DOI:10.16016/j.1000-5404.201507137

杨梅素减轻去卵巢大鼠骨质疏松

甘 宁[1,5,6],郁雪松[2,5],陈 军[3],叶 国[4,5,6] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科[1],修复科[2],正畸科[3],牙周科[4],口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室[5];重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室[6])

[摘要] **目的** 观察杨梅素对去卵巢大鼠骨量的影响,初步探讨机制。**方法** 12 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、去卵巢组(OVX)和杨梅素注射组(OVX + Myricetin)。建模后 1 周,OVX + Myricetin 组、假手术组和 OVX 组分别腹腔注射杨梅素 85 mg/kg 和甲醇溶剂,2 次/周,8 周。取材前10 d 和前 3 d 分别皮下注射茜素红。microCT 扫描股骨远心端。HE 染色观察骨小梁。Elisa 检测血清 PINP 浓度。荧光显微镜观察茜素红荧光条带。ALP 染色检测 BMMSCs 成骨能力。荧光标记法检测 BMMSCs 活性氧水平。Real-time PCR 检测基因表达。**结果** OVX 组的骨量/组织量(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁厚度(Tb.Th)低于假手术组;骨小梁间隙(Tb.Sp)大于假手术组,HE 切片 OVX 组的骨小梁少于假手术组,OVX 组的血清 PINP、茜素红荧光条带间距低于假手术组。OVX + Myricetin 组的 BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 大于 OVX 组;Tb.Sp 小于 OVX 组,HE 切片 OVX + Myricetin 组的骨小梁多于 OVX 组,OVX + Myricetin 组的血清 PINP、茜素红荧光条带间距高于 OVX 组。OVX 组 BMMSCs 的 ROS 水平高于假手术组,SOD 表达降低,ALP 活性和成骨基因表达降低;OVX + Myricetin 组低于 OVX 组,SOD 表达升高,ALP 活性和成骨基因表达升高。H_2O_2 处理后的 BMMSCs 的 ROS 水平升高,SOD 表达降低,ALP 活性和成骨基因表达降低;加杨梅素处理后的 BMMSCs 的 ROS 水平降低,SOD 表达升高,ALP 活性和成骨基因表达升高。**结论** 杨梅素通过降低 ROS 水平恢复内源性 BMMSCs 的成骨能力,减少去卵巢大鼠骨量丢失。

[关键词] 杨梅素;去卵巢;骨质疏松;活性氧;成骨分化
[中图法分类号] R282.71;R336;R681 [文献标志码] A

Effect of myricetin on alleviating osteoporosis in ovariectomized rats

Gan Ning[1,5,6], Yu Xuesong[2,5], Chen Jun[3], Ye Guo[4,5,6] ([1]Department of Conservation Dentistry and Endodontics, [2]Department of Prosthodontic, [3]Department of Orthodontics, [4]Department of Periodontics, [5]Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedicine, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147; [6]Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Chongqing Higher Education, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of myricetin on bone volume of ovariectomized (OVX) rats and primarily explore the mechanism. **Methods** Twelve female SD rats were randomly divided into sham group, OVX group and OVX + myricetin group. In 1 week after modeling, the OVX + myricetin group, sham group and OVX group were intraperitoneally injected with myricetin 85 mg/kg or methanol solvent, twice per week, for 8 weeks. Subcutaneous injection of alizarin red was conducted on the 10th day and 3rd day before the rats were sacrificed. Distal femurs were analyzed by MicroCT scanning. Trabecular bone (Tb) was tested by HE staining. Serum amino-terminal propeptide of type Ⅰ procollagen (PINP) was detected by ELISA. Alizarin red fluorescent strips were observed with fluorescence microscopy. Osteogenesis of BMMSCs was analyzed by ALP staining. ROS level was detected by fluorescence tagging. Gene expression was tested by real-time PCR. **Results** The bone volume/tissue volume (BV/TV), Tb number and Tb thickness of the

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(CSTC2014jcyjA10055);重庆市渝北区科委项目(渝北财教[2013]31 号)
[通信作者] 叶 国,E-mail:ygcqykd@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1355.043.html(2015-12-04)

OVX group were lower than those of the sham group, whereas the Tb space was higher. Tb of the OVX group was less than that of the sham group. Serum PINP and the distance between two alizarin red fluorescent strips in the OVX group were lower than those in the sham group. BV/TV, Tb number and Tb thickness of the OVX + myricetin group were higher than those of the OVX group, whereas Tb space was lower. Tb of the OVX + myricetin group was more than that of the OVX group. Serum PINP and the distance between two alizarin red fluorescent strips in the OVX + myricetin group were higher than those in the OVX group. The ROS level of endogenous BMMSCs in the OVX group was higher than that in the sham group, the expression of SOD was lower, and ALP activity and osteogenic genes were higher. ROS level of endogenous BMMSCs in the OVX + myricetin group was lower than that of the OVX group, the expression of SOD was higher, and ALP activity and osteogenic genes were lower. Furthermore, ROS level of H_2O_2-treated BMMSCs was higher than that of non-treated BMMSCs, the expression of SOD was lower, and ALP activity and osteogenic genes were higher. ROS level of H_2O_2-treated BMMSCs declined after treatment with myricetin, the expression of SOD was higher, and ALP activity and osteogenic genes were lower. **Conclusion** Myricetin reduces bone loss of OVX rats through lowering endogenous ROS level and restoring osteogenesis of endogenous BMMSCs.

[**Key words**] myricetin; ovariectomization; ROS; osteogenesis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2014jcyjA10055) and the Project of Science and Technology Commission of Yubei District, Chongqing(2013-31). Corresponding author: Ye Guo, E-mail: ygcqykd@163.com

研究表明,内源性骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)成骨活性的减弱可以打破骨稳态,引发骨质疏松[1-2]。黄酮类小分子化合物与雌激素具有类似的化学结构,能有效恢复骨质疏松动物的骨量[3],是骨质疏松研究领域的焦点。杨梅素作为一种黄酮类化合物,不仅具有优良的抗氧化活性[4-7],在体外还能可以促进细胞成骨活性[8-9],抑制破骨活性[10-11],而目前尚少见其治疗骨质疏松的报道。本研究拟观察腹腔注射杨梅素能否减少去势大鼠的骨量丢失,探讨其对内源性 BMMSCs 的影响及其明确机制,以期为临床应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

SPF 级雌性 SD 大鼠 12 只,体质量约 180 g[合格证号 SCXK(渝 2007-0001)]。杨梅素标准品(上海永叶生物,UV ≥98%),茜素红(上海谱振生物),血清 PINP Elisa 试剂盒(上海研辉生物),ALP 染色试剂盒、活性氧检测试剂盒(碧云天),Trizol reagent、RNA 反转录试剂盒及大鼠 β-actin、ALP 和 Osterix 引物(TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及腹腔注射 实验分为假手术组、OVX 组和 OVX + Myricetin 组。术后 1 周,OVX + Myricetin 组以 85 mg/kg、2 次/周腹腔注射杨梅素溶液,注射8 周;假手术和 OVX 组以相同的频率注射等体积的甲醇。

1.2.2 皮下注射茜素红 取材前 10 d 和前 3 d,以 30 mg/kg 的剂量分别皮下注射。

1.2.3 取材 8 周后取材,常规麻醉,心脏采血并分离血清。分离股骨,用于细胞学与组织学检测。

1.2.4 microCT 扫描及茜素红荧光带检测 取左侧股骨远心端 2 cm,扫描重建;左侧股骨近心端树脂包埋,50 μm 厚硬组织切片,荧光显微镜观察荧光条带。

1.2.5 HE 染色 常规脱钙,石蜡包埋,染色。

1.2.6 血清Ⅰ型前胶原氨基端前肽(Amino-terminal propeptideof type Ⅰ procollagen, PINP)检测 按操作说明,取 10 μL 血清检测,检测浓度 ×5 获得终浓度。

1.2.7 BMMSCs 成骨能力检测 BMMSCs 以 1×10^5 接种于 12 孔板,成骨诱导 7 d 后,ALP 染色。同组复孔用于提取总 RNA,检测成骨基因表达。

1.2.8 BMMSCs 活性氧水平检测 BMMSCs 以 4×10^4 接种于 24 孔板,贴壁后,加入 800 μmol/L 的 H_2O_2 处理 6 h,再加入 10 nmol/L 的杨梅素预处理 18 h。按活性氧试剂盒操作说明染色,荧光显微镜下拍照。同组复孔用于提取总 RNA,检测 SOD 基因表达。

1.2.9 real-time PCR 检测 TRIzol 法提取 BMMSCs 总 RNA,反转录,real-time PCR 扩增。β-actin 上游引物 5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′(20 bp),下游引物5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′(21 bp)。ALP 上游引物 5′-GCACAACATCAAGGACATCG-3′(20 bp),下游引物 5′-AGGGAAGGGTCAGTCAGG-3′(18 bp)。Osterix 上游引物 5′-GAGTAGGATTGTAG-

GATTGG-3′(20 bp),下游引物 5′-TGCTTGAGGAAGTTCACTATGGC-3′(23 bp)。SOD 上游引物 5′-TGACCTGCCTTACGACTA-3′(18 bp),下游引物 5′-CGACCTTGCTCCTTATTG-3′(18 bp)。

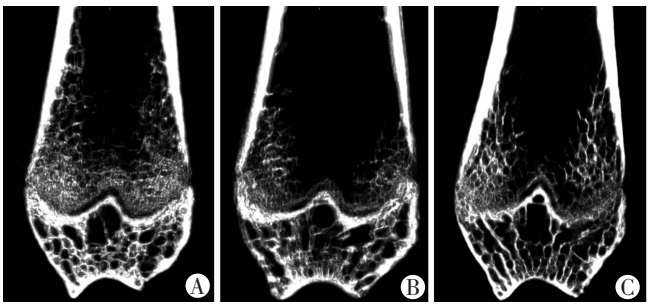
1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 成功建立骨质疏松模型

OVX 组的 BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 低于假手术组,而 Tb. Sp 高于假手术组(图 1、表 1);HE 切片中,OVX 组的骨小梁少于假手术组(图 2)。OVX 组的血清 PINP 浓度低于假手术组(表 1)。OVX 组的成骨速率低于假手术组(图 3、表 1)。

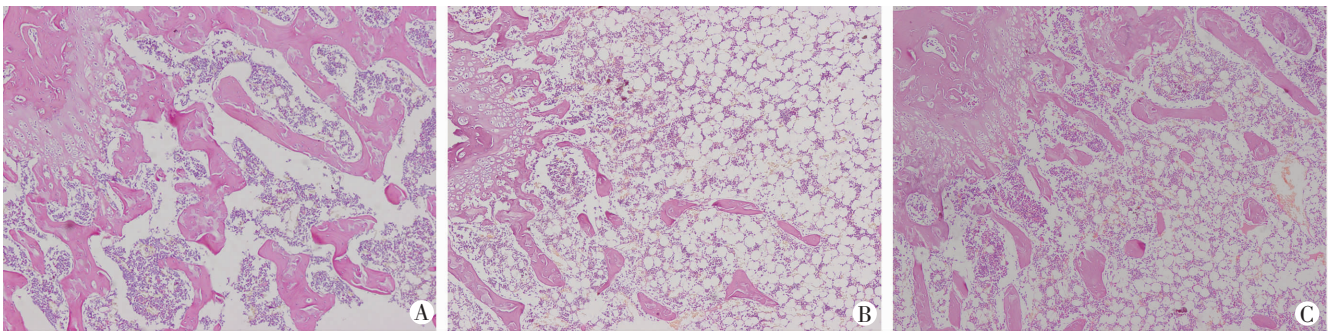


A:假手术组;B:去卵巢组;C:去卵巢 + 杨梅素组

图 1 各组大鼠股骨远心端 microCT 扫描观察

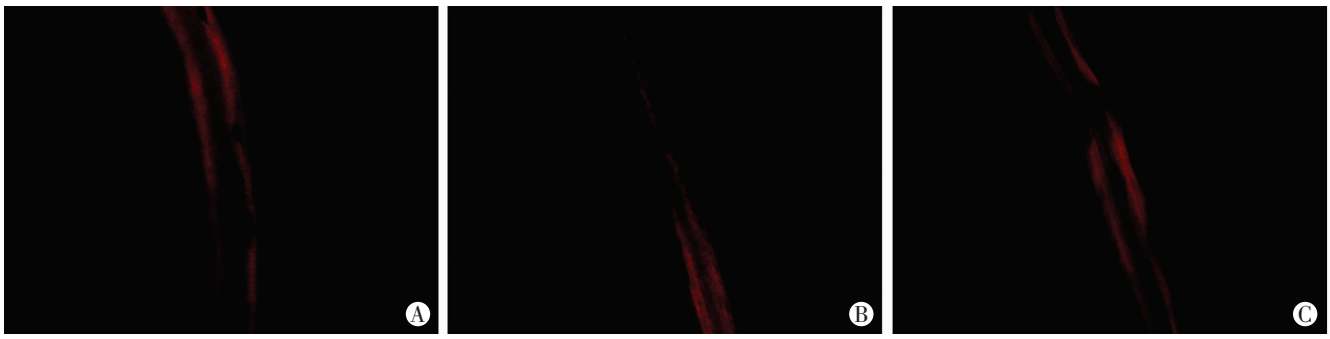
2.2 杨梅素可以有效缓解骨质疏松

OVX + Myricetin 组的 BV/TV、Tb. N 参数高于 OVX 组,而 Tb. Sp 低于 OVX 组(图 1、表 1);HE 切片中,OVX + Myricetin 组的骨小梁多于 OVX 组(图 2)。OVX + Myricetin 组的血清 PINP 浓度高于 OVX 组(表 1)。OVX + Myricetin 组的成骨速率高于 OVX 组(图 3、表 1)。



A:假手术组;B:去卵巢组;C:去卵巢 + 杨梅素组

图 2 各组大鼠股骨远心端 HE 染色观察 (×100)



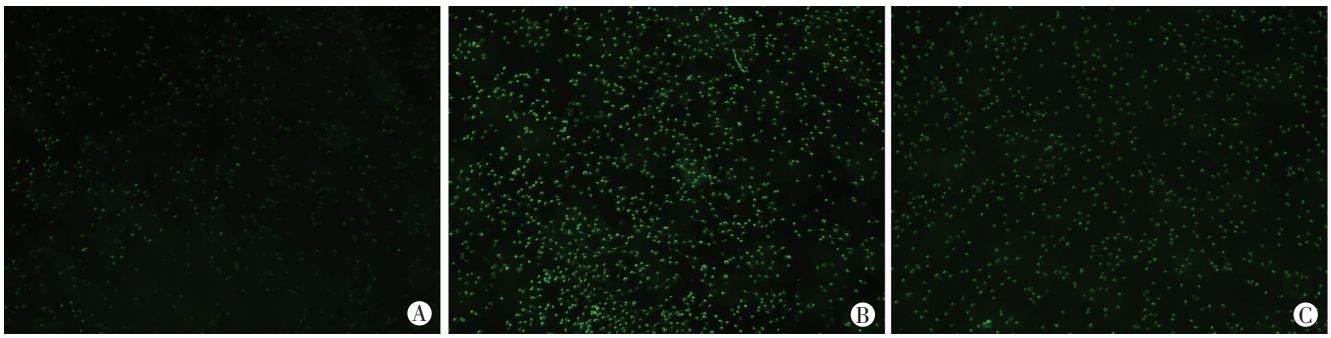
A:假手术组;B:去卵巢组;C:去卵巢 + 杨梅素组

图 3 茜素红荧光标记各组大鼠新生骨带 (×200)

表 1 各组大鼠股骨远心端骨小梁参数、血清浓度及成骨速率 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

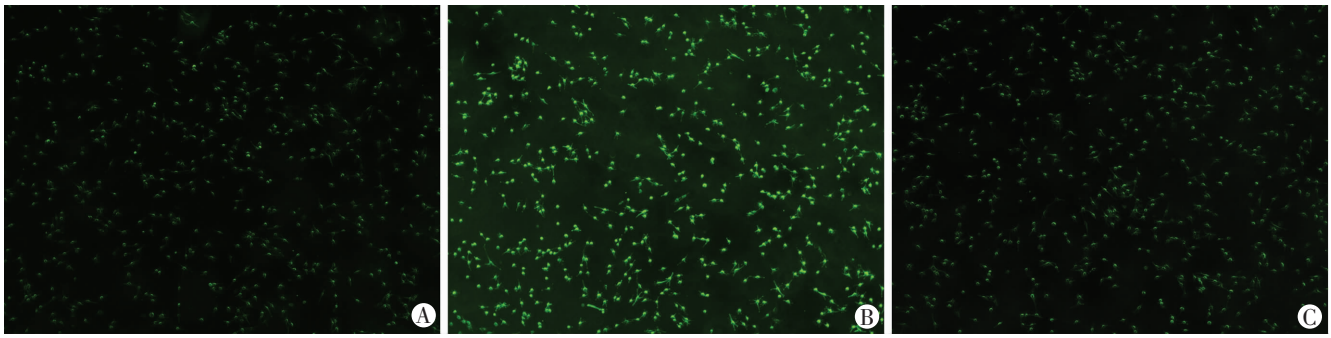
组别	BV/TV	Tb. N(/mm)	Tb. Th(mm)	Tb. Sp(mm)	PINP(ng/mL)	成骨速率(μm/d)
假手术组	0.42 ± 0.02	3.54 ± 0.13	0.072 ± 0.003	0.047 ± 0.013	5.818 ± 0.974	3.319 ± 0.346
OVX 组	0.22 ± 0.03[a]	1.56 ± 0.12[a]	0.040 ± 0.006[a]	0.161 ± 0.015[a]	2.088 ± 0.489[a]	1.553 ± 0.189 *
OVX + Myricetin 组	0.31 ± 0.02[ab]	2.34 ± 0.09[ab]	0.059 ± 0.002[ab]	0.117 ± 0.010[ab]	3.565 ± 0.527[ab]	2.195 ± 0.163[ab]

a: $P<0.05$,与假手术组比较;b: $P<0.05$,与 OVX 组比较



A:假手术组;B:去卵巢组;C:去卵巢+杨梅素组

图4　各组大鼠内源性 BMMSCs 的 ROS 水平观察　(×40)

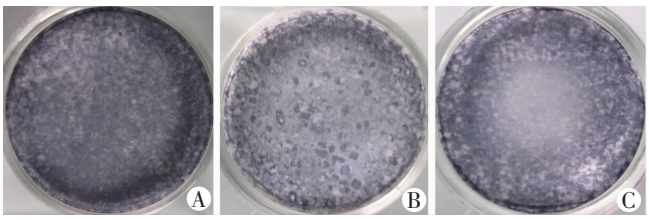


A:BMMSCs 组;B:BMMSCs + H_2O_2 组;C:BMMSCs + H_2O_2 + 杨梅素组

图6　各组大鼠外源性 BMMSCs 的 ROS 水平观察　(×40)

2.3　杨梅素可以降低内源性 ROS 水平,并恢复内源性 BMMSCs 的成骨活性

与假手术组相比,OVX 组内源性 BMMSCs 的 ROS 水平升高,SOD 表达降低。而与 OVX 组相比,OVX + Myricetin 组的内源性 ROS 水平降低,SOD 表达升高。OVX 组内源性 BMMSCs 的 ALP 活性、成骨基因 ALP 和 Osterix 的表达量低于假手术组,而 OVX + Myricetin 组则高于 OVX 组。见图4、图5、表2。



A:假手术组;B:去卵巢组;C:去卵巢+杨梅素组

图5　各组大鼠内源性 BMMSCs 的 ALP 活性观察

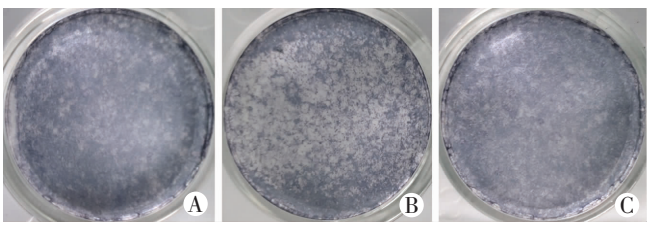
表2　各组大鼠内源性 BMMSCs 基因的表达($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD	ALP	Osterix
假手术组	9.25 ± 0.63	11.12 ± 1.14	10.73 ± 1.20
OVX 组	3.03 ± 0.80[a]	2.90 ± 0.80[a]	4.27 ± 0.92[a]
OVX + Myricetin 组	6.07 ± 0.47[ab]	5.92 ± 0.63[ab]	8.05 ± 0.48[ab]

a: $P<0.05$,与假手术组比较; b: $P<0.05$,与 OVX 组比较

2.4　杨梅素通过降低活性氧水平恢复 BMMSCs 的成骨活性

我们在体外利用 H_2O_2 处理外源性 BMMSCs 模拟 OVX 大鼠内源性 BMMSCs 的状态。外源性 BMMSCs 用 H_2O_2 处理后,ROS 水平高于未处理的 BMMSCs,SOD 表达降低;而加入杨梅素后 ROS 水平降低,SOD 表达升高(图6、图7、表3)。外源性 BMMSCs 用 H_2O_2 处理后,ALP 活性、成骨基因 ALP 和 osterix 表达低于未处理的 BMMSCs;加入杨梅素后 ALP 活性、成骨基因 ALP 和 osterix 表达升高。



A:BMMSCs 组;B:BMMSCs + H_2O_2 组;C:BMMSCs + H_2O_2 + 杨梅素组

图7　各组大鼠外源性 BMMSCs 的 ALP 活性观察

表3　各组大鼠外源性 BMMSCs 基因的表达($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD	ALP	Osterix
BMMSCs	6.73 ± 0.53	9.74 ± 0.54	12.18 ± 0.79
BMMSCs + H_2O_2	2.29 ± 0.33[a]	3.42 ± 0.93[a]	4.79 ± 0.81[a]
BMMSCs + H_2O_2 + Myr	6.40 ± 0.36[b]	8.43 ± 1.01[b]	7.68 ± 0.69[ab]

a: $P<0.05$,与假手术组比较;b: $P<0.05$,与 OVX 组比较

3 讨论

目前临床主流药物虽然能够在一定程度上治疗骨质疏松,但是仍然存在一些副作用或者应用缺陷[12-14],因此急需寻找到一种疗效与安全俱佳的药物。杨梅素不仅具有黄酮类化学结构,毒性也较其他黄酮类化合物低,并且有较好的抗氧化作用,具有成为骨质疏松治疗药物的潜质。

本实验成功建立了骨质疏松模型。通过 microCT 扫描及参数分析,明确腹腔注射杨梅素后,可以有效减少 OVX 大鼠的骨量丢失,改善骨小梁微结构;HE 染色结果与 microCT 检测结果一致,从组织学上确认了杨梅素的疗效。血清 PINP 是较为公认的成骨活性指标,杨梅素注射后,血清 PINP 升高,说明杨梅素促进了 OVX 大鼠机体的成骨活性。茜素红荧光条带间距离反映两次注射间隔期间内的新骨形成情况,杨梅素注射后,OVX 大鼠的荧光条带间距明显加宽,也同样说明杨梅素促进 OVX 大鼠的内源性成骨活性。杨梅素的抗氧化作用[5-7]和促进成骨作用已经明确,但是两者之间的上下游关系尚不明确。本研究发现,杨梅素降低 ROS 的同时,内源性 BMMSCs 的成骨活性增强。为了进一步确认这一现象,我们在体外利用 H_2O_2 处理外源性 BMMSCs 模拟 OVX 大鼠内源性 BMMSCs 的状态,也观察到了类似的现象。所以我们有理由推测杨梅素很可能是通过降低内源性 BMMSCs 的氧化应激水平,从而促进成骨,最后达到缓解骨质疏松的目的。但是,从结果中也可以看出虽然杨梅素可以有效恢复 OVX 大鼠的骨量,但是仍无法恢复到正常状态,提示需要对治疗策略进行优化,比如进一步探索给药剂量、频率及时间等,或者联合其他小分子化合物协同治疗,力求达到更好的疗效。

本研究初步表明,杨梅素减少骨量丢失,机制之一是通过降低内源性 BMMSCs 的 ROS 水平,促进内源性成骨活性,从而治疗骨质疏松。那么明确影响的靶细胞以及分子机制将是我们进一步研究的重点。机体的骨稳态是在成骨和破骨的动态平衡中维持的,成骨和破骨任何一方的改变都将影响到骨骼。已有研究表明,杨梅素在体外可以有效促进成骨细胞活性[8-9],抑制破骨细胞活性[10-11]。

参考文献:

[1] Dalle-Carbonare L, Valenti M T, Zanatta M, *et al*. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(11): 3356-3365. DOI:10.1002/art.24884

[2] Pino A M, Rosen C J, Rodríguez J P. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis[J]. Biol Res, 2012, 45(3): 279-287. DOI:10.4067/S0716-97602012000300009

[3] 吴彬, 张勇, 陈明亮, 等. 雌马酚对去卵巢后大鼠骨质疏松症的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(3): 256-260. DOI:10.16016/j.1000-5404.201409076.

[4] Lee K H, Choi E M. Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-D-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 591(1/3): 1-6.

[5] Yao Y, Lin G, Xie Y, *et al*. Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid[J]. Pharmazie, 2014, 69(1): 19-26.

[6] Mendes V, Vilaca R, de Freitas V, *et al*. Effect of myricetin, pyrogallol, and phloroglucinol on yeast resistance to oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 782504. DOI:10.1155/2015/782504

[7] Sadasivam K, Kumaresan R. Antioxidant behavior of mearnsetin and myricetin flavonoid compounds--a DFT study[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011, 79(1): 282-293.

[8] Ying X, Chen X, Feng Y, *et al*. Myricetin enhances osteogenic differentiation through the activation of canonical Wnt/beta-catenin signaling in human bone marrow stromal cells[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 738: 22-30. DOI:10.1016/j.ejphar.2014.04.049

[9] Hsu Y L, Chang J K, Tsai C H, *et al*. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(4): 504-514.

[10] Wu C, Wang W, Tian B, *et al*. Myricetin prevents titanium particle-induced osteolysis in vivo and inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 93(1): 59-71. DOI:10.1016/j.bcp.2014.10.019

[11] Ko S Y. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(12): 1623-1632. DOI:10.1016/j.archoralbio.2012.06.012

[12] Honig S, Rajapakse C S, Chang G. Current treatment approaches to osteoporosis - 2013[J]. Bull Hosp Jt Dis (2013), 2013. 71(3): 184-188.

[13] Teitelbaum S L. Stem cells and osteoporosis therapy[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 553-554.

[14] Bonura F. Prevention, screening, and management of osteoporosis: an overview of the current strategies[J]. Postgrad Med, 2009, 121(4): 5-17. DOI:10.3810/pgm.2009.07.2021

(**收稿**:2015-07-23;**修回**:2015-09-07)

(编辑 龙 亮)