

金合欢素对骨质疏松模型小鼠的骨量影响

王小军

(浙江中医药大学附属湖州中医院 浙江湖州 313000)

摘要:目的:金合欢素对骨质疏松模型小鼠的骨量影响。方法:选取 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 15 只,采用随机数字表法分为空白对照组、LPS 组及 LPS+金合欢素组,每组 5 只,按各组条件进行饲养,10d 取材,分别进行 Micro-CT 扫描分析、苏木精-伊红染色、通道相关蛋白检查。结果:LPS+金合欢素组小鼠胫骨骨量增加明显,骨皮质增厚,骨密度增加,骨小梁结构趋于完整,且差异有统计学意义($P<0.05$); LPS+金合欢素组小鼠胫骨骨髓腔空洞明显减少,骨小梁密度显著增高,数目增多,结构趋于完整,无大片溶解出现,且差异有统计学意义($P<0.05$); 金合欢素可抑制 NF- κ B 信号通路 P65、I κ B α 的磷酸化及 MAPK 通路中 ERK 磷酸化,且差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:金合欢素通过 NF- κ B 及 MAPK 信号通路调控破骨细胞生成,对骨质疏松症引起的骨量丢失的治疗与预防有明显的作

关键词:骨质疏松症; 金合欢素; NF- κ B 信号通路; MAPK 信号通路

骨质疏松症是临床上常见的代谢性骨病,可引发骨质丢失及溶解,同时给患者的生活带来不良影响,给医疗造成巨大负担。因此,探索如何解决骨质疏松症等破骨细胞过度活动引起的骨量丢失成为研究热点^[1]。近年来发现^[2],天然化合物对骨质疏松症中骨量丢失疾病具有保护作用。金合欢素是黄酮类化合物,存在植物之中。本文主要探讨金合欢素对骨质疏松模型小鼠骨量的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,鼠龄 6-8 周,体重 25-30g,20-25 $^{\circ}$ C 饲养 1 周进行实验。

1.2 实验试剂及仪器

金合欢素 (Selleck, 美国); DMEM 基础培养基 (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); RANKL (R&D, 美国); CCK-8 试剂盒 (碧云天, 中国); PVDF 膜 (Millipore, 美国); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (康为世纪, 中国); 苏木精&伊红染色试剂盒 (碧云天, 中国); EDTA (Sigma, 美国); 化学发光成像仪 (Tanon, 美国); Micro-CT (Leica, 德国); 切片染色机 (Leica, 德国)。

1.3 实验方法

将 15 只小鼠随机分成 3 组,每组 5 只,分别是:空白对照组、LPS 组及 LPS+金合欢素组。

空白对照组小鼠于第 1d 及第 4d 时 0.1%DMSO 腹腔注射。

LPS 组方法:先把 LPS 溶解于 0.1%DMSO 中,然后第 1d 及第 4d 将 5mg/kg LPS 腹腔注射。LPS+金合欢素组方法:于第 1d 及第 4d 注射 LPS,第 2d 起,8mg/kg 的金合欢素每、4 天注射一次。第 10d,异戊巴比妥钠注射将 3 组小鼠处死,收集各组胫骨。

1.3.1 Micro-CT 扫描、分析

将收集的各组小鼠胫骨用多聚甲醛固定;并使用 Micro-CT 进行扫描、分析。测定胫骨的体积分数 (BV/TV) (%)、骨小梁的厚度 (Tb.Th) (mm)、骨小梁的数目 (Tb.N) (mm^{-1})、骨小梁的分离度 (Tb.Sp) (mm)。

1.3.2 苏木精-伊红 (H&E) 染色

将收集的各组小鼠胫骨用多聚甲醛固定;再使用 10% EDTA 脱钙液及乙醇分别进行脱钙、脱水;经二甲苯中浸泡、二甲苯脱蜡洗涤等进行染色,光学显微镜下观察

1.3.3 通道相关蛋白检查

收集获得的小鼠骨髓源性巨噬细胞 (BMMs),实验组加入 RANKL 和 8 μ M 金合欢素,对照组加入 RANKL 和 DMSO,在 0、5、10、20、30 及 60min 提取蛋白并进行 Western Blot 检测分析。

1.4 统计分析

所有的数据 3 次独立重复的实验中获得,以平均数 \pm 标准差的形式表示。使用 SPSS 22.0 软件进行分析。 $P<0.05$ 时则认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组骨量指数定量分析 见图1。

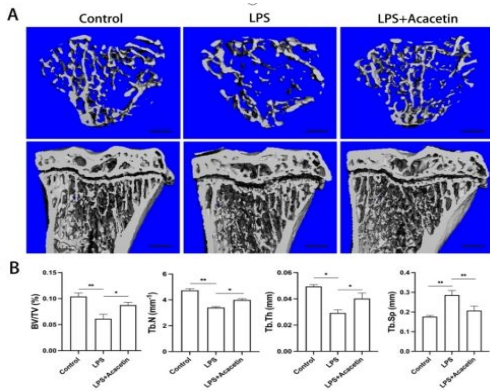


图1 (A)各组胫骨近端 Micro-CT 三维重建结果。(B) 各组骨量指数定量分析结果。*P<0.05, **P<0.01, 标尺=500 微米。

2.2 3组 H&E 染色结果 见图2。

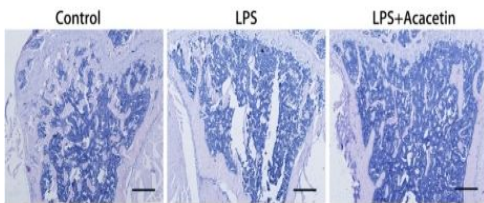


图2 各组 H&E 染色结果。

2.3 通道相关蛋白检查 见图3。

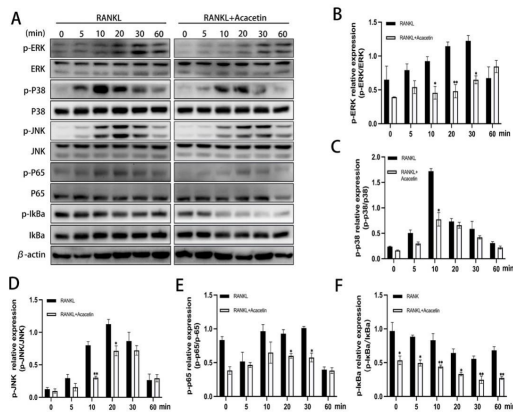


图3 (A) 经金合欢素使用, MAPK 及 NF-κ B 信号通路总蛋白条带及各磷酸化蛋白。(B-F) ERK、JNK、P38、Iκ B α、P65 磷酸化表达水平定量分析。*P<0.05, **P<0.01。

3 讨论

MAPK 信号通路主要与 JNK、P38、ERK 蛋白表达相关^[3]。NF-κ B 信号通路主要与 Iκ B α、P65 蛋白磷酸化水平相关^[4]。从实验结果,我们发现金合欢素可抑制 NF-κ B 信号通路 P65、Iκ B α 的磷酸化及 MAPK 通路中 ERK 磷酸化来干预破骨细胞分化。我们还发现 LPS 组小鼠胫骨的骨量丢失多、骨皮质变薄明显、骨小梁稀疏显著,经金合欢素干预后, LPS+金合欢素组小鼠胫骨骨量增加明显,骨皮质增厚,骨密度增加,骨小梁结构趋于完整,且差异有统计学意义;同时从 H&E 染色结果发现 LPS 组小鼠骨髓腔骨小梁密度降低明显、骨小梁部分溶解,骨髓腔出现空洞。经金合欢素干预后, LPS+金合欢素组小鼠胫骨骨髓腔空洞明显减少,骨小梁密度显著增高,数目增多,结构趋于完整,无大片溶解出现。

综上所述,金合欢素通过 NF-κ B 及 MAPK 信号通路调控破骨细胞生成,对骨质疏松症引起的骨量丢失的治疗与预防有明显的作

参考文献:

[1]JIANG Y, ZHANG P, ZHANG X, et al. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis [J]. Cell Prolif, 2021, 54(1): e12956.
 [2]CUI J, LI X, WANG S, et al. Triptolide prevents bone loss via suppressing osteoclastogenesis through inhibiting PI3K-AKT-NFA Tc1 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6149-61.
 [3]宋敏,李凯,王凯,等.通过 MAPK/ERK1/2 信号通路探讨固本增骨方对 MC3T3-E1 成骨分化的影响[J].中国骨质疏松杂志,2023,29(11):1592-1597.

李渊深,索艳晖,谢延平,等.紫草素调节 NF-κ B/ERK 信号通路对膝关节骨性关节炎大鼠炎症反应的影响[J].中国免疫学杂志,2023,39(12):2577-2581.

基金: 湖州市公益性应用研究项目 (2022GY44); 浙江中医药大学校级科研项目 (2021FSYYZY10)