

基于RANKL/OPG探讨桂枝芍药知母汤对骨质疏松症模型大鼠的治疗作用

彭伟, 张青, 黄勤挽, 魏蜀君*, 高永翔*
(成都中医药大学药学院, 基础医学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:基于大鼠卵巢切除术(OVX)联合糖皮质激素注射致骨质疏松模型探讨桂枝芍药知母汤(GSZT)对骨质疏松症(OP)模型SD雌鼠的治疗作用。方法:OVX手术1周后,除假手术组外,大鼠分为OP模型组、骨化醇组($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),GSZT低、中、高剂量组($0.8, 1.6, 3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除假手术组,大鼠肌肉注射地塞米松($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,2次/周),连续6周;给药8周后,处死动物收集股骨样本,计算机微断层扫描(Micro CT)扫描股骨远端1/3,检测骨矿物质密度(BMD),骨体积(BV),组织体积(TV),结构模式指数(SMI),骨小梁连接密度(Conn.D),骨小梁数目(Tb.N),骨小梁厚度(Tb.Th),和骨小梁分离度(Tb.Sp)。采用苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色检查股骨组织病理学改变。采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色分析骨组织中破骨细胞。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测骨组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织蛋白酶K(CTSK),抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRAP5b)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织中核转录因子- κ B受体活化因子配体(RANKL),骨保护素(OPG),碱性磷酸酶(ALP),骨碱性磷酸酶(BALP)蛋白表达。结果:与正常组比较,OP模型大鼠骨松质部位骨小梁数量明显减少,间距增宽,厚度变薄,连续性差;与模型组比较,GZST中、高剂量组对股骨骨松质的骨小梁改变均有改善作用。Masson染色表明与正常组比较,OP模型组股骨远端骨骺生长板厚度变薄,新生骨面积变小,骨化醇及GZST高剂量组可抑制新生骨的减少。TRAP染色结果表明,与正常组比较,OP组破骨细胞数目明显增加,与模型组比较,GZST中、高剂量组可减少OP大鼠破骨细胞数量。Micro CT结果表明,与正常组比较,OP大鼠BMD,BV,Tb.N,Tb.Th和Conn.D减小,SMI和Tb.Sp显著升高($P<0.01$);与模型组比较,GZST中、高剂量可改善OP大鼠骨质疏松程度,BV,Tb.N显著升高,SMI,Tb.Sp显著降低($P<0.01$)。ELISA结果表明,与正常组比较,OP模型组ALP含量显著减少($P<0.01$),MMP-9,TRAP5b和CTSK含量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,GZSD高剂量ALP含量显著升高($P<0.01$),MMP-9,TRAP5b和CTSK显著减少($P<0.01$)。Western blot结果表明,与模型组比较,骨化醇组及GSZD高剂量组均抑制RANKL蛋白的表达($P<0.05$),提高OPG表达($P<0.05$)。结论:本研究表明GSZT对OVX联合激素引起的大鼠骨质疏松具有治疗作用,其机制与调节RANKL,OPG相关,为其进一步的临床应用和现代制剂开发奠定了一定基础。

[关键词] 桂枝芍药知母汤;骨质疏松;计算机微断层扫描(Micro CT);核转录因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R68 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)23-0011-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212339

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211018.1130.002.html>

[网络出版日期] 2021-10-18 17:33

Therapeutic Effect of Guizhi Shaoyao Zhimutang on Osteoporosis in Rats Based on RANKL/OPG

PENG Wei, ZHANG Qing, HUANG Qin-wan, WEI Shu-jun*, GAO Yong-xiang*
(School of Pharmacy, School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20210722(004)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721004-009-002);四川省科技计划项目(2019JDRC0074)

[第一作者] 彭伟,博士,副教授,从事中药物质基础及其机制研究工作,Tel:028-61801001,E-mail:pengwei@cdutcm.edu.cn

[通信作者] *高永翔,博士,教授,从事中西医结合与临床研究,Tel:028-61801001,E-mail:drgaoyx@cdutcm.edu.cn;

*魏蜀君,博士,讲师,从事中西医结合与临床研究,Tel:028-61801001,E-mail:Shujunwei05@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effect of Guizhi Shaoyao Zhimutang (GSZT) on the osteoporosis (OP) in SD female rats induced by ovariectomy (OVX) combined with glucocorticoid injection and its related mechanisms. **Method:** The rats were divided into a sham operation group and an experimental group for OVX. One week later, the experimental rats were divided into an OP model group, a calciferol (positive control, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and low ($0.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium ($1.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) GSZT groups. Except for those in the sham operation group, the rats received an intramuscular injection of dexamethasone ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) twice per week for six weeks. After the rats were treated correspondingly for eight weeks, the rats were sacrificed for thighbone sample collection. The computer microtomography (Micro CT) was used to analyze the parameters of bone mineral density (BMD), bone volume (BV), tissue volume (TV), structure model index (SMI), connectivity density (Conn.D), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular pattern factor (Tb.Pf), and trabecular separation (Tb.Sp). In addition, hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining was used for the histopathological examination of the thighbone. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to analyze osteoclasts in bone tissues. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), cathepsin K (CTSK), and TRAP5b in bone tissues, and Western blot was carried out to determine receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), alkaline phosphatase (ALP) in bone tissues. **Result:** Compared with normal group, the number of bone trabeculae in cancellous part of OP model rats decreased significantly, the spacing widened, the thickness became thinner, and the continuity was poor. Compared with model group, GZST medium and high-dose groups could improve the changes of femoral bone trabecular cancellous bone. Masson staining showed that compared with the normal group, the growth plate thickness of the distal femur epiphysis was thinner and the area of new bone was smaller in the OP model group, while the reduction of new bone was inhibited in the high dose group of calcitol and GZST. TRAP staining results showed that the number of osteoclasts in OP group was significantly increased compared with the normal group, and the number of osteoclasts in medium-high dose GZST group was reduced. Micro CT results showed that compared with normal group, BMD, BV, Tb.N, Tb.Th and Conn.D of OP rats were decreased, SMI and Tb.Sp were significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, medium and high dose of GZST could improve the degree of osteoporosis in OP rats, BV, Tb.N were significantly increased, SMI, Tb.Sp were significantly decreased ($P<0.01$). ELISA results revealed that compared with the sham operation group, the OP model group showed decreased ALP content ($P<0.01$) and increased MMP-9, TRAP5b, and CTSK ($P<0.01$). Compared with the OP model group, the high-dose GSZT group showed increased ALP content ($P<0.01$) and decreased MMP-9, TRAP5b, and CTSK ($P<0.01$). Western blot results demonstrated that compared with the OP model group, the calciferol group and the high-dose GSZT group showed inhibited expression of the RANKL protein ($P<0.05$), and increased OPG expression ($P<0.05$). **Conclusion:** The findings suggest that GZST has a potential therapeutic effect on OP caused by OVX combined with glucocorticoids in rats, and the underlying mechanism is associated with the regulation of RANKL/OPG in bone tissues. This study is expected to lay a preliminary foundation for its clinical application and modern preparation development.

[Keywords] Guizhi Shaoyao Zhimutang (GZST); osteoporosis; computer microtomography (Micro CT); nuclear transcription factor- κ B receptor activating factor ligand (RANKL); osteoprotectin (OPG)

骨质疏松(OP)是临床最常见的全身性骨代谢疾病之一,常见于老龄人群和绝经后的妇女;因为骨量减少,骨组织微结构损伤,骨脆性增加,特别容易造成骨折的发生^[1-2]。除骨折外,OP还易引起腰背疼痛、脊柱变形、行动受限等,严重危害了患者生

活质量和健康。流行病学研究显示OP人群已经超过2亿,已受到全世界广泛的关注。我国骨质疏松在50岁以上人群发病率约为20%,特别是女性发病高达32%^[3]。目前,临床治疗OP主要为药物治疗,包括促骨形成剂和抑制骨吸收剂,然而临床治疗效

果不是特别理想。祖国传统医学中,OP属于中医“骨萎”“骨痹”的范畴,临床表现为慢性腰背痛、乏力、关节痛等,严重者会出现脆性骨折、驼背、身高变矮或脊柱畸形。本病好发于老龄人群和绝经后的妇女,中医学认为本病病因为肝肾亏虚,血脉瘀滞,治法常以补肝益肾,补气健脾,活血化痰为主。目前,越来越多的报道表明中医药在治疗OP方面具有独特的优势^[4]。

桂枝芍药知母汤出自《金匮要略》,曰:“诸肢节疼痛身体魁羸,脚肿如脱,头眩短气,温温欲吐,桂枝芍药知母汤主之。”桂枝芍药知母汤由桂枝、白芍、知母、防风、白术、生姜、麻黄、甘草、炮附子9味药组成,主治历节日久,邪恋正虚,郁而化热伤阴之证。组方严谨,诸法相合,而又兼顾表里寒热虚实,临床应用较为广泛,为治疗痹证的经典名方^[5-6]。现代药理研究证明本方具有抗炎、镇痛、免疫调节等多方面功效作用,本课题组前期研究也表明GSZT对于类风湿关节炎所致的骨破坏具有改善作用^[7],其机制与抑制破骨细胞的数量、调节滑膜组织中核转录因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)和骨保护素(OPG)的表达相关^[7-8]。破骨细胞的升高是造成OP的主要原因,RANKL和OPG是OP防治重要的靶点^[9],然而GSZT是否能用于OP的治疗现未见系统的临床研究报道和动物实验证据。因此,本文拟基于大鼠卵巢摘除手术(OVX)联用糖皮质激素的方法建立大鼠OP模型,系统评价GSZT对实验性OP动物的治疗作用,并对其机制进行探讨,为该药临床应用于OP治疗和现代中药复方制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 动物 36只SPF级雌性SD大鼠(220±20)g购于斯贝福(北京)生物科技有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。本实验获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(备案号2018-014),符合中国伦理委员会指导原则。饲养于成都中医药大学中西医基础医学实验中心动物实验室,温度为24~30℃,湿度为50%~65%,摄食辐照大鼠用灭菌饲料,由斯贝福(北京)生物科技有限公司提供。

1.2 药品 桂枝芍药知母汤由桂枝12g,白芍9g,知母12g,防风12g,白术15g,生姜15g,麻黄6g,甘草6g,炮附子6g,所有饮片均自四川省中药饮片有限责任公司公司购入,由成都中医药大学药学院中药炮制学教研室吴纯洁教授鉴定后使用。阿法骨化醇软胶囊(阿法迪三)购自成都中医药大学附

属医院门诊西药房,梯瓦制药工业有限公司(以色列)生产,批号A48198。按照处方称取九味饮片,加水1000mL,浸泡30min,大火煮沸,小火微沸后,浓缩至约300mL,200目纱布双层过滤,冷凝浓缩至100mL,-60℃冷冻干燥,得桂枝芍药知母汤冻干粉(得率约为18%)。

1.3 试剂 戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号20191011);注射用青霉素钠(华北制药集团动物保健品有限责任公司,批号20190510);地塞米松磷酸钠注射液(山西省芮城科龙兽药有限公司,批号20200127);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,马松(Masson)染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别BA-4022,BA-4079A);抗酒石酸酸性磷酸酶染色液(南京建成生物工程研究所,批号20200102);骨蛋白提取试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,批号20201225);BCA蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020,P1200);RANKL兔源多克隆抗体,OPG兔源多克隆抗体,碱性磷酸酶(ALP)兔源抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白G(IgG), β -肌动蛋白(β -actin)兔源多克隆抗体(美国Affinity公司,批号分别为AF0313,DF6824,DF12525,S0001,AF7018);大鼠OPG酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-EL-R3005);大鼠基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织蛋白酶K(CTSK),抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRAP5b),骨碱性磷酸酶(BALP)ELISA检测试剂盒(上海酶联生物技术有限公司,批号分别为ml059268,ml003294,ml059485)。

1.4 仪器 Quantum GX型计算机微断层扫描(Micro CT)仪器(美国PerkinElmer公司);Analyze 12.0 Micro CT小动物活体成像数据分析系统(美国PerkinElmer);MS23型显微镜(日本Olympus公司);MDF-382E型超低温冰箱(日本三洋电机株式会社);40266883型高速冷冻离心机(德国Heraeus公司);KD-BM型石蜡包埋机(金华科迪仪器);RM22445型组织切片机(德国Leica公司);S10型匀浆仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);UPH超纯水制造系统(优普ULP);721BR00339型化学发光显影仪(美国Bio-Rad公司);CMaXPLUS型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 OP模型的制备及分组 36只大鼠分为6组,

假手术组,模型组,骨化醇组,桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组。假手术组以外的其他各组,适应性喂养7 d后,禁食8 h后,根据大鼠体质量,将3%戊巴比妥钠($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)注射入大鼠腹腔进行麻醉,水平腹部向下固定,备皮后局部碘伏消毒;于大鼠背部单侧(肋骨下1 cm,脊柱旁开约3 cm)做约1 cm纵行切口,分离皮肤肌肉,将子宫末端与卵巢之间用手术线结扎,摘除双侧卵巢,将子宫放回腹腔中;假手术组在开腹后,仅摘取卵巢周围部分脂肪组织。手术结束1周后,除假手术组外,其余各组大鼠肌注地塞米松磷酸钠($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每周2次,连续6周^[10];假手术组则相应肌注等体积的生理盐水。每4天称体质量1次,调整用药剂量。

2.2 给药 桂枝芍药知母汤人用临床使用剂量为 $93 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,换算为大鼠给药剂量约为 $93 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。由于冻干粉出粉率约为18%,9.3 g生药冻干后约1.58~1.67 g,所以选取 $1.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为本次实验桂枝芍药知母汤给药的中剂量,低剂量为 $0.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高剂量为 $3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,冻干粉灌胃给药前用CMC-Na研磨成混悬液。阿法骨化醇人用临床使用剂量为 $1 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,换算为大鼠给药剂量为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,灌胃给药前用CMC-Na研磨成混悬液。假手术组、模型组予CMC-Na $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃。以上给药每天1次,每周6 d,连续8周。每4 d称体质量1次,调整用药剂量。

2.3 标本采集 末次灌胃24 h后,腹腔注射戊巴比妥钠($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,腹主动脉采血。采血后室温静置1 h后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径7 cm,下同),吸取上清液于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存以待进一步检测。剥离出大鼠双侧股骨、胫骨,取右侧股骨远端1/3采用4%多聚甲醛固定,用于Micro CT扫描,制作脱钙骨切片,用于HE染色,TRAP染色,Masson染色。左侧股骨及双侧胫骨剪碎后放于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存,用于ELISA及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。

2.4 Micro CT扫描成像 各实验组随机选取3只大鼠右侧股骨,4%多聚甲醛固定48 h。固定完成后流水冲洗3 h行Micro CT扫描成像。用微焦计算机断层扫描技术获得股骨远端1/3的平扫及三维重建图像,计算矿物质密度(BMD),骨体积(BV),组织体积(TV),结构模式指数(SMI),骨小梁连接密度(Conn.D),骨小梁数目(Tb.N),骨小梁厚度(Tb.Th),和骨小梁分离度(Tb.Sp)。

2.5 病理学检测 右侧股骨远端完成Micro CT后

在自来水中冲洗1 h,置于纯水中浸泡20 min后置于EDTA脱钙液中脱钙。 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 脱钙2周,正常脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,切片厚度为 $5 \text{ }\mu\text{m}$,以HE和Masson染色进行病理学检查。

2.6 骨蛋白提取 按照说明书操作将骨组织在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,用pH7.4的PBS充分浸泡2次,将骨组织剪碎,称质量后加入骨蛋白提取液(骨组织200 mg加入蛋白提取液500 μL),用匀浆机进行匀浆。匀浆后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,样品上清 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.7 ELISA检测 OPG, MMP-9, CTSK, TRAP5b的含量 ELISA试剂盒操作方法按照说明书操作,测定血清和骨组织匀浆中ALP, OPG, MMP-9, CTSK, TRAP5b的含量。

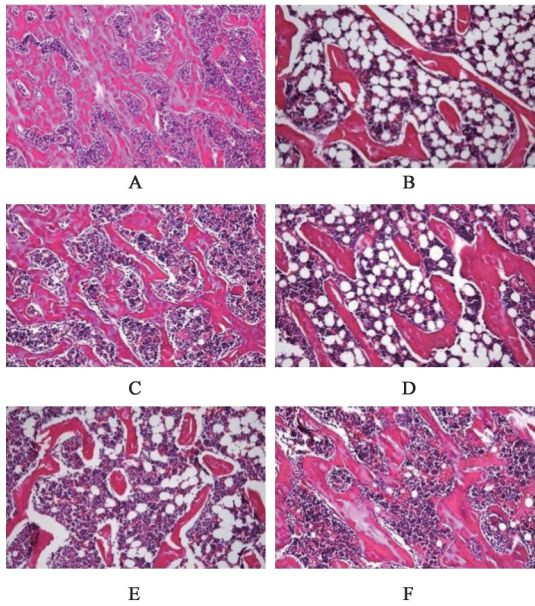
2.8 Western blot检测 骨匀浆中RANKL, OPG, ALP蛋白的表达 骨组织蛋白采用BCA试剂盒测定浓度后,取蛋白样品30 μg 采用SDS-PAGE进行分离。分离后的蛋白条带采用湿转的方式转到PVDF膜,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h后,加入一抗RANKL, OPG, ALP(1:500)室温孵育过夜;TBST洗膜3次后,二抗(1:1 000)孵育1 h。TBST洗膜3次后,以ECL试剂进行化学发光,凝胶成像仪曝光成像后,应用Image Pro-plus 6.0分析胶片中的目的条带,分析条带的光密度值并统计。

2.9 统计学分析 采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析进行组间差异比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对OP模型大鼠组织病理学的影响 采用HE和Masson染色组织切片对股骨远端1/3进行观察。与假手术组比较,模型组大鼠表现出明显的骨质疏松,骨松质部位骨小梁数量明显减少,间距增宽,厚度变薄,连续性差;与模型组比较,骨化醇组和桂枝芍药知母汤中、高剂量组对股骨骨松质的骨小梁改变均有改善作用,桂枝芍药知母汤低剂量组与模型组比较无明显变化,见图1。Masson染色可显示大鼠新生骨和成熟骨的部位和面积,浅蓝色为新生骨,深蓝色为成熟骨。与假手术组比较,模型组股骨远端骨骺生长板厚度较假手术组明显更薄,新生骨面积较小;与模型组比较,骨化醇及桂枝芍药知母汤高剂量组可抑制新生骨的减少,桂枝芍药知母汤低、中剂量组与模型组无明显差异。见图2。

各组大鼠右侧股骨远端骨小梁微结构变化的



A. 假手术组; B. 模型组; C. 骨化三醇组; D-F. 桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组(图2~5同)

图1 桂枝芍药知母汤对各组大鼠股骨远端组织学病理变化的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of GSZT on distal femur histopathology in OP model rats visualized(HE, ×100)

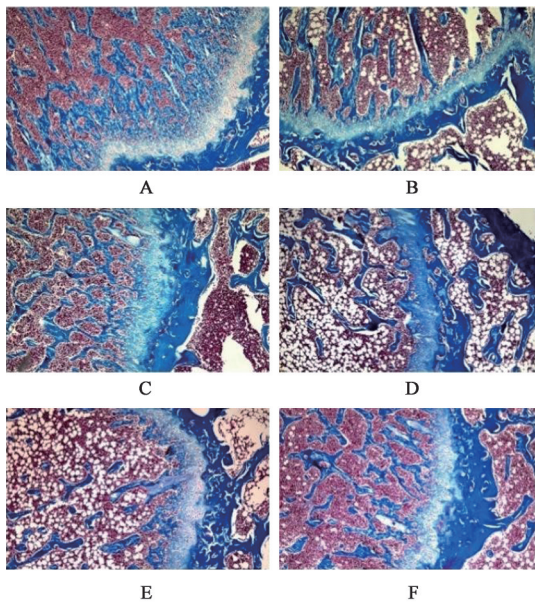


图2 桂枝芍药知母汤对各组大鼠股骨远端组织学病理变化的影响(Masson, ×40)

Fig. 2 Effect of GSZT on distal femurs histopathology in OP model rats visualized(Masson, ×40)

三维影像扫描结果与HE染色结果具有相似性,与假手术组比较,模型组大鼠BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th和Conn.D显著降低, SMI和Tb.Sp显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,骨化三醇及桂枝芍药知母汤中、高剂量可不同程度的改善OP大鼠骨质疏松程

度,尤其是SMI, Tb.N, Tb.Sp改善显著($P < 0.01$)。见图3,表1。

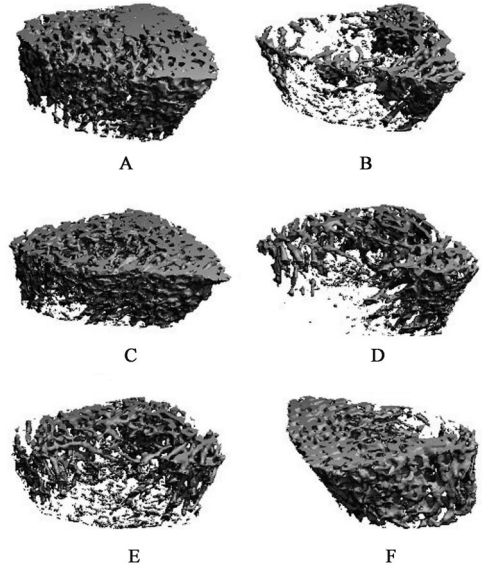


图3 桂枝芍药知母汤对各组大鼠股骨影像学变化的影响(Micro CT, ×24)

Fig. 3 Effect of GSZT on Micro CT imaging of distal femurs of OP rats (Micro CT, ×24)

3.2 对OP模型大鼠破骨细胞数量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠的OC数量显著升高;与模型组大鼠比较,骨化醇组和桂枝芍药知母汤中、高剂量OC明显减少,低剂量组与模型组比较差异无统计学意义。见图4。

3.3 对OP模型大鼠骨匀浆ALP, MMP-9, TRAP5b和CTSK水平的影响 ELISA结果显示与假手术组比较,模型组ALP含量显著减少($P < 0.01$), MMP-9, TRAP5b和CTSK水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,骨化醇组及桂枝芍药知母汤中、高剂量组ALP含量显著升高($P < 0.01$), MMP-9, TRAP5b和CTSK显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

3.4 对OP模型大鼠血清中OPG和TRAP5b含量的影响 与假手术组比较,模型组OPG含量显著降低($P < 0.01$), TRAP5b含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,骨化醇组及桂枝芍药知母汤各剂量组OPG含量显著升高($P < 0.01$),骨化醇组及桂枝芍药知母汤中、高剂量组TRAP5b含量显著减少($P < 0.01$)。见表3。

3.5 对OP模型大鼠骨匀浆中RANKL, OPG, ALP蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组ALP, OPG蛋白含量显著降低($P < 0.01$), RANKL蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,骨化醇组及桂

表 1 桂枝芍药知母汤对各组大鼠股骨 Micro CT 扫描数据的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of GSZT on Micro CT scanning data of femur of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | BMD/mg·cm ⁻¹ | BV/TV | Conn.D/1·mm ⁻³ | SMI |
|---------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 假手术 | | 706.80±11.74 | 0.35±0.06 | 68.76±13.79 | 0.70±0.22 |
| 模型 | | 624.21±5.50 ²⁾ | 0.06±0.02 ²⁾ | 9.37±3.74 ²⁾ | 2.58±0.09 ²⁾ |
| 骨化三醇 | 1×10 ⁻⁴ | 680.32±10.84 ⁴⁾ | 0.28±0.04 ⁴⁾ | 56.86±3.86 ⁴⁾ | 1.44±0.32 ⁴⁾ |
| 桂枝芍药知母汤 | 0.8 | 643.13±4.35 | 0.09±0.01 | 13.51±0.76 | 2.39±0.08 |
| | 1.6 | 644.21±5.08 | 0.20±0.01 ⁴⁾ | 35.49±18.65 | 1.85±0.05 ³⁾ |
| | 3.2 | 658.82±7.14 ³⁾ | 0.24±0.03 | 48.51±2.28 | 1.34±0.09 ⁴⁾ |
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Tb.N/1·mm ⁻¹ | Tb.Th/mm | Tb.Sp/mm | |
| 假手术 | | 3.887±0.259 | 0.094±0.007 | 0.162±0.006 | |
| 模型 | | 0.973±0.293 ²⁾ | 0.059±0.002 ²⁾ | 1.040±0.366 ²⁾ | |
| 骨化三醇 | 1×10 ⁻⁴ | 3.600±0.370 ⁴⁾ | 0.077±0.004 ⁴⁾ | 0.207±0.022 ⁴⁾ | |
| 桂枝芍药知母汤 | 0.8 | 1.367±0.040 | 0.062±0.001 | 0.672±0.022 | |
| | 1.6 | 2.997±0.040 ⁴⁾ | 0.066±0.001 | 0.266±0.001 ⁴⁾ | |
| | 3.2 | 3.203±0.161 ⁴⁾ | 0.074±0.004 ³⁾ | 0.238±0.023 ⁴⁾ | |

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表 2~4 同)。

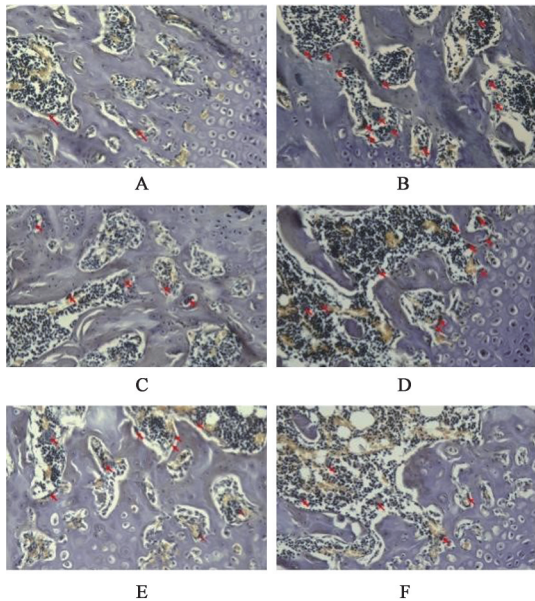


图 4 桂枝芍药知母汤对各组大鼠股骨远端破骨细胞数量变化的影响 (TRAP, ×100)

Fig. 4 Effect of GSZT on changes in osteoclasts of distal femurs of OP rats (TRAP, ×100)

枝芍药知母汤高剂量组 ALP, OPG 蛋白表达均明显升高 ($P<0.05, P<0.01$), RANKL 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。见图 5, 表 4。

4 讨论

桂枝芍药知母汤为临床治疗骨与关节疾病的常用方、基础方。方中桂枝和附子为君药, 桂枝辛温, 长于温经散寒, 活血止痛; 附子辛甘大热, 长于温经散寒止痛, 二者合用, 能祛风除湿以通脉, 温经

散寒以助阳。麻黄辛温, 助桂、附散寒, 又可通毛窍以宣痹, 盖风邪由表而入也; 防风辛温, 长于祛风除湿止痛, 伍附子, 增其祛风之功; 白术甘温, 入脾胃经; 三药合用, 助君药祛风除湿, 重用白术, 可使麻、桂行中有收, 祛风外达而不耗伤营阴。白芍养阴和营, 伍白术以和气血; 知母清热滋阴, 可清解郁热, 伍白芍滋阴血以壮水, 又可防桂、附温燥伤阴; 重用生姜降水饮之上逆以和胃止呕, 且其助胃行津液, 以助祛湿; 以上三药共为佐药。使以甘草调和诸药, 其与白芍相合, 能缓急舒筋止痛; 与姜相伍, 可和胃调中。全方合用, 共达宣痹通经之功, 使风寒湿得祛, 痹痛得止, 郁热得清^[5-6]。本方在临床上治疗类风湿关节炎 (RA) 具有显著疗效, 通过祛邪与扶正并重, 能在 RA 发病早期和活动期外散邪气、内调营卫、防止病邪内传于肾, 使肾气得以保存, 骨髓生化有源, 固护筋骨, 以达到对 RA 骨保护的作用。

本课题组前期研究表明 GSZT 对于 RA 所致的骨破坏具有改善作用, 可以抑制 CIA 模型大鼠的膝、踝骨关节的破坏, 其机制与抑制破骨细胞 (OCs) 的数量、调节 RANKL 和 OPG 的表达相关^[7, 10-11]。OCs 是造成 OP 主要的原因, RANKL 和 OPG 是 OP 防治重要的靶点, 然而 GSZT 是否能用于 OP 的治疗现未见系统的临床报道和动物实验证据。所以此次选择 OP 模型对本方抗全身性骨破坏的作用进行研究。本次研究是从骨代谢的角度观察本方的骨保护作用, 采用的联合造模法建立 OP 模型, 具

表 2 桂枝芍药知母汤对各组大鼠骨匀浆中 ALP, MMP-9, TRAP5b 和 CTSK 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of GSZT on ALP, MMP-9, TRAP5b and CTSK in bone homogenate of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ALP/μg·L ⁻¹ | TRAP5b/μg·L ⁻¹ | MMP-9/mg·L ⁻¹ | CTSK/μg·L ⁻¹ |
|---------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术 | | 93.31±2.21 | 22.28±4.60 | 0.34±0.10 | 21.17±0.99 |
| 模型 | | 46.49±0.71 ²⁾ | 83.26±8.82 ²⁾ | 5.54±0.32 ²⁾ | 61.19±1.40 ²⁾ |
| 骨化三醇 | 1×10 ⁻⁴ | 83.42±2.52 ⁴⁾ | 35.41±3.47 ⁴⁾ | 0.83±0.04 ⁴⁾ | 25.10±0.58 ⁴⁾ |
| 桂枝芍药知母汤 | 0.8 | 48.18±1.65 | 71.54±5.99 | 5.24±0.40 | 60.60±1.20 |
| | 1.6 | 60.32±4.11 ⁴⁾ | 66.86±2.92 ⁴⁾ | 4.61±0.34 ⁴⁾ | 52.86±1.15 ⁴⁾ |
| | 3.2 | 73.53±2.31 ⁴⁾ | 34.85±3.56 ⁴⁾ | 1.90±0.10 ⁴⁾ | 30.00±0.64 ⁴⁾ |

表 3 桂枝芍药知母汤对各组大鼠血清中 OPG 和 TRAP5b 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of GSZT on OPG and TRAP5b levels in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TRAP5b/μg·L ⁻¹ | OPG/ng·L ⁻¹ |
|---------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 假手术 | | 33.75±3.21 | 490.30±16.31 |
| 模型 | | 98.84±3.97 ²⁾ | 276.40±13.14 ²⁾ |
| 骨化三醇 | 1×10 ⁻⁴ | 43.05±4.07 ⁴⁾ | 414.70±19.31 ⁴⁾ |
| 桂枝芍药知母汤 | 0.8 | 91.76±4.35 | 364.40±12.86 ⁴⁾ |
| | 1.6 | 73.93±6.10 ⁴⁾ | 392.80±12.64 ⁴⁾ |
| | 3.2 | 49.08±5.09 ⁴⁾ | 398.40±12.63 ⁴⁾ |

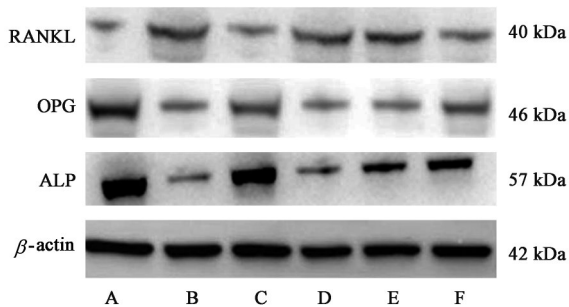


图 5 各组大鼠骨匀浆中 RANKL, OPG, ALP 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoretic of RANKL, OPG and ALP protein expression in OP rats via

有骨吸收增加和骨形成减少的骨代谢特点。OCs 是影响骨代谢的关键因素之一。OCs 由 M-CSF,

RANKL 刺激分化产生^[12]。RANKL/RANK/OPG 是诱导破骨细胞分化的重要途径。OPG 是 RANKL 的诱骗受体, 可与 RANK 竞争性结合, 从而阻断 RANKL 与 RANK 之间的相互作用, 抑制破骨细胞激活、分化和成熟^[13]。OPG 是负调控骨吸收的重要体液调节因子, 研究发现 RA 患者血清 RANKL 升高和 OPG/RANKL 比值降低^[14-17]。在骨吸收过程中, 酸性物质溶解羟基磷灰石, CTSK 和 MMP-9, TRAP 是骨破坏的经典标志物。CTSK 将有机成分从骨基质中分离和降解, 是破骨细胞中表达量最高, 溶骨活性最强的一种半胱氨酸蛋白酶^[18]。MMP-9 由活化的 OC 产生, 是 MMPs 超家族中相对分子质量最大的酶, 又称 IV 型胶原酶, 通过消化骨基质而增强破骨细胞性骨吸收, 导致骨破坏^[19]。TRAP 是破骨细胞特异性高表达的糖基化的含金属蛋白酶, 在酸性条件下可以催化磷酸酯键的水解, 直接参与破骨细胞的骨吸收过程^[20]。

在本研究中, 首次通过系统的动物实验表明, GSZT 具有改善 OP 大鼠骨质疏松症的作用, 治疗后 OP 大鼠骨矿物质密度显著增高, 并且降低了股骨远端骨骺端生长板的变薄和骨小梁的数量减少、厚度变薄, 改善了骨小梁的连接度, 同时还可降低破骨细胞数量以达到骨保护的作用。本方可以降低骨组织中 MMP-9, TRAP5b 和 CTSK 的水平, 提高 ALP 表达, 调节 RANKL/OPG。这表明桂枝芍药知母汤

表 4 桂枝芍药知母汤对各组大鼠骨匀浆中 RANKL, OPG, ALP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GSZT on RANKL, OPG and ALP protein expression in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | RANKL/β-actin | OPG/β-actin | ALP/β-actin |
|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | | 0.165±0.005 | 0.874±0.096 | 2.075±0.152 |
| 模型 | | 0.815±0.049 ²⁾ | 0.371±0.026 ²⁾ | 0.679±0.035 ²⁾ |
| 骨化三醇 | 1×10 ⁻⁴ | 0.246±0.007 ⁴⁾ | 0.624±0.053 ⁴⁾ | 1.691±0.110 ⁴⁾ |
| 桂枝芍药知母汤 | 0.8 | 0.812±0.125 | 0.341±0.016 | 0.664±0.035 |
| | 1.6 | 0.660±0.110 | 0.365±0.017 | 0.717±0.051 |
| | 3.2 | 0.390±0.067 ⁴⁾ | 0.580±0.034 ³⁾ | 1.104±0.119 ³⁾ |

治疗RA或OP的作用机制可能与OC的分化成熟及相关细胞因子的分泌有关。接下来本课题组将对GSZT骨保护作用的机制及物质基础进一步深入研究,为该复方进一步的临床应用推广和现代制剂开发奠定了一定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] JOHNSTON C B, DAGAR M. Osteoporosis in older adults [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104 (5) : 873-884.

[2] JIANG Y, ZHANG P, ZHANG X, et al. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(1) : e12956.

[3] 陈镜,冯正平. 骨质疏松症治疗药物研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(5) : 776-780.

[4] 谢雁鸣,刘垲,姜俊杰,等. 绝经后骨质疏松症中医临床实践指南(征求意见稿)[J]. 中国中药杂志, 2021, doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20210709.501.

[5] 曲道炜,朱辉,艾华. 桂枝芍药知母汤方证辨析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8) : 90-92.

[6] 谭川川,肖靛宜,张文兴. 张仲景运用桂枝组方治疗痹证探析[J]. 江苏中医药, 2017, 49(4) : 10-11.

[7] WEI S J, ZHANG Q, XIANG Y J, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates bone erosion in rats that have collagen-induced arthritis via modulating NF- κ B signalling to suppress osteoclastogenesis [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1) : 262-274.

[8] 虞佳乐,张杰. 桂枝芍药知母汤对II型胶原蛋白诱导关节炎大鼠RANKL/OPG水平的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15 : 24-25.

[9] 颜艳,林欣,代晓华,等. 破骨细胞形成和功能调节的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28 : 1435-1440.

[10] 张青,徐月,彭伟,等. 分子对接结合网络药理学研究桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的分子作用机制[J]. 中草药, 2020, 51(18) : 4673-4684.

[11] ZHANG Q, PENG W, WEI S, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction possesses anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats via suppression of inflammatory reactions, inhibition of invasion & migration and induction of apoptosis in synovial

fibroblasts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118 : 109367.

[12] WALSH M C, KIM N, KADONO Y, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24 : 33-63.

[13] SAGAR D R, ASHRAF S, XU L. Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(8) : 1558-1565.

[14] VANDERBORGHT A, LINSSEN L, THEWISSEN M. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls [J]. *J Rheumatol*, 2004, 31(8) : 1483-1490.

[15] ZIOLKAWSKA M, KUROWSKA M, RADZIKOWSKA A. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46 (7) : 1744-1753.

[16] BOYCE B F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions [J]. *J Dent Res*, 2013, 92(10) : 860-867.

[17] WALSH M C, CHOI Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond [J]. *Front Immunol*, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00511.

[18] ADAMI G, SAAG K G. Osteoporosis pathophysiology, epidemiology, and screening in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2019, 21(7) : 34.

[19] KUSANO K, MIYAURA C, INADA M, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption [J]. *Endocrinology*, 1998, 139 (3) : 1338-1345.

[20] RODAN G A, MARTIN T J. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. *Science*, 2000, 289(5484) : 1508-1514.

[责任编辑 孙丛丛]