doi:10.11659/jjssx.09E021112

·基础研究·

舒芬太尼对去卵巢骨质疏松大鼠骨小梁结构及骨代谢的影响

吴敬峰[1],赵亚丹[1],朱文明[1],及 超[1],李聪杰[2] (1.保定市第二医院骨二科,河北 保定 071000;2.河北大学附属医院骨科,河北 保定 071000)

[摘 要] **目的** 探究舒芬太尼对去卵巢骨质疏松大鼠骨小梁结构及骨代谢的影响。**方法** 采用双侧卵巢切除术(OVX)建立绝经后骨质疏松大鼠模型,将50只雌性SD大鼠随机分为5组:假手术组、OVX组、OVX+低、中、高剂量舒芬太尼组(1、2、4 μg/kg),每组10只。取股骨行uCT扫描测量骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨体积分数(BV/TV),并观察骨小梁数量及软骨数量;采用HE染色观察股骨组织损伤情况;采用TRAP染色检测破骨细胞数量变化情况;采用实时荧光PCR和蛋白印迹检测骨匀浆液中骨标记蛋白[成骨相关转录因子抗体(Osx)、胶原蛋白Ⅰ(Colla1)和远中缺失同源盒基因2(Dlx2)]和骨吸收功能相关蛋白(破骨细胞相关受体OSCAR、TRAP)及mRNA的表达。**结果** 与假手术组比较,OVX组骨小梁结构明显破坏,排列无规则,BV/TV、Tb.Th、骨小梁数量、软骨数量及Osx、Colla1、Dlx2 mRNA和蛋白表达均减少/降低($P<0.05$),Tb.Sp、破骨细胞数量及OSCAR、TRAP mRNA和蛋白表达均增加/升高($P<0.05$);与OVX组比较,OVX+中、高剂量舒芬太尼组骨小梁结构相对完整,排列趋于紧密,BV/TV、Tb.Th、骨小梁数量、软骨数量及Osx、Colla1、Dlx2 mRNA和蛋白表达均增加/升高($P<0.05$),Tb.Sp、破骨细胞数量及OSCAR、TRAP mRNA和蛋白表达均减少/降低($P<0.05$)。**结论** 舒芬太尼可改善骨小梁微结构、促进骨形成、抑制骨吸收,从而减轻骨质疏松大鼠骨小梁损伤并进行骨重塑。

[关键词] 骨质疏松;舒芬太尼;骨重塑;骨形成;骨吸收

[中图分类号] R681 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-24

Effects of sufentanil on bone trabecula structure and bone metabolism in ovariectomized-induced osteoporosis rats

WU Jing-feng[1], ZHAO Ya-dan[1], ZHU Wen-ming[1], JI Chao[1], LI Cong-jie[2] (1. Second Department of Orthopedics, Baoding Second Hospital, Baoding Hebei 071000, China; 2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of sufentanil on bone trabecula structure and bone metabolism in ovariectomized-induced osteoporosis rats. **Methods** The postmenopausal osteoporosis rat models were constructed by bilateral ovariectomy (OVX). A total of 50 female SD rats were randomly divided into 5 groups: the sham operation group, the OVX group, the OVX + low-dose, medium-dose and high-dose sufentanil groups (1, 2, 4 μg/kg), with 10 rats in each group. The uCT scan for femurs was conducted to measure the trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp) and bone volume/total volume (BV/TV). The numbers of bone trabecula and cartilages were observed. The femoral tissue damage was observed by HE staining. The changes in number of osteoclasts were detected by TRAP staining. The expressions of bone marker proteins [osteogenesis-related transcription factor antibody (Osx), collagen Ⅰ (Colla1), distal-less homeobox (Dlx2)] and bone resorption function related proteins (osteoclast-related receptors OSCAR, TRAP) and mRNA expressions in bone homogenate were detected by real-time fluorescent PCR and Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the bone trabecular structure was obviously damaged with irregular arrangement in the OVX group, BV/TV, Tb.Th, numbers of bone trabecula and cartilages, and mRNA and protein expression of Osx, Colla1 and Dlx2 were all decreased in the OVX group ($P<0.05$), while Tb.Sp, number of osteoclasts, and mRNA and protein expression of OSCAR and TRAP were increased in the OVX group ($P<0.05$). Compared with the OVX group, the bone trabecular structure was relatively intact with dense arrangement in the OVX + medium-dose and high-dose sufentanil groups, BV/TV, Tb.Th, numbers of bone trabecula and cartilages, and mRNA and protein expression of Osx, Colla1 and Dlx2 were all increased in the OVX + medium-dose and high-dose sufentanil groups ($P<0.05$), while Tb.Sp, numbers of osteoclasts, and mRNA and protein expression of OSCAR and TRAP were decreased in the OVX + medium-dose and high-dose sufentanil groups ($P<0.05$). **Conclusion** Sufentanil may reduce trabecular bone damage and conduct bone remodeling in osteoporotic rats by improving microstructure of bone trabecula, promoting bone formation and inhibiting bone resorption.

Keywords: osteoporosis; sufentanil; bone remodeling; bone formation; bone resorption

[基金项目] 保定市科技计划项目(16ZF060)

[通信作者] 吴敬峰,E-mail:wjf13331213339@163.com

骨质疏松症是一种慢性代谢性骨病,主要表现为骨的脆性增加,极易发生骨折,骨量减少和骨微结构的破坏是其基础病理特征,多见于绝经妇女[1]。目前常用激素替代疗法防治绝经妇女的骨质疏松症,但存在致癌风险和阴道出血等不良反应,患者接受度较低[2]。在骨损伤或骨科手术后,患者常使用阿片类药物缓解急性疼痛,然而阿片类药物对骨形成和骨愈合存在负面影响,可能增加骨折的发生风险[3]。有研究指出,阿片类药物瑞芬太尼可上调成骨前 C2C12 细胞中 Runx2/osterix 表达,从而促进骨形成[4]。舒芬太尼属于阿片受体激动药物[5],但其在骨形成与骨愈合中是否也具有调控作用尚不清楚。故本研究采用双侧卵巢切除术(ovariectomy,OVX)建立绝经骨质疏松大鼠模型,探讨舒芬太尼对模型大鼠骨小梁结构及骨代谢的影响,以期为骨质疏松症的临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50 只雌性 SPF 级 SD 大鼠,3 月龄(未经产),体质量 240 ~ 280 g,购自河北医科大学实验动物公共服务平台,动物生产许可证号:SCXK(冀)2020-001。饲养环境:温度 22 ~ 24 ℃,相对湿度 40% ~ 60%,每 12 h 昼夜交替照明。

1.2 药物与试剂

枸橼酸舒芬太尼注射液购于宜昌人福药业有限责任公司,规格 2 mL/100 μg;TRAP 染色试剂盒购于德国 Sigma Aldrich;成骨相关转录因子抗体(osteogenesis-related transcription factor antibody,Osx)、胶原蛋白Ⅰ(collagen Ⅰ,Colla1)、远中缺失同源盒基因 2(distal-less homeobox 2,Dlx2)、破骨细胞相关受体(osteoclast-associated receptor,OSCAR)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase,TRAP)蛋白一抗工作液购于美国 Abcam。

1.3 方法

1.3.1 动物造模、分组及给药 50 只大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 5 组:假手术组、OVX 组、OVX + 低、中、高剂量舒芬太尼组(1、2、4 μg/kg)[6],每组 10 只。所有大鼠腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,假手术组仅切除卵巢周围部分脂肪组织,其他组均行双侧 OVX,术后注意预防感染。术后第 8 周,采用双能X 射线检测大鼠股骨骨密度,确定骨质疏松大鼠造模是否成功[7]。造模成功后 OVX + 低、中、高剂量舒芬太尼组分别腹腔注射 1、2、4 μg/kg 舒芬太尼,假手术组和 OVX 组给予等体积生理盐水,每周给药 1 次,连续 8 周。

1.3.2 样本采集 完成给药后禁食 12 h,麻醉大鼠取出股骨,剔除肌肉组织,用预冷的生理盐水冲洗后置于 -80 ℃冰箱冻存备用。

1.3.3 uCT 检测骨组织形态 取大鼠股骨,以浸润生理盐水的纱布包裹,垂直放于样品杯中,随后放入 uCT 扫描仪(瑞士 Scanco Medical)内进行骨小梁微结构分析,观察参数包括骨小梁厚度(trabecular thickness,Tb. Th)、骨小梁分离度(trabecular separation,Tb. Sp)、骨体积分数(bone volume/total volume,BV/TV)、骨小梁数量及软骨数量。

1.3.4 HE 染色观察股骨组织损伤情况 将大鼠股骨组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h,再用 EDTA 脱钙液处理 15 d,制备 4 μm 石蜡切片,行常规 HE 染色,观察大鼠股骨组织病理损伤情况。

1.3.5 TRAP 染色检测破骨细胞数量变化情况 取股骨组织石蜡切片,经常规脱蜡水化后,滴加固定液固定组织 30 s,再添加 TRAP 染色剂,37 ℃避光孵育 1 h,甲基绿复染 30 s 后封片保存,光镜下观察骨小梁表面黏附的破骨细胞数量变化情况。

1.3.6 实时荧光 PCR 检测骨匀浆液中骨标记基因 mRNA 水平 取股骨组织制备骨匀浆液,加入 Trizol 裂解液提取总 RNA,确定 RNA 质量后逆转录合成 cDNA链,再经实时荧光 PCR 扩增,反应条件:预变性 95 ℃ 5 min,变性 95 ℃ 15 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,共 40 个循环。反应结束后,以 GAPDH 为内参,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 Osx、Colla1、Dlx2、OSCAR、TRAP mRNA 水平。

1.3.7 蛋白印迹检测骨匀浆液中骨标记蛋白表达 取股骨组织制备骨匀浆液,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,测定蛋白浓度后经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再采用湿转法进行电转,取出 PVDF 膜浸于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h,接着浸于 1∶1 000 一抗工作液中 4 ℃摇床孵育过夜,次日浸于 1∶5 000 二抗工作液中 37 ℃摇床孵育 45 min,最后添加 ECL 发光试剂显影。以 β-actin 为内参,Osx、Colla1、Dlx2、OSCAR、TRAP 蛋白灰度值与 β-actin 灰度值的比值表示其相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验;计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

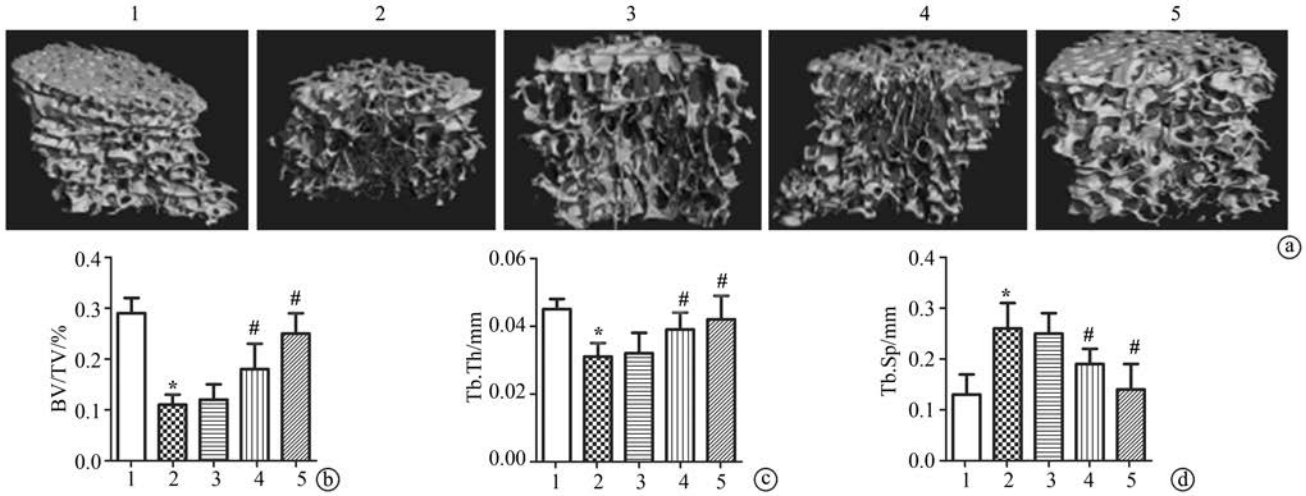
2 结果

2.1 舒芬太尼对骨质疏松大鼠股骨骨小梁微结构的影响

与假手术组比较,OVX 组大鼠股骨 BV/TV、Tb.Th水平均降低,Tb. Sp 水平升高($P<0.05$);与 OVX组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组 BV/TV、Tb. Th 水平均升高,Tb. Sp 水平降低($P<0.05$),见图 1。

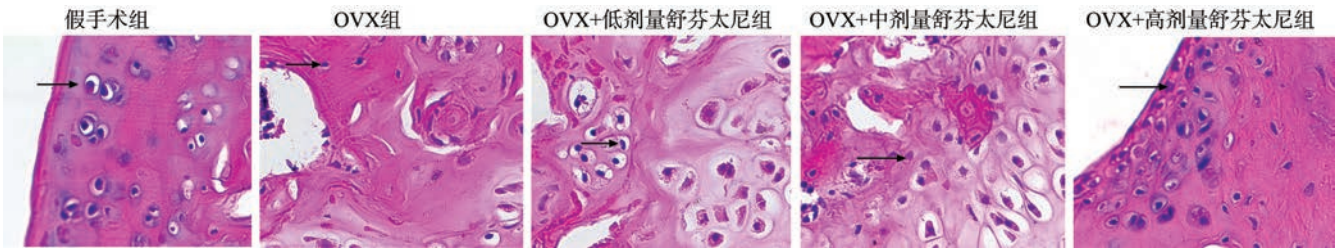
2.2 舒芬太尼对骨质疏松大鼠股骨组织损伤的影响

HE 染色显示,假手术组骨小梁结构稳定,排列完整;OVX 组骨小梁结构明显破坏,排列无规则;与 OVX 组比较,OVX + 低、中、高剂量舒芬太尼组骨小梁结构相对完整,排列趋于紧密,见图 2。



a:股骨骨小梁微结构 uCT 扫描图像;b:BV/TV;c:Tb. Th;d:Tb. Sp 1:假手术组;2:OVX 组;3:OVX + 低剂量舒芬太尼组;4:OVX + 中剂量舒芬太尼组;5:OVX + 高剂量舒芬太尼组;*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 OVX 组比较,$P<0.05$

图 1 舒芬太尼对骨质疏松大鼠股骨骨小梁微结构的影响



箭头:骨小梁

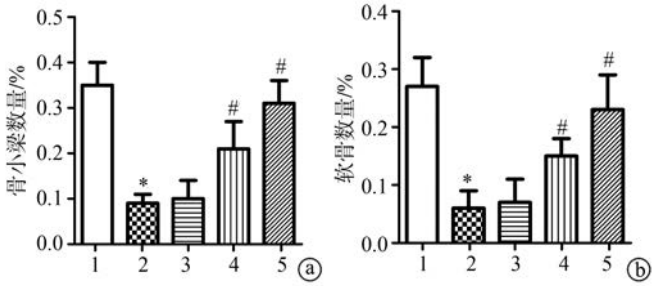
图 2 舒芬太尼对骨质疏松大鼠股骨组织损伤的影响(HE 染色,×200)

2.3 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨小梁数量及软骨数量的影响

与假手术组比较,OVX 组大鼠骨小梁数量及软骨数量均减少($P<0.05$);与 OVX 组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组骨小梁数量及软骨数量均增加($P<0.05$),见图 3。

2.4 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨标记基因 mRNA 和蛋白表达的影响

与假手术组比较,OVX 组大鼠骨匀浆液中 Osx、Colla1、Dlx2 mRNA 及蛋白表达水平均降低($P<0.05$);与 OVX 组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组 Osx、Colla1、Dlx2 mRNA 及蛋白表达水平均升高($P<0.05$),见图 4。



a:骨小梁数量;b:软骨数量 1:假手术组;2:OVX 组;3:OVX + 低剂量舒芬太尼组;4:OVX + 中剂量舒芬太尼组;5:OVX + 高剂量舒芬太尼组;*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 OVX 组比较,$P<0.05$

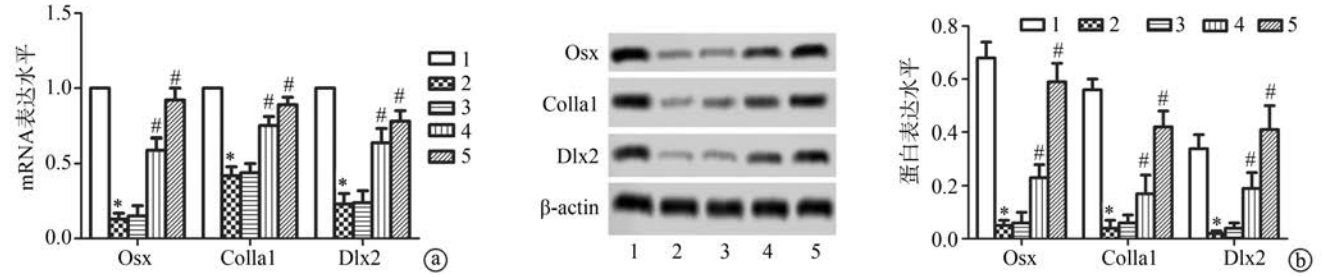
图 3 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨小梁数量及软骨数量的影响

2.5 舒芬太尼对骨质疏松大鼠破骨细胞分化的影响

TRAP 染色显示,与假手术组比较,OVX 组大鼠 TRAP 染色阳性的破骨细胞数量明显增加;与 OVX 组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组 TRAP 染色阳性的破骨细胞数量明显减少,见图 5。

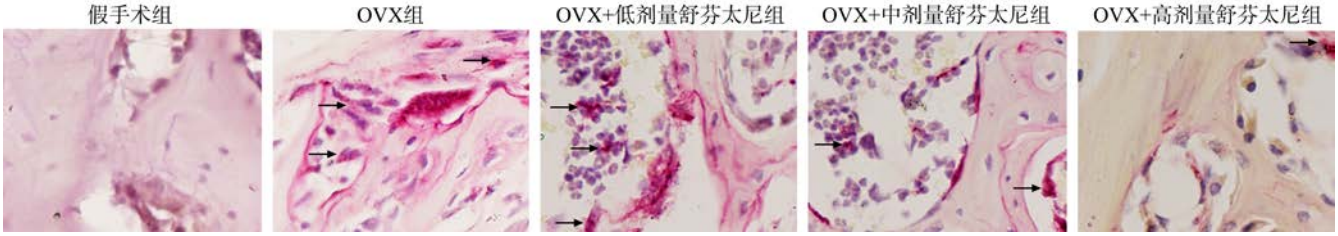
2.6 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨吸收功能相关 mRNA和蛋白表达的影响

与假手术组比较,OVX 组大鼠骨匀浆液中OSCAR、TRAP mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 OVX 组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组 OSCAR、TRAP mRNA 及蛋白表达水平降低($P<0.05$),见图 6。



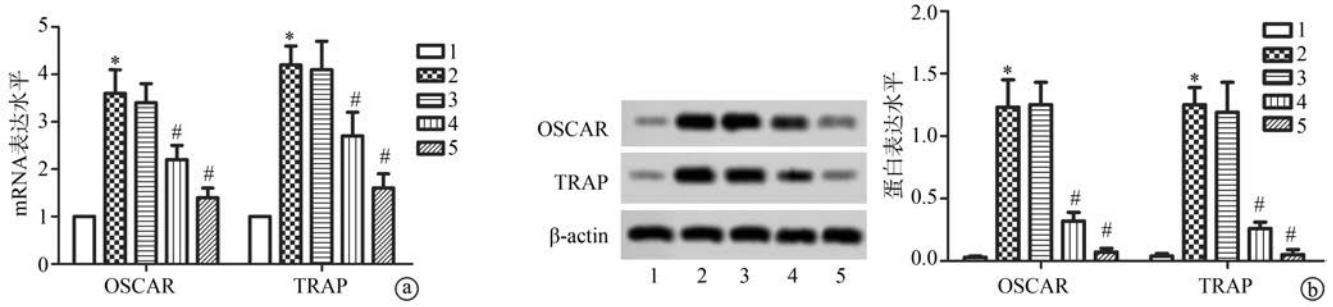
a:mRNA 水平;b:蛋白表达水平 1:假手术组;2:OVX 组;3:OVX + 低剂量舒芬太尼组;4:OVX + 中剂量舒芬太尼组;5:OVX + 高剂量舒芬太尼组;*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 OVX 组比较,$P<0.05$

图 4 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨标记 mRNA 和蛋白表达的影响



箭头:TRAP 染色阳性细胞

图 5 舒芬太尼对骨质疏松大鼠破骨细胞分化的影响(TRAP 染色,×200)



a:mRNA 水平;b:蛋白表达水平 1:假手术组;2:OVX 组;3:OVX + 低剂量舒芬太尼组;4:OVX + 中剂量舒芬太尼组;5:OVX + 高剂量舒芬太尼组;*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 OVX 组比较,$P<0.05$

图 6 舒芬太尼对骨质疏松大鼠骨吸收功能相关 mRNA 和蛋白表达的影响

3 讨论

骨是一种特殊形式的结缔组织,是成骨细胞合成骨和破骨细胞吸收骨形成动态平衡的骨代谢过程,当这种平衡偏向破骨细胞激活时可导致多种临床疾病的发生,如骨质减少和骨质疏松症[8]。其中,绝经妇女体内雌激素缺乏导致的骨质疏松症是原发性骨质疏松症最常见的类型,雌激素降低引起的骨量减少及骨组织结构变化会增加骨脆性,导致患者容易骨折,而骨折会引起疼痛、骨骼变形、相关合并症,甚至死亡,严重影响绝经女性群体的健康及生活质量[9]。本研究采用双侧 OVX 建立骨质疏松大鼠模型,给予不同剂量舒芬太尼处理 8 周后,观察其对骨质疏松大鼠骨小梁微结构、骨形成及骨吸收相关标记物的影响。

研究表明,骨质疏松骨组织的改变包括骨小梁微结构的退变,这种内在结构的变化不仅影响骨强度,还会改变骨生物力学性能[10]。本研究采用 uCT 对各组大鼠股骨进行扫描,结果显示,切除卵巢会导致骨小梁

结构发生损伤,与假手术组比较,OVX 组 BV/TV、Tb.Th、骨小梁数量、软骨数量均下降/减少,而 Tb.Sp 升高;给予舒芬太尼处理后,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组股骨骨小梁结构得到明显改善;同时,HE 染色结果也显示,舒芬太尼处理可明显修复卵巢切除后引起的骨小梁损伤。

据报道,促进骨形成或抑制骨吸收在骨质疏松的治疗中具有重要意义,可指导药物作用靶点的新药研究[11]。成骨细胞是骨形成细胞,可以合成骨基质,调节矿化,最终分化为骨细胞或骨内衬细胞[12]。成骨细胞的生长和分化包括 3 个阶段,涉及多种特有基因的表达:①细胞持续增殖,主要表达 Colla1、纤维连接蛋白和骨钙蛋白;②细胞外基质成熟,主要表达碱性磷酸酶、Colla1 等多种细胞外基质蛋白;③骨钙素、骨涎蛋白及骨钙蛋白的表达,使基质矿化并富集[13-14]。同时,Osx、Dlx2 等成骨相关转录因子转录激活后,可增加骨小梁数量、矿化基质及骨密度,并诱导 Colla1、骨钙蛋白等成骨细胞标志物的表达[15]。本研究结果显示,Osx、Colla1、Dlx2 等成骨标志物在 OVX 组中表达降低,而在 OVX + 中、高剂量舒芬太尼组中表达升高,提示舒芬太尼可能通过促进 Osx、Colla1、Dlx2 表达,诱导成骨细胞的生长和分化,从而促进骨形成。

破骨细胞是专门用于骨吸收的大型多核细胞,主要由单核巨噬细胞分化而来,核遗传程序的激活引起破骨细胞分化成熟因子 OSCAR、TRAP 表达上调,使 TRAP 阳性的单核细胞,即破骨细胞前体细胞,逐渐融合为成熟的破骨细胞[16]。本研究结果显示,与 OVX 组比较,OVX + 中、高剂量舒芬太尼组破骨细胞数量和骨匀浆液中 OSCAR、TRAP 表达均显著减少/降低,表明舒芬太尼可能通过下调OSCAR、TRAP 水平抑制破骨细胞分化成熟,从而在骨质疏松中发挥抑制骨吸收的作用。

综上所述,舒芬太尼可通过减轻骨质疏松大鼠骨小梁的损伤进行骨重塑,可能途径有:改善骨小梁微结构;上调 Osx、Colla1、Dlx2 表达,促进骨形成;下调 OSCAR、TRAP 水平,抑制骨吸收。本研究通过双侧 OVX 建立绝经骨质疏松大鼠模型,揭示了舒芬太尼对大鼠骨小梁结构及骨代谢的影响,但舒芬太尼在骨质疏松中的骨代谢调控机制仍有待深入探究。

[参考文献]

[1] Aspray TJ,Hill TR. Osteoporosis and the aging skeleton[J]. Subcell Biochem,2019,91:453 - 476. doi:10.1007/978 - 981 - 13 - 3681 - 2_16.

[2] Allyson S,Clements JN. Abaloparatide:a new pharmacological option for osteoporosis[J]. Am J Health Syst Pharm,2019,76(3):130 - 135. doi:10.1093/ajhp/zxy022.

[3] Coluzzi F,Scerpa MS,Centanni M. The effect of opiates on bone formation and bone healing[J]. Curr Osteoporos Rep,2020,18(3):325 - 335. doi:10.1007/s11914 - 020 - 00585 - 4.

[4] Yoon JY,Kim TS,Ahn JH,et al. Remifentanil promotes osteoblastogenesis by upregulating Runx2/osterix expression in preosteoblastic C2C12 cells[J]. J Dent Anesth Pain Med,2019,19(2):91 - 99. doi:10.17245/jdapm.2019.19.2.91.

[5] Alderman CP, Antimisiaris DE. Sufentanil sublingual tablet: a new option for acute pain management[J]. Ann Pharmacother, 2019, 53(12):1220 - 1226. doi:10.1177/1060028019863144.

[6] Zhang K, Li M, Peng XC, et al. The protective effects of sufentanil pretreatment on rat brains under the state of cardiopulmonary bypass[J]. Iran J Pharm Res,2015,14(2):559 - 566.

[7] Zhou LG,Shi P,Sun YJ,et al. MiR-214-3p delays fracture healing in rats with osteoporotic fracture through inhibiting BMP/Smad signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(2):449 - 455. doi:10.26355/eurrev_201901_16854.

[8] Han L,Wang B,Wang R,et al. The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor[J]. Stem Cell Res Ther,2019,10(1):377. doi:10.1186/s13287 - 019 - 1498 - 0.

[9] Kanis JA,Cooper C,Rizzoli R,et al. Executive summary of the European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int,2019,104(3):235 - 238. doi:10.1007/s00223 - 018 - 00512 - x.

[10] Toni R,Conza GD,Barbaro F,et al. Microtopography of immune cells in osteoporosis and bone lesions by endocrine disruptors[J]. Front Immunol,2020,11:1737. doi:10.3389/fimmu.2020.01737.

[11] Si J,Wang C,Zhang D,et al. Osteopontin in bone metabolism and bone diseases[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e919159. doi: 10.12659/MSM.919159.

[12] Crescitelli MC,Rauschemberger MB,Cepeda S,et al. Role of estrone on the regulation of osteoblastogenesis[J]. Mol Cell Endocrinol,2019,498:110582. doi:10.1016/j.mce.2019.110582.

[13] Choi HK,Kim GJ,Yoo HS,et al. Vitamin C activates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis via Wnt/β-Catenin/ATF4 signaling pathways[J]. Nutrients, 2019, 11(3): 506. doi: 10.3390/nu11030506.

[14] Fiscaletti M,Biggin A,Bennetts B,et al. Novel variant in Sp7/Osx associated with recessive osteogenesis imperfecta with bone fragility and hearing impairment[J]. Bone,2018,110:66 - 75. doi:10.1016/j.bone.2018.01.031.

[15] Mei B,Wang Y,Ye W,et al. LncRNA ZBTB40-IT1 modulated by osteoporosis GWAS risk SNPs suppresses osteogenesis[J]. Hum Genet,2019,138(2):151 - 166. doi:10.1007/s00439 - 019 - 01969 - y.

[16] Li K,Chen S,Cai P,et al. MiRNA-483-5p is involved in the pathogenesis of osteoporosis by promoting osteoclast differentiation[J]. Mol Cell Probes,2020,49:101479. doi:10.1016/j.mcp.2019.101479.

(编辑:魏 源)