

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.002

芪苈通络胶囊对小鼠骨质疏松的改善作用及机制研究*

王鹏程¹, 唐 渊^{2△}

(1. 广东省珠海市口腔医院, 广东 珠海 519000; 2. 中国人民解放军陆军军医大学药学院, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨芪苈通络胶囊对维甲酸导致小鼠骨质疏松的改善作用及作用机制。方法 按随机数字表法将48只昆明小鼠分为6组, 每组8只。除对照组[A组, 给予等体积0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)]外, 其余各组小鼠均于每天7:00给予维甲酸105 mg/kg, 持续14 d造模。造模成功后, 每天9:00继续给予上述剂量维甲酸, 18:00仙灵骨葆组(C组)小鼠灌胃给予仙灵骨葆胶囊1.5 g/kg, 芪苈通络胶囊高、中、低剂量组(D₁, D₂, D₃组)给予按生药量计为1.8, 0.9, 0.45 g/kg的治疗, A组和模型组(B组)小鼠均给予等体积的0.5% CMC-Na。称取小鼠初始体质量和末期体质量, 称取胸腺、肝、脾质量, 计算脏器指数; 测量小鼠股骨湿重、干重、长度和直径; 采用试剂盒检测血清钙、血清磷浓度; 应用Quantum FX型小动物CT检测股骨密度; 计算免疫组化检测股骨中OPG/RANKL蛋白比值的变化。结果 与A组相比, B组小鼠体质量、股骨湿重、股骨干重、血清钙含量、骨密度均显著降低($P < 0.05$), 血清磷含量显著升高($P < 0.05$); 与B组相比, 各给药组小鼠体质量有升高趋势, C组和D₁组小鼠股骨湿重、干重、血清钙含量和骨密度显著升高($P < 0.05$), C组和D₂, D₃组小鼠血清磷含量显著降低($P < 0.05$); 免疫组化结果显示, B组小鼠OPG/RANKL蛋白比值显著降低($P < 0.05$), C组和D₁组, D₂组, D₃组小鼠OPG/RANKL蛋白比值显著升高($P < 0.05$)。结论 芪苈通络胶囊对维甲酸导致的小鼠骨质疏松有改善作用, 其作用机制可能与升高OPG/RANKL蛋白表达比值有关。

关键词: 芪苈通络胶囊; 维甲酸; 骨质疏松; OPG/RANKL蛋白比值; 小鼠

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)21-0005-04

Effect and Mechanism of Qixiong Tongluo Capsules on Osteoporosis in Mice

WANG Pengcheng¹, TANG Yuan²

(1. Zhuhai Stomatological Hospital, Zhuhai, Guangdong, China 519000; 2. College of Pharmacy, Army Medical University, Chongqing, China 400038)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Qixiong Tongluo Capsules on osteoporosis induced by retinoic acid in mice. **Methods** According to the random number table method, 48 Kunming mice were divided into 6 groups with 8 mice in each group. In addition to group A [given equal volume of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na)], mice in the other groups were continuously given 105 mg/kg retinoic acid at 7:00 every day for 14 d. After successful modeling, all mice were given 105 mg/kg retinoic acid at 9:00 every day. At 18:00 every day, the mice in Xianlinggubao group (group C) were given 1.5 g/kg Xianlinggubao Capsules by gavage, the high-, medium- and low-dose groups of Qixiong Tongluo Capsules (group D₁, D₂, D₃) were given Qixiong Tongluo Capsules (1.8, 0.9, 0.45 g/kg according to the crude drug dose), the mice in the control group (group A) and the model group (group B) were given equal volume of 0.5% CMC-Na. The initial and final body weight of mice, the thymus, liver and spleen were weighed and the organ index was calculated. The wet weight, dry weight, length and diameter of femur were measured. The concentrations of calcium and phosphorus in serum were measured by kits. The bone mineral density (BMD) of femur was determined by Quantum FX CT. The ratio of OPG/RANKL protein in femur was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with group A, the body weight, wet weight, and dry weight of femur, the serum calcium content and BMD in group B were significantly decreased ($P < 0.05$), and the content of serum phosphorus in group B was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group B, the body weight of mice in each treatment group was increased, the wet weight and dry weight of femur, the serum calcium content and BMD of mice in group C and group D₁ were significantly increased ($P < 0.05$), and the content of serum phosphorus in group C, group D₂ and group D₃ was significantly decreased ($P < 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that the ratio of OPG/RANKL protein in group B was significantly decreased ($P < 0.05$), while the ratios of OPG/RANKL protein in group C, group D₁, group D₂ and group D₃ were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Qixiong tongluo Capsules can improve osteoporosis induced by retinoic acid in mice, and its mechanism of action may be related to the increase of the ratio of OPG/RANKL protein expression.

Key words: Qixiong tongluo Capsules; retinoic acid; osteoporosis; ratio of OPG/RANKL protein; mice

骨质疏松症(OP)是一种以骨体积减少、骨小梁退化、骨力学性能下降和骨折易感性为特征的全身性疾病^[1]。目前, 临床治疗OP的药物有雌激素类药物、钙剂、维生素D、磷酸盐、氟化物等, 均有副作用, 限制了临床

*基金项目: 2018年度国家科技重大专项[2018ZX09J18109]。

第一作者: 王鹏程, 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向为普通外科学, (电子信箱)593729593@qq.com。

△通信作者: 唐渊, 男, 博士研究生, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学与中药药理学, (电子信箱)tangyuanty99@sina.com。

的使用^[12-41]。中医认为,OP是由肝血虚和肾气虚导致的并发症^[15-61],故补肾补血是中医治疗OP的主要方法。芪芎通络胶囊有益气活血、化痰通络功效,主要用于治疗气虚血瘀痰阻证,症见半身不遂、口舌歪斜、言语蹇涩或不语、偏身麻木、眩晕等,同时具有改善OP的作用。骨保护素(OPG)存在于骨组织中,其表达水平降低,可减少骨组织形成,引起严重的OP。核因子 κ B受体激活剂配体(RANKL)促进破骨细胞前体细胞增殖、分化成破骨细胞,并增强其骨吸收活性;阻断RANK基因表达,则可抑制破骨细胞活性,改善OP的形成^[17]。口服维甲酸可促进破骨细胞形成,使得骨吸收大于骨形成,形成维甲酸性OP,其是动物实验中常用的OP模型^[18-91]。本研究中采用维甲酸灌胃方式制备小鼠OP模型,研究芪芎通络胶囊对维甲酸导致小鼠OP的改善作用及作用机制,为临床治疗OP提供实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:TI-U型正置显微镜(尼康映象仪器销售<中国>有限公司);Micro CT(上海徕卡仪器有限公司);680型酶标仪(伯乐生命医学产品<上海>有限公司);S7220-B型组织切片机(沈阳恒松科技有限公司);5810R型离心机(艾本德中国有限公司);CP225D型电子天平(德国赛多利斯集团,精度为0.01 mg)。

试剂:维甲酸(上海生工生物有限公司,批号为A506728);仙灵骨葆胶囊(国药集团同济堂制药有限公司,批号为A14001226041);芪芎通络胶囊(吉林万通药业股份有限公司,批号为14000219623);血清钙检测试剂盒(批号为C004-3-1),血清磷检测试剂盒(批号为C006-1-1),均购自南京建成生物工程研究所;OPG抗体(北京博奥森生物技术公司,批号为bs-20624R);RANKL抗体(Cell Signaling Technology,批号为3959)。

动物:清洁级雌性昆明小鼠,9周龄,购自中国人民解放军陆军军医大学实验动物中心(动物使用合格证号为1103221911003384)。饲养条件为温度 $(24 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%~65%,光照12h黑暗12h,适应性饲养3d后开展实验,期间小鼠自由进食和饮水。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药

将48只小鼠随机分为对照组(A组)、模型组(B组)、仙灵骨葆组(C组)和芪芎通络胶囊高、中、低剂量组(D₁组,D₂组,D₃组),每组8只。由于中药粉末和维甲酸不易溶于水,采用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配置成混悬液。除A组外,各组小鼠于每天9:00给予105 mg/kg维甲酸灌胃,14d后用Quantum FX型小动物CT测定小鼠骨密度,确定造模是否成功。A组每天9:00

继续给予上述剂量维甲酸,C组18:00灌胃给予仙灵骨葆胶囊1.5 g/kg,D₁组,D₂组,D₃组分别给予芪芎通络胶囊高、中、低剂量(按生药量计为1.8,0.9,0.45 g/kg)治疗,A组和B组小鼠给予等体积的0.5% CMC-Na,持续14d。实验开始时和结束时,称定动物的体质量。

1.2.2 股骨计量学指标

取左侧股骨,去除附着的软组织,测定股骨计量学指标。股骨湿重和干重:用电子天平称量股骨湿重和干重(mg);股骨长度:用游标卡尺测量股骨长度(mm);股骨直径:分别于股骨的近端1/3点、中点、远端1/3点,用游标卡尺量取最大外径及最小外径,取6个值的平均值,得股骨直径(mm)。

1.2.3 血清钙、磷分析和脏器指数

实验结束时摘眼球取血,以1 000 g离心15 min,分离血清,按试剂盒说明书操作,检测血清钙、血清磷的含量。取血完成后处死小鼠,取肝、脾、胸腺,并称定质量,计算脏器指数。脏器指数(mg/g)=脏器质量(mg)/体质量(g)。

1.2.4 骨密度分析

取小鼠股骨,用4%多聚甲醛固定,运用Micro CT扫描股骨,采用Materialise软件计算骨密度。

1.2.5 免疫组化分析

取左侧股骨,用4%多聚甲醛固定,制备石蜡切片,进行免疫组化实验,以DAB显色呈棕黄色为阳性,采用image J软件进行灰度值分析。

1.3 统计学处理

采用GraphPadPrism 7软件分析。数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量和脏器指数

实验末期,与A组相比,B组动物体质量、胸腺指数和肝脏指数均显著降低($P < 0.05$)。与B组相比,C组、D₁组、D₂组、D₃组的实验末期体质量和肝脏指数均呈升高趋势,且C组和D₁组胸腺指数显著升高($P < 0.05$),C组和D₁组的脾脏指数呈下降趋势。详见表1。

2.2 股骨指标

与A组相比,B组小鼠股骨湿重和股骨干重均显著降低($P < 0.05$),股骨长度和股骨直径呈降低趋势。与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组股骨湿重和干重显著增加($P < 0.05$),股骨长度和股骨直径有增加趋势。详见表2。

2.3 血清钙、磷分析

与A组相比,B组小鼠血清钙含量显著降低($P < 0.05$),血清磷含量显著升高($P < 0.05$)。与B组相比,C组血

表1 各组小鼠体质量和脏器指数比较($\bar{X} \pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	实验初体质量(g)	实验末体质量(g)	胸腺指数(mg/g)	肝脏指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)
A组		26.7±1.6	31±1.9	0.72±0.09	59.56±3.08	4.40±0.76
B组		27.3±1.8	21.1±2.4 [#]	0.58±0.11 [#]	53.13±5.90 [#]	5.44±0.54
C组	1.5	26.8±1.8	23.7±1.2	0.73±0.12 [*]	61.59±6.41	4.69±1.05
D ₁ 组	1.8	26.4±0.9	23.71±1.7	0.80±0.12 [*]	57.36±2.58	4.99±1.12
D ₂ 组	0.9	27.3±1.5	24.1±1.2	0.53±0.11	55.22±4.04	5.94±0.60
D ₃ 组	0.45	27.7±1.5	23.1±1.1	0.58±0.16	55.65±5.90	5.55±1.31

注:与A组比较,[#] $P<0.05$;与B组比较,^{*} $P<0.05$ 。表2、表3和图1同。

表2 各组小鼠股骨指标比较($\bar{X} \pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	股骨湿重(mg)	股骨干重(mg)	股骨长度(mm)	股骨直径(mm)
A组		55.56±0.81	35.58±0.53	13.34±0.34	1.78±0.08
B组		47.67±1.09 [#]	28.59±0.99 [#]	12.96±0.19	1.51±0.18
C组	1.5	55.33±0.48 [*]	33.57±0.30 [*]	13.45±0.52	1.77±0.09
D ₁ 组	1.8	54.97±0.45 [*]	33.00±0.30 [*]	13.15±0.24	1.79±0.10
D ₂ 组	0.9	54.03±0.64 [*]	33.54±0.42 [*]	12.99±0.99	1.80±0.09
D ₃ 组	0.45	53.88±0.57 [*]	33.69±1.16 [*]	13.10±0.42	1.64±0.08

血清钙含量显著升高($P<0.05$),血清磷含量显著下降($P<0.05$);D₁组血清钙含量显著升高($P<0.05$),D₁组、D₂组、D₃组血清磷含量显著降低($P<0.05$)。详见表3。

表3 各组小鼠血清钙、血清磷含量比较($\bar{X} \pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	血清钙(mmol/L)	血清磷(mmol/L)
A组		1.25±0.04	1.47±0.02
B组		0.86±0.05 [#]	2.03±0.07 [#]
C组	1.5	1.32±0.05 [*]	1.62±0.04 [*]
D ₁ 组	1.8	1.59±0.07 [*]	1.63±0.11 [*]
D ₂ 组	0.9	1.16±0.03	1.64±0.03 [*]
D ₃ 组	0.45	1.17±0.01	1.92±0.11

2.4 骨密度

与A组相比,B组小鼠的骨密度显著降低($P<0.05$);

与B组相比,C组和D₁组骨密度显著升高($P<0.05$)。D₂组和D₃组骨密度呈升高趋势。详见图1。

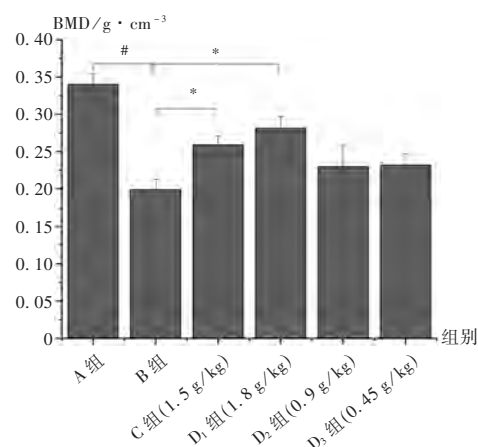
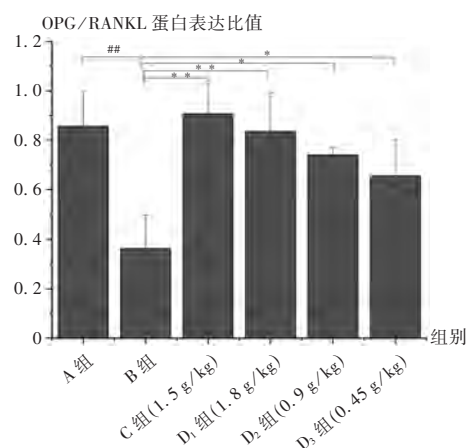


图1 小鼠骨密度检测

2.5 对骨组织中 OPG/RANKL 蛋白表达比值的影响

OPG/RANKL 蛋白的表达比值改变是影响骨质疏松症的重要作用机制之一。OPG 主要表达在破骨细胞的细胞膜、细胞质或细胞核上,RANKL 主要表达在细胞



注:与A组比较,^{##} $P<0.01$;与B组比值,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图2 骨组织中 OPG/RANKL 蛋白表达比值

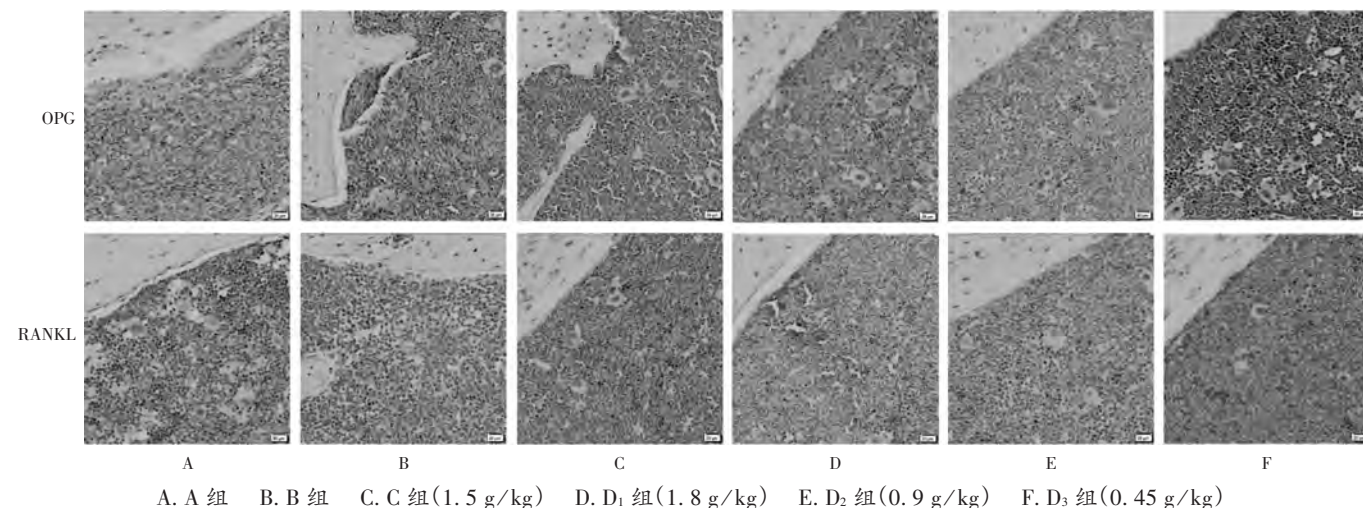


图3 骨组织中 OPG 和 RANKL 蛋白表达情况

膜表面,免疫组化检测以DAB显色呈棕黄色。与A组相比,B组小鼠股骨中OPG/RANKL蛋白的表达比值显著下降($P < 0.05$);与B组相比,C组、D₁组、D₂组、D₃组股骨中OPG/RANKL蛋白的表达比值显著升高($P < 0.05$)。详见图2和图3。

3 讨论

OP常发生在老年人群中,其主要特征为骨骼强度降低,导致骨折复发率增加^[9]。研究发现,地黄、淫羊藿、黄芪、丹参、知母、补骨脂、吴茱萸等中药不仅单味使用具有抗绝经期OP的作用,配伍使用也有一定疗效^[10-11]。维甲酸可损伤性腺功能,减少雌激素分泌,使破骨细胞数量增加,骨吸收增加,骨量丢失,造成骨密度下降,可用于制备典型的动物OP模型^[12]。本研究结果显示,维甲酸造模后小鼠的体质量、骨密度及血清钙含量均显著下降,血清磷含量升高,OPG/RANKL蛋白表达比值明显下降。D₁组、D₂组、D₃组,尤其D₁组对模型小鼠OP相关指标具有明显改善作用,可发挥抗OP作用。

OPG和RANKL信号通路是破骨细胞的重要调控通路,其表达比例是影响骨吸收的重要因素。骨组织中OPG的过度表达可增加破骨细胞的生成量,减少骨组织形成,引起OP^[13]。RANKL与破骨细胞前体细胞表面RANK上的TRAF6特异性结合后,激活NF- κ B转录因子、c-Jun氨基末端激酶,活化T细胞核因子- κ B、蛋白激酶B等,促进破骨细胞前体细胞增殖、分化成破骨细胞,增强其骨吸收活性^[14]。OPG下调和RANKL上调,将促进破骨细胞骨吸收活性,导致OP^[15]。本研究结果显示,芪苈通络胶囊能上调股骨组织中OPG蛋白表达,下调RANKL蛋白表达,可抑制破骨细胞的活性,导致骨吸收减少,减缓骨密度的降低,减少钙质流失,发挥抗OP作用。

芪苈通络胶囊是中药复方制剂,由黄芪、三七、川芎、豨薟草、胆南星5味中药组方,具有益气活血、化痰通络功效,主要用于轻中度动脉粥样硬化性血栓性脑梗死气虚血瘀痰阻证。方中,黄芪补气血、健脾胃,常用来治疗骨痛和腰膝酸软,可改善钙的吸收,其所含黄芪甲苷可上调OP模型鼠血清中OPG蛋白的表达、降低RANKL蛋白的表达;三七中有效成分三七总皂苷临床广泛用于骨折的愈合、软组织的损伤及骨关节的损伤等,可促进成骨细胞增殖、上调骨组织中OPG蛋白的表达;川芎可有效治疗甲状腺功能亢进性OP,与丹参合用,能升高OP模型鼠血清钙含量,增加股骨骨密度^[16]。豨薟草、胆南星入肝经,具有补血作用;豨薟草入肾经,具有强筋骨作用。

本研究结果表明,芪苈通络胶囊可能通过上调

OPG/RANKL蛋白比值,调节血清钙、血清磷含量,改善骨密度状况,发挥抗OP作用,但仍有待在不同种属动物、不同OP模型中作进一步研究。

参考文献:

- [1] FARR JN, ROWSEY JL, ECKHARDT BA, et al. Independent roles of estrogen deficiency and cellular senescence in the pathogenesis of osteoporosis: evidence in young adult mice and older humans[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(8): 10-15.
- [2] 张礼超, 薛青, 周奕. 不同类型维生素D₃对原发性骨质疏松患者的影响[J]. 新疆医学, 2019, 49(7): 690-693.
- [3] 蔡娅娟, 梁启聪, 王丽丽. 阿仑膦酸钠维D₃片(福美加)治疗骨质疏松症的临床疗效、不良反应[J]. 北方药学, 2020, 17(1): 141-142.
- [4] 陈俊敏. 二磷酸盐(唑来膦酸)治疗骨质疏松症引起不良反应与维生素D的相关性[D]. 银川:宁夏医科大学, 2019.
- [5] 葛臻, 丁阅昇. 骨质疏松症的中医证素分布研究[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(9): 126-127.
- [6] 张楚天, 林燕萍. 基于OPG/RANKL/RANK信号通路探究中药对破骨细胞的调控作用[J]. 康复学报, 2018, 28(5): 59-64.
- [7] YANG J, WU N, PENG J, et al. Prevention of retinoic acid-induced osteoporosis in mice by isoflavone-enriched soy protein[J]. J Sci Food Agr, 2016, 96(1): 331-338.
- [8] WEI M, YANG Z, LI P, et al. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model[J]. Am J Chin Med, 2007, 35(4): 663-667.
- [9] 石敏, 赵继荣, 薛旭, 等. 从“肾”论治激素性骨质疏松症的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2717-2720.
- [10] 张训浩, 陈伟, 杨德全, 等. 仙灵骨葆胶囊联合粗针治疗原发性骨质疏松患者腰背痛的临床疗效[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2815-2817.
- [11] 徐旭东, 周龙云, 孙玉明. 补肾健脾、活血化瘀类中药复方联合碳酸盐D₃治疗原发性骨质疏松症的Meta分析[J]. 中国药房, 2017, 28(3): 351-355.
- [12] 周圆媛. 维甲酸诱发C57小鼠骨质疏松模型的形态学和骨密度变化[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(17): 4312-4314.
- [13] 曹盼举, 张晓刚, 于海洋, 等. 基于OPG/RANK/RANKL信号轴探讨中医“瘀证”与骨质疏松症之间的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1): 114-117.
- [14] 潘亚磊, 谢培, 史鑫波, 等. 珠子参提取物促进大鼠成骨细胞增殖、分化、矿化及调节OPG/RANKL表达的作用[J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1851-1855.
- [15] 成鹏, 白银亮, 胡彩莉, 等. 黄芪甲苷通过调控FoxO3a/Wnt2/ β -catenin通路抑制去卵巢大鼠骨质疏松的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 161-166.
- [16] 孙胜奎, 廖建红, 范银燕, 等. 丹参川芎联合骨瓜或骨肽对糖尿病骨质疏松患者糖代谢和骨代谢的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(6): 1493-1497.

(收稿日期:2020-07-29)