

· 论 著 ·

# 沉默信息调节因子 1 在绝经后 骨质疏松性骨折端的表达变化及意义

翟怀远<sup>1</sup>, 郭依龙<sup>1</sup>, 翟娟<sup>1</sup>, 刘艳红<sup>1</sup>, 宋星辰<sup>1</sup>, 王申<sup>2</sup>, 耿庆贺<sup>1,3,4</sup>

1. 徐州医科大学附属邳州医院中心实验室, 江苏 徐州 221300; 2. 北京大学人民医院骨科, 北京 100044;  
3. 徐州医科大学肿瘤实验室, 江苏 徐州 221000; 4. 徐州医科大学附属邳州医院骨科, 江苏 徐州 221300

**摘要:** **目的** 观察骨质疏松性骨折(OPF)患者血液、骨折断端骨组织中沉默信息调节因子 1(Sirt1)基因及蛋白表达变化,探讨 Sirt1 在 OPF 发病中的意义。**方法** 前瞻性选取 2018 年 1 月至 2021 年 10 月在徐州医科大学附属邳州医院骨科就诊的绝经后女性股骨粗隆间骨折患者 50 例,其中骨质疏松症患者 25 例(OPF 组),骨量正常患者 25 例(对照组)。术前采集患者外周血,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 Sirt1 浓度。术中于骨折端内用刮匙刮取骨组织约 1.0 g,提取骨组织总 RNA 和总蛋白。采用 RT-qPCR 方法检测 Sirt1 的 mRNA 表达差异;采用 Western blot 方法检测 Sirt1 蛋白的表达差异。**结果** 与对照组相比,OPF 组患者血清中 Sirt1 浓度明显下降,骨组织中 Sirt1 的 RNA 及蛋白水平表达均显著降低( $P<0.05$ )。**结论** OPF 的发生可能与 Sirt1 表达降低有关。Sirt1 可能是骨质疏松症治疗的一个重要靶标,可通过调控 Sirt1 的表达干预 OPF 的发生和治疗。

**关键词:** 绝经; 骨质疏松性骨折; 沉默信息调节因子 1; 骨密度

**中图分类号:** R58 R683 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2022)06-0761-04

## Expression and significance of silent information regulator 1 in postmenopausal osteoporotic fracture

ZHAI Huai-yuan\*, GUO Yi-long, ZHAI Juan, LIU Yan-hong, SONG Xing-chen, WANG Shen, GENG Qing-he

\* *Central Laboratory of Pizhou Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221300, China**Corresponding author: GENG Qing-he, E-mail: Qinghegen@xzhmu.edu.cn*

**Abstract: Objective** To observe the changes of silent information regulator 1 (SIRT1) gene and protein expression in blood and bone tissue of osteoporotic fracture (OPF) patients, and to explore the significance of SIRT1 in the pathogenesis of OPF. **Methods** Fifty postmenopausal female patients with femoral intertrochanteric fracture treated in the Department of orthopedics, Pizhou Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University from January 2018 to October 2021 were prospectively selected, including 25 patients with osteoporosis (OPF group) and 25 patients with normal bone mass (control group). The peripheral blood was collected before operation, and the concentration of SIRT1 in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). During the operation, about 1.0 g of bone tissue was scraped with a curette in the fracture end, and the total RNA and total protein of bone tissue were extracted. The mRNA expression of SIRT1 was detected by RT-qPCR, and the expression of SIRT1 protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the concentration of SIRT1 in serum and the expression of SIRT1 RNA and protein in bone tissue in OPF group decreased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The occurrence of OPF may be related to the decrease of SIRT1 expression. SIRT1 may be an important target for the treatment of osteoporosis. The occurrence and treatment of OPF can be intervened by regulating the expression of SIRT1.

**Keywords:** Menopause; Osteoporotic fracture; Silent information regulator 1; Bone density

**Fund program:** General Project of China National Postdoctoral Foundation (2020M681739); Medical Scientific

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.06.004

**基金项目:** 中国国家博士后基金委面上项目(2020M681739); 江苏省卫健委医学科研立项项目(Z2021046); 江苏省重点实验室开放课题(XZSYSKF2020004); 徐州医科大学科技处资助项目(2018KJ23)

**通信作者:** 耿庆贺, E-mail: Qinghegen@xzhmu.edu.cn

**出版日期:** 2022-06-20

Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (Z2021046); Open Project of Jiangsu Key Laboratory (XZSYSKF2020004); Science and Technology Department of Xuzhou Medical University Supported Program (2018KJ23)

骨质疏松症是临床常见的多因素、全身性骨骼疾病,以低骨量、骨微结构退化、骨脆性增加和易骨折为特征<sup>[1-3]</sup>。因为能够显著增加患者的死亡率,骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)目前被认为是一个严重的公共卫生问题。髌部骨折的情况,表现尤其明显。50岁以后,约42%~56%的女性和27%~29%的男性会发生OPF。随着人口老龄化问题加剧,OPF的数量会以每年4%的比例增加<sup>[4]</sup>。OPF内固定操作困难、愈合变缓,易发生骨不连。而且,OPF术后再骨折可能性明显增高<sup>[5]</sup>。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, Sirt1)是一种Ⅲ型乙酰转移酶基因参与了一系列生物学过程,包括能量代谢、DNA修复、线粒体内稳定、细胞衰老、肿瘤抑制等。研究表明,Sirt1基因参与骨代谢,与骨量多少关系密切<sup>[6-8]</sup>。本研究拟采用酶联免疫法(ELISA)、RT-qPCR、Western blot技术检测血液及骨中Sirt1表达水平,观察OPF患者血液及骨折端骨组织Sirt1表达变化,探讨Sirt1在OPF中的作用及意义。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究前瞻性选取2018年1月至2021年10月在徐州医科大学附属邳州医院骨科就诊的绝经后女性股骨粗隆间骨折患者50例,其中骨质疏松症患者25例(OPF组),骨量正常患者25例(对照组)。所有患者入院前无认知障碍、有正常活动能力、有完全民事行为能力。术前均行X线检查,确诊为股骨粗隆间骨折,均需行股骨近端髓内钉(proximal femoral nail antirotation, PFNA)内固定术。术前告知研究涉及的相关事宜,所有患者均同意为本研究受试,并签署知情同意书。本研究获得徐州医科大学附属邳州医院伦理委员会批准(批准编号:2021-2-018)。

1.2 入组与排除标准 (1)OPF组入组标准:①满足受试基本条件;②对侧未骨折髌关节骨密度的T值 $\leq -2.5$ ,诊断为骨质疏松症。(2)对照组入组标准:①满足受试基本条件;②对侧未骨折髌关节骨密度,T值 $\geq -1.0$ 。(3)排除标准:①近1年内服用甲状腺激素、雌激素史;②近1年内服用甲状旁腺激素、双膦酸盐、地舒单抗、鲑鱼降钙素等抗骨质疏松药物;③合并各种能够引起继发性骨质疏松的内分泌性疾

病;④合并各种严重慢性疾病如冠心病、脑梗死、心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病等。

1.3 骨密度检测 采用韩国 Osteosys PRIMUS 双能X线全身骨密度测量仪,扫描对侧健康髌关节,检测其骨密度,记录其T值。

1.4 标本收集 (1)血液标本收集:患者入院次日晨间空腹采集静脉血5 ml。离心分离血清,于-80℃冰箱保存备用。(2)骨组织标本收集:患者在伤后3~7 d内均行PFNA内固定术。术中于骨折端内用刮匙刮取骨折处骨组织约1.0 g,迅速放入小液氮瓶中。

### 1.5 样本检测

1.5.1 ELISA法检测血清Sirt1水平 按ELISA检测试剂盒说明书,配制标准液,取冻存的血清,按要求步骤进行检测。

1.5.2 RT-qPCR法检测血管内皮生长因子mRNA的表达 100 mg骨组织置于无菌研钵中,加入液氮研磨匀浆。采用一步法提取骨总RNA。紫外分光光度计测定吸光度值,分析浓度及纯度。取2  $\mu$ g的RNA,使用PrimeScript RT reagent Kit (Code No.:RR037A)试剂盒,将mRNA逆转成互补DNA(cDNA)。分别以各自的引物扩增Sirt1和GAPDH。以GAPDH做Sirt1基因相对表达分析的内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算骨组织中Sirt1基因的表达量。引物序列为Sirt1正向引物:5'-CCCAGAACATAGACACGCTGGA-3',反向引物:5'-ATCAGCTGGGCACCTAGGACA-3'。内参GAPDH正向引物:5'-GATTCCACCCATGGCAAATTC-3',反向引物:5'-AGCATCGCCCCACTTGATT-3'。

1.5.3 Western blot检测骨折断端Sirt1的表达 术中所取骨组织按组织裂解法提取总蛋白。使用制胶试剂盒制胶。蛋白上样电泳,结束后转膜。使用5%脱脂牛奶对硝酸纤维素薄膜封闭。一抗孵育过夜,更换二抗室温继续孵育2 h,洗涤液洗膜。使用ECL发光液在暗室中对膜显色,在胶片上显示出目的条带。用Gene Genius生物图像分析仪对膜上目的条带进行灰度值测量。以GAPDH为参考,计算Sirt1蛋白相对表达水平。Sirt1(ab110304)、GAPDH抗体均购自Abcam公司。

1.6 统计学处理 用Graphpad 7.0统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患者一般资料 患者一般资料见表1。两组患者年龄、BMI 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。对照组骨密度正常,OPF 组骨密度 T 值 $<-2.5$ ,两组之间差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

2.2 两组患者血清 Sirt1 浓度比较 使用 ELISA 法检测两组患者血清中 Sirt1 浓度。结果发现 OPF 组血清中 Sirt1 浓度较对照组浓度明显降低( $P<0.05$ )。见图 1A。

2.3 两组患者骨组织 Sirt1 的 RNA 表达比较 使用 RT-qPCR 法检测两组患者骨中 Sirt1 的 RNA 表达。结果发现 OPF 组骨中 Sirt1 的 RNA 表达较对照明显

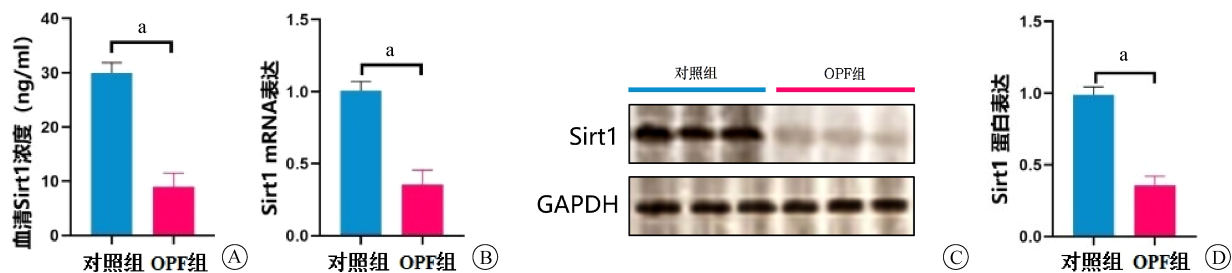
降低( $P<0.05$ )。见图 1B。

2.4 两组患者骨组织 Sirt1 蛋白表达比较 使用 Western blot 法检测两组患者骨中 Sirt1 蛋白质表达。结果发现 OPF 组骨中 Sirt1 蛋白表达较对照组明显降低( $P<0.05$ )。见图 1C、1D。

表 1 两组患者一般情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 1 General information of patients between two groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	年龄(岁)	BMI	对侧髋部 T 值
对照组	25	68.96 $\pm$ 5.29	27.18 $\pm$ 2.06	-0.37 $\pm$ 0.35
OPF 组	25	69.32 $\pm$ 5.74	26.99 $\pm$ 2.42	-2.95 $\pm$ 0.28
t 值		0.23	0.30	28.78
P 值		0.82	0.76	<0.01



注:A 为血清 Sirt1 浓度比较;B 为骨组织 Sirt1 的 RNA 表达比较;C、D 为骨组织 Sirt1 蛋白表达比较。与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

图 1 两组患者血清及骨组织 Sirt1 表达变化

Fig. 1 Changes of SIRT1 expression in serum and bone of the two groups

## 3 讨论

因为骨量减少、骨微结构破坏,导致骨强度下降、骨脆性升高,最终引起 OPF 发生。虽然手术是 OPF 目前最有效的治疗方法,但许多 OPF 术后会并发骨不连、骨坏死、瘫痪、脑血管意外,甚至死亡。因此,寻找能够预防或治疗骨质疏松症的靶标,减少 OPF 的发生,具有十分重要的实际意义。

Sirt1 是沉默信息调节因子(sirtuin)家族的一员,可通过蛋白去乙酰化修饰调控细胞的多种生理过程,最先探讨 Sirt1 在骨代谢中的作用是从研究 Sirt1 全基因敲除(Sirt1<sup>-/-</sup>)小鼠开始的<sup>[6-7]</sup>。和野生型对照小鼠相比,Sirt1<sup>-/-</sup>小鼠在胚胎期和出生时体型较小,围产期死亡率高,视网膜和心脏严重发育缺陷。这些小鼠同时合并颅面异常,包括颅面骨发育、闭合缺陷,异常的腭结构和无脑畸形<sup>[6-7]</sup>。此外,Sirt1<sup>-/-</sup>幼崽表现出颅骨、椎骨、指骨骨矿化延迟<sup>[7]</sup>。同样,成年小鼠全基因敲除 Sirt1 后,松质骨、皮质骨显著减少。Sirt1 杂合子(Sirt1<sup>+/-</sup>)小鼠也显示出长骨中的松质骨和皮质骨骨量明显减少。除了基因敲除模型,还开发了 Sirt1 过表达(Sirt1<sup>Tg</sup>)小鼠模型,研究 Sirt1 激活对

于骨稳态的影响。与野生型小鼠相比,2.5 年的老龄转基因小鼠骨量高 40%~50%。年轻(1 个月)和老年(18 个月)Sirt1<sup>Tg</sup>小鼠骨量均增加,与成骨细胞增加和破骨细胞减少有关。这些影响是通过恢复间充质干细胞(MSC)中的氧化还原平衡来实现<sup>[8]</sup>。这些结果表明,Sirt1 在骨骼发育和重塑中发挥重要作用。此外,Sirt1 可以通过调节激素和内分泌信号通路影响骨骼重塑和生长轴。雌激素治疗能够上调 Sirt1 表达。相反,卵巢切除(OVX)导致 Sirt1 表达下降<sup>[9]</sup>。

Sirt1 通过直接调节性别决定区 Y-box2,促进 MSCs 的自我更新和维持。据报道,Sirt1 还可以通过 RUNX2 的直接脱乙酰或间接通过形成 Sirt1-FOXO3A 复合物进行激活 RUNX2,促进 MSC 向成骨细胞分化。Sirt1 抑制过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),促进 MSC 向成骨细胞分化。Sirt1 还可通过抑制 WNT/ $\beta$ -连环蛋白拮抗剂硬化蛋白(SOST)的表达,促进骨形成<sup>[10]</sup>。Sirt1 通过修饰 SOST 启动子处的 H3K9 乙酰化,抑制 SOST 表达。此外,Sirt1 激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ )转录活性,诱导线粒体及抗氧化酶生成,抑制线粒体产生 ROS,从而保护骨内细胞<sup>[11]</sup>。Sirt1 上

调后,通过调节 FoxO1/ $\beta$ -catenin 通路,抑制  $H_2O_2$  诱导成骨细胞凋亡<sup>[11]</sup>。同样,Sirt1 已被证明可以通过抑制 p53-p21 和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 信号传导,抑制成骨细胞凋亡。此外,Sirt1 通过负调节 NF- $\kappa$ B 和 FoxO 转录因子,抑制破骨细胞分化。研究表明,Sirt1 依赖性去乙酰化 SOST 启动子,导致 SOST 表达降低,增强 WNT/ $\beta$ -catenin 信号,导致小鼠骨量增加<sup>[12]</sup>。

第一代 Sirt1 激活剂白藜芦醇在 2003 年被发现。白藜芦醇能够以剂量依赖性方式增加 Sirt1 蛋白表达,并延长酵母寿命<sup>[13]</sup>。用白藜芦醇治疗超过 18 个月的小鼠,显示松质骨和皮质骨的质量显著改善,表明 Sirt1 激活对衰老相关的骨质流失具有保护作用。此外,白藜芦醇治疗可防止 OVX 小鼠模型中骨质流失,表明 Sirt1 激活可以预防或减轻绝经后骨质疏松症。对 2 周龄幼鼠予以白藜芦醇给药 10 周后,也明显增加了小鼠骨量和成骨细胞数量<sup>[14]</sup>。

过去研究中发现了 SRT1720、SRT2104 和 SRT3025 等一系列 Sirt1 激活剂。对 7 月龄老年小鼠予以 SRT1720 治疗 5 个月后,股骨小梁骨量增加了 50%<sup>[15]</sup>。SRT1720 减轻 OVX 模型中骨质流失,其骨保护作用可能是因为促进骨形成、抑制骨吸收,和降低硬化蛋白水平<sup>[15]</sup>。SRT2104 不仅延长小鼠寿命,还能够提高骨密度达 65%,其原因可能是由于 SRT2104 较高的线粒体含量和炎症减少。SRT3025 可通过抑制骨硬化蛋白,显著恢复 OVX 小鼠骨骼<sup>[10]</sup>。Sirt1 激活可以防止糖皮质激素和噻唑烷二酮导致的骨质流失。SRT2104 能够缓解肢体制动诱发的骨质疏松症<sup>[15]</sup>。Sirt1 能够作为一种有效的治疗靶标,对抗骨质疏松症和其他相关骨骼疾病。

本研究根据患者骨密度,将所有骨折患者分为对照组和 OPF 组。通过 ELISA 法、RT-PCR 法、Western blot 法分别对两组患者的血清样本、骨折断端骨组织样本进行分析。结果发现,与骨密度正常的对照组相比较,OPF 组患者血清 Sirt1 浓度下降,骨折断端骨组织样本内 Sirt1 在基因水平、蛋白水平表达均下降,提示 Sirt1 参与骨质疏松症的发展。

总而言之,本研究发现 OPF 与 Sirt1 因子有着密切关系。对于骨质疏松的患者,Sirt1 可能是一个有效靶标。通过 Sirt1 基因水平的干预,可以预防或减轻骨质疏松症的发生发展,降低 OPF 发生的概率。

## 参考文献

- [1] Geng QH, Gao HY, Yang RL, 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.
- [2] Geng QH, Heng K, Li J, et al. A soluble bone morphogenetic protein type 1A receptor fusion protein treatment prevents glucocorticoid-induced bone loss in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4232-4247.
- [3] Wang S, Li J, Sun HB, et al. Treatment with soluble bone morphogenetic protein type 1A receptor fusion protein alleviates irradiation-induced bone loss in mice through increased bone formation and reduced bone resorption[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3):743-757.
- [4] Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture [J]. *Osteoporos Int*, 2004, 15(11):897-902.
- [5] Bliuc D, Nguyen ND, Nguyen TV, et al. Compound risk of high mortality following osteoporotic fracture and refracture in elderly women and men [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(11):2317-2324.
- [6] Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice [J]. *PNAS*, 2003, 100(19):10794-10799.
- [7] Lemieux ME, Yang X, Jardine K, et al. The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(10):1097-1105.
- [8] Wang H, Hu ZX, Wu J, et al. Sirt1 promotes osteogenic differentiation and increases alveolar bone mass via Bmi1 activation in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(6):1169-1181.
- [9] Wang XW, Chen LB, Peng W. Protective effects of resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):5032-5038.
- [10] Artsi H, Cohen-Kfir E, Gurt I, et al. The Sirtuin1 activator SRT3025 down-regulates sclerostin and rescues ovariectomy-induced bone loss and biomechanical deterioration in female mice [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(9):3508-3515.
- [11] Yao HL, Yao Z, Zhang SC, et al. Upregulation of SIRT1 inhibits  $H_2O_2$ -induced osteoblast apoptosis via FoxO1/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6681-6690.
- [12] Stegen S, Stockmans I, Moermans K, et al. Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2557.
- [13] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*, 2003, 425(6954):191-196.
- [14] Zhao M, Ko SY, Garrett IR, et al. The polyphenol resveratrol promotes skeletal growth in mice through a sirtuin 1-bone morphogenetic protein 2 longevity axis [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(21):4183-4192.
- [15] Zainabadi K, Liu CJ, Guarente L. SIRT1 is a positive regulator of the master osteoblast transcription factor, RUNX2 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0178520.

收稿日期:2021-11-27 修回日期:2022-01-24 编辑:王娜