

• 实验研究 •

龟甲胶对绝经后骨质疏松大鼠骨代谢的影响及机制研究

万文渊¹ 罗娟^{1△} 彭真灵¹ 朱莹莹¹ 罗杰¹

[摘要] 目的:观察龟甲胶对绝经后骨质疏松(PMOP)大鼠能量代谢和骨代谢稳态的影响,及对腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)/沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)通路的调控作用。方法:将60只雌性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组、龟甲胶低、中、高剂量组,每组各10只。除假手术组外,其余大鼠采用双侧卵巢摘除法复制绝经后骨质疏松大鼠模型,以尼尔雌醇片作为阳性对照药,于造模完成后给予尼尔雌醇片1 mg/kg灌胃,1次/d,龟甲胶低、中、高剂量组分别给予0.45,0.90,1.80 g/kg灌胃,2次/d,持续治疗8周。称量大鼠子宫质量并计算子宫指数,双能X线骨密度仪测定 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度,显微CT分析骨形态计量学参数,ELISA法实验检测血清骨钙素(BGP)、骨碱性磷酸酶(BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP-5b)、I型胶原交联羧基末端肽(CTX-I)含量,Western Blot法及RT-PCR检测骨组织AMPK/SIRT1通路相关蛋白和mRNA表达。结果:与假手术组相比,模型组子宫指数、 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);骨形态计量学参数骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)明显降低,骨小梁间隔(Tb.Sp)明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I的水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);骨组织中p-AMPK/AMPK、SIRT1、PGC1- α 的蛋白及AMPK、SIRT1、PGC1- α 的mRNA水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。龟甲胶高、中、低剂量组治疗后,子宫指数、 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度较模型组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);BV/TV、Tb.N、Tb.Th明显升高,Tb.Sp明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I的水平均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);同时明显上调了骨组织中p-AMPK/AMPK、SIRT1、PGC1- α 的蛋白及AMPK、SIRT1、PGC1- α 的mRNA水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:龟甲胶对绝经后骨质疏松大鼠具有较好的改善效果,能够保护大鼠骨微结构,调节骨代谢水平,其作用机制可能与激活AMPK/SIRT1通路、提高骨骼肌能量代谢相关。

[关键词] 绝经后骨质疏松;龟甲胶;骨密度;骨代谢

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)04-0018-06

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240404

Efficacy and Mechanism of Tortoise Shell Glue on Bone Metabolism in Postmenopausal Osteoporosis Rats

WAN Wenyan¹ LUO Juan^{1△} PENG Zhenling¹ ZHU Yingying¹ LUO Jie¹

¹ Zhuzhou Traditional Chinese Medicine Traumatology Hospital, Zhuzhou 412000, Hunan China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of tortoise shell glue on energy metabolism and bone metabolism homeostasis in postmenopausal osteoporosis (PMOP) rats, as well as its regulatory efficacy on the AMPK/SIRT1 pathway. **Methods:** 60 female SD rats were randomly divided into a sham surgery group, a model group, a positive control group, a high, medium and low dose group of tortoise shell glue, with 10 rats in each group. In addition to the sham surgery group, the other

rats used bilateral ovariectomy to duplicate the PMOP model. Nilestriol tablets were used as a positive control drug, 1 mg/kg of Nilestriol tablets were administered by gavage once a day after the completion of modeling. The low, medium, and high dose groups of tortoise shell glue were given

基金项目:湖南省中医药管理局株洲市联合中医药科研课题

(E2023016)

¹ 株洲市中医伤科医院(湖南 株洲, 412000)

[△]通信作者 E-mail: zyj135920@163.com

0.45, 0.90, 1.80 g/kg by gavage twice a day for 8 weeks. The weight of the rat uterus was weighed and the uterine index was calculated. Dual energy X-ray bone mineral density (BMD) instrument was used to measure the BMD of $L_{4/5}$ and bilateral femurs. Bone morphometric parameters were analyzed by micro CT. The serum levels of osteocalcin (BGP), bone alkaline phosphatase (BALP), anti tartaric acid phosphatase 5b (TRACP-5b), and type I collagen cross-linked carboxyl terminal peptide (CTX-I) were detected by ELISA. Western Blot and RT-PCR were used to detect the expression of AMPK/SIRT1 pathway related proteins and mRNA in bone tissue. **Results:** The uterine index, $L_{4/5}$ and bilateral femoral BMD in the model group were significantly lower compared with the sham surgery group ($P < 0.05$). The bone metrology parameters, bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), decreased significantly, and trabecular septa (Tb.Sp) were increased significantly ($P < 0.05$). The levels of BGP, BALP, TRACP-5b and CTX-I in serum were significantly increased ($P < 0.05$). The protein levels of p-AMPK/AMPK, SIRT1, PGC1- α and the mRNA levels of AMPK, SIRT1, PGC1- α in bone tissue were significant reduced ($P < 0.05$). The uterine index, $L_{4/5}$ and bilateral femoral BMD were significantly increased compared to the model group after treatment with high, medium, and low doses of tortoise shell glue ($P < 0.05$). BV/TV, Tb.N, Tb.Th were significantly increased, while Tb.Sp was significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of BGP, BALP, TRACP-5b and CTX-I in serum were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein levels of p-AMPK/AMPK, SIRT1, PGC1- α and the mRNA levels of AMPK, SIRT1, PGC1- α in bone tissue were simultaneously significantly upregulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tortoise shell glue has a good improvement efficacy on PMOP rats, which can protect the bone microstructure and regulate bone metabolism levels, its mechanism of action may be related to activating the AMPK/SIRT1 pathway and improving skeletal muscle energy metabolism.

Keywords: postmenopausal osteoporosis; tortoise shell glue; bone mineral density; bone metabolism

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis, PMOP)是一种常发于绝经后 5~10 年的骨代谢性疾病,随着全球人口老龄化,发病人数逐年上升^[1-2]。针对绝经后骨质疏松症,临床常用雌激素类及抑制骨吸收、促进骨形成药物治疗,但副作用较多^[3]。中医学认为围绝经期女性肾脏虚损,肾精渐衰,故出现腰膝酸软、胸背疼痛等症候,应以补肾方药防治^[4]。龟甲胶具有补肾填精、益肾健骨之效,常用于绝经后骨质疏松症的临床治疗^[5]。本研究通过复制绝经后骨质疏松症大鼠模型,观察龟甲胶对骨代谢水平及 AMPK/SIRT1 信号通路的影响,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 未曾交配, 体重为 250~350 g, 分笼于 SPF 级动物房饲养, 保持室温为 18~25 °C, 相对湿度为 50%~70%, 室内 12 h/12 h 光暗交替, 动物自由进食饮水。

1.2 实验药物

尼尔雌醇片购自北京四环制药公司, 规格为 2 mg/片。龟甲胶购于湖南省中医药研究院附属医院, 加三蒸水, 大火煮沸后文火慢煮 20 min, 温火蒸馏至 100 mL, 获得浓度为 1 g/mL 的龟甲胶水煎液, 储存于 4 °C 冰箱备用。

1.3 仪器与试剂

MEDIX90 数字化双能 X 线骨密度仪(法国 MEDILINK), 显微 CT 影像系统(德国 Siemens AG), -80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo 公司), Mirofuge

20 R 低温高速离心机(美国 Thermo 公司), Multi-skan Mk3 酶标仪(美国 Thermo 公司), Bio-Rad 电泳仪(上海一恒科技有限公司), QuantStudio 7 定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。大鼠血清骨钙素(BGP)、骨碱性磷酸酶(BALP)、TRACP-5b、CTX-I ELISA 检测试剂盒购自上海酶科生物科技有限公司; 腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)、p-AMPK、SIRT1、PGC1- α 鼠单克隆抗体, 兔 β -actin 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。

1.4 模型制备及干预

60 只大鼠适应性饲养 7 d 后按体重高低随机分为假手术组、模型组、阳性对照组、龟甲胶低剂量组、龟甲胶中剂量组、龟甲胶高剂量组, 每组各 10 只。除假手术组外, 其余大鼠采用双侧卵巢摘除法复制绝经后骨质疏松症模型^[6]: 术前大鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠充分麻醉后仰卧固定于手术台, 腹部用 75% 乙醇消毒, 去腹毛, 于下腹正中作一 2 cm 竖状切口, 去除卵巢周围的脂肪团, 止血钳结扎输卵管峡部, 切除双侧卵巢后止血缝合, 75% 乙醇消毒, 术后给予青霉素(20 万单位/只)肌肉注射以防感染, 1 次/d, 持续 3 d; 假手术组大鼠仅去除卵巢周围少量脂肪, 不切除卵巢。手术后 5 d 对各组大鼠进行阴道涂片镜检, 以连续 5 d 无动情周期变化为模型成功标准, 假手术组于观察第 7 天出现正常动情周期。造模完成后, 阳性对照组给予尼尔雌醇片混悬液灌胃(1 mg/kg), 1 次/d, 持续 8 周; 龟甲胶低、中、高剂量组按人体和大鼠

体表面积比进行剂量换算,得出大鼠等效给药剂量分别为 0.45,0.90,1.80 g/kg 灌胃,1 次/d,持续 8 周。

1.5 方法

1.5.1 子宫指数测定 实验结束后处死大鼠,剥离子宫,称取子宫湿重,按公式计算子宫指数:子宫指数=子宫质量(g)/动物体重(kg)。

1.5.2 骨密度测量 实验结束后大鼠给予 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,仰卧于双能 X 线骨密度仪,测定大鼠 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度(BMD)。

1.5.3 骨形态参数检测 大鼠给予 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,分离右侧完整股骨,剥离干净,用浸有生理盐水的纱布包裹后置于样本管中,固定在显微 CT 工作槽中进行扫描,定量分析股骨远端骨微结构,分析骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁间隔(Tb. Sp)的变化。

1.5.4 血清骨代谢指标检测 大鼠给予 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,以 3 000 r/min 离心取上清,采用 ELISA 试剂盒检测血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 的含量;加一定量稀释的血清样品及酶标抗体于反应孔中,同时做空白孔和标准孔,酶标板置于 37℃下反应 1 h 后洗涤,加入显色剂显色,37℃下避光 15 min,调节酶标仪波长为 450 nm,测定各孔光密度值,以标准品浓度为横坐标,相应光密度值为纵坐标作标准曲线,将血清样品光密度值代入后得出血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 的浓度。

1.5.5 骨组织 AMPK/SIRT1 通路相关蛋白检测 大鼠给予 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后取左侧股骨,剥离干净,取部分骨组织加入 RIPA 裂解液,12 000 r/min,4℃下离心 30 min 后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,稀释蛋白浓度后进行凝胶电泳,湿转法转膜,加入 5%TBST 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗(1:1 000 比例稀释)于 4℃下过夜,加二抗(1:5 000 比例稀释)于室温下反应 1 h,显色后拍照,以 β -actin、AMPK 为内参,通过与内参的灰度比分别得出 p-AMPK、SIRT1、PGC1- α 条带的相对表达量。

1.5.6 骨组织 AMPK/SIRT1 通路相关 mRNA 检测 大鼠给予 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后取左侧股骨,剥离干净,取部分骨组织充分研磨,采用 Trizol 一步法提取骨组织总 RNA,紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度,取 2 μ g 组织反转录合成为 cDNA 后进行 PCR 扩增,AMPK 上游引物为 5'-TTTACCTGGTT-GACAAT-CGGAGCTA-3',下游引物为 5'-AATC-

GACTTGACCG-AGGTCTG-3';SIRT1 上游引物为 5'-TGTTTCCTGTGGGATACCTGA-3',下游引物为 5'-TGAAGAATGGTCTTGGGTCTTT-3';PGC1- α 上游引物为 5'-CTCGACACAGGTCGTGTTCC-3',下游引物为 5'-GCGGTGTCTGTAGTGGCTTG-3'; β -actin 上游引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3',下游引物为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'。扩增条件为:95℃ 2 min,95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,共 40 个循环,以 β -actin 为内参,AMPK、SIRT1、PGC1- α 的 mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。

1.6 统计学方法

用 SPSS 20.0 软件分析实验数据,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,柱状图以 GraphPad Prism 5.0 软件绘制,结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 龟甲胶对大鼠子宫指数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠子宫指数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠子宫指数均有不同程度回升,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着给药剂量的提高子宫指数逐渐升高,见表 1。

表 1 各组大鼠子宫指数比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	子宫指数
假手术组	1.65 \pm 0.15
模型组	0.24 \pm 0.04 ¹⁾
阳性对照组	0.75 \pm 0.08 ²⁾
龟甲胶低剂量组	0.59 \pm 0.06 ²⁾
龟甲胶中剂量组	0.67 \pm 0.09 ²⁾
龟甲胶高剂量组	0.72 \pm 0.05 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$;2)与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 龟甲胶对大鼠骨密度的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠 $L_{4/5}$ 及双侧股骨骨密度均有不同程度提升,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着给药剂量的提高骨密度水平逐渐提高,见表 2。

2.3 龟甲胶对大鼠骨形态参数的影响

与假手术组比较,模型组 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 明显降低,Tb. Sp 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 明显提升,Tb. Sp 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着给药剂量的提高各参数水平逐渐改善,见表 3。

表 2 各组大鼠骨密度水平比较($n=10, \bar{x} \pm s, g/cm^2$)

组别	L _{4/5}	左股骨	右股骨
假手术组	0.33±0.03	0.37±0.04	0.35±0.03
模型组	0.14±0.02 ¹⁾	0.17±0.03 ¹⁾	0.19±0.02 ¹⁾
阳性对照组	0.29±0.04 ²⁾	0.32±0.05 ²⁾	0.31±0.04 ²⁾
龟甲胶低剂量组	0.19±0.02 ²⁾	0.22±0.03 ²⁾	0.24±0.03 ²⁾
龟甲胶中剂量组	0.23±0.03 ²⁾	0.24±0.06 ²⁾	0.27±0.04 ²⁾
龟甲胶高剂量组	0.26±0.03 ²⁾	0.28±0.04 ²⁾	0.30±0.03 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠骨形态参数比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	(BV/TV)/%	Tb. N/个	Tb. Th/mm	Tb. Sp/mm
假手术组	0.82±0.11	8.59±1.14	0.328±0.027	0.104±0.022
模型组	0.45±0.07 ¹⁾	4.19±0.65 ¹⁾	0.145±0.016 ¹⁾	0.265±0.018 ¹⁾
阳性对照组	0.78±0.09 ²⁾	7.70±1.08 ²⁾	0.272±0.028 ²⁾	0.136±0.015 ²⁾
龟甲胶低剂量组	0.56±0.06 ²⁾	5.64±0.73 ²⁾	0.189±0.024 ²⁾	0.192±0.028 ²⁾
龟甲胶中剂量组	0.67±0.10 ²⁾	6.21±1.17 ²⁾	0.213±0.031 ²⁾	0.177±0.012 ²⁾
龟甲胶高剂量组	0.73±0.08 ²⁾	7.42±0.81 ²⁾	0.254±0.026 ²⁾	0.149±0.014 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.4 龟甲胶对大鼠血清骨代谢标志物的影响

与假手术组比较,模型组血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 的水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 的水平明显降低,

差异有统计学意义($P<0.05$),随着给药剂量的提高骨代谢指标水平逐渐下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 龟甲胶对大鼠骨组织 AMPK/SIRT1 通路蛋白的影响

与假手术组比较,模型组骨组织中 p-AMPK、

表 4 各组大鼠血清骨代谢标志物水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血清骨钙素/(pg·mL ⁻¹)	骨碱性磷酸酶/(IU·L ⁻¹)	TRACP-5b/(pg·mL ⁻¹)	CTX-I/(μg·mL ⁻¹)
假手术组	114.67±13.76	12.75±2.69	967.78±54.95	8.75±1.60
模型组	202.35±23.58 ¹⁾	29.26±3.15 ¹⁾	1782.58±69.23 ¹⁾	17.93±2.39 ¹⁾
阳性对照组	132.10±10.26 ²⁾	15.63±2.72 ²⁾	1140.17±43.82 ²⁾	10.12±1.73 ²⁾
龟甲胶低剂量组	165.34±15.89 ²⁾	21.39±2.84 ²⁾	1516.67±55.30 ²⁾	15.35±2.08 ²⁾
龟甲胶中剂量组	155.20±14.22 ²⁾	19.52±3.07 ²⁾	1301.87±49.11 ²⁾	14.61±1.77 ²⁾
龟甲胶高剂量组	146.24±12.57 ²⁾	17.28±2.53 ²⁾	1257.05±50.72 ²⁾	12.52±2.54 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$ 。

SIRT1、PGC1-α 的蛋白表达明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠骨组织中 p-AMPK、SIRT1、PGC1-α 的蛋

白表达明显增多,随着给药剂量的升高 p-AMPK、SIRT1、PGC1-α 的蛋白水平逐渐提升,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

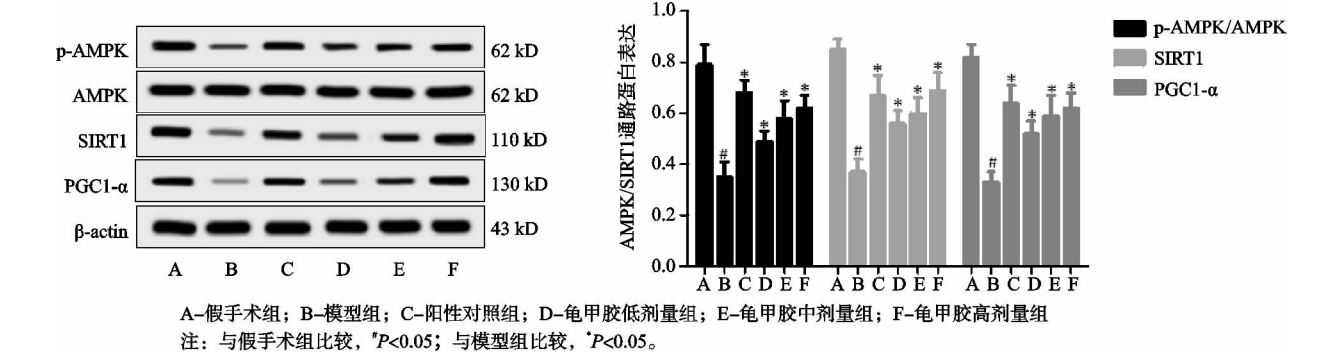


图 1 各组大鼠骨组织 AMPK/SIRT1 通路蛋白表达

2.6 龟甲胶对大鼠骨组织 AMPK/SIRT1 通路 mRNA 的影响

与假手术组比较,模型组骨组织中 AMPK、SIRT1、

PGC1-α 的 mRNA 表达明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,龟甲胶低、中、高剂量组灌胃干预后大鼠骨组织中 AMPK、SIRT1、PGC1-α 的 mRNA

表达明显增多,随着给药剂量的升高 AMPK、SIRT1、PGC1- α 的 mRNA 水平逐渐提升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

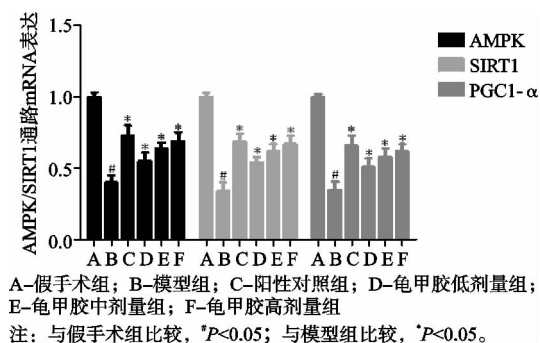


图 2 各组大鼠骨组织 AMPK/SIRT1 通路 mRNA 表达

3 讨论

中医学根据绝经后骨质疏松症状表现将其归属于“骨痿”“骨枯”“骨痹”等范畴,认为肾精亏耗、肾主骨功能的低下为其内在病因^[7]。现代研究亦证明^[8],肾虚可致下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴失衡,与绝经后雌激素水平降低而引起的绝经后骨质疏松症病因及临床症状相同。龟甲胶具有滋阴潜阳、补肾填精、益肾健骨之效,《神农本草经》将其列为上品。现代药理证明^[9],龟甲胶有效成分主要为胶原蛋白、肽类、氨基酸及各种微量元素,具有增强免疫、抗衰老、调节能量代谢等多种药理活性。林嘉辉等^[10]发现,龟甲胶可通过下调 JNK、p38 MAPK 的基因水平防止豚鼠软骨细胞基质降解,抑制细胞的过度凋亡,从而延缓骨关节炎进展。陈炳艺等^[11]研究表明,龟甲胶能够提升关节豚骨软骨细胞 MKK 的基因水平,促进软骨细胞的增殖。在去卵巢骨关节炎大鼠模型中,龟甲胶可通过提升血清雌二醇(E_2)水平促进膝关节软骨基质中 Collagen-II 的表达量^[12]。

本实验采用双侧卵巢摘除法复制绝经后骨质疏松症大鼠模型,大鼠摘除卵巢后子宫萎缩变小,子宫指数明显降低,给予不同剂量龟甲胶连续灌胃治疗后子宫指数明显回升,提示龟甲胶可抑制去卵巢所致的雌激素水平骤降,缓解子宫萎缩。骨密度可作为绝经后骨质疏松症诊断的定量指标,双能 X 线吸收法是目前国际公认的骨密度检测方法,其测定值为骨质疏松的诊断金标准^[13]。此外,骨密度并不能完全反映骨强度变化,骨小梁微结构是影响骨强度及其功能的最重要因素^[14]。本研究发现绝经后骨质疏松症大鼠骨密度明显降低,骨小梁形态学参数 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 明显降低,Tb. Sp 明显升高;龟甲胶灌胃治疗后,骨密度明显升高,BV/TV、Tb. N、Tb. Th 升高,Tb. Sp 降低,提示龟甲胶可改善绝经后骨质疏松症大鼠骨微结构。血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、

CTX-I 水平的变化能特异性反映骨质疏松骨代谢情况,血清骨钙素、骨碱性磷酸酶可反映成骨细胞数量及功能,TRACP-5b、CTX-I 可反映破骨细胞数量及功能^[15-16]。ELISA 结果显示,绝经后骨质疏松症大鼠血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 水平均增高,提示卵巢摘除后成骨细胞和破骨细胞活性均有增加,导致骨转换加快,骨量流失。经龟甲胶干预后,大鼠血清中血清骨钙素、骨碱性磷酸酶、TRACP-5b、CTX-I 水平均明显降低,表明龟甲胶可影响成骨、破骨细胞活性而改善绝经后骨质疏松症大鼠骨代谢。

磷酸腺苷激活的蛋白激酶是维持细胞能量水平的重要分子,能够调节骨代谢并通过激活 SIRT1 等众多下游分子促进成骨细胞功能^[17]。过氧化物酶增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α (PGC1- α)是一种细胞能量代谢及核受体转录的辅激活因子,AMPK 激活 SIRT1 后,使下游的 PGC1- α 去乙酰化激活,进而促进线粒体生物合成,并通过激活核受体活性调节雌激素水平,在雌激素调节的骨代谢过程中发挥作用^[18-19]。本研究结果显示,绝经后骨质疏松症大鼠骨组织中 p-AMPK/AMPK、SIRT1、PGC1- α 的蛋白水平及 AMPK、SIRT1、PGC1- α 的 mRNA 水平明显降低,龟甲胶治疗可提高 p-AMPK/AMPK、SIRT1、PGC1- α 的蛋白及 AMPK、SIRT1、PGC1- α 的 mRNA 水平,提示龟甲胶可能通过激活 AMPK 和 SIRT1,上调 PGC1- α 表达促进骨骼肌能量代谢。

综上所述,本研究表明龟甲胶对去卵巢所诱导的绝经后骨质疏松症大鼠具有明显的改善效果,能够缓解大鼠子宫萎缩程度,改善骨代谢情况和骨微结构,其作用机制可能与激活 AMPK/SIRT1 通路、促进骨骼肌能量代谢、提高骨密度相关。

参考文献

- [1] MILLER P D, ADACHI J D, ALBERGARIA B H, et al. Efficacy and safety of romosozumab among postmenopausal women with osteoporosis and mild-to-moderate chronic kidney disease[J]. J Bone Miner Res, 2022, 37(8): 1437-1445.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- [3] EBINA K, ETANI Y, TSUBOI H, et al. Effects of prior osteoporosis treatment on the treatment response of romosozumab followed by denosumab in patients with postmenopausal osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2022, 33(8): 1807-1813.
- [4] 蔡毅, 赵继荣, 陈文, 等. 基于“肾主骨生髓”理论综述骨髓间充质干细胞与绝经后骨质疏松的关系[J]. 中国骨质疏

- 松杂志,2021,27(11):1666-1670.
 - [5] 颜宇轩,何滨铎.绝经后骨质疏松的用药规律及作用机制探讨[J].中医临床研究,2020,12(31):29-33.
 - [6] KALU D N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss[J]. Bone Miner,1991,15(3):175-191.
 - [7] 石敏,赵继荣,薛旭,等.基于“脾主肉、肾主骨”理论探讨绝经后骨质疏松症的 OPG/RANK/RANKL 信号调控机制[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(9):1336-1339.
 - [8] 招文华,尚奇,余富勇,等.从肾-脑-骨生物轴探讨老年性骨质疏松症海马-下丘脑-垂体-性腺轴失衡的神经内分泌机制[J].中华中医药杂志,2022,37(10):5735-5738.
 - [9] 唐宇,肖丹,刘子毓,等.龟甲胶的研究现状及展望[J].中华中医药杂志,2019,34(6):2593-2598.
 - [10] 林嘉辉,陈炳艺,龙美兵,等.龟甲胶和鹿角胶含药血清对豚鼠骨关节炎软骨细胞 JNK 及 p38 MAPK 基因表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(10):1-4.
 - [11] 陈炳艺,陈泽华,林嘉辉,等.龟甲胶、鹿角胶调控 MKK 基因表达促进豚鼠 OA 软骨细胞增殖的研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(7):805-808.
 - [12] 杜江,黄远鹏,李奕修,等.龟鹿二仙胶及其拆方对去势骨关节炎大鼠血清雌二醇浓度及膝关节软骨细胞 II 型胶原表达的影响[J].中医正骨,2013,25(3):11-20.
 - [13] GOLOB A L, LAYA M. Osteoporosis: screening, prevention, and management[J]. Med Clin North Am, 2015, 99(3):587-606.
 - [14] WADA H, ASO K, IZUMI M, et al. The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis[J]. Sci Rep, 2023, 13(1):2926.
 - [15] WU P Y, CHEN W, HUANG H, et al. Morinda officinalis polysaccharide regulates rat bone mesenchymal stem cell osteogenic-adipogenic differentiation in osteoporosis by upregulating miR-21 and activating the PI3K/AKT pathway[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(7):675-685.
 - [16] WEI W, CAI M, YU S, et al. Effect of magnetic nanoparticles on hormone level changes during perimenopausal period and regulation of bone metabolism[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2022, 68(12):91-96.
 - [17] JIN C, TAN K, YAO Z, et al. A novel anti-osteoporosis mechanism of VK2: interfering with ferroptosis via AMPK/SIRT1 pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(6):2745-2761.
 - [18] XIAO J, LI W, LI G, et al. STK11 overexpression prevents glucocorticoid-induced osteoporosis via activating the AMPK/SIRT1/PGC1 α axis[J]. Hum Cell, 2022, 35(4):1045-1059.
 - [19] KIM D Y, KO S H. Common regulators of lipid metabolism and bone marrow adiposity in postmenopausal women[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(2):322.
- (收稿日期:2023-08-05)
-
- (上接第 17 页)
- [10] HOSONO Y, KUWASAWA A, TOYODA E, et al. Multiple intra-articular injections with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis cause severe arthritis with anti-histone H2B antibody production[J]. Regen Ther, 2023, 24:147-153.
 - [11] CHENG P, GONG S, GUO C, et al. Exploration of effective biomarkers and infiltrating immune cells in osteoarthritis based on bioinformatics analysis[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2023, 51(1):242-254.
 - [12] XU X, XU L, XIA J, et al. Harnessing knee joint resident mesenchymal stem cells in cartilage tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2023, 168:372-387.
 - [13] JACKSON P, SPECTOR A L, STRATH L J, et al. Epigenetic age acceleration mediates the relationship between neighborhood deprivation and pain severity in adults with or at risk for knee osteoarthritis pain[J]. Soc Sci Med, 2023, 331:116088.
 - [14] 燕军,蒋素英,周璇,等.改良拔河针法在兔膝关节软骨修复中的作用及其机制研究[J].中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(9):1-6.
 - [15] SCHEUING W J, REGINATO A M, DEEB M, et al. The burden of osteoarthritis: is it a rising problem? [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2023, 27(2):101836.
 - [16] 彭文忠,刘渝松,徐慧华,等.中医综合疗法联合臭氧水治疗膝关节骨性关节炎临床观察[J].实用中医药杂志, 2022, 38(3):353-355.
 - [17] YANG K, XIE Q, LIAO J, et al. Shang-Ke-Huang-Shui and coptisine alleviate osteoarthritis in the knee of monosodium iodoacetate-induced rats through inhibiting CXCR4 signaling[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 311:116476.
 - [18] LI Y, LI L, WANG M, et al. O-alg-THAM/gel hydrogels functionalized with engineered microspheres based on mesenchymal stem cell secretion recruit endogenous stem cells for cartilage repair[J]. Bioact Mater, 2023, 28:255-272.
 - [19] DIVJAK A, JOVANOVIĆ I, MATIĆ A, et al. The influence of vitamin D supplementation on the expression of mediators of inflammation in knee osteoarthritis[J]. Immunol Res, 2023, 71(3):442-450.
- (收稿日期:2023-10-02)