

补肾法对去卵巢大鼠 OPG/RANK/RANKL 信号通路影响的 Meta 分析

高城翰, 刘晓炜, 关雪峰*
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:随着全球老龄化趋势的发展,绝经后骨质疏松症(PMOP)已成为世界性的女性健康问题。目前常用的生物制剂存在不良反应多、无法长期用药等缺陷。多项 Meta 分析已证明补肾法对 PMOP 患者的安全性和有效性,但其治疗机制尚不明确。该文 Meta 分析评估基于 PMOP 动物模型的补肾法对骨保护素(OPG)/核转录因子(NF)- κ B 受体激活因子(RANK)/NF- κ B 受体激活因子配体(RANKL)信号通路的影响,为用补肾法治疗 PMOP 提供实验依据。方法:计算机检索 PubMed, Ovid Medline, Embase, 中国知网(CNKI), 维普和万方数据库,以收集检索从建库至 2020 年 1 月的研究,并对每篇纳入文章的研究质量进行了评估。根据 SYRCLE 的偏倚风险工具对每一篇纳入的文章的研究质量进行评价。使用 RevMan 5.3 软件根据 Cochrane 系统评价方法进行 Meta 分析。结果:包括 619 只大鼠的 32 项研究,纳入研究的质量分数都在 3~5 分。Meta 分析结果表明,补肾法在增加骨密度(BMD)值方面优势明显[标准化均数差(SMD)=2.01, 95% 置信区间(CI)=1.50~2.52, $P<0.000\ 01$]。同时补肾法可增加卵巢切除(OVX)大鼠骨组织中血清 OPG 水平(SMD=3.33, 95% CI=2.59~4.07, $P<0.000\ 01$),提高 OPG mRNA 表达(SMD=11.81, 95% CI=7.49~16.13, $P<0.000\ 01$)和促 OPG 蛋白生成(SMD=4.95, 95% CI=3.09~6.81, $P<0.000\ 01$)。补肾法可以降低血清 RANKL 水平(SMD=-4.88, 95% CI=-6.01~-3.75, $P<0.000\ 01$)和 RANK 水平(SMD=-7.30, 95% CI=-9.53~-5.07, $P<0.000\ 01$);补肾法还可降低骨 RANKL mRNA(SMD=-6.22, 95% CI=-8.95~-3.49, $P<0.000\ 01$)和骨 RANK mRNA(SMD=-3.18, 95% CI=-6.19~-0.18, $P<0.05$)及 RANKL 蛋白在骨组织中的表达(SMD=-3.99, 95% CI=-5.47~-2.50, $P<0.000\ 01$)。结论:该研究发现补肾法在调节 PMOP 的动物模型中 OPG/RANK/RANKL 信号通路平衡方面具有重要优势,但仍然需要更多的样本,合理的设计和高质量的动物实验来进行进一步的验证。

[关键词] 补肾法; 骨保护素(OPG)/核因子(NF)- κ B 受体激活因子(RANK)/NF- κ B 受体激活因子配体(RANKL)信号通路; 绝经后骨质疏松; 动物模型; Meta 分析

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0172-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211216

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210812.1001.002.html>

[网络出版日期] 2021-08-12 10:11

Effect of Kidney-tonifying Method on OPG/RANK/RANKL Signaling Pathway in Postmenopausal Osteoporosis Animal Model: A Meta-analysis

GAO Cheng-han, LIU Xiao-wei, GUAN Xue-feng*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** As the problem of global aging intensifies, postmenopausal osteoporosis (PMOP) has become a global health problem among females. At present, the commonly used biological agents have been proved not suitable for long-term use due to multiple adverse reactions. Several Meta-analyses have confirmed the good safety and effectiveness of kidney-tonifying method against PMOP, but its therapeutic mechanism remains unclear. The purpose of this Meta-analysis was to evaluate the effect of kidney-tonifying

[收稿日期] 20210206(003)

[基金项目] 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015029)

[第一作者] 高城翰, 硕士, 从事中医药防治骨质疏松症研究, Tel: 024-23260249, E-mail: lnzygch@163.com

[通信作者] * 关雪峰, 博士, 教授, 从事中医药防治骨关节病、骨质疏松症工作, Tel: 024-31207068, E-mail: lnzygxf@163.com

method on osteoclastogenesis inhibitory factor(OPG)/receptor activator of nuclear transcription factor (NF)- κ B (RANK)/receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) signaling pathway in PMOP animal model, so as to provide an experimental basis for the treatment of PMOP with kidney-tonifying method. **Method:** The related articles were retrieved from PubMed, Ovid Medline, Embase, China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Chongqing Weipu Database for Chinese Technical Periodicals (VIP), and Wanfang Data Knowledge Service Platform with the retrieval time set from their inception to January 2020. The quality of each included article was evaluated using the SYRCLE's risk of bias tool. Then RevMan 5.3 was utilized for Meta-analysis according to the Cochrane systematic review methodology. **Result:** Thirty-two studies involving 619 rats were included. The quality score of these studies ranged from 3 to 5 points. The results of the Meta-analysis indicated obvious advantages of kidney-tonifying method in increasing bone mineral density (BMD)[standardized mean difference (SMD)=2.01, 95% confidence interval(CI)=1.50-2.52, $P<0.000\ 01$], serum OPG level (SMD=3.33, 95% CI=2.59-4.07, $P<0.000\ 01$), and OPG mRNA expression (SMD=11.81, 95% CI=7.49-16.13, $P<0.000\ 01$), promoting OPG protein production (SMD=4.95, 95% CI=3.09-6.81, $P<0.000\ 01$), reducing serum RANKL (SMD=-4.88, 95% CI=-6.01--3.75, $P<0.000\ 01$) and RANK levels (SMD=-7.30, 95% CI=-9.53--5.07, $P<0.000\ 01$), and down-regulating RANKL (SMD=-6.22, 95%CI=-8.95--3.49, $P<0.000\ 01$) and RANK mRNA (SMD=-3.18, 95% CI=-6.19--0.18, $P<0.05$) expression and RANKL protein expression in bone tissue (SMD=-3.99, 95% CI=-5.47--2.50, $P<0.000\ 01$). **Conclusion:** The kidney-tonifying method has been proved to possess potential advantages in regulating the balance of OPG/RANK/RANKL signaling pathway in PMOP animal model. Nevertheless, more large-sample sized, properly designed, and high-quality animal experiments are still needed for further verification.

[Keywords] kidney-tonifying method; osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG)/receptor activator of nuclear transcription factor (NF)- κ B (RANK)/receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) signaling pathway; postmenopausal osteoporosis (PMOP); animal model; Meta-analysis

绝经后骨质疏松症(PMOP)是一种常见的骨病,其特征是因雌激素水平下降而导致的骨骼脆性增加,并伴有BMD降低和骨微结构退化^[1]。PMOP作为无声的流行病,影响了全世界近50%的绝经后妇女,并且被认为是中老年女性发病率最高的疾病之一^[2]。骨质疏松症会增加严重骨折的危险,从而威胁生命。其髋部骨折致残也给患者的家庭和社会带来负担^[3-4]。

人体骨组织处于成骨细胞骨矿沉积与破骨细胞骨质吸收的动态平衡中,其中核转录因子(NF)- κ B受体激活因子(RANK)/NF- κ B受体激活因子配体(RANKL)信号通路参与破骨细胞的调控与生成,而骨保护素(OPG)由成骨细胞分泌,竞争性的与RANKL结合,从而抑制破骨细胞的功能表达。目前有效而安全的PMOP治疗方法主要集中在OPG/RANK/RANKL信号通路的受体激活剂和RANKL抑制剂。在许多有关PMOP的诊断和治疗的临床实践指南中,建议将denosumab(AMC-162,RANKL抑制剂)作为具有高骨折风险的PMOP的初始疗法之一。然而该药物可能导致低钙血症、皮肤感染、

皮疹、甚至骨坏死和非典型的股骨骨折^[5-6],使得该药物治疗PMOP的长期安全性备受争议。因此探索更安全有效的PMOP治疗方案显得至关重要。

PMOP属中医学“骨枯”“骨痿”“肾痹”“骨蚀”。《素问·上古天真论》:“七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”肾精亏虚、骨枯髓减、骨失濡养,最终受累而至病^[7]。《素问·逆调论》:“肾者水也,而生于骨,肾不生,则髓不能满,故寒甚至骨也。”肾主骨,骨髓失养,则髓枯筋燥,痿废不起,腰为肾之府,肾精不充,则腰失所养,转摇不能。中医学认为,肾为先天之本,主骨生髓,女子七七而天癸竭,肾气衰而导致的肾亏虚PMOP形成的主要病机。因此肾气虚弱被认为是PMOP的根本病因,所以补肾法治疗PMOP是其根本大法^[8]。

近年多项针对绝经后女性Meta分析^[9-12]证实补肾法治疗PMOP的临床疗效确切,且无不良事件报道。补肾法对PMOP患者的多项临床指标如VAS评分、骨密度、骨代谢以及脆性骨折发生率等均优于常规西医治疗,但补肾法的具体作用机制尚未明确,亟待研究阐明。

OPG/RANK/RANKL 信号通路的发现是破骨细胞生成和骨吸收基础调节机制的突破^[13-14]。越来越多的研究证明了补肾法对 PMOP 动物模型 OPG/RANK/RANKL 信号通路的有效性,然而各项研究中的样本量小使得很难得出明确的结论。目前还没有系统的综述和 Meta 分析来探究补肾法对 PMOP 模型中 OPG/RANK/RANKL 信号通路的有效性。本研究旨在通过全面搜集有关基于动物实验的补肾法对 PMOP 的治疗作用机制,并为未来的研究提供有价值的循证医学证据。

1 方法

1.1 搜索策略 此研究在 PROSPERO 数据库中注册(CRD42020165967)。检索数据库为 PubMed, Ovid Medline, Embase, 中国知网(CNKI), 维普和万方, 收集检索从建库至 2020 年 1 月语言限于中文和英文的相关研究。中文检索式关键词=(“动物”OR “大鼠”) AND “补肾” AND (“OPG”OR “RANK”OR “RANKL”) AND (“绝经后骨质疏松症” OR “绝经期骨质丢失”); 英文检索式 keywords=(postmenopausal osteoporosis) AND (animal) AND (Kidney-tonifying Chinese herbs) AND (OPG) OR (RANK) OR (RANKL)。

1.2 纳入标准 ①研究类型为公开发表的,有独立对照组和治疗组的随机对照试验(RCT);②研究对象不限于种类的 PMOP 大鼠模型;③干预措施,治疗组均采用补肾法中药,包含单味药(如酒续断),组方(如左归丸、地黄饮子)及中成药(如补肾活血颗粒、补肾活血颗粒);④实验内容,所有实验所涉及的干预剂量,持续时间和给药方法均符合相关指南推荐药物;⑤结局指标,常规指标 BMD,根据 OPG/RANK/RANKL 信号通路的表达选择血清 OPG 水平,血清 RANK 水平,血清 RANKL 水平,骨 OPG mRNA 和蛋白、骨 RANKL mRNA 和蛋白、骨 RANK mRNA 和蛋白。

1.3 排除标准 ①案例研究,交叉研究或无单独对照组的研究;②重复发表或数据不详的文献;③实验中具有合并症的大鼠,如患有 PMOP 以外的其他骨病、影响到与治疗效果相关的疾病或离体研究;④对照组采用中西医结合或多种中医治法的干预措施;⑤不符合结局指标或无法提取有效数据。

1.4 质量评价和资料提取

1.4.1 质量评价 使用实验室动物实验系统评价中心(SYRCLE)偏倚风险评估工具。SYRCLE 由 Cochrane 发展而来,包含 10 相条目,其中涉及选择

性偏倚,实施偏倚,测量偏倚,损耗偏倚,报告偏倚和其他偏倚 6 种偏倚^[15]。通过对工具的每个域评分“是”,表明存在偏见的风险较低;“否”,表明存在很大的偏见风险;如果报告的详细信息不足,则可以对内部评价和外部有效性进行评分“不确定”。

1.4.2 资料提取 根据上述设计审阅搜索整理数据库,并列出所有相关结果。内容主要包括,研究设计为实验组,对照组和每组的动物数量;动物模型为种类,性别,体质量,存活周龄;结局指标为 BMD,血清 OPG 水平,血清 RANK 水平,血清 RANKL 水平,骨组织中 OPG mRNA 和蛋白表达,骨组织中 RANKL mRNA 和蛋白表达,骨组织中 RANK mRNA 和蛋白表达;其他为第一作者,发表年份。

1.5 统计学分析 本 Meta 分析使用 Cochrane Collaboration 提供的 Revman 5.3 软件分析数据。所有结果均视为连续数据。采用标准平均差(SMD)是综合效应大小的估值。置信区间(CI)为 95%, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。为了评估异质性,使用了 I^2 统计量和 χ^2 分布,用漏斗图评估表示偏倚。

2 结果

2.1 纳入文献 根据已制定的文献纳入、排除标准,双人双次独立操作,对检索的文献信息进行筛选。本 Meta 分析从 6 个数据库中检索出 1 367 项相关研究,删除重复文献后,筛选出 1 019 篇符合标准的文献篇名和摘要。在排除了 904 篇文献后,选择对 115 篇文献进行全文审阅。最终有 32 篇符合标准的文献纳入本 Meta 分析^[16-47]。见图 1,表 1。

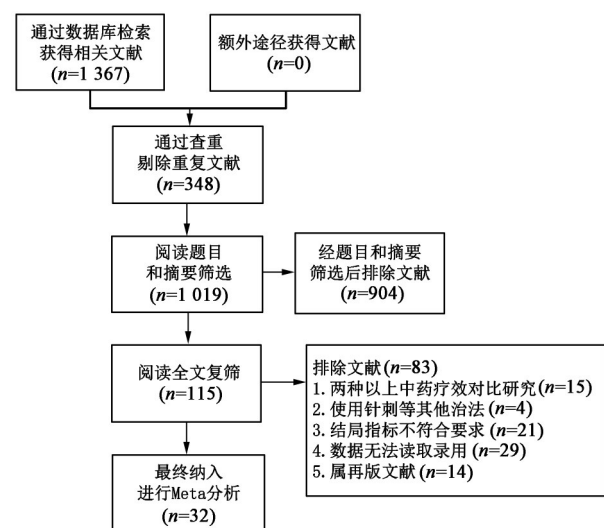


图1 PMOP 文献筛选流程及结果

Fig. 1 Process of PMOP literature screening

2.2 纳入文献一般特征 32 项纳入研究涉及 619 只大鼠。对照组总数为 310 只,实验组总数为 309

表1 纳入研究的基本特征

Table 1 General information of included literature

纳入研究	实验动物种类	体质量/g	Ne/Nc	模型	干预措施		疗程/周	结局指标
					Ne	Nc		
安方玉 2018 ^[16]	雌性SD大鼠	180±20	10/10	OVX	左归丸	DW	4	①②③④
曹寅生 2018 ^[17]	雌性SD大鼠	230~280	10/10	OVX	金刚健骨片	DW	12	⑥⑦⑧
陈奇红 2016 ^[18]	雌性SD大鼠	220±20	8/8	OVX	补肾活血颗粒	DW	12	①⑥⑦⑧⑨⑩
邓海东 2011 ^[19]	雌性SD大鼠	250±10	8/8	OVX	抗疏健骨颗粒	NS	12	②③
范竞 2014 ^[20]	雌性SD大鼠	240±20	11/12	OVX	温肾通络止痛方	NS	12	①②③
冯佳 2012 ^[21]	雌性SD大鼠	NR	8/8	OVX	强骨康疏胶囊	NS	4	①⑨⑩
冯建书 2012 ^[22]	雌性SD大鼠	260±15	10/10	OVX	仙灵骨葆胶囊	DW	12	①②③⑥⑦⑧
甘国兴 2017 ^[23]	雌性SD大鼠	220±15	12/12	OVX	壮骨止痛方	DW	13	②③⑤⑨⑩
葛继荣 2016 ^[24]	雌性SD大鼠	NR	10/10	OVX	续苓健骨方	NS	12	①⑨⑩
郭杨 2017 ^[25]	雌性SD大鼠	210±10	11/12	OVX	温肾通络止痛汤	NS	12	①②③
黄淑燕 2017 ^[26]	雌性SD大鼠	NR	10/10	OVX	补肾化痰方	NS	8	②③⑤⑨⑩
惠红岩 2016 ^[27]	雌性SD大鼠	260~280	10/10	OVX	自拟补肾活血颗粒	DW	12	①②③④
李鸿泓 2013 ^[28]	雌性Wistar大鼠	200~220	12/13	OVX	补肾健脾方	DW	12	①②③
刘振涛 2017 ^[29]	雌性SD大鼠	322±20	10/10	OVX	二至丸粗提液	NS	12	①②③⑥⑦⑨⑩
吕朝晖 2016 ^[30]	雌性SD大鼠	180~110	12/12	OVX	筋骨胶囊	DW	12	⑥⑦
闵文 2013 ^[31]	雌性SD大鼠	260~279	12/12	OVX	补肾通络方	NS	10	⑥⑦
闵文 2018 ^[32]	雌性SD大鼠	260~280	12/12	OVX	补肾通络方	NS	10	①⑨⑩
芮丹云 2015 ^[33]	雌性SD大鼠	310~370	8/8	OVX	补肾活血颗粒	NS	12	①⑥⑦⑨⑩
史传道 2012 ^[34]	雌性SD大鼠	250±10	8/8	OVX	抗疏健骨颗粒	NS	12	②③⑤
苏麒麟 2016 ^[35]	雌性SD大鼠	250~270	10/11	OVX	补肾中药验方	NS	8	①②③
尚艳锋 2008 ^[36]	雌性Wistar大鼠	200±50	6/6	OVX	补肾健脾验方	DW	12	⑥⑦
陶益 2016 ^[37]	雌性SD大鼠	NR	5/5	OVX	酒续断	NS	12	②③④
吴佳莹 2017 ^[38]	雌性SD大鼠	240±20	12/12	OVX	左归丸	DW	12	⑥⑦⑨⑩
徐强 2009 ^[39]	雌性SD大鼠	200	10/10	OVX	补肾壮骨液	NS	12	②③
颜春鲁 2018a ^[40]	雌性SD大鼠	180±20	10/10	OVX	地黄饮子水煎剂	DW	4	①②③④
颜春鲁 2018b ^[41]	雌性SD大鼠	160~200	10/10	OVX	藤黄健骨胶囊	DW	4	②③
杨军 2017a ^[42]	雌性SD大鼠	200±20	10/9	OVX	壮骨止痛方	DW	12	②③④
杨博文 2017b ^[43]	雌性SD大鼠	180±20	10/10	OVX	温肾强身散	DW	4	②③④
张志海 2009 ^[44]	雌性SD大鼠	180~210	12/11	OVX	骨康	DW	8	①②③
张信成 2019 ^[45]	雌性Wistar大鼠	345±15	6/6	OVX	强骨颗粒	NS	6	②③⑨⑩
郑德开 2018 ^[46]	雌性SD大鼠	NR	6/6	OVX	巴戟天	NS	12	②③
钟佳贤 2016 ^[47]	雌性SD大鼠	210±3	10/10	OVX	护骨胶囊	NS	12	②③⑤

注:Ne. 试验组;Nc. 对照组;NR. 无明确报道;OVX. 去卵巢模型;DW. 蒸馏水;NS. 生理盐水;BMD. 骨密度;①BMD;②血清OPG;③血清RANKL;④血清RANK level;⑤血清OPG/RANKL;⑥OPG mRNA在骨组织中的表达;⑦RANKL mRNA在骨组织中的表达;⑧RANK mRNA在骨组织中的表达;⑨The OPG蛋白在骨组织中的表达;⑩The RANKL蛋白在骨组织中的表达。

只。大鼠品种为Sprague-Dawley (SD)大鼠和Wistar大鼠,其中29项研究使用SD大鼠,3项研究使用Wistar大鼠。32项研究中有24项提到大鼠的周龄,范围从8周到48周。27项研究提到大鼠的体质量在160~370 g。32项研究均为卵巢切除(OVX)模

型。32项纳入研究中使用了24种不同类型的补肾中药,剂型包括丸剂,汤剂,片剂,颗粒剂或胶囊剂或单味药。

2.3 方法学质量 根据SYRCLE的偏倚风险工具,纳入研究的偏倚风险为3~5分(总10分)。1项研究

获得3分(3.1%);23项研究获得4分(71.9%);8项研究获得5分(25%)。详见表2。

表2 纳入研究的方法学质量评估

Table 2 Methodological quality assessment of included studies

纳入研究	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	得分/分
安方玉2018 ^[16]	U	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	3
曹寅生2018 ^[17]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
陈奇红2016 ^[18]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
邓海东2011 ^[19]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
范竞2014 ^[20]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
冯佳2012 ^[21]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
冯建书2012 ^[22]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
甘国兴2017 ^[23]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
葛继荣2016 ^[24]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
郭杨2017 ^[25]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
黄淑燕2017 ^[26]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
惠红岩2016 ^[27]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
李鸿泓2013 ^[28]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
刘振涛2017 ^[29]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
吕朝晖2016 ^[30]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
闵文2013 ^[31]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
闵文2018 ^[32]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
芮丹云2015 ^[33]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
史传道2012 ^[34]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
苏麒麟2016 ^[35]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
尚艳锋2008 ^[36]	U	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
陶益2016 ^[37]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
吴佳莹2017 ^[38]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
徐强2009 ^[39]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
颜春鲁2018 ^[40]	Y	Y	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	5
颜春鲁2018 ^[41]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
杨军2017 ^[42]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
杨博文2017 ^[43]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
张志海2009 ^[44]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
张信成2019 ^[45]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
郑德开2018 ^[46]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4
钟佳贤2016 ^[47]	Y	U	U	U	U	U	U	Y	Y	Y	4

注:①分配序列的产生或应用是否充分/正确;②分组基线是否相同或是否对混杂因素进行调整;③分配隐藏是否充分/正确;④实验过程中动物是否被随机安置;⑤实验中是否对动物饲养者和研究者施盲,以避免其知晓动物接受何种干预措施;⑥结果评价中的动物是否经过随机选择;⑦是否对结果评价使用者采用盲法;⑧不完整的数据是否被充分/正确报告;⑨不完整的数据是否被充分/正确的报告;⑩研究报告是否与选择性结果报告无关;Y.是(低偏倚的);N.否(高偏倚的);U.不确定。

对于补肾法对血清OPG的影响,漏斗图不对称,有潜在性偏倚。见图2。

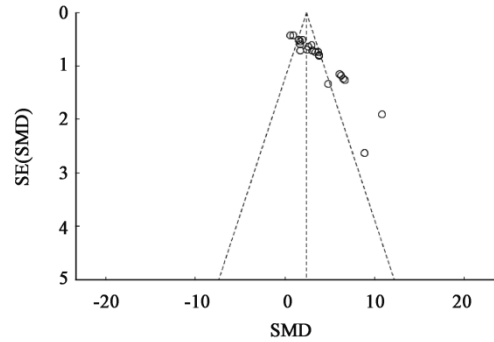


图2 偏倚分析漏斗

Fig. 2 Bias analysis funnel plot

2.4 疗效评价

2.4.1 BMD 15项研究采用BMD作为结局指标。根据测量部位的不同,将所有研究分为3组进行亚组分析。分析显示补肾法组的BMD高于对照组($n=376$, $SMD=2.01$, $95\% CI=1.50\sim 2.52$, $P<0.000 01$; 异质性 $\chi^2=64.22$, $I^2=74\%$, 随机效应模型),亚组Meta分析显示,补肾法在腰椎以外的所有部位均优于对照组,股骨BMD($n=267$, $SMD=2.31$, $95\% CI=1.60\sim 3.03$, $P<0.000 01$);异质性 $\chi^2=57.36$, $I^2=79\%$, 随机效应模型);胫骨BMD($n=86$, $SMD=1.56$, $95\% CI=1.06\sim 2.06$, $P<0.000 01$; 异质性 $\chi^2=2.22$, $I^2=0\%$, 随机效应模型);腰椎BMD($n=23$, $SMD=0.85$, $95\% CI=-0.01\sim 1.71$, $P=0.05$, 随机效应模型),但腰椎BMD仅纳入1项研究,所以可能存在更大的偏倚。

2.4.2 血清中OPG/RANK/RANKL信号通路水平

2.4.2.1 血清OPG水平 22项研究表明,补肾法对提高血清OPG水平与对照组相比有显著影响。补肾法组的血清OPG水平明显高于对照组($n=423$, $SMD=3.33$, $95\% CI=2.59\sim 4.07$, $P<0.000 01$; 异质性 $\chi^2=120.45$, $I^2=83\%$, 随机效应模型)。

2.4.2.2 血清RANKL水平 22项研究表明,与对照组相比,补肾法对降低血清RANKL水平有影响。除1项研究^[17]均值差异较大外,其他结果显示与对照组相比补肾法组血清RANKL水平有明显下降趋势($n=407$, $SMD=-4.88$, $95\% CI=-6.01\sim -3.75$, $P<0.000 01$; 异质性 $\chi^2=181.60$, $I^2=89\%$, 随机效应模型)。

2.4.2.3 血清RANK水平 5项研究表明,与对照组相比,补肾法对降低血清RANK水平有影响。除1项研究^[35]均值差异较大外,其他结果显示与对照

组相比,补肾法组血清RANK水平有明显下降趋势($n=100$, $SMD=-7.30$, $95\% CI=-9.53\sim-5.07$, $P<0.000\ 01$;异质性 $\chi^2=13.98$, $I^2=71\%$, 随机效应模型)。

2.4.3 骨 OPG/RANK/RANKL 信号通路的 mRNA 表达

2.4.3.1 骨 OPG mRNA 的表达 9项研究表明,与对照组相比补肾法促进骨 OPG mRNA 表达。2项研究^[16,28]显示均值差异较大外,其他研究结果显示,与对照组相比补肾法组内 OPG mRNA 表达水平有明显增加的趋势($n=136$, $SMD=11.81$, $95\% CI=7.49\sim16.13$, $P<0.000\ 01$;异质性 $\chi^2=103.18$, $I^2=94\%$, 随机效应模型)。

2.4.3.2 骨 RANKL mRNA 的表达 9项研究表明,与对照组相比补肾法抑制骨 RANKL mRNA 的表达。有3项研究^[16,28,31]显示均值差异较大外,其余研究结果表明,与对照组相比补肾法组内 RANKL mRNA 表达水平明显下降($n=120$, $SMD=-6.22$, $95\% CI=-8.95\sim-3.49$, $P<0.000\ 01$;异质性 $\chi^2=45.23$, $I^2=89\%$, 随机效应模型)。

2.4.3.3 骨 RANK mRNA 的表达 3项研究表明,与对照组相比补肾法抑制骨 RANK mRNA 的表达。研究表明补肾法组内 RANK mRNA 表达水平明显低于对照组($n=56$, $SMD=-3.18$, $95\% CI=-6.19\sim-0.18$, $P<0.05$;异质性 $\chi^2=21.15$, $I^2=91\%$, 随机效应模型)。

2.4.4 骨 OPG/RANK/RANKL 信号通路蛋白表达

2.4.4.1 骨 OPG 蛋白的表达 10项研究表明补肾法可以改善骨 OPG 蛋白表达。研究表明补肾法组的 OPG 蛋白表达水平明显高于对照组($n=192$, $SMD=4.95$, $95\% CI=3.09\sim6.81$, $P<0.000\ 01$;异质性 $\chi^2=103.42$, $I^2=91\%$, 随机效应模型)。

2.4.4.2 骨 RANKL 蛋白的表达 10项研究表明,与对照组相比补肾法抑制骨 RANKL 蛋白的表达。除1项研究^[31]均值差的偏差非常大,其余研究结果显示,与对照组相比补肾法组的 RANKL 蛋白表达水平明显下降($n=176$, $SMD=-3.99$, $95\% CI=-5.47\sim-2.50$, $P<0.000\ 01$;异质性 $\chi^2=62.46$, $I^2=87\%$, 随机效应模型)。

3 讨论

3.1 证据总结 本研究表明补肾法能明显提升 PMOP 模型的 BMD 水平,尤其在股骨和胫骨效果显著。补肾法可明显提高血清 OPG 水平及骨组织中 OPG mRNA 和蛋白的表达,同时降低血清 RANKL 和 RANK 水平及其在骨组织中 mRNA 和蛋白的表

达。因此补肾法调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路的平衡是其抗 POMP 的重要机制。

OVX 模型是使用最普遍且用于研究最广泛的 PMOP 动物模型,也是美国食品药品监督管理局(FDA)和欧盟药品审评局(EMA)批准的新药临床前药效评价模型^[48-49]。为本次 Meta 分析的结论提供重要基础保证。

补肾法能明显提高 OVX 模型胫骨和股骨的 BMD 水平,但是对腰椎 BMD 水平改善不明显,未看到补肾法对 PMOP 患者腰椎 BMD 的明显改善作用^[50]。导致腰椎 BMD 水平改善不明显的原因可能与腰椎比胫骨近端或股骨颈对卵巢切除术引起的骨小梁体积变化的拮抗性有关^[51]。

OPG/RANK/RANKL 信号通路与人体的成骨破骨平衡密切相关,是近年来的研究热点。RANK 高度表达于破骨细胞中,而 RANKL 作为 RANK 的配体,对于破骨细胞分化时的基因转录具有决定性作用^[52]。OPG 作为诱导受体,可以竞争性 RANKL 结合,起到抑制破骨细胞分化的作用。女性绝经后雌激素的缺乏导致 OPG 表达降低和 RANKL 表达增加,从而导致 OPG/RANK/RANKL 信号通路紊乱,进而导致破骨细胞增多和成骨细胞减少,最终导致骨质流失^[53]。临床目前 RANKL 抑制剂作为调控手段,因其副作用较多和药物假期所以应用受限。通过本 Meta 分析发现,应用补肾法能明显改善血清 OPG 值,降低骨 RANKL 基因和蛋白表达,所以补肾法可以明显改善 OVX 模型的 OPG/RANK/RANKL 信号通路平衡,为用补肾法治疗 POMP 提供了较雄厚的科学依据。

3.2 研究局限性 本研究纳入文献语言仅为中文和英文,其他语言文献未纳入。干预措施不包括其他具有补肾功效的中医疗法,如针刺、灸法等。本研究纳入的研究质量偏低,总样本量偏少,其中现有研究中符合纳入本 Meta 分析的关于血清 RANK,骨 RANK mRNA 较少,故 Meta 分析结果可能偏倚性较高。各项研究所涉及的补肾法对 OPG/RANK/RANKL 信号通路的有效性可能被夸大。

此次 Meta 分析首次总结了补肾法在 OVX 大鼠模型中的抗骨质疏松疗效,其机制与调节 PMOP 动物模型中 OPG/RANK/RANKL 信号通路的平衡方面密切相关。结论的确切性仍需要更大的样本,更合理的设计以及高质量的动物实验研究来进行进一步的验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BLACK D M, ROSEN C J. Postmenopausal osteoporosis [J]. *New Eng J Med*, 2016, 374 (3) : 254-262.
- [2] SATPATHY S, PATRA A, AHIRWAR B. Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis [J]. *J Complement Integr Med*, 2015, 12(4):251-266.
- [3] BURGE R, DAWSON-HUGHES B, SOLOMON D H, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025 [J]. *J Bone Mineral Res*, 2007, 22(3):465-475.
- [4] GUO Y, TAN L J, LEI S F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(1):e1000806.
- [5] CAMACHO P M, PETAK S M, BINKLEY N, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis-2016-executive summary [J]. *Endocr Pract*, 2016, 22(S4):1-42.
- [6] COSMAN F, BEUR S J D, LEBOFF M S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Osteoporosis Int*, 2015, 26(7) : 2045-2047.
- [7] 王少君,李艳,刘红,等. 中医理论对骨质疏松症发病机制的认识 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(9):1044-1048.
- [8] SHU B, SHI Q, WANG Y J. Shen (Kidney)-tonifying principle for primary osteoporosis: to treat both the disease and the Chinese medicine syndrome [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(9):656-661.
- [9] 黄委委,李姣,郑旭耀,等. 补肾中药治疗绝经后骨质疏松症有效性和安全性:系统评价和Meta分析 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2019, 12(5) : 500-510.
- [10] 詹魁骏,安艳军,牟新. 补肾中成药对绝经后骨质疏松症骨代谢影响的Meta分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(2):202-211.
- [11] 赵思怡,黄帆,冯子桐,等. 补肾活血类中药复方制剂治疗绝经后骨质疏松症有效性和安全性的Meta分析 [J]. *中国药房*, 2019, 30(8):1105-1111.
- [12] 陈砺,朱春燕,王小平,等. 补肾中药对绝经后骨质疏松症患者骨密度影响的Meta分析 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(30):6703-6705.
- [13] GREENFIELD E M, BI Y, MIYAUCHI A. Regulation of osteoclast activity [J]. *Life Sci*, 1999, 65 (11) : 10870-1102.
- [14] LACEY D L, TIMMS E, TAN H L, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. *Cell*, 1998, 93(2):165-176.
- [15] HOOIJMANS C R, ROVERS M M, DE VRIES R B, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2014, 14(1):43.
- [16] 安方玉,颜春鲁,刘永琦,等. 左归丸对去势骨质疏松大鼠钙磷代谢和细胞核因子 κ B受体活化因子配体/骨保护素的影响 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(3):261-266.
- [17] 曹寅生,李喆,李木清. 金刚健骨片对骨质疏松症模型大鼠骨组织OPG/RANKL/RANK系统影响的实验研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(3):161-163.
- [18] 陈奇红,何帮剑,姚新苗. 补肾活血颗粒对去势骨质疏松大鼠OPG/RANK/RANKL系统的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(4):403-406.
- [19] 邓海东. 中药抗疏健骨颗粒对OP模型大鼠RANKL, RANK, OPG影响的实验研究 [D]. 西安:陕西中医药大学, 2011.
- [20] 范竟. “温肾通络止痛方”治疗肾虚体质相关型骨质疏松症的方剂优化及实验研究 [D]. 南京:南京中医药大学, 2014.
- [21] 冯佳,袁林,苏林冲,等. 强骨康疏胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨细微结构及骨代谢的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(9):797-801.
- [22] 冯建书,付强,闫世杰,等. 仙灵骨葆对骨质疏松大鼠OPG/RANK/RANKL表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(23):4438-4441, 4437.
- [23] 甘国兴,李劲平,刘毓,等. 壮骨止痛方调节OPG/RANKL平衡抗绝经后骨质疏松作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(7):938-942.
- [24] 葛继荣,李生强,陈娟,等. 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠骨密度及OPG和RANKL蛋白表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(5):592-595.
- [25] 郭杨,郑苏阳,马勇,等. 温肾通络止痛汤对去卵巢模型大鼠骨密度与血清生化指标的影响 [J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(12):1055-1058, 1074.
- [26] 黄淑燕. 补肾化痰方对去势骨质疏松大鼠OPG/RANKL/RANK通路影响的研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2017.
- [27] 惠红岩,董玉珍. 自拟补肾活血颗粒对去卵巢骨质疏松症大鼠的治疗作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9):1683-1687.
- [28] 李鸿泓. 基于破骨细胞分化调节通路OPG/RANKL探讨补肾健脾方治疗骨质疏松症的作用机理 [D]. 北

- 京:中国中医科学院,2013.
- [29] 刘振涛. 二至丸粗提液对去势骨质疏松模型鼠RANKL/RANK/OPG系统干预作用的实验研究[D]. 厦门:厦门大学,2017.
- [30] 吕朝晖,李伟举,董云鹏,等. 筋骨胶囊对骨质疏松大鼠骨髓细胞OPG和RANKL mRNA表达量的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(5):5-8.
- [31] 闵文,黄桂成,华永庆,等. 补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织RANKL/OPG基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):258-261.
- [32] 闵文,韩龙,韩诗雨,等. 补肾通络方对骨质疏松大鼠骨吸收的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(19):4743-4746.
- [33] 芮丹云,唐丽媛,陈洁,等. 补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠骨组织中OPG/RANKLmRNA及蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(24):7036-7038.
- [34] 史传道,邓海东,樊晓晨. 抗疏健骨颗粒对骨质疏松模型大鼠OPG和RANKL的影响[J]. 西部中医药,2012,25(3):11-13.
- [35] 苏麒麟,孙鑫,杨芳,等. 补肾中药对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨及肌肉组织Notch信号通路蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(8):3208-3212.
- [36] 倘艳锋,陈久毅,李玉雄. 补肾健脾法对骨质疏松大鼠OPG mRNA,RANKL mRNA表达影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2008,16(5):28-28.
- [37] 陶益,陈西,任玉超,等. 酒续断对骨质疏松型大鼠OPG/RANK/RANKL轴系统的调控研究[J]. 现代医药卫生,2016,32(8):1127-1129.
- [38] 吴佳莹. 基于Hepcidin-OPG/RANKL探讨左归丸治疗去卵巢所致大鼠骨质疏松症的作用机理[D]. 北京:中国中医科学院,2017.
- [39] 徐强,冯小玲,白巍,等. 补肾壮骨液对骨质疏松模型大鼠血清OPG、RANKL蛋白表达的影响[J]. 中医药信息,2009,26(4):80-81.
- [40] 颜春鲁,王琳,安方玉,等. 地黄饮子水煎剂对去势骨质疏松大鼠生物力学及OPG/RANKL/RANK含量的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(10):4642-4645.
- [41] 颜春鲁,李盛华,安方玉,等. 藤黄健骨胶囊对骨质疏松大鼠OPG/RANK/RANKL调节轴的影响[J]. 解放军药学报,2018,34(3):217-220.
- [42] 杨军,莫新民. 壮骨止痛方对骨质疏松大鼠Wnt/ β -catenin、RANKL/RANK/OPG信号通路的影响[J]. 北京中医药,2017,36(7):611-613.
- [43] 杨博文,颜春鲁,王鹏,等. 补肾中药温肾强身散对去卵巢大鼠骨代谢和OPG/RANKL平衡的影响[J]. 中医研究,2017,30(9):61-64.
- [44] 张志海,徐无忌,罗毅文,等. 骨康对去势大鼠骨密度、OPG、RANKL的影响[J]. 陕西中医,2009,30(9):1259-1261.
- [45] 张信成,张旭桥,仇湘中,等. 强骨颗粒对骨质疏松大鼠胫骨组织中OPG、RANKL表达的影响[J]. 湖南中医杂志,2019,35(7):145-146,150.
- [46] 郑德开,阮诗钒,叶春华,等. 巴戟天对卵巢切除大鼠OPG、RANKL蛋白表达的影响[J]. 江西中医药大学学报,2018,30(3):74-76.
- [47] 钟佳贤,林泽苗,贾欢欢,等. 护骨胶囊对去卵巢大鼠血清骨代谢指标的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(5):602-608.
- [48] THOMPSON D D, SIMMONS H A, PIRIE C M, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis [J]. Bone, 1995, 17(4 Suppl): 125S-133S.
- [49] CORTET B. Bone repair in osteoporotic bone: Postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis [J]. Osteoporosis Int, 2011, 22(6):2007-2010.
- [50] JIN Y X, WU P, MAO Y F, et al. Chinese herbal medicine for osteoporosis: A Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Clin Densitom, 2017, 20(4):516-525.
- [51] WRONSKI T J, DANN L M, HORNER S L. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats [J]. Bone, 1989, 10(4):295-301.
- [52] 仲蕾蕾,杨冰,黄晓斌,等. OPG/RANKL/RANK系统在成骨细胞和破骨细胞相互调节中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2011,17(11):1010-1013.
- [53] WOLSKI H, DREWS K, BOGACZ A, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis [J]. Ginekologia Polska, 2016, 87(5):347-352.

[责任编辑 顾雪竹]