

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230806

三七总皂苷调控CTRP6/RhoA/Rock 对骨质疏松大鼠的保护作用机制研究

蔡猛¹, 徐琳琳², 张永宁³✉

(1. 驻马店市中心医院, 河南 驻马店 463000;

2. 河南医学高等专科学校, 河南 郑州 450053; 3. 黄淮学院医学院, 河南 驻马店 463003)

【摘要】目的:探究三七总皂苷对骨质疏松大鼠的保护作用及机制。方法:雌性SD大鼠50只,随机分为假手术组、模型组、三七总皂苷组(40 mg/kg)、三七总皂苷+si-NC组(40 mg/kg三七总皂苷组+4 nmol/kg si-NC)、三七总皂苷+si-CTRP6组(40 mg/kg三七总皂苷组+4 nmol/kg si-CTRP6),每组各10只。除假手术组外,其余各组均采用双侧卵巢切除法构建骨质疏松症大鼠模型。选模成功后,各组采用相应药物干预10周。检测血清雌二醇(E₂)、骨代谢相关指标[Ca、P、1,25(OH)₂D₃]、炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)水平以及氧化应激(SOD、GSH-Px、MDA)水平;苏木素-伊红染色观察股骨组织病理学变化;显微CT分析股骨骨微结构变化;Western blot检测大鼠股骨组织CTRP6/RhoA/Rock通路蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠股骨组织出明显病理损伤,血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃、SOD、GSH-Px水平均降低(P<0.01),TNF-α、IL-1β、IL-6及MDA水平均升高(P<0.01),股骨组织CTRP6表达降低(P<0.01),GTP-RhoA/RhoA、Rock1/Rock2比值均增加(P<0.01)。与模型组比较,三七总皂苷组大鼠股骨组织损伤减轻,血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃、SOD、GSH-Px水平均升高(P<0.01),TNF-α、IL-1β、IL-6及MDA水平均降低(P<0.01),股骨组织CTRP6表达增加(P<0.01),GTP-RhoA/RhoA、Rock1/Rock2比值均降低(P<0.01)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷+si-CTRP6组大鼠上述指标均被显著抑制(均P<0.01)。结论:三七总皂苷能够改善骨质疏松模型大鼠股骨组织的损伤情况,其机制与调控CTRP6/RhoA/Rock通路,抑制炎症与氧化应激相关。

【关键词】骨质疏松;三七总皂苷;CTRP6/RhoA/Rock通路

【引用格式】

蔡猛,徐琳琳,张永宁.三七总皂苷调控CTRP6/RhoA/Rock对骨质疏松大鼠的保护作用机制研究[J].中医药信息,2023,40(8):37-43.

CAI M, XU L L, ZHANG Y N. Protective effect mechanism of *Panax notoginseng* saponins on regulating CTRP6/RhoA/Rock in rats with osteoporosis[J]. Information on TCM, 2023, 40(8):37-43.

骨质疏松是一种全身骨代谢障碍性疾病,多发于老年及绝经后妇女,主要以骨结构破坏、骨量减少以及脆性增加等病理改变为特征,极易引起骨折,严重影响患者的生命健康^[1]。既往研究发现,炎症反应及氧化应激能够诱导成骨细胞凋亡,抑制成骨细胞分化,与

骨质疏松患者骨密度和骨量的减少密切相关^[2-3]。三七是中国传统的中药材,具有活血、化痰、通络等功效,通常用于心脑血管疾病治疗,三七总皂苷是其成分^[4]。近年来,三七总皂苷在骨伤科领域研究日益增加,其能通过增加成骨细胞活性,提高骨密度,从而

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(20B320120)

第一作者简介:蔡猛(1989-),男,主治医师,主要研究方向:骨科相关临床与基础性研究。

✉通信作者简介:张永宁(1990-),女,讲师,主要研究方向:骨关节软骨细胞再生康复研究。

促进骨折患者恢复^[5-6]。三七总皂苷还能通过促进骨形成、抑制骨吸收以及血管生成等途径促进骨折愈合^[7]。但是目前有关三七总皂苷用于骨质疏松治疗的研究鲜有报道,特别是对骨质疏松炎症反应以及氧化应激的影响尚不明晰。

Ras同源基因家族成员A/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(protein kinase)通路骨质疏松密切相关^[8],抑制RhoA/Rock信号通路活化能够显著降低骨关节炎的炎症反应^[9]。同时,抑制RhoA/Rock通路可以通过降低氧化应激减轻心肌细胞的损伤^[10]。以上研究提示,通过调控RhoA/Rock可影响炎症反应和氧化应激途径,从而发生骨质疏松。C1q肿瘤坏死因子相关蛋白6(CTRP6)是与组织炎症和氧化应激密切相关的脂肪因子蛋白超家族成员之一^[11]。研究发现,CTRP6能够通过负向调控RhoA/Rock通路,抑制炎症反应和氧化应激,从而减轻脑缺血再灌注损伤^[12]。但是目前有关CTRP6/RhoA/Rock通路在骨质疏松中的作用尚不清楚,因此本研究拟通过构建骨质疏松症大鼠模型,探究三七总皂苷对CTRP6/RhoA/Rock通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

SPF级雌性SD大鼠50只,体质量180~200g(郑州大学医学院实验动物学部),生产许可证号:SCXK(豫)2018-0007,使用许可证号:SYXK(豫)2019-0013。动物实验符合3R原则,且本实验通过驻马店市中心医院动物医学伦理委员会审查。饲养环境为温度(24±2)℃,相对湿度55%~65%,昼夜交替光照,自由饮食、饮水,适应性喂养1周。

1.1.2 主要试剂

三七总皂苷(成都埃法生物科技有限公司,质量分数90%,批号:AF20033002);大鼠雌二醇(E₂)、钙(Ca)、磷(P)、1,25-二羟基维生素D₃[(1,25(OH)₂D₃](南京建成生物工程研究所,批号分别为E20201001A、20201016、20201020、E20201001A);肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)检测试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号分别为20180052IL6M、20165200IL1M、20160645TNF1M);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(北京依塔生物技术公司,批号分别为SY3017、SY6488、SY6454);二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、显影液、β-actin抗体(上海碧云天生物技术公司,批号分别为P0012S、

ST023、C0105S、C1091、AF5001);CTRP6抗体(Abcam公司,批号:ab36898);RhoA抗体、Rock1抗体、Rock2抗体(美国Cell Signaling Technology,批号分别为2117、28999、47012)。

1.1.3 仪器

多功能酶标仪(长春乐璞科技有限公司,型号:LP-5117);荧光倒置显微镜(日本/奥林巴斯Olympus,型号:CKX53);高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司,型号:H3-18KR);凝胶成像系统(美国Bio-Rad伯乐公司,型号:Gel Doc XR⁺);小动物显微CT成像系统(广州中科凯盛医疗公司,型号:ZKKS-MCT-SHARP);-80℃冷冻冰箱[日本SANYO公司,型号:MDF-C8V(N)]。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松动物模型建立及分组

各组大鼠适应性喂养1周后,摘除双侧卵巢构建骨质疏松大鼠模型^[13],1周后利用显微CT对大鼠股骨进行扫描。检测结果显示股骨结构断裂、骨量明显减少等现象视为模型构建成功。造模成功40只大鼠,随机分为模型组、三七总皂苷组、三七总皂苷+CTRP6基因干扰阴性对照组(三七总皂苷+si-NC组)、三七总皂苷+CTRP6基因干扰组(三七总皂苷+si-CTRP6组),每组各10只。另外,选取10只雌性大鼠作为假手术组,只暴露卵巢,不摘除。将三七总皂苷与25%的葡萄糖注射液混合制备成储存液,三七总皂苷组按照40mg/kg剂量灌胃,1次/d^[14];三七总皂苷+si-NC组大鼠给予三七总皂苷灌胃的同时,经尾静脉注射si-NC 4nmol/kg,1次/周;三七总皂苷+si-CTRP6组大鼠给予三七总皂苷灌胃的同时,经尾静脉注射si-CTRP6 4nmol/kg,1次/周。假手术组和模型组大鼠给予等量的生理盐水灌胃处理。以上各组大鼠均连续给药10周。

1.2.2 血液及股骨远端标本采集

各组大鼠末次给药结束后12h,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血8mL,并于4℃,3000r/min离心15min,吸取上清液放置于-80℃冰箱内保存。大鼠断头处死,摘取左右两后置股骨,分离并剔除骨组织周围结缔组织以及肌肉组织。将左侧股骨组织标本放置-80℃冰箱低温冷冻保存,右侧股骨组织放置于4%的多聚甲醛溶液中固定。

1.2.3 血清E₂、骨代谢血清生化指标、炎症因子及氧化应激指标检测

取各组大鼠血清标本,于4℃条件下解冻,严格按照试剂盒检测说明书操作,酶标仪定量测定血清E₂、

Ca、P、1, 25(OH)₂D₃、TNF-α、IL-1β、IL-6、SOD、GSH-Px和MDA含量。

1.2.4 股骨组织形态结构检测

取右侧股骨远端组织标本,经乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙、脱水、透明石蜡包埋,制备组织切片,切片厚度3~5 μm,进行HE染色、封片后于200倍显微镜下观察组织病理学变化情况。显微CT对各组大鼠左侧股骨远端组织标本进行扫描,利用成像系统计算骨连接密度(Conn. D)、骨密度(BMD)、骨小梁数量(Tb. N)以及骨小梁分离度(Tb. Sp)。

1.2.5 股骨组织CTRP6/RhoA/Rock通路蛋白表达检测

取左侧股骨组织标本,股骨组织剪碎,液氮碾磨成细粉状,按照1:5质量与体积比加入裂解液,于4℃条件下裂解40 min;BCA法测定各组股骨远端组织蛋白质浓度;蛋白上样(按照每孔上样量40 μg计算得出上样体积);凝胶电泳;湿转法转膜;5% BSA室温封闭2 h;分别加入CTRP6抗体(1:1 000)、RhoA抗体

(1:1 000)、Rock1抗体(1:1 000)、Rock2抗体(1:1 000)及β-actin抗体(1:2 000),4℃孵育过夜;加对应的山羊抗兔二抗或者山羊抗鼠二抗(1:5 000),室温孵育1~2 h;TBST洗涤3次,每次5 min,滴加显影液,显影并拍照。

1.2.6 统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用SPSS20.0进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清E₂和骨代谢生化指标的比较

与假手术组比较,模型组大鼠血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,三七总皂苷组大鼠血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃水平均显著升高($P < 0.01$)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷+si-CTRP6组大鼠血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃水平均显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃水平比较($\bar{x} \pm s$)

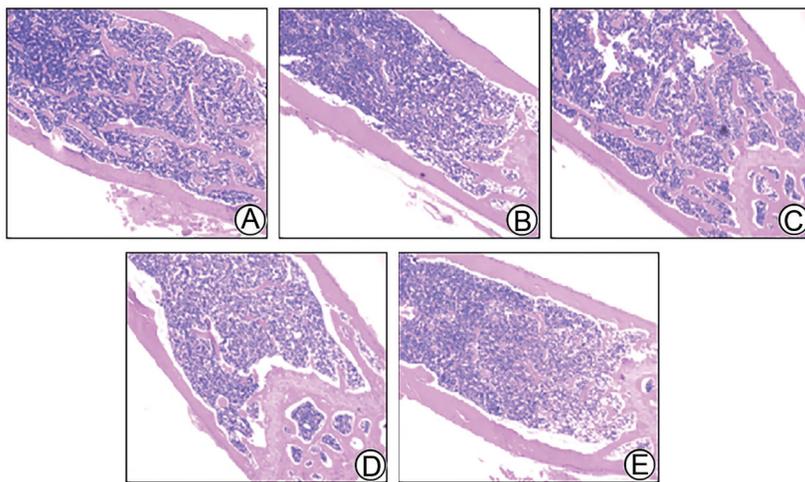
组别	n	E ₂ /(pmol/L)	Ca/(mmol/L)	P/(mmol/L)	1,25(OH) ₂ D ₃ /(ng/mL)
假手术组	10	8.40 ± 1.64	3.36 ± 0.10	1.92 ± 0.12	46.76 ± 3.41
模型组	10	4.01 ± 0.71**	2.91 ± 0.08**	1.31 ± 0.14**	32.53 ± 2.04**
三七总皂苷组	10	6.42 ± 1.01 [#]	3.30 ± 0.14 [#]	1.87 ± 0.20 [#]	42.80 ± 1.16 [#]
三七总皂苷+si-NC	10	6.30 ± 0.80	3.26 ± 0.16	1.88 ± 0.22	41.36 ± 1.40
三七总皂苷+si-CTRP6	10	4.89 ± 0.40 ^{△△}	3.00 ± 0.09 ^{△△}	1.41 ± 0.13 ^{△△}	34.71 ± 0.86 ^{△△}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与三七总皂苷组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠股骨远端组织病理学变化情况比较

假手术组大鼠骨小梁丰富、饱满,成骨细胞形态结构完整清晰。模型组大鼠骨小梁稀疏、变细,骨细胞明显减少且结构模糊。与模型组比较,三七总皂苷组和

三七总皂苷+si-NC组大鼠骨小梁变粗且排列较为紧密,结构清晰,成骨细胞数量增多。三七总皂苷+si-CTRP6组大鼠骨组织病理形态学变化与模型组大鼠相近。见图1。



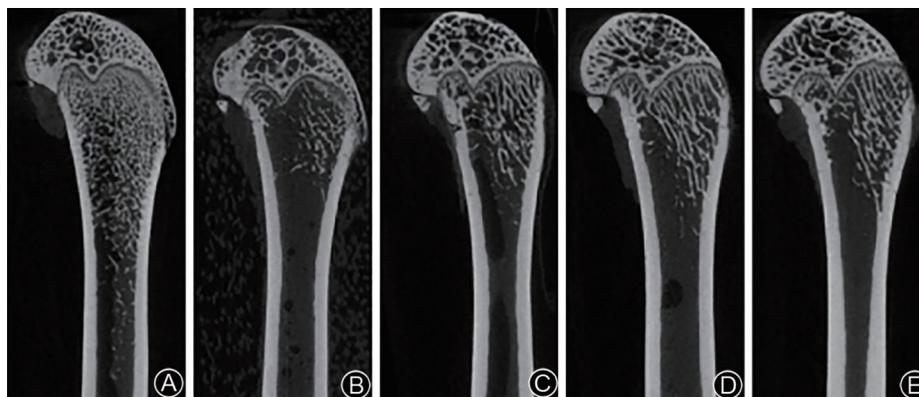
注:A为假手术组;B为模型组;C为三七总皂苷组;D为三七总皂苷+si-NC组;E为三七总皂苷+si-CTRP6组。

图1 各组大鼠股骨远端组织病理学变化情况(HE,×200)

2.3 各组大鼠骨组织超微结果变化情况比较

显微CT显示,与假手术组比较,模型组大鼠Conn. D、Tb. N、BMD均显著降低($P < 0.01$),Tb. Sp显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,三七总皂苷组大鼠Conn. D、

Tb. N、BMD均显著升高($P < 0.01$),Tb. Sp显著降低($P < 0.01$)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷 + si-CTRP6组大鼠Conn. D、Tb. N、BMD均显著降低($P < 0.01$),Tb. Sp显著升高($P < 0.01$)。见图2和表2。



注:A为假手术组;B为模型组;C为三七总皂苷组;D为三七总皂苷 + si-NC组;E为三七总皂苷 + si-CTRP6组。

图2 各组大鼠股骨远端显微CT成像变化

表2 各组大鼠骨组织相关参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Conn. D/(1/mm ³)	Tb. N/(1/mm ³)	Tb. Sp/(mm)	BMD/(mg/cm ³)
假手术组	10	106.20 ± 9.88	3.30 ± 0.32	0.25 ± 0.04	218.94 ± 11.03
模型组	10	48.31 ± 5.66**	1.40 ± 0.11**	0.60 ± 0.10**	118.45 ± 8.32**
三七总皂苷组	10	80.17 ± 6.89##	2.80 ± 0.20##	0.39 ± 0.08##	180.69 ± 8.77##
三七总皂苷 + si-NC	10	79.24 ± 7.06	2.79 ± 0.16	0.40 ± 0.06	178.54 ± 7.98
三七总皂苷 + si-CTRP6	10	51.20 ± 6.50 ^{△△}	1.56 ± 0.19 ^{△△}	0.54 ± 0.07 ^{△△}	127.16 ± 5.51 ^{△△}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与三七总皂苷组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠血清炎症因子水平的比较

与假手术组比较,模型组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,三七总皂苷组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均显著降低($P < 0.01$)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷 + si-CTRP6组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均显著增加($P < 0.01$)。见表3。

2.5 各组大鼠血清氧化水平的比较

与假手术组比较,模型组大鼠血清SOD、GSH-Px水平均显著降低($P < 0.01$),MDA水平升高($P < 0.01$)。与模型组比较,三七总皂苷组大鼠血清SOD、GSH-Px水平均显著升高($P < 0.01$),MDA水平降低($P < 0.01$)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷 + si-CTRP6组大鼠血清SOD、GSH-Px水平均显著降低($P < 0.01$),MDA水平升高($P < 0.01$)。见表4。

表3 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	10	30.25 ± 4.01	80.78 ± 8.41	90.25 ± 9.21
模型组	10	130.26 ± 12.88**	294.00 ± 28.17**	178.33 ± 15.33**
三七总皂苷组	10	70.53 ± 8.90##	125.64 ± 13.32##	107.55 ± 11.79##
三七总皂苷 + si-NC	10	74.66 ± 7.29	128.76 ± 14.06	110.62 ± 9.86
三七总皂苷 + si-CTRP6	10	110.87 ± 10.24 ^{△△}	211.84 ± 18.77 ^{△△}	160.11 ± 13.86 ^{△△}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与三七总皂苷组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.6 各组大鼠骨组织CTRP6/RhoA/Rock通路相关蛋白比较

与假手术组比较,模型组大鼠CTRP6蛋白表达明显降低($P < 0.01$)、GTP-RhoA/RhoA和Rock1/Rock2比值显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,三七总皂苷组大

鼠CTRP6蛋白表达明显增加($P < 0.01$),GTP-RhoA/RhoA和Rock1/Rock2比值显著降低($P < 0.01$)。与三七总皂苷组比较,三七总皂苷 + si-CTRP6组大鼠CTRP6蛋白表达显著降低($P < 0.01$),GTP-RhoA/RhoA和Rock1/Rock2比值显著增加($P < 0.01$)。见表5和图3。

表4 各组大鼠血清SOD、GSH-Px及MDA水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

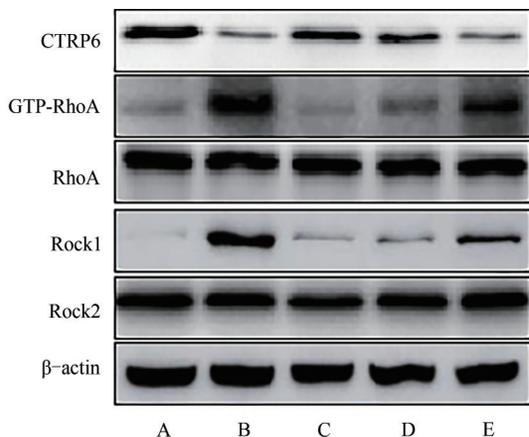
组别	n	SOD	GSH-Px	MDA
假手术组	10	70.73 ± 6.29	108.73 ± 7.66	100.60 ± 8.41
模型组	10	35.26 ± 4.44**	60.23 ± 5.46**	180.67 ± 11.28**
三七总皂苷组	10	61.19 ± 6.71##	82.37 ± 8.07##	125.11 ± 9.97##
三七总皂苷 + si-NC	10	62.20 ± 6.01	83.22 ± 7.55	124.41 ± 8.86
三七总皂苷 + si-CTRP6	10	40.10 ± 3.88 $\Delta\Delta$	65.98 ± 6.03 $\Delta\Delta$	169.94 ± 9.39 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与三七总皂苷组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

表5 各组大鼠CTRP6/RhoA/Rock通路相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CTRP6	GTP-RhoA/RhoA	Rock1/Rock2
假手术组	6	1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.24	1.05 ± 0.14
模型组	6	0.41 ± 0.08**	2.87 ± 0.39**	2.23 ± 0.31**
三七总皂苷组	6	0.83 ± 0.13##	1.19 ± 0.17##	1.12 ± 0.12##
三七总皂苷 + si-NC	6	0.80 ± 0.12	1.20 ± 0.20	1.21 ± 0.20
三七总皂苷 + si-CTRP6	6	0.52 ± 0.11 $\Delta\Delta$	1.89 ± 0.22 $\Delta\Delta$	1.80 ± 0.18 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与三七总皂苷组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。



注:A为假手术组;B为模型组;C为三七总皂苷组;D为三七总皂苷 + si-NC组;E为三七总皂苷 + si-CTRP6组。

图3 各组大鼠骨组织CTRP6/RhoA/Rock通路相关蛋白表达情况

3 讨论

骨质疏松症是全球范围内日益严重的公共健康问题,其防治已引起国内外学者广泛的关注。流行病学调查显示,绝经后骨质疏松症是原发性骨质疏松症常见的类型,近50%绝经后女性会患有不同程度的骨质疏松症,与健康人群比较,骨质疏松症患者有高达20%的可能性发生骨折^[15]。因此如何降低和改善骨质疏松症已成为临床研究的热点。

三七总皂苷是中药三七的主要活性成分,能够改善骨形成、提升骨密度,对骨质疏松性骨折的愈合及恢复具有良好的促进作用^[16]。但是目前有关三七总皂苷对绝经后骨质疏松治疗作用的机制尚不清楚。Ca和P作为骨矿物质中最基本的元素,在成骨细胞矿化过程中发挥重要作用^[17]。1,25(OH)₂D₃是维生素D在机体中最重要的活性形式,可以通过协同甲状腺旁激素,升高血Ca和P浓度^[18]。E₂的缺乏会导致Ca的排泄增

加,加重骨质的流失^[19]。本研究结果显示,三七总皂苷能够升高血清E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃水平,提示三七总皂苷可能通过调节E₂、Ca、P和1,25(OH)₂D₃影响骨代谢,从而改善大鼠骨质疏松。骨小梁是骨质疏松时损伤的关键部位,其结构的完整性在维持骨强度和降低骨折发生率中具有重要作用^[20]。因此通过对骨小梁结构的观察是评价骨质疏松的重要指标。骨密度作为骨质疏松的金标准,其含量的高低与骨质疏松的严重程度成反比^[21]。Tb.N、Tb.Sp、Conn.D等指标是评价骨小梁结构变化的关键指标,研究发现骨质疏松症患者中Conn.D和Tb.N降低,Tb.Sp升高^[22]。本研究结果显示,与模型组比较,三七总皂苷组大鼠Conn.D、Tb.N、BMD均升高,Tb.Sp显著降低,骨小梁变粗且排列较为紧密,结构清晰,表明三七总皂苷能够通过改善骨小梁结构相关参数,增加骨小梁数量、骨连接密度和骨密度,降低骨小梁分离度,从而达到治疗骨质疏松目的。以往研究显示,氧化应激和炎症的失衡是导致骨质疏松疾病进展的重要机制,其中机体氧化应激水平的失衡会导致炎症因子如IL-6、IL-1 β 和TNF- α 等合成与释放增加,诱导破骨细胞活性增强,促进骨吸收,并最终导致骨质疏松疾病加重^[23]。在骨质疏松症大鼠模型中氧化应激指标MDA水平升高,SOD、GSH-Px水平降低,而抑制氧化应激能够明显改善骨质疏松症状^[24]。本研究结果显示,与模型组比较,三七总皂苷能够降低骨质疏松大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及MDA水平,升高SOD、GSH-Px水平,表明三七总皂苷能够通过抑制氧化应激和炎症反应,发挥抗骨质疏松作用。但是目前有关三七总皂苷调控氧化应激和炎症反应的机制尚不清楚。

CTRP6/RhoA/Rock 通路是与组织炎症和氧化应激水平密切相关,CTRP6能够通过抑制 RhoA/Rock 通路活化,抑制炎症反应和氧化应激水平,改善脑缺血再灌注损伤^[12]。RhoA 是 RhoGTP 亚家族蛋白成员之一, Rock 是其下游效应分子,主要包含 Rock1 和 Rock2 两种亚型^[25]。研究证实,RhoA 能够通过激活 Rock 从而影响细胞炎症、氧化应激等参与多种疾病的发生、发展^[26]。在骨关节炎动物模型中 RhoA/Rock 被明显激活,诱导软骨降解,从而影响骨形成,而抑制 RhoA/Rock 通路活化能够降低组织炎症反应,可有效减轻软骨退变,有利于关节软骨的修复^[9]。可见,通过调控 CTRP6/RhoA/Rock 通路可能是影响骨质疏松炎症和氧化应激的重要机制。本研究结果显示,与模型组比较,三七总皂苷组大鼠股骨组织 CTRP6 表达增加,GTP-RhoA/RhoA 和 Rock1/Rock2 比值降低,表明三七总皂苷可改善骨质疏松,其机制与调控 CTRP6/RhoA/Rock 通路相关。CTRP6 是与组织炎症和氧化应激密切相关调节因子,抑制 CTRP6 表达能够显著促进炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 等释放,增加 ROS 和 MDA 水平,诱导氧化应激,并最终加重七氟醚诱导的小鼠中枢神经组织损伤^[27]。本研究发现,与三七总皂苷组比较,大鼠尾静脉注射 si-CTRP6 后血清 E₂、Ca、P 和 1,25(OH)₂D₃ 水平均降低,Conn. D、Tb. N、BMD 降低,Tb. Sp 显著升高,炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平增加,氧化应激指标 MDA 增加,SOD、GSH-Px 降低。Western blot 检测显示,与三七总皂苷组比较,大鼠尾静脉注射 si-CTRP6 后 GTP-RhoA/RhoA 和 Rock1/Rock2 比值增加。

综上所述,本研究通过探讨三七总皂苷对大鼠骨质疏松的影响及作用机制,结果显示,三七总皂苷能够调控 CTRP6/RhoA/Rock 通路,上调 CTRP6 表达,下调 GTP-RhoA/RhoA 和 Rock1/Rock2 比值,抑制炎症与氧化应激反应,改善骨质疏松。本研究结果初步揭示了三七总皂苷治疗骨质疏松的作用机制,为其临床应用提供了参考。

【参考文献】

- [1] 王奇,杨鹏,孙建军,等. 二苯乙烯苷调控 miR-34a/SIRT1 对骨质疏松大鼠的作用及机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(2): 185-191.
- [2] 徐红余,姚麒. 小檗碱调控 Wnt/catenin 信号对骨质疏松大鼠的作用研究[J]. 现代实用医学, 2020, 32(11): 1314-1317, 1298.
- [3] KIMBALL J S, JOHNSON J P, CARLSON D A. Oxidative stress and osteoporosis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2021, 103(15): 1451-1461.
- [4] 李青融,王子好. 三七总皂苷药理作用的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(9): 216-218.
- [5] WEI C C, YUE L F, YOU F T, et al. Panax notoginseng saponins alleviate osteoporosis and joint destruction in rabbits with antigen-induced arthritis[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(5): 1302.
- [6] 王晓燕,李冠武,常时新. 三七总皂苷通过血管生成改善绝经后骨质疏松机制探析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8): 964-967, 977.
- [7] 李晋玉,康晟乾,孙旗,等. 三七总皂苷在促进骨折愈合的信号通路基础实验研究概况[J]. 环球中医药, 2021, 14(3): 539-544.
- [8] 林奇生,邹学农,曾瑞芬,等. 杜仲醇提取物通过 RhoA/ROCK 信号通路调控大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 26-30.
- [9] DENG Z, JIA Y, LIU H, et al. RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5324-5331.
- [10] 朱振侠,杨晓霞,冯斐斐. RhoA/ROCK 通路在缺氧复氧诱导的人心肌 AC16 细胞损伤中的作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(12): 1021-1027.
- [11] KONG M, GAO Y, GUO X, et al. Role of the CTRP family in tumor development and progression[J]. Oncol Lett, 2021, 22(4): 723.
- [12] LI Y, SUN J, GU L, et al. Protective effect of CTRP6 on cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammation, oxidative stress and apoptosis in PC12 cells[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 344-352.
- [13] 刘勇,易振宇,张信成. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探究益肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(8): 1277-1282.
- [14] 胡广,关智宇,张开伟. 三七总皂苷干预去势骨质疏松性骨折模型大鼠的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2): 172-177.
- [15] 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.
- [16] 蒋擎,陈晓超,田康勇,等. 三七总皂苷结合细胞穿透肽 Tat 经皮给药促进骨折愈合的研究[J]. 医学理论与实践, 2022, 35(10): 1621-1623, 1627.
- [17] GAFFNEY C D, PAGANO M J, KUKER A P, et al. Osteoporosis and low bone mineral density in men with testosterone deficiency syndrome[J]. Sex Med Rev, 2015, 3(4): 298-315.
- [18] BOSIACKI M, GUTOWSKA I, PIOTROWSKA K, et al. Concentrations of Ca, Mg, P, Prostaglandin E₂ in bones and parathyroid hormone; 1,25-dihydroxyvitamin D₃; 17- β -estradiol; testosterone and somatotropin in plasma of aging rats subjected to physical training in cold water[J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 616.
- [19] LI L, WANG Z. Ovarian aging and osteoporosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1086: 199-215.
- [20] 王进,张倩,唐好知,等. 虎潜丸对去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织的保护作用及其机制研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(12): 1829-1833, 1838.
- [21] 冯媛琴,曹爱春. 骨密度检测在围绝经期妇女骨质疏松诊断中的意义[J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(2): 151-152.
- [22] 魏占英,章振林. Micro-CT 在骨代谢研究中骨微结构指标的解读及应用价值[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11(2): 200-205.

- [23] 易莉娟, 田旭, 宋国敏. 氧化应激与糖尿病骨质疏松症相关性研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 99-103.
- [24] LEE C W, LIN H C, WANG B Y, et al. Ginkgolide B monotherapy reverses osteoporosis by regulating oxidative stress-mediated bone homeostasis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 168: 234-246.
- [25] 王柳, 韩芮, 谢俊雄, 等. RhoA/ROCK 信号通路在骨性关节炎中的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(5): 331-336.
- [26] 赵庆利, 吴师, 周裕凯. 亚甲蓝对阿尔茨海默症大鼠认知功能障碍及 RhoA/ROCK2 通路的影响[J]. 中华保健医学杂志, 2022, 24(1): 64-68.
- [27] LIU Z, YANG B. CTRP6 (C1q/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related protein-6) alleviated the sevoflurane induced injury of mice central nervous system by promoting the expression of p-Akt (phosphorylated Akt) [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 5716-5726.
- (收稿日期: 2022-09-15)

Protective Effect Mechanism of *Panax notoginseng* Saponins on Regulating CTRP6/RhoA/Rock in Rats with Osteoporosis

CAI Meng¹, XU Linlin², ZHANG Yongning³✉

(1. Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China;

2. Henan Medical College, Zhengzhou 450053, China; 3. School of Medicine, Huanghuai University, Zhumadian 463003, China)

【Abstract】 Objective: To explore the protective effect and its mechanism of *Panax notoginseng* saponins in osteoporosis rats. Methods: 50 female SD rats were randomly divided into the sham operation group, the model group, the *Panax notoginseng* saponins group (40 mg/kg), the *Panax notoginseng* saponins (40 mg/kg) plus si-NC (4 nmol/kg) group, the *Panax notoginseng* saponins (40 mg/kg) plus si-CTRP6 (4 nmol/kg) group, with 10 in each group. The osteoporosis rat model was established by bilateral oophorectomy in all groups except the sham operation group. After successful modeling, corresponding medication intervention was performed for 10 weeks. The serum levels of E_2 , bone metabolism-related indexes [Ca, P, $1,25(OH)_2D_3$], the levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and the levels of oxidative stress related indexes (SOD, GSH-Px, MDA) were detected in the groups. HE staining was used to observe the pathological changes of femur. Micro-CT was used to analyze the changes of femoral bone microstructure. Western blot was used to detect the protein expressions of CTRP6/RhoA/Rock pathway in femoral tissues of the rats. Results: Compared with those in the sham operation group, the femoral tissues showed obvious pathological damages, and the serum levels of E_2 , Ca, P, $1,25(OH)_2D_3$, SOD and GSH-Px were decreased ($P < 0.01$), whereas the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA were increased ($P < 0.01$), the expression of CTRP6 in femoral tissues was decreased ($P < 0.01$), and the ratios of GTP-RhoA/RhoA and Rock1/Rock2 were increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the damages of femoral tissues were alleviated, the serum levels of E_2 , Ca, P, $1,25(OH)_2D_3$, SOD and GSH-Px were increased ($P < 0.01$), the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA were decreased ($P < 0.01$), the expression of CTRP6 in femoral tissues was increased ($P < 0.01$), and the ratios of GTP-RhoA/RhoA and Rock1/Rock2 were decreased in the *Panax notoginseng* saponins group ($P < 0.01$). Compared with those in the *Panax notoginseng* saponins group, the changes of the above indicators were all significantly inhibited in the *Panax notoginseng* saponins plus si-CTRP6 group ($P < 0.01$). Conclusion: *Panax notoginseng* saponins can improve the femoral damages in osteoporosis rats, and its mechanism is related to regulating CTRP6/RhoA/Rock pathway and inhibiting inflammation and oxidative stress.

【Key words】 Osteoporosis; *Panax notoginseng* saponins; CTRP6/RhoA/Rock pathway