

· 论著 ·

黄芪多糖治疗对去卵巢诱导骨质疏松大鼠骨密度、骨量和骨代谢的影响

张小钰¹ 陈慧² 马敬祖¹ 马志荣¹ 汪玉海^{1*}

1.西北民族大学第一附属医院(宁夏回族自治区人民医院),宁夏 银川 750012

2.解放军联勤保障部队 940 医院,甘肃 兰州 730050

中图分类号: R-332;R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 01-0021-05

摘要: **目的** 探索黄芪多糖对去卵巢大鼠骨量和骨代谢以及 BMP-2/Smads 信号通路的影响。**方法** 30 只雌性 SD 大鼠进行去卵巢手术或假手术。正常饲养 12 周后被分为黄芪多糖组(ASNT 组)、对照组(CON 组)和去卵巢组(OVX 组),其中黄芪多糖组每天给予 400 mg/kg 黄芪多糖治疗。通过骨密度、骨代谢指标、Micro-CT 以及 WB 检测评估 ASNT 对骨质疏松症大鼠骨量、骨代谢以及 BMP-2/Smads 信号通路的影响。**结果** 经过 12 周治疗,ASNT 组大鼠骨密度较 OVX 组显著增加($P<0.05$);ASNT 治疗 12 周可以降低血清 ALP 和 OC 水平,增加血钙含量,增加股骨骨密度。经过 12 周治疗,ASNT 组大鼠骨体积分数(BV/TV)、表面积体积分数(BS/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数目(Tb.N)较 OVX 组显著增加;而骨小梁间隙(Tb.Sp)较 OVX 组显著降低,差异比较有统计学意义($P<0.05$)。WB 结果表明 OVX 大鼠骨组织的 BMP-2/Smads 信号通路受到抑制;ASNT 可以通过上调 BMP-2、p-Smad1 和 p-Smad5 的表达显著激活 BMP-2/Smads 信号通路传导。**结论** 研究表明 ASNT 对去卵巢大鼠骨密度和骨量具有保护作用,可能和激活 BMP-2/Smads 信号通路有关。

关键词: 骨质疏松;去卵巢;黄芪多糖;BMP-2/Smads 信号通路;大鼠;骨密度

Effect of astragalus polysaccharide treatment on bone mineral density, bone mass, and bone metabolism in ovariectomized osteoporotic rats

ZHANG Xiaoyu¹, CHEN Hui², MA Jingzu¹, MA Zhirong¹, WANG Yuhai^{1*}

1.The First Affiliated Hospital of Northwest Minzu University, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750012

2. 940 Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730050, China

* Corresponding author: WANG Yuhai, Email: 398672611@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the effects of astragalus polysaccharide on bone mass and bone metabolism and BMP-2/Smads signaling pathway in ovariectomized rats. **Methods** Thirty female Sprague-Dawley rats underwent ovariectomy or sham surgery. After 12 weeks of normal feeding, the rats were divided into astragalus polysaccharide group (ASNT group), control group (CON group), and ovarian removal group (OVX group). Rats in the astragalus polysaccharide group received 400 mg/kg astragalus polysaccharide every day. The effect of ASNT on bone mass, bone metabolism, and BMP-2/Smads signaling pathway in osteoporotic rats were evaluated with bone mineral density, bone metabolism indicators, micro-CT, and WB tests. **Results** After 12 weeks of treatment, bone mineral density in ASNT group increased significantly compared to that in OVX group ($P<0.05$). ASNT treatment for 12 weeks reduced serum ALP and OC levels, increased blood calcium content, and increased femoral bone density. After 12 weeks of treatment, bone volume fraction (BV/TV), surface area volume fraction (BS/TV), trabecular thickness (Tb.Th), and number of trabecular bone (Tb.N) in ASNT group were significantly higher than those in OVX group. Trabecular space (Tb.Sp) was significantly lower than that in OVX group, and there was a significant difference ($P<0.05$). WB result showed that the BMP-2/Smads signaling pathway in OVX rats was inhibited. ASNT significantly activated BMP-2/Smads signaling pathway by up-regulating the expression of BMP-2, p-Smad1 and p-Smad5. **Conclusion** Studies have shown that ASNT has a protective effect on bone

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(31920180092)

* 通信作者: 汪玉海, Email: 398672611@qq.com

mineral density and bone mass in ovariectomized rats, which may be related to activating the BMP-2/Smads signaling pathway.

Key words: osteoporosis; ovariectomy; astragalus polysaccharide; BMP-2/Smads signaling pathway; rat; bone mineral density

绝经后骨质疏松症是一种常见的骨病,其特征是骨量降低和骨微结构破坏,导致骨脆弱性增加和骨折风险升高^[1-2]。绝经后骨质疏松症已经成为一种日益重要的健康问题,给全世界数百万人的家庭和本人都带来了严重的影响^[3]。目前,治疗这类骨质疏松症最常用的药物包括二磷酸盐、选择性雌激素受体调节剂、甲状旁腺激素(1~34)、RANK 配体抑制剂和性激素^[4]。然而,这些药物的临床疗效受到药物耐受性较差和长期不良反应的影响^[5],因此急需新的药物来改善这类情况。黄芪多糖(astragalus polysaccharide, ASNT)是从中药黄芪中提取、分离,纯化所得主要有效活性成分,具有刺激骨髓造血和增强免疫功能的作用;近年来有研究指出 ASNT 能减轻绝经后骨质疏松症的症状,但治疗机理尚不清楚^[6-7]。本研究的目的是研究黄芪多糖对双侧去卵巢手术诱导大鼠骨质疏松模型骨密度和骨量的影响,并探索获得这种疗效的可能机制。

1 资料和方法

1.1 动物模型的建立和治疗

6 月龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠购买于上海实验动物中心,并饲养在 12 h 光暗循环,温度控制在(22±2)℃和湿度控制在 50%~60%的环境中。所有大鼠能自由接触到实验室提供的标准啮齿动物食物和水。在实验之前所有大鼠适应性饲养 7 d。随后对大鼠进行背侧双侧去卵巢术(OVX)或假手术(Sham),并将大鼠正常条件下饲养 12 周以达到成功构建骨质疏松症模型;随机选择 10 只 OVX 及 Sham 大鼠(每组 5 只大鼠),通过测试骨密度(bone mineral density, BMD)验证成功建模。然后将大鼠分成 3 组,每组 10 只。CON 组:Sham 大鼠+生理盐水。OVX 组:OVX 大鼠+生理盐水;ASNT 组:OVX 大鼠给予 400 mg/(kg·d)黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,国药准字 220040086,药物融入生理盐水)灌胃治疗,药物剂量参考^[8]。药物治疗 12 周后取出左股骨,用 10%中性缓冲福尔马林固定 24 h,进行 BMD 微型计算机断层扫描检查(Micro-CT)。将右股骨切片并在液氮中冷冻以用于 Western 印迹(WB)分析。所有实验方案均经医院伦理委员会批准(No.2019016)。

1.2 血清测定中骨代谢指标

给药 12 周后称重每组动物,以 10%水合氯醛 4 mL/kg 麻醉,并从腹腔动脉取血以测量血清中雌二醇(E₂)、钙(Ca)、碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素(OC)水平。使用原子吸收光谱仪检测大鼠的血清钙和雌二醇的水平;血清骨转换标志物包括碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)使用酶联免疫吸附法检测,试剂盒由北京中肽生物科技有限责任公司提供。

1.3 骨密度测量

在 10%中性缓冲福尔马林中固定 24 h 后,左侧股骨用生理盐水冲洗 2 h。骨密度使用专门的小动物高分辨率骨密度仪(Discovery A/SL/W/C; HOLOGY, Bedford, MA, 01730 USA)通过双能量 X 射线吸收测量法测量大鼠股骨骨密度。

1.4 Micro-CT 检查

在骨密度测量后,左侧股骨通过锥束台式微型 CT 测量(μ CT80, Sanco Medical, Brüttisellen, Switzerland),并通过相关分析软件(μ CT80 Evaluation Program v6.51, Sanco Medical, Switzerland)进行评估。扫描后选择股骨远端高于生长板 1 mm 的松质骨作为 VOI,该 VOI 仅限于股骨内部区域,其中通过使用 CT 分析器软件绘制自由形式等高线来提取小梁和皮质骨。使用标准化技术勾勒松质骨的微观结构,通过多平面重组获得三维(3D)图像;以确定骨体积分数(BV/TV, %)、表面积体积分数(BS/TV, mm⁻¹)、骨小梁厚度(Tb.Th, μ m)、骨小梁数日(Tb.N, mm⁻¹)和骨小梁间隙(Tb.Sp, μ m)。

1.5 WB 检测

左侧股骨在液氮中粉碎后,用 IP 裂解缓冲液从骨组织中提取总蛋白。用 BCA 蛋白试剂盒定量测定蛋白浓度。将蛋白与加载缓冲液混合,在 100℃煮沸 5 min,使其变性。用 10%和 15%SDS-PAGE 分离 50 μ g 总蛋白,转移到 0.45 m 聚偏氟乙烯(PVDF)膜中。用 5%的脱脂奶粉在室温下封闭 1 h 后,将膜分别和 BMP-2、Smad1、p-Smad1、Smad5、p-Smad5 一抗在 4℃孵育过夜,然后与辣根过氧化物偶联的二抗在室温下孵育 1 h。用 ECL 试剂(美国 Thermo Scientific)显影印迹。使用 GAPDH 蛋白进行归一化。用 Image J 软件测量各蛋白条带的总和密度。

1.6 统计学分析

实验数据表示为均数 $\pm$ 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。 $P<0.05$ 判断差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度和骨代谢指标分析

各组大鼠之间的平均 BMD 结果如表 1 所示。

表 1 各组大鼠之间的平均 BMD 值结果($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Mean BMD values results in the groups($\bar{x}\pm s$)

组别	股骨 BMD (g/cm^2)	E_2 (ng/L)	ALP (U/L)	OC ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Ca (mmol/L)
CON 组	0.45 ± 0.07	46.23 ± 11.07	85.74 ± 18.55	2.34 ± 0.52	2.28 ± 0.45
OVX 组	$0.21\pm 0.04^{**}$	$26.54\pm 11.25^{**}$	$127.82\pm 30.12^{**}$	$3.12\pm 0.39^{**}$	$1.76\pm 0.38^{**}$
ASNT 组	$0.34\pm 0.08^{**\#\#}$	$38.58\pm 8.60^{**\#\#}$	$95.26\pm 29.37^{**\#\#}$	$2.65\pm 0.58^{**\#\#}$	$2.08\pm 0.20^{**\#\#}$

注:和 CON 组比较, $^{**}P<0.05$;和 OVX 组比较, $^{\#\#}P<0.01$ 。

2.2 ASNT 对 OVX 大鼠股骨干骺端骨微结构的影响

大鼠股骨干骺端骨小梁三维重建如图 1 所示;骨微结构参数包括 BV/TV、BS/TV、Tb.Th、Tb.N 和 Tb.Sp,如图 2 所示。与 CON 组相比,OVX 组大鼠 BV/TV($P=0.043$)、BS/TV($P=0.000$)、Tb.Th($P=$

CON 组和 OVX 组比较时发现 OVX 组股骨 BMD 值和 E_2 、Ca 水平较 CON 组显著降低($P<0.05$);而 ASNT 组 BMD 和 Ca、 E_2 水平较 OVX 组明显升高,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。和 CON 组比较,OVX 组 ALP 和 OC 显著升高($P<0.05$);而 ASNT 组 ALP 和 OC 水平较 OVX 组明显降低,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。这些结果表明 ASNT 能提高去卵巢大鼠骨密度和降低骨转换速度。

0.002)和 Tb.N($P=0.033$)的水平显著下降,而 Tb.Sp($P=0.000$)显著增加。ASNT 组的 Tb.Sp 水平显著下降,而其他参数明显增加(和 OVX 组比较,BV/TV: $P=0.024$;BS/TV: $P=0.002$;Tb.Th: $P=0.000$;Tb.N: $P=0.025$;Tb.Sp: $P=0.000$)。

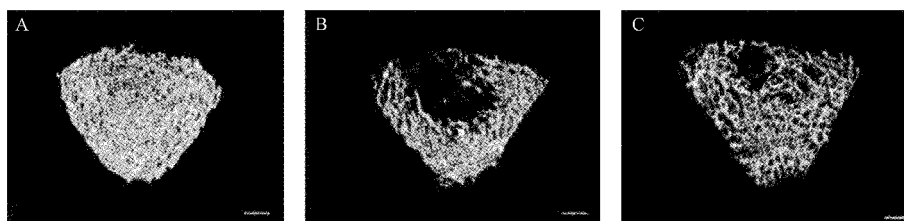


图 1 ASNT 骨质疏松大鼠股骨三维重建显微 CT 图像的影响

Fig.1 Assessment of the effect of ASNT on the femur of the osteoporosis rats in 3D-reconstructed micro-CT images

2.3 ASNT 增强 OVX 大鼠中的 BMP-2/Smads 信号传导和骨形成

BMP-2、Smad1、p-Smad1、Smad5、p-Smad5 的蛋白表达如图 3 所示,OVX 组大鼠 BMP-2($P=0.000$)、Smad1($P=0.009$)、p-Smad1($P=0.000$)、p-Smad5($P=0.009$)的蛋白质表达水平显著下调。而 ASNT 治疗能有效上调 BMP-2($P=0.000$)、p-Smad1($P=0.000$)和 p-Smad5($P=0.025$)的表达水平。

3 讨论

绝经后骨质疏松症的形成是一个长期的病理过

程。骨密度和骨小梁微观结构变化可以反映出骨量的细微变化^[9]。血清中的骨代谢指标可以反映骨代谢的状态,因此可以作为评价药物疗效的另一标准^[10]。黄芪多糖在以往的研究已经表现出促进骨和改善骨髓间充质干细胞成骨分化的效果^[11-12]。因此,本实验以骨密度、血清骨代谢指标和骨微观结果变化为主要指标研究黄芪多糖对去卵巢大鼠治疗的效果。

绝经后雌激素水平降低,并且 T 细胞被激活以促进破骨细胞形成^[13]。血清中的 OC 可以表明新形成的成骨细胞处于活跃状态,而 ALP 是骨形成和

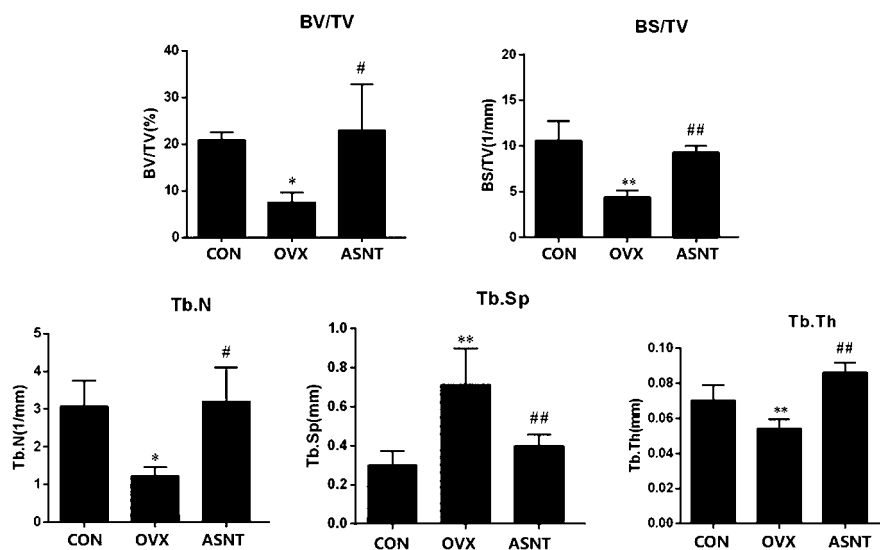


图 2 ASNT 对骨质疏松大鼠微结构参数的影响

Fig.2 Assessment of ASNT effect on micro-architectural parameters in osteoporosis rat model

注:和 CON 组比较, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$; 和 OVX 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

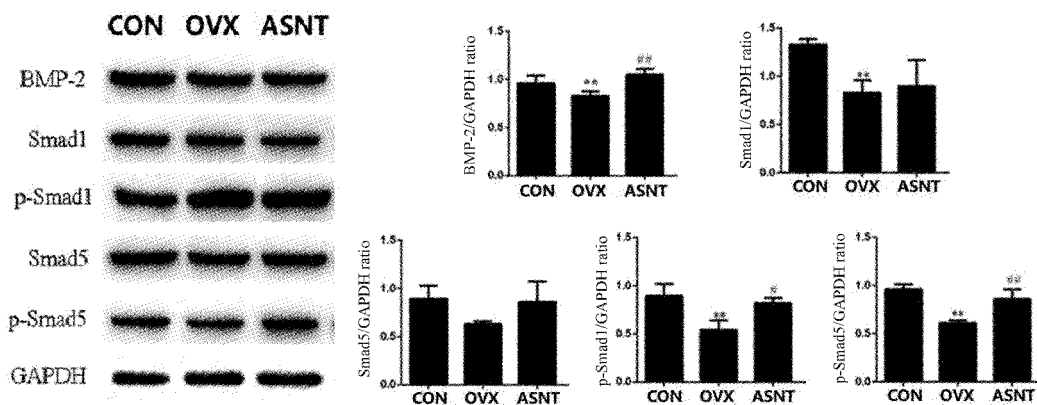


图 3 Western blot 分析 BMP-2、Smad1、p-Smad1、Smad5、p-Smad5 蛋白的表达

Fig.3 Western blotting analysis of protein expressions of BMP-2, Smad1, p-Smad1, Smad5, and p-Smad5

注:和 CON 组比较, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$; 和 OVX 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

骨转换的重要生化指标。血清中的 OC 水平可以表明新形成的成骨细胞处于活跃状态,而 ALP 是骨形成和骨转换的重要生化指标^[14]。实验结果表明,模型组血清 E_2 明显降低,而 OC 水平显著升高,表明成功建立了高转化性骨质疏松症模型,与绝经后骨质疏松症的临床特征相符^[15]。黄芪多糖可以显著增加大鼠血清中 E_2 、ALP 和 OC 的水平,表明黄芪多糖具有雌激素样作用,并且可以通过降低血清中的 ALP 和 OC 来预防卵巢切除术后骨质疏松的形成。本研究进一步对股骨远端进行 Micro-CT 扫描发现去卵巢术后 12 周,OVX 组大鼠的 BV/TV、BS/TV、Tb.Th 和 Tb.N 明显降低,而 Tb.Sp 明显升高。在本

研究中,ASNT 治疗 12 周后,BV/TV、BS/TV、Tb.Th 和 Tb.N 与 OVX 大鼠相比显著升高。相反,ASNT 组大鼠股骨远端 Tb.Sp 与 OVX 组相比明显降低。因此,本研究表明 ASNT 可以改善股骨的 BMD 和骨微结构特性,和之前研究得出相似的结果^[11-12]。

低 BMP-2 表达与低 BMD 和骨折高风险密切相关^[16]。由于 BMP-2 可以通过激活 I 型激活素受体样激酶和 II 型跨膜丝氨酸苏氨酸 Ki-Nase 受体的异源四聚体复合物发挥作用,后者随后磷酸化并激活受体调控因子 Smad1、5、8;而磷酸化的 Smad1、5、8 因子与 Smad4 结合并转移到细胞核中以介导成骨相关基因的表达^[17]。在本研究中,卵巢切除可以在

蛋白质水平上显著下调 BMP-2 和 Smad1、p-Smad1 和 p-Smad5 因子的表达。ASNT 治疗可以显著逆转 OVX 大鼠这些蛋白质表达的变化,明显上调 BMP-2 和 Smad1、p-Smad1 和 p-Smad5 的表达;上述结果表明 ASNT 治疗可以刺激 BMP-2/Smads 信号通路的激活。

本研究有其不足之处,首先研究模型限制了研究结果进一步推广;其次剂量选取的原因只能证实本研究选取的剂量对去卵巢引起骨量流失保护作用,是否合适其他类型的骨质疏松症就不得而知了;由于没有进一步研究该药物对细胞的影响,因此需要进一步进行体外研究验证其对成骨细胞和破骨细胞的影响。

本研究的结果表明黄芪多糖对 BMD 的积极影响,同时也发现它对骨微结构具有显著的积极保护作用。另外,黄芪多糖治疗后 BMP-2/Smads 信号通路的激活。总之,黄芪多糖可以作为治疗绝经后骨质疏松症的有潜力治疗药物之一,治疗效果可归因于 BMP-2/Smads 信号通路的激活,具体效果如何还需要进一步进行相关实验。

【 参 考 文 献 】

- [1] Isa Y, He P, Li N, et al. Protective effects of honey by been on decreased cortical thickness and bone impact strength of ovariectomized rats as models for menopause [J]. Veterinary World, 2019, 12(6) : 868-876.
- [2] 陶周善,吕杨训,崔伟,等. β -TCP 修复骨质疏松性骨缺损的实验研究[J].中国骨质疏松杂志, 2014, 20(10) : 1178-1183.
- [3] 彭方亮,于洪涛,邵辉,等.骨质疏松骨折史和合并症对健康相关生活质量的影响[J].中国骨质疏松杂志, 2019, 25(11) : 1585-1588.
- [4] 张倩,韩婕,汤旭磊.不同浓度白藜芦醇对破骨细胞分化的影响及自噬的作用[J].中国骨质疏松杂志, 2020, 26(4) : 564-569, 594.
- [5] Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating bone resorption and bone formation in opposite directions in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Drugs, 2015, 75(10) : 1049-1058.
- [6] Chai YH, Gao J, Tian XZ, et al. Effect of astragali radix polysaccharide on mRNA and protein expression of CYP27B, CYP24A in MC-3T3-E1 osteoblasts [J]. Chin J Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(13) : 147-151.
- [7] Zhang HB, Cao WB, Ping LU, et al. Experimental study on anti-osteoporosis effect of astragals polysaccharides on ovariectomized female rats [J]. J Yulin Normal University, 2012, 33(5) : 51-55.
- [8] 闫伟华,常静侠,黄芪多糖对哮喘大鼠气道炎症及肺组织血管内皮生长因子表达的影响[J].中国临床药理学杂志, 2020, 36(8) : 953-955.
- [9] Shanbhogue VV, Hansen S, Frost M, et al. Bone geometry, volumetric density, microarchitecture, and estimated bone strength assessed by HR-pQCT in adult patients with type 1 diabetes mellitus [J]. J Bone & Mineral Research, 2015, 30(12) : 2188-2199.
- [10] 庄铭城,王小燕,林泽伟.不同年龄段健康人群骨代谢指标 I 型前胶原 N 末端前肽的特点分析[J].中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2) : 268-272.
- [11] 柴艺汇,高洁,田兴中,等.黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B, CYP24A mRNA 及蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13) : 147-151.
- [12] 曾高峰,张志勇,鲁力,等.多糖干预骨质疏松模型大鼠的作用及机制[J].中国组织工程研究, 2012, 16(50) : 9471-9478.
- [13] Tolba MF, El-Serafi AT, Omar HA. Caffeic acid phenethyl ester protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vivo: Impact on oxidative stress and RANKL/OPG signals [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2017, 324(4) : 26-35.
- [14] 张奇,蔡菁,靳勇,等.中老年女性血清 25 羟维生素 D 水平与骨密度、体质量指数的调查研究[J].中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3) : 328-332.
- [15] Wei S, Zhang Z, Huang Z. Effects of estrogen on Wnt16, β -catenin, OPG, RANKL expression in bone tissue of ovariectomized rats [J]. Zhejiang Med J, 2017, 39(9) : 245-249.
- [16] Harris MR, Se B. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2 [J]. Plos Biology, 2003, 1(3) : 324-328.
- [17] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, et al. Bone morphogenetic proteins: A critical review [J]. Cellular Signalling, 2011, 23(4) : 609-620.

(收稿日期: 2020-02-11;修回日期: 2020-05-29)