

# 补骨防疏汤对骨质疏松症大鼠骨组织 OPG 表达的影响

洗华, 曹文富\*

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331)

**[摘要]** 目的: 观察补骨防疏汤对骨质疏松症大鼠骨组织骨保护素(OPG)的影响。方法: Wistar 大鼠分为4组, 采用维甲酸  $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  连续2周, 制备大鼠骨质疏松模型, 观察灌服中、高剂量补骨防疏汤 ( $40, 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 治疗4, 8, 12周后大鼠骨组织 OPG 的变化及骨小梁形态计量学变化。结果: 维甲酸 ig 2周后, 模型对照组大鼠骨小梁明显稀疏, 骨小梁面积为  $(22.52 \pm 3.15)\%$ , 骨组织 OPG 的面积积分吸光度 (IA) 为  $0.29 \pm 0.15$ , 均显著低于正常组 ( $P < 0.01$ ), 说明造模成功。补骨防疏汤治疗后中、高剂量组大鼠骨小梁面积为  $(36.41 \pm 1.40)\%$ ,  $(37.58 \pm 1.40)\%$ , 显著高于模型对照组 ( $P < 0.01$ ), 骨组织 OPG 的 IA 为  $2.41 \pm 1.40$ ,  $3.07 \pm 0.40$ , OPG 阳性表达明显增多 ( $P < 0.01$ ), 骨组织病理变化明显改善。结论: 补骨防疏汤能显著提高骨质疏松症大鼠 OPG 表达, 改善骨质疏松的病理变化。

**[关键词]** 补骨防疏汤; 骨质疏松症; 骨小梁; 骨保护素

**[中图分类号]** R681 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0180-04

## Effect of Bugu Fangshu Decoction on Osteoprotegerin Expression of Bone Tissues in Osteoporosis Rats

XIAN Hua, CAO Wen-fu\*

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Bugu Fangshu decoction on osteoprotegerin (OPG) in osteoporosis rats. **Method:** The experimental animals were divided into 4 groups, and the model was made by

**[收稿日期]** 20110616(007)

**[第一作者]** 洗华, 讲师, 硕士, 从事骨代谢性疾病研究, Tel: 13618395067, E-mail: wanda122577@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 曹文富, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合内分泌代谢病研究, Tel: 13883658367, E-mail: caowenfu9316@163.com

### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 392.
- [2] 朴惠顺, 金光洙. 锦鸡儿属植物研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 430.
- [3] 张彩, 曹海涛. 四君子汤抗小鼠运动性疲劳拆方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 187.
- [4] 吴君, 黄萍, 成金乐, 等. 党参破壁粉粒增强免疫功能及抗疲劳作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 179.
- [5] 王永新, 詹皓, 魏日胞, 等. 复方红景天醇提物提高运动耐力(抗疲劳)的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 172.
- [6] 朱磊, 王振宇. 黑木耳多糖对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 营养学报, 2008, 30(4): 430.
- [7] 熊正英, 柳茜茜. 浅谈中医与运动性疲劳[J]. 山西体育科技, 2007, 27(3): 46.
- [8] 张子彦, 赵爱泉. 中医药对运动性疲劳恢复作用[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5): 685.
- [9] 王丛笑, 周军. 对中药抗运动性疲劳研究中动物模型的一些思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 83.
- [10] 朴惠顺, 金光洙. 小叶锦鸡儿研究概况[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(5): 47.
- [11] 赵光. 蜂王浆对大鼠力竭运动能力的影响[J]. 体育学刊, 2003, 10(3): 33.
- [12] 齐敦禹. 乳酸的产生原因与运动能力[J]. 体育世界: 学术版, 2007(5): 65.

[责任编辑 聂淑琴]

administration of retinoic acid. The osteoporosis rats were treated by middle-dose Bugu Fangshu decoction (MDB group,  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high-dose Bugu Fangshu decoction (HDB group  $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Expression of OPG in bone tissues and morphological changes of bone tissue were observed. **Result:** Retinoic acid ig 2 weeks, the model control group rats significantly sparse trabecular bone, trabecular bone area percentage of  $(22.52 \pm 3.15)\%$ . spectral area of OPG bone density (IA) value of  $0.29 \pm 0.15$ , significantly lower than the normal group ( $P < 0.01$ ), shows that successful model. After treated by Bugu Fangshu, the percentage of trabecular bone area of MDB group and HDB group is  $(36.41 \pm 1.40)\%$  and  $(37.58 \pm 1.40)\%$ , significantly higher than the control group ( $P < 0.01$ ). The OPG IA of bone is  $2.41 \pm 1.40$ ,  $3.07 \pm 0.40$ , was significantly increased ( $P < 0.01$ ), significant improvement in pathological changes in bone tissue. **Conclusion:** Bugu Fangshu decoction could increase significantly the expression of OPG and improve pathological changes of osteoporosis obviously.

[**Key words**] Bugu Fangshu decoction; osteoporosis; bone trabecula; osteoprotegerin

骨质疏松症是中老年人常见病、多发病,严重影响该类人群的健康和生活质量,以骨量减少和(或)骨组织结构破坏为特征,进而导致骨强度降低,骨脆性增加,易发骨折的全身性骨骼疾病<sup>[1]</sup>。目前临床治疗多采用钙剂、活性维生素 D、性激素、降钙素、双膦酸盐和氟化物等,虽有一定疗效,但副作用大,费用昂贵。本实验利用维甲酸诱导的大鼠骨质疏松症模型,研究中临床经验方补骨防疏汤治疗骨质疏松症的作用。

## 1 材料

**1.1 药物** 补骨防疏汤由龟板、熟地黄、当归、牛膝、淫羊藿等 13 味中药组成,全部药材均购自重庆桐君阁大药房,经重庆医科大学中医药学院中药教研室制为浓缩液,每 1 毫升含生药 2 g。维甲酸(山东良福集团制药有限公司,批号 20090405)研成细粉后加蒸馏水配成一定浓度的混悬液,避光保存备用。

**1.2 动物** 6 月龄雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重  $190 \sim 231 \text{ g}$ ,由重庆医科大学动物实验中心提供。普通饲料喂养,自由摄水。

**1.3 试剂及仪器** 一抗兔抗人 OPG 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,进口分装);SABC 免疫组化染色试剂盒(博士德生物工程有限公司);DAB 显色剂(北京中杉生物技术有限公司)。Olympus-BX41 照相显微镜(日本 Olympus 公司);GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统(成都金盘电子科大多媒体技术有限公司);形态计量软件(Mediaplyer,IPP, USA)。

## 2 方法

**2.1 骨质疏松模型的建立** 用维甲酸  $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ig,每日 1 次,连续 2 周<sup>[2]</sup>。

**2.2 动物分组及给药** 健康雄性 Wistar 大鼠 72

只,随机分为 4 组:正常对照组、模型对照组、补骨防疏汤中、高剂量组。造模成功后,正常对照组及模型对照组生理盐水 ig(生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。补骨防疏汤高、中剂量组(生药  $40, 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ig,每日 1 次。分别于治疗后第 4,8,12 周末各处死大鼠 6 只。

**2.3 标本收集** 处死大鼠后,取其左侧股骨上端和左胫骨上端,去除软组织后,置于 4% 多聚甲醛固定液中 24 h,10% EDTA/PBS (pH 7.4) 脱钙后常规切片。

**2.4 骨组织形态学观察** 将左侧股骨骨组织病理切片行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察骨小梁的形态结构并照相,应用形态计量软件分析,计算骨小梁与总面积的百分比。

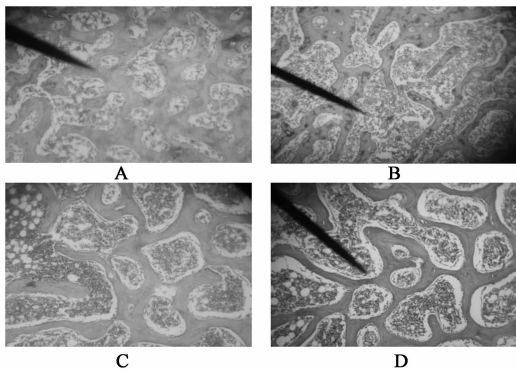
**2.5 OPG 免疫组织化学染色** 大鼠左侧胫骨石蜡切片,脱蜡和脱水后,按链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法进行免疫组织化学染色。OPG 的一抗稀释浓度为 1:100,苏木素对比染色。阳性对照以一胫骨阳性切片作为对照片;阴性对照以 PBS 溶液代替一抗作为对照。观察各组大鼠在不同时间段局部 OPG 表达情况,并通过多媒体图像分析方法,将 OPG 表达情况转化为积分吸光度(IA)值,对 OPG 的表达进行定量比较,统计分析。

**2.6 统计学分析** 所有数据均使用 SAS 9.0 统计分析软件及 Excel 完成。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组资料比较经检验方差齐同,采用单因素方差分析,随后的组间两两比较采用 Student-newman-keuls 检验。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠骨组织形态学观察及骨小梁面积** 维甲酸 ig 2 周后,正常组大鼠骨小梁粗大,连续性较好,相互联结成网络结构且较整齐,模型对照组大鼠骨小梁明显稀疏,变细变小,较多中断,小梁表面骨

吸收陷窝增多;模型对照组大鼠骨小梁面积为  $(22.52 \pm 3.15)\%$ , 正常对照组大鼠骨小梁面积为  $(40.31 \pm 2.85)\%$ , 模型组明显低于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明造模成功。补骨防疏汤治疗后中、高剂量组大鼠骨小梁面积为  $(36.41 \pm 1.40)\%$ ,  $(37.58 \pm 1.40)\%$ , 显著高于模型对照组 ( $P < 0.01$ ), 补骨防疏汤中、高剂量组大鼠骨病理损害均较模型对照组有所减轻(图 1, 表 1)。



A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. 补骨防疏汤  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; D. 补骨防疏汤  $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (图 2 同)

图 1 药物干预后各组大鼠骨组织形态学观察 (HE,  $\times 100$ )

表 1 药物干预后各组大鼠骨小梁面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	骨小梁面积/ $\%$		
		4 周	8 周	12 周
正常对照	-	$41.12 \pm 2.34$	$40.54 \pm 3.12$	$39.87 \pm 2.78$
模型对照	-	$21.34 \pm 3.15$	$22.27 \pm 3.16$	$22.30 \pm 3.14$
补骨防疏汤	20	$31.78 \pm 1.11$	$35.28 \pm 1.50^{1)}$	$36.41 \pm 1.40^{2)}$
	40	$32.48 \pm 1.13$	$36.17 \pm 1.70^{1)}$	$37.58 \pm 1.40^{2)}$

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

### 3.2 各组大鼠骨组织 OPG 表达情况

**3.2.1 胫骨 OPG 免疫组织化学切片染色** OPG 的阳性染色区域在成骨细胞系和骨髓基质细胞中,呈棕色颗粒,软骨细胞和破骨细胞 OPG 表达阴性。正常对照组大鼠标本骨髓内 OPG 染色呈均匀一致的深棕色;模型对照组 OPG 染色明显降低,且降低与疏松程度成正比;补骨防疏汤治疗后骨组织 OPG 表达明显增高(图 2)。

**3.2.2 造模及治疗后 OPG 阳性表达的情况** 造模 2 周后,正常对照组大鼠胫骨 OPG 的 IA 为  $4.72 \pm 0.80$ ,模型对照组大鼠胫骨 OPG 的 IA 为  $0.29 \pm 0.15$ ,模型组 OPG 阳性表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。治疗后,补骨防疏汤中、高剂量组大鼠骨组织 OPG 染色 IA 明显低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。药物干预后大鼠胫骨 OPG 阳性表达结果见表 2。

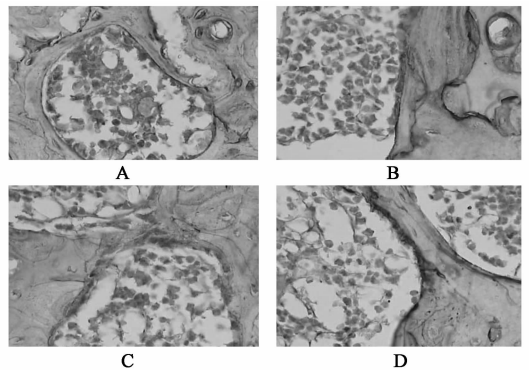


图 2 药物干预后各组大鼠胫骨 OPG (免疫组织化学染色,  $\times 400$ )

表 2 药物干预后各组大鼠 OPG 的 IA 值 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	OPG		
		4 周	8 周	12 周
正常对照	-	$4.72 \pm 0.80$	$4.58 \pm 0.79$	$4.70 \pm 0.78$
模型对照	-	$0.29 \pm 0.15$	$0.27 \pm 0.16$	$0.30 \pm 0.14$
补骨防疏汤	20	$0.43 \pm 0.11$	$1.28 \pm 0.50^{1)}$	$2.41 \pm 1.40^{2)}$
	40	$0.48 \pm 0.13$	$1.47 \pm 0.50^{1)}$	$3.07 \pm 0.40^{2)}$

## 4 讨论

中药补骨防疏汤是临床经验方,为了更好的观察补骨防疏汤对骨质疏松的防治作用,本实验采用维甲酸法诱导骨质疏松模型。中医历代文献中关于骨痿、骨枯、骨痹的描述,与现代医学的骨质疏松症极其相似,尤其是“骨痿”。补骨防疏汤的组方原则是补益肝肾、健脾益气补血,符合中医学对骨质疏松肾虚、脾虚、气血亏虚的病机的认识。方中补骨脂既能补肾填精又可温补脾胃,与改善骨质疏松症肾虚脾虚的病理相一致。现代药理研究证实补骨脂具有较强的雌激素样作用,能促进骨的钙化<sup>[3]</sup>。淫羊藿是温补肾阳的常用之品,对骨骼系统具有明显的调节作用<sup>[4]</sup>,在骨质疏松症的中药治疗中应用很广泛。刘氏等<sup>[5]</sup>研究发现淫羊藿能促进犬骨的骨髓基质细胞增殖以及促进骨髓基质细胞合成碱性磷酸酶,从而能促进成骨。于波等<sup>[6]</sup>发现淫羊藿对成骨细胞的生长增殖具有促进作用。此外,研究还发现淫羊藿可减少破骨细胞的形成、抑制破骨细胞的骨吸收功能以及诱导破骨细胞的凋亡,从而发挥抗骨质疏松的作用<sup>[7-8]</sup>。李东晓等<sup>[9]</sup>研究认为淫羊藿本身或其代谢产物在一定剂量和条件下可诱导骨髓基质干细胞的成骨分化,其机制与提高相关成骨因子在体液中的浓度有关。气血亏虚在骨质疏松的发病中占有重要地位,本方的另一论治立法基础是健脾

益气补血,方中用黄芪、茯苓、熟地黄等药健脾益气补血,恢复脾主运化的生理功能,促进肠道对钙磷等矿物质的吸收。盛莉等<sup>[10]</sup>研究认为,熟地黄水煎剂可抑制骨吸收,延缓去卵巢大鼠骨量丢失,对骨质疏松有一定的防治作用。现代药理研究表明,黄芪能促进和调节免疫功能,促进蛋白质的合成,具有防治骨质疏松的作用<sup>[11]</sup>。补骨防疏汤干预骨质疏松大鼠后,治疗组比模型组骨小梁百分面积明显增高,骨的细微结构也明显改善。

目前大多数研究认为,OPG 与骨代谢相关。其机制主要是 OPG 与 RANK 及配体 RANKL 三者通过调控破骨细胞的分化和成熟的破骨细胞的凋亡而调节骨代谢水平<sup>[12]</sup>。OPG 作为多种激素和细胞因子调节破骨形成的终末因素,在骨组织微环境中,是成骨细胞和骨髓基质细胞调控破骨细胞分化、活化的重要调节分子<sup>[13]</sup>。研究表明,OPG 分泌增高,可有效的抑制破骨细胞性骨吸收<sup>[14]</sup>。

本次实验表明大鼠经维甲酸造模后,骨组织微环境中 OPG 阳性表达明显减少,提示维甲酸导致大鼠骨吸收增强,与光镜下骨组织形态观察结果一致。OPG 在多种组织和细胞都有表达,在骨组织为成骨细胞系表达,本实验也证实,OPG 阳性染色区域在成骨细胞系和骨髓基质细胞中。研究发现,OPG 受多种激素和细胞因子调节,如雌激素可上调 OPG 表达。本实验骨质疏松大鼠经补骨防疏汤治疗后,骨组织 OPG 阳性表达明显增高,提示补骨防疏汤可抑制破骨细胞的吸收功能,使骨形成大于骨的破坏,其对骨代谢的调节作用随时间的延长效果更加明显。这与光镜下观察到中药干预 8 周及 12 周后骨小梁明显增粗,增多,小梁间隙变小也是一致的,本研究也显示补骨防疏汤能明显改善骨质疏松大鼠骨病理损害。

综上所述,补骨防疏汤能促进骨组织 OPG 的表达,抑制破骨细胞的分化增殖,使骨吸收减少,有效的改善骨质疏松大鼠的骨病理改变,从而对骨质疏松起到改善的作用。

## [参考文献]

[1] 肖建德.实用骨质疏松学[M].北京:科学出版社,2004:3.

- [2] Liao E Y, Luo X H, Wang W B, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis[J]. *Endocr Rev*, 2003, 29:23.
- [3] 寿清耀,杨荣平,王宾豪,等.补骨脂雌激素样作用的有效成分研究[J].*中药新药与临床药理*, 2007, 18(6):425.
- [4] 叶纯,苏进,王凡,等.淫羊藿影响去势大鼠椎骨微环境中 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$  表达的研究[J].*中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(6):687.
- [5] 刘海江,王小平,林娟,等.淫羊藿苷和黄芪苷 I 对骨髓基质细胞增殖及成骨能力的影响[J].*中药材*, 2006, 29(10):1062.
- [6] 于波,杨久山,刘岩,等.淫羊藿苷对成人成骨细胞的作用[J].*中医正骨*, 2006, 18(6):17.
- [7] 张大威,程岩,张金超,等.淫羊藿苷对破骨细胞的分化及骨吸收功能的影响[J].*中国药理学通报*, 2007, 23(4):463.
- [8] 吕明波,刘兴炎,葛宝丰,等.淫羊藿苷对破骨细胞活性的影响[J].*中国骨伤*, 2007, 20(8):529.
- [9] 李东晓,张磊,王岚,等.淫羊藿总黄酮对肌内植入组织工程化骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].*中药药理与临床*, 2007, 23(5):88.
- [10] 盛莉,邢国胜,王毅,等.熟地对去卵巢大鼠骨代谢生化指标及骨密度的影响[J].*中国骨质疏松杂志*, 2006, 12(5):496.
- [11] 刘汉丹,翟佐发.黄芪药理作用研究进展[J].*现代中西医结合杂志*, 2002, 11(18):1861.
- [12] Steven I, Teitelbaum F, Patrick R, et al. Genetic regulation of osteoclast development function [J]. *Nature*, 2003, 4:638.
- [13] Hofbauer L C, Khosla S, Dunstan C R, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. *Bone and Miner Res*, 2000, 15(1):2.
- [14] Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(9):3478.

[责任编辑 聂淑琴]