

· 基础研究 ·

p53半剂量缺失纠正1,25(OH)₂D₃缺乏小鼠的骨质疏松

张 维¹,倪进荣²,周 俊³,刘 昀^{1*},张群虎^{2*}

¹南京医科大学康达学院基础医学部人体解剖学系,江苏 连云港 222000;²南京医科大学附属宿迁第一人民医院骨科,江苏 宿迁 223800;³南京医科大学附属宿迁第一人民医院风湿免疫科,江苏 宿迁 223800

[摘要] 目的:探索p53半剂量缺失杂合子小鼠能否通过增强抗氧化能力纠正活性维生素D(1,25(OH)₂D₃)缺乏引起的骨质疏松。方法:取10周龄高钙高磷饮食喂养的同窝野生型(wild type, WT)小鼠、p53半剂量缺失杂合子(p53^{+/-})小鼠、1 α -羟化酶基因敲除[1 α (OH)ase^{-/-}]小鼠及p53半剂量缺失的1 α -羟化酶基因敲除[1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-}]小鼠的长骨,利用X线、micro-CT、组织病理学和分子生物学等方法,比较各组小鼠血清学、长骨骨矿化、骨形成、骨吸收以及氧化应激等表达变化。结果:与WT小鼠相比,p53^{+/-}小鼠血清钙、磷、甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)和1,25(OH)₂D₃水平差异无统计学意义,骨密度、总胶原(total collagen, T-col)阳性面积、成骨细胞数量、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和I型胶原(collagen type I, Col- I)阳性面积均有所增加,活性氧水平降低,抗氧化酶SOD1表达增加。与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比,1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠血清钙、磷和PTH差异无统计学意义,血清中检测不到1,25(OH)₂D₃,骨密度、T-col阳性面积、成骨细胞数量、ALP和Col- I阳性面积均明显增加,破骨细胞数量减少,活性氧水平降低,抗氧化酶SOD1表达增加。结论:p53半剂量缺失可通过增强抗氧化能力纠正1,25(OH)₂D₃缺乏小鼠的骨质疏松。

[关键词] 骨质疏松;p53;1,25(OH)₂D₃;氧化应激

[中图分类号] R591.44

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)04-455-08

doi: 10.7655/NYDXBNSN230997

p53 heterozygote attenuates osteoporosis phenotype of 1,25(OH)₂D₃ deficient mice

ZHANG Wei¹, NI Jinrong², ZHOU Jun³, LIU Yun^{1*}, ZHANG Qunhu^{2*}

¹Department of Human Anatomy, Kangda College, Nanjing Medical University, Lianyungang 222000; ²Department of Orthopedics, the Affiliated Suqian First People's Hospital of Nanjing Medical University, Suqian 223800; ³Department of rheumatology and immunology, the Affiliated Suqian First People's Hospital of Nanjing Medical University, Suqian 223800, China

[Abstract] **Objective:** To explore whether p53 heterozygote attenuates osteoporosis phenotype of 1,25(OH)₂D₃ deficient mice by enhancing the antioxidant capacity. **Methods:** The long bones of 10-week-old wild type (WT) mice, p53 heterozygote (p53^{+/-}) mice, 1 α -hydroxylase knockout [1 α (OH)ase^{-/-}] mice, and 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} mice, fed on a high-calcium and high-phosphorus diet, were analyzed and compared using X-ray, micro-CT, histopathological and molecular biology methods to observe and compare changes in serum levels, bone mineralization, bone formation, bone absorption, and oxidative stress expression. **Results:** Compared with WT mice, p53^{+/-} mice showed no significant differences in serum calcium, phosphorus, parathyroid hormone (PTH), and 1,25(OH)₂D₃ levels, but had the increased bone density, total collagen (T-col) positive area, osteoblast number, alkaline phosphatase (ALP), and type I collagen (Col- I) positive area, along with the decreased levels of reactive oxygen species and the increased expression of the antioxidant enzyme SOD1. Compared with 1 α (OH)ase^{-/-} mice, 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} mice showed no significant differences in serum calcium, phosphorus, and PTH levels, with undetectable levels of 1,25(OH)₂D₃ in the serum, but showed significantly increased bone density, T-col positive area, osteoblast number, ALP and Col- I positive area, decreased osteoclast number and reactive oxygen species levels, and increased expression of SOD1. **Conclusion:** Half-dose deletion of p53 can attenuate osteoporosis phenotype of 1,25(OH)₂D₃ deficient

[基金项目] 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(22KJB320016);南京医科大学康达学院科研人才培养计划(KD2021KYRC025);宿迁市科技计划资助(KY202214);宿迁市科技计划自然科学基金项目(K202001)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhang_9086@163.com; 15195969201@163.com

mice by enhancing the antioxidant capacity.

[Key words] osteoporosis; p53; 1, 25(OH)₂D₃; oxidative stress

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(04): 455-461, 545]

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种全身性骨骼疾病,以骨量减少、骨组织的微结构恶化、易引发脆性骨折为主要病理特征^[1]。骨质疏松是一种衰老相关的慢性疾病,常见于中老年患者。全球骨质疏松患病率约为18.3%^[2],且脆性骨折发生率随年龄增长明显增加^[3-4]。因此,深入研究骨质疏松发生发展的分子机制对其早期诊断及防治具有重要意义。

在肝脏25-羟化酶的作用下,维生素D原被转化成25(OH)D₃,后通过肾脏1 α -羟化酶[1 α (OH)ase]转化成活性维生素D[1,25(OH)₂D₃],再与维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)结合发挥其功能^[5]。维生素D能促进肠道对钙、磷的吸收,维持体内钙磷平衡,对骨骼矿化和骨量维持有重要意义^[6]。研究显示,1 α (OH)ase^{-/-}及VDR^{-/-}小鼠均表现佝偻病、骨质疏松等早衰表型,补充内源性或外源性1,25(OH)₂D₃均能促进成骨细胞骨形成^[7-8],然而,1,25(OH)₂D₃缺失导致骨质疏松发生发展的分子机制有待进一步研究。

p53-p21是介导细胞衰老的经典通路之一,DNA损伤激活p53信号通路在细胞衰老中起重要作用^[9]。p53敲除(p53^{-/-})小鼠的成骨细胞衰老减少,分化加速,骨密度增加^[10]。但p53作为重要的抑癌基因,p53^{-/-}小鼠仅能存活6个月^[11]。研究表明,氧化应激反应抑制骨形成,导致骨损伤,而抗氧化剂能够促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSC)向成骨细胞分化,抑制破骨细胞活性,从而预防骨质疏松的发生^[12-13]。也有研究发现,1,25(OH)₂D₃通过VDR介导转录调控核因子E2相关因子(nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor, Nrf2)的基因转录,增强其下游抗氧化酶的表达,从而发挥抗氧化剂的作用^[14]。

本研究通过建立p53半剂量缺失伴1,25(OH)₂D₃缺乏[1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-}]的小鼠模型,给予高钙高磷饮食,利用X线、CT、组织病理学和分子生物学等方法,比较它们与同窝野生型(wild type, WT)小鼠、p53半剂量缺失杂合子(p53^{+/-})小鼠和1 α 羟化酶基因敲除[1 α (OH)ase^{-/-}]小鼠的长骨表型差异以及氧化应激等相关指标的表达变化,探索p53半剂量缺失能否通过增强抗氧化能力纠正活性维生素D缺乏

所致的骨质疏松。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

本研究所用1 α (OH)ase^{+/-}小鼠由加拿大麦吉尔大学引进,亲代p53^{+/-}小鼠通过南京大学模式动物中心代为从美国Jackson lab引进。成年1 α (OH)ase^{+/-}小鼠与p53^{+/-}小鼠雌雄合笼,获得1 α (OH)ase^{+/-}p53^{+/-}双杂基因型小鼠,再将双杂基因型小鼠雌雄合笼,获得5组同窝WT、p53^{+/-}、1 α (OH)ase^{-/-}及1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠,雌雄不限,3周龄分笼后,给予高钙高磷饮食(含2%钙、1.25%磷、20%乳糖)喂养至10周龄。动物使用均严格遵照南京医科大学实验动物管理规范进行(IACUC: 1802007)。

1.1.2 试剂

兔抗I型胶原(collagen type I, Col- I)抗体(Chemicon公司,美国),兔抗超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)1抗体(Abcam公司,美国),2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯(DCF-DA, Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 组织取材及切片

采用0.3%的戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/10 g体重)腹腔注射麻醉小鼠后,经心脏穿刺取外周血,静置4 h后离心分离血清做血清生化检测。取股骨和胫骨,使用PLP(2%副醛,75 mmol/L赖氨酸,10 mmol/L过碘酸钠)固定液固定,骨组织经过脱钙、脱水、浸蜡及石蜡包埋后切片,片厚5 μ m。同时取新鲜胫骨冻存,用于提取蛋白做Western blot检测。

1.2.2 X射线摄影、micro CT扫描及三维重建分析

取各组小鼠,解剖分离胫骨或股骨,PLP固定后,先进行X射线摄影,再进行micro-CT扫描,扫描后分别利用NRecon、Dataviewer、CTan、ANT软件进行三维重建分析。

1.2.3 组织化学和免疫组织化学染色

石蜡切片经常规脱蜡水化,参照参考文献[15]进行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)、总胶原(total collagen, T-col)、碱性磷酸酶(alkaline phos-

phatase, ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色和 Col- I 免疫组织化学染色^[16]。

1.2.4 ROS 流式细胞仪检测

小鼠麻醉后, 取股骨, 减去股骨两端抽出骨髓, 经过 300 目筛网获得单细胞悬液, 加预冷的 PBS 将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL。取 1 mL 单细胞悬液, 加 5 μ L DCF-DA 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 清洗多余的染液后通过流式仪检测细胞内荧光探针的平均荧光强度。

1.2.5 Western blot 实验

参照参考文献^[17]提取骨组织蛋白后进行 Western blot 实验和结果分析。骨组织按质量/体积约为 1:25 加入 RIPA 裂解, 剪碎、匀浆后, 于冰盒中静置 30 min。裂解液 13 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清使用 BCA 法进行定量。蛋白样 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。每组蛋白加样 20 μ g 至 10%SDS-PAGE 胶, 110 V 恒压电泳 2 h。300 mA 恒流转膜 90 min, 使蛋白湿转至硝酸纤维素膜。用含 5% 脱脂奶粉 PBST 于 37 $^{\circ}$ C 条件下封闭 60 min。加入适量一抗[兔抗 β actin 抗体(1:1 000)、兔抗 SOD1 抗体(1:1 000)]在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。5%PBST 洗涤

后, 加入特异性二抗, 室温条件下孵育 60 min。洗膜后, 滴加 ECL 混合液, 自动成像仪曝光, 保存显影图像。采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析图像。

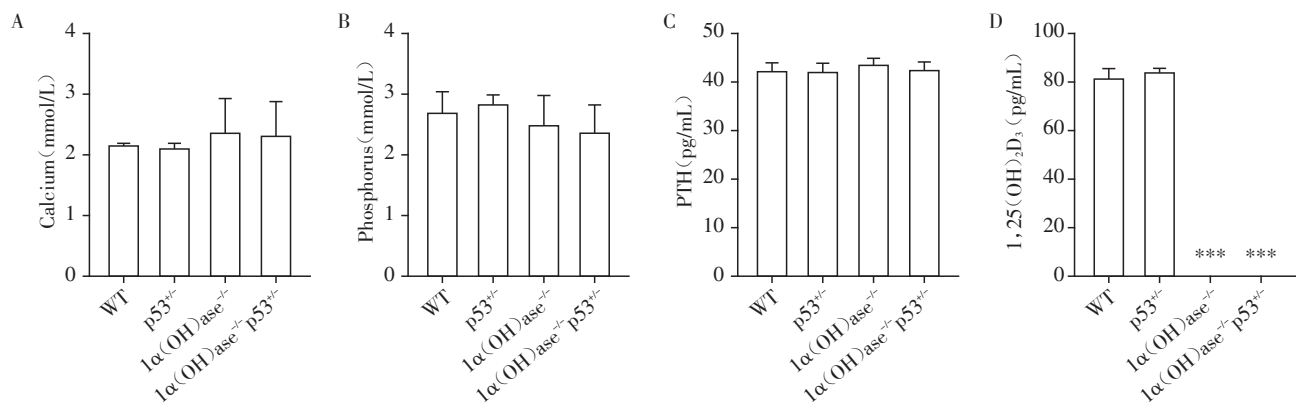
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析及作图。各组计量结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验和单因素方差(one-way ANOVA)进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p53 半剂量缺失对 1, 25(OH)₂D₃ 缺乏小鼠血清指标的影响

检测了 10 周龄高钙磷饮食同窝 WT、p53^{+/-}、1 α (OH)ase^{-/-}和 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} 小鼠血清钙、磷、1, 25(OH)₂D₃ 和甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)水平的变化。结果发现: 给予高钙磷饮食喂养后, 各组小鼠血清钙(图 1A)、磷(图 1B)和 PTH(图 1C)水平差异无统计学意义。p53^{+/-} 小鼠与 WT 小鼠的血清 1, 25(OH)₂D₃ 水平差异无统计学意义, 而 1 α (OH)ase^{-/-} 小鼠和 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} 小鼠均检测不到 1, 25(OH)₂D₃ (图 1D), 以上实验结果提示 p53 半剂量缺失改善 1, 25(OH)₂D₃ 缺乏小鼠的骨质疏松与钙磷变化无关。



A: Statistical diagram of serum calcium levels in four group mice. B: Statistical diagram of serum phosphorus levels in four group mice. C: Statistical diagram of PTH levels in four group mice. D: Statistical diagram of 1, 25(OH)₂D₃ levels in four group mice. Compared with the WT group, *** $P < 0.001$ ($n=5$).

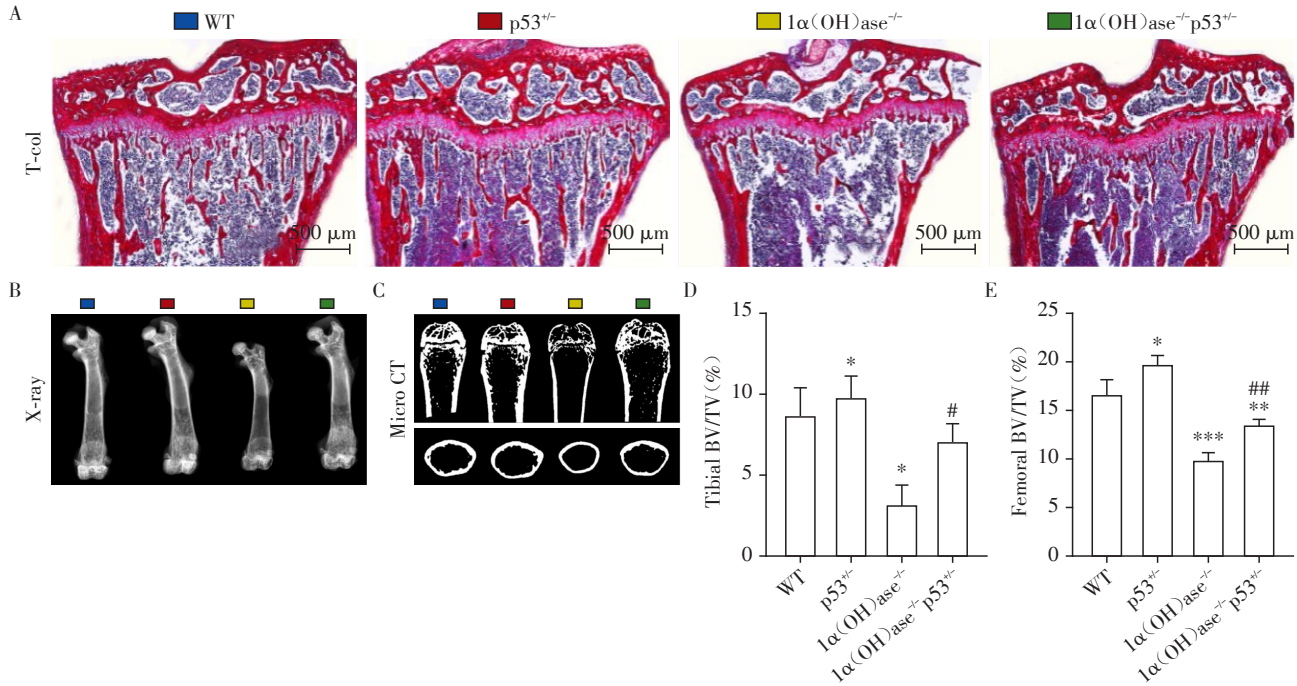
图1 p53 半剂量缺失对 1, 25(OH)₂D₃ 缺乏小鼠血清钙、磷、PTH 和 1, 25(OH)₂D₃ 水平的影响

Figure 1 Effects of half-dose deletion of p53 on mouse serum levels of calcium, phosphorus, PTH and 1, 25(OH)₂D₃ in 1, 25(OH)₂D₃ deficient mice

2.2 p53 半剂量缺失对 1, 25(OH)₂D₃ 缺乏小鼠骨矿化和骨容量的影响

为了明确 p53 半剂量缺失能否改善活性维生素 D 缺乏引起的骨骼矿化和骨容量减少, 利用 X 线摄影、micro-CT 扫描、三维重建分析和总胶原组织化学染色的方法, 比较分析了 10 周龄高钙磷饮食 WT、

p53^{+/-}、1 α (OH)ase^{-/-} 和 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} 小鼠骨矿化程度与骨容量的变化。结果显示: 与 WT 小鼠相比, p53^{+/-} 小鼠骨矿化和骨容量增加, 1 α (OH)ase^{-/-} 小鼠显著降低。与 1 α (OH)ase^{-/-} 小鼠相比, 1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-} 小鼠骨容量(图 2A、D、E)与骨矿化程度(图 2B、C)显著增加。上述结果证明 p53 半剂量缺失能



A: Representative micrographs of total collagen (T-col) staining of the tibias ($\times 50$). B: Representative X-ray radiographs of the femurs. C: Representative images of micro-CT-scanned sections of 3D reconstructions of the femurs. D: Statistical diagram of tibia bone volume relative to total volume (BV/TV, %). E: The femur bone volume relative to total volume (BV/TV, %). Compared with the WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the $1\alpha(\text{OH})\text{ase}^{-/-}$ group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=5$).

图2 p53半剂量缺失对1, 25(OH)₂D₃缺乏小鼠骨矿化和骨容量的影响

Figure 2 Effects of half-dose deletion of p53 on bone mineralization and volume in 1, 25(OH)₂D₃ deficient mice

够改善1, 25(OH)₂D₃缺乏小鼠的骨矿化降低和骨容量减少。

2.3 p53半剂量缺失对1, 25(OH)₂D₃缺乏小鼠成骨细胞骨形成的影响

为探索p53半剂量缺失改善1, 25(OH)₂D₃缺乏小鼠的骨骼矿化和骨容量减少是否与成骨细胞骨形成增加有关, 通过HE、ALP和Col-I免疫组织化学染色, 比较分析了10周龄高钙磷饮食WT、p53^{+/-}、1α(OH)ase^{-/-}和1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠成骨细胞骨形成的变化。结果显示: 与WT小鼠相比, p53^{+/-}小鼠成骨细胞数量、ALP和Col-I阳性面积有所增加, 1α(OH)ase^{-/-}小鼠则显著降低, 而与1α(OH)ase^{-/-}小鼠相比, 1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠成骨细胞数量(图3A、D)、ALP(图3B、E)和Col-I(图3C、F)阳性面积均显著增加。这些结果证明p53半剂量缺失能够改善1, 25(OH)₂D₃缺乏引起的成骨细胞骨形成减少。

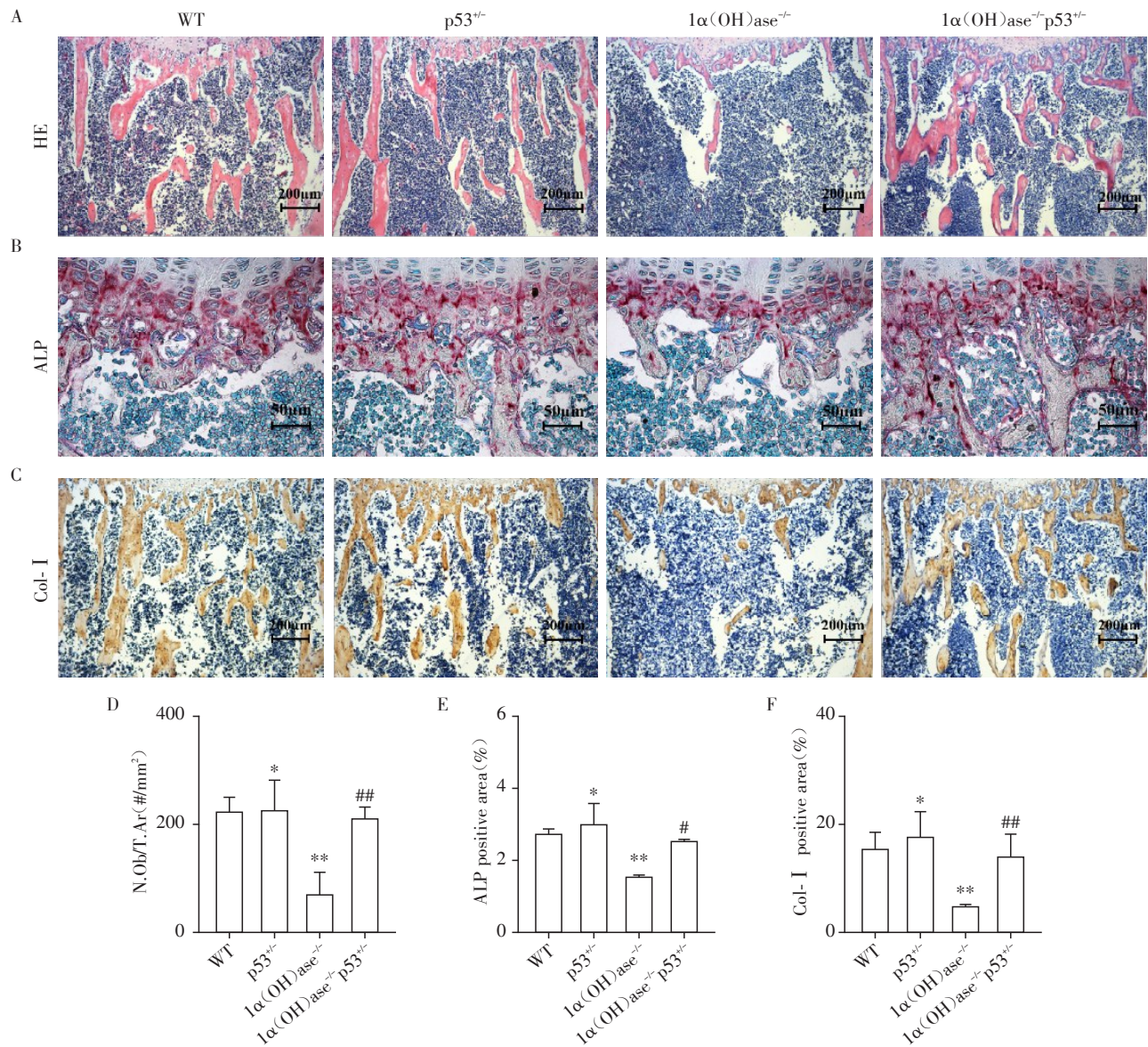
2.4 p53半剂量缺失对1, 25(OH)₂D₃缺乏小鼠破骨细胞骨吸收的影响

为研究p53半剂量缺失改善1, 25(OH)₂D₃缺乏引起的骨骼矿化和骨容量减少是否与破骨细胞骨吸收有关, 利用TRAP组织化学染色的方法, 比较分

析了10周龄高钙磷饮食WT、p53^{+/-}、1α(OH)ase^{-/-}和1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠破骨细胞骨吸收的变化。结果显示: 与WT小鼠相比, p53^{+/-}小鼠TRAP阳性破骨细胞无显著变化, 1α(OH)ase^{-/-}小鼠则显著增多。而与1α(OH)ase^{-/-}小鼠相比, 1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠TRAP阳性破骨细胞(图4A、B)显著减少。这些结果证明p53半剂量缺失能够减少1, 25(OH)₂D₃缺乏引起的破骨细胞骨吸收。

2.5 p53半剂量缺失对活性维生素D缺乏小鼠骨组织氧化损伤的影响

为研究p53半剂量缺失改善活性维生素D缺乏引起的骨质疏松是否与抗氧化能力增强有关, 利用DCF-DA标记、流式细胞检测和Western blot, 比较分析了10周龄高钙磷饮食WT、p53^{+/-}、1α(OH)ase^{-/-}和1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠骨髓细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)和骨组织抗氧化酶SOD1蛋白表达水平的变化。结果显示: 与WT小鼠相比, p53^{+/-}小鼠ROS水平降低、SOD1蛋白表达水平增加。而与1α(OH)ase^{-/-}小鼠相比, 1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠活性氧ROS水平(图5A、B)显著降低、SOD1蛋白表达水平(图5C、D)显著增加。这些结果证明p53半剂量



A: Representative HE staining of mouse tibias (×100). B: Representative ALP stained trabecular bone area of mouse tibias (×400). C: Immunohistochemical staining for Col- I (×100). D: Quantitative analysis of the number of osteoblasts per tissue area (N.Ob/T.Ar, #/mm²). E: Quantification of ALP positive area. F: Quantification of Col- I positive area. Compared with the WT group; **P* < 0.05, ***P* < 0.01; compared with the 1α(OH)ase^{-/-} group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 (*n* = 5).

图3 p53半剂量缺失对活性维生素D缺乏小鼠成骨细胞骨形成的影响

Figure 3 Effects of half-dose deletion of p53 on bone formation by osteoblasts in 1, 25(OH)₂D₃ deficient mice

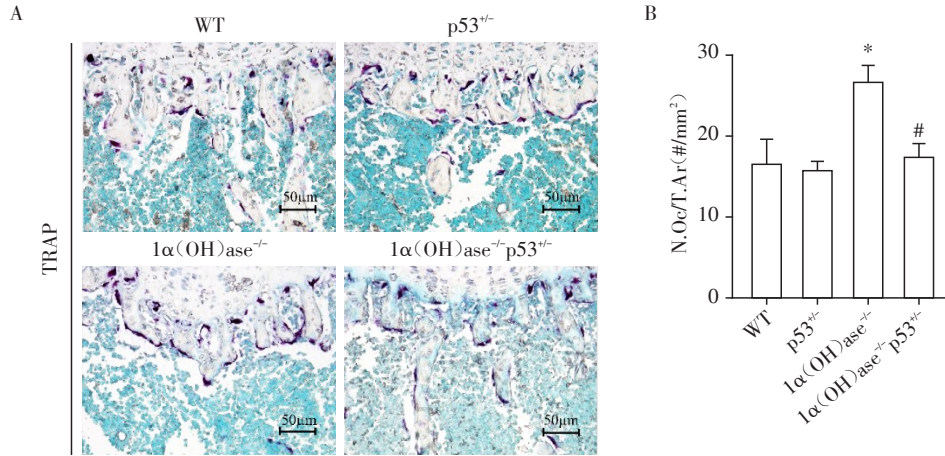
缺失能够纠正活性维生素D缺乏引起的骨质疏松与抗氧化能力增强有关。

3 讨论

维生素D缺乏和不足是一个全球性的健康问题,维生素D缺乏与多种急慢性疾病有关,包括免疫性疾病、骨软化、肿瘤和心血管疾病等^[18-19]。维生素D代谢物1, 25(OH)₂D₃的主要作用是刺激肠道对钙的吸收,维生素D缺乏的后果是继发性甲状旁腺功能亢进和骨质流失,导致骨质疏松和骨折^[20-21],然而具

体的分子机制尚不清楚。本研究使用已经较为成熟的活性维生素D缺乏小鼠模型,即1α(OH)ase基因敲除小鼠[1α(OH)ase^{-/-}],以进一步验证活性维生素D缺乏导致骨质疏松的分子机制。

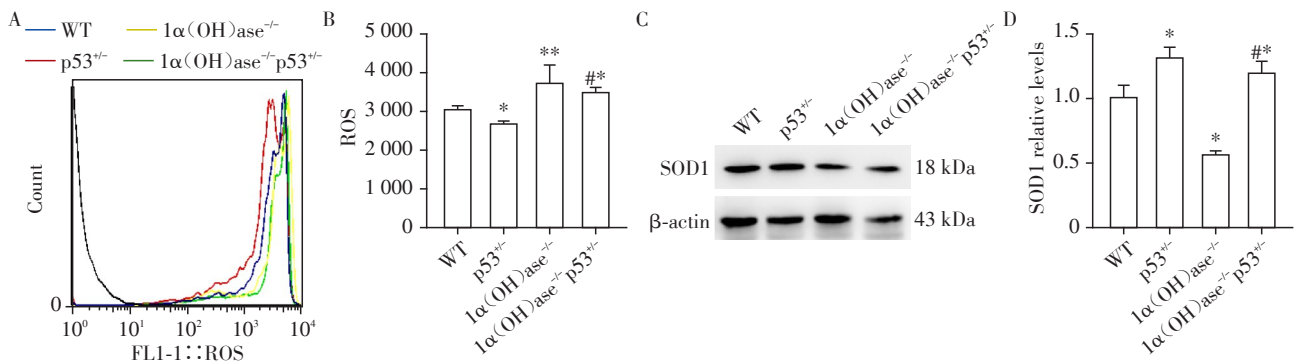
骨质疏松是衰老相关疾病,而p53-p21是介导衰老的经典通路之一,先前研究已经证明p53基因敲除小鼠骨容量增加^[10]。因此设想p53敲除能够纠正活性维生素D缺乏导致的骨质疏松表型。由于p53^{-/-}小鼠仅能存活6个月,为排除肿瘤的影响,本研究使用p53半剂量缺失的1α(OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小



A: Representative micrographs of tibial sections were stained histochemically for tartrate-resistant acid phosphatase (×400). B: Quantitative analysis of the number of osteoclasts per tissue area (N.Oc/T.Ar, #/mm²). Compared with the WT group, **P* < 0.05; compared with the 1α(OH)ase^{-/-} group, #*P* < 0.05 (n=5).

图4 p53半剂量缺失对1,25(OH)₂D₃缺乏小鼠破骨细胞骨吸收的影响

Figure 4 Effects of half-dose deletion of p53 on bone resorption by osteoclasts in 1,25(OH)₂D₃ deficient mice



A: Representative graphs of flow cytometry analysis of bone marrow cells for DCF-DA. B: ROS levels were assessed by mean fluorescence intensity analysis. C: Western blot of bone extracts for the expression of SOD1. D: The SOD1 protein relative levels to β-actin were assessed by densitometric analysis. Compared with the WT group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; compared with the 1α(OH)ase^{-/-} group, #*P* < 0.05 (n=5).

图5 p53半剂量缺失对活性维生素D缺乏小鼠骨组织氧化损伤的影响

Figure 5 Effects of half-dose deletion of p53 on oxidative damage to bone tissue in 1,25(OH)₂D₃ deficient mice

鼠模型。

活性维生素D生物学效应的发挥既有VDR介导的直接作用,也可有细胞外钙磷介导的间接作用,而活性维生素D调节骨矿化的经典作用是通过提高细胞外钙磷水平^[22]。1α(OH)ase基因敲除小鼠表现为血清低钙低磷且无活性维生素D,为了排除钙磷的影响,给予各组小鼠高钙高磷饮食。结果发现,高钙磷饮食喂养后,WT和p53^{-/-}小鼠血清钙、磷、1,25(OH)₂D₃和PTH水平在正常范围内;1α(OH)ase^{-/-}小鼠、1α(OH)ase^{-/-}p53^{-/-}小鼠的血清钙、磷和PTH可以被高钙磷饮食矫正至正常水平,仅表现为无血清1,25(OH)₂D₃。此模型观察了活性维生素D缺乏对骨质疏松的影响。结果发现:活性维生素D缺乏小鼠骨容量和矿化程度较WT小鼠明显减少,但p53半

剂量缺失能够明显增加活性维生素D缺乏小鼠的骨容量及骨矿化程度。骨量的增加可能与成骨细胞骨形成增加有关,也可能与破骨细胞骨吸收的减少有关。因此检测了各组小鼠成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收的变化。结果显示1α(OH)ase^{-/-}小鼠表现为骨形成明显降低,破骨细胞骨吸收显著增加,p53半剂量缺失能增加活性维生素D缺乏小鼠骨形成,也能降低破骨细胞骨吸收。

大量的研究证实活性维生素D具有保护正常细胞免受氧化应激攻击的作用。补充活性维生素D能够显著提高红细胞的SOD和过氧化氢酶活性^[23]。氧化应激抑制骨形成,导致骨损伤,而抗氧化剂补充能够促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,抑制破骨细胞活性,从而预防骨质疏松的发生^[24]。研

究表明,当细胞产生的ROS水平高于自身清除能力时,会发生氧化应激反应,导致端粒氧化、DNA损伤,并激活ATM激酶活性,促进组蛋白H2AX的磷酸化,直接或间接使p53发生磷酸化,上调p53的活性,促进细胞衰老^[25-27]。本研究中,活性维生素D缺乏小鼠细胞ROS水平明显升高,抗氧化酶SOD1表达降低,而p53半剂量缺失能够较好地纠正活性维生素D缺乏小鼠的高氧化应激水平。

综上所述,当给予1 α (OH)ase^{-/-}p53^{+/-}小鼠高钙磷补充后,随着血清钙、磷和PTH水平纠正,p53半剂量缺失则呈现了其在改善活性维生素D缺失引起的骨质疏松中的纠正作用,包括抑制氧化应激,促进成骨细胞骨形成,抑制破骨细胞骨吸收。因此,p53半剂量缺失可通过增强抗氧化能力纠正1,25(OH)₂D₃缺乏小鼠的骨质疏松。

[参考文献]

- [1] ASPRAY T J, HILL T R. Osteoporosis and the ageing skeleton[J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476
- [2] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 609
- [3] LU C, CHEN Y, ZHANG B, et al. Response to teriparatide in Chinese patients with established osteoporosis: osteocalcin and lumbar spine bone-mineral density changes from teriparatide phase III study[J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 12: 1717-1723
- [4] TALEVSKI J, SANDERS K M, BUSIJA L, et al. Health service use pathways associated with recovery of quality of life at 12-months for individual fracture sites: analyses of the International Costs and Utilities Related to Osteoporotic fractures Study (ICUROS) [J]. *Bone*, 2021, 144: 115805
- [5] SAPONARO F, SABA A, ZUCCHI R. An update on vitamin D metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6573
- [6] GONG A, LIU Y, XU F, et al. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D in alleviating alveolar bone loss and gingival inflammation in ligature-induced periodontitis [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(5): 3079-3091
- [7] JI J, LU R, ZHOU X, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ contributes to regulating mammary calcium transport and modulates neonatal skeletal growth and turnover cooperatively with calcium[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(5): e889-900
- [8] CHEN J, ZHANG J, LI J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D deficiency accelerates aging-related Osteoarthritis via Downregulation of Sirt1 in Mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 610-624
- [9] CAI Y, LIU H, S E, et al. Deficiency of telomere-associated repressor activator protein 1 precipitates cardiac aging in mice via p53/PPAR α signaling [J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4710-4727
- [10] YANG Y, SUN Y, MAO W W, et al. Oxidative stress induces downregulation of TP53INP2 and suppresses osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis through the autophagy degradation pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 166: 226-237
- [11] DONEHOWER L A, HARVEY M, SLAGLE B L, et al. Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours [J]. *Nature*, 1992, 356(6366): 215-221
- [12] CHEN L, SHI X, XIE J, et al. Apelin-13 induces mitophagy in bone marrow mesenchymal stem cells to suppress intracellular oxidative stress and ameliorate osteoporosis by activation of AMPK signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*. 2021, 163: 356-368
- [13] LEE C W, LIN H C, WANG B Y, et al. Ginkgolide B monotherapy reverses osteoporosis by regulating oxidative stress-mediated bone homeostasis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 168: 234-246
- [14] CHEN L, YANG R, QIAO W, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12951
- [15] YANG R, CHEN J, ZHANG J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D protects against age-related osteoporosis by a novel VDR-Ezh2-p16 signal axis[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(2): e13095
- [16] QIAO W, YU S, SUN H, et al. 1,25-Dihydroxy vitamin D insufficiency accelerates age-related bone loss by increasing oxidative stress and all senescence [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(2): 507-518
- [17] 崔 敏,刘轶宁,庄旻羽,等. Chk2敲除可通过增强抗氧化能力改善由Bmi-1缺失所致的小鼠脑衰老表型[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(7): 963-969
- [18] ZITTMANN A, TRUMMER C, THEILER-SCHWETZ V, et al. Vitamin D and cardiovascular disease: an updated narrative review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2896
- [19] HAMPSON G, ELDER G J, COHEN-SOLAL M, et al. A review and perspective on the assessment, management and prevention of fragility fractures in patients with osteoporosis and chronic kidney disease [J]. *Endocrine*, 2021, 73(3): 509-529

(下转第545页)

- 6397
- [76] 艾秋实, 张哲, 屈凌波, 等. 拟南芥 GCR2 参与感应 N-丁酰基高丝氨酸内酯过程的初步研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 94-101
- [77] DEEB E S, AL-HARRASI A, KHAN A, et al. Microscale thermophoresis as a powerful growing analytical technique for the investigation of biomolecular interaction and the determination of binding parameters [J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2022, 10(4): 042001
- [78] 郑凤娇, 刘亚楠, 李亚, 等. 微量热泳动技术的生物医学研究进展[J]. 生命的化学, 2016, 36(4): 443-448
- [79] ASMARI M, WAQAS M, IBRAHIM A E, et al. Microscale thermophoresis and molecular modelling to explore the chelating drug transportation in the milk to infant[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4604
- [80] CHEN W Q, WANG S, SONG T, et al. DCSE: double-channel-Siamese-Ensemble model for protein protein interaction prediction[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 555
- [81] 胡嘉伦, 姜瞻梅. 计算机软件模拟 α -乳白蛋白与皂苷的分子对接[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 1-6
- [收稿日期] 2023-10-24
(本文编辑: 陈汐敏)

(上接第 461 页)

- [20] LEBOFF M S, CHOU S H, RATLIFF K A, et al. Supplemental vitamin D and incident fractures in Midlife and Older Adults [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(4): 299-309
- [21] ANBARCIOGLU E, KIRTILOGLU T, ÖZTÜRK A, et al. Vitamin D deficiency in patients with aggressive periodontitis[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(1): 242-249
- [22] GOLTZMAN D, MIAO D, PANDA D K, et al. Effects of calcium and of the vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 89: 485-489
- [23] POLIDORO L, PROPERZI G, MARAMPON F, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk - Sirt1 axis activation [J]. *J Cardiovasc Trans Res*, 2013; 6(2): 221-231
- [24] MANOLAGAS S C, PARFITT A M. What old means to bone[J]. *Trends Endocrin Met*, 2010, 21(6): 369-374
- [25] SHARMA P, KAUSHAL N, SALETH L R, et al. Oxidative stress - induced apoptosis and autophagy: balancing the contrary forces in spermatogenesis [J]. *biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(6): 166742
- [26] MOHAMMADZADEH A, MIRZA - AGHAZADEH - ATTARI M, HALLAJ S, et al. Crosstalk between p53 and DNA damage response in ageing [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 80: 8-15
- [27] GILLMAN R, LOPES FLORO K, WANKELL M, et al. The role of DNA damage and repair in liver cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875 (1): 188493
- [收稿日期] 2023-10-25
(本文编辑: 戴王娟)