

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)03-042-08
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.010



基于 RANKL / RANK - NF - κ B - NLRP3 炎性小体通路 探讨强骨饮治疗骨质疏松症模型大鼠的作用机制*

邓祖跃¹, 李志豪², 徐俊峰³, 黄俊俊⁴, 董艳蓉³, 蒋霞¹, 任艳云^{5△}

(1. 浙江省食品药品检验研究院·浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室·国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310014; 3. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012; 4. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005; 5. 中国人民解放军联勤保障部队第903医院, 浙江 杭州 310022)

摘要:目的 探讨强骨饮调节核因子- κ B受体激活因子配体/核因子- κ B受体激活因子-核因子- κ B受体-NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(RANKL/RANK-NF- κ B-NLRP3)炎性小体通路治疗骨质疏松症(OP)的作用机制。方法 将100只SD大鼠随机分为正常对照组(A组, 等量生理盐水, 灌胃给药), OP组(B组, 等量生理盐水, 灌胃给药), 强骨饮低、中、高剂量组[C₁组、C₂组、C₃组, 0.83, 1.66, 3.32 g/(kg·d), 灌胃给药], 己烯雌酚(DES)组[D组, 0.1 mg/(kg·d), 灌胃给药], 吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(PDTC)组[E组, 0.1 g/(kg·d), 腹腔注射], C₂组+E组(F组), 氟甲基酮(Z-YVAD)组[G组, 0.15 mg/(kg·d), 尾静脉给药], C₂组+G组(H组), 各10只。除A组外, 其余各组大鼠均行腹部切口双侧去卵巢术, 复制OP大鼠模型。连续6周给药后处死大鼠, 采用发色底物法测定血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、骨形成发生蛋白-2(BMP-2)、I型胶原C端肽(CTX-I)水平; 采用免疫印迹(Western blot)法检测骨组织中RANKL、RANK、NF- κ B亚基p65(NF- κ B p65)、NLRP3、胱天蛋白酶-1 p20(caspase-1 p20)、消皮素D-N端抗体(GSDMD-N)的蛋白表达水平; 采用双能X线扫描仪测定大鼠股骨中段骨密度(BMD); 采用Micro-CT仪观察大鼠股骨头的结构, 记录骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.sp)、骨体积分数(BV/TV); 采用苏木精-伊红(HE)染色法观察各

*基金项目: 浙江省中医药科技计划项目[2021ZB178]。

第一作者: 邓祖跃, 男, 博士, 主任药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)dzy7317@sina.com。

△通信作者: 任艳云, 女, 硕士, 主任医师, 研究方向为临床医学, (电子信箱)ryy220@sohu.com。

- 及体外释放度考察[J]. 实用药物与临床, 2009, 12(3): 194-196.
- [7] 刘羽, 翟光喜, 周国勤. 盐酸二甲双胍渗透泵制剂的制备和释药因素的研究[J]. 安徽医药, 2013, 17(9): 1477-1480.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 132-137.
- [9] The United States Pharmacopieial Convention. USP 40 - NF35[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2016: 540-557.
- [10] 宋新康, 曾玉梅. 高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍缓释片中盐酸二甲双胍的含量和释放度[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(6): 801-802.
- [11] 徐可, 姜建国, 朱娜, 等. 市售盐酸二甲双胍片仿制制剂溶出曲线与溶出度研究[J]. 中国药业, 2018, 27(22): 28-32.
- [12] ICH. ICH Harmonised Guideline: Biopharmaceutics Classification System - Based Biowaivers (M9)[EB/OL]. (2019-11-16) [2023-09-13]. https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_1116.html.
- [13] AULTON ME, TAYLOR KMG. Aulton's Pharmaceutics[M]. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2013: 561-562.
- [14] 张继睿, 董阳雨, 韩清, 等. 聚维酮和共聚维酮为载体的硝苯地平渗透泵片的制备[J]. 药学研究, 2018, 37(7): 397-400.
- [15] SHESKEY PJ, COOK WG, CABLE CG. Handbook of Pharmaceutical Excipients[M]. London: Pharmaceutical Press, 2017: 651-653.
- [16] PIPLANI M, BHATEJA P, ASIJA R. An Insight into Osmotic Drug Delivery Systems[J]. Letters in Drug Design & Discovery, 2022, 20(1): 16-30.
- [17] MIRNA GF, LUZ MARÍA MC, EFRÉN HB. Critical Factors for Metformin Osmotic Controlled Release Pump[J]. Journal of Pharmaceutical Research International, 2020, 32(35): 1-12.
- [18] SHANKHADIP N, AYAN B, HUSSAN RK. Formulation and Evaluation of Enteric Coated Elementary Osmotic Tablets of Aceclofenac[J]. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 18(4): 498-509.
- [19] 陈馨怡, 袁凤, 史楷岐, 等. 渗透泵药物控释剂包衣工艺研究进展[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(23): 1874-1879.
- [20] 曾媛, 朱兰琼, 彭瑛, 等. 盐酸地芬尼多单层渗透泵控释片处方与制备工艺优化[J]. 中国药业, 2021, 30(9): 22-26.
- [21] WU L, WANG LB, WANG SX. Three dimensional structural insight of laser drilled orifices in osmotic pump tablets[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 93: 287-294.

(收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2024-07-17)

组大鼠骨组织的病理变化。**结果** 与 B 组比较, C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组、D 组、E 组、F 组、G 组、H 组大鼠的 BMD, Tb. N, Tb. Th, BV / TV 均显著升高($P < 0.05$), Tb. sp 均显著降低($P < 0.05$), 骨皮质更厚, 骨小梁更粗, 排列更有序, 成骨细胞数量更多, 血清 CTX - I, IL - 1 β , IL - 18, IL - 6, TNF - α 水平均显著降低($P < 0.05$), 其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均显著更优($P < 0.05$); C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组、D 组、F 组、H 组大鼠的 SOD 水平均显著升高($P < 0.05$), MDA 水平均显著降低($P < 0.05$), 其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均显著更优($P < 0.05$); C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组、D 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κ B p65, NLRP3, caspase - 1 p20 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$); C₂ 组、F 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κ B p65 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), E 组仅 NF - κ B p65 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$); C₂ 组、H 组大鼠的 NLRP3, caspase - 1 p20 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), G 组仅 caspase - 1 p20 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。与 E 组比较, F 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κ B p65 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与 G 组比较, F 组大鼠的 NLRP3, caspase - 1 p20 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。**结论** 强骨饮可通过改善 OP 模型大鼠的 BMD 及骨指标而治疗 OP, 其作用机制与抑制 RANKL / RANK - NF - κ B - NLRP3 炎性小体通路相关。

关键词: 强骨饮; 骨质疏松症; 核因子 - κ B 受体激活因子配体; 核因子 - κ B 受体激活因子 - 核因子 - κ B 受体 - NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3

Mechanism of Qiangguinyin in Inhibiting Osteoporosis Model Rats Based on the RANKL / RANK - NF - κ B - NLRP3 Inflammasome Pathway

DENG Zuyue¹, LI Zhihao², XU Junfeng³, HUANG Junjun⁴, DONG Yanrong³, JIANG Xia¹, REN Yanyun⁵

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control • Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Province • NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine < Traditional Chinese Patent Medicine >, Hangzhou, Zhejiang, China 310052; 2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang, China 310014; 3. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang, China 310012; 4. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China 310005; 5. No. 903 Hospital of PLA, Hangzhou, Zhejiang, China 310022)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qiangguinyin in regulating RANKL / RANK - NF - κ B - NLRP3 inflammasome pathway in the treatment of osteoporosis (OP). **Methods** A total of 100 SD rats were randomly divided into the normal control group (group A, equal volume of physiological saline, administered by gavage), the OP group (group B, equal volume of physiological saline, administered by gavage), the low -, medium -, and high - dose groups of Qiangguinyin [groups C₁, C₂, C₃, 0.83, 1.66, 3.32 g / (kg·d), administered by gavage], the diethylstilbestrol (DES) group [group D, 0.1 mg / (kg·d), administered by gavage], the pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group [group E, 0.1 g / (kg·d), intraperitoneal injection], the group C₂ + group E (group F), the Z - YVAD group [group G, 0.15 mg / (kg·d), administered via tail vein], and the group C₂ + group G (group H), 10 mice in each group. Except for rats in group A, the rats in the other groups underwent bilateral ovariectomy through the abdominal incision to replicate OP rat models. Rats were euthanized after six consecutive weeks of administration. The levels of serum malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were measured by the chromogenic substrate method. The levels of serum interleukin (IL) - 1 β , IL - 18, IL - 6, tumor necrosis factor - α (TNF - α), bone morphogenetic protein - 2 (BMP - 2), and C - terminal peptide of type I collagen (CTX - I) were detected by the enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of RANKL, RANK, NF - κ B p65, NLRP3, caspase - 1 p20, and GSDMD - N antibody protein were detected by the Western blot method. The bone mineral density (BMD) of the mid - femur was measured by dual energy X - ray absorptiometry. The structure of the femur was observed by the Micro - CT scanner. The trabecular number (Tb. N), trabecular number (Tb. N), trabecular separation (Tb. sp), and bone volume / tissue volume (BV / TV) were recorded. The pathological changes of bone tissue in each group were observed by the hematoxylin - eosin (HE) staining method. **Results** Compared with those in group B, the BMD, Tb. N, Tb. Th, BV / TV significantly increased ($P < 0.05$), while Tb. sp significantly decreased in groups C₁, C₂, C₃, D, E, F, G, and H ($P < 0.05$); the cortical bone was thicker, the trabecular bone was thicker and more orderly arranged, and the number of osteoblasts was higher in groups C₁, C₂, C₃, D, E, F, G, and H; the levels of serum CTX - I, IL - 1 β , IL - 18, IL - 6, and TNF - α significantly decreased in groups C₁, C₂, C₃, D, E, F, G, and H ($P < 0.05$), and the indexes in group F were significantly better than those in group E, and those in group H were significantly better than those in group G ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the level of SOD significantly increased ($P < 0.05$), while the MDA levels significantly decreased in groups C₁, C₂, C₃, D, F, and H ($P < 0.05$), the indexes in group F were significantly better than those in group E, and those in group H were significantly better than those in group G ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the expression levels of RANKL, RANK, NF - κ B p65, NLRP3, and caspase - 1 p20 proteins in groups C₁, C₂, C₃, and D significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the expression levels of RANKL, RANK, and NF - κ B p65 proteins in group C₂ and group F significantly decreased ($P < 0.05$), while only the expression level of NF - κ B p65 protein in group E significantly decreased ($P < 0.01$). The expression levels of NLRP3 and caspase - 1 p20 proteins significantly decreased in groups C₂ and H ($P < 0.05$), while only the expression level of caspase - 1 p20 protein in group G significantly decreased ($P < 0.01$). Compared

with those in group E, the expression levels of RANKL, RANK, and NF- κ B p65 proteins in group F significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with those in group G, the expression levels of NLRP3 and caspase-1 p20 proteins in group F significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiangguyin can treat OP by improving the BMD and bone indicators in OP model rats, and its mechanism is related to the inhibition of the RANKL / RANK - NF- κ B - NLRP3 inflammasome pathway.

Key words: Qiangguyin; osteoporosis; RANKL; RANK - NF- κ B - NLRP3

骨质疏松症(OP)是一种由多种因素导致骨量减少、骨脆性增加,易发生骨折的慢性骨代谢性疾病,常发生于绝经后妇女和中老年人,严重影响其身心健康和生活质量^[1]。目前,临床主要采用钙剂、双膦酸盐、雌激素等化学药物治疗,虽疗效不错,但存在一定不良反应^[2-3]。中医药治疗骨相关疾病的疗效明显,不良反应少^[4]。据报道,强骨饮对OP患者的疗效较好,可改善绝经后OP患者的血清雌激素水平^[5-6],抑制破骨细胞吸收,促进成骨细胞增殖^[7]。前期研究发现,强骨饮治疗OP骨折与降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)水平有关^[8]。为进一步明确强骨饮调节这些炎症因子的机制,本研究中探讨了强骨饮调节核因子- κ B受体激活因子配体/核因子- κ B受体激活因子-核因子- κ B受体-NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(RANKL / RANK - NF- κ B - NLRP3)炎性小体通路治疗OP的作用机制,为强骨饮的临床应用提供理论基础和实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:SKYSCAN1176型Micro-CT仪(比利时Bruker公司);OsteoSys型小动物双能X线扫描仪(韩国Medikors公司);SpectraMax M2型酶标仪(Molecular Devices公司);RM2235型切片机、DM4000 B型显微镜(德国Leica公司);Amersham Image Quant 800型化学发光成像系统(美国GE公司)。

试剂:强骨饮浓缩液(组方:防风15 g、黄芪30 g、忍冬藤25 g、露蜂房20 g、杜仲15 g、肉桂10 g、川芎20 g、川续断30 g、骨碎补20 g、鸡血藤25 g、秦艽15 g、鹿角霜20 g等,浙江省立同德医院提供,药剂科统一煎制,人用剂量为1天1副,质量浓度为每1 mL含2.48 g生药);己烯雌酚(DES,天津市金耀氨基酸有限公司,批号为H18040536);丙二醛(MDA,批号为20220312),超氧化物歧化酶(SOD,批号为20220625),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号为20160315),均购自南京建成生物工程研究所;大鼠IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号为ELS-0083-2),IL-18 ELISA试剂盒(批号为ELS-1373-1),TNF- α ELISA试剂盒(批号为ELS-0109-1),IL-6 ELISA试剂盒(批号为ELS-0138-2),均购自合肥博美生物科技有限责任公司;骨形成发生蛋白-2(BMP-2)试剂盒(批号为202201),

I型胶原C端肽(CTX-I)试剂盒,批号为202206),均购自上海江莱生物科技有限公司;NF- κ B亚基p65(NF- κ B p65)一抗(货号为sc-8008),RANK一抗(货号为sc-374360),RANKL一抗(货号为sc-52950),NLRP3一抗(货号为sc-66846),胱天蛋白酶-1 p20(caspase-1 p20)一抗(货号为sc-56036),均购自美国Santa公司;消皮素D-N端抗体(GSDMD-N,武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号为A20197);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,货号为AF1186),羊抗大鼠抗体(货号为A0192),Bradford蛋白浓度测定试剂盒(货号为P0006),吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(PDTC,批号为S1809),均购自上海碧云天生物技术有限公司;氟甲基酮(Z-YVAD,上海浩然生物技术有限公司,批号为1141-1)。

动物:雌性SD大鼠100只,清洁级,体质量205~232 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号为SCXK<沪>2017-0005。饲养于12 h/12 h明暗循环、相对湿度(55 $\pm$ 5)%、温度(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C的环境中,自由饮水、进食。

1.2 方法

分组、建模与给药:将100只SD大鼠随机分为正常对照组(A组,等量生理盐水,灌胃给药),OP组(B组,等量生理盐水,灌胃给药),强骨饮低、中、高剂量组[C₁组、C₂组、C₃组,0.83, 1.66, 3.32 g/(kg $\cdot$ d),灌胃给药],DES组[D组,0.1 mg/(kg $\cdot$ d),灌胃给药],PDTC组[E组,0.1 g/(kg $\cdot$ d),腹腔注射],C₂组+E组(F组),Z-YVAD组[G组,0.15 mg/(kg $\cdot$ d),尾静脉给药],C₂组+G组(H组),各10只。除A组外,其余各组大鼠均行腹部切口双侧去卵巢术,复制OP大鼠模型。造模6周后,各组大鼠分别予相应药物,每周称体质量1次,按体质量调整给药剂量,连续6周。

股骨分离与血清处理:处死大鼠,在无菌条件下取其一侧完整股骨,分离股骨髓,剥离股骨髓肌肉筋膜,充分暴露股骨头,一部分置10%福尔马林溶液中固定用于组织病理检查,一部分置-70 $^{\circ}$ C冰箱保存用于提取骨组织中蛋白。最后1次给药24 h后,麻醉大鼠,心脏取血,离心(转速为3 000 r/min)30 min,取血清,分装,-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

骨密度(BMD)测定:卵巢切除术后12周,处死动物前,采用双能X线扫描仪进行股骨中段BMD测定,采用

DR. DXA VET 软件分析,记录数据并进行组间比较。

骨指标检测:固定大鼠股骨头在专用扫描垫上,用 Micro-CT 仪扫描,检测各组大鼠的骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)、骨体积分数(BV / TV)。扫描参数为 65 kV、45 μ A,曝光 1 000 ms,扫描厚度 12 μ m,扫描角度 180°,每旋转 0.5°拍摄图像 2 张,采用 NRecon 软件进行三维图像重建,采用 CT-Analyser 软件分析参数。

股骨组织 HE 染色观察:实验完成后,用 4℃生理盐水冲洗大鼠股骨,置 10% 中性甲醛中固定 48 h,用乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2Na)脱钙 1 个月,以不同体积分数乙醇脱水,透明,石蜡包埋,切片(厚度为 5 μ m),常规 HE 染色,光镜下高倍视野拍照($\times 50$),对骨切面单位视野内的骨小梁、骨基质、软骨细胞、骨细胞等结构进行组织形态学观察。

血清指标测定:取冻存血清,恢复至室温,采用发色底物法测定血清 MDA 含量和 SOD 活力,按试剂盒说明书检测 BMP-2,CTX-I,TNF- α ,IL-6,IL-1 β ,IL-18 水平。

免疫印迹(Western blot)法检测股骨组织相关蛋白的表达水平:取适量大鼠冻存股骨,液氮粉碎,按 1:10(*m* / *V*)加入 RIPA 裂解液,混匀,离心,取上清液,以 Bradford 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度,按 4:1(*V* / *V*)的比例加入蛋白上样缓冲溶液,95℃加热使蛋白质变性,制备凝胶,加样,电泳结束后转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,取 RANKL,RANK,NF- κ B p65,NLRP3,caspase-1 p20,GSDMD-N 抗体,按说明书要求稀释到相应浓度,加入相应一抗,4℃孵育过夜,用含 Tween 20 的 Tris 缓冲溶液(TBST)洗膜 3 次,室温孵育二抗 1 h,TBST / Tris 缓冲溶液(TBS)洗膜后,采用 BeyoECL Plus 软件显色,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 27.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMD 与骨指标

与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D 组、E 组、F 组、G 组、H 组大鼠的 BMD,Tb. N,Tb. Th,BV / TV 均显著增加(*P* < 0.05),Tb. sp 均显著降低(*P* < 0.05),其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均显著更优(*P* < 0.05)。详见表 1。与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D 组、E 组、F 组大鼠的骨皮质更厚,骨小梁更粗、排列更有序,成骨细胞数量更多。详见图 1。

2.2 股骨病理学形态

与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D 组、E 组、F 组、G 组、

H 组大鼠的 Tb. N,Tb. Th 均增加,骨小梁间隙变窄,成骨细胞增多,其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均更优。详见图 2。

2.3 血清炎症因子水平

与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D 组、E 组、F 组、G 组、H 组大鼠的血清 IL-1 β ,IL-18,IL-6,TNF- α 水平均显著降低(*P* < 0.05),其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均显著更低(*P* < 0.05)。详见表 2。

2.4 血清 BMP-2,CTX-I,MDA 水平与 SOD 活力

与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D 组、E 组、F 组、G 组、H 组大鼠的血清 CTX-I 水平均显著降低(*P* < 0.05),BMP-2 水平均显著升高(*P* < 0.05),其中 F 组较 E 组、

表 1 各组大鼠骨密度与骨指标比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	BMD(<i>g</i> / <i>cm</i> ²)	Tb.N(1 / <i>mm</i>)	Tb.Sp(<i>mm</i>)	Tb.Th(<i>mm</i>)	BV / TV(%)
A 组	0.376 ± 0.007	0.323 ± 0.054	3.476 ± 0.324	0.382 ± 0.008	58.32 ± 3.83
B 组	0.204 ± 0.004 [△]	0.164 ± 0.032 [△]	4.823 ± 0.376 [△]	0.209 ± 0.006 [△]	32.26 ± 2.17 [△]
C ₁ 组	0.253 ± 0.008 [#]	0.193 ± 0.036 [#]	4.128 ± 0.368 [#]	0.242 ± 0.006 [#]	38.35 ± 3.03 [#]
C ₂ 组	0.295 ± 0.008 ^{##}	0.213 ± 0.041 [#]	3.734 ± 0.316 [#]	0.278 ± 0.007 ^{##}	43.67 ± 3.92 ^{##}
C ₃ 组	0.314 ± 0.008 ^{##}	0.273 ± 0.039 ^{##}	3.562 ± 0.302 ^{##}	0.315 ± 0.006 ^{##}	48.41 ± 3.74 ^{##}
D 组	0.325 ± 0.008 ^{##}	0.288 ± 0.056 ^{##}	3.323 ± 0.311 ^{##}	0.328 ± 0.011 ^{##}	51.17 ± 4.16 ^{##}
E 组	0.287 ± 0.008 ^{##}	0.234 ± 0.032 [#]	3.641 ± 0.287 ^{##}	0.263 ± 0.007 [#]	42.43 ± 3.93 [#]
F 组	0.336 ± 0.008 ^{##□}	0.303 ± 0.052 ^{##□}	3.237 ± 0.316 ^{##□}	0.325 ± 0.012 ^{##□}	53.36 ± 5.14 ^{##□}
G 组	0.315 ± 0.008 ^{##}	0.258 ± 0.03 [#]	3.526 ± 0.351 ^{##}	0.278 ± 0.008 ^{##}	44.62 ± 3.21 ^{##}
H 组	0.345 ± 0.008 ^{##▲}	0.316 ± 0.062 ^{##▲}	3.127 ± 0.281 ^{##▲}	0.334 ± 0.012 ^{##▲}	55.37 ± 4.53 ^{##▲}

注:与 A 组比较,^{*}*P* < 0.05,^{**}*P* < 0.01;与 B 组比较,[#]*P* < 0.05,^{##}*P* < 0.01;与 E 组比较,[□]*P* < 0.05;与 G 组比较,[▲]*P* < 0.05。表 2 和表 3、图 3 至图 6 同。

Note: Compared with those in group A, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01; Compared with those in group B, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; Compared with those in group E, [□]*P* < 0.05; Compared with those in group G, [▲]*P* < 0.05.

表 2 各组大鼠血清炎症因子水平比较($\bar{X} \pm s, \text{pg} / \text{mL}, n = 10$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β	IL-18
A 组	2.08 ± 0.32	15.63 ± 1.56	87.43 ± 7.18	11.35 ± 2.74
B 组	6.12 ± 0.68 [△]	47.64 ± 4.35 [△]	173.75 ± 15.42 [△]	35.92 ± 5.49 [△]
C ₁ 组	4.35 ± 0.44 [#]	35.64 ± 3.65 [#]	132.63 ± 14.62 [#]	24.72 ± 4.67 [#]
C ₂ 组	3.86 ± 0.35 ^{##}	26.52 ± 2.51 ^{##}	125.58 ± 13.37 ^{##}	15.67 ± 3.83 ^{##}
C ₃ 组	2.43 ± 0.32 ^{##}	21.64 ± 1.85 ^{##}	105.68 ± 8.37 ^{##}	12.56 ± 2.31 ^{##}
D 组	2.12 ± 0.28 ^{##}	18.42 ± 1.53 ^{##}	91.46 ± 6.47 ^{##}	11.87 ± 1.68 ^{##}
E 组	3.75 ± 0.36 [#]	30.56 ± 3.67 ^{##}	130.62 ± 8.37 [#]	19.24 ± 1.82 [#]
F 组	2.34 ± 0.23 ^{##□}	22.37 ± 2.83 ^{##□}	108.36 ± 9.26 ^{##□}	13.13 ± 1.26 ^{##□}
G 组	3.52 ± 0.32 ^{##}	28.58 ± 2.54 ^{##}	125.94 ± 11.35 ^{##}	17.86 ± 1.64 ^{##}
H 组	2.05 ± 0.23 ^{##▲}	20.35 ± 2.17 ^{##▲}	96.48 ± 9.27 ^{##▲}	10.28 ± 1.13 ^{##▲}

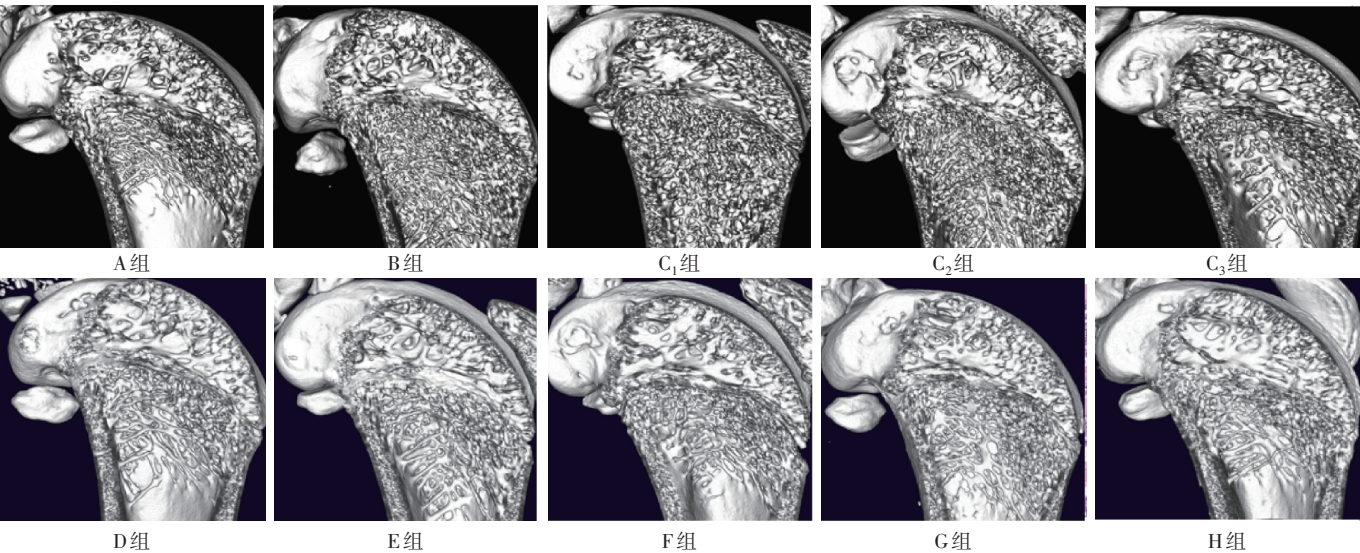


图 1 各组大鼠股骨头 Micro - CT 仪三维重建图 (n = 10)

Fig.1 Three - dimensional reconstruction images of femur in each group by Micro CT scanner (n = 10)

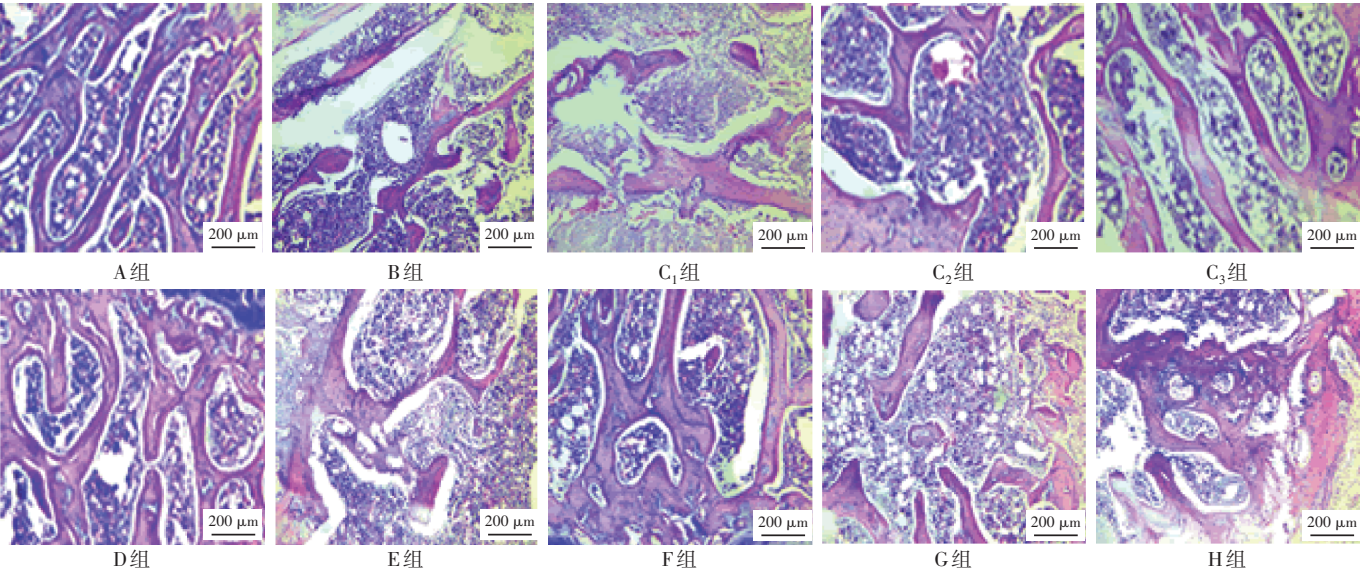


图 2 各组大鼠股骨病理组织 HE 染色 (× 50, n = 10)

Fig2. Pathological tissue of femur in each group by HE staining (× 50, n = 10)

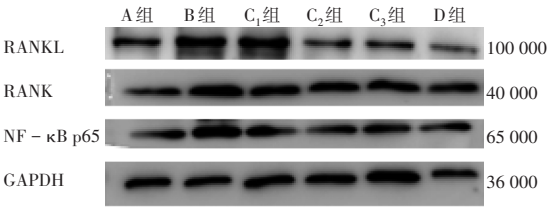
H 组较 G 组以上指标均显著更优 ($P < 0.05$) ; C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组、D 组、F 组、H 组大鼠的血清 MDA 水平均显著降低 ($P < 0.05$), SOD 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 其中 F 组较 E 组、H 组较 G 组以上指标均显著更优 ($P < 0.05$)。详见表 3。

2.5 RANKL/RANK - NF - κB 通路相关蛋白表达水平
与 B 组比较, C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组、D 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κB p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。详见图 3 A 和图 3 C。与 B 组比较, C₂ 组、F 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κB p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), E 组仅 NF - κB p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$) ; 与 E 组比较, F 组大鼠的 RANKL, RANK, NF - κB p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。详

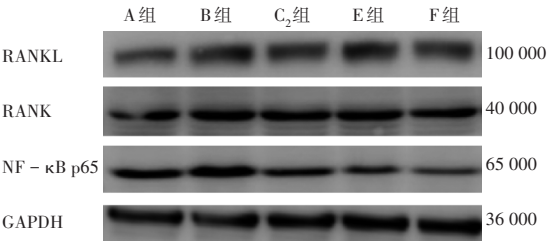
表 3 各组大鼠血清 BMP, CTX - I, MDA, SOD 水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Comparison of serum BMP, CTX - I, MDA and SOD levels in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

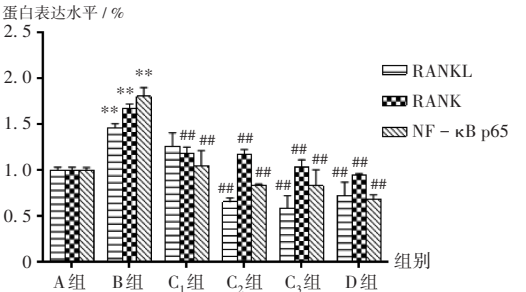
组别	BMP - 2 (pg / mL)	CTX - I (pg / mL)	SOD (U / mL)	MDA (nmol / mL)
A 组	15.45 ± 2.38	25.36 ± 2.24	6.34 ± 0.64	2.03 ± 0.18
B 组	6.16 ± 1.37**	55.13 ± 5.13**	2.63 ± 0.28**	6.26 ± 0.55**
C ₁ 组	8.68 ± 1.26 [#]	37.68 ± 3.45 [#]	3.87 ± 0.24 [#]	5.25 ± 0.43 [#]
C ₂ 组	11.57 ± 1.53 ^{##}	35.68 ± 3.26 ^{##}	4.79 ± 0.36 ^{##}	4.62 ± 0.38 ^{##}
C ₃ 组	12.86 ± 1.86 ^{##}	32.54 ± 3.02 ^{##}	5.83 ± 0.42 ^{##}	3.54 ± 0.32 ^{##}
D 组	13.78 ± 2.12 ^{##}	31.62 ± 2.93 ^{##}	6.06 ± 0.49 ^{##}	3.18 ± 0.36 ^{##}
E 组	9.43 ± 1.82 [*]	36.46 ± 3.46 ^{##}	2.57 ± 0.42	6.37 ± 0.42
F 组	12.36 ± 2.08 ^{##□}	33.69 ± 3.15 ^{##□}	5.16 ± 0.51 ^{##□}	4.58 ± 0.35 ^{##□}
G 组	10.76 ± 1.47 ^{##}	35.74 ± 3.57 ^{##}	2.71 ± 0.46	6.16 ± 0.43
H 组	13.62 ± 2.49 ^{##▲}	30.39 ± 2.86 ^{##▲}	5.27 ± 0.63 ^{##▲}	4.32 ± 0.32 ^{##▲}



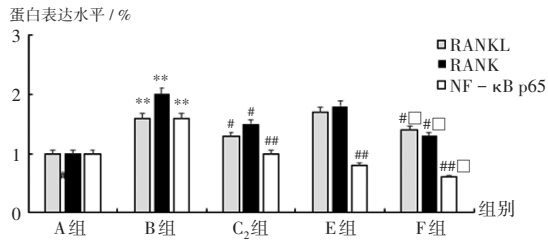
A



B



C



D

A - B. 电泳图 C - D. 柱状图

图3 各组大鼠RANKL / RANK - NF - κB p65通路相关蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

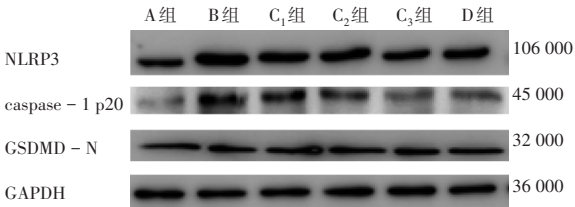
A - B. Electropherograms C - D. Bar charts

Fig. 3 Comparison of expression levels of RANKL, RANK, and NF - κB p65 pathway - related protein in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

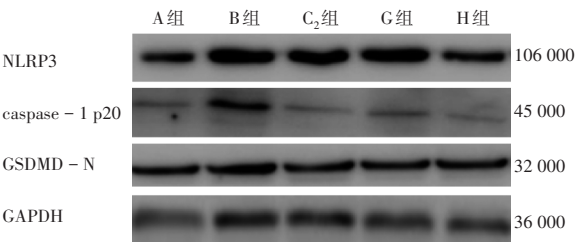
见图3 B和图3 D。

2.6 NLRP3 炎性小体相关蛋白表达水平

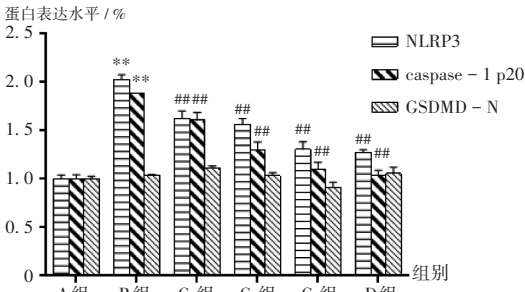
与B组比较,C₁组、C₂组、C₃组、D组大鼠的NLRP3, caspase - 1 p20蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), 但GSDMD - N蛋白表达水平无显著变化($P > 0.05$)。详见图4 A和图4 C。与B组比较,C₂组、H组大鼠的NLRP3, caspase - 1 p20蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), G组仅caspase - 1 p20蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$); 与G组比较,H组大鼠的NLRP3, caspase - 1 p20蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见图4 B和图4 D。



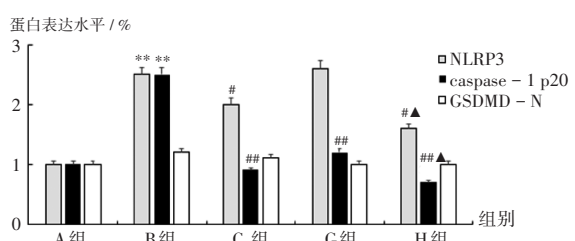
A



B



C



D

A - B. 电泳图 C - D. 柱状图

图4 各组大鼠NLRP3炎性小体相关蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

A - B. Electropherograms C - D. Bar charts

Fig. 4 Comparison of expression levels of NLRP3 inflammasome protein in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

3 讨论

OP主要表现为骨量降低,骨皮质变薄,骨脆性增加^[8]。本研究结果显示,OP模型大鼠的股骨BMD, Tb. N, Tb. Th, BV / TV均显著降低($P < 0.05$), Tb. sp显著升高($P < 0.05$),骨皮质范围缩小,骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱,表明造模成功。而强骨饮对上述症状有明显改善作用,可使OP模型大鼠的BMD升高, Tb. N增多、变粗,表明强骨饮有明显抗OP作用。

OP的发生主要是由于骨代谢平衡失调,即骨的破骨能力增强和成骨能力下降^[9]。BMP - 2是骨组织形成过程中间充质细胞分化为成骨细胞信号通路的重要蛋

白^[10]。CTX - I 被称为新一代的骨转换标志物,反映了骨流失速度^[11]。本研究结果显示,OP模型大鼠的骨组织中BMP - 2水平显著降低($P < 0.05$),CTX - I水平显著升高($P < 0.05$),表明OP模型大鼠的雌激素水平下降,导致骨转换率增加,骨流失速度加快,引起OP;而强骨饮显著升高了大鼠的BMP - 2水平($P < 0.05$),显著降低了CTX - I水平($P < 0.05$),表明其可影响雌二醇水平,从而抑制破骨细胞的骨吸收,促进成骨细胞增殖,这与赵稜等^[5]的研究结果一致。

骨代谢改变与RANKL和RANK相关^[12],女性绝经后RANKL浓度在早期较正常人高2~3倍^[13]。因为当成骨细胞/骨髓基质细胞表达、分泌过多的RANKL时,RANKL与RANK结合,激活破骨细胞上的RANK,刺激信号活化NF - κ B,导致c - Fos的表达上调,信号进一步传导,促进破骨细胞的分化、成熟及骨吸收^[14]。研究发现,接受卵巢切除术大鼠的血清TNF - α ,IL - 6,IL - 1,IL - 17水平均显著高于对照组大鼠,这些细胞因子具有促进骨吸收作用^[15-17]。本研究结果显示,OP模型大鼠的RANKL,RANK,NF - κ B p65,IL - 1 β ,IL - 6,TNF - α 水平均显著升高($P < 0.05$);强骨饮显著降低了RANKL,RANK,NF - κ B p65,IL - 1 β ,IL - 6,TNF - α 水平($P < 0.05$);NF - κ B抑制剂PDTC显著降低了NF - κ B p65蛋白表达水平和TNF - α ,IL - 1 β ,IL - 18,IL - 6水平($P < 0.05$),而强骨饮联用抑制剂PDTC显著降低了大鼠骨组织中RANKL,RANK,NF - κ B p65蛋白表达水平及TNF - α ,IL - 1 β ,IL - 18,IL - 6水平($P < 0.05$),表明强骨饮影响了RANKL / RANK - NF - κ B通路和炎性因子水平。

炎性因子的产生主要由NLRP3炎性小体调节^[18],NLRP3水平在雌激素缺乏性OP中会升高^[19]。本研究结果显示,OP模型大鼠的NLRP3炎性小体相关蛋白NLRP3,caspase - 1 p20蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);而强骨饮显著降低了NLRP3,caspase - 1 p20蛋白表达水平($P < 0.05$);抑制剂Z - YVAD仅显著降低了caspase - 1 p20蛋白表达水平($P < 0.05$);强骨饮联用抑制剂Z - YVAD则显著降低了NLRP3,caspase - 1 p20蛋白表达水平($P < 0.05$)。表明强骨饮可通过调节NLRP3炎性小体来影响炎性因子的表达,对GSDMD - N蛋白表达无明显影响,其机制需进一步探讨。

RANKL / RANK - NF - κ B通路和NLRP3炎性小体通路是不同的系统,但RANKL与RANK结合激活的NF - κ B及后期产生的TNF - α 也可激活NF - κ B,诱导NLRP3炎性小体活化^[14,16,18]。本研究结果显示,OP模型大鼠的血清MDA,IL - 18,IL - 1 β 水平均显著升高($P < 0.05$),血清SOD水平显著降低($P < 0.05$);强骨饮

各剂量组血清SOD水平均显著升高($P < 0.05$),血清MDA水平均显著降低($P < 0.05$),这是由于强骨饮中的川芎为典型抗氧化中药,可增加体内的抗氧化能力,降低NLRP3炎性小体的活化因素。

综上所述,强骨饮治疗OP的作用机制为通过RANKL / RANK - NF - κ B - NLRP3炎性小体通路影响OP模型大鼠炎性因子的表达和释放,进一步影响破骨细胞的分化,调节骨代谢平衡。

参考文献

- [1] 黄洁柔. 骨质疏松症:一种“静悄悄”的疾病[J]. 科学之友, 2022(12):64 - 65.
- [2] 郭世绂. 骨质疏松症的药物治疗及其理论基础[J]. 中华骨科杂志, 2004, 24(11):54 - 58.
- [3] 张新龙, 宫玉锁, 陈国栋, 等. 防治骨质疏松症中药保健品及中成药组方分析[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2023, 47(1):58 - 61.
- [4] 史晓林. 自拟强骨饮治疗骨质疏松症的32例临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(2):57 - 58.
- [5] 赵稜, 汪煌, 魏杰, 等. 自拟强骨饮对绝经后骨质疏松患者血清雌激素水平及骨密度影响的临床观察[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4):529 - 531.
- [6] 李旭云, 孙峰, 李静伟, 等. 益气温经方强骨饮治疗原发性骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8):1003 - 1006.
- [7] 杨依然. CKIP - 1介导mTOR通路对绝经后骨质疏松症致病机理及强骨饮对其干预的研究[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2021.
- [8] 刘雨晴, 李璐, 黄虎, 等. 大鼠骨质疏松模型骨组织形态测量[J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30(21):1987 - 1991.
- [9] 徐蕾, 张春芳, 韩国柱, 等. 骨质疏松发病机制的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2022, 44(5):433 - 439.
- [10] 代鹏展, 刘新. BMP - 2骨吸收作用的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(4):687 - 690.
- [11] 于莉. 骨代谢标志物实验室检测在绝经后骨质疏松症治疗中的意义[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(2):18 - 21.
- [12] INFANTE M, FABI A, COGNETTI F, et al. RANKL / RANK / OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(12):1 - 18.
- [13] MOHAMAD NV, IMA - NIRWANA S, CHIN KY. Are oxidative stress and inflammation mediators of bone loss due to estrogen deficiency? A review of current evidence[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2020, 20(9):1478 - 1487.
- [14] 叶超群, 纪树荣, 钟兴明. RANKL - RANK - OPG骨调节轴[J]. 首都体育学院学报, 2006, 18(6):61 - 64.
- [15] 刘文和, 刘忠厚. 原癌基因c - fos与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(10):770 - 775.
- [16] 白利永, 陈翔淑, 张元维, 等. 炎性细胞因子与老年性骨质疏松症相关性的研究进展[J]. 实用老年医学, 2022, 36(11):1158 - 1161.
- [17] FENG C, XIAO L, YU JC, et al. Simvastatin promotes osteo-