

瑞舒伐他汀通过 AMPK/Sirt1/NF- κ B 通路改善骨质疏松雌性大鼠骨微结构的研究

牛建锋¹, 朱海慧¹, 杨庆宇¹, 刘建华¹, 田明波²

1. 郑州人民医院 药学部, 河南 郑州 450003

2. 郑州人民医院 骨科, 河南 郑州 450003

摘要: 目的 探讨瑞舒伐他汀对骨质疏松大鼠腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/沉默信息调节因子 1 (Sirt1)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路和骨微结构的影响。方法 将雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、雌二醇 (0.05 mg/kg) 组、瑞舒伐他汀 (1.0、2.0、4.0 mg/kg) 组, 每组 12 只。采用双侧卵巢切除术复制大鼠骨质疏松症模型。术后第 9 周雌二醇组和瑞舒伐他汀各剂量组 ip 相应药物, 1 次/d, 连续给药 12 周。假手术组和模型组 ip 等体积生理盐水。ELISA 法检测血清骨代谢标志物成骨特异性转录因子 (CBF- α 1)、I 型胶原交联羧基端肽 (CTX-I)、I 型前胶原氨基端原肽 (PINP)、骨钙素 (OC) 水平和血清雌二醇 (E₂)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 水平; Micro-CT 扫描大鼠右侧股骨观察大鼠股骨远端骨微结构变化, 分析骨小梁骨密度 (BMD)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁间隔 (Tb.Sp)、骨小梁厚度 (Tb.Th); 苏木精-伊红 (HE) 染色观察骨组织形态学变化; Western blotting 法检测骨组织 Sirt1、AMPK、p-AMPK、NF- κ B p65、NF- κ B p65 (acetyl K310) 蛋白表达。结果 与假手术组相比, 模型组大鼠血清 E₂、骨代谢相关标志物 CBF- α 1、CTX-I、PINP、OC 水平、BMD 明显降低, 炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高, 骨小梁微结构参数 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 明显降低, Tb.Sp 明显升高 ($P < 0.05$), 骨小梁出现断裂, 排列疏松, 骨组织 p-AMPK/AMPK、Sirt1 蛋白表达明显降低, NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 瑞舒伐他汀 2.0、4.0 mg/kg 组大鼠血清 E₂、骨代谢相关标志物 CBF- α 1、CTX-I、PINP、OC 水平、BMD 明显升高 ($P < 0.05$), 炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平下降, 骨小梁微结构参数 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 增加, Tb.Sp 明显降低 ($P < 0.05$), 新生骨小梁, 形态相对完整; 骨组织 p-AMPK/AMPK、Sirt1 蛋白表达明显升高, NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论 瑞舒伐他汀可改善骨质疏松大鼠的骨微结构, 对骨质疏松具有保护作用, 其作用机制可能与激活 AMPK 和 Sirt1 蛋白表达, 降低 NF- κ B p65 乙酰化水平有关。

关键词: 瑞舒伐他汀; 骨质疏松症; 腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1/核转录因子- κ B; 骨微结构; 保护作用

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)01-0025-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.01.004

Effects of rosuvastatin on AMPK/Sirt1/NF- κ B pathway and bone microstructure in rats with osteoporosis

NIU Jian-feng¹, ZHU Hai-hui¹, YANG Qing-yu¹, LIU Jian-hua¹, TIAN Ming-bo²

1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China

2. Department of orthopedics, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To investigate the effects of rosuvastatin on AMP-activated protein kinase (AMPK)/silent information regulator 1 (Sirt1)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway and bone microstructure in osteoporosis rats. **Methods** Female SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, estradiol (0.05 mg/kg) group and rosuvastatin (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg) groups, with 12 rats in each group. Osteoporosis (OP) model was established by bilateral ovariectomy. At 9th week after operation, the estradiol group and rosuvastatin groups were ip administered with corresponding drugs, once daily for 12 weeks. The sham operation group and model group were ip administered with equal volume of normal saline. After 12 weeks of administration, the samples were collected and related indexes were detected. The levels of serum core-binding factor α 1 (CBF- α 1), cross linked C-telopeptide of type I collagen

收稿日期: 2021-08-10

基金项目: 河南省医学科技攻关项目 (202102310507)

作者简介: 牛建锋 (1984—), 男, 河南开封人, 主管药师, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: jhx86x@163.com

(CTXI), procollagen I N-terminal propeptide (PINP), osteocalcin (OC), estradiol (E₂), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by ELISA method. The right femur of rats was scanned by Micro-CT, the changes of bone microstructure of distal femur were observed, and trabecular bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb. N), trabecular septum (Tb.Sp), and trabecular thickness (Tb.Th) were analyzed. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of bone tissue. The protein expression of Sirt1, AMPK, p-AMPK, NF- κ B p65, and NF- κ B p65 (acetyl K310) was detected by Western blotting method. **Results** Compared with those in the sham operation group, the serum E₂, CBF- α 1, CTX- I, PINP, OC, and BMD were significantly lower in the model group, the levels of inflammatory factors IL-6, TNF- α , and IL-1 β were significantly higher, bone trabecular microstructure parameters BV/TV, Tb.N, and Tb.Th were significantly lower, Tb.Sp was significantly higher ($P < 0.05$), while the trabeculae were broken and arranged loosely, the protein expression of p-AMPK/AMPK and Sirt1 in bone tissue was significantly lower, and the protein expression of NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the serum E₂, CBF- α 1, CTX- I, PINP, OC, and BMD were significantly higher in the rosuvastatin 2.0 and 4.0 mg/kg groups, the levels of inflammatory factors IL-6, TNF- α , and IL-1 β were significantly lower, bone trabecular microstructure parameters BV/TV, Tb.N, and Tb.Th were significantly higher, while Tb.Sp was significantly lower ($P < 0.05$), and new bone trabeculae could be seen with relatively complete shape. The protein expression of p-AMPK/AMPK and Sirt1 in bone tissue was significantly higher, but the protein expression of NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin can improve the bone microstructure and protect osteoporosis in rats, which may be related to the activation of AMPK and Sirt1 protein expression and the decrease of NF- κ B p65 acetylation level.

Key words: rosuvastatin; osteoporosis; AMP-activated protein kinase/silent information regulator 1/nuclear factor- κ B; bone microstructure; protection

骨质疏松症是一种以骨强度降低、骨微结构受损、骨量减少、骨脆性增加为特征的骨代谢疾病。随着人口老龄化趋势的加剧，骨质疏松症的发病率越来越高，严重危害中老年人的健康^[1]。女性的骨质疏松症发病率高于男性，绝经后雌激素水平突然降低会引起骨代谢紊乱，破坏了骨吸收与骨形成之间的稳态，导致骨密度降低，增加骨折的风险^[2-3]。近年来，许多研究认为，骨质疏松可能不仅与雌激素缺乏等内分泌系统的紊乱相关，炎症反应与骨质疏松症有直接关系^[4-5]。许多炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 2 (IL-2) 等可通过促进骨吸收或降低骨形成在骨质疏松的进展中发挥关键作用，阻断炎症反应已经成为防治骨质疏松的重要途径^[6]。瑞舒伐他汀是一种调脂药，临床上广泛应用于冠心病、心肌梗死、脑梗死等心血管疾病。研究发现瑞舒伐他汀还具有抗炎作用^[7]，可影响骨保护素和核因子 κ B (NF- κ B) 受体活化因子配体 (RANKL) 活性，在一定程度上改善骨组织的吸收，促进新骨形成，使骨的微观构造得到重构，增加骨密度^[8]。沉默信息调节因子 1 (Sirt1) /腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) /NF- κ B 通路是炎症反应中一条重要的信号通路，虽然国内外明确提出了 Sirt1/AMPK/NF- κ B 信号通路，但对其进行深入研究的报道并不多，而且大多数研究集中于其在骨骼肌、脂肪组织、心肌等炎症反应中的作

用。本研究观察瑞舒伐他汀对骨质疏松大鼠骨微结构、AMPK/Sirt1/NF- κ B 信号通路相关蛋白和炎症相关因子的表达，探讨瑞舒伐他汀对骨质疏松的影响及其作用机制。

1 实验材料

1.1 仪器

iMark680 多功能酶标仪 (Bio-Rad 公司)，电动显微镜 (日本 Olympus 公司)，Micro-CT 影像系统 (德国 Siemens AG)。

1.2 药品和试剂

瑞舒伐他汀钙片 (阿斯利康制药有限公司，规格 5 mg/片，批号 J20170009)；戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司广州分公司，规格 1 mg/片，批号 JYHB1901034)；血清核心结合因子 α 1 (CBF- α 1) (货号 E201906)、I 型胶原交联羧基末端肽 (CTX-I) (货号 E201906)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) (货号 E201905)、骨钙素 (OC) (货号 E201901) ELISA 检测试剂盒均购自北京方程生物科技有限公司；雌二醇 (E₂) (货号 R3063)、IL-6 (货号 R3141)、TNF- α (货号 R3528)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) (货号 R3160) ELISA 试剂盒均购自深圳子科生物科技有限公司；兔抗 SIRT1 抗体 (货号 ab189494)、兔抗 AMPK 抗体 (货号 ab207442)、兔抗 p-AMPK 抗体 (货号 ab23875)、兔抗 NF- κ B p65 抗体 (货号 ab16502)、兔抗乙酰化细胞核因子 NF- κ B p65

(acetyl K310) 抗体 (货号 ab19870)、兔抗 β -actin 抗体 (货号 ab8227)、羊抗兔 IgG H&L (HRP) (货号 ab205718) 均购自英国 Abcam 公司。

1.3 实验动物

SPF 级健康 SD 雌性大鼠 72 只, 体质量 (280 ± 20) g, 购自济南朋悦动物繁育有限公司, 合格证号为 SCXK (鲁) 20140007。所有动物均严格按照动物饲养规则喂养, 温度为 24°C , 湿度为 50%, 12 h 明暗交替, 自由饮水和摄食。适应性饲养 3 d 后开始实验。

2 方法

2.1 动物分组和模型复制

将大鼠随机分为假手术组、模型组、雌二醇 ($0.05 \text{ mg/kg}^{[9]}$) 组、瑞舒伐他汀 (1.0 、 2.0 、 $4.0 \text{ mg/kg}^{[10]}$) 组, 每组 12 只。术前禁食 12 h, 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) ip 麻醉, 参考文献报道的去卵巢法复制骨质疏松症模型^[11]: 大鼠以俯卧位固定, 背部脱毛, 碘伏消毒, 脊柱两侧分别作 1 个 1 cm 左右的纵行切口, 分离皮下组织和肌肉, 切开腹膜进入腹腔, 找到卵巢和输卵管, 在距卵巢 5 mm 出结扎输卵管, 切除卵巢, 逐层缝合腹膜和皮肤, 碘伏消毒, im 青霉素预防感染。假手术组麻醉后除不切除卵巢外其余操作相同。手术后饲养 8 周。以骨密度 (BMD) 明显降低、骨小梁微结构受损严重判定模型复制成功^[9]。

2.2 给药

手术 8 周后, 第 9 周开始给药, 假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 雌二醇组和瑞舒伐他汀各剂量组 ig 给予相应的药物, 体积为 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$, 1 次/d, 连续给药 12 周。

2.3 大鼠体质量变化

实验前、实验过程中和给药结束后分别称量各组大鼠体质量, 观察大鼠的体质量变化。

2.4 血清骨代谢标志物 CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 检测

末次给药后, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 使用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、CTXI、PINP、OC 水平, 各血清因子水平严格按照试剂盒说明书的步骤操作。

2.5 血清 E_2 、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 检测

采用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清 E_2 、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平, 严格按照试剂盒说明书的

步骤操作。

2.6 骨密度和骨小梁微结构参数检测

分离各组大鼠右侧完整股骨, 剥离附着的肌肉组织, 10% 甲醛固定 24 h 后, 保存在 70% 乙醇溶液中, 使用 Micro-CT 影像系统对股骨远端进行扫描。图片经三维重组后, 观察各组大鼠股骨远端骨微结构的变化, 分析骨小梁 BMD、骨体积分数 (感兴趣区内骨组织体积/总体积, BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁间隔 (Tb.Sp)、骨小梁厚度 (Tb.Th) 的变化。

2.7 骨组织形态学检测

每组随机选取 6 只大鼠, 取其左侧股骨, 剥离附着的肌肉组织, 10% 甲醛固定, 加入 10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙处理后进行常规脱水、透蜡、包埋、切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察骨组织形态学变化。

2.8 Western blotting 法检测骨组织 AMPK、p-AMPK、Sirt1、NF- κB p65、NF- κB p65 (acetyl K310) 蛋白表达

取剩余 6 只大鼠的左侧股骨, RIPA 裂解液提取骨组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 [Sirt1、AMPK、p-AMPK、NF- κB p65、NF- κB p65 (acetyl K310)], 按 1:1000 的比例稀释; β -actin 按 1:2000 稀释, 4°C 下孵育过夜, HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, ECL 显色, 以 β -actin 为内参, 通过与内参的灰度比, 得出目的条带的相对表达水平。

2.9 统计学分析

本研究所得数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间有差异进一步采用 SNK-Q 检验。

3 结果

3.1 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠体质量的影响

实验开始时, 各组大鼠体质量差异无统计学意义; 造模后, 与假手术组相比, 各组大鼠体质量均明显升高 ($P < 0.05$); 给药 8、12 周后, 与假手术组相比, 模型组大鼠体质量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 雌二醇组和瑞舒伐他汀 2.0 、 4.0 mg/kg 组大鼠体质量明显降低 ($P < 0.05$); 与雌二醇组相比, 瑞舒伐他汀 1.0 mg/kg 组大鼠体质量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠血清骨代谢标志物 CBF- α 1、CTX- I、PINP、OC 水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清 CBF- α 1、CTX- I、PINP、OC 水平均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,雌二醇组和瑞舒伐他汀 2.0、4.0 mg/kg 组血清 CBF- α 1、CTX- I、PINP、OC 水平均明显升高 ($P < 0.05$);与雌二醇组相比,瑞舒伐他汀 1.0、2.0 mg/kg 组血清 CBF- α 1、CTX- I、PINP、OC 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠血清 E_2 、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

与假手术组相比,模型组血清 E_2 水平明显降低,IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,雌二醇组和瑞舒伐他汀各剂量组血清 E_2 水平明显升高,IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.05$);且与雌二醇组相比,瑞舒伐他汀 1.0、2.0 mg/kg 组血清 E_2 、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平差异均非常显著 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of rosuvastatin on the body weight of osteoporosis model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	体质量/g				
		初始	造模后	给药 4 周	给药 8 周	给药 12 周
假手术	—	282.68 ± 10.93	305.35 ± 11.82	322.64 ± 12.82	336.37 ± 10.96	345.50 ± 10.87
模型	—	280.98 ± 10.35	356.46 ± 12.38 [#]	371.73 ± 14.60 [#]	385.26 ± 8.66 [#]	401.23 ± 14.05 [#]
雌二醇	—	276.57 ± 11.84	354.63 ± 10.11 [#]	362.10 ± 18.24 [#]	363.10 ± 12.51 [*]	366.78 ± 16.27 [*]
瑞舒伐他汀	1.0	277.00 ± 11.35	355.11 ± 9.88 [#]	369.28 ± 13.57 [#]	375.31 ± 14.70 ^{**}	381.68 ± 9.29 ^{**}
	2.0	282.51 ± 10.06	352.84 ± 7.47 [#]	367.38 ± 16.26 [#]	370.45 ± 13.44 [*]	376.56 ± 10.77 [*]
	4.0	278.89 ± 12.89	354.06 ± 7.54 [#]	364.33 ± 17.29 [#]	366.90 ± 11.34 [*]	369.59 ± 11.20 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与雌二醇组比较: ^{**} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{**} $P < 0.05$ vs estradiol group

表 2 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠血清骨代谢标志物的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 2 Effects of Rosuvastatin on serum bone metabolism markers in osteoporosis model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	CBF- α 1/(μ g·L ⁻¹)	CTX- I/(μ g·L ⁻¹)	PINP/(μ g·L ⁻¹)	OC/(μ g·L ⁻¹)
假手术	—	52.17 ± 8.11	15.54 ± 3.03	41.17 ± 7.33	20.50 ± 3.81
模型	—	28.99 ± 5.28 [#]	9.47 ± 1.25 [#]	28.23 ± 5.02 [#]	12.34 ± 2.37 [#]
雌二醇	—	40.39 ± 6.29 [*]	12.73 ± 2.02 [*]	37.17 ± 6.11 [*]	17.58 ± 3.20 [*]
瑞舒伐他汀	1.0	32.78 ± 5.31 ^{**}	10.47 ± 1.75 ^{**}	31.21 ± 5.47 ^{**}	13.47 ± 2.18 ^{**}
	2.0	37.57 ± 6.34 ^{**}	11.49 ± 1.33 ^{**}	33.20 ± 6.16 ^{**}	14.85 ± 2.76 ^{**}
	4.0	45.25 ± 7.25 [*]	13.32 ± 2.11 [*]	38.18 ± 7.45 [*]	18.11 ± 2.39 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与雌二醇组比较: ^{**} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{**} $P < 0.05$ vs estradiol group

表 3 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠血清 E_2 、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 3 Effect of rosuvastatin on serum E_2 , IL-6, TNF- α , and IL-1 β levels in osteoporosis model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	E_2 /(pg·L ⁻¹)	IL-6/(μ g·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(μ g·L ⁻¹)
假手术	—	80.04 ± 14.65	635.49 ± 52.67	82.41 ± 9.36	105.32 ± 14.13
模型	—	45.17 ± 10.48 [#]	939.03 ± 68.57 [#]	134.32 ± 10.85 [#]	174.65 ± 15.34 [#]
雌二醇	—	69.94 ± 11.59 [*]	628.53 ± 57.49 [*]	98.46 ± 8.83 [*]	118.27 ± 13.56 [*]
瑞舒伐他汀	1.0	51.82 ± 10.55 ^{**}	865.11 ± 68.72 ^{**}	124.84 ± 12.71 ^{**}	159.25 ± 16.93 ^{**}
	2.0	60.27 ± 11.72 ^{**}	738.26 ± 61.22 ^{**}	117.46 ± 11.03 ^{**}	141.57 ± 12.41 ^{**}
	4.0	72.38 ± 14.45 [*]	658.82 ± 52.73 [*]	102.55 ± 9.37 [*]	122.43 ± 15.57 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与雌二醇组比较: ^{**} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{**} $P < 0.05$ vs estradiol group

3.4 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠骨密度、骨小梁微结构参数的影响

与假手术组相比,模型组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均明显降低, Tb.Sp 明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,雌二醇组和瑞舒伐他汀各剂

量组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均明显升高, Tb.Sp 明显降低 ($P < 0.05$); 且与雌二醇组相比,瑞舒伐他汀 1.0、2.0 mg/kg 组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp 水平差异均非常显著 ($P < 0.05$)。见图 1、表 4。

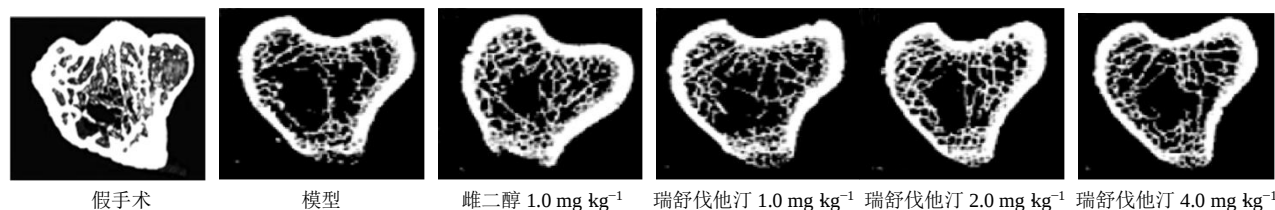


图 1 各组大鼠股骨微结构 (Micro-CT 扫描)

Fig. 1 Microstructure of rat femurs in each group (Micro-CT scan)

表 4 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠骨密度、骨小梁微结构参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effects of rosuvastatin on bone mineral density and trabecular bone microstructure parameters of osteoporosis model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	BMD/(g·cm ⁻²)	BV/TV/%	Tb.N/个	Tb.Sp/mm	Tb.Th/mm
假手术	—	0.211 ± 0.021	0.84 ± 0.12	8.49 ± 0.12	0.102 ± 0.016	0.312 ± 0.031
模型	—	0.161 ± 0.018 [#]	0.47 ± 0.08 [#]	4.24 ± 0.07 [#]	0.252 ± 0.019 [#]	0.145 ± 0.024 [#]
雌二醇	—	0.193 ± 0.026 [*]	0.74 ± 0.09 [*]	7.53 ± 0.09 [*]	0.146 ± 0.013 [*]	0.257 ± 0.036 [*]
瑞舒伐他汀	1.0	0.173 ± 1.560 ^{**}	0.54 ± 0.08 ^{**}	5.57 ± 0.09 ^{**}	0.194 ± 0.017 ^{**}	0.185 ± 0.033 ^{**}
	2.0	0.185 ± 0.017 ^{**}	0.67 ± 0.11 ^{**}	6.11 ± 0.12 ^{**}	0.176 ± 0.018 ^{**}	0.207 ± 0.035 ^{**}
	4.0	0.197 ± 0.019 [*]	0.78 ± 0.12 [*]	7.82 ± 0.11 [*]	0.138 ± 0.017 [*]	0.273 ± 0.042 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与雌二醇组比较: ^{**} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{**} $P < 0.05$ vs estradiol group

3.5 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠骨组织形态的影响

HE 染色结果显示,假手术组大鼠骨组织中可见骨小梁形态完整,结构清晰,排列整齐;与假手

术组相比,模型组大鼠骨小梁出现断裂,排列疏松,数量减少,骨小梁孔隙变大;与模型组相比,雌二醇组和瑞舒伐他汀 2.0、4.0 mg/kg 组可见新生骨小梁,数量有所增多,形态相对完整;见图 2。

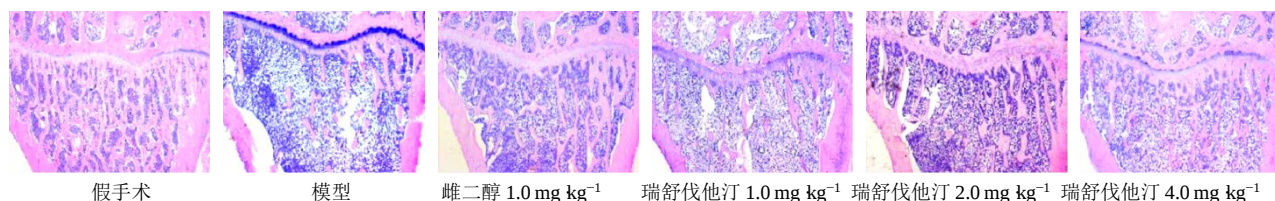


图 2 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠骨组织形态的影响 (HE, ×40)

Fig. 2 Effect of rosuvastatin on the bone tissue morphology of osteoporosis model rats (HE, ×40)

3.6 瑞舒伐他汀对骨质疏松症大鼠骨组织 Sirt1、AMPK、p-AMPK、NF-κB p65、NF-κB p65 (acetyl K310) 蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠骨组织 Sirt1、

p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平均明显降低, NF-κB p65 (acetyl K310) /NF-κB p65 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,雌二醇组和瑞舒伐他汀 2.0、4.0 mg/kg 组大鼠 Sirt1、p-AMPK/AMPK

蛋白表达水平均明显升高, NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$); 且与雌二醇组相比, 瑞舒伐他汀 1.0、2.0

mg/kg 组大鼠 Sirt1、p-AMPK/AMPK、NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达差异均非常显著 ($P < 0.05$)。见表 5、图 3。

表 5 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠骨组织 Sirt1、p-AMPK/AMPK、NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Effect of rosuvastatin on the protein expression of Sirt1, p-AMPK/MPK, NF- κ Bp65 (acetyl K310)/ NF- κ Bp65 in bone tissue of osteoporosis model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	Sirt1/ β -actin	p-AMPK/AMPK	NF- κ B p65(acetyl K310)/NF- κ B p65
假手术	—	0.94 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.11
模型	—	0.77 $\pm$ 0.08 [#]	0.46 $\pm$ 0.06 [#]	0.85 $\pm$ 0.12 [#]
雌二醇	—	1.03 $\pm$ 0.11 [*]	0.64 $\pm$ 0.09 [*]	0.55 $\pm$ 0.08 [*]
瑞舒伐他汀	1.0	0.82 $\pm$ 0.08 ^{**}	0.50 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.77 $\pm$ 0.12 ^{**}
	2.0	0.88 $\pm$ 0.09 ^{**}	0.56 $\pm$ 0.07 ^{**}	0.68 $\pm$ 0.09 ^{**}
	4.0	1.00 $\pm$ 0.12 [*]	0.65 $\pm$ 0.10 [*]	0.59 $\pm$ 0.07 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与雌二醇组比较: ^{**} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{**} $P < 0.05$ vs estradiol group

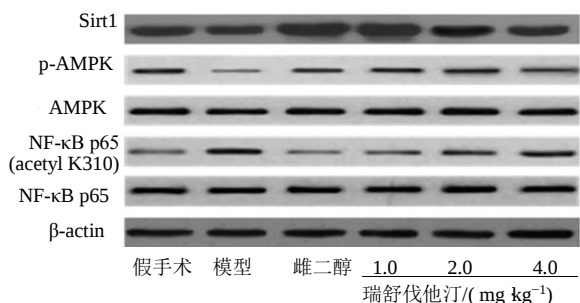


图 3 瑞舒伐他汀对骨质疏松症模型大鼠骨组织 Sirt1、AMPK、p-AMPK、NF- κ B p65、NF- κ B p65 (acetyl K310) 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of rosuvastatin on the protein expression of Sirt1, AMPK, p-AMPK, NF- κ B p65, NF- κ B p65 (acetyl K310) in bone tissue of osteoporosis model rats

4 讨论

绝经后的女性是患骨质疏松症的主要人群, 发病率远大于男性, 主要原因就是雌激素的缺乏^[12]。动物实验也证实, 手术摘除卵巢是制备骨质疏松症动物模型的有效方法^[13]。近年来, 不少研究发现骨质疏松症与炎症反应密切相关^[14]; 黄陈恕等^[15]发现肝炎、肝硬化患者的炎症介质 IL-1、IL-6、TNF- α 水平升高, 可以通过增加核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 刺激破骨细胞和骨质吸收, 还可以抑制成骨细胞分化, 促进其凋亡, 从而导致骨质疏松症的发生。徐志平等^[16]研究发现慢性肾功能衰竭患

者血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平显著升高, 与骨密度呈负相关, 容易发生骨质疏松症。抑制 NF- κ B 通路介导的炎症反应是防治骨质疏松症的重要途径^[17]。雌激素类药物是临床广泛认可的治疗骨质疏松症的一线药物, 但由于其肝肠清除率高、吸收率低、副作用大等不良反应限制了其使用。因此筛选和研发新型、安全、有效的药物是临床和研究人员工作的重点。

瑞舒伐他汀是临床常用的治疗心血管疾病的药物, 不仅有较好的降脂作用, 还具有抗炎作用, 可通过增加骨形成影响骨代谢^[18], 石雅娴等^[19]研究发现瑞舒伐他汀可抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性, 有效降低慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症反应。Wang 等^[18]发现瑞舒伐他汀可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨质疏松大鼠间充质干细胞成骨分化, 改善骨质疏松大鼠的骨代谢, 增加骨密度。Lazzerinia 等^[20]研究发现瑞舒伐他汀可降低成骨细胞产生 IL-6 的能力, 从而间接抑制破骨细胞的功能活性。血清 CBF- α 1、CTXI、PINP、OC 水平能特异性地反映骨质疏松症骨代谢平衡情况。骨密度并不能完全反映骨的强度, 骨小梁的微结构变化是影响骨强度最重要的因素, 显微 CT 能够很好地评价骨小梁微结构, 骨小梁的微结构破坏增加, 骨质疏松和骨折发生的风险也相应增加^[21]。本研究发现, 去卵巢后模型大鼠血清 E₂、骨代谢相关标志物 CBF- α 1、CTX-I、PINP、OC 含量、BMD 明显降

低, 炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平升高, 骨小梁微结构参数 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 明显降低, Tb.Sp 明显升高, 骨小梁出现断裂, 排列疏松; 经瑞舒伐他汀干预后, 大鼠血清 E₂、骨代谢相关标志物 CBF- α 1、CTX-I、PINP、OC 含量、BMD 明显升高, 炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平下降, 骨小梁微结构参数 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 增加, Tb.Sp 降低, 可见新生骨小梁, 形态相对完整; 提示瑞舒伐他汀可有效改善骨质疏松症模型大鼠的骨微结构, 但其作用机制尚不明确。

NF- κ B 参与多种炎症因子转录调控, 当细胞受到刺激后, NF- κ B p65 活化, 进入细胞核激活转录, 调控下游多种炎症因子 (如 IL-6、TNF- α 、IL-1 β), 促进炎症反应。有研究表明, Sirt1 是 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 可与 NF- κ B 复合体 RelA/p65 亚基相互作用, 将 p65 蛋白的 Lys³¹⁰ 位点去乙酰化, 减弱 NF- κ B p65 的转录激活能力。Zuo 等^[22]研究发现 17 β -雌二醇可通过激活 Sirt1 表达, 抑制 NF- κ B 的表达改善成骨细胞功能, 治疗绝经后骨质疏松症。Hou 等^[23]发现阿魏酸可增加 Sirt1 的 mRNA 和蛋白水平, 降低 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白水平, 增加骨密度。AMPK 对细胞能量水平十分敏感, 可以调节机体代谢状态并激活众多下游分子 (如 Sirt1、p53 等), 抑制 NF- κ B 介导的炎症反应。研究发现 AMPK 可通过增加细胞中 NAD⁺ 的合成激活 Sirt1^[24]。Guo 等^[25]发现在人 Eca109 细胞中, 辣椒素可通过活化 AMPK 相关的 Sirt1 脱乙酰基作用, 降低 NF- κ B p65 的乙酰化水平来抑制 NF- κ B 活性。本研究结果显示, 骨质疏松症模型大鼠 Sirt1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达明显降低, NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达明显升高, 瑞舒伐他汀可升高 Sirt1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达, 降低 NF- κ B p65 (acetyl K310)/NF- κ B p65 蛋白表达; 提示瑞舒伐他汀可能通过激活 AMPK 和 Sirt1 蛋白表达, 降低 NF- κ B p65 乙酰化水平, 抑制骨质疏松大鼠炎症反应, 改善骨微结构。

综上所述, 瑞舒伐他汀可改善骨质疏松大鼠的骨微结构, 对骨质疏松具有保护作用, 其作用机制可能与激活 AMPK 和 Sirt1 蛋白表达, 降低 NF- κ B p65 乙酰化水平有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松

症流行病学研究现状 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 253-258.

- [2] Liu Q, Zhang X, Jiao Y, et al. In vitro cell behaviors of bone mesenchymal stem cells derived from normal and postmenopausal osteoporotic rats [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 669-678.
- [3] Heidari B, Mohammadi A, Javadian Y, et al. Associated factors of bone mineral density and osteoporosis in elderly males [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2017, 15(1): e39662.
- [4] Gravalles E M, Schett G. Effects of the IL-23-IL-17 pathway on bone in spondyloarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(11): 631-640.
- [5] Li J Y, Yu M C, Tyagi A M, et al. IL-17 receptor signaling in osteoblasts/osteocytes mediates PTH-induced bone loss and enhances osteocytic RANKL production [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(2): 349-360.
- [6] Blumenfeld O, Williams F M, Valdes A, et al. Association of interleukin-6 gene polymorphisms with hand osteoarthritis and hand osteoporosis [J]. *Cytokine*, 2014, 69(1): 94-101.
- [7] 曹峰, 李明峰. 瑞舒伐他汀对 ACS 患者 PCI 术后血管内皮功能、炎症因子的影响 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(15): 2242-2244.
- [8] 余波, 张韶英, 聂斌. 瑞舒伐他汀对动脉钙化的疗效及对骨保护素/核因子 κ B 受体活化因子配体的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(24): 5898-5900.
- [9] 张庆刚, 张庆红, 张克民, 等. 基于 OPG/RANKL 信号通路探讨姜黄素对去势骨质疏松模型大鼠骨代谢平衡的影响 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2119-2124.
- [10] 朱灿阳, 吴丹娜, 黎燕峰. 瑞舒伐他汀通过抑制炎症反应改善心肌梗死大鼠心功能及心肌纤维化 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(16): 1742-1745.
- [11] Yıldırım M, Saral S, Mercantepe T, et al. White tea reduced bone loss by suppressing the TRAP/CTX pathway in ovariectomy-induced osteoporosis model rats [J]. *Cells Tissues Organs*, 2020, 209(1): 64-74.
- [12] Yu F, Xia W. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China [J]. *Arch Osteoporos*, 2019, 14(1): 32.
- [13] Xu X, Zhang P, Li X, et al. MicroRNA expression profiling in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis before and after estrogen treatment [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4251-4263.
- [14] Chisălău B A, Crînguș L, Vreju F A, et al. New insights into IL-17/IL-23 signaling in ankylosing spondylitis (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3493-3497.
- [15] 黄陈恕, 汤荣睿, 易小翠. 慢性乙型肝炎与骨质疏松相关性初步探讨 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1136-1139.

- [16] 徐志平, 闻纯, 王丽, 等. 慢性肾衰管着褪黑素水平、氧化应激、炎症水平与骨密度相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(4): 485-489.
- [17] 李啸群, 徐凯航, 纪方. 补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化缓解小鼠去卵巢骨质疏松 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 25(2): 186-197.
- [18] Wang B X, Li K P, Yu T, *et al.* Rosuvastatin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the rat model of osteoporosis by the Wnt/ β -catenin signal [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22): 10161-10168.
- [19] 石雅娴, 隗世波, 刘俊, 等. 瑞舒伐他汀对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症的抑制作用及对 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(7): 666-669.
- [20] Lazzerinia P E, Capperucci C, Spreafico A, *et al.* Rosuvastatin inhibits spontaneous and IL-1 β -induced interleukin-6 production from human cultured osteoblastic cells [J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(2): 195-200.
- [21] 马剑雄, 赵杰, 何伟伟, 等. 高分辨率外周定量计算机断层扫描评估骨小梁微结构和骨强度的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2018, 35(3): 468-474.
- [22] Zuo H L, Xin H, Yan X N, *et al.* 17 β -Estradiol improves osteoblastic cell function through the Sirt1/NF- κ B/ MMP-8 pathway [J]. *Climacteric*, 2020, 23(4): 404-409.
- [23] Hou T T, Zhang L R, Yang X H. Ferulic acid, a natural polyphenol, protects against osteoporosis by activating SIRT1 and NF- κ B in neonatal rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120(1): 109205-109211.
- [24] Lan F, Cacicedo J M, Ruderman N, *et al.* SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(41): 27628-27635.
- [25] Guo Y, Liu N, Liu K, *et al.* Capsaicin inhibits the migration and invasion via the AMPK/NF- κ B signaling pathway in esophagus squamous cell carcinoma by decreasing matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20190819.

[责任编辑 解学星]