

# 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法

刘飞祥<sup>1</sup>, 林子璇<sup>1</sup>, 徐道明<sup>2</sup>, 叶素敏<sup>1</sup>, 张明玥<sup>1</sup>, 樊巧玲<sup>1\*</sup>, 谭峰<sup>1\*</sup>,  
李星<sup>1</sup>, 柴毅<sup>1</sup>, 尚文斌<sup>1</sup>, 卢圣峰<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学 基础医学院, 第一临床医学院, 国家重点省部共建针药结合实验室, 南京 210023;  
2. 南京中医药大学 附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** 左归丸是滋阴补肾、填精益髓的经典名方,体现了“阳中求阴”的配伍思路,是防治骨质疏松症(OP)的常用有效方剂之一。OP 动物模型模拟了 OP 在人体的病理状态和发病机制,是 OP 防治和新药研发的重要手段。该文详细论述了左归丸防治 OP 的 2 大类常用动物模型和特点,即原发性 OP 动物模型,包括去卵巢法动物模型和自发性老年 OP 动物模型;继发性 OP 动物模型,包括糖皮质激素诱导性动物模型,环磷酰胺诱导性动物模型以及肾大部切除性动物模型。左归丸防治 OP 的效用评价,包括酶联免疫吸附测定实验检测骨吸收标记物和骨形成标记物含量,双能 X 射线检测骨密度,显微 CT 分析骨小梁数量、骨小梁分离度、骨小梁厚度、骨体积/组织体积比以及骨表面/体积比,以衡量骨微结构水平,苏木精-伊红染色法观察骨病理形态,生物力学实验测试骨最大载荷力等生物力学特性。OP 动物模型的成功与否,以及左归丸的药效作用,必须与 5 种不同的客观评价方法结合起来进行综合衡量,才能为左归丸的基础和临床研究提供科学的参考依据。但 OP 动物模型有待进一步优化,以凸显左归丸治疗 OP 的中医病机和证候特征。

**[关键词]** 左归丸; 骨质疏松; 动物模型; 评价方法

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0016-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191525

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190417.1350.021.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-18 15:48

## Review of Zuoguiwan on Animal Models and Evaluation in Prevention and Treatment of Osteoporosis

LIU Fei-xiang<sup>1</sup>, LIN Zi-xuan<sup>1</sup>, XU Dao-ming<sup>2</sup>, YE Su-min<sup>1</sup>, ZHANG Ming-yue<sup>1</sup>, FAN Qiao-ling<sup>1\*</sup>,  
TAN Feng<sup>1\*</sup>, LI Xing<sup>1</sup>, CHAI Yi<sup>1</sup>, SHANG Wen-bin<sup>1</sup>, LU Sheng-feng<sup>1</sup>

(1. College of Basic Medicine, First School of Clinical Medicine, Key Laboratory of Acupuncture and Medicine Research Under Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;  
2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Zuoguiwan is a classic prescription for replenishing vital essence, tonifying kidney-Yin and nourishing the bone marrow. Zuoguiwan is one of the effective prescriptions for the prevention and treatment of osteoporosis (OP), which reflects the thought of Reinforcing Yang from Yin. The OP animal model simulates the pathological state and pathogenesis of OP in human, which is an important means to research the pathogenesis of OP and verify the effect of drugs. In this paper, two kinds of animal models and characteristics of Zuoguiwan in the

**[收稿日期]** 20190118(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573874,81873229);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(18KJB360006);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX18\_1525)

**[第一作者]** 刘飞祥,博士,从事中药复方的药效机制及配伍规律研究,E-mail:1353336582@qq.com

**[通信作者]** \* 樊巧玲,博士,教授,从事中药复方的药效机制及配伍规律研究,E-mail:fjxql@163.com;

\* 谭峰,博士,讲师,从事中药复方的药效机制及配伍规律研究,E-mail:ver-1978@163.com

prevention and treatment of osteoporosis were discussed in details. They are the primary osteoporosis animal models, including ovariectomized animal models and spontaneous elderly osteoporosis animal models, and the secondary osteoporosis models, including glucocorticoid-induced animal models, cyclophosphamide-induced animal models and subtotal nephrectomy animal models. The evaluation methods of Zuoguiwan in preventing and treating OP, including bone absorption markers and bone formation markers analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), bone mineral density detected with dual-energy X-ray, the number of trabeculae, trabecular segregation, trabecular thickness, bone volume/tissue volume ratio and bone surface/volume ratio analyzed using micro-CT, bone pathological morphology observed by hematoxylin-eosin staining, bone biomechanical properties, such as the maximum load force based on biomechanical test. In order to provide scientific reference for the basic and clinical research of Zuoguiwan, the OP animal models and the pharmacodynamic effect of Zuoguiwan are evaluated comprehensively with five different and objective evaluation methods. However, the animal model of OP needs to be further optimized to highlight the pathogenesis and syndrome characteristics of Zuoguiwan in the treatment of OP.

**[Key words]** Zuoguiwan; postmenopausal osteoporosis; animal models; evaluation methods

骨质疏松(OP)是一种全身性骨骼疾病,其特征是骨量减少和骨宏观、微观结构改变,骨折风险增加,其中女性绝经后或伴随年龄而发生的OP称为原发性OP,因疾病或者药物引起的称为继发性OP<sup>[1]</sup>。OP易导致髋部骨折,其并发率和死亡率高,严重威胁了患者的生命健康和生活质量<sup>[2-3]</sup>。根据中国卫生部2003—2006年的调查,中国大陆地区50岁以上人群当中大约有15.7%(男性8.8%,女性30.8%)患有OP,而到2015年我国OP的患病率已上升到17.96%,随着我国社会进入人口老龄化阶段,本病的发病率将继续升高,会对我国医疗和社会经济的发展带来沉重的负担<sup>[4-5]</sup>。因此,通过采取多种方法,建立OP动物模型,模拟OP在人体的病理状态和发病机制,对于OP的防治和新药的研发具有重要的意义。

骨吸收抑制剂、骨形成刺激剂及他汀类药物是目前临床上常用的三类抗OP药物,这些药物在OP的治疗和预防中发挥了重要作用,但其费用昂贵、靶点单一、副作用较大等问题限制其在临床中的长期使用<sup>[6-7]</sup>。因而寻找多靶点,副作用较少,费用低廉的药物成为新的研究热点。传统中药多来源于天然植物,以其副作用较少,便于长期服用而被用于OP的预防和治疗<sup>[8]</sup>。左归丸出自《景岳全书·新方八阵》,由熟地黄、山药、枸杞子、山萸肉、川牛膝、鹿角胶、龟板胶、菟丝子8味药物经粉碎,炼蜜为丸而成,具有滋阴补肾,填精益髓的作用,治疗“真阴肾水不足,不能滋养营卫,渐至衰弱,或虚热往来,自汗盗汗,或神不守舍,血不归原,或虚损伤阴,或遗淋不禁,或气虚昏运,或眼花耳聋,或口干舌干,或腰酸

腿软,凡精髓内亏、津液枯涸”等证<sup>[9]</sup>。相关实验研究表明,左归丸能够改善骨量,延缓骨钙流失以防治OP<sup>[10-12]</sup>。本文系统地总结左归丸近年来在OP动物模型和效用评价方面的研究进展,旨在为今后对左归丸的药物作用机制研究提供科学的理论和实验参考依据。

## 1 动物模型

OP的动物模型,是通过特定的方法处理实验动物,引起其骨量下降,从而发生原发性OP或继发性OP,是研究骨量变化的生理、病理和抗OP药物作用机制的重要依据<sup>[13]</sup>。据统计,目前研究OP常用的动物模型主要有四大类型,即激素干预型、废用型、营养型和其他类型的OP动物模型<sup>[14]</sup>。其中激素干预型OP模型包括去势法、切断下丘脑垂体法、切除甲状腺法、糖皮质激素诱导法以及布舍瑞林诱导法等;局部废用型OP模型包括单侧肢体废用性模型、悬吊模型、钢板或螺钉内固定未骨折的骨骼诱发的OP模型以及石膏绷带固定诱导OP模型等;营养缺陷型OP模型包括低钙饮食诱发的OP动物模型和低钠诱导的OP模型;其他类型的OP动物模型包括维甲酸诱发的OP模型、链脲佐菌素诱发的OP模型和联合造模法诱发的OP动物模型等。不同的造模方法模拟的OP发生机制不同,因而动物模型需要根据药物效用特点进行选择。目前研究左归丸治疗OP分子机制的模型主要采用去卵巢型、自发性老年型、糖皮质激素诱导型、环磷酰胺诱导型以及肾大部切除型(图1)。

### 1.1 原发性骨质疏松症大鼠模型

**1.1.1 去势型** 去势法大鼠OP模型,是将雌性

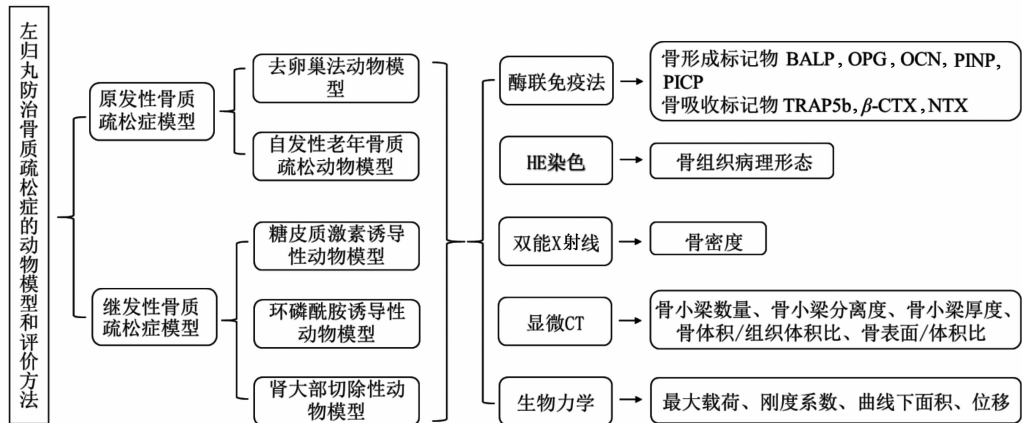


图 1 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法

Fig. 1 Animal models and evaluation of Zuoguiwan in prevention and treatment of osteoporosis

大鼠双侧卵巢或雄性大鼠双侧睾丸切除,造成激素绝对缺乏,形成骨吸收大于骨形成的高转换型的 OP 模型,这一模型与人 OP 发生的病理改变非常相似<sup>[15-17]</sup>。

LIU 等<sup>[18]</sup>对去卵巢摘除大鼠骨组织中骨硬化素(SOST),细胞外因子(Wnt),细胞膜上共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(LRP5/6),β-连环蛋白(β-catenin)的观察,发现大鼠骨中 SOST 蛋白表达升高,Wnt-LRP5/6-β-catenin 信号通路不受抑制,而给予左归丸治疗,可显著抑制 SOST 的表达,加强 Wnt 的信号,增加其与 LRP5/6 受体结合,抑制 β-catenin 不被降解,进而提高骨量。LIU 等<sup>[19]</sup>观察去卵巢大鼠骨密度(BMD)以及海马和胫骨组织中 β<sub>2</sub>-肾上腺素能受体(β<sub>2</sub>AR),核转录因子-κB 受体激活因子配体(RANKL)和骨保护素(OPG)mRNA 和蛋白的表达,发现大鼠卵巢去除后,骨量下降,海马和骨组织中 OPG mRNA 和蛋白表达下降,β<sub>2</sub>AR 和 RANKL 蛋白明显升高,经左归丸治疗 12 周后,胫骨组织中 OPG mRNA 和蛋白表达上调,海马组织中 β<sub>2</sub>AR 和胫骨组织中 RANKL mRNA 和蛋白表达水平下调,骨矿含量提高。付小卫<sup>[20]</sup>通过观察不同性别同龄去势大鼠腰椎 BMD 以及胫骨中 RANKL,OPG,Wnt,LRP-5 及 β-catenin 等 mRNA 和蛋白表达的影响,发现去势法都能引起不同性别大鼠发生 OP,但雄性大鼠的骨转换率和骨丢失率明显高于雌性大鼠,二者胫骨中 RANKL,Wnt,LRP-5,β-catenin mRNA 和蛋白表达均显著提高,OPG 表达明显下降,给予左归丸治疗后,去卵巢大鼠 BMD 有明显的改善,胫骨中 RANKL,Wnt,LRP-5,β-catenin mRNA 和蛋白表达显著降低,OPG 表达明显提高,但雄性去势大鼠 BMD 以及上述关键因子未见明显变化,

说明左归丸更适合于治疗雌激素缺乏型 OP。

**1.1.2 自发型** 自发性老年型 OP 动物模型是通过常规饲养,使受试动物自然生长到相当于人类老年阶段(60~65 岁以上),从而完全模拟老年 OP 患者病理机制,自发形成低骨矿含量和低骨强度状态的一种动物模型<sup>[21]</sup>。此外,快速衰老小鼠 6(SAMP6)也是目前国际上较为常用的老年 OP 自发性动物模型,该模型通过基因突变而引起,导致骨髓中对成骨细胞的形成具有负向调节作用的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 升高,从而引起皮质骨和松质骨形成减少和骨折风险增加<sup>[22-23]</sup>。

李琳<sup>[24]</sup>通过对老年大鼠海马组织中跨膜受体-1(Notch-1),Wnt 及细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)蛋白的观察,发现左归丸老年大鼠海马组织中 Notch-1,Wnt 及 ERK1/2 的蛋白表达明显下调,而经左归丸治疗 4 个月,能显著上调 Wnt,Notch-1,ERK1/2 蛋白的表达。而 Wnt-LRP5/6/β-catenin 是成骨细胞分化的关键信号通路,c-Jnk 氨基末端激酶(JNK)/丝裂原活化蛋白激酶(MARK)/细胞外信号调节激酶(ERK)也是调节骨量、促进骨形成的最重要信号转导途径之一<sup>[25-29]</sup>。

**1.2 继发性骨质疏松症模型**

**1.2.1 糖皮质激素诱导型** 糖皮质激素诱导性 OP 动物模型是通过每周皮下注射地塞米松,连续给药 1 个月后,引起大鼠骨吸收增加,骨形成减少,骨矿含量水平下降的一种继发性 OP 模型<sup>[30-31]</sup>。该模型发生的病理机制主要在于糖皮质激素能通过氧化还原的途径影响破骨细胞和成骨细胞的分化和凋亡,调节 Wnt/LRP5/6/β-catenin 和 OPG/RANKL/RANK 信号通路,从而抑制骨形成,促进骨吸收,引起 BMD 下降,导致 OP 的发生<sup>[32-34]</sup>。

刘梅洁等<sup>[35]</sup>通过观察糖皮质激素诱导性大鼠 OP 模型中的血清中骨钙素 (BGP) 和促生长因子 (IGF-I) 的含量,发现其大鼠血清中骨形成标记物 BGP, IGF-I 含量明显下降,通过左归丸灌胃 2 个月,大鼠血清中 BGP, IGF-I 含量显著升高。张志达等<sup>[36]</sup>对糖皮质激素性大鼠 OP 模型中 BMD 以及骨中 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 和 Runt 转录因子 2 (Runx2) mRNA 的表达,发现其骨量减少, DKK1 mRNA 表达明显上调而 Runx2 mRNA 表达显著下调,使用左归丸治疗后,大鼠骨矿含量明显增加, DKK1 mRNA 表达显著下调, Runx2 mRNA 表达明显上调。DKK1 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路具有抑制作用,糖皮质激素可诱导其表达升高。因此,左归丸改善糖皮质激素性 OP 模型的作用机制可能与促进骨形成,减少骨吸收,抑制 DKK1 基因的表达有关。

**1.2.2 环磷酰胺诱导型** 环磷酰胺 (CPD) 诱导性 OP 模型,是通过腹腔注射 CPD,模拟肿瘤或自身免疫性疾病患者在长期、大量使用 CPD 后,从而引起的血清钙、磷下降,骨吸收增加,骨量减少,骨显微结构损坏严重,骨折风险增高的继发性 OP<sup>[37]</sup>。CPD 是目前常用的抗肿瘤药物,其能有效抑制肿瘤细胞的增殖,提高癌症患者的生存率<sup>[38-39]</sup>。然而,现有证据表明,接受 CPD 治疗的癌症患者,会出现性腺功能的减退和卵巢功能的衰竭,引起男性雄激素水平以及女性雌激素水平下降,从而导致骨小梁和皮质骨出现 OP 的特征<sup>[40]</sup>。此外,CPD 通过促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化、抑制其向成骨细胞方向分化,调节 RANKL/OPG,从而减少骨形成,促进骨吸收,降低 BMD,引起 OP 的发生<sup>[41]</sup>。

刘政<sup>[42]</sup>对 CPD 诱导的 OP 大鼠模型中血清钙、磷和 BMD 等指标进行观察,发现其血钙、磷以及骨量明显减少,使用左归丸治疗 1 个月后,环磷酰胺诱导性大鼠 OP 模型血清中钙、磷代谢得到改善, BMD 水平提高。彭慧娟等<sup>[43]</sup>通过对 CPD 致卵巢早衰大鼠卵巢中凋亡前体蛋白 (Bax), 细胞色素 C (cyt-C) 及抗凋亡蛋白 (Bcl-2) mRNA 和蛋白的研究,发现 Bax, cyt-C mRNA 和蛋白表达水平明显升高, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显下降,给予左归丸治疗可显著降低 CPD 致卵巢早衰大鼠卵巢中 Bax, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显,提高线粒体通路相关的 cyt-C mRNA 和蛋白表达水平,从而改善 CPD 对大鼠卵巢的毒性作用。由此可见,左归丸改善 CPD 致 OP 大鼠的 BMD 水平,其作用机制可能与对卵巢中 Bax, Bcl-2, cyt-C mRNA 和蛋白的调节有关。

**1.2.3 肾大部切除型** 肾大部切除性大鼠 OP 模型,是通过保留肾门部位,先完全切除大鼠一侧肾脏,然后一周后切除另一侧约 2/3 的肾组织,2 次术后 1 周予高磷饮水,4 个月后引起骨形成代谢指标下降,骨吸收代谢指标升高,骨陷窝明显增大和骨基质中 I 型胶原减少的一种继发性 OP 模型<sup>[44]</sup>。该模型模拟慢性肾衰竭患者肾单位进行性损坏,肾功能持续下降导致的钙、磷代谢紊乱和 BMD 下降。同时,该模型会继发引起甲状旁腺功能亢进,从而造成骨形成减少而骨吸收增加,因此还可以作为甲状旁腺功能亢进引起的 OP 模型<sup>[44-45]</sup>。

王小琴等<sup>[46]</sup>对肾大部切除 OP 模型大鼠中血清全段甲状旁腺激素 (PTH), 钙, 磷和骨碱性磷酸酶 (BALP), 以及 BMD 等骨指标进行观察,发现造模 4 个月后血清中 PTH, BALP 含量显著升高,血钙、磷含量和 BMD 水平明显下降,左归丸治疗 3 个月后, PTH, BALP 含量明显降低, BMD 显著提高。以上可知,左归丸通过调节钙磷代谢及参与成骨细胞代谢,抑制甲状旁腺激素,从而提高 BMD 水平。

## 2 动物模型和药效评价指标

**2.1 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 实验检测骨转换标记物** 破骨细胞和成骨细胞在调节骨代谢、维持骨形成和骨吸收平衡中起着重要作用<sup>[47]</sup>。BALP 是基质矿化的充分必要条件,是成骨细胞合成和分泌的骨形成特异性和敏感性标志物,其在血清中的含量对成骨细胞的活性具有重要的指示作用<sup>[48]</sup>。BALP 在血中的半衰期较长,且早于骨矿含量等其他指标出现,因此对于 OP 的早起诊断和评估具有较高的参考价值<sup>[49]</sup>。I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) 和 I 型前胶原羧基端前肽 (PICP) 是成骨细胞分泌的 I 型前胶原裂解的片段,血清和尿液中的 PINP 和 PICP 的含量变化,对于成骨细胞的活性判断、抗 OP 药物治疗的效果评价和 OP 的早期诊断具有较高的参考意义<sup>[50-51]</sup>。此外,骨钙素 (OCN) 是参与矿化的重要因素,OPG 也是成骨细胞合成和分泌的骨形成特异性标志物<sup>[52-53]</sup>。

抗酒石酸性磷酸酶 (TRAP5b) 是由破骨细胞释放的骨吸收标志物,对于 OP 的早期诊断和骨折风险的预测具有重要的意义,是评价骨吸收的敏感性指标之一<sup>[54]</sup>。TRAP5b 对于破骨细胞活性的调节和骨代谢有着重要的作用,血清中 TRAP5b 的含量与 BMD 水平呈负相关,TRAP5b 含量越高,预示着破骨细胞活性越强,骨吸收大于骨形成<sup>[55]</sup>。I 型胶原交联羧基末端肽 ( $\beta$ -CTX) 是 I 型胶原在骨代谢中

降解的产物,是破骨细胞活性增强的敏感性指标之一,对于 OP 性骨折的早期预测,尤其是老年 OP 患者骨折风险的判断有重要的监测意义<sup>[56]</sup>。I 型胶原交联氨基末端肽(NTX)是 I 型胶原的特异性降解产物,血清和尿中 NTX 能够反映破骨细胞活性,指示骨吸收的活跃程度,具有较高的敏感性和特异性<sup>[57]</sup>。

ELISA 基本原理是让抗体与酶复合物结合。叶素敏等<sup>[58]</sup>采用 ELISA 观察去卵巢大鼠血清中 TRAP5b,OCN,PINP 水平,发现血清 OCN,PINP 含量明显降低,而 TRAP5b 含量显著提高,经左归丸治疗 3 个月后,血清中骨形成标记物 OCN,PINP 水平明显升高,而骨吸收标记物 TRAP5b 水平明显下降。本课题组通过 ELISA 实验对去卵巢大鼠血清中 BALP,OPG, $\beta$ -CTX,TRAP5b 的含量进行观察,发现左归丸灌胃 3 个月,既能降低大鼠血清中  $\beta$ -CTX 和 TRAP5b 水平,又能提高血清中 BALP,OPG 含量<sup>[19,59]</sup>。卢健华等<sup>[60]</sup>通过采用 ELISA 观察了去卵巢大鼠血中 PINP 和尿液中 I 型胶原氨基末端肽排泄率(NTX/Cr)的含量,发现大鼠血中 PINP 和尿液 NTX/Cr 明显升高,给予左归丸煎剂治疗后,PINP 和 NTX/Cr 含量显著下降。孙月娇等<sup>[61]</sup>通过 ELISA 检测了去势大鼠血清中 PICP 和 OCN 含量,发现 PICP 和 OCN 的含量明显升高,而给予左归丸治疗 4 个月后,PICP 和 OCN 含量明显下降。

**2.2 双能 X 射线和显微 CT 检测骨密度和骨显微结构** 世界卫生组织认为,OP 的诊断应以双能 X 射线吸收法测定的 BMD 与同一性别的正常年轻成人的平均 BMD(骨量峰值)相比所得的平均峰值骨量(T 值)为基础<sup>[1]</sup>。即①  $-1.0 \leq T \text{ 值} \leq +2.5$  为骨量正常;②  $-2.5 < T \text{ 值} < -1.0$  为骨量减少;③  $T \text{ 值} \leq -2.5$  为 OP;④  $T \text{ 值} \leq -2.5$ ,伴有 1 处或多处脆性骨折的严重性 OP<sup>[1]</sup>。虽然 BMD 代表了骨量和强度,是诊断 PMOP 和评估骨折风险的金标准<sup>[62-63]</sup>。然而,更多的研究表明骨强度与 BMD 水平并非完全相关<sup>[48]</sup>,而越来越多的研究认为骨小梁显微结构可作为预测 PMOP 骨丢失和结构恶化的决定性参数<sup>[64]</sup>。BMD 联合骨显微 CT,可使骨强度和骨折风险预测值的准确度提高 15%<sup>[64]</sup>。

谭峰等<sup>[10]</sup>通过观察去卵巢大鼠 BMD,发现大鼠去势 10 周后股骨上段及整体 BMD 水平显著下降,而给予左归丸治疗 10 周后,大鼠 BMD 水平显著提高。刘政<sup>[42]</sup>对环磷酸胺致 OP 大鼠 BMD 以及骨微结构进行研究,发现其骨量明显减少,骨小梁显微

结构损坏严重,而使用左归丸治疗 1 个月后,大鼠骨量显著提高,骨小梁数目增加,骨小梁分离度减小,骨小梁显微结构得到改善。LIU 等<sup>[19]</sup>通过观察去卵巢大鼠股骨 BMD 和松质骨显微结构,发现大鼠去势 2 个月后,其 BMD 水平明显下降,骨显微结构破坏严重,而左归丸治疗 3 个月后,大鼠 BMD,骨小梁数目,骨小梁厚度和骨体积/组织体积比显著提高,骨表面/体积比和骨小梁分离度明显下降,骨小梁显微结构有显著的改善。

**2.3 苏木精-伊红(HE)染色法观察骨病理形态** HE 染色法是石蜡切片技术里常用的染色法之一,常用于组织、胚胎和病理研究<sup>[65]</sup>。骨组织由黏多糖和蛋白纤维构成的有机质及沉积于其中的无机盐组成,无机盐主要是羟基磷灰石结晶,其中大部分为磷酸钙和碳酸钙。HE 染色能较好保存骨及骨髓组织中的组织和细胞结构,是评价骨及骨髓组织病理学改变的良好方法。

卢健华等<sup>[66]</sup>通过 HE 染色分析去卵巢大鼠腰椎骨形态,发现大鼠腰椎平均骨小梁厚度变薄,骨小梁体积百分比减少,骨小梁矿化沉积率和单位骨小梁周长骨形成率明显增加,而给予左归丸治疗 12 周,大鼠腰椎平均骨小梁厚度显著变厚,骨小梁体积百分比明显增加,骨小梁矿化沉积率和单位骨小梁周长骨形成率显著减少。王如然等<sup>[67]</sup>通过 HE 染色观察去卵巢大鼠骨病理形态变化,发现其股骨皮质骨变薄,骨髓腔变空,松质骨骨小梁厚度变薄,分离度增大,骨空泡增多,部分骨小梁断裂增多,排列顺序紊乱,而左归丸治疗 10 周后,大鼠骨小梁厚度和数量增加,分离度减小,骨空泡数量减少,骨小梁排列相对整齐。

**2.4 生物力学测试仪检测骨生物力学** 生物力学实验,是检测骨骼力学强度变化的重要手段,而其中极限载荷、刚度、能量吸收以及杨氏模量均影响骨脆性<sup>[68]</sup>。卵巢切除后,大鼠的股骨干最大载荷、刚度、最大压强、以及弹性模量均显著下降。

董苗森<sup>[69]</sup>通过力学测试观察大鼠去卵巢 3 个月后的骨生物力学特性,发现其股骨头最大载荷力明显降低,而经左归丸联合大鼠运动训练治疗 3 个月后,其股骨头最大载荷力明显增加,骨生物力学特性得到显著改善。

### 3 结语

随着医学科学技术的进步,OP 的模型建立方法和评价指标将不断创新和完善,这将对于 OP 的发病机制和新药的药效评价提供良好的支持和依据。

但需要指出的是,OP 的中医证候包括肝肾亏虚、脾肾阳虚、气血两虚、气滞血瘀等,左归丸滋阴补肾、填精益髓的作用更偏向于治疗肝肾阴亏型 OP,而卵巢摘除后的大鼠其 OP 的中医证型特点是否完全符合肝肾阴虚特点,仍需要足够的论证支持。此外,去势法主要用于衡量激素类药物对骨的作用机制,而目前左归丸是否具有植物雌激素样作用尚存在分歧。因此,如何突出左归丸治疗 OP 的中医效用特征,建立更加适宜的突出左归丸方药特点的 OP 模型是未来研究的重要方向。

[参考文献]

[1] Rossini M, Adami S, Bertoldo F, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis [J]. *Reumatismo*, 2016,68(1):1-39.

[2] Muhammad A, Mada S B, Malami I, et al. Postmenopausal osteoporosis and breast cancer: The biochemical links and beneficial effects of functional foods[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018,107:571-582.

[3] Ichimaru R, Tominari T, Yoshinouchi S, et al. Raloxifene reduces the risk of local alveolar bone destruction in a mouse model of periodontitis combined with systemic postmenopausal osteoporosis [J]. *Arch Oral Biol*, 2018,85:98-103.

[4] YU F, XIA W. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China[J]. *Arch Osteoporos*, 2019,14(1):32.

[5] PENG C, LI Z, HU Y. Prevalence of osteoporosis in China: a Meta-analysis and systematic review[J]. *BMC Public Health*, 2016,16(1):1039-1050.

[6] CHEN H, WU M, KUBO K Y. Combined treatment with a traditional Chinese medicine, Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) and alendronate improves bone microstructure in ovariectomized rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012,142(1):80-85.

[7] Black D M, Greenspan S L, Ensrud K E, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2003,349(13):1207-1215.

[8] CHENG M, WANG Q, FAN Y, et al. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011,138(2):279-285.

[9] 张景岳. 景岳全书[M]. 李继明,王大淳整理. 北京:中国中医药出版社,2011:1283-1284.

[10] 谭峰,樊巧玲,卞玉群,等. 左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响[J]. 中国实

验方剂学杂志,2015,21(9):137-140.

[11] 李然,黄瀚,刘立萍,等. 左归丸对去卵巢大鼠骨组织降钙素受体蛋白表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018,36(12):2993-2995.

[12] 谭彪,孙瑗,杨世鹏. 左归丸加减内服配合玻璃酸钠关节内注射治疗肝肾亏虚型膝关节炎近期疗效观察[J]. *中国社区医师*,2018,34(22):81-82.

[13] Minne H W, Pfeifer M, Hinz C. Osteoporosis--mode or disease [J]. *Med Klin: Munich*, 2004, 99 ( 11 ): 663-670.

[14] 郭鱼波,马如风,王丽丽,等. 骨质疏松动物模型及其评价方法的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*,2015,21(9):1149-1154.

[15] 鞠大宏,张春英,王安民,等. 左归丸对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的治疗作用[J]. *中国中医基础医学杂志*,2001,7(3):17-20.

[16] 黄宏兴,柴生颢,黄红,等. 骨质疏松症中医证型的聚类分析[J]. *广州中医药大学学报*,2007,24(3):180-183,187.

[17] Chow S K, Leung K S, QIN J, et al. Mechanical stimulation enhanced estrogen receptor expression and callus formation in diaphyseal long bone fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic rats[J]. *Osteoporos Int*,2016,27(10):2989-3000.

[18] LIU M J, LI Y, PAN J H, et al. Effects of Zuogui pill (左归丸) on Wnt signal transduction in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011,31(2):98-102.

[19] LIU F, TAN F, TONG W, et al. Effect of Zuoguiwan on osteoporosis in ovariectomized rats through RANKL/OPG pathway mediated by  $\beta_2AR$  [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2018, 103:1052-1060.

[20] 付小卫. 基于破骨细胞和成骨细胞调控通路探讨左、右归丸对不同性别去势大鼠骨质疏松症的作用差异及其机制[D]. 北京:中国中医科学院,2014.

[21] Jilka R L, Weinstein R S, Takahashi K, et al. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(7):1732-1740.

[22] Azuma K, ZHOU Q, Kubo K Y. Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6) [J]. *Med Mol Morphol*, 2018, 51(3):139-146.

[23] CHEN H, Shoumura S, Emura S. Ultrastructural changes in bones of the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19:677-685.

[24] 李琳. 衰老海马 Notch、Wnt 和 MAPK 信号通路的关键

- 蛋白表达变化及补肾方作用机理研究[D]. 郑州:河南中医药大学,2017.
- [25] 刘梅洁,鞠大宏,赵宏艳,等.“肾主骨”的机理研究—左归丸含药血清对破骨细胞分化调控因子 OPG、RANKL 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(3):184-187,196.
- [26] WANG H, SHAN X B, QIAO Y J. PDK2 promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by upregulation of Sox6 and activation of JNK/MAPK/ERK pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(2):e5988.
- [27] HU Y, CHAN E, WANG S X, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation[J]. *Endocrinology*, 2003,144(5):2068-2074.
- [28] 刘立萍,任艳玲,李然,等.左归丸含药血清通过 p38 MAPK 信号通路诱导 MC3T3-E1 成骨细胞的分化[J]. 中国老年学杂志,2013,33(7):1579-1581.
- [29] 刘立萍,任艳玲,李然,等. JNK 通路对左归丸含药血清调控 MC3T3 成骨细胞 Runx2 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):143-146.
- [30] ZHANG Z, REN H, SHEN G, et al. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis; an updated review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 438-446.
- [31] ZHAO J, LI Y, ZHANG H, et al. Preventative effects of metformin on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, doi: 10. 1007/S00774-019-00989-y.
- [32] DING Z, SHI H, YANG W. Osteoprotective effect of cimracemate in glucocorticoid-induced osteoporosis by osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B / receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand signaling [J]. *Pharmacology*, 2019, 103 ( 3/4 ): 163-172.
- [33] LIU Y, ZUO G, MENG X, et al. Adrenomedullin inhibits osteoclast differentiation through the suppression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 ( 5 ): 4009-4016.
- [34] Wolski H, Drews K, Bogacz A, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis[J]. *Ginekol Pol*, 2016,87(5):347-352.
- [35] 刘梅洁,潘静华,李艳,等.左归丸对糖皮质激素所致骨质疏松大鼠血清中 BGP, IGF- I 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):133-136.
- [36] 张志达,任辉,沈耿杨,等.左归丸调控 DKK1 靶点防治糖皮质激素性骨质疏松[J]. 中国组织工程研究, 2018,22(16):2520-2525.
- [37] Saarto T, Blomqvist C, Välimäki M, et al. Chemical castration induced by adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy causes rapid bone loss that is reduced by clodronate: a randomized study in premenopausal breast cancer patients[J]. *J Clin Oncol*, 1997,15(4):1341-1347.
- [38] Murphy C, Muscat A, Ashley D, et al. Tailored NEOadjuvant epirubicin, cyclophosphamide and nanoparticle albumin-bound paclitaxel for breast cancer: The phase II NEONAB trial-clinical outcomes and molecular determinants of response [J]. *PLoS One*, 2019,14(2):e0210891.
- [39] Sugita J, Kagaya Y, Miyamoto T, et al. Myeloablative and reduced-intensity conditioning in HLA-haploidentical peripheral blood stem cell transplantation using post-transplant cyclophosphamide [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54(3):432-441.
- [40] PEI Y, ZHENG K, SHANG G, et al. Therapeutic effect of strontium ranelate on bone in chemotherapy-induced osteopenic rats via increased bone volume and reduced bone loss[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 187(2): 472-481.
- [41] ZHAO D, WANG C, ZHAO Y, et al. Cyclophosphamide causes osteoporosis in C57BL/6 male mice: suppressive effects of cyclophosphamide on osteoblastogenesis and osteoclastogenesis [J]. *Oncotarget*, 2017,8(58):98163-98183.
- [42] 刘政.环磷酰胺致骨质疏松大鼠模型的建立及左归丸的防治作用[D]. 广州:暨南大学,2015.
- [43] 彭慧娟,朱玲,许丽绵,等.左归丸对环磷酰胺卵巢早衰大鼠卵巢 Bax, Bcl-2 及 Cyt-c 的影响[C]//中国中西医结合学会妇产科专业委员会. 第9届中国中西医结合学会妇产科专业委员会第二次学术会议论文集. 昆明,2017:8-10.
- [44] 周家俊,关鑫,赵东.部分肾切除加高磷饮食所致大鼠肾性骨病模型研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2002(10):567-569.
- [45] 袁军,王小琴,马晓红,等.左归丸对 5/6 肾大部切除模型并肾性骨病大鼠甲状旁腺的影响[J]. 中医学报,2013,41(1):76-79.
- [46] 王小琴,袁军,马晓红,等.左归丸对 5/6 肾大部切除模型并肾性骨病大鼠骨代谢指标的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(7):584-586.
- [47] LONG F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,

- 2011,13(1):27-38.
- [48] Gomes A M, Douglas-de-Oliveira D W, Ferreira S D, et al. Periodontal disease, peri-implant disease and levels of salivary biomarkers IL-1 $\beta$ , IL-10, RANK, OPG, MMP-2, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ : follow-up over 5 years[J]. J Appl Oral Sci, 2019,27:e20180316.
- [49] LI B, Boast S, Kenia de los S, et al. Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation[J]. Nat Genet, 2000,24(3):304-308.
- [50] Burshell A L, Mörnicke R, Correa-Rotter R, et al. Correlations between biochemical markers of bone turnover and bone density responses in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate[J]. Bone, 2010, 46(4): 935-939.
- [51] Glover S J, Eastell R, McCloskey E V, et al. Rapid and robust response of biochemical markers of bone formation to teriparatide therapy[J]. Bone, 2009,45(6):1053-1058.
- [52] Akbari Moghaddam Kakhki R, LU Z, Thanabalan A, et al. Eimeria challenge adversely affected long bone attributes linked to increased resorption in 14-day-old broiler chickens [J]. Poult Sci, 2019, 98(4): 1615-1621.
- [53] Kim S K, Lee M H, Rhee M H. Studies on the effects of biomedicinal agents on serum concentration of Ca<sup>2+</sup>, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats[J]. J Vet Sci, 2003,4(2):151-154.
- [54] YAO H H, TANG S M, WANG Z M, et al. Study of bone mineral density and serum bone turnover markers in newly diagnosed systemic lupus erythematosus patients[J]. J Peking Univ Health Sci, 2018,50(6): 998-1003.
- [55] Hatate K, Kayano M, Kawashima C, et al. The effect of colostrum intake on osteoprotegerin and bone metabolic markers in the blood of newborn calves during the first week of life[J]. J Vet Med Sci, 2019,81(1):15-21.
- [56] PAN C, LIU X, LI T, et al. Kinetic of bone turnover markers after osteoporotic vertebral compression fractures in postmenopausal female [J]. J Orthop Surg Res, 2018,13(1):314.
- [57] Rief H, Omlor G, Akbar M, et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with spinal metastases after resistance training under radiotherapy-a randomized trial [J]. BMC Cancer, 2016,16:231.
- [58] 叶素敏,谭峰,刘飞祥,等. 左归丸对去卵巢大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191021.
- [59] 童伟伟. 基于补肾益髓理论探讨左归丸防治 PMOP 的疗效机制[D]. 南京:南京中医药大学,2018.
- [60] 卢建华,王维佳,储小兵,等. 补肾方对去卵巢大鼠 I 型胶原代谢的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(7):1109-1111.
- [61] 孙月娇,任艳玲,曲宁宁,等. 左、右归丸及其拆方对去卵巢骨质疏松模型大鼠的比较研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(8):910-913, 921.
- [62] 李泽钊,邓建强. 地仲强骨胶囊治疗肾虚兼气血不足型骨质疏松症的疗效及对骨代谢、骨转化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(8):159-164.
- [63] Kanis J A, Cooper C, Rizzoli R, et al. Review of the guideline of the American College of Physicians on the treatment of osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2018,29(7):1505-1510.
- [64] Hanson N A, Bagi C M. Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography[J]. Bone, 2004,35(1):326-333.
- [65] 刘晓,于文涛,靳贺超,等. 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):96-102.
- [66] 卢建华,王维佳,陈明涛,等. 补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响[J]. 中医正骨,2011,23(5): 24-26.
- [67] 王如然,冯艳华,张玉杰,等. 左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松模型大鼠的效用[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(3):1104-1109.
- [68] Massie A M, Kapatkin A S, Garcia T C, et al. Effects of hole diameter on torsional mechanical properties of the rabbit femur[J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2019, 32(1):51-58.
- [69] 董苗淼. 运动配合左归丸对去卵巢大鼠骨生物力学及相关激素的影响[D]. 上海:上海体育学院,2010.

[责任编辑 张丰丰]