

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research通拉嘎-5 调控 PINK1/Parkin 通路介导自噬
对骨质疏松小鼠骨代谢的研究Research of Tonglagat - 5 regulating PINK1/Parkin pathway - mediated autophagy
on bone metabolism in osteoporotic mice

包乌云毕力格, 图布新

(内蒙古民族大学 附属医院 骨病科, 内蒙古自治区
通辽 028000)

BAO Wu - yun - bi - li - ge,

TU Bu - xin

(Department of Orthopedics and
Traumatology, Affiliated Hospital of Inner
Mongolia University for Nationalities,
Tongliao 028000, Inner Mongolia
Autonomous Region, China)基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助项目
(2020MS08101); 中西医结合骨病
临床医学研究中心开放课题资助项目
(2024FYKF041)作者简介: 包乌云毕力格(1980 -), 男, 主治医师,
主要从事骨科相关的工作

通信作者: 图布新, 副主任医师

MP: 13624753886

E - mail: Tubuxin361@163.com

摘要:目的 基于同源性磷酸酶张力蛋白诱导的激酶 1 (PINK1)/Parkin 介导的线粒体自噬探讨蒙药通拉嘎-5 对骨质疏松症(OP)小鼠骨微结构和骨代谢的影响,及其作用机制。方法 通过卵巢切除(OVX)法构建 OP 小鼠模型。将 OP 模型小鼠随机分为模型组(灌胃等体积 0.9% NaCl)、对照组(灌胃 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊酸雌二醇)、实验组(灌胃 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎-5 溶液)和联合组(灌胃 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎-5 溶液 + 腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Mdivi-1), 每组 10 只;另取 10 只正常小鼠作为假手术组(灌胃等体积 0.9% NaCl)。5 组小鼠在连续给药 10 周后,用 Micro-CT 检测组织矿物质密度(BMD),用试剂盒检测骨代谢标志物 [I 型胶原 C 末端肽(CTX-I)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)]水平,用蛋白质印迹法检测线粒体外膜转运酶 20(Tomm20)、p62、染色体 10 上删除的磷酸酶和 Tensin 同源物诱导激酶 1 (PINK1)和 Parkin 蛋白的表达水平。结果 假手术组、模型组、对照组、实验组和联合组的 BMD 分别为 (0.23 ± 0.02) 、 (0.09 ± 0.01) 、 (0.22 ± 0.03) 、 (0.23 ± 0.01) 和 $(0.11 \pm 0.02) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-3}$, CTX-I 水平分别为 (14.58 ± 1.22) 、 (26.62 ± 2.04) 、 (16.44 ± 2.31) 、 (12.31 ± 1.98) 和 $(22.76 \pm 2.52) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, ALP 水平分别为 (4.87 ± 1.12) 、 (1.41 ± 1.10) 、 (3.03 ± 1.07) 、 (4.44 ± 1.15) 和 $(2.05 \pm 1.41) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, BGP 水平分别为 (9.35 ± 1.06) 、 (5.28 ± 0.84) 、 (7.76 ± 0.35) 、 (8.34 ± 0.87) 和 $(6.12 \pm 0.81) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, Tomm20 蛋白相对表达水平分别为 0.93 ± 0.08 、 0.10 ± 0.01 、 0.37 ± 0.03 、 0.84 ± 0.06 和 0.28 ± 0.03 , p62 蛋白相对表达水平分别为 0.15 ± 0.02 、 0.93 ± 0.09 、 0.65 ± 0.06 、 0.37 ± 0.04 和 0.86 ± 0.06 , PINK1 蛋白相对表达水平分别为 0.87 ± 0.09 、 0.14 ± 0.02 、 0.32 ± 0.03 、 0.69 ± 0.06 和 0.26 ± 0.03 , Parkin 蛋白相对表达水平分别为 0.79 ± 0.08 、 0.12 ± 0.02 、 0.26 ± 0.04 、 0.58 ± 0.05 和 0.23 ± 0.03 。实验组、对照组和假手术组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 通拉嘎-5 能够改善 OVX 小鼠的骨微结构和骨代谢,减少骨质流失,其机制可能与激活 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬来发挥骨保护作用有关。

关键词: 通拉嘎-5; 骨质疏松症; 线粒体自噬; 骨代谢

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.08.013

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)08-1119-07

Abstract: Objective To investigate the effects of Tonglagat - 5, a Mongolian drug, on bone microstructure and bone metabolism in osteoporotic mice, and to explore the possible mechanisms of action based on phosphatase and tensin homologue - induced kinase 1 (PINK1)/Parkin - mediated mitophagy. **Methods** Osteoporotic mouse model was established by ovariectomy (OVX). Osteoporotic model mice were

randomly divided into model group (equal volume 0.9% NaCl by gavage), control group (estradiol valerate 1 mg · kg⁻¹ by gavage), experimental group (0.05 g · kg⁻¹ Tonglagat-5 solution by gavage) and combined group (0.05 g · kg⁻¹ Tonglagat-5 solution by gavage + 50 mg · kg⁻¹ Mdivi-1 by intraperitoneal injection), with 10 mice per group; ten mice were randomly selected as the sham-operation group. After 10 consecutive weeks of treatment, the bone mineral density (BMD) was measured by Micor-CT assay, the bone metabolism marker assay [C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I), alkaline phosphatase (ALP) and bone Gla-protein (BGP)] were detected by kit, and the protein expression levels of translocase of outer mitochondrial membrane 20 (Tomm20), p62, PINK1 and Parkin were performed by Western blot. **Results** The BMD in the sham-operation, model, control, experimental and combined groups were (0.23 ± 0.02), (0.09 ± 0.01), (0.22 ± 0.03), (0.23 ± 0.01) and (0.11 ± 0.02) g · mm⁻³; the levels of CTX-I were (14.58 ± 1.22), (26.62 ± 2.04), (16.44 ± 2.31), (12.31 ± 1.98) and (22.76 ± 2.52) ng · mL⁻¹; the levels of ALP were (4.87 ± 1.12), (1.41 ± 1.10), (3.03 ± 1.07), (4.44 ± 1.15) and (2.05 ± 1.41) U · L⁻¹; the levels of BGP were (9.35 ± 1.06), (5.28 ± 0.84), (7.76 ± 0.35), (8.34 ± 0.87) and (6.12 ± 0.81) ng · mL⁻¹; the relative expression levels of Tomm20 protein were 0.93 ± 0.08, 0.10 ± 0.01, 0.37 ± 0.03, 0.84 ± 0.06 and 0.28 ± 0.03; the relative expression levels of p62 protein were 0.15 ± 0.02, 0.93 ± 0.09, 0.65 ± 0.06, 0.37 ± 0.04 and 0.86 ± 0.06; the relative expression levels of PINK1 protein were 0.87 ± 0.09, 0.14 ± 0.02, 0.32 ± 0.03, 0.69 ± 0.06 and 0.26 ± 0.03; the relative expression levels of Parkin protein were 0.79 ± 0.08, 0.12 ± 0.02, 0.26 ± 0.04, 0.58 ± 0.05 and 0.23 ± 0.03, respectively. The above indexes in model group were compared those in sham-operation, control and experimental groups, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Tonglagat-5 is able to improve bone microstructure and bone metabolism and reduce bone loss in OVX mice, and the mechanism may be related to the activation of PINK1/Parkin pathway-mediated mitophagy to exert osteoprotective effects.

Key words: Tonglagat-5; osteoporosis; mitophagy; bone metabolism

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨脆性增加、骨折概率高、骨小梁减少、骨微结构破坏为特征的全身性代谢性疾病,其发病风险和患病率不断上升^[1]。OP在蒙医属“骨枯症”,健脾养胃、改善消化、增强胃火、促进吸收是其治疗关键^[2]。蒙药通拉嘎-5出自《至高药方》,由石榴、肉桂、豆蔻、荜茇、红花配合而成,能够阻止维A酸导致的骨矿物丢失和骨组织纤维结构的改变,可能对骨质疏松有一定的干预作用^[3]。线粒体自噬参与调控OP,且可能与同源性磷酸酶张力蛋白诱导的激酶1(pho-snhataase and tensin-homologue-induced kinase 1, PINK1)/Parkin信号通路有关^[4]。本研究通过构建卵巢切除(ovariectomy, OVX)OP小鼠模型,旨在探讨通拉嘎-5对OP小鼠骨微结构和骨代谢的影响,并基于PINK1/Parkin介导的线粒体自噬探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 雌性清洁级C57BL/6小鼠,鼠龄8周,体重20~23 g,购自布林凯斯(深圳)生物技术有限公

司。动物许可证号:SYXK(粤)2024-0354。本实验经内蒙古民族大学附属医院动物伦理委员会批准(伦理批号:NM-LL-2024-06-20-01)。

药品与试剂 石榴,批号:221115,产地:山东枣庄,四川和顺康药业有限公司生产;肉桂,批号:230601,产地:广西苍梧县,四川秦巴本草药业有限公司生产;荜茇,批号:C066231201,产地:云南临沧,成都欣福源中药饮片有限公司生产;豆蔻,批号:231101,产地:广西柳州,红花,批号:230901,产地:河南商丘,均由四川省卓宇制药有限公司生产;上述中药材均经内蒙古民族大学蒙药生药教研室布和巴特尔教授鉴定为正品。线粒体自噬抑制药Mdivi-1,规格:每瓶50 mg,批号:HY-15886, MCE生物科技有限公司生产。I型胶原C末端肽(C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-I)、骨钙素(bone Gla-protein, BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒,均由南京建成生物工程研究所生产;骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP2)、Runx2、线粒体外膜转运酶20(translocase of outer mitochondrial membrane 20,

Tomm20)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule - associated protein light chain 3, LC3)、p62、染色体 10 上删除的磷酸酶和 Tensin 同源物诱导激酶 1 (phosphatase and tensin homologue - induced kinase 1, PINK1)、Parkin 抗体,均购自美国 Abcam 公司。引物,均由北京博尔迈生物技术有限公司设计合成。

仪器 ABI 7500 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real - time polymerase chain reaction, RT - PCR) 系统,美国 Applied Biosystems 公司产品; SkyScan - 1176 小动物活体 Micro - CT 影像系统,德国 Bruker 公司产品; HX53 正置荧光显微镜,日本奥林巴斯公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

取石榴皮 8 g、红花 4 g、肉桂 1 g、豆蔻 1 g 和萆薢 1 g,加入蒸馏水 200 mL 煎成药液,浓缩配制成含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,过滤后分装,置于 4°C 冰箱中保存,备用。

2.2 模型构建

参照文献[5]的方法,用双侧 OVX 法构建 OP 小鼠模型。小鼠经 2% 戊巴比妥钠麻醉后,切除双侧卵巢。假手术组小鼠只切除卵巢附近的脂肪组织。术后连续 3 d 以青霉素 $5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量进行肌内注射。

2.3 动物分组与给药方法

手术 1 周后,将 OP 模型小鼠随机分为模型组、对照组、实验组和联合组,每组 10 只;另取 10 只正常小鼠作为假手术组。对照组灌胃给予 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊酸雌二醇,每天 1 次^[6];实验组灌胃给予 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎 - 5 溶液,每天 1 次^[7];联合组灌胃给予 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎 - 5 溶液,每天 1 次 + 腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Mdivi - 1,每天 1 次,每周 5 次^[8];假手术组和模型组均灌胃给予等体积 0.9% NaCl。5 组小鼠均连续给药 10 周。末次给药后禁食 12 h,过量麻醉后,取腹主动脉血,左侧和右侧股骨。

2.4 Micro - CT 检测左侧股骨骨微结构^[9]

取左侧股骨用于骨微结构分析。用高分辨率 Micro - CT 对远端干骺端进行扫描。Micro - CT 系统软件对小梁结构进行分析并进行三维重建,记录骨小梁数量 (trabecular number, Tb. N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁分离度 (trabecular spacing, Tb. Sp)、骨体积/组织体积 (bone volume/total volume, BV/TV) 和组织矿物质密度 (bone mineral density, BMD) 等参数。参数检测条件:电压 80 kV,电流 100 μA ,图像矩阵 $13\% \times 2\,000$ 。

2.5 组织学分析和免疫组织化学分析法检测股骨组织形态及 LC3 和 Tomm20 蛋白的表达水平^[10]

股骨组织在 Micro - CT 检测完成后,用 10% 乙二胺四乙酸进行脱钙处理,为期 30 d。脱钙溶液每 3 d 更换 1 次,在换液过程中检查骨组织的脱钙情况。待骨组织软化后,将股骨组织置于梯度乙醇中脱水后,用二甲苯处理至透明。随后,将股骨组织包埋于石蜡中,制成 $6 \mu\text{m}$ 的切片。用二甲苯对石蜡切片进行脱蜡后,用梯度乙醇脱水。根据相应试剂盒,用苏木精 - 伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色法检查骨组织形态,用免疫组织化学法评估骨组织线粒体自噬情况 (LC3 和 Tomm20)。于光学显微镜下观察染色切片,用 Image - Pro Plus 软件确定每个样本中阳性染色区域的平均光密度值 (average optical density, AOD)。

2.6 试剂盒检测骨代谢指标的水平^[11]

小鼠腹主动脉取血,以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清,置于 -20°C 保存,待测。严格按照试剂盒说明书的步骤进行操作,检测血清中 CTx - I、骨钙素、TRAP 和 ALP 的水平。

2.7 RT - PCR 法检测 mRNA 的表达水平^[12]

用 TRIzol 试剂从股骨组织中分离总 RNA。用 iScript cDNA 合成试剂盒从提取的 RNA 中合成 cDNA,并进行逆转录。用 SYBR Green PCR Master mix 试剂盒检测基因的表达情况。用 RT - PCR 系统进行扩增,扩增程序设置如下: 95°C 预变性 5 min; 95°C 30 s、 60°C 30 s、 72°C 30 s,循环 40 次; 72°C 延伸 6 min。以甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法评估基因的相对表达水平。

2.8 蛋白质印迹法检测蛋白的表达水平^[13]

取各组大鼠右侧股骨,研磨后,在冷的放射免疫沉淀分析裂解缓冲液中匀浆 10 min,用高速离心法获得总蛋白。经 BCA 法测定进行定量后,取蛋白 30 μg 在 10% 或 12% 硫酸盐 - 聚丙烯酰胺凝胶上电泳 2 h,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上电泳约 1.5 h。在含 Tween 20 的 TBS 中洗涤 3 次后,将膜浸泡在一抗中,于 4°C 下孵育 8 h。在 37°C 下与二抗共孵育 1.5 h 后,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,用增强化学发光试剂盒和 Amersham Imager 600 分析膜上蛋白条带的灰度。

3 统计学处理

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析 (one - way analysis of variance, ANOVA) 分析,组间两两比较用最

小显著性差异法(least significant difference, LSD 法)。

结 果

1 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠骨微结构的影响

实验组给予 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎-5 溶液;对照组给予 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊酸雌二醇;联合组给予 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通拉嘎-5 溶液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Mdivi-1;假手术组和模型组均给予等体积 0.9% NaCl。

Micro-CT 分析显示:模型组与假手术组相比,小鼠 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 均明显降低,而 Tb. Sp 明显升高(均 $P < 0.05$);实验组和对照组小鼠 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 均较模型组明显升高,而 Tb. Sp 均较模型组明显降低(均 $P < 0.05$);联合组与实验组相比,小鼠 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 均明显降低,而 Tb. Sp 明显升高(均 $P < 0.05$)。结果见表 1。

2 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠股骨组织形态的影响

HE 染色显示:假手术组小鼠股骨组织结构正常,骨小梁厚度均匀、结构完整,骨细胞形态清晰。相较于假手术组,模型组可观察到松质骨结构改变,股骨组织干骺端骨小梁数减少,结构破坏严重,骨小梁变薄,部分骨小梁明显细长或断裂,连接不完整,且间隙变宽。相较于模型组,对照组和实验组骨组织形态损伤有所减轻。结果见图 1。

3 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠血清骨转换生化指标的影响

模型组与假手术组相比,小鼠血清中 TRAP 和 CTx-I 水平均明显升高,ALP 和 BGP 水平均明显降低(均 $P < 0.05$);实验组和对照组小鼠血清中 TRAP 和 CTx-I 水平均较模型组明显降低,ALP 和 BGP 水平均较模型组明显升高(均 $P < 0.05$);联合组与实验组相比,小鼠血清中 TRAP 和 CTx-I 水平均明显升高,ALP 和 BGP 水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。结果见表 2。

4 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠股骨组织成骨分化标志蛋白表达的影响

实验组、对照组、联合组、模型组和假手术组股骨组织中 BMP2 蛋白相对表达水平分别为 0.89 ± 0.06 、 0.32 ± 0.03 、 0.28 ± 0.03 、 0.15 ± 0.02 和 0.96 ± 0.08 , Runx2 蛋白相对表达水平分别为 0.67 ± 0.04 、 0.26 ± 0.03 、 0.22 ± 0.02 、 0.11 ± 0.01 和 0.85 ± 0.06 。模型组与假手术组相比,小鼠股骨组织中 BMP2 和 Runx2 蛋白相对表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$);实验组和对照组股骨组织中 BMP2 和 Runx2 蛋白相对表达水平均较模型组明显升高(均 $P < 0.05$);联合组与实验组相比,小鼠股骨组织中 BMP2 和 Runx2 蛋白相对表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。

5 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠股骨组织 Tomm20 和 LC3 阳性表达的影响

实验组、对照组、联合组、模型组和假手术组股骨

表 1 各组小鼠骨密度和股骨远端骨小梁参数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of bone mineral density and trabecular bone parameters of the distal femur of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	BMD ($\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$)	BV/TV (%)	Tb. N ($\cdot \text{mm}^{-1}$)	Tb. Th (μm)	Tb. Sp (mm)
Sham-operation	10	0.23 ± 0.02	13.57 ± 1.78	2.16 ± 0.23	43.51 ± 1.21	0.21 ± 0.04
Model	10	$0.09 \pm 0.01^*$	$5.12 \pm 0.93^*$	$0.93 \pm 0.11^*$	$30.32 \pm 1.03^*$	$0.96 \pm 0.16^*$
Control	10	$0.22 \pm 0.03^{\#}$	$10.84 \pm 1.16^{\#}$	$1.87 \pm 0.17^{\#}$	$38.25 \pm 1.42^{\#}$	$0.33 \pm 0.03^{\#}$
Experimental	10	$0.23 \pm 0.01^{\#}$	$12.36 \pm 1.42^{\#}$	$2.02 \pm 0.25^{\#}$	$40.36 \pm 2.06^{\#}$	$0.24 \pm 0.04^{\#}$
Combined	10	$0.11 \pm 0.02^{\Delta}$	$7.06 \pm 0.95^{\Delta}$	$1.03 \pm 0.14^{\Delta}$	$31.79 \pm 2.52^{\Delta}$	$0.78 \pm 0.12^{\Delta}$

BMD: Bone mineral density; BV/TV: Bone volume/total volume; Tb. N: Trabecular number; Tb. Th: Trabecular thickness; Tb. Sp: Trabecular spacing; Sham-operation group: 0.9% NaCl; Model group: 0.9% NaCl; Control group: $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ estradiol valerate; Experimental group: $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Tonglagat-5 solution; Combined group: $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Tonglagat-5 solution + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ mitophagy inhibitor; Compared with sham-operation group, $^* P < 0.05$; Compared with model group, $^{\#} P < 0.05$; Compared with experimental group, $^{\Delta} P < 0.05$.

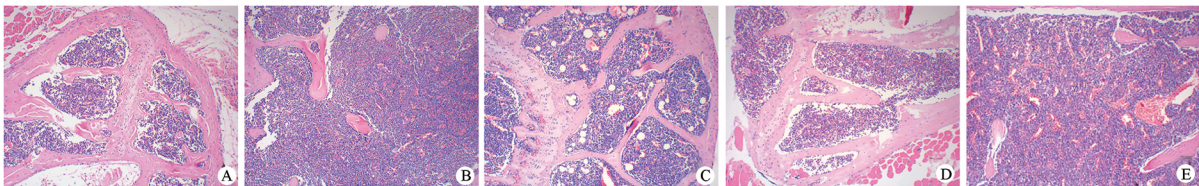


图 1 各组小鼠股骨远端骨组织的苏木精-伊红染色结果($\times 400$)

Figure 1 Results of hematoxylin-eosin staining of bone tissue of distal femur in each group ($\times 400$)

A: Sham-operation group; B: Model group; C: Control group; D: Experimental group; E: Combined group.

表2 各组小鼠骨代谢标志物的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of bone metabolism markers of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	TRAP ($U \cdot L^{-1}$)	CTx - I ($ng \cdot mL^{-1}$)	ALP ($U \cdot L^{-1}$)	BGP ($ng \cdot mL^{-1}$)
Sham - operation	1.65 $\pm$ 0.21	14.58 $\pm$ 1.22	4.87 $\pm$ 1.12	9.35 $\pm$ 1.06
Model	3.73 $\pm$ 0.19 *	26.62 $\pm$ 2.04 *	1.41 $\pm$ 1.10 *	5.28 $\pm$ 0.84 *
Control	2.16 $\pm$ 0.25 #	16.44 $\pm$ 2.31 #	3.03 $\pm$ 1.07 #	7.76 $\pm$ 0.35 #
Experimental	1.87 $\pm$ 0.43 #	12.31 $\pm$ 1.98 #	4.44 $\pm$ 1.15 #	8.34 $\pm$ 0.87 #
Combined	3.28 $\pm$ 0.85 Δ	22.76 $\pm$ 2.52 Δ	2.05 $\pm$ 1.41 Δ	6.12 $\pm$ 0.81 Δ

Dose and n refer to table 1; TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase; CTx - I: Type I collagen cross-linked C-terminal peptide; ALP: Alkaline phosphatase; BGP: Bone Gla protein; Compared with sham-operation group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

组织中线粒体自噬标记蛋白 Tomm20 阳性表达水平分别为 0.28 ± 0.03 、 0.23 ± 0.03 、 0.14 ± 0.01 、 0.11 ± 0.02 和 0.32 ± 0.04 , 自噬标志蛋白 LC3 阳性表达水平分别为 0.26 ± 0.03 、 0.22 ± 0.02 、 0.11 ± 0.01 、 0.10 ± 0.02 和 0.37 ± 0.03 。模型组与假手术组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20 和 LC3 阳性表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$); 实验组和对照组股骨组织中 Tomm20 和 LC3 阳性表达水平均较模型组明显升高(均 $P < 0.05$); 联合组与实验组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20 和 LC3 阳性表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。结果见图 2。

6 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠股骨组织线粒体自噬相关基因表达的影响

模型组与假手术组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20、LC3、PINK1、Parkin mRNA 相对表达水平均明显降低, p62 mRNA 相对表达水平明显升高(均 $P < 0.05$); 实验组和对照组股骨组织中 Tomm20、LC3、PINK1、Parkin mRNA 相对表达水平均较模型组

明显升高, p62 mRNA 相对表达水平均较模型组明显降低(均 $P < 0.05$); 联合组与实验组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20、LC3、PINK1、Parkin mRNA 相对表达水平均明显降低, p62 mRNA 相对表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。结果见表 3。

7 通拉嘎-5 对 OVX 骨质疏松小鼠股骨组织线粒体自噬相关蛋白表达的影响

模型组与假手术组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20、LC3 II/LC3 I、PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均明显降低, p62 蛋白相对表达水平明显升高(均 $P < 0.05$); 实验组和对照组股骨组织中 Tomm20、LC3 II/LC3 I、PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均较模型组明显升高, p62 蛋白相对表达水平明显降低(均 $P < 0.05$); 联合组与实验组相比, 小鼠股骨组织中 Tomm20、LC3 II/LC3 I、PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均明显降低, p62 蛋白相对表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。结果见表 3 和图 3。

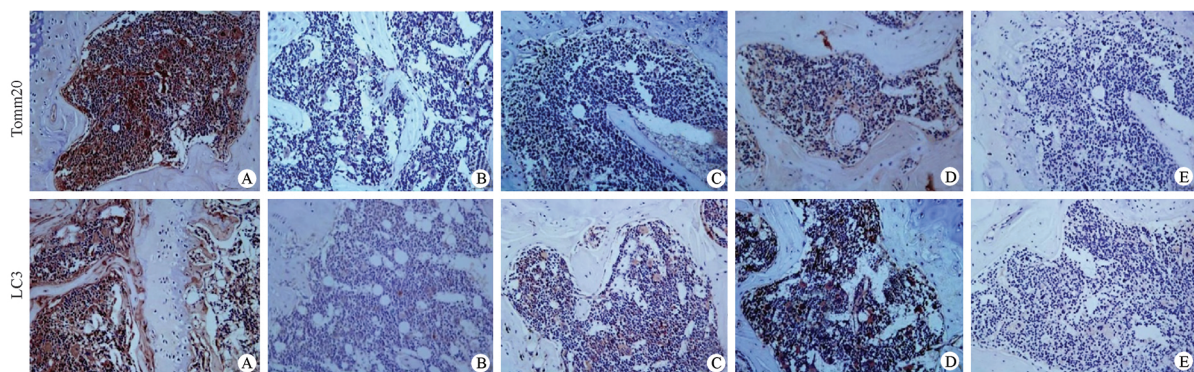


图2 用免疫组织化学染色观察各组小鼠股骨组织中线粒体外膜转运酶 20 (Tomm20) 和微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 阳性表达的情况($\times 400$)

Figure 2 Positive expressions of translocase of outer mitochondrial membrane 20 (Tomm20) and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) in femoral tissues were observed by immunohistochemical staining($\times 400$)

A - E refer to figure 1.

表3 各组小鼠股骨组织中线粒体自噬相关基因和蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the expression levels of mitochondrial autophagy – related genes and proteins in bone and femur tissues of mice in various groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA				
	<i>Tomm20</i>	<i>LC3</i>	<i>p62</i>	<i>PINK1</i>	<i>Parkin</i>
Sham – operation	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
Model	0.26 ± 0.03 *	0.33 ± 0.03 *	2.62 ± 0.11 *	0.31 ± 0.03 *	0.28 ± 0.03 *
Control	0.57 ± 0.04 #	0.52 ± 0.05 #	1.79 ± 0.11 #	0.64 ± 0.06 #	0.54 ± 0.05 #
Experimental	0.93 ± 0.06 #	0.96 ± 0.07 #	1.13 ± 0.09 #	0.97 ± 0.09 #	0.95 ± 0.06 #
Combined	0.34 ± 0.04 Δ	0.45 ± 0.05 Δ	2.06 ± 0.13 Δ	0.52 ± 0.06 Δ	0.42 ± 0.05 Δ

Group	Protein				
	<i>Tomm20</i>	<i>LC3 II/LC3 I</i>	<i>p62</i>	<i>PINK1</i>	<i>Parkin</i>
Sham – operation	0.93 ± 0.08	0.96 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.87 ± 0.09	0.79 ± 0.08
Model	0.10 ± 0.01 *	0.08 ± 0.01 *	0.93 ± 0.09 *	0.14 ± 0.02 *	0.12 ± 0.02 *
Control	0.37 ± 0.03 #	0.53 ± 0.03 #	0.65 ± 0.06 #	0.32 ± 0.03 #	0.26 ± 0.04 #
Experimental	0.84 ± 0.06 #	0.78 ± 0.06 #	0.37 ± 0.04 #	0.69 ± 0.06 #	0.58 ± 0.05 #
Combined	0.28 ± 0.03 Δ	0.12 ± 0.01 Δ	0.86 ± 0.06 Δ	0.26 ± 0.03 Δ	0.23 ± 0.03 Δ

Dose and *n* refer to table 1; PINK1: Phosphatase and tensin homologue – induced kinase 1; Compared with sham – operation group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

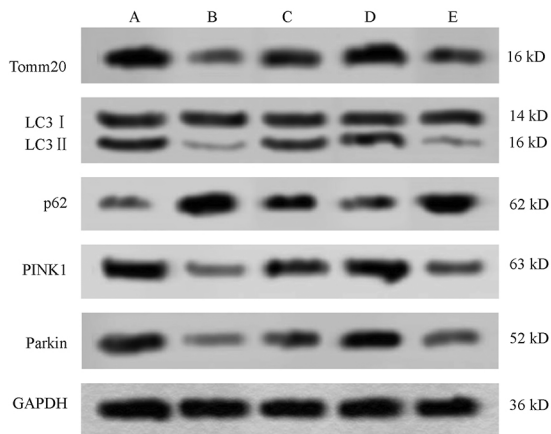


图3 用蛋白质印迹法分析各组小鼠股骨组织中线粒体自噬相关蛋白的表达情况

Figure 3 Expression of mitochondrial autophagy – related proteins in the femoral tissues of mice in various groups analysed by Western blotting

A – E refer to figure 1.

讨 论

通拉嘎-5 作为经典的蒙药复方制剂已被临床用于治疗消化不良、高脂血症等疾病^[14]。研究发现,通拉嘎-5 具有抗骨质疏松的功效^[15]。本研究发现,通拉嘎-5 能够增加 OVX 小鼠骨微结构中的 BMD、BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th, 同时降低 Tb. Sp, 提示通拉嘎-5 能够减轻 OVX 引起的骨微结构破坏和骨量丢失。同时, HE 染色结果发现,通拉嘎-5 能够增加 OVX 小鼠骨小梁数量,促进骨小梁结构恢复。这说明通拉嘎-5

能够提高 OVX 诱导 OP 小鼠的骨密度,改善骨微结构,减少骨质流失。

本研究发现,通拉嘎-5 治疗可以增加骨形成标志物 ALP 和 BGP 的水平,降低骨吸收标志物 CTX-1 和 TRAP 的水平,并诱导骨组织中成骨分化标志物 BMP2 和 Runx2 的表达,提示通拉嘎-5 可以促进 OVX 诱导的 OP 小鼠的骨形成并抑制骨吸收,改善骨代谢。这说明通拉嘎-5 可能通过改善骨代谢来缓解 OVX 小鼠的骨质流失。有证据表明,线粒体自噬水平异常会破坏骨代谢平衡,并在骨相关疾病中发挥关键作用,提示基于线粒体自噬的干预治疗可能是骨相关疾病很有前景的治疗策略^[16-17]。本研究发现,模型组与假手术组相比,小鼠股骨组织中线粒体自噬标记蛋白 Tomm20 阳性表达水平明显降低,自噬蛋白 LC3 II/LC3 I 比值降低而 p62 增加,且线粒体自噬相关蛋白 PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均明显降低,提示 OVX 小鼠股骨组织中线粒体自噬受损,而通拉嘎-5 能够激活 OP 小鼠股骨组织中 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬。同时,本研究发现,线粒体自噬抑制药 3-MA 能够在一定程度上消除通拉嘎-5 对 OP 小鼠骨微结构破坏、骨量丢失和骨代谢失衡的改善作用,并逆转通拉嘎-5 对线粒体自噬的诱导作用。这说明通拉嘎-5 可能通过激活股骨组织中 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬来改善 OVX 小鼠骨代谢。

本研究提示:通拉嘎-5 能够改善 OVX 小鼠的骨微结构和骨代谢,减少骨质流失,其机制可能与激活 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬来发挥骨保护作用有关。

参考文献:

- [1] YONG E L, LOGAN S. Menopausal osteoporosis: Screening, prevention and treatment [J]. *Singapore Med J*, 2021, 62(4): 159—166.
- [2] 赵军, 师建平. 蒙医骨枯症“治以补暖补精, 抑制赫依过刺”理论探微[J]. *西部中医药*, 2021, 34(7): 61—63.
- [3] 特木日巴根, 图布新, 秦雄, 等. 蒙药通拉嘎-5 味丸对维甲酸所致大鼠骨质疏松的干预作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2014, 40(4): 763—767.
- [4] WANG S, DENG Z, MA Y, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2675—2691.
- [5] XIAO L, ZHONG M, HUANG Y, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy - induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS - dependent MAPK/NF - κ B signaling pathways [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 21706—21729.
- [6] GENG Q, GAO H, YANG R, et al. Pyrroloquinoline quinone prevents estrogen deficiency - induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1): 58—68.
- [7] 徐才猛, 董馨, 胡少男, 等. 基于 HPLC - Q - Exactive MS/MS 和分子对接技术的通拉嘎-5 抗绝经后骨质疏松药效物质基础和作用机制研究[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2023, 45(2): 140—144.
- [8] MIZUMURA K, CLOONAN S M, NAKAHIRA K, et al. Mitophagy - dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3987—4003.
- [9] 郭中华, 史栋梁, 曹玉举, 等. 柴胡皂苷 A 通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路对骨质疏松症大鼠发挥保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(22): 2500—2506.
- [10] 赵军, 李昕, 谢静华, 等. 蒙药蓝刺头对去卵巢大鼠 BMD、E₂ 及股骨头 CYP450 的作用[J]. *西部中医药*, 2022, 35(4): 21—24.
- [11] 冯阳阳, 常宝生, 赵程锦, 等. 芹菜素调节绝经后骨质疏松症大鼠骨吸收与骨形成稳态的作用[J]. *热带医学杂志*, 2023, 23(9): 1203—1211, 1178.
- [12] 侯天泽, 易双双, 张志群, 等. 秋石斛 RT - qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. *园艺学报*, 2022, 49(11): 2489—2501.
- [13] 郭文文, 袁圆, 王浩, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体在肾缺血 - 再灌注损伤中的保护作用及其机制研究[J]. *器官移植*, 2023, 14(3): 371—378.
- [14] 陶古斯, 李英格, 奥乌力吉, 等. 蒙药通拉嘎-5 的研究概况及展望[J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2014, 29(3): 333—335.
- [15] 秦雄, 韩巴根那, 马瑞瑞. 蒙药加减通拉嘎-5 对维甲酸所致大鼠骨质疏松的治疗作用[J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2014, 29(1): 74—76.
- [16] LU X, ZHANG Y, ZHENG Y, et al. The miRNA - 15b/USP7/KDM6B axis engages in the initiation of osteoporosis by modulating osteoblast differentiation and autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 2069—2081.
- [17] 邓豪, 夏志, 尚画雨. TANK 结合激酶 1 在 PINK1/Parkin 依赖性和非依赖性线粒体自噬中的作用研究进展[J]. *生理学报*, 2024, 76(1): 161—172. (收稿日期 2024 - 10 - 07)

· 科学文摘 ·

药物涂层球囊血管成形术后抗栓新策略——
逐级双联抗血小板降阶策略

引自: GAO C, et al. Stepwise dual antiplatelet therapy de - escalation in patients after drug coated balloon angioplasty (REC - CAGEFREE II): Multicentre, randomised, open label, assessor blind, non - inferiority trial [J/OL]. *BMJ*, 2025, 388:e082945. 2025 - 03 - 31 [2025 - 04 - 04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40164448/>.

GAO 等评估了是否可以接受药物包覆气球治疗的患者用较低强度的抗血小板治疗方案。REC - CAGEFREE II 试验按多中心、随机、开放标签、评估盲、非劣效性试验设计。该研究共纳入 2021 - 11 - 27—2023 - 01 - 21 来自中国 41 个研究中心的 1 948 例药物球囊植入成功的急性冠状动脉综合征患者, 其中 975 例被随机分配至逐级降阶组, 973 例分配至标准组。研究主要终点为 12 个月内发生的不良临床事件, 包括全因死亡、卒中、心肌梗死、血运重建、出血学术联盟(Bleeding Academic Research Consortium, BARC)定义的 3 型或 5 型出血事件。

受试者平均年龄为 59.2 岁, 男性占 74.9%, 30.5% 有糖尿病病史, 冠心病介入或心肌梗死病史分别占 32.2% 和 13.2%, 高出血风险人群占 20.6%。在病变类型中, 17.8% 为支架内再狭窄, 42.7% 为分叉病变, 60.9% 为小血管病变。该研究中共有 99.3% 的受试者完成了 12 个月随访。逐步降级组和标准组分别有 87 例(8.9%) 和 84 例(8.6%) 者达到主要终点(组间差异为 0.36%, 单侧 95% 置信区间为 2.47%, $P_{\text{非劣效性}} < 0.05$), 达到了统计学非劣效。逐级降阶组和标准组的 BARC 3 型或 5 型出血率分别为 0.4% 和 1.6% (组间差异为 -1.19%, 95% 置信区间为 -2.07 ~ -0.31, $P < 0.01$), 全因死亡、卒中、心肌梗死和血运重建导致的复合事件率分别为 8.6% 和 7.6% (组间差异为 1.05%, 95% 置信区间为 -1.37 ~ 3.47, $P > 0.05$)。

该研究提示: 在可以仅用药物涂层球囊治疗的急性冠状动脉综合征受试者中, 对于不良临床事件, 逐级双抗降阶治疗的临床疗效不劣于 12 个月双抗降阶治疗。