

生骨胶囊对骨质疏松大鼠骨组织骨保护素及核因子 KB 受体活化因子配基表达的影响

张旭桥¹ 张信成² 仇湘中^{2△} 姜升平³ 黄超文³ 王晓晖³

[摘要] **目的:**探讨生骨胶囊对骨质疏松大鼠胫骨组织中骨保护素(OPG)及核因子 KB 受体活化因子配基(RANK)表达的影响,分析其改善骨质疏松的作用机制。**方法:**建立 36 只骨质疏松大鼠模型,随机分为正常对照组、假手术组、模型组、生骨胶囊组、骨疏康颗粒组和尼尔雌醇片组,每组 6 只,生骨胶囊组予以生骨胶囊灌胃;其他组分别予等剂量生理盐水、骨疏康颗粒和尼尔雌醇片治疗。分别于给药后第 3 周和第 6 周每组随机抽取 3 只,处死大鼠取患处组织标本,采用染色后视野下的阳性表达部位的累积光密度和视野下样品面积的比值法测定大鼠骨组织中 OPG 和 RANK 的含量,对所得数据进行统计学分析。**结果:**生骨胶囊组大鼠在第 3 周及第 6 周末患处骨组织标本中 OPG 和 RANK 表达均优于其他组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**生骨胶囊可通过改善骨质疏松骨组织中 OPG 和 RANK 的表达,从而达到改善骨质疏松的作用。

[关键词] 生骨胶囊;骨质疏松;骨保护素;核因子 KB 受体活化因子配基;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2020)08-0021-05

Effect of Raw Bone Capsule on the Expression of OPG and RANKL in Tibia of Osteoporotic Rats

ZHANG Xuqiao¹ ZHANG Xincheng² QIU Xiangzhong^{2△}
JIANG Shengping³ HUANG Chaowen³ WANG Xiaohui³

¹Shenzhen Hospital Beijing University of Traditional Chinese Medicine(Longgang),Shenzhen 518172,Guangdong China;

²Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine,Changsha 410006,China;

³Xiangtan Hospital of Traditional Chinese Medicine,Xiangtan 411100,Hunan China.

Abstract Objective:To investigate the effect of raw bone capsule on the expression of OPG and RANK in tibia of osteoporotic rats,and to analyze the mechanism of raw bone capsule in improving osteoporosis. **Methods:**36 osteoporosis rat models were established and randomly divided into normal control group,sham-operated group,model group,raw bone capsule group,Gushukang granule group and Nilestriol tablet groupwith 6 rats in each group. Raw bone capsule group was given raw bone capsule by gastric perfusion;The normal control group,sham-operated group and model group were given the same dose of physiological saline. The Gushukang granule group was given the same dose of Gushukang granules;The Nilestriol tablet group was given the same dose of Nilestriol tablet. At the 3rd and 6th week after administration,3 rats were randomly selected from each group detected. The contents of OPG and RANK in bone tissue of rats were determined by the ratio of cumulative light density of the positive expression site in the vision field after staining and the area of the

sample in the vision field. The data were analyzed statistically. **Results:**The expressions of OPG and RANK in bone tissue samples of Raw bone capsule group were higher than those of other control groups at the 3rd and 6th week ($P<0.05$). **Conclusion:**Raw bone capsule can promote the expression of OPG and RANK in osteoporotic bone tissue and improve osteoporosis.

Keywords: raw bone capsule;osteoporosis;osteoprotegeri;receptor activator of NF-KB;rat

基金项目:湖南省中医药科研基金 2014 年资助项目(2014126)
全国名老中医仇湘中教授传承工作室专项资金资助
(国中医药人教发[2016]42 号文)
全国中医临床特色技术传承骨干人才专项资金资助
(国中医药人教函[2019]36 号文)

¹ 北京中医药大学深圳医院(龙岗)(广东 深圳,518172)

² 湖南省中医药研究院附属医院

³ 湘潭市中医医院

△通信作者 E-mail:18974991366@189.cn

本研究中的生骨胶囊(湘药制字 Z20070355)为湘潭市中医医院院内制剂,其主要是由西洋参、木香、血竭、白芷、丹参、活性钙等组成,其功效为补养气血、行气止痛、活血通络,主治证候表现为筋骨痿软无力、气血不足的骨质疏松;且课题组前期临床研究表明该药能改善骨质疏松的症状及骨密度,疗效满意、未见明显不良反应^[1]。课题组在该前期研究的基础上^[1-2],拟进一步揭示生骨胶囊对骨质疏松大鼠胫骨组织中骨保护素(Osteoprotegeri, OPG)及核因子 KB 受体活化因子配基(Receptor Activator of NF-KB Ligand, RANKL)表达影响的作用机制,从而揭示生骨胶囊治疗骨质疏松的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 36 只 10 个月龄 SPF 级雌性 Wistar 大鼠,由湖南省中医药研究院实验动物中心统一采购并饲养,所有大鼠均来自同一批次(SCXK 湘 2013-0004)。

1.2 实验药物

本次实验药物为湘潭市中医医院的院内制剂生骨胶囊(批号 20130235),组方为:西洋参 50 g,木香 20 g,血竭 20 g,白芷 20 g,丹参 50 g,活性钙 150 mg,每盒分 30 粒包装。

1.3 实验试剂

由 Bioss 公司提供 OPG 免疫组织化学检测试剂盒,Proteintech 公司提供 RANKL 免疫组织化学检测试剂盒,上海酶联生物公司提供大鼠骨动素(MTL)、骨保护素(OPG)、核因子 KB 受体活化因子配体(RANKL)ELISA 检测试剂盒,实验过程中每种试剂均来自同一批次。

1.4 造模和分组

36 只大鼠按数量随机平均分为 6 组:对照组、假手术组、模型组、生骨胶囊组、骨疏康颗粒组和尼尔雌醇片组,每组各 6 只,各组间大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.5 干预方法

造模:去势大鼠模型的制作,将气虚血瘀模型大鼠^[3]按照去卵巢手术法进行骨质疏松造模,造模成功后^[4]1 d,待切口干燥后,每只每天按照 75 mg/kg 的标准将生骨胶囊分两次灌胃。其他组分别换算^[5]为等剂量的生理盐水、骨疏康颗粒和尼尔雌醇片灌胃。

1.6 观察方法及观察指标

分别于造模后第 3 周及第 6 周随机抽取 3 只大鼠,对其尾静脉血离心,采用 ELISA 检测 RANKL 和 OPG 含量,并进行统计分析;并采用脱颈的方法对其处死,取其左侧胫骨近端骨组织,经免疫组化检测骨 RANKL 及 OPG 的表达情况,采用图像分析软件 IPP(Image-Pro-Plus),对 400 倍视野下平均 IOD(视野下的阳性表达部位的累积光密度和视野下样品面积的比值)和同视野下阳性率(阳性表达细胞核数量与细胞核总数的比值),并进行比较分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 对所有数据进行统计分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 OPG 含量和胫骨 OPG 表达情况

生骨胶囊组、模型组、尼尔雌醇组、骨疏康组均在治疗第 3 周及第 6 周时,血清 OPG 含量和胫骨 OPG 表达均较正常对照组下降,差异有统计学意义($P<0.05$);经治疗后,生骨胶囊组、尼尔雌醇组、骨疏康组均较模型组血清 OPG 和胫骨 OPG 表达有上升,差异有统计学意义($P<0.05$),且治疗第 6 周时血清 OPG 和胫骨 OPG 表达较本组治疗第 3 周时均得到增加($P<0.05$),提示经生骨胶囊、尼尔雌醇片和骨疏康颗粒治疗后,大鼠血清 OPG 和胫骨骨组织中 OPG 表达均得到增加,见表 1-2 及图 1-6。

2.2 各组大鼠血清 RANKL 含量和胫骨 RANKL 表达情况

生骨胶囊组、模型组、尼尔雌醇组、骨疏康组在治疗第 3 周及第 6 周时,血清 RANKL 含量和胫骨 RANK

表 1 各组大鼠血清 OPG 含量比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	鼠数	第 3 周	第 6 周	<i>t</i>	<i>P</i>
正常对照组	6	0.69±0.07	0.68±0.07	0.529	0.780
假手术组	6	0.67±0.06	0.68±0.08	0.484	0.824
模型组	6	0.16±0.04 ¹⁾	0.17±0.05 ²⁾⁵⁾	0.472	0.816
生骨胶囊组	6	0.35±0.07 ¹⁾³⁾	0.46±0.07 ²⁾⁴⁾⁶⁾	24.356	<0.001
骨疏康组	6	0.35±0.06 ¹⁾³⁾	0.49±0.08 ²⁾⁴⁾⁶⁾	25.708	<0.001
尼尔雌醇组	6	0.34±0.08 ¹⁾³⁾	0.47±0.08 ²⁾⁴⁾⁶⁾	23.516	<0.001
<i>F</i>		57.353	67.516		
<i>P</i>		<0.01	<0.01		

注:与正常对照组比较:1) $P<0.05$,2) $P<0.05$ 。与模型组比较:3) $P<0.05$,4) $P<0.05$ 。生骨胶囊组、骨疏康组、尼尔雌醇组互相比较:第 3 周 $P>0.05$,第 6 周 $P>0.05$ 。组内干预前后比较:5) $P>0.05$,6) $P<0.05$ 。

表达均较正常对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$);经治疗后,生骨胶囊组、尼尔雌醇组、骨疏康组均较模型组血清 RANKL 和胫骨 RANK 表达均下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且治疗第 6 周时血

清 RANKL 和胫骨 RANK 表达均较本组治疗第 3 周时得到下降($P<0.05$),提示经生骨胶囊、尼尔雌醇片和骨疏康颗粒治疗后,大鼠血清 RANKL 和胫骨 RANK 表达均得到降低,见表 3-4 及图 7-12。

表 2 各组大鼠胫骨 OPG 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠 数	第 3 周	第 6 周	<i>t</i>	<i>P</i>
正常对照组	6	22.13±2.25	22.19±3.24	0.457	0.830
假手术组	6	22.03±2.21	22.20±3.27	0.673	0.681
模型组	6	7.03±0.65 ¹⁾	7.06±0.96 ²⁾⁵⁾	0.426	0.849
生骨胶囊组	6	10.23±1.05 ¹⁾³⁾	14.33±1.54 ²⁾⁴⁾⁶⁾	31.518	<0.001
骨疏康组	6	10.24±1.04 ¹⁾³⁾	14.75±1.86 ²⁾⁴⁾⁶⁾	31.711	<0.001
尼尔雌醇组	6	10.61±1.33 ¹⁾³⁾	14.78±2.22 ²⁾⁴⁾⁶⁾	30.615	<0.001
<i>F</i>		66.062	73.597		
<i>P</i>		<0.01	<0.01		

注:与正常对照组比较:1) $P<0.05$,2) $P<0.05$ 。与模型组比较:3) $P<0.05$,4) $P<0.05$ 。生骨胶囊组、骨疏康组、尼尔雌醇组互相比较:第 3 周 $P>0.05$,第 6 周 $P>0.05$ 。组内干预前后比较:5) $P>0.05$,6) $P<0.05$ 。

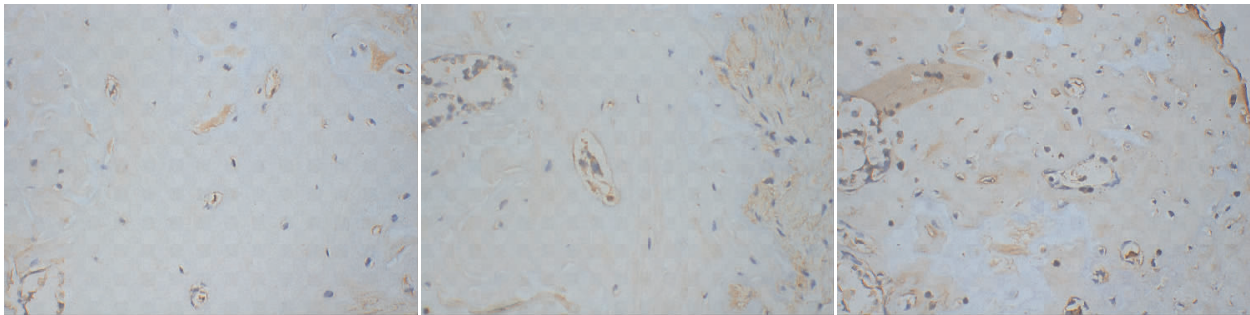


图 1 生骨胶囊组第 3 周骨组织 OPG 表达(400×)

图 2 生骨胶囊组第 6 周骨组织 OPG 表达(400×)

图 3 正常组第 3 周骨组织 OPG 表达(400×)

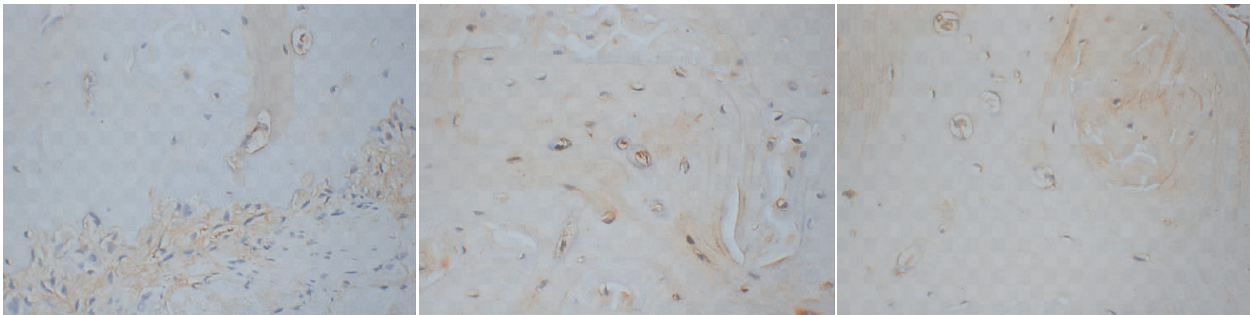


图 4 正常组第 6 周骨组织 OPG 表达(400×)

图 5 模型组第 3 周骨组织 OPG 表达(400×)

图 6 模型组第 6 周骨组织 OPG 表达(400×)

表 3 各组大鼠血清 RANKL 含量比较($\bar{x}\pm s$,ng/L)

组别	鼠 数	第 3 周	第 6 周	<i>t</i>	<i>P</i>
正常对照组	6	28.09±2.84	29.11±2.93	0.791	0.565
假手术组	6	28.10±3.11	29.21±3.41	0.753	0.546
模型组	6	80.53±7.03 ¹⁾	81.62±9.26 ²⁾⁵⁾	0.762	0.563
生骨胶囊组	6	67.04±8.21 ¹⁾³⁾	38.43±3.75 ²⁾⁴⁾⁶⁾	31.521	<0.001
骨疏康组	6	68.52±8.72 ¹⁾³⁾	39.26±4.33 ²⁾⁴⁾⁶⁾	31.708	<0.001
尼尔雌醇组	6	67.71±7.08 ¹⁾³⁾	38.27±4.52 ²⁾⁴⁾⁶⁾	30.614	<0.001
<i>F</i>		102.784	122.271		
<i>P</i>		<0.01	<0.01		

注:与正常对照组比较:1) $P<0.05$,2) $P<0.05$ 。与模型组比较:3) $P<0.05$,4) $P<0.05$ 。生骨胶囊组、骨疏康组、尼尔雌醇组互相比较:第 3 周 $P>0.05$,第 6 周 $P>0.05$ 。组内干预前后比较:5) $P>0.05$,6) $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠胫骨 RANKL 表达比较(̄x±s)

组 别	鼠数	第 3 周	第 6 周	t	P
正常对照组	6	6.84±0.57	6.98±0.57	0.675	0.676
假手术组	6	6.77±0.55	6.84±0.56	0.691	0.668
模型组	6	40.32±5.86 ¹⁾	40.49±7.04 ²⁾⁵⁾	0.811	0.511
生骨胶囊组	6	31.39±3.72 ¹⁾³⁾	20.66±2.55 ²⁾⁴⁾⁶⁾	22.542	<0.001
骨疏康组	6	32.09±3.74 ¹⁾³⁾	20.88±2.59 ²⁾⁴⁾⁶⁾	23.107	<0.001
尼尔雌醇组	6	31.82±4.03 ¹⁾³⁾	20.90±2.71 ²⁾⁴⁾⁶⁾	22.852	<0.001
F		66.063	73.596		
P		<0.01	<0.01		

注:与正常对照组比较:1)P<0.05,2)P<0.05。与模型组比较:3)P<0.05,4)P<0.05。生骨胶囊组、骨疏康组、尼尔雌醇组互相比较:第3周 P>0.05,第6周 P>0.05。组内干预前后比较:5)P>0.05,6)P<0.05。

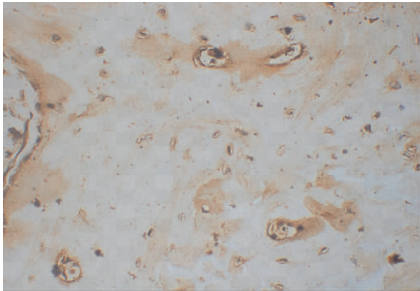


图 7 生骨胶囊组第 3 周骨组织 RANK 表达(400×)

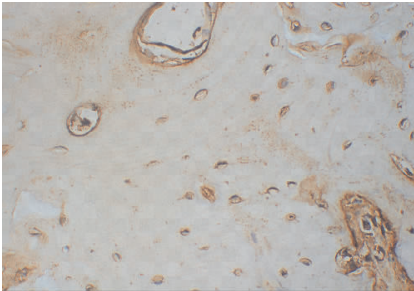


图 8 生骨胶囊组第 6 周骨组织 RANK 表达(400×)

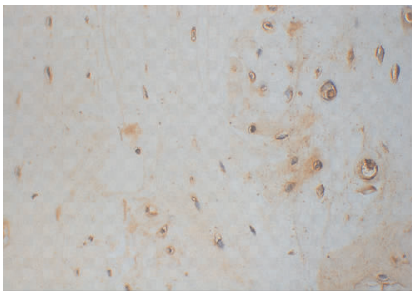


图 9 正常组第 3 周骨组织 RANK 表达(400×)

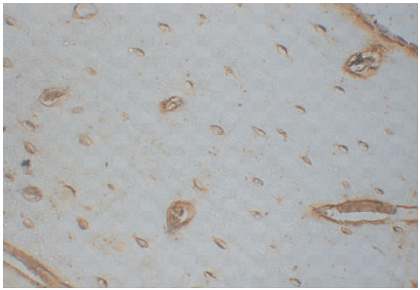


图 10 正常组第 6 周骨组织 RANK 表达(400×)

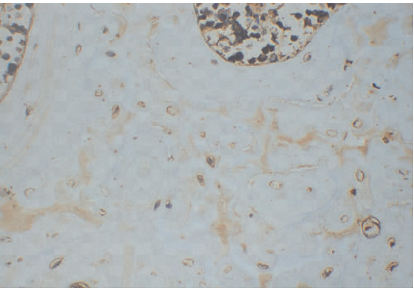


图 11 模型组第 3 周骨组织 RANK 表达(400×)

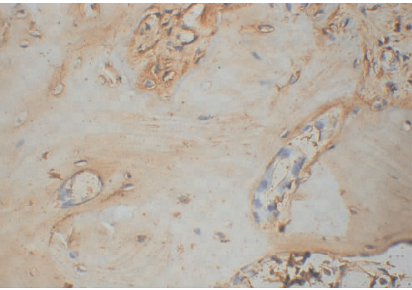


图 12 模型组第 6 周骨组织 RANK 表达(400×)

3 讨论

骨质疏松的发病机制与脾胃功能密切相关,患有“骨痿”的老年人,因其脾胃运化无力,导致筋骨失养,并气虚行血无力,继发脉络瘀阻,形成气虚所致的不荣之痛和血瘀的不通之痛的虚实夹杂之症^[6],是本虚标实之证;因此,治疗上应通过补脾健胃治其本,行气化痰、通络止痛治其标,从而达到标本兼治、改善骨质疏松及其导致的疼痛等临床症状。课题组前期已证实补脾益气、通络止痛的方法(生骨胶囊)对骨质疏松性骨折有满意的临床疗效,并能促进骨合成、改善血钙磷沉积、增加骨量^[1-2]。生骨胶囊通过较大剂量的西洋参达到补脾胃、益气血的作用,是该方的君药;丹参与木香配伍,发挥行气活血的作用,二者共位臣药;白芷、血竭共用以化瘀止痛,共为佐药;同时西洋参提升正气、改善身体代谢机能,从而使整个药物的治疗作用得以更好的发挥,该功效实际是整个方剂的使药;此外,该药物中通添加的活性钙成分也可调节骨钙代谢、改善骨

密度。上述中西药的合用具有补益气血、活血行气、化痰止痛的作用,从而达到改善骨质疏松及其导致的疼痛等临床症状的作用。前期研究揭示活性钙能补充钙离子,调节钙磷沉积,促进钙磷参与成骨^[1-2]。

生骨胶囊自 2003 年开始在湘潭市中医医院用于治疗骨质疏松和促进骨折愈合,因其补养气血、通络止痛的显著功效,取得了显著的临床疗效。有研究表明西洋参具有植物雌激素的活性,能改善雌激素缺乏导致的骨代谢障碍,并能改善骨矿物质含量,这与本研究中改善去卵巢骨质疏松的作用有关^[7-8];这在中医学“脾为后天之本”“脾主运化”的理论上能得到解释,即脾胃通过运化水谷精微而濡养全身骨骼肌肉,从而改善骨代谢。此外,西洋参和木香配伍能改善 MMP-2^[9]的表达,从而促进骨折愈合^[10],且木香是历代医家治疗骨科疼痛的常用药物,具有行气通络止痛的功效^[11],二药配伍具有补气不壅滞、行气不伤正的特点。有研究者报道丹参能促进成骨细胞的增殖和骨髓间充质干细胞的定向分化,进

而对骨折愈合和骨质代谢起到改善作用^[12]；也有研究者发现丹参素能调节 OPG 和 RANKL 水平，且该效应与丹参素的有效浓度呈正相关，从而揭示丹参素能改善去卵巢大鼠的骨质疏松、增加其骨密度^[13]；该研究结论与本研究的生骨胶囊含有较大剂量的丹参具有具有异曲同工之妙。还有研究证实丹参酮ⅡA 对废用性骨质疏松症有积极的防治作用^[14]。血竭具有改善血液高凝状态、促进成骨细胞增殖，从而改善骨质疏松、促进骨折愈合^[15]。动物实验证实白芷能缓解大鼠肌肉痉挛、阻止疼痛递质的传导，从而缓解疼痛^[16]。生骨胶囊中的活性钙具有易吸收、生物效能高的特点，通过改善骨钙代谢达到改善骨质疏松、促进骨折愈合。

OPG/RANKL 是骨代谢过程中非常重要的调控通路^[17]，RANKL 能分化和激活破骨细胞，OPG 则是 RANKL 的阻滞受体，二者通过相互拮抗的作用维持骨代谢的平衡^[18-19]。课题组前期研究发现，生骨胶囊能改善骨质疏松患者骨折愈合过程中的钙磷沉积，并能改善骨密度、促进骨折愈合^[1]；本研究则通过动物实验证实了生骨胶囊能改善骨代谢中 OPG 和 RANKL 的表达，进而能有效改善骨质疏松，因此可认为生骨胶囊可作为改善骨质疏松的一种新的中成药制剂，值得进一步推广应用。

参考文献

- [1] 张旭桥,王晓晖,黄光明,等.生骨胶囊联合 PVP 或 PKP 治疗原发性老年骨质疏松性胸腰椎骨折临床研究[J].中医学报,2018,33(10):2025-2030.
- [2] 张旭桥,王晓晖,黄光明,等.生骨胶囊在经皮椎体强化术治疗老年骨质疏松性胸腰椎骨折中的应用研究[J].中医正骨,2016,28(11):21-25.
- [3] 李苹,李洁,邓时贵,等.气虚血瘀模型大鼠脾代谢酶活性变化的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2019,39(8):993-996.
- [4] 任洁,卢建华. RANKL/RANK/OPG 系统与绝经后骨质疏松模型的研究[J].浙江中西医结合杂志,2015,25(9):892-895.
- [5] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,

2004,9(9):1069-1072.

- [6] 刘钟,杨依然,王均华,等. 益气温经方对 CKIP-1 介导的破骨细胞凋亡的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2018,26(8):14-17.
- [7] 赵元,郑红霞,徐颖,等. 中药植物雌激素的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3474-3487.
- [8] 杜娟,蒲建中,张彩凤,等. 玫参胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(1):140-143.
- [9] 戴焱,李浩,范彦博. 青娥方调节 MMP2/EGFR 通路影响成骨细胞凋亡的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2018,26(11):7-12.
- [10] 王轩,潘琪,张慧萍,等. 桃仁、木香、黄芪分别与红花配伍对大鼠早期桡骨骨折愈合过程中 BMP-2 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(6):1423-1425.
- [11] 华金福,屈尚可,邓颖,等. 明代以前治疗腰腿痛的潜在用药规律探讨[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(2):79-82.
- [12] 莫朝伦,张军梅,贾莹,等. 丹参酮Ⅱ-A 对大鼠成骨细胞体外增殖分化的影响[J]. 贵阳医学院学报,2016,41(4):391-394.
- [13] 桑龙,韩红德,吴克第,等. 丹参素通过核因子 κ B 受体活化因子配体通路抑制破骨细胞分化治疗大鼠骨质疏松症的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(23):3072-3076.
- [14] 王玺,李凯,冯康虎,等. 丹参酮Ⅱ A 对尾吊大鼠发生废用性骨质疏松症防治作用的研究[J]. 中成药,2019(6):1-6.
- [15] 高宗强,袁伟杰,严淑婷. 续骨补肾方含药血清对成骨细胞增殖及骨形成蛋白-2, I 型胶原表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(11):5-10.
- [16] 王蕊,刘军,杨大宇,等. 白芷化学成分与药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2020,37(2):123-128.
- [17] 张信成,张旭桥,仇湘中,等. 强骨颗粒对骨质疏松大鼠胫骨组织中 OPG、RANKL 表达的影响[J]. 湖南中医杂志,2019,35(7):145-146.
- [18] 向益,郑烽,王显. 基于 OPG/RANKL/RANK 通路探讨单味中药治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(2):86-88.
- [19] 陈瀚宇,徐颖鹏,李鼎鹏,等. RANK/RANKL/OPG 系统在骨性关节炎与骨质疏松相关性中的作用机制[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(1):86-88.

(收稿日期:2020-03-04)

(上接第 20 页)

- [18] 李春亮,罗成林,朱海勇,等. 骨质疏松合并压缩性骨折患者 Th17 细胞功能测定及其与骨代谢的相关性分析[J]. 疑难病杂志,2018,17(10):72-75.
- [19] 黄宁庆. 老年骨质疏松性胸腰椎压缩骨折患者 IL-17 变化对其 PKP 术后再发骨折的影响[J]. 颈腰痛杂志,2020,41(1):80-82.
- [20] SALIBA R M, SARANTOPOULOS S, KITKO C L, et al. B-cell activating factor(BAFF) plasma level at the time of chronic GvHD diagnosis is a potential predictor of non-re-

lapse mortality[J]. Bone Marrow Transplantation, 2017, 52(7):1010-1015.

- [21] GYLLEMARK P, FORSBERG P, ERNERUDH J, et al. Intrathecal Th17 and B cell-associated cytokine and chemokine responses in relation to clinical outcome in Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study[J]. Journal of Neuroinflammation, 2017, 14(1):27.

(收稿日期:2020-03-22)