

## 吴茱萸次碱改善 MAFLD 小鼠脂肪肝和骨质疏松的作用

张煜皓<sup>1</sup>, 李依宁<sup>1</sup>, 姜新海<sup>1,2</sup>, 王伟志<sup>1</sup>, 李顺旺<sup>1</sup>, 盛任<sup>1</sup>, 雷丽娟<sup>1</sup>, 张语嫣<sup>1</sup>,  
王晶锐<sup>1</sup>, 魏欣玮<sup>1</sup>, 许艳妮<sup>1</sup>, 林燕<sup>3\*</sup>, 唐琳<sup>4\*</sup>, 司书毅<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 卫健委微生物药物生物技术重点实验室, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 国家新药(微生物)筛选实验室, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015; 3. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京市中医药研究所, 北京 100010; 4. 盛实百草药业有限公司, 天津 300301)

**摘要:** 代谢相关脂肪性肝病 (metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD) 和骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是两种非常普遍的代谢性疾病。越来越多的实验证据支持 MAFLD 和 OP 之间有病理生理联系, MAFLD 常伴随 OP 的发生。吴茱萸次碱 (rutaecarpine, RUT) 是中药吴茱萸的主要活性成分之一, 课题组前期研究发现 RUT 具有降脂、抗炎和抗动脉粥样硬化作用, 并且可以改善大鼠的 OP。但是, RUT 能否同时改善 MAFLD 小鼠的脂肪肝和 OP 症状, 目前尚待研究。本研究利用高脂饲料饮食 (high fat diet, HFD) 4 个月喂养的 C57BL/6 小鼠构建 MAFLD 模型。灌胃给予 RUT 低剂量 (5 mg·kg<sup>-1</sup>) 和高剂量 (15 mg·kg<sup>-1</sup>) 4 周, 实验结束时评价 RUT 在体内对肝脏脂肪变性和骨代谢的影响 (本实验获得中国医学科学院医药生物技术研究所动物伦理委员会批准, 批准号: IMB-20190124D<sub>3</sub>03)。研究结果表明, RUT 治疗显著减少了肝脏脂肪变性和脂质积累, 同时显著减少骨丢失并促进了骨形成。综上, 本研究表明 RUT 具有改善 MAFLD 小鼠的脂肪肝和 OP 的作用。

**关键词:** 吴茱萸次碱; 非酒精性脂肪性肝病; 代谢相关脂肪性肝病; 骨质疏松症; 骨代谢  
**中图分类号:** R966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2025)01-0141-09

## The effect of rutaecarpine on improving fatty liver and osteoporosis in MAFLD mice

ZHANG Yu-hao<sup>1</sup>, LI Yi-ning<sup>1</sup>, JIANG Xin-hai<sup>1,2</sup>, WANG Wei-zhi<sup>1</sup>, LI Shun-wang<sup>1</sup>, SHENG Ren<sup>1</sup>,  
LEI Li-juan<sup>1</sup>, ZHANG Yu-yan<sup>1</sup>, WANG Jing-rui<sup>1</sup>, WEI Xin-wei<sup>1</sup>, XU Yan-ni<sup>1</sup>, LIN Yan<sup>3\*</sup>,  
TANG Lin<sup>4\*</sup>, SI Shu-yi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Microbial Drugs, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, National Center for Screening Novel Microbial Drugs, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China; 4. China Medico Corporation, Tianjin 300301, China)

**Abstract:** Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) and osteoporosis (OP) are two very common

收稿日期: 2024-09-14; 修回日期: 2024-10-10.

基金项目: 中国药学会-以岭生物医药创新基金 (CPA-B04-ZC-2021-005); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2022-JKCS-10); 国家自然科学基金青年基金项目 (82404723).

\*通讯作者 Tel: 86-10-87906669, E-mail: linyan18@sina.com;

Tel: 86-22-583570086, E-mail: 626733424@qq.com;

Tel: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0907

metabolic diseases. A growing body of experimental evidence supports a pathophysiological link between MAFLD and OP. MAFLD is often associated with the development of OP. Rutaecarpine (RUT) is one of the main active components of Chinese medicine *Euodiae Fructus*. Our previous studies have demonstrated that RUT has lipid-lowering, anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects, and can improve the OP of rats. However, whether RUT can improve both fatty liver and OP symptoms of MAFLD mice at the same time remains to be investigated. In this study, we used C57BL/6 mice fed a high-fat diet (HFD) for 4 months to construct a MAFLD model, and gave the mice a low dose ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and a high dose ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) of RUT by gavage for 4 weeks. The effects of RUT on liver steatosis and bone metabolism were then evaluated at the end of the experiment [this experiment was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences (approval number: IMB-20190124D<sub>3</sub>03)]. The results showed that RUT treatment significantly reduced hepatic steatosis and lipid accumulation, and significantly reduced bone loss and promoted bone formation. In summary, this study shows that RUT has an effect of improving fatty liver and OP in MAFLD mice.

**Key words:** rutaecarpine; nonalcoholic fatty liver disease; metabolic-associated fatty liver disease; osteoporosis; bone metabolism

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除酒精和其他明确的肝损伤因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征, 这种代谢性肝脏疾病与肥胖、2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2D) 和代谢综合征密切相关。NAFLD疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化和肝癌。NAFLD全球患病率约为25%, 并持续上升, 每年约有350万新诊断病例<sup>[1,2]</sup>, 流行病学数据表明, 亚洲人是NAFLD的高危人群, 在中国其患病率高达29.2%。NAFLD是一种超越肝脏表现的多系统疾病过程, 包括肾脏疾病、心血管疾病及慢性肾脏疾病等<sup>[3,4]</sup>。

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种骨代谢疾病, 其特征是骨密度降低和骨结构破坏, 导致骨质疏松和骨折风险增加<sup>[5]</sup>。OP在绝经后妇女和老年人中尤为普遍, 严重影响了患者的身体健康和生活质量。随着人口老龄化进程的加速, OP已经成为全球关注的公共健康问题。根据世界卫生组织对OP的诊断标准, 全球50岁及以上人群中约有6.3%男性和21.2%女性患有OP<sup>[6]</sup>, 而全球55岁以上人群每年发生多达3700万例脆性骨折<sup>[7]</sup>。髌部骨折是最严重的骨质疏松性骨折, 髌部骨折后1年内, 20%的患者死于并发症, 50%的患者残疾, 患者的生活质量明显下降<sup>[8]</sup>。

NAFLD是一种常见的慢性肝脏疾病, 而NAFLD这一词过分强调了酒精摄入不足, 未能体现代谢因素在其发病机制中的核心作用。为了解决这一局限性, 2020年国际专家共识建议将NAFLD更名为“代谢相关脂肪性肝病” (metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD), 更好地反映了其潜在机制<sup>[9]</sup>。

MAFLD和OP都是非常普遍的代谢性疾病, 且肥胖<sup>[10]</sup>、炎症<sup>[11]</sup>和胰岛素抵抗 (insuline resistance, IR)<sup>[12]</sup>可能是MAFLD和OP之间合理的病理生理联系, 肝与骨之间可能存在一种相互作用、相互调节的信号轴“肝-骨”轴, 共同参与调节肝脏代谢和骨代谢。

吴茱萸次碱 (rutaecarpine, RUT) 来源于芸香科植物吴茱萸, 是一种吲哚喹啉类生物碱。RUT具有广泛的药理作用, 包括抗炎、抗纤维化、抗血栓形成、抗脂毒性、抗癌和保肝活性<sup>[13-17]</sup>, 实验室前期研究发现RUT具有调脂、抗动脉粥样硬化<sup>[18]</sup>、抗炎<sup>[19]</sup>和抗OP<sup>[20]</sup>的作用。脂代谢紊乱、动脉粥样硬化、炎症、MAFLD和OP之间有一些共同的发病机制<sup>[21]</sup>, 这些疾病相互影响, 并可能同时发生。但是, RUT能否同时改善MAFLD小鼠的脂肪肝和OP症状, 目前尚待研究。因此, 本研究使用高脂饲料成功建立脂肪肝小鼠模型, 并考察RUT是否可以同时改善MAFLD小鼠的脂肪肝和OP, 这对MAFLD及其相关疾病的治疗具有重要的意义。

## 材料与方法

**药品和实验动物** RUT购于杨凌慈缘生物科技有限公司 (含量 > 98%, 相对分子质量: 287.32, 货号: CY0096)。奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA) 购于上海源叶生物科技有限公司 (货号: T93981)。8周龄雄性C57BL/6J小鼠40只 [21~23 g, 北京维通利华实验动物科技有限公司, 实验动物许可证号SCXK (京) 2016-0006]。动物实验获得中国医学科学院医药生物技术研究所有关动物护理和使用委员会的批准 (批准号: IMB-20190124D<sub>3</sub>03)。

**MAFLD小鼠模型与动物分组** 将C57BL/6小鼠适应性喂养1周, 按照体重随机分为5组 (每组8只),

设置对照组 (control)、模型组 (model)、奥贝胆酸 (OCA) 阳性对照组 ( $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 以及 RUT 低剂量组 (RUT-L,  $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和 RUT 高剂量组 (RUT-H,  $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。对照组给予 10 kcal% Fat 对照饲料 (control diet, CD, 货号: D12450B, 美国 Research Diets 公司), 其他组均给予 60 kcal% Fat 高脂饲料 (high fat diet, HFD, 货号: D12492, 美国 Research Diets 公司), 喂养 16 周。OCA 和 RUT 均用 0.5% CMC-Na (货号: C9481, 美国 Sigma-Aldrich 公司) 溶解, 对照组和模型组灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液, 每天灌胃给药 1 次, 连续灌胃 4 周。每周监测 1 次体重和摄食量。末次给药后过夜禁食, 称量体重, 小鼠异氟烷麻醉后眼眶后静脉取血, 迅速解剖摘取肝脏, 置于 4% 多聚甲醛 (货号: BL539A, 北京 Biosharp 公司) 中, 其余肝脏置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中冻存。

**血清生化指标测定** 收集血液于肝素润过的 EP 管中, 使用低温离心机 (Legend micro 1.6R, 美国 Thermo Fisher 公司)  $2\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 收集血浆, 分装后于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中保存。使用全自动生化分析仪 (71800, 日本 Hitachi 公司) 以及相应的试剂盒 (均购自北京中生北控公司) 测定血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC, 货号: 100020080)、甘油三酯 (triglyceride, TG, 货号: 100020090)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C, 货号: 100020248)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C, 货号: 100020238)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT, 货号: 100020000) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST, 货号: 100020010) 水平。采用 ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司) 测定小鼠血浆中骨保护素 (osteoprotegerin, OPG, 货号: SBJ-M0277)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN, 货号: SBJ-M0924)、核因子  $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体 [receptor activator for nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (RANK) ligand, RANKL, 货号: SBJ-M0556] 的水平。

**MAFLD 小鼠肝脏组织石蜡切片和 H&E 染色** 取适当大小 4% 多聚甲醛固定好的肝脏组织, 将肝组织包埋在石蜡中, 切成  $3\sim 5 \mu\text{m}$  石蜡切片。将肝脏组织石蜡切片置于二甲苯中脱蜡 20 min, 乙醇梯度水化 (每次 5 min), 清水冲洗, 苏木精染液染色 10 min, 自来水冲洗后将切片放置分化液中 2 s, 放入自来水中 5 min, 伊红染液染色 30 s, 再依次放入 70% 乙醇、95% 乙醇以及无水乙醇中, 二甲苯中脱水 20 min, 中性树脂封片, 晾干后用切片扫描仪 (Pannoramic MIDI, 匈牙利 3DHISTECN 公司) 扫描切片。

**小鼠肝脏组织冰冻切片和油红 (oil red O, ORO) 染色** 取适当大小 4% 多聚甲醛固定好的肝脏组织,

在 20% 蔗糖溶液中脱水, 将肝脏组织放入 OCT 包埋剂中, 低温待其完全凝固后, 置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱避光保存。用冰冻切片 (CM1950, 德国 Leica 公司) 将包埋好的肝脏组织切成  $6\sim 8 \mu\text{m}$  的冰冻切片。将冰冻切片晾干, 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 蒸馏水中洗 3 次, 60% 异丙醇中同化 3 min, 新配置的油红工作液中染色 30 min, 60% 异丙醇分色 1 min, 蒸馏水洗 3 次, 苏木素染液中染色 2 min, 蒸馏水洗 3 次, 中性树脂封片, 晾干后在显微镜 (DM2500, 德国 Leica 公司) 下拍摄。

**肝脏组织脂含量检测** 每个样本称取大约 50 mg 的肝组织, 分别使用 TC 和 TG 检测裂解液处理的肝组织样本, 按照 TC (货号: E1015, 北京普利莱基因技术有限公司) 和 TG (货号: E1013, 北京普利莱基因技术有限公司) 定量试剂盒的使用说明进行肝组织 TC 和 TG 定量, 测定样品的蛋白含量, 计算肝组织内的 TC 和 TG 含量 (表示为  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ protein}$ )。

**小鼠股骨 micro-CT 检测** 小鼠股骨去除周围筋膜和肌肉组织等, 用 4% 多聚甲醛固定, 使用 micro-CT 扫描仪 (Inveon Micro PET/CT, 德国 Siemens 公司) 对小鼠股骨远端进行分析。扫描结束后利用 Inveon 分析工作站进行成像和数据分析, 计算骨密度 (bone mineral density, BMD), 测量分析骨形态学指标 [骨体积分数 (bone volume to tissue volume, BV/TV)、骨小梁数目 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨面积与骨体积比 (bone surface to tissue volume, BS/BV)、骨小梁间距 (trabecular separation, Tb.Sp)] 和骨皮质厚度 (cortical thickness, Ct.Th) 等。

**钙黄绿素双标实验** 动物实验结束前第 6 天和第 1 天两个时间点, 对照组、模型组以及 RUT-L 和 RUT-H 组分别注射钙黄绿素 (货号: C0875, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 钙黄绿素能在注射的两个时间点产生两条沉积线, 用于计算矿物质沉积率 (mineral apposition rate, MAR)。MAR = 两次钙黄绿素沉积线宽度/两次注射时间间隔天数。

**统计学分析** 实验数据采用 GraphPad Prim 8 软件进行统计学分析以及作图, 使用 normality and lognormality test 进行正态检验, 正态分布的实验数据以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM) 表示。三组以及三组以上组间统计学差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验进行比较, 并采用 Dunnett's 检验进行事后检验 (post hoc)。 $P < 0.05$  时认为差异具有显著性意义。

## 结果

### 1 RUT 对 MAFLD 小鼠的血浆中脂质水平的影响

为了考察 RUT (结构见图 1A) 是否具有同时改善

脂肪肝和OP的药理作用,本研究使用60 kcal% Fat高脂饲料喂养C57BL/6小鼠16周构建MAFLD小鼠模型,然后灌胃给予RUT和阳性药。鉴于RUT低剂量组(5 mg·kg<sup>-1</sup>)改善OP的效果比较好<sup>[20]</sup>,因此,本研究选择RUT-L(5 mg·kg<sup>-1</sup>)、RUT-H(15 mg·kg<sup>-1</sup>)和阳性对照OCA(35 mg·kg<sup>-1</sup>)连续灌胃4周(图1B),在实验终点时考察RUT对MAFLD小鼠脂代谢的影响。

与对照饲料饲喂的对照小鼠(control组)相比,高脂饲料喂养的模型组(model组)小鼠的体重显著增加(图1C),且其血浆中TC、TG、LDL-C明显增高(图1E);RUT低剂量和高剂量组在体重(图1C)以及血浆脂质水平(图1E)与模型组没有明显差异;此外,各组小鼠摄食量没有明显差异(图1D)。

## 2 RUT对MAFLD小鼠血浆中OP的标志物水平的影响

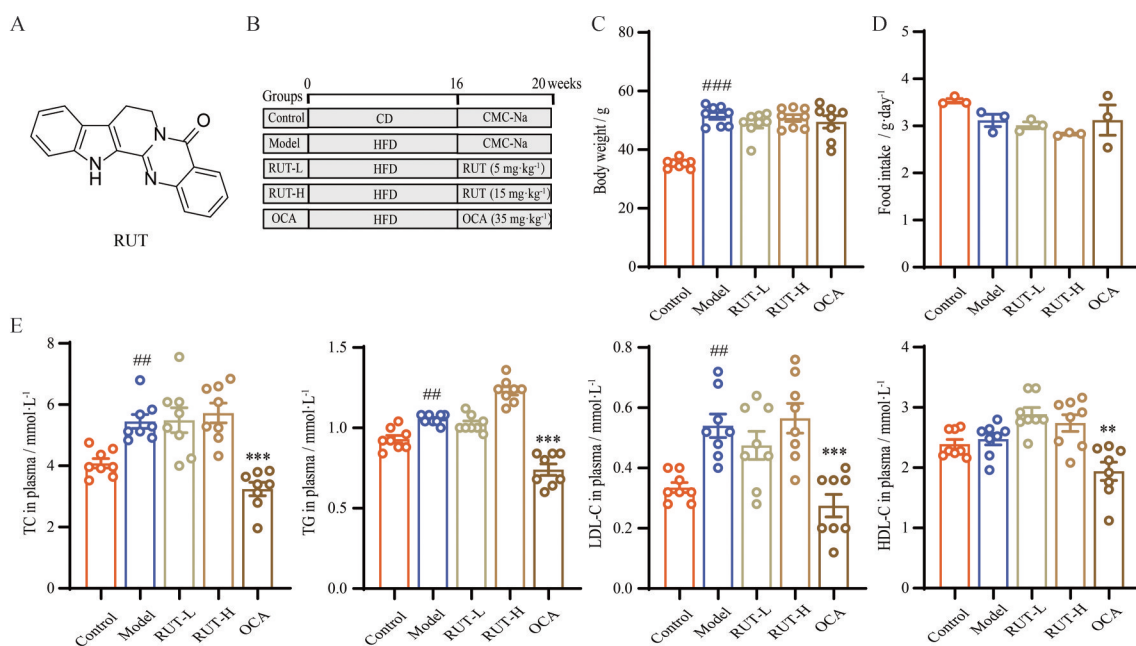
OPG和RANKL由成骨细胞分泌,OPG/RANKL/RANK通路在调节骨相关疾病中具有重要地位<sup>[22,23]</sup>;RANKL与核因子κB受体活化因子(RANK)结合能促进单核细胞前体细胞的分化,从而形成成熟的破骨细胞,还能增强成熟破骨细胞的骨吸收活性;OPG是RANKL的诱饵受体,它可以和RANKL结合,从而抑制RANKL诱导的破骨细胞形成和破骨细胞骨吸

收<sup>[22,23]</sup>。此外,OPN是成骨细胞和破骨细胞产生的骨基质蛋白,参与骨基质的矿化和重吸收过程<sup>[24]</sup>。为了研究RUT是否会改善MAFLD小鼠的骨代谢,本研究首先检测了小鼠血浆中骨形成和骨吸收特异性标志物(OPG、RANKL、OPN)的水平。

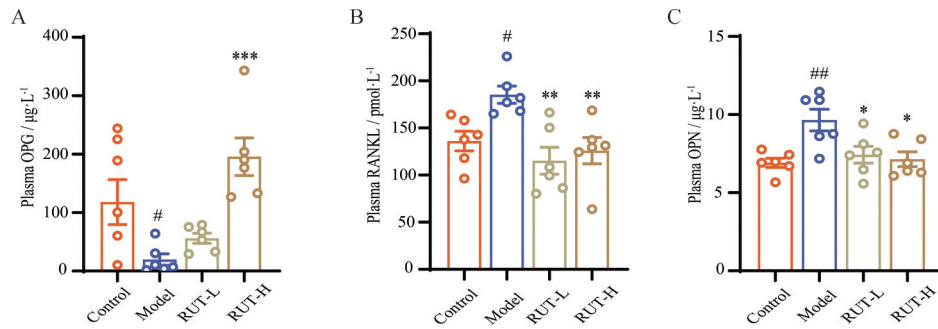
结果显示,与对照组(control组)相比,MAFLD模型组小鼠血清中骨形成标志物OPG水平显著降低(图2A),而骨吸收标志物RANKL(图2B)和OPN(图2C)水平显著增加;与模型组相比,RUT低剂量给药后增加了血清中OPG水平,但是没有显著性(图2A),而RUT高剂量给药后显著增加了血清中OPG水平(图2A);与模型组相比,RUT低剂量和高剂量均显著降低了RANKL(图2B)和OPN(图2C)的水平;上述结果提示RUT在MAFLD小鼠体内具有促进骨形成和抑制骨吸收的作用。

## 3 RUT可减轻MAFLD小鼠的脂肪肝

进一步,本研究利用H&E和ORO染色等方法,评价了RUT对脂肪肝的作用。H&E染色结果(图3A)显示,对照组小鼠肝组织形态正常,模型组小鼠肝细胞受损,出现明显的肝脏脂肪变性和肝细胞气球样变;而RUT低剂量和高剂量显著改善了小鼠肝脏中HFD饮食造成的肝脏脂肪变性和肝细胞气球样变。根据



**Figure 1** The effect of rutaecarpine (RUT) on plasma lipid levels in metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) mice. A: The chemical structure of RUT; B: The schematic diagram of the experimental procedure in this study. Mice were fed the control diet (CD) or the high fat diet (HFD) for 16 weeks, and then were intragastrically administered 0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na), RUT (5 or 15 mg·kg<sup>-1</sup>), or obeticholic acid (OCA, 35 mg·kg<sup>-1</sup>) once daily for 4 weeks; C: Body weight values ( $n = 8$ ); D: The average food intake values ( $n = 3$ ); E: The plasma lipid total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels ( $n = 8$ ). mean  $\pm$  SEM.  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs model group. RUT-L: Low-dose RUT group, 5 mg·kg<sup>-1</sup>; RUT-H: High-dose RUT group, 15 mg·kg<sup>-1</sup>



**Figure 2** The effect of RUT on plasma bone metabolism related markers' levels in MAFLD mice. Plasma osteoprotegerin (OPG, A), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL, B), and osteopontin (OPN, C) levels in MAFLD mice treated with or without RUT.  $n = 6$ , mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

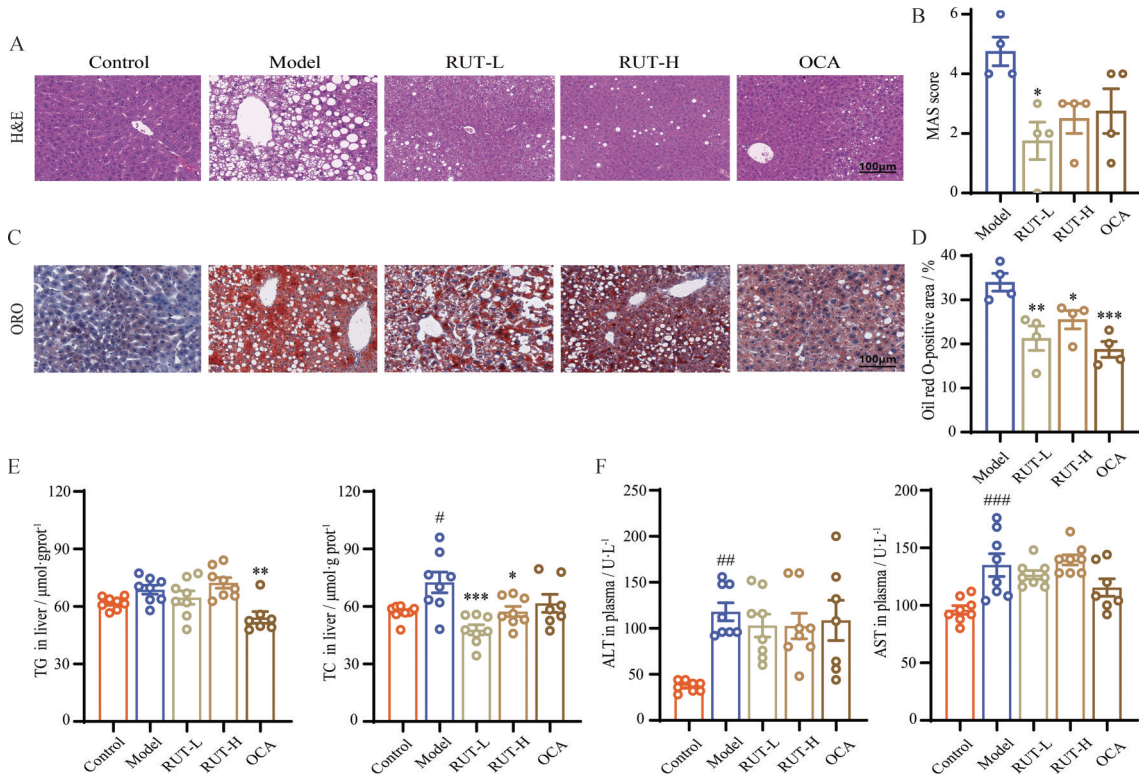
H&E 染色结果, 对 MAFLD 活性进行评分 (图 3B), 与模型组相比, 低剂量 RUT 组显著降低了 MAS 评分。

ORO 染色和肝脏脂质测定结果 (图 3C~E) 显示, 与对照组相比, 模型组肝细胞中有大量的脂质聚积; 与模型组相比, RUT 低剂量和高剂量均显著减少了 ORO 染色阳性面积 (图 3C、D) 和肝脏 TC 含量 (图 3E), 说明 RUT 能显著减少肝脏脂质聚积 (图 3C~E)。与对照组小鼠相比, 模型组小鼠血浆中 ALT 和 AST 水平 (图 3F) 明显升高, 说明 HFD 饮食造成了小鼠的肝损伤; 但是,

各给药组和模型组没有明显区别 (图 3F)。此外, 阳性药 OCA 也能改善脂肪肝小鼠的肝脂质聚积情况 (图 3A~E)。以上数据表明, RUT 给药可减轻高脂饲料喂养引起的肝脏脂质聚积和脂肪变性情况。

#### 4 RUT 抑制 MAFLD 小鼠的骨丢失

本研究进一步在 MAFLD 小鼠模型中研究了 RUT 体内抗 OP 的活性, 结果如图 4 所示。与对照组相比, 模型组小鼠的 micro-CT 二维图 (图 4A) 和三维图 (图 4B) 表现出明显的骨小梁骨丢失, 而经过 4 周的给



**Figure 3** The effect of RUT on fatty liver in MAFLD mice. A: Representative images of H&E staining of liver sections from mice. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; B: MAFLD activity score (MAS score) for each group according to the H&E staining images ( $n = 4$ ); C: Representative images of oil red O (ORO) staining of liver sections from mice. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; D: The statistics of ORO positive areas were shown ( $n = 4$ ); E: TG and TC levels in the liver ( $n = 7-8$ ); F: Plasma alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels ( $n = 7-8$ ). Mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

药治疗,小鼠的骨丢失程度得到明显改善(图4A、B)。

通过micro-CT分析各组小鼠股骨远端的骨形态学参数,结果表明(图4C),与对照组相比,模型组BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N和Ct.Th明显低于对照组,Tb.Sp显著增加;与模型组相比,RUT低剂量和高剂量给药治疗4周后,BV/TV、Tb.N和Ct.Th明显增加,Tb.Sp显著降低,且RUT高剂量组显著增加了小鼠BMD;各组BS/BV没有明显差异。以上数据表明,RUT给药可抑制MAFLD小鼠的骨丢失,显著改善了MAFLD小鼠的OP症状。

### 5 RUT促进MAFLD小鼠的骨形成

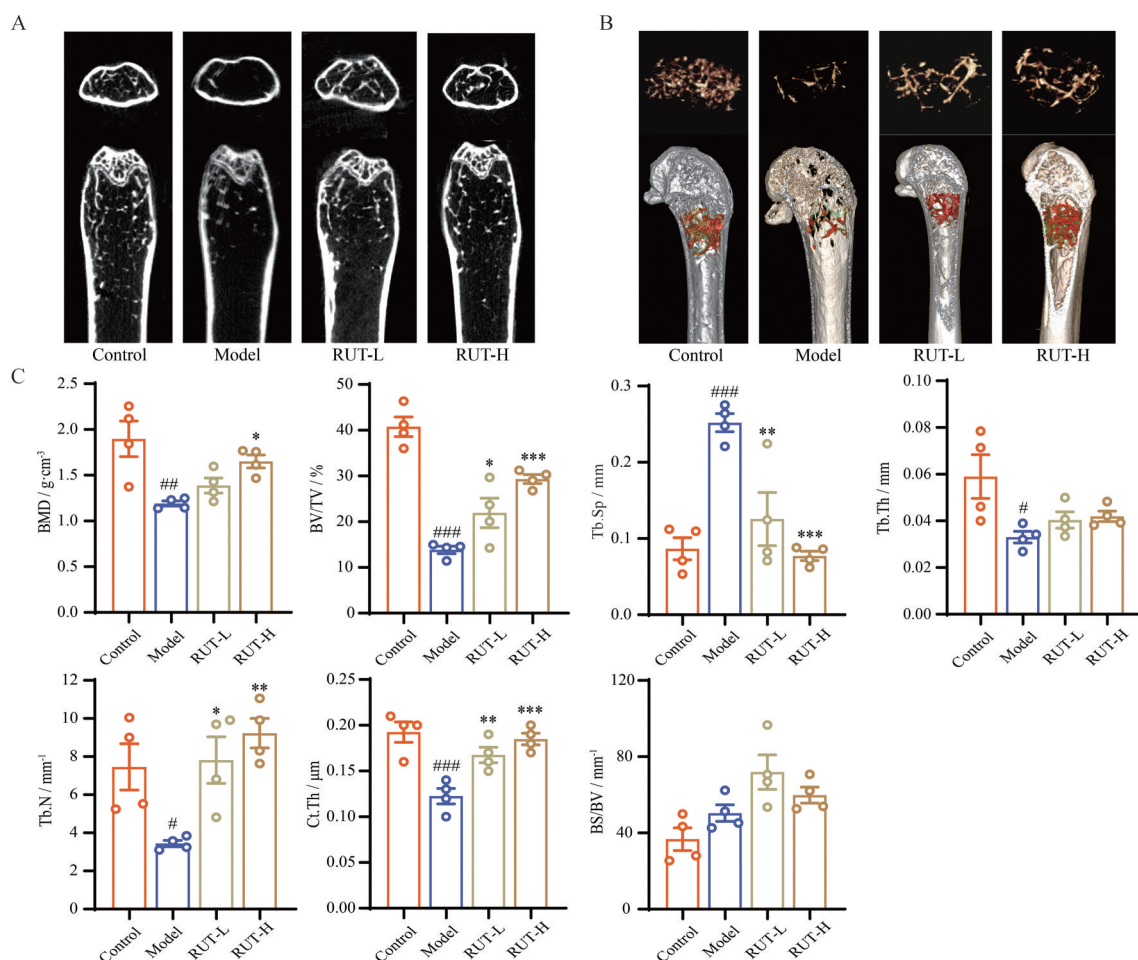
钙黄绿素双标实验是观测两个时间点之间形成的两条钙黄绿素沉积线的距离,从而确定两次注射时间间隔内的骨形成量,本研究分别选取小鼠处死前第6天和第1天注射钙黄绿素,从而计算RUT给药对MAFLD小鼠矿化沉积率(MAR)的影响。因此,通过钙黄绿素

双标实验进一步考察RUT对骨形成的影响。结果显示(图5A、B),与对照组相比,模型组小鼠的矿化宽度显著性减少;与模型组相比,RUT低剂量和高剂量给药后均能明显增加矿化宽度和矿化沉积率,表明RUT给药能够在体内促进骨的动态形成。

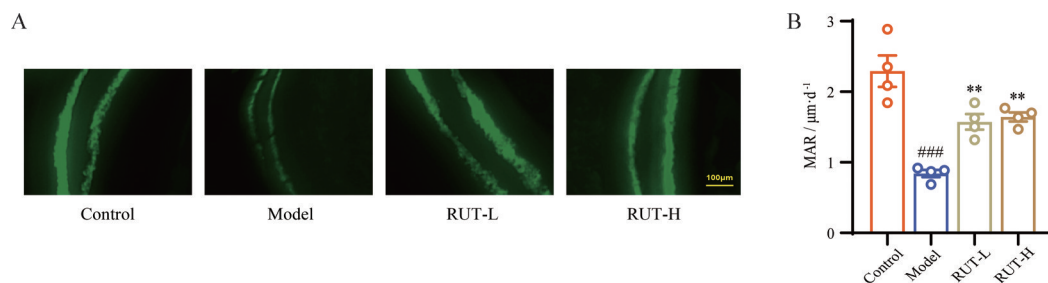
### 讨论

代谢稳定对维持体内平衡非常重要。肝脏作为代谢中心,通过与多个器官相互作用来调节机体稳态<sup>[25]</sup>。骨骼是另一个重要的代谢器官,具有重要的内分泌功能,可以影响糖脂代谢和心血管功能等<sup>[25]</sup>。MAFLD和OP是两种非常普遍的代谢性疾病,它们二者之间存在复杂的关联,主要体现在它们存在共同的发病机制,共同参与调节肝脏代谢和骨代谢,并相互影响,这也是临床“异病同治”的基础。

成骨细胞和脂肪细胞从共同的前体多功能间充质



**Figure 4** RUT inhibits bone loss in MAFLD mice. A: Representative micro-CT images of distal femurs from control, model, RUT-L and RUT-H, respectively; B: Representative micro-CT 3D image of mouse femur distal femurs; C: Trabecular bone parameters including bone mineral density (BMD), bone volume to tissue volume (BV/TV), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular number (Tb.N), cortical thickness (Ct.Th), and bone surface area/bone volume (BS/BV) were analyzed by micro-CT.  $n = 4$ , mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group



**Figure 5** RUT treatment promotes bone formation in MAFLD mice. A: Representative calcein double labeling images were shown. Scale bar = 100 μm; B: Mineralization deposition rate (MAR) was calculated as in methods part.  $n = 4$ , mean  $\pm$  SEM. ###  $P < 0.001$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$  vs model group

干细胞 (MSC) 分化而来, 并且骨髓 (BMSC) 和脂肪组织 (AD-MSC) 中均存在 MSC<sup>[26]</sup>。许多转录因子和多个调节脂肪形成和成骨细胞形成的细胞外和细胞内信号已被发现参与 MSC 分化为成骨细胞和脂肪细胞的过程。如典型的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路诱导成骨细胞形成, 抑制脂肪生成; 而过氧化物酶体增殖激活受体- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 是脂肪形成的主要诱导剂, 它能抑制成骨细胞的形成。与 MAFLD 发病机制相关的慢性炎症过程可能导致骨密度的降低, 细胞脂质超载导致细胞脂毒性, 触发由肝星状细胞和树突状细胞介导的炎症级联反应, 产生多种促炎和促纤维化分子, 导致肝纤维化和炎症性 OP<sup>[27]</sup>。生长激素 (GH) 和胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的补充显著改善了 MAFLD 小鼠肝脏脂肪变性和炎症<sup>[28]</sup>; IGF-1 也参与骨组织成熟和骨骼重建, IGF-1 水平低与髌部和椎骨骨折的高风险相关<sup>[29]</sup>; GH/IGF-1 轴的破坏可能与 MAFLD 患者的低骨密度有关。MAFLD 往往伴有 IR, 而骨密度与 IR 呈负相关<sup>[30]</sup>。肝脏分泌的维生素 B12 (VitB12) 衍生牛磺酸和维生素 D 等可以调节骨骼发育, 肝脏功能受损可能导致维生素 D 的吸收和利用障碍, 增加 OP 的风险<sup>[31]</sup>。肝细胞来源的 IGFBP1 可以增加活化 T 细胞核因子-1 (NFATc1) 在破骨细胞中的转录活性, 从而影响骨吸收。骨细胞分泌的硬化蛋白水平升高与肝硬化患者的肝功能障碍标志物白蛋白相关。因此, 在肝脏和骨骼之间可能存在一个信号轴“肝-骨”轴, 该轴可调节它们的各自功能。

芸香科吴茱萸是一种常用的中草药, 在中医配方中被用来治疗肝病在内的各种疾病。RUT 作为吴茱萸的主要活性成分之一, 具有广泛的药理作用, 包括抗炎、抗纤维化、抗血栓形成、抗脂毒性、抗 T2D、抗肝癌和保肝活性<sup>[13-17]</sup>, 本课题组前期研究发现 RUT 具有调脂、抗动脉粥样硬化<sup>[15]</sup>、抗炎<sup>[16]</sup>和抗 OP<sup>[17]</sup>的作用。RUT 通过激活抗氧化酶保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤<sup>[32]</sup>, 通过上调抗氧化酶的活性抑制

t-BHP 诱导的肝损伤<sup>[33]</sup>; RUT 通过 AMPK/PRDM16 通路诱导脂肪细胞褐变, 可能是治疗肥胖的潜在候选药物<sup>[34]</sup>; RUT 通过调节 IRS-1/PI3K/Akt 和 AMPK/ACC2 信号通路改善高脂饮食联合链脲佐菌素处理小鼠的高脂血症和高血糖症<sup>[35]</sup>, 通过调节葡萄糖稳态来治疗 T2D 的作用<sup>[36]</sup>, 还能增强二甲双胍的治疗糖尿病的作用<sup>[37]</sup>。RUT 通过降低破骨细胞分化过程中 NFATc1 的蛋白水平和其他信号通路的磷酸化来抑制骨髓来源的破骨细胞生成和骨吸收作用<sup>[38]</sup>; RUT 可以促进衰老相关的人骨髓基质干细胞 (hBMSCs) 的成骨分化, 增加骨形成<sup>[39]</sup>; RUT 通过抑制巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 和 RANKL 刺激的信号通路来减轻破骨细胞形成<sup>[38]</sup>。此外, RUT 衍生物 R3 具有抑制 NLRP3 炎症小体的作用以及抗动脉粥样硬化的作用<sup>[19]</sup>, RUT 衍生物 B-RUT 通过减轻炎症和氧化应激减轻酒精诱导肝损伤<sup>[40]</sup>。槲皮素、枸杞素和 RUT 可能是二妙散 (EMS) 的主要活性化合物, EMS 能抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等炎症因子水平, 具有抗炎和治疗类风湿性关节炎的作用<sup>[41]</sup>。因此, 以上研究的结果表明, RUT 可能同时调节 MAFLD 和 OP 共同的发病机制 (如炎症、骨代谢、氧化应激、肥胖、糖脂代谢紊乱等), 实现对 MAFLD 和 OP 的治疗。

本研究通过高脂饮食成功建立小鼠 MAFLD 模型, 并同时考察了 RUT 给药对 MAFLD 以及 OP 的作用。与对照组相比, 高脂饮食组出现了脂肪肝和 OP 有关的病理性改变, 而 RUT 治疗可显著改善 MAFLD 小鼠的肝脏脂肪病变和炎症, 增加骨密度、改善骨组织的微结构、促进骨形成和抑制骨丢失。高剂量 RUT (15 mg·kg<sup>-1</sup>) 改善 OP 效果更好, 低剂量 RUT (5 mg·kg<sup>-1</sup>) 对 MAFLD 的治疗效果更好。RANKL 与破骨前体细胞和破骨细胞上的 RANK 结合, 导致破骨细胞的分化和骨吸收, 是 OP 发病的主要机制, 而 RANKL 可被循环中的可溶性受体 OPG 中和; OPN 可以调节骨量并参与多种骨相关细胞的增殖、迁移和黏附等过程, 且

OPN水平与机体骨密度呈负相关<sup>[24]</sup>。高脂饮食增加小鼠血浆中OPN和RANKL水平,降低OPG水平,这使RANKL/RANK/OPG轴失衡而增加骨吸收,导致骨密度降低,从而引起OP;而RUT给药可以显著降低血浆RANKL和OPN水平,增加OPG的表达水平,这可能是其抗MAFLD小鼠模型OP作用的机制。此外,RUT还具有抗炎和抗糖脂代谢紊乱等药理作用,这些均与MAFLD和OP的机制之间有关联,因此,RUT的这些药理作用可能对改善MAFLD和OP都有益。综上,本研究证明了RUT在MAFLD模型小鼠体内能同时改善脂肪肝和OP,后续可以针对其作用机制进行深入研究。因此,下一步可以在MSC成骨成脂分化、炎症、Wnt/ $\beta$ -catenin和PPAR $\gamma$ 等信号通路研究RUT调节脂骨代谢的机制,明确RUT同时改善MAFLD和OP的机制。

综上,MAFLD患者常伴有OP的发生,肝脏与骨骼之间存在调节作用。尽管目前已经上市的抗OP药物在临床治疗中表现出了良好的疗效,但大多数药物有不良反应,难以实现长期用药;MAFLD易发生于肥胖者、T2D患者和高脂血症患者等,Resmetirom成为目前唯一获得FDA批准用于治疗NASH的药物;但目前没有能同时治疗MAFLD和OP的药物。本研究证明RUT能够同时改善MAFLD和OP,具有良好的应用前景。

**作者贡献:** 司书毅、唐琳、林燕、许艳妮、张煜皓和李依宁构思并设计整体实验,并进行论文修改工作;张煜皓、李依宁和林燕进行了体内的主要动物实验、数据分析、论文撰写工作;姜新海、王伟志、李顺旺、盛任、王晶锐和魏欣玮参与动物实验;雷丽娟和张语嫣参与数据分析。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10: 284-296.
- [2] Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease [J]. *Hepatology*, 2018, 67: 123-133.
- [3] Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49: 197-211.
- [4] Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, 16: 421-427.
- [5] Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou ZA, et al. Postmenopausal osteoporosis coexisting with other metabolic diseases: treatment considerations [J]. *Maturitas*, 2021, 147: 19-25.
- [6] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, et al. A reference standard for the description of osteoporosis [J]. *Bone*, 2008, 42: 467-475.
- [7] GBD 2019 Fracture Collaborators. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2021, 2: e580-e592.
- [8] Guzon-Illescas O, Perez Fernandez E, Crespi Villarias N, et al. Mortality after osteoporotic hip fracture: incidence, trends, and associated factors [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14: 203.
- [9] Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158: 1999-2014.
- [10] Tao J, Li H, Wang H, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and osteoporosis: the mechanisms and roles of adiposity [J]. *Osteoporos Int*, 2024, 35: 2087-2098.
- [11] Vachliotis ID, Anastasiakis AD, Goulas A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and osteoporosis: a potential association with therapeutic implications [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2022, 24: 1702-1720.
- [12] Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition [J]. *Cell*, 2022, 185: 746.
- [13] Li D, Huang Z, Xu X, et al. Promising derivatives of rutaecarpine with diverse pharmacological activities [J]. *Front Chem*, 2023, 11: 1199799.
- [14] Qin R, Zhao Q, Han B, et al. Indole-based small molecules as potential therapeutic agents for the treatment of fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 845892.
- [15] Jia S, Hu C. Pharmacological effects of rutaecarpine as a cardiovascular protective agent [J]. *Molecules*, 2010, 15: 1873-1881.
- [16] Li X, Ge J, Zheng Q, et al. Evodiamine and rutaecarpine from *Tetradium ruticarpum* in the treatment of liver diseases [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153180.
- [17] Tian KM, Li JJ, Xu SW. Rutaecarpine: a promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu) [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 541-550.
- [18] Xu Y, Liu Q, Xu Y, et al. Rutaecarpine suppresses atherosclerosis in *ApoE<sup>-/-</sup>* mice through upregulating ABCA1 and SR-BI within RCT [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55: 1634-1647.
- [19] Luo J, Wang X, Jiang X, et al. Rutaecarpine derivative R3 attenuates atherosclerosis via inhibiting NLRP3 inflammasome-related inflammation and modulating cholesterol transport [J]. *FASEB J*, 2020, 34: 1398-1411.
- [20] Li Y, Han X, Wang W, et al. Rutaecarpine exerted anti-osteoporosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 511-519.
- [21] Kong W, Li Y, Jiang J. Biological principles for "homotherapy for heteropathy" [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59:

- 269-278.
- [22] Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions [J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59: 99-107.
- [23] Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system [J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39: 2-11.
- [24] Si J, Wang C, Zhang D, et al. Osteopontin in bone metabolism and bone diseases [J]. *Med Sci Moni*, 2020, 26: e919159.
- [25] Lu K, Shi TS, Shen SY, et al. Defects in a liver-bone axis contribute to hepatic osteodystrophy disease progression [J]. *Cell Metab*, 2022, 34: 441-457.
- [26] Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis *versus* adipogenesis: implications for targeted therapies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13: 593-603.
- [27] Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1066-1079.
- [28] Cabrera D, Cabello-Verrugio C, Solís N, et al. Somatotrophic axis dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease: beneficial hepatic and systemic effects of hormone supplementation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1339.
- [29] Liu JM, Zhao HY, Ning G, et al. IGF-1 as an early marker for low bone mass or osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women [J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26: 159-164.
- [30] Srikanthan P, Crandall CJ, Miller-Martinez D, et al. Insulin resistance and bone strength: findings from the study of midlife in the United States [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29: 796-803.
- [31] Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Vitamin D supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: present and future [J]. *Nutrients*, 2017, 9: 1015.
- [32] Choi JH, Jin SW, Lee GH, et al. Rutaecarpine protects against acetaminophen-induced acute liver injury in mice by activating antioxidant enzymes [J]. *Antioxidants*, 2021, 10: 86.
- [33] Jin SW, Hwang YP, Choi CY, et al. Protective effect of rutaecarpine against t-BHP-induced hepatotoxicity by upregulating antioxidant enzymes *via* the CaMKII-Akt and Nrf2/ARE pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 100: 138-148.
- [34] Liu X, Zhang Y, Chu Y, et al. The natural compound rutaecarpine promotes white adipocyte browning through activation of the AMPK-PRDM16 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 545: 189-194.
- [35] Nie XQ, Chen HH, Zhang JY, et al. Rutaecarpine ameliorates hyperlipidemia and hyperglycemia in fat-fed, streptozotocin-treated rats *via* regulating the IRS-1/PI3K/Akt and AMPK/ACC2 signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37: 483-496.
- [36] Surbala L, Singh CB, Devi RV, et al. Rutaecarpine exhibits anti-diabetic potential in high fat diet-multiple low dose streptozotocin induced type 2 diabetic mice and *in vitro* by modulating hepatic glucose homeostasis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 143: 307-314.
- [37] Song XM, Li BJ, Zhang YY, et al. Rutaecarpine enhances the anti-diabetic activity and hepatic distribution of metformin *via* up-regulation of Oct1 in diabetic rats [J]. *Xenobiotica*, 2021, 51: 818-830.
- [38] Fukuma Y, Sakai E, Komaki S, et al. Rutaecarpine attenuates osteoclastogenesis by impairing macrophage colony stimulating factor and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand-stimulated signalling pathways [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45: 863-865.
- [39] Ali D, Okla M, Abuelreich S, et al. Apigenin and rutaecarpine reduce the burden of cellular senescence in bone marrow stromal stem cells [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1360054.
- [40] Xu JJ, Li HD, Wu MF, et al. 3-B-RUT, a derivative of RUT, protected against alcohol-induced liver injury by attenuating inflammation and oxidative stress [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107471.
- [41] Guo B, Zhao C, Zhang C, et al. Elucidation of the anti-inflammatory mechanism of Er Miao San by integrative approach of network pharmacology and experimental verification [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106000.