

补肾方剂对绝经后骨质疏松症大鼠的影响及其作用机制研究

徐绍俊¹, 黄建烽², 邵敏³, 王天⁴, 孙友强⁵, 姜涛², 黄永青² (1. 广州市正骨医院, 广东 广州 510045; 2. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510360; 3 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240; 4. 海南省中医院, 海南 海口 570000; 5. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405)

摘要：目的 考察补肾方剂六味地黄丸和金匱肾气丸对绝经后骨质疏松症(PMOP)大鼠的治疗效果及其潜在的作用机制。方法 采用双侧卵巢切除术构建 PMOP 模型大鼠后, 连续 3 个月灌胃给药治疗, 通过双能 X 线骨密度仪和雌激素酶联免疫分析试剂盒分别检测大鼠股骨骨密度和血清雌激素水平。同时, 体外分离培养大鼠原代成骨细胞, 10, 50, 100 ng·μL⁻¹ 不同浓度补肾方剂处理后, 通过 CCK-8 试剂盒和碱性磷酸酶(ALP)试剂盒分别检测成骨细胞活性和 ALP 活性; 通过 RT-PCR 和 WB 检测成骨细胞内雌激素受体 ERs (ERα, ERβ, ERRα) Collagen I 和 p-AMPK 表达变化。结果 金匱肾气丸可显著改善 PMOP 大鼠股骨骨密度和血清雌激素水平($P < 0.05$), 但六味地黄丸作用不明显。成骨细胞经不同浓度补肾方剂处理后, 浓度为 50 ng·μL⁻¹ 和 100 ng·μL⁻¹ 的金匱肾气丸可有效提高成骨细胞活力, ALP 活性和 Collagen I 蛋白表达, 且随着金匱肾气丸浓度越高, 作用效果越明显, 而六味地黄丸对成骨细胞作用不显著。此外, 金匱肾气丸可显著增加 ERα 的表达($P < 0.01$), 抑制 p-AMPK 蛋白表达, 但对 ERβ, ERRα 表达影响不明显。结论 金匱肾气丸可通过促进 ERα 表达, 抑制 p-AMPK 有效治疗 PMOP, 明显促进成骨细胞增殖分化, 改善成骨细胞功能, 但六味地黄丸作用效果不显著。

关键词：金匱肾气丸; 六味地黄丸; 绝经后骨质疏松症; 卵巢切除术; 成骨细胞

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.0

Effects of Bushen recipes on postmenopausal osteoporosis and the relative mechanisms

[Abstract] Objective: To study the effects of Liuwei Dihuang Pill and Jinkui Shenqi Pill treating for postmenopausal osteoporosis (PMOP) and the underlying mechanisms. Methods: Model of PMOP rats were established by bilateral ovariectomy. The bone mineral density (BMD) of femur and levels of serum estrogen in PMOP rats which treated with Jinkui Shenqi Pill and Liuwei Dihuang Pill for 3 months were examined by dual energy X ray absorptiometry and estrogen detection kit, respectively. Meanwhile, the primary osteoblasts were isolated in vitro and treated with Jinkui Shenqi Pill and Liuwei Dihuang Pill with different concentrations (10, 50, 100 ng·μL⁻¹). The cell viability and ALP activity were evaluated by CCK-8 kit and alkaline phosphatase kit; mRNA expressions of estrogen receptors (ERα, ERβ, ERRα) were examined by RT-PCR, and protein expressions of Collagen I, ERα and p-AMPK were measured by western blotting. Results: The BMD of femur and levels of serum estrogen in PMOP rats treated with Jinkui Shenqi Pill increased significantly ($P < 0.05$), while there was no obvious change in Liuwei Dihuang Pill treated group. Meanwhile, the cell viability, ALP activity and the expressions of Collagen I of osteoblasts increased notably after treated with 50 and 100 ng·μL⁻¹ Jinkui Shenqi Pill, especially at the concentration of 100 ng·μL⁻¹; but there were no changes after LiuWei DiHuang Pill treatment. In addition, the mRNA and protein expression of ERα and p-AMPK increased and decreased respectively, but the expressions of ERβ, ERRα did not change.

收稿日期: 2017-04-12

作者简介: 徐绍俊, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。Email: 290936029@qq.com。通信作者: 邵敏, 男, 教授, 主任医师, 研究方向: 骨质疏松、骨关节炎。Email: shaomin98@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373654)。

Conclusion: Jinkui Shenqi Pill while not Liuwei Dihuang Pill could treat for PMOP effectively, promote the differentiation and improve the functions of osteoblasts through increasing the expression of ER α and inhibiting expression of the p-AMPK.

Key words: Jinkui Shenqi Pill; Liuwei Dihuang Pill; Postmenopausal Osteoporosis; Ovariectomy; Osteoblasts

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis, PMOP)是骨质疏松症常见类型之一,其患病率高达40%~50%,其中,约30%~50%的女性将经历骨质疏松相关的骨折,由此带来的并发症和巨额医疗费用使骨质疏松成为一个重要的公共健康问题^[1]。目前,治疗 PMOP 的西药大致可分为两大类^[2]:一类是以抑制骨吸收为主的骨吸收抑制剂,如:雌激素、钙剂、降钙素、双磷酸盐及活性维生素D等;另一类是以促进骨形成为主的骨形成促进剂,如:氟化物、生长激素、雄激素、合成蛋白同化激素、维生素K等。近年研究发现,PMOP 发生与雌激素关系密切,雌激素缺乏是其首要病因^[3],数年来的临床研究已确定,雌激素替代治疗(ERT)是PMOP的首选治疗方案^[4]。然而,雌激素替代疗法引起的副作用和并发症一直是研究者面临的一大难题和对绝经后妇女健康的一大威胁。中医药治疗PMOP已有几十年历史,尤其是近年,相关临床研究和报道日益增多。与西药相比,中药副作用相对较少,且中药资源丰富,价格低廉,更适合长期使用^[5]。传统中医认为女性肾虚证随年龄的增大而增加,提示女性肾虚证时骨矿物含量减少,女性肾虚证的发生与年龄呈正相关,所以,补益脾肝肾,活血化瘀是中医药治疗 PMOP 的原则之一^[6]。虽然,近年来采用补肾方药治疗 PMOP 的研究日益增多,但目前其作用机制尚不完全清楚。

本研究中,拟选用经典补肾方剂六味地黄丸和金匱肾气丸为模型药物,通过双侧卵巢切除术建立 PMOP 模型大鼠,评价金匱肾气丸在体内对PMOP的疗效。同时,体外培养成骨细胞,通过用不同浓度补肾方剂处理成骨细胞,考察补肾方剂对成骨细胞活性及功能的影响,并对其作用机制作进一步研究,为中医药治疗PMOP的机理提供理论基础,优化防治策略。

1 材料与方法

1.1 动物 健康SD大鼠,雌性,SPF级,32周龄,体质量约300~400 g,由广州中医药大学实验动物中

心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2013-0020。

1.2 药品及试剂 金匱肾气丸,北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号:14030693;六味地黄丸,北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号:14071873;雌二醇(E₂),美国Sigma公司,批号:MO63103;水合氯醛:江苏省昆山市石浦年沙助剂厂,批号:080120;DMEM培养基,美国Gibico公司,批号:8115304;BCA蛋白定量试剂盒,上海贝博生物公司,批号:BB150101;大鼠雌激素酶联免疫分析试剂盒,美国RD公司,批号:201501;CCK8试剂盒,日本DOJINDO研究所,批号:JJ729;碱性磷酸酶试剂盒,南京建成生物科技有限公司,批号:20151110;山羊抗鼠Collagen I抗体,批号:11115;兔抗鼠ER α 抗体,批号:8818;兔抗鼠p-AMPK抗体,批号:F3372;山羊IgG抗体,批号:H1715,均为美国Santa Cruz公司产品;兔IgG抗体,美国CST公司,批号:7074P2;DAP显色试剂盒,批号:K156616A;ECL发光液,上海碧云天生物技术研究,批号:P0018;PrimeScript RT Master Mix, Takara公司,批号:AZZ01A;SYBR,批号:AK6506;RNAiso pul,批号:AA1305-1;TRLZO1试剂,批号:14105,均为Takara公司产品。

1.3 仪器 双能X线骨密度仪,美国Lunar公司,Prodigy型。

1.4 绝经后骨质疏松大鼠模型的建立^[7] 选用32周健康雌性SD大鼠64只,依照随机数字表将其分为卵巢切除(OVX)组(50只)和假手术组(14只)。卵巢切除组大鼠经10%水合氯醛腹腔注射麻醉(4 mL·kg⁻¹),手术时在背部剪毛,形成3 cm×5 cm的去毛区,并以5%聚维酮碘消毒两次后用75%酒精脱碘。其后沿背中线向下做纵行的切口,长度大约2~3 cm,切开皮肤后可见位于两侧肾外下方呈粉红色的卵巢及其紧密相连的子宫角,结扎并切断子宫角,将卵巢摘除后缝合背部肌肉及皮肤。假手术组大鼠的手术过程与卵巢切除组相同,但不切除卵巢组织。手术后,每只大鼠连续5 d肌注20万单位青霉素,以防感染。术后6周,随机从各组中分别取出两只大鼠,

使用双能 X 线骨密度仪检测股骨头骨密度, 以确定 PMOP 的建立。

1.5 分组及取材检测 将成模大鼠随机分为 4 组, 分别为模型组, 六味地黄丸组, 金匱肾气丸组, 雌二醇组, 每组 12 只, 并以假手术组作为对照。其中, 金匱肾气丸组和六味地黄丸组大鼠以 $1.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物灌胃, 假手术组和模型组大鼠每天灌胃等体积的生理盐水, 雌二醇组尾静脉注射雌二醇, 每 3 d 注射 1 次, 剂量为 $0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠从术后第 7 天开始, 每天给药 1 次, 连续给药 3 个月。

3 个月后, 经腹主动脉取 5 mL 全血, 立即以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min, 分离上清, 用雌激素酶联免疫分析试剂盒检测雌二醇(E_2)含量。取各组大鼠的股骨, 剔除附着在周围的软组织和肌肉, 使用双能 X 线骨密度仪检测股骨头骨密度。

1.6 成骨细胞培养 取大鼠 1 日龄幼鼠的头盖骨, 置于磷酸盐缓冲溶液中清洗, 去除粘连的结缔组织, 剪碎, 加入胰蛋白酶消化, 而后将其置于培养瓶中, 加入含 10 % 胎牛血清 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 青霉素 $56 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $56 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMEM 培养液, 在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 条件下的培养箱中培养, 并每隔 48 h 换液 1 次, 融合率达 80 % 左右进行传代。当传至三代后, 进行以下实验。

1.7 成骨细胞活性检测 成骨细胞以 3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种至 96 孔板中, 并将其分为假手术组, 六味地黄丸组, 金匱肾气丸组。其中, 金匱肾气丸组和六味地黄丸组分别加入浓度为 10, 50, 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的金匱肾气丸和六味地黄丸含药培养液, 假手术组加入等体积的培养液。采用 CCK8 试剂盒检测成骨细胞培养 24 h 和 48 h 细胞活性的变化情况。用 $2-(\text{OD 样品} - \text{ODCON})$ 计算细胞活力。

1.8 成骨细胞碱性磷酸酶活性检测 按上述方法接种及处理成骨细胞, 培养 48 h 后, 采用碱性磷酸酶试剂盒检测 ALP 活性。实验方法按说明书进行。

1.9 Collagen I、 $\text{ER}\alpha$ 及 AMPK 蛋白表达水平检测 成骨细胞以 3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种至 6 孔板中, 加入不同浓度的金匱肾气丸和六味地黄丸含药培养液, 培养 48 h 后, PBS 漂洗, 进而加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 转移裂解液, 离心, 采用 BCA 试剂盒检测目的蛋白浓度, 并根据检测结果将所有样品用 Lysis Buffer 稀释至同一浓度, 加入上样缓冲液, 煮沸 5 min, 混匀后离心。随后样品加入到 10 % 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺上进行电泳; 电泳结束后, 将蛋

白转移到 PVDF 膜上, 进而放入 5 % 脱脂牛奶中, 室温 1 h; 加入到稀释到相应比例的一抗, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜; 在 $1 \times \text{TBST}$ 中漂洗 $10 \text{ min} \times 3$ 次后, 将膜置于 5 % 脱脂牛奶稀释的相应二抗中, 室温孵育 1 h; 二抗孵育结束后, 将膜在 $1 \times \text{TBST}$ 中漂洗 $10 \text{ min} \times 3$ 次。将等体积混合的 Super ECL 的 A 液和 B 液加到膜上, 压片后显影及定影, 用扫描仪扫描 X 光片。

1.10 ERs 受体表达水平 采用 RNA 提取试剂盒提取培养细胞的总 RNA, 紫外线检测 RNA 浓度及纯度, 并按照 RevertAid cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 的合成。其中, $\text{ER}\alpha$ 引物为 F-CGCCGTGTTCAACTAC, R-AAGCCCCCAGACTATT; $\text{ER}\beta$ 引物为 F-CTGTGATGA-ACTACAGT, R-GCATAGAGGAGCCGATG; $\text{ERR}\alpha$ 引物为 F-GGTCCTGGATGAAGAG, R-ACGGAGTCAGAGTTGG; GAPDH 引物为 F-GCACC-GTCAAGGCTGAGAAC, R-TGCTG -AAGACGCCAG-TGGA。反应条件为预变性, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; 变性, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min, 共 40 个循环。计算机计算 Ct 值, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 $\text{ER}\alpha$, $\text{ER}\beta$ 和 $\text{ERR}\alpha$ 的相对表达量。

1.11 统计学处理方法 采用 Stata 13.0 软件进行统计学分析, 实验数据用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。多组间比较, 应用单因素方差分析; 两组独立样本间比较, 则采取独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 补肾方剂对绝经后骨质疏松大鼠雌激素及骨密度的影响 各组大鼠血清中雌二醇(E_2)的含量显示, 模型组 E_2 水平显著下降, 与假手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 金匱肾气丸组 E_2 水平显著上升, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 骨密度(BMD)检测显示, 模型组 BMD 显著降低, 与假手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 金匱肾气丸组 BMD 显著升高, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而六味地黄丸组的作用效果并不明显。见表 1。

2.2 补肾方剂对成骨细胞活性的影响 通过考察不同浓度金匱肾气丸及六味地黄丸对成骨细胞活性的影响, 发现金匱肾气丸 50, 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组与成骨细胞作用 48 h 能明显上调细胞活性, 与假手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 但在六味地黄丸作用下, 成骨细胞活性无明显变化。说明金匱肾气丸 50, 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组可促进成骨细胞增殖。见表 2。

表 1 对绝经后骨质疏松模型大鼠 E₂ 及 BMD 的影响($\bar{x} \pm s$, n=12)

Table 1 Effects of chinese medicine on the E₂ level and BMD of PMOP model rats by oral administration

组别	n	剂量 / (g·kg ⁻¹)	E ₂ 含量 /pg·mL ⁻¹	BMD/g·cm ³ ⁻¹
假手术组	12	-	60.18 ± 9.601	0.381 ± 0.029
模型组	12	-	17.16 ± 8.323*	0.297 ± 0.024*
金匱肾气丸组	12	1.9	45.06 ± 7.634 [#]	0.343 ± 0.019 [#]
六味地黄丸组	12	1.9	19.95 ± 8.170	0.304 ± 0.020
雌二醇组	12	0.1 μg·kg ⁻¹	41.23 ± 8.225 [#]	0.345 ± 0.027 [#]

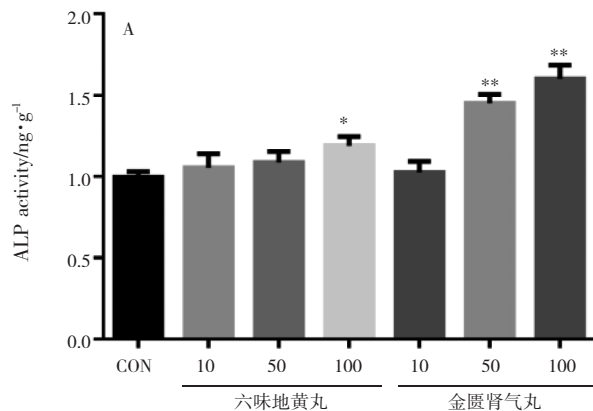
注: 与假手术组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, [#]P < 0.05。

表 2 不同浓度补肾方剂对成骨细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Effects of different concentration of Bushen recipes on osteoblasts activity

组别	n	剂量 / (ng·μL ⁻¹)	24 h	48 h
假手术组	6	-	1.015 ± 0.011	1.003 ± 0.024
六味地黄丸组	6	10	1.027 ± 0.042	1.109 ± 0.057
六味地黄丸组	6	50	0.986 ± 0.023	1.091 ± 0.029
六味地黄丸组	6	100	1.003 ± 0.031	1.173 ± 0.045
金匱肾气丸组	6	10	1.062 ± 0.028	1.249 ± 0.101
金匱肾气丸组	6	50	1.155 ± 0.079	1.307 ± 0.087*
金匱肾气丸组	6	100	1.068 ± 0.091	1.652 ± 0.098**

注: 与假手术组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。



A. 补肾方剂对成骨细胞 ALP 活性影响; B. 中药对成骨细胞 Collagen I 表达的影响

注: 与假手术组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

图 1 补肾方剂对成骨细胞功能的影响

Figure 1 Effects of Bushen recipes on the functions of osteoblasts

2.5 补肾方剂对雌激素受体蛋白表达的影响 通过免疫印迹法进一步考察补肾方剂对成骨细胞 ERα 蛋白表达的影响。实验发现, 在不同浓度六味地黄丸和金匱肾气丸作用下, ERα 蛋白表达有不同程度上调。在同一浓度补肾方剂作用下, 金匱肾气丸对 ERα 蛋白表达促进作用较六味地黄丸明显, 且呈浓度依赖性, 随着金匱肾气丸作用浓度增大, 促进 ERα 蛋白表达作用越显著。见图 3。

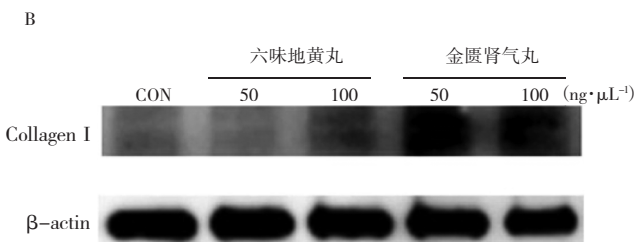
2.5 补肾方剂对 AMPKα 蛋白表达的影响 实验通过免疫印迹法考察不同浓度金匱肾气丸和六味地黄丸

2.3 补肾方剂对成骨细胞功能的影响

100 ng·μL⁻¹ 六味地黄丸组 ALP 活性显著上升, 与假手术组比较, 差异有统计学意义(P < 0.05); 50, 100 ng·μL⁻¹ 金匱肾气丸组能显著提高成骨细胞 ALP 活性, 与假手术组比较, 差异有统计学意义(P < 0.01)。六味地黄丸较金匱肾气丸作用效果弱, 成骨细胞只有在 100 ng·μL⁻¹ 六味地黄丸作用下, ALP 活性才有显著上升, 50 ng·μL⁻¹ 六味地黄丸组 ALP 活性有所上升, 但与假手术组比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。100 ng·μL⁻¹ 六味地黄丸组和 50, 100 ng·μL⁻¹ 金匱肾气丸组, Collagen I 蛋白表达均有明显上调。见图 1。

2.4 补肾方剂对雌激素受体表达的影响

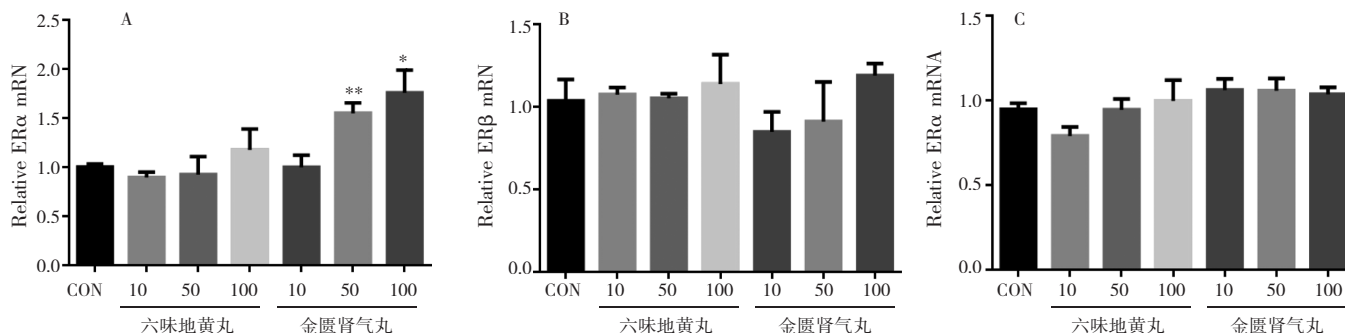
结果表明, 50, 100 ng·μL⁻¹ 金匱肾气丸组能显著提高 ERα 的 mRNA 表达, 与假手术组比较, 差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01), 但对 ERβ, ERRα 的表达无明显影响(P > 0.05)。此外, 六味地黄丸对雌激素受体 ERα, ERβ, ERRα 无明显作用, 与假手术组比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。见图 2。



对在成骨细胞中 p-AMPKα 蛋白表达的情况。实验发现, 不同浓度六味地黄丸和金匱肾气丸(50, 100 ng·μL⁻¹)对 p-AMPKα 蛋白表达有不同程度下调, 此外, 随着补肾方剂浓度的增加, p-AMPKα 蛋白表达下调越明显。且金匱肾气丸比六味地黄丸对 p-AMPKα 蛋白表达抑制效果更佳。见图 4。

3 讨论

PMOP 是中老年妇女的常见病, 该疾病以其高致残率、高致死率、高经济负担及低生活质量的特点



A. 对成骨细胞 ERα mRNA 表达的影响; B. 对成骨细胞 ERβ mRNA 表达的影响; C. 对成骨细胞 ERRα mRNA 表达的影响。

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 补肾方剂对成骨细胞雌激素受体 ERs 表达的调节

Figure 2 Bushen recipes regulate the expression of ERs in osteoblasts

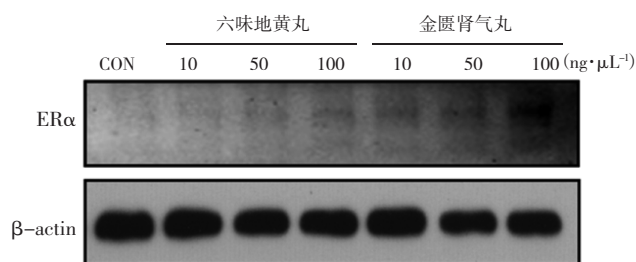


图 3 补肾方剂对成骨细胞 ERα 蛋白表达的影响

Figure 3 Bushen recipes affect the protein expression of ERα in osteoblasts

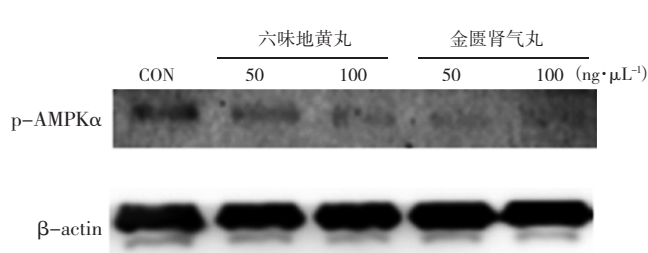


图 4 补肾方剂对成骨细胞 AMPK 蛋白表达的调节

Figure 4 Bushen recipes regulate the protein expression of AMPK in osteoblasts

引起了医学界的普遍关注。中医因相对较少的副作用在疾病治疗中受到越来越多的重视, 中医认为治疗 PMOP 的一个主要原则是补肾益气, 故多以补肾方辅助骨病治疗。然而, 补肾药治疗 PMOP 的作用机制尚不完全清楚。

本研究首先通过双侧卵巢切除术成功建立了 PMOP 模型大鼠。同时, 通过对 PMOP 模型大鼠连续 3 个月给药, 考察了补肾方剂金匱肾气丸和六味地黄丸对 PMOP 的治疗效果, 结果发现金匱肾气丸能显著提高 PMOP 股骨骨密度和血清雌激素水平, 但六味地黄丸作用效果不明显。此外, 体外实验考察了不同浓度 (10, 50, 100 ng·μL⁻¹) 补肾方剂对成骨细胞的影响, 发现成骨细胞在浓度为 50 ng·μL⁻¹ 和 100 ng·μL⁻¹ 的金匱肾气丸作用下, 细胞活力和 ALP 活性明显增强, 且 Collagen I 蛋白表达也明显上调, 但六味地黄丸的作用不显著。上述结果说明补肾方剂金匱肾气丸是治疗 PMOP 的有效药物, 而六味地黄丸的治疗效果明显低于金匱肾气丸。

有研究表明, 植物雌激素对骨质疏松症有缓解或治疗作用^[8-10]。如研究认为大豆异黄酮具有明显的防治骨质疏松的作用, 其可以阻断破骨细胞酸的分泌, 从而减少骨质消溶^[11]。另外, 许多补肾方剂也因

含有植物雌激素成分而对骨质疏松症有较好的疗效。此外有研究表明, 具有植物雌激素样作用的淫羊藿, 补骨脂, 蛇床子, 骨碎补, 阿胶, 枸杞子, 甘草等组成的中药复方可显著提高雌激素水平, 并可使去卵巢大鼠骨组织 ER mRNA 表达增强, 其又可通过 ER 发挥转录因子的作用, 并调控与骨代谢相关基因的表达, 从而达到治疗骨质疏松症的效果^[12]。金匱肾气丸的主要成分是地黄、山药、山茱萸、茯苓、牡丹皮、泽泻、桂枝、附子、牛膝、车前子, 六味地黄丸的主要成分是熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹、茯苓。在本研究中, 我们通过方剂对比, 发现六味地黄丸缺乏金匱肾气丸中的几种单味中药, 发现这几种药物中含有多种雌激素类似物, 以川牛膝、桂枝及车前子等药含量最高, 其重要的雌激素类似物分别为牛膝甾酮、蜕皮甾酮、香豆素、熊果酸等。且到目前为止, 川牛膝、桂枝及车前子等被用于治疗 PMOP 的研究报道较多。因此, 进一步实验将筛选出补肾方剂金匱肾气丸治疗 POMP 的主要有效成分。

人成骨细胞内雌激素受体数量随年龄增长而递减, 因此认为, 人成骨细胞的雌激素受体数量与绝经后骨质疏松的发生密切相关。目前认为其机制是

成骨细胞内存在高亲和力的 $ER\alpha$ ，雌激素与成骨细胞内的雌激素受体结合后，促使其分泌胶原酶、释放细胞因子及生长因子等进行骨重建^[13]。成骨细胞中存在不同的 ERs 依赖性的反应机制。雌激素等配体通过与 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ERR\alpha$ 相互作用对成骨细胞发挥生物学效应。但哪一种亚型是成骨细胞优势雌激素受体亚型，目前尚无定论。本实验研究发现，金匱肾气丸可显著提高雌激素受体 $ER\alpha$ 的表达，但对 $ER\beta$ 及 $ERR\alpha$ 的表达改善作用不明显。说明金匱肾气丸主要是通过促进 $ER\alpha$ 的表达而不是其他亚型表达，从而改善成骨细胞的生长状态。

AMP 激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，是一个异源三聚体蛋白，由 α (63 kD)、 β (30 kD) 和 γ (37–63 kD) 三个亚基组成。AMPK 激活后可以开启分解代谢通路以产生更多的 ATP，同时会关闭合成代谢通路以减少 ATP 的消耗。AMPK 在骨组织代谢中发挥着重要作用^[14]。体外研究^[15–17]显示 AMPK 可以调控骨组织细胞的分化和功能，同时体内研究^[18–19]表明 AMPK α 或 β 亚基敲除的小鼠会出现骨量下降，但是其中 AMPK 涉及的信号通路并不明确。AMPK 可以调节分解代谢和合成代谢通路的平衡，AMPK 可能成为治疗骨质疏松的一个新的靶点。目前，关于 $ER\alpha$ /AMPK 信号通路调控异常与衰老相关性的研究很少，可能是 $ER\alpha$ 通过与热休克蛋白 (HSP90) 结合后，抑制了 AMPK 上游的激酶的表达和活化，如 LKB1 等，进而抑制了 AMPK 的磷酸化^[20]。而在本研究中发现，金匱肾气丸不仅可有效促进成骨细胞 $ER\alpha$ ，还可显著抑制 p-AMPK 蛋白表达。说明，金匱肾气丸是通过 $ER\alpha$ /AMPK 信号通路改善 PMOP。但目前金匱肾气丸改善 $ER\alpha$ 表达，是怎样抑制 AMPK 磷酸化尚未可知，有待进一步进行实验研究。

综上所述，金匱肾气丸可通过 $ER\alpha$ /AMPK 信号通路有效治疗 PMOP，明显促进成骨细胞增殖分化，为 PMOP 防治提供一定的指导。

参考文献:

- [1] Seeman E, Eisman J A. 7: Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. The single most important consideration is the individual's absolute risk of fracture [J]. The Medical journal of Australia, 2004, 180(6): 298–303.
- [2] 黄立莉, 洪文, 王立源, 等. 绝经后骨质疏松症的临床治疗进展 [J]. 中国医药导报, 2011, (18): 7–10.
- [3] Al-Azzawi F. Prevention of postmenopausal osteoporosis and associated fractures: Clinical evaluation of the choice between estrogen and bisphosphonates[J]. Gynecol. Endocrinol., 2008, 24(11): 601–609.
- [4] Hosoi T. [Hormone replacement Up-to-date. Selective estrogen receptor modulator(SERM) for the treatment of osteoporosis][J]. Clinical calcium, 2007, 17(9): 1419–1423.
- [5] An J, Yang H, Zhang Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation[J]. Life sciences, 2016, 147: 46–58.
- [6] 齐尚锋, 张永波. 中医药防治骨质疏松症的研究概况[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009(3): 230–235.
- [7] 王立童, 詹红生. 原发性骨质疏松动物模型的复制及其机制[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(8): 178–180.
- [8] 王谦, 刘光军, 许硕贵. 各类抗骨质疏松药物的临床研究进展[J]. 实用医药杂志, 2010, (4): 368–371.
- [9] 王建华. 植物雌激素防治去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究及其作用机制探讨[D]. 河北医科大学, (2003).
- [10] 严红梅, 张振海, 孙娥, 等. 中药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中草药, 2014, (8): 1174–1178.
- [11] 李湘辉, 张金超, 肖培根, 等. 大豆异黄酮类防治骨质疏松的作用机制[J]. 国外医药(植物药分册), 2006, (1): 1–5.
- [12] 赵丕文. 十种中药植物雌激素样作用及其机制的研究[D]. 北京中医药大学, (2007).
- [13] Westberry J M, Trout A L, Wilson M E. Epigenetic regulation of estrogen receptor beta expression in the rat cortex during aging[J]. Neuroreport, 2011, 22(9): 428–432.
- [14] 王钰钢, 范启明, 汤亭亭. AMPK 信号通路对骨代谢的调节作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, (3): 322–326.
- [15] Shah M, Kola B, Batavcljic A, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass[J]. Bone, 2010, 47(2): 309–319.
- [16] Kim E K, Lim S, Park J M, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase [J]. Journal of cellular physiology, 2012, 227(4): 1680–1687.
- [17] Kasai T, Bandow K, Suzuki H, et al. Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity[J]. Journal of cellular physiology, 2009, 221(3): 740–749.
- [18] Quinn J M, Tam S, Sims N A, et al. Germline deletion of AMP-activated protein kinase beta subunits reduces bone mass without altering osteoclast differentiation or function[J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2010, 24(1): 275–285.
- [19] Jeyabalan J, Shah M, Viollet B, et al. Mice lacking AMP-activated protein kinase alpha1 catalytic subunit have increased bone remodelling and modified skeletal responses to hormonal challenges induced by ovariectomy and intermittent PTH treatment[J]. The Journal of endocrinology, 2012, 214(3): 349–358.
- [20] Fullerton M D. AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism [J]. Current opinion in lipidology, 2016, 27(2): 172–180.

(编辑: 宋威)