

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.04.0405

• 专题报道 •

新型 β -链蛋白结合药物 SAHPA1 治疗去卵巢小鼠骨质疏松

李全¹,袁承杰^{1,2},翁蔚宗^{1,2},刘超^{2,3},胡宏岗^{2,3},苏佳灿^{1,2*}

1. 第二军医大学长海医院创伤骨科,上海 200433
2. 中韩生物医学工程中心,上海 201802
3. 第二军医大学药学院有机化学教研室,上海 200433

[摘要] **目的** 评估新型 β -链蛋白(β -catenin)结合药物 SAHPA1 在绝经后骨质疏松小鼠模型中的治疗效果。**方法** 选取 C57 雌性小鼠作为实验对象。将实验动物分为 3 组,分别为假手术组、骨质疏松模型组(模型组)、骨质疏松模型治疗组(治疗组),每组 5 只小鼠。假手术组仅暴露卵巢后缝合切口;模型组和治疗组动物行双侧卵巢切除,建立去卵巢骨质疏松模型。治疗组在切除卵巢后即刻开始每日肌注 β -catenin 结合药物 SAHPA1 (10 mg/kg),假手术组和模型组每日注射同剂量的生理盐水。8 周后,利用骨组织切片 H-E 染色、micro-CT 等方法观察小鼠股骨干骺端骨小梁形态并进行形态学计量分析,评估 SAHPA1 对去卵巢骨质疏松的治疗效果。**结果** 与假手术组比较,模型组小鼠骨密度、骨小梁数量、骨小梁厚度均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。经 SAHPA1 治疗后,小鼠骨密度和骨小梁数量增高($P < 0.05$),骨小梁厚度与模型组比较虽有一定提升但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 新型 β -catenin 结合药物 SAHPA1 对绝经后骨质疏松小鼠模型有一定治疗作用。

[关键词] 绝经后骨质疏松;动物模型;骨密度; β -链蛋白;SAHPA1

[中图分类号] R 681.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)04-0405-04

A novel β -catenin-binding drug SAHPA1 in treatment of osteoporosis in ovariectomized mice

LI Quan¹, YUAN Cheng-jie^{1,2}, WENG Wei-zong^{1,2}, LIU Chao^{2,3}, HU Hong-gang^{2,3}, SU Jia-can^{1,2*}

1. Department of Orthopaedic Trauma, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. China-South Korea Biomedical Engineering Center, Shanghai 201802, China
3. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the therapeutic effect of novel β -catenin-binding drug SAHPA1 on postmenopausal osteoporosis animal models. **Methods** C57 female mice were selected and divided into 3 groups ($n=5$): Sham group, osteoporosis model group (OP group), and osteoporosis model treatment group (Treat group). The mice in the Sham group only underwent surgical incision exposing bilateral ovaries, while the mice in the OP and Treat groups underwent bilateral ovariectomy and the ovariectomized osteoporosis mouse models were established. Then the mice in the Treat group were immediately treated with SAHPA1 (10 mg/kg) by daily intramuscular injection, and those in the Sham and OP groups were injected with the same dose of saline daily. The morphology of trabecular bone in the femur metaphyseal bone in mice was observed and the morphometric analysis was performed by bone tissue sections with H-E staining and micro-CT. The therapeutic effect of SAHPA1 on osteoporosis in ovariectomized mice models was also evaluated. **Results** The bone mineral density (BMD), trabecular bone number (Tb. N) and trabecular bone thickness (Tb. Th) of mice in the OP group were significantly lower than those in the Sham group ($P < 0.05$). The BMD and Tb. N of mice in the Treat group were significantly higher than those in the OP group ($P < 0.05$), while there was no significant difference in Tb. Th between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The novel β -catenin-binding drug SAHPA1 has a certain therapeutic effect on postmenopausal mice with osteoporosis.

[收稿日期] 2016-12-25 **[接受日期]** 2017-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作项目(8141101156),上海市科委生物医药专项(15411950600). Supported by International Cooperative Project of National Natural Science Foundation of China (8141101156) and Biological Medicine Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (15411950600).

[作者简介] 李全,博士,主治医师. E-mail: drliquan@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161699, E-mail: drsujiacan@163.com

[Key words] postmenopausal osteoporosis; animal models; bone density; β -catenin; SAHPA1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(4): 405-408]

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织微细结构破坏为特征,伴骨质疏松性和骨折危险性增加的一种全身性骨骼疾病。骨质疏松症在绝经后的老年女性人群中高发,绝经后骨质疏松症的防治是临床医师面临的重要问题。以往研究表明,Wnt信号通路对骨代谢的调节作用具有重要影响,对骨的维持和修复至关重要^[1-2]。 β -catenin是经典Wnt通路的重要成员,早期成骨细胞的增殖分化和破骨细胞的抑制都需要 β -catenin的参与, β -catenin的积聚可促进骨生成。绝经后骨质疏松症患者血清 β -catenin水平显著低于正常人群^[3],因此通过Wnt信号通路对 β -catenin进行精密的调控有望成为治疗绝经后骨质疏松症的一种新策略。

靶向Axin蛋白- β -catenin复合物的 α 螺旋肽(SAHPA1)是一种新型调控 β -catenin水平的药物^[4]。SAHPA1具有稳定的 α 螺旋结构,与靶标的结合能力能够提高上千倍,通过与 β -catenin的结合可以有效地打破内源的Axin蛋白- β -catenin复合物的生成,提高 β -catenin水平。体外实验表明SAHPA1可以高度特异性地激活Wnt/ β -catenin信号通路^[4]。鉴于此,我们认为SAHPA1有望成为治疗骨质疏松症的药物,但相关动物体内实验尚未见报道。本研究通过建立绝经后骨质疏松症动物模型,评估SAHPA1对绝经后骨质疏松症的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物和模型建立 8周龄雌性C57小鼠15只,购自上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002]。将小鼠随机分为3组,分别为假手术组、骨质疏松模型组(模型组)、骨质疏松模型治疗组(治疗组),每组5只。假手术组仅实施手术暴露卵巢后缝合切口;模型组和治疗组经背部切口分离暴露出双侧卵巢,切除后缝合切口,建立去卵巢骨质疏松小鼠模型。治疗组在切除卵巢后即刻开始每日肌注SAHPA1(由第二军医大学药学院胡宏岗课题组参照文献^[4]方法合成),剂量为10 mg/kg;假手术组和模型组每日肌注

同等剂量的生理盐水。连续处理8周。动物饲养于SPF级动物实验室,温度22~25℃,相对湿度40%~70%,自动光控(12 h明/12 h暗),自由采食、饮水。

1.2 骨质疏松监测指标 实验后8周将小鼠处死,取股骨行骨组织切片,H-E染色鉴定骨组织形态。同时取小鼠股骨进行micro-CT扫描测定骨形态计量学参数。

1.2.1 骨组织学检测 剔除小鼠后肢骨附着软组织,经4%多聚甲醛固定、EDTA脱钙、冲洗、梯度乙醇脱水后常规石蜡包埋,做5 μ m厚的连续切片。取股骨远端干骺端的骨组织切片,经H-E染色后,在普通光学显微镜下观察。

1.2.2 Micro-CT检测 小鼠处死后剥离后肢骨,剔除附着软组织,经4%多聚甲醛固定后,于SCANCO Medical micro-CT(SCANCO Medical AG, Switzerland)进行扫描,预装64位图像处理软件行三维重建并进行骨组织形态计量学分析。

1.3 统计学处理 应用SPSS 15.0软件进行统计学分析。计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和LSD-*t*检验比较组间差异。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠股骨H-E染色形态学观察 股骨远端干骺端的骨组织切片经H-E染色后,在光镜下观察骨组织形态。可见与假手术组相比,模型组小鼠骨小梁数量明显减少,小梁厚度较薄,而骨小梁间隙增宽,骨髓中可见较多的脂肪组织。治疗组小鼠的骨小梁数目和厚度均较模型组有所增加,脂肪组织有所减少,但与假手术组相比仍有一定差距(图1)。

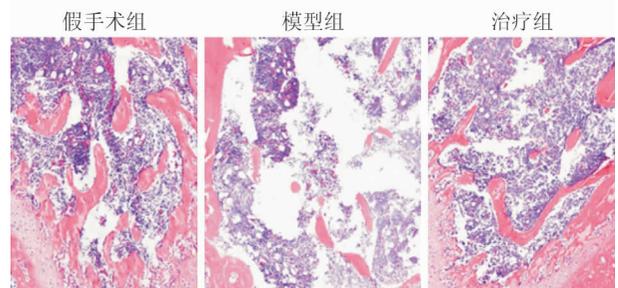


图1 各组小鼠股骨干骺端组织切片的H-E染色结果

Original magnification: $\times 10$

2.2 各组小鼠股骨 micro-CT 扫描计量学参数 取小鼠后肢股骨进行 micro-CT 扫描。股骨远端三维重建图像显示模型组小鼠骨小梁数目明显少于假手术组,小梁间隙增加。而治疗组小鼠的骨小梁数目及间隙与模型组相比均有一定改善,但相比假手术组仍有一定差异(图 2)。

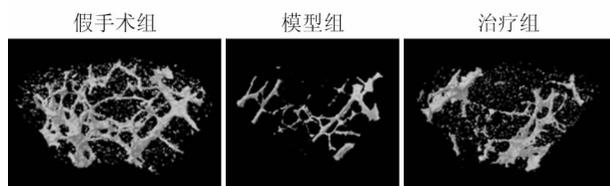


图 2 各组小鼠股骨骨小梁的 micro-CT 三维重建图像

骨组织形态计量学相关分析结果如表 1 所示。模型组小鼠骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)以及骨密度(BMD)与假手术组相比明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组小鼠骨小梁数量以及骨密度与模型组相比有明显提升($P < 0.05$),但与假手术组相比仍有显著差距($P < 0.05$);骨小梁厚度也得到一定的提升,但与模型组和假手术组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠股骨计量学参数

组别	n=5, $\bar{x} \pm s$		
	BMD $\rho / (\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3})$	Tb. Th l / mm	Tb. N (mm^{-1})
假手术组	153.6 ± 15.1	0.045 ± 0.004	1.21 ± 0.09
模型组	78.9 ± 11.7*	0.038 ± 0.002*	0.45 ± 0.05*
治疗组	97.5 ± 16.2*△	0.042 ± 0.001	0.79 ± 0.11*△

BMD: 骨密度; Tb. Th: 骨小梁厚度; Tb. N: 骨小梁数量。

* $P < 0.05$ 与假手术组比较; △ $P < 0.05$ 与模型组比较

3 讨论

绝经后骨质疏松症是最常见的一种继发性骨质疏松症,老年女性由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,使骨脆性增高易于骨折。研究表明,成体骨组织处于骨重建的平衡之中,即成骨细胞介导的新骨形成和破骨细胞介导的骨吸收^[5]之间处于相对平衡的状态。雌激素与骨代谢有着密切的联系,它能帮助钙的吸收,对骨生成产生直接作用,使骨吸收和重建达到平衡,老年女性由于雌激素缺乏,从而使得骨重建平衡被破坏^[6-7]。补充雌激素有助于预防骨质疏松,但雌激素不良反应多,且可能会增加妇科疾病和乳腺癌的发病风险,因此人们在尝试

探寻其他治疗绝经后骨质疏松症的途径。

经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路激活后,能够有效促进新骨形成^[1]。前期研究中发现绝经后骨质疏松患者的血清 β -catenin 水平显著降低^[3]。而另一项体外研究发现,对体外培养的去卵巢大鼠间充质干细胞给予雌激素作用后,能够有效增加 β -catenin 表达,间充质干细胞的成骨分化能力得到了恢复^[8]。推测雌激素增加间充质干细胞成骨能力的过程与 β -catenin 水平有关,提示激活该通路可能成为治疗绝经后骨质疏松的策略之一。

既往的体外实验已明确 SAHPA1 能够特异性地激活体内的 Wnt/ β -catenin 信号通路^[4]。本研究通过骨组织学检测来评价 SAHPA1 对去卵巢骨质疏松小鼠的治疗效果。结果发现模型小鼠在接受 SAHPA1 治疗 8 周后能有效缓解骨丢失症状,表现为骨小梁数目和骨密度有所增加,以及骨小梁厚度也相对增加。并且 H-E 染色还发现模型组小鼠骨髓出现大量脂肪化现象,与临床观察结果^[9]一致,但 SAHPA1 处理后骨髓脂肪组织明显减少。这些结果说明 SAHPA1 激活的 Wnt/ β -catenin 信号通路能够有效改善绝经后骨质疏松症的临床表现,缓解骨丢失,抑制骨髓脂肪化。Micro-CT 测定结果显示 SAHPA1 治疗组小鼠的骨小梁数量和骨密度等虽然得到明显改善,但与假手术组相比仍有差距,说明肌注 SAHPA1 尚不能完全将骨丢失恢复到正常水平。因此,虽然 SAHPA1 激活的 Wnt/ β -catenin 信号通路能有效缓解激素抑制的成骨分化、促进新骨形成,但未能完全恢复新骨形成的能力,推测可能是由于 Wnt/ β -catenin 信号通路并非唯一影响绝经后骨质疏松的信号通路,SAHPA1 只能部分改善绝经后骨质疏松症。已有大量文献证实除 Wnt/ β -catenin 信号通路以外, MAPK^[10]、PI3K/Akt^[11]、RANKL/RANK/OPG^[12]、Hedgehog^[13] 和 Notch^[14] 等信号通路均在骨质疏松的发病机制中起着重要调节作用,因此理论上 SAHPA1 难以完全抑制骨质疏松症的发生。另一方面,SAHPA1 作为一种新型的多肽类药物,前期只进行了细胞实验^[4],使用剂量在本动物实验开展时缺乏可供借鉴的经验。为检验药物的有效性,我们参考了临床和文献中其他多肽类药物的使用剂量,选择了 10 mg/kg 这一我们认为较大的剂量,未设置其他剂量分组。对于 SAHPA1 的剂

量相关的药效作用,还有待进一步的工作探索。

本研究证实 SAHPA1 激活的 Wnt/ β -catenin 信号通路能有效促进新骨形成、缓解骨丢失,但在不高于 10 mg/kg 的剂量下不能完全抑制去卵巢小鼠骨质疏松的发生。SAHPA1 促进体内新骨形成的机制及对绝经后骨质疏松症的防治作用有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] KARNER C M, LONG F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 1649-1657.
- [2] 陈晓,苏佳灿. 骨质疏松研究热点:骨髓间充质干细胞分化命运[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38: 397-404.
- CHEN X, SU J C. New focus on osteoporosis: differentiation fate of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2017, 38: 397-404.
- [3] XU X J, SHEN L, YANG Y P, ZHU R, SHUAI B, LI C G, et al. Serum β -catenin levels associated with the ratio of rankl/opg in patients with postmenopausal osteoporosis[J/OL]. *Int J Endocrinol*, 2013, 2013: 534352. doi: 10.1155/2013/534352. 22.
- [4] CUI H K, ZHAO B, LI Y, GUO Y, HU H, LIU L, et al. Design of stapled α -helical peptides to specifically activate Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Cell Res*, 2013, 23: 581-584.
- [5] ABDELGAWAD M E, DELAISSE J M, HINGE M, JENSEN P R, ALNAIMI R W, ROLIGHED L, et al. Early reversal cells in adult human bone remodeling: osteoblastic nature, catabolic functions and interactions with osteoclasts[J]. *Histochem Cell Biol*, 2016, 145: 603-615.
- [6] ERIKSEN E F, HODGSON S F, EASTELL R, CEDEL S L, O' FALLON W M, RIGGS B L. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels[J]. *J Bone Miner Res*, 1990, 5: 311-319.
- [7] XIAO W, LI S, PACIOS S, WANG Y, GRAVES D T. Bone remodeling under pathological conditions[J]. *Front Oral Biol*, 2016, 18: 17-27.
- [8] LI L, YAO X L, HE X L, LIU X J, WU W C, KUANG W, et al. Role of mechanical strain and estrogen in modulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from normal and ovariectomized rats [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2013, Suppl 59: OL1889-OL1893.
- [9] AGRAWAL K, AGARWAL Y, CHOPRA R K, BATRA A, CHANDRA R, THUKRAL B B. Evaluation of MR spectroscopy and diffusion-weighted mri in postmenopausal bone strength[J/OL]. *Cureus*, 2015, 7: e327. doi: 10.7759/cureus.327.
- [10] CHOI S W, PARK K I, YEON J T, RYU B J, KIM K J, KIM S H. Anti-osteoclastogenic activity of matairesinol via suppression of p38/ERK-NFATc1 signaling axis[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 35. doi: 10.1186/1472-6882-14-35.
- [11] LIU Y, KOU X, CHEN C, YU W, SU Y, KIM Y, et al. Chronic high dose alcohol induces osteopenia via activation of mTOR signaling in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34: 2157-2168.
- [12] WOLSKI H, DREWS K, BOGACZ A, KAMIŃSKI A, BARLIK M, BARTKOWIAK-WIECZOREK J, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis[J]. *Ginekol Pol*, 2016, 87: 347-352.
- [13] NAKAMURA T, NARUSE M, CHIBA Y, KOMORI T, SASAKI K, IWAMOTO M, et al. Novel hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230: 922-929.
- [14] ZANOTTI S, CANALIS E. Notch signaling in skeletal health and disease[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168: R95-R103.

[本文编辑] 孙岩