

# 壮骨止痛方调节 OPG/RANKL 平衡抗绝经后骨质疏松作用

甘国兴<sup>1</sup>, 李劲平<sup>2\*</sup>, 刘毓<sup>1</sup>, 胡德志<sup>1</sup>, 张国民<sup>3</sup>, 汤海燕<sup>1</sup>(1.清远市中医院, 广东 清远 511500; 2.中南大学, 长沙 410013; 3.湖南中医药大学, 长沙 410028)

**摘要:** 目的 研究壮骨止痛方对去卵巢骨质疏松大鼠骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和 NF- $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK)/RANK 配体(RANK ligand, RANKL)的影响, 探讨其抗骨质疏松的作用机制。方法 72 只 SD 大鼠按体质量随机抽出假手术组 12 只, 造模组 60 只, 造模组采用双侧去卵巢法造模, 假手术组只切除卵巢周围相应等量的脂肪。术后造模组大鼠按体质量随机分为模型组、壮骨止痛方高剂量组(13.2 g·kg<sup>-1</sup>)、中剂量组(6.6 g·kg<sup>-1</sup>)、低剂量组(3.3 g·kg<sup>-1</sup>)和戊酸雌二醇组, 每组 12 只。术后第 5 天开始药物干预, 模型组和假手术组给予相应体积的纯净水, 持续 13 周。给药结束后, 股骨进行病理组织检测, 酶联免疫法检测大鼠血清和骨组织 OPG、RANKL 含量, 免疫组化法检测大鼠骨组织 OPG、RANKL 蛋白表达。结果 模型组大鼠股骨骨小梁面积率显著降低, 血清和骨组织 OPG 含量显著下降, RANKL 含量显著增加, OPG/RANKL 比值显著降低, 骨组织 OPG 蛋白表达显著下调, RANKL 蛋白表达显著增强, OPG/RANKL 比值显著降低, 与假手术组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。壮骨止痛方各剂量组大鼠股骨骨小梁面积率显著增加, 显示其具有良好的抗骨质疏松作用; 血清和骨组织 OPG 含量显著增加, RANKL 含量显著下降, OPG/RANKL 比值升高; 骨组织 OPG 蛋白表达显著增强, RANKL 蛋白表达显著下调, OPG/RANKL 比值显著升高, 与模型组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论 去卵巢大鼠 OPG/RANKL 比值显著降低, 壮骨止痛方能显著升高去卵巢大鼠 OPG/RANKL 比值, 调节 OPG/RANKL 平衡是壮骨止痛方抗绝经后骨质疏松的作用机制之一。

**关键词:** 骨质疏松; 壮骨止痛方; 骨保护素; RANKL; OPG/RANKL

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)07-0938-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.002

引用本文: 甘国兴, 李劲平, 刘毓, 等. 壮骨止痛方调节 OPG/RANKL 平衡抗绝经后骨质疏松作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 938-942.

## Regulate Effect of Zhuanggu Zhitong Prescription on the Balance of OPG/RANKL to Anti-osteoporosis

GAN Guoxing<sup>1</sup>, LI Jinping<sup>2\*</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, HU Dezhi<sup>1</sup>, ZHANG Guomin<sup>3</sup>, TANG Haiyan<sup>1</sup>(1.Qingyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingyuan 511500, China; 2.Central South University, Changsha 410013, China; 3.Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 410028 Changsha, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effect of Zhuanggu Zhitong Prescription on the osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in ovariectomized rats and investigate its mechanism in anti-osteoporosis. **METHODS** The 72 SD rats were randomly divided into sham group and model group, the model group rats were ovariectomized and the sham group rats were excised equal weight fat. After the modeling, the rats were randomly divided into model group, Zhuanggu Zhitong Prescription high-dose group (13.2 g·kg<sup>-1</sup>), middle-dose group (6.6 g·kg<sup>-1</sup>), low-dose group (3.3 g·kg<sup>-1</sup>) and estradiol valerate group, 12 rats in each group. Five days after the operation started to drug therapy for 13 weeks. The model group and sham group rats were given equal volume water. After the test, the femur was examined by pathological examination. The content of OPG and RANKL in serum and bone tissue of rats were detected by Elisa. The protein expression of OPG and RANKL in bone tissue were detected by immunohistochemical method. **RESULTS** The femur trabecular area ratio of ovariectomized rats was significantly declined, the content of OPG in serum and bone tissue of model group was significantly declined, and the RANKL was significantly increased. The protein expression of OPG was significantly declined, and the protein expression of RANKL was significantly increased, compared with sham operation group, the difference was statistically significant( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Zhuanggu Zhitong Prescription could significantly increase the femur trabecular area ratio, indicating a good anti-postmenopausal osteoporosis effect. The content of OPG in serum and bone tissue of Zhuanggu Zhitong Prescription groups were significantly increased, and the RANKL were significantly declined; the protein expression of OPG was significantly increased and RANKL was significantly declined, compared with the model group, the difference was statistically significant( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** The OPG/RANKL ratio significantly decreased in ovariectomized

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273816); 清远市科技专项项目(2016A020)

作者简介: 甘国兴, 男, 硕士 Tel: 18211320398 E-mail: guoxinggan@126.com

E-mail: pjjingli@163.com

\*通信作者: 李劲平, 男, 博士, 副教授, 硕士 Tel:

rats, Zhuanggu Zhitong Prescription can obviously increase the ratio of OPG/RANKL in ovariectomized rats. Regulating balance of OPG/RANKL may be part of the mechanism of Zhuanggu Zhitong Prescription to anti-osteoporosis.

**KEY WORDS:** osteoporosis; ZhuangguZhitong Prescription; osteoprotegerin (OPG); receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL); OPG/RANKL

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是绝经后妇女的常见病及多发病, 主要因绝经后妇女的卵巢功能减退、雌激素水平下降, 导致骨生成和骨吸收的代谢失衡。中医药治疗骨质疏松症疗效确切, 但是大部分作用机制尚未明确。壮骨止痛方根据“益肝肾, 筋骨自坚”理论由补骨脂丸化裁而成, 具有补益肝肾、壮骨止痛的功效, 对骨质疏松症具有很好的疗效<sup>[1]</sup>, 其具体的作用机制尚未完全明确。NF- $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK)/RANK 配体(RANK ligand, RANKL)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)系统是近年来的研究热点。OPG 和 RANKL 在体内保持着一定的比率, 如果二者比率失去平衡, 就可能引起骨代谢紊乱, 产生各种骨疾病。本研究从调节 OPG/RANKL 平衡角度探讨壮骨止痛方抗 PMOP 的作用机制, 为临床合理用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物及饲养环境

72 只 SPF 级 SD 大鼠, ♀, 体质量(220±15)g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物质量合格证号 NO.43004700005517, 中南大学湘雅三医院动物实验中心许可证号: SYXK(湘)2013-0001。饲料为湖南斯莱克景达实验动物有限公司标准普通饲料。

### 1.2 仪器

BioTek 酶标仪(美国 BioTek 公司); CP214 电子天平(奥豪斯仪器有限公司); HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅(上海南阳仪器有限公司); LEICA DMLB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司); MIAS 型医学图像分析系统(北航公司); Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司); DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); Motic B5 型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司); Haier 医用微波炉(Haier 集团); S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.3 药物与试剂

壮骨止痛方药材购自长沙九芝堂股份有限公

司, 由中南大学药学院李劲平副教授鉴定并制备; 戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号: J20130009); OPG、RANKL ELISA 检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司, 批号分别为 0615609、0715614); OPG、RANKL 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司, 批号分别为 BA1475-1、BA1323)。

## 2 方法

### 2.1 药物制备

补骨脂和女贞子先用 6 倍体积 70%乙醇回流提取 2 h, 过滤, 再加 4 倍体积 70%乙醇回流提取 2 h, 过滤, 合并滤液减压回收乙醇得流浸膏 A 备用; 乙醇提取后的药渣与处方其他药材一起加 10 倍蒸馏水煎煮 2 h, 过滤, 药渣再加 8 倍水煎煮 1.5 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至相应浓度得流浸膏 B, 将 A 与 B 合并调整浓度相当于生药浓度 1.32 g·mL<sup>-1</sup> 为高剂量, 用蒸馏水稀释成浓度 0.66 g·mL<sup>-1</sup> 为中剂量, 稀释成浓度 0.33 g·mL<sup>-1</sup> 为低剂量。

### 2.2 造模

72 只大鼠适应性饲养 7 d 后, 按体质量随机选取 12 只为假手术组, 其余采用双侧去卵巢法造模。大鼠用水合氯醛麻醉后, 在无菌条件下从距离大鼠第 1 胸腰椎外侧 1 cm 处纵向切开皮肤及两侧肌肉, 摘除双侧卵巢, 假手术组仅在卵巢周围切除相应质量的脂肪, 分 2 层缝合伤口并用生理盐水擦洗干净血迹, 术后连续 3 d 大腿肌肉注射青霉素, 每只大鼠 40 000 U·d<sup>-1</sup>。饲养于室温 23~25℃, 相对湿度 50%~70%的清洁环境中, 自由摄食和饮水。

### 2.3 分组与给药

造模成功后, 将造模大鼠按体质量随机分为模型组、壮骨止痛方高、中、低剂量组、戊酸雌二醇组, 加上假手术组共 6 组。从术后第 5 天开始, 各组开始灌胃给药干预, 持续 13 周。给药剂量根据大鼠体表面积换算, 壮骨止痛方高、中、低剂量分别相当于生药 13.2, 6.6, 3.3 g·kg<sup>-1</sup>, 戊酸雌二醇 0.021 mg·kg<sup>-1</sup>。给药体积均为

1 mL·(100 g)<sup>-1</sup>, 模型组和假手术组给予等体积的纯净水。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 血清 OPG、RANKL 含量测定** 大鼠最后一次灌胃给药后, 禁食 12 h, 水合氯醛麻醉后腹主动脉真空管采血 8 mL, 静置 2 h 后, 台式离心机 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液按照试剂盒操作说明, 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 OPG, RANKL 含量。

**2.4.2 骨组织 OPG、RANKL 含量测定** 大鼠取血后迅速处死, 取颈椎, 剥离干净周围肌肉组织, 匀浆。台式离心机 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液按照试剂盒操作说明, 用 ELISA 法检测各组大鼠骨组织 OPG, RANKL 含量。

**2.4.3 骨组织 OPG、RANKL 蛋白免疫组化检测和病理检测** 大鼠取血后迅速处死, 取股骨, 剥离干净周围肌肉组织, 用 4% 的多聚甲醛固定 48 h, 然后用 5% 的硝酸脱钙 1 周, 石蜡包埋。标本用 Shandon 切片机间断连续切片, 切片厚 4 μm, 60 °C 恒温培养箱中烘烤 24 h, 常规脱蜡去水, PBS 洗后, 用 SABC 法(按试剂盒使用说明书)行免疫组织化学染色。DAB 显色, 苏木素衬染, 常规封片。以棕黄色或棕褐色为阳性, 每张免疫组化的切片选 5 个视野, 采用北航 MIAS 医学图像分析系统进行分析。

另取骨切片进行 HE 染色, 分析骨小梁面积率。

## 2.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行正态性检验和方差分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐用多个独立样本的单因素方差分析, 方差不齐则采用多个独立样本的非参数检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对去卵巢大鼠股骨骨小梁面积率的影响

与假手术组比较, 去卵巢后骨质疏松模型大鼠股骨的骨小梁面积显著降低( $P < 0.01$ ), 大鼠骨小梁稀疏、破坏, 骨髓腔扩大, 骨髓比明显下降。与模型组比较, 给予壮骨止痛方药物后, 能显著提高模型大鼠股骨的骨小梁面积( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 大鼠骨小梁密度比较均匀, 骨小梁密度基本恢复正常。结果见表 1、图 1。

表 1 对去卵巢大鼠股骨骨小梁面积率的影响( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effect on femur trabecular area ratio of ovariectomized rats( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 骨小梁面积率/%                      |
|--------|-----------------------|-------------------------------|
| 假手术组   | —                     | 0.885 2±0.127 1               |
| 模型组    | —                     | 0.571 7±0.108 5 <sup>1)</sup> |
| 戊酸雌二醇组 | 2.1×10 <sup>-5</sup>  | 0.836 5±0.134 9 <sup>3)</sup> |
| 壮骨止痛方  |                       |                               |
| 高剂量组   | 13.2                  | 0.794 1±0.110 6 <sup>3)</sup> |
| 中剂量组   | 6.6                   | 0.725 3±0.106 3 <sup>2)</sup> |
| 低剂量组   | 3.3                   | 0.701 9±0.113 7 <sup>2)</sup> |

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

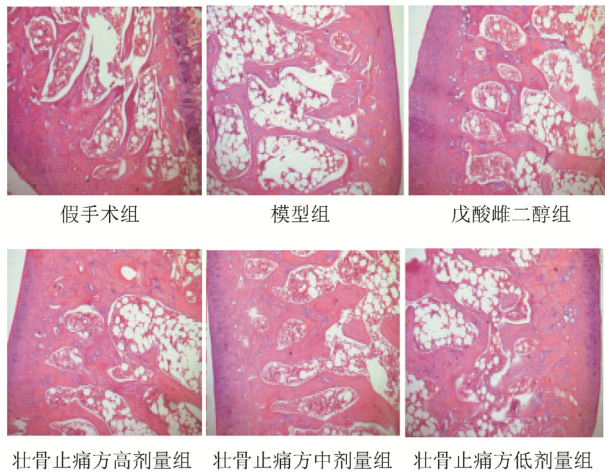


图 1 大鼠股骨组织病理切片(100×)

Fig. 1 Pathological sections of rat femoral tissue(100×)

### 3.2 对去卵巢大鼠血清和骨组织 OPG、RANKL 含量及其比值的影响

与假手术组比较, 大鼠去卵巢后, 血清和骨组织 OPG 含量显著下降( $P < 0.05$ ), RANKL 含量极显著增加( $P < 0.01$ ), OPG 与 RANKL 之间的比值极显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 给予壮骨止痛方干预 13 周后, 各剂量组大鼠血清 OPG 含量均显著增加( $P < 0.05$ ), 高、中剂量组大鼠血清 RANKL 含量极显著下降( $P < 0.01$ ), 低剂量组大鼠血清 RANKL 含量显著下降( $P < 0.05$ ), OPG 与 RANKL 之间的比值显著升高( $P < 0.05$ ); 各组大鼠骨组织 OPG 含量显著增加( $P < 0.05$ ), 高剂量组大鼠骨组织 RANKL 含量显著下降( $P < 0.05$ ), 高剂量组大鼠骨组织 OPG 与 RANKL 之间的比值极显著升高( $P < 0.01$ ), 中、低剂量组大鼠骨组织 OPG 与 RANKL 之间的比值显著升高( $P < 0.05$ )。但与假手术组比较差异无统计学意义。结果见表 2~3。

表 2 对去卵巢大鼠血清 OPG、RANKL 含量及其比值的影响( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Effect on the content of OPG, RANKL and OPG/RANKL in serum of ovariectomized rats( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 剂量/<br>$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | OPG/<br>$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ | RANKL/<br>$\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | OPG/RANKL<br>比值         |
|--------|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
| 假手术组   | —                                      | 498.21±69.93                            | 99.03±13.89                                 | 5.14±0.69               |
| 模型组    | —                                      | 415.07±65.28 <sup>1)</sup>              | 134.54±15.43 <sup>2)</sup>                  | 3.51±0.53 <sup>2)</sup> |
| 戊酸雌二醇组 | $2.1 \times 10^{-5}$                   | 491.93±65.78 <sup>3)</sup>              | 110.51±23.89 <sup>3)</sup>                  | 4.58±0.62 <sup>4)</sup> |
| 壮骨止痛方  |                                        |                                         |                                             |                         |
| 高剂量组   | 13.2                                   | 472.21±50.28 <sup>3)</sup>              | 103.38±16.19 <sup>4)</sup>                  | 4.27±0.73 <sup>3)</sup> |
| 中剂量组   | 6.6                                    | 480.21±52.36 <sup>3)</sup>              | 102.94±16.59 <sup>4)</sup>                  | 4.35±0.59 <sup>3)</sup> |
| 低剂量组   | 3.3                                    | 484.07±68.93 <sup>3)</sup>              | 103.81±25.05 <sup>3)</sup>                  | 4.36±0.61 <sup>3)</sup> |

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with the model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

表 3 对去卵巢大鼠股骨 OPG、RANKL 含量及其比值的影响( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Effect on the content of OPG, RANKL and OPG/RANKL in femur of ovariectomized rats( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 剂量/<br>$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | OPG/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ | RANKL/<br>$\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | OPG/RANKL<br>比值         |
|--------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
| 假手术组   | —                                      | 319.64±47.28                         | 63.13±15.43                                 | 5.07±0.49               |
| 模型组    | —                                      | 251.35±53.78 <sup>1)</sup>           | 108.29±22.94 <sup>2)</sup>                  | 2.63±0.35 <sup>2)</sup> |
| 戊酸雌二醇组 | $2.1 \times 10^{-5}$                   | 311.42±58.64 <sup>3)</sup>           | 72.08±18.91 <sup>4)</sup>                   | 4.48±0.51 <sup>4)</sup> |
| 壮骨止痛方  |                                        |                                      |                                             |                         |
| 高剂量组   | 13.2                                   | 309.78±55.21 <sup>3)</sup>           | 85.19±25.45 <sup>3)</sup>                   | 3.91±0.65 <sup>4)</sup> |
| 中剂量组   | 6.6                                    | 319.21±51.00 <sup>3)</sup>           | 99.27±23.54                                 | 3.65±0.54 <sup>3)</sup> |
| 低剂量组   | 3.3                                    | 319.00±52.78 <sup>3)</sup>           | 99.56±26.32                                 | 3.46±0.64 <sup>3)</sup> |

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with the model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

### 3.3 对去卵巢大鼠骨组织 OPG、RANKL 蛋白表达的影响

免疫组化结果提示, 与假手术组比较, 大鼠去卵巢后骨组织 OPG 蛋白表达显著下调( $P<0.05$ ), RANKL 蛋白表达极显著增强( $P<0.01$ ), OPG 与 RANKL 比值非常显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, 壮骨止痛方给药干预后, 各剂量组大鼠骨组织 OPG 蛋白表达显著增强( $P<0.05$ ), 高剂量组大鼠 RANKL 蛋白表达极显著下调( $P<0.01$ ), OPG 与 RANKL 比值极显著升高( $P<0.01$ ), 中、低剂量组大鼠骨组织 RANKL 蛋白表达显著下调( $P<0.05$ ), OPG 与 RANKL 比值显著升高( $P<0.05$ )。但与假手术组比较, 差异无统计学意义。结果见表 4、图 2~3。

表 4 对去卵巢大鼠骨组织 OPG、RANKL 蛋白表达及其比值的影响( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Effect on the protein expression of OPG, RANKL and OPG/RANKL in femur of ovariectomized rats( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 剂量/<br>$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | OPG/<br>$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ | RANKL/<br>$\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | OPG/RANKL<br>比值         |
|--------|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
| 假手术组   | —                                      | 0.47±0.11                               | 0.31±0.08                                   | 1.52±0.18               |
| 模型组    | —                                      | 0.32±0.08 <sup>1)</sup>                 | 0.48±0.09 <sup>2)</sup>                     | 0.73±0.13 <sup>2)</sup> |
| 戊酸雌二醇组 | $2.1 \times 10^{-5}$                   | 0.51±0.17 <sup>3)</sup>                 | 0.36±0.06 <sup>3)</sup>                     | 1.38±0.15 <sup>4)</sup> |
| 壮骨止痛方  |                                        |                                         |                                             |                         |
| 高剂量组   | 13.2                                   | 0.47±0.12 <sup>3)</sup>                 | 0.31±0.11 <sup>4)</sup>                     | 1.31±0.17 <sup>4)</sup> |
| 中剂量组   | 6.6                                    | 0.41±0.09 <sup>3)</sup>                 | 0.39±0.07 <sup>3)</sup>                     | 1.26±0.18 <sup>3)</sup> |
| 低剂量组   | 3.3                                    | 0.46±0.13 <sup>3)</sup>                 | 0.36±0.08 <sup>3)</sup>                     | 1.20±0.16 <sup>3)</sup> |

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with the model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

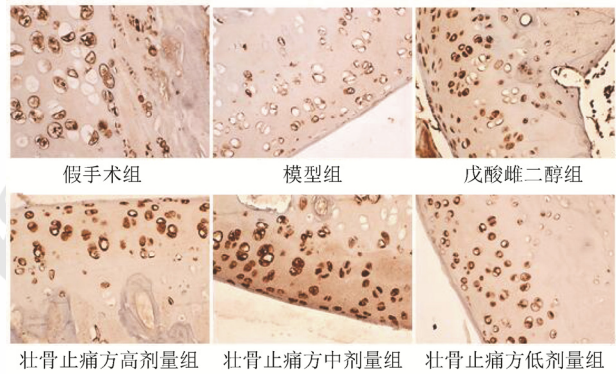


图 2 各组大鼠骨组织 OPG 蛋白表达免疫组化结果(SABC 法, 400×)

Fig. 2 Immunohistochemical results of OPG protein expression in rat bone tissue(SABC method, 400×)

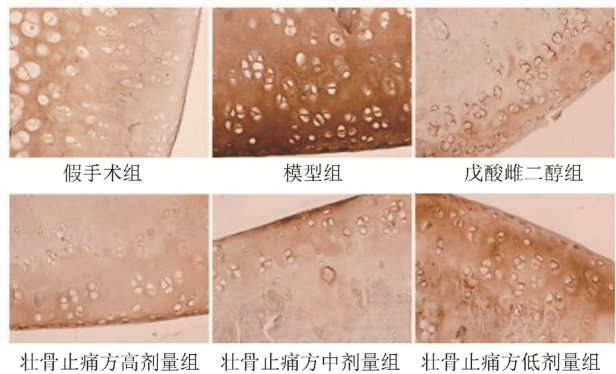


图 3 各组大鼠骨组织 RANKL 蛋白表达免疫组化结果(SABC 法, 400×)

Fig. 3 Immunohistochemical results of RANKL protein expression in rat bone tissue(SABC method, 400×)



#### 4 讨论

壮骨止痛方由补骨脂、淫羊藿、枸杞、牛膝等 7 味药物组成。方中补骨脂补肾气，温肾阳，善治腰脚疼痛之疾，为君药；淫羊藿助君药补肾虚，又能“壮腰膝，通经络”，为臣药；枸杞子，《本草正》云其“味重而纯，故能补阴，阴中求阳，故能补气，其功则明耳目，添精益髓，健骨强筋”，为佐药；川牛膝，善引诸药下达腰膝，不仅能补肝强筋骨，尚能在滋腻之群中轻疏灵动，通调经脉而活血祛瘀，兼有“调血”之职，为使药。总之，壮骨止痛方既着重补肾气、温肾阳，兼顾滋补肝肾阴精，以冀阳中求阴，阴中求阳，阴阳互生；另外补益的同时，加用牛膝等通经化瘀活络之品，标本兼顾，补而不滞，通而不伤其正<sup>[2]</sup>。

骨质疏松症的发病机制与骨重建失衡密切相关。骨重建受到内分泌激素如雌激素、降钙素和甲状旁腺素等的调节，同时骨微环境中许多细胞因子也起重要调节作用，其中 RANKL/RANK/OPG 系统是近年来的研究热点。RANKL/RANK/OPG 是破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路，在破骨细胞生成、活化、发育、激活、成熟过程中起着决定性作用。RANKL 是破骨细胞发育和激活的关键因素<sup>[3]</sup>。当成骨细胞表达并释放 RANKL，与破骨前体细胞膜上的 RANK 结合，肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factor, TRAFs)结合到 RANK 的胞质区，TRAF2、5、6 都能与 RANK 结合，其中 TRAF6 与破骨细胞生成有关。TRAF6 与 RANK 结合后，NF- $\kappa$ B 活化并转运到核内，NF- $\kappa$ B 增加了 c-Fos 的表达，c-Fos 进一步与活化的 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT-c1)结合并相互作用，启动破骨细胞生成基因的转录，最终诱导成熟的破骨细胞形成<sup>[4]</sup>。成骨细胞分泌的 OPG 以二聚体形式，竞争性地与三聚体 RANKL 结合，使其失去结

合 RANK 的活性，从而使破骨细胞的生成受到抑制。因此，OPG/RANKL 的比率与破骨细胞的生成密切相关，并最终影响骨密度和骨强度。体内外研究表明药物可以通过上调 OPG 的表达，下调 RANKL 的表达，提高 OPG/RANKL 的比值，从而抑制骨吸收、促进骨形成<sup>[5-6]</sup>。本研究中大鼠去卵巢后血清和骨组织 OPG 含量显著下降，RANKL 含量显著增加，OPG/RANKL 比值显著下降，与假手术组比较差异有统计学意义。给予壮骨止痛方干预后，各剂量组大鼠血清和骨组织 OPG 含量显著增加，RANKL 含量显著下降，OPG/RANKL 比值显著上升。

综上所述，壮骨止痛方通过促进成骨细胞分泌 OPG，抑制 RANKL 的表达和释放，调节 OPG/RANKL 平衡，抑制破骨细胞生成，从而发挥抗骨质疏松作用。但是，壮骨止痛方调节 RANKL/RANK/OPG 信号通路下游因子的具体机制还需要进一步深入研究。

#### REFERENCES

- [1] ZENG Y, MO X M, LEI X M, et al. Effects of Zhuanggu Zhitong capsule on bone density and biochemical criterion in ovariectomized rats with osteoporosis [J]. J Hunan Univ Chin Med(湖南中医药大学学报), 2008, 28(2): 10-12.
- [2] GAN G X, MO X M, LI J P, et al. Effective components of Zhuanggu Zhitong Prescription and its influence on hormones related to bone metabolism in female rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(15): 126-130.
- [3] SIMONET W S, LACEY D, DUNSTAN C, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.
- [4] BOYCE B F, XING L P. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(Suppl 1): S1.
- [5] 马金, 郑洪新. 补肾中药防治骨质疏松症的细胞分子生物学机制探要[J]. 中医药学刊, 2002, 20(2): 161-163.
- [6] WAN Y. Osteoporosis with type 2 diabetes mellitus the basic and clinical study [D]. Hebei: Hebei Medical University, 2011.

收稿日期: 2016-10-18

(本文责编: 李艳芳)