

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0963-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.202404010

## 鹿茸多肽对大鼠绝经后骨质疏松的改善作用及其机制

迟雪婷<sup>1</sup>, 陈芳园<sup>1</sup>, 皮子凤<sup>1</sup>, 律广富<sup>2</sup>, 王雨辰<sup>1</sup>, 李银清<sup>1</sup>, 黄晓巍<sup>1,3</sup>, 林喆<sup>1</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. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院中药药理组, 吉林 长春 130117; 3. 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)

**[摘要]** **目的:** 探讨鹿茸多肽(VAP)对绝经后骨质疏松症(PMOP)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雌性大鼠随机分为假手术组、模型组、阿仑膦酸钠组(1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>阿仑膦酸钠灌胃)、低剂量VAP组(100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>VAP灌胃)、中剂量VAP组(200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>VAP灌胃)和高剂量VAP组(300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>VAP灌胃), 每组10只。除假手术组外, 其余各组大鼠摘除双侧卵巢, 复制PMOP大鼠模型。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)、骨碱性磷酸酶(BALP)和I型前胶原N端前肽(PINP)水平, 采用相关试剂盒检测各组大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平, HE染色法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磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶B(AKT)和磷酸化AKT(p-AKT)蛋白表达水平。**结果:** 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨BMD降低( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠股骨BMD升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与假手术组比较, 模型组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP及PINP水平和SOD活性降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), MDA水平升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 中剂量VAP组大鼠血清中P水平升高( $P<0.01$ ), 阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP及PINP水平和SOD活性升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), MDA水平降低( $P<0.05$ )。HE染色, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中骨小梁纤细, 大片断裂, 髓腔扩大; 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组、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, 骨细胞数量多。Western blotting法, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值降低( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 各剂量VAP组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K比值升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠骨组织中p-AKT/AKT比值升高( $P<0.01$ )。**结论:** VAP对大鼠PMOP具有改善作用, 其机制可能与VAP调控骨组织中PI3K/AKT信号通路及降低骨组织氧化应激有关。

**[关键词]** 骨质疏松症; 鹿茸多肽; 氧化应激; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B信号通路

**[中图分类号]** R285.5; R589; R681 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-10-09

**[基金项目]** 吉林省科技厅科技发展计划项目(20210101200JC); 吉林省发改委创新能力建设项目(2021C011); 国家级大学生创新创业项目(202210199049)

**[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]** 黄晓巍, 主任药师, 博士研究生导师(E-mail: 15948000740@163.com);

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

## Improvement effect of velvet antler polypeptide on postmenopausal osteoporosis in rats and its mechanism

CHI Xueting<sup>1</sup>, CHEN Fangyuan<sup>1</sup>, PI Zifeng<sup>1</sup>, LYU Guangfu<sup>2</sup>, WANG Yuchen<sup>1</sup>, LI Yinqing<sup>1</sup>, HUANG Xiaowei<sup>1,3</sup>, LIN Zhe<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy and Chinese Medicine Pharmacology, School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Basic Research Institute, Northeast Asia Institute of Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the protective effect of velvet antler peptide (VAP) on the postmenopausal osteoporosis (PMOP) model rats, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** A total of 60 twelve-week-old female SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, alendronate sodium group (1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> alendronate sodium administered via gavage), low dose of VAP group (100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP administered via gavage), medium dose of VAP group (200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP administered via gavage), and high dose of VAP group (300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP administered via gavage), and there were 10 rats in each group. Except for the sham operation group, the rats in the other groups underwent bilateral ovariectomy to establish the PMOP rat models. Dual-energy X-ray absorptiometry was used to detect the femur bone mineral density (BMD) of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of serum calcium (Ca<sup>2+</sup>), serum phosphorus (P), bone alkaline phosphatase (BALP), and procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) of the rats in various groups; Kits were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA) 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 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (AKT), and phosphorylated AKT (p-AKT) proteins in bone tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with sham operation group, the BMD in femur of the rats in model group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with model group, the BMD in femur of the rats in alendronate sodium group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group was increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with sham operation group, the levels of Ca<sup>2+</sup>, P, BALP, PINP, and SOD activity in serum of the rats in model group were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the MDA level was increased ( $P < 0.01$ ); compared with model group, the level of P in serum of the rats in medium dose of VAP group was increased ( $P < 0.01$ ), and the levels of Ca<sup>2+</sup>, P, BALP, PINP and the activities of SOD in serum of the rats in alendronate sodium group and high dose of VAP group were increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the level of MDA in serum was decreased ( $P < 0.05$ ). The HE staining results showed that compared with sham operation group, the bone trabeculae in bone tissue of the rats in model group were thin and fractured, and the medullary cavity was enlarged; compared with model group, the bone trabeculae in bone tissue of the rats in alendronate sodium group, medium dose of VAP group, and high dose of VAP group were thick and tightly arranged, and had more osteocytes. The Western blotting results showed that compared with sham operation group, the ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT in bone tissue of the rats in model group were decreased ( $P < 0.01$ ); compared with model group, the ratios of p-PI3K/PI3K in bone tissue of rats in different doses of VAP groups were increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the ratios of p-AKT/AKT of the rats in alendronate sodium group and high

dose of VAP group was increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** VAP can improve PMOP in the rats, and its mechanisms may be related to the regulation of the PI3K/AKT signaling pathway and the reduction of oxidative stress in bone tissue by VAP.

**KEYWORDS** Osteoporosis; Velvet antler polypeptides; Oxidative stress; Phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 分为原发性 OP 和继发性 OP, 原发性 OP 包括绝经后 OP (postmenopausal osteoporosis, PMOP)、老年性 OP 和特发性 OP<sup>[1]</sup>。据报道, 近 10 年全国 OP 的发病率为 23%, 男性和女性的发病率分别为 16% 和 27%<sup>[2]</sup>。目前 OP 已经成为世界性的公共卫生问题。随着人口老龄化趋势日益严重, PMOP 患者的患病率逐年上升。绝经后的妇女随着年龄的增长, 雌激素不断流失, 骨量丢失会加快, 骨形成速率降低, 同时骨质量会下降, 最终导致骨脆性增加, 危害女性患者的健康, 影响其生活质量, 增加了社会负担<sup>[3]</sup>。氧化应激是由于活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在机体内产生和消除平衡被打破, 进而产生超正常水平的 ROS, 导致机体细胞损伤和细胞凋亡, 最终对细胞的功能产生影响从而发展成不同类型的疾病<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示: 氧化应激标志物水平升高时, 骨量会降低。鹿茸是鹿科动物额外脊上生长的一种附属性器官, 在我国有着悠久的药用历史记载<sup>[6]</sup>。鹿茸多肽 (velvet antler polypeptide, VAP) 是鹿茸的主要生理活性物质和药用活性成分。本课题组前期研究<sup>[7-8]</sup>显示: 聚丙烯交酯-乙交酯微球搭载 VAP 对 PMOP 大鼠模型具有明显的保护作用; 在骨重建过程中, VAP 能够使成骨细胞成熟, 同时促进软骨细胞形成。研究<sup>[9]</sup>显示: VAP 对 PMOP 大鼠具有预防作用, 但是其具体的作用机制目前尚不明确。本研究通过探讨 VAP 对 PMOP 大鼠的影响, 以阐明 VAP 抗氧化应激进而保护 PMOP 的作用机制, 为临床采用 VAP 治疗 PMOP 提供理论依据。

## 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, 雌性, 体质量 180~220 g, 购自吉林省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。本研究所用实验动物操作均遵守实验动物伦理保护法, 并经过长春中医药大学实验伦理委员会批准通过 (伦理批准号: 2020232)。实验用大鼠的饲养、给药、模

型制备和模型制备后的组织取材均在长春中医药大学实验动物中心进行, 动物使用许可证号: SYXK (吉) 2018-0014。大鼠饲养于屏障环境设施中, 24 h 自由饮食饮水, 动物饲料、垫料和饮用水消毒灭菌处理后使用, 笼具及垫料定期由专人清理和更换。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 (杭州默沙东制药有限公司, 批号: H20160100), 血钙 (calcium,  $Ca^{2+}$ ) 检测试剂盒、血磷 (phosphorus, P) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: BC0725、BC1655、BC0175 和 BC0025), 大鼠骨碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP) 和大鼠 I 型前胶原 N 端前肽 (procollagen of type I N-terminal propeptide, PINP) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (江苏酶免生物科技有限公司, 货号: MM-0619R1 和 MM-20710R1), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0012), 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体和磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号: ab86714 和 ab182651), 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体和磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 抗体 (美国 CST 公司, 货号: 4691s 和 4060s)。骨密度仪 (美国 HOLOGIC 公司, 型号: Discovery Wi), 多功能微孔酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司, 型号: Multiskan FC), 生物显微镜 (德国 LEICA 公司, 型号: DM250), 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: BE6085), 多功能化学发光成像仪 (英国 UVItec 公司, 型号: Q9-Alliance)。

**1.2 实验动物分组和 PMOP 模型制备** 60 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后随机分为假手术组、模型组、阿仑膦酸钠组、低剂量 VAP 组、中剂量 VAP 组和高剂量 VAP 组, 每组 10 只。各组大鼠腹腔注射麻醉后, 除假手术组外, 其余各组大鼠行摘除双

侧卵巢手术,复制PMOP大鼠模型,术后腹腔注射青霉素钠,避免伤口感染。假手术组大鼠在上述相同的位置行切开手术但不摘除卵巢,其余操作同上。造模后,低、中和高剂量VAP组大鼠分别灌胃给予100、200和300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> VAP,假手术组大鼠给予等体积的生理盐水灌胃,阿仑膦酸钠组大鼠给予阿仑膦酸钠2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,持续90 d。末次给药2 h后,大鼠麻醉后行腹主动脉取血,按组别分装好血清,-80℃条件下保存备用。

**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)** 处死各组大鼠后,取右侧股骨组织约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。

**1.4 ELISA法检测各组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平** 取各组大鼠血清,按照ELISA试剂盒说明书中的方法分别检测各大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平(单位分别为mmol·L<sup>-1</sup>、mmol·L<sup>-1</sup>、μg·L<sup>-1</sup>和μg·L<sup>-1</sup>)。

**1.5 采用试剂盒检测各组大鼠血清中SOD活性和MDA水平** 取各组大鼠血清,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(U·mL<sup>-1</sup>)和MDA水平(μmol·L<sup>-1</sup>)。

**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,剥离各组大鼠的股骨,采用4%多聚甲醛固定,将固定好的骨组织放入脱钙液中浸泡脱钙24 h,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并拍照。

**1.7 Western blotting法检测各组大鼠骨组织中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达水平** 将冻存的各组大鼠股骨组织取出,常温静置解冻,剪碎后于匀浆管中裂解、匀浆和破碎,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、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β-actin为内参,采用凝胶成像系统进行分析并保存,采用Image J图像分析软件分析蛋白条带灰度值,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/β-actin蛋白条带灰度值。同时计算p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值。

**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Ca<sup>2+</sup>、P、BALP、PINP和MDA水平及SOD活性,各组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值均符合正态分布,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** 与假手术组比较,模型组大鼠股骨BMD降低( $P<0.01$ );与模型组比较,阿仑膦酸钠组、中剂量VAP组和高剂量VAP组大鼠股骨BMD升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表1。

表1 各组大鼠股骨BMD

Tab. 1 Femur BMD of rats in various groups

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

Group	BMD
Sham operation	309.48±1.23
Model	229.79±5.71*
Alendronate sodium	271.06±16.84 <sup>△△</sup>
VAP	
Low dose	239.03±9.59
Middle dose	256.77±18.07 <sup>△</sup>
High dose	263.54±17.16 <sup>△</sup>

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

**2.2 各组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平** 与假手术组比较,模型组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与模型组比较,中剂量VAP组大鼠血清中P水平升高( $P<0.01$ ),阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠血清中Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平升高( $P<0.05$ )。见表2。

**2.3 各组大鼠血清中SOD活性和MDA水平** 与假手术组比较,模型组大鼠血清中SOD活性降低( $P<0.05$ ),MDA水平升高( $P<0.01$ );与模型组比较,阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠血清中SOD活性升高( $P<0.05$ ),MDA水平降低( $P<0.05$ )。见表3。

**2.4 各组大鼠骨组织病理形态表现** HE染色显微镜下观察:假手术组大鼠骨小梁粗壮,骨细胞分布均匀,结构紧密;与假手术组比较,模型组大鼠骨组织中骨小梁细小,出现大面积断裂,髓腔变大,

表2 各组大鼠血清Ca<sup>2+</sup>、P、BALP和PINP水平Tab. 2 Serum Ca<sup>2+</sup>, P, BALP and PINP levels in rats in various groups(n=10,  $\bar{x}\pm s$ )

Group	Ca <sup>2+</sup> [c <sub>B</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> )]	P [c <sub>B</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> )]	BALP [ρ <sub>B</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )]	PINP [ρ <sub>B</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )]
Sham operation	3.555±0.058	1.617±0.192	213.15±42.82	36.29±6.79
Model	1.673±0.616**	0.683±0.111**	117.48±43.44*	19.88±3.84*
Alendronate sodium	3.081±0.491 <sup>△</sup>	1.581±0.336 <sup>△</sup>	215.82±50.26 <sup>△</sup>	28.82±2.02 <sup>△</sup>
VAP				
Low dose	2.159±0.795	0.845±0.318	158.13±12.52	20.83±11.47
Middle dose	2.518±0.193	1.348±0.159 <sup>△△</sup>	169.57±43.45	21.41±3.92
High dose	2.834±0.341 <sup>△</sup>	1.509±0.376 <sup>△</sup>	187.83±23.46 <sup>△</sup>	24.75±2.93 <sup>△</sup>

\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs sham operation 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 [m <sub>B</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )]
Sham operation	196.09±3.91	4.62±0.24
Model	110.63±11.59*	6.88±0.55**
Alendronate sodium	181.81±10.38 <sup>△</sup>	5.44±0.18 <sup>△</sup>
VAP		
Low dose	116.56±37.39	6.18±0.56
Middle dose	159.61±5.67	5.90±0.43
High dose	174.68±3.26 <sup>△</sup>	5.59±0.22 <sup>△</sup>

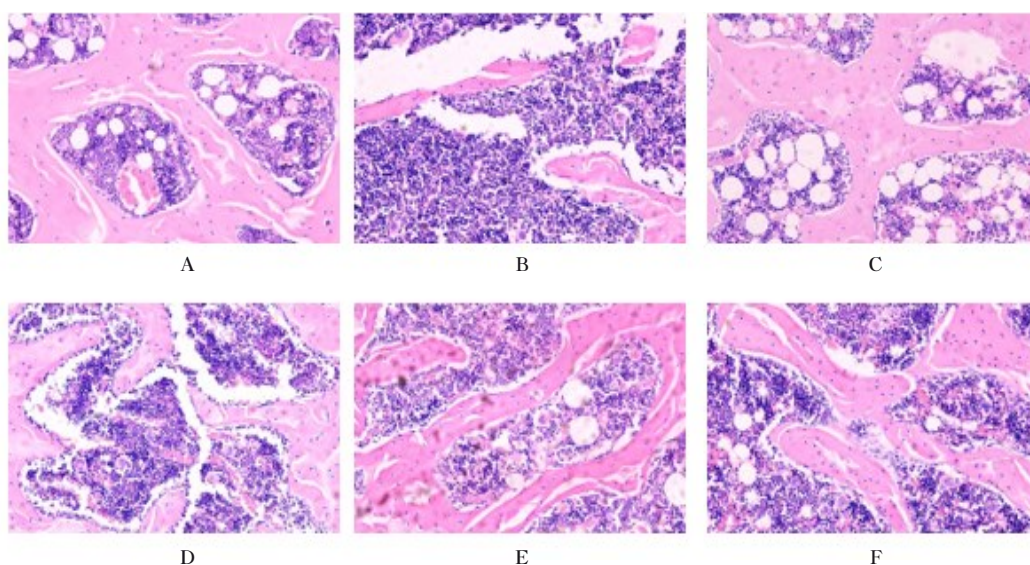
\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs sham operation group; <sup>△</sup>P<0.05 vs model group.

骨细胞排列不均匀; 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠骨组织中骨小梁更为粗壮, 髓腔变小。见图1。

**2.5 各组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值** 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值降低(P<0.01); 与模型组比较, 各剂量VAP组大鼠骨组织中p-PI3K/PI3K比值升高(P<0.05或P<0.01), 阿仑膦酸钠组和高剂量VAP组大鼠骨组织中p-AKT/AKT比值升高(P<0.01)。见图2和表4。

### 3 讨论

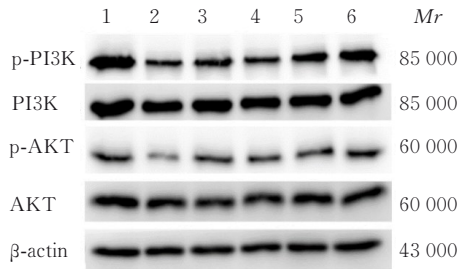
目前, 我国PMOP发病率不断升高<sup>[10]</sup>。临床



A: Sham operation group; B: Model group; C: Alendronate sodium group; D: Low dose of VAP group; E: Middle 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: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3: Alendronate sodium group; Lane 4: Low dose of VAP group; Lane 5: Middle dose of VAP group; Lane 6: High dose of VAP group.

图2 各组大鼠骨组织中 p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT, and AKT proteins in bone tissue of rats in various groups

表4 各组大鼠骨组织中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值

Tab. 4 Ratios of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT in bone tissue of rats in various groups ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Group	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Sham operation	1.024 ± 0.029	0.908 ± 0.023
Model	0.694 ± 0.026*	0.522 ± 0.012*
Alendronate sodium	0.740 ± 0.002	0.892 ± 0.085 <sup>△△</sup>
VAP		
Low dose	0.633 ± 0.008 <sup>△</sup>	0.612 ± 0.188
Middle dose	0.880 ± 0.013 <sup>△△</sup>	0.677 ± 0.182
High dose	0.877 ± 0.020 <sup>△△</sup>	0.886 ± 0.050 <sup>△△</sup>

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

治疗 PMOP 的常用药物主要包括二磷酸盐和锶盐等, 但是长期应用机体对该类药物的耐药性增加, 同时可能伴随着多种不良反应<sup>[11]</sup>。在我国治疗骨病的历史中, 中医药发挥了重要作用, 鹿茸是其中的核心药材之一, 多年来在临床上广泛应用且未见明显的不良反应<sup>[12]</sup>。VAP 作为鹿茸的主要药效成分, 对多种原因引起的 OP 具有明显的保护作用。本研究采用摘除双侧卵巢的方法复制大鼠 PMOP 模型, 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨 BMD 降低, 股骨组织中的骨小梁整体排布紊乱, 骨小梁变细, 有部分已经断裂, 表明 PMOP 动物模型建立成功。

MDA 是一种氧化应激因子, 可反映机体的氧化损伤程度, 对于机体细胞有一定的毒性<sup>[13]</sup>。

SOD 活性和 MDA 水平可以作为正常机体评判氧化应激程度的指标, SOD 在机体内起到清除 ROS 的作用, 以此减轻机体的氧化应激损伤<sup>[14]</sup>。本研究结果显示: PMOP 大鼠给予 VAP 干预后, 血清中 SOD 活性升高, MDA 水平降低, 且呈剂量依赖性, 表明 VAP 对 PMOP 具有治疗作用, 且其作用机制可能与抗氧化应激有关。

PI3K 是存在于细胞中的一种信号转导分子, 具有磷脂酰肌醇激酶的活性, 多种来自于细胞外信号的刺激、激素和氧化环境等均可对 PI3K 产生激活作用<sup>[15]</sup>。AKT 是 PI3K 的重要载体, AKT 活化后可以促进参与相关细胞生长和凋亡的蛋白质磷酸化, 进而传达细胞生长信号<sup>[16]</sup>。PI3K/AKT 信号通路参与细胞的存活和代谢等多种生理过程<sup>[17]</sup>, 作为调控成骨细胞和破骨细胞功能的信号通路网的中心, 对维持骨质疏松症骨组织动态平衡具有重要作用<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>表明: PI3K/AKT 信号通路可以促进成骨细胞的增殖、分化和骨形成进而达到抑制 OP 的目的。研究<sup>[20-22]</sup>显示: 地塞米松可以通过下调 p-PI3K 的表达进而抑制成骨细胞和 MC3T3-E1 细胞中 PI3K/AKT 信号通路的激活, 最终抑制细胞增殖并诱导其凋亡; 给予 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂 LY294002 干预后, PI3K 和 p-AKT 表达水平均降低, 表明 PI3K/AKT/mTOR 通路在体外成骨的过程中发挥了积极的调节作用。激活 PI3K/AKT 信号通路可对成骨细胞表达 VEGF 发挥诱导的作用, 进而加速血管的形成过程, 同时提高 BMD, 增加骨形成, 发挥治疗 OP 的作用<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值降低, 说明 PMOP 的发生与 PI3K/AKT 信号通路有关; 经过 VAP 给药干预后, 大鼠骨组织中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值升高, 表明 PI3K/AKT 信号通路被激活, 进一步证明 VAP 可有效激活 PI3K/AKT 信号通路, 进而促进骨形成, 发挥治疗 PMOP 的作用。

综上所述, VAP 对 PMOP 大鼠具有明显的保护作用, 并且其效果可能与 VAP 剂量有一定关联, 其抗 PMOP 的作用机制可能通过介导 PI3K/AKT 信号通路途径对抗氧化应激过程进而实现骨保护作用。但 PMOP 的发生机制复杂, 由多种因素共同参与, 因此 VAP 通过 PI3K/AKT 信号通路发挥抗 PMOP 的作用机制有待进一步研究。

**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设计、数据整理分析和论文撰写, 陈芳园、皮子凤、律广富、王雨辰和李银清参与实验操作和数据收集, 黄晓巍和林喆参与实验设计指导和论文审校。

**[参考文献]**

- [1] 田欣, 陈珺, 黄慧灵, 等. 橘红素对去卵巢大鼠子宫及血清激素、骨代谢和炎症因子的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(4): 249-255.
- [2] 罗令, 孙晓峰, 皮丕喆, 等. 近10年来我国中老年人骨质疏松症患病率的荟萃分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(11): 1415-1420.
- [3] 阿卜杜吾普尔·海比尔, 阿里木江·玉素甫, 买合木提·亚库甫, 等. 特立帕肽和双膦酸盐治疗绝经后骨质疏松性骨折有效及安全性的Meta分析[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(4): 639-645.
- [4] 汪青, 钱胤华, 黄昊强, 等. 氧化应激在骨质疏松症与肩袖损伤共病机制中的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(5): 776-780.
- [5] 许晓宇, 安小春. 绝经后骨质疏松发生机制的研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2023, 46(1): 77-80.
- [6] FELEKE M, BENNETT S, CHEN J Z, et al. New physiological insights into the phenomena of Deer antler: a unique model for skeletal tissue regeneration[J]. J Orthop Translat, 2021, 27: 57-66.
- [7] 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.
- [8] XIU Z B, LIN J H, WU Z Y, et al. Effect of pilose of antler polypeptides on chondrogenic phenotype differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells invitro[J]. J Clin Rehabil Tissue Engin Res, 2011, 15(19): 3563-3566.
- [9] 龚庆, 赵文海, 宋秋莹, 等. 鹿茸多肽对去卵巢大鼠骨质疏松预防作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(5): 890-893.
- [10] LIU C X, KUANG X T, LI K L, et al. Effects of combined calcium and vitamin D supplementation on osteoporosis in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Food Funct, 2020, 11(12): 10817-10827.
- [11] 许显卓. 常用抗骨质疏松药物临床应用分析[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(5): 889.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 李芳. Apelin-13促大鼠血管平滑肌细胞增殖的PI3K/Akt信号通路研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.
- [16] GONCALVES M D, HOPKINS B D, CANTLEY L C. Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer[J]. N Engl J Med, 2018, 379(21): 2052-2062.
- [17] 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.
- [18] ZHAO F J, XU Y E, OUYANG Y L, et al. Silencing of miR-483-5p alleviates postmenopausal osteoporosis by targeting SATB2 and PI3K/AKT pathway [J]. Aging, 2021, 13(5): 6945-6956.
- [19] XI J C, ZANG H Y, GUO L X, et al. The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 640-645.
- [20] PAN J M, WU L G, CAI J W, et al. Dexamethasone suppresses osteogenesis of osteoblast *via* the PI3K/Akt signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2019, 39(1): 80-86.
- [21] DENG S, DAI G, CHEN S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110: 602-608.
- [22] ZHOU H M, JIAO G J, DONG M, et al. Orthosilicic acid accelerates bone formation in human osteoblast-like cells through the PI3K-akt-mTOR pathway [J]. Biol Trace Elem Res, 2019, 190(2): 327-335.
- [23] 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.
- [24] 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.