

43(4): 179-184.

[28] Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2010, 20(2): 87-103.

[29] Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(11): 571-577.

[30] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.

[31] Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation[J]. *Brain Res Rev*, 2008, 60(1): 57-64.

[32] Sharma J N, Alomran A, Parvathy S S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases [J]. *Inflammopharmacology*, 2007, 15(6): 252-259.

[33] Gonon A T, Erbas D, Bröijersén A, *et al.* Nitric oxide mediates protective effect of endothelin receptor antagonism during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 286(5): H1767-H1774.

[34] Hubbard A K, Giardina C. Regulation of ICAM-1 expression in mouse macrophages[J]. *Inflammation*, 2000, 24(2): 115-125.

[35] Xu J, Zhao Y, Aisa H A. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 2095-2101.

[36] Berkoz M. Diosmin suppresses the proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages *via* NF- κ B and MAPKs signal pathways[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38(4): 315-324.

[37] Chiang H M, Chiu H H, Liao S T, *et al.* Isoflavonoid-Rich *Flemingia macrophylla* extract attenuates UVB-induced skin damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MAP kinase and MMP expression[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 696879.

[38] Hsieh P C, Ho Y L, Huang G J, *et al.* Hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Flemingia macrophylla* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(2): 349-365.

[39] 何思蓉, 余黄合, 杨 珍, 等. 穿心莲内酯调控 HaCaT 细胞中 Nrf2/ARE 通路的抗氧化作用机制研究[J]. *中国药学杂志*, 2019, 54(10): 777-782.

骨宝丸对维甲酸诱导的骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路的影响

区作明^{1,2}, 刘效仿¹, 李 雪¹, 陈 茹³, 邓向亮^{4*}, 张念军^{1*}
(1. 广州中医药大学附属佛山市中医院骨科, 广东 佛山 528000; 2. 佛山市高明区中医院骨科, 广东 佛山 528500; 3. 南方医科大学顺德医院中医科, 广东 佛山 528300; 4. 广东药科大学中医学院及附属第二医院, 广东 云浮 527300)

摘要: **目的** 考察骨宝丸对维甲酸诱导的骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路的影响。**方法** BALB/c 小鼠灌胃给予维甲酸 30 d 建立骨质疏松模型, 灌胃给予骨宝丸 1.5、3、6 g/kg, 另设立正常组和模型组。HE 染色观察股骨头病理结构变化, 三点弯曲实验检测股骨最大值载荷和最大值弯曲应力, ELISA、免疫组化法分别检测 OPG、RANKL 在外周血和骨组织的表达。**结果** 骨宝丸各剂量对维甲酸致小鼠股骨头组织结构改变、最大值弯曲应力和最大值载荷的减少均有拮抗作用。与正常组比较, 模型组小鼠血清和骨组织 RANKL 分泌升高 ($P<0.05$), 骨组织 OPG 表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 骨补丸各剂量组小鼠血清和骨组织 RANKL 分泌降低 ($P<0.05$), 骨组织 OPG 水平升高 ($P<0.05$)。**结论** 骨宝丸对维甲酸诱导的骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路有调节作用, 可能是其防治骨质疏松的作用机制。

关键词: 骨宝丸; 骨质疏松; 维甲酸; RANKL; OPG

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)11-3158-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.043

收稿日期: 2020-03-18
基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81601911); 佛山市医学科研项目 (20190388); 广东药科大学“创新强校工程”项目 (2018KTSCX104)
作者简介: 区作明 (1983—), 男, 博士生, 主治医师, 从事骨与关节损伤及骨质疏松症的治疗和研究。Tel: 18928522133, E-mail: ouzuoming@ qq.com
* 通信作者: 邓向亮 (1985—), 男, 讲师, 从事中药药理研究。E-mail: dxl@ gdpu.edu.cn
张念军 (1986—), 男, 主治医师, 从事骨与关节损伤及骨质疏松症的防治研究。E-mail: znjszy@ 126.com

骨宝丸由熟地、仙茅、山萸肉等十多种中药组成，具有补肝肾、强筋骨、健脾胃、益气血的功效，是佛山市中医院的院内制剂^[1]。三十余年临床应用结果表明骨宝丸对骨质疏松、骨折愈合迟缓、股骨头无菌性坏死及肝肾亏损诸症，均有较为理想的临床疗效^[1-4]。骨质疏松症（osteoporosis, OP）是一种骨骼系统疾病，常见于中老年人，特别是绝经后女性，随着我国人口老龄化到来，预测我国骨质疏松患者约占世界 50%^[5-6]。骨质疏松形成的机制之一是骨吸收与骨形成之间的动态失衡，导致骨吸收大于骨形成，破坏了两者的共同维持的骨质及骨量的平衡。OPG/RANKL/RANK 系统在骨吸收和骨形成的偶联中起着关键性的作用，其中核因子 κ B 受体活化因子（receptor activator for nuclear factor- κ B, RANK）与其配体 RANKL（receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL）结合具有促进破骨细胞分化及骨吸收的形成的作用；而骨保护素（osteoprotegerin, OPG）则与 RANK 竞争性结合 RANKL，从而抑制破骨细胞的分化和成熟，诱导破骨细胞凋亡^[7-8]。骨宝丸治疗骨质疏松疗效显著，但是其相关作用机制尚未完全清楚，本研究考察骨宝丸对骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路的影响，从骨宝丸干预骨吸收的角度探讨其潜在的作用机制，为其在临床上进一步的推广和使用提供科学依据。

1 材料与方法

- 1.1 动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 30 只，体质量（20±2）g，由广东省医学实验动物中心提供，实验动物生产许可证号为 SCXK（粤）2013-0002，饲养于 SPF 级动物实验室。
- 1.2 药物 骨宝丸（粤药制字 Z20060052）由淫羊藿、龟板胶、鹿角胶、熟地、当归、淮山药、山茱萸肉、杜仲、川芎、黄芪、仙茅、红参组成，上述药材经清洗、烘干、粉碎后制备成糊丸（小丸），小袋密封保存，每袋 6 g。TLC 检测黄芪、熟地黄、当归、川芎有效成分时，可作为该制剂质量控制标准^[9]。
- 1.3 试剂与仪器 维甲酸（大连美仑生物科技有限公司）；免疫组化二抗试剂盒（美国 Cell Signaling Technology 公司）；兔来源的 OPG 和 RANKL 一抗、OPG ELISA Kit

（北京博奥森生物技术有限公司）；RANKL ELISA Kit（武汉华美生物工程有限公司）。L535R 型台式冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；Multiskan FC 酶标仪（美国 Thermo 公司）；BX53 型倒置光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.4 分组、造模与给药 小鼠随机分为正常组、模型组及骨宝丸高剂量组（6 g/kg）、中剂量组（3 g/kg）、低剂量组（1.5 g/kg），每组 6 只。除正常组外，其余小鼠灌胃给予维甲酸（100 mg/kg），每天 1 次，连续 30 d；骨宝丸各剂量组小鼠灌胃给予相应药液（骨宝丸研磨成粉状，加入水制成混悬液，剂量 0.2 mL/10 g），每天 1 次，连续 30 d，按成人剂量的 10 倍剂量作为给药中剂量（即 3 g/kg），同法得到高剂量（6 g/kg）、低剂量（1.5 g/kg）。

1.5 HE 染色 将小鼠股骨置于 10% 中性甲醛溶液中固定 48 h，脱钙液脱钙，制作股骨头横切面的石蜡切片，进行 HE 染色。

1.6 股骨生物力学检测 将小鼠左侧股骨用 10% 中性甲醛溶液固定，委托广州元合生物科技有限公司进行三点弯曲实验，检测最大值载荷和最大值弯曲应力。

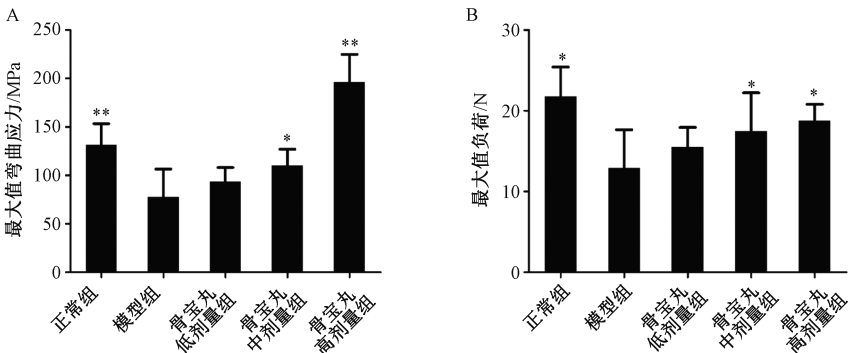
1.7 酶联免疫吸附实验 取小鼠外周血，离心分离血清，按照 ELISA 试剂盒方法检测血清中 OPG、RANKL 水平。

1.8 免疫组化 按“1.5”项下方法处理小鼠股骨后制作石蜡切片，采用免疫组化法检测骨组织 OPG、RANKL 分泌。为排除免疫组化的非特异性染色，设置阴性对照组，即采用磷酸盐缓冲液代替一抗溶液与该组织孵育，其余操作同各实验组。

1.9 统计学分析 采用 Graphpad 软件作图，并以其自带的统计功能进行统计学处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）形式表示，组间比较采用方差分析（Dunnett 法）。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠股骨生物力学的影响 与正常组比较，模型组小鼠最大值弯曲应力（图 1A）、最大值载荷（图 1B）均降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）；与模型组比较，骨宝丸各剂量组小鼠最大值弯曲应力、最大值载荷均有不同程度升高，以中、高剂量更明显（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 骨宝丸对小鼠股骨生物力学的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

2.2 对小鼠股骨头组织结构的影响 如图 2 所示, 模型组小鼠股骨头体积缩小, 骨髓腔明显小于正常组, 骨髓内容物减少, 这与肉眼观察到的股骨头变小、股骨体色泽枯白的情况一致; 与模型组比较, 肉眼观察到骨宝丸各剂量组

小鼠股骨头粗壮, 其中高剂量组与正常组无显著差异, 股骨体显现隐隐的红润光泽, 而在显微镜下观察骨宝丸各剂量组小鼠骨髓腔大于模型组, 骨髓内容物增加。

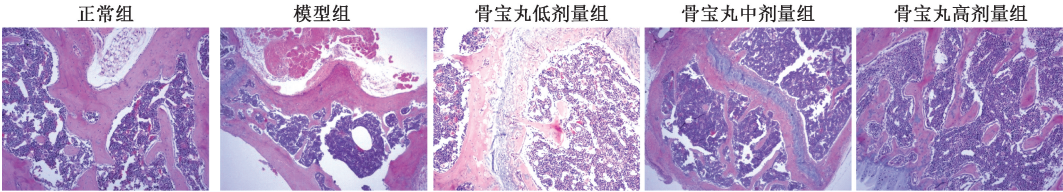
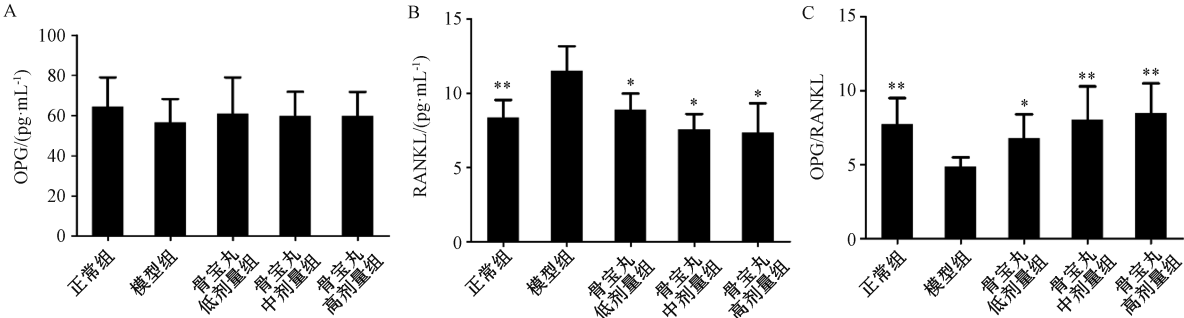


图 2 小鼠股骨头 HE 染色 (×100)

2.3 对小鼠血清 OPG、RANKL 分泌的影响 如图 3A~3C 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 OPG 水平较正常组有降低的趋势, RANKL 水平升高 ($P<0.01$), 模型组小鼠 OPG/RANKL 比值降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 骨

宝丸各剂量组小鼠血清 RANKL 水平降低 ($P<0.05$), 而 OPG 水平较模型组有升高的趋势, 骨宝丸各剂量组小鼠 OPG/RANKL 比值升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

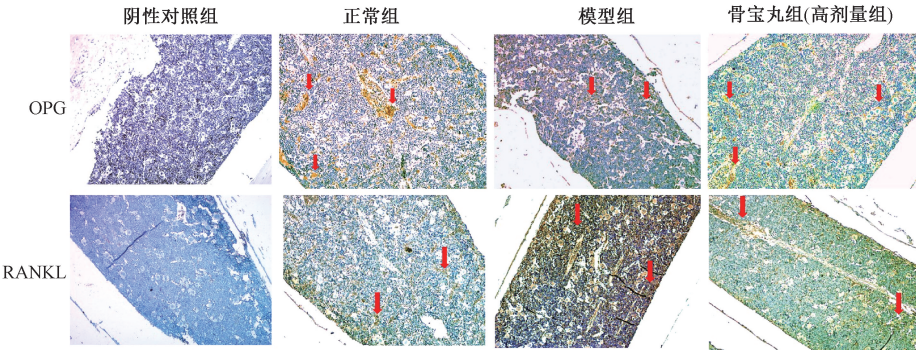


注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 骨宝丸对小鼠血清 OPG、RANKL 分泌的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

2.4 对小鼠股骨组织 OPG、RANKL 分泌的影响 如图 4 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠股骨组织 OPG 分泌减

少, RANKL 分泌增加; 与模型组比较, 骨宝丸高剂量组小鼠股骨组织 OPG 分泌增加, RANKL 分泌减少。



注: 红色箭头所指灰棕色处为组织分泌的 OPG 或 RANKL。

图 4 骨宝丸对小鼠股骨组织 OPG、RANKL 分泌的影响 (×100)

3 讨论

本研究结果表明骨宝丸可以拮抗维甲酸诱导的小鼠股骨最大值弯曲应力和最大值载荷减少以及骨髓组织微结构的改变, 并且对小鼠血清和骨组织 OPG/RANKL 有调节作用。

骨质疏松的动物模型有多种造模方法, 其中维甲酸造模具有简便、成功率高、动物无死亡等优势, 因此本研究

参考文献 [8] 选用维甲酸诱导小鼠制备骨质疏松模型。骨质疏松会导致机体骨生物力学发生显著改变, 例如骨的最大值弯曲应力和最大值载荷降低, 这也是骨质疏松患者容易出现骨折的重要原因。本研究发现骨宝丸显著拮抗维甲酸诱导小鼠股骨的最大值弯曲应力和最大值载荷的降低, 提示骨宝丸对小鼠骨质疏松有显著防治作用。结果与文献 [8] 报道骨宝丸显著增加去除卵巢的骨质疏松大鼠胫骨的

抗弯程度和弹性模量、刚性系数、韧性系数相一致。中医理论认为“肾主骨生髓”，类似的补肾益精中药阿胶补肾健骨方对去势骨质疏松症大鼠骨密度、最大载荷和最大值弯曲应力均有提高^[10]，这提示骨宝丸治疗骨质疏松与其“补肾”功能密切相关，而本研究的 HE 染色结果还显示骨宝丸可以显著增加骨质疏松小鼠骨髓内容物，该结果为上述观点提供了支持。

为了进一步探讨骨宝丸防治骨质疏松的作用机制，考察了骨宝丸对维甲酸诱导骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 的影响。结果显示，维甲酸诱导的骨质疏松小鼠血清和骨组织 RANKL 分泌水平升高，而 OPG 在骨组织分泌水平降低、在血清中有下降的趋势；同时 OPG/RANKL 的比值降低。骨宝丸干预可以明显改善小鼠上述指标的变化，即对维甲酸诱导的骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路有显著调节作用。骨骼是一个高重建的器官，具有持续重塑周期，其中骨形成和骨吸收这组偶联处于动态更新、共同维持骨质及骨量的平衡。研究表明 OPG 基因剔除的小鼠表现为破骨细胞分化活跃和骨吸收增强，出现严重骨质疏松^[11-13]；RANKL 可促进破骨细胞分化，增强成熟破骨细胞的活力，阻止破骨细胞凋亡，是破骨细胞分化的关键刺激因子，而 RANK 在破骨前体细胞或成熟破骨细胞表面高度表达，是目前发现的 RANKL 的唯一靶受体^[14-15]。体内骨量的改变和体外破骨细胞的形成取决于 RANKL 与 OPG 的比值，即骨形成还是骨吸收，若 OPG 基因表达高于 RANKL，则破骨细胞形成受抑制；相反，若 OPG 基因表达低于 RANKL，则破骨细胞形成活跃^[7]。因此，本实验结果提示，骨宝丸防治骨质疏松的机制可能与其调节 OPG/RANKL 通路进而抑制过强的骨吸收相关。

综合上述，本研究结果表明骨宝丸对维甲酸诱导的骨质疏松小鼠 OPG/RANKL 通路有调节作用，这可能是其防治骨质疏松的作用机制之一。

参考文献：

[1] 杨海韵, 陈逊文, 陈志维. “骨宝丸”促进骨折愈合作用的临床疗效观察与实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 1996, 2(3): 203-205.

[2] 刁伟霞, 余俊文, 李 婷, 等. 骨宝口服液治疗绝经后骨

质疏松症 42 例[J]. 河南中医, 2014, 34(10): 1943-1944.

[3] 黎清斌, 张兆华, 潘海文, 等. 骨宝丸对肝肾不足型膝关节骨性关节炎的疗效观察[J]. 陕西中医, 2016, 37(9): 1198-1199.

[4] 招丽娟, 江 湧, 黎慧萍, 等. 鲑鱼降钙素联合骨宝丸治疗绝经后骨质疏松症的临床观察[J]. 海峡药学, 2015, 27(1): 127-129.

[5] 刘 峰. 骨质疏松流行病学及防治研究进展[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(22): 3321-3322.

[6] Lin X, Xiong D, Peng Y Q, *et al.* Epidemiology and management of osteoporosis in the People’s Republic of China: current perspectives[J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 25(10): 1017-1033.

[7] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(12): 5050-5055.

[8] 关力昕. 骨宝丸对去卵巢骨质疏松大鼠胫骨生物力学的影响[J]. 中医临床研究, 2014, 6(10): 25-26.

[9] 梁秀清. 骨宝丸质量标准研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(4): 154-155.

[10] 贾玉民, 向 楠. 阿胶补肾健骨方治疗去卵巢大鼠骨质疏松症的作用机制研究[J]. 中医药导报, 2013, 19(9): 66-69.

[11] Simonent W S, Laeey D L, Dunstan C R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.

[12] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1329-1337.

[13] Kearns A E, Khosla S, Kostenuik P J. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(2): 155-192.

[14] Teiji W D, Tomoki N, Nishina H, *et al.* RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. *Trends Mol Med*, 2005, 12(1): 17-25.

[15] Liu C Z, Walter T S, Huang P, *et al.* Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling[J]. *J Immunol*, 2010, 184(12): 6910-6919.