

补肾化痰方对去卵巢大鼠骨形成的影响 及其作用机制研究

张麟¹, 向楠², 周广文², 周亚娜³, 胡娅⁴, 张妍², 李章青²

(1. 湖北省武汉市第一医院, 湖北 武汉 430022;

2. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430061;

3. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061;

4. 长江大学, 湖北 荆州 434023)

摘要 **目的:**观察补肾化痰方对去卵巢大鼠骨形成的影响及其作用机制。**方法:**将 30 只 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和补肾化痰组, 每组 10 只。模型组和补肾化痰组大鼠手术摘除双侧卵巢, 假手术组不摘除卵巢, 只切除卵巢周围与双侧卵巢质量相等的脂肪组织。造模术后 5 周开始, 补肾化痰组以 $0.94 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 补肾化痰方药液灌胃, 假手术组和模型组以等体积生理盐水灌胃, 均每天 1 次, 连续干预 8 周。药物干预结束后, 将所有大鼠处死, 摘除双侧眼球取血检测血清骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) -2、Runt 相关转录因子 (Runt related transcription factor, RUNX) -2 含量, 取左侧股骨行 Micro CT 扫描测定骨密度、骨小梁数量、骨小梁平均厚度、骨小梁分离度, 取右侧股骨上端部分骨片以蛋白免疫印迹法测定骨组织中 BMP-2、RUNX-2 含量, 取右侧股骨下端部分骨片以免疫组织化学法检测 BMP-2、RUNX-2 的定位。**结果:**①一般情况。所有大鼠均在造模手术麻醉 3~4 h 后完全清醒, 正常进食, 1 周后切口完全愈合。药物干预过程中, 模型组 1 只大鼠死亡、补肾化痰组 2 只大鼠死亡。②血清 BMP-2、RUNX-2 含量检测结果。3 组大鼠的血清 BMP-2 含量比较, 差异有统计学意义 [$(245.40 \pm 10.10) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(111.03 \pm 29.75) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(190.35 \pm 14.00) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 109.998$, $P = 0.000$]; 模型组、补肾化痰组的血清 BMP-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组的血清 BMP-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠的血清 RUNX-2 含量比较, 差异有统计学意义 [$(4131.04 \pm 277.39) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(1601.09 \pm 266.10) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(3134.90 \pm 202.33) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 237.192$, $P = 0.000$]; 模型组、补肾化痰组的血清 RUNX-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组的血清 RUNX-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。③股骨 Micro CT 扫描结果。3 组大鼠骨密度比较, 差异有统计学意义 [$(556.90 \pm 8.86) \text{ mg HA} \cdot \text{cm}^{-3}$, $(498.81 \pm 9.26) \text{ mg HA} \cdot \text{cm}^{-3}$, $(530.17 \pm 10.70) \text{ mg HA} \cdot \text{cm}^{-3}$, $F = 90.488$, $P = 0.000$]; 模型组、补肾化痰组的骨密度均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组的骨密度高于模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠骨小梁数量比较, 差异有统计学意义 [$(2.65 \pm 0.32) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(1.74 \pm 0.22) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(2.41 \pm 0.33) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $F = 23.900$, $P = 0.000$]; 模型组的骨小梁数量少于补肾化痰组和假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组的骨小梁数量与假手术组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.224$)。3 组大鼠骨小梁平均厚度比较, 差异有统计学意义 [$(109.33 \pm 16.12) \mu\text{m}$, $(79.27 \pm 18.17) \mu\text{m}$, $(95.73 \pm 11.38) \mu\text{m}$, $F = 8.730$, $P = 0.001$]; 模型组的骨小梁平均厚度低于假手术组 ($P = 0.001$), 补肾化痰组的骨小梁平均厚度分别与假手术组和模型组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.181$, $P = 0.098$)。3 组大鼠骨小梁分离度比较, 差异有统计学意义 [$(350.95 \pm 68.46) \mu\text{m}$, $(472.33 \pm 33.70) \mu\text{m}$, $(406.68 \pm 47.77) \mu\text{m}$, $F = 12.460$, $P = 0.000$]; 模型组、补肾化痰组的骨小梁分离度均高于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.036$), 补肾化痰组的骨小梁分离度低于模型组 ($P = 0.017$)。④股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白含量检测结果。3 组大鼠股骨组织中的 BMP-2 含量比较, 差异有统计学意义 (0.73 ± 0.03 , 0.26 ± 0.02 , 0.48 ± 0.02 , $F = 738.111$, $P = 0.000$); 模型组、补肾化痰组股骨组织中的 BMP-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组股骨组织中的 BMP-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠股骨组织中的 RUNX-2 含量比较, 差异有统计学意义 (0.67 ± 0.03 , 0.36 ± 0.03 , 0.47 ± 0.02 , $F = 286.493$, $P = 0.000$); 模型组、补肾化痰组股骨组织中的 RUNX-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 补肾化痰组股骨组织中的 RUNX-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。⑤股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白定位检测结果。BMP-2、RUNX-2 的阳性表达主要位于骨髓基质细胞胞浆及骨小梁周边成骨细胞中, 光学显微镜下阳性表达蛋白呈棕黄色颗粒。**结论:**补肾化痰方能通过调节 BMP-2/Smads/RUNX-2 信号转导通路, 促进去卵巢大鼠的骨形成。

关键词 骨质疏松; 补肾化痰方; 信号传导; 骨形态发生蛋白质 2; Runt 相关转录因子 2; 大鼠, Sprague-Dawley; 动物实验

基金项目: 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目 (2012Z-Y31); 湖北中医药大学“青苗计划”资助项目 (2016ZZX016)

通讯作者: 向楠 E-mail: xiangnan61@sina.com

Effect of Bushen Huatan Fang(补肾化痰方) on bone formation of ovariectomized rats and its mechanism of action

ZHANG Lin¹, XIANG Nan², ZHOU Guangwen², ZHOU Yana³, HU Ya⁴, ZHANG Yan², LI Zhangqing²

1. The First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei, China

2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China

3. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China

4. Changjiang University, Jingzhou 434023, Hubei, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Bushen Huatan Fang(补肾化痰方, BSHTF) on bone formation of ovariectomized rats and its mechanism of action. **Methods:** Thirty 6-month-old SPF – grade female SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group and BSHTF group, 10 cases in each group. The bilateral ovariectomy were performed on rats in model group and BSHTF group, and the resection of same mass of fat around bilateral ovaries were performed on rats in sham – operated group. Since the 5th week after the modeling operation, the rats in BSHTF group were intragastric administrated with BSHTF solution in dosages of 0.94 g/mL, while the rats in sham – operated group and model group were intragastric administrated with the same dose of normal saline, once a day for consecutive 8 weeks. After the end of drug intervention, all rats were executed and their bilateral eyeballs were removed and their blood were fetched out for detecting the serum contents of bone morphogenetic protein(BMP) – 2 and Runt related transcription factor(RUNX) – 2. Their left femurs were fetched out for determining bone mineral density(BMD), trabecular number(Tb. N), mean trabecular thickness(Tb. Th) and trabecular separation(Tb. Sp) through Micro – CT scanning. Meanwhile, the sclerites were fetched out from the upper end and the lower end of right femurs respectively for measuring the contents of BMP – 2 and RUNX – 2 in bone tissues by using Western blot assay and detecting the location of BMP – 2 and RUNX – 2 by using immunohistochemical method. **Results:** All rats were fully waked up from 3 – 4 – hour anesthesia for the modeling surgery and fed normally, and their incisions healed completely 1 week later. One rat in model group and 2 rats in BSHTF group died during the drug intervention. The detection results of serum contents of BMP – 2 and RUNX – 2 showed that there was statistical difference in serum contents of BMP – 2 between the 3 groups(245.40 ± 10.10, 111.03 ± 29.75, 190.35 ± 14.00 pg/mL, $F = 109.998$, $P = 0.000$). The serum contents of BMP – 2 were lower in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and were higher in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$). There was statistical difference in serum contents of RUNX – 2 between the 3 groups(4131.04 ± 277.39, 1601.09 ± 266.10, 3134.90 ± 202.33 pg/mL, $F = 237.192$, $P = 0.000$). The serum contents of RUNX – 2 were lower in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and were higher in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$). The results of Micro – CT scanning on femurs showed that there was statistical difference in the BMD between the 3 groups(556.90 ± 8.86, 498.81 ± 9.26, 530.17 ± 10.70 mg HA/cm(–3), $F = 90.488$, $P = 0.000$). The BMD was lower in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and was higher in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$). There was statistical difference in Tb. N between the 3 groups(2.65 ± 0.32, 1.74 ± 0.22, 2.41 ± 0.33 /mm, $F = 23.900$, $P = 0.000$). The Tb. N was less in model group compared to BSHTF group and sham – operated group($P = 0.000$, $P = 0.000$), and there was no statistical difference in Tb. N between BSHTF group and sham – operated group($P = 0.224$). There was statistical difference in mean Tb. Th between the 3 groups(109.33 ± 16.12, 79.27 ± 18.17, 95.73 ± 11.38 μm, $F = 8.730$, $P = 0.001$). The mean Tb. N was less in model group compared to sham – operated group($P = 0.001$), and there was no statistical difference in mean Tb. N between BSHTF group and sham – operated group and between BSHTF group and model group($P = 0.181$, $P = 0.098$). There was statistical difference in Tb. Sp between the 3 groups(350.95 ± 68.46, 472.33 ± 33.70, 406.68 ± 47.77 μm, $F = 12.460$, $P = 0.000$). The Tb. Sp was higher in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and was lower in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$, $P = 0.036$; $P = 0.017$). The detection results of contents of BMP – 2 and RUNX – 2 protein in femoral tissues showed that there was statistical difference in content of BMP – 2 in femoral tissues between the 3 groups(0.73 ± 0.03, 0.26 ± 0.02, 0.48 ± 0.02, $F = 738.111$, $P = 0.000$). The contents of BMP – 2 in femoral tissues were lower in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and were higher in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$). There was statistical difference in content of RUNX – 2 in femoral tissues between the 3 groups(0.67 ± 0.03, 0.36 ± 0.03, 0.47 ± 0.02, $F = 286.493$, $P = 0.000$). The contents of RUNX – 2 in femoral tissues were lower in model group and BSHTF group compared to sham – operated group, and were higher in BSHTF group compared to model group($P = 0.000$,

$P=0.000; P=0.000$). The detection results of location of BMP-2 and RUNX-2 protein in femoral tissues showed that the positive expressions of BMP-2 and RUNX-2 were mainly found in cytoplasm of bone marrow stromal cells and osteoblasts around bone trabecula, and the positive expressed protein presented with brown-yellow granules under the optical microscope. **Conclusion:** BSHTF can promote the bone formation of ovariectomized rats through regulating BMP-2/Smads/RUNX-2 signal transduction pathway.

Keywords osteoporosis; Bushen Huatan Fang; signal transduction; bone morphogenetic protein 2; Runt related transcription factor 2; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 作为原发性骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 的常见类型之一, 其高发病率严重困扰着中老年绝经女性的健康。近年来的大量研究表明, 中医药疗法可以提高 PMOP 患者的骨密度, 减轻其疼痛症状^[1]。基于对骨衰老、脂代谢紊乱与 OP 的认识, 向楠及其课题组提出应从“痰”论治 OP, 以补肾化痰方作为主方, 取得了一定的临床疗效^[2]。而前期研究也已证实补肾化痰方能够显著提高去卵巢大鼠的骨密度, 其机制与调控骨髓间充质干细胞的成骨及成脂分化有关^[3-4]。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)-2/Smads/Runt 相关转录因子 (Runt related transcription factor, RUNX)-2 信号转导通路是目前已经发现的骨组织代谢信号调节系统之一^[5]。为探讨补肾化痰方防治 OP 的作用机制, 本研究观察了补肾化痰方对去卵巢大鼠骨形成及 BMP-2/Smads/RUNX-2 信号通路的影响, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只, 体重 (280 ± 30) g, 由华中科技大学同济医学院提供, 实验动物合格证号 SCXK (鄂) 42000600017470。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验药物与试剂 补肾化痰方 (药物组成包括菟丝子 30 g、淫羊藿 10 g、补骨脂 15 g、瓜蒌 15 g、红曲 12 g、净山楂 20 g), 生药均由湖北省中医院门诊部药房提供, 加水煎煮浓缩后在 4 ℃ 贮存备用。大鼠 BMP-2 试剂盒、RUNX-2 试剂盒 (武汉基因美科技有限公司), 大鼠 BMP-2 抗体、大鼠 RUNX-2 抗体 (Abcam 公司)。

1.3 实验仪器 MK3 酶标仪 (Labsystems Multiskan MS 公司), Tanon-5200 全自动化学发光分析仪 (上海天能公司), RM2235 石蜡切片机 (徕卡显微系统有限公司), uCT50 Micro CT (SCANCO Medical 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分

为假手术组、模型组和补肾化痰组, 每组 10 只。所有大鼠均按照 30 mg · kg⁻¹ 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉, 起效后做背部正中切口, 模型组和补肾化痰组大鼠进入腹腔在肾下极附近找到卵巢, 用 4 号线结扎并摘除双侧卵巢, 分层缝合切口; 假手术组术式相同, 但不摘除卵巢, 只切除卵巢周围与双侧卵巢质量相等的脂肪组织。

2.2 药物干预 按照人和动物间体表面积折算法, 以临床成人常用剂量 (按体质量 60 kg 计算) 计算大鼠的用药量。造模术后 5 周开始, 补肾化痰组以 0.94 g · mL⁻¹ 补肾化痰方药液灌胃, 假手术组和模型组以等体积的生理盐水灌胃, 均每天 1 次, 连续干预 8 周。药物干预期间各组大鼠分笼常规饲养, 自由饮水。

2.3 实验指标检测 药物干预结束后, 将所有大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后脱颈处死。摘除双侧眼球取血检测血清 BMP-2、RUNX-2 含量, 取左侧股骨行 Micro CT 扫描测定骨密度、骨小梁数量、骨小梁平均厚度、骨小梁分离度, 在右侧股骨上端取部分骨片以蛋白免疫印迹法测定骨组织中 BMP-2、RUNX-2 含量, 取右侧股骨下端部分骨片以免疫组织化学法检测 BMP-2、RUNX-2 的定位。

2.3.1 血清 BMP-2、RUNX-2 含量检测 摘除大鼠双侧眼球取血, 置于肝素抗凝管内, 在 30 min 内以 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min (离心半径 5.56 cm), 取上清在 -20 ℃ 保存备用。血清采集完毕后, 采用酶联免疫吸附法测定血清中 BMP-2、RUNX-2 含量, 严格按照试剂盒说明进行操作。

2.3.2 股骨 Micro CT 扫描 取左侧股骨, 固定在 Micro CT 载物台上, 以 360° 扫描角度、15 μm 的扫描分辨率沿大鼠股骨长轴扫描股骨远端, 获取连续平面图像。扫描完成后, 选取生长板远端 1.0 mm、层厚 2.0 mm 的骨组织为感兴趣区域进行三维重组, 最低阈值 170, 提取图像信息。获取重组图像后, 使用 Micro CT 自带的软件进行定量分析, 检测参数包括骨密度、骨小梁数量、骨小梁平均厚度、骨小梁分

离度。

2.3.3 股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白含量测定 将取得的右侧股骨骨片研磨成细小的碎片,每 20 mg 加入 150 ~ 250 μL 裂解液裂解匀浆,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 5.56 cm),取上清,进行蛋白质定量后在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。样本收集完毕后以全自动酶标仪检测蛋白浓度,加入载样缓冲液,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。取蛋白质样品采用体积百分比为 15% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,设置电泳条件 70 V,待电泳至蛋白 Marker 后调整电压为 110 V,直至电泳完毕。将蛋白从十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜上,转膜条件为恒流 0.3 A、30 ~ 60 min。转膜完毕后,用含质量百分比为 5% 脱脂奶粉的磷酸盐洗涤缓冲液室温封闭 2 h。一抗 BMP-2、RUNX-2 用 5% 磷酸盐洗涤缓冲液稀释,其中 BMP-2 稀释比例为 1:500、RUNX-2 稀释比例为 1:1000,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,孵育一抗的膜用磷酸盐洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。随后根据用量,按照 1:10 000 稀释 HRP 标记的二抗,与膜室温孵育 1 h 后进行电化学发光检测:将膜放置在暗室中,根据用量取电化学发光检测发光液 A 和 B 等量混匀,加在膜的正面与之充分接触,然后将膜置于全自动化学发光分析仪中检测。

2.3.4 股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白定位 取右侧股骨下端放入 4% 多聚甲醛中固定,用乙二胺四乙酸在 4 $^{\circ}\text{C}$ 脱钙 15 ~ 20 d,常规脱水、石蜡包埋,用 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲溶液进行抗原高压热修复。在阻断内源性过氧化物酶活性后,滴加兔抗 I 型胶原一抗(1:200),室温过夜,PBS 清洗,滴加 50 μL 即用型 MaxVision 试剂,湿盒孵育,室温下放置 20 ~ 30 min。PBS 冲洗,DAB 染色,苏木素复染,显微镜下观察控制染色程度。水洗烘干后置于二甲苯中透明,中性树胶封片后在光镜下观察。

2.4 数据统计 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析。3 组大鼠血清 BMP-2 含量、血清 RUNX-2 含量、骨组织 BMP-2 含量、骨组织 RUNX-2 含量、骨密度、骨小梁数量、骨小梁平均厚度、骨小梁分离度的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 一般情况 所有大鼠均在造模手术麻醉 3 ~ 4 h

后完全清醒,正常进食,1 周后切口完全愈合。药物干预过程中,模型组 1 只大鼠死亡、补肾化痰组 2 只大鼠死亡。

3.2 血清 BMP-2、RUNX-2 含量检测结果 3 组大鼠的血清 BMP-2 含量比较,差异有统计学意义;模型组、补肾化痰组的血清 BMP-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$),补肾化痰组的血清 BMP-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠的血清 RUNX-2 含量比较,差异有统计学意义;模型组、补肾化痰组的血清 RUNX-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$),补肾化痰组的血清 RUNX-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠血清骨形态发生蛋白 2 和 Runt 相关转录因子 2 含量 $\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	样本量 (只)	骨形态发生 蛋白 2	Runt 相关转录 因子 2
假手术组	10	245.40 \pm 10.10	4 131.04 \pm 277.39
模型组	9	111.03 \pm 29.75	1 601.09 \pm 266.10
补肾化痰组	8	190.35 \pm 14.00	3 134.90 \pm 202.33
F 值		109.998	237.192
P 值		0.000	0.000

3.3 股骨 Micro CT 扫描结果 3 组大鼠骨密度比较,差异有统计学意义;模型组、补肾化痰组的骨密度均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$),补肾化痰组的骨密度高于模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠骨小梁数量比较,差异有统计学意义;模型组的骨小梁数量少于补肾化痰组和假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$),补肾化痰组的骨小梁数量与假手术组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.224$)。3 组大鼠骨小梁平均厚度比较,差异有统计学意义;模型组的骨小梁平均厚度低于假手术组 ($P = 0.001$),补肾化痰组的骨小梁平均厚度分别与假手术组和模型组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.181$, $P = 0.098$)。3 组大鼠骨小梁分离度比较,差异有统计学意义;模型组、补肾化痰组的骨小梁分离度均高于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.036$),补肾化痰组的骨小梁分离度低于模型组 ($P = 0.017$)。见表 2。

3.4 股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白含量检测结果 3 组大鼠股骨组织中的 BMP-2 含量比较,差异有统计学意义;模型组、补肾化痰组股骨组织中的 BMP-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$),补肾化痰组股骨组织中的 BMP-2 含量高于

表 2 3 组大鼠股骨 Micro CT 扫描结果 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(只)	骨密度 (mg HA · cm ⁻³) ¹⁾	骨小梁数量 (个 · mm ⁻¹) ²⁾	骨小梁平均厚度 (μm)	骨小梁分离度 (μm)
假手术组	10	556.90 ± 8.86	2.65 ± 0.32	109.33 ± 16.12	350.95 ± 68.46
模型组	9	498.81 ± 9.26	1.74 ± 0.22	79.27 ± 18.17	472.33 ± 33.70
补肾化痰组	8	530.17 ± 10.70	2.41 ± 0.33	95.73 ± 11.38	406.68 ± 47.77
<i>F</i> 值		90.488	23.900	8.730	12.460
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.001	0.000

1) mg HA · cm⁻³ 代表每立方厘米骨组织中的羟基磷灰石 (HA) 的质量; 2) 个 · mm⁻¹ 表示图像中每毫米内骨组织与非骨组织的交点数量

模型组 ($P = 0.000$)。3 组大鼠股骨组织中的 RUNX-2 含量比较, 差异有统计学意义; 模型组、补肾化痰组股骨组织中的 RUNX-2 含量均低于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$), 补肾化痰组股骨组织中的 RUNX-2 含量高于模型组 ($P = 0.000$)。见表 3、图 1。

表 3 3 组大鼠股骨组织中骨形态发生蛋白 2 和 Runt 相关转录因子 2 含量 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(只)	骨形态发生蛋白 2	Runt 相关转录因子 2
假手术组	10	0.73 ± 0.03	0.67 ± 0.03
模型组	9	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.03
补肾化痰组	8	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.02
<i>F</i> 值		738.111	286.493
<i>P</i> 值		0.000	0.000

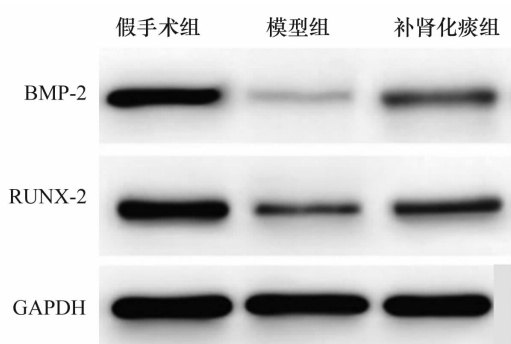


图 1 3 组大鼠股骨组织中 BMP-2 和 RUNX-2 蛋白印迹图 BMP-2 为骨形态发生蛋白 2; RUNX-2 为 Runt 相关转录因子 2

3.5 股骨组织中 BMP-2、RUNX-2 蛋白定位检测结果 检测结果显示 BMP-2、RUNX-2 的阳性表达主要位于骨髓基质细胞胞浆及骨小梁周边成骨细胞中, 光学显微镜下阳性表达蛋白呈棕黄色颗粒 (图 2、图 3)。

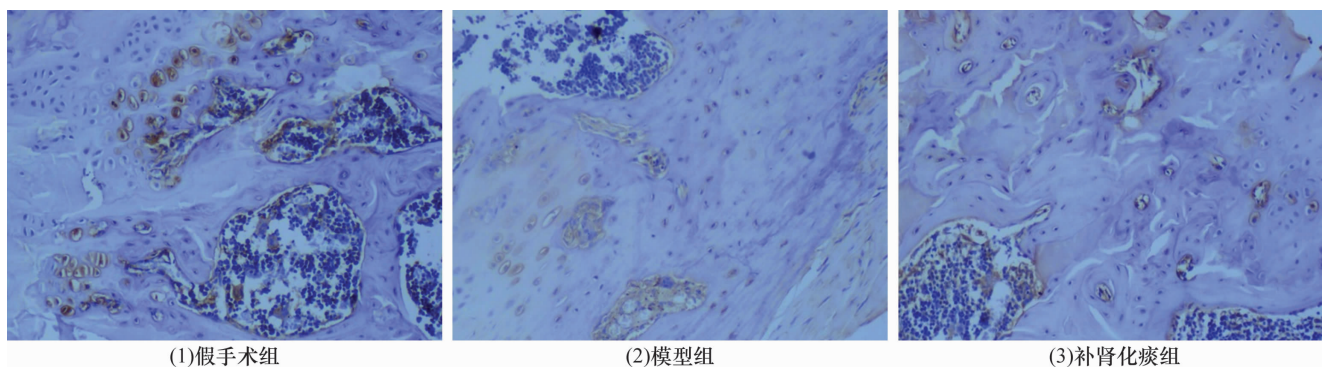


图 2 3 组大鼠股骨组织中骨形态发生蛋白 2 免疫组织化学染色结果 (×200)

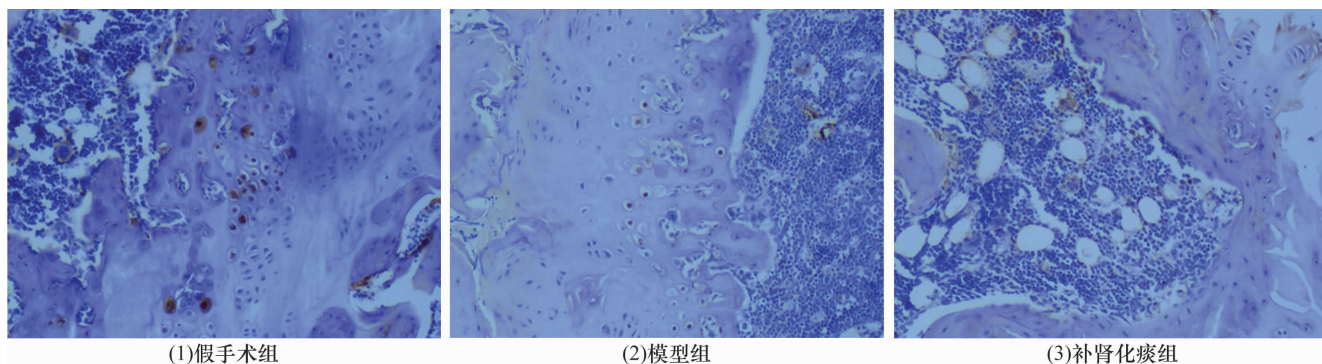


图 3 3 组大鼠股骨组织中 Runt 相关转录因子 2 免疫组织化学染色结果 (×200)

4 讨 论

现代研究表明,骨代谢的异常,即骨形成(成骨细胞调控)和骨吸收(破骨细胞调控)之间的动态失衡是 OP 发病的中心环节。而随着骨生物学研究的不断深入,研究者发现在调节骨代谢过程中有诸多信号通路的参与,通过调节成骨或破骨细胞功能,进而影响 OP 的发病。其中, BMP-2/Smads/RUNX-2 信号转导通路在骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化和成骨细胞的分化成熟方面起着至关重要的作用。 BMP-2 是成骨细胞分化和骨形成最有效的诱导因子,可以通过 Smads 途径上调 RUNX-2 的表达^[6],后者是重要的成骨细胞分化转录因子。 RUNX-2 参与调控成骨细胞分化进程中细胞外基质蛋白的基因表达,同时通过调节成骨细胞的分化完成对骨生成的控制,对成骨细胞的成熟、稳定起着重要的作用^[7]。 RUNX-2 的表达受到参与成骨细胞分化的多种生长因子和激素的调控。大量基础研究也表明, BMP-2/Smads/RUNX-2 信号通路参与成骨细胞分化以及骨细胞细胞外基质合成与分泌,可促进骨的形成及骨量增加^[8]。

中医认为 OP 属于“骨痿”“骨痹”等范畴。现代学者普遍认为其发生与肾精亏损、脾胃虚弱、肝血亏虚、瘀血阻络 4 个因素有关^[9],并多从这几个方面入手,辨证施治^[10]。 OP 是机体衰老过程在骨代谢方面的体现,肾虚髓空是导致衰老的根本原因,而我们认为在髓枯与骨痿之间,还存在着“痰生”的过程。中医理论认为,人体的衰老过程就是肾气肾精由充盛到衰少继而耗竭的过程。老者肾气亏虚,蒸腾气化作用失常,津液不能蒸化而为痰浊;或肾精亏虚,阴虚火动,灼津为痰。《杂病源流犀烛·痰饮源流》曰:“其为物则流动不测,故其为害,上至巅顶,下至涌泉,随气升降,周身内外皆到,五脏六腑皆有。”故痰浊产生之后,外而经络、肌肤、筋骨,内而脏腑,全身各处,无处不到,阻滞气血运行,达到一定程度而不能消除时,便可引起组织器官损伤而导致衰老。由此可见,痰浊既是脏腑虚衰的病理产物,又是导致脏腑功能进一步减退的因素^[11]。痰瘀皆为津血所化,有形属阴,在疾病治疗过程中往往相互影响,使疾病迁延难愈,然而其对应的现代医学研究的内涵却不尽相同。很多研究者认为中医学的“血瘀”学说在 OP 发病中起着至关重要的作用。血瘀通过影响骨内微循环进而影响

成骨细胞和破骨细胞活性,最终导致 OP 发生。很多研究者从理论、临床、实验研究等方面广泛而深入地探讨了高脂血症与痰浊的关系,认为血脂增高和脂蛋白异常与中医学中的“痰”有关,脂质代谢紊乱是“痰浊”的物质基础^[12]。治疗高脂血症时以治痰为主^[13],辨证配伍,取得的良好疗效也反证了高脂血症与痰浊之间的密切联系。很多临床和实验研究发现,脂代谢紊乱与 OP 的发生密切相关:动物实验和流行病学调查分析肯定了血脂升高常与 OP 共存^[14], OP 和血脂紊乱发生率都在绝经后明显增加^[15],防治 OP 的药物对血脂有调节作用,降脂类药物可改善 OP,骨代谢和脂代谢的遗传基因存在相关性^[16],骨髓间充质干细胞向成骨方向分化减弱、向成脂方向分化增强是导致老年人发生 OP 和肥胖的主要原因之一^[17]。因此,本课题组基于对痰浊在 OP 发病中作用的认识,结合“肾主骨,生髓”的中医理论,提出了“脂代谢异常可能与 OP 痰浊有关”的假说,并制定了补肾化痰的新治则,从“痰”论治骨质疏松^[2]。我们前期的研究已经证实了补肾化痰方能够增加去卵巢大鼠的骨密度,降低其骨髓过氧化物酶增殖物活化受体 $\gamma 2$ mRNA 表达,上调骨髓细胞中骨钙素 mRNA、核心结合因子 mRNA、 BMP-2 和转化生长因子 $\beta 1$ 的表达水平^[3-4]。

除骨密度降低外,骨质疏松骨组织的改变还包括骨小梁微结构(包括骨小梁数量、骨小梁分离度和骨小梁厚度)的退变^[18]。骨微结构独立于骨密度影响骨强度,松质骨微结构与其生物力学性能存在一定的线性关系,骨微结构的退变与骨质疏松性骨折密切相关^[19]。

本研究的结果提示,补肾化痰方能通过调节 BMP-2/Smads/RUNX-2 信号转导通路,促进去卵巢大鼠的骨形成。本研究的不足之处在于,药物干预沿用之前研究中采用的方法,没有对造模后(即 0 周)及药物干预前(即 5 周)的相关指标进行检测,无法确定补肾化痰方对 OP 起预防性作用还是治疗性作用,这些还有待进一步的研究。

5 参考文献

- [1] 吴海洋,索欢,王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 241-244.
- [2] TIAN L, YU XJ. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction - interrelated and mutually regulated (Review) [J]. Mol

- Med Rep, 2015, 12(1): 783 - 794.
- [3] 周亚娜, 向楠, 陈辉. 补肾化痰法影响骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(3): 275 - 277.
- [4] 胡娅, 向楠, 唐曦, 等. 补肾化痰方对去卵巢大鼠血清 TRACP5b 和 β -CTX 的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(12): 2227 - 2229.
- [5] 查小云, 胡予. 骨质疏松相关信号通路研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 37(2): 205 - 209.
- [6] JAVED A, AFZAL F, BAE JS, et al. Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2 - induced RUNX2 - SMAD complex to promote osteoblast differentiation[J]. Cells Tissues Organs, 2009, 189(1/4): 133 - 137.
- [7] KOMORI T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 189 - 195.
- [8] 於绍龙, 刘丹平. 成骨因子 BMP - 2/Smads/Runx2 信号转导通路[J]. 锦州医科大学学报, 2014, 35(5): 94 - 96.
- [9] 刘政, 吴倩, 黄帅立. 骨质疏松症的中医病因病机与治则研究[J]. 江苏中医药, 2014, 46(2): 42 - 44.
- [10] 葛继荣, 郑洪新, 万小明, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1023 - 1028.
- [11] 第五永长. 老年性痴呆“髓空痰浊”病机及治法再识[J]. 中医杂志, 2016, 57(12): 1075 - 1077.
- [12] 丁宁, 张梅, 张琳丽, 等. 脂代谢紊乱的中医药研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(2): 549 - 552.
- [13] 李维娜, 冯玲, 隋歌川. 从痰浊论治高血脂血症研究进展[J]. 山东中医杂志, 2017, 36(5): 430 - 433.
- [14] 张冰雨, 曾瑞翔, 雷涛. 脂代谢与骨代谢相关机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(10): 1263 - 1266.
- [15] 苏甜, 罗湘杭. 血脂紊乱与骨代谢[J]. 药物与临床, 2015, 12(15): 27 - 33.
- [16] 沈蕴茹. 载脂蛋白 E 的基因多样性对脂代谢及骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(10): 1353 - 1358.
- [17] 陈晓, 苏佳灿. 骨质疏松研究热点: 骨髓间充质干细胞分化命运[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(4): 397 - 404.
- [18] 丁文鸽. 卵巢切除骨质疏松小鼠骨折愈合不同时期骨微结构及力学性能变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(42): 8247 - 8250.
- [19] DAVISON KS, KENDLER DL, AMMANN P, et al. Assessing fracture risk and effects of osteoporosis drugs: bone mineral density and beyond[J]. Am J Med, 2009, 122(11): 992 - 997.

(收稿日期: 2018-06-07 本文编辑: 李晓乐)

· 简 讯 ·

《中医正骨》2019 年广告业务范围及收费标准

■ 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息, 如书刊征订、招生启事、会议通知等

刊登位置	印刷规格	版面	每期收费标准(元)	半年收费标准(元)	全年收费标准(元)
封二	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 000	54 000	75 600
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 000	48 000	67 200
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	10 000	60 000	84 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	7 000	42 000	58 800
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	6 000	36 000	50 400
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120