

## 壮骨止痛方对骨质疏松大鼠核因子 $\kappa$ B 受体活化因子配体和骨保护素的影响\*

杨 军<sup>1</sup>, 曲 璇<sup>1</sup>, 莫新民<sup>2</sup>, 张博涵<sup>3</sup>

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007;

3. 上海振华综合高级中学, 上海 200120)

**摘要:**目的 探讨壮骨止痛方对骨质疏松大鼠核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK)、核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)表达的影响。方法 将实验动物分为假手术组、模型组、壮骨止痛方高剂量治疗组、壮骨止痛方低剂量治疗组、雌二醇组 5 组,用酶联免疫法测定大鼠血清中 OPG、RANKL 的水平。结果 模型组大鼠血清 OPG 降低、RANKL 水平升高,经壮骨止痛方药物干预后,大鼠血清 OPG 水平明显下降、RANKL 水平明显下降。结论 壮骨止痛方药物可以降低大鼠血清 RANKL/OPG 的比值,激活 RANKL/RANK/OPG 信号系统,达到预防治疗骨质疏松的作用。

**关键词:** 壮骨止痛方; 骨保护蛋白; 核因子  $\kappa$ B 受体活化因子; 核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)06-0014-03

**DOI:** 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.004

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是以骨量减少,骨小梁变细、断裂、数量减少,皮质骨多孔、变薄等骨的微观结构退化为特征的一种全身性骨病<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化的迅速到来,骨质疏松症已成为严重的社会问题,其发病率已经跃居世界各种常见病的第 7 位<sup>[2]</sup>。壮骨止痛方是湖南省名中医莫新民教授研发而成,已经获得国家新药证书[国药证字 Z20050125],对绝经后骨质疏松症有良好疗效<sup>[3-6]</sup>。本研究以经典的骨质疏松动物模型,用壮骨止痛方药物进行干预治疗,检测大鼠血清中 OPG、RANKL 的浓度及 RANKL/OPG 比值变化,从而揭示壮骨止痛方预防治疗骨质疏松的作用机制。

### 1 材料

#### 1.1 实验药物

壮骨止痛方(补骨脂、淫羊藿、枸杞、党参、白术、芍药、骨碎补、丹参、甘草)药物由陕西中医药大学附属医院药剂科提供,动物灌胃前制备成混悬液,戊酸雌二醇(生产企业:拜耳医药保健有限公司广州分公司,药品批准文号:国药准字 J20130009)

#### 1.2 实验动物

SD 大鼠 50 只,SPF 级,体质量(200±20)g,雌鼠,购自第四军医大学实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)2012-0007。动物饲养于清洁级饲养室,期间自由饮水、摄食,室温 20~25℃,湿度 40%~70%,光照周期 12h/12h,通风良好。

#### 1.3 试剂与仪器

青霉素(华北制药股份有限公司,国药准字 H13020655);大鼠骨保护素(OPG)ELISA 检测试剂盒,大鼠核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配基(RANKL)ELISA 检测试剂盒均购自(E20160801A,苏州尔卡文生物科技有限公司)。ELX808-IU 酶标仪(美国宝特);BT-25S 型电子天平(上海),0.5~10μL、2~20μL、1~200μL、200~1000μL 移液枪。

### 2 方法

#### 2.1 动物造模

参照文献[7]方法复制雌性大鼠去卵巢 3 个月的绝经后骨质疏松症模型,取同批次 250g 左右的雌性 SD 大白鼠共 40 只,月龄 10~12 个月。按体质量将大鼠随机分为假手术组、模型组、壮骨止痛方高剂量治疗组(13.2g/kg/d)、壮骨止痛方低剂量治疗

\* 基金项目: 陕西省教育厅自然专项计划基金项目(15JK1212)

收稿日期: 2016-10-12

作者简介: 杨军(1971-),男,甘肃兰州人,医学博士,讲师,主治医师,主要从事经方治疗老年病的研究与临床。

组(3.3g/kg/d)、雌二醇组(0.167mg/kg/d)共5组,每组10只。除假手术组外,其余4组均切除双侧卵巢造成绝经后骨质疏松症病理模型。

## 2.2 给药方法

假手术组和模型组每天灌胃以相应体积冷水,壮骨止痛方治疗组、雌二醇组灌胃以相应药物,剂量按成人剂量及大鼠体表面积折算确定。各组均从第5天拆线后开始给药,每天灌胃1次,连续12周。(造模开始第1天开始给药,连续3月,实验过程中,可能由于术后处理不当,模型组和低剂量组各有一只肠胀气死亡)。

## 2.3 标本采集

给药12周,最后1次灌胃后2h,人道主义处死各组大鼠,从腹主动脉取血,分离血清后,再转入-80℃冰箱中保存备用待分析。

## 2.4 指标检测

指标检测前,严格按试剂盒说明书进行相关项目的测定。主要测定大鼠血清 OPG, RANKL 比率变化,方法为酶联免疫分析。

## 2.5 统计学方法

用 SPSS16.0 软件包分析,实验设计为多因素非平衡的组合类型,将组别拆分成两个组合进行比较,即模型组与空白组进行比较,模型组与观察组、

对照组进行比较,实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,先进行正态分析,符合要求后各组间差异分别采用单因素方差分析和  $t$  检验, $P$  值小于 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

结果如表1所示:①与假手术组比较,模型组大鼠血清中 OPG 含量明显下降( $P<0.01$ )说明绝经后骨质疏松症大鼠造模成功;与模型组比较,壮骨止痛方高剂量给药组和雌二醇阳性药组大鼠血清中 OPG 含量明显升高( $P<0.01$ ),壮骨止痛方低剂量给药组血清中 OPG 含量也显著升高( $P<0.05$ ),提示壮骨止痛方药物对升高绝经后骨质疏松症大鼠血清 OPG 含量有较好作用。②与假手术组比较,模型组大鼠血清中 RANKL 含量明显升高( $P<0.01$ ),有显著差异;与模型组比较,壮骨止痛方高剂量给药组和雌二醇阳性药组大鼠血清中 RANKL 含量明显下降( $P<0.01$ ),壮骨止痛方低剂量给药组血清中 RANKL 含量显著下降( $P<0.05$ ),提示壮骨止痛方药物对降低绝经后骨质疏松症大鼠血清 RANKL 含量有较好作用。③与假手术组比较,模型组大鼠血清中 RANKL/OPG 比值明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,壮骨止痛方高剂量给药组、低剂量给药组和雌二醇阳性药组大鼠血清中 RANKL/OPG 比值明显下降( $P<$

表1 各组大鼠血清中 OPG、RANKL 含量及 RANKL/OPG 的变化

| 组别        | $n$ | OPG/(ng·mL <sup>-1</sup> )    | RANKL/(pg·mL <sup>-1</sup> )   | RANKL/OPG                        |
|-----------|-----|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 假手术组      | 10  | 2.295 $\pm$ 0.52              | 22.79 $\pm$ 1.47               | 0.011 $\pm$ 0.002                |
| 模型组       | 9   | 1.46 $\pm$ 0.14 <sup>##</sup> | 33.4 $\pm$ 4.19 <sup>##</sup>  | 0.023 $\pm$ 0.006 <sup>**</sup>  |
| 雌二醇阳性药组   | 10  | 2.23 $\pm$ 0.36 <sup>**</sup> | 23.93 $\pm$ 1.04 <sup>**</sup> | 0.011 $\pm$ 0.002 <sup>**</sup>  |
| 壮骨止痛方高剂量组 | 10  | 2.11 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup> | 24.18 $\pm$ 1.29 <sup>**</sup> | 0.011 $\pm$ 0.0016 <sup>**</sup> |
| 壮骨止痛方低剂量组 | 9   | 1.785 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>  | 25.68 $\pm$ 3.01 <sup>*</sup>  | 0.014 $\pm$ 0.003 <sup>**</sup>  |

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

0.01),提示壮骨止痛方药物对降低绝经后骨质疏松症大鼠血清 RANKL/OPG 比值有较好作用。

## 4 讨论

壮骨止痛方由补骨脂、淫羊藿、枸杞、党参、白术、芍药、骨碎补、丹参、甘草9味药物组成,具有补益肝肾、壮骨止痛之功。

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的新成员,也被称为破骨细胞抑制因子,具有抑制破骨细胞的功能,破骨细胞的分化过程需要成骨细胞参与,成骨细胞分泌 OPG 配体 OPGL 和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)两种细胞

活性因子,通过旁分泌途径调节破骨细胞的生成。OPG 主要作用于破骨细胞分化的末期阶段,不但能阻断成骨细胞,还能抑制破骨细胞的生成、成熟破骨细胞的存活及其骨吸收活性<sup>[8]</sup>,在本实验中,模型组大鼠血清 OPG 含量明显下降,但是经过壮骨止痛方干预后,尤其是高剂量组药物干预后,OPG 含量明显上升( $P<0.01$ ),低剂量药物也有良好效果( $P<0.05$ ),说明壮骨止痛方可能通过抑制破骨细胞的生成,从而达到治疗骨质疏松的作用。

核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)是一种具有诱导破骨细

胞分化、发育功能Ⅱ型跨膜蛋白,是调控破骨细胞分化激活的细胞因子,此种蛋白的表达显著,使破骨细胞作用增强,从而加速骨质疏松的形成<sup>[9-10]</sup>。在本实验中,与假手术组相比,模型组大鼠血清中 RANKL 含量明显升高( $P<0.01$ ),经过壮骨止痛方药物干预后,与模型组比较,壮骨止痛方高剂量组和雌二醇阳性药组大鼠血清中 RANKL 含量明显下降( $P<0.01$ ),壮骨止痛方低剂量组血清中 RANKL 含量显著下降( $P<0.05$ ),说明壮骨止痛方可以降低大鼠 RANKL 在血清中的表达,抑制破骨细胞,达到治疗骨质疏松的药效。

RANKL/RANK/OPG 系统是近年来发现的在骨重建和破骨细胞分化过程中的一个重要信号通路。RANK 是一种激动因子,可和破骨前体细胞表面的 RANKL 结合,当 RANK 被激活后,破骨细胞便开始分化成熟,大量活化的破骨细胞造成溶骨性骨吸收。OPG 是一种可溶性抑制蛋白,是 RANKL 的竞争性抑制剂,与 RANK 竞争 RANKL,从而抑制破骨前体细胞的分化和成熟。RANKL 和 OPG 的表达水平反映了骨吸收的程度。一般来说,当 RANKL/OPG 的比例上升时,破骨细胞的数量和活性将增加,RANKL/OPG 的比例下降时破骨细胞的数量和活性将降低。RANKL/OPG 的比值是 RANKL/RANK/OPG 系统最终效应的决定性因素<sup>[11]</sup>。本实验显示,与假手术组比较,模型组大鼠 RANKL/OPG 比值上升明显( $P<0.01$ ),但经过壮骨止痛方干预后,无论是高剂量组还是低剂量组,RANKL/OPG 比值下降较为明显( $P<0.01$ ),说明壮骨止痛方药物可以通过调节 RANKL/OPG 的比值来影响 RANKL/RANK/OPG 系

统,达到治疗骨质疏松的临床疗效。

#### 参考文献:

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京:科技出版社,1998:142.
- [2] Hanley DA, Josse RG. Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the Scientific Advisory Board of the Osteoporosis Society of Canada. 1. Introduction [J]. CMAJ, 1996, 155(7): 921-923.
- [3] 杨军, 张小莉, 刘仕杰, 等. 齐墩果酸对去卵巢骨质疏松症雌鼠的疗效及机理研究[J], 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1564-1565.
- [4] 莫新民, 曾英, 洪净. 去卵巢后雌鼠骨质疏松症模型相关局部因子检测 [J], 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(4): 37-38.
- [5] 刘仕杰, 莫新民, 李劲平, 等. 淫羊藿苷对去卵巢骨质疏松症雌鼠的疗效及机理初步研究[J], 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(3): 271-272.
- [6] 杨军, 张小莉, 莫新民. 基于蛋白质组学壮骨止痛方治疗骨质疏松症的作用机理研究 [J], 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 817-820.
- [7] 李素萍. 骨质疏松动物模型的研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3767-3770.
- [8] Baudhuin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, et al. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2007, 7(2): 221-232.
- [9] 艾纯华, 贾全章, 卞传华, 等. 骨保护素及临床应用[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(23): 3615-3618.
- [10] 仲蕾蕾, 杨冰, 黄晓斌, 等. OPG/RANKL/RANK 系统在成骨细胞和破骨细胞相互调节中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(11): 1010-1013.
- [11] 邓博, 贾丽群, 高福云, 等. 三骨汤对骨转移癌 OPG 和 RANKL 表达的调节作用 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1390-1392.

(编辑:徐建平)

### Effect of Strong Bone Pain Side All on Receptoractivator of NF- $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin in Osteoporosis Rats

YANG Jun<sup>1</sup>, QU Xuan<sup>1</sup>, MO Xinming<sup>2</sup>, ZHANG Bohan<sup>3</sup>

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

3. Shanghai Zhenhua Comprehensive High School, Shanghai 200120, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To study about Strong Bone Pain Side All action on osteoporosis female on the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK), receptoractivator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). **Methods** Rat was randomly divided into five groups: control group, OP model group and Strong Bone Pain Side All high dose treatment group, Strong Bone Pain Side All lower dose treatment groups, estradiol group. Determination of OPG and RANGKL in rat serum by ELISA. **Results** Serum OPG of model group rats decreased and RANGKL levels increased, rats serum OPG levels increased and RANGKL levels decreased significantly by strong Bone Pain Side All intervention. **Conclusion** Strong Bone Pain Side All can reduce rats serum RANKL/OPG ratio, activation of RANKL/RANK/OPG signal system, achieve the prevention and treatment of osteoporosis.

**KEY WORDS:** Strong Bone Pain Side All; OPG; RANK; RANKL