

六味地黄汤及其“补泻”药对对绝经后骨质疏松大鼠股骨和肾脏中 OPG 及 RANKL 蛋白表达的影响

戴冰¹, 李玉星², 张嘉妮², 易健¹, 肖子曾^{2*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的:观察六味地黄汤及其3个“一补一泻”药对对绝经后骨质疏松模型大鼠股骨及肾脏中骨保护素(OPG)及核转录因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)的影响。方法:将3~4月龄SD大鼠随机分为空白组(假手术组,蒸馏水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型组(蒸馏水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),六味地黄汤组($6.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),山茱萸-牡丹皮组($1.89\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),熟地黄-泽泻组($2.97\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),山药-茯苓组($1.89\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),阿仑膦酸钠组(阳性药物组, $6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除空白组外,其余各组大鼠均采用摘除双侧卵巢的方法制备绝经后骨质疏松症大鼠模型。造模后第16天开始,各组按相应剂量连续灌胃给药90 d,每周观察各组大鼠体重的变化,并采用免疫组化法检测股骨成骨细胞和肾脏肾小管上皮细胞中 OPG、RANKL 蛋白的表达。结果:与模型组比较,六味地黄汤组能上调股骨成骨细胞及肾脏肾小管上皮细胞中的 OPG 的蛋白表达、下调 RANKL 的蛋白表达;但山茱萸-牡丹皮药对仅能降低股骨成骨细胞中 OPG 的灰度值($P < 0.05$),升高 RANKL 的灰度值($P < 0.01$),即山茱萸-牡丹皮药对仅能上调股骨成骨细胞中 OPG 的蛋白表达、下调 RANKL 的蛋白表达(灰度值越低,OPG、RANKL 的蛋白表达越强)。结论:六味地黄汤改善绝经后骨质疏松症的机制之一可能与其中山茱萸-牡丹皮药对调节股骨中的 OPG 及 RANKL 的蛋白表达有关。

[关键词] 六味地黄汤; 山茱萸-牡丹皮药对; 绝经后骨质疏松症; 骨保护素; 核转录因子- κ B受体活化因子配体
[中图分类号] R285.5; R242; R287; R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0116-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020116
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1342.022.html>
[网络出版时间] 2017-09-06 13:42

Effect of Liuwei Dihuangtang and ‘Reinforcing and Reducing’ Herb Pairs on OPG and RANKL in Femur and Kidney of Ovariectomized Rats Model with Osteoporosis

DAI Bing¹, LI Yu-xing², ZHANG Jia-ni², YI Jian¹, XIAO Zi-zeng^{2*}

(1. *The First Hospital to Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;*
2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Liuwei Dihuangtang and its three ‘reinforcing and reducing’ herb pairs on the osteoprotegerin (OPG) and the nucleus factor- κ B receptor activation factor ligands (RANKL) in kidney and femur of ovariectomized rat models with osteoporosis. **Method:** The 3-4 month SD rats were randomly divided into blank group (sham operation group, distilled water, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), model group (distilled water, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), Liuwei Dihuangtang group ($6.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Corni Fructus-Moutan Cortex group ($1.89\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Rehmanniae Radix Praeparata-Alismatis Rhizoma group ($2.97\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Dioscoreae Rhizoma-Poria group ($1.89\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and alendronate group (positive drug group, $6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except for the blank group, all the other rats were ovariectomized to induce the model of postmenopausal osteoporosis. After 16 days, the rats from different groups received intragastric administration for continuous 90 days. The weight changes of the

[收稿日期] 20170527 (006)

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(15A140);湖南省中医药科研计划重点课题项目(201802)

[第一作者] 戴冰,博士,教授,从事临床中药学及炮制学的研究,Tel:15973157636,E-mail:db0223@163.com

[通信作者] *肖子曾,教授,从事方剂的应用及其疗效机制研究,Tel:13574801749,E-mail:1092341361@qq.com

rats were observed every week, and the protein expression levels of OPG and RANKL were detected by using immunohistochemical method. **Result:** As compared with model group, the OPG protein expression in osteoblast and renal tubular epithelial cells was increased, and the protein expression of RANKL in osteoblast and renal tubular epithelial cells was decreased by Liuwei Dihuangtang. But the gray value of OPG was reduced ($P < 0.05$) and the RANKL in osteoblast was increased ($P < 0.01$) by Corni Fructus-Moutan Cortex pair, indicating that the OPG protein expression was increased and the protein expression of RANKL in osteoblast was decreased (the lower of gray value, the higher expression of OPG and RANKL). **Conclusion:** One of the mechanism of Liuwei Dihuangtang for postmenopausal osteoporosis maybe related to regulating OPG and RANKL protein expression in femur by Corni Fructus-Moutan Cortex herb pair.

[**Key words**] Liuwei Dihuangtang; Corni Fructus-Moutan Cortex herb pair; pastmenopausal osteoporosis; osteoprotegerin (OPG); nucleus factor- κ B receptor activation factor ligands (RANKL)

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是发生于绝经后妇女的一种常见慢性病,主要是因绝经后妇女卵巢功能衰退、雌激素水平下降,从而使骨吸收大于骨形成,出现以全身骨量减少、骨密度降低的一种代谢性疾病。目前 PMOP 约占我国 7 000 万骨质疏松患病人数的 80%^[1]。PMOP 发病机制与破骨细胞的骨吸收功能和成骨细胞的骨形成功能有关,骨形成和骨吸收平衡失调是绝经后骨质疏松症的发病原因之一^[2]。

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 又称骨保护蛋白,是一种可溶性的分泌型糖蛋白,属于肿瘤坏死因子 (TGF) 受体超家族成员,由成骨细胞合成和分泌;细胞核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (the nucleus factor κ B receptor activation factor ligands, RANKL) 发现于成骨细胞表面,为 II 型跨膜蛋白;NF- κ B 受体活化因子 (nuclear factor- κ B receptor activation factor, RANK) 为 I 型跨膜蛋白,属于 TGF 受体超家族成员,存在于破骨细胞及其祖细胞表面,是 RANKL 的唯一靶信号受体。OPG 通过竞争性结合 RANKL,从而减少 RANKL 与 RANK 结合,抑制破骨细胞的分化成熟,诱导破骨细胞凋亡,当局部微环境中的 RANKL/OPG 浓度比升高时,破骨细胞的活跃度增加,引起骨密度的下降,造成骨质疏松。而雌激素减少时,OPG 分泌减少,RANKL/OPG 浓度比升高,RANKL 与 RANK 结合增加,促进破骨细胞的分化成熟,骨吸收大于骨形成,可引起绝经后骨质疏松^[3]。故,OPG/RANKL/RANK 系统在骨吸收过程中与绝经后骨质疏松症关系密切。

目前临床治疗该病主要是抑制骨吸收和促进骨形成的药物,如雌激素、钙制剂等,其疗效已得到临床验证,但其多种副作用也一定程度限制了其推广应用。而中药因其确切疗效越来越受到研究人员的

重视^[4]。中医学认为,肾为先天之本,主骨生髓,肝为血海,主藏血,精血互生,肝肾同源,女子七七而天癸竭,肾气衰而导致的“肾亏虚”是绝经后骨质疏松症形成的主要病机。因此,补肾法历来被作为治疗绝经后骨质疏松症的主要疗法。

六味地黄丸出自宋·钱乙《小儿药证直诀》:熟地黄(八钱),山茱萸、山药(各四钱),泽泻、牡丹皮、茯苓(去皮各三钱),上为末,炼蜜丸。临床适用由于肾阴虚而引起的肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软、消渴等病候。该方由 3 个“一补一泻”药对即山茱萸-牡丹皮药对、熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对组成,3 个“补泻”药对合用,共同支撑方剂表达良好的滋阴补肾作用。目前用该丸改善绝经后骨质疏松症已取得一定疗效,研究表明长期服用六味地黄丸可提高绝经后骨质疏松症患者腰椎、股骨颈、桡骨远端的骨密度值并改善临床症状^[5],其改善绝经后骨质疏松症的作用机制不仅可能与其能通过调节成骨细胞的 Wnt/ β -链蛋白 (Wingless + Int1 / β -catenin, Wnt/ β -catenin) 系统^[6],还与其可通过调控两面神激酶 (JAK) / 信号传导及转录激活因子 (STAT) 信号通路的相关因子有关^[7]。本课题组前期研究发现六味地黄汤可提高绝经后骨质疏松症模型大鼠的骨密度值、血清碱性磷酸酶及抗酒石酸酸性磷酸酶水平,增加血磷、血钙含量,调节骨吸收和骨形成的骨代谢平衡,从而改善绝经后骨质疏松症;其中山茱萸-牡丹皮药对为该方改善绝经后骨质疏松症的主要药效组成部分之一。但六味地黄汤是否还能通过调节 OPG/RANKL/RANK 系统中的 OPG, RANKL 因子,从而改善绝经后骨质疏松症,其药效组成部分与 3 个“一补一泻”药对有何关联鲜有报道。因此本文通过观察六味地黄汤及其 3 个“补泻”药对对绝经后骨质疏松模型大鼠 OPG, RANKL 因子的蛋白

表达影响,拟进一步研究该方改善绝经后骨质疏松症的作用机制、物质基础及组方规律,这对于为六味地黄丸临床应用提供科学的数据支撑,丰富其方剂的药对配伍理论至关重要。

1 材料

1.1 药物 熟地黄(批号CS14120109),泽泻(批号SH15040701),山茱萸(酒)(批号NG14122602),牡丹皮(批号NG15030903),山药(批号CS15020203),茯苓(批号JC15051201),饮片均由湖南中医药大学第一附属医院药房出售并经该院张志国教授鉴定符合2015年版《中国药典》规定;阿仑膦酸钠片(杭州默沙东制药有限公司,批号152160601)。

1.2 动物 SD雌性大鼠42只,体重(200±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2011-0003,饲养于湖南中医药大学实验动物中心。本实验经过湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,符合实验动物伦理委员会指导原则。

1.3 试剂 水合氯醛(上海山浦化工有限公司,批号20130502);雌二醇(E₂)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号150820);大鼠OPG/RANKL免疫组化试剂盒(中杉金桥,批号ZLI-9017/9018/9019);OPG兔抗,RANKL兔抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为294389,382425)。

1.4 仪器 JY3002型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),GC-1200型放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业有限公司),Unigamma X-RAY Plus型双能X射线骨密度仪(意大利LACN公司),Shandon325型石蜡切片机(英国Shandon公司),MoticBS型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

2 方法

2.1 药液制备 按比例称取六味地黄汤各味药材饮片[熟地黄24g,山茱萸(酒)12g,山药12g,牡丹皮9g,泽泻9g,茯苓9g],加6倍量水浸泡30min后,煎煮2次,每次30min,合并2次药液后用旋转蒸发器浓缩至含生药1.5g·mL⁻¹。再按比例分别称取山茱萸-牡丹皮药对、熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对,操作同上,均得含生药1.5g·mL⁻¹的浓缩液。

2.2 绝经后骨质疏松症大鼠模型的制备^[8] 大鼠适应性喂养1周后,行双侧卵巢摘除术造绝经后骨质疏松症大鼠模型(术前所有大鼠均禁食不禁水12h),以每只大鼠3.5mL·kg⁻¹的剂量腹腔注射

10%水合氯醛溶液进行麻醉,麻醉后,将其仰卧于手术台上,四肢固定,于腹部正中偏下处备皮,再用75%乙醇消毒,于腹正中线切开皮肤,依次分开肌肉、腹膜,打开腹壁,找到“Y”型子宫,顺着子宫分离出被脂肪组织包裹的略带粉红色的“桑椹样”卵巢组织,用无菌手术线结扎后剪去双侧卵巢,并逐层缝合切口,用生理盐水擦净血迹;每只大鼠以青霉素40万U腹腔注射1次,预防感染。空白组仅在大鼠肾周脂肪区取相应质量的脂肪,余下操作同造模组。

2.3 分组及给药 除空白(假手术)组6只大鼠外,将已造模的36只大鼠随机分为模型组,六味地黄汤组(6.75g·kg⁻¹),山茱萸-牡丹皮组(1.89g·kg⁻¹),熟地黄-泽泻组(2.97g·kg⁻¹),山药-茯苓组(1.89g·kg⁻¹),每组6只;各组按相应剂量灌胃给药,每日1次,连续3月;阿仑膦酸钠组(6.3g·kg⁻¹),每周灌胃给药1次,连续3月。空白组与模型组每日灌胃蒸馏水(10mL·kg⁻¹),每日1次,连续3月。

2.4 标本采集与处理 各组大鼠禁食不禁水12h后,即刻按每只大鼠3.5mL·kg⁻¹腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉,对其腹主动脉采血,将血液静置1h后,以3500r·min⁻¹离心15min后分离血清并置于-20℃冰箱中保存。再取该大鼠左右后肢完整股骨,将其面上附着的肌肉组织去除(保留骨膜),将大鼠右侧股骨用湿纱布包裹,左侧股骨置于4%的多聚甲醛中固定以备用;取大鼠左侧肾脏清洗后置于4%的多聚甲醛中常温保存以备用。

2.5 指标检测

2.5.1 骨密度(BMD)的测定 由湖南中医药大学附属第一医院骨密度室采用双能X射线骨密度仪检测大鼠右侧股骨的骨密度。

2.5.2 血清E₂的测定 由湖南中医药大学附属第一医院同位素室采用放免法测定大鼠血清E₂含量(按E₂放射免疫分析试剂盒操作,过程,在试管中加入不同浓度的血液样品,每管加入等量的放射性标记抗原和抗体,在37℃下保温,待反应平衡后进行分离,测量放射性强度,由放射性强度比量制出标准曲线,即可测出E₂样品值)。

2.5.3 大鼠股骨及肾脏OPG,RANKL因子蛋白表达的检测 取大鼠左侧肾脏,置于4%多聚甲醛溶液中保存。常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,浸蜡、石蜡包埋,切片4~5μm,并将其附于载玻片上,置于60℃的烘箱内2h烘干。严格按照OPG及RANKL免疫组化试剂盒操作,用3% H₂O₂去离子

水孵育 10 min,再用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 min,反复冲洗 3 次。滴加 I 抗(1:100),室温孵育 2 h,PBS 冲洗 2 min,反复冲洗 3 次。再滴加试剂 1 (Polymer Helper),室温孵育 20 min, PBS 冲洗 2 min,反复冲洗 3 次。滴加试剂 2 (polyperoxidase-anti-rabbit IgG),室温孵育 30 min,PBS 冲洗 2 min,反复冲洗 3 次。应用二氨基联苯胺(DAB)溶剂显色,自来水充分冲洗,苏木素复染,树胶封片。每张切片应用 MoticBS 显微摄像系统观察并拍照,图象颜色越深表示阳性表达越强,反之亦然。再运用 IPP 6.0 图象分析系统对切片上的阳性染色细胞转化成的灰度值进行分析即灰度值越低,OPG,RANKL 的蛋白表达越强^[9]。将大鼠左侧股骨置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,用 5% 的硝酸脱钙 1 周后,余下操作同肾脏 OPG,RANKL 因子的蛋白表达检测。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先对数据进行正态性检验,符合正态分布者,对多组样本均数统计采用单因素方差分析;样本方差齐时,选用 LSD 法进行组间多重比较,方差不齐时,则选用 Tamhanes T2 法进行比较;两组间的比较采用 *t* 检验进行两样本均数的比较;不符合正态分布者采用秩和检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 绝经后骨质疏松症大鼠模型的评价

3.1.1 模型大鼠术前体重及术后第 16 天至第 90 天的周体重变化 与空白组比较,模型组大鼠体重在术后第 79 天至第 90 天(处死前)有显著性差异(*P* < 0.05),提示造模近 3 月后大鼠的体重显著提高。见表 1。

表 1 药物对绝经后骨质疏松症模型大鼠术后第 16 天至第 90 天每周体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect to different groups on weight in OVX rats in 16-90 days after operating per week($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	术前	术后					
			第 16 天	第 23 天	第 30 天	第 37 天	第 44 天	第 51 天
空白	-	209.00 ± 7.17	267.22 ± 13.81	270.00 ± 16.32	274.98 ± 15.15	277.5 ± 18.79	281.72 ± 17.80	285.23 ± 9.43
模型	-	212.97 ± 10.10	275.67 ± 10.73	282.58 ± 11.79	290.83 ± 11.30	298.2 ± 12.95	305.42 ± 11.26	309.20 ± 10.61
六味地黄汤	6.75	213.72 ± 9.59	286.02 ± 14.45	296.68 ± 15.32	302.03 ± 14.44	305.97 ± 15.75	306.63 ± 15.32	308.43 ± 14.22
山茱萸-牡丹皮	1.89	216.35 ± 8.78	287.18 ± 10.90	291.17 ± 23.68	294.23 ± 23.53	298.36 ± 29.70	303.22 ± 29.65	307.81 ± 17.70
熟地黄-泽泻	2.97	211.35 ± 10.02	287.53 ± 11.11	291.22 ± 24.43	295.67 ± 19.20	302.86 ± 14.80	305.02 ± 17.46	309.58 ± 11.25
山药-茯苓	1.89	210.18 ± 5.28	289.34 ± 9.02	294.72 ± 19.67	296.1 ± 14.90	302.58 ± 12.43	307.52 ± 11.16	310.51 ± 9.68
阿仑膦酸钠	6.3	208.95 ± 11.18	279.31 ± 9.17	283.68 ± 10.39	287.83 ± 12.90	292.27 ± 19.40	296.02 ± 20.50	300.39 ± 17.90

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	术后					
		第 58 天	第 65 天	第 72 天	第 79 天	第 86 天	第 90 天
空白	-	290.90 ± 14.84	294.70 ± 14.18	301.29 ± 15.49	305.28 ± 16.43	309.44 ± 17.08	310.08 ± 20.64
模型	-	314.06 ± 12.93	319.8 ± 11.58	326.73 ± 10.71	335.19 ± 9.96 ²⁾	340.55 ± 10.88 ²⁾	345.8 ± 9.47 ²⁾
六味地黄汤	6.75	310.63 ± 14.47	313.02 ± 14.98	315.78 ± 16.91	316.19 ± 16.51	317.2 ± 13.77 ²⁾	318.92 ± 16.66 ²⁾
山茱萸-牡丹皮	1.89	311.70 ± 16.90	314.16 ± 19.33	316.43 ± 17.89	317.61 ± 17.69	318.73 ± 19.34 ²⁾	319.62 ± 36.80 ²⁾
熟地黄-泽泻	2.97	310.47 ± 15.46	314.6 ± 16.47	316.97 ± 16.39	318.14 ± 18.43	319.74 ± 19.11 ²⁾	322.8 ± 20.02 ²⁾
山药-茯苓	1.89	313.43 ± 11.70	315.34 ± 16.49	317.66 ± 19.49	318.78 ± 17.04	320.51 ± 17.47 ²⁾	323.83 ± 13.30 ²⁾
阿仑膦酸钠	6.3	301.21 ± 12.47	303.44 ± 15.90	305.27 ± 15.42	308.2 ± 12.50 ¹⁾	311.04 ± 18.19 ²⁾	313.48 ± 19.34 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾*P* < 0.01,²⁾*P* < 0.05;与模型组比³⁾*P* < 0.05,⁴⁾*P* < 0.01;与六味地黄汤比较⁵⁾*P* < 0.05,⁶⁾*P* < 0.01(表 2~5 同)。

3.1.2 模型大鼠术后第 90 天的 BMD 及血清 E₂ 水平比较 与空白组比较,模型组大鼠术后第 90 天的 BMD,E₂ 水平均有显著性差异(*P* < 0.01);提示模型大鼠 BMD 值(0.45 ± 0.01)与空白组(0.31 ± 0.01),E₂ 水平(12.50 ± 1.71)与空白组(6.10 ± 0.93)比较均降低,表明造模成功。

3.2 药物对绝经后骨质疏松症模型大鼠术后第 16 天至第 90 天的每周体重的影响 与模型组比较,各给药组从术后第 86 天至第 90 天(处死前)体重均具有显著性差异(*P* < 0.05),提示术后第 86 天至第 90 天,六味地黄汤、山茱萸-牡丹皮、熟地黄-泽泻、山药-茯苓组均可抑制大鼠体重的增长。见表 1。

3.3 各组药物对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨、肾脏中 OPG, RANKL 因子蛋白表达的影响

3.3.1 药物对模型大鼠股骨成骨细胞中 OPG, RANKL 因子蛋白表达的影响

OPG 阳性判断标准, 细胞膜、胞浆和或细胞核呈棕黄色, 在股骨中主要存在于成骨细胞中。阳性染色细胞转化成的灰度值进行分析, 即灰度值越低, OPG, RANKL 的蛋白表达越强。

与空白组比较, 模型组股骨成骨细胞中染色的 OPG 阳性细胞数量减少, 该类细胞的颜色为浅黄色, OPG 灰度值上升且有显著性差异 ($P < 0.01$); 提示大鼠造模后股骨成骨细胞中的 OPG 因子的蛋白表达减少; 与模型组比较, 六味地黄汤及山茱萸-牡丹皮药对组股骨成骨细胞中染色的 OPG 阳性细胞数量增加, 该类细胞的颜色为棕色, OPG 灰度值下降且有显著性差异 ($P < 0.05$), 熟地黄-泽泻及山药-茯苓药对的 OPG 灰度值无显著性差异, 提示六味地黄汤及山茱萸-牡丹皮药对组能上调模型大鼠股骨成骨细胞中 OPG 因子的蛋白表达。

RANKL 阳性判断标准, 细胞膜、胞浆和或细胞核呈棕黄色, 在股骨中主要存在于成骨细胞中。

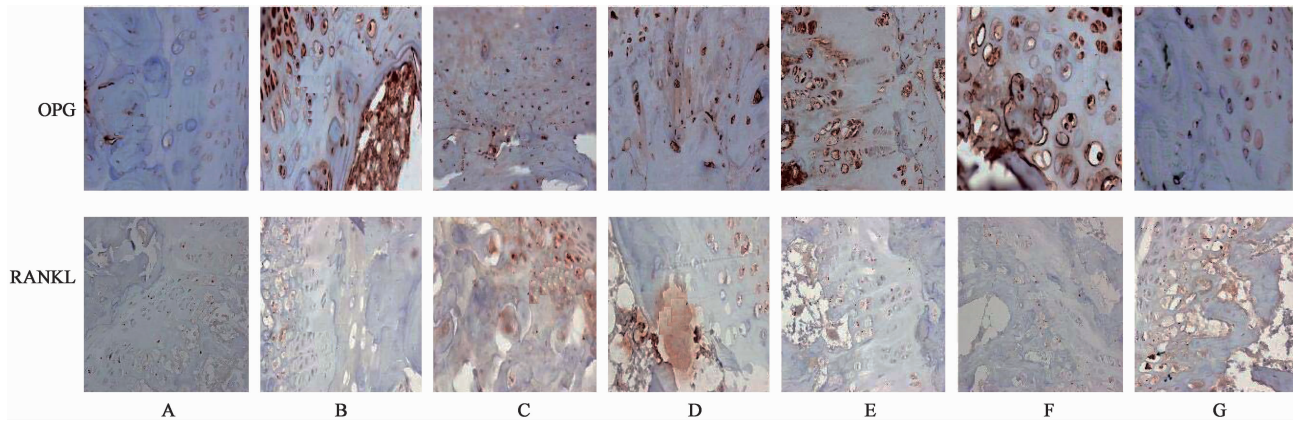
与空白组比较, 模型组股骨成骨细胞中染色的 RANKL 阳性细胞数量增加, 该类细胞的颜色为棕

褐色, RANKL 灰度值下降且有显著性差异 ($P < 0.01$), 提示该成骨细胞中 RANKL 因子的蛋白表达增加; 与模型组比较, 六味地黄汤及山茱萸-牡丹皮药对组股骨成骨细胞中染色的 RANKL 阳性细胞数量减少, 该类细胞的颜色为浅棕色, RANKL 灰度值上升且有显著性差异 ($P < 0.01$), 熟地黄-泽泻及山药-茯苓药对的 RANKL 灰度值无显著性差异, 提示六味地黄汤及山茱萸-牡丹皮药对组能下调该股骨成骨细胞中的 RANKL 因子的蛋白表达。见表 2, 图 1。

表 2 药物对模型大鼠股骨成骨细胞中 OPG, RANKL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Changes of gray value of OPG and RANKL on femur of osteoblast in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	OPG	RANKL
空白	-	150.87 ± 6.03	143.67 ± 19.56
模型	-	176.80 ± 4.36 ¹⁾	105.13 ± 25.48 ¹⁾
六味地黄汤	6.75	159.50 ± 3.24 ³⁾	138.47 ± 23.37 ³⁾
山茱萸-牡丹皮	1.89	164.33 ± 21.44 ²⁾	134.73 ± 14.97 ³⁾
熟地黄-泽泻	2.97	170.70 ± 10.26 ^{4,5)}	124.87 ± 18.07 ^{4,5)}
山药-茯苓	1.89	172.17 ± 9.18 ^{4,5)}	123.93 ± 4.83 ^{4,5)}
阿仑膦酸钠	6.3	155.80 ± 3.56 ³⁾	141.70 ± 4.92 ³⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 六味地黄汤; D. 山茱萸-牡丹皮; E. 熟地黄-泽泻; F. 山药-茯苓; G. 阿仑膦酸钠 (图 2 同)

图 1 药物对模型大鼠股骨成骨细胞中 OPG, RANKL 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Comparison of protein expression of OPG, RANKL by immunohistochemical in femur of osteoblast in OVX rats (IHC, ×200)

3.3.2 药物对模型大鼠肾脏肾小管上皮细胞中 OPG, RANKL 因子蛋白表达的影响

OPG 阳性判断标准, 细胞膜、胞浆和或细胞核呈棕黄色, 在肾脏中主要存在于肾小管上皮细胞中。

与空白组比较, 模型组肾脏肾小管上皮细胞染色的 OPG 阳性细胞数量减少, 该类细胞颜色为浅黄色, OPG 灰度值上升且有显著性差异 ($P < 0.01$), 提

示大鼠造模后肾脏肾小管上皮细胞中的 OPG 因子的蛋白表达减少; 与模型组比较, 六味地黄汤组 OPG 阳性细胞数量增加, 该类细胞颜色为棕色, OPG 灰度值下降且有显著性差异 ($P < 0.05$); 山茱萸-牡丹皮药对、熟地黄-泽泻及山药-茯苓药对的 OPG 的灰度值无显著性差异, 提示六味地黄汤组能上调大鼠肾脏肾小管上皮细胞中 OPG 因子的

蛋白表达。

RANKL 阳性判断标准,细胞膜、胞浆和或细胞核呈棕黄色,在肾脏中主要存在于肾小管上皮细胞中。

与空白组比较,模型组肾脏肾小管上皮细胞中 RANKL 阳性细胞成片且该类细胞颜色呈棕褐色, RANKL 灰度值下降且有显著性差异 ($P < 0.01$);提示大鼠造模后肾脏肾小管上皮细胞中的 RANKL 因子的蛋白表达增加。与模型组比较,六味地黄汤组 RANKL 阳性细胞数量减少,该类细胞颜色为浅棕色, RANKL 灰度值上升且有显著性差异 ($P < 0.01$);山茱萸-牡丹皮药对、熟地黄-泽泻及山药-茯苓药对的 RANKL 的灰度值无显著性差异,提示六味地黄汤组能下调大鼠肾脏肾小管上皮细胞中

RANKL 因子的蛋白表达。见表 3,图 2。

表 3 药物对模型大鼠肾脏肾小管上皮细胞中 OPG, RANKL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Changes of gray value of OPG and RANKL on kidney of renal tubular epithelial cell in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	OPG	RANKL
空白	-	111.80 ± 9.56	62.10 ± 18.25
模型	-	140.40 ± 13.78 ¹⁾	40.30 ± 19.64 ¹⁾
六味地黄汤	6.75	117.23 ± 33.23 ²⁾	52.53 ± 14.88 ²⁾
山茱萸-丹皮	1.89	124.50 ± 17.90 ³⁾	45.83 ± 14.98 ³⁾
熟地黄-泽泻	2.97	125.40 ± 11.68 ³⁾	44.17 ± 5.16 ³⁾
山药-茯苓	1.89	130.37 ± 10.25 ⁴⁾	43.50 ± 6.73 ³⁾
阿仑膦酸钠	6.3	110.30 ± 16.62 ²⁾	60.00 ± 15.75 ²⁾

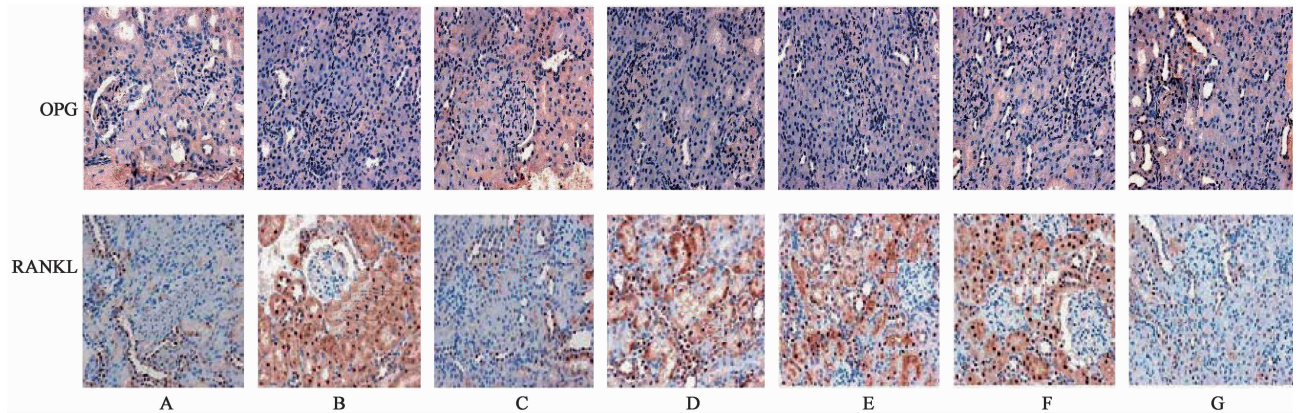


图 2 药物对模型大鼠肾脏肾小管上皮细胞中 OPG, RANKL 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Comparison of protein expression of OPG, RANKL by immunohistochemical in kidney of renal tubular epithelial cell in OVX rats (IHC, ×200)

4 讨论

骨密度(BMD)测量是明确骨质疏松诊断及疗效评价的必要手段。临床检测骨密度时常用其“T 值”判断人体的骨密度是否正常,其将检测者检测所得到骨密度与 30 ~ 35 岁健康年轻人的骨密度作比较,以得出高出(+)或低于(-)年轻人的标准差数。即 $-1 < T \text{ 值} < 1$ 表示骨密度值正常; $-2.5 < T \text{ 值} < -1$ 表示骨量低、骨质流失; $T \text{ 值} < -2.5$ 表示骨质疏松症^[10-11]。但目前对绝经后骨质疏松症模型的评价指标骨密度的判断仅从模型组与空白组比较是否具有显著性差异,并无具体的骨密度数值,也无人与动物骨密度正常值的换算公式与标准。因此,建立绝经后骨质疏松症动物模型的骨密度值标准很有必要。

研究发现,女性绝经后,由于卵巢的功能衰退,雌激素的分泌量明显减少,脂代谢异常,食欲亢进而

饥饿,进食较多引起肥胖^[12]。本实验采用的是通过切除大鼠双侧卵巢而引起雌激素的减少,模拟绝经后骨质疏松症模型。实验发现造模后的第 79 天至第 90 天(处死前)大鼠的体重显著提高;这可能与笔者前期实验发现模型大鼠双侧卵巢摘除长达 80 d 后,血中雌激素水平降低至原来的一半,雌激素的分泌量明显减少,从而导致肾上腺分泌雌酮,在脂肪组织中加速转化为雌激素以弥补血中不足,引起体内脂质代谢失常,脂肪堆积导致的体重增加^[13]有关。而补充雌激素能改善由于去卵巢后所导致的大鼠体重增加^[14],实验中还发现连续给药第 86 天后,六味地黄汤及其药对可抑制去卵巢大鼠体重增长趋势;故推测六味地黄汤及其药对在长期蓄积给药后有类似雌激素的作用,但其中所含成分是否与雌激素相同或类似还有待探讨。

本研究显示,六味地黄汤既能上调股骨成骨细

胞及肾脏肾小管上皮细胞中 OPG 因子的蛋白表达,使 OPG 与 RANKL 的结合增加,又能下调股骨成骨细胞及肾脏肾小管上皮细胞中 RANKL 因子的蛋白表达,使 RANKL 与 RANK 的结合减少,从而抑制破骨细胞活性,降低骨吸收,改善绝经后骨质疏松症,这可能是六味地黄汤改善绝经后骨质疏松症的重要机制之一。其中山茱萸-牡丹皮药对也具有与该方剂同样的作用,故该药对可能是六味地黄汤通过调节股骨成骨细胞中 OPG/RANKL/RANK 系统从而改善绝经后骨质疏松症的药效物质组成部分。但山茱萸-牡丹皮在调节肾脏肾小管上皮细胞中 OPG, RANKL 因子的蛋白表达时与六味地黄汤有显著性差异,其产生差异的原因还需探讨。而熟地黄-泽泻、山药-茯苓药对调节绝经后骨质疏松症 OPG/RANKL/RANK 系统的作用均不明显,但 3 个药对配伍后可协同改善绝经后骨质疏松症 OPG/RANKL/RANK 系统,完善了其作用机制及六味地黄方的组方原理。但在六味地黄汤及其“一补一泻”药对改善绝经后骨质疏松症 OPG/RANKL/RANK 系统的部分机制中,OPG 和 RANKL 因子在全身其他组织中是否还有不同程度的表达,尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 徐娟,朱俊卿,陈智勇,等. 浅谈中药治疗绝经后骨质疏松症[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(2):441-444.

[2] 邵秉一,于洋,傅潇慧,等. 去势小鼠尾静脉注射骨髓间充干细胞通过抑制体内破骨细胞活性治疗绝经后骨质疏松[J]. 免疫学杂志,2014,30(4):302-305.

[3] 郑文菊,靖立新,赵希海,等. 围更年期女性牙本质敏感症与骨质疏松症的相关性[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2015,8(3):215-218.

[4] Paschalis E P, Gamsjaeger S, Hassler N, et al. Vitamin D and calcium supplementation for three years in

postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality[J]. Bone,2017, 11(95):41-46.

[5] 关俭,唐洁凤,郭荣林. 六味地黄丸对绝经后骨质疏松患者骨密度的干预研究[J]. 海南医学,2009,20(5):79-80.

[6] XIA B, XU B, SUN Y, et al. The effects of Liuwei Dihuang on canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteoporosis[J]. J Ethnopharmacol,2014, 153(1): 133-141.

[7] 谢丽华,陈娟,李生强,等. 六味地黄丸对绝经后骨质疏松症肾虚证 JAK/STAT 信号通路基因的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(7):741-746.

[8] 黄桂榕,李沛,林莺,等. 电针“命门”穴对绝经后骨质疏松症大鼠骨形成蛋白-2 的影响[J]. 针刺研究,2014,39(2): 130-135.

[9] 赵勤,范怀玲,纪峰,等. 电针命门穴对去卵巢骨质疏松大鼠股骨 OPG/RANKL 系统的影响[J]. 中国民族民间医药,2015(7): 26-29.

[10] 任洁,卢建华. RANKL/RANK/OPG 系统与绝经后骨质疏松模型的研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2015, 25(9):892-894.

[11] 魏玉芳,刘钰林,张姗红,等. 针刺对去势大鼠骨质疏松模型雌激素及骨密度作用的研究[J]. 针刺研究,2007, 32(1): 38-41.

[12] 黄庭惠,伍杨,郑永梅. 王不留行对去势大鼠骨密度和骨代谢指标的影响[J]. 中国老年学,2015, 35(11):2921-2923.

[13] 奚玲,李璐,张日华,等. 雌激素对雌性大鼠脂质代谢及血糖影响的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2016,36(2): 189-192.

[14] 朱家恩,白延斌,蔺美玲,等. 白芍对去卵巢大鼠体重、血脂及抗氧化能力的影响[J]. 中国老年学,2009, 29(2):135-137.

[责任编辑 邹晓翠]