

## 鹿茸多肽对骨质疏松模型大鼠的改善作用及对SIRT1/FOXO1信号通路的影响

迟雪婷<sup>1</sup>, 黄晓巍<sup>1,2</sup>, 陈芳园<sup>1</sup>, 周高峰<sup>1</sup>, 王晋冀<sup>1</sup>, 律广富<sup>3</sup>, 林喆<sup>1</sup>, 龚庆<sup>4</sup>

(1. 长春中医药大学药学院临床药学与中药药理教研室, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学东北亚中医药研究院基础研究所, 吉林 长春 130117; 3. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院中药药理组, 吉林 长春 130117; 4. 长春中医药大学附属医院骨科中心, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** **目的:** 探讨鹿茸多肽(VAP)对骨质疏松(OP)模型大鼠的保护作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 60只12周龄SD大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药组(1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>阿仑膦酸钠灌胃)、低剂量(100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) VAP组、中剂量(200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) VAP组和高剂量(300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) VAP组, 每组10只。除对照组外, 其余各组大鼠肌肉注射地塞米松(2 mg·kg<sup>-1</sup>)复制OP大鼠模型, 对照组大鼠肌肉注射等体积生理盐水, 每周2次, 连续11周。双能X射线骨密度仪检测各组大鼠股骨骨密度(BMD), 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组大鼠血清中血钙(Ca<sup>2+</sup>)、血磷(P)、骨保护素(OPG)、碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素(OCN)水平, 生化法检测各组大鼠血清中丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活性, HE染色观察各组大鼠骨组织病理形态表现, Western blotting法检测各组大鼠骨组织中沉默信息调节因子1(SIRT1)、过氧化氢酶(CAT)、Runt相关转录因子2(RUNX2)和叉头框蛋白O1(FOXO1)蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组大鼠股骨BMD明显降低( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠股骨BMD明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与对照组比较, 模型组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P和OPG水平及SOD活性明显降低( $P<0.05$ ), ALP、OCN和MDA水平明显升高( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 低剂量VAP大鼠血清中OPG水平明显升高( $P<0.05$ ), 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P和OPG水平及SOD活性明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 阳性药组和各剂量VAP组大鼠血清中ALP、OCN和MDA水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。HE染色, 与对照组比较, 模型组大鼠骨组织中骨细胞数量减少且排列混乱, 骨小梁纤细, 出现大片断裂, 髓腔扩大; 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠骨组织中骨小梁粗壮, 排列紧密。Western blotting法, 与对照组比较, 模型组大鼠骨组织中SIRT1、CAT、RUNX2和FOXO1蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠骨组织中SIRT1、CAT、RUNX2和FOXO1蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。**结论:** VAP对OP模型大鼠具有保护作用, 其作用机制可能与介导SIRT1/FOXO1信号通路抗氧化应激作用有关。

**[关键词]** 骨质疏松症; 地塞米松; 鹿茸多肽; 氧化应激; 沉默信息调节因子1; 叉头框蛋白O1; 信号通路

**[中图分类号]** R285.5; R681 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-03-02

**[基金项目]** 吉林省科技厅发展计划项目(20210101200JC); 长春中医药大学大学生创新训练基金项目(202210199049); 吉林省发改委创新能力建设项目(2021C011)

**[作者简介]** 迟雪婷(1999—), 女, 吉林省松原市人, 在读硕士研究生, 主要从事心血管和内分泌药理学方面的研究。

**[通信作者]** 龚庆, 主治医师(E-mail: 272632635@qq.com);

林喆, 教授, 博士研究生导师(E-mail: linzhe1228@163.com)

## Improvement effect of velvet antler polypeptide in osteoporosis model rats and its effect on SIRT1/FOXO1 signaling pathway

CHI Xueting<sup>1</sup>, HUANG Xiaowei<sup>1,2</sup>, CHEN Fangyuan<sup>1</sup>, ZHOU Gaofeng<sup>1</sup>, WANG Jinji, LYU Guangfu<sup>1</sup>, LIN Zhe<sup>3</sup>, GONG Qing<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology of Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Basic Research Institute, Northeast Asia Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 4. Orthopedic Center, Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the protective effect of velvet antler peptide (VAP) in the osteoporosis (OP) model rats, and to clarify the possible mechanism. **Methods:** Sixty 12-week-old SD rats were randomly divided into control group, model group, positive drug group (treated with 1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of alendronate sodium by gavage), low dose of VAP group (treated with 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP), medium dose of VAP group (treated with 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP), and high dose of VAP group (treated with 300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP), and there were ten rats in each group. Except for control group, the rats in the other groups were injected with dexamethasone (2 mg·kg<sup>-1</sup>) to replicate the OP rat model, while the rats in control group were injected with the equivalent volume of saline twice a week for 11 consecutive weeks. Dual-energy X-ray absorptiometry was used to detect the bone mineral density (BMD) of femur tissue of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of serum calcium (Ca<sup>2+</sup>), phosphate (P), osteoprotegerin (OPG), alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin (OCN) in serum of the rats in various groups; biochemical method was used to detect the malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity in serum of the rats in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of bone tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of silent information regulator 1 (SIRT1), catalase (CAT), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and forkhead box protein O1 (FOXO1) proteins in bone tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with control group, the BMD of femoral tissue of the rats in model group was decreased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the BMD of femur tissue of the rats in positive drug group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group were increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with control group, the levels of Ca<sup>2+</sup>, P, OPG, and SOD activities in serum of the rats in model group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the levels of ALP, OCN, and MDA were increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the level of OPG in serum of the rats in low dose of VAP group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the levels of Ca<sup>2+</sup>, P, OPG, and activities of SOD in serum of the rats in positive drug group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the levels of ALP, OCN, and MDA in serum of the rats in positive drug group and different doses of VAP groups were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The HE staining results showed that compared with control group, the rats in model group had fewer bone cells and disordered arrangements in the bone tissue, thinner bone trabeculae with large fractures, and an expanded marrow cavity; compared with model group, the rats in positive drug group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group had thicker bone trabeculae arranged more tightly. The Western blotting results showed that compared with control group, the

expression levels of SIRT1, CAT, RUNX2, and FOXO1 proteins in bone tissue of the rats in model group were decreased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the expression levels of SIRT1, CAT, RUNX2, and FOXO1 proteins in bone tissue of the rats in positive drug group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** VAP has the protective effect against OP in the rats, and its mechanism may be related to mediating the antioxidant stress action through the SIRT1/FOXO1 signaling pathway.

**KEYWORDS** Osteoporosis; Dexamethasone; Velvet antler polypeptide; Oxidative stress; Silent information regulator 1; Forkhead box protein O1; Signaling pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是通过减少骨量和劣化微观组织结构来实现对全身骨骼系统改变的病症, 即骨小梁细化、消失和孔隙变大, 从而导致骨脆性增加, 骨生物力学性能下降, 荷载功能降低, 最终导致骨小梁的断裂<sup>[1]</sup>。OP已影响全世界数以百万计的人, 其中对老人和绝经后女性的影响尤为明显, 其主要病理机制是骨吸收与骨形成在整个骨代谢过程中的不平衡<sup>[2]</sup>。鹿茸为未骨化的雄性马鹿或梅花鹿的幼角<sup>[3-4]</sup>。鹿茸多肽 (velvet antler polypeptide, VAP) 是鹿茸的主要药用活性成分。本课题组前期研究<sup>[5-6]</sup>证实: 聚丙交酯-乙交酯微球搭载 VAP 对 OP 模型大鼠具有明显的保护作用; VAP 能够增强由东莨菪碱引起的轻度认知障碍大鼠的学习和记忆能力, 增加大鼠体内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 同时减少丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的产生。氧化应激是由于氧化还原系统平衡被机体内过剩的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基或缺乏抗氧化剂所打破, 氧化应激可导致很多组织损伤, 最终可能会引起生物体的衰老甚至死亡<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明: 氧化应激介导骨吸收和形成的平衡系统, 通过直接或间接的方式发挥作用, 早衰鼠模型表现出 OP 的症状和状态与氧化应激损伤有关<sup>[9]</sup>。VAP 在体外可促进成骨细胞分化, 对破骨细胞有抑制作用<sup>[10]</sup>。但 VAP 在体内通过何种途径对 OP 发挥作用及其作用机制尚未完全阐明。本研究通过探讨 VAP 对地塞米松所致 OP 模型大鼠的影响, 阐明 VAP 通过抗氧化应激对 OP 的作用机制, 为临床 OP 的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 12 周龄 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK (吉) 2020-0002。VAP 由长

春中医药大学药学院制备, 每 1 g VAP 约含生药鹿茸 28.9 g, 批号: 20201120。阿仑膦酸钠 (批号: H20160100, 杭州默沙东制药有限公司), 组织及血液碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测试剂盒、血磷 (phosphorus, P) 检测试剂盒、血钙 (calcium,  $\text{Ca}^{2+}$ ) 检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒、MDA 检测试剂盒、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 抗体、RUNX 家族转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 抗体、叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 抗体和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 抗体 (北京索莱宝科技有限公司), 大鼠骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 和 大鼠骨钙素 (osteocalcin, OCN) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (货号: MM-0115R2 和 MM-20603R2, 江苏酶免生物科技有限公司), BCA 测定蛋白浓度试剂盒 (货号: P0012s, 上海碧云天生物技术有限公司)。双能 X 射线骨密度仪 (型号: Discovery Wi, 美国 HOLOGIC 公司), 多功能微孔酶标仪 (型号: Multiskan FC, 美国赛默飞世尔科技公司), 生物显微镜 (型号: DM250, 德国 LEICA 公司), 电泳仪 (型号: BE6085, 美国 Bio-Rad 公司), 多功能化学发光成像仪 (型号: Q9-Aliance, 英国 UVltec 公司)。

**1.2 实验动物分组和 OP 模型制备** 60 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d, 随机分为对照组、模型组、阳性药组、低剂量 VAP 组、中剂量 VAP 组和高剂量 VAP 组, 每组 10 只。除对照组外其余各组大鼠肌肉注射地塞米松 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 复制 OP 大鼠模型, 对照组大鼠肌肉注射等体积生理盐水, 每周 2 次, 连续 11 周。造模的同时, 低、中和高剂量 VAP 组大鼠分别灌胃给予 100、200 和  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  VAP, 对照组大鼠灌胃给予等体积生理盐水, 阳性药组大鼠灌胃给予阿仑膦酸钠  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,

连续75 d。末次给药2 h后, 大鼠麻醉后进行腹主动脉取血, 收集同组大鼠血清,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**1.3 双能X射线骨密度仪检测各组大鼠股骨骨密度(bone mineral density, BMD)** 处死大鼠后, 取各组大鼠右侧股骨长度约1 cm, 采用双能X射线骨密度仪按照仪器说明书操作检测各组大鼠股骨BMD ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ )。

**1.4 ELISA法检测各组大鼠血清中 $\text{Ca}^{2+}$ 、P、OPG、ALP和OCN水平** 按照ELISA试剂盒说明书中的方法分别检测各组大鼠血清中 $\text{Ca}^{2+}$ 、P、OPG、ALP和OCN水平, 单位分别为 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.5 生化法检测各组大鼠血清中SOD活性和MDA水平** 按照试剂盒说明书中的方法分别检测各组大鼠血清中SOD活性 ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和MDA水平 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

**1.6 HE染色观察各组大鼠骨组织病理形态表现**

实验完成后, 剥离各组大鼠股骨, 4%多聚甲醛固定, 分别加入酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋制成石蜡切片。经过HE染色, 中性树脂封片, 显微镜下观察各组大鼠骨组织病理形态表现。

**1.7 Western blotting法检测各组大鼠骨组织中SIRT1、CAT、RUNX2和FOXO1蛋白表达水平**

取出 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温环境中冻存的各组大鼠股骨组织, 常温静置解冻, 剪碎, 于匀浆管中裂解、匀浆并破碎, 取上清液采用BCA法测定蛋白浓度, 配制电泳液和转膜液, 配胶、上样、转膜和5%脱脂奶粉封闭, 剪膜, 加一抗摇床过夜, 室温孵育二抗, ECL显色, 以 $\beta$ -actin为内参, 采用凝胶成像系统进行分析并保存, 采用Image J图像分析系统分析各蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin蛋白条带灰度值。

**1.8 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组大鼠股骨BMD, 各组大鼠血清中 $\text{Ca}^{2+}$ 、P、OPG、ALP、OCN、MDA水平和SOD活性, 各组大鼠骨组织中相关通路蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠股骨BMD** 与对照组比较, 模型组

大鼠股骨BMD明显降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠股骨BMD明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表1。

表1 各组大鼠股骨BMD

Tab. 1 BMD of femur tissue of rats in various groups

( $n=10, \bar{x}\pm s, \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ )

Group	BMD of femur tissue
Control	247.14 $\pm$ 10.15
Model	197.36 $\pm$ 16.07*
Positive drug	222.58 $\pm$ 3.94 $\Delta\Delta$
VAP	
Low dose	198.45 $\pm$ 9.28
Medium dose	216.47 $\pm$ 7.27 $\Delta$
High dose	218.99 $\pm$ 5.49 $\Delta$

\* $P<0.05$  vs control group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs model group.

**2.2 各组大鼠血清中 $\text{Ca}^{2+}$ 、P、OPG、ALP和OCN水平** 与对照组比较, 模型组大鼠的 $\text{Ca}^{2+}$ 、P和OPG水平明显降低 ( $P<0.05$ ), ALP和OCN水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 低剂量VAP大鼠血清中OPG水平明显升高 ( $P<0.05$ ), 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠血清中 $\text{Ca}^{2+}$ 、P和OPG水平明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 阳性药组和各剂量VAP组大鼠血清中ALP和OCN水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表2。

**2.3 各组大鼠血清中SOD活性和MDA水平** 与对照组比较, 模型组大鼠血清中SOD活性明显降低 ( $P<0.05$ ), MDA水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠血清中SOD活性明显升高 ( $P<0.05$ ), 阳性药组和各剂量VAP组大鼠血清中MDA水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表3。

**2.4 各组大鼠骨组织病理形态表现** 显微镜下观察: 对照组大鼠骨密质较厚且均匀, 骨细胞排列整齐, 骨小梁粗壮, 结构连接密切; 与对照组比较, 模型组大鼠骨密质薄弱, 骨细胞数量减少, 排列混乱, 骨小梁变细, 呈大块断裂状态, 髓腔变得更扩展; 与模型组比较, 阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠骨密质明显变厚, 骨小梁粗壮,

表2 各组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、OPG、ALP和OCN水平Tab. 2 Levels of Ca<sup>2+</sup>, P, OPG, ALP, and OCN in serum of rats in various groups (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Ca <sup>2+</sup>	P	OPG	ALP	OCN
	[c <sub>B</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> )]	[c <sub>B</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> )]	[ρ <sub>B</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )]	[λ <sub>B</sub> /(U·L <sup>-1</sup> )]	[ρ <sub>B</sub> /(ng·L <sup>-1</sup> )]
Control	3.786±0.146	2.516±0.067	1.190±0.020	59.890±6.120	9.640±1.820
Model	2.098±0.265*	1.042±0.179*	0.790±0.160*	106.970±8.430*	19.390±0.930*
Positive drug	3.466±0.193 <sup>△△</sup>	2.300±0.127 <sup>△△</sup>	1.130±0.040 <sup>△△</sup>	68.760±3.690 <sup>△△</sup>	14.030±2.390 <sup>△</sup>
VAP					
Low dose	2.545±0.135	1.563±0.275	0.990±0.040 <sup>△</sup>	81.990±5.780 <sup>△</sup>	11.640±1.990 <sup>△△</sup>
Medium dose	2.672±0.182 <sup>△</sup>	1.851±0.208 <sup>△</sup>	1.010±0.040 <sup>△</sup>	76.130±7.570 <sup>△</sup>	11.640±1.930 <sup>△△</sup>
High dose	3.220±0.383 <sup>△△</sup>	1.995±0.076 <sup>△△</sup>	1.060±0.040 <sup>△△</sup>	72.970±10.820 <sup>△△</sup>	11.070±2.890 <sup>△△</sup>

\*P<0.05 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs model group.

表3 各组大鼠血清中SOD活性和MDA水平

Tab. 3 Activities of SOD and levels of MDA in serum of rats in various groups (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	SOD[λ <sub>B</sub> /(U·mL <sup>-1</sup> )]	MDA[c <sub>B</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )]
Control	204.71±12.53	6.65±0.57
Model	106.97±7.93*	6.88±0.13*
Positive drug	185.71±14.29 <sup>△</sup>	5.32±0.18 <sup>△△</sup>
VAP		
Low dose	119.96±33.99	5.82±0.44 <sup>△</sup>
Medium dose	148.85±5.10 <sup>△</sup>	5.72±0.31 <sup>△△</sup>
High dose	171.61±6.33 <sup>△</sup>	5.41±0.32 <sup>△△</sup>

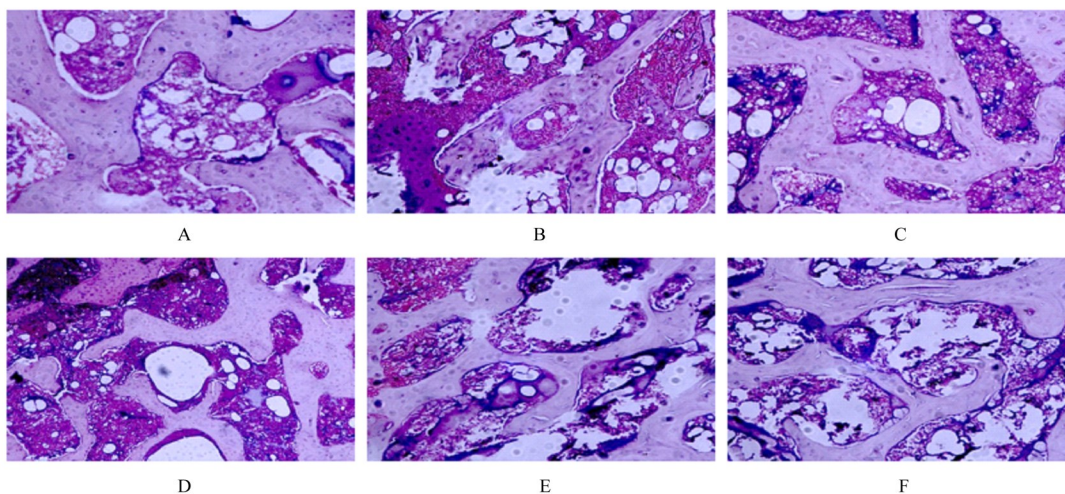
\*P<0.05 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs model group.

排列交错紧密。见图1。

2.5 各组大鼠骨组织中SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平 与对照组比较,模型组大鼠股骨组织中SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平明显降低(P<0.05);与模型组比较,阳性药组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠骨组织中SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平明显升高(P<0.05或P<0.01),低剂量VAP组大鼠骨组织中SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平差异无统计学意义(P>0.05)。见图2和表4。

### 3 讨论

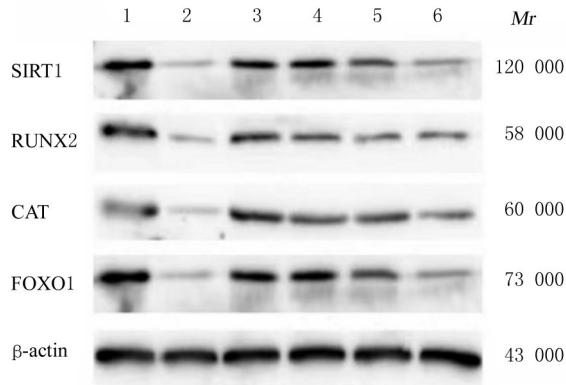
随着全球性老龄化人口的增加,OP发病率不



A: Control group; B: Model group; C: Positive drug group; D: Low dose of VAP group; E: Medium dose of VAP group; F: High dose of VAP group.

图1 各组大鼠骨组织病理形态表现(HE,×200)

Fig. 1 Pathomorphology of bone tissue of rats in various groups (HE, ×200)



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Positive drug group; Lane 4: High dose of VAP group; Lane 5: Medium dose of VAP group; Lane 6: Low dose of VAP group.

图 2 各组大鼠骨组织中 SIRT1、RUNX2、CAT 和 FOXO1 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of SIRT1, RUNX2, CAT, and FOXO1 proteins in bone tissue of rats in various groups

断升高, 患者数量呈逐年递增的趋势, 同时由于其致残率极高且在早期不易被发现, OP 已成为全球

性的社会医疗问题<sup>[11]</sup>。目前临床上治疗 OP 常用药物主要包括二膦酸盐和锶盐等, 但是长期应用此类药物会出现药效逐渐减弱的现象, 甚至会出现较多不良反应<sup>[12]</sup>。中医药治疗骨病有着悠久的历史, 作为核心药材的鹿茸在中医临床上广泛应用且未见明显的毒副作用<sup>[10, 13-14]</sup>。VAP 是鹿茸的主要药用成分, 对多种原因导致的 OP 均有明显的保护作用。随着年龄的增长和雌激素水平降低, OP 会逐渐严重, 因此高发人群主要为绝经后的女性和老年人, 其次是由糖皮质激素引起的 OP<sup>[15]</sup>。采用糖皮质激素诱导建立动物 OP 模型对临床研究人类 OP 具有重要意义, 目前最常用的糖皮质激素主要有地塞米松和泼尼松龙。本研究采用肌肉注射地塞米松诱导 12 周龄的 SD 大鼠制备 OP 模型, 与对照组比较, 模型组大鼠股骨 BMD 降低, 血清中 OPG、Ca<sup>2+</sup>和 P 水平降低, ALP 和 OCN 水平升高, 骨组织中骨小梁稀疏, 结构排列紊乱, 间隙增大, 出现了骨小梁断裂的情况, 证实 OP 模型建立成功; 经 VAP 干预后, 上述各指标明显改善, 且与 VAP 的剂量有关, 表明 VAP 具有治疗 OP 的作用。

表 4 各组大鼠骨组织中 SIRT1、RUNX2、CAT 和 FOXO1 蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of SIRT1, CAT, RUNX2, and FOXO1 proteins in bone tissue of rats in various groups

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	SIRT1 protein	RUNX2 protein	CAT protein	FOXO1 protein
Control	0.668±0.083	0.686±0.010	0.537±0.048	0.789±0.036
Model	0.216±0.028*	0.285±0.002*	0.244±0.015*	0.352±0.034*
Positive drug	0.568±0.075 <sup>△△</sup>	0.498±0.019 <sup>△△</sup>	0.521±0.017 <sup>△△</sup>	0.665±0.025 <sup>△△</sup>
VAP				
Low dose	0.287±0.047	0.280±0.004	0.293±0.014	0.283±0.025
Medium dose	0.534±0.060 <sup>△</sup>	0.384±0.010 <sup>△△</sup>	0.483±0.008 <sup>△△</sup>	0.598±0.029 <sup>△△</sup>
High dose	0.561±0.036 <sup>△△</sup>	0.385±0.010 <sup>△△</sup>	0.488±0.026 <sup>△△</sup>	0.643±0.022 <sup>△△</sup>

\*P<0.05 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs model group.

氧化应激因子 MDA 反映机体氧化损伤情况, 具有一定的细胞毒性, 是机体氧化的最终产物<sup>[16-17]</sup>。在正常机体环境中, 常用 MDA 和 SOD 判定氧化应激损伤程度。SOD 是一种在机体氧化和抗氧化平衡系统中起着关键作用的抗氧化金属酶, 能够有效地清除人体产生的 ROS, 进而减轻其对组织的损害<sup>[18]</sup>。本研究结果显示: 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 MDA 水平升高, SOD 活性降低, 表明糖皮质激素诱导的 OP 大鼠体内氧化与抗氧化失衡, 处于氧化应激状态; 与模型组比较, 中

和高剂量 VAP 组大鼠血清中 SOD 活性升高, 各剂量 VAP 组大鼠血清中 MDA 水平降低, 提示 VAP 可以改善大鼠氧化应激状态, 增强抗氧化防御进而防止骨吸收, 增加骨骼的形成, 降低氧化应激对身体的伤害。

SIRT1 是一种在骨组织生理活动中发挥重要作用的去乙酰化酶<sup>[19]</sup>, 通过脱乙酰的作用调节其下游的靶标, 如 P53 和核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)<sup>[20]</sup>。研究<sup>[21]</sup>显示: SIRT1 作为叉头框蛋白 O (forkhead box protein O, FOXO)

家族转录因子中的一种共激活剂,通过氧化应激发挥功能,可以有效地促进SIRT1与FOXO之间相互作用。SIRT1可以调节破骨细胞的活性进而起到维持骨量的作用,其机制主要是催化FOXO的脱乙酰化过程。研究<sup>[21-22]</sup>表明:SIRT1与OP的发展有明显相关性,白藜芦醇治疗的去卵巢OP大鼠股骨组织中SIRT1表达上调,可以通过激活SIRT1/FOXO1信号通路介导抗氧化应激作用进而发挥对OP的保护作用。RUNX2可启动成骨过程,是诱导成骨细胞特异基因表达的重要因素<sup>[23]</sup>。SIRT1可通过介导SIRT1/FOXO3a信号通路途径,上调RUNX2基因的表达。FOXO反应元件序列位于RUNX2基因启动子上游,激活SIRT1后,SIRT1可以独立提高FOXO3a表达水平,结合后形成活性复合物SIRT1/FOXO3a,该活性复合物能够在细胞核中作用于上述反应元件序列,间接提高RUNX2基因的表达,因此RUNX2可以被SIRT1直接或间接激活,促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞<sup>[24]</sup>。沉默FOXO1的表达可以降低RUNX2的表达水平<sup>[25]</sup>。研究<sup>[26]</sup>显示:SIRT1通过去乙酰化的作用机制修饰FOXO1、FOXO3和FOXO4,并且可以通过此作用调节以上因子的转录活性,上调过氧化氢酶和血红素加氧酶1的表达进而抑制破骨细胞的形成。本文作者认为VAP可以介导SIRT1/FOXO1途径的抗氧化应激作用进而促进骨生成。本研究结果显示:与对照组比较,模型组大鼠骨组织中的SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平明显降低,证实SIRT1/FOXO1信号通路参与OP的发生;给予VAP干预后大鼠骨组织中的SIRT1、RUNX2、CAT和FOXO1蛋白表达水平升高,表明在VAP抗氧化应激治疗OP的过程中,SIRT1/FOXO1信号通路起到了积极的正向作用。

综上所述,VAP对糖皮质激素诱导的OP大鼠具有明显的保护作用,并且其作用效果呈剂量依赖性,其抗OP机制可能是通过SIRT1/FOXO1信号通路介导抗氧化应激反应,进而促进成骨分化,发挥治疗OP的作用。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

迟雪婷参与实验方案的设计、数据整理分析和论文撰写,黄晓巍、陈芳园、周高峰、王晋冀和律广富参与实验研究

过程和收集数据整理,林喆和龚庆参与研究设计指导和论文审核。

#### [参考文献]

- [1] TIAN L M, YANG R F, WEI L H, et al. Prevalence of osteoporosis and related lifestyle and metabolic factors of postmenopausal women and elderly men: a cross-sectional study in Gansu Province, Northwestern of China[J]. *Medicine*, 2017, 96(43): e8294.
- [2] 严伟,王中汉,刘贺.骨重建失衡导致骨质疏松发生的作用机制及其药物治疗策略[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(30): 4866-4874.
- [3] HUO Y S, HUO H, ZHANG J. The contribution of Deer velvet antler research to the modern biological medicine[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(10): 723-728.
- [4] SUI Z G, ZHANG L H, HUO Y S, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 229-240.
- [5] 龚庆,宋秋莹,邱莉晶,等. PLGA微球搭载鹿茸多肽对去卵巢骨质疏松大鼠保护作用研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(6): 813-817.
- [6] 黄晓巍,刘玥欣,王晋冀,等.鹿茸多肽对轻度认知功能障碍大鼠学习记忆能力的改善作用及其调节Keap1/Nrf2/HO-1信号通路的机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(5): 1215-1220.
- [7] SAPAROV A, OGAY V, NURGOZHIN T, et al. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(9): 739-751.
- [8] AN Y N, ZHANG H F, WANG C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- $\kappa$ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [9] LIU Y H, WANG C, WANG G, et al. Loureirin B suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis via attenuating NFATc1 and ROS activities[J]. *Theranostics*, 2019, 9(16): 4648-4662.
- [10] LIU G W, MA C, WANG P A, et al. Pilose antler peptide potentiates osteoblast differentiation and inhibits osteoclastogenesis via manipulating the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 388-395.
- [11] JOHNSTON C B, DAGAR M. Osteoporosis in older adults[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(5): 873-884.
- [12] COTTS K G, CIFU A S. Treatment of osteoporosis[J]. *JAMA*, 2018, 319(10): 1040-1041.
- [13] 龚伟,郑洪新,李峰,等.鹿茸不同组分对去卵巢

- 骨质疏松症大鼠的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1819-1821.
- [14] REN C, GONG W, LI F, et al. Protective and therapeutic effects of Pilose antler against kidney deficiency-induced osteoporosis [J]. *Cell Mol Biol*, 2019, 65(5): 24-31.
- [15] 付涛, 吴晓东, 阿力·艾拜. 水飞蓟宾通过PI3K/AKT/FoxO1通路改善骨质疏松大鼠骨代谢和骨量[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(10): 1416-1420.
- [16] 王泽凤, 高强, 朱煜, 等. 红景天苷调控FoxO1/ $\beta$ -catenin通路对2型糖尿病骨质疏松大鼠的保护作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 55-60.
- [17] 时英才, 雷瑞瑞, 周栩平, 等. 岩藻多糖对氧糖剥夺诱导的新生大鼠海马神经元的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(6): 852-856.
- [18] CHEN X S, HAN D P, LIU T F, et al. Asiatic acid improves high-fat-diet-induced osteoporosis in mice via regulating SIRT1/FOXO1 signaling and inhibiting oxidative stress [J]. *Histol Histopathol*, 2022, 37(8): 769-777.
- [19] YANG X H, JIANG T L, 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.
- [20] 牛建锋, 朱海慧, 杨庆宇, 等. 瑞舒伐他汀通过AMPK/Sirt1/NF- $\kappa$ B通路改善骨质疏松雌性大鼠骨微结构的研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 25-32.
- [21] JIANG Y X, LUO W Q, WANG B, et al. Resveratrol promotes osteogenesis via activating SIRT1/FoxO1 pathway in osteoporosis mice [J]. *Life Sci*, 2020, 246: 117422.
- [22] IYER S, HAN L, BARTELL S M, et al. Sirtuin1 (Sirt1) promotes cortical bone formation by preventing  $\beta$ -catenin sequestration by FoxO transcription factors in osteoblast progenitors [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(35): 24069-24078.
- [23] 邹毅, 冷华伟, 桂鹏, 等. 人工虎骨粉对去卵巢大鼠骨组织中Sirt1/Runx2信号通路的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(8): 1142-1146.
- [24] ALMEIDA M, PORTER R M. Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis [J]. *Bone*, 2019, 121: 284-292.
- [25] LIANG W N, LI X H, LI G H, et al. Sirt1/foxo axis plays a crucial role in the mechanisms of therapeutic effects of erzhi pill in ovariectomized rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9210490.
- [26] KIM H N, HAN L, IYER S, et al. Sirtuin1 suppresses osteoclastogenesis by deacetylating FoxOs [J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(10): 1498-1509.