

· 基础研究 ·

# 从脂代谢角度探讨补肾活血方 治疗绝经后骨质疏松症的作用机制

章胜权<sup>1</sup>, 王煦程<sup>2</sup>, 叶福生<sup>3</sup>, 袁文华<sup>4</sup>

(1. 杭州市富阳中医骨伤医院, 浙江 杭州 311400; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;  
3. 浙江萧山医院, 浙江 杭州 311200; 4. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要 目的:**从脂代谢角度探讨补肾活血方治疗绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的作用机制。**方法:**将 15 只 9 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只。模型组和补肾活血方组小鼠结扎两侧输卵管后, 剪去卵巢进行 PMOP 造模; 假手术组小鼠结扎两侧输卵管后剪除卵巢旁部分脂肪组织。从造模术后第 2 天开始, 补肾活血方组使用折合生药浓度为  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的补肾活血方浓缩剂灌胃, 每次 0.4 mL, 每天 1 次; 假手术组和模型组小鼠以等量生理盐水灌胃。3 组小鼠均每天灌胃 1 次, 连续灌胃 8 周。药物干预结束后第 2 天, 将所有小鼠脱颈处死, 取股骨远端进行观察。以 Micro-CT 进行骨组织微结构观察, 通过阿尔新蓝-苏木素染色观察髓腔中脂肪空泡数量, 通过免疫组织化学染色观察骨组织中脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid-binding protein 4, FABP4) 表达情况。**结果:**①一般情况。实验期间小鼠饮食、精神状况正常, 活动规律, 至处死前无小鼠死亡。②骨组织微结构观察结果。Micro-CT 图像显示, 与假手术组相比, 模型组小鼠股骨骨密度明显降低, 骨小梁减少; 补肾活血方组小鼠的股骨骨密度和骨小梁数量与假手术组相当。假手术组、模型组、补肾活血方组小鼠的股骨骨密度比较, 差异有统计学意义 [ $(0.033 \pm 0.009) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $(0.003 \pm 0.001) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $(0.022 \pm 0.009) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $F = 14.240$ ,  $P = 0.005$ ]; 模型组的股骨骨密度低于假手术组和补肾活血方组 ( $P = 0.046$ ,  $P = 0.050$ ); 补肾活血方组和假手术组的股骨骨密度比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.203$ )。③髓腔中脂肪空泡数量观察结果。阿尔新蓝-苏木素染色结果显示, 模型组髓腔内脂肪空泡数量较假手术组增加; 补肾活血方组髓腔内脂肪空泡数量少于模型组, 与假手术组接近。④骨组织中 FABP4 表达情况检测结果。假手术组、模型组、补肾活血方组股骨组织中的 FABP4 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(1.287 \pm 0.015) \%$ ,  $(11.897 \pm 0.703) \%$ ,  $(0.990 \pm 0.162) \%$ ,  $F = 800.200$ ,  $P = 0.000$ ]。模型组的 FABP4 含量高于假手术组和补肾活血方组 ( $P = 0.001$ ;  $P = 0.001$ ), 假手术组的 FABP4 含量高于补肾活血方组 ( $P = 0.034$ )。**结论:**通过调控 FABP4 表达, 抑制骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化, 可能是补肾活血方治疗 PMOP 的作用机制之一。

**关键词** 骨质疏松; 绝经后; 补肾活血方; 脂类代谢; 小鼠; 动物实验

## Investigation on the mechanism of Bushen Huoxue Fang(补肾活血方) for treatment of postmenopausal osteoporosis from the view of lipid metabolism

ZHANG Shengquan<sup>1</sup>, WANG Xucheng<sup>2</sup>, YE Fusheng<sup>3</sup>, YUAN Wenhua<sup>4</sup>

1. Fuyang TCM Orthopedic - Traumatological Hospital, Hangzhou 311400, Zhejiang, China  
2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China  
3. Zhejiang Xiaoshan Hospital, Hangzhou 311200, Zhejiang, China  
4. Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of Bushen Huoxue Fang(补肾活血方, BSHXF) in treatment of postmenopausal osteoporosis (PMOP) from the view of lipid metabolism. **Methods:** Fifteen 9-week-old healthy SPF-grade female C57BL/6J mice were randomly divided into model group, BSHXF group and sham-operated group, 5 cases in each group. The mice in model group and BSHXF group were subjected to bilateral tubal ligation, followed by removing ovaries for inducing PMOP; while the ones in sham-operated group underwent bilateral tubal ligation, followed by removal of peri-ovarian adipose tissues. From the 2nd day after the modeling operation, the

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2020ZB208); 杭州市医药卫生科技项目 (B20200552); 浙江中医药大学基本科研能力提升项目 (2021JKJNTZ017A)

通讯作者: 袁文华 E-mail: 337979694@qq.com

mice in BSHXF group were intragastric administrated with BSHXF concentrate (equivalent to the crude drug with concentration of 1.5 g/mL), once a day, 0.4 ml at a time; while the ones in sham-operated group and model group with the same dose of normal saline. All mice in the 3 groups were intragastric administrated once a day for consecutive 8 weeks. On day 2 after the end of drug intervention, all mice were executed by cervical dislocation and their distal femurs were harvested for observation. The bone tissue microstructure was observed by micro-CT scanning, and the number of fatty vacuoles in medullary cavity was observed via alcian blue-hematoxylin (ABH) staining, moreover, the expression of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) in bone tissues was detected by using immunohistochemical staining. **Results:** ① During the experiment, all mice were in normal mental states with euphagia and regular activities, and no death occurred before the execution. ② As demonstrated by the Micro-CT images, the femur bone mineral density (BMD) was obviously declined and the bone trabecula decreased in model group compared with those in sham-operated group; while the femur BMD and bone trabecula number in BSHXF group were similar to those of sham-operated group. There was statistical difference in femur BMD between the 3 groups ( $0.033 \pm 0.009$ ,  $0.003 \pm 0.001$ ,  $0.022 \pm 0.009$  g/cm<sup>3</sup>),  $F = 14.240$ ,  $P = 0.005$ . The femur BMD was lower in model group compared to sham-operated group and BSHXF group ( $P = 0.046$ ,  $P = 0.050$ ), and there was no statistical difference in femur BMD between BSHXF group and sham-operated group ( $P = 0.203$ ). ③ The results of ABH staining showed that the number of fatty vacuoles in medullary cavity increased in model group compared to sham-operated group, while it was less in BSHXF group compared to model group, and was similar to that of sham-operated group. ④ There was statistical difference in the level of FABP4 in femur tissues between the 3 groups ( $1.287 \pm 0.015$ ,  $11.897 \pm 0.703$ ,  $0.990 \pm 0.162\%$ ),  $F = 800.200$ ,  $P = 0.000$ . The level of FABP4 was higher in model group compared to sham-operated group and BSHXF group ( $P = 0.001$ ;  $P = 0.001$ ), and was lowest in BSHXF group ( $P = 0.034$ ). **Conclusion:** BSHXF can inhibit the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into adipocytes through regulating the expression of FABP4, which may be one of its mechanisms for treatment of PMOP.

**Keywords** osteoporosis, postmenopausal; Bushen Huoxue Fang; lipid metabolism; mice; animal experimentation

绝经后女性人群中骨质疏松症的发生率较高,并且很多绝经后女性有明显的骨量减少<sup>[1]</sup>,而绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)导致的骨质疏松性骨折会给患者和家庭造成严重负担。骨质疏松症与中医学中的“骨痿”最为相似<sup>[2]</sup>。中医学理论认为,该病是由肾精亏虚、骨骼失养、脉络不畅、瘀血阻络所致,治疗当以补肾填精活血为主。依据上述病机和治则,临床常选用补肾活血方治疗该病<sup>[3]</sup>。补肾活血方的药物组成复杂,目前该方治疗 PMOP 的作用机制尚不完全明确。研究表明,骨质疏松症和脂代谢之间的关系密切<sup>[4-5]</sup>。为此,我们进行了此次实验,拟从脂代谢角度探讨补肾活血方治疗 PMOP 的作用机制,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 9 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6J 小鼠 15 只,体质量 18~20 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016。实验方案通过浙江中医药大学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂** 补肾活血方药物组成包括熟地黄 9 g、杜仲 4 g、炮附片 6 g、枸杞子 9 g、山萸肉 6 g、红花 3 g、山药 6 g、肉桂 6 g、桃仁 6 g、炙甘草 3 g,所有药物

均购自浙江中医药大学中药饮片有限公司,委托浙江省中医院制剂中心提取浓缩;熟地黄、杜仲、炮附片、枸杞子、山萸肉、红花、山药、炙甘草以 12 倍量纯净水回流提取 3 次,肉桂、桃仁以 10 倍量 60% 乙醇浸泡提取 3 次,将水提物、醇提物充分混合后,浓缩至每毫升含生药 3 g,小鼠用药量按体表面积折算为等效剂量。4% 组织细胞固定液、柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司),苏木素、硫酸铝铵、碘酸钠、甘油、阿利新蓝(美国 Sigma 公司),PBS 磷酸盐缓冲液(北京博奥森生物技术有限公司)。

**1.3 主要设备** VIP 5jr 脱水机(日本樱花公司),AP280-2 包埋机、HM355S 石蜡切片机(德国 Microm 公司),Zeiss Axio ScopeA1 显微镜及显微拍摄系统(德国蔡司公司),Skyscan117 Micro-CT(比利时布鲁克林公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及造模** 将 15 只小鼠随机分为假手术组、模型组和补肾活血方组,每组 5 只,适应性喂养 1 周后进行造模。按  $0.009 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  给小鼠腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠进行麻醉,剔除术区毛发。模型组和补肾活血方组小鼠结扎两侧输卵管后,剪去卵巢;假手术组小鼠结扎两侧输卵管后剪除卵巢旁部分脂

肪组织。术后将小鼠置于 37 ℃ 环境中约 20 min 进行复温,具体时间以小鼠恢复排便或行动为准。

**2.2 药物干预** 从造模术后第 2 天开始,补肾活血方组使用折合生药浓度为  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的补肾活血方浓缩剂灌胃,每次 0.4 mL;假手术组和模型组小鼠以等量生理盐水灌胃。3 组小鼠均每天灌胃 1 次,连续灌胃 8 周。

**2.3 实验指标检测** 药物干预结束后第 2 天,将所有小鼠腹腔过量注射 0.3% 戊巴比妥钠麻醉后脱颈处死,取股骨远端进行观察分析。

**2.3.1 骨组织微结构观察** 采用 Micro-CT 对小鼠的股骨远端进行扫描,设置参数:管电压 90 kV,管电流 450 mA,分辨率  $9 \mu\text{m}$ 。以股骨远端骺线距近端 50 层为起点,计量 100 层,使用 N-Recon 软件进行三维图像重建,观察骨组织的微结构变化情况,并通过 CT-AN 软件分析股骨骨密度。

**2.3.2 髓腔中脂肪空泡数量观察** 将股骨远端组织置于 14% EDTA 溶液中脱钙 15 d,脱水后石蜡包埋切片,切片厚度  $0.5 \mu\text{m}$ 。选取部分切片进行阿尔新蓝-苏木素染色后,在光镜下观察各组小鼠股骨髓腔中脂肪空泡数量。

**2.3.3 骨组织中脂肪酸结合蛋白 4 表达情况检测** 取部分骨组织切片脱蜡复水后,使用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸钠在 60 ℃ 下浸泡 4 h 进行抗原修复。以内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 30 min 后,使用 10% 山羊血清进行封闭。滴加以 PBS 缓冲液稀释的脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid-binding protein 4, FABP4) 抗体 (FABP4 抗体: PBS 缓冲液 = 1:300) 后于 4 ℃ 过夜。次日复温后滴加酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,二氨基联苯胺显色 5 min,苏木素复染,然后依次经过 1% 盐酸酒精分化、脱水、透明处理后以中性树脂封片。显微镜下观察骨组织中 FABP4 的表达情况,采集图像后使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图像中 FABP4 的表达比例进行分析。

**2.4 数据统计** 采用 SPSS26.0 软件进行数据统计分析。3 组小鼠股骨骨密度、股骨组织中 FABP4 含量的组间总体比较均采用方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 一般情况** 实验期间小鼠饮食、精神状态正常,活动规律,至处死前无小鼠死亡。

**3.2 骨组织微结构观察结果** Micro-CT 图像显示,与假手术组相比,模型组小鼠股骨骨密度明显降低,骨小梁减少;补肾活血方组小鼠的股骨骨密度和骨小梁数量与假手术组相当 (图 1)。假手术组、模型组、补肾活血方组小鼠的股骨骨密度比较,差异有统计学意义 [ $(0.033 \pm 0.009) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $(0.003 \pm 0.001) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $(0.022 \pm 0.009) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $F = 14.240$ ,  $P = 0.005$ ];模型组的股骨骨密度低于假手术组和补肾活血方组 ( $P = 0.046$ ,  $P = 0.050$ );补肾活血方组和假手术组的股骨骨密度比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.203$ )。

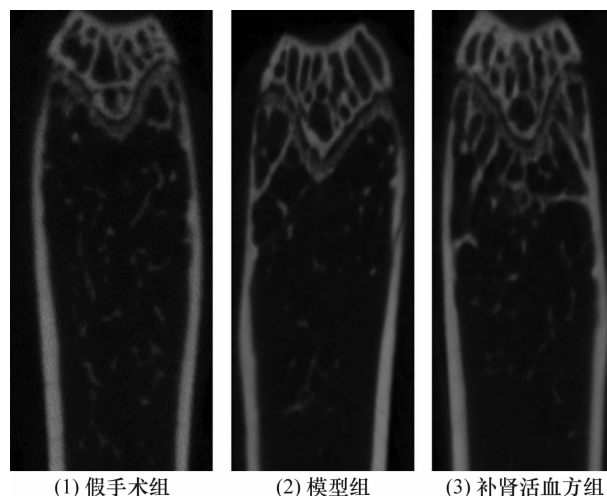


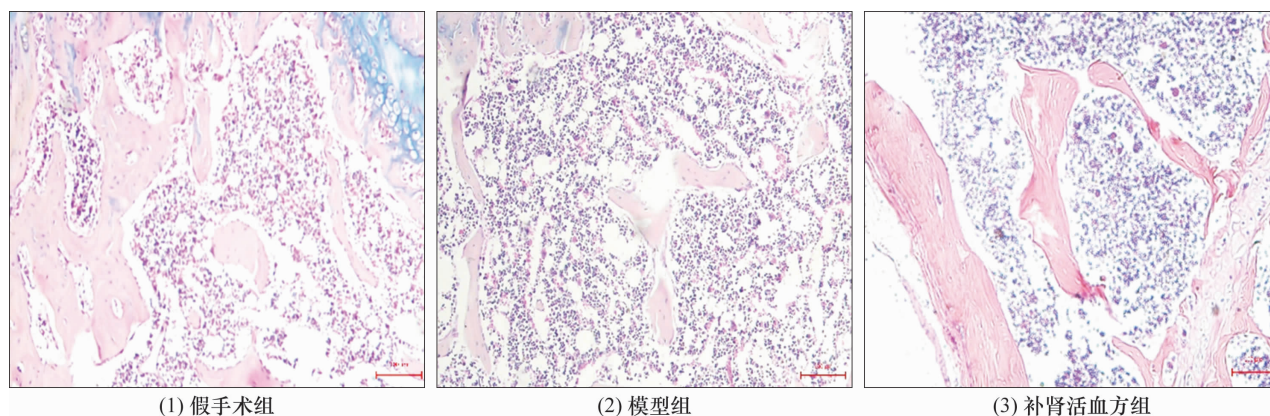
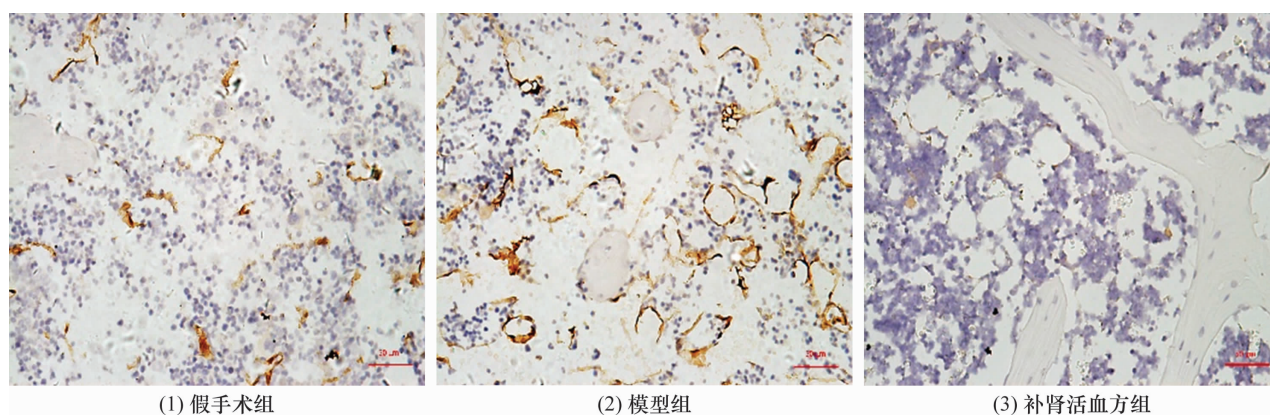
图 1 3 组小鼠股骨远端 Micro-CT 图像

**3.3 髓腔中脂肪空泡数量观察结果** 阿尔新蓝-苏木素染色结果显示,模型组髓腔内脂肪空泡数量较假手术组增加;补肾活血方组髓腔内脂肪空泡数量少于模型组,与假手术组接近 (图 2)。

**3.4 骨组织中 FABP4 表达情况检测结果** 假手术组、模型组、补肾活血方组股骨组织中的 FABP4 含量比较,差异有统计学意义 [ $(1.287 \pm 0.015) \%$ ,  $(11.897 \pm 0.703) \%$ ,  $(0.990 \pm 0.162) \%$ ,  $F = 800.200$ ,  $P = 0.000$ ]。模型组的 FABP4 含量高于假手术组和补肾活血方组 ( $P = 0.001$ ;  $P = 0.001$ ),假手术组的 FABP4 含量高于补肾活血方组 ( $P = 0.034$ )。见图 3。

## 4 讨论

骨髓脂肪细胞被认为是骨髓微环境的重要组成部分,由骨髓间充质干细胞分化而来<sup>[6]</sup>。脂质是一种与骨质疏松关系密切的生物大分子<sup>[7]</sup>,骨质疏松症患者的骨髓脂肪组织较健康人群明显增加<sup>[8]</sup>。Fazeli 等<sup>[9]</sup>的研究发现,绝经后女性骨小梁周围脂肪空泡数量明显上升。Muruganandan 等<sup>[10-11]</sup>的研究证实,脂肪细胞与骨细胞的发育和功能关系密切,能够影响骨

图 2 3 组小鼠股骨远端组织阿尔新蓝-苏木素染色结果( $\times 10$ )图 3 3 组小鼠股骨远端组织免疫组织化学染色结果( $\times 20$ )

重塑过程;脂肪细胞分泌的可溶性细胞因子会影响成骨细胞分化以及骨吸收功能。

FABP4 作为一种脂肪酸结合蛋白,是调节脂肪酸运输和脂质代谢的关键因子<sup>[12]</sup>,能够调控骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化与脂滴形成<sup>[13]</sup>,在动脉粥样硬化、乳腺癌、糖尿病等多种疾病的发生发展中起重要作用<sup>[14-16]</sup>。而且,FABP4 也被认为与骨质疏松症的发生密切相关<sup>[17]</sup>。Song 等<sup>[18]</sup>的研究表明,抑制 FABP4 的表达能够减少去卵巢小鼠的骨量丢失。

补肾活血方是由经典古方右归饮加减而成,其中熟地黄、枸杞子、山茱萸、山药可补肾阴,杜仲、附子、肉桂善补肾阳,桃仁、红花是活血化瘀的经典药物,甘草调和诸药。相关研究表明,补肾活血方能够通过干预 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响成骨细胞分化<sup>[19]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路作为骨质疏松症的经典通路,能够调节内源性骨形成<sup>[20]</sup>,而且对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的干预也能影响 FABP4 表达<sup>[21]</sup>。

本研究的结果提示,通过调控 FABP4 表达,抑制骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化,可能是补肾活血方治疗 PMOP 的作用机制之一。

## 参考文献

- [1] 王柄棋,孙雨晴,陈翔,等. 绝经后骨质疏松症药物治疗的现状与思考[J]. 中国骨质疏松杂志,2017,23(6): 818-823.
- [2] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019 年版)[J]. 中医正骨,2020,32(2):1-13.
- [3] 许兵,方剑利,刘慧,等. 补肾活血方对去势大鼠骨质疏松的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(3):177-182.
- [4] 王龙梅,刘康佳,刘子欣,等. 脂代谢及相关疾病与骨质疏松症关系研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2021,27(5):767-770.
- [5] HU X, MA S, YANG C, et al. Relationship between senile osteoporosis and cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(6): 4417-4420.
- [6] HU L, YIN C, ZHAO F, et al. Mesenchymal stem cells: cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 360.
- [7] PAGNOTTI G M, STYNER M, UZER G, et al. Combating osteoporosis and obesity with exercise: leveraging cell mechanosensitivity[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(6): 339-355.

- [8] MURUGANANDAN S, GOVINDARAJAN R, SINAL C J. Bone marrow adipose tissue and skeletal health [J]. Curr Osteoporos Rep, 2018, 16(4): 434–442.
- [9] FAZELI P K, HOROWITZ M C, MACDOUGALD O A, et al. Marrow fat and bone—new perspectives [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(3): 935–945.
- [10] MURUGANANDAN S, SINAL C J. The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation [J]. IUBMB Life, 2014, 66(3): 147–155.
- [11] MURUGANANDAN S, DRANSE H J, ROURKE J L, et al. Chemerin neutralization blocks hematopoietic stem cell osteoclastogenesis [J]. Stem Cells, 2013, 31(10): 2172–2182.
- [12] SHU L, HOO R L, WU X, et al. A – FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14147.
- [13] JUREK S, SANDHU M A, TRAPPE S, et al. Optimizing adipogenic transdifferentiation of bovine mesenchymal stem cells: a prominent role of ascorbic acid in FABP4 induction [J]. Adipocyte, 2020, 9(1): 35–50.
- [14] FURUHASHI M, TUNCMAN G, GÖRGÜN C Z, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty – acid – binding protein aP2 [J]. Nature, 2007, 447(7147): 959–965.
- [15] ZHAO W, RASHEED A, TIKKANEN E, et al. Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease [J]. Nat Genet, 2017, 49(10): 1450–1457.
- [16] HAO J, ZHANG Y, YAN X, et al. Circulating Adipose fatty acid binding protein is a new link underlying obesity – associated breast/mammary tumor development [J]. Cell Metab, 2018, 28(5): 689–705.
- [17] LIU Z Z, HONG C G, HU W B, et al. Autophagy receptor OPTN(optineurin) regulates mesenchymal stem cell fate and bone – fat balance during aging by clearing FABP3 [J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2766–2782.
- [18] SONG C, TAN P, ZHANG Z, et al. Rev – erb agonism suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy – induced bone loss partially via FABP4 upregulation [J]. FASEB J, 2018, 32(6): 3215–3228.
- [19] 许兵, 金红婷, 王萧枫, 等. 补肾活血含药血清对成骨细胞经典 Wnt/ $\beta$  – catenin 通路的影响研究 [J]. 中国骨伤, 2015, 28(6): 553–558.
- [20] XIA C, ZOU Z, FANG L, et al. Bushenhuoxue formula promotes osteogenic differentiation of growth plate chondrocytes through  $\beta$  – catenin – dependent manner during osteoporosis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110170.
- [21] XU R, ZENG Q, XIA C, et al. Fractions of Shen-Sui-Tong-Zhi formula enhance osteogenesis via activation of  $\beta$  – catenin signaling in growth plate chondrocytes [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 711004.

(收稿日期: 2021-10-31 本文编辑: 李晓乐)

## · 简 讯 ·

### 《中医正骨》2022 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	12 600	75 000	150 000
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	11 000	67 000	134 000
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	14 000	84 000	168 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 800	58 500	117 000
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 400	50 000	100 000
内文插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 400	50 000	100 000
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	4 200	25 000	50 000
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	2 500	15 000	30 000
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	4 200	25 000	50 000
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	2 500	15 000	30 000