

补肾化痰方调控去势骨质疏松大鼠骨脂分化改善 绝经后骨丢失的机制

张妍¹, 向楠^{2*}, 周广文², 李章青², 谭张奎², 黄诗怡², 熊梦欣², 张麟³

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院(武汉市妇幼保健院), 武汉 430032;

2. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 3. 武汉市中西医结合医院, 武汉市第一医院, 武汉 430022)

[摘要] 目的:探讨补肾化痰方维持去势骨质疏松模型大鼠成骨/成脂分化平衡防治绝经后骨质疏松症(PMOP)的作用机制。方法:6月龄雌性未孕SD大鼠75只,随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀组、利维爱组、补肾化痰组,除假手术组外,其余4组大鼠均切除双侧卵巢,假手术组切除卵巢周围相应体积的脂肪组织。术后第5周起给予对应药物灌胃,剂量分别为补肾化痰组 $9.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、阿托伐他汀组 $0.92\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、利维爱组 $0.23\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组和假手术组给予等容生理盐水,1次/d,持续8周。采用微计算机断层扫描技术(Micro CT)检测各组大鼠胫骨骨密度(BMD),苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠骨髓脂肪组织(BMAT)相对面积,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织Runt相关转录因子2(Runx2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、瘦素(LPN)、瘦素受体(OBR)表达量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠BMD明显下降($P<0.05$),BMAT相对面积明显升高($P<0.05$),LPN、OBR、Runx2表达明显下降($P<0.05$),PPAR γ 明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,阿托伐他汀组、利维爱组、补肾化痰组BMD明显升高($P<0.05$),BMAT相对面积明显下降($P<0.05$),LPN、OBR、Runx2表达明显上升($P<0.05$),PPAR γ 明显下降($P<0.05$)。结论:补肾化痰方可能通过上调骨组织中LPN及OBR的表达,维持去势骨质疏松大鼠的骨脂分化平衡,从而减少绝经后骨丢失,发挥防治PMOP的作用。

[关键词] 补肾化痰方; 瘦素; 成骨分化; 成脂分化; 绝经后骨质疏松症

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R274 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0053-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221838

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220714.1808.002.html>

[网络出版日期] 2022-07-15 12:25

Mechanism of Bushen Huatan Prescription in Regulation of Osteogenesis and Adipogenic Differentiation and Improvement of Postmenopausal Bone Loss in Ovariectomized Rats with Osteoporosis

ZHANG Yan¹, XIANG Nan^{2*}, ZHOU Guangwen², LI Zhangqing², TAN Zhangkui², HUANG Shiyi², XIONG Mengxin², ZHANG Lin³

(1. Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430032, China; 2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Wuhan Hospital of Traditional Chinese & Western Medicine, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying mechanism of Bushen Huatan prescription in alleviating postmenopausal osteoporosis (PMOP) by maintaining the balance of osteogenesis and adipogenic differentiation in ovariectomized rats with osteoporosis. **Method:** Seventy-five 6-month-old non-pregnant

[收稿日期] 2022-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074416,81904267);湖北省自然科学基金项目(2019CFB232);湖北省卫生健康委员会中医药科研青年人才项目(ZY2019Q006);研究湖北中医名师向楠工作室建设项目(鄂卫生计生通报(2018)15号);武汉市卫生健康委员会武汉市医学科研项目(WZ20C28);武汉市卫生健康委员会武汉市医学科研项目(WZ19Q03)

[第一作者] 张妍,博士,副主任医师,从事中西医结合防治内分泌疾病研究,E-mail:zhyaang@163.com

[通信作者] *向楠,博士,二级教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治内分泌疾病研究,E-mail:xiangnan61@sina.com

female SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, atorvastatin group, liviol group, and Bushen Huatan prescription group. Bilateral ovaries were removed in the four groups except the sham-operation group, while only the same mass of adipose tissue around the ovaries was removed in the sham-operation group. On the 5th week after surgery, drugs were consecutively administrated for 8 weeks. Rats in the Bushen Huatan prescription group received 9.4 mg·kg⁻¹ of the prescription, rats in the atorvastatin group received 0.92 mg·kg⁻¹ of atorvastatin, rats in the Liviol group received 0.23 mg·kg⁻¹ of liviol, and rats in the model group and the sham-operation group received saline once a day. Micro-computed tomography (Micro CT) was used to detect bone mineral density (BMD) of rat tibia in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the relative area of rat bone marrow adipose tissue (BMAT) in each group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the relative expression levels of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ), leptin (LPN), and leptin receptor (OBR) in bone tissues. **Result:** As compared with the sham operation group, the BMD of rats in the model group decreased ($P<0.05$), while the relative area of BMAT increased ($P<0.05$). In addition, the expression levels of LPN, OBR, and Runx2 decreased in the model group ($P<0.05$), while the level of PPAR γ increased ($P<0.05$). As compared with the model group, the BMD of rats in the atorvastatin group, the Livial group, and the Bushen Huatan prescription group increased ($P<0.05$), and the relative area of BMAT decreased ($P<0.05$). The expression levels of LPN, OBR, and Runx2 in these groups increased ($P<0.05$), while the expression level of PPAR γ decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Bushen Huatan prescription plays the anti-osteoporosis role in the rat model of PMOP through up-regulating LPN and OBR in bone tissues and maintaining the balance of osteogenesis and adipogenic differentiation, thereby reducing postmenopausal bone loss and playing a role in the prevention and treatment of PMOP.

[Keywords] Bushen Huatan prescription; leptin; osteogenic differentiation; adipogenic differentiation; postmenopausal osteoporosis

绝经后骨质疏松症(PMOP)是一种最常见的骨质疏松类型,是由绝经后雌激素缺乏导致骨吸收与骨形成代谢失衡、骨量减少及骨微结构变化,进而引起骨脆性增加而易于骨折,从而导致疼痛、骨骼变形、出现多脏器损伤等合并症,多发生在女性绝经后5~10年^[1-2]。2018年10月我国首个骨质疏松症流行病学调查结果显示,我国50岁以上女性PMOP患病率高达32.1%,而同龄男性仅为6.0%,PMOP已成为我国中老年女性人群的重要健康问题^[3]。世界范围内,骨质疏松症的发病形势也非常严峻,已跃居慢性疾病的第三位^[4]。因而,有效防治PMOP显得尤为重要和棘手。PMOP的治疗药物主要包括骨形成促进剂和骨吸收抑制剂,但均有一定的不良反应和/或药物假期等问题^[5]。中医药在防治PMOP,尤其是改善临床症状方面疗效显著^[6],具有很好的应用前景,但其防治PMOP的基础研究证据尚欠深入,在一定程度上限制了其进一步临床推广。

研究表明,骨髓脂肪组织(BMAT)含量与骨密度(BMD)呈负相关,骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成脂/成骨分化的动态平衡稳态对骨微环境和骨量

的维持至关重要,且此过程也受到了雌激素的强烈影响。女性绝经后雌激素缺乏,BMSCs成脂分化增强致BMAT异常增多、骨脂平衡紊乱是PMOP的重要发病因素之一^[7-8]。所以,恢复骨脂平衡稳态,可能成为防治骨质疏松症的有效途径之一。PMOP属祖国医学“骨痿”范畴,肾精亏虚是本病的根本病机,“补肾益精、健脾益气、活血祛瘀”为基本治法^[6]。湖北中医名师向楠教授根据PMOP的中西医病理特征和痰浊致病特点,提出“补肾化痰”的新治法。本课题组前期研究发现补肾化痰方可以提高去势大鼠的BMD,促进BMSCs成骨分化、抑制其成脂分化而促进骨形成并改善脂代谢,从而有效的防治PMOP^[9-14]。近年来,瘦素(LPIN)对骨脂平衡的影响逐渐引起了业界广泛的关注,有望成为防治骨质疏松症的潜在靶点。因此,本实验进一步以去除大鼠双侧卵巢建立PMOP模型,观察补肾化痰方对模型大鼠BMAT含量和BMD的影响及对骨组织LPIN及瘦素受体(OBR)的调节作用,探讨补肾化痰方对去势大鼠骨脂分化平衡的调控作用,为补肾化痰方防治PMOP提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 6月龄SPF级未孕雌性SD大鼠75只, 体重270~300 g, 购于湖北省赤壁市实验中心, 动物合格证号SCXK(鄂)2017-0067。于湖北中医药大学动物实验中心屏障环境饲养, 饲养环境为恒温(22~24 °C)、恒湿(50%~60%)、12 h循环昼夜光照(8:00~20:00), 大鼠自由饮水、进食。本实验对动物的处置遵循《关于动物伦理与福利的作者指南共识》, 并由湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准, 伦理批号HUCMS00267449。

1.2 药物 补肾化痰方(淫羊藿10 g、补骨脂15 g、菟丝子30 g、全瓜蒌15 g、红曲12 g、山楂20 g)于湖北省中医院购入, 执行标准依照2015年版《中华人民共和国药典》, 由湖北省中医院制剂室煎煮浓缩至生药含量 $0.94 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[15], 封存于4 °C冰箱内备用; 利维爱片(南京欧加农制药有限公司, 批号H20051085); 阿托伐他汀片(北京嘉林药业股份有限公司, 批号H19990258)。

1.3 试剂 TRIzol(北京艾德莱生物科技有限公司, 批号252250AX); Taq Plus DNA Polymerase(北京天根生化科技有限公司, 批号ET105-01); 大鼠单抗 β -肌动蛋白(β -actin)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为BM0627、BA1051); 兔多克隆LPN抗体、兔多克隆OBR抗体、兔多克隆Runx2相关转录因子2(Runx2)抗体、兔多克隆过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)抗体(美国Affinity公司, 批号分别为Df8583、Df7139、Af5186、Af6284); 苏木素(美国Sigma公司, 批号H9627); 伊红Y(水溶性, 国药集团, 批号71014544)。

1.4 仪器 RM2016型病理切片机(德国Leica公司); BX53型显微镜(日本Olympus公司); Skyscan 1176型微计算机断层扫描(Micro CT)仪(比利时Bruker公司); DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一仪器厂); m μ lISKANMK3型酶标仪(美国Thermo公司); 7900型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司); JY02S型紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

2 方法

2.1 去势骨质疏松大鼠模型的制备 大鼠麻醉成功后, 大鼠取俯卧位, 备皮并术区消毒, 取背侧正中切口进入腹腔, 定位卵巢后, 结扎并切除; 假手术组大鼠保留卵巢, 切除卵巢周围同等质量的脂肪组织, 后缝合腹壁各层切口。术后12周根据BMD及

大鼠骨组织病理形态和影像学改变验证模型是否成功。

2.2 动物分组与给药 经适应性喂养1周后采用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组、模型组、补肾化痰组、阿托伐他汀组、利维爱组, 每组15只, 造模术后予青霉素4万U/只/d连续肌注3 d以预防感染, 术后第5周开始给药。模型组和假手术组均给予生理盐水灌胃, 其他干预组根据人与动物等效换算剂量^[16]分别给予补肾化痰方 $9.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、阿托伐他汀悬液 $0.92 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、利维爱悬液 $0.23 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 每天1次, 连续给药8周。

2.3 标本制备 最后一次灌胃后禁食24 h, 10%水合氯醛麻醉大鼠后处死, 于冰上快速分离大鼠股骨、胫骨和周围软组织, 取部分骨组织于-80 °C冻存, 部分骨组织置4%多聚甲醛固定液固定。

2.4 指标检测

2.4.1 Micro CT检测大鼠BMD 取出冻存的胫骨新鲜标本, 置于室温下使其解冻, 先用PBS冲洗, 然后使用Micro CT进行检测。

2.4.2 苏木素-伊红(HE)染色观察BMAT含量 骨组织经4%多聚甲醛固定24 h后置于10% EDTA脱钙液中进行脱钙处理, 再顺序依照脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片等程序制作石蜡切片, 然后脱蜡、行HE染色, 最后脱水、封片, 于显微镜下观察, 取大鼠股骨下段干骺端同一水平面组织切片, 分为5个区域进行拍照。使用IPP软件分析光密度, 分析时圈出脂滴的空泡, 综合计算选区的光密度与整个视野中组织面积比值作为BMAT的相对含量。

2.4.3 Real-time PCR检测大鼠骨组织LPN、OBR、Runx2、PPAR γ mRNA的表达 TRIzol法提取组织RNA, 计算RNA纯度及浓度后逆转录成cDNA, 再对cDNA模板进行扩增, 行Real-time PCR检测, 反应体系由4倍稀释的cDNA 4 μ L、浓度100 μ mol \cdot L⁻¹的上下游引物各0.4 μ L及SYBR Green/Master Mix 10 μ L和H₂O 5.2 μ L组成, 扩增条件为50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。 β -actin为参照, 以2^{- $\Delta\Delta$ C_t}进行分析。扩增引物由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司提供, 引物序列见表1。

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织LPN、OBR、Runx2、PPAR γ 蛋白表达 从-80 °C冰箱中取出各组大鼠股骨组织于冰上快速剪碎并加入蛋白裂解液, 12 000 r \cdot min⁻¹离心5 min(离心半径10 cm)后收集上清液。测定蛋白浓度, 依次行制胶、上样、电泳、转膜、封闭等步骤后滴加一抗(LP

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|----------------|-----------------------------|-------|
| β -actin | 上游 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC | 240 |
| | 下游 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT | |
| LPN | 上游 CCAGGATGACACAAAACCC | 211 |
| | 下游 TATCTGCAGCACGTTTGGG | |
| OBR | 上游 AATCAAAATCGGCCAGCCTG | 164 |
| | 下游 CCAGAATTCAGGCCCTCTCA | |
| Runx2 | 上游 TCAGCGTCCTATCAGTCCC | 174 |
| | 下游 ATTCAAAACGGTTGGGGAGC | |
| PPAR γ | 上游 AGGGCGATCTTGACAGGAAA | 164 |
| | 下游 CGAAACTGGCACCTTGAAA | |

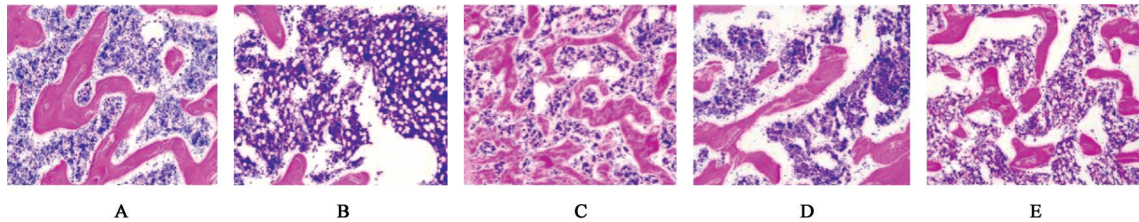
1: 1 000、OBR 1: 1 000、Runx2 1: 1 000、PPAR γ 1: 1 000、 β -actin 1: 500), 于4 °C冰箱摇床孵育过夜, 第2天PBS洗膜, 滴加二抗(1: 1 000), 室温孵育2 h, PBS洗膜后显影, 晾干、扫描胶片, 采用Image J软件分析灰度值。

2.5 统计学分析 采用GraphPad 6软件进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 如数据符合正态分布, 则采用单因素方差分析进行组间比较, 采用最小显著性差异法(LSD)检验(方差齐时)或Dunnett's T3检验(方差不齐时)进行组间多重比较; 如不符合正态分布, 采用秩和检验(Kruskal-Wallis)进行组间比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况 大鼠于术后1周左右伤口愈合, 活动、进食、排便正常。实验过程中, 共有3只大鼠死亡, 均由药液误灌入气管导致窒息而亡。

3.2 对各组大鼠骨组织形态的影响 从各组大鼠股骨组织HE染色图片可见, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨小梁明显稀疏, 骨髓腔显著扩大, 内有大量脂肪细胞堆积; 与模型组比较, 补肾化痰组、阿托伐他汀组、利维爱组大鼠骨小梁数目明显增多, 排列尚整齐, 连接较紧密, 脂肪细胞显著减少。通过Micro CT重建图对各组大鼠胫骨近端骨小梁变化的观察结果与HE染色相似。见图1和图2。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 阿托伐他汀组; D. 利维爱组; E. 补肾化痰组(图2和图3同)

图1 补肾化痰方对各组大鼠股骨组织学病理变化的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Bushen Huatan prescription on femur histopathology of rats in each group (HE, $\times 100$)

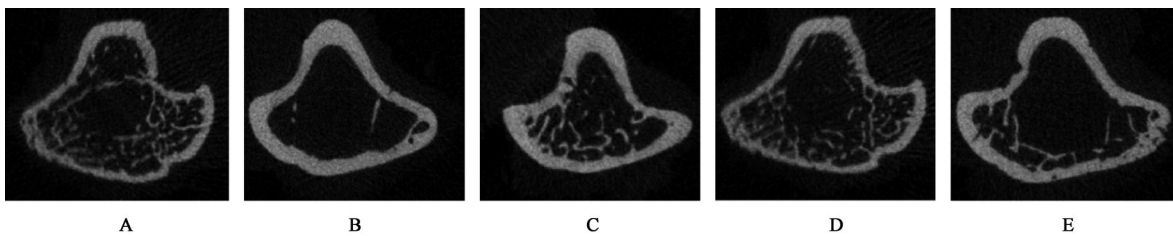


图2 补肾化痰方对各组大鼠胫骨Micro CT影像变化的影响

Fig. 2 Effect of Bushen Huatan prescription on Micro CT imaging of proximal tibia of rats in each group

3.3 对各组大鼠BMD、BMAT的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠BMD明显降低, BMAT相对面积明显增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 补肾化痰组、阿托伐他汀组、利维爱组大鼠的BMD均明显升高, BMAT相对面积明显减少($P < 0.05$), 其余各组间比较差异无统计学意义。见表2。

3.4 对各组大鼠骨组织Runx2、PPAR γ 、LPN、OBR mRNA表达水平的影响 与假手术组比较, 模型组

大鼠骨组织中LPN、OBR、Runx2 mRNA表达水平均明显下调($P < 0.05$), PPAR γ mRNA表达水平明显上调($P < 0.05$); 与模型组比较, 补肾化痰组、阿托伐他汀组、利维爱组大鼠骨组织中LPN、OBR、Runx2 mRNA表达水平均明显上调($P < 0.05$), PPAR γ mRNA表达水平均明显下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其余各组间比较差异无统计学意义。见表3。

表2 补肾化痰方对各组大鼠BMD、BMAT的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Bushen Huatan prescription on BMD and BMAT of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | BMD/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | BMAT |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 0.53±0.08 | 0.09±0.02 |
| 模型组 | | 0.43±0.04 ¹⁾ | 0.22±0.02 ¹⁾ |
| 阿托伐他汀组 | 9.2×10 ⁻⁴ | 0.47±0.06 ²⁾ | 0.16±0.04 ²⁾ |
| 利维爱组 | 2.3×10 ⁻⁴ | 0.49±0.04 ²⁾ | 0.15±0.04 ²⁾ |
| 补肾化痰组 | 9.4 | 0.48±0.04 ²⁾ | 0.16±0.06 ²⁾ |

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表3和表4同)

表3 补肾化痰方对各组大鼠骨组织Runx2、PPAR γ 、LPN、OBR mRNA表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Bushen Huatan prescription on expression of Runx2, PPAR γ , LPN, OBR mRNA in bone tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | Runx2 | PPAR γ | LPN | OBR |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 1.10±0.12 | 1.04±0.15 | 1.01±0.09 | 1.13±0.11 |
| 模型组 | | 0.46±0.08 ¹⁾ | 3.12±0.25 ¹⁾ | 0.43±0.06 ¹⁾ | 0.53±0.12 ¹⁾ |
| 阿托伐他汀组 | 9.2×10 ⁻⁴ | 0.68±0.06 ²⁾ | 2.41±0.23 ²⁾ | 0.62±0.12 ²⁾ | 0.73±0.10 ²⁾ |
| 利维爱组 | 2.3×10 ⁻⁴ | 0.82±0.08 ²⁾ | 2.06±0.20 ²⁾ | 0.71±0.11 ²⁾ | 0.85±0.11 ²⁾ |
| 补肾化痰组 | 9.4 | 0.80±0.06 ²⁾ | 2.09±0.13 ²⁾ | 0.64±0.08 ²⁾ | 0.77±0.09 ²⁾ |

3.5 对各组大鼠骨组织Runx2、PPAR γ 、LPN、OBR蛋白表达水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠骨组织中LPN、OBR、Runx2蛋白表达水平均明显下调($P<0.05$),PPAR γ 蛋白表达水平明显上调($P<0.05$);与模型组比较,补肾化痰组、阿托伐他汀组、利维爱组大鼠骨组织中LPN、OBR、Runx2蛋白表达水平均明显上调($P<0.05$),PPAR γ 蛋白表达水平均明显下调($P<0.05$),其余各组间比较差异无统计学意义。见表4、图3和图4。

4 讨论

本研究基于LPN对骨代谢的外周调控作用,研究补肾化痰方对去势骨质疏松模型大鼠骨脂平衡的影响。本研究发现去除双侧卵巢后,大鼠表现为成骨分化降低和骨量下降,同时其成脂分化上升和BMAT含量增高,与前人的研究结果一致^[17-18]。笔者发现,补肾化痰方可以提高去势骨质疏松大鼠的BMD含量、降低BMAT含量,同时可以促进成骨分化及骨形成、降低成脂分化,其作用机制与上调骨组织LPN、OBR的表达有关。

PMOP归属为中医学“骨痿”范畴,主要是由于肾精不足、骨枯而髓减、骨失滋养导致的全身骨骼

表4 补肾化痰方对各组大鼠骨组织Runx2、PPAR γ 、LPN、OBR蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Bushen Huatan prescription on expression of Runx2, PPAR γ , LPN, OBR protein in bone tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | Runx2/ β -actin | PPAR γ / β -actin | LPN/ β -actin | OBR/ β -actin |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 0.94±0.13 | 0.18±0.04 | 1.20±0.14 | 0.41±0.05 |
| 模型组 | | 0.34±0.03 ¹⁾ | 0.60±0.05 ¹⁾ | 0.60±0.04 ¹⁾ | 0.14±0.01 ¹⁾ |
| 阿托伐他汀组 | 9.2×10 ⁻⁴ | 0.56±0.05 ²⁾ | 0.38±0.06 ²⁾ | 0.70±0.08 ²⁾ | 0.30±0.05 ²⁾ |
| 利维爱组 | 2.3×10 ⁻⁴ | 0.70±0.12 ²⁾ | 0.32±0.03 ²⁾ | 0.91±0.10 ²⁾ | 0.33±0.02 ²⁾ |
| 补肾化痰组 | 9.4 | 0.62±0.07 ²⁾ | 0.33±0.02 ²⁾ | 0.83±0.02 ²⁾ | 0.31±0.03 ²⁾ |

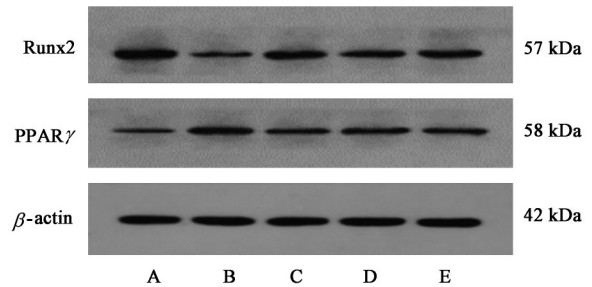


图3 各组大鼠骨组织Runx2、PPAR γ 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Runx2 and PPAR γ protein expression in bone tissue of rats in each group

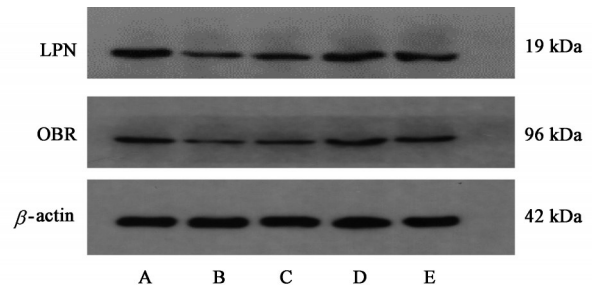


图4 各组大鼠骨组织LPN、OBR蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of LPN and OBR protein expression in bone tissue of rats in each group

的慢性退行性疾病^[6]。天癸衰竭、肾精亏虚是女子绝经期的根本病理改变,也是本病发生的基本病机。而肾主水,肾虚可生痰,痰浊流注于骨中,则致骨失所养、髓枯骨痿,而发为PMOP。大量研究发现,绝经后女性,因雌激素缺乏出现PMOP的同时常常也并发脂代谢紊乱^[19]。他汀类降脂药物具有改善骨代谢的作用^[20],PMOP患者在治疗后,脂代谢紊乱也随之得到一定程度的改善^[21],而脂代谢紊乱已被证实是“痰浊”的微观物质基础之一^[22]。因此,基于痰浊与脂代谢紊乱和PMOP的密切联系,湖北中医名师向楠教授认为“痰浊”也是PMOP的致病因素之一,所以提出在补肾的基础上“从痰论治

PMOP”,继而制订了补肾化痰的新治法,并融合《本草纲目》补肾脂丸与《丹溪心法》黄瓜萎丸加减拟成补肾化痰方运用于临床防治PMOP,取得了很好的疗效。方中淫羊藿、补肾脂共同发挥补肾益精、强筋健骨的作用而为君药。菟丝子益气强阴、补髓添精与功可清热化痰,宽胸散结的全瓜萎同为臣药。善于消食化积痰的山楂和长于健脾消食、化痰之红曲同为佐药,二药健脾可助全瓜萎化痰,同时兼具活血通络之功。现代药理学已证实,三味补肾中药均可改善骨质疏松^[23-25],且三味化痰中药均具有降脂作用^[26-28],红曲还兼具抗骨质疏松作用^[29]。故全方共奏补肾益髓,化痰调脂之功。

骨质疏松症的主要病理改变是骨量下降和骨微结构改变^[6]。Micro CT可在不破坏骨组织标本内部结构的同时快速、准确、无创地对标本进行超高分辨率三维成像,并对指定骨组织BMD等指标进行分析以观测骨量和骨微结构的变化^[30]。骨组织病理学变化是评价骨质疏松模型建立是否成功和干预措施是否有效的最主要的指标之一^[31]。骨质疏松骨组织典型的病理学改变为骨小梁稀疏、变细变薄,排列松散而不规则。骨小梁出现吸收陷窝,当陷窝加深,可发生穿孔及断裂。同时,骨皮质变薄,骨髓腔扩大,内有大量脂肪细胞堆积^[32]。本研究Micro CT和HE染色结果显示,假手术组大鼠骨小梁致密、连续性好、排列整齐,而模型组大鼠则呈现典型的骨质疏松病理学改变,且BMD明显下降、BMAT明显增多,表明PMOP造模成功。与模型组比较,补肾化痰组大鼠骨组织病变明显减轻,BMD明显升高且BMAT明显减少,说明补肾化痰方具有延缓绝经后骨量减少和骨微结构改变的作用。

BMAT是由脂肪细胞在骨髓腔内累积所形成,占人体脂肪组织总质量的10%,骨髓脂肪细胞与成骨细胞有着共同的前体细胞BMSCs^[33]。BMSCs是一种具有自我更新且有多向分化潜能的成体干细胞,在适当的条件下可向成骨、成软骨、成肌、成脂等方向分化^[34]。其中,BMSCs的成脂与成骨分化相互抑制、相互转化,二者此消彼长,保持着动态平衡^[35]。BMSCs偏向于脂肪细胞系会直接影响成骨细胞的形成,反之亦然^[36]。在骨质疏松症中,骨髓成骨微环境发生改变,BMSCs分化平衡向成脂方向偏移,更多分化为脂肪细胞,致BMAT增加且成骨细胞数量显著减少^[37]。大量临床及骨质疏松症动物模型研究发现,随着BMD下降,骨小梁退变、断裂、间隙扩大的同时,BMAT的数量及体积也明显增

加^[38],BMAT生成在骨量调节中起着负调节作用,BMAT异常增多被认为是导致骨质疏松的重要因素之一^[7]。因此,BMSCs成骨/成脂分化平衡对骨稳态的维持起着至关重要的作用,所以有学者提出,PMOP的发展存在两个主要的失衡,一是成骨细胞主导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收之间的失衡,二是骨-脂失衡^[39]。

BMSCs分化成成骨细胞或脂肪细胞有赖于多种谱系特异性转录因子的启动,其中,Runx2为BMSCs成骨分化过程中最重要且必需的转录因子之一^[40],而PPAR γ 则在BMSCs成脂分化中起着关键的调节作用^[17],二者共同参与影响BMSCs的成骨/成脂分化稳态。ZHANG等^[41]的研究显示,褪黑素可通过抑制PPAR γ 表达和增强Runx2表达抑制人BMSCs成脂分化,并促进人BMSCs成骨分化,从而发挥抗骨质疏松的作用。另外,不同浓度的淫羊藿苷可促进体外培养的骨质疏松大鼠BMSCs Runx2的表达、抑制PPAR γ 的表达,从而促进大鼠BMSCs成骨分化,抑制其成脂分化^[42]。可见,Runx2和PPAR γ 在诱导BMSCs向成脂或成骨谱系分化过程中相互作用、互相制约,启动PPAR γ 可下调Runx2的表达,而PPAR γ 缺乏可抑制BMAT的形成,并促进Runx2的表达而促进成骨分化^[43]。本实验发现,补肾化痰方可显著提高去势大鼠BMD、降低BMAT含量,同时上调去势大鼠骨组织Runx2的表达、下调PPAR γ 的表达,提示补肾化痰方具有减少去势大鼠骨丢失,促进成骨分化及骨形成,并可抑制其成脂分化和降低BMAT,从而维持去势大鼠的骨脂平衡,与以往研究相一致。

LPN是一种由肥胖基因编码,主要由白色脂肪组织产生的,由167个氨基酸残基组成的蛋白质类激素^[44]。LPN通过与广泛分布于中枢和外周OBR结合,进而启动多种细胞信号转导通路,发挥广泛的生物学功能^[45]。OBR广泛存在于成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞及骨髓干细胞中,提示LPN对骨组织具有调控作用^[46]。研究发现,LPN通过中枢间接调控和外周直接调控两种方式参与调节骨代谢,其中枢可以抑制骨形成,而在外周则发挥促进骨形成、抑制骨吸收的作用^[47]。同时,LPN对骨组织的外周作用可抵消其中枢作用^[48],总体上表现为促进骨形成的作用。此外,LPN对骨的外周直接调控主要是通过BMSCs实现的^[49],其与BMSCs的OBR结合后,可以抑制BMSCs成脂分化,并促进成骨基因表达诱导成骨分化^[50],从而维持骨脂平衡。LPN是

调节 BMSCs 成骨/成脂分化的因子之一^[51]。BARTELL 等^[52]通过对瘦素缺陷小鼠进行脑室内和皮下注射 LPN 发现,经 LPN 治疗的小鼠其骨髓中 Runx2 的表达增加、PPAR γ 的表达下降,同时 BMAT 生成减少、成骨指数增加,且此效应呈浓度依赖性递增。本研究亦发现,补肾化痰方可以显著提高骨组织 LPN、OBR 的表达,说明补肾化痰方可能通过调控骨组织中 LPN、OBR 的表达而维持去势骨质疏松大鼠的骨脂平衡、减少骨量丢失,从而防治 PMOP。

综上所述,补肾化痰方可能通过调控骨组织中 LPN 及其受体的表达,减少去势骨质疏松大鼠的骨量丢失、降低 BMAT 含量,从而改善去势骨质疏松大鼠的骨脂失衡,防治 PMOP。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] CONFERENCE C D. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis[J]. *Am J Med*, 1993, 94(6): 646-650.

[2] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(3): 281-309.

[3] 佚名.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.

[4] 白璧辉,谢兴文,李鼎鹏,等.我国近5年来骨质疏松症流行病学研究现状[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2): 253-258.

[5] 祝晓雨,张伟光,赵志刚.骨质疏松症国内外药物治疗的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(5): 588-592.

[6] 史晓林,吴连国,刘康.绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版)[J]. *中医正骨*, 2020, 32(2): 1-13.

[7] TENCEROVA M, FERENCAKOVA M, KASSEM M. Bone marrow adipose tissue: Role in bone remodeling and energy metabolism [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35(4): 101545.

[8] 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.

[9] 周亚娜,陈辉,向楠.补肾化痰法影响骨髓间充质干细胞成脂分化的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(10): 2325-2327.

[10] 周亚娜,向楠,陈辉.补肾化痰法影响骨髓间充质干

细胞成骨分化的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(3): 275-277.

[11] 谭张奎,周广文,张妍,等.补肾化痰方基于白细胞介素-2/信号转导及转录启动子5通路改善去势大鼠骨代谢的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6): 3277-3282.

[12] 李章青,向楠,周广文,等.补肾化痰方影响去势骨质疏松大鼠 Leptin 及 β_2 -AR 表达的实验研究[J]. *天津中医药*, 2020, 37(1): 87-92.

[13] 张麟,向楠,周广文,等.补肾化痰方对去卵巢大鼠骨形成的影响及其作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2018, 30(10): 12-18.

[14] 谭张奎,周广文,张妍,等.补肾化痰方对去势骨质疏松模型大鼠 Th17/Treg 平衡机制的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 33-40.

[15] 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.

[16] 陈奇. *中药药理研究方法学*. 2版[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 31-33

[17] BEEKMAN K M, VELDHUIS-VLUG A G, VAN DER VEEN A, et al. The effect of PPAR γ inhibition on bone marrow adipose tissue and bone in C3H/HeJ mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(1): E96-E105.

[18] WEHRLI F W, HOPKINS J A, HWANG S N, et al. Cross-sectional study of osteopenia with quantitative MR imaging and bone densitometry [J]. *Radiology*, 2000, 217(2): 527-538.

[19] ROY B, CURTIS M E, FEARS L S, et al. Molecular mechanisms of obesity-induced osteoporosis and muscle atrophy[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 439.

[20] LIU J, ZHU L P, YANG X L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and bone mineral density: A Meta-analysis [J]. *Bone*, 2013, 54(1): 151-156.

[21] 蔡晓燕,董光富.脂代谢及血清骨钙素水平与骨质疏松症的相关性分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, doi:10.3969/j.issn.1006-7108.2016.06.011.

[22] 孙建芝,牛晓亚.痰浊证微观辨证指标的实验研究[J]. *河南中医*, 1996, 16(2): 2.

[23] 徐众华,莫雨晴,周驰.基于 BMP/Runx2/Osx 信号通路研究淫羊藿总黄酮改善绝经后骨质疏松模型大鼠的作用机制[J]. *中国药房*, 2020, 31(19): 2333-2338.

[24] 陈露华,唐宏宇.补骨脂素对绝经后大鼠骨质疏松及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(6): 697-701.

[25] 赵素霞,刘会丽,江红.菟丝子黄酮通过调节 Wnt/

- β -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(1):25-28.
- [26] 贺立勃. 瓜蒌、薤白降脂作用的析因研究[J]. 湖南中医药导报, 2002, doi: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2002.04.040.
- [27] 王林海, 卢健棋, 黄舒培, 等. 中医药治疗血脂异常的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 106-109.
- [28] 李丹, 董开心, 刘燕华, 等. 降脂类中药降脂成分及降脂机制的研究进展[J]. 江西医药, 2020, 55(11): 1736-1740.
- [29] 冷明昊, 张卫华, 陈东, 等. 红曲通过启动腺苷酸活化蛋白激酶上调骨形态发生蛋白2表达对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(3):7-11.
- [30] 魏占英, 章振林. Micro-CT在骨代谢研究中骨微结构指标的解读及应用价值[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11(2):6.
- [31] 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):6.
- [32] 梁克玉, 邓小川, 何承建. 骨质疏松症[M]. 湖北科学技术出版社. 2013:46.
- [33] HERRMANN M. Marrow fat-secreted factors as biomarkers for osteoporosis[J]. Curr Osteoporos Rep, 2019, 17(6):429-437.
- [34] 张玲莉, 雷乐, 吴伟. MAPK 信号通路在骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2021, 14(1):75-81.
- [35] JAMES A W. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation [J]. Scientifica, 2013, doi:10.1155/2013/684736.
- [36] BUKOWSKA J, FRAZIER T, SMITH S, et al. Bone marrow adipocyte developmental origin and biology [J]. Curr Osteoporos Rep, 2018, 16(3):312-319.
- [37] 胡衍, 陈晓, 苏佳灿. 重视骨髓脂肪组织在骨质疏松性骨折愈合中的调控作用[J]. 中华创伤杂志, 2021, 37(11):968-972.
- [38] 陈琼, 王亮. 微循环与骨质疏松的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8):1086-1089, 1099.
- [39] 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.
- [40] 周鑫, 赵佳佳, 陈莉莉. 调节骨髓间充质干细胞成骨成脂分化的因素[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(17):2759-2765.
- [41] ZHANG L, SU P, XU C, et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR γ expression and enhancing Runx2 expression [J]. J Pineal Res, 2010, 49(4):364-372.
- [42] 李智奎, 孔俊博, 赵王林. 淫羊藿苷调控 Wnt/ β -catenin 信号通路干预大鼠 MSCs 成脂成骨双向分化实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24):2985-2990.
- [43] MURUGANANDAN S, ROMAN A A, SINAL C J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(2):236-253.
- [44] MARGETIC S, GAZZOLA C, PEGG G G, et al. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions[J]. Int J Obes, 2002, 26(11):1407-1433.
- [45] TRINH T, BROXMEYER H E. Role for leptin and leptin receptors in stem cells during health and diseases [J]. Stem Cell Rev Rep, 2021, 17(2):511-522.
- [46] UPADHYAY J, FARR O M, MANTZOROS C S. The role of leptin in regulating bone metabolism [J]. Metabolism, 2015, 64(1):105-113.
- [47] COEN G. Leptin and bone metabolism[J]. J Nephrol, 2004, 17(2):187-189.
- [48] 何琪, 杨均政, 张罡瑜, 等. 通过 Micro-CT 评价瘦素受体缺乏的 2 型糖尿病小鼠四肢骨的骨代谢变化 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(4):492-497.
- [49] HAMRICK M W, FERRARI S L. Leptin and the sympathetic connection of fat to bone[J]. Osteoporosis Int, 2008, 19(7):905-912.
- [50] THOMAS T, GORI F, KHOSLA S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes[J]. Endocrinology, 1999, 140(4):1630-1638.
- [51] THOMAS T, BURGUERA B. Is leptin the link between fat and bone mass? [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(9):1563-1569.
- [52] BARTELL S M, RAYALAM S, AMBATI S, et al. Central (ICV) leptin injection increases bone formation, bone mineral density, muscle mass, serum IGF-1, and the expression of osteogenic genes in leptin-deficient ob/ob mice [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(8):1710-1720.

[责任编辑 孙丛丛]