

红曲通过激活腺苷酸活化蛋白激酶上调骨形态发生蛋白 2 表达对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用

冷明昊¹ 张卫华^{2△} 陈东² 廖银平³

[摘要] **目的:**探讨红曲对去卵巢大鼠骨质疏松症的作用,以及对腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路和骨形态发生蛋白 2(BMP2)表达的影响。**方法:**采取双侧卵巢切除手术构建骨质疏松症大鼠模型,给予造模成功的大鼠结合雌激素和质量分数浓度的红曲(1.56,3.12,6.24 g/kg)每天灌胃治疗,分为去卵巢组,雌激素组,红曲低、中、高剂量组,另设假手术组,每组 6 只。连续干预 12 周后,处死动物,称量大鼠体质量,双能 X 线测量骨密度,苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠骨组织病理形态的改变,ELISA 检测骨代谢的生物标志物,包括碱性磷酸酶(ALP)、酒石性酸性磷酸酶(TRAP)、骨钙素(OC)、I 型前胶原羧基端肽(PICP)水平,Western Blot 法检测骨组织 AMPK 和 BMP2 的表达。**结果:**与假手术组相比,去卵巢组大鼠体质量降低,骨密度显著降低,骨小梁排列稀疏、紊乱并连接不完整,骨量减少,骨代谢的生物标志物 ALP,TRAP,OC,PICP 水平显著升高,下调了 AMPK 和 BMP2 的表达;与去卵巢组相比,红曲各剂量组大鼠体质量增加,骨密度显著增加,骨小梁排列有所改善,骨小梁数目增加且连接增强,骨代谢的生物标志物 ALP,TRAP,OC,PICP 水平显著降低,激活 AMPK 信号通路并上调 BMP2 的表达;其中红曲中剂量组变化最显著。**结论:**红曲增加了去卵巢大鼠的体质量和骨密度,改善了骨组织的形态和排列,降低了骨代谢标志物 ALP,TRAP,OC,PICP 水平,进而对骨质疏松症有改善作用,可能是通过激活 AMPK 信号通路上调 BMP2 来调控的。

[关键词] 红曲;腺苷酸活化蛋白激酶/骨形态发生蛋白 2;去卵巢大鼠;骨质疏松症

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)03-0007-05

Red Yeast Rice Improves Osteoporosis in Ovariectomized Rats by Activating AMPK and Up-Regulating BMP2 Expression

LENG Minghao¹ ZHANG Weihua^{2△} CHEN Dong² LIAO Yinping³

¹Department of Orthopedics, Suizhou Central Hospital, Suizhou 441300, Hubei China;

²Department of Orthopedics, Wuhan Hanyang Hospital, Wuhan 430050, China;

³Department of Basic Medicine, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China.

Abstract Objective: To explore the effect of red yeast rice on osteoporosis from ovariectomized rats, as well as the effects on AMPK signaling pathway and BMP2 protein expression. **Methods:** Bilateral oophorectomy was used to construct a rat model of osteoporosis. Rats with successful modeling were given intragastric treatment combined with estrogen and different concentrations of red yeast (1.56, 3.12, 6.24 g/kg), which can be divided into ovary group, estrogen group, red, low, medium and high dose groups, another sham operation group with 6 animals in each group. After 12 weeks of continuous intervention, the animals were sacrificed, the rats were weighed. The bone density was measured by dual-energy X-ray. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of bone tissue in rats, and the biomarkers of bone metabolism were detected by ELISA. Substances including ALP, TRAP, OC, PICP levels. Western Blot was used to

detect bone tissue AMPK and BMP2 protein expression.

Results: Compared with the sham-operated group, the ovariectomized group had lower body weight, significantly lower bone density, sparse trabecular arrangement, disorder and incomplete connection, reduced bone mass, and levels of bone metabolism biomarkers ALP, TRAP, OC and lower PICP, down-regulated the expression of AMPK and BMP2.

基金项目:湖北省卫生健康委员会创新团队项目

(WJ2019M038)

¹ 湖北随州市中心医院骨科(湖北 随州, 441300)

² 武汉市汉阳医院骨一科

³ 武汉科技大学医学院基础医学部

△通信作者 E-mail: gpywzs@163.com

Compared with the ovariectomized group, the weight of the red yeast rice group increased significantly, and the bone density was significantly increased. The trabecular bone arrangement was improved, and the number of trabecular bone was increased. The connection was enhanced, and the levels of bone metabolism biomarkers ALP, TRAP, OC and PICP were significantly reduced. The AMPK signaling pathway and up-regulating the protein expression of BMP2 was activated. Among them, the middle dose group of red yeast rice had the most significant changes. **Conclusion:** Red yeast rice increases the weight and bone density of ovariectomized rats, improves the morphology and arrangement of bone tissue, and reduces the levels of bone metabolism markers ALP, TRAP, OC and PICP, which in turn can improve osteoporosis, which may be regulated by activating the AMPK signaling pathway to upregulate BMP2.

Keywords: red yeast rice; AMPK/BMP2; ovariectomized rats; osteoporosis

骨质疏松症是一种常见的骨骼疾病,由低骨量和骨组织结构恶化引起,影响着数百万人,其中80%为绝经后妇女^[1]。红曲由红曲霉发酵而成,含有洛伐他汀和其他活性成分^[2],被认为在治疗冠心病、糖尿病、骨质疏松症等方面发挥作用^[3]。研究发现红曲可以促进骨形成和增加骨密度^[4],可能与AMPK激活促进BMP2表达调节骨形成和分化有关^[5]。本研究观察红曲对去卵巢骨质疏松症大鼠体重、骨密度和骨代谢指标的影响,旨在研究红曲对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周龄SPF级的雌性Wistar SD大鼠(48只,体重220~240 g),由武汉科技大学实验动物中心提供,自由饮食饮水,给予12 h(光)/12 h(暗)的周期循环。

1.2 药品和试剂

红曲购自浙江桐君堂中药饮片有限公司,雌激素购自华北制药股份有限公司;10%水合氯醛溶液购自国药集团化学试剂北京有限公司;血清骨代谢标志物ALP、TRAP、OC、PICP ELISA检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;GAPDH抗体购自上海闪晶分子生物科技有限公司;AMPK和BMP2抗体购自Cell Signaling Technology公司。

1.3 方法

1.3.1 药物配制 将红曲溶解于75%乙醇中,超声处理30 s,60℃水浴蒸发,配制母液浓度为0.1,0.2,0.4 g/mL红曲水提液。配制结合雌激素水溶液浓度为6.25 μg/mL。

1.3.2 动物分组及造模 所有的动物适应7 d后,将8周龄的雌性SD大鼠随机分为6组($n=8$),包括假手术组、去卵巢组、雌激素组和红曲低、中、高剂量组。其中模型组、雌激素组和红曲低、中、高剂量组大鼠分别用10%水合氯醛全身麻醉,在无菌条件下进行双侧卵巢切除手术,假手术组仅打开腹腔,不切除卵巢。

1.3.3 药物治疗 造模手术后恢复4周,再对雌激素和红曲组造模成功的大鼠每天给予雌激素(25 μg/kg)和红曲低、中和高剂量(1.56,3.12,6.24 g/kg)灌胃治

疗,假手术组和模型组每天给予等量的0.9%的生理盐水,连续灌胃12周。实验期间每隔4周对小鼠称重1次。

1.3.4 大鼠样本的收集

末次治疗后1天处死大鼠,取各组大鼠L5椎体及左右侧的股骨、胫骨,剔除掉周围软组织,再浸泡在10%甲醛溶液中低温保存,用来进行骨密度分析和苏木精-伊红(HE)染色,同时经眼球采集血样检测血清骨代谢参数。

1.3.5 骨密度检测

将浸泡在10%甲醛里的大鼠股骨标本取出,采用双能X线骨密度分析仪扫描和测量骨密度。这些数值由Encore 2006软件包自动计算。

1.3.6 胫骨组织 HE 染色

取大鼠右侧胫骨在10%福尔马林固定,以10%EDTA脱钙,嵌入在石蜡,切成5 μm部分。切片经脱蜡,常规HE染色,光镜下观察。

1.3.7 血清骨代谢标志物检测 血清骨代谢标志物ALP、TRAP、OC、PICP水平平均通过ELISA试剂盒检测。所有步骤均按照ELISA检测试剂盒制造商的说明书进行测定,最后在酶标仪450 nm处检测吸光度,记录数值,再根据标准曲线换算出标志物的含量。

1.3.8 Western Blot 用100 μL裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Igepal, 0.1% 十二烷基硫酸钠, 10 μg/mL 苯甲基磺酰氟, 10 μg/mL 亮抑酶肽, 10 μg/mL 胃酶抑素, 和 10 μg/mL 热活化原钒酸钠)从骨组织中提取骨蛋白。获得细胞裂解物并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,分别在4℃条件下孵育鼠抗AMPK及BMP2抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:2 000)过夜。次日回收一抗,室温孵育二抗(鼠抗)1.5 h,1×TBST洗膜,用ECL检测反应条带。GAPDH作为内参。

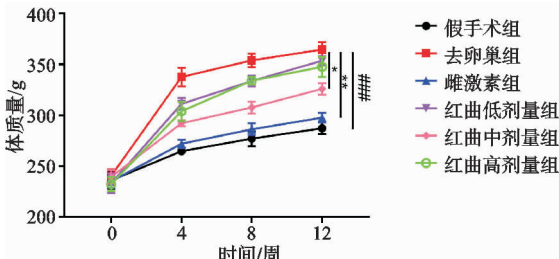
1.4 统计学方法

统计分析中所有的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用SPSS 20.0软件进行统计分析。采用ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠体质量的影响

如图 1 所示,各组大鼠初期的体质量差异无统计学意义($P>0.05$),但随着造模与治疗时间变化,与假手术组相比,去卵巢组大鼠体质量显著增多,差异有统计学意义($P<0.001$)。同时相比于去卵巢组,雌激素组预防了大鼠体质量的增加,差异有统计学意义($P<0.001$),红曲各剂量组大鼠体质量均下降,但红曲中剂量组效果最显著,差异有统计学意义($P<0.01$)。因此,红曲可以预防去卵巢骨质疏松大鼠体质量的增加。

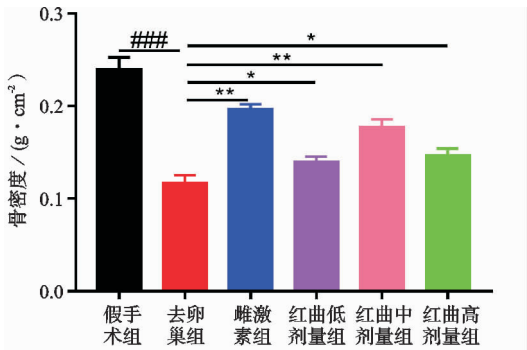


注:与假手术组相比,*** $P<0.001$;与去卵巢组相比,** $P<0.01$,* $P<0.05$ 。

图 1 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠体质量的影响

2.2 红曲增加去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度

如图 2 所示,与假手术组相比,去卵巢组股骨的骨密度明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$)。但与去卵巢组相比,雌激素组明显抑制了去卵巢引起的骨



注:与假手术组相比,*** $P<0.001$;与去卵巢组相比,** $P<0.01$,* $P<0.05$ 。

图 2 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响

2.3 红曲改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨形态

对大鼠股骨组织使用 HE 染色检查股骨近端组织学改变,如图 3 所示,假手术组大鼠骨排列整齐,骨小梁正常,体积大、丰满,呈网状。而相比于假手术组,去卵巢组大鼠股骨近端小梁变薄,空骨陷窝数量增加,体积增大。与去卵巢组大鼠相比,红曲各剂量组大鼠股骨近端小梁厚度及总骨量明显增加,其中红曲中剂量组增加最显著。

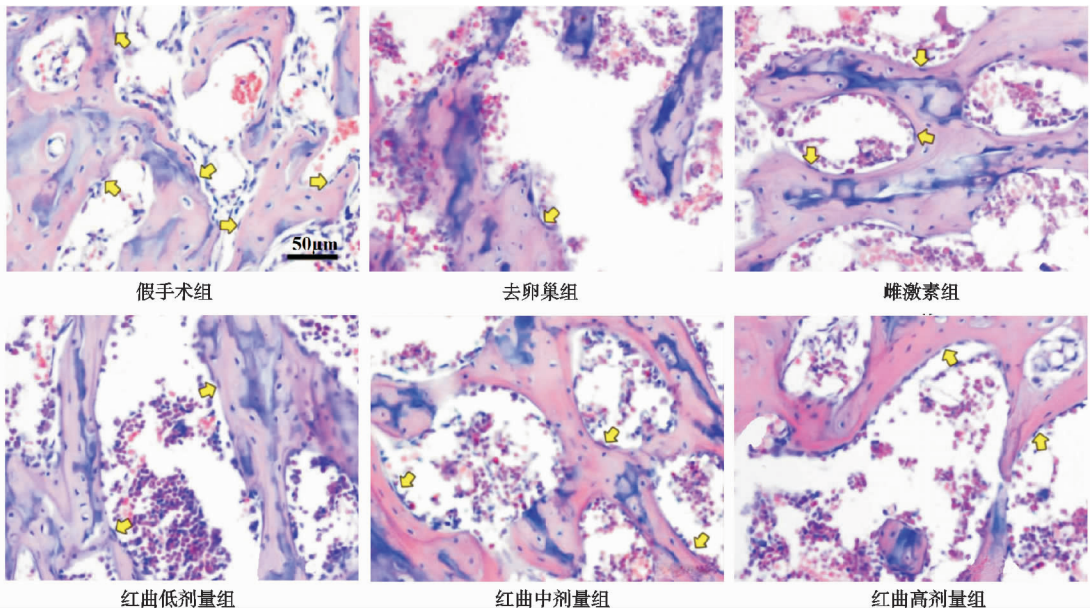


图 3 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠骨形态的影响(黄色箭头是成骨细胞)

2.4 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响

探究了红曲对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响,ELISA 结果显示:与假手术组相比,去卵巢组大鼠血清中 ALP,TRAP,OC 及 PICP 水平升高;同时与去卵巢组相比,雌激素组显著抑制了 ALP,TRAP,OC 及 PICP 水平的升高,而红曲组表现出与

雌激素组相似的效果,差异有统计学意义(图 4a-d, $P<0.05$)。因此,红曲对去卵巢引起的骨质疏松大鼠的骨代谢和骨形成有保护作用。

2.5 红曲激活 AMPK 信号通路、促进 BMP2 表达

为进一步探讨红曲保护去卵巢引起的骨质疏松的分子机制,采用 Western Blot 方法检测各组大鼠骨组织中 AMPK 和 BMP2 的蛋白表达,结果显示:相对

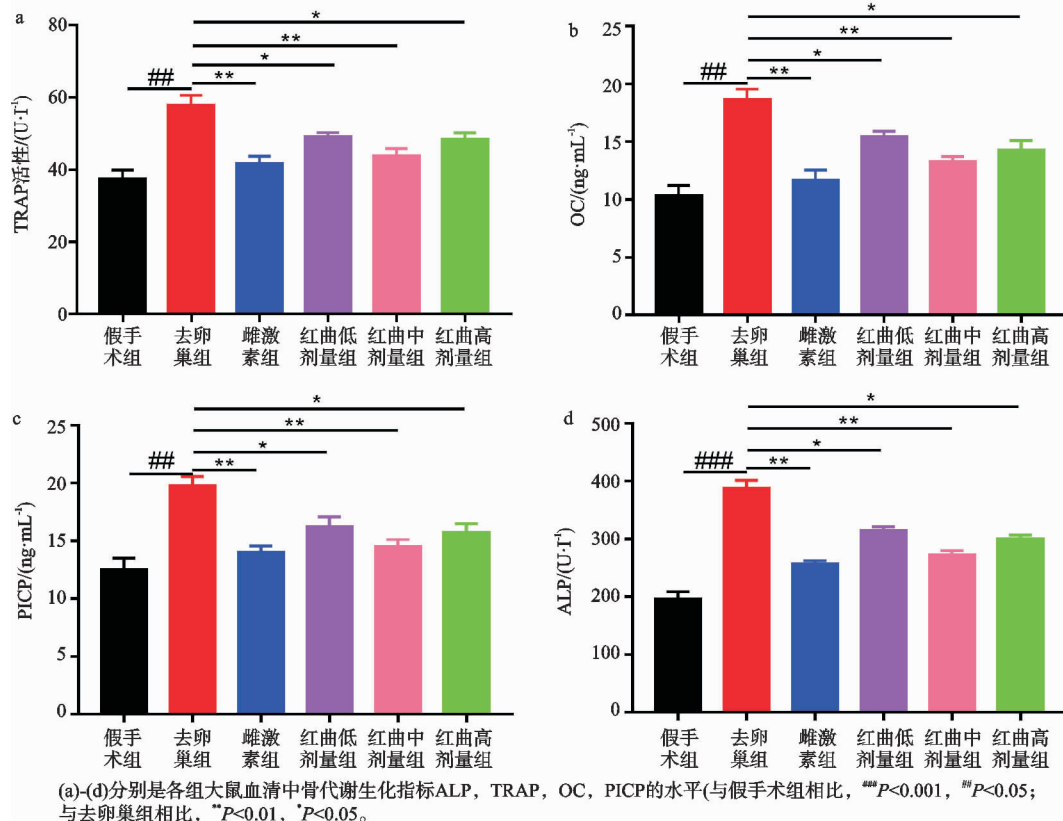


图4 红曲对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响

于假手术组,去卵巢组大鼠骨组织中 AMPK 和 BMP2 蛋白表达下调,而相对于去卵巢组,雌激素组 AMPK 被激活,显著上调了 BMP2 蛋白表达,红曲各剂量组 AMPK 也被激活并上调 BMP2 蛋白表达,其中红曲中剂量组上调最显著。因此,红曲可能通过激活 AMPK 信号通路来上调 BMP2 表达,进而改善了去卵巢大鼠骨质疏松。

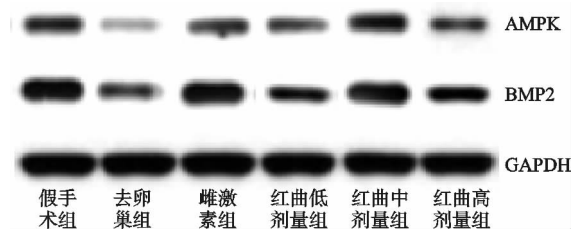


图5 红曲激活 AMPK 信号通路并上调 BMP2 表达

3 讨论

骨质疏松症是最常见的骨骼疾病之一,目前全世界约有 2 亿人受到影响^[6]。骨质疏松症分为原发性骨质疏松症和继发性骨质疏松症。另外,原发性骨质疏松症又分为绝经后骨质疏松症、老年骨质疏松症和特发性骨质疏松症^[7]。其发病率随着人口老龄化和预期寿命的增加而显著增加,15.5%的患者在 50~59 岁之间,81%的患者在 80~89 岁之间,骨质疏松症在世界各地的老年人中越来越普遍^[8]。其中女性在绝经后更容易患骨质疏松症,这是由于雌激素缺乏导致的骨代谢加速,从而增加了骨折的风险^[9-10]。目前,治疗骨

质疏松的药物具有一定的局限性,因此,寻找有效治疗或改善骨质疏松症的药物是非常迫切的。

红曲是从大米中提取的一种物质,用一种叫红曲霉的酵母发酵,作为一种传统药物在中国和其他亚洲国家使用了几个世纪,对肥胖、胰岛素抵抗、高脂血症和非酒精性脂肪性肝炎有一定作用^[11],还被用作食用色素、添加剂和防腐剂^[12]。此外,有研究还发现红曲可以促进骨形成^[4],但其中的分子机制并不明确,同时,目前对红曲的研究并不广泛,因为尚不清楚理想的剂量和长期安全性。因此,本研究通过建立去卵巢骨质疏松大鼠模型,再进行红曲低、中、高剂量灌胃治疗来探究不同剂量红曲对骨质疏松症的影响。笔者通过骨密度和骨代谢生化指标 ALP, TRAP, OC, PICP 来评估是否造模成功。TRAP 是了解骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物,骨质疏松症患者可表现出 TRAP 升高^[13],而 ALP, OC 和 PICP 都是骨形成的标志物^[14]。研究结果显示:相比于假手术组,去卵巢组大鼠骨密度降低,骨代谢生化指标 ALP, TRAP, OC, PICP 显著升高。这一结果与国内外同类实验结果一致,说明去卵巢大鼠模型可作为雌激素减少引起骨密度降低的骨质疏松症的实验研究。造模成功后经不同剂量红曲灌胃治疗,发现相比于去卵巢组,红曲各剂量组可以显著改善去卵巢大鼠骨质疏松症的表型,包括抑制大鼠体质量的增多,抑制骨密度的降低进而保护骨丢失和骨形成,还对骨小梁的形态和排列有显著的改善作用,同时抑制骨

代谢生化指标 ALP, TRAP, OC 及 PICP 的升高。以上系列变化在红曲中剂量组最为显著。因此,红曲可改善卵巢大鼠骨质疏松症的表型。

AMPK 即 AMP 依赖的蛋白激酶,是生物能量代谢调节的关键分子,在调节细胞生长和重编程代谢中发挥着重要作用,还与细胞自噬和细胞极性过程有关^[15]。有报道指出 AMPK 在体内外被激活均可调节骨形成和骨量,还可通过调节 BMP2 的表达对成骨细胞的分化和骨骼发育有重要作用^[16-19]。然而红曲是否可通过激活 AMPK 促进 BMP2 表达来改善去卵巢引起的骨质疏松尚不清楚。因此,笔者进一步检测 AMPK 和 BMP2 在各组大鼠骨组织中的表达,发现相比于假手术组,去卵巢组 AMPK 和 BMP2 表达降低;而相比于去卵巢组,红曲各剂量组 AMPK 被激活,同时 BMP2 表达被上调。其中红曲中剂量组的变化最显著。因此,红曲改善去卵巢大鼠骨质疏松症的表型可能是通过激活 AMPK 信号通路,进一步促进 BMP2 表达来实现的。

综上所述,红曲对去卵巢大鼠的骨质疏松症具有改善作用,尤其是中剂量组,表现在抑制大鼠体重增加、骨密度降低和骨代谢生化指标 ALP, TRAP, OC 及 PICP 含量的升高,这一系列变化可能是通过激活 AMPK 信号通路并上调 BMP2 表达来实现的。

参考文献

- [1] WEAVER C M, GORDON C M, JANZ K F, et al. The national osteoporosis foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors; a systematic review and implementation recommendations[J]. *Osteoporosis International*, 2016, 27(4): 1281-1386.
- [2] HEBER D, YIP I, ASHLEY J M, et al. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 69(2): 231-236.
- [3] YANG C, MOUSA S A. The effect of red yeast rice (*Monascus purpureus*) in dyslipidemia and other disorders[J]. *Complementary Therapies in Medicine*, 2012, 20(6): 466-474.
- [4] 卢建华, 卢烨超, 金红婷, 等. 红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(9): 5-8.
- [5] SHAH M, KOLA B, BATAVELJIC A, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass[J]. *Bone*, 2010, 47(2): 309-319.
- [6] ZHAO X, WU Z, ZHANG Y, et al. Anti-osteoporosis activity of cibotium barometz extract on ovariectomy-induced bone loss in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137(3): 1083-1088.
- [7] ETTIGER B. Postmenopausal osteoporosis[J]. *Curr Ther*

- Endocrinol Metab*, 1997, 6: 639-644.
- [8] ZANKER J, DUQUE G. Osteoporosis in older persons: old and new players[J]. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2019, 67(4): 831-840.
- [9] 孟魏魏, 葛京化, 龚政. 骨密冲水煎剂治疗绝经后骨质疏松症的临床观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(4): 19-22.
- [10] MCCLUNG M R, BROWN J P, DIEZPEREZ A, et al. Effects of 24 months of treatment with romosozumab followed by 12 months of denosumab or placebo in postmenopausal women with low bone mineral density: a randomized, double-blind, phase 2, parallel group study[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2018, 33(8): 1397-1406.
- [11] FUJIMOTO M, TSUNEYAMA K, CHEN S Y, et al. Study of the effects of monacolin K and other constituents of red yeast rice on obesity, insulin-resistance, hyperlipidemia, and nonalcoholic steatohepatitis using a mouse model of metabolic syndrome[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 892697.
- [12] HUME A L. Red yeast rice[J]. *Pharmacy Today*, 2019, 25(3): 16.
- [13] BLUMER M J, HAUSOTT B, SCHWARZER C, et al. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development[J]. *Mechanisms of Development*, 2012, 129(5): 162-176.
- [14] SHIMOZUMA K, SONOO H, FUKUNAGA M, et al. Biochemical markers of bone turnover in breast cancer patients with bone metastases: a preliminary report[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 1999, 29(1): 16-22.
- [15] MAGNO L D, BASILE A, CONI S, et al. The energy sensor AMPK regulates Hedgehog signaling in human cells through a unique Gli1 metabolic checkpoint [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9538-9549.
- [16] JEYABALAN J, SHAH M, VIOLLET B, et al. AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism[J]. *Journal of Endocrinology*, 2012, 212(3): 277-290.
- [17] TABE Y, YAMAMOTO S, SAITOH K, et al. Bone marrow adipocytes facilitate fatty acid oxidation activating AMPK and a transcriptional network supporting survival of acute monocytic leukemia cells[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(6): 1453-1464.
- [18] KANAZAWA I, TAKENO A, TANAKA K, et al. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates postnatal skeletal development in male mice[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 597-608.
- [19] HUANG C, LEE C, CHEN M, et al. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, 224(2): 475-483.