

• 实验研究 •

基于白介素 6/Janus 激酶 2/信号转导与转录活化因子 3 信号通路探讨补肾活血方对去势大鼠骨质疏松症的影响

李正兴^{1,2} 田林^{1,2} 任童森^{1,2} 孙昭杰^{1,2} 仲锋锋^{1,2} 马勇^{1,2,3} 韩庭良^{1,2△}

[摘要] 目的:观察补肾活血方对绝经后骨质疏松症的干预作用,从白介素 6(IL-6)/Janus 激酶 2(JAK2)/信号转导与转录活化因子 3(STAT3)信号通路探讨其作用机制。方法:将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组、中药治疗组、抑制剂组、激活剂组,除正常组切除卵巢周围脂肪组织外,其余各组均采用切除大鼠双侧卵巢组织构建绝经后骨质疏松症动物模型。造模成功后给予药物干预 12 周, Micro-CT 检测右侧股骨组织骨体积分数(BV/TV)、骨表面组织体积比值(BS/BV)、骨密度(BMD)及骨小梁宽度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)等微观结构静态参数。苏木精-伊红(HE)染色观察股骨组织骨小梁、破骨细胞及脂肪细胞的染色情况。ELISA 检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 含量。Western Blot 法检测大鼠右侧股骨组织中 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白的表达水平。RT-PCR 检测 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平。结果:与正常组相比,模型组 BMD、BV/TV、Tb. Th 均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$), BS/BV、Tb. Sp、破骨细胞及脂肪细胞均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),骨质疏松症模型造模成功。与模型组相比,阳性对照组、中药治疗组、抑制剂组 BMD、BV/TV、Tb. Th 均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$), BS/BV、Tb. Sp、破骨细胞及脂肪细胞均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。大鼠血清中 IL-6、TNF- α 含量显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。股骨组织中 IL-6、JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。股骨组织中 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与中药治疗组相比,抑制剂组 BMD、BV/TV、Tb. Th 均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$), BS/BV、Tb. Sp、破骨细胞及脂肪细胞均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。大鼠血清中 IL-6、TNF- α 含量显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。而激活剂组中 BMD、BV/TV、Tb. Th 均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$), BS/BV、Tb. Sp、破骨细胞及脂肪细胞均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。大鼠血清中 IL-6、TNF- α 含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:补肾活血方具有控制炎症反应、调节骨稳态平衡、改善骨密度、延缓骨质疏松症进程的作用,其作用机制可能与抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路有关。

[关键词] 补肾活血方;绝经后骨质疏松症;白介素 6/Janus 激酶 2/信号转导与转录活化因子 3 信号通路;炎症反应;骨稳态

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)06-0001-07

DOI:10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 250601

Effect of Kidney Tonifying and Blood Activating Formula on Osteoporosis in Castrated Rats Based on the IL-6/JAK2/STAT 3 Signaling Pathway

LI Zhengxing^{1,2} TIAN Lin^{1,2} REN Tongsen^{1,2}SUN Zhaojie^{1,2} ZHONG Fengfeng^{1,2}MA Yong^{1,2,3} HAN Tingliang^{1,2△}

基金项目:江苏省卫生健康委员会科研项目(Z2023033)

盐城市科技局指令性项目(YCBK2023046)

盐城市卫生健康委员会重点项目(YK2023015)

¹ 南京中医药大学附属盐城中医院(江苏 盐城, 224001)² 盐城市中医院³ 南京中医药大学中医学院(中西医结合学院)

△通信作者 E-mail:2017172134@qq. com

¹ Yancheng Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Yancheng 224001, Jiangsu China;² Yancheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yancheng 224001, Jiangsu China;

³ College of Traditional Chinese Medicine (College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine), Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China.

Abstract Objective: To observe the intervention effect of kidney tonifying and blood activating formula on postmenopausal osteoporosis, and explore its mechanism of action from the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway. **Methods:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group, Chinese medicine treatment group, inhibitor group, and activator group. Except for the normal group, which had their ovarian adipose tissue removed, all other groups used bilateral ovarian tissue removal to construct postmenopausal osteoporosis animal models. After successful modeling, drug intervention was given for 12 weeks. Micro-CT was used to detect static microstructural parameters such as bone volume fraction (BV/TV), bone surface tissue volume ratio (BS/BV), bone mineral density (BMD), trabecular width (Tb. Th), and trabecular separation degree (Tb. Sp) in the right femur tissue. HE staining was used to observe the staining of bone trabeculae, osteoclasts, and adipocytes in femoral tissue. ELISA detection of IL-6 and TNF- α levels in rat serum. Western Blot was used to detect the expression levels of IL-6, JAK2, p-STAT3, and STAT3 proteins in the right femur tissue of rats. RT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of IL-6, JAK2, and STAT3. **Results:** Compared with the normal group, the model group showed a significant decrease in BMD, BV/TV, and Tb. Th ($P < 0.05$), while BS/BV, Tb. Sp, osteoclasts, and adipocytes were significantly increased ($P < 0.05$), indicating the successful establishment of the osteoporosis model. Compared with the model group, the positive control group, Chinese medicine treatment group, and inhibitor group had significantly increased BMD, BV/TV, and Tb. Th ($P < 0.05$), while BS/BV, Tb. Sp, osteoclasts, and adipocytes were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in rat serum significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expression of IL-6, JAK2, STAT3, and p-STAT3 in femoral tissue significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of IL-6, JAK2, and STAT3 mRNA in femoral tissue significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the Chinese medicine treatment group, the inhibitor group showed significantly increased BMD, BV/TV, Tb. Th ($P < 0.05$), while BS/BV, Tb. Sp, osteoclasts, and adipocytes were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in rat serum significantly decreased ($P < 0.05$). In the activator group, BMD, BV/TV, Tb. Th were significantly reduced ($P < 0.05$), while BS/BV, Tb. Sp, osteoclasts, and adipocytes were significantly increased ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in rat serum were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The kidney tonifying and blood activating formula has the effects of controlling inflammatory response, regulating bone homeostasis balance, improving bone density, and delaying the process of osteoporosis. Its mechanism of action may be related to the inhibition of the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords: kidney tonifying and blood activating formula; postmenopausal osteoporosis; IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway; inflammatory response; bone homeostasis

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis, PMOP)是女性绝经后雌激素水平下降导致骨吸收大于骨形成,骨强度降低及脆性骨折危险性增高的疾病^[1]。目前我国绝经后骨质疏松症的发病率达17.4%,至2050年其发病率将高达39.19%^[2-4]。因此,深入研究绝经后骨质疏松症发病机制及防治措施具有重要意义。研究发现^[5-6] IL-6/JAK2/STAT3信号通路在维系骨代谢平衡中起着重要的调控作用。前期研究已证实本院补肾活血方具有调节骨代谢平衡的临床疗效^[7-8],本研究基于IL-6/JAK2/STAT3信号通路探索其作用机制,为中草药治疗绝经后骨质疏松症提供新的理论依据,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 72只SPF级12周龄健康雌性SD大鼠由江苏省集萃药康生物科技股份有限公司提供(许可证号为SYXK(苏)2023-0009,货号为

202428590),饲养于南京中医药大学实验动物中心(许可证号为SYXK(苏)2018-0048)。SD大鼠体重为200~220 g,分笼饲养,温度保持在(20±2)℃,湿度保持在60%±5%,昼夜交替12 h/12 h,自由进食饮水。本研究符合3R(替代、减少、优化)原则并经南京中医药大学附属盐城中医院伦理委员会批准(批准文号为KY241015)。

1.1.2 实验药物与主要试剂 补肾活血方,功效为补肾填精、活血化瘀,组方:熟地黄15 g,当归15 g,山茱萸10 g,杜仲10 g,续断10 g,川牛膝10 g,蛇床子10 g,淫羊藿10 g,川芎10 g,桃仁5 g,红花5 g,赤芍10 g,淮山药10 g,茯苓10 g,木香6 g,陈皮6 g,炙甘草6 g。中草药由盐城市中医院中药房提供,生药含量为1.58 g/mL。利塞膦酸钠片由江苏正大清江制药有限公司提供,规格为5 mg/片(国药准字H20100136)。IL-6(CST批号为Cat#12912T)、JAK2(CST批号为Cat#3230T)、STAT3(CST批号为Cat#9139T)、p-

STAT3 抗体(CST 批号为 Cat # 9145T),IL-6 ELISA 试剂盒(Abcam,批号为 ab222503)、TNF- α ELISA 试剂盒(JONLNBIO,批号为 JL10484-96T)。JAK2 抑制剂 AG490(MCE,批号为 HY-P1061)、STAT 激活剂 Colivelin(MCE,批号为 HY-12000)。

1.1.3 主要实验仪器 小动物 Micro-CT 机(美国 Revvitty 公司),低温高速离心机(上海 KUBOTA 公司),电泳仪(日本 Mini-Slab 公司),凝胶成像仪(美国赛默飞世尔科技公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司),电子光学显微镜(德国 ZEISS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模 将适应性饲养 1 周的 SD 大鼠随机分为 6 组:正常组、模型组、阳性对照组、中药治疗组、抑制剂组、激活剂组,每组 12 只。以 40 mg/kg 剂量的 2%戊巴比妥行腹腔注射麻醉,麻醉满意后,备皮、消毒、铺无菌手术单,沿大鼠背侧正中作 2 cm 纵向切口,皮下分离至脊柱双侧 1 cm 肋弓下方暴露卵巢及周围脂肪组织。正常组仅切除双侧卵巢周围脂肪组织,其余组大鼠均切除双侧卵巢组织,术野内充分止血后缝合皮肤。按照分组分笼饲养,术后给予青霉素 20×10^4 U/kg 肌肉注射预防感染,2 次/d,连续给药 3 d。

1.2.2 给药 大鼠造模后饲养 12 周,造模成功后,依据《药理实验方法学》(第 4 版)中换算公式,正常组与模型组按 1 mL/(100 g·d)生理盐水灌胃;阳性对照组,将 0.525 mg/kg 的利塞膦酸钠溶解于 1 mL/(100 g·d)的生理盐水中灌胃;中药治疗组给予 1 mL/(100 g·d)补肾活血方汤剂灌胃;抑制剂组予以 1 mL/(100 g·d)补肾活血方汤剂灌胃,同时将 JAK2 抑制剂(AG490)配制成 0.5 mg/mL 水溶液,以 1 mL/(100 g·d)的 AG490 水溶液腹腔注射;激活剂组给予 1 mL/(100 g·d)补肾活血方汤剂灌胃,同时将 STAT3 激活剂(Colivelin)配制成 0.5 mg/mL 水溶液,以 1 mL/(100 g·d)的 Colivelin 水溶液腹腔注射。各组给药均为 1 次/d,连续给药 12 周。给药结束后处死大鼠,分离大鼠双侧后肢股骨组织,置于-80℃冰箱保存备用。

1.2.3 Micro-CT 检测骨组织微观结构 用 Micro-CT 对各组大鼠右侧股骨组织进行扫描,分辨度为 10 μ m,扫描后行股骨三维重建。测量右侧股骨组织的静态参数——骨体积分数(BV/TV)、骨表面积体积比值(BS/BV)、骨密度(BMD),以描述骨密度等骨骼整体结构情况,骨小梁宽度(Tb. Th)及分离度(Tb. Sp)以描述骨小梁结构形态。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色 取大鼠左侧股骨组织,放入福尔马林中固定 48 h 后洗涤、脱水、浸蜡、包埋后放置在切片机上,以 5 μ m 厚度切片。再将脱蜡后的股骨切片水化,按照试剂盒说明书放入苏木精水

溶液和伊红染色液中染色,染色后的切片脱水透明后封片。观察股骨组织中成骨细胞的变化。

1.2.5 ELISA 法检测血清促炎因子指标 取大鼠腹主动脉血 3 000 r/min 离心 10 min 后取血清上清液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测 IL-6、TNF- α 含量。

1.2.6 Western Blot 法检测大鼠股骨组织中 IL-6、JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达水平 从冰箱中取出冻存大鼠右侧股骨组织解冻后,按照说明书加入 RIPA 裂解液裂解大鼠股骨组织,提取总蛋白。取样、制胶、电泳、转膜后,在室温下用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜。TBST 洗涤后,二抗室温孵育 2 h,ECL 显色曝光。以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件定量分析蛋白条带。

1.2.7 RT-PCR 检测 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平 取出大鼠右侧股骨组织,液氮研磨,采用 Trizol 试剂盒说明书方法提取各组大鼠右侧股骨组织的总 RNA。依据 Trizol 试剂盒说明书方法逆转 cDNA,用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 IL-6、JAK2、STAT3 基因进行定量分析。扩增引物序列见表 1。

表 1 扩增引物序列

基因	引物序列(5'-3')
IL-6	F:GTTGCCTTCTTGGGACTGATG
	R:TACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
JAK2	F:AGTGACCCAACCTTCAGTGG
	R:AGCCCAACGTGTTCTTCACT
STAT3	F:TGGGCATCAATCCTGTGGTAT
	R:TAGTTCACACCAGGCCCTAAG
GAPDH	F:CACGATGGAGGGGCCGGAATCATC
	R:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

1.3 统计学方法

用 SPSS22.0 统计学软件对实验数据进行分析,数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。多组数据比较,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两组之间数据比较,符合正态分布且方差齐时,采用 SKK-q 检验,方差不齐则采用 t' 检验,若不符合正态分布,则采用非参数检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾活血方对大鼠股骨组织微观结构的影响

与模型组相比,其余各组大鼠 BMD、BV/TV 和 Tb. Th 均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),而 BS/BV 及 Tb. Sp 均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与中药治疗组比较,中药+JAK2 抑制剂组 BMD、BV/TV、Tb. Th 均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),BS/BV 及 Tb. Sp 显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);但激活剂组 BMD、BV/TV、Tb. Th 显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),

BS/BV 及 Tb. Sp 显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1 和图 2。

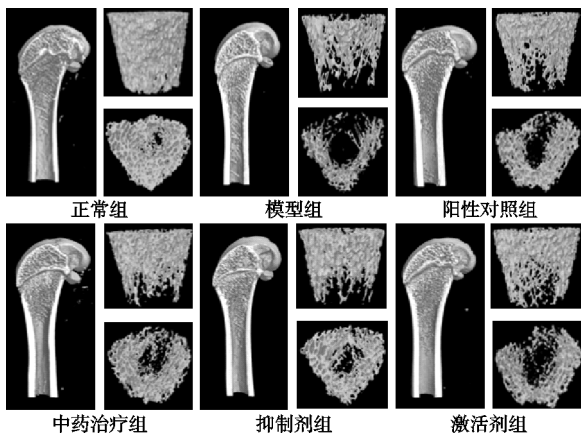
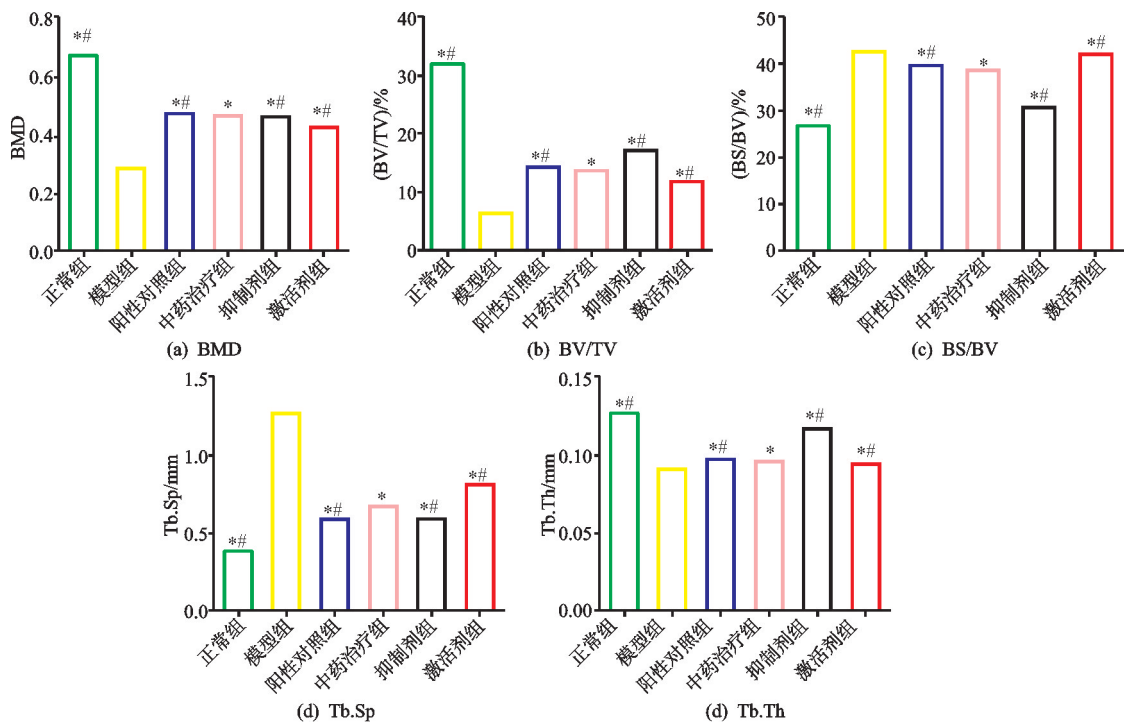


图 1 各组大鼠股骨组织微观结构 Micro-CT 三维重建图



注: 与模型组相比, * $P < 0.05$, 与中药治疗组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠股骨组织形态结构静态指数比较

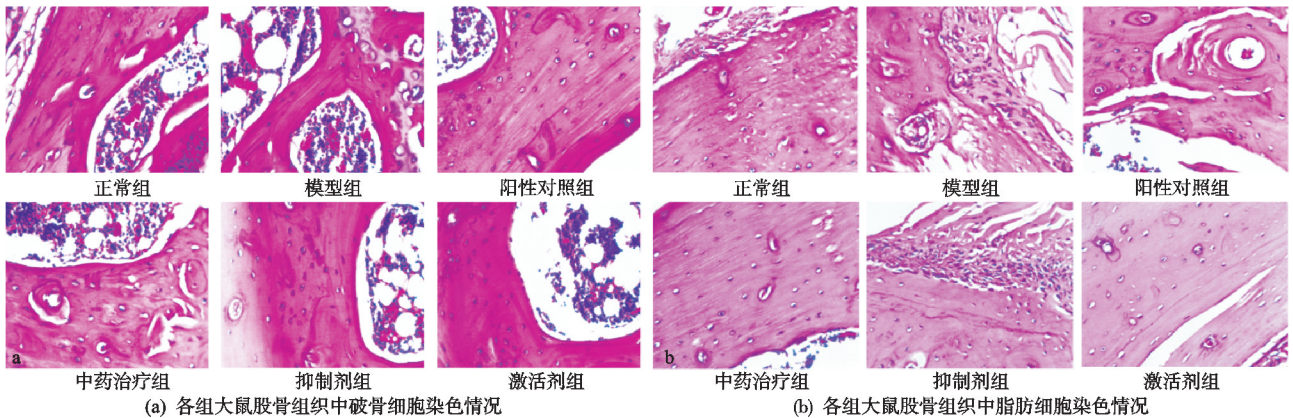


图 3 各组大鼠股骨组织 HE 染色结果 ($\times 40$)

计学意义 ($P < 0.05$); 与中药治疗组相比, 抑制剂组 IL-6 及 TNF- α 浓度显著下降, 差异有统计

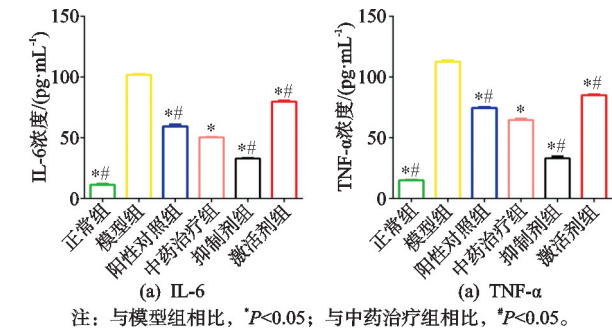
2.2 补肾活血方对大鼠股骨组织病理变化的影响

与正常组相比, 模型组骨小梁厚度下降, 骨髓腔增大, 破骨细胞及脂肪细胞数量明显增多; 与模型组相比, 阳性对照组及中药治疗组骨小梁厚度增厚, 骨髓腔缩小, 同时破骨细胞数量明显减少, 髓腔内脂肪细胞也明显减少; 与中药治疗组相比, 抑制剂组破骨细胞及脂肪细胞数量减少, 而激活剂组破骨细胞及脂肪细胞数量增多, 见图 3。

2.3 补肾活血方对大鼠血清中 IL-6 及 TNF- α 的影响

与正常组相比, 模型组 IL-6 及 TNF- α 浓度均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 其余各组 IL-6 及 TNF- α 浓度均明显下降, 差异有统

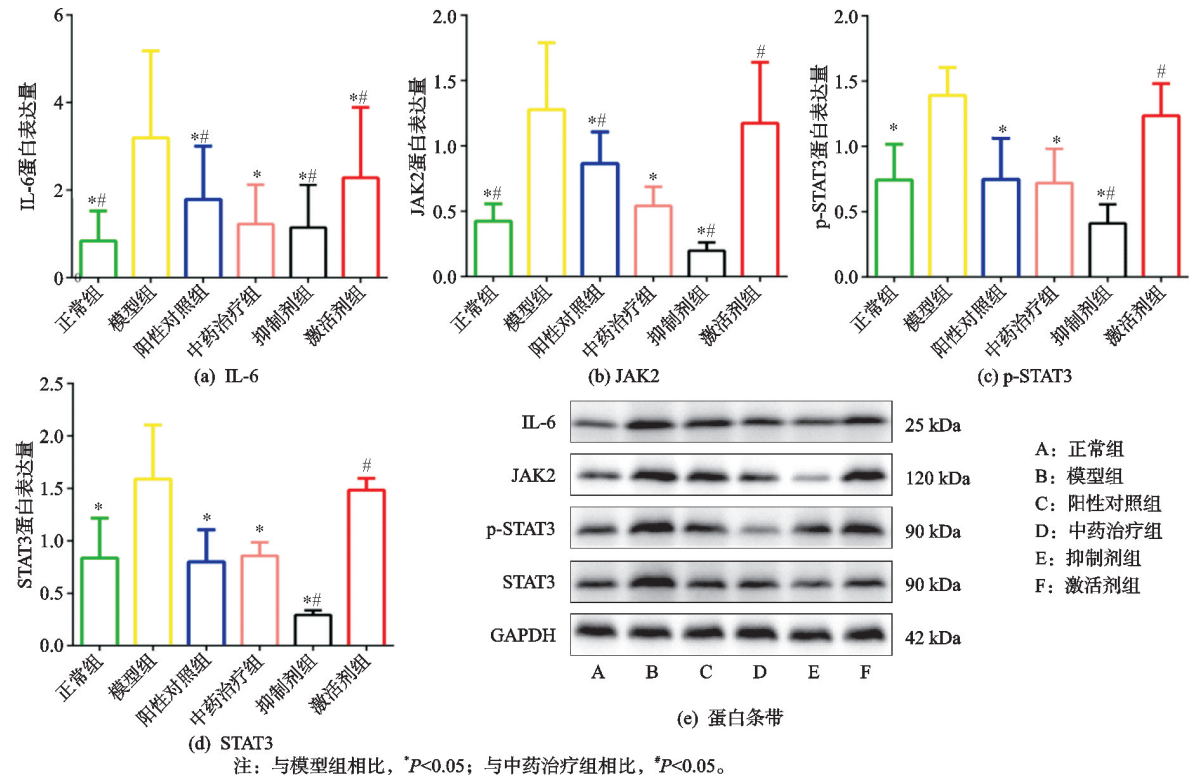
高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



注：与模型组相比，* $P<0.05$ ；与中药治疗组相比，# $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠血清中 IL-6 及 TNF- α 的表达水平

2.4 补肾活血方对大鼠股骨组织中 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白的影响



注：与模型组相比，* $P<0.05$ ；与中药治疗组相比，# $P<0.05$ 。

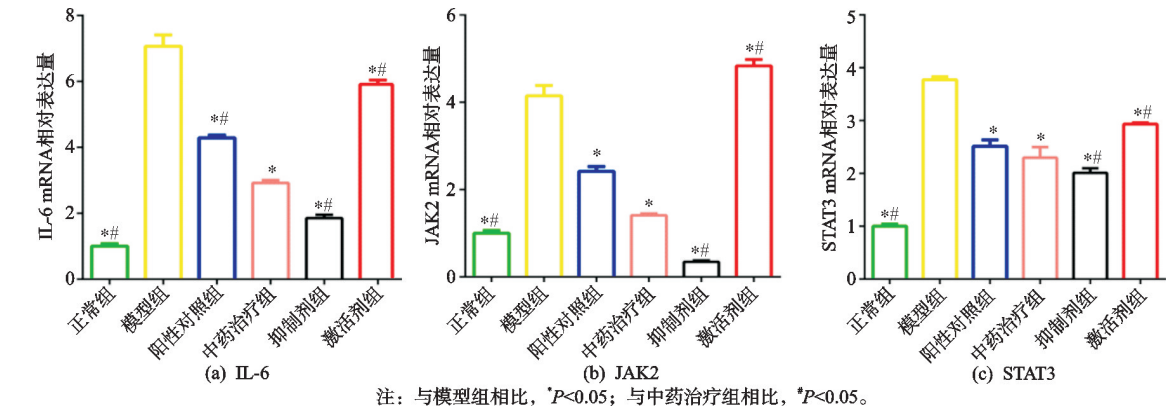
图 5 各组大鼠股骨 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白的表达水平

2.5 补肾活血方对大鼠股骨组织中 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达的影响

与正常组相比，模型组 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达量均明显升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与模型组相比，各组 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 蛋白表达量

与正常组相比，模型组 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达量均明显升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与模型组相比，阳性对照组、中药治疗组及抑制剂组 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达量均明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与中药治疗组相比，抑制剂组 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达量均明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，而激活剂组 IL-6、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达量显著升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 5。

均明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与中药治疗组相比，抑制剂组 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达量均明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，激活剂组 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 表达量显著升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 6。



注：与模型组相比，* $P<0.05$ ；与中药治疗组相比，# $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠 IL-6、JAK2、STAT3 mRNA 的表达水平

3 讨论

绝经后骨质疏松症是女性绝经后雌激素分泌水平急剧下降导致骨稳态失衡、骨密度下降的一种老年代谢性疾病,中医学归属于“骨痿”“骨枯”范畴。《灵枢·经脉》中记载:“足少阴气绝,则骨枯。少阴者,冬脉也,伏行而濡骨髓者也。”肾中精气濡养骨髓,肾气竭绝,骨失所养,则发为骨枯。肾中精气亏虚是绝经后骨质疏松症发病的主要病因基础。《医述 杂证汇参》曰:经热则痹,络血则痿。邪中于经则痹,邪中于络则痿。邪气中于脉络,血液运行不畅,发为骨痿。血瘀是绝经后骨质疏松症发病的主要病理因素。肾精亏虚,虚则行血无力,加重血瘀;脉内瘀滞,瘀则新生不顺,加重肾虚。虚实夹杂,两者互为因果,共同致病。综上所述,“肾虚血瘀”是绝经后骨质疏松症的主要发病机制,肾精亏虚为本,脉内血瘀为标,虚瘀相兼,相互影响。

本院省名中医董松林教授在“久病必虚、因虚致瘀、肾虚血瘀”理论指导下,结合其 50 余载绝经后骨质疏松症的临床诊疗经验,创立“补肾活血方”。本方由归肾丸和桃红四物汤化裁而来,归肾丸去菟丝子、枸杞子,加淫羊藿、蛇床子、牛膝、续断;桃红四物汤去白芍,加陈皮、木香。归肾丸补肾填精,滋阴养血;桃红四物汤补血行气,活血化瘀。方中以熟地黄、当归为君,补肾益精、活血养血。山茱萸、杜仲、续断、牛膝补益肝肾、活血续筋;淫羊藿、蛇床子温补肾阳;桃仁、红花、赤芍、川芎活血化瘀,均为臣药;茯苓、淮山药健脾,陈皮、木香理气以行血为佐;炙甘草调和诸药为使。全方共奏补肾填精、活血化瘀、强筋健骨之功。现代医学研究发现,熟地黄水提物梓醇、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷等可促进成骨细胞增殖,抑制破骨细胞形成^[9]。当归提取物藁本内酯具有抑制炎症因子、抗炎的作用^[10]。杜仲、续断可增加血清雌二醇,降低骨钙素,抑制铁死亡,起到抗炎、延缓衰老及保护骨组织的作用^[11]。淫羊藿水提取物对炎症介质、促炎细胞因子及相关产物具有抑制作用^[12]。综上所述,补肾活血方在抑制慢性炎症、调节骨代谢平衡及改善骨密度方面的作用具有较强的理论支持。

雌激素可调控炎症的发生发展,雌激素与炎症水平变化密切相关,绝经后妇女雌激素水平急剧下降,炎症因子分泌增多,患者长期处于慢性炎症状态^[13]。炎症细胞因子影响间质干细胞和破骨细胞前体,破骨细胞活性增加,骨稳态失衡,形成骨质疏松,所以绝经后骨质疏松症被认为是一种慢性炎症性疾病^[14-15]。IL-6 作为一种多功能促炎因子,其代谢失调与慢性炎症及自身免疫功能紊乱等因素有关。现代研究已发现,绝经后骨质疏松症患者血清中 IL-6 及 TNF- α 较绝经前

显著升高,同时与无骨质疏松症的绝经后患者相比亦显著升高,说明绝经后骨质疏松症的进展与 IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达密切相关^[16-17]。JAK2/STAT3 信号通路是较为经典的炎症相关性通路。IL-6 与特异性 IL-6 结合蛋白(IL-6R)结合形成复合体,再与糖蛋白 130(gp130)关联二聚体化,从而激活 JAK2/STAT3 信号通路,IL-6R/gp130 与 JAK2 结合,JAK2 被磷酸化形成 pJAK2,继而磷酸化 STAT3(pSTAT3),pSTAT3 二聚体化后进入细胞核内,进一步促进 IL-6 等促炎因子的基因转录,加剧炎症的进程,促进绝经后骨质疏松症进展^[18]。已有研究证实,通过抑制 IL-6 的表达,可降低 JAK2 及 STAT3 的磷酸化以影响 JAK2/STAT3 信号通路,进而通过正反馈下调 IL-6 的表达,抑制炎症的进展^[19]。JAK2 激活剂可以增加 IL-1 β 、IL-6、STAT3 蛋白及基因表达,促进炎症的进展^[20]。

本研究发现与模型组相比,中药治疗组骨密度明显升高,骨小梁致密性改善,HE 染色显示成骨细胞增多,脂肪细胞减少,证实补肾活血方具有改善骨密度、调节骨稳态平衡的作用。与正常组相比,模型组去势大鼠血清中 IL-6、TNF- α 炎症因子表达水平显著上升,证实绝经后骨质疏松症是一种炎症相关性的代谢性疾病。然而与模型组相比,中药治疗组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 的表达水平显著下降,大鼠股骨组织中 IL-6 蛋白及基因的表达也显著下降,说明补肾活血方具有抑制炎症因子表达的作用。中药对照组大鼠股骨组织中 JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白及 JAK2、STAT3 mRNA 表达较模型组显著降低,说明补肾活血方具有调控炎症相关的 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的作用。为此,本课题组设立抑制剂组及激活剂组,实验结果显示,抑制剂组血清中 IL-6、TNF- α 水平和股骨组织中 IL-6、JAK2、STAT3 蛋白及 mRNA 表达较中药治疗组更低,说明 JAK2 抑制剂 AG490 可增加补肾活血方的抗炎作用。激活剂组表达较中药治疗组更高,两者有显著差异,说明 STAT3 激活剂 Colivelin 可削弱补肾活血方的抗炎作用。可知补肾活血方是通过调控 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路达到控制炎症反应、延缓绝经后骨质疏松症进程的作用。

综上所述,本研究阐明了补肾活血方可抑制去势大鼠血清及股骨组织中 IL-6 等炎症因子的表达,抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的激活,从而抑制 JAK2、STAT3 蛋白及 mRNA 的表达。同时说明补肾活血方具有控制炎症反应、调节骨稳态平衡、改善骨密度、延缓绝经后骨质疏松症进程的作用,这种药理作用可能是通过抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路实现的。本研究也存在一些不足之处:首先,补肾活血方

是中药复方制剂,其中有效成分的确定仍是目前研究的一项难题;其次,本实验以动物为载体,采用体内研究,本实验的结论需要体外细胞实验进一步证实;最后,中药复方制剂的含药浓度可能对实验结果带来一定的误差,需要进一步探索最佳药物浓度以应用于临床。

参考文献

- [1] WALKER M D, SHANE E. Postmenopausal osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(21):1979-1991.
- [2] ZHANG X, WANG Z, ZHANG D, et al. The prevalence and treatment rate trends of osteoporosis in postmenopausal women[J]. *PLoS One*, 2023, 18(9):e290289.
- [3] XIAO P L, CUI A Y, HSU C J, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis[J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33(10):2137-2153.
- [4] OU Y W, LAI C C, TSOU M T, et al. Development of machine learning models for prediction of osteoporosis from clinical health examination data[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(14):7635.
- [5] XIAO W, SHEN Y, XU Y. LOX(G473A) induces the formation of osteoclasts in RAW264. 7 cells via IL-6/JAK2/STAT3 signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 409(1):112890.
- [6] 马铭,任汉强. IL-37 通过调控 M-CSF 和抑制 IL-6/JAK2/STAT3 抑制骨质疏松的机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(10):1552-1556.
- [7] 李正兴,韩庭良,尹佩玉,等. 补肾活血方联合 PKP 术治疗骨质疏松性椎体骨折的临床疗效[J]. *内蒙古中医药*, 2020, 39(10):16-18.
- [8] 韩庭良,王国军,尹佩玉,等. PKP 联合补肾活血方治疗骨质疏松椎体压缩骨折的临床研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2016, 24(10):35-39.
- [9] MENG J, ZHANG W, WANG C, et al. Catalpol suppresses osteoclastogenesis and attenuates osteoclast-derived bone resorption by modulating PTEN activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 171:113715.
- [10] MA Z, BAI L. The anti-inflammatory effect of Z-ligustilide in experimental ovariectomized osteopenic rats[J]. *Inflammation*, 2012, 35(6):1793-1797.
- [11] 李新春,胡万钧,甘发荣,等. 杜仲-续断药对通过调控铁死亡途径对去卵巢骨质疏松症大鼠的保护作用及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(9):103-106.
- [12] OH Y C, JEONG Y H, CHO W K, et al. Inhibitory effects of epimedium herb on the inflammatory response in vitro and in vivo[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(5):953-968.
- [13] WU W, FU J, GU Y, et al. JAK2/STAT3 regulates estrogen-related senescence of bone marrow stem cells[J]. *J Endocrinol*, 2020, 245(1):141-153.
- [14] GINTZLER A R, STORMAN E M, LIU N J. Estrogens as arbiters of sex-specific and reproductive cycle-dependent opioid analgesic mechanisms[J]. *Vitam Horm*, 2019, 111:227-246.
- [15] CLINE-SMITH A, AXELBAUM A, SHASHKOVA E, et al. Ovariectomy activates chronic low-grade inflammation mediated by memory t cells, which promotes osteoporosis in mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(6):1174-1187.
- [16] HUANG X, NI B, LI Q, et al. Association between postmenopausal osteoporosis and IL-6, TNF- α : a systematic review and a meta-analysis[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2024, 27(15):2260-2266.
- [17] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(5):115327.
- [18] 谭张奎,向楠,张妍,等. 基于 IL-6/JAK2/STAT3 通路探讨补肾化痰方改善去势大鼠骨丢失的作用机制[J]. *中草药*, 2021, 52(16):4904-4912.
- [19] LIU J, XIE X, QIN K, et al. Dexamethasone and potassium canrenoate alleviate hyperalgesia by competitively regulating IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway during inflammatory pain in vivo and in vitro[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2022, 10(11):e721.
- [20] 沈锦涛,华茂奇,张北,等. 由 IL-10/JAK2/STAT3 通路探讨养血柔筋方对兔膝关节炎软骨损伤的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(6):796-801.

(收稿日期:2024-12-16)