

基于 TGF- β /Smad 与 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨龟鹿二仙胶对去势大鼠骨质疏松的保护作用

徐卫峰, 朱旭祥, 何丹, 王善付, 尹恒^{*}(南京中医药大学无锡附属医院, 江苏 无锡 214071)

摘要: 目的 评价龟鹿二仙胶对去势大鼠骨质疏松的保护作用并探讨其机制。方法 120 只大鼠, 随机分为正常组, 模型组, 龟鹿二仙胶低、中、高剂量组和阿法骨化醇组, 共 6 组, 除正常组外均去势造模。龟鹿二仙胶按低、中、高剂量(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), 阿法骨化醇按 0.1 μ g·kg⁻¹·d⁻¹ 分别灌胃干预, 正常组和模型组分别给予等量生理盐水。采用 HE 染色检测大鼠股骨病理改变, 采用试剂盒检测股骨钙(calcium, Ca)、磷(phosphorus, P)、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), 同时采用蛋白质印迹法检测去势大鼠股骨 TGF- β 、p-Smad-3 蛋白的表达以及 p-JNK、p-ERK、p-P38、p-NF- κ B P65 蛋白的表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠股骨 Ca、P、Hyp、ALP 水平显著下降($P<0.01$), TRAP 水平显著升高($P<0.01$), 骨小梁结构排列紊乱、形态变薄且有断裂迹象, TGF- β 、p-Smad-3 蛋白表达水平下调以及 p-JNK、p-ERK、p-P38 与 p-NF- κ B P65 蛋白表达水平上调($P<0.01$)。与模型组比较, 龟鹿二仙胶显著增加大鼠股骨 Ca、P、Hyp、ALP 水平($P<0.01$), 降低股骨中 TRAP 水平($P<0.01$), 改善股骨病理改变, 同时龟鹿二仙胶显著诱导 TGF- β 、p-Smad-3 蛋白表达并显著降低 p-JNK、p-ERK、p-P38 与 p-NF- κ B P65 蛋白表达($P<0.01$)。结论 龟鹿二仙胶能显著改善去势大鼠的骨质疏松, 其机制与激活 TGF- β /Smad 信号通路和抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 龟鹿二仙胶; 骨质疏松症; TGF- β /Smad; MAPK/NF- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)13-1661-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.13.001

引用本文: 徐卫峰, 朱旭祥, 何丹, 等. 基于 TGF- β /Smad 与 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨龟鹿二仙胶对去势大鼠骨质疏松的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13): 1661-1667.

Explore on Protective Effect of Guilu Erxian Jiao on Osteoporosis in Ovariectomized Rats Based on TGF- β /Smad and MAPK/NF- κ B Signaling Pathway

XU Weifeng, ZHU Xuxiang, HE Dan, WANG Shanfu, YIN Heng^{*}(Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi 214071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the protective effect of Guilu Erxian Jiao on osteoporosis in ovariectomized rats and to explore its mechanism. **METHODS** A total of 120 rats were randomly divided into normal group, model group, low-dose, medium-dose and high-dose of Guilu Erxian Jiao group and alfacalcidol group. There were 6 groups in total, and all of them were emasculated and modeled except the normal group. Guilu Erxian Jiao was administrated with low, medium, high dose(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), alfacalcidol was administrated with 0.1 μ g·kg⁻¹·d⁻¹ dose, the normal group and the model group were given the same amount of normal saline respectively. The pathological changes of femur in rats were detected by HE staining, and the calcium(Ca), phosphorus(P), hydroxyproline(Hyp), alkaline phosphatase(ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) of femur were detected by kits. At the same time, Western blotting was used to detect the expression of TGF- β , p-Smad-3 protein and p-JNK, p-ERK, p-P38, p-NF- κ B P65 protein in femur of ovariectomized rats. **RESULTS** Compared with the normal group, the levels of Ca, P, Hyp and ALP in femur of rats in the model group were significantly decreased($P<0.01$), while the level of TRAP was significantly increased($P<0.01$). The trabecular structure of rats in the model group was disordered, the morphology was thinned and showed signs of fracture. The protein expression levels of TGF- β and p-Smad-3 in femur of the model group were down-regulated, while the protein expression levels of p-JNK, p-ERK, p-P38 and p-NF- κ B P65 in femur were up-regulated($P<0.01$). Compared with the model group, Guilu Erxian Jiao significantly increased the levels of Ca, P, Hyp and

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973878); 江苏省自然科学基金项目(BK20180167); 无锡市卫生计生委科研项目(Q201628)

作者简介: 徐卫峰, 男, 硕士, 副主任药师, 硕导 E-mail: wxzy024@njucm.edu.cn **通信作者:** 尹恒, 男, 博士, 副主任中医师, 硕导 E-mail: wxzy011@njucm.edu.cn

ALP in femur of rats($P<0.01$), decreased the level of TRAP in femur of rats($P<0.01$), and improved the pathological changes of femur. Meanwhile, Guilu Erxian Jiao significantly induced the expression of TGF- β and p-Smad-3 protein, and significantly decreased the expression of p-JNK, p-ERK, p-P38 and p-NF- κ B protein($P<0.01$). **CONCLUSION** Guilu Erxian Jiao can significantly improve osteoporosis in ovariectomized rats, and the mechanism is related to the activation of TGF- β /Smad signaling pathway and the inhibition of MAPK/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS: Guilu Erxian Jiao; osteoporosis; TGF- β /Smad; MAPK/NF- κ B

骨质疏松症被认为是一种以骨质流失和骨组织结构恶化为特征的疾病^[1]。这可能是机体生理功能减退所致,也可能是由于治疗其他疾病大量运用激素所致,如糖皮质激素、皮质类固醇等^[2]。由于大鼠的骨结构和遗传与人类非常相似,大鼠骨质疏松模型是研究骨变形和发育不良的一种有效且成熟的动物模型^[3]。

龟鹿二仙胶出自《医便》,是益阳的经典方剂,有填精益气、滋阴壮阳之功效,临床常用于调节气血、精血不足、腰膝酸软等,为中药经典名方现代化应用的体现^[4]。先前的研究阐明,龟鹿二仙胶显示出对抗炎症、糖尿病和糖皮质激素诱导的骨质疏松症的理想效果^[5]。然而,很少有研究关注龟鹿二仙胶对骨质疏松症的潜在机制^[6]。因此,本研究旨在采用大鼠骨质疏松模型研究龟鹿二仙胶对骨质疏松症的保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 动物

120只SPF级SD大鼠,♀,体质量(270 ± 10)g,6月龄,购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2016-0010,饲养于江南大学实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(苏)2016-0045。动物实验操作符合无锡市中医医院伦理委员会相关要求。所有大鼠实验前适应7d,饲养在通风良好的聚丙烯笼子中,温度20~24℃,湿度50%~60%,阴暗光照时间控制在12h/12h,自由进水和喂食。

1.2 药物和试剂

龟鹿二仙胶(自制)原料龟板胶、鹿角胶、人参、枸杞子(批号分别为201911006,202041008,20200502,20200310)均购自北京同仁堂有限公司;阿法骨化醇(Sigma Aldrich,货号:Y0002137);羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)测定试剂盒(货号分别为A030-2-1, A059-2-2, D023-1-1)均购自南京建成生物工程研究所;MAPK/NF- κ B与TGF- β /Smad通路蛋白抗体(TGF- β 货号:3709;

GAPDH 货号:#3692;p-Smad-3 货号:9520;Smad-3 货号:12747;p-JNK 货号:4668;JNK 货号:4306;p-ERK 货号:3510;ERK 货号:4375;p-P38 货号:4511;P38 货号:4092;p-NF- κ B P65 货号:3033;NF- κ B P65 货号:8242)购自美国CST公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物有限公司,货号:P0012);HNO₃(货号:N116240)、HClO₄(货号:P112072)、HCl(货号:H399832)、Tris-HCl(pH 9.5, 货号:T301497)、对硝基苯磷酸盐(PNPP, 货号:P109039)、NaOH溶液(货号:S291895)、乙二胺四乙酸四钠盐合物(EDTA, 货号:B301167)、酒石酸钠(货号:S304799)、3 mol·L⁻¹醋酸钠缓冲液(货号:S378199)、10%甲醛(货号:F111934)、10%硝酸溶液(货号:N291977)、促蓝溶液(0.5%氨水溶液)(货号:A299569)、95%乙醇(货号:A112720)、无水乙醇(货号:E130059)、ELC发光液(货号:E266188)均购自阿拉丁公司;MgCl₂(货号:M8266)、ZnCl₂(货号:208086)、苏木精溶液(货号:03971)、曙红溶液(货号:HT110232)、二甲苯(货号:534056)、10%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液(货号:71736)、30%丙烯酰胺溶液(货号:A3574)均购自Sigma-Aldrich公司;RIPA裂解液(货号:C1053)、TBST(货号:B1009)均购自北京普利莱基因技术有限公司;PVDF膜(货号:FFP32)、脱脂奶粉(货号:P0216)、二抗稀释液(货号:P0258)均购自上海碧云天生物有限公司。

1.3 仪器

LB-ICP6800电感耦合等离子体发射光谱仪(青岛路博);V-1800PC分光光度计(上海棱光);SPS-100电泳槽(上海天能科技有限公司);TY15/ZX1003分析天平(北京海富达科技有限公司);GX53光学显微镜(奥林巴斯)。

2 方法

2.1 龟鹿二仙胶的制备

分别对龟鹿二仙胶原料(龟板胶、鹿角胶、人参、枸杞子)按1.5:1:1:1.5的比例进行称重。人参、枸杞子用蒸馏水浸泡过夜,先武火煎煮沸

腾,再文火熬制 1 h,过滤后备用。龟板胶、鹿角胶打碎后烊化,与上述煎煮过滤后的药液混合搅拌再浓缩成胶块,4℃保存备用。试验前,将胶块精准称重后烊化,配置成相应浓度的龟鹿二仙胶溶液。

2.2 动物分组和造模

SD 大鼠随机分为正常组,模型组,龟鹿二仙胶低、中、高剂量组和阿法骨化醇组,共 6 组,每组 20 只。制作大鼠骨质疏松模型,SD 大鼠用 3%水合氯醛生理盐水溶液($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后,于下腹部正中纵行切开皮肤,钝性分离腹部肌肉,切开腹膜,进入腹腔,除正常组外,其他组大鼠均去势结扎并完整摘除双侧卵巢。所有大鼠术后腹腔注射青霉素[青霉素(规格:每瓶 1 600 000 U)溶至 5 mL], $0.2\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$,连续给药 3 d。

2.3 药物干预和标本采集

术后第 60 天开始,龟鹿二仙胶各剂量组按照低、中、高($0.5, 1.5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)剂量分别灌胃给药,阿法骨化醇组按照 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃给药,正常组、模型组予等量生理盐水灌胃。持续给药 30 d 后,将大鼠麻醉后腹主动脉采血,静置 2 h 后 $704\times\text{g}$ 离心 15 min,取上清,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,同时取大鼠股骨组织,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.4 矿物分析

股骨样本采用消化法处理。取 0.2 g 股骨样本置烧杯中,加硝酸和高氯酸(4:1)静置过夜,于电热板上 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温加热,至内容物为干燥无色,冷却后用软化水洗涤多次并转移至 10 mL 比色管中,准确定容至 5.0 mL。采用电感耦合等离子体发射光谱法,对样本中的钙(calcium, Ca)和磷(phosphorus, P)进行检测分析。

2.5 Hyp 活性

收集股骨样本,用盐水洗涤样品并在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下完全干燥约 48 h 直到恒重, $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下在二氧化硅坩埚中进行焚烧,记录粉碎样品的质量,然后用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCL 水解,按照试剂盒说明书测定 Hyp 活性。

2.6 ALP 活性

ALP 活性检测方法,根据文献报道稍作调整^[7]。将切割固定的股骨用碱性缓冲液($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 9.5, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnCl_2)预处理 30 min,然后用含有 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对硝基苯磷酸盐的 150 μL 碱性缓冲液孵育 1 h。使用含有 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二醇四乙酸的溶液停止反应,随后采用分光光度计进行

检测。

2.7 TRAP 活性

TRAP 活性检测方法,参考既往文献报道^[8]。将切割固定的股骨在含有 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸盐、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液的溶液中孵育。1 h 后,用由 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸盐、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对硝基苯磷酸盐组成的溶液替换培养基。加入 50 μL $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠,反应停止,采用分光光度计检测对硝基苯酚的量反映 TRAP 活性。

2.8 HE 染色

将大鼠股骨组织用 10%甲醛固定,用 10%硝酸溶液脱 Ca,用自来水洗涤过夜,包埋在石蜡中,切成 4 μm 厚。至于切片,在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱中烘烤 6 h 左右。将组织切片常规脱蜡至水中,水洗 1~2 min,苏木精染料溶液染色 3~6 min,流水洗涤除去苏木精染料溶液 1~2 min,然后加入 1%盐酸乙醇 1~3 s,水洗 1~2 s,促蓝溶液返蓝 5~10 s,水洗 15~30 s,0.5%曙红染料溶液染色 2~3 min,蒸馏水洗 1~2 s,80%乙醇处理 15~30 s,95%乙醇处理 15~30 s,无水乙醇处理 1~2 s,分别在二甲苯 I 和二甲苯 II 中透明 2 次,每次在光学显微镜下($200\times$),观察各组大鼠股骨组织切片的 HE 染色。

2.9 MAPK/NF- κ B 和 TGF- β /Smad 相关蛋白含量测定

用 RIPA 裂解液提取各组大鼠滑膜总蛋白, $11\text{ }269\times\text{g}$ 离心 15 min,收集上清。采用 BCA 试剂盒对各组蛋白进行定量。蛋白样本首先采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到 PVDF 膜上,采用 5%脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h,后 PVDF 膜与相应的抗体孵育,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 4 次,每次 8 min。然后将 PVDF 膜置于二抗溶液于摇床室温孵育 2 h。取出 PVDF 膜用 TBST 清洗 4 次,每次 8 min,加入 ELC 发光液后进行曝光显影条带。

2.10 统计学分析

符合正态分布的数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差[one-way(ANOVA)]分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠骨 Ca 和 P 含量的影响

骨矿化是提高骨骼强度的重要过程,骨矿化被认为是表征成骨细胞分化的标志。通过测定 Ca 和 P 的含量,探讨龟鹿二仙胶对骨质疏松症大鼠

矿物质含量的影响。结果显示,与正常组大鼠比较,模型组大鼠体内 Ca 和 P 的含量显著降低($P<0.01$)。而与模型组相比,矿化基质经龟鹿二仙胶各剂量组($0.5, 1.5, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)与阿法骨化醇组($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)治疗后能显著提高 Ca 和 P 含量($P<0.01$),结果见表 1。

表 1 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠骨 Ca 和 P 含量的影响
Tab. 1 Effect of Guilu Erxian Jiao on content of Ca and P in bone of osteoporosis rats

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	Ca/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	P/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
正常组		1.49±0.07	3.23±0.18
模型组		0.52±0.04 ¹⁾	1.32±0.15 ¹⁾
龟鹿二仙胶			
低剂量组	0.5×10^6	0.72±0.09 ²⁾	1.97±0.13 ²⁾
中剂量组	1.5×10^6	0.83±0.06 ²⁾	2.06±0.15 ²⁾
高剂量组	2.5×10^6	1.07±0.19 ²⁾	2.12±0.12 ²⁾
阿法骨化醇组	0.1	1.11±0.07 ²⁾	2.75±0.08 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.2 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 Hyp 含量的影响

Hyp 的水平通常用于评估药物改善骨变形和发育不良相关的疾病的能力。结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 Hyp 的水平含量显著降低($P<0.01$)。而与模型组相比,龟鹿二仙胶各剂量组($0.5, 1.5, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)与阿法骨化醇组($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)能显著增加 Hyp 含量($P<0.01$),结果见表 2。

表 2 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 Hyp 含量的影响
Tab. 2 Effect of Guilu Erxian Jiao on content of Hyp in osteoporosis rats

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	Hyp/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
正常组		0.84±0.06
模型组		0.23±0.02 ¹⁾
龟鹿二仙胶		
低剂量组	0.5×10^6	0.33±0.02 ²⁾
中剂量组	1.5×10^6	0.40±0.06 ²⁾
高剂量组	2.5×10^6	0.49±0.05 ²⁾
阿法骨化醇组	0.1	0.61±0.04 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 ALP 和 TRAP 含量的影响

本研究分别测定并评估了骨形成和骨吸收的典型标志物 ALP 和 TRAP 的含量。结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 TRAP 活性显著升高($P<0.01$),ALP 活性显著降低($P<0.01$)。而与模型组相比,龟鹿二仙胶各剂量组($0.5, 1.5, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)

与阿法骨化醇组($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)能显著降低 TRAP 含量并增加 ALP 活性($P<0.01$),结果见表 3。

表 3 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 ALP 和 TRAP 含量的影响
Tab. 3 Effects of Guilu Erxian Jiao on content of ALP and TRAP in osteoporosis rats

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	TRAP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		21.21±4.9	121.28±9.59
模型组		113.94±7.8 ¹⁾	28.29±5.37 ¹⁾
龟鹿二仙胶			
低剂量组	0.5×10^6	91.44±7.44 ²⁾	78.00±7.18 ²⁾
中剂量组	1.5×10^6	83.33±3.31 ²⁾	86.29±8.49 ²⁾
高剂量组	2.5×10^6	80.34±5.69 ²⁾	91.32±0.12 ²⁾
阿法骨化醇	0.1	54.88±5.25 ²⁾	99.77±18.17 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.4 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠股骨病理改变的影响

股骨组织切片 HE 染色结果见图 1。光镜下观察组织结构和形态,与正常组相比,模型组大鼠骨小梁结构排列紊乱,形态变薄且有断裂迹象。与模型组相比,龟鹿二仙胶与阿法骨化醇干预大鼠的骨小梁相对排列整齐,骨微结构和形态得到改善,骨小梁变粗且排列整齐。

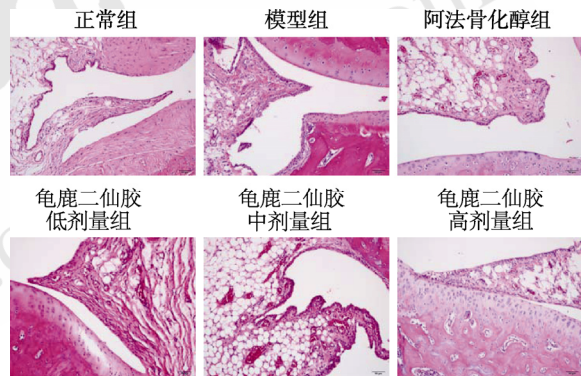


图 1 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠股骨病理改变的影响 (HE 染色, 200×)

Fig. 1 Effect of Guilu Erxian Jiao on pathological changes of femur of osteoporosis rats (HE staining, 200×)

3.5 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 TGF-β-Smad 信号通路蛋白表达的影响

影响 TGF-β-Smad 信号转导通路会导致骨代谢紊乱,进而诱发骨质疏松,因此笔者采用 Western blotting 研究 TGF-β、p-Smad-3 蛋白的表达。结果显示,与正常组大鼠比较,模型组大鼠 TGF-β、p-Smad-3 蛋白的表达水平下调($P<0.01$),龟鹿二仙胶($0.5, 1.5, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)与阿法骨化醇($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)能显著诱导 TGF-β、p-Smad-3 蛋白的表达($P<0.01$)。结果见图 2。

3.6 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 MAPK/NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响

结果显示,与正常组大鼠比较,模型组大鼠 p-JNK、p-ERK、p-P38 与 p-NF- κ B P65 蛋白的表

达水平上调($P<0.01$),相反,龟鹿二仙胶(0.5, 1.5, 2.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)与阿法骨化醇(0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)能显著降低 p-JNK、p-ERK、p-P38 与 p-NF- κ B P65 蛋白的表达($P<0.01$),结果见图 3。

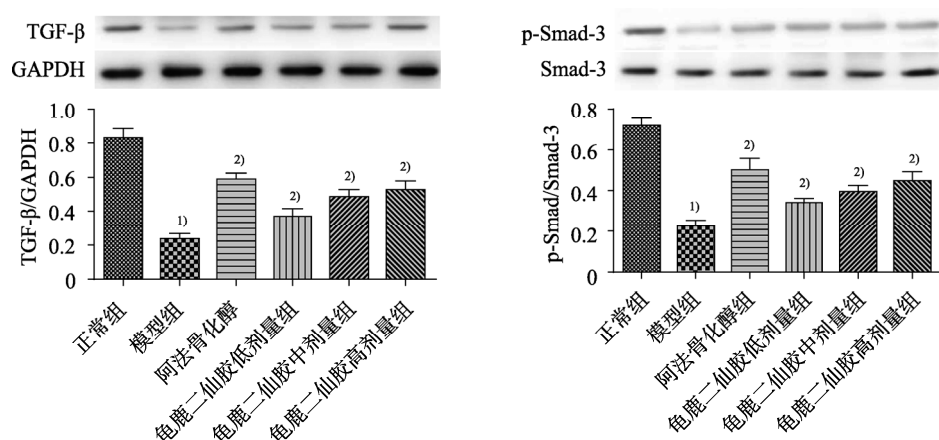


图 2 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 TGF- β -Smad 信号通路蛋白表达的影响
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Guilu Erxian Jiao on protein expression of TGF- β -Smad signaling pathway in osteoporosis rats
Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

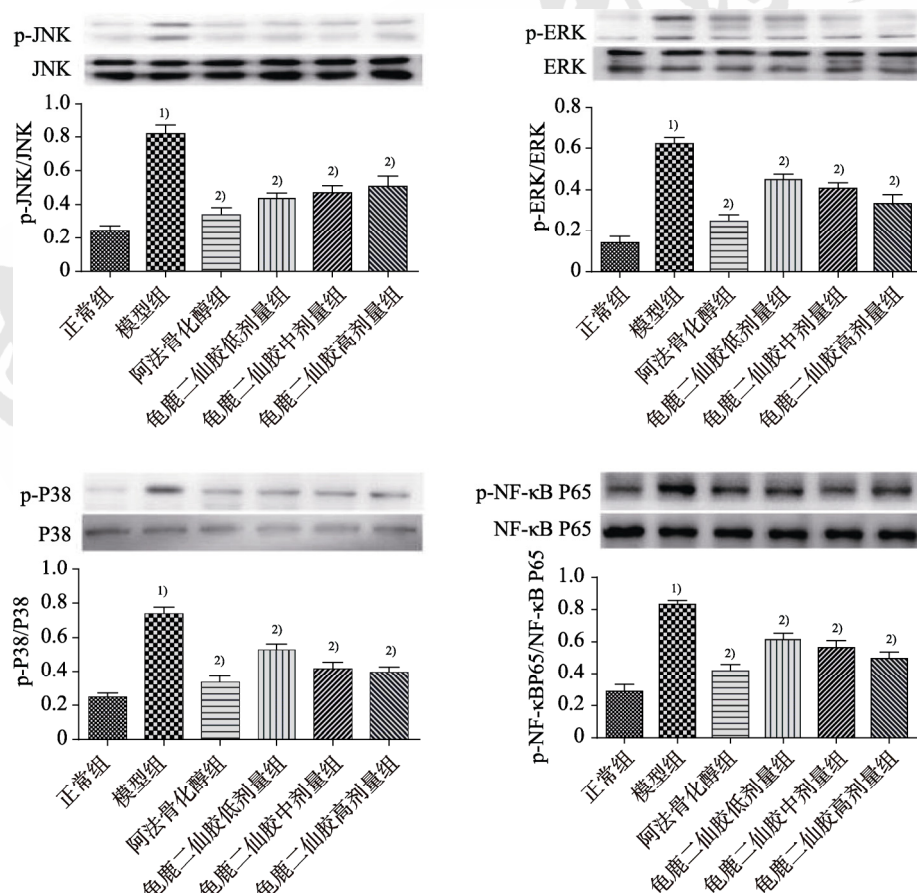


图 3 龟鹿二仙胶对骨质疏松大鼠 MAPK/NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of Guilu Erxian Jiao on protein expression of MAPK/NF- κ B signaling pathway in osteoporosis rats
Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

先前笔者所在团队研究发现龟鹿二仙胶对于地塞米松诱导的斑马鱼骨质疏松模型有保护作用^[9]，为了扩展龟鹿二仙胶治疗骨质疏松的范围，本研究通过双侧卵巢切除术建立大鼠骨质疏松模型，并采用龟鹿二仙胶干预探索其抗骨质疏松作用及其发生机制。骨的形成和替换必须不断进行，以保证其强度和完整性。同时，产生有机骨基质的成骨细胞以及溶解骨矿物质和基质的破骨细胞相互冲突的活动会影响骨重塑^[10]。骨代谢平衡是通过骨形成与骨吸收实现的，一旦骨吸收超过形成，骨骼中骨质疏松症产生和骨折的风险将由于骨丢失而增加^[11-12]。在本研究中，一方面，破骨细胞活性标志酶 TRAP 在吸收陷窝存在时发挥其水解作用，通过 TRAP 的骨含量测定来评估破骨细胞的活性，反映骨吸收情况；另一方面，ALP 是反映骨分化的重要指标，测定其骨含量反映成骨细胞的活性，表达骨形成情况。上述 2 个骨含量生化指标的测定方法在彭伟等^[13]骨质疏松大鼠的治疗研究中得到了验证。TRAP 和 ALP 活性的生化检测已经证明了用龟鹿二仙胶治疗能够减弱去势对成骨细胞和破骨细胞的负面影响。龟鹿二仙胶(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)与阿法骨化醇(0.1 μg·kg⁻¹·d⁻¹)能使 ALP 活性显著升高、TRAP 活性显著减低，这意味着骨形成/骨吸收体内平衡的恢复更接近规模上的控制水平。TGF-β 调节细胞生长、分化和免疫，是骨代谢的主要途径之一。最新研究表明，在成骨细胞分化和骨形成中 TGF-β1/Smad 信号通路发挥着关键作用^[14]，细胞基质的生成亦可通过 TGF-β 来调控。Smad-3 可以被 TGF-β 激活的Ⅱ型受体(TβR)磷酸化，然后将信号从细胞质传导到细胞核^[15]。TGF-β 磷酸化其下游靶标 Smad3，Smad3 受 TGF-β 调节与 Smad4 二聚形成 Smad 复合物，从而进入 TGF-β 反应基因的转录^[16]。在本研究中，TGF-β 和 p-Smad-3 的蛋白表达在骨质疏松大鼠中显著下降，龟鹿二仙胶(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)与阿法骨化醇(0.1 μg·kg⁻¹·d⁻¹)可以显著增加 TGF-β 和 p-Smad-3 的蛋白表达，从而刺激 TGF-β/Smad 途径的激活。

MAPKs 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族，在不同的细胞过程中发挥重要作用，如增殖、分化和炎症。据报道，P38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路的激活可以上调骨形成相关基因的表达，促进成骨细胞分化

和矿化^[17]。另有报道，3 个主要的 MAPKs 家族，即 ERK、P38 和 JNK 与成骨细胞分化有关^[18-20]。为了研究 MAPK 在骨质疏松中的作用，笔者评估了 MAPK 信号分子的蛋白水平。在本研究中，笔者发现在骨质疏松大鼠中，p-ERK1/2、p-P38 和 p-JNK 的水平显著增加。龟鹿二仙胶(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)与阿法骨化醇(0.1 μg·kg⁻¹·d⁻¹)可以显著抑制 p-ERK1/2、p-P38 和 p-JNK 的蛋白表达。MAPK 上调可以激活其下游 NF-κB 信号通路，一些研究^[21-22]表明，NF-κB 在成骨细胞分化中起着重要的作用，因为笔者采用 Western blotting 检测 NF-κB 信号，研究发现，骨质疏松大鼠 p-NF-κB P65 表达显著增加，龟鹿二仙胶(0.5, 1.5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)与阿法骨化醇(0.1 μg·kg⁻¹·d⁻¹)可以显著降低 p-NF-κB P65 蛋白水平，从而说明 MAPK/NF-κB 信号通路在龟鹿二仙胶治疗骨质疏松中具有重要的作用。

综上，本研究表明龟鹿二仙胶可以通过逆转骨形成/骨吸收的不平衡、激活 TGF-β-Smad 信号通路和抑制 MAPK/NF-κB 信号通路来预防骨质疏松症。

REFERENCES

- [1] QIU M L, XIE Y, WANG X H, et al. Practice guideline for patients with osteoporosis[J]. Chin J Intern Med(中华内科杂志), 2020, 59(12): 953-959.
- [2] 张里程, 姜裔恒, 吕厚辰. 中国脆性骨折术后规范化抗骨质疏松治疗指南(2021)[J]. 中华创伤骨科杂志, 2021, 23(2): 93-101.
- [3] WANG H, ZHAO W, TIAN Q J, et al. Effect of lncRNA AK023948 on rats with postmenopausal osteoporosis via PI3K/AKT signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2181-2188.
- [4] BIN D H, LI L, TANG Y, et al. Analyzing the prescription and clinical application of Guilu Erxian Jiao formula based on the philosophical thinking of traditional Chinese medicine[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2020, 61(17): 1559-1561, 1564.
- [5] WANG J, WANG Q, WANG Z Z, et al. Comparative study on hypoglycemic effects of different traditional Chinese medicine treatments in rats with diabetes mellitus induced by alloxan[J]. J Integr Med, 2010, 8(8): 781-784.
- [6] LI H M, YANG W, ZHANG Y L, et al. Randomized controlled trial outcome indicators of postmenopausal osteoporosis treated by traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(16): 4274-4286.
- [7] KORNOUKHOVA L A, EMANUEL V L, DENISOV N L. The role of adipose tissue and laboratory predictors of primary osteoporosis[J]. Russ Clin Lab Diagn, 2020, 65(4): 205-211.
- [8] ZHAO Y, XU Y, ZHENG H X, et al. QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK

- and PI3K/Akt signal pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2021 (268): 113644.
- [9] YIN H. Experiment based on regulation of TGF- β /smads signal-transduction pathway induced by Gui Lu Er Xian Jiao which instumulate osteoblast synthesis of type I collagen to improve steoporosis[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016.
- [10] PHAN T C A, XU J, ZHENG M H. Interaction between osteoblast and osteoclast: Impact in bone disease[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(4): 1325-1344.
- [11] LI H, HUANG C, ZHU J, et al. Lutein suppresses oxidative stress and inflammation by Nrf2 activation in an osteoporosis rat model[J]. Med Sci Monit, 2018(24): 5071-5075.
- [12] WANG J, ZHENG L F, XU J, et al. Therapeutic effect observation of Jinkui Shenqi pill assisted with percutaneous kyphoplasty on osteoporotic vertebral compression fracture[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(21): 2730-2735.
- [13] PENG W, ZHANG Q, HUANG Q W, et al. Therapeutic effect of Guizhi Shaoyao Zhimutang on osteoporosis in rats based on RANKL/OPG[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(23): 11-18.
- [14] YANG Y, NIAN H L, TANG X F, et al. Effects of the combined Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on bone turnover and TGF- β 1/Smads pathway in GIOP rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017(201): 91-99.
- [15] YIN H, WANG S F, ZHANG Y F, et al. Zuogui Pill improves the dexamethasone-induced osteoporosis progression in zebrafish larvae[J]. Biomed Pharmacother, 2018(97): 995-999.
- [16] MALLANO T, PALUMBO-ZERR K, ZERR P, et al. Activating transcription factor 3 regulates canonical TGF β signalling in systemic sclerosis[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(3): 586-592.
- [17] ZHONG H B, GUO X, HUANG L H. Puerarin stimulates osteogenesis and bone formation through ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways[J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2019, 29(2): 78-83.
- [18] HUANG Q, WANG Y, LI X R, et al. Berberine inhibits osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells induced by osteogenic induction medium[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(11): 3059-3065.
- [19] HOSHIKAWA S, SHIMIZU K, WATAHIKI A, et al. Phosphorylation-dependent osterix degradation negatively regulates osteoblast differentiation[J]. FASEB J, 2020, 34(11): 14930-14945.
- [20] ZHU D, DENG X, HAN X F, et al. Wedelolactone enhances osteoblastogenesis through ERK- and JNK-mediated BMP2 expression and smad1/5/8 phosphorylation[J]. Molecules, 2018, 23(3): 561.
- [21] ZHOU X F, MOUSSA F M, MANKOCI S, et al. Orthosilicic acid, Si(OH)₄, stimulates osteoblast differentiation *in vitro* by upregulating miR-146a to antagonize NF- κ B activation[J]. Acta Biomater, 2016(39): 192-202.
- [22] SHEN G Y, REN H, SHANG Q, et al. miR-128 plays a critical role in murine osteoclastogenesis and estrogen deficiency-induced bone loss[J]. Theranostics, 2020, 10(10): 4334-4348.

收稿日期: 2021-09-26

(本文责编: 李艳芳)