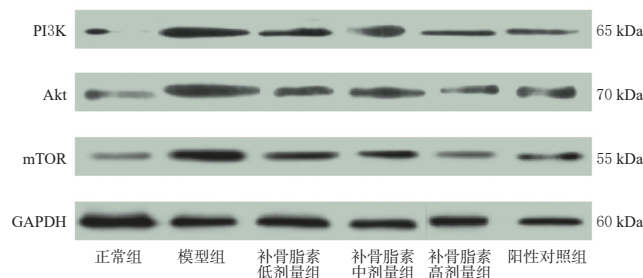


图1 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达影响的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the effects of psoralen on protein expression of PI3K, Akt and mTOR in femur tissue of PMOP model rats

表6 补骨脂素对PMOP模型大鼠股骨组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Effects of psoralen on protein expression of PI3K, Akt and mTOR in femur tissue of PMOP model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	PI3K	Akt	mTOR
正常组	2.35 ± 0.94	2.34 ± 0.97	2.59 ± 1.08
模型组	3.56 ± 1.25 [*]	3.38 ± 1.19 [#]	3.62 ± 1.27 [*]
补骨脂素低剂量组	3.32 ± 1.28 [#]	2.92 ± 1.11 [#]	3.45 ± 1.22 [#]
补骨脂素中剂量组	2.93 ± 1.14 ^{ΔΔ}	2.64 ± 1.25 ^{ΔΔ}	3.17 ± 1.23 ^{ΔΔ}
补骨脂素高剂量组	1.97 ± 1.23 ^{ΔΔ}	2.32 ± 1.19 ^{ΔΔ}	2.43 ± 1.52 ^{ΔΔ}
阳性对照组	1.88 ± 1.12 ^Δ	2.54 ± 1.19 ^Δ	2.86 ± 1.30 ^Δ

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与补骨脂素低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, [▲] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. psoralen low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. positive control group, [▲] $P < 0.05$

4 讨论

目前,治疗PMOP的化学药主要包括双膦酸盐、降钙素、选择性雌激素受体调节剂(如戊酸雌二醇)、甲状旁腺激素类似物等^[11-12]。但这些药物在临床使用中均有可能引发不良反应(如高钙血症、高磷血症)或造成其他风险^[13]。近年来,中医药通过“多成分、多途径、多靶点”的方式在PMOP的治疗中发挥了越来越大的作用^[14]。传统中药补骨脂具有补肾健骨的作用,研究发现补骨脂的有效成分补骨脂素作为一种天然植物雌激素,可改善骨质疏松模型小鼠骨代谢指标和股骨生物力学性能^[15],但其相关作用机制尚未阐明。

骨钙素和P1NP是反映全身性骨代谢变化的骨转换标志物,是反映成骨细胞功能状态的直接或间接产物^[16]。本研究结果表明,补骨脂素和戊酸雌二醇均可提高PMOP模型大鼠血清中骨钙素和P1NP的含量,且与

补骨脂素成剂量依赖性趋势。

维持骨重建过程中,骨形成与骨吸收的动态平衡是治疗PMOP的一个关键点^[17]。已有研究发现,PI3K/Akt/mTOR信号通路可调控成骨细胞和破骨细胞的活动^[18]。该通路是癌症中的经典生长调节途径,其中PI3K/Akt参与细胞增殖、迁移和存活等多种过程;mTOR是该PI3K/Akt途径下游的关键激酶,并可通过多种方式被PI3K激活^[19]。已有研究表明,骨组织中的BMP2等信号分子能够选择性激活PI3K/Akt途径中的相关基因,从而调控成骨细胞和破骨细胞的活动^[20-21]。抗骨质疏松药物雷奈酸锶可通过PI3K/Akt/mTOR信号通路促进成骨及血管生成^[22];白藜芦醇可通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调节线粒体吞噬作用来保护地塞米松处理的成骨细胞,同时抑制破骨细胞^[23]。以上均说明了PI3K/Akt/mTOR信号通路可影响骨形成与骨吸收。VEGF作为主要的血管形成因子之一,同时又是骨生长因子之一,在骨修复中也起着重要作用^[24]。本研究结果表明,补骨脂素和戊酸雌二醇均可上调PMOP模型大鼠血清中BMP2、VEGF的水平,下调其股骨组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA及蛋白的表达水平,且与补骨脂素成剂量依赖性趋势,补骨脂素高剂量组部分指标改善效果有优于戊酸雌二醇的趋势。

综上所述,补骨脂素可显著提高PMOP模型大鼠的骨密度、骨钙素等指标,改善绝经后大鼠的骨质疏松,其机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

参考文献

[1] MICHAËLSSON K, ASPENBERG P. Postmenopausal osteoporosis[J]. *New Engl J Med*, 2016, 374(21):2095.

[2] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南:2017[J].*中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(3):281-309.

[3] BARRIOS-MOYANO A, PEÑA-GARCÍA CDL. Prevalence of osteoporosis and osteopenia in patients occupationally active[J]. *Acta Ortop Mex*, 2018, 32(3):131-133.

[4] KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11):898-907.

[5] QI M, ZHANG L, MA Y, et al. Autophagy maintains the function of bone marrow mesenchymal stem cells to prevent estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. *Theranostics*, 2017, 7(18):4498-4516.

[6] 王伟舟,郭皓,袁勇.自噬在绝经后骨质疏松中作用的研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(12):1675-1680.

[7] 翟远坤,武祥龙,潘亚磊,等.补骨脂抗骨质疏松研究概况[J].*中医杂志*, 2012, 53(14):1244-1248.

[8] 张骋,徐西林,赵军,等.针刺调控雌激素及PI3K/AKT/mTOR通路改善绝经后骨质疏松症的研究进展[J].*辽宁中医药大学学报*, 2021[2021-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20210120.1549.004.html>.

[9] 徐众华,莫雨晴,周驰.基于BMP/Runx2/Osx信号通路研究淫羊藿总黄酮改善绝经后骨质疏松模型大鼠的作用机制[J].*中国药房*, 2020, 31(19):2333-2338.

[10] 巢传琦,蔡君,吕俊华.补骨方对去卵巢大鼠骨质疏松的

防治作用研究[J].*中药材*, 2015, 38(4):807-809.

[11] BRIOT K, ROUX C, THOMAS T, et al. 2018 update of French recommendations on the management of postmenopausal osteoporosis[J]. *Joint Bone Spine*, 2018, 85(5):519-530.

[12] TELLA SH, GALLAGHER JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142:155-170.

[13] KANIS JA, COOPER C, RIZZOLI R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Osteoporosis Int*, 2019, 30(1):3-44.

[14] AN J, YANG H, ZHANG Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: the effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation[J]. *Life Sci*, 2016, 147:46-58.

[15] 黄奎,邹季.补骨脂素对骨质疏松小鼠骨代谢指标和生物力学的影响[J].*生物骨科材料与临床研究*, 2017, 14(6):11-13.

[16] 中国医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.骨代谢生化标志物临床应用指南[J].*中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2015, 8(4):283-292.

[17] LU X, HAN W, LIU Y. Suppression of miR-451a accelerates osteogenic differentiation and inhibits bone loss via BMP6 signaling during osteoporosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120:109378.

[18] 陈亚辉,龚忠勤,崔燎. PI3K/Akt信号通路在骨质疏松病理过程中的作用[J].*中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(3):356-360.

[19] TATEISHI K, NAKAMURA T, JURATLI TA, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway alterations promote malignant progression and xenograft formation in oligodendroglial tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(14):4375-4387.

[20] GAN D, XU X, CHEN D, et al. Network pharmacology-based pharmacological mechanism of the chinese medicine rhizoma drynariae against osteoporosis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:5700-5716.

[21] AGAS D, SABBITI MG, MARCHETTI L, et al. FGF-2 enhances Runx-2/Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(11):2149-2158.

[22] GUO X, WEI S, LU M, et al. Dose-dependent effects of strontium ranelate on ovariectomy rat bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(12):1511-1522.

[23] YANG X, JIANG T, WANG Y, et al. The role and mechanism of sirt1 in resveratrol-regulated osteoblast autophagy in osteoporosis rats[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):18424.

[24] 纪经涛,胡永成,夏群,等.血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白在骨组织工程中的作用[J].*中国组织工程研究*, 2015, 19(33):5356-5363.

(收稿日期:2020-11-10 修回日期:2021-02-22)

(编辑:邹丽娟)