

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00857

运动联合阿仑膦酸钠片对去卵巢大鼠 RANKL/OPG 平衡及 MAPK 信号通路的影响

邝志强¹, 张荣华^{2*}

1. 暨南大学附属第一医院康复科, 广州 510630

2. 暨南大学药学院中药学教研室, 广州 510630

[摘要] **目的** 观察运动联合阿仑膦酸钠片(Aln)对去卵巢(OVX)大鼠核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)表达及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响。**方法** 90只6月龄雌性SD大鼠随机分为假手术组(sham组)、OVX组、Aln治疗组(OVX+Aln组)、运动治疗组(OVX+EX组)、Aln与运动联合治疗组(OVX+Aln+EX组),每组18只,后4组大鼠切除双侧卵巢。大鼠切除卵巢8周后,各治疗组大鼠分别进行1 mg/(kg·d) Aln灌胃和(或)跑台运动干预。干预12周后采用双能X线骨密度仪检测大鼠左、右股骨骨密度(BMD),ELISA法检测大鼠血清RANKL、OPG含量,real-time PCR检测大鼠骨组织RANKL、OPG mRNA表达,蛋白质印迹分析法检测骨组织c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38 MAPK(p38)、细胞外调节激酶(ERK)的磷酸化水平及c-Fos表达。**结果** 干预治疗12周后:(1)与sham组相比,OVX组大鼠左、右股骨BMD降低($P < 0.05$),血清RANKL含量增加、OPG含量降低、RANKL/OPG比值增大(P 均 < 0.05),骨组织RANKL mRNA表达增加、OPG mRNA表达减少(P 均 < 0.05)。(2)与OVX组相比,OVX+Aln组、OVX+EX组及OVX+Aln+EX组大鼠左、右股骨BMD均增加(P 均 < 0.05),血清RANKL含量降低、OPG含量增加、RANKL/OPG比值减小(P 均 < 0.05),骨组织RANKL mRNA表达减少、OPG mRNA表达增加(P 均 < 0.05)。(3)与OVX+Aln组和OVX+EX组相比,OVX+Aln+EX组大鼠左、右股骨BMD,血清RANKL、OPG含量,骨组织RANKL、OPG mRNA表达差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。(4)与sham组相比,OVX组大鼠骨组织p-JNK、c-Fos表达增加(P 均 < 0.05);OVX+Aln组、OVX+EX组及OVX+Aln+EX组与OVX组相比,大鼠骨组织p-JNK、c-Fos表达降低(P 均 < 0.05),但3组间表达差异无统计学意义;p-p38、p-ERK在各组间的表达差异无统计学意义。**结论** 运动联合Aln治疗能够提高OVX大鼠左、右股骨骨密度,其作用可能与调节RANKL/OPG平衡、抑制JNK磷酸化及c-Fos表达有关。

[关键词] 运动;阿仑膦酸钠;骨质疏松;骨保护素

[中图分类号] R 681.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)08-0857-07

Effects of exercise combined with alendronate sodium tablets on RANKL/OPG balance and MAPK signaling pathways in ovariectomized rats

KUANG Zhi-qiang¹, ZHANG Rong-hua^{2*}

1. Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of exercise combined with alendronate sodium tablets (Aln) on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) expression and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** A total of 90 6-month-old female SD rats were evenly randomized into sham group, OVX group, Aln treatment (OVX+Aln) group, exercise therapy (OVX+EX) group, and Aln combined with exercise treatment (OVX+Aln+EX) group. Eight weeks after ovariectomy, rats in the latter three groups were treated with intragastric 1 mg/(kg·d) Aln and/or exercise. After 12 weeks of treatment, dual-energy X-ray absorptiometry was used to examine the bone mineral density (BMD) of the left and right femurs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the serum levels of RANKL and OPG. Real-time PCR was used to examine RANKL and OPG mRNA expression in bone tissues. Western blotting analysis was used to examine the phosphorylation of c-Jun N-terminal

[收稿日期] 2013-03-20

[接受日期] 2013-05-07

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2011010004581). Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011010004581).

[作者简介] 邝志强, 博士, 主治医师. E-mail: 2571561078@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 020-85220023, E-mail: tzhzrh@jnu.edu.cn

kinase (JNK), p38 MAPK (p38), extracellular-regulated kinase (ERK), and c-Fos protein expression in bone tissues.

Results The following results were observed after 12-week treatment. (1) Compared with sham group, the BMD values of the left and right femurs were significantly decreased in OVX group ($P < 0.05$). The serum RANKL level was significantly increased, serum OPG level was significantly decreased, and the RANKL/OPG ratio was significantly increased (all $P < 0.05$). The RANKL mRNA expression was significantly increased and OPG mRNA expression was significantly decreased in bone tissues (all $P < 0.05$). (2) Compared with OVX group, the BMD values of left and right femurs of OVX+Aln, OVX+EX and OVX+Aln+EX groups were significantly increased (all $P < 0.05$). The serum RANKL level was significantly decreased, serum OPG level was significantly increased, and the RANKL/OPG ratio decreased (all $P < 0.05$). The RANKL mRNA expression was significantly decreased, and OPG mRNA expression was significantly increased in bone tissues (all $P < 0.05$). (3) The femoral BMD values, serum RANKL and OPG levels, and RANKL and OPG mRNA expression in bone tissues in OVX+Aln+EX group were significantly different from those in OVX+Aln group and OVX+EX group (all $P < 0.05$). (4) Compared with sham group, bone tissue p-JNK and c-Fos expression in OVX group was significantly increased (all $P < 0.05$). However, compared with OVX group, bone tissue p-JNK and c-Fos expression in OVX+Aln, OVX+EX and OVX+Aln+EX groups was significantly decreased (all $P < 0.05$), and there were no significant differences among the latter three groups. p-p38 and p-ERK expression was similar in all groups. **Conclusion** Exercise combined with Aln can improve the BMD values of left and right femurs in OVX rats, which may be related to the regulation of RANKL/OPG balance and inhibition of JNK phosphorylation and c-Fos expression.

[Key words] exercise; alendronate sodium; osteoporosis; osteoprotegerin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8): 857-863]

阿仑膦酸钠片(alendronate sodium tablet, Aln; 商品名:福善美)是临床中应用最广的骨吸收抑制剂。临床研究显示,Aln能够抑制骨转换,并增加腰椎、全髋关节、股骨颈的骨密度(bone mineral density, BMD),降低皮质骨孔隙,调节骨皮质矿化位点,并可改善髋关节的几何结构参数(皮质骨厚度、横截面面积、截面模量和屈曲比率等)^[1-2]。作为改善骨质疏松的重要方式之一,运动能够增强肌肉力量与关节协调性,减少跌倒和骨折的发生,并可增加椎体BMD^[3]。我们前期研究发现,运动可以缩短去卵巢(ovariectomized, OVX)大鼠肌电图中运动末端潜伏期,Aln联合运动对于腰椎BMD的改善作用也明显优于单独Aln干预或运动干预^[4]。本研究旨在进一步探讨运动联合Aln对于股骨BMD的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 90只6月龄雌性SD大鼠,体质量(248.2±12.0)g,从广东省医学实验动物中心购入,合格证号:SCXK(粤)2008-0002。实验大鼠自由饮水进食,分笼饲养,在实验前适应环境3d,相对湿度控制在60%~80%,温度控制在(24±2)℃。

1.2 主要试剂及仪器 Aln(70 mg/粒)购自杭州默沙东制药有限公司(批号:110590),大鼠血清核因

子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG) ELISA检测试剂盒购自美国R&D公司,BCA-100蛋白定量检测试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司。兔抗大鼠c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、磷酸化的JNK(p-JNK)、细胞外调节激酶(extracellular-regulated kinase, ERK)、磷酸化的ERK(p-ERK)、p38、磷酸化的p38(p-p38)、c-Fos、兔抗大鼠GAPDH抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。SYBR[®] Premix Ex Taq[™]荧光定量试剂盒、反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司。Prodigy型双能X线骨密度仪(美国Lunar公司),Model 680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),LightCycler480荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)。

1.3 实验分组及模型建立 90只6月龄雌性SD大鼠随机分为假手术组(sham组)、OVX组、Aln治疗组(OVX+Aln组)、运动治疗组(OVX+EX组)、Aln与运动联合治疗组(OVX+Aln+EX组),每组18只,后4组大鼠切除双侧卵巢;0.2%戊巴比妥钠(0.01 mL/kg)腹腔注射全身麻醉,仰卧位固定,备皮、消毒,无菌操作行双侧卵巢切除术,sham组除不切除卵巢外,其余操作相同。

1.4 实验干预 建模8周后,各组大鼠进行相应措

施干预。Sham 组和 OVX 组：双蒸水(4.0 mL/只)灌胃, 1 次/d, 每周灌胃 6 d, 休息 1 d, 共灌胃 12 周。OVX+Aln 组：1 mg/kg Aln(4.0 mL/只)灌胃, 1 次/d, 每周灌胃 6 d, 休息 1 d, 共灌胃 12 周。OVX+EX 组：双蒸水(4.0 mL/只)灌胃, 1 次/d; 灌胃后大鼠进行跑台训练, 开始时跑速 12 m/min, 持续时间为 20 min; 每隔 1 d 跑速增加 3 m/min, 持续时间增加 10 min; 从第 2 周起跑速维持在 20 m/min, 持续时间 30 min, 每周跑步 6 d, 休息 1 d, 持续 12 周结束。OVX+Aln+EX 组：1 mg/kg Aln(4.0 mL/只)灌胃, 1 次/d; 灌胃后的干预方法同 OVX+EX 组。

1.5 大鼠左、右股骨 BMD 检测 各组大鼠干预治疗 12 周后, 0.2% 戊巴比妥钠溶液(0.01 mL/kg)腹腔注射麻醉, 应用双能 X 线骨密度仪测定大鼠左、右股骨 BMD。

1.6 ELISA 法检测大鼠血清 RANKL、OPG 含量 各组大鼠干预治疗 12 周后, 用 0.2% 戊巴比妥钠溶液(0.01 mL/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 胸部正中切口开胸暴露心脏并采血, 室温静置 2 h, 1 200×g 离心 10 min, 取上层血清, -80℃ 保存备用。按 ELISA 试剂盒操作说明测定血清 RANKL、OPG 含量。

1.7 Real-time PCR 检测大鼠骨组织 RANKL、OPG mRNA 表达 各组大鼠干预治疗 12 周后, 用 0.2% 戊巴比妥钠溶液(0.01 mL/kg)腹腔注射麻醉, 截取左下肢 1 cm 骨组织, 充分匀浆后用 TRIzol 法提取 RNA, 进行反转录及 PCR 扩增。RANKL (产物长度 196 bp): 上游引物 5'-CGT ACC TGC GGA CTA TCT TCA-3', 下游引物 5'-GTT GGA CAC CTG GAC GCT AA-3'; OPG (产物长度 201 bp): 上游引物 5'-CAT CGA AAG CAC CCT GTA-3', 下游引物 5'-CAC TCA GCC AAT TCG GTA T-3'; GAPDH (产物长度 307 bp): 上游引物 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3', 下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成与鉴定, mRNA 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.8 蛋白质印迹分析法检测大鼠骨组织 p-JNK、p-p38、p-ERK、c-Fos 蛋白表达 各组大鼠干预治疗 12 周后, 用 0.2% 戊巴比妥钠溶液(0.01 mL/kg)腹

腔注射麻醉, 截取左下肢 1 cm 骨组织, 充分匀浆后加入 0.5 mL RIPA 裂解液, 提取蛋白, 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度, 上样, 电泳, 200 mA 转膜 1 h, 一抗 (1:1 000) 孵育过夜, 漂洗后二抗 (1:1 000) 孵育, 漂洗后化学发光、显影、定影后用 Bio-Rad Quantity One 软件分析。以 p-JNK/总 JNK、c-Fos/GAPDH、p-p38/总 p38、p-ERK/总 ERK 灰度值比值表示各自表达量。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间多重比较若方差齐采用 LSD 法, 若方差不齐采用 Tamhane's T2 法。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠左、右股骨 BMD 变化 检测结果 (表 1) 显示, 干预治疗 12 周后, 与 sham 组相比, OVX 组大鼠左、右股骨 BMD 降低 ($P < 0.05$); 与 OVX 组相比, OVX+Aln 组、OVX+EX 组及 OVX+Aln+EX 组大鼠左、右股骨 BMD 均增加 (P 均 < 0.05), 且 OVX+Aln+EX 组 BMD 高于 OVX+Aln 组和 OVX+EX 组 (P 均 < 0.05)。

表 1 干预治疗 12 周后各组大鼠股骨 BMD 变化

Tab 1 Changes of rat femoral BMD after 12-week treatment

$n=18, \bar{x} \pm s, (g \cdot cm^{-2})$

Group	Left femur	Right femur
Sham	0.285±0.008	0.283±0.008
OVX	0.214±0.010*	0.231±0.003*
OVX+Aln	0.253±0.007 Δ \blacktriangle	0.254±0.006 Δ \blacktriangle
OVX+EX	0.244±0.004 Δ \blacktriangle	0.243±0.005 Δ \blacktriangle
OVX+Aln+EX	0.287±0.007 Δ	0.281±0.008 Δ

BMD: Bone mineral density; OVX: Ovariectomized group; OVX+Aln: Alendronate sodium tablet (Aln) treatment group; OVX+EX: Exercise therapy group; OVX+Aln+EX: Aln combined with exercise treatment group. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs OVX group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs OVX+Aln+EX group

2.2 各组大鼠血清 RANKL、OPG 含量变化 ELISA 法检测结果 (表 2) 显示, 干预治疗 12 周后, 与 sham 组相比, OVX 组大鼠血清中 RANKL 含

量增加,OPG 含量降低,RANKL/OPG 比值增大(P 均 <0.05);与 OVX 组相比,OVX+Aln 组、OVX+EX 组及 OVX+Aln+EX 组大鼠血清中 RANKL 含量降低,OPG 含量增加,RANKL/OPG 比值减小

(P 均 <0.05)。OVX+Aln+EX 组大鼠血清中 RANKL、OPG 含量及 RANKL/OPG 比值与 OVX+Aln组、OVX+EX 组相比差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。

表 2 干预治疗 12 周后各组大鼠血清 RANKL、OPG 含量变化

Tab 2 Changes of rat serum RANKL and OPG contents after 12-week treatment

$n=18, \bar{x} \pm s$

Group	RANKL $\rho_B/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	OPG $\rho_B/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	RANKL/OPG
Sham	14.300 \pm 0.560	384.500 \pm 11.180	0.040 \pm 0.010
OVX	84.940 \pm 1.600*	247.440 \pm 11.660*	0.350 \pm 0.020*
OVX+Aln	46.800 \pm 1.620 Δ \blacktriangle	331.720 \pm 14.230 Δ \blacktriangle	0.140 \pm 0.010 Δ \blacktriangle
OVX+EX	50.060 \pm 0.980 Δ \blacktriangle	299.420 \pm 10.180 Δ \blacktriangle	0.170 \pm 0.010 Δ \blacktriangle
OVX+Aln+EX	25.800 \pm 1.200 Δ	368.240 \pm 10.520 Δ	0.070 \pm 0.010 Δ

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: Osteoprotegerin; OVX: Ovariectomized group; OVX+Aln: Alendronate sodium tablet (Aln) treatment group; OVX+EX: Exercise therapy group; OVX+Aln+EX: Aln combined with exercise treatment group. * $P<0.05$ vs sham group; Δ $P<0.05$ vs OVX group; \blacktriangle $P<0.05$ vs OVX+Aln+EX group

2.3 各组大鼠骨组织 RANKL、OPG mRNA 表达变化 Real-time PCR 检测结果(图 1)显示,干预治疗 12 周后,与 sham 组相比,OVX 组大鼠骨组织 RANKL mRNA 表达增加,OPG mRNA 表达减少 (P 均 <0.05);而与 OVX 组相比,OVX+Aln 组、

OVX+EX 组及 OVX+Aln+EX 组大鼠骨组织 RANKL 表达减少,OPG mRNA 表达增加 (P 均 <0.05),与血清中蛋白表达变化一致,且 OVX+Aln+EX 组与 OVX+Aln 组、OVX+EX 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

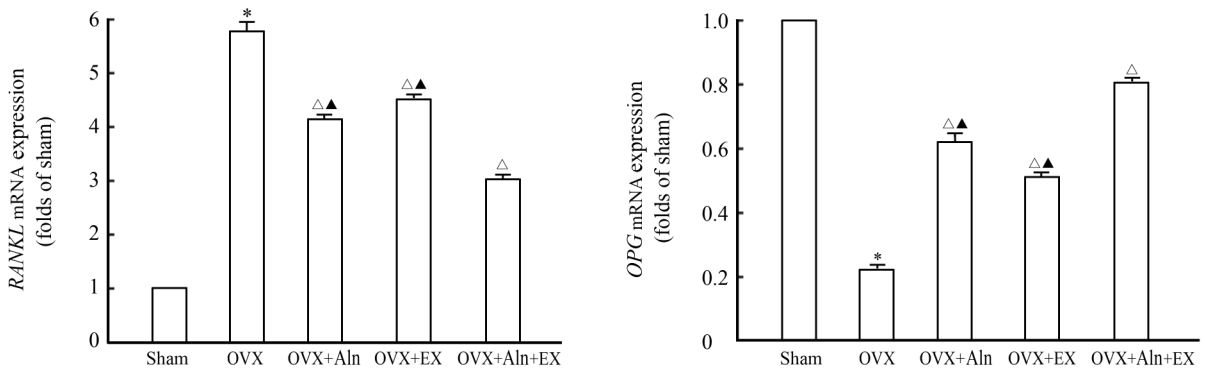


图 1 干预治疗 12 周后各组大鼠骨组织 RANKL、OPG mRNA 的表达

Fig 1 Expression of RANKL and OPG mRNA in rat bone tissues after 12-week treatment

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; OPG: Osteoprotegerin; OVX: Ovariectomized group; OVX+Aln: Alendronate sodium tablet (Aln) treatment group; OVX+EX: Exercise therapy group; OVX+Aln+EX: Aln combined with exercise treatment group. * $P<0.05$ vs sham group; Δ $P<0.05$ vs OVX group; \blacktriangle $P<0.05$ vs OVX+Aln+EX group. $n=6, \bar{x} \pm s$

2.4 运动和(或)Aln 对各组大鼠骨组织丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 信号通路的影响 蛋白质印迹分析结果(图 2)显示,干预治疗 12 周后,与 sham 组相比,OVX 组大鼠骨组织 p-JNK 和 c-Fos 蛋白表

达增加(P 均 <0.05);与 OVX 组相比,OVX+Aln 组、OVX+EX 组及 OVX+Aln+EX 组大鼠骨组织 p-JNK 和 c-Fos 蛋白表达减少(P 均 <0.05),而这 3 个干预组间蛋白表达差异无统计学意义 ($P>$

0.05)。各组大鼠骨组织 p-p38、p-ERK 蛋白表达差

异无统计学意义(P 均 >0.05)。

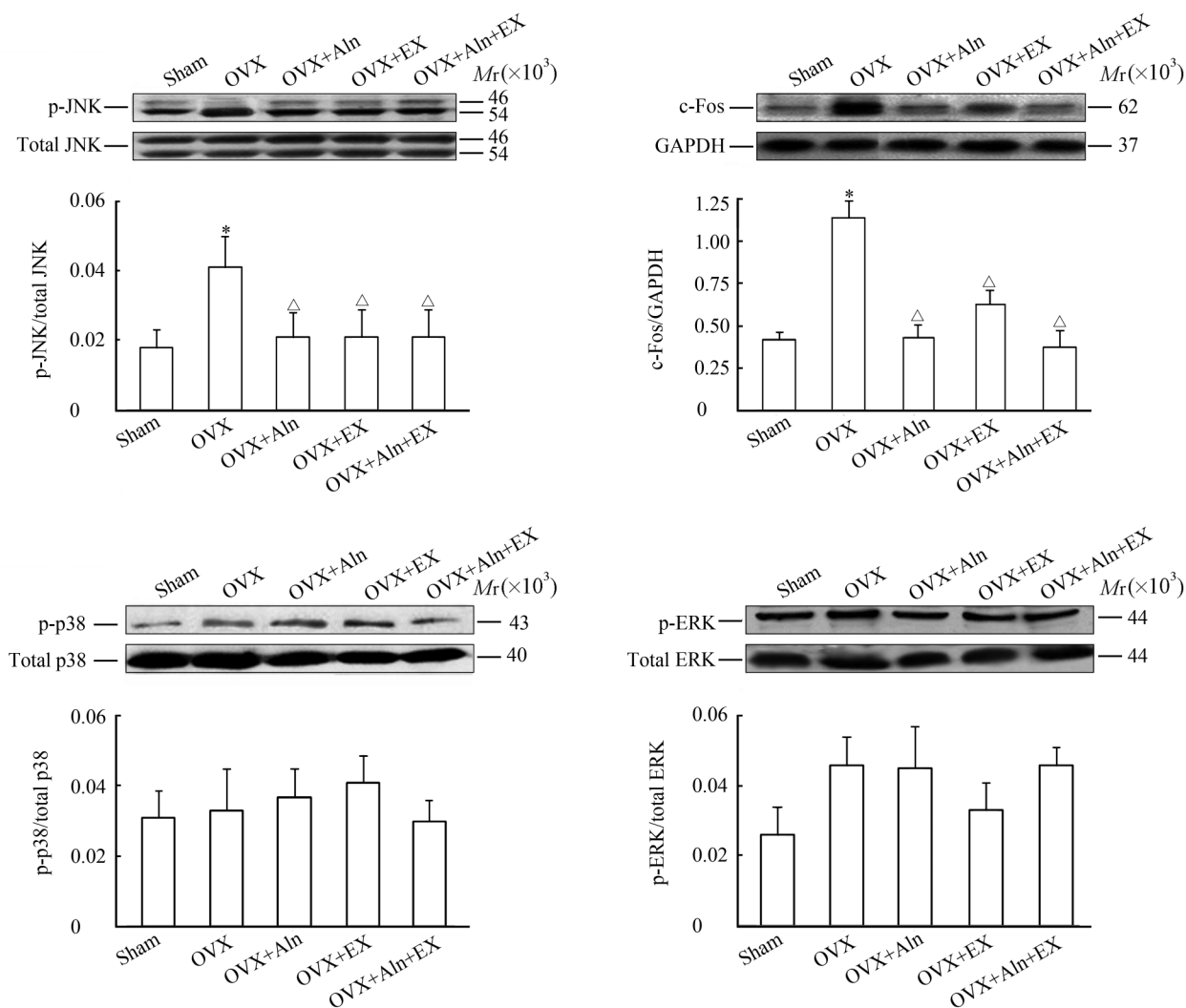


图 2 干预治疗 12 周后各组大鼠骨组织 p-JNK、c-Fos、p-p38、p-ERK 蛋白的表达

Fig 2 Expression of p-JNK, c-Fos, p-p38 and p-ERK protein in rat bone tissues after 12-week treatment

OVX: Ovariectomized group; OVX+Aln: Alendronate sodium tablet (Aln) treatment group; OVX+EX: Exercise therapy group; OVX+Aln+EX: Aln combined with exercise treatment group. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs OVX group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究结果表明运动联合 Aln 能够提高 OVX 大鼠左、右股骨 BMD, 其作用可能与调节 RANKL/OPG 平衡及抑制 JNK 磷酸化及 c-Fos 表达有关。

骨重建过程包括破骨细胞(osteoclast, OC)激活骨吸收开始和与之相偶联的成骨细胞(osteoblast, OB)激活骨形成终结两个过程。局部因子通过对 OB 和 OC 之间的偶联关系及相互作用的调节控制骨转换的速度^[5]。RANKL、核因子 κ B 受体活化因子(RANK)和 OPG 是肿瘤坏死因子超家族成员, 在

调节骨吸收和骨形成方面起着关键作用^[6]。RANKL 与成熟 OC 及其祖细胞膜表面的 RANK 结合, 直接促进成熟 OC 活化和生成。RANK 表达于 OC 的前体细胞表面, 被认为是 OC 分化和活化信号途径的一道关键闸门^[7]。RANK 是 RANKL 刺激 OC 分泌、成熟的唯一靶受体, 两者结合后可启动 OC 的分化与成熟。RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)是目前已知的 OC 生成所必需的细胞因子^[8]。OPG 又称 OC 抑制因子(osteoclast inhibitory factor, OCIF), 主要由 OB 谱系的各种细胞产生

的一种糖蛋白,有生化特性相似的单体和二聚体两种存在形式。OPG的N末端与RANK结构相似,OPG是RANKL的“诱饵”受体,是一种重要的OC负性调节因子^[9],其生物学作用是竞争性与RANKL[OPG配体(OPGL)]结合,竞争性抑制RANKL与OC表面RANK的结合,进而阻断其信号连接,使前体OC分化、生存、融合与活化过程受到抑制、成熟OC凋亡增加^[9]。

RANKL和OPG均由OB产生,是反映OB与OC间互相调节的偶联因子之一。OPG、RANKL、RANK组成的RANKL-RANK-OPG系统在骨重建中起到核心调节作用。RANKL/OPG比值是OC诱导分化的决定性因素,其比值的变化受骨形成与骨吸收状态的影响^[10];阻断RANKL与OC表面RANK的结合,降低RANKL/OPG比值就可抑制OC的分化、成熟、活化,进而达到防治骨质疏松的作用^[11]。

在本研究中,我们分别采用real-time PCR、ELISA方法检测各组大鼠骨组织中RANKL、OPG的mRNA和蛋白表达水平。结果显示,与sham组相比,无论在mRNA水平还是在蛋白水平,OVX组大鼠RANKL含量增高($P < 0.05$),OPG含量降低($P < 0.05$),这主要是由于大鼠卵巢切除引起雌激素缺乏,OC功能活跃,骨吸收增加,骨丢失加快所致。Aln和运动或运动联合Aln干预治疗12周后,大鼠血清OPG的含量增加($P < 0.05$),RANKL的含量降低($P < 0.05$),RANKL/OPG比值降低($P < 0.05$),提示Aln和运动均可能通过影响RANKL/OPG比值,减少OC诱导分化,抑制OC的骨吸收而发挥抗骨质疏松作用。运动联合Aln组在调节RANKL、OPG表达及影响BMD变化上效果优于单独Aln或运动组。

此外,Viereck等^[12]研究结果表明,含氮双磷酸盐可增加人OB中OPG的表达,降低RANKL/OPG比值。唑来膦酸同样使RANKL/OPG比值下降^[13]。本实验与这些研究结果一致,进一步佐证了本实验结果。

上述结果表明,Aln、运动均可通过调节RANKL/OPG比值来影响RANKL-RANK-OPG系统,从而调节骨形成与骨吸收。我们知道,RANKL与OC表面的RANK结合后,可激活一系

列的信号转导通路来调控OC的骨吸收作用,本研究还进一步验证了Aln和运动对RANKL-RANK-OPG系统下游信号通路的影响。

MAPK介导信号通路是RANKL-RANK-OPG系统向下游传递信号的主要途径。RANKL与OC表面的RANK结合后可进一步激活MAPK家族信号通路(JNK、ERK、p38),进而激活转录因子——活化蛋白1(activating protein 1, AP-1),将RANKL的信号传递下去^[14]。而c-Fos是AP-1的主要组成部分,在OC分化中起重要作用。

蛋白质印迹分析检测大鼠骨组织MAPK家族(JNK、p38、ERK)及MAPK下游转录因子c-Fos表达结果显示,骨组织p38和ERK磷酸化水平很低且无明显差别,p-p38/总p38、p-ERK/总ERK比值亦无明显改变,这说明OVX大鼠在Aln、运动或运动联合Aln干预治疗12周后,p38和ERK未被激活。而OVX大鼠骨组织p-JNK/总JNK比值增大(与sham组相比),JNK的磷酸化水平增高($P < 0.05$),说明OVX大鼠的JNK蛋白被激活;Aln、运动或运动联合Aln均降低p-JNK/总JNK比值($P < 0.05$),即降低JNK蛋白的磷酸化水平,但3个治疗组间JNK的磷酸化水平无明显差别。同样,OVX大鼠骨组织c-Fos蛋白的表达水平较sham组增高($P < 0.05$),Aln、运动或运动联合Aln均使c-Fos的表达降低($P < 0.05$),3个治疗组间c-Fos的表达水平亦未见明显差别。以上结果表明,Aln、运动或运动联合Aln可能通过抑制JNK蛋白和下游的转录因子c-Fos,进而调控OC的骨吸收作用。

临床中Aln用于治疗绝经后妇女及男性骨质疏松,运动对于男性和女性BMD及骨折均显示出较好的改善作用^[3,15],但运动联合Aln对去势雄鼠骨代谢的影响及其临床效果需进一步观察。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Lin T, Wang C, Cai X Z, Zhao X, Shi M M, Ying Z M, et al. Comparison of clinical efficacy and safety between denosumab and alendronate in postmenopausal women with osteoporosis: a meta-analysis[J]. Int J Clin Pract,

- 2012,66:399-408.
- [2] Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H. Hip fracture protection by alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis; a review of the literature[J]. *Clin Interv Aging*, 2008,3:483-489.
- [3] Howe T E, Shea B, Dawson L J, Downie F, Murray A, Ross C, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(7):CD000333.
- [4] 邝志强, 张荣华. 运动联合福善美对去卵巢大鼠骨密度和神经传导的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28:1097-1102.
- [5] 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:184-228.
- [6] Coetzee M, Kruger M C. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio; a new approach to osteoporosis treatment? [J]. *South Med J*, 2004,97:506-511.
- [7] 肖献忠. 实用骨质疏松学[M]. 北京:科学出版社, 2004:87.
- [8] Hodge J M, Collier F M, Pavlos N J, Kirkland M A, Nicholson G C. M-CSF potentially augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts [J]. *PLoS One*, 2011,6:e21462.
- [9] Schoppet M, Preissner K T, Hofbauer L C. RANK ligand and osteoprotegerin; paracrine regulators of bone metabolism and vascular function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002,22:549-553.
- [10] Hofbauer L C, Khosla S, Dunstan C R, Lacey D L, Boyle W J, Riggs B L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. *J Bone Miner Res*, 2000,15:2-12.
- [11] Halleen J M, Alatalo S L, Janckila A J, Woitge H W, Seibel M J, Väänänen H K. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption[J]. *Clin Chem*, 2001,47:597-600.
- [12] Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch K H, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,291:680-686.
- [13] Pan B, Farrugia A N, To L B, Findlay D M, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE) [J]. *J Bone Miner Res*, 2004,19:147-154.
- [14] Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6[J]. *Mol Cell Biol*, 2002,22:992-1000.
- [15] Sinaki M. Exercise for patients with osteoporosis; management of vertebral compression fractures and trunk strengthening for fall prevention[J]. *PM R*, 2012, 4: 882-888.

[本文编辑] 商素芳