

# 基于 SIRT3 介导成骨细胞凋亡通路探讨茶多酚对骨质疏松疾病的干预研究

盛东, 殷震宇\*

南京中医药大学附属张家港市中医医院 骨伤科, 江苏 苏州 215600

**摘要:** **目的** 基于 SIRT3 介导成骨细胞凋亡通路分析茶多酚对骨质疏松症 (OP) 的干预作用和相关分子机制。**方法** 40 只大鼠于后肢臀部 im 氢化可的松建立 OP 大鼠模型, 将造模大鼠随机分为模型组, 茶多酚低剂、高 (25、100 mg/kg) 剂量组, 阿仑膦酸钠 (1 mg/kg) 组, 每组 10 只, 另取 10 只正常饲养的大鼠设为对照组。造模成功后第 2 周各组大鼠均给药干预。采用 Micro-CT 分析大鼠骨密度 (BMD) 和骨微结构; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察大鼠股骨组织病理形态; ELISA 法检测大鼠血清骨代谢指标和氧化应激指标; TUNEL 染色检测大鼠股骨组织细胞凋亡指数 (AI); Western blotting 法检测大鼠股骨组织中去乙酰化酶 3 (SIRT3)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 (Bax) 表达。**结果** 与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组大鼠骨组织病理损伤明显减轻, 大鼠 BMD、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨连接密度 (Conn.D) 均显著升高, 骨小梁分离度 (Tb.Sp) 显著降低; 血清碱性磷酸酶 (ALP)、I 型前胶原氨基端前肽 (P I NP) 水平和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性均显著升高, I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I) 水平、丙二醛 (MDA) 含量均显著降低; 大鼠股骨组织 AI、Bax 蛋白表达量显著降低, SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达量显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。茶多酚 100 mg/kg 组大鼠上述指标均显著优于茶多酚 25 mg/kg 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 茶多酚可能通过调控 SIRT3/Bcl-2 信号通路调节骨代谢指标水平、减轻氧化应激、抑制成骨细胞凋亡, 从而对 OP 产生良好的保护作用。

**关键词:** 茶多酚; 骨质疏松症; 去乙酰化酶 3; 细胞凋亡; 氧化应激; 骨代谢

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)07-1445-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.07.004

## Study on intervention of tea polyphenols on osteoporosis based on SIRT3 mediated osteoblast apoptosis pathway

SHENG Dong, YIN Zhen-yu

Department of Orthopedics, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215600, China

**Abstract:** **Objective** The intervention effect of tea polyphenols on osteoporosis (OP) and related molecular mechanism were analyzed based on SIRT3 mediated osteoblast apoptosis pathway. **Methods** Forty rats were injected with hydrocortisone intramuscularly into the buttocks of the hind limbs to establish the OP rat model. The rats were randomly divided into model group, tea polyphenol low and high (25, 100 mg/kg) dose group, and alendronate sodium 1 mg/kg group, with 10 rats in each group. Another 10 normal rats were set as control group. The rats in each group were given drug intervention in the second week after successful modeling. Bone mineral density (BMD) and bone microstructure were analyzed by Micro-CT, HE staining was used to observe the pathological morphology of rat femur, serum bone metabolism and oxidative stress were detected by ELISA, TUNEL staining was used to detect the apoptosis index (AI) of rat femur, the expressions of Sirtuin 3 (SIRT3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and B-cell-lymphoma-2 related protein (Bax) in rat femur were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the pathological damage of bone tissue in tea polyphenol 25 and 100 mg/kg group was significantly reduced, and the BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th, and Conn.D increased significantly, and Tb.Sp decreased significantly. The levels of ALP, P I NP, SOD, and GSH-Px increased significantly, while the levels of CTX-I and MDA decreased significantly. The expression of AI and Bax protein in rat femur

收稿日期: 2022-06-02

基金项目: 张家港市青年科技项目 (ZJGQNK201912)

作者简介: 盛东, 男, 研究方向为骨质疏松。E-mail: zxl0138@163.com

\*通信作者: 殷震宇, 男, 副主任医师, 研究方向为骨质疏松。E-mail: 724760388@qq.com

decreased significantly, while the expression of SIRT3 and Bcl-2 protein increased significantly, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Above indexes of rats in tea polyphenol 100 mg/kg group were significantly better than those in tea polyphenol 50 mg/kg group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Tea polyphenols may regulate the level of bone metabolism, alleviate oxidative stress, and inhibit osteoblast apoptosis by regulating SIRT3/Bcl-2 signaling pathway, thus have a good protective effect on OP.

**Key words:** tea polyphenols; osteoporosis; SIRT3; apoptosis; oxidative stress; bone metabolism

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种随年龄增长而发生的全身退行性骨骼疾病, 主要特征是骨骼强度降低, 骨折风险增加。OP 多发生于绝经后妇女及老年人群, 有资料统计, 45 岁以上的妇女近 1/3 患有轻重不同的骨质疏松, 而 75 岁以上妇女 OP 的患病率高达 90% 以上<sup>[1-2]</sup>。OP 发病率随着人口寿命的延长和人口结构的改变正逐年上升, 我国老年人数居世界首位, 其中绝大部分老年人患有 OP, OP 引发的骨折以及骨折导致的残疾和死亡严重影响老年人健康和生活质量, 同时极大地增加了社会及家庭的经济负担<sup>[3]</sup>。然而, OP 的机制尚未完全揭示, 当前临床仍缺乏有效的 OP 治疗策略。因此, 积极探索 OP 的发病机制, 寻找安全有效的药物治疗方法极为重要。去乙酰化酶 3 (SIRT3) 是定位于线粒体的去乙酰化酶家族成员之一, 是一种高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性去乙酰化酶, 在多种组织中均有表达。研究表明<sup>[4]</sup>, SIRT3 通过介导多种去乙酰化蛋白质调节细胞生物活性, 如线粒体凋亡、代谢和氧化应激等。最近的研究发现<sup>[5]</sup>, SIRT3 表达的增加有助于修复成骨细胞线粒体损伤, 并减轻骨量的损失, 其可能是 OP 治疗的潜在靶点。茶多酚是茶叶中类多羟基酚类化合物的总称, 主要包括儿茶素类、黄烷醇类、黄酮类等。茶多酚最早被人们广泛认识是因能捕获活性氧 (ROS) 而具有抗氧化能力<sup>[6]</sup>。Yang 等<sup>[7]</sup>发现, 绿茶多酚可通过 SIRT3 依赖性脱乙酰化减轻高脂饮食诱导的肾性氧化应激。Shen 等<sup>[8]</sup>则报道, 长期补充茶多酚可以改善去卵巢中年大鼠骨结构和骨力学性能, 还可以抑制去卵巢引起的过度骨转换。提示茶多酚具有骨保护作用。茶多酚在 OP 中的研究相对较少, 其作用机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨茶多酚对 OP 的干预作用及其相关分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级健康雌性 SD 大鼠 50 只, 购自南京医科大学, 动物生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0001, 9~10 周龄, 体质量 340~350 g。于清洁级动物房

饲养, 使用许可证号: SYXK(苏)2018-0049, 予自来水和无菌饲料喂养, 垫料隔天换 1 次, 光照时间是 12 h/12 h, 室温 18~24 °C, 相对湿度 50%~70%。本研究动物实验操作均严格遵循 3R 原则, 动物实验经南京中医药大学附属张家港市中医医院批准 (批号 20210517062)。

### 1.2 主要试剂

注射用氢化可的松 (规格 10 mg, 批号 20210211) 购自吉林敖东药业集团延吉股份有限公司; 茶多酚 (质量分数 ≥ 98%, 规格 25 kg, 批号 20210123) 购自南京百慕达生物科技有限公司; 阿仑膦酸钠片 (规格 70 mg, 批号 20200113) 购自万特制药 (海南) 有限公司; RIPA 蛋白提取试剂盒 (批号 20191027)、BCA 蛋白测定试剂盒 (批号 01803E)、苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 G1012)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 20200097) 均购自上海浦予工业科技有限公司; I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I, 批号 MM-1037R2)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP, 批号 MM-1056R2)、碱性磷酸酶 (ALP, 批号 MM-0619R2) ELISA 检测试剂盒购自江苏菲亚生物科技有限公司; 丙二醛 (MDA, 批号 20200104)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px, 批号 20200116)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 20191125) 检测试剂盒购自武汉赛培生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 批号 ab263899)、SIRT3 (批号 ab97299)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2, 批号 ab183218)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 (Bax, 批号 ab254360) 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ab221660) 均购自美国 Abcam 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 OP 大鼠模型建立** 大鼠饲养 1 周后随机选取 40 只, 参考文献方法<sup>[9]</sup>以左右后肢交替注射的方式于后肢臀部 im 20 mg/kg (5 mg/mL) 氢化可的松, 隔日注射 1 次, 连续 8 周, 造模后大鼠行 Micro-CT 扫描, 检测股骨远端骨密度, 若大鼠出现骨结构断裂, 骨量减少现象即为 OP 模型造模成功。

**1.3.2 实验分组和给药干预** 将造模成功的大鼠随机分为模型组、茶多酚低、高剂量组、阿仑膦酸钠组, 每组 10 只, 另取 10 只正常饲养、未行 OP 造模的大鼠设为对照组。造模成功后第 2 周开始给药干预, 结合文献方法<sup>[10]</sup>和预实验结果确定给药剂量, 其中茶多酚低剂量组大鼠每天 ig 茶多酚 25 mg/kg; 茶多酚高剂量组大鼠每天 ig 茶多酚 100 mg/kg; 阿仑膦酸钠组大鼠每天 ig 阿仑膦酸钠 1 mg/kg; 对照组和模型组大鼠每天 ig 给予等量生理盐水。各组给药 1 次/d, 连续给药 12 周。

**1.3.3 样本采集** 各组大鼠末次给药后, 禁食不禁水 12 h, ip 3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉大鼠, 取腹主动脉血 5 mL, 在 3 000 r/min、4 °C 条件下离心 20 min, 收集上清液保存于-80 °C 备用。处死大鼠后, 取大鼠双后肢股骨, 清理干净后, 左侧股骨用生理盐水纱布包裹, 置于-80 °C 保存备用, 右侧股骨标本用医用纱布包裹, 置入 4 %多聚甲醛中固定 24 h 备用。

**1.3.4 Micro-CT 分析** 取大鼠右侧后肢股骨远端标本, 应用上海玉研科学仪器有限公司生产的小动物 Micro-CT 影像系统对大鼠股骨进行扫描, Micro-CT 扫描参数: 图像矩阵 1 024×1 024, 整合时间为 200 ms, 能量/强度为 90 kVp、100  $\mu$ A、8 W, 分辨率为 18  $\mu$ m, 以 0° 旋转扫描, 扫描范围设定为股骨中上段及中下段。扫描完成后, 选择股骨纵切面距离生长板远端 1.0 mm 处、层厚 1.0 mm 的骨组织为松质骨感兴趣区域进行三维重组定量分析, 图像信息最低阈值为 170。对骨组织重组的图像进行数据定量分析, 分析骨密度 (BMD)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁分离度 (Tb.Sp) 和骨连接密度 (Conn.D) 指标。

**1.3.5 HE 染色** 取大鼠右侧后肢股骨远端标本, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗后用 10%螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙, 将脱钙标本依次脱水、透明, 石蜡包埋, 制成 5  $\mu$ m 切片, 切片进行 HE 染色, 封片后在显微镜下观察大鼠股骨组织病理形态。

**1.3.6 大鼠血清骨代谢、氧化应激指标检测** 取大鼠血清标本, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中骨代谢指标 (ALP、P I NP、CTX-I) 水平和氧化应激指标 (MDA、GSH-Px、SOD) 含量。

**1.3.7 TUNEL 染色** 大鼠股骨远端石蜡切片脱蜡至水, 漂洗后滴加 20  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K 溶液浸润,

37 °C 恒温孵育 30 min, 随后按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行染色标记, 在荧光显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞, 凋亡阳性细胞呈棕黄色, 计算细胞凋亡指数 (AI)。

**1.3.8 Western blotting 实验检测** 取大鼠左侧后肢股骨组织, 加入裂解液提取蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。取定量蛋白样品与上样缓冲液按照特定比例混匀, 置于沸水浴加热 10 min 变性, 经 10% SDS-PAGE 分离, 将 PAGE 胶上的蛋白样品转移至 PVDF 膜, 加 5 %脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 清洗膜, 分别加入 SIRT3、Bcl-2、Bax、GAPDH 一抗稀释液 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗膜, 加入 HRP 标记的二抗稀释液 (1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 清洗膜, 加入 ECL 试剂显影, 以 GAPDH 为内参蛋白, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验。

## 2 结果

### 2.1 茶多酚对 OP 大鼠 BMD 及骨微结构的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D 均显著降低, Tb.Sp 显著升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组、阿仑膦酸钠组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D 均显著升高, Tb.Sp 显著降低 ( $P<0.05$ ); 与茶多酚 25 mg/kg 组比较, 茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D 均显著升高, Tb.Sp 显著降低 ( $P<0.05$ ), 见表 1、图 1。

### 2.2 茶多酚对 OP 大鼠骨组织病理学形态的影响

对照组的骨小梁形态完整、结构均匀, 骨细胞排列均匀, 骨髓腔正常; 模型组骨小梁形态模糊、断裂, 骨小梁孔隙度增大, 骨细胞排列散乱, 骨髓腔明显增宽; 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组的骨小梁形态较模型组有不同程度改善, 骨细胞排列较为整齐, 骨髓腔减小, 见图 2。

### 2.3 茶多酚对 OP 大鼠血清骨代谢指标水平的影响

与对照组比较, 模型组血清 ALP、P I NP 水平降低, CTX-I 水平升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠血清 ALP、P I NP 水平显著升高, CTX-I 水平显著降低

表 1 茶多酚对 OP 大鼠 BMD 及骨微结构的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Effects of tea polyphenols on BMD and bone microstructure of OP rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg kg <sup>-1</sup> ) | BMD/(g cm <sup>-3</sup> )     | BV/TV/%                       | Tb.N/mm                       | Tb.Th/ $\mu$ m                 | Tb.Sp/ $\mu$ m                | Conn.D/mm <sup>3</sup>          |
|-------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 对照    | —                         | 0.57 $\pm$ 0.06               | 1.33 $\pm$ 0.15               | 10.61 $\pm$ 1.10              | 58.46 $\pm$ 6.22               | 1.62 $\pm$ 0.15               | 127.46 $\pm$ 11.92              |
| 模型    | —                         | 0.25 $\pm$ 0.02*              | 1.02 $\pm$ 0.09*              | 5.38 $\pm$ 0.51*              | 30.78 $\pm$ 3.19*              | 3.26 $\pm$ 0.30*              | 73.56 $\pm$ 8.35*               |
| 茶多酚   | 25                        | 0.32 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>  | 1.13 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>  | 6.93 $\pm$ 0.70 <sup>#</sup>  | 41.52 $\pm$ 4.13 <sup>#</sup>  | 2.78 $\pm$ 0.28 <sup>#</sup>  | 85.11 $\pm$ 8.92 <sup>#</sup>   |
|       | 100                       | 0.45 $\pm$ 0.04 <sup>#▲</sup> | 1.24 $\pm$ 0.13 <sup>#▲</sup> | 8.74 $\pm$ 0.89 <sup>#▲</sup> | 49.30 $\pm$ 5.47 <sup>#▲</sup> | 1.80 $\pm$ 0.16 <sup>#▲</sup> | 98.62 $\pm$ 10.14 <sup>#▲</sup> |
| 阿仑膦酸钠 | 1                         | 0.46 $\pm$ 0.05 <sup>#▲</sup> | 1.27 $\pm$ 0.13 <sup>#▲</sup> | 8.91 $\pm$ 0.85 <sup>#▲</sup> | 50.11 $\pm$ 5.36 <sup>#▲</sup> | 1.77 $\pm$ 0.15 <sup>#▲</sup> | 99.30 $\pm$ 10.35 <sup>#▲</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与茶多酚 25 mg kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs tea polyphenols 25 mg kg<sup>-1</sup> dose group

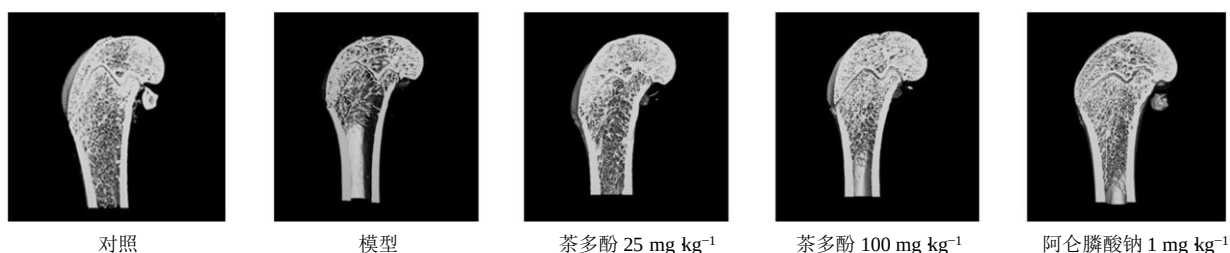


图 1 Micro-CT 分析大鼠股骨微结构

Fig. 1 Microstructure of rat femur analyzed by micro-CT

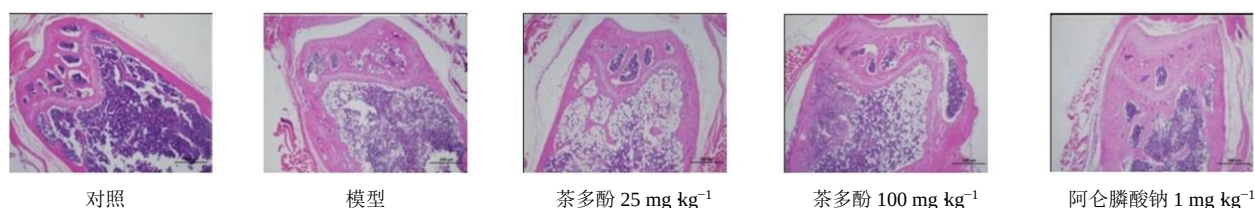


图 2 茶多酚对 OP 大鼠骨组织病理学形态的影响 (HE 染色,  $\times 40$ )

Fig. 2 Effect of tea polyphenols on bone histopathological morphology of OP rats (HE staining,  $\times 40$ )

( $P < 0.05$ ); 与茶多酚 25 mg/kg 组比较, 茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组血清 ALP、P I NP 水平显著升高, CTX-I 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

#### 2.4 茶多酚对 OP 大鼠血清氧化应激指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 MDA 含量显著升高, SOD、GSH-Px 活性均显著降低 ( $P < 0.05$ );

与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠血清 MDA 含量显著降低, SOD、GSH-Px 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与茶多酚 25 mg/kg 组比较, 茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠血清 MDA 含量均显著降低, SOD、GSH-Px 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 茶多酚对 OP 大鼠血清骨代谢指标水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Effect of tea polyphenols on serum bone metabolism index level of OP rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg kg <sup>-1</sup> ) | ALP/(U L <sup>-1</sup> )       | CTX-I/(ng mL <sup>-1</sup> )   | P I NP/(ng mL <sup>-1</sup> )  |
|-------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照    | —                         | 75.32 $\pm$ 8.17               | 16.83 $\pm$ 1.75               | 15.07 $\pm$ 1.61               |
| 模型    | —                         | 33.68 $\pm$ 2.75*              | 26.53 $\pm$ 2.59*              | 10.85 $\pm$ 1.15*              |
| 茶多酚   | 25                        | 40.65 $\pm$ 4.60 <sup>#</sup>  | 20.65 $\pm$ 2.17 <sup>#</sup>  | 12.04 $\pm$ 1.28 <sup>#</sup>  |
|       | 100                       | 65.28 $\pm$ 6.30 <sup>#▲</sup> | 18.70 $\pm$ 1.64 <sup>#▲</sup> | 13.52 $\pm$ 1.44 <sup>#▲</sup> |
| 阿仑膦酸钠 | 1                         | 66.43 $\pm$ 6.05 <sup>#▲</sup> | 18.51 $\pm$ 1.60 <sup>#▲</sup> | 13.96 $\pm$ 1.47 <sup>#▲</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与茶多酚 25 mg kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs tea polyphenols 25 mg kg<sup>-1</sup> dose group

表 3 茶多酚对 OP 大鼠血清氧化应激指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )Table 3 Effects of tea polyphenols on serum oxidative stress indexes of OP rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg kg <sup>-1</sup> ) | MDA/(nmol mL <sup>-1</sup> ) | SOD/(U mL <sup>-1</sup> )    | GSH-Px/(U mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照    | —                         | 9.05 ± 1.20                  | 136.18 ± 12.25               | 121.78 ± 10.52               |
| 模型    | —                         | 13.58 ± 1.84*                | 62.49 ± 6.57*                | 78.11 ± 8.03*                |
| 茶多酚   | 25                        | 11.75 ± 1.50 <sup>#</sup>    | 93.11 ± 8.55 <sup>#</sup>    | 90.52 ± 8.93 <sup>#</sup>    |
|       | 100                       | 9.88 ± 1.31 <sup>#▲</sup>    | 116.35 ± 10.81 <sup>#▲</sup> | 101.30 ± 9.47 <sup>#▲</sup>  |
| 阿仑膦酸钠 | 1                         | 9.63 ± 1.18 <sup>#▲</sup>    | 117.83 ± 10.56 <sup>#▲</sup> | 102.11 ± 9.76 <sup>#▲</sup>  |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与茶多酚 25 mg kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs tea polyphenols 25 mg kg<sup>-1</sup> dose group

## 2.5 茶多酚对 OP 大鼠股骨组织细胞凋亡的影响

对照组大鼠股骨组织中存在少量呈棕黄色的凋亡阳性细胞; 模型组大鼠股骨组织中棕黄色凋亡阳性细胞明显增多; 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织中棕黄色凋亡阳性细胞较模型组均有不同程度的减少, 且茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织中棕黄色凋亡阳性细胞减少更为显著, 见图 3A。

与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织 AI 显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织 AI 均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织 AI 均显著低于茶多酚 25 mg/kg 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。

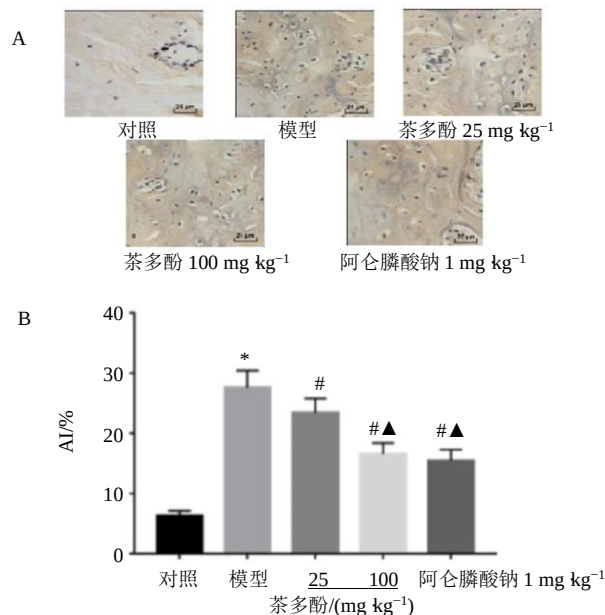
## 2.6 茶多酚对 OP 大鼠股骨组织中 SIRT3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织中 SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达量显著降低, Bax 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 茶多酚 25、100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织中 SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达量显著升高, Bax 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与茶多酚 25 mg/kg 组比较, 茶多酚 100 mg/kg 组和阿仑膦酸钠组大鼠股骨组织中 SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达量均显著升高, Bax 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

## 3 讨论

茶多酚具有抗炎、抗氧化、抗癌、抗病毒、调节免疫等多重生物活性, 临床试验分析表明<sup>[11-13]</sup>, 持续食用富含茶多酚的饮食可以预防炎症、氧化应激引起的慢性损伤性疾病, 包括糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病和肝、肾损伤等。研究发现<sup>[14]</sup>, 茶多酚能够有效清除自由基, 抑制 ROS 生成, 抗氧化活性较为显著, 作为一种安全有效的抗氧化剂被广泛应用。近年来, 研究茶多酚在骨骼疾病方面

的治疗作用发现, 茶多酚通过调节 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件 (Keap1/Nrf2/ARE) 通路减轻氧化应激诱导的椎间盘退变<sup>[15]</sup>, 此外, 茶多酚还可维持骨内稳态, 具有骨保护作用<sup>[16]</sup>。本研究探讨茶多酚对 OP 的干预作用, 结果显示, 茶多酚能够提高 OP 大鼠骨密度, 减轻 OP 导致的大鼠骨微结构改变和骨组织病理形态变化, 且低剂量茶多酚的作用效果弱于高剂量, 而高剂量茶多酚干预效果与阳性药物阿仑膦酸钠效果相当。本研究结果证实茶多酚对 OP 具有有效的干预治疗作用。



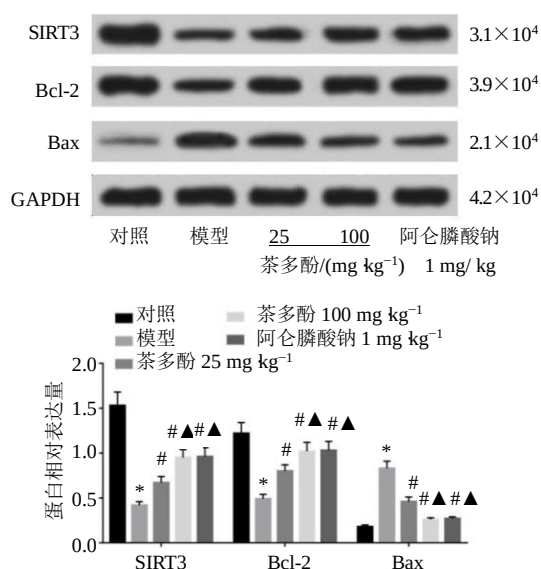
与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与茶多酚 25 mg kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs tea polyphenols 25 mg kg<sup>-1</sup> dose group

图 3 茶多酚对 OP 大鼠股骨组织细胞凋亡的影响(TUNEL 染色,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of tea polyphenols on apoptosis of femur in OP rats (TUNEL staining,  $\times 200$ )





与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与茶多酚 25 mg kg<sup>-1</sup>组比较: ▲ $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  vs tea polyphenols 25 mg kg<sup>-1</sup> dose group

图 4 茶多酚对 OP 大鼠股骨组织中 SIRT3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of tea polyphenols on SIRT3, Bax and bcl-2 protein expression in femur of OP rats

骨代谢包含骨形成、骨吸收 2 个基本过程, 正常情况下, 成骨细胞介导的骨形成作用和破骨细胞介导的骨吸收作用形成骨偶联, 保持相对动态平衡, 但当骨吸收大于骨形成时, 骨偶联失去平衡, 导致 OP 发生<sup>[17]</sup>。在骨微环境中, 骨形成标志物 P I NP、ALP 和骨吸收标志物 CTX-I 等细胞因子参与调控成骨细胞、破骨细胞的增殖、分化<sup>[18]</sup>。相关研究报道<sup>[19]</sup>, OP 发生后, 机体 CTX-I 水平明显升高, 而 P I NP 水平则明显降低, 针对降低 CTX-I 水平、提高 P I NP 水平的干预治疗则有望提高 OP 治疗效果, 降低骨质疏松性骨折的发生率。Feng 等<sup>[20]</sup>研究报道, 促进成骨细胞中 ALP 表达, 具有促进骨形成、改善 OP 的作用。本研究检测 OP 大鼠血清骨代谢指标发现, OP 大鼠血清中 ALP、P I NP 水平低表达, CTX-I 水平高表达, 经茶多酚和阿仑膦酸钠干预后, 大鼠血清中 ALP、P I NP 水平明显升高, CTX-I 水平明显降低。表明茶多酚可能通过调节骨代谢指标水平改善 OP。

氧化应激反应在 OP 的发生中起重要作用, ROS 大量积累后, 主要通过增强成骨细胞活性导致骨吸收和骨形成产生差异, 进而参与雌激素缺失或糖皮质激素诱导的骨丢失<sup>[21]</sup>。既往研究表明<sup>[22]</sup>, 长

期使用糖皮质激素类药物会增加机体氧化损伤, 而过度氧化应激会对成骨细胞的分化和矿化功能产生负面影响。因此, 糖皮质激素诱导的 OP 治疗关键在于降低成骨细胞内的氧化应激反应。本实验以糖皮质激素药物氢化可的松诱导 OP 大鼠模型, 检测发现 OP 大鼠血清中脂质过氧化产物 MDA 含量升高, 抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性均降低, 证实了氧化应激参与糖皮质激素所致 OP 的发生发展。本研究中, 茶多酚干预后, OP 大鼠血清 MDA 含量明显降低, SOD、GSH-Px 活性明显升高。根据 Tolba 等<sup>[23]</sup>报道, 减轻糖皮质激素所致 OP 股骨组织的氧化应激有助于提高 OP 的治疗效果。本研究结果证实, 茶多酚的抗氧化活性可有效改善糖皮质激素所致 OP 中氧化应激水平, 从而对 OP 具有良好的改善作用。

有报道称糖皮质激素诱导 OP 发生与 ROS 积累和线粒体膜电位丧失有关, 而 ROS 积累和线粒体损伤则通过脂质过氧化、抗氧化酶抑制导致其他细胞器的损伤并诱导细胞凋亡, 加剧 OP 进展和骨量损失<sup>[24-25]</sup>。SIRT3 作为许多代谢酶和线粒体代谢活性的上游调节剂, 已被证实可通过激活 Bcl-2 介导的凋亡抑制途径减少细胞凋亡<sup>[26]</sup>。此外, 相关研究表明<sup>[27-28]</sup>, 在成骨细胞氧化损伤模型和绝经后 OP 大鼠模型中 SIRT3 表达降低。提示 SIRT3 在逆转氧化损伤引起的成骨细胞凋亡中发挥重要作用。本研究结果显示, OP 大鼠股骨组织细胞凋亡增加, 大鼠股骨组织中 SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达下调, Bax 蛋白表达上调。茶多酚干预后, OP 大鼠股骨组织细胞凋亡减少, 大鼠股骨组织中 SIRT3 和 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达降低。表明茶多酚可能通过调控 SIRT3 介导的成骨细胞凋亡通路发挥治疗 OP 的作用。

综上所述, 茶多酚通过调节骨代谢指标水平、减轻氧化应激以及抑制成骨细胞凋亡改善 OP, 其作用机制可能与调控 SIRT3/Bcl-2 信号通路活性有关。本研究为茶多酚的开发应用和 OP 的治疗提供了新方向和新靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Aspray T J, Hill T R. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476.
- [2] Kanis J A, Cooper C, Rizzoli R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in

- postmenopausal women [J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(1): 3-44.
- [3] Johnston C B, Dagar M. Osteoporosis in older adults [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(5): 873-884.
- [4] Zhai M, Li B, Duan W, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis [J]. *J Pineal Res*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12419.
- [5] Yang K, Pei L, Zhou S, et al. Metformin attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced osteoblast apoptosis by regulating SIRT3 via the PI3K/AKT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1316.
- [6] Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols in promotion of human health [J]. *Nutrients*, 2018, 11(1): 39.
- [7] Yang H, Zuo X Z, Tian C, et al. Green tea polyphenols attenuate high-fat diet-induced renal oxidative stress through SIRT3-dependent deacetylation [J]. *Biomed Environ Sci*, 2015, 28(6): 455-459.
- [8] Shen C L, Smith B J, Li J, et al. Effect of long-term green tea polyphenol supplementation on bone architecture, turnover, and mechanical properties in middle-aged ovariectomized rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 104(3): 285-300.
- [9] 姚高琼, 周远大. 复方甘氨酸钙对氢化可的松致骨质疏松模型大鼠的防治作用 [J]. *中国药房*, 2007(13): 984-986.
- [10] 邓凤君, 曾娅玲, 龚勇珍, 等. 茶多酚对脊髓损伤大鼠急性期氧自由基与炎症因子的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(9): 1079-1083.
- [11] Oz H S. Chronic inflammatory diseases and green tea polyphenols [J]. *Nutrients*, 2017, 9(6): 561.
- [12] Yin B, Lian R, Li Z, et al. Tea polyphenols enhanced the antioxidant capacity and induced Hsps to relieve heat stress injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9615429.
- [13] 石明亮, 王晓磊, 李江琳, 等. 基于 Wnt 信号通路研究表没食子酸儿茶素没食子酸酯对肝星状细胞活化的作用及机制 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 758-766.
- [14] Yan Z, Zhong Y, Duan Y, et al. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits [J]. *Anim Nutr*, 2020, 6(2): 115-123.
- [15] Song D, Ge J, Wang Y, et al. Tea polyphenol attenuates oxidative stress-induced degeneration of intervertebral discs by regulating the Keap1/Nrf2/ARE pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6684147.
- [16] Li B Y, Gao Y H, Pei J R, et al. ClC-7/Ostm1 contribute to the ability of tea polyphenols to maintain bone homeostasis in C57BL/6 mice, protecting against fluorosis [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1155-1163.
- [17] Suzuki A, Minamide M, Iwaya C, et al. Role of metabolism in bone development and homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8992.
- [18] Szulc P, Naylor K, Hoyle N R, et al. Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability [J]. *Osteoporos Int*, 2017, 28(9): 2541-2556.
- [19] Zhong Y, Li J, Luo J, et al. Advances in bone turnover markers (PINP and CTX) in optimizing anti-resorptive and anabolic therapies against osteoporosis [J]. *Discov Med*, 2021, 32(167): 149-154.
- [20] Feng X, Jiang S, Zhang F, et al. Extraction and characterization of matrix protein from pacific oyster (*Crassostrea giga*) shell and its anti-osteoporosis properties *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 9066-9076.
- [21] Zhang Q, Song X, Chen X, et al. Antiosteoporotic effect of hesperidin against ovariectomy-induced osteoporosis in rats via reduction of oxidative stress and inflammation [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(8): e22832.
- [22] Torres M L, Wanionok N E, McCarthy A D, et al. Systemic oxidative stress in old rats is associated with both osteoporosis and cognitive impairment [J]. *Exp Gerontol*, 2021, 156: 111596.
- [23] Tolba M F, El-Serafi A T, Omar H A. Caffeic acid phenethyl ester protects against glucocorticoid-induced osteoporosis *in vivo*: Impact on oxidative stress and RANKL/OPG signals [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 324: 26-35.
- [24] Chen L, Hu S L, Xie J, et al. Proanthocyanidins-mediated Nrf2 activation ameliorates glucocorticoid-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblasts [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9102012.
- [25] Han D, Gu X, Gao J, et al. Chlorogenic acid promotes the Nrf2/HO-1 anti-oxidative pathway by activating p21Waf1/Cip1 to resist dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137: 1-12.
- [26] Shukla S, Sharma A, Pandey V K, et al. Concurrent acetylation of FoxO1/3a and p53 due to sirtuins inhibition elicit Bim/PUMA mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in berberine-treated HepG2 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 291: 70-83.
- [27] Zhou W, Liu Y, Shen J, et al. Melatonin increases bone mass around the prostheses of OVX rats by ameliorating mitochondrial oxidative stress via the SIRT3/SOD2 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4019619.
- [28] Chiu H C, Chiu C Y, Yang R S, et al. Preventing muscle wasting by osteoporosis drug alendronate *in vitro* and in myopathy models via sirtuin-3 down-regulation [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(3): 585-602.

[责任编辑 高源]