

引用:高云航,李晗,宋玲,陈腾飞,侯红平,康丽娟,彭博,李鹏,叶祖光,张广平.优韧集胶囊对去势骨质疏松症大鼠的作用及其机制[J].中医药导报,2025,31(1):13-19.

优韧集胶囊对去势骨质疏松症大鼠的作用及其机制^{*}

高云航¹,李 晗¹,宋 玲¹,陈腾飞¹,侯红平¹,康丽娟²,彭 博¹,李 鹏²,叶祖光¹,张广平¹

(1.中国中医科学院中药研究所,北京 100700;

2.河北御芝林生物科技有限公司,河北 石家庄 050000)

[摘要] 目的:探讨优韧集胶囊(YRJ)对去势骨质疏松症大鼠的保护作用,并基于骨保护素(OPG)/核因子-κB受体活化因子配体(RANKL)/核因子-κB受体活化因子(RANK)信号通路探究其作用机制。方法:将60只SD雌性大鼠随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇组(0.1 mg/kg)、优韧集低剂量组(175.0 mg/kg)、优韧集中剂量组(350.0 mg/kg)、优韧集高剂量组(700.0 mg/kg),每组10只。采用手术摘除双侧卵巢的方法复制骨质疏松症模型,随后灌胃给予相应药物,共12周。12周后记录大鼠禁食体重,采用Micro CT检测大鼠股骨微观结构;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清钙(Ca)、磷(P)、甲状旁腺激素(PTH)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)及抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP-5b)水平;逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测骨组织OPG mRNA、RANKL mRNA及RANK mRNA表达水平;蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测骨组织中OPG、RANKL及RANK蛋白表达水平。结果:模型组大鼠体质量、骨小梁分离度(Tb.Sp)高于假手术组($P<0.05$),骨密度(BMD)、骨小梁数(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨体积分数(BV/TV)、骨矿物质含量(BMC)低于假手术组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠体质量、Tb.Sp均低于模型组($P<0.05$),BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV及BMC均高于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠血清Ca、ALP及BGP水平低于假手术组($P<0.05$),血清PTH、TRACP-5b水平高于假手术组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清Ca、BGP水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清PTH水平均低于模型组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清ALP水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集中剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清TRACP-5b水平均低于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠骨组织OPG mRNA相对表达量低于假手术组($P<0.05$),RANKL mRNA、RANK mRNA相对表达量高于假手术组($P<0.05$);优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织OPG mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.05$),RANKL mRNA相对表达量低于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANK mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠骨组织OPG蛋白相对表达量低于假手术组($P<0.05$),RANKL、RANK蛋白相对表达量高于假手术组($P<0.05$);优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织OPG蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANKL蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANK蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。结论:优韧集胶囊能改善去势大鼠骨质疏松症,具有促进骨形成、抑制骨吸收的作用,其机制可能与调控OPG/RANKL/RANK信号通路相关。

[关键词] 骨质疏松症;OPG/RANKL/RANK;优韧集胶囊;骨形成;骨吸收;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)01-0013-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.01.003

Effect and Mechanism of Yurenji Capsules (优韧集胶囊) on Ovariectomized Osteoporotic Rats

GAO Yunhang¹, LI Han¹, SONG Ling¹, CHEN Tengfei¹, HOU Hongping¹, KANG Lijuan², PENG Bo¹, LI Peng², YE Zuguang¹, ZHANG Guangping¹

(1.Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2.Hebei Yuzhilin Biotech Co., LTD, Shijiazhuang Hebei 050000, China)

*基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1602013)

通信作者:张广平,男,研究员,研究方向为中药药理研究

[Abstract] Objective: To investigate the protective effect of Yurenji capsules (YRJ) on ovariectomy-induced osteoporosis in rats, and to explore the underlying mechanisms based on the osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) signaling pathway. Methods: Totally 60 female SD rats were randomly divided into sham group, model group, estradiol valerate group (0.1 mg/kg), low-dose YRJ group (175.0 mg/kg), medium-dose YRJ group (350.0 mg/kg) and high-dose YRJ group (700.0 mg/kg), with 10 rats in each group. An osteoporosis model was established by bilateral ovariectomy, followed by gavage administration of the corresponding drugs for a total of 12 weeks. After 12 weeks, the fasting body weight of the rats was recorded. Micro CT was used to assess the microstructural changes in the femur. Serum levels of calcium (Ca), phosphorus (P), parathyroid hormone (PTH), alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (BGP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP-5b) were analyzed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of OPG mRNA, RANKL mRNA and RANK mRNA in bone tissue were determined using reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). Western blotting was employed to measure the protein expression levels of OPG, RANKL and RANK in the bone tissue. Results: The model group showed higher body weight and Tb.Sp than sham group ($P<0.05$), while lower BMD, Tb.N, Tb.Th, BV/TV and BMC than sham group ($P<0.05$). The low-dose YRJ group, medium-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed lower body weight and Tb.Sp than model group ($P<0.05$), while higher BMD, Tb.N, Tb.Th, BV/TV and BMC than model group ($P<0.05$). The model group showed lower serum levels of Ca, ALP and BGP than sham group ($P<0.05$), while higher PTH and TRACP-5b levels than model group ($P<0.05$). The low-dose YRJ group, medium-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed higher serum Ca and BGP levels than model group ($P<0.05$). The high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed lower serum PTH levels than model group ($P<0.05$); The low-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed higher serum ALP levels than model group ($P<0.05$), and the medium-dose YRJ and estradiol valerate groups showed lower serum TRACP-5b levels than model group ($P<0.05$). The model group showed lower relative expression of OPG mRNA in bone tissue, than sham group ($P<0.05$), while higher relative expression of RANKL mRNA and RANK mRNA than sham group ($P<0.05$). The medium-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed higher relative expression of OPG mRNA than model group ($P<0.05$), while lower relative expression of RANKL mRNA than model group ($P<0.05$). The high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed lower relative expression of RANK mRNA levels than model group ($P<0.05$). The model group showed lower relative expression of OPG protein in bone tissue, than sham group ($P<0.05$), and higher relative expression of RANKL and RANK protein levels than sham group ($P<0.05$). The medium-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed higher relative expression of OPG protein levels than model group ($P<0.05$). The low-dose YRJ group, high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed lower RANKL protein levels than model group ($P<0.05$), and the high-dose YRJ group and estradiol valerate group showed lower RANK protein levels than model group ($P<0.05$). Conclusion: YRJ are effective in improving osteoporosis in ovariectomized rats by promoting bone formation and inhibiting bone resorption. The underlying mechanisms may be associated with the regulation of the OPG/RANKL/RANK signaling pathway.

[Keywords] osteoporosis; OPG/RANKL/RANK; Yurenji capsules; bone formation; bone resorption; rat

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨密度降低、骨强度下降及骨折风险增加为特征的全身性代谢性骨病。随着人口老龄化日益严重,我国骨质疏松症患者人数约占世界骨质疏松症患者总数的50%,骨质疏松症已成为我国重要的公共卫生健康问题^[1-2]。治疗骨质疏松症药物主要分为促进骨形成与抑制骨吸收两大类,但治疗过程中引发的发热、恶心呕吐、心悸等诸多不良反应,造成远期疗效不佳^[3-4]。因此,急需寻找更为安全有效的防治骨质疏松症药物。

骨质疏松症归属于中医“骨痿”“骨枯”范畴,中医药治疗

骨质疏松症疗效确切。三七、骨碎补和葛根均是治疗骨质疏松症的常用药物。现代医学研究发现,三七、骨碎补和葛根发挥抗骨质疏松症的作用与骨保护素(OPG)和核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)靶点密切相关^[5-7]。优韧集胶囊主要成分为三七粉、骨碎补提取物、葛根提取物、硫酸软骨素钠盐、D-氨基葡萄糖盐酸盐、碳酸钙和鱼胶原蛋白。动物实验证实优韧集胶囊具有改善骨密度的作用^[8],但是其作用机制尚未阐明。研究证实,骨质疏松症发生的根本原因是骨形成与骨吸收偶联失衡,骨吸收大于骨形成,骨稳态破坏造成总骨量

丢失。OPG/RANKL/核因子-κB受体活化因子(RANK)信号传导机制作为骨形成和骨吸收偶联的关键平衡轴^[9-10],可调控骨形成和骨吸收的速率^[11-12]。优韧集胶囊是否作用于OPG/RANKL/RANK通路改善骨质疏松症尚未可知。

因此,本研究在前期药效学基础上,利用去势骨质疏松症大鼠模型进一步探讨优韧集胶囊对骨质疏松症大鼠模型OPG/RANKL/RANK信号通路的影响,以阐明其作用机制。

1 材 料

1.1 实验动物 雌性SPF级SD大鼠60只,8~9周龄,体质量210~250 g,购自北京市维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0011。动物质量合格证号:110011211104157783。大鼠饲养于中国中医科学院中药研究所SPF级动物房。饲养条件:12 h明暗交替,温度(23±2)℃,湿度(50±15)%,自主饮水及进食。本实验经中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核通过,动物伦理审查号:2021B032。

1.2 药物与试剂 优韧集胶囊(河北御芝林药业有限公司,批号:2021030108);戊酸雌二醇片(德国拜耳公司,批号:616A);异氟烷(香港友诚生物科技有限公司,批号:G45780);血清钙(Ca)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:20210818)、磷(P)ELISA试剂盒(批号:20210825)、碱性磷酸酶(ALP)ELISA试剂盒(批号:20210902)均购自北京索莱宝科技有限公司;甲状腺激素(PTH)ELISA试剂盒(批号:J23038278)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP-5b)ELISA试剂盒(批号:J24038268)、骨钙素(BGP)ELISA试剂盒(批号:I30014521)均购自武汉华美生物工程有限公司;cDNA反转录试剂盒(批号:AE311-02)、实时荧光定量PCR试剂(批号:AQ131-01)均购自北京全式金生物技术股份有限公司;10% SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒(北京博泰斯生物技术有限公司,批号:WB2102);兔抗鼠GAPDH抗体(批号:ab181602)、兔抗鼠OPG抗体(批号:ab9986)、小鼠抗鼠RANKL抗体(批号:ab239607)、兔抗鼠RNAK抗体(批号:ab305233)均购自美国abcam公司。

1.3 主要仪器 高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:Centrifuge 5810R);多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:Spectramax i3x);Real time PCR仪(美国Bio-Rad公司,型号:CFXTM96);MicroCT(德国Bruker公司,型号:Skyscan1276);微机控制电子万能试验机(深圳瑞格尔仪器有限公司,型号:RGWT4005);小动物气体麻醉机(英国ASA公司,型号:1680);超灵敏多功能成像系统(美国GE公司,型号:Amersham Imager 680)。

2 方 法

2.1 分组、造模及给药 SD大鼠适应性喂养6 d后,按体质量随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇组、优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组,每组10只。造模方法如下^[13]:异氟烷麻醉,除假手术组外,其余各组大鼠采取背部双切口卵巢切除术造模,假手术组大鼠摘除卵巢附近等体积大小的脂肪组织。术后7 d开始灌胃给药,根据优韧集胶囊和戊酸雌二醇片的成人推荐剂量,按人与大鼠体表面积进行折

算,优韧集低、中、高剂量组给药剂量分别为175.0、350.0、700.0 mg/kg,1次/d;戊酸雌二醇组给药剂量为0.1 mg/kg,1次/d。假手术组和模型组灌胃给予等体积动物饮用水,10 mL/kg,1次/d,连续12周,末次给药12 h后称量大鼠体质量。

2.2 观察指标

2.2.1 骨微结构 取大鼠左侧股骨,剔除表面肌肉组织,对股骨远端进行Micro CT扫描,将骨骺线下1 mm定位为扫描参考线,线下约3 mm厚度区域设为分析区,进行三维重建。利用Ctan软件定量分析,量化指标包括骨密度(BMD)、骨小梁数(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨体积分数(BV/TV)、骨矿物质含量(BMC)和骨小梁分离度(Tb.Sp)。

2.2.2 骨代谢指标 给药结束后,腹腔注射戊巴比妥钠(48 mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 r/min(离心半径为16 cm),4 ℃离心15 min分离血清,按ELISA试剂盒说明书方法检测血清Ca、P、PTH、ALP、BGP、TRACP-5b水平。

2.2.3 骨组织OPG mRNA、RANKL mRNA、RNA mRNA表达水平 每组随机取6只大鼠右侧股骨远端组织,液氮冷冻研磨,加入Trizol匀浆,提取骨组织RNA,采用核酸浓度仪进行浓度和纯度检测。按逆转录试剂盒说明书操作合成cDNA。根据SYBR GREEN试剂盒说明书建立PCR反应体系,反应条件:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40个循环,以GAPDH作为内参。以2^{-ΔΔCT}方法分析目的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 各基因PCR引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
GAPDH	F:GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R:ACCACCCCTGTTGCTGTAGCCAA	131
RANKL	F:CAGCATCGCTCTGTCCTGTAA R:CTGCCTTTCATGGAGTCTCA	107
OPG	F:TGAGACGTCATCGAAAGCAC R:CGCACAGGGTGACATCTATT	152
RANK	F:GTCTCATCGCCTGCTCCTCTT R:CAGCGTTTCCCTCCCTTC	89

2.2.4 骨组织OPG、RANKL、RNAK蛋白表达水平 每组随机取6只大鼠右侧股骨远端组织,液氮冷冻研磨,加入裂解液冰上裂解提取总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,定量蛋白并制备样品。SDS-PAGE凝胶电泳分离目的蛋白,PVDF膜湿转1 h,BSA溶液封闭2 h,分别孵育OPG(1:1 000)、RANKL(1:200)、RNAK(1:1 000)和GAPDH(1:10 000)一抗4 ℃过夜,37 ℃孵育1 h,TBST洗膜后,二抗(1:2 500)37 ℃孵育30 min。ECL化学发光后,采用凝胶成像系统拍照,Image J处理并计算灰度值。

2.3 统计学方法 采用SPSS Statistics 25.0软件进行统计分析,计量资料采用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),在各组间符合正态性检验的前提下,检验方差齐性,若方差齐采用LSD检验,若方差不齐采用塔姆黑尼检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 各组大鼠体质量比较 模型组大鼠体质量高于假手术组($P < 0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂

量组、戊酸雌二醇组大鼠体质量均低于模型组($P<0.05$)。(见表2)

表2 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	体质量/g
假手术组	10		321.82±6.61
模型组	10		431.39±14.37 ^a
戊酸雌二醇组	10	0.1	345.34±14.95 ^b
优韧集低剂量组	10	175.0	355.14±19.69 ^b
优韧集中剂量组	10	350.0	351.33±8.56 ^b
优韧集高剂量组	10	700.0	339.88±13.47 ^b
F			77.810
P			0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠骨微结构比较 假手术组大鼠股骨远端骨微结构致密;模型组大鼠骨微结构恶化,骨小梁数量减少、部分断裂、结构稀疏;戊酸雌二醇组大鼠骨小梁排列紧密,骨结构完整;优韧集低、中、高剂量组可见髓腔结构改善,骨小梁相对致密,连续性好。模型组大鼠BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV、BMC低于假手术组($P<0.05$),Tb.Sp高于假手术组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV、BMC均高于模型组($P<0.05$),Tb.Sp均低于模型组($P<0.05$)。(见图1、表3)

3.3 各组大鼠血清Ca、P及PTH水平比较 模型组大鼠血清Ca水平低于假手术组($P<0.05$),血清PTH水平高于假手术组

($P<0.05$);模型组大鼠血清P水平与假手术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清Ca水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清PTH水平均低于模型组($P<0.05$)。(见表4)

表4 各组大鼠血清Ca、P、PTH水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	Ca/(mmol/mL)	P/(mmol/L)	PTH/(pg/mL)
假手术组	10		2.29±0.27	1.21±0.34	82.68±12.72
模型组	10		1.76±0.18 ^a	1.58±0.38	113.55±15.88 ^a
戊酸雌二醇组	10	0.1	2.37±0.43 ^b	1.34±0.42	95.11±11.01 ^b
优韧集低剂量组	10	175.0	2.35±0.22 ^b	1.46±0.52	107.63±9.88
优韧集中剂量组	10	350.0	2.42±0.42 ^b	1.39±0.42	108.95±17.22
优韧集高剂量组	10	700.0	2.55±0.36 ^b	1.44±0.38	100.54±15.31 ^b
F			7.020	0.901	6.538
P			0.000	0.487	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠血清ALP、BGP及TRACP-5b水平比较 模型组大鼠血清ALP、BGP水平低于假手术组($P<0.05$),血清TRACP-5b水平高于假手术组($P<0.05$)。优韧集低剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清ALP水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清BGP水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集中剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清TRACP-5b水平均低于模型组($P<0.05$)。(见表5)

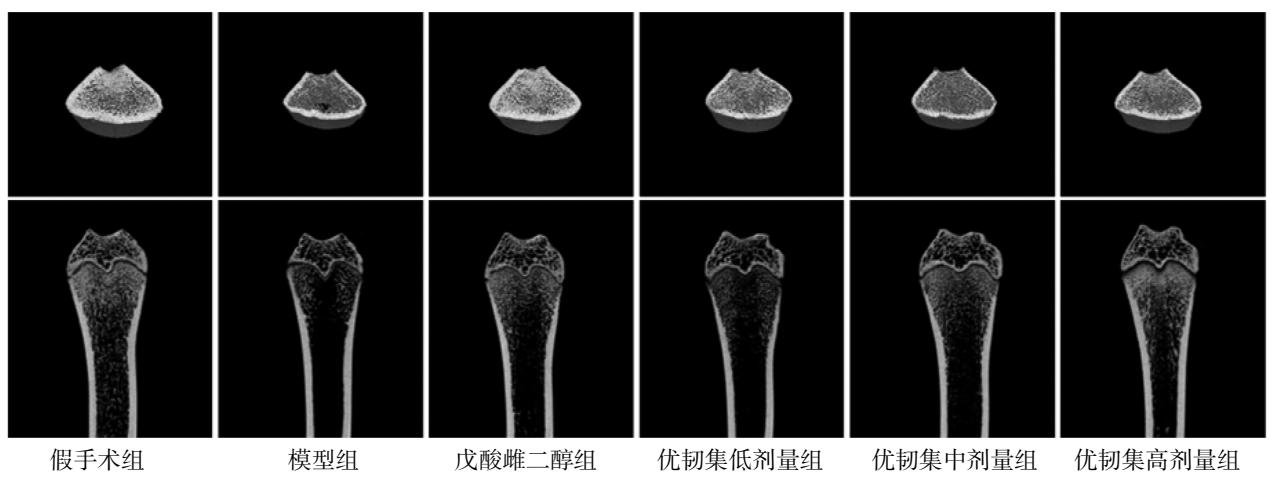


图1 大鼠股骨远端骨微结构

表3 各组大鼠骨微结构比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	BMD/(g/cm ³)	BV/TV/%	Tb.Th/mm	Tb.N/(1/mm)	Tb.Sp/mm	BMC/g
假手术组	10		0.23±0.07	40.86±7.13	0.107±0.009	3.80±0.43	0.19±0.03	0.021±0.011
模型组	10		0.06±0.03 ^a	12.74±4.91 ^a	0.095±0.006 ^a	1.32±0.45 ^a	0.81±0.22 ^a	0.002±0.002 ^a
戊酸雌二醇组	10	0.1	0.31±0.08 ^b	46.42±7.76 ^b	0.110±0.004 ^b	4.15±0.42 ^b	0.17±0.02 ^b	0.034±0.008 ^b
优韧集低剂量组	10	175.0	0.25±0.08 ^b	41.46±8.83 ^b	0.106±0.007 ^b	3.89±0.65 ^b	0.18±0.03 ^b	0.028±0.011 ^b
优韧集中剂量组	10	350.0	0.29±0.07 ^b	49.84±10.4 ^b	0.109±0.009 ^b	4.11±0.47 ^b	0.17±0.03 ^b	0.037±0.011 ^b
优韧集高剂量组	10	700.0	0.29±0.04 ^b	46.11±5.15 ^b	0.110±0.006 ^b	4.19±0.31 ^b	0.17±0.02 ^b	0.034±0.008 ^b
F			21.866	32.094	6.911	57.097	79.419	20.796
P			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

表5 各组大鼠血清ALP、BGP及TRACP-5b水平比较(±s)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	ALP/(U/mL)	BGP/(pg/mL)	TRACP-5b/(U/L)
假手术组	10		0.059±0.009	143.64±28.34	2.60±0.49
模型组	10		0.039±0.016 ^a	107.24±44.04 ^a	4.04±0.83 ^a
戊酸雌二醇组	10	0.1	0.062±0.020 ^b	154.86±34.71 ^b	3.00±1.12 ^b
优韧集低剂量组	10	175.0	0.053±0.019 ^b	148.58±34.21 ^b	3.24±1.17
优韧集中剂量组	10	350.0	0.051±0.009 ^b	163.04±47.07 ^b	2.96±0.93 ^b
优韧集高剂量组	10	700.0	0.055±0.010 ^b	148.50±26.87 ^b	3.23±0.97
F			2.951	2.789	2.610
P			0.020	0.026	0.035

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05。

3.5 各组大鼠骨组织OPG mRNA、RANKL mRNA及RANK mRNA相对表达量比较 模型组大鼠骨组织OPG mRNA相对表达量低于假手术组($P<0.05$),RANKL mRNA、RANK mRNA相对表达量高于假手术组($P<0.05$);优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织OPG mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.05$),RANKL mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANK mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。(见表6)

表6 各组大鼠骨组织OPG mRNA、RANKL mRNA及RANK mRNA相对表达量比较(±s)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	OPG mRNA	RANKL mRNA	RANK mRNA
假手术组	6		1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.05
模型组	6		0.42±0.02 ^a	1.52±0.10 ^a	1.66±0.08 ^a
戊酸雌二醇组	6	0.1	0.83±0.04 ^b	1.17±0.07 ^b	1.36±0.10 ^b
优韧集低剂量组	6	175.0	0.52±0.06	1.47±0.03	1.64±0.05
优韧集中剂量组	6	350.0	0.57±0.05 ^b	1.40±0.06 ^b	1.59±0.07
优韧集高剂量组	6	700.0	0.62±0.07 ^b	1.34±0.03 ^b	1.49±0.06 ^b
F			97.760	48.922	77.850
P			0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05。

3.6 各组大鼠骨组织OPG、RANKL及RANK蛋白相对表达量比较 模型组大鼠骨组织OPG蛋白相对表达量低于假手术组($P<0.05$),RANKL、RANK蛋白相对表达量高于假手术组($P<0.05$);优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织OPG蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.05$);优韧集低剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANKL蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠骨组织RANK蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。(见图2、表7)

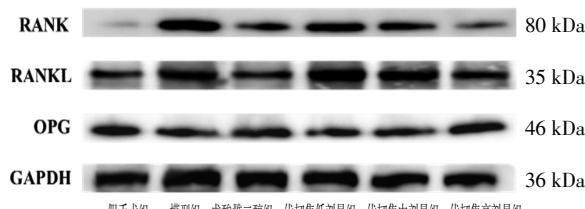


图2 各组大鼠骨组织OPG、RANKL及RANK蛋白表达 Western blotting图

表7 各组大鼠骨组织OPG、RANKL及RANK蛋白

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	OPG/GAPDH	RANKL/GAPDH	RANK/GAPDH
假手术组	6		0.92±0.12	0.64±0.21	0.6±0.23
模型组	6		0.59±0.07 ^a	1.23±0.23 ^a	1.17±0.19 ^a
戊酸雌二醇组	6	0.1	0.93±0.19 ^b	0.88±0.07 ^b	0.78±0.14 ^b
优韧集低剂量组	6	175.0	0.81±0.30	0.99±0.17 ^b	0.98±0.24
优韧集中剂量组	6	350.0	0.87±0.20 ^b	1.07±0.23	1.01±0.27
优韧集高剂量组	6	700.0	0.89±0.14 ^b	0.92±0.12 ^b	0.82±0.12 ^b
F			2.844	7.287	5.742
P			0.032	0.001	0.001

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05。

4 讨论

骨质疏松症是一种发病率高、隐匿性强的慢性疾病,骨吸收大于骨形成是骨质疏松症发生的根源^[14]。因此靶向调控骨形成和骨吸收平衡是拮抗骨质疏松症的重要策略。目前,临床治疗骨质疏松症的药物主要包括促进骨形成和抑制骨吸收两类,长期服用易诱发不良反应。中医学将骨质疏松症归属于“骨痿”“骨枯”范围。现代研究发现,多种中药具有促进骨形成、抑制骨吸收及抗骨质疏松症的作用^[5-7,15]。

本实验采用摘除大鼠双侧卵巢法(OVX)^[16]构建骨质疏松症大鼠模型。既往研究发现,雌激素骤降,机体糖、脂质代谢紊乱,导致体质量激增^[17],因此体质量可以作为风险因素对骨质疏松症进行初步评估。结果显示,优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠体质量均低于模型组($P<0.05$)。骨微结构的改变主要表现为骨密度和骨三维结构的变化,是评价骨丢失和骨结构退化的关键指标^[18]。本研究采用Micro CT扫描大鼠股骨。结果显示,模型组大鼠骨小梁结构疏松,间隙变大,结构退化。模型组大鼠骨密度、骨小梁数目和厚度、骨矿物质含量显著降低,分离度增大,提示成功复制了去势大鼠骨质疏松症模型。优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV及BMC均高于模型组($P<0.05$),Tb.Sp均低于模型组($P<0.05$)。表明优韧集胶囊具有改善去势大鼠骨质疏松症的作用。

研究发现,骨质疏松症发展过程中,血钙降低,血磷和PTH升高^[19-21]。优韧集低剂量组、优韧集中剂量组、优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清Ca水平均高于模型组($P<0.05$);优韧集高剂量组、戊酸雌二醇组大鼠血清PTH水平均低于模型组($P<0.05$)。表明优韧集胶囊可升高骨质疏松症大鼠血清Ca水平,降低血清P和PTH水平。此外,一系列的酶参与骨吸收和骨形成过程。ALP是成骨细胞分泌的胞外酶,可促进骨质合成及成骨细胞的增殖和分化能力^[22-23]。BGP是成骨细胞分化的必要蛋白,能促进骨形成,调节骨密度。两者均可反映成骨细胞的功能和活性,是评价骨形成速率的重要生化指标^[24-25]。TRACP-5b作为主要标志物,主要由破骨细胞分泌,可反映破骨细胞功能和骨吸收强度。血液中TRACP-5b不受肝肾代谢影响,特异性高^[26-27]。大鼠去卵巢后血清中TRACP-5b的含量显著升高^[28]。本研究结果表明,优韧集胶囊可升高骨质疏松症

大鼠血清ALP、BGP水平,降低血清TRACP-5b水平,进一步提示优韧集胶囊具有促进骨形成和抑制骨吸收,改善骨质疏松症的作用。

为更深入阐明优韧集胶囊改善骨质疏松症的作用机制,本研究聚焦于OPG/RANKL/RANK信号传导途径。该信号通路在成骨细胞和破骨细胞驱动的骨形成和骨吸收过程中发挥重要作用。研究发现,OPG由成骨细胞分泌,上调OPG mRNA表达可以促进成骨细胞增殖、促进骨形成^[29-30]。RANKL作为破骨细胞重要调节因子,在骨吸收中起核心作用^[31]。RANKL能与破骨前体细胞表面配体RANK结合,增强骨吸收作用。这种结合可被OPG竞争性拮抗,阻断RANKL与RANK结合,限制破骨细胞功能,诱导破骨细胞凋亡^[32-33]。研究显示,抑制RANKL因子的水平,以及促进OPG表达水平,可调控骨吸收和骨形成偶联平衡,发挥抗骨质疏松症的作用^[34]。前期研究发现优韧集胶囊可通过促进骨形成并抑制骨吸收改善骨微结构,增加骨密度。本研究结果显示优韧集胶囊能够促进OPG mRNA和OPG蛋白表达,抑制RANKL mRNA、RANK mRNA及RANKL、RANK蛋白表达,逆转骨吸收和骨形成的失衡,改善骨微结构,增加骨量,发挥抗骨质疏松症的作用。

综上所述,优韧集胶囊可改善去势大鼠骨质疏松症,促进骨形成,抑制骨吸收,其作用机制可能与调控OPG/RANKL/RANK信号通路有关。

参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2022,15(6):573-611.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2019,12(4):317-318.
- [3] JIA Y, SUN J G, ZHAO Y, et al. Chinese patent medicine for osteoporosis: A systematic review and meta-analysis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3):5581-5597.
- [4] 李传华.唑来膦酸治疗骨质疏松症的使用情况和安全性评价[J].临床合理用药,2023,16(25):133-136.
- [5] 桂先革,蒋增辉,陈标,等.中药三七对激素性股骨头坏死兔股骨头微结构的影响及其机制[J].新中医,2019,51(12):9-12.
- [6] 李建民,王雷鸣.骨碎补提取物对去卵巢骨质疏松大鼠血清学指标及疗效的影响研究[J].新中医,2019,51(9):5-8.
- [7] PARK K H, GU D R, JIN S H, et al. Pueraria lobata inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis via down-regulation of CREB/PGC1 β /c-fos/NFATc1 signaling [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(8):1725-1744.
- [8] 高云航,李晗,宋玲,等.优韧集胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的作用研究[J].预防医学研究,2023,5(10):11-12.
- [9] REN S W, JIAO G J, ZHANG L, et al. Bionic tiger-bone powder improves bone microstructure and bone biomechanical strength of ovariectomized rats[J]. Orthop Surg, 2021, 13(3):1111-1118.
- [10] LI X F, CUI L K, CHEN W H, et al. QiangGuYin modulates the OPG/RANKL/RANK pathway by increasing secretin levels during treatment of primary type I osteoporosis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021:7114139.
- [11] TANTIKANLAYAPORN D, WICHIT P, SUKSEN K, et al. Andrographolide modulates OPG/RANKL axis to promote osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells and protects bone loss during estrogen deficiency in rats[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 131:110763.
- [12] MENG B W, WU D L, CHENG Y F, et al. Interleukin-20 differentially regulates bone mesenchymal stem cell activities in RANKL-induced osteoclastogenesis through the OPG/RANKL/RANK axis and the NF- κ B, MAPK and AKT signalling pathways[J]. Scand J Immunol, 2020, 91(5):e12874.
- [13] FUSE H, FUKUMOTO S, SONE H, et al. A new synthetic steroid, osaterone acetate (TZP-4238), increases cortical bone mass and strength by enhancing bone formation in ovariectomized rats[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(4):590-597.
- [14] 范志梁,田兴中,顾春松,等.黄芪调节维生素D介导OPG/RANKL/RANK信号通路对维甲酸诱导骨质疏松C57BL/6J小鼠股骨的影响[J].时珍国医国药,2023,34(4):831-834.
- [15] 郑旭霞,柴爽,魏立伟,等.基于PI3K/Akt信号通路的骨松益骨方对去势大鼠的骨保护作用[J].中药新药与临床药理,2023,34(12):1691-1699.
- [16] YOUSEFZADEH N, KASHFI K, JEDDI S, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: A practical guide[J]. EXCLI J, 2020, 19:89-107.
- [17] LI B, WANG Y, GONG S Q, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics[J]. Phytomedicine, 2022, 102:154198.
- [18] LI J, CHEN X, LU L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2020, 52:88-98.
- [19] 李超,张贤,邵家豪.骨代谢过程中钙离子通道TRPV5、TRPV6的作用[J].中国组织工程研究,2022,26(12):1950-1955.
- [20] WU H S, LV Y, WEI F Y, et al. Comparative analysis of anti-osteoporosis efficacy in Radix Dipsaci before and after processing with salt based on spectrum-effect relationship[J]. J Pharm Biomed Anal, 2022, 221:115078.
- [21] ALDER K D, WHITE A H, CHUNG Y H, et al.

- Systemic parathyroid hormone enhances fracture healing in multiple murine models of type 2 diabetes mellitus[J]. JBMR Plus, 2020, 4(5):e10359.
- [22] NAM S W, KIM S H, HAN Y. Discovery and development of berberine derivatives as stimulants of osteoblast differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 527(1):110–116.
- [23] TOLEDANO –OSORIO M, DE LUNA –BERTOS E, TOLEDANO M, et al. Doxycycline –doped collagen membranes accelerate in vitro osteoblast proliferation and differentiation[J]. J Periodontal Res, 2023, 58(2):296–307.
- [24] 易生辉,招文华,任辉,等.中西医治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(5):274–282.
- [25] 彭斯伟,宋敏,范凯,等.铁代谢与骨质疏松症的相关因素研究现状[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(12):1868–1872.
- [26] REN M X, LIU H D, JIANG W K, et al. Melatonin repairs osteoporotic bone defects in iron-overloaded rats through PI3K/AKT/GSK-3 β /P70S6k signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2023, 2023:7718155.
- [27] 方文焕,麦伟,颜志坚,等.绝经后骨质疏松性椎体压缩性骨折患者血清雌激素、前脂肪因子-1水平与骨代谢和骨密度相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(12):1763–1766,1773.
- [28] TOMINAGA N, YONAHARA T, YAMANOUCHI M, et al. Bone responsiveness to parathyroid hormone is negatively associated with parathyroid hormone–lowering drug use in patients undergoing hemodialysis: A cross-sectional study[J]. BMC Nephrol, 2021, 22(1):275.
- [29] 夏宁,蔡云,刘达,等.骨转换标志物在骨质疏松症诊断与治疗中的应用进展[J].国际骨科学杂志,2021,42(3):144–148.
- [30] YANG Y, WEI Q, AN R, et al. Anti–osteoporosis effect of SemenCuscutae in ovariectomized mice through inhibition of bone resorption by osteoclasts[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 285:114834.
- [31] TSUKASAKI M, TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: Evolving concepts in bone –immune interactions in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(10):626–642.
- [32] 范荣,刘玉金,白曼莫,等.补肾活血汤加减配合LCP治疗四肢长骨骨干骨折不愈合的临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(7):80–85.
- [33] YEOM J, MA S, LIM Y H. Probiotic Propionibacteriumfreudenreichii MJ2 enhances osteoblast differentiation and mineralization by increasing the OPG/RANKL ratio[J]. Microorganisms, 2021, 9(4):673.
- [34] LIANG F Q, SUN L, WANG Y B. The relationship between GNRI changes and bone metabolism parameters and the occurrence of osteoporosis in elderly male patients with T2D[J]. Altern Ther Health Med, 2023, 29(1):85–89.

(收稿日期:2024-05-09 编辑:蒋凯彪)

(上接第12页)药大学,2021.

- [27] 白雪,梁文菲,彭阿建,等.黄芪甲苷介导内皮祖细胞外泌体对高糖受损内皮细胞增殖和凋亡的影响[J].中国临床药理学杂志,2021,37(15):2048–2050.
- [28] 王禹萌,邹晓玲,余亦程,等.黄芪甲苷促人内皮祖细胞分泌血管生长因子的实验研究[J].中医学报,2020,35(5):1050–1054.
- [29] 安小翠,朱瑞雪,蔺淑梅,等.黄芪甲苷抑制ROS NF- κ B信号通路促进肝癌细胞增殖、凋亡的作用机制[J].现代消化及介入诊疗,2019,5(12):1399–1403.
- [30] 职玉娟.黄芪甲苷对H₂O₂诱导心肌细胞凋亡及相关调控蛋白表达的影响[J].国医论坛,2022,37(6):68–71.
- [31] LIU T, HU J, ZUO Y H, et al. Identification of microRNA-like RNAs from Curvularia lunata associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing[J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291(2):587–596.

- [32] 郭静,莫友胜,王奇,等.当归补血汤对内皮祖细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(20):39–45.
- [33] 刘建平,何建峰.黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[J].西部中医药,2018,31(2):21–25.
- [34] 于婧文,郭敏芳,杨鹏伟,等.黄芪甲苷IV通过激活Nrf-2/HO-1信号通路抑制氧化应激介导的人SY5Y细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2022,38(11):979–985.
- [35] 边义莹,皮静波.Nfe2l2/Nrf2可通过干扰红细胞抗氧化能力及促凝活性增加TiO2NPs暴露致小鼠静脉血栓形成[C]//中国毒理学会.中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集.珠海,2023.
- [36] 邓长青,张京兰,金海涛.基于NRF2/FPN1通路探究黄芪甲苷减轻糖尿病心肌梗死大鼠心肌损伤的作用机制[J].西部医学,2023,35(10):1439–1443,1451.

(收稿日期:2024-04-07 编辑:罗英姣)