

# 褐藻胶寡糖对 D-半乳糖诱导小鼠骨质疏松的作用

王珊,冯文静,毛拥军

(青岛大学附属医院老年医学科,山东 青岛 266100)

**[摘要]** 目的 探讨褐藻胶寡糖(AOS)对 D-半乳糖(D-gal)诱导的衰老小鼠骨质疏松的作用及其可能的机制。方法 将45只8周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组(Control组)、模型组(D-gal组)、D-gal+AOS低剂量组(D-gal+AOS-L组)、D-gal+AOS中剂量组(D-gal+AOS-M组)和 D-gal+AOS高剂量组(D-gal+AOS-H组)。除 Control组外,其余组小鼠颈部注射 D-gal 8周建立小鼠骨质疏松模型。D-gal+AOS-L、D-gal+AOS-M和 D-gal+AOS-H组从第5周开始分别给予 50、100、150 mg/(kg·d)的 AOS 灌胃4周,Control组和 D-gal组给予蒸馏水灌胃。药物干预完成后,应用骨密度仪测量各组小鼠股骨骨密度,采用 Western Blot 检测小鼠股骨组织中衰老相关蛋白 P16 及氧化应激相关蛋白 P67 phox 的表达,RT-PCR 检测氧化应激相关基因 *p47 phox* 和 *gp91 phox* mRNA 的表达及破骨细胞活化相关基因核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)mRNA 的表达。结果 D-gal组小鼠骨密度较 Control组降低,AOS干预各组小鼠骨密度较 D-gal组均增加,差异有统计学意义( $F=46.853$ ,  $P<0.05$ )。D-gal组小鼠股骨组织中 P16 和 P67 phox 蛋白表达较 Control组增加,AOS干预各组 P16 和 P67 phox 蛋白表达较 D-gal组降低,差异均有统计学意义( $F=50.862, 156.943$ ,  $P<0.05$ )。D-gal组小鼠股骨组织中 *p47 phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 相对表达量较 Control组增加,AOS干预各组小鼠 *p47 phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 相对表达量较 D-gal组均降低,差异有统计学意义( $F=17.373\sim 112.311$ ,  $P<0.05$ )。结论 AOS 对 D-gal 诱导的小鼠骨质疏松具有保护作用,其机制可能与氧化应激和破骨细胞活化的抑制有关。

**[关键词]** 海藻酸;寡糖类;半乳糖;骨质疏松;衰老;氧化性应激;RANK 配体

**[中图分类号]** R681 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2020)03-0261-04

**doi:** 10.11712/jms.2096-5532.2020.56.113

**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**



**[网络出版]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20200610.1359.004.html>;

2020-06-11 11:06

**EFFECT OF ALGINATE OLIGOSACCHARIDE ON D-GALACTOSE-INDUCED OSTEOPOROSIS IN MICE** WANG Shan, FENG Wenjing, MAO Yongjun (Department of Geriatric Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266100, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of alginate oligosaccharide (AOS) on D-galactose (D-gal)-induced osteoporosis in senescent mice and its possible mechanism. **Methods** A total of 45 male C57BL/6J mice, aged 8 weeks, were randomly divided into Control group, model group (D-gal group), D-gal+low-dose AOS group (D-gal+AOS-L group), D-gal+middle-dose AOS group (D-gal+AOS-M group), and D-gal+high-dose AOS group (D-gal+AOS-H group). All mice except those Control group were given subcutaneous injection of D-gal at the back of the neck for 8 weeks to establish a mouse model of osteoporosis. D-gal+AOS-L group, D-gal+AOS-M group, and D-gal+AOS-H group were given AOS by gavage at a dose of 50, 100, and 150 mg/(kg·d) for 4 weeks since week 5, and Control group and D-gal group were given distilled water by gavage. After drug intervention, dual-energy X-ray absorptiometry was used to measure bone mineral density (BMD) of the femur, Western Blot was used to measure the protein expression of the aging-related protein P16 and the oxidative stress-related protein P67 phox, and RT-PCR was used to measure the mRNA expression of the oxidative stress-related genes *p47 phox* and *gp91 phox* and the osteoclast activation-related gene receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL). **Results** Compared with Control group, D-gal group had a significant reduction in BMD, and compared with D-gal group, the AOS intervention groups had a significant increase in BMD ( $F=46.853$ ,  $P<0.05$ ). Compared with Control group, D-gal group had significant increases in the protein expression of P16 and P67 phox in femoral tissue, and compared with D-gal group, the AOS intervention groups had significant reductions in the protein expression of P16 and P67 phox ( $F=50.862, 156.943$ ;  $P<0.05$ ). Compared with Control group, D-gal group had significant increases in the relative mRNA expression of *p47 phox*, *gp91 phox*, and RANKL in femoral tissue, and compared

with D-gal group, the AOS intervention groups had significant reductions in the relative mRNA expression of *p47 phox*, *gp91 phox*, and RANKL ( $F=17.373\sim 112.311$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** AOS exerts a protective effect against D-gal-induced osteoporosis in mice, possibly by inhibiting oxidative stress and osteoclast activation.

**[收稿日期]** 2019-11-24; **[修订日期]** 2020-05-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(31571829, 31-640050); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2016HQ23)

**[第一作者]** 王珊(1993-),女,硕士研究生。

**[通信作者]** 毛拥军(1964-),男,博士,教授,博士生导师。

E-mail: mmc168@126.com.

[KEY WORDS] alginic acid; oligosaccharides; galactose; osteoporosis; aging; oxidative stress; RANK ligand

骨质疏松具有骨微观结构退行性改变、骨量减少和骨密度降低的特点,导致骨强度降低<sup>[1]</sup>、骨脆性增加<sup>[2]</sup>及骨折风险增加<sup>[3]</sup>,引起了老龄化社会的广泛关注。氧化应激学说是衰老的重要机制之一<sup>[4]</sup>,该学说认为活性氧(ROS)的积聚超过机体的清除能力造成DNA损伤、激活氧化应激,从而导致衰老及衰老相关疾病的发生。ROS在体内积聚可激活核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)信号通路,导致骨吸收增加。RANKL信号通路被认为是促进破骨细胞活化的主要靶点,可激活多种下游信号通路<sup>[5]</sup>,从而促进骨吸收和破骨细胞分化过程。长期注射D-半乳糖(D-gal)可导致实验动物产生一系列类似于自然老化的病理变化,如认知障碍、氧化应激和骨量减少等<sup>[6]</sup>。用D-gal诱导建立亚急性衰老模型具有周期短、价格低廉、操作简便、结果稳定可靠等优点,已广泛应用于衰老机制研究和抗衰老药物筛选。褐藻胶寡糖(AOS)具有较高的生物活性,如抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤等<sup>[7]</sup>。骨质疏松性骨折是导致老年人死亡的主要原因之一<sup>[8]</sup>,因此骨质疏松症的早期预防、诊断和治疗十分重要,开发更有效的延缓骨质疏松症的药物具有重要意义。目前大多数骨质疏松研究侧重于绝经后妇女,而缺乏对老年男性骨质疏松的研究。故本实验采用D-gal诱导建立小鼠骨质疏松模型,探讨AOS对衰老雄性小鼠骨质疏松的作用及其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

健康雄性C57BL/6J小鼠45只,SPF级,8周龄,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,饲养于青岛大学医学部SPF级实验动物中心。饲养条件:12h昼夜循环,室温(20±2)℃,相对湿度40%~60%,自由摄食物和水。动物实验操作均经青岛大学动物福利和伦理管理委员会批准,并且遵守中国动物保护委员会制订的《动物保护与使用指南》。P16小鼠单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,RIPA裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天公司,逆转录试剂盒及Mix购自Roche公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 45只小鼠适应性喂养1周后,随机分为对照组(Control组,A组)、模型组

(D-gal组,B组)、D-gal+AOS低剂量组(D-gal+AOS-L组,C组)、D-gal+AOS中剂量组(D-gal+AOS-M组,D组)以及D-gal+AOS高剂量组(D-gal+AOS-H组,E组),每组9只。Control组小鼠颈背部皮下注射灭菌注射用水5mL/(kg·d),其余组小鼠颈背部皮下注射D-gal200mg/(kg·d),连续8周。从D-gal注射第5周开始,AOS干预低、中、高剂量组分别给予AOS50、100、150mg/(kg·d)灌胃处理4周,Control组和D-gal组小鼠给予蒸馏水10mL/(kg·d)灌胃处理4周。

1.2.2 骨密度测量 药物干预完成后,取每组各3只小鼠的同侧股骨,采用双能X线骨密度仪(Dexa; Osteosys Primus, Korea)对整个股骨进行骨密度测量(扫描间距1.5mm,扫描速度60mm/s)。

1.2.3 Western Blot检测P16和P67phox蛋白表达 药物干预完成后,取每组各3只小鼠的股骨组织进行液氮研磨,将RIPA裂解液加入研磨好的股骨组织中提取蛋白,用BCA试剂盒检测蛋白浓度。提取的蛋白进行SDS-PAGE电泳,待溴酚蓝至分离胶底部时转移到PVDF膜上,凝胶成像系统成像后用Quantity One软件分析灰度值。

1.2.4 RT-PCR检测股骨组织*p47 phox*、*gp91 phox*和RANKL mRNA的表达 药物干预完成后,取每组各3只小鼠的股骨组织进行液氮研磨,加Trizol 50~100g/L,颠倒混匀室温放置30min。4℃下以12000r/min离心5min,弃沉淀,加1/5体积氯仿,充分震荡混匀后置于冰上静置5min。4℃下以12000r/min离心15min,将上清转移至新的1.5mLEP管中。加入与上清等体积的异丙醇,充分震荡混匀,置于冰上静置10min。4℃下以12000r/min离心10min,弃上清,加体积分数0.75的乙醇溶液悬浮沉淀。4℃下以12000r/min离心5min,吸除上清,自然晾干后加入10 $\mu$ L DEPC水溶解RNA。用Nanodrop分光光度计测定RNA浓度,用逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA。应用RT-PCR法进行扩增,扩增条件:95℃、600s,95℃、10s,60℃、10s,72℃、15s,共计40个循环;95℃、10s,65℃、60s,97℃、1s。PCR引物及其序列见表1。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 21.0软件对数据进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差

分析,组间两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

表 1 PCR 引物及其序列

引物	序列(5'→3')
<i>p47 phox</i>	正义链 TGGTGGGTGGTCAGGAAAGGG
	反义链 ATGCTCTGTGCGTTGCGGATG
<i>gp91 phox</i>	正义链 GAGTGCCCACTACCAAAGT
	反义链 CCACAAGCATTGAATAGCC
RANKL	正义链 ATGGAAGGCTCATGGTTGGATGTG
	反义链 TGGCAGCATTGATGGTGAGGTG
$\beta$ -actin	正义链 ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	反义链 CACATTGGGTAGGAACAC

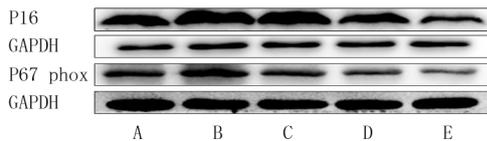
## 2 结 果

### 2.1 各组小鼠股骨骨密度比较

与 Control 组相比较,D-gal 组小鼠股骨骨密度明显下降;与 D-gal 组相比较,AOS 干预各组小鼠股骨骨密度明显增加,差异均有统计学意义( $F = 46.853, P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.2 各组小鼠股骨组织中 P16 和 P67 phox 蛋白表达比较

与 Control 组相比较,D-gal 组小鼠股骨组织中 P16 和 P67 phox 蛋白表达增加;与 D-gal 组比较,AOS 干预各组小鼠股骨组织中 P16 和 P67 phox 蛋白表达降低,差异均有统计学意义( $F = 50.862, 156.943, P < 0.05$ )。见图 1、表 2。



A: Control 组, B: D-gal 组, C: D-gal + AOS-L 组, D: D-gal + AOS-M 组, E: D-gal + AOS-H 组。

图 1 各组小鼠股骨组织中 P16 和 P67 phox 蛋白表达的 Western Blot 检测

表 2 各组小鼠股骨骨密度及 P16 和 P67 phox 蛋白表达比较( $n = 3, x \pm s$ )

组别	骨密度	P16	P67 phox
A 组	0.670±0.010	1.000±0.000	1.000±0.000
B 组	0.423±0.038	1.503±0.092	1.917±0.081
C 组	0.620±0.010	1.415±0.050	1.043±0.095
D 组	0.677±0.049	1.063±0.013	0.753±0.071
E 组	0.717±0.015	0.567±0.015	0.573±0.070

### 2.3 各组小鼠股骨组织中 *p47 phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 表达比较

与 Control 组相比较,D-gal 组股骨组织中 *p47*

*phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 表达增加;与 D-gal 组相比,AOS 干预各组小鼠股骨组织中 *p47 phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 表达降低,差异均有统计学意义( $F = 17.373 \sim 112.311, P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组小鼠股骨组织中 *p47 phox*、*gp91 phox* 和 RANKL mRNA 表达( $n = 3, x \pm s$ )

组别	<i>p47 phox</i>	<i>gp91 phox</i>	RANKL
A 组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
B 组	2.503±0.140	1.804±0.061	7.962±0.609
C 组	1.643±0.087	1.378±0.276	4.135±1.225
D 组	1.138±0.095	1.183±0.163	1.681±0.172
E 组	0.804±0.161	0.848±0.111	1.092±0.075

## 3 讨 论

到 2050 年,65 岁以上的老年人口将超过 8 亿。随着世界人口平均寿命的延长,衰老相关疾病如阿尔茨海默病<sup>[9]</sup>、骨质疏松<sup>[10]</sup>等的发病率和死亡率将明显增加,其造成的社会医疗负担也日益加重。骨质疏松症是一种与年龄相关的退行性疾病,严重影响人们的生活质量,导致老年人的死亡率增加。衰老可以引起骨皮质和骨小梁的矿化减少、孔隙度增加及骨密度降低等,导致骨质疏松和骨折的风险增加<sup>[11]</sup>。本文研究结果显示,D-gal 组衰老性骨质疏松模型小鼠的股骨骨密度较 Control 组显著降低,而与 D-gal 组相比,AOS 干预各组小鼠的股骨骨密度显著增加。说明 AOS 对 D-gal 诱导的骨质疏松有保护作用。P16 作为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子<sup>[12]</sup>,在衰老和抑制肿瘤生长过程中起重要作用。P16 在大多数啮齿动物和人体组织中的表达随年龄增长而显著增加<sup>[13]</sup>。本文结果显示,P16 蛋白在 D-gal 组股骨中的表达增加,而与 D-gal 组相比,AOS 干预各组小鼠股骨中 P16 蛋白的表达降低,说明 AOS 延缓了 D-gal 诱导的衰老进程。

氧化应激可诱导 DNA 损伤和细胞衰老,而抑制衰老可能是治疗骨丢失的有效方法。氧化应激与许多年龄相关疾病(骨质疏松、心血管疾病和神经退行性疾病等)有关,它可以破坏骨骼系统中骨吸收和骨形成的动态平衡,使骨硬度和强度降低,在骨质疏松的发生和发展中起重要作用<sup>[14]</sup>。ROS 的一个主要来源是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶,它可促进氧化应激的发生。本研究结果显示,D-gal 组股骨中 NADPH 氧化酶亚基 *p67 phox*、*p47*

*phox* 和 *gp91 phox* 的 mRNA 表达增加,而与 D-gal 组相比,AOS 干预各组股骨中 NADPH 氧化酶亚基 mRNA 表达减少。表明 AOS 对衰老性骨质疏松的保护作用可能与氧化应激的抑制有关。

随着年龄的增长,破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨生成之间失去平衡<sup>[15]</sup>,当骨吸收超过骨形成时出现骨代谢失衡,引起骨量降低从而导致骨质疏松的发生。RANKL 在破骨细胞生成中发挥着重要的作用<sup>[16]</sup>,可以与核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(RANK)结合激活信号通路,促进破骨细胞活化、分化和成熟等过程<sup>[17]</sup>。RANKL 相关信号通路被认为是促进骨丢失和破骨细胞活化的主要靶点<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,在衰老性骨质疏松 D-gal 组股骨中 RANKL mRNA 表达增加,而与 D-gal 组相比,AOS 干预各组小鼠股骨中 RANKL mRNA 表达降低,说明 AOS 对衰老性骨质疏松的保护作用可能与 RANKL 通路抑制有关。

综上所述,AOS 对 D-gal 诱导的 C57BL/6J 小鼠骨质疏松有保护作用,其机制可能与氧化应激和破骨细胞活化抑制有关,具体机制还需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] CHEN L R, HOU P, CHEN K H. Nutritional support and physical modalities for people with osteoporosis: current opinion[J]. *Nutrients*, 2019,11(12):2848.
- [2] BOTTANI M, BANFI G, LOMBARDI G. Perspectives on miRNAs as epigenetic markers in osteoporosis and bone fracture risk: a step forward in personalized diagnosis[J]. *Front Genet*, 2019,10:1044.
- [3] ZHANG Zhida, REN Hui, SHEN Gengyang, et al. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: an updated review[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016,84:438-446.
- [4] LI Y D, HONG Y F, YUSUFUJAJI Y, et al. Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and-133 in patients with age-associated atrial fibrillation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015,12(3):3243-3248.
- [5] LIU Y X, ZUO G L, MENG X, et al. Adrenomedullin inhibits osteoclast differentiation through the suppression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Exp Ther Med*, 2017,14(5):4009-4016.
- [6] GIOVOS G, YAVROPOULOU M P, YOVOS J G. The role of cellular senescence in diabetes mellitus and osteoporosis: molecular pathways and potential interventions [J]. *Hormones*, 2019,18(4):339-351.
- [7] FALKEBORG M, CHEONG L Z, GIANFICO C, et al. Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. *Food Chemistry*, 2014,164:185-194.
- [8] DE MARTINIS M, FRANCESCHI C, MONTI D, et al. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly[J]. *Exp Mol Pathol*, 2006,80(3):219-227.
- [9] TOEPPER M. Dissociating normal aging from Alzheimer's disease: a view from cognitive neuroscience[J]. *J Alzheimer's Dis: JAD*, 2017,57(2):331-352.
- [10] FATHI KAZEROONI A, POZO J M, MCCLOSKEY E V, et al. Diffusion MRI for assessment of bone quality: a review of findings in healthy aging and osteoporosis[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2020,51(4):975-992.
- [11] JIN H M, WANG Q Q, CHEN K, et al. Astilbin prevents bone loss in ovariectomized mice through the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019,23(12):8355-8368.
- [12] ZHEN Y Z, LIN Y J, LI K J, et al. Effects of Rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1):303-308.
- [13] CHEN Linbo, YAO Hui, CHEN Xiongbin, et al. Ginsenoside Rg1 decreases oxidative stress and down-regulates Akt/mTOR signalling to attenuate cognitive impairment in mice and senescence of neural stem cells induced by D-galactose[J]. *Neurochemical Research*, 2018,43(2):430-440.
- [14] ZHU S W, WEI W F, LIU Z W, et al. Tanshinone-II A attenuates the deleterious effects of oxidative stress in osteoporosis through the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(5):6969-6976.
- [15] KIERNAN J, DAVIES J E, STANFORD W L. Concise review: musculoskeletal stem cells to treat age-related osteoporosis[J]. *STEM CELLS Transl Med*, 2017,6(10):1930-1939.
- [16] OMI M, KAARTINEN V, MISHINA Y. Activin A receptor type 1-mediated BMP signaling regulates RANKL-induced osteoclastogenesis via canonical SMAD-signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2019,294(47):17818-17836.
- [17] KWAK S C, BAEK J M, LEE C H, et al. Umbelliferone prevents lipopolysaccharide-induced bone loss and suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis by attenuating Akt-c-fos-NFATc1 signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2019,15(11):2427-2437.
- [18] KIM J S, LEE H, NIRMALA F S, et al. Dry-fermented soybean food (Cheonggukjang) ameliorates senile osteoporosis in the senescence-accelerated mouse prone 6 model[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2019,22(10):1047-1057.

(本文编辑 马伟平)