

# 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

闵文<sup>1</sup>, 黄桂成<sup>1\*</sup>, 华永庆<sup>1</sup>, 黄正泉<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)基因表达的影响,探讨补肾通络方治疗原发性骨质疏松症的分子机制。方法:通过卵巢去势的方法造成大鼠骨质疏松模型,造模后随机分为6组:假手术组、模型组、仙灵骨葆组( $5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、补肾基础组( $5.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、通络组( $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、补肾通络组( $6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。ig给药,1次/d,共10周。治疗10周后,在无菌条件下取出大鼠L<sub>3</sub>椎体,剔除软组织及骨膜,用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测骨组织RANKL/OPG基因mRNA的表达。结果:与模型组相比,补肾通络组、补肾基础组、通络组RANKL mRNA表达明显下降,RANKL/OPG明显下降( $P < 0.01$ ),3组间比较,补肾通络组的干预作用明显优于补肾基础组与通络组( $P < 0.05$ )。结论:补肾通络方治疗原发性骨质疏松症的作用机制可能与调控RANKL mRNA表达,改善RANKL/OPG,从而抑制破骨细胞活性,降低骨吸收有关。

**[关键词]** 补肾通络方;骨质疏松;细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体;骨保护素

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0258-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013150258

**[收稿日期]** 20120914(019)

**[基金项目]** 江苏省中医药局课题(2009-2011, LZ09012)

**[第一作者]** 闵文,博士,副教授,从事中医骨伤科学、骨质疏松、足踝外科临床工作, Tel:13905168696, E-mail:wenge1977@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*黄桂成,教授、博士生导师,从事中医骨伤科学的临床应用及基础研究, Tel:025-85811003, E-mail:hgc@njutcm.edu.cn

性期具有显著地脑保护作用,其具体的作用机制尚需进一步深入研究。

## [参考文献]

[1] 郭笑冬. 缺血性卒中中西医治疗研究进展[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(1): 31.

[2] 王松龄, 王爱凤, 张社峰. 中西医结合防治急性脑血管病[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 92.

[3] 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 198.

[4] Zea-Longa Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.

[5] David A Greenberg, Michael J Aminoff, Roger P Simon. 临床神经病学[M]. 5版. 主译: 王维治 王化冰. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 290.

[6] 刘明, 孙建宁, 董世芬, 等. 大鼠脑缺血不同时间脑能量代谢的变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 216.

[7] 樊凯芳, 唐迎雪, 李晓亮. 三化汤对脑缺血再灌注大鼠神经功能、脑含水量及脑组织病理改变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 161.

[8] 朱慧渊. 川芎嗪和葛根素配伍对脑缺血损伤大鼠神经功能及脑组织形态学变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 224.

[9] 涂雪松. 神经内科学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999: 194.

[10] 中华医学会. 临床诊疗指南: 神经病学分册[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2008: 14.

[11] 张加英, 倪光夏. 缺血半暗带的研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(6): 1312.

[12] 许强, 张云亭. 超急性与急性期脑缺血半暗带演变的DWI研究[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(1): 52.

[13] 姚小梅, 佟志刚. 缺血性脑血管病的实验研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(1): 135.

[14] 王爱凤, 王伟民, 赵彦青. 中风防治灵颗粒治疗急性脑梗死的临床观察[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1732.

[责任编辑 李玉洁]

## Effects of Bushen Tongluo Decoction on OPG/RANKL mRNA Expression of in Osteoporosis Rats

MIN Wen<sup>1</sup>, HUANG Gui-cheng<sup>1\*</sup>, HUA Yong-qin<sup>1</sup>, HUANG Zheng-quan<sup>2</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the effects of Bushen Tongluo decoction (BTD) on mRNA expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) /osteoprotegerin system (OPG) in the osteoporosis rats by bilateral ovariectomy and explore the molecular mechanism of treating osteoporosis with BTD. **Method:** Rat model of the osteoporosis was established by bilateral ovariectomy. The rats were divided into six groups randomly: the sham operated group, model group, Xianling Gubao group (5.0 g·kg<sup>-1</sup>), Bushen decoction group (5.4 g·kg<sup>-1</sup>), Tongluo decoction group (0.9 g·kg<sup>-1</sup>), BTD group (6.3 g·kg<sup>-1</sup>). After ten weeks treatment. The mRNA expression of OPG and RANKL in L<sub>3</sub> bone tissues was analyzed by RT-PCR. **Result:** BTD group, Bushen decoction group and Tongluo decoction group could reduce RANKL mRNA expression, decrease the ratio of RANKL/OPG compared with model group, and there was significant difference ( $P < 0.01$ ). The effect of BTD was superior to Bushen decoction and Tongluo decoction ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The effect and related mechanism of BTD in the treatment of primary osteoporosis may be related to regulation of RANKL mRNA and improve RANKL/OPG ratio, thereby inhibiting osteoclast activity and reducing bone resorption.

[ **Key words** ] Bushen Tongluo decoction; osteoporosis; OPG; RANKL

补肾通络方是在中医整体观念和辨证施治的理论指导下治疗原发性骨质疏松症的临床验方。该方以补肾法为基础,结合通络法,采用补肾药物,配伍虫类中药搜剔络邪。临床研究<sup>[1]</sup>发现该方在改善原发性骨质疏松症的中医证候方面具有良好疗效,药物安全性良好。实验研究<sup>[2]</sup>发现该方能提高去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度、血清钙(Ca)含量,降低模型大鼠体重及血清磷(P)、血清碱性磷酸酶(ALP)含量,从而改善骨质疏松的骨代谢状态,起到治疗骨质疏松症的作用。

本研究将通过观察补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体/骨保护素(RANKL/OPG)基因表达的影响,进一步探讨补肾通络方治疗原发性骨质疏松症的分子机制。

### 1 材料

**1.1 动物** 6月龄SD系SPF级雌性大鼠92只,体重约260~280g,由扬州大学比较医学中心提供,动物许可证号SCXK(苏)2007-0001。

**1.2 药物** 补肾基础方、通络方、补肾通络方均由江苏省中医院制剂室提供,含生药1.0g·mL<sup>-1</sup>。补肾基础方:淫羊藿、骨碎补、续断、茯苓、白芍、甘草等组成。通络方:蜈蚣、全蝎等组成。补肾通络方:淫羊藿、骨碎补、续断、蜈蚣、全蝎、茯苓、白芍、甘草等

组成。仙灵骨葆胶囊,贵州同仁堂制药有限公司生产,批号090921。

**1.3 仪器** MultiGene Gradient PCR循环仪(美国Labnet),HH-4数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)UV-2450,SHIMADZU紫外光度仪(日本岛津公司),Lunar Prodigy Advanced双能X射线骨密度仪(美国GE公司)。

### 2 方法

**2.1 造模、分组及给药** 将大鼠随机分为假手术组和手术组,分别为22只和70只。全部动物水合氯醛(300mg·kg<sup>-1</sup>)ip麻醉。用碘伏行皮肤消毒后,用手术剪刀(已灭菌)沿后正中中线切开皮肤,切口长约1.5~2cm。于肋弓下脊柱旁开1cm处切开肌肉,打开后腹膜。找到位于肾脏后下方的脂肪团,将卵巢轻柔提出,并分离周围脂肪组织,结扎双侧卵巢下方的输卵管、血管。切除双侧卵巢,放入固定液固定。然后逐层缝合,在每侧手术部位注射青霉素(6000万U·L<sup>-1</sup>)1mL。假手术组仅切除双侧卵巢旁部分脂肪,余处理同实验组。术后每天青霉素钠盐(5万U/只)im,连续3d。术后10周从2组分别随机选出10只大鼠处死后取右侧股骨,去除附着肌肉和结缔组织,采用双能X射线骨密度仪进行检测,以验证造模是否成功。造模成功后,假手术组剩

下 12 只,手术组大鼠随机分为 5 组;模型组、仙灵骨葆组、补肾基础组、通络组、补肾通络组各 12 只。补肾通络组、补肾基础组、通络组分别给予 6.3, 5.4, 0.9 g·kg<sup>-1</sup> 水提液, ig, 仙灵骨葆组给予 5.0 g·kg<sup>-1</sup> 水溶液, ig。1 次/d, 共 10 周。

**2.2 取材及样本处理** 末次给药后 20:00 全部动物禁食不进水, 次日全部动物 7% 水合氯醛 (300 mg·kg<sup>-1</sup>) ip 麻醉。待麻醉生效后, 在无菌条件下取出大鼠 L<sub>3</sub> 椎体, 剔除软组织及骨膜, 用 4 °C 预冷的生理盐水冲洗干净后, 用铝箔纸包裹并标记, 投入液氮中冻存。

**2.3 RT-PCR 检测 RANKL/OPG 基因 mRNA 的表达** 按 80 g·L<sup>-1</sup> 加入 Trizol (美国 Gibco 公司) 抽提骨组织总 RNA。取 RNA 样品用 1 × TE Buffer 稀释样品 100 倍, 分别测定样品在波长 260 nm 和 280 nm 的 A 确定 RNA 的质量。

RNA 的浓度 = A<sub>260</sub> × 稀释倍数 × 0.04 g·L<sup>-1</sup>

A<sub>260/280</sub> 在 1.8 ~ 2.1 视为抽提的 RNA 的纯度符合实验要求。

取 2 μg 总 RNA, 用逆转录试剂盒逆转录后 PCR 反应检测 OPG 和 RANKL mRNA, PCR 反应条件: 94 °C × 5 min, 94 °C × 40 s, 56 °C × 30 s, 72 °C × 35 s, 32 个循环, 72 °C × 10 min, 以 Actin 为内参照。Actin (527 bp) 上游引物: 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3', 反义引物: 5'-CGTGAGAAGGTCGGAAGGAA-33'。OPG primer (430 bp) 上游引物: 5'-TGG CTGAGTGTCTGGTGA-3', 反义引物: 5'-TGA CGTTTTGGGAAAGTGG-3'。RANKL primer (319 bp) 上游引物: 5'-CTATGATGGAAGTTCGTGGC-3'; 反义引物: 5'-CTTGGGATTTTGATGCTGGTT-3'。反应结束后, 取反应液 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 反应产物。

**2.4 数据处理与分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较, 方差齐多重检验采用单因素方差分析, 方差不齐采用秩和 (χ<sup>2</sup>) 检验, P < 0.05 为有统计意义。

### 3 结果

**3.1 RNA 提取以及质量检测** 各样品 RNA 质量符合要求。见表 1。

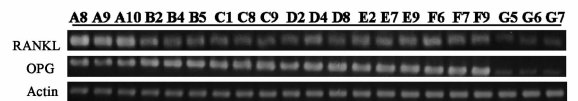
**3.2 RT-PCR 检测 RANKL/OPG 基因的表达** 与假手术组比较, 模型组 OPG mRNA, RANKL mRNA 都明显升高 (P < 0.01); 但 2 组间 RANKL/OPG 差异无统计学意义。与模型组比较, 各药物干预组 OPG mRNA 表达无统计学差异; 仙灵骨葆组 RANKL

表 1 RNA 浓度检测

样品	标记	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/A280</sub>	C/g·L <sup>-1</sup>
1	A8	0.184	0.099	1.859	0.736
2	A9	0.045	0.025	1.800	0.180
3	A10	0.054	0.029	1.862	0.216
4	B2	0.103	0.054	1.907	0.412
5	B4	0.097	0.055	1.764	0.388
6	B5	0.582	0.301	1.934	2.328
7	C1	0.350	0.193	1.813	1.400
8	C8	0.119	0.064	1.859	0.476
9	C9	0.047	0.024	1.958	0.188
10	D2	0.389	0.225	1.729	1.556
11	D4	0.097	0.052	1.865	0.388
12	D8	0.073	0.035	2.086	0.292
13	E2	0.365	0.187	1.952	1.460
14	E7	0.086	0.050	1.720	0.344
15	E9	0.071	0.035	2.029	0.284
16	G5	0.417	0.223	1.870	1.668
17	G6	0.162	0.095	1.705	0.648
18	G7	0.107	0.054	1.981	0.428

注: 以测定样品在 260 nm 和 280 nm 的 A 确定 RNA 的质量。A. 模型组; B. 仙灵骨葆 5.0 g·kg<sup>-1</sup> 组; C. 补肾通络 6.3 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 补肾基础 5.4 g·kg<sup>-1</sup> 组; E. 通络 0.9 g·kg<sup>-1</sup> 组; G. 假手术组 (图 1 同)。

mRNA 表达明显下调 (P < 0.05), RANKL/OPG 明显下降 (P < 0.01); 补肾通络组、通络组、补肾基础组 RANKL mRNA 表达下调, RANKL/OPG 明显下降, 差异显著 (P < 0.01)。补肾通络组、补肾基础组、通络组 3 组组间比较, 补肾通络组 RANKL mRNA 表达下调较补肾基础组、通络组更明显 (P < 0.05); 补肾通络组 RANKL/OPG 较补肾基础组、通络组下降明显 (P < 0.05); 补肾基础组、通络组 RANKL mRNA 表达、RANKL/OPG 两组无统计学差异。见图 1, 表 2。



A. 模型组; B. 仙灵骨葆 5.0 g·kg<sup>-1</sup> 组;  
C. 补肾通络 6.3 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 补肾基础 5.4 g·kg<sup>-1</sup> 组;  
E. 通络 0.9 g·kg<sup>-1</sup> 组; G. 假手术组

图 1 补肾通络方对去卵巢骨质疏松症模型 OPG/RANKL 基因表达的影响

### 4 讨论

骨形成-骨吸收偶联失衡是骨质疏松发生的原因。细胞核因子 κB 受体活化因子配体/细胞核因子 κB 受体活化因子/骨保护素 (RANKL/RANK/OPG) 系统是调节骨形成—骨吸收偶联平衡的关键环节<sup>[3-4]</sup>。OPG 是肿瘤坏死因子受体超家族新成员, 由骨组织中的成骨细胞 (OB) 及骨髓基质细

**表 2 补肾通络方对去卵巢骨质疏松症模型 OPG/RANKL 基因表达的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	OPG	RANKL	RANKL
		/Actin	/Actin	/OPG
假手术	-	0.31 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>2)</sup>	1.205 ± 0.256
模型	-	1.42 ± 0.14	2.04 ± 0.22	1.445 ± 0.156
仙灵骨葆	5.0	1.65 ± 0.07	1.25 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.761 ± 0.036 <sup>2)</sup>
补肾通络	6.3	1.61 ± 0.11	0.87 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.540 ± 0.013 <sup>2)</sup>
补肾基础	5.4	1.49 ± 0.09	0.91 ± 0.15 <sup>2,5)</sup>	0.611 ± 0.067 <sup>2,5)</sup>
通络	0.9	1.38 ± 0.90	1.07 ± 0.16 <sup>2,5)</sup>	0.777 ± 0.139 <sup>2,5)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与假手术组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与补肾通络组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ 。

胞分泌,具有抑制破骨细胞(OC)形成的作用。OPG 通过与其配体 RANKL 结合,阻止其配体与 OC 表面膜的 RANK 的结合,从而竞争性的阻断 RANK 受体的活性,抑制 OC 的分化及活化,阻止 OC 的骨吸收作用,从而发挥其拮抗 OC 骨吸收的作用;同时干扰骨髓基质细胞与 OC 之间的相互作用而诱导 OC 的凋亡。删除编码 OPG 基因的大鼠则出现严重的骨质疏松<sup>[5]</sup>。此外,OPG 和 RANKL 基因的启动子部位包含了 OB 转录因子 Runx2 的结合位点,进一步保证了 OB 和 OC 功能的偶联。OB 和骨髓间充质干细胞通过 RANKL/RANK/OPG 轴偶联,调控 OC 的分化和活性,诱导骨髓中 OC 前体细胞向 OC 分化,对保持骨代谢的完整性具有重要意义。

RANKL/OPG 是影响 OC 分化的重要诱导因素<sup>[6]</sup>。如果 RANKL/OPG 增加,可以促进 OC 的活化和减少成熟 OC 的凋亡。反之,则 OC 的分化和活化减少。随着 OB 的分化成熟,比值逐渐缩小,最后失去对 OC 的促分化和激活作用,以确保骨吸收和骨形成 2 个过程的紧密相连并达到平衡。本实验研究发现,与假手术组比,模型组 OPG mRNA, RANKL mRNA 表达明显升高,说明模型大鼠的骨形成与骨吸收都增强,与前期实验<sup>[2]</sup>中模型组骨密度的改变一致,提示模型大鼠骨密度在下降,符合去卵巢骨质疏松模型大鼠高转换型骨代谢的特点<sup>[7]</sup>。

各药物干预组能上调 OPG mRNA 的表达,这与相关实验报道是相一致的<sup>[8]</sup>。但各药物干预组 OPG mRNA 表达与模型组比无统计学差异,说明其治疗作用可能并不仅仅是通过对 OPG mRNA 的调控实现的。与模型组比,补肾通络组、补肾基础组、通络组 RANKL mRNA 表达明显下降,说明补肾中药、虫类通络中药均可下调 RANKL mRNA 的表达,降低 RANKL/OPG,从而抑制 OC 的活化和促进成熟

OC 的凋亡,从而达到改善骨质疏松的作用。补肾通络组、补肾基础组、通络组 3 组间比较提示,补肾通络组对 RANKL mRNA, OPG mRNA 的表达及 RANKL/OPG 干预作用明显优于补肾基础组与通络组,说明补肾通络法中补肾中药与虫类通络中药之间具有良好的协同增效作用。

目前,中医药学者对于治疗骨质疏松症,多从肝肾不足、脾气亏虚、血瘀病机着手选药组方,从用药特点来说,以补益药和活血药为主<sup>[9]</sup>,但针对通络法及虫类通络中药的临床和实验研究却鲜见报道。前期实验研究证实<sup>[2]</sup>,补肾中药与虫类通络中药均能调节去势大鼠的骨代谢速率,防止其骨量丢失,并具有良好的协同增效作用。本实验提示,这种作用机制和协同增效作用主要是通过调控 RANKL mRNA 表达和改善 RANKL/OPG,从而抑制 OC 活性,降低骨吸收实现的。

[参考文献]

[1] 闵文,黄桂成,马勇,等. 补肾通络对原发性骨质疏松症中医证候影响的临床研究[J]. 南京中医药大学学报,2010,26(5):344.

[2] 闵文,黄桂成,华永庆,等. 补肾通络方治疗去势大鼠骨质疏松的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):189.

[3] Parfitt A M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression [J]. Bone, 2002, 30(1):5.

[4] Kearns A E, Khosla S, Kostenuik P J. Receptoractivator of nuclear factorB ligand and osteoprotegerin in regulation of bone remodeling in health and disease [J]. Endocr Rev, 2008, 29(2):155.

[5] Cheng S D, Tang D Z, Wang Y J, et al. Application of OPG in bone disease clinical research [J]. Spinal Surg, 2007, 5(4):174.

[6] Elefterion F, Ahn J D, Takedas, et al. Leptin reulation of bone resoption by the sympathetic neverous system and cart [J]. Nature, 2005, 434(7033):514.

[7] Eermann M, Goldhahn J. Animal models for fracture treatment in osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2005, 16(2):129.

[8] 洗华,曹文富. 补肾防疏汤对骨质疏松症大鼠骨组织 OPG 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):180.

[9] 郭杨,马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(7):188.

[责任编辑 李玉洁]