

加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响

黄思敏¹, 陈志^{1,2}, 张丽¹, 董业红¹, 徐彭¹, 刘波¹(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 江西省赣州市人民医院, 江西 赣州 341000)

摘要: **目的** 探讨加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响。**方法** 将 60 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、福善美组($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)以及加味补阳还五汤高、中、低剂量组(18.18 、 9.09 、 $4.545 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。采用双侧卵巢摘除法建立绝经后骨质疏松症大鼠模型。造模 1 周后开始灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 90 d。采用 DPX-L 双能 X 射线骨密度仪检测大鼠股骨的骨密度值; 扫描电镜观察大鼠松质骨微结构变化; ELISA 法检测大鼠骨髓内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及髓过氧化物酶(MPO)的含量; 采用 Western Blot 法检测大鼠胫骨组织中骨形成蛋白 2(BMP-2)、骨保护素(OPG)及 I 型胶原蛋白(Collagen I)表达情况。提取各组大鼠原代骨髓间充质干细胞(BMSCs), 采用 MTT 法检测各组大鼠 BMSCs 生长速率, 描绘生长速率曲线。**结果** 与假手术组比较, 去卵巢后大鼠的骨密度明显降低($P < 0.01$); 大鼠股骨的骨小梁塌陷, 无完整结构, 有明显吸收陷窝; 模型组大鼠骨髓内的 MPO 水平明显升高($P < 0.05$), 而 SOD 活力明显降低($P < 0.05$), MDA 含量升高但差异无统计学意义($P > 0.05$); 大鼠胫骨组织中 BMP-2 及 Collagen I 的蛋白表达明显下调($P < 0.05$), OPG 蛋白表达有下调但差异无统计学意义($P > 0.05$); 模型组第 3~8 天的 BMSCs 增殖速率均明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠的骨密度显著提高($P < 0.01$); 松质骨微结构得到明显改善, 骨小梁结构比较完整, 壁厚且连接性较好; 各给药组的骨髓内 SOD 活力均有所升高但差异无统计学意义($P > 0.05$), 加味补阳还五汤高剂量组的 MDA、MPO 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 加味补阳还五汤中、高剂量组去卵巢大鼠胫骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 的蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$); 各给药组第 3~8 天的 BMSCs 增殖速率均明显升高($P < 0.01$)。**结论** 加味补阳还五汤可能通过上调骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白表达, 促进 BMSCs 的增殖及骨向分化, 降低体内氧化应激水平, 从而发挥对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用。

关键词: 加味补阳还五汤; 骨质疏松症; 去卵巢; 骨髓间充质干细胞; 骨密度; 抗氧化应激; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-0932-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.005

Effect of Modified Buyang Huanwu Decoction on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

HUANG Simin¹, CHEN Zhi^{1, 2}, ZHANG Li¹, DONG Yehong¹, XU Peng¹, LIU Bo¹(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of modified Buyang Huanwu decoction on osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Sixty female SD rats were randomly divided into Sham operation group, model group, Fushanmei group($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and modified Buyang Huanwu decoction high, medium and low dose groups(18.18 , 9.09 , $4.545 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 10 rats per group. Rat model of postmenopausal osteoporosis was established by bilateral ovarian extraction. One week after the model was established, the intragastric administration was started, once a day, for 90 consecutive days. DPX-L dual-energy X-ray bone densitometer was used to detect the bone mineral

收稿日期: 2020-10-28

作者简介: 黄思敏, 女, 硕士研究生, 研究方向: 防治衰老性疾病。Email: 2061281469@qq.com。通信作者: 刘波, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 防治衰老性疾病。Email: liubo827@jxutcm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560723); 江西中医药大学研究生创新基金项目(JZC19S11)。

density of rat femur; scanning electron microscope was used to observe the microstructure changes of rat cancellous bone; the ELISA method was used to detect superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and marrow peroxidase (MPO) in bone marrow of rats. Western Blot method was used to detect expression of bone morphogenetic protein (BMP-2), osteoprotegerin (OPG), and type I collagen (Collagen I) in rat tibia tissue. The primary bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of each group of rats were extracted, and the growth rate of BMSCs of each group was detected by MTT method, and the growth rate curve was drawn. **Results** Compared with the Sham operation group, the bone mineral density of the rats after ovariectomy was significantly reduced ($P < 0.01$); the trabecular bone of the rat femur was collapsed without a complete structure, and there were obvious resorption lacuna. The level of MPO in the bone marrow of the model group was significantly increased ($P < 0.05$), while the SOD activity was significantly reduced ($P < 0.05$), and the MDA content was increased but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The protein expression of BMP-2 and Collagen I in rat tibia tissue was significantly down-regulated ($P < 0.05$), OPG protein expression was down-regulated but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The proliferation rate of BMSCs in the model group was significantly reduced on day 3–8 ($P < 0.01$). Compared with the model group, the bone mineral density of rats in each treatment group was significantly increased ($P < 0.01$); the microstructure of cancellous bone was significantly improved, the trabecular bone structure was relatively complete, the wall was thick and the connectivity was better. The SOD activities of treatment groups were increased but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The MDA and MPO levels of the high-dose group of modified *Buyang Huanwu* decoction were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expressions of BMP-2, OPG and Collagen I in the tibia tissue of ovariectomized rats in the decoction medium and high dose groups were significantly up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The proliferation rates of BMSCs in all treatment groups were significantly increased from the 3rd to 8th day after administration ($P < 0.01$). **Conclusion** Modified *Buyang Huanwu* decoction may increase the expression of BMP-2, OPG and Collagen I protein in bone tissue, promote the proliferation and bone differentiation of BMSCs, and reduce the level of oxidative stress in the body, thereby play a role in prevention and treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. **Keywords:** Modified *Buyang Huanwu* decoction; osteoporosis; ovariectomy; bone marrow mesenchymal stem cells; bone density; antioxidant stress; rats

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨密度降低为特征的, 由于骨脆性增加, 容易发生骨折的一种全身代谢性骨骼疾病^[1], 在中老年人, 尤其是绝经后女性中常见。据统计^[2], 女性患骨质疏松症的概率是男性的 5 倍左右, 而我国绝经后女性骨质疏松症的患病率达到 50.1%。绝经后骨质疏松症的病因复杂, 主要机制是雌激素缺乏导致破骨细胞增殖, 进而促进骨吸收, 同时骨形成蛋白 2 (BMP-2)、骨保护素 (OPG) 等骨形成相关蛋白表达下调使骨形成受阻。当骨吸收速度超过骨形成速度时, 骨基质中的无机物和有机物减少, 从而诱发骨质疏松症^[3]。

中医理论将骨质疏松症归为“骨痹”“骨痿”范畴, 认为肾虚是骨质疏松的根本原因^[4–5], 而血瘀可以促进骨质疏松发展^[6–7]。因此, 中医临床多采用补肾、活血、化瘀的方法防治骨质疏松症。补阳还五

汤出自清代著名医家王清任的《医林改错》, 是治疗因虚致瘀的代表药方, 近年来, 临床上常被用于治疗骨质疏松症^[8–9]。全方以黄芪为君, 大补元气, 使气旺而增强固摄生血之功, 减轻钙流失并促进钙沉积; 再辅以活血化瘀药当归、赤芍、川芎、红花、桃仁, 并以通络药地龙为佐, 瘀去络通, “通则不痛”, 从而减轻骨质疏松症患者的疼痛症状。而在该方中加用补肾壮骨的淫羊藿及仙茅^[10–12], 更加切中病机, 增强补肾壮骨、益气活血通络的功能。故本研究拟探讨加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用及相关机制, 以期骨质疏松症的临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性 SD 大鼠, SPF 级, 6 月龄, 体质量

230~250 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号: 4300470021477, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2011-0004。动物饲养条件: 室温控制在 20~22 ℃, 恒湿, 光照与环境一致, 自由饮水, 实验前 12 h 禁食。

1.2 药物 加味补阳还五汤处方: 黄芪 60 g、当归 6 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g、川芎 3 g、淫羊藿 9 g、仙茅 9 g, 方中药材均购自北京同仁堂南昌象山北路店, 经江西中医药大学中药鉴定学科组付小梅教授鉴定合格。按比例称取上述药材, 加入 4 倍量水浸没药材 3~5 cm, 浸泡 30 min 后, 先用武火煮沸, 再改用文火慢煎 50 min; 煎煮 2 次后过滤, 合并滤液, 使用旋转蒸发仪浓缩至 1.818 g·mL⁻¹, 备用。福善美(阳性对照药), 购于杭州默沙东制药有限公司, 批号: 110640。

1.3 主要试剂 骨保护素(OPG, 批号: ab73400)、I 型胶原蛋白(Collagen I, 批号: ab34710)、骨形成蛋白 2(BMP-2, 批号: ab14933)抗体, 均购自英国 Abcam 公司; 丙二醛(MDA, 批号: 20151014)、超氧化物歧化酶(SOD, 批号: 20151014)、髓过氧化物酶(MPO, 批号: 20150624)检测试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; RIPA 高效裂解液(批号: 20130318)、噻唑蓝(MTT, 批号: 410C055), 均购自北京索莱宝科技有限公司; 戊巴比妥钠, 美国 Sigma 公司, 批号: 20100511; ECL 发光试剂盒, 美国 Thermo 公司, 批号: 0H189779; β -actin 抗体, 北京中杉金桥生物科技有限公司, 批号: 19AW0403。

1.4 主要仪器 DPX-L 型双能 X 射线骨密度仪, 美国 Lunar 公司; Quanta 250 型扫描电镜, 美国 FEI 公司; 台式高速冷冻离心机、超低温冰箱, 美国 Thermo Fisher 公司; 真空旋转蒸发仪, 上海荣生生化仪器厂; H-2 型数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 电泳仪、垂直电泳槽、转移电泳槽、凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; ELx800 型吸收光酶标仪, 美国 Bio-Tek 仪器有限公司。

1.5 动物分组、模型复制及给药 将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、福善美组(阳性药组, 0.9 mg·kg⁻¹)及加味补阳还五汤高、中、低剂量组(18.18、9.09、4.545 g·kg⁻¹)。适应性喂养 1 周后, 用 3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠, 从季肋区腋中线和脊柱外侧入路切口, 彻底摘

除两侧卵巢, 制备骨质疏松症模型。假手术组仅作暴露, 不摘除双侧卵巢。各组大鼠缝合伤口, 然后涂以红霉素软膏抗感染。手术后第 2 天起, 进行阴道涂片检查, 连续观察 1 周, 每天 1 次, 不出现规则动情变化的大鼠为卵巢摘除成功。根据本课题组前期研究^[13]结果, 雌性大鼠成功摘除卵巢后会起骨质疏松症。

造模成功后开始灌胃给药, 加味补阳还五汤按照临床 70 kg 成人等效剂量(101 g 生药量)折算为大鼠中剂量(9.09 g·kg⁻¹), 高、低剂量分别为中剂量的 2 倍及 1/2。阳性药组灌胃 0.9 mg·kg⁻¹ 福善美, 假手术组及模型组灌胃等体积蒸馏水; 给药体积均为 10 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续给药 90 d。

1.6 细胞培养 末次给药结束后, 将各组 SD 雌性大鼠颈椎脱臼处死; 以 75% 乙醇浸泡 10 min 后, 无菌条件下分离后肢双侧胫骨及股骨, 提取骨髓间充质干细胞(BMSCs)^[14-15]; 置于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 传代后供实验用。

1.7 大鼠股骨骨密度检测 取大鼠左侧股骨, 将其周围组织和肌肉剔除干净后, 整齐摆放在双能 X 射线骨密度仪的吸收测量平台上。采用计算机在小动物梯级标准分析软件模式下, 自动记录股骨整体、股骨近端(为股骨近侧干骺端 1/3)及股骨远端(为股骨远侧干骺端 1/4)的骨密度, 并求平均值。

1.8 扫描电镜检测大鼠股骨组织超微结构 处死大鼠后尽快取出右侧股骨, 剔除周围的软组织; 将骨髓端组织切下, 固定于 4% 多聚甲醛中 24 h 后, 用 10% 次氯酸钠溶液处理 6 h, 超声冲洗 10 min, 然后用蒸馏水反复冲洗数次; 采用乙醇逐级脱水, 乙醚浸泡后, 室温干燥, 真空喷金, 制成 5 mm×5 mm×5 mm 的电镜观察标本; 置于扫描电镜下对各组大鼠的松质骨微结构变化进行观察。

1.9 ELISA 法检测骨髓内 SOD、MDA 及 MPO 的含量 处死大鼠后尽快取出右侧股骨, 剔除周围软组织, 将其两端切除, 暴露骨髓腔; 以 1 mL 生理盐水反复冲洗数次, 直到把骨髓腔冲白为止, 收集冲洗液; 根据 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测大鼠骨髓内 SOD、MDA 及 MPO 的含量。

1.10 Western Blot 法检测胫骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白的表达 随机选择每组大鼠的右侧胫骨, 用剪刀剪下骨髓端, 置于锡箔纸中, 用锤子砸碎, 迅速收集碎片称质量; 再放入预先灭菌冷冻、干燥洁净的装有液氮的研钵内研成粉末,

期间保证液氮不完全挥发；然后将粉末状骨组织收集到 1.5 mL 的 EP 管中。按照每 20 mg 组织加入 150~200 μ L 裂解液，裂解完成后的样品以 14 000 $\times$ g 离心 3~5 min，取上清液，收集总蛋白，采用 BCA 试剂盒检测上清液的蛋白浓度。确定蛋白上样量为 40 μ g，再加入蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min 后，即可上样。用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，转膜，以 5% 脱脂牛奶封闭 120 min；加入一抗 β -actin(1:1 000)、OPG(1:1 000)、BMP-2(1:1 000) 及 Collagen I (1:1 000)，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，然后按照说明书步骤稀释并加入经辣根过氧化物酶标记的二抗(1:8 000)，室温孵育下 120 min。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，滴入 ECL 发光试剂，用 X-射线胶片进行显影、拍照；以 β -actin 为内参，使用 ImageJ 软件对目的蛋白进行半定量分析。

1.11 MTT 法检测各组大鼠 BMSCs 生长速率 本课题组前期研究^[14-15]应用流式细胞仪对“1.6”项下提取的细胞进行过鉴定，证明 P₁ 代细胞中绝大多数为大鼠 BMSCs，可用于实验。取各组生长状态良好的 P₁ 代细胞，将细胞悬液以每孔 2 $\times$ 10³ 个的密度接种到 96 孔板中，每组设 8 个复孔；接种 24 h 后，在每个接种孔中加入 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的 MTT 溶液 20 μ L，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵育 4 h 后，吸弃上清液；每孔加入 DMSO 150 μ L，振荡 10 min，检测 490 nm 波长下的光密度(OD)值。其他平行板分别于接种后第 2~8 天，分别以相同方法测定 OD 值。最后统计结果，计算：增殖速率(K_n)=OD_n/OD₁，1 $\leq n \leq 8$ ， n 为天数；并以时间为横坐标，增殖速率 K 的平均值为纵坐标，描绘生长速率曲线。

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示；多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，两两比较用 LSD 检验；以 $P < 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨密度的影响

结果见表 1。与假手术组比较，去卵巢后大鼠的骨密度明显降低($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠的骨密度显著提高($P < 0.01$)，且呈一定剂量依赖趋势。结果表明，加味补阳还五汤能够增加大鼠骨密度，改善去卵巢引起的大鼠骨质疏松症。

表 1 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 Effect of modified Buyang Huanwu decoction on bone mineral density of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg ⁻¹)	骨密度/(g $\cdot$ cm ⁻²)
假手术组	—	0.246 $\pm$ 0.010
模型组	—	0.226 $\pm$ 0.007 [#]
福善美组	0.9 mg $\cdot$ kg ⁻¹	0.251 $\pm$ 0.016 ^{**}
加味补阳还五汤高剂量组	18.18	0.251 $\pm$ 0.009 ^{**}
加味补阳还五汤中剂量组	9.09	0.247 $\pm$ 0.008 ^{**}
加味补阳还五汤低剂量组	4.55	0.245 $\pm$ 0.011 ^{**}

注：与假手术组比较，[#] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

2.2 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠松质骨微结构的影响

结果见图 1。假手术组大鼠股骨远端松质骨丰富，组织结构完整，纹理走向清楚，骨小梁连接性好，无断裂，壁厚且均匀，形态规则，间隙适中，表面较光滑清晰，骨吸收孔少且较小，多为圆形或椭圆形。模型组股骨的骨小梁结构破坏，萎缩变细、变薄，数量减少，排列紊乱，有断裂，骨吸收孔增多且大小不一，形状各异，骨板层次结构疏松，骨质疏松特征明显。福善美组和加味补阳还五汤高、中剂量组股骨的骨小梁结构较完整，纹理走向较清楚，骨小梁连接性较好，壁厚较致密，有少量断接现象，形态较规则且数目明显多于模型组；加味补阳还五汤中剂量组的骨小梁有塌陷现象，低剂量组骨板完整，有较多的骨吸收孔，大小不一，形态各异。

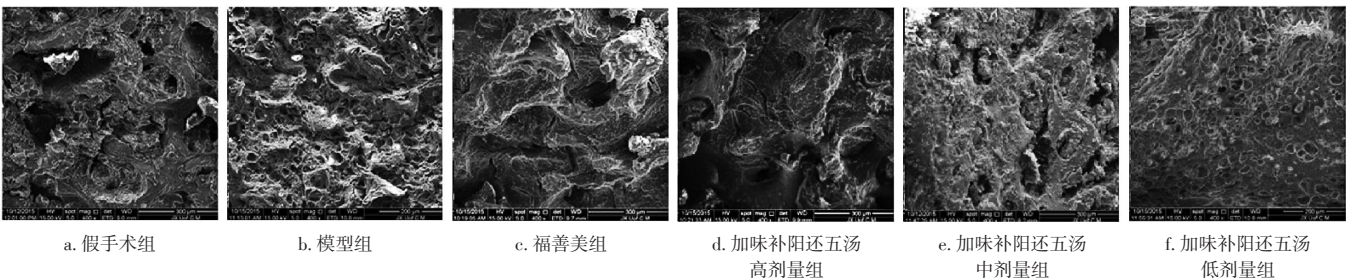
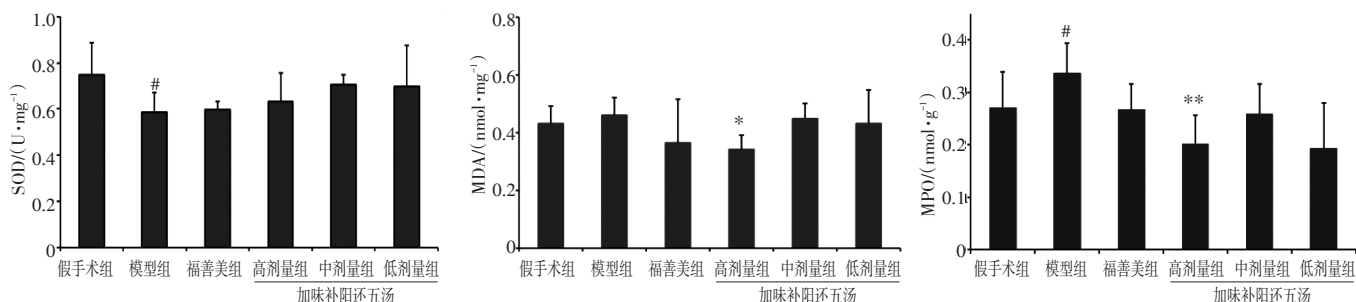


图 1 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠松质骨微结构的影响(扫描电镜， $\times 400$)

Figure 1 Effect of modified Buyang Huanwu decoction on the microstructure of cancellous bone in ovariectomized rats(SEM, $\times 400$)

2.3 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨髓内 SOD、MDA 及 MPO 含量的影响 结果见图 2。与假手术组相比,模型组大鼠骨髓内的 MPO 水平明显升高($P<0.05$),而 SOD 活力明显降低($P<0.05$),MDA 含量升高但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠骨髓内的 SOD 活力均有所

升高但差异无统计学意义($P>0.05$),加味补阳还五汤高剂量组的 MDA、MPO 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,加味补阳还五汤能够降低去卵巢大鼠骨髓中的 MDA、MPO 含量,一定程度上增强 SOD 活力,减轻氧化应激对骨组织的损伤。



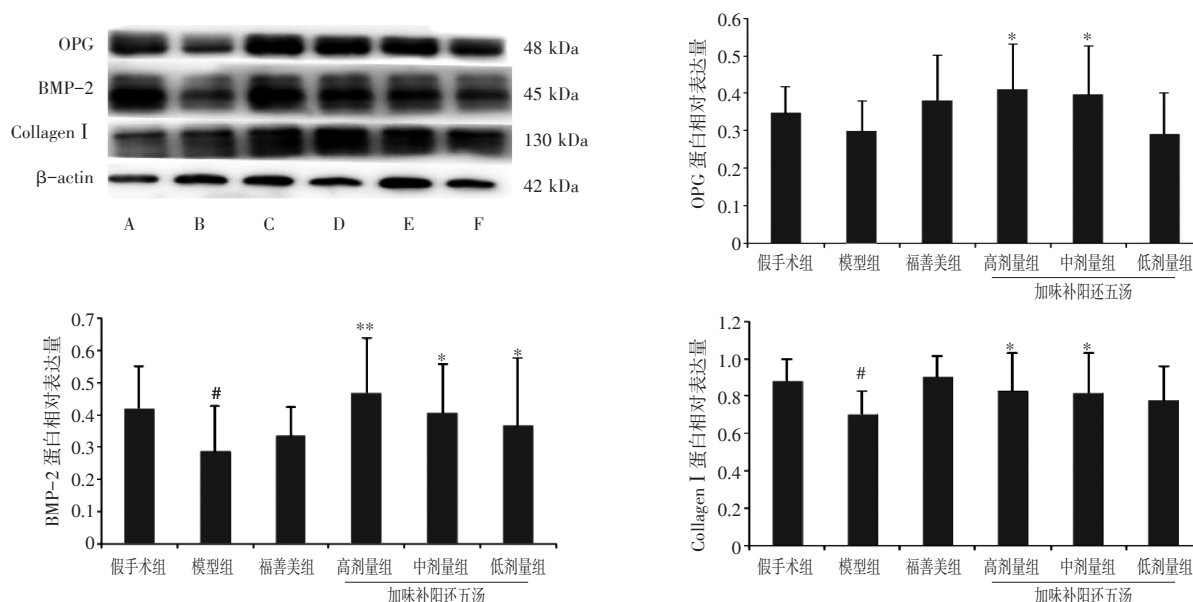
注:与假手术组比较, $^{\#}P<0.05$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$

图2 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨髓内 SOD、MDA 及 MPO 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 2 Effect of modified *Buyang Huanwu* decoction on SOD, MDA and MPO contents in bone marrow of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.4 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠胫骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白表达的影响 结果见图 3。与假手术组比较,模型组大鼠胫骨组织中 BMP-2 及 Collagen I 的蛋白表达明显下调($P<0.05$),OPG 蛋白表达有下调但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,加味补阳还五汤中、高剂量组去卵巢大鼠

胫骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 的蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,加味补阳还五汤能够通过增加骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 的表达量,从而促进骨形成,起到防治骨质疏松症的目的。

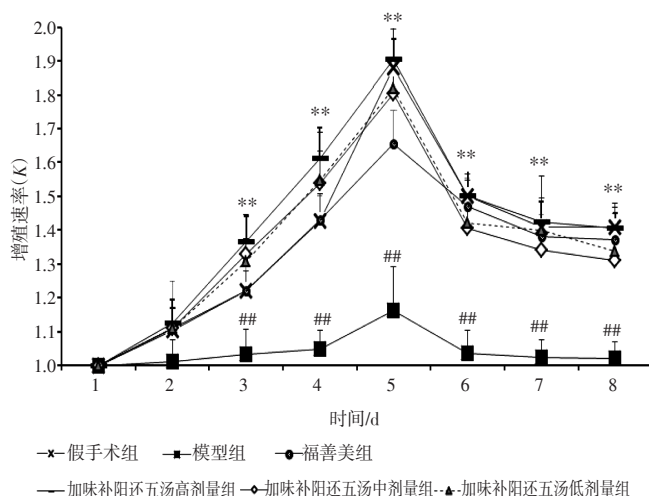


注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 福善美组; D、E、F 分别为加味补阳还五汤高、中、低剂量组。与假手术组比较, $^{\#}P<0.05$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$

图3 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠胫骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 3 Effect of modified *Buyang Huanwu* decoction on the expression of BMP-2, OPG and Collagen I protein in tibia tissue of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.5 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠 BMSCs 增殖速率曲线的影响 结果见图 4。从图中 BMSCs 生长速率曲线可以看出, 模型组的细胞增殖速率比较平缓, 而假手术组及各给药组的细胞增殖速率明显较快; 第 5 天各组 BMSCs 增殖速率 K 均达到最大值, 其后逐渐降低。与假手术组比较, 模型组第 3~8 天的 BMSCs 增殖速率均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组第 3~8 天的 BMSCs 增殖速率均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明, 加味补阳还五汤可以促进 BMSCs 的增殖分化, 从而促进成骨细胞的形成来延缓骨质疏松症的发生发展。



注: 与假手术组比较, $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$

图 4 加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 增殖速率曲线的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 4 Effect of modified Buyang Huanwu decoction on the proliferation rate curve of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) from ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

绝经后骨质疏松症的病因复杂, 主要与机体内分泌、遗传等因素有关。中医理论^[16]认为骨质疏松症的发病与肾虚和血瘀有关。补阳还五汤具有补气活血化瘀的功效, 临床上对骨质疏松症的治疗具有较好效果^[17-18]。淫羊藿和仙茅是常用补肾壮骨药, 具有促性激素分泌, 提高碱性磷酸酶活力和增强血管功能等作用^[10,12]。在补阳还五汤基础上加入适量淫羊藿和仙茅, 可能提高原方对去卵巢致骨质疏松症大鼠的治疗作用。

骨密度能反映 70% 的骨强度, 可预测骨质疏松骨折的风险, 是评价骨质疏松症及药物治疗效果的金指标, 也是间接评价骨丢失程度的指标之一^[19-21]。骨组织显微结构的破坏也是导致骨质疏松症及发生

骨折的重要病理环节^[22]。本研究结果显示, 大鼠摘除卵巢后其骨密度明显下降, 且大鼠股骨的骨小梁塌陷, 无完整结构, 有明显吸收陷窝, 证明雌性大鼠摘除卵巢后引起了骨质疏松症; 给予加味补阳还五汤后去卵巢大鼠的骨密度明显升高, 松质骨微结构得到明显改善, 骨小梁结构比较完整, 壁厚且连接性较好。表明加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨质疏松症具有一定的防治作用。

骨形成蛋白 (BMP) 是一种由成骨细胞合成分泌, 可以启动间充质干细胞 (MSCs) 的成骨过程, 具有诱导成骨细胞分化和体外成骨能力的蛋白^[23-24]。骨保护素 (OPG) 属于肿瘤坏死因子受体家族, 主要由成骨细胞系合成, 并随着细胞分化而表达增多, 起到抑制破骨细胞形成、促进破骨细胞凋亡的作用^[25-26]。I 型胶原蛋白 (Collagen I) 是骨有机基质的主要成分, 也是构成骨组织的主要纤维蛋白成分, 对维持骨的正常生理结构和功能起到重要作用^[27]。Collagen I 可高效地促进 MSCs 黏附、增殖和分化, 也是骨细胞分化成熟的标志蛋白^[28]。上述 3 种蛋白都对骨形成起着重要作用。本研究发现, 加味补阳还五汤能够通过上调骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白表达, 从而促进骨形成, 起到防治骨质疏松症的目的。

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 存在于骨髓基质中, 可分化为成骨细胞, 对骨形成起着重要作用。去卵巢大鼠的 BMSCs 增殖能力下降, 骨向分化能力减弱^[14]。有研究^[29]表明, 将体外培养的 BMSCs 注入骨髓腔内, 有助于骨质疏松骨折的愈合。本研究通过提取给药后大鼠的原代 BMSCs 进行体外培养, 通过检测细胞的增殖速率来直接观察加味补阳还五汤对大鼠体内 BMSCs 增殖的影响。结果表明, 模型组 BMSCs 的增殖能力最弱, 增殖速率平缓, 加味补阳还五汤组 BMSCs 的增长速率显著提高 ($P < 0.01$), 提示其可能通过促进 BMSCs 的增殖及骨向分化来防治骨质疏松症。

研究^[30]认为, 骨质疏松症的发病机制与体内雌激素减少后活性氧的产生密切相关。大鼠卵巢摘除后导致雌激素下降, 发生氧化应激, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力下降, 丙二醛 (MDA) 及髓过氧化物酶 (MPO) 含量上升, 促进骨质疏松发展。肾虚和血瘀也会导致体内活性氧增多, 骨髓微环境、造血组织和骨组织微结构发生改变, 诱导骨质疏松症^[31-32]。补阳还五汤是补气活血化瘀的代表药方, 能改善骨微循环, 减轻血管内皮细胞水肿, 抗氧化、抗自由基损害^[33-34]。本研究结果显示, 去卵巢大鼠骨髓中

SOD 活力明显下降, 而 MDA 及 MPO 含量升高, 与相关研究^[30]结果一致; 加味补阳还五汤能够降低去卵巢大鼠骨髓中的 MDA、MPO 含量, 一定程度上增强 SOD 活力。表明加味补阳还五汤可能通过提高去卵巢大鼠的抗氧化酶活性, 降低体内氧化应激水平, 从而改善骨髓内组织的炎性浸润情况。

综上所述, 加味补阳还五汤能够提高去卵巢大鼠的骨密度, 改善松质骨微结构, 对去卵巢大鼠骨质疏松症具有一定的防治作用, 其机制与上调骨组织中 BMP-2、OPG 及 Collagen I 蛋白表达, 促进 BMSCs 的增殖及骨向分化, 从而促进骨形成, 以及提高机体抗氧化酶活性, 降低体内氧化应激水平有关。

参考文献:

- [1] DAS A K, RAJKUMAR V. Effect of different fat level on microwave-cooking properties of goat meat patties[J]. J Food Sci Technol, 2013, 50(6): 1206-1211.
- [2] 陶柱萍, 韦桂宁, 王雪雪, 等. 卵巢摘除诱导围绝经期综合征动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 260-266.
- [3] 张萌萌. 雌激素与雌激素受体骨代谢调节作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(5): 704-708.
- [4] 邢燕, 田雪峰, 张倩楠, 等. 中医治疗骨质疏松进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 36(4): 401-404.
- [5] 李杨, 关雪峰. 中药对骨质疏松症骨代谢影响研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(5): 94-97.
- [6] 葛继荣, 郑洪新, 万小明, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1023-1028.
- [7] 任之强, 庄洪, 晋大祥. 活血化瘀法在治疗原发性骨质疏松症中的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 569-574.
- [8] 梁冬波, 黄承军, 娄宇明, 等. 补阳还五汤治疗绝经后骨质疏松症疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(8): 829-830.
- [9] 刘志轩, 杨业荣, 吴启斌. 补阳还五汤加减联合红外线照射及鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松症伴腰痛的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(21): 38-39.
- [10] 何丽君, 江金井, 陈豪, 等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(2): 17-20.
- [11] 张威, 郑洪新. 补肾健骨中药防治骨质疏松机制研究概况[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(11): 74-77.
- [12] 张梦柳. 补肾壮骨类中药多糖的抗骨质疏松作用及促进骨形成机制的初步探讨[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [13] 刘波, 陈明, 李姗姗, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 129-132.
- [14] 吴琪, 刘波, 陈志, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及骨向分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(25): 3963-3968.
- [15] 周年, 刘波, 徐彭. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和分化能力鉴定[J]. 江西中医药, 2018, 49(5): 34-36, 52.
- [16] 周君鹏. 补肾活血方治疗老年骨质疏松性桡骨远端骨折临床研究[J]. 新中医, 2019, 51(12): 169-171.
- [17] 皇甫沁媛, 耿艳, 范利锋, 等. 温针灸结合补阳还五汤治疗骨质疏松性椎体压缩骨折经皮椎体后凸成形术后残留痛疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(25): 2819-2822.
- [18] 周黎明. 补阳还五汤治疗骨折后-骨质疏松性疼痛54例报告[J]. 浙江临床医学, 2000, 2(7): 480-481.
- [19] MILLER P D. Management of severe osteoporosis[J]. Expert Opin Pharmacol, 2016, 17(4): 473-488.
- [20] ZHANG N D, HAN T, HUANG B K, et al. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: implication for antiosteoporotic drug discovery[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 61-80.
- [21] WANG T, LIU Q, TJHIOE W, et al. Therapeutic potential and outlook of alternative medicine for osteoporosis[J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(9): 1051-1068.
- [22] 刘飞祥, 林子璇, 徐道明, 等. 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 16-23.
- [23] PATRICIA G G, RICARTO R, ELISABET S M, et al. PLGA-BMP-2 and PLA-17 β -estradiol microspheres reinforcing a composite hydrogel for bone regeneration in osteoporosis[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(12): 648.
- [24] ELISABET S M, PATRICIA G G, RICARTO R, et al. Bone regeneration in osteoporosis by delivery BMP-2 and PRGF from tetrionic-alginate composite thermogel[J]. Int J Pharm, 2018, 543(1-2): 160-168.
- [25] WU F, ZHOU D, SHEN G, et al. Association of VDR and OPG gene polymorphism with osteoporosis risk in Chinese postmenopausal women[J]. Climacteric, 2019, 22(2): 208-212.
- [26] WANG P, CAO Y, ZHAN D, et al. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(13): 1480-1485.
- [27] 孙晓丽, 李丽娟, 苏海峰, 等. 壮骨伸筋胶囊对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗及其作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 113-117.
- [28] EASTELLI R, SZULC P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis[J]. Lancet Diabetes Endo, 2017, 5(11): 908-923.
- [29] JAFARI A, QANIE D, ANDERSEN T L, et al. Legumain regulates differentiation fate of human bone marrow stromal cells and is altered in postmenopausal osteoporosis[J]. Stem Cell Rev, 2017, 8(2): 373-386.
- [30] ZHOU Q Z, ZHU L, ZHANG D F, et al. Oxidative stress-related biomarkers in postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analyses[J]. Dis Markers, 2016, 2016: e7067984.
- [31] 何升华, 任之强, 王建, 等. 从血瘀对骨代谢的影响探讨血瘀在女性原发性骨质疏松症发病中的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 69-73+96.
- [32] 王磊. 温肾壮骨汤治疗肾虚血瘀型骨质疏松症疗效及对骨代谢指标的影响[J]. 浙江中医杂志, 2021, 56(3): 166-167.
- [33] 韦珊瑶, 张永全, 张艺, 等. 补阳还五汤研究进展[J]. 大众科技, 2019, 21(7): 50-53.
- [34] 李文彬, 王宇红, 谭琥, 等. 补阳还五汤药理学研究概况[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(5): 93-96.

(编辑: 邹元平)