

金刚丸对骨质疏松症模型大鼠 p38 MAPK、JNK、IL-1 表达的影响

沈琳玲¹, 戎宽², 叶子丰¹, 安娟¹, 匡浩铭¹, 匡建军^{3*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410000;

3. 湖南中医药高等专科学校 湖南省中医药研究院, 长沙 410000)

[摘要] 目的:探讨不同浓度金刚丸对骨质疏松症模型大鼠破骨细胞、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及白细胞介素-1(IL-1)表达的影响,根据实验结果分析金刚丸治疗骨质疏松症作用机制,同时筛选出金刚丸最佳用药浓度。方法:将56只SPF级大鼠随机分为空白组($n=8$)、假手术组($n=8$)、模型组($n=8$)、金刚丸低剂量组($n=8$)、金刚丸中剂量组($n=8$)、金刚丸高剂量组($n=8$)、戊酸雌二醇组($n=8$)。金刚丸高、中、低剂量组分别以 0.72 、 0.36 、 $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予金刚丸蒸馏水溶液灌服;戊酸雌二醇组以 $0.009 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌服。模型组大鼠、空白组、假手术组给予3 mL生理盐水。给药12周后取样。采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色法观察破骨细胞数量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清JNK、p38 MAPK及IL-1含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测p38 MAPK、JNK mRNA表达水平。结果:TRAP染色结果显示,与模型组比较,雌二醇组及不同浓度的金刚丸溶液均可不同程度抑制破骨细胞的形成。ELISA检测结果显示,与空白组及假手术组比较,模型组大鼠血清中的p38 MAPK、JNK及炎性因子IL-1水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,金刚丸低、中、高剂量组及戊酸雌二醇组p38 MAPK、JNK及IL-1水平显著降低($P<0.01$)。金刚丸高剂量组血清中JNK及IL-1含量低于雌二醇组($P<0.05$)。Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组股骨中p38 MAPK、JNK mRNA相对表达量显著增加($P<0.01$),与模型组比较,戊酸雌二醇组、金刚丸高、中、低剂量组股骨中p38 MAPK、JNK mRNA相对表达量均显著降低($P<0.01$)。结论:金刚丸可以抑制破骨细胞的形成,同时降低骨髓腔的直径,提高骨质量,降低炎性因子的产生,并影响MAPK信号通路代谢,降低p38 MAPK、JNK活性从而抑制破骨细胞的分化及增殖,调节骨代谢预防骨质疏松症。因此,金刚丸可能在维持骨骼健康,治疗骨质疏松方面具有应用的价值。

[关键词] 骨质疏松; 破骨细胞; 金刚丸; p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK); c-Jun氨基末端激酶(JNK); 白细胞介素-1(IL-1); 绝经后骨质疏松症

[中图分类号] R242;R285.5;R2-031;R681 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)09-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220793

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220110.1457.012.html>

[网络出版日期] 2022-01-10 16:22

Effect of Jingangwan on p38 MAPK, JNK, and IL-1 Content in Osteoporosis Model Rats

SHEN Lin-ling¹, RONG Kuan², YE Zi-feng¹, AN Juan¹, KUANG Hao-ming¹, KUANG Jian-jun^{3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410000, China;

3. Hunan Traditional Chinese Medical College, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jingangwan on the expression of osteoclast, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), and interleukin-1 (IL-1) in the

[收稿日期] 2021-06-07

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(18A221);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40173)

[第一作者] 沈琳玲, 硕士, 从事中医骨伤科学研究, E-mail: 1244786994@qq.com

[通信作者] * 匡建军, 博士, 研究员, 主任医师, 从事中医骨伤科学研究, E-mail: 13786165656@163.com

osteoporosis model rats, explore the mechanism of Jingangwan in the treatment of osteoporosis, and determine the optimal dosing concentration of Jingangwan. **Method:** Fifty-six rats of SPF grade were randomized into a blank group, a sham operation group, a model group, model group, high-, medium-, and low-dose Jingangwan groups ($0.72, 0.36, 0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, *ig*), and an estradiol valerate group ($0.009 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, *ig*), with eight rats in each group. The rats in the model group, the blank group, and the sham operation group received 3 mL of normal saline, respectively. Samples were collected 12 weeks after drug administration. The number of osteoclasts was observed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Serum levels of JNK, p38 MAPK, and IL-1 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression levels of p38 MAPK and JNK were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** The TRAP staining results showed that compared with the model group, the estradiol valerate group and the Jingangwan groups could inhibit the formation of osteoclasts to different degrees. As revealed by ELISA results, compared with the model group and the sham operation group, the model group showed increased serum levels of p38 MAPK, JNK, and IL-1 ($P < 0.01$), while compared with the model group, all the groups with drug intervention showed decreased levels of p38 MAPK, JNK, and IL-1 ($P < 0.01$). The serum levels of JNK and IL-1 in the high-dose Jingangwan group were lower than those in the estradiol valerate group ($P < 0.05$). Real-time PCR results showed that compared with the blank group, the model group showed increased relative mRNA expression of p38 MAPK and JNK in the thighbone ($P < 0.01$), while compared with the model group, all the groups with drug intervention showed decreased relative mRNA expression of p38 MAPK and JNK in the thighbone ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jingangwan can inhibit the formation of osteoblasts, reduce the diameter of the bone marrow cavity, improve bone quality, suppress the production of inflammatory factors, affect the metabolism of the MAPK signaling pathway, and blunt p38 MAPK and JNK activities to inhibit the differentiation and proliferation of osteoblasts and regulate bone metabolism, thereby preventing osteoporosis. Therefore, Jingangwan may be of application value in maintaining bone health and treating osteoporosis.

[Keywords] osteoporosis; osteoclast; Jingangwan; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK); c-Jun N-terminal kinase (JNK); interleukin-1 (IL-1); postmenopausal osteoporosis

绝经后骨质疏松症 (PMOP) 是一种全身性骨骼疾病, 主要由于女性在绝经后 5~10 年内卵巢功能衰退而引起的代谢失常——以雌激素分泌减少为主, 导致成骨-破骨偶联失衡形成的^[1]。现临床上主要通过 X 射线检查结果进行诊断, 主要影像学特征表现为骨密度减少, 骨微结构破坏^[2], 表现为骨的脆性增加引起的骨折发生率上升, 同时患者还可伴有疼痛等症状, 严重者可出现骨骼畸形, 对患者生活质量产生了极大的影响。

PMOP 主要由于骨形成与骨吸收失衡引起, 若骨吸收大于骨形成, 骨密度则逐渐降低, 骨质疏松症形成。因此治疗主要目的为降低骨吸收、提高骨形成。破骨细胞的分化增殖是骨吸收的主要分子机制, 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 主要包括 p38 MAPK、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 3 条通路, 是调节破骨细胞代谢的主要信号通路。JNK 和 p38 已被证实是破骨细胞分化和激活的关键因素^[3-6]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、

白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 (IL-1) 等炎性介质又可刺激 p38 MAPK 及 JNK 激活通路, 进而影响破骨细胞代谢^[7-8], 且局部累积可导致严重骨丢失和骨折延迟愈合。

PMOP 在中医划分为“骨痿”, 其临床表现表明肾虚是 PMOP 的核心病机^[9]。现代研究也显示, 肾虚可通过不同途径影响骨代谢^[10-11], 故临床治疗骨质疏松症应以补肾为主。“金刚丸”最早记载于金·刘完素《素问病机气宜保命集》, 是“温补肾阳”的经典名方, 课题组前期通过临床实践证明, 金刚丸治疗骨质疏松症疗效确切。但其具体治疗机制尚未阐明, 为研究金刚丸是否通过激活 p38 MAPK 及 JNK 磷酸化及炎症介质 IL-1 表达, 调节破骨细胞的分化从而达到治疗骨质疏松的目的, 本实验通过复制绝经后骨质疏松病变大鼠模型, 予金刚丸水溶液灌服 12 周后取材, 通过抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色法观察破骨细胞数量、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清磷酸化 (p)-JNK、p-p38

MAPK、IL-1 含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 p38 MAPK、JNK mRNA 表达水平,并与模型组进行对比,观察金刚丸对 PMOP 大鼠模型的治疗作用,分析其对破骨细胞的影响及 MAPK 通路作用机制,为临床治疗 PMOP 提供新思路及新靶点。

1 材料

1.1 动物 湖南省中医药研究院实验动物中心提供 56 只雌性未经产 3 月龄 SPF 级 SD 大鼠,体质量(230±20)g[合格证号 SCXK(湘)2019-0004]。饲养于湖南省中医药研究院动物房开放式动物饲养室,室温控制在 20~25 °C,湿度 50%~60%,明暗周期 12 h/12 h,标准营养颗粒饲料喂养,自由饮水。本动物实验已通过湖南省中医药研究院动物实验伦理委员会审批(伦理审查编号 2020-0065)。

1.2 药物 金刚丸(陕西天洋制药有限公司,国药准字 Z61020726,丸剂,成人剂量为每日 2 次,1 次 1 丸,3.5 g/丸)。戊酸雌二醇片(法国 DELPHARM Lille S.A.S. 公司,进口药品注册证号 H20080108,国药准字 J20080036,成人剂量为每日 1 次,1 次 1 粒,0.5 mg/粒)。

1.3 试剂 6×上样缓冲液、mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture、DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW0610、CW2569、CW2141、CW2601、CW0632);乙二胺四乙酸(EDTA,中国大连美伦生物技术有限公司,批号 MB2514);核酸染料(中国北京普利莱基因技术有限公司,批号 PB11141);p38 MAPK、JNK ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml437037、ml620318、ml037375);苏木素、伊红染液(上海威奥生物科技有限公司,批号分别为 C200501、C200702)。

1.4 仪器 H1650R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司);BA210T 型显微镜[麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司];DHP-500 型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司);TS-1 型摇床(中国江苏其林贝尔);PIKOREAL96 型 Real-time RCP 仪、SPL0960 型荧光 PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备^[12-15] 实验共分 7 组。将 56 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为去卵巢组

40 只,假手术组 8 只及空白组 8 只。将去卵巢组的 40 只大鼠手术摘除双侧卵巢,假手术组的 8 只也做同样切口,仅切除少量脂肪。术后连续 3 d 臀部肌注青霉素,5 万单位/只,1 次/d,预防伤口感染。第 2 周开始,每天给去卵巢组大鼠进行后肢肌注 20 mg·kg⁻¹ 氢化可的松注射液(5 g·L⁻¹),假手术组肌肉注射生理盐水(4 mL·kg⁻¹),持续 2 周。第 4 周开始至第 3 个月,每周给去卵巢组大鼠肌注氢化可的松注射液 2 次,以维持肾虚状态,假手术组则肌注生理盐水。术后 8 周结合骨密度及大鼠行为学观察验证模型成功。

2.2 给药方法 8 周模型验证成功后,采用随机数字表法将去卵巢组 40 只分为 5 组,即模型组(*n*=8)、金刚丸低剂量组(*n*=8)、金刚丸中剂量组(*n*=8)、金刚丸高剂量组(*n*=8)、戊酸雌二醇组(*n*=8)进行给药。计算动物灌胃给药量,大鼠等效剂量 3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ 作为中剂量组,等效剂量的 1/2 倍作为低剂量组,2 倍剂量作为高剂量组^[16]。戊酸雌二醇组戊酸雌二醇蒸馏水溶液剂量为 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹,空白组、假手术组、模型组每天灌服等体积蒸馏水溶液。

具体方案:戊酸雌二醇组,含戊酸雌二醇生药 0.009 g·kg⁻¹·d⁻¹,配制成 0.009 g·mL⁻¹ 水溶液;金刚丸低剂量组,含金刚丸生药 1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹,配制成 0.18 g·mL⁻¹ 水溶液;金刚丸中剂量组,含金刚丸生药 3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,配制成 0.36 g·mL⁻¹ 水溶液;金刚丸高剂量组,含金刚丸生药 7.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,配制成 0.72 g·mL⁻¹ 水溶液;其余空白组、假手术组、模型组分别予同体积蒸馏水(1.0 mL·kg⁻¹),由专业人员进行灌胃给药。每周称量体质量后调整给药剂量。

给药 12 周后进行取材。以水合氯醛麻醉大鼠后,进行腹主动脉取血,每只留取 5~6 mL,并取双侧胫骨、股骨,后对大鼠进行处死。所取全血室温静置后,经 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 8 cm)取血清。右侧股骨以中性多聚甲醛固定,其余所有标本以生理盐水纱布包裹,封口袋密封后保存于 -80 °C 备用。

2.3 酒石酸酸性磷酸酯(TRAP)染色法观察阳性破骨细胞数量及骨组织形态 取胫骨上段 1 cm 左右长度,以 4% 多聚甲醛固定,脱水石蜡包埋切片。60 °C 烤片 1~2 h;切片脱蜡至水:先将切片置于二甲苯中 10 min,2 次。梯度乙醇水化,每级放置 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min;配制 TRAP 试剂,包括 B 液、C 液及孵育液 37 °C 孵育 70 min、流水冲洗 3 min;苏

木素染 5~10 min, 蒸馏水冲洗, 氨水返蓝; 梯度乙醇 (95%~100%) 脱水, 每级 5 min (或者直接把片子烤干)。取出后置于二甲苯 10 min, 2 次, 中性树胶封片、显微镜观察。

2.4 ELISA 检测血清 JNK、p38 MAPK 和 IL-1 含量
术后 12 周取材, 由腹主动脉取血, 所取全血室温静置后, 经 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 8 cm) 取血清。设置标准品孔和样本孔, 标准孔各加不同溶度的对照品 $50\ \mu\text{L}$ 。分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先后加样品稀释液及待测样品。加样将样品加于酶标板孔底部, 空白孔除外。用封板膜封板后置 $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 60 min。将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。每孔先加入显色剂 A $50\ \mu\text{L}$, 再加入显色剂 B $50\ \mu\text{L}$, 轻轻震荡混匀, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光显色 15 min。每孔加终止液 $50\ \mu\text{L}$, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。使用专业制作曲线软件 "Curve Expert" 进行分析, 计算出样本浓度。

2.5 Real-time PCR 检测 p38 MAPK、JNK mRNA 表达水平
取冻存的大鼠股骨组织放入液氮充分研磨, 先后加入三氯甲烷 $200\ \mu\text{L}$, 等体积异丙醇, 75% 乙醇 (无菌 DEPC 处理水配制) $1\ \text{mL}$ 及无菌无酶水 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ 提取总 RNA。再加入相应试剂进行反转录, 在 PCR 反应条件下加入扩增反应系, 按照试剂盒说明书进行操作。反应条件为 $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s, 循环 40 次。用相对定量分析法分析, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 反映各样品相对于对照组样品目的基因表达水平的比值。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
JNK	上游 ACGAGTTTATGATGACGCCTT	103
	下游 CCACAGACCATAAATCCACGTT	
p38 MAPK	上游 AGCTTACCGATGACCACGTT	188
	下游 CACGTAGCCGGTCATTTTCGTC	
GAPDH	上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	

2.6 统计学分析 统计分析使用 SPSS 21.0 软件, 实验中所有项目检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 数据进行正

态性、方差齐性检测, 符合则用采用单因素方差分析, 不符合则用 Dunnett-*t* 检验, 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 金刚丸对大鼠阳性破骨细胞及骨组织形态的影响
TRAP 染色结果显示, 空白组、假手术组骨小梁形态完整、无明显断裂, 骨髓腔正常, 骨细胞排列均匀; 模型组骨小梁形态模糊、广泛断裂, 骨髓腔增宽, 骨细胞排列散乱; 与模型组比较, 戊酸雌二醇组及不同浓度的金刚丸溶液均可不同程度抑制阳性破骨细胞的形成, 戊酸雌二醇组、金刚丸低、中、高剂量组可见骨小梁形态较模型组改善、结构较为紧密, 骨髓腔减小, 骨外膜排列接近正常组。见图 1。

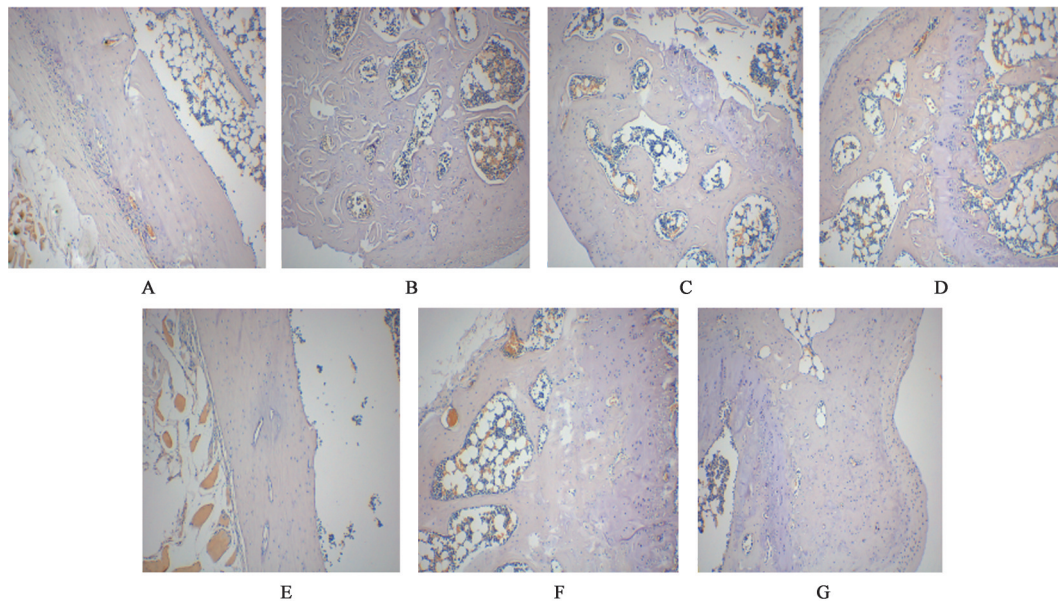
3.2 金刚丸对各组大鼠血清中 JNK、p38 MAPK、IL-1 含量的影响
与空白组、假手术组比较, 模型组血清中 p38 MAPK、JNK、IL-1 水平含量显著增加 ($P<0.01$), 与模型组比较, 戊酸雌二醇组、金刚丸高、中剂量组血清中 p38 MAPK、JNK 及 IL-1 水平含量均降低 ($P<0.01$)。各给药组之间比较, 金刚丸高剂量组血清中 JNK 及 IL-1 含量低于雌二醇组 ($P<0.05$), 金刚丸高剂量组对 JNK 及炎症介质 IL-1 的抑制作用明显优于金刚丸低剂量组, 对 p38 MAPK 的抑制作用明显优于金刚丸中剂量组 ($P<0.05$)。见表 2。

3.3 金刚丸对各组大鼠股骨组织中 JNK、p38 MAPK mRNA 表达水平的影响
与空白组比较, 模型组股骨中 p38 MAPK、JNK mRNA 相对表达量显著增加 ($P<0.01$), 与模型组比较, 雌二醇组、金刚丸高、中、低剂量组股骨中 p38 MAPK、JNK mRNA 相对表达量均显著降低 ($P<0.01$)。随着金刚丸药物浓度升高, 其 p38 MAPK、JNK mRNA 相对表达量也呈现相应程度的降低, 其中金刚丸高剂量组 p38 MAPK 相对表达量低于金刚丸中、低剂量组, JNK 相对表达量低于金刚丸低剂量组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

4 讨论

随着我国进入老年化社会, 骨质疏松发病率逐年上升, 且以绝经后妇女最为多见, 是我国老年女性最为常见的全身骨代谢性疾病。对我国中老年妇女的身体健康及生活质量产生了极大的威胁, 因此充分认识 PMOP 并了解其发病机制, 在此基础上进行对症治疗, 研究并发现抗骨质疏松症效验方具有重要的社会及科研价值。

对于骨质疏松症的发病机制, 中医还没有形成



注:A. 空白组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 戊酸雌二醇组;E~G. 金刚丸高、中、低剂量组

图1 金刚丸对大鼠阳性破骨细胞及骨组织病理形态的影响 (TRAP, ×100)

Fig. 1 Effect of Jingangwan on positive osteoclasts and bone histopathological morphology in rats (TRAP, ×100)

表2 金刚丸对大鼠血清中JNK、p38 MAPK及IL-1含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Jingangwan on JNK, p38 MAPK and IL-1 in rat serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p38 MAPK	JNK	IL-1
空白组		193.7±25.58	2.270±0.23	66.37±5.69
假手术组		197.2±4.61	2.443±0.22	65.19±3.91
模型组		297.5±13.80 ^{1,2)}	5.862±0.37 ^{1,2)}	112.1±4.15 ^{1,2)}
金刚丸低剂量组	1.8	262.7±10.15	4.939±0.38 ⁵⁾	96.31±3.83 ⁵⁾
金刚丸中剂量组	3.6	226.1±17.22 ^{3,5)}	4.024±0.35 ³⁾	85.74±3.20 ³⁾
金刚丸高剂量组	7.2	215.8±15.85 ³⁾	3.141±0.55 ³⁾	73.64±4.27 ³⁾
戊酸雌二醇组	0.009	237.4±11.31 ³⁾	4.216±0.39 ^{3,4)}	86.84±3.66 ^{3,4)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与假手术组比较²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.01;与金刚丸高剂量组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01

表3 金刚丸对大鼠股骨组织中JNK和p38 MAPK mRNA表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Jingangwan on JNK and p38 MAPK mRNA level in rat serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p38 MAPK	JNK
空白组		1.43±0.37	1.18±0.15
假手术组		1.42±0.40	1.382±0.27
模型组		10.33±0.86 ¹⁾	14.44±1.37 ¹⁾
金刚丸低剂量组	0.009	6.61±0.67 ^{2,3)}	7.00±1.65 ^{2,3)}
金刚丸中剂量组	7.2	4.89±0.59 ^{2,3)}	3.762±0.70 ²⁾
金刚丸高剂量组	3.6	3.00±0.77 ²⁾	2.887±0.65 ²⁾
戊酸雌二醇组	1.8	4.36±0.85 ²⁾	3.897±0.63 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;与金刚丸高剂量组比较³⁾P<0.05

统一的观点,但普遍认为其发病以肾虚为本,肝虚为促使发病关键因素,脾虚为重要因素,其中血瘀

起到促进作用^[17-18]。西医学表明雌激素的缺乏是导致PMOP的主要原因,当妇女绝经后,雌激素的流失导致成骨-破骨偶联失衡,从而产生骨质疏松的一系列症状^[19-20]。现有的研究发现,通过阻断RANKL诱导的p38 MAPK及JNK的磷酸化可阻止破骨细胞的分化及去势骨的丢失^[21-22]、IL-1通过ERK1/2、p38 MAPK通路抑制成骨细胞增殖,最终影响骨重建,参与炎性骨疾病和骨质疏松的发展^[23]。

金刚丸为古代抗骨痿名方,出自刘素问《素问病机气宜保命集》,书中记载金刚丸制作方法为萆薢、杜仲、肉苁蓉及菟丝子等分为末,后加入酒煮猪腰捣而成丸^[24]。萆薢归肾、胃经,可用于利湿去浊、祛风除痹^[25]。有课题组研究发现萆薢可有效抑制破骨样多核细胞的形成、促进成骨株UMR106增殖活性、提高去势大鼠血清中雌二醇(E₂)水平达到调

节骨代谢并改善骨生物力学的作用从而治疗骨质疏松^[26]。杜仲归肝肾两经,具有强筋壮骨、补益肝肾等功效。网络药理学研究发现,杜仲可通过细胞凋亡信号通路、MAPK 信号通路、核转录因子- κ B (NF- κ B)信号通路等多个信号通路调节骨细胞代谢平衡治疗骨质疏松^[27]。肉苁蓉归肾、大肠经,具有益肾填精、润肠通便等作用,临床多用于肾虚精亏等病症。肉苁蓉可提高骨质疏松模型大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,其治疗相关靶标主要包含于MAPK、内皮生长因子(VEGF)、Wnt、肿瘤坏死因子(TNF)等7条信号通路中^[28]。菟丝子性平擅补肝肾,现代药理学研究证明菟丝子提取物再促成骨细胞分化的过程中发挥着巨大的作用^[29]。而猪腰以肾形充肾气,佐以酒浸煮以助金刚丸之温热之性。课题组前期临床观察发现采用金刚丸原方剂量治疗骨质疏松症患者,总有效率达到93.3%,症状疼痛积分、中医症状积分都有显著的降低^[30]。动物实验发现金刚丸能够显著升高骨质疏松模型大鼠血清中骨保护素(OPG)mRNA 表达量,降低大鼠股骨中转化生长因子 β 激活激酶1(TAK1)、NF- κ B受体活化因子配体(RANKL)mRNA 的表达,抑制破骨细胞的增殖、分化、成熟。戊酸雌二醇能有效地抑制去卵巢大鼠过高的骨转换,使小梁骨骨量增加,结构改善,松质骨的力学特征得到改善,是合适的阳性药物。

破骨细胞是一种特殊的终末分化细胞主要负责骨吸收,RANK 与 RANKL 结合后诱导破骨细胞分化,同时激活 MAPKs 信号通路实现骨吸收的功能,一旦骨吸收能力大于骨形成,则会发生骨代谢失衡。骨代谢失衡是骨质疏松发病的重要机制,PMOP 的雌激素降低,不能抑制 RANKL 基因与破骨细胞表面的 RANK 结合,TNF- α 、IL-6 或 IL-1 等炎性介质又可激活 MAPK 信号通路,从而活化破骨细胞转录因子,导致破骨细胞大量分化、增殖、成熟。本实验研究结果表明,与空白组、手术组比较,模型组血清中 p38 MAPK、JNK 及 IL-1 含量显著升高,表明 p38 MAPK 信号通路及 JNK 信号通路被炎性介质 IL-1 等激活,促进破骨细胞的分化及增殖,参与了 PMOP 的发生、发展。金刚丸及戊酸雌二醇组进行干预后,p38 MAPK、JNK 及炎性介质 IL-1 含量较模型组降低,其中金刚丸高剂量组及戊酸雌二醇组较模型组含量明显降低。这意味着金刚丸及戊酸雌二醇可能通过抑制炎性因子的产生从而降低 JNK 及 p38 通路的活性,减少破骨细胞的分化增殖,

改善骨质疏松症。

骨髓腔直径大小及骨小梁数量、质量、形态是骨质量的重要标志之一,通过观察骨小梁可反映骨质疏松严重程度。本实验证实骨质疏松状态下大鼠骨小梁形态模糊、广泛断裂,骨髓腔增宽,骨细胞排列散乱。经药物干预后的戊酸雌二醇组、金刚丸低、中、高剂量组可见骨小梁形态较模型组改善、结构较为紧密,骨髓腔减小,其中金刚丸高剂量组治疗后骨小梁结构及形态明显改善,骨外膜排列接近正常组。其治疗效果优于阳性药组。这意味着金刚丸可以通过改善骨小梁的形态及结构,较小骨髓腔直径,提高骨质量,治疗及预防骨质疏松症。

综上所述,金刚丸可以改善骨小梁的形态及结构,同时降低骨髓腔的直径,提高骨质量,降低炎症因子水平,影响 MAPK 信号通路代谢,降低 p38 MAPK 及 JNK 活性从而抑制破骨细胞的分化及增殖,调节骨代谢预防骨质疏松症。但具体的分子机制还未完全探索清楚,特别是否通过其它代谢组起到作用,需要进一步的深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(5):413-443.
- [2] 程晓光,李娜. 绝经后骨质疏松的影像学表现及诊断标准[J]. 实用妇产科杂志,2020,36(7):484-487.
- [3] RAMAN M, CHEN W, COBB M H. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. *Oncogene*, 2007,26(22):3100-3112.
- [4] MOLINA J R, ADJEI A A. The Ras/Raf/MAPK pathway[J]. *J Thorac Oncol*,2006,1(1):7-9.
- [5] 杨羽晨,杨佩佩,黄碧莹,等. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路介导的自噬可调节破骨细胞的增殖分化和功能[J]. *中国组织工程研究*,2021,25(26):4192-4197.
- [6] 张波,耿彬,谭小义,等. MAPK 信号通路与骨质疏松关系的研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*,2014,22(23):2161-2164.
- [7] ZHANG LH, XIAO B, ZHONG M, et al. LncRNA NEAT1 accelerates renal mesangial cell injury via modulating the miR-146b/TRAF6/NF- κ B axis in lupus nephritis[J]. *Cell Tissue Res*,2020, 82(3): 627-638.
- [8] 刘晨,李兴勇,姚兴璋,等. 绝经后骨质疏松症的流行病学概况及发病机制研究进展[J]. *中医正骨*,2018,30(03):52-55,58.
- [9] SŁOPIEŃ R, RYNIO P, KUBALA E, et al.

- Denosumab- a new medication in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Prz Menopauzalny*, 2017, 16(3):75-78.
- [10] JIA J, ZHOU H, ZENG X, et al. Estrogen stimulates osteoprotegerin expression via the suppression of miR-145 expression in MG-63 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):1539-1546.
- [11] TU K N, LIE J D, WAN C, et al. Osteoporosis: A review of treatment options [J]. *P T*, 2018, 43 (2): 92-104.
- [12] 刘飞祥,林子璇,徐道明,等. 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18):16-23.
- [13] 李延红,党晓谦,龚福太,等. 骨质疏松动物模型的研究进展及文献回顾[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(12):1956-1961.
- [14] OMAR N I., BAHARIN B, LAU S F, et al. The influence of in preserving alveolar bone in ovariectomized rats [J]. *Vete Medi Int*, 2020, doi: 10.1155/2020/8862489.
- [15] 黄云梅. 基于RANKL/RANK/OPG轴的绝经后骨质疏松症发病机制及健骨颗粒干预研究[D]. 福州:福建中医药大学, 2014.
- [16] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.
- [17] 王维,赵学千,贾育松,等. 绝经后骨质疏松症发病机制的表观遗传学研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(8):1235-1240.
- [18] 张文达,任艳玲. 绝经后骨质疏松症病因病机研究概况[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(7):101-104.
- [19] 申浩,魏戌,谢雁鸣等. 绝经后骨质疏松症骨折危险因素及中医症状相关性研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(1):50-56.
- [20] CHOI S W, PARK K I, YEON J T, et al. Anti-osteoclastogenic activity of matairesinol via suppression of p38/ERK-NFATc1 signaling axis [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:35.
- [21] WU X, LI Z, YANG Z, et al. Caffeic acid 3, 4-dihydroxy-phenethyl ester suppresses receptor activator of NF- κ B ligand - induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss through inhibition of mitogen-activated protein kinase/activator protein 1 and Ca^{2+} - nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 signaling pathwa [J]. *J Bone Mine Res*, 2012, 27(6):1298-1308.
- [22] 张雨晴,王蕾. 骨痿历史沿革探析[J]. *环球中医药*, 2019, 12(10):1610-1614.
- [23] 陈冲,曾臣红,张斯琪,等. 草薢的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(18):3488-3496.
- [24] 肖扬,李国政. 草薢药理作用研究进展[J]. *山西中医*, 2018, 34(7):54-56.
- [25] HENGARTNER N E, FIEDLER J, IGNATIUS A, et al. IL-1 β inhibits human osteoblast migration [J]. *Mol Med*, 2013, 19(1):36-42.
- [26] 门志涛,徐敏,黄承军,等. 基于网络药理学研究杜仲治疗骨质疏松性骨折的作用机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(5):721-726.
- [27] 王延涛,杨智华,陈怡,等. 肉苁蓉治疗骨质疏松作用机制的网络药理学研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(5):645-651.
- [28] 李慧敏,方康权. 骨质疏松症的药物治疗研究进展 [J]. *黑龙江医学*, 2019, 43(5):554-556.
- [29] 黄红,林燕平,黄佳纯,等. 菟丝子-黄芪治疗骨质疏松症的网络药理学机制研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(1):121-127.
- [30] 匡建军,张信诚,武昌,等. 超微金刚治疗绝经后骨质疏松症 60 例[J]. *湖南中医杂志*, 2011, 27(4):40-42.

[责任编辑 王鑫]