益肾补骨汤对骨质疏松症大鼠骨形成和一氧化氮-环磷酸鸟苷信号通路的影响[Δ]

王勤俭*,张睿昕#(河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院骨病二科,郑州 450000)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)01-0021-06
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.01.004

摘 要 目的:探究益肾补骨汤对骨质疏松症大鼠骨形成及一氧化氮-环磷酸鸟苷(NO-cGMP)信号通路的影响。方法:采用摘除双侧卵巢法建立绝经后骨质疏松症(PMOP)SD 大鼠模型,将大鼠按照随机数字表法分为假手术组(sham 组)、PMOP 大鼠模型组(PMOP 组),益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组(分别给予益肾补骨汤 2、4 和 8 mL/kg 灌胃干预),以及阳性对照组(给予戊酸雌二醇灌胃干预)。比较各组大鼠术前和术后体重,观察各组大鼠一般状态,采用酶联免疫吸附试验检测血清中总碱性磷酸酶(TALP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)含量,双能 X 线检测大鼠骨密度,苏木精-伊红染色检测大鼠股骨组织形态学变化,分别用分光光度计法和放射免疫法检测大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量;采用蛋白质印迹法检测股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达。结果:与 sham 组相比,PMOP 组大鼠体重明显降低($P<0.05$);与 PMOP 组相比,益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组大鼠体重明显升高($P<0.05$),差异均有统计学意义。PMOP 组大鼠血清 TALP 含量和股骨 BMD 低于 sham 组,血清 TRAP 含量高于 sham 组($P<0.05$);益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组血清 TALP 含量和股骨 BMD 高于 PMOP 组,血清 TRAP 含量低于 PMOP 组($P<0.05$),且具有浓度依赖性,差异均有统计学意义。益肾补骨汤 H 组和阳性对照组大鼠血清 TALP、TRAP 含量和股骨 BMD 的差异无统计学意义($P>0.05$)。与 sham 组比较,PMOP 组大鼠骨小梁间隙变大不规则,粗细不均匀,骨小梁表型更薄;与 PMOP 组比较,益肾补骨汤 L 组、M 组、H 组以及阳性对照组大鼠骨小梁间隙均不同程度变小,且骨小梁粗细均匀且逐渐规则。与 sham 组比较,PMOP 组股骨组织中 NO、cGMP 含量明显升高($P<0.05$);益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量低于 PMOP 组($P<0.05$),差异均有统计学意义。与 sham 组比较,PMOP 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达明显降低($P<0.05$);益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达明显高于 PMOP 组($P<0.05$),且呈剂量依赖性,差异均有统计学意义。结论:益肾补骨汤可促进 PMOP 大鼠骨形成,可能是通过抑制 NO-cGMP 信号通路抑制骨吸收。

关键词 益肾补骨汤; 骨质疏松症; 骨形成; 一氧化氮-环磷酸鸟苷信号通路

Effects of Yishen Bugu Decoction on Bone Formation and Nitric Oxide-Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Pathway in Osteoporotic Rats[Δ]

WANG Qinjian, ZHANG Ruixin (Dept. of Osteopathy, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the effects of Yishen Bugu decoction on bone formation and nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate (NO-cGMP) signaling pathway in osteoporotic rats. METHODS: The SD rat model of postmenopausal osteoporosis (PMOP) was established by removing both ovaries. According to the random number table method, the rats were divided into the sham operation group (sham group), PMOP rat model group (PMOP group), Yishen Bugu decoction L group, M group and H group (treated with Yishen Bugu decoction 2, 4 and 8 mL/kg by gavage, respectively), and positive control group (treated with estradiol valerate by gavage). The preoperative and postoperative body mass of rats in each group were compared, and the general state of rats in each group was observed. The content of total alkaline phosphatase (TALP) and serum anti-tartrate acid phosphatase (TRAP) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Rat bone mineral density was detected by dual-energy X-ray. Hematoxylin and Eeosin staining was used to detect the histomorphological changes of rat femur, and spectrophotometer and radioimmunoassay were used to detect the content of NO and cGMP in rat femoral tissue. The protein expressions of Wnt3a and β-catenin in femur tissue were detected by Western blotting. RESULTS: Compared with the sham group, the body mass of the PMOP group decreased significantly ($P<0.05$); compared with the PMOP group, the

Δ 基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(No. 20-21ZY2120,No. 2019JDZX055)
* 副主任医师,硕士。研究方向:中医药治疗颈肩腰腿痛类疾病。E-mail:lidd1981xj@163.com
# 通信作者:主治医师,硕士。研究方向:中医骨伤。E-mail:250202194@qq.com

body mass of the Yishen Bugu decoction L, M, and H groups increased significantly ($P<0.05$), with statistically significant differences. The serum TALP content and femoral BMD of the PMOP group were lower than those of the sham group, and the TRAP content was higher than that of the sham group ($P<0.05$); the TALP content and femoral BMD in the Yishen Bugu decoction L, M, and H groups were higher than those in the PMOP group, the TRAP content was lower than the PMOP group ($P<0.05$), with concentration-dependent manner, the differences were statistically significant. There was no significant difference in serum TALP, TRAP content and femoral BMD between Yishen Bugu decoction H group and positive control group ($P>0.05$). Compared with the sham group, the trabecular bone space of rats in the PMOP group became larger and irregular, the thickness was uneven, and the trabecular bone phenotype was thinner. Compared with the PMOP group, the trabecular bone gap of the rats in the Yishen Bugu decoction L, M, and H groups and positive control group decreased to varying degrees, and the thickness of the trabecular bone was uniform and gradually regular. Compared with the sham group, the contents of NO and cGMP in the femoral tissue of the PMOP group increased significantly ($P<0.05$); the contents of NO and cGMP in the femoral tissue of Yishen Bugu decoction L, M and H group were lower than those of PMOP group ($P<0.05$), the differences were statistically significant. Compared with the sham group, the expressions of Wnt3a and β-catenin proteins in the femoral tissue of the PMOP group were decreased significantly ($P<0.05$); the expressions of Wnt3a and β-catenin proteins in the femoral tissue of the Yishen Bugu decoction L, M and H group were higher than those of the PMOP group ($P<0.05$), with dose-dependent manner, the differences were statistically significant. CONCLUSIONS: Yishen Bugu decoction can promote bone formation in PMOP rats, possibly by inhibiting the NO-cGMP signaling pathway to inhibit bone resorption.

KEYWORDS Yishen Bugu decoction; Osteoporosis; Bone formation; Nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway

骨质疏松症是临床上常见的全身性疾病,该病患者骨量明显降低,骨微结构受到明显破坏,严重者可导致患者发生骨折[1]。研究结果发现,导致骨质疏松症的危险因素有多种,包括钙摄入量不足、性激素失调、吸烟和饮酒等,其中女性绝经后骨质疏松是重要的危险因素之一[2-4]。绝经后骨质疏松症(postemnopausal osteoporosis,PMOP)是一类全身代谢性骨病,其为绝经妇女因体内的雌激素分泌减少,骨量降低导致骨纤维结构退化,进而发生骨质疏松。目前,临床主要采用降钙素、双磷酸盐、氟化物和维生素 D 等药物治疗骨质疏松症,但由于以上药物的疗效并不十分理想且不良反应显著,因此其在临床的使用受到一定限制[5]。近年来,随着中医理论的不断发展,学者们认为导致 PMOP 的主要因素为肾虚[6]。研究结果发现,益肾补骨汤对促进骨细胞和骨保护素表达、抑制骨吸收有很好的作用[7]。近年来的研究结果表明,一氧化氮/环磷酸鸟苷(NO/cGMP)信号通路介导骨代谢,NO 不仅可抑制破骨细胞骨吸收,还能促进成骨细胞的分化,NO 被成骨细胞释放后可激活鸟苷酸环化酶,进而增加 cGMP 的形成,同时 NO 能通过激活受体Ⅱ型 cGMP 依赖性蛋白激酶的表达,促进成骨细胞分化[8-9]。但关于 NO/cGMP 通路在 PMOP 中的作用机制研究较少,因此,本研究旨在探讨益气补骨汤对 PMOP 大鼠骨形成及 NO/cGMP 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验 60 只 SD 大鼠均购自河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2017-0001。大鼠为 2 个月龄,SPF 级,雌性未生育,体重为 200~240 g。将大鼠饲养在统一的动物房内,保持室内温度为 24~26 ℃,相对湿度为 50%~70%,室内光照 12 h/12 h 循环,每日自由饮水、进食普通饲料。适应性饲养大鼠 7 d。动物实验在我院伦理委员会批准下进行,并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 仪器

TXK4 型离心机(长沙英泰仪器有限公司);双能 X 线骨密度仪[博卓生物科技(上海)有限公司];124 型万分之一分析天平(日本 Shimadzu 公司)。

1.3 药品与试剂

益肾补骨汤由葛根 60 g、山药 30 g、川续断 30 g、穿山甲 30 g、淫羊藿 30 g、补骨脂 30 g、黄芪 30 g、茯苓 20 g、鹿角霜 20 g、熟地黄 15 g、当归 15 g 和红花 10 g 组成;上述中药购于南京药业股份有限公司,由我院制剂室制成水煎液,加水 2 000 mL 浸泡上述药物 2 h,取出药物用水煎煮 40 min,共煎煮 2 次;将 2 次的煎煮液合并并浓缩为 1 g/mL 的溶液,于 4 ℃冰箱冷藏备用。戊酸雌二醇用蒸馏水溶化制备为 0.1 mg/mL 的溶液。Wnt3a、β-catenin 抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(货号:ab54479、ab32572 和 ab6721,美国 Abcam 公司);磷酸缓冲盐溶液(货号:P1020,南京森贝伽生物科技有限公司);NO 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号:BC1475、G1120,北京索莱宝科技有限公司);cGMP ELISA 试剂盒(货号:LM-cGMP-Ge,上海联迈生物工程有限公司)。

1.4 分组与模型制备

将大鼠按照随机数字表法分为六组,即 sham 组、PMOP 组、益肾补骨汤 L 组、益肾补骨汤 M 组、益肾补骨汤 H 组和阳性对照组,各 10 只。各组大鼠均腹腔注射 300 mg/kg 水合氯

醛麻醉,沿大鼠腹部正中线切一 2 cm 的小口,在肋弓脊柱旁 1 cm 处将肌肉切开,将卵巢组织充分暴露在外,取出卵巢组织并将脂肪组织分离,将卵巢下方的输卵管和血管进行结扎;后切除大鼠卵巢组织并固定,缝合大鼠皮肤。sham 组大鼠仅将卵巢暴露后再放回,不切除,逐层缝合皮肤。术后各组大鼠均给予青霉素钠盐 5 万 IU/d 腹腔注射,预防感染,连续注射 3 d。用双能 X 线骨密度仪检测大鼠右侧股骨密度(BMD),判断模型是否制备成功。造模过程中,有 3 只大鼠造模失败,予以补充后进行后续实验。

1.5 给药方法

益肾补骨汤 L 组、益肾补骨汤 M 组和益肾补骨汤 H 组大鼠分别给予益肾补骨汤 2、4 和 8 mL/kg 灌胃干预,阳性对照组大鼠给予戊酸雌二醇 0.09 mg/kg 灌胃干预,sham 组和 PMOP 组大鼠均给予等量的 0.9%氯化钠溶液干预。所有大鼠给药均 1 日 1 次,共给药 12 周。

1.6 标本收集及处理

末次给药后,各组大鼠均禁食 12 h,自由饮水,记录各组大鼠体重变化,观察各组大鼠一般情况的变化,包括精神状态、毛发、活动和大小便等。称量后麻醉各组大鼠,取各组大鼠腹主动脉血,静置 30 min 后离心(3 000 r/min,离心半径 5 cm)5 min,收集上清液,于-80 ℃环境中保存。剥离大鼠双侧股骨,剔除肌肉组织和结缔组织后用 0.9%氯化钠溶液冲洗,固定左侧股骨组织于 10%甲醛溶液中,48 h 后浸泡于 10%硝酸中,待到用缝合针能够刺进骨组织时为脱钙成功。用流水冲洗组织,12 h 后取 1 cm^3 股骨用于制作病理切片。

1.7 ELISA 法检测血清总碱性磷酸酶(TALP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)含量

将“1.6”中保存于-80 ℃冰箱中的血清取出并解冻,用 ELISA 检测试剂盒检测各组大鼠血清 TALP、TRAP 含量。

1.8 BMD 测定

分别取各组大鼠右侧股骨组织,剔除周围的肌肉组织和结缔组织,以 0.9%氯化钠溶液冲洗后用 0.9%氯化钠溶液纱布包裹,用双能 X 线骨密度仪检测各组大鼠的 BMD。将股骨置于双能 X 线骨密度仪探头处进行检测,应用小动物学骨密度测试软件进行股骨颈 BMD 分析。测定完毕后,用湿纱布再次包裹股骨,用保鲜膜将股骨密封,保存于-80 ℃冰箱中,用于后续实验。

1.9 股骨 HE 染色

取“1.6”中 1 cm^3 股骨组织,石蜡包埋,切成厚度为 4 μm 的薄片,将薄片脱水处理后,用苏木精染色 5 min,伊红染色 1 min,再次脱水后透明组织并干燥,最后用中性树脂封片,将股骨组织置于倒置显微镜下观察其形态结构。

1.10 股骨组织中 NO、cGMP 含量测定

取“1.6”中股骨组织,加入蛋白裂解液,将股骨组织置于含有冰冷 0.9%氯化钠溶液的玻璃匀浆器中制成质量分数为 10%的股骨组织匀浆,1 500 r/min,4 ℃离心(离心半径 5 cm)20 min,取上清液。用分光光度计法检测血清中 NO 含量,用放射免疫法测定血清中 cGMP 含量,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.11 蛋白质印迹法检测股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 的表达

取各组大鼠股骨组织,于冰上裂解组织至组织匀浆,离心组织匀浆,用二喹啉甲酸法检测上清液中蛋白浓度。分别配置浓缩胶和分离胶,浓度分别为 5%和 8%,在胶孔中分别加入样品蛋白,电泳 10 min 后转膜。孵育 2 h 后,将 5%封闭液加入到样品中,激活后转移至 PVDF 膜上,封闭 PVDF 膜 1 h。分别加入一抗 Wnt3a、β-catenin 过夜,继续加入 HRP 标记的二抗,继续孵育 2 h。用电化学发光试剂盒检测细胞 PVDF 膜并成像。

1.12 统计学方法

实验数据采用 Graphpad priam 8.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组样本间比较采用两独立样本 t 检验,多组样本间采用单因素方差分析(ANOVA 分析),组间两两比较采用 LSD-t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较

术前,各组大鼠体重的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1、图 1(A)。术后,PMOP 组大鼠行动较 sham 组明显迟缓,活动变少,体毛粗糙无光,食欲降低,部分大鼠存在粪便稀软现象;益肾补骨汤 L、M 及 H 组大鼠以上情况得到改善明显,益肾补骨汤 H 组和阳性对照组大鼠活动状况、体毛、饮食及粪便情况相似。PMOP 组大鼠体重明显低于 sham 组($P<0.05$);益肾补骨汤 L 组、M 组和 H 组大鼠体重明显高于 PMOP 组,且益肾补骨汤 H 组和阳性对照组大鼠体重高于益肾补骨汤 L 组、M 组($P<0.05$),差异均有统计学意义,见图 1(B)。

表 1 各组大鼠实验前体重比较($\bar{x}\pm s$,g)

Tab 1 Comparison of body mass of rats in each group before experiment ($\bar{x}\pm s$,g)

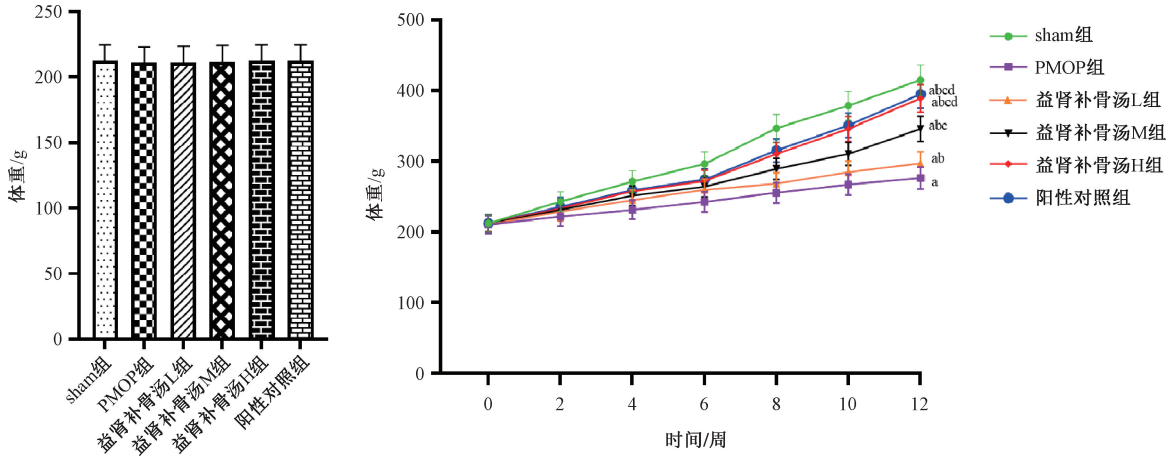
组别	体重
sham 组($n=10$)	212.34±5.62
PMOP 组($n=10$)	215.61±5.42
益肾补骨汤 L 组($n=10$)	218.37±5.57
益肾补骨汤 M 组($n=10$)	216.47±5.51
益肾补骨汤 H 组($n=10$)	219.14±5.38
阳性对照组($n=10$)	214.46±5.53
F	2.084
P	0.081 5

2.2 各组大鼠血清中 TALP、TRAP 含量比较

PMOP 组大鼠血清 TALP 含量明显低于 sham 组,TRAP 含量明显高于 sham 组;益肾补骨汤 L 组、M 组及 H 组大鼠血清 TALP 含量明显高于 PMOP 组,TRAP 含量明显低于 PMOP 组;益肾补骨汤 H 组大鼠血清中 TALP 含量高于益肾补骨汤 L 组、M 组,TRAP 含量低于益肾补骨汤 L 组、M 组,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 各组大鼠 BMD 和股骨组织形态变化比较

与 sham 组相比,PMOP 组大鼠股骨 BMD 降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 PMOP 组相比,益肾补骨汤 L 组、M 组及 H 组 BMD 均不同程度升高,且呈浓度依赖,差异均有统计学意义($P<0.05$);益肾补骨汤 H 组大鼠股骨 BMD 与阳性对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3、图 2(A)。与 sham 组相比,PMOP 组大鼠骨小梁间隙变大不规则,粗细不均匀,骨小梁表型更薄;与 PMOP 组相比,益肾补骨汤 L 组、



A. 各组大鼠实验前体重比较；B. 各组大鼠实验后不同时间体重比较；与 sham 组相比，[a]$P<0.05$；与 PMOP 组相比，[b]$P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，[c]$P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，[d]$P<0.05$

A：*vs.* body mass of rats before experiment；B：*vs.* Body mass of rats at different times after experiment；*vs.* sham group，[a]$P<0.05$；*vs.* PMOP group，[b]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction L group，[c]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction M group，[d]$P<0.05$

图 1　各组大鼠体重比较

Fig 1　Comparison of body mass in rats among different groups

表 2　各组大鼠血清 TALP、TRAP 含量比较（$\bar{x}\pm s$，pg/mL）

Tab 2　Comparison of TALP and TRAP content in rats among different groups（$\bar{x}\pm s$，pg/mL）

组别	TALP	TRAP
sham 组（$n=10$）	150.32±10.47	1 002.45±56.32
PMOP 组（$n=10$）	76.48±5.42[a]	2 148.31±100.47[a]
益肾补骨汤 L 组（$n=10$）	91.35±6.38[ab]	1 816.27±83.51[ab]
益肾补骨汤 M 组（$n=10$）	107.66±7.15[abc]	1 526.25±76.34[abc]
益肾补骨汤 H 组（$n=10$）	132.42±8.32[abcd]	1 217.48±62.16[abcd]
阳性对照组（$n=10$）	135.18±8.46[abcd]	1 226.15±63.42[abcd]
F	127.3	326.1
P	<0.000 1	<0.000 1

注：与 sham 组相比，[a]$P<0.05$；与 PMOP 组相比，[b]$P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，[c]$P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，[d]$P<0.05$

Note：*vs.* sham group，[a]$P<0.05$；*vs.* PMOP group，[b]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction L group，[c]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction M group，[d]$P<0.05$

表 3　大鼠股骨 BMD 比较（$\bar{x}\pm s$，g/cm^2）

Tab 3　Comparison of femur BMD（$\bar{x}\pm s$，g/cm^2）

组别	BMD
sham 组（$n=10$）	0.28±0.03
PMOP 组（$n=10$）	0.21±0.01[a]
益肾补骨汤 L 组（$n=10$）	0.23±0.01[ab]
益肾补骨汤 M 组（$n=10$）	0.26±0.01[abc]
益肾补骨汤 H 组（$n=10$）	0.28±0.02[abcd]
阳性对照组（$n=10$）	0.28±0.02[abcd]
F	16.32
P	<0.000 1

注：与 sham 组相比，[a]$P<0.05$；与 PMOP 组相比，[b]$P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，[c]$P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，[d]$P<0.05$

Note：*vs.* sham group，[a]$P<0.05$；*vs.* PMOP group，[b]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction L group，[c]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction M group，[d]$P<0.05$

M 组、H 组和阳性对照组大鼠骨小梁间隙均不同程度变小，且骨小梁粗细均匀且逐渐规则，见图 2（B）。

2.4　各组大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量比较

与 sham 组相比，PMOP 组股骨组织中 NO、cGMP 含量升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；益肾补骨汤 L 组、M 组及 H 组大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量明显低于 PMOP 组，且随着浓度升高降低越显著，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；益肾补骨汤 H 组与阳性对照组大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量的差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 4。

表 4　各组大鼠股骨组织中 NO、cGMP 含量比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 4　Comparison of NO and cGMP contents in femoral tissue of rats among different groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	NO/（μmol/g）	cGMP/（nmol/g）
sham 组（$n=10$）	2.31±0.18	0.21±0.02
PMOP 组（$n=10$）	4.56±0.35[a]	0.62±0.05[a]
益肾补骨汤 L 组（$n=10$）	3.27±0.31[ab]	0.54±0.04[ab]
益肾补骨汤 M 组（$n=10$）	2.86±0.25[abc]	0.42±0.03[abc]
益肾补骨汤 H 组（$n=10$）	2.53±0.21[abcd]	0.35±0.02[abcd]
阳性对照组（$n=10$）	2.55±0.20[abcd]	0.31±0.02[abcd]
F	103.4	293.2
P	<0.000 1	<0.000 1

注：与 sham 组相比，[a]$P<0.05$；与 PMOP 组相比，[b]$P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，[c]$P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，[d]$P<0.05$

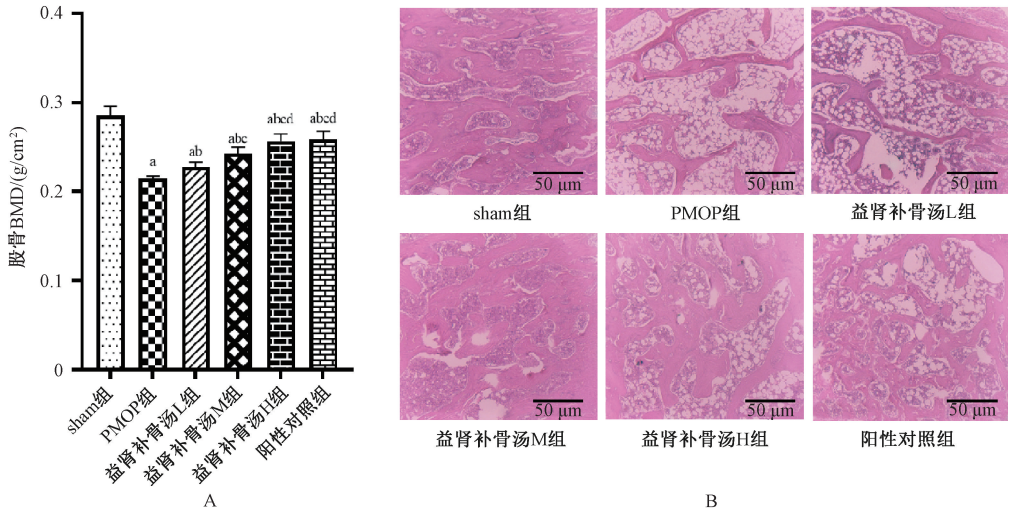
Note：*vs.* sham group，[a]$P<0.05$；*vs.* PMOP group，[b]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction L group，[c]$P<0.05$；*vs.* Yishen Bugu decoction M group，[d]$P<0.05$

2.5　各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达比较

与 sham 组相比，PMOP 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达明显降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；益肾补骨汤 L 组、M 组及 H 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达明显高于 PMOP 组，且呈剂量依赖性，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；益肾补骨汤 H 组与阳性对照组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达的差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 5、图 3。

3　讨论

PMOP 是妇女的常见病，主要由于机体中的雌激素水平降低导致骨量大量丢失所致[10]。激素替代治疗是防止 60 岁以下女性骨质疏松症的一线选择，但对 60 岁及 60 岁以上的女性预防骨质疏松症的治疗不作为首选，主要因为激素替代治疗



A. 各组大鼠股骨 BMD 比较；B. 各组大鼠股骨组织 HE 染色；与 sham 组相比，$^{a}P<0.05$；与 PMOP 组相比，$^{b}P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，$^{c}P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，$^{d}P<0.05$

A. *vs.* femur BMD of rats; B. HE staining of rat femur tissue; *vs.* sham group, $^{a}P<0.05$; *vs.* PMOP group, $^{b}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction L group, $^{c}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction M group, $^{d}P<0.05$

图 2　各组大鼠 BMD 和股骨组织形态变化比较

Fig 2　Comparison of BMD and morphological changes of femur in rats among different groups

表 5　各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 5　Comparison of Wnt3a and β-catenin protein expression in femoral tissue of rats among different groups（$\bar{x}\pm s$）

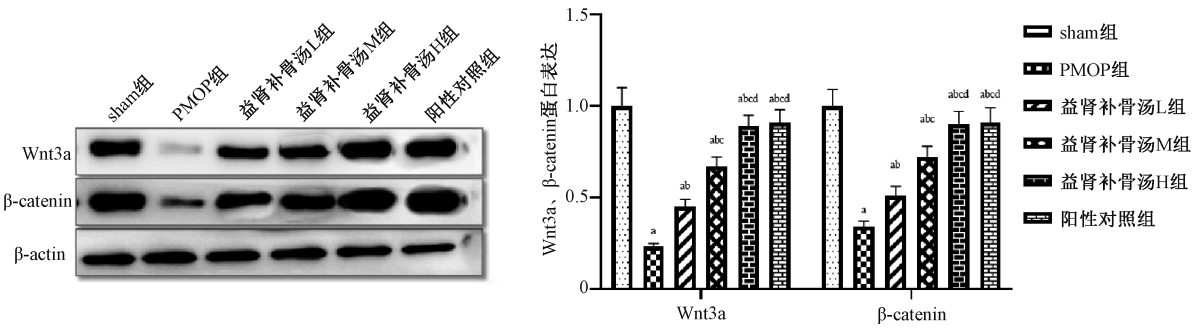
组别	Wnt3a	β-catenin
sham 组（$n=10$）	1.00±0.10	1.00±0.09
PMOP 组（$n=10$）	0.23±0.02^{a}	0.34±0.03^{a}
益肾补骨汤 L 组（$n=10$）	0.45±0.04^{ab}	0.51±0.05^{ab}
益肾补骨汤 M 组（$n=10$）	0.67±0.05^{abc}	0.72±0.06^{abc}
益肾补骨汤 H 组（$n=10$）	0.89±0.06^{abcd}	0.90±0.07^{abcd}
阳性对照组（$n=10$）	0.91±0.07^{abcd}	0.91±0.08^{abcd}
F	236.9	152.2
P	<0.000 1	<0.000 1

注：与 sham 组相比，$^{a}P<0.05$；与 PMOP 组相比，$^{b}P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，$^{c}P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，$^{d}P<0.05$

Note: *vs.* sham group, $^{a}P<0.05$; *vs.* PMOP group, $^{b}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction L group, $^{c}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction M group, $^{d}P<0.05$

会引起乳腺癌、心血管不良事件的发生风险升高[11]。因此，安全有效地缓解 PMOP 的药物成为研究的热点。中医认为，骨质疏松症是由肝肾亏虚、淤血阻滞所致，《医经精义·中卷》中认为，肾精逐渐衰弱，骨髓生化无源、骨髓空虚，进而导致肾虚型 PMOP 发生[12]。有学者发现，PMOP 通常为机体中骨吸收和骨形成出现失衡所致，属于高转换型骨质疏松症[13]。近年来研究结果发现，中药治疗 PMOP 的疗效显著[14]。益肾补骨汤方中葛根可祛热升阳；黄芪、山药有益气健脾的功效；熟地黄、补骨脂可补肾填髓，滋阴养肝，强筋壮骨续折伤；穿山甲、当归具有益气健脾、活血化瘀等功效；以上药物共用，不仅可补肾健脾，还可活血化瘀、强筋健骨。

目前，临床上多通过测定 BMD 来判定骨质疏松症，其可有效反映骨骼中骨矿物质的含量[15]。本研究通过测定各组大鼠 BMD 以验证 PMOP 大鼠模型制备是否成功，结果发现，PMOP 组大鼠体重降低，猜测可能是因为雌激素水平降低、内分泌紊乱，进而影响体重。骨代谢生化指标通常可对机体中的骨吸收



与 sham 组相比，$^{a}P<0.05$；与 PMOP 组相比，$^{b}P<0.05$；与益肾补骨汤 L 组相比，$^{c}P<0.05$；与益肾补骨汤 M 组相比，$^{d}P<0.05$

vs. sham group, $^{a}P<0.05$; *vs.* PMOP group, $^{b}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction L group, $^{c}P<0.05$; *vs.* Yishen Bugu decoction M group, $^{d}P<0.05$

图 3　各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白表达比较

Fig 3　Comparison of Wnt3a and β-catenin protein expression in femoral tissue of rats among different groups

和骨形成情况进行有效反映，目前临床上反映骨形成情况的指标有多种，如碱性磷酸酶、骨钙素等[16]。本研究通过检测血清TALP水平来反映新骨的生成情况，通常骨质疏松症患者的新骨形成明显少于正常人群，且反映新骨形成的血清指标活性也会降低。本研究结果显示，PMOP组大鼠血清TALP水平明显降低，益肾补骨汤L组、M组及H组大鼠血清TALP水平显著高于PMOP组，提示益肾补骨汤可促进PMOP大鼠的新骨生成。临床上通常用血清TRAP、降钙素和甲状旁腺激素等指标反映骨吸收情况。本研究通过检测血清TRAP水平反映骨吸收情况，结果显示，PMOP组大鼠血清TRAP水平明显升高，可见PMOP大鼠骨吸收增加，骨量大量减少，益肾补骨汤治疗后大鼠血清TRAP水平显著降低，提示益肾补骨汤可抑制PMOP大鼠骨吸收情况。韩龙等[17]的研究结果证实，与假手术组相比，骨质疏松症模型组大鼠血清TALP水平降低，TRAP水平升高，与本研究结果一致。

NO参与并调控骨重建等多种生理过程，可与可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的血红素基团相结合，通过提高sGC活性而提高cGMP水平，进而激活cGMP依赖性蛋白激酶级联，同时激活下游信号通路发挥生理活性作用[18]。体外实验结果显示，成骨细胞自身可产生少量的NO，其可调节成骨细胞内生长因子的产生。NO供体内NO的缓慢释放诱导体外成骨细胞的生长和分化[19]。本研究结果显示，PMOP大鼠血清中NO、cGMP含量升高，益肾补骨汤干预后大鼠股骨组织中NO、cGMP含量显著降低，提示益肾补骨汤可降低PMOP大鼠股骨组织中NO、cGMP含量，进一步证明益肾补骨汤在促进骨形成过程中与抑制NO/cGMP信号通路有关。宋明甲等[20]的研究结果证实，7-甲氧基-4'-羟基异黄酮可通过NO/cGMP/sGC信号通路促进体外培养成骨细胞成熟与矿化。

Wnt3a是Wnt蛋白家族成员之一，Wnt信号通路可调节骨重建等过程，是骨质疏松的重要病理基础。在Wnt/β-catenin信号通路中，β-catenin是关键的调节因子，在骨形成过程中β-catenin水平降低，其可通过升高碱性磷酸酶水平并降低BMD，进而介导骨质疏松的发生发展[21]。本研究结果显示，益肾补骨汤可增加PMOP大鼠股骨组织中Wnt3a和β-catenin蛋白表达，提示益肾补骨汤可能通过增加股骨组织中Wnt3a和β-catenin蛋白表达来治疗骨质疏松症。邢威等[22]的研究结果证实，杜仲健骨方可通过调控Wnt/β-catenin信号通路来发挥治疗骨质疏松症的作用。

综上所述，益肾补骨汤可促进骨质疏松症大鼠的骨形成，可能是通过抑制NO/cGMP信号通路抑制骨吸收。

参考文献

[1] LI S, QU Z X, ZHANG H, et al. Research progress of osteoporosis based on the theory of "Homology of Liver and Kidney"[J]. J Clin Nurs Res, 2021, 5(4): 103-105.

[2] 谢兴文，钟建春，李鼎鹏，等. 薯蓣皂苷防治原发性骨质疏松的研究进展[J]. 基础医学与临床，2022，42(6)：960-963.

[3] YUN L, WANG L N, PAN Y L, et al. Current status and development trend of miRNAs in osteoporosis-related research: a bibliometric analysis[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2021, 59(4): 203-211.

[4] 王明远，张帅，高云，等. 中医食疗防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国全科医学，2021，24(S2)：169-172.

[5] JIANG Y, ZHANG P, ZHANG X, et al. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis[J]. Cell Prolif, 2021, 54(1): e12956.

[6] 赵进东，忻凌，余婵娟，等. 中药治疗肾虚血瘀证2型糖尿病合并骨质疏松症患者用药规律研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2020，26(7)：942-945，966.

[7] 周秀，彭霞，杨东，等. 益肾补骨汤联合经皮椎体后凸成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折疗效研究[J]. 陕西中医，2020，41(10)：1440-1442，1470.

[8] 闫丽萍，侯保权，李守栋，等. 电针对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓L-Arg/NO/cGMP通路的影响[J]. 针刺研究，2019，44(12)：893-897，905.

[9] 宋明甲，文益民，柴晓亮，等. 葛根素通过NO信号通路促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成骨性分化[J]. 中国现代应用药学，2019，36(17)：2124-2130.

[10] 胡忠慧，张茜，李梅. 糖皮质激素性骨质疏松症的生物靶向药物治疗研究进展[J]. 中国全科医学，2022，25(6)：756-759.

[11] GAO Y G, PATIL S, JIA J X. The development of molecular biology of osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8182.

[12] 王桂云，刘湘琳，陈沙，等. 中医药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 湖南中医杂志，2020，36(6)：162-165.

[13] 卢春燕，陈德才. 绝经后骨质疏松症的药物治疗[J]. 实用妇产科杂志，2020，36(7)：489-492.

[14] 李攀，胡志俊，唐占英，等. 中药从肾论治骨质疏松症的研究进展[J]. 长春中医药大学学报，2022，38(4)：464-466.

[15] 杨云凤，刘菊华，吴碧华，等. 有氧运动联合锝[^{99}Tc]-亚甲基二膦酸盐对老年骨质疏松骨密度及血清抗酒石酸酸性磷酸酶5b的影响[J]. 安徽医药，2020，24(1)：128-131.

[16] 张鹏，罗伟. 老年性骨质疏松症中医证型与骨代谢指标的相关性研究[J]. 山东中医杂志，2020，39(3)：265-267，276.

[17] 韩龙，闵文，吴铭杰，等. 补肾通络方促进骨质疏松症大鼠骨形成机制[J]. 中国中西医结合杂志，2019，39(1)：97-102.

[18] 郭文钧，高冉，樊天斐，等. PDE5抑制剂与cGMP信号通路相关疾病的研究进展[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(1)：159-165.

[19] 邵佳乐，李志忠，周建，等. 低频脉冲电磁场通过IGF-1 R/NO信号通路促进大鼠颅骨成骨细胞成熟及矿化[J]. 浙江大学学报(医学版)，2019，48(2)：158-164.

[20] 宋明甲，文益民，吴晓燕，等. 7-甲氧基-4′-羟基异黄酮促进大鼠成骨细胞成骨性分化的作用机制[J]. 医药导报，2019，38(6)：730-734.

[21] 孙英飞，张启栋，石东平，等. β-连环蛋白、铁蛋白、碱性磷酸酶表达水平变化影响骨质疏松进展的临床研究[J]. 中华实验外科杂志，2019，36(9)：1693-1695.

[22] 邢威，陈雁雁，王树人，等. 杜仲健骨方对大鼠骨质疏松症作用机制研究[J]. 广东药科大学学报，2020，36(2)：254-258.

(收稿日期：2022-05-15　修回日期：2022-07-25)