

• 实验研究 •

密骨方对去卵巢骨质疏松骨折大鼠臂板蛋白 3A 表达的影响

李婷婷¹ 洪勇良¹ 王艺喆¹ 孙大明¹ 黄婉莹¹ 徐嘉祺² 汪学红^{1△}

[摘要] 目的:采用密骨方干预去卵巢骨质疏松骨折 Wistar 大鼠,观察密骨方对大鼠骨折断端臂板蛋白 3A 表达的影响,探讨中药密骨方影响骨折愈合的机制。方法:45 只 3 个月龄雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:假手术骨折对照组(Sham, $n=15$),骨质疏松骨折模型组(OVX, $n=15$),骨质疏松骨折密骨方组(OVX-M, $n=15$)。适应性饲养 1 周后建立骨质疏松模型,OVX 组与 OVX-M 组依次摘除双侧卵巢,Sham 组切除卵巢周围同质量的脂肪组织。3 组大鼠去卵巢术后 5 个月,建立骨折模型,手术刀加外力致股骨中部骨折,并复位固定。骨折术后第 2 天,OVX-M 组进行中药密骨方灌胃干预,采用 1 mL/100 g 的剂量比例进行灌服,1 次/d。分别在密骨方干预后第 2,4,6 周采集骨组织样本,用 Western Blot 实验方法检测骨折断端臂板蛋白 3A 含量。结果:Sham 组在第 2,4,6 周呈上升趋势;OVX 组在第 2,4,6 周呈先上升后下降趋势;OVX-M 组在第 2,4,6 周呈先上升后下降趋势。第 2 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.223$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.066$)。第 4 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.159$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.093$)。第 6 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.004$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.023$)。结论:中药密骨方干预可提高大鼠骨折断端臂板蛋白 3A 的表达,促进骨质疏松骨折愈合。

[关键词] 密骨方;骨质疏松;骨折;臂板蛋白 3A

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)10-0006-04

Effect of Migufang on the Expression of Semaphorin 3A in Rats with Ovariectomized Osteoporosis Fracture

LI Tingting¹ HONG Yongliang¹ WANG Yizhe¹ SUN Daming¹
HUANG Wanying¹ XU Jiaqi² WANG Xuehong^{1△}

¹Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China;

²Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China.

Abstract Objective: To observe the expression of protein 3A by the Migufang in the Wistar rats with ovariectomized osteoporosis fracture, and to explore the mechanism of Migufang on fracture healing. **Methods:** 45 female Wistar rats with 3-month-old were randomly divided into 3 groups, the Sham operation fracture control group(Sham, $n=15$), the osteoporosis fracture model group(OVX, $n=15$), and the osteoporosis fracture Migufang group(OVX-M, $n=15$). The osteoporosis model was established after 1 week of adaptive feeding. Bilateral ovaries were removed in the OVX group and the OVX-M group, and adipose tissue of the same weight around the ovaries was removed in the Sham group. 5 months after ovariectomy, the central femur fracture model was established by external force and scalpel, and the fracture was reduced and fixed. On the second day after fracture, the Migufang gavage intervention was carried out with ratio of 1 mL/100 g and once a day. Bone tissue samples were collected at 2nd, 4th and 6th week after the prognosis of Migufang, and the Semaphorin 3A protein was detected and compared by Western Blot. **Results:** Protein 3A in the Sham group revealed an upward trend from 2nd, 4th to 6th week. It in OVX and OVX-M increased first and then decreased. There was no significant difference among these 3 groups($P>0.05$) at the 2nd and 4th week. At the 6th week, there was a significant difference between the Sham group vs OVX group($P<0.01$) and the OVX-M group vs the OVX group($P<$

0.05). **Conclusion:** Migufang intervention may promote the healing of osteoporotic fracture by improve the expression of Semaphorin 3A protein at the broken end of fracture in rats.

Keywords: Migufang; osteoporosis; fracture; Semaphorin 3A

¹ 武汉体育学院(武汉, 430079)

² 湖北中医药大学

[△]通信作者 E-mail: 287615517@qq.com

骨质疏松症(Osteoporosis)是常见的全身性骨骼疾病,多发于老年人和绝经后妇女,发病率高,易发生骨折,且骨折不易愈合,严重影响患者生活质量。随着人口老龄化程度的加重,骨质疏松症的患病率不断升高,2007—2017 年,我国中老年骨质疏松症发病率明显上升,总体发病率为 23%,其中绝经后妇女占较高比例,骨质疏松症已成为我国中老年人群重要的健康问题^[1]。中医将骨质疏松症归属于“骨痿”“骨极”“骨繇”范畴,肾阴阳两虚,肾虚髓空、气滞血瘀导致骨质疏松。中医药在防治骨质疏松症方面具有巨大的潜力和独特的优势,临床中常用补肾壮骨、益气健脾类中药治疗骨质疏松,可减轻骨质疏松症状,改善骨密度,疗效确切^[2]。中药密骨方已多次被证实可改善骨质疏松症状^[3-4],为了进一步了解其作用机制,本研究通过建立去卵巢骨质疏松骨折大鼠模型,采用中药密骨方干预治疗,观察骨折断端 Sema 3A 表达情况,探讨密骨方在去卵巢骨质疏松骨折的愈合过程中的作用,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45 只 3 个月龄雌性 Wistar 大鼠,体质量为 260~300 g,由湖北省疾病预防控制中心提供,生产合格证号为 SCXK(鄂)2008-0005,为无特定病原体(SPF)动物。

1.2 实验药物及试剂

中药密骨方:淫羊藿 15 g,杜仲 20 g,补骨脂 20 g,续断 20 g,自然铜 6 g,黄芪 30 g,天花粉 5 g,牛膝 15 g,药物从湖北中医药大学国医堂购得。

SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,ASPEN 公司;RIPA 总蛋白裂解液,ASPEN 公司;BCA 蛋白质浓度测定试剂盒,ASPEN 公司;ECL 化学发光检测试剂盒,ASPEN 公司。

1.3 实验仪器

克氏针,武汉金凯瑞生物有限公司;电泳仪 DYY-6C,北京市六一仪器厂;转移电泳仪槽 DYCZ-400D,北京市六一仪器厂;垂直电泳槽 DYCZ-24DN,北京市六一仪器厂;台式离心机 TGL-16c,上海安亭科学仪器厂;冷冻离心机 TGL-16,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.4 方法

1.4.1 造模方法

1.4.1.1 去卵巢骨质疏松模型 大鼠禁食 6 h 后麻醉,取仰卧位,固定四肢,清除下腹部的毛并消毒,医用剪刀横向切开组织,确定卵巢位置。OVX 组与 OVX-M 组依次摘除双侧卵巢,Sham 组切除卵巢周围同质量的脂肪组织,见图 1。通过观察大鼠的动情周期变化,确定去卵巢造模是否成功。

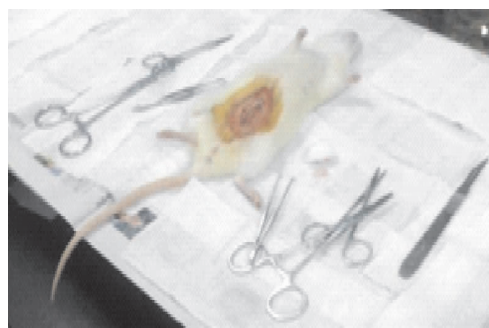


图 1 大鼠去卵巢骨质疏松造模

1.4.1.2 骨折模型 大鼠去卵巢术后 5 个月,建立骨折模型,见图 2。大鼠腹腔麻醉,后肢酒精消毒,医用剪刀纵向切开组织,暴露股骨干。股骨髁间凹插入注射器针头进行髓腔扩髓,手术刀片在股骨中段切至少 3 个横截面至少为 1 mm² 的切口,止血钳固定靠切口的股骨近端,操作者在靠近切口的股骨远端突然发力,出现股骨断裂即骨折造模成功。随后对骨折部位进行复位并用克氏针固定,逐层闭合切口。



图 2 大鼠骨折造模

1.4.2 分组方法 将大鼠随机分为 3 组:假手术骨折对照组(Sham, $n=15$),骨质疏松骨折模型组(OVX, $n=15$),骨质疏松骨折密骨方组(OVX-M, $n=15$)。3 组大鼠分笼饲养,自由活动,自由摄食。

1.4.3 干预方法 中药密骨方采用传统水煮法,去药渣留取中药药液,OVX-M 组在骨折术后第 2 天开始进行灌胃,根据大鼠体质量采用 1 mL/100 g 的剂量比例进行灌服,1 次/d,每天煎煮中药。Sham 组与 OVX 组灌服同等剂量的生理盐水。

1.4.4 标本制作方法 在中药干预后第 2,4,6 周,各脱颈椎处死各组 5 只大鼠。处死后提取骨组织,剥离骨组织表面附着的肌肉,用滤纸清除骨组织上残留的血液,放入无菌冻存管,并迅速放入冰箱中以备后续检测。

1.5 实验指标测定

使用 Western Blot 方法检测大鼠股骨骨折断端 Sema 3A 蛋白表达含量,实验过程根据测定标准进行规范操作。

1.6 统计学方法

用 SPSS 21.0 进行统计学分析,组间显著性差异比较采用单因素方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P <$

0.05 差异有统计学意义,使用 GraphPad Prism 5.0 绘制统计图。

2 结果

大鼠各时间段骨折断端 Sema 3A 表达情况: Sham 组在第 2,4,6 周呈上升趋势;OVX 组在第 2,4,6 周呈先上升后下降趋势;OVX-M 组在第 2,4,6 周呈先上升后下降趋势。第 2 周,Sham 组与 OVX 组比

较,差异无统计学意义($P=0.223$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.066$)。第 4 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.159$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异无统计学意义($P=0.093$)。第 6 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.004$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.023$),见表 1 和图 3-4。

表 1 各组大鼠各时间段骨折断端 Sema 3A 含量比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

时间	Sham 组	OVX 组	OVX-M 组
第 2 周	0.551±0.015	0.310±0.015	0.710±0.308
第 4 周	0.757±0.010	0.408±0.019	0.841±0.376
第 6 周	0.938±0.016	0.065±0.010	0.645±0.329

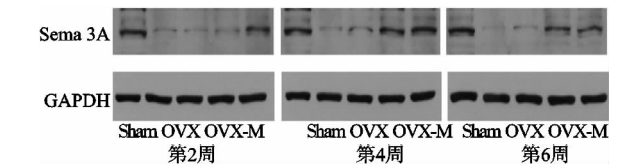


图 3 骨折断端 Sema 3A 蛋白含量

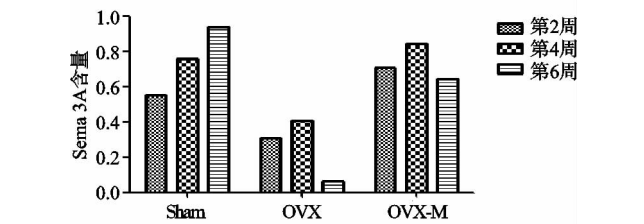


图 4 骨折断端 Sema 3A 蛋白含量比较

3 讨论

绝经后骨质疏松症是女性由于卵巢功能衰退,雌激素下降导致的骨代谢紊乱的一种骨骼疾病,表现为骨微结构破坏,骨强度下降,骨脆性增加,易引发骨折。现代中医认为绝经后骨质疏松症与肝、脾、肾及血瘀关系密切,绝经期妇女“多虚多瘀”,五脏虚损,气虚血瘀,新血生成受阻,肾精虚少,骨髓化源不足,出现骨质失养,骨质流失^[5]。肾虚是本,血瘀是标,临床治疗中需要兼顾标本,在补肾益精同时兼顾益气养血。

肾主骨生髓,补肾活血中药可通过调节骨吸收与骨形成平衡,减少激素水平降低造成的骨的高转换,提高骨密度,减少骨量丢失。淫羊藿是补肾壮阳的良药,味辛甘性温,益精气、强筋骨,可提高去卵巢大鼠的雌激素水平,防止绝经后骨质疏松的发生^[6]。杜仲补益肝肾、强筋壮骨,可提高去卵巢大鼠雌激素水平,调节骨代谢相关细胞因子,促进骨保护素生成,从而改善骨质疏松,增强骨密度^[7]。补骨脂具有补肾壮骨的功效,能促进钙盐沉积、增加骨钙素分泌;续断可补肝肾、强筋骨、续折伤,《滇南本草》云“补肝,强筋骨,走经络……”,调节骨平衡,改善骨质疏松^[8]。活血类中药益气通瘀,可改善骨组织微循环,促进骨折愈合。密骨方中自然铜可入血行血,续筋接骨,在骨折中期可增加

微量元素及钙盐的吸收和沉积^[9];黄芪为补气的要药,气行则血行,可促进血液代谢,改善骨代谢,又可增强免疫功能^[10];天花粉能滋阴降火、改善骨折后炎症反应,具有抗氧化性^[11];牛膝为引经药,对骨质疏松有较好的改善作用^[12]。密骨方合用淫羊藿、杜仲、补骨脂、续断、自然铜、黄芪、天花粉、牛膝多味中药,具有滋阴补肾、补肾壮阳的功效。

Sema 3A 是在骨微环境中发现的第一个增加骨量的局部因素,可减少破骨细胞的分化,增加骨形成,是一种抑制破骨细胞形成的成骨细胞衍生蛋白^[13]。Sema 3A除了以自分泌的方式直接刺激成骨细胞分化,抑制破骨细胞分化外,Sema 3A 在神经支配的调节中也有作用,可通过调节感觉神经发育间接调节骨重建^[14]。研究发现一个基于 Sema 3A 基因治疗的骨靶向药物传递系统,可通过抑制破骨细胞骨吸收,同时增加成骨细胞骨形成,改善骨质疏松去卵巢小鼠的骨丢失^[15]。骨质疏松骨折大鼠 Sema 3A 处理可在骨折后第 4 周增加愈伤组织体积和密度,在骨折后第 8 周诱导愈伤组织骨化和重塑^[16]。Sema 3A 作为破骨细胞和成骨细胞的双重调节因子,可能是一个绕过现有药物限制的新的治疗靶点^[17]。本研究中 Sham 组大鼠骨折断端 Sema 3A 在第 2,4,6 周呈上升趋势,说明在骨折逐渐自愈过程中 Sema 3A 的表达有促进作用。Sema 3A 主要在骨折 2~4 周增加愈伤组织的体积和密度,4~6 周诱导愈伤组织骨化和重塑,OVX 组与 OVX-M 组在第 2,4,6 周均呈先上升后下降趋势,与 OVX 组及 OVX-M 组去卵巢导致的雌激素缺乏相关,致 Sema 3A 在 4~6 周表达不足。第 6 周,Sham 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.004$);OVX-M 组与 OVX 组比较,差异有统计学意义($P=0.023$),说明密骨方中药干预可促进 Sema 3A 表达,促进骨质疏松骨折愈合。

综上所述,中药密骨方可促进 Sema 3A 表达,具有积极的成骨效应,促进骨质疏松后骨折愈合,是临床

绝经后女性骨质疏松或骨质疏松骨折的可供参考的治疗用药。

参考文献

- [1] 罗令,孙晓峰,皮丕喆,等.近 10 年来我国中老年人骨质疏松症患病率的荟萃分析[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1415-1420.
- [2] 孙亚奇,卞艳芳,周春娜,等.中药治疗骨质疏松症研究进展[J].中国临床医学,2018,25(2):307-313.
- [3] 汪学红,姜婷,夏家红,等.密骨方对去势大鼠骨质疏松后骨折愈合的影响[J].中华实验外科杂志,2010,27(9):1328-1330.
- [4] 周丹丹,张梓瑞,李强,等.密骨方对去卵巢大鼠骨折免疫炎症因子的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(6):6-9.
- [5] 黄晋,李建国,谢兴文,等.中药复方治疗绝经后骨质疏松症的临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(2):277-280.
- [6] 张禄锴,马剑雄,匡明杰,等.淫羊藿治疗骨质疏松的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2017,24(4):445-448.
- [7] 罗伟,王亚芹,冯晗,等.杜仲抗骨质疏松及其机制研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(12):1434-1440.
- [8] ZHANG W,XUE K,GAO Y,et al. Systems pharmacology dissection of action mechanisms of Dipsaci Radix for osteoporosis[J]. Life Sciences,2019,235:116820.
- [9] 赵根华,翁泽斌,高倩倩,等.自然铜炮制前后促进骨折愈合作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2015,26

(4):481-485.

- [10] 徐德娟.中药黄芪的药理作用及临床应用效果临床价值体会[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(69):189.
- [11] CHEN Y,MIAO Y,HUANG L,et al. Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis;an in vivo and in vitro evaluation[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine,2014,14(1):86.
- [12] 郎小琴,高越,周叶,等.牛膝多糖对老年骨质疏松大鼠模型骨代谢及生物力学特征的影响[J].中华全科医学,2019,17(4):547-550.
- [13] OHLSSON C. Novel osteoporosis targets [J]. Nature Reviews Endocrinology,2013,9(2):72-74.
- [14] FUKUDA T,TAKEDA S,XU R,et al. Sema 3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations[J]. Nature,2013,497(7450):490-493.
- [15] YANG K,MIRON R J,BIAN Z,et al. A bone-targeting drug-delivery system based on Semaphorin 3A gene therapy ameliorates bone loss in osteoporotic ovariectomized mice[J]. Bone,2018,114:40-49.
- [16] LI Y,YANG L,HE S,et al. The effect of Semaphorin 3A on fracture healing in osteoporotic rats [J]. Journal of Orthopaedic Science,2015,20(6):1114-1121.
- [17] 张峻,张里程,唐佩福.骨改建中潜在的作用靶点-信号素 Sema 3A 的研究进展[J].解放军医学院学报,2016,37(10):1100-1102.

(收稿日期:2020-03-22)

(上接第 5 页)

- [9] 付俊,戴焱.淫羊藿苷对骨桥蛋白体外调控成骨细胞增殖作用研究[J].华南国防医学杂志,2019,33(9):587-589.
- [10] 帅波,杨功旭,沈霖,等.加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部 1,25(OH)₂D₃/VDR mRNA/RAS 信号转导通路的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(7):1-5.
- [11] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等.基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(9):1-6.
- [12] 金剑飞,何维英,周钰龙.淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子-κB 通路的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2020,28(3):5-9.
- [13] TERCENIO M C,FERRANDIZ M L,CARCELLER M C,et al. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2016,79(2):120-128.
- [14] 钟培瑞,廖瑛,廖源,等.去卵巢对大鼠膝关节软骨及软骨下骨的影响[J].风湿病与关节炎,2017,6(11):5-10.
- [15] ZHOU J,ZHONG P R,LIAO Y,et al. Electroacupuncture

ameliorates subchondral bone deterioration and inhibits cartilage degeneration in ovariectomised rats[J]. Acupunct Med,2018,36(1):37-43.

- [16] LONG F. Energy metabolism and bone[J]. Bone,2018,115(10):1.
- [17] LICINI C,VITALE-BROVARONE C,MATTIOLI-BEL-MONTE M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2019,49(10):59-69.
- [18] ZHANG B,DAI J,WANG H,et al. Anti-osteopontin monoclonal antibody prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice by promotion of osteoclast apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,452(3):795-800.
- [19] 王金蕴,林燕萍.青娥丸治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2013,21(10):70-72.
- [20] 马陈,沈霖,杨艳萍,等.青娥丸对绝经后骨质疏松症患者血清癌胚抗原相关细胞黏附分子 1,β-链蛋白水平及骨密度的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(2):15-18.

(收稿日期:2020-04-15)