

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.16.013

知母-黄柏药对对卵巢切除骨质疏松症模型大鼠股骨微结构及骨脂分化的影响

李春财, 原明星, 李嘉炜, 邓静, 申重阳, 刘渊[✉]

成都中医药大学, 四川省成都市温江区柳台大道1166号, 611137

[摘要] **目的** 探究知母-黄柏药对缓解绝经后骨质疏松症(PMOP)的可能作用机制。**方法** 将60只未孕雌性SD大鼠随机分成空白组、模型组、知母-黄柏低剂量组、知母-黄柏高剂量组和雌二醇组, 每组12只。除空白组外, 其余各组大鼠切除双侧卵巢构建PMOP大鼠模型, 空白组大鼠仅切除卵巢周围少量脂肪组织。大鼠卵巢切除1周后, 知母-黄柏低、高剂量组分别给予知母和黄柏浓缩液1.8、7.2 g/(kg·d)灌胃, 雌二醇组给予雌二醇溶液0.09 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组给予10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃, 均每天1次, 持续12周。取材前记录大鼠体质量, 取大鼠完整子宫并计算子宫指数; ELISA法检测血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平; Micro CT检测股骨微结构相关参数[包括骨体积/组织体积(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨密度(BMD)、骨小梁分离度(Tb.Sp)和皮质骨面积(Ct.Ar)]; HE染色法观察股骨病理学变化; RT-qPCR法检测股骨组织中骨脂分化相关因子[包括Runt相关转录因子2(*Runx2*)、骨形态发生蛋白2(*BMP-2*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (*PPAR γ*)、趋化素(*Chemerin*)、趋化因子样受体1(*CMKLR1*)] mRNA表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠体质量升高, 子宫指数、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、BMD降低, Tb.Sp和血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高, 股骨组织中*Runx2*、*BMP-2* mRNA表达降低, *PPAR γ* 、*Chemerin*和*CMKLR1* mRNA表达升高($P<0.01$); HE染色显示, 股骨组织骨小梁数量减少、排列稀疏, 髓腔明显增大, 含有大量脂肪细胞。与模型组比较, 知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组上述各指标均有不同程度改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$); HE染色显示, 骨小梁数量明显增多, 排列较整齐, 脂肪细胞明显减少。与知母-黄柏低剂量组比较, 知母-黄柏高剂量组子宫指数、BMD升高, 体质量及*PPAR γ* 、*Chemerin* mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与知母-黄柏高剂量组比较, 雌二醇组子宫指数、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、BMD及*BMP-2* mRNA表达降低, IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平, Tb.Sp及*PPAR γ* 、*Chemerin*、*CMKLR1* mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 知母-黄柏药对可以缓解PMOP骨质流失, 其作用机制与降低炎症因子水平, 纠正骨髓间充质干细胞骨脂分化紊乱, 促进骨髓间充质干细胞成骨细胞分化有关。

[关键词] 绝经后骨质疏松症; 知母; 黄柏; 骨脂分化; 炎症因子; 股骨微结构

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是因绝经后妇女雌激素骤降而导致骨量减少、骨微结构破坏的代谢性疾病, 可引起骨骼变形和疼痛, 增加骨折风险, 降低绝经后女性的生活质量^[1]。成骨细胞和破骨细胞平衡破坏是导致骨量减

少、骨微结构破坏的直接原因, 成骨细胞的前体细胞骨髓间充质干细胞(BMSCs), 可分化为成骨细胞或脂肪细胞, 其分化状态直接影响骨形成和骨稳态的维持^[2]。绝经后女性雌激素下降会引起机体慢性炎症, 导致BMSCs骨脂分化紊乱, 成骨分化减少, 成脂分化增加, 骨形成不足而引起骨质流失^[3]。缓解慢性炎症, 纠正BMSCs骨脂分化紊乱, 增加成骨分化, 减少成脂分化是治疗PMOP的有效

基金项目: 国家自然科学基金(82174226); 四川省自然科学基金(2025ZNSFSC0620); 四川省中医药管理局科技项目(2023MS399)

✉ 通讯作者: liuy60s@sina.com

方法^[4]。课题组前期理论研究^[5]发现, 阴虚火旺、虚火蚀骨导致的骨痿与女性绝经后 BMSCs 骨脂分化紊乱介导的骨质疏松症临床特征高度契合。知母-黄柏是滋阴降火的代表药对, 常用于 PMOP 的治疗, 如二仙汤^[6]和知柏地黄丸^[7]等均含有此药对。为探究滋阴降火法对 PMOP 的影响, 本研究从股骨微结构和骨脂分化角度探索知母-黄柏药对对 PMOP 的可能作用机制。本研究已获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批件号:2024358)。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级未孕雌性 SD 大鼠 60 只, 8 周龄, 体质量为 200~220 g, 购自北京市华阜康有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0008。所有大鼠饲养于温度(22±2)℃、湿度(65±5)%、自然光照为 12 h 的 SPF 级屏障实验室环境中。

1.2 药物

知母(批号:20220513)、黄柏(批号:Y2208009)购自北京同仁堂, 知母、黄柏以 1:1 比例加水煎煮并浓缩, 配制成 0.18 g/ml 和 0.72 g/ml 的浓缩液。戊酸雌二醇片(国药准字: J2017103, 拜耳医药保健有限公司), 研磨成粉后用纯净水配制成浓度 0.009 mg/ml 溶液。

1.3 主要试剂和仪器

苏木素染液(货号: CR22002071), 武汉塞维生物技术有限公司; 伊红染液(货号: YE2080)、15% EDTA 脱钙液(货号: YE0105), 合肥博美生物科技有限责任公司; 戊巴比妥钠(货号: P3761), Sigma 公司; 大鼠白细胞介素 1β(IL-1β)、大鼠白细胞介素 6(IL-6)、大鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α) ELISA 试剂盒(货号分别为 E-EL-R0012C、E-EL-R0015C、E-EL-R2856c), Elabscience 公司; RNA 提取试剂盒(货号: R220901), 成都福际生物技术有限公司; 逆转录试剂盒(货号: 7E650I2)、SYBR qPCR Master Mix(货号: 7E501K1), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

Skyscan1276 型微电脑断层扫描器, 比利时 Bruker 公司; 徕卡 2016 转轮式切片机, 德国 Leica 公司; BMJ-A 组织包埋机, 常州郊区中威电子仪器厂; BA210Digital 数码三目摄像显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; DNM-9602G 酶标仪分析仪, 北京普朗新技术有限公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组与造模方法

将大鼠按照随机数字表法分成空白组、模型组、知母-黄柏低剂量组、知母-黄柏高剂量组、雌二醇组, 每组 12 只, 分笼饲养, 每笼 6 只。除空白组外, 其余各组大鼠按照参考文献[8]方法构建 PMOP 大鼠模型: 大鼠俯卧位, 剔除双侧肋骨后缘及腰背部体毛, 在肋骨下缘与脊柱交接处作切口, 无菌丝线结扎卵巢周围血管后切除双侧卵巢, 术后涂抹碘伏以防止感染和大鼠撕咬伤口。空白组大鼠仅切除卵巢周围少量脂肪组织。术后 12 周大鼠股骨微结构破坏、骨密度降低, 即 PMOP 模型造模成功^[9]。

1.5 给药方法

知母和黄柏的成人临床用药剂量为 10 g/天, 雌二醇为 1 mg/天。卵巢切除 1 周后, 根据人和大鼠之间的体表面积计算公式, 换算系数为 6.3^[10], 知母-黄柏低、高剂量组分别给予知母和黄柏浓缩液 1.8、7.2 g/(kg·d) 灌胃, 其中低剂量为临床等效剂量; 雌二醇组给予雌二醇溶液 0.09 mg/(kg·d) 灌胃; 空白组和模型组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 1 次, 持续 12 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 观察一般情况与体质量 每周观察大鼠的饮食、毛发、精神活动状况。

1.6.2 ELISA 法检测血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平 末次给药后禁食 12 h, 记录大鼠体质量。称重后用 3% 戊巴比妥钠 2 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 行腹主动脉取血, 静置后装入离心管中, 4℃、3000 r/min 离心 20 min (离心半径 10 cm), 取上层血清, 于 -80℃ 冰箱中保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤, 检测血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平。

1.6.3 测定子宫指数 腹主动脉取血后取出大鼠完整子宫, 予生理盐水冲洗干净, 吸水纸吸净水分, 采用电子分析天平称重, 根据公式^[11]计算子宫指数, 子宫指数=子宫重量/大鼠体质量。

1.6.4 Micro CT 检测股骨微结构相关参数 采用随机数字表法各组选取 3 只大鼠分离右侧股骨, 剔除肌肉及周围结缔组织后用多聚甲醛固定 24 h, 随后用于股骨微结构相关参数检测。扫描区域为生长板下 2 mm, 向下延伸 3 mm。获得平面图像后通过 NRecon(V1.7.4.2) 软件进行 3D 重建, 采用 CTan 1.20.8.0 软件进行定量分析, 检测指标为: 骨体积/组织体积(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨

小梁厚度 (Tb. Th)、骨密度 (BMD)、骨小梁分离度 (Tb. Sp) 和皮质骨面积 (Ct. Ar)。

1.6.5 HE 染色法观察股骨病理学变化 将 1.6.4 中经多聚甲醛固定 24 h 的右侧股骨置于 15% EDTA 脱钙液中, 3 天更换一次脱钙液并观察脱钙效果, 直至完成脱钙。随后进行股骨脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡至水中后, HE 染色, 脱水、透明、封片后镜检, 观察股骨病理学变化。

1.6.6 RT-qPCR 法检测股骨组织中骨脂分化相关因子 mRNA 表达 各组大鼠均提取左侧股骨组织, 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 逆转录得到 cDNA 后进行 PCR 检测。PCR 反应条件为: 95 ℃、3 min, 95 ℃、10 s, 60 ℃、30 s, 40 个循环。检测 Runt 相关转录因子 2 (*Runx2*)、骨形态发生蛋白 2 (*BMP-2*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (*PPAR γ*)、趋化素 (*Chemerin*)、趋化因子样受体 1 (*CMKLR1*) 的 mRNA 表达, 以 β -actin 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 定量分析数据, 引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 大鼠股骨组织中骨脂分化相关因子引物序列

Table 1 Primer sequences of osteogenic-adipogenic differentiation-related factors in rat femoral tissues

引物	序列	产物 长度/bp
<i>Runx2</i>	上游 TGTCCGCCACCACTCACTACC	136
	下游 GGGAAGTGATAGGATGCTGACGAAG	
<i>BMP-2</i>	上游 GAAAGGCAACAGAAGCCCAG	162
	下游 AGCAACACTAGAAGACAGCGG	
<i>PPARγ</i>	上游 GCCAAGGTGCTCCAGAAGATGAC	102
	下游 GTGAAGGCTCATGTCTGTCTCTGTC	
<i>Chemerin</i>	上游 CTGGGCACAGCGGACATACA	156
	下游 TGAGAAGAAGAGGTCATCAGCACT	
<i>CMKLR1</i>	上游 CAACTTCTTGCTCAGCCACAACATG	117
	下游 CGGATGCTGCGGTGTTCTG	
β -actin	上游 AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT	174
	下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	

注: *Runx2*, Runt 相关转录因子 2; *BMP-2*, 骨形态发生蛋白 2; *PPAR γ* , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; *Chemerin*, 趋化素; *CMKLR1*, 趋化因子样受体 1。

1.7 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐时多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's *t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠毛发紧密、有光泽, 进食及饮水、精神、运动状况均正常。与空白组比较, 模型组大鼠毛发疏松且部分有脱落现象、光泽度较差, 进食及饮水、精神、运动状况无明显差异。与模型组比较, 知母-黄柏低、高剂量组及雌二醇组大鼠毛发光亮、紧密, 其他状况无明显差异。与知母-黄柏低剂量组比较, 知母-黄柏高剂量组毛发较光亮、紧密, 雌二醇组毛发疏松, 其他状况均无明显差异。

2.2 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均降低 ($P<0.01$)。与知母-黄柏高剂量组比较, 雌二醇组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平均升高 ($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较

Table 2 Comparison of serum levels of IL-1 β , IL-6, and

TNF- α among rats in each group ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
空白组	12	2.99 $\pm$ 1.00	4.86 $\pm$ 1.33	0.68 $\pm$ 0.68
模型组	12	17.98 $\pm$ 1.26 ^{a)}	21.27 $\pm$ 2.79 ^{a)}	9.77 $\pm$ 1.09 ^{a)}
知母-黄柏低 剂量组	12	4.61 $\pm$ 1.13 ^{b)}	10.28 $\pm$ 1.04 ^{b)}	3.42 $\pm$ 0.89 ^{b)}
知母-黄柏高 剂量组	12	3.40 $\pm$ 1.12 ^{b)}	7.51 $\pm$ 1.31 ^{b)}	2.27 $\pm$ 0.77 ^{b)}
雌二醇组	12	6.18 $\pm$ 1.39 ^{b) c)}	11.97 $\pm$ 1.46 ^{b) c)}	4.06 $\pm$ 1.02 ^{b) c)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与知母-黄柏高剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠体质量和子宫指数比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量升高, 子宫指数降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 知母-黄柏高剂量组和雌二醇组体质量降低, 知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组子宫指数均升高 ($P<0.01$)。与知母-黄柏低剂量组比较, 知母-黄柏高剂量组体质量降低, 知母-黄柏高剂量组和雌二醇组子宫指数升高 ($P<0.01$)。与知母-黄柏高剂量组比较, 雌二醇组子宫指数降低 ($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠 Micro CT 检测股骨微结构相关参数比较

图 1 示, 空白组骨小梁为网络状, 数量多, 连接紧密。与空白组比较, 模型组骨髓腔空隙增大,

表 3 各组大鼠体质量和子宫指数比较

Table 3 Comparison of body mass and uterine index among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	子宫指数
空白组	12	304.10±9.87	0.071 2±0.004 2
模型组	12	340.70±16.77 ^{a)}	0.024 5±0.003 2 ^{a)}
知母-黄柏低剂量组	12	327.80±12.61	0.047 7±0.002 7 ^{b)}
知母-黄柏高剂量组	12	306.10±11.21 ^{b) c)}	0.062 5±0.005 6 ^{b) c)}
雌二醇组	12	316.50±11.78 ^{b)}	0.053 7±0.002 8 ^{b) c) d)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与知母-黄柏低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与知母-黄柏高剂量组比较， $P<0.01$ 。

骨小梁数量减少、排列稀疏，骨小梁间距较大，有断裂现象。与模型组比较，知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组骨小梁数量较多，连接较紧密，其中知母-黄柏高剂量组骨小梁数量最多、连接最紧密，低剂量组次之，雌二醇组骨小梁数量最少、排列较稀疏。表4示，与空白组比较，模型组大鼠股

骨微结构相关参数BV/TV、Tb. N、Tb. Th、BMD均减少，Tb. Sp增加 ($P<0.01$)。与模型组比较，知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组BV/TV、Tb. N、Tb. Th、BMD均增加，Tb. Sp减少 ($P<0.01$)。与知母-黄柏低剂量组比较，知母-黄柏高剂量组BMD增加，雌二醇组Tb. N、Tb. Th减少，Tb. Sp增加 ($P<0.05$)。与知母-黄柏高剂量组比较，雌二醇组BV/TV、Tb. N、Tb. Th、BMD均减少，Tb. Sp增加 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠股骨组织病理学变化比较

图2示，空白组大鼠股骨组织中骨小梁排列整齐、连续，脂肪细胞少。与空白组比较，模型组大鼠股骨组织中骨小梁数量减少、排列稀疏，髓腔明显增大，含有大量脂肪细胞。与模型组比较，知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组大鼠股骨组织中骨小梁数量明显增多，排列较整齐，脂肪细胞明显减少。三组给药组比较，知母-黄柏高剂量组大鼠股骨组织中脂肪细胞最少，雌二醇组脂肪细胞最多。

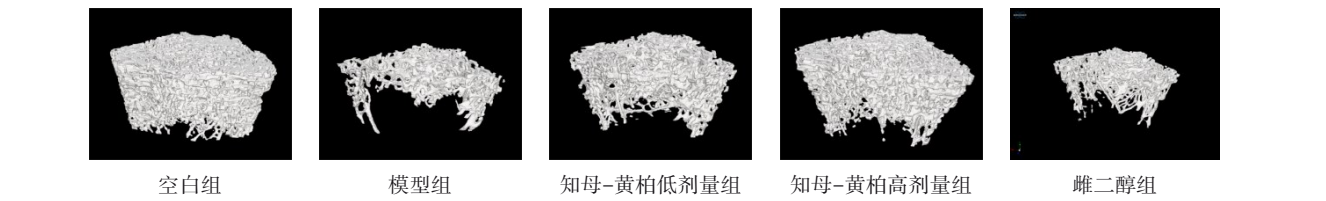


图 1 各组大鼠 Micro CT 检测股骨微结构三维重建图

Figure 1 Three-dimensional reconstruction images of femoral microstructure detected by Micro CT in rats of each group

表 4 各组大鼠 Micro CT 检测股骨微结构相关参数比较

Table 4 Comparison of femoral microstructure-related parameters detected by Micro CT among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BV/TV/%	Tb. N/ $1\cdot\text{mm}^{-1}$	Tb. Th/mm	BMD/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	Tb. Sp/mm	Ct. Ar/ mm^{-2}
空白组	3	33.78±2.68	3.22±0.11	0.102±0.001	0.35±0.02	0.22±0.04	4.82±0.08
模型组	3	9.85±0.90 ^{a)}	1.02±0.15 ^{a)}	0.086±0.001 ^{a)}	0.09±0.01 ^{a)}	1.09±0.05 ^{a)}	4.90±0.02
知母-黄柏低剂量组	3	23.34±1.31 ^{b)}	2.63±0.08 ^{b)}	0.097±0.002 ^{b)}	0.25±0.02 ^{b)}	0.42±0.04 ^{b)}	4.94±0.06
知母-黄柏高剂量组	3	27.43±2.70 ^{b)}	2.83±0.17 ^{b)}	0.098±0.002 ^{b)}	0.32±0.01 ^{b) c)}	0.35±0.03 ^{b)}	4.69±0.03
雌二醇组	3	19.43±1.35 ^{b) d)}	2.04±0.06 ^{b) c) d)}	0.094±0.001 ^{b) c) d)}	0.23±0.01 ^{b) d)}	0.59±0.05 ^{b) c) d)}	4.92±0.17

注：BV/TV，骨体积/组织体积；Tb. N，骨小梁数量；Tb. Th，骨小梁厚度；BMD，骨密度；Tb. Sp，骨小梁分离度；Ct. Ar，皮质骨面积。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与知母-黄柏低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与知母-黄柏高剂量组比较， $P<0.05$ 。

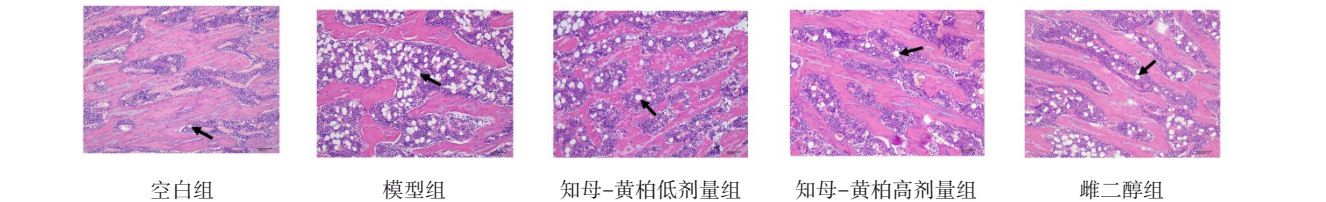


图 2 各组大鼠股骨组织病理学变化 (HE 染色，×100)

Figure 2 Pathological changes of femoral tissues in rats of each group (HE staining, ×100)

表 5 各组大鼠股骨组织中 *Runx2*、*BMP-2*、*PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达比较Table 5 Comparison of mRNA expressions of *Runx2*, *BMP-2*, *PPAR γ* , *chemerin* and *CMKLR1* in femoral tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

名称	鼠数	<i>Runx2</i>	<i>BMP-2</i>	<i>PPARγ</i>	<i>Chemerin</i>	<i>CMKLR1</i>
空白组	12	1.01±0.10	1.02±0.08	1.06±0.11	1.02±0.08	1.14±0.05
模型组	12	0.45±0.10 ^{a)}	0.47±0.04 ^{a)}	3.33±0.09 ^{a)}	2.60±0.10 ^{a)}	3.47±0.18 ^{a)}
知母-黄柏低剂量组	12	0.78±0.06 ^{b)}	0.78±0.05 ^{b)}	1.97±0.07 ^{b)}	1.81±0.14 ^{b)}	2.10±0.13 ^{b)}
知母-黄柏高剂量组	12	0.89±0.11 ^{b)}	0.91±0.10 ^{b)}	1.41±0.08 ^{b) c)}	1.40±0.11 ^{b) c)}	1.72±0.14 ^{b)}
雌二醇组	12	0.71±0.08 ^{b)}	0.71±0.07 ^{b) d)}	2.17±0.22 ^{b) d)}	1.92±0.19 ^{b) d)}	2.21±0.24 ^{b) d)}

注：*Runx2*，Runt 相关转录因子 2；*BMP-2*，骨形态发生蛋白 2；*PPAR γ* ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ；*Chemerin*，趋化素；*CMKLR1*，趋化因子样受体 1。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与知母-黄柏低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与知母-黄柏高剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠股骨组织中 *Runx2*、*BMP-2*、*PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达比较

表 5 示，与空白组比较，模型组大鼠股骨组织中 *Runx2*、*BMP-2* mRNA 表达降低，*PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，知母-黄柏低、高剂量组和雌二醇组大鼠股骨组织中 *Runx2*、*BMP-2* mRNA 表达升高，*PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与知母-黄柏低剂量组比较，知母-黄柏高剂量组大鼠股骨组织中 *PPAR γ* 、*Chemerin* mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与知母-黄柏高剂量组比较，雌二醇组大鼠股骨组织中 *BMP-2* mRNA 表达降低，*PPAR γ* 、*Chemerin*、*CMKLR1* mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。

3 讨论

根据临床症状 PMOP 属于中医学“骨痿”范畴，目前该病治疗多以肾精不足为立足点，以补肾中药为主展开研究^[12]。本课题组发现 PMOP 的发展经历两个阶段，前期以阴虚火旺为主，后期以肾精亏虚为主^[5]。女性五七阳明脉衰，气血生化乏源，不能充养肾精，肾精逐渐减少，虚火内生，随着时间推移，肾精亏虚日久，虚火亢盛日强，至女子七七任脉虚之时，虚火达到亢盛状态，出现潮热汗出、心烦失眠等症状^[13]。女子绝经后久虚之肾精不能速补，然亢盛之虚火可降，故滋阴降火是该阶段的主要治法。据此我们认为，阴虚火旺是 PMOP 发展的核心环节，虚火蚀骨是 PMOP 早期的主要病机。本研究结果显示，模型组大鼠毛发疏松，体质量升高，子宫指数降低，病理结果和股骨微结构相关参数提示骨质流失严重，表明大鼠卵巢切除成功后向骨质疏松症发展。与模型组比较，各给药组大鼠毛发光亮、紧密，体质量降低、子宫指数升高、骨质流失减少，且知母-黄柏高剂量组改

善效果最佳，说明知母-黄柏药对可有效减缓卵巢切除大鼠的骨质流失。

有研究^[14]认为，BMSCs 是肾精在细胞层面的表达，肾精不足或者阴虚火旺可导致 BMSCs 分化异常。因此，我们推测“虚火蚀骨”介导的 PMOP 可能与炎症因子引起 BMSCs 分化紊乱有关。有研究发现，绝经后女性雌激素下降，机体处于慢性炎症表型，炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高^[15]，导致 BMSCs 分化偏差，出现骨脂分化紊乱^[16-18]。本研究结果显示，模型组大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高，股骨组织中骨小梁数量减少且含有大量脂肪细胞，表明卵巢切除后大鼠炎症反应增加，BMSCs 骨脂分化紊乱，成骨分化减少，成脂分化增加。给药后，知母-黄柏低、高剂量组血清中炎症因子水平均降低，股骨组织中骨小梁数量增加、脂肪细胞数量减少，且知母-黄柏高剂量组的改善效果优于雌二醇组，表明知母-黄柏药对可通过下调炎症因子表达，纠正 BMSCs 骨脂分化紊乱，缓解雌激素缺乏介导的骨质流失。

BMSCs 的骨脂分化受成骨信号通路和成脂信号通路调节，成骨分化与 BMP-2 密切相关，BMP-2/Smads/Runx2 通路激活可促进 BMSCs 成骨分化，并抑制其分化为脂肪细胞^[19]。成脂分化主要由转录因子 PPAR γ 调控^[20]，PPAR γ 通过激活 Chemerin/CMKLR1 信号通路促进 BMSCs 向脂肪细胞分化，并抑制其成骨分化^[21-23]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠股骨组织中 *BMP-2* 和 *Runx2* mRNA 表达降低，*PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达升高，提示成骨信号通路被抑制，成脂信号通路被激活，说明卵巢切除后大鼠 BMSCs 出现骨脂分化紊乱。与模型组比较，知母-黄柏低、高剂量组大鼠股骨组织中 *BMP-2* 和 *Runx2* mRNA 表

达升高, *PPAR γ* 、*Chemerin* 和 *CMKLR1* mRNA 表达降低, 且知母-黄柏高剂量组在升高 *BMP-2* mRNA 表达, 降低 *PAR γ* 、*Chemerin*、*CMKLR1* mRNA 表达方面效果优于雌二醇组, 表明知母-黄柏药对可通过调控 BMSCs 骨脂分化信号, 纠正卵巢切除后大鼠 BMSCs 骨脂分化紊乱, 促进 BMSCs 向成骨细胞分化。

综上, 知母-黄柏药对可缓解 PMOP 骨质流失, 其机制与降低炎症因子水平, 纠正 BMSCs 骨脂分化紊乱, 促进 BMSCs 成骨细胞分化有关, 且以高剂量效果更佳。但本研究没有提取大鼠 BMSCs, 后续可通过体外 BMSCs 培养以探索知母-黄柏药对调控 BMSCs 骨脂分化信号的表现遗传学机制, 为其临床应用提供充分的实验基础。

参考文献

- [1] The North American Menopause Society. Management of osteoporosis in postmenopausal women: the 2021 position statement of The North American Menopause Society [J]. *Menopause*, 2021, 28(9): 973-997.
- [2] NING K, LIU S, YANG B, et al. Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation [J]. *Mol Metab*, 2022, 58: 101450. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101450.
- [3] WANG LT, CHEN LR, CHEN KH. Hormone-related and drug-induced osteoporosis: a cellular and molecular overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5814.
- [4] YOU Y, LIU J, ZHANG L, et al. WTAP-mediated m6A modification modulates bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential and osteoporosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 33.
- [5] 原明星, 李春财, 李嘉伟, 等. 基于“肾欲坚, 急食苦以坚之, 用苦补之”探讨绝经后骨质疏松症的防治 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(4): 410-412, 416.
- [6] 张亚楠, 冯康虎. 二仙汤治疗绝经后骨质疏松症的有效性系统评价和 Meta 分析 [J]. *中医临床研究*, 2021, 13(29): 10-15.
- [7] 程垠哲. 知柏地黄丸治疗绝经后骨质疏松的效果观察 [J]. *内蒙古中医药*, 2024, 43(9): 1-2.
- [8] 陈俊景, 吕敦庆, 潘宇, 等. 卵巢切除模拟绝经后骨质疏松动物模型的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(12): 1848-1853.
- [9] BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1468-1486.
- [10] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [11] 田欣, 陈珺, 黄慧灵, 等. 橘红素对去卵巢大鼠子宫及血清激素、骨代谢和炎症因子的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(4): 249-255.
- [12] 寇文超, 师建平, 党赢, 等. 由骨免疫学探讨中医药防治绝经后骨质疏松症研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(8): 1215-1218.
- [13] 王晓轶, 黄立师, 杨东见, 等. 围绝经期综合征相关症状及中医证型分布规律研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(1): 35-38, 45.
- [14] 蔡毅, 赵继荣, 陈文, 等. 基于“肾主骨生髓”理论综述骨髓间充质干细胞与绝经后骨质疏松的关系 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(11): 1666, 1670.
- [15] DAMANI JJ, DE SOUZA MJ, STROCK NCA, et al. Associations between inflammatory mediators and bone outcomes in postmenopausal women: a cross-sectional analysis of baseline data from the prune study [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 639-663. doi: 10.2147/JIR.S397837.
- [16] GUO X, WU Z. GABARAP ameliorates IL-1 β -induced inflammatory responses and osteogenic differentiation in bone marrow-derived stromal cells by activating autophagy [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11561.
- [17] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: implications for postmenopausal osteoporosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 123: 14-21. doi: 10.1016/j.semedb.2021.05.014.
- [18] WANG Z, WU J, LI L, et al. Eicosapentaenoic acid supplementation modulates the osteoblast/osteoclast balance in inflammatory environments and protects against estrogen deficiency-induced bone loss in mice [J]. *Clin Nutr*, 2023, 42(9): 1715-1727.
- [19] REN C, GONG W, LI F, et al. Pilose antler aqueous extract promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by stimulating the BMP-2/Smad1, 5/Runx2 signaling pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(10): 756-767.
- [20] WANG X, ZHANG C, ZHAO G, et al. Obesity and lipid metabolism in the development of osteoporosis (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(1): 61.
- [21] MURUGANANDAN S, PARLEE SD, ROURKE JL, et al. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23982-23995.

[22]MURUGANANDAN S, ROMAN AA, SINAL CJ. Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(2): 222–234.

[23]GUO Y, HUO J, WU D, et al. Simvastatin inhibits the adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through the downregulation of chemerin/CMKLR1 signaling[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(2): 751–761.

Effects of Zhimu (*Anemarrhena asphodeloides*)–Huangbai (*Phellodendron amurense*) Medicinal Pair on Femoral Microstructure and Osteogenic-Adipogenic Differentiation in Ovariectomized Osteoporosis Model Rats

LI Chuncai, YUAN Mingxing, LI Jiawei, DENG Jing, SHEN Chongyang, LIU Yuan

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137

ABSTRACT **Objective** To investigate the potential mechanisms of Zhimu (*Anemarrhena asphodeloides*)–Huangbai (*Phellodendron amurense*) medicinal pair in alleviating postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** Sixty unpregnant female SD rats were randomly divided into five groups, blank group, model group, low-dose Zhimu-Huangbai group, high-dose Zhimu-Huangbai group, and estradiol group, with 12 rats in each group. Except for the blank group, all other groups had their ovaries removed to create PMOP rat models, while the blank group only had the fat tissue around the ovaries removed. One week after the ovarian removal, the low-dose and high-dose Zhimu-Huangbai groups received concentrated solution of Zhimu and Huangbai with 1.8, 7.2 g/(kg·d) via gavage, the estradiol group received estradiol solution 0.09 mg/(kg·d) via gavage, and the blank group and the model group received 10 ml/(kg·d) of normal saline via gavage, once daily for 12 weeks. Before sampling, the body mass of the rats was recorded, and uterine tissue was taken to calculate the uterine index. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were detected by ELISA; micro CT was used to examine the parameters of femoral microstructure, including bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular number (Tb. N), trabecular thickness (Tb. Th), bone mineral density (BMD), trabecular separation (Tb. Sp), and cortical bone area (Ct. Ar). HE staining was used to observe pathological changes in the femur; RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of osteogenic-adipogenic differentiation-related factors in femoral tissue, including Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), bone morphogenetic protein 2 (*BMP-2*), peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR γ*), chemerin and chemokine-like receptor 1 (*CMKLR1*). **Results** Compared with the blank group, the model group showed a significant increase in body mass, a significant decrease in the uterine index, BV/TV, Tb. N, Tb. Th and BMD, a significant increase in Tb. Sp, and serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels, a significant reduction of mRNA expression of *Runx2* and *BMP-2* in bone tissue, and a significant increased mRNA expression of *PPAR γ* , *chemerin*, and *CMKLR1* ($P<0.01$). HE staining revealed that the femoral tissue showed a reduction and sparsity of trabeculae, a significant enlargement of the medullary cavity, and a large number of fat cells. Compared to the model group, the low-dose, high-dose Zhimu-Huangbai groups, and estradiol group showed significant improvements in all the above-mentioned indicators ($P<0.05$ or $P<0.01$). HE staining revealed a significant increase in trabeculae, more organized arrangement, and a marked reduction in fat cells. Compared to low-dose Zhimu-Huangbai group, the high-dose Zhimu-Huangbai group exhibited a significant increase in the uterine index and BMD, and a significant reduction in body mass and *PPAR γ* and *Chemerin* mRNA expression ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to high-dose Zhimu-Huangbai group, the estradiol group showed a decrease in uterine index, BV/TV, Tb. N, Tb. Th, BMD, and *BMP-2* mRNA expression, while the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6, as well as Tb. Sp and the mRNA expressions of *PPAR γ* , *chemerin*, and *CMKLR1* increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The Zhimu-Huangbai medicinal pair can alleviate PMOP bone loss, and its mechanism of action is related to reducing the levels of inflammatory factors, correcting the disorder of osteogenic-adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and promoting the differentiation of BMSCs into osteoblasts.

Keywords postmenopausal osteoporosis; Zhimu (*Anemarrhena asphodeloides*); Huangbai (*Phellodendron amurense*); osteogenic-adipogenic differentiation; inflammatory factors; femoral microstructure

(收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-05-27)

[编辑: 邓媛]