

# 红景天苷在抗骨质疏松症中的作用及相关机制研究

刘雷<sup>1</sup> 张明焕<sup>1</sup> 陶圣祥<sup>1</sup> 毛文<sup>1△</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨红景天苷在抗骨质疏松症中的作用及其可能机制。**方法:**培养小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),用红景天苷加以处理,用PBS加以处理作为对照组,采用碱性磷酸酶(ALP)活性实验和茜素红染色检测两组BMSCs成骨分化能力,并采用实时PCR和蛋白印迹实验检测两组成骨分化相关基因(ALP和BMP-2)的mRNA和蛋白表达情况。用去卵巢法建立骨质疏松症小鼠模型,灌胃给予红景天苷药物,灌胃给予生理盐水作为对照组。分别检测两组小鼠股骨的抗弯能力和骨小梁面积。**结果:**红景天苷组ALP活性( $0.944 \pm 0.132$ )高于对照组( $0.714 \pm 0.134$ ), $P < 0.05$ ;茜素红染色结果显示红景天苷组细胞矿化程度明显高于对照组;量化两组矿化钙结节结果显示红景天苷组钙结节形成数目( $24.40 \pm 5.20$ )高于对照组( $16.55 \pm 4.40$ ), $P < 0.05$ 。在小鼠BMSCs成骨分化基因ALP、BMP-2的mRNA相对表达量方面,红景天苷组均高于对照组。在小鼠BMSCs成骨分化基因ALP、Runx2的蛋白相对表达量方面,红景天苷组均高于对照组。与对照组相比,红景天苷组小鼠股骨抗弯强度( $832.95 \pm 65.36$ )N/mm高于对照组( $776.39 \pm 41.64$ )N/mm;microCT检测结果表明,红景天苷组小鼠股骨下段骨小梁面积( $21.68 \pm 4.89$ ) $\mu\text{m}^2$ 大于对照组( $16.47 \pm 3.65$ ) $\mu\text{m}^2$ 。**结论:**红景天苷能一定程度上促进干细胞的成骨分化能力,动物实验证实红景天苷有很好的抗小鼠骨质疏松症的作用,其作用机制与ALP和BMP-2的表达相关。

**[关键词]** 骨质疏松症;骨髓间充质干细胞;红景天苷;成骨分化

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)08-0018-04

## Study on the Role of Salidroside in Anti-Osteoporosis and Its Related Mechanism

LIU Lei<sup>1</sup> ZHANG Minghuan<sup>1</sup> TAO Shengxiang<sup>1</sup> MAO Wen<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedics, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China.

**Abstract Objective:** To investigate the role of salidroside in osteoporosis and its possible mechanism. **Methods:** Mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured and treated with salidroside and PBS as control group. ALP activity test and alizarin red staining were used to detect the osteogenic differentiation ability of BMSCs in two groups. The expression of osteogenic differentiation related genes (ALP and BMP-2) was detected by RT-PCR and Western Blotting. Osteoporosis mouse model was established by ovariectomy. Salidroside was administered intragastrically and saline was used as control group. The femoral bending resistance and trabecular bone volume of the two groups of mice were measured respectively. **Results:** The ALP activity of salidroside group ( $0.944 \pm 0.132$ ) was higher than that in the control group ( $0.714 \pm 0.134$ ) ( $P < 0.05$ ). Alizarin red staining showed that salidroside group had higher cellular mineralization than that in the control group. Quantitative analysis of mineralized calcium nodules showed that the number of calcium nodules in the salidroside group ( $24.40 \pm 5.20$ ) was higher than that in the control group ( $16.55 \pm 4.40$ ) ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of osteogenic differentiation genes ALP and BMP-2 in the BMSCs of the salidroside group were higher than those in the control group. The relative expression levels of osteogenic differentiation genes ALP and Runx2 in the BMSCs of the salidroside up-regulated group were higher than those in the control group. Compared with the control

group, the flexural strength of the femur in the salidroside group ( $832.95 \pm 65.36$ ) N/mm was higher than that in the control group ( $776.39 \pm 41.64$ ) N/mm, and the microCT scan showed that the area of trabecula in the lower femur of salidroside group mice ( $21.68 \pm 4.89$ )  $\mu\text{m}^2$  were larger than

基金项目:武汉市卫健委面上项目(WX19C18)

<sup>1</sup> 武汉市第三医院骨科(武汉,430060)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:492614315@qq.com

those in the control group ( $16.47 \pm 3.65$ )  $\mu\text{m}^2$ . **Conclusion:** Salidroside can promote the osteogenic differentiation of stem cells. Animal experiments had confirmed that salidroside could improve the degree of osteoporosis in mice, and its mechanism was related to ALP and BMP-2.

**Keywords:** osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; salidroside; osteogenic differentiation

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP)<sup>[1]</sup> 是一种全身性的骨骼系统疾病, 骨质疏松症患者在大量骨质丢失后自身骨骼的骨皮质强度下降、骨小梁结构被破坏<sup>[2]</sup>, 比普通人更容易发生骨折<sup>[3]</sup>, 致残率和死亡率大大增加。因此, 对治疗和改善骨质疏松症的药物的研究具有重要的价值和意义。

红景天苷 (Salomycin, SAL) 具有保护心脑血管、视网膜等器官, 抗缺氧、辐射, 抗炎、抗氧化衰老, 调节内分泌降糖, 调节免疫功能等显著功效<sup>[4]</sup>。有研究显示红景天苷通过影响糖尿病并发骨质疏松症大鼠的瘦素表达, 能降低糖尿病并发骨质疏松症大鼠的血糖水平, 升高糖尿病并发骨质疏松症大鼠血清中瘦素的浓度和胫骨的骨密度<sup>[5]</sup>。然而, 有关红景天苷在抗骨质疏松症中的作用和机制尚缺乏全面的研究。本研究分析红景天苷对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 细胞成骨分化及骨强度和骨小梁面积的影响, 并建立去卵巢骨质疏松症小鼠模型, 探讨红景天苷在抗骨质疏松症中的作用和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠骨质疏松症模型建立及检测

选取 10 只 8 周龄雌性 C57 小鼠, 麻醉下手术切除卵巢, 术后行抗生素治疗 3 d 并进行伤口护理, 正常饲养 8 周后开始建立小鼠骨质疏松症模型, 8 周后小鼠均存活良好, 伤口愈合良好, 无感染等并发症发生。实验分为红景天苷组 (灌胃 100 mg/(kg·次)) 和对照组 (生理盐水灌胃 100 mg/(kg·次)), 灌胃处理: 隔日灌胃 1 次, 连续灌胃 5 次, 结束后继续正常饲养 4 周, 然后断颈处死小鼠, 提取小鼠的股骨行抗弯压强度分析, 提取小鼠的胫骨进行 microCT 检测并记录骨小梁面积。

### 1.2 骨髓间充质干细胞 (BMSCs)

细胞培养应用  $\alpha$ -MEM 培养基 (含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗) 培养小鼠的 BMSCs 细胞, 在细胞专用培养箱中进行多代培养, 并采用第 4~6 代 BMSCs 细胞进行本次实验。实验分为红景天苷处理组 (60  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 PBS 处理对照组。

### 1.3 实时 PCR 检测

应用 TRIzol 方法提取本次实验中的血液及细胞的 RNA, 以 PrimeScript III RT 试剂盒进行本次实验的逆转录操作培养, 获得 cDNA, 用 SYBR® PremixEx-

TaqI 试剂进行 mRNA 的 qPCR 的相关实验检测, ALP、BMP-2 引物由上海吉凯公司提供。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 获取本次实验样本中 mRNA 相对表达量。

### 1.4 碱性磷酸酶染色

染色碱性磷酸酶 (ALP) 在成熟成骨细胞中标志性表达, 在实验中作为一种标志性酶, 在碱性条件下 BMSCs 细胞内的 ALP 能水解磷酸萘酚并产生萘酚, 萘酚被重氮盐捕获后可以产生不溶性的蓝色沉淀物。参考碱性磷酸酶染色试剂盒说明书, ALP 染色步骤简要概括为: 实验组及对照组分别制备各自细胞爬片, 取处理后第 7 天的细胞进行实验, 用试剂中的 1 号液滴加在细胞爬片上, 在室温下固定 1~2 min 后, 用 PBS 漂洗 2 次, 晾干后再滴加提前配置的试剂作用液, 后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育器中孵化 2~4 h, 用 PBS 漂洗 2 遍, 晾干, 在显微镜下观察并拍照得到相关实验结果。

### 1.5 茜素红染色

成骨分化的标志是钙结节的形成, 沉积在细胞外的钙结节能与茜素红染液发生明显的显色现象, 而细胞外形成钙结节数量的多少能很好地反映出成骨分化的强弱。实验步骤概括为: 将细胞置于 6 孔板中进行培养, 选取第 7 天的细胞, 取出细胞培养孔板, 除去细胞培养基, 用 PBS 冲洗 2~3 次, 在室温条件下, 以 95% 的乙醇固定 15 min, 再用双蒸水冲洗 2~3 遍, 于每孔中添加 pH 值为 8.3 的 0.1% 茜素红-Tris-HCl 2 mL 染色, 后在 37  $^{\circ}\text{C}$  环境下进行 60 min 的孵育, 最后用双蒸水冲洗 2~3 遍并晾干, 在显微镜下观察、拍照, 最后随机选取 5 个视野并记录钙结节的数目。

### 1.6 Western Blotting 检测

除去孔板中的培养基后, 用 PBS 冲洗 2 遍, 用细胞裂解液对细胞裂解 15 min, 在离心机中以 12 000 r/min 离心 15 min, 最后提取细胞总蛋白, 用 BCA 法检测细胞的蛋白浓度。每孔上样蛋白 50  $\mu\text{g}$  后, 采用 10% 分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后进行转膜, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 将蛋白转至 PVDF 膜上。在室温条件下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入兔抗人的 ALP、BMP-2 一抗, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育器中孵育过夜。每次洗膜 15 min, 总计洗膜 3 次, 然后加入有 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 在室温条件下孵育 1 h, 后同样每次 15 min 洗膜 3 次, 在 ECL 下

显影曝光,记录各个条带的灰度值,汇总后计算蛋白相对灰度比值。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,实验组及对照组比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红景天苷促进小鼠 BMSCs 成骨分化

碱性磷酸酶染色结果显示红景天苷组中 BMSCs 成骨分化能力明显强于对照组,将实验中上清液提取以 415 nm 吸光度值进行检测,结果显示红景天苷组 ALP 活性( $0.944 \pm 0.132$ )高于对照组( $0.714 \pm 0.134$ ),  $P < 0.05$ ;茜素红染色结果(图 1)显示红景天苷组细胞矿化程度明显高于对照组;两组钙化结节量化处理后结果显示红景天苷组钙结节数目( $24.40 \pm 5.20$ )高于对照组( $16.55 \pm 4.40$ ),  $P < 0.05$ 。

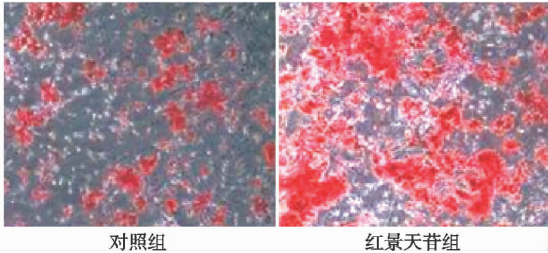


图 1 茜素红染色结果( $\times 40$ )

2.2 红景天苷促进小鼠 BMSCs 成骨分化基因表达

实验中进行成骨分化诱导 7 d 后,检测两组细胞成骨分化相关基因表达水平,实时 PCR 检测结果显示红景天苷组小鼠 BMSCs 成骨分化基因 ALP、BMP-2 的 mRNA 相对表达量均高于对照组,见表 1。Western Blotting 实验结果显示红景天苷上调组小鼠 BMSCs 成骨分化基因 ALP、Runx2 的蛋白相对表达量均高于对照组,见图 2。

表 1 两组小鼠 BMSCs 成骨分化基因 mRNA 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	ALP	BMP-2
红景天苷组	5	$2.45 \pm 0.38$	$1.84 \pm 0.43$
对照组	5	$1.47 \pm 0.29$	$1.35 \pm 0.42$
$t$		3.376	4.692
$P$		0.019	0.013

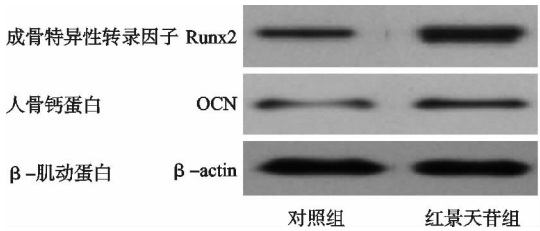


图 2 Western Blotting 检测两组细胞成骨分化蛋白表达比较

2.3 两组骨质疏松症模型小鼠的股骨强度和胫骨骨小梁面积比较

两组骨质疏松症模型小鼠股骨抗弯压结果显示红景天苷组小鼠股骨抗弯强度( $832.95 \pm 65.36$ )N/mm 高于对照组( $776.39 \pm 41.64$ )N/mm;microCT 检测结果(图 3)显示红景天苷组小鼠股骨下段骨小梁面积( $21.68 \pm 4.89$ ) $\mu\text{m}^2$  大于对照组( $16.47 \pm 3.65$ ) $\mu\text{m}^2$ , 见表 2。

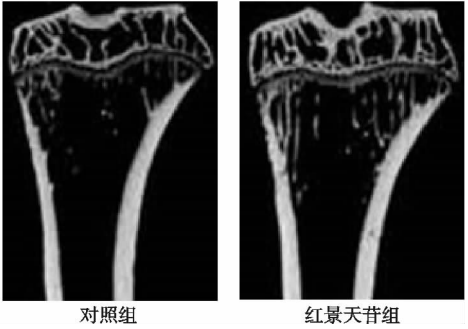


图 3 两组小鼠股骨远端 microCT 检测结果

表 2 两组骨质疏松症模型小鼠股骨强度和胫骨骨小梁面积比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	股骨强度 /( $\text{N} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	胫骨骨小梁面积 / $\mu\text{m}^2$
红景天苷组	5	$832.95 \pm 65.36$	$21.68 \pm 4.89$
对照组	5	$776.39 \pm 41.64$	$16.47 \pm 3.65$
$t$		6.76	8.64
$P$		0.004	0.001

3 讨论

骨质疏松症是一种老年退行性疾病,且与社会人口老年化密切相关,随着人类寿命延长,患病的风险增加,骨质疏松症<sup>[6]</sup>的严重后果是发生骨质疏松性骨折,而有文献表明<sup>[7]</sup>后天环境因素在骨质流失过程中起到至关重要的作用<sup>[8]</sup>。有些药物<sup>[9]</sup>在一定程度上可以抑制骨质流失、增强骨质强度<sup>[10]</sup>,目前针对骨质疏松症的发病机制已研发出多种药物,在动物实验及临床实验中取得较好的效果,例如降钙素能减少破骨细胞数量,抑制破骨细胞功能,减少骨量丢失;双磷酸盐能特异性结合到骨重建活跃的骨表面,抑制破骨细胞功能,从而抑制骨吸收。越来越多的证据表明中药对于抗骨质疏松症也有很好的效果且其副作用小。

红景天苷被誉为“高原人参”<sup>[11]</sup>,对各种慢性疾病具有多种治疗效果,具有增加免疫力、抗肿瘤等功效<sup>[12]</sup>,因此在临床上有一定的潜在应用价值<sup>[13]</sup>。骨质疏松发生过程中的病理生理机制十分复杂,主要特征是持续骨形成下降伴有早期一过性骨吸收增加<sup>[14]</sup>,其体内机制为成骨细胞减少或功能下降,破骨细胞增加或功能增强,导致骨质形成减少、丢失增加,体内总体骨量丢失。因此在抗骨质疏松症中,促进成骨细胞增

加或抑制破骨细胞生成意义重大。ALP 和 BMP-2 在成骨细胞分化和形成的通路中有至关重要的作用,能显著增加成骨细胞的分化能力。有研究显示红景天苷能激活 AKT 信号通路来达到抗氧化应激、减少凋亡损伤的作用。目前红景天苷在抗骨质疏松症中的作用尚未见报道,本研究中红景天苷能明显提升细胞中 ALP 和 BMP-2 的表达,从而促进成骨细胞的分化和形成,增加成骨作用,减少骨质流失。

成骨分化诱导实验、ALP 活性检测和茜素红染色结果显示:红景天苷能促进小鼠骨髓间充质干细胞<sup>[15]</sup>成骨分化,而且红景天苷能上调 BMSCs 成骨分化基因 ALP 和 BMP-2 的 mRNA 和蛋白表达。ALP 和 BMP-2 在成骨细胞的分化过程和骨基质形成中起着关键作用,ALP 和 BMP-2 也参与了多种信号通路过程,如力学刺激-信号转导、甲状旁腺激素信号通路、骨形态蛋白的发生等<sup>[16]</sup>。ALP 和 BMP-2 在成骨分化的多种信号通路中起着中心作用<sup>[16]</sup>,因此,红景天苷可能通过 ALP 和 BMP-2 信号通路调控干细胞成骨分化过程。通过建立骨质疏松症小鼠模型,红景天苷处理后组织学定量分析结果显示红景天苷组骨质疏松症小鼠的骨小梁面积增加,骨质疏松程度得到改善,而且力学检测显示红景天苷组骨质疏松症小鼠股骨力学性能也得到一定程度恢复。因此,本研究的动物实验进一步证实红景天苷组小鼠骨质疏松症程度得到显著改善。有研究者通过建立小鼠胚胎成骨细胞体外过氧化氢诱导的氧化胁迫模型和卵巢切除小鼠的骨质疏松症模型来研究红景天苷作用原理,结果显示红景天苷能明显改善骨质疏松,能很好地抑制骨吸收介质的释放,并且保护成骨细胞免受氧化损伤,以此来达到减轻骨质疏松的目的<sup>[17-18]</sup>。

总之,本实验表明红景天苷具有改善骨质疏松的作用,能促进干细胞成骨分化能力,改善小鼠骨质疏松程度,其机制与 ALP 和 BMP-2 相关。

## 参考文献

- [1] 中国医师协会风湿免疫科医师分会,中华医学会风湿病学分会,中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会,等. 2020 版中国糖皮质激素性骨质疏松症防治专家共识[J]. 中华内科杂志,2021,60(1):13-21.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(1):2-17.
- [3] 荆楠,刘力畅,野炳钊,等. 阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松合并骨关节炎患者骨强度的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2021,27(1):119-122.
- [4] 张华果,宋咪,徐月,等. 老年骨质疏松性骨折再发的研究进展[J]. 中国全科医学,2021,24(7):886-889.
- [5] 余琴,刘迅,邢莎莎,等. 红景天苷在疾病中的作用及机制

- 研究进展[J]. 中国药师,2020,23(3):526-529.
- [6] 冯闯,左中夫,刘文强,等. 红景天苷对糖尿病早期大鼠视网膜 Müller 细胞的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2020,26(5):609-612.
- [7] SU Y,LEUNG J,KWOK T. The role of previous falls in major osteoporotic fracture prediction in conjunction with FRAX in older Chinese men and women; the Mr. OS and Ms. OS cohort study in Hong Kong[J]. Osteoporosis Int, 2018,29(6):1469.
- [8] HARVEY N C,ODEN A,ORWOLL E,et al. Falls predict fractures independently of FRAX probability:a meta-analysis of the osteoporotic fractures in men (MrOS) study[J]. J Bone Miner Res,2018,33(3):510-516.
- [9] MOCKEL L,BARTNECK M,MOCKEL C. Risk of falls in postmenopausal women treated with romosozumab: preliminary indices from a meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. Osteoporos Sarcopenia, 2020, 6(1): 20-26.
- [10] BONACCORSI G,PIVA I,GRECO P,et al. Oxidativessa postmenopausal osteoporosis: existing vision support of the axisis oestrogen deficiency-redox imbalance-bone loss [J]. India J MedRes,2018,147(4):341.
- [11] QIAO W,YU S,SUN H,et al. 1,25-dihydroxyvitamin D insufficiency accelerates age-related bone loss by increasing oxidative stress and cell senescence[J]. Am J Transl Res,2020,12(2):507-518.
- [12] 张申尧,董克芳,王凡. 红景天苷抵抗骨细胞凋亡的作用和对绝经后骨质疏松患者的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(22):3624-3629.
- [13] 崔雅妹,穆超超,李书宁,等. 红景天临床应用概况[J]. 实用中医内科杂志,2019,33(4):74-77.
- [14] ZHANG P,ZHANG H,LIN J,et al. Insulin impedes osteogenesis of BMSCs by inhibiting autophagy and promoting premature senescence via the TGF- $\beta$ 1 pathway[J]. Aging (Albany,NY),2020,12(3):2084-2100.
- [15] BUCKLEY L,HUMPHREY M B. Glucocorticoid induced osteoporosis[J]. N Engl J Med,2018,379(26):2547-2556.
- [16] 陈光华,黄贵芝,林颢,等. 骨髓间充质干细胞移植对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017,21(1):49-53.
- [17] ZHANG J K,YANG L,MENG G L,et al. Protection by salidroside against bone loss via inhibition of oxidative stress and bone-resorbing mediators[J]. PLoS One,2013, 8(2):e57251.
- [18] LING L,YE Q,XIN J,et al. Protective effect of salidroside against bone loss via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  pathway-induced angiogenesis [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32131.

(收稿日期:2021-01-16)