

基于 OPG/RANKL/RANK 轴观察加味阳和汤及其拆方对去卵巢骨质疏松大鼠的影响

曹端广¹ 杨文龙² 夏汉庭² 吴凡² 许权² 杨凤云^{2*}

1.江西中医药大学,江西 南昌 330000

2.江西中医药大学附属医院,江西 南昌 330000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 06-0818-05

摘要: **目的** 观察加味阳和汤及其拆方对 OPG、RANKL、RANK 含量的影响,探讨其防治绝经后骨质疏松症可能的作用机制及组方配伍的合理性。**方法** 选取 48 只雌性 SD 大鼠,加味阳和汤按君臣佐使关系拆方,将大鼠等量随机分为假手术组 (SHAM)、模型组 (OVX)、君药+臣药组 (A 组)、君药+臣药+佐药组 (B 组)、君药+臣药+佐药+使药组 (C 组)、戊酸雌二醇组 (E₂V)。除 SHAM 组外,均采用去卵巢骨质疏松大鼠模型,干预给药后 (灌胃 90 d),处死动物后取右侧股骨及胫骨通过双能 X 射线骨密度仪检测骨密度 (bone mineral density, BMD) 及骨矿含量 (bone mineral content, BMC),取左侧股骨行 HE 染色观察骨显微结构,检测血清中骨代谢指标 ALP、Ca²⁺、P³⁻、E₂ 及血清 OPG、RANKL、RANK 含量。**结果** 与 SHAM 组相比,OVX 组大鼠股骨及胫骨 BMD、BMC 降低 ($P<0.05$),骨小梁变细、间隙增大、结构缺失,血清 Ca²⁺、P³⁻、E₂、OPG 水平下降 ($P<0.05$),血清 ALP、RANKL、RANK 水平上升 ($P<0.05$);与 OVX 组比较,除 A 组大鼠股骨及胫骨 BMD、BMC、血清 Ca²⁺、P³⁻、E₂、OPG、RANKL 及 B 组 P³⁻ 水平无显著差异外 ($P>0.05$),各给药组大鼠股骨及胫骨 BMD、BMC 均显著升高 ($P<0.05$),骨小梁增多、间隙减小、结构趋向完整,血清 Ca²⁺、P³⁻、E₂、OPG 水平上升 ($P<0.05$),血清 ALP、RANKL、RANK 水平下降 ($P<0.05$)。**结论** 加味阳和汤及其拆方通过提高去卵巢骨质疏松大鼠 BMD、BMC,降低骨代谢,改善骨显微结构从而发挥治疗作用,调节 OPG/RANKL/RANK 轴是可能的机制。

关键词: 加味阳和汤;绝经后骨质疏松症;OPG/RANKL/RANK 轴

Effect of Jiawei Yanghe decoction and its disassembled prescription on ovariectomized osteoporosis rats based on the observation of OPG/RANKL/RANK axis

CAO Duanguang¹, YANG Wenlong², XIA Hanting², WU Fan², XU Quan², YANG Fengyun^{2*}

1.Jiangxi University of traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

2.Affiliated Hospital of Jiangxi University of traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

* Corresponding author: YANG Fengyun, Email: fn_or@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of Jiawei yanghe decoction and its disassembled prescription on the levels of OPG, RANKL, and RANK, and to explore the possible mechanism in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis and the rationality of prescription compatibility. **Methods** Forty-eight female SD rats were selected. The prescription of Jiawei yanghe decoction was disassembled according to its rule of chief, adjuvant, assistant, and courier herbs. Rats were randomly divided into control group (SHAM), model group (OVX), Chief + Adjuvant group (group A), Chief + Adjuvant + Assistant group (group B), Chief + Adjuvant + Assistant + Courier group (group C), and estradiol valerate group (E₂V). Except SHAM group, rats in other groups were ovariectomized to establish the model of osteoporosis. After drug intervention (gavage for 90 days), bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) of the right femur and tibia were detected with dual energy X-ray absorptiometry. Bone microstructure of the left femur was observed with HE staining method. Serum bone metabolic indexes, contents of ALP, Ca²⁺, P³⁻, E₂, and serum levels of OPG, RANKL, and RANK were examined. **Results** Compared with those in SHAM group,

基金项目: 江西省一流学科专项基金 (JXSYLXK-ZHYI012); 江西省卫生健康委中医药科研计划课题 (2018A371); 江西省研究生创新专项基金 (YC2018-S268, YC2017-S363)

* 通信作者: 杨凤云, Email: fn_or@126.com

BMD and BMC of the femur and tibia in OVX group decreased ($P<0.05$), the bone trabeculae became thinner, the space increased, and the structure was missing. Serum Ca^{2+} , P^{3-} , E2, and OPG levels decreased ($P<0.05$), and serum ALP, RANKL, and RANK levels increased ($P<0.05$). Compared with those in OVX group, there was no significant difference in BMD, BMC, serum Ca^{2+} , P^{3-} , E2, OPG, RANKL levels in group A and P^{3-} level in group B in the femur and tibia ($P>0.05$). BMD and BMC of the femur and tibia increased significantly ($P<0.05$). trabecular bone increased, gap decreased, structure tended to complete, and serum levels of Ca^{2+} , P^{3-} , E2, and OPG increased ($P<0.05$) in every dose group. Serum levels of ALP, RANKL, and RANK decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Jiaweiyanghe decoction and its disassembled prescriptions play a therapeutic role in improving BMD and BMC, reducing bone metabolism, and improving bone microstructure in ovariectomized osteoporotic rats. The possible mechanism is to regulate the OPG/RANKL/RANK axis.

Key words: Jiaweiyanghe decoction; postmenopausal osteoporosis; OPG/RANKL/RANK axis

骨质疏松症是指骨吸收大于骨形成,全身骨量减少、骨微结构破坏的一种代谢性骨病。我国约有7 000万人患有骨质疏松症,约有2亿人存在不同程度的骨密度(bone mineral density, BMD)及骨矿含量(bone mineral content, BMC)下降^[1]。更年期后,妇女雌激素水平下降,松质骨退变,骨量下降,最有效的治疗方法就是补充雌激素,然而过量雌激素易使女性子宫出血、心血管等疾病的风险增加^[2]。传统中医药疗效可靠,毒副作用小,可能是一种可行的替代方法。补肾活血类中药治疗绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)取得了理想的疗效,可以防止患者BMD下降^[3-4]; OPG/RANKL/RANK轴能调节骨吸收与骨形成,是维持人体骨量平衡的重要通路。前期研究^[5]发现,加味阳和汤对维甲酸所致药物性大鼠骨质疏松症有良好的防治作用,然而对加味阳和汤组方配伍合理性及对去卵巢骨质疏松大鼠的作用效果及可能机制,却未见相关报道。因此,本研究通过检测加味阳和汤干预后去卵巢骨质疏松大鼠的BMD、BMC、骨显微结构及血清学指标,研究加味阳和汤对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用,探讨其可能的作用机制及组方配伍的合理性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:雌性SD大鼠48只,3月龄,质量为(225±5)g,购自江西中医药大学实验动物科技中心,动物生产许可证号:SCXK(赣)2018-0003。将大鼠随机分为假手术组(SHAM)、模型组(OVX)、君药+臣药组(A组)、君药+臣药+佐药组(B组)、君药+臣药+佐药+使药组(C组)、戊酸雌二醇组(estradiol valerate, E_2V)组,每组8只。

1.1.2 主要药物:熟地黄15 g、鹿角胶10 g(另烱化)为君,肉桂10 g、炮姜6 g为臣,白芥子10 g、麻

黄10 g、鸡血藤20 g、汉防己10 g为佐,木瓜6 g、甘草3 g为使,共10味中药,A组、B组、C组的用药经煎煮后分别浓缩至含生药浓度0.41 g/mL、0.91 g/mL、1 g/mL。

1.2 方法

1.2.1 动物造模:造模方法参照参考文献[6],除SHAM组外,其余各组均摘除卵巢,制作去卵巢骨质疏松大鼠模型。

1.2.2 造模干预:各组大鼠于术后2周开始干预,SHAM组、OVX组用等量生理盐水灌胃,A组、B组、C组分别用不同浓度中药灌胃,阳性药物组将 E_2V 按0.2 mg/kg灌胃,100 g/mL持续灌胃90 d。

1.2.3 动物取材:药物干预结束后处死动物,取右侧股骨及胫骨测定BMD、BMC,左侧股骨制作病理组织HE染色切片,分离血清备用。

1.2.4 BMD及BMC测定:采用美国Hologic Discovery W型双能X射线骨密度仪,对大鼠股骨、胫骨行单根摆放骨密度扫描。

1.2.5 骨组织HE染色:甲醛固定,脱钙,常规包埋、石蜡切片脱蜡至水洗、苏木素染色、伊红复染、脱水封片,显微镜镜检。

1.2.6 血清指标检测:送入江西中医药大学附属医院检验科,检测 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、ALP、E2含量。采用ELISA检测试剂盒,按说明书要求检测OPG、RANKL、RANK含量。

1.3 统计学分析

通过SPSS 17.0统计软件对数据进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合方差齐性,多组比较采用单因素方差分析,如不符合则采用Dunnett's T3比较,组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨及胫骨BMD、BMC含量比较
与SHAM组比较,除C组股骨BMD、阳性药物

组股骨及胫骨 BMD 无显著差异外 ($P>0.05$), OVX 组及各给药组股骨及胫骨 BMD、BMC 均明显降低 ($P<0.05$); 与 OVX 组比较, 除 A 组股骨及胫骨 BMD、股骨 BMC 无显著差异 ($P>0.05$) 外, 各给药组的股骨及胫骨 BMD、BMC 均不同程度升高 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠股骨及胫骨的骨密度和骨矿物质含量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Bone mineral density and bone mineral content in the femur and tibia of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	BMD/(g/cm ²)		BMC/g	
		股骨	胫骨	股骨	胫骨
SHAM	8	0.282±0.013 [*]	0.28±0.01 [*]	0.154±0.024 [*]	0.146±0.025 [*]
OVX	8	0.236±0.016 [#]	0.228±0.012 [#]	0.075±0.014 [#]	0.071±0.016 [#]
A 组	8	0.245±0.016 [#]	0.238±0.022 [#]	0.08±0.011 [#]	0.09±0.012 ^{*#}
B 组	8	0.256±0.02 ^{*#}	0.259±0.01 ^{*#}	0.093±0.007 ^{*#}	0.099±0.012 ^{*#}
C 组	8	0.268±0.016 [*]	0.264±0.012 ^{*#}	0.101±0.012 ^{*#}	0.125±0.01 ^{*#}
E ₂ V	8	0.271±0.009 [*]	0.269±0.014 [*]	0.131±0.018 ^{*#}	0.121±0.012 ^{*#}

注: 与 OVX 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 SHAM 组比较, [#] $P<0.05$ 。

2.2 各组骨显微结构比较

骨组织切片检查示, SHAM 组骨小梁粗细均匀, 结构完整, 间隙小; 与 OVX 组相比, 各给药组骨组织形态均有不同程度的改善, OVX 组和 A 组骨髓腔变

大, 骨小梁变细、间隙增大, 结构缺失严重, B 组骨小梁增多、疏松, 但结构仍不完整, C 组和阳性药物组骨皮质与骨髓分界清晰、结构完整, 基本接近正常。见图 1。

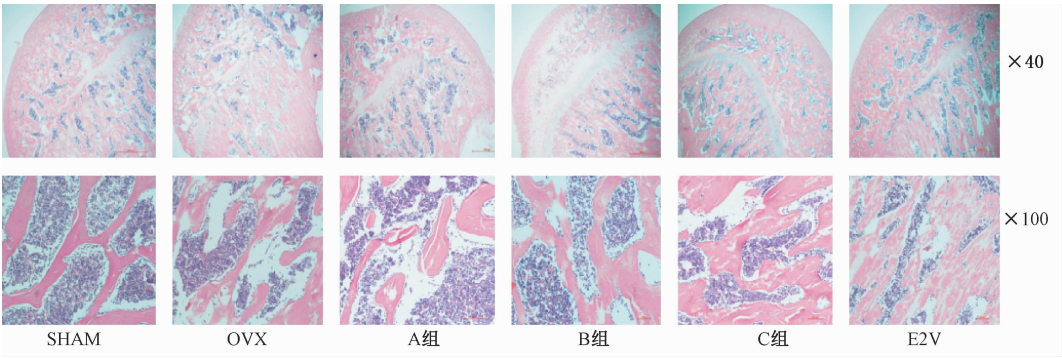


图 1 加味阳和汤对骨质疏松大鼠股骨组织形态学的影响

Fig.1 Effect of Jiaweiyanghe decoction on the histomorphology of the osteoporotic rat femur

2.3 各组骨代谢指标比较

与 SHAM 组比较, 除阳性药物组 P^{3-} 无显著差异外 ($P>0.05$), OVX 组及各给药组血清 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 均明显降低 ($P<0.05$), ALP 均明显升高 ($P<$

0.05); 与 OVX 组比较, A 组对 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 及 B 组对 P^{3-} 水平均有升高作用, 但无显著差异 ($P>0.05$), 其余各给药组均能显著升高血清 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 同时降低 ALP ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组中大鼠血清 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、ALP、E2 的水平 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Serum levels of Ca^{2+} , P^{3-} , ALP, and E2 in each rat group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Ca^{2+} /(mmol/L)	P^{3-} /(mmol/L)	ALP/(U/L)	E2/(pg/mL)
SHAM	8	2.92±0.07 [*]	2.85±0.30 [*]	168.25±9.63 [*]	32.69±3.81 [*]
OVX	8	2.61±0.06 [#]	2.21±0.30 [#]	293.75±4.05 [#]	16.74±2.63 [#]
A 组	8	2.67±0.03 [#]	2.30±0.34 [#]	205.63±5.74 ^{*#}	18.52±2.79 [#]
B 组	8	2.72±0.05 ^{*#}	2.45±0.19 [#]	197.75±8.71 ^{*#}	21.12±1.16 ^{*#}
C 组	8	2.76±0.07 ^{*#}	2.51±0.29 ^{*#}	194.13±9.03 ^{*#}	25.42±2.85 ^{*#}
E ₂ V	8	2.83±0.07 ^{*#}	2.58±0.19 [*]	188.25±3.70 ^{*#}	28.96±3.60 ^{*#}

注: 与 OVX 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 SHAM 组比较, [#] $P<0.05$ 。

2.4 各组血清 OPG、RANKL、RANK 水平比较

与 SHAM 组比较, 除与阳性药物组 RANK 上升

但无显著差异外 ($P>0.05$), OVX 组及各给药组大鼠血清 OPG 均明显降低 ($P<0.05$), RANKL、RANK 均明显升高 ($P<0.05$); 与 OVX 组比较, A 组对 OPG

水平具有升高作用, 同时可抑制 RANKL, 但无显著差异 ($P>0.05$), 其余各给药组均能显著降低血清 RANKL、RANK 同时升高 OPG ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 OPG、RANKL、RANK 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)
Table 3 Comparison of serum levels of OPG, RANKL, and RANK between each rat group ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	OPG	RANKL	RANK
SHAM	8	2 046.63±119.49 *	100.50±7.35 *	98.75±4.87 *
OVX	8	942.75±110.43 [#]	174.50±8.20 [#]	154.13±7.69 [#]
A 组	8	1 045.00±109.55 [#]	167.75±7.92 [#]	133.88±12.93 * [#]
B 组	8	1 118.13±88.48 * [#]	155.88±8.19 * [#]	124.63±18.73 * [#]
C 组	8	1 309.88±93.42 * [#]	141.50±6.48 * [#]	117.88±4.78 * [#]
E2V	8	1 401.88±74.66 * [#]	130.50±10.50 * [#]	107.75±8.29 *

注: 与 OVX 组比较, * $P<0.05$; 与 SHAM 组比较, [#] $P<0.05$ 。

3 讨论

去卵巢所致骨质疏松大鼠模型, 类似于人 PMOP 状态, 稳定, 成功率高, 常用于 PMOP 动物模型的制作^[7]。中医认为骨质疏松症为“骨萎”, 治疗中主要以补肾精、益骨髓为主。加味阳和汤是江西中医药大学许鸿照教授针对 PMOP 患者在阳和汤基础上加味鸡血藤、汉防己、木瓜而来的经验名方, 有益骨髓、补肝肾、活血络之功。鹿角胶组能抑制破骨细胞增殖, 抑制骨吸收; 鸡血藤能促进 MC3TW-E1 细胞增殖, 提高细胞 ALP 活性^[8-9]。

本研究结果显示, OVX 组大鼠股骨及胫骨 BMD、BMC 降低, 骨小梁变细、间隙增大、结构缺失, 说明去卵巢骨质疏松大鼠造模成功。各给药组大鼠股骨及胫骨 BMD、BMC 均不同程度的升高, 骨小梁增粗, 间隙减小, 说明加味阳和汤及其拆方能增强去卵巢骨质疏松大鼠的骨骼强度, 提高骨量。测定骨形成标志物 ALP 和 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 能有效的反映骨代谢情况^[10-12], 实验结果显示, OVX 组大鼠血清 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 下降, ALP 上升, 提示去卵巢骨质疏松大鼠骨矿沉积不足, 骨形成减少, 骨代谢活跃, 骨量丢失, 符合人 PMOP 状态。各给药组大鼠血清 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、E2 均不同程度上升, 同时均可降低 ALP, 揭示加味阳和汤及其拆方具有类雌激素样作用, 可不同程度的加速骨矿物质的沉积, 促进骨形成, 降低骨代谢, 抑制骨量丢失, 其中 A 组对骨代谢有一定影响但无明显差异。

PMOP 的发生与 OPG/RANKL/RANK 轴关系密切, PMOP 患者由于雌激素水平下降, 使得体内 OPG 的表达降低, RANKL、RANK 表达升高, 破骨细胞数量增加, 骨吸收加快^[13-16]。实验结果显示,

OVX 组大鼠血清 OPG 下降, 血清 RANKL、RANK 上升, 各给药组大鼠血清 OPG 水平均不同程度上升, 血清 RANKL、RANK 水平均不同程度下降, 提示加味阳和汤及其拆方防治 PMOP 可能的机制是调节 OPG/RANKL/RANK 轴, 从而调控成骨及破骨细胞, 抑制骨吸收, 减少骨量丢失。

多数学者对中药治疗骨萎病的研究^[17]集中于补益肝肾中药, 对活血及引经调和中药、中药复方中君臣佐使相互配伍之后“药力”的表达研究较少。因此, 加味阳和汤中补益肝肾中药及其配伍活血及引经调和中药后治疗 PMOP 是否会使药物的疗效得以增强、加味阳和汤中君臣佐使相互配伍之后“药力”是否得到了充分表达、PMOP 的发生与 OPG/RANKL/RANK 轴之间的关系等, 基于 OPG/RANKL/RANK 轴观察加味阳和汤及其拆方对去卵巢骨质疏松大鼠的影响则能很好的探讨上述问题。

综上所述, 加味阳和汤能够通过调节 OPG/RANKL/RANK 轴, 提高去卵巢骨质疏松大鼠 BMD、BMC, 降低骨代谢, 改善骨显微结构, 从而发挥治疗作用。加味阳和汤及其拆方抗骨质疏松作用为 C 组>B 组>A 组, 在君臣药的基础上, 配伍佐药及使药后能显著增强抗骨质疏松作用, 其作用机制可能是在君臣药补肾温阳基础上与活血中药相配合并辅以引经调和中药, 能更好的延缓骨量丢失, 防治 PMOP。加味阳和汤防治 PMOP, 具体的影响机制还不明确, 且中药复方具有多通路、多靶点的特点, 可能还具有其它作用机制; 采用不同的拆方方式使加味阳和汤中有效中药得以进一步筛选, 缩小寻找治疗 PMOP 有效药物的范围, 这些均是本课题组以后工作的重点。