

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.05.014

实验研究

固本增骨方联合高压氧疗对骨质疏松症模型大鼠骨代谢平衡的影响

冯宜菴¹, 来积芳¹, 宋敏², 郭小荣¹, 董万涛^{1✉}

1. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃省兰州市城关区嘉峪关西路 732 号, 730020; 2. 甘肃中医药大学

[摘要] **目的** 探讨固本增骨方联合高压氧疗对骨质疏松症骨代谢平衡的影响及可能机制。**方法** 50 只雌性 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、高压氧组、固本增骨方组、联合组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用去卵巢法建立骨质疏松症大鼠模型。造模成功后空白组、模型组、高压氧组大鼠给予 30 ml/kg 生理盐水灌胃, 固本增骨方组及联合组给予固本增骨方混悬液 4.6 g/(kg·d) 灌胃, 高压氧组、联合组大鼠每天灌胃后进行高压氧治疗。干预 12 周后检测大鼠血清骨代谢标志物 [包括骨特异性碱性磷酸酶 (BALP)、核结合因子 $\alpha 1$ (CBF- $\alpha 1$)、I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP)、骨钙素 (OC)] 含量变化; 显微 CT 影像观察大鼠股骨骨密度水平及骨小梁微结构; 检测大鼠下丘脑和股骨组织中骨保护素 (OPG)、核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠骨密度及 BALP、CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 含量、相对骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度、连接密度降低, 骨小梁分离度、结构模型指数升高, 下丘脑及股骨组织中 OPG 蛋白和 mRNA 表达下降、RANKL 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 高压氧组、固本增骨方组和联合组大鼠各指标均显著改善 ($P < 0.05$); 且固本增骨方组和联合组各指标改善优于高压氧组, 联合组各指标改善优于固本增骨方组 ($P < 0.01$)。**结论** 固本增骨方联合高压氧疗能够调节骨质疏松症模型大鼠骨代谢平衡, 增加骨量, 改善骨小梁微结构, 其机制可能与调控 OPG/RANKL 信号通路有关。

[关键词] 骨质疏松症; 固本增骨方; 高压氧疗; 骨代谢; 骨小梁; OPG/RANKL 信号通路

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是临床常见疾病, 该病发生多与骨质退变、骨量减少以及骨微结构改变有关, OP 可降低骨载荷承受力、增加骨脆性, 从而引起慢性疼痛, 增加骨折危险^[1]。临床评价 OP 多从骨量、骨代谢标志物等入手。近年研究^[2-3]发现, 骨保护素/核因子 κB 受体活化因子配体 (OPG/RANKL) 信号通路对破骨细胞的形成、分化和吸收具有重要调节作用。另有研究^[4]表明, 高压氧疗能够改善骨微结构, 具有促进成骨细胞生成的作用。固本增骨方为甘肃中医药大学附属医院关节外科临床经验方, 临床研究^[5-6]结果显示, 固本增骨方治疗 OP 患者安全有效, 能够增加骨密度、缓解疼痛症状。实验研究^[7-8]亦证实, 固

本增骨方可调控实验大鼠骨组织中的游离钙水平, 调控骨细胞生成及转换。本研究采用切除雌性大鼠双侧卵巢的方法建立 OP 大鼠模型, 给予固本增骨方联合高压氧疗进行干预, 旨在观察该法对 OP 模型大鼠 OPG/RANKL 信号通路的影响, 分析其对骨代谢平衡的影响。本研究经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准, 伦理批号: GSZY [2019]1203。

1 资料与方法

1.1 动物

雌性 SPF 级 Wistar 大鼠 50 只, 3 周龄, 体质量 (180 ± 20) g, 由甘肃中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (甘) 2011-0001。

1.2 药品

固本增骨方组成: 炙黄芪 40 g, 当归 12 g, 炙淫羊藿 15 g, 党参 12 g, 烫狗脊 6 g, 补骨脂 12 g,

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (17JR5RA056)

✉ 通讯作者: 2114822237@qq.com

购于甘肃中医药大学附属医院中药房。将上方煎煮、浓缩后制成粉末，用生理盐水配制成浓度为 25 g/L 的混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

1.5% 戊巴比妥钠 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 922L035); OPG 抗体 (批号: bs-0431R-1)、RANKL 抗体 (批号: bs-0747R-1), 博奥森 (北京) 生物技术有限公司; ELISA 试剂盒: 骨特异性碱性磷酸酶 (BALP, 批号: E201902)、核结合因子 $\alpha 1$ (CBF- $\alpha 1$, 批号: E201906)、I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I, 批号: E201906)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) ELISA 试剂盒 (批号: E201905)、骨钙素 (OC) ELISA 试剂盒 (批号: E201901), 北京方程生物有限公司; RNA 抽提试剂盒 (美国 Thermo 公司, 货号: K0331); Takara 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司, 货号: K1725); RIPA 裂解缓冲液 (货号: BYL40835)、ECL 试剂 (货号: BYL51725), 上海基尔顿生物公司产品; BCA 蛋白测定试剂盒 (美国 Thermo 公司, 货号: PICPI23233)。

离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司, 型号: KH19A); 实验动物微型 CT 影像系统 (Siemens Inveon 公司, 型号: 16HR PET/CTIRS); 骨密度仪 (韩国 OteoSys 公司, 型号: EXA-PRESTO); 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: Benchmark Plus); 高压氧舱 (上海七零一所杨园高压氧舱有限公司, 型号: GR3400/0.3-30)。

1.4 动物分组与造模

50 只大鼠适应性喂养 1 周后采用随机数字表法分为空白组、模型组、高压氧组、固本增骨方组、联合组, 每组 10 只。除空白组外, 其余大鼠均参照文献 [9] 去卵巢法建立 OP 模型: 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后, 以俯卧位固定, 于大鼠背部脊柱两侧切口, 在无菌条件下摘除其双侧卵巢。造模后 3 个月检测骨密度明显降低、骨小梁微结构严重破坏判定模型复制成功^[10]。

1.5 干预方法

造模成功后空白组、模型组、高压氧组大鼠给予 30 ml/kg 生理盐水灌胃, 固本增骨方组及联合组给予成人等效剂量固本增骨方混悬液 4.6 g/(kg·d) 灌胃, 均每日 1 次。高压氧组、联合组大鼠每天灌胃后进行高压氧治疗: 高压氧舱压力设定成 0.25 MPa, 吸纯氧 30 min。各组大鼠环境及饲养条件相同, 干预持续 12 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 骨代谢标志物含量测定 大鼠处死后心脏取血 2 ml, 置于离心机中, 30 ℃ 3000 r/min 离心 10 min (半径 10 cm), 取上清液, ELISA 法检测血清中骨特异性碱性磷酸酶 (BALP)、核结合因子 $\alpha 1$ (CBF- $\alpha 1$)、I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP)、骨钙素 (OC) 含量水平, 按试剂盒说明书步骤进行。

1.6.2 骨密度及骨小梁微结构测定 分离各组大鼠右侧股骨标本, 使用实验动物微型 CT 影像系统对远端干骺端进行扫描 (扫描电压: 65 kV, 电流: 384 mA, 分辨率: 18 μ m)。扫描完成后, 选择感兴趣区域 (ROI) 行三维重组后提取图像资料, 利用专用骨骼分析软件 Advanced Bone Analysis (ABA) 2.0 进行骨组织计量学分析, 包括骨密度、相对骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度、连接密度、骨小梁分离度、结构模型指数。上述所有操作均由同一组研究人员完成。

1.6.3 RT-PCR 法检测 OPG、RANKL mRNA 表达

提取各组大鼠下丘脑及股骨部分组织, RNA 抽提试剂盒提取组织中总 RNA, 对 RNA 纯度含量进行检测后实用 Takara 逆转录试剂盒获取 cDNA, 引物由大连宝生物工程公司合成, 应用 Primer 5.0 设计引物序列, OPG: 上游 CATCTGCAGCTCCGTGCA-CAGA, 下游 ATCAGCGAGTGTACAGGCTTGAGT, 扩增长度 183 bp; RANKL: 上游 GTTGGTCCACAGCA-CATCAGAATATAG, 下游 TTAATAGTGTCCGGAT-GAGGATGATGG, 扩增长度 126 bp; GAPDH: 上游 CACAGCAACGGAAGGTCAGTT, 下游 AGCACCACATCACCACAGAT, 扩增长度 121 bp。以 GAPDH 作为内参对照, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析数据。

1.6.4 蛋白免疫印迹法检测 OPG、RANKL 蛋白表达 提取出各组大鼠下丘脑及股骨部分组织, 加入 RIPA 裂解缓冲液冰上放置 30 min, 分别提取各组大鼠相应组织中的总蛋白, 然后使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定各组大鼠皮肤中蛋白质的浓度。蛋白质用 SDS-PAGE 进行等量分离, 然后移至 PDVF 膜上, 并置于 4 ℃ 下添加一抗与 β -actin (1 : 500) 孵育过夜。洗涤后添加辣根过氧化物酶缀合的二抗 (1 : 500), 常温下孵育 2 h。使用 ECL 试剂进行显影, 应用软件 Quantity One 2.0 对蛋白相对表达水平进行分析。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计量资料均符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间

比较采用 F 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度及骨代谢标志物比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠骨密度及 BALP、CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 含量均明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 高压氧组、固本增骨方组和联合组大鼠骨密度、BALP、CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 含量均升高 ($P < 0.05$); 且固本增骨方组和联合组各指标改善优于高压氧组, 联合组各指标改善优于固本增骨方组 ($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠骨小梁微结构指标比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠相对骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度、连接密度均降低, 骨小梁分离度、结构模型指数均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 高压氧组、固本增骨方组和联合组大鼠相对骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度、连接密度均升高, 骨小梁分离度、结构模型指数均降低 ($P < 0.05$); 且固本增骨方组和联

合组各指标改善优于高压氧组, 联合组各指标改善优于固本增骨方组 ($P < 0.01$)。各组大鼠股骨干骺端骨组织 CT 重建图显示: 空白组骨小梁结构完整, 无间隙; 模型组大鼠骨小梁分离明显、间隙增大而且数量稀少, 可见大片无骨连接的空洞; 而高压氧组、固本增骨方组及联合组与模型组相比, 骨小梁间隙变小、数量增多, 其中以联合组恢复较佳。详见图 1。

2.3 各组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG、RANKL mRNA 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG mRNA 表达下降, RANKL mRNA 表达上升 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 高压氧组、固本增骨方组和联合组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG mRNA 表达明显上升, RANKL mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$); 且固本增骨方组和联合组各指标改善优于高压氧组, 联合组各指标改善优于固本增骨方组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠骨密度及骨代谢标志物含量比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	骨密度/ $g \cdot cm^{-2}$	BALP/ $\mu g \cdot L^{-1}$	CBF- $\alpha 1$ / $\mu g \cdot L^{-1}$	CTX-I/ $\mu g \cdot L^{-1}$	PINP/ $\mu g \cdot L^{-1}$	OC/ $\mu g \cdot L^{-1}$
空白组	10	0.179 $\pm$ 0.002	21.55 $\pm$ 10.12	49.66 $\pm$ 15.63	12.57 $\pm$ 6.21	30.12 $\pm$ 12.05	18.53 $\pm$ 10.17
模型组	10	0.141 $\pm$ 0.004 ^{a)}	16.22 $\pm$ 11.23 ^{a)}	22.76 $\pm$ 19.04 ^{a)}	8.55 $\pm$ 6.67 ^{a)}	25.25 $\pm$ 10.97 ^{a)}	12.67 $\pm$ 11.14 ^{a)}
高压氧组	10	0.152 $\pm$ 0.001 ^{b)}	18.27 $\pm$ 12.25 ^{b)}	30.28 $\pm$ 12.74 ^{b)}	9.53 $\pm$ 6.64 ^{b)}	27.14 $\pm$ 10.63 ^{b)}	14.26 $\pm$ 10.71 ^{b)}
固本增骨方组	10	0.161 $\pm$ 0.003 ^{b) c)}	19.81 $\pm$ 9.29 ^{b) c)}	39.67 $\pm$ 18.91 ^{b) c)}	11.38 $\pm$ 8.44 ^{b) c)}	28.62 $\pm$ 16.13 ^{b) c)}	16.74 $\pm$ 11.19 ^{b) c)}
联合组	10	0.171 $\pm$ 0.002 ^{b) c) d)}	20.65 $\pm$ 11.41 ^{b) c) d)}	44.07 $\pm$ 17.26 ^{b) c) d)}	12.06 $\pm$ 10.22 ^{b) c) d)}	29.72 $\pm$ 12.45 ^{b) c) d)}	18.45 $\pm$ 13.06 ^{b) c) d)}

注: BALP, 骨特异性碱性磷酸酶; CBF- $\alpha 1$, 核结合因子 $\alpha 1$; CTX-I, I型胶原羧基末端肽; PINP, I型前胶原氨基端前肽; OC, 骨钙素。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与高压氧组比较, $P < 0.01$; d) 与固本增骨方组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠骨小梁微结构参数比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	相对骨体积分数/%	骨小梁数量/ cm^{-1}	骨小梁厚度/ μm	连接密度/ cm^{-3}	骨小梁分离度/ cm^{-1}	结构模型指数
空白组	10	0.42 $\pm$ 0.04	6.74 $\pm$ 0.63	56.66 $\pm$ 10.71	93.68 $\pm$ 5.77	0.33 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.01
模型组	10	0.21 $\pm$ 0.07 ^{a)}	2.88 $\pm$ 0.21 ^{a)}	33.87 $\pm$ 10.15 ^{a)}	59.61 $\pm$ 10.78 ^{a)}	0.71 $\pm$ 0.12 ^{a)}	1.78 $\pm$ 0.14 ^{a)}
高压氧组	10	0.32 $\pm$ 0.09 ^{b)}	4.66 $\pm$ 0.17 ^{b)}	41.39 $\pm$ 13.85 ^{b)}	65.56 $\pm$ 6.29 ^{b)}	0.49 $\pm$ 0.17 ^{b)}	0.86 $\pm$ 0.72 ^{b)}
固本增骨方组	10	0.39 $\pm$ 0.07 ^{b) c)}	6.15 $\pm$ 0.29 ^{b) c)}	50.78 $\pm$ 17.86 ^{b) c)}	88.43 $\pm$ 17.33 ^{b) c)}	0.37 $\pm$ 0.04 ^{b) c)}	0.65 $\pm$ 0.22 ^{b) c)}
联合组	10	0.41 $\pm$ 0.02 ^{b) c) d)}	6.43 $\pm$ 0.41 ^{b) c) d)}	52.88 $\pm$ 18.37 ^{b) c) d)}	91.17 $\pm$ 10.26 ^{b) c) d)}	0.34 $\pm$ 0.11 ^{b) c) d)}	0.58 $\pm$ 0.05 ^{b) c) d)}

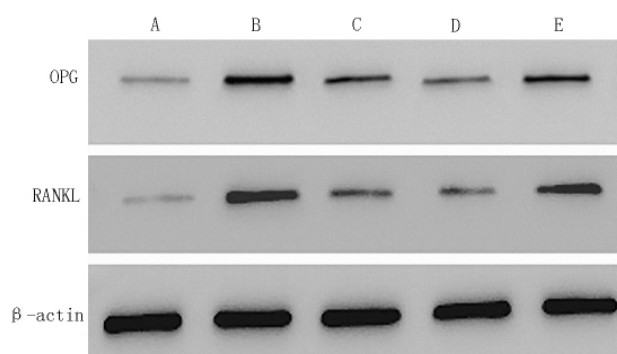
注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与高压氧组比较, $P < 0.01$; d) 与固本增骨方组比较, $P < 0.01$ 。



图 1 各组大鼠股骨骨小梁微结构 CT 重建图

2.4 各组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG、RANKL 蛋白表达比较

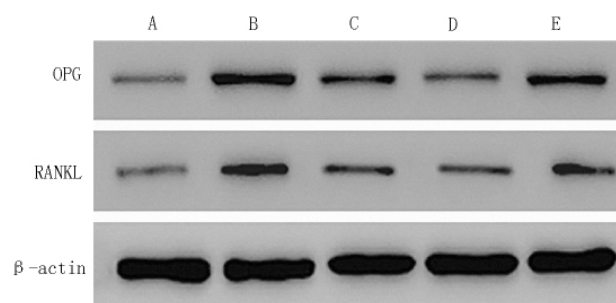
表 4 示, 与空白组比较, 模型组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG 蛋白表达下降, RANKL 蛋白表达上升 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 高压氧组、固本增骨方组和联合组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG 蛋白表达明显上升, RANKL 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 且固本增骨方组和联合组各指标改善优于高压氧组, 联合组各指标改善优于固本增骨方组 ($P < 0.01$)。各组大鼠下丘脑组织中 OPG、RANKL 蛋白电泳图见图 2, 各组大鼠股骨组织中 OPG、RANKL 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 高压氧组; D, 固本增骨方组; E, 联合组。

OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体。

图 2 大鼠下丘脑组织中 OPG、RANKL 蛋白电泳图



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 高压氧组; D, 固本增骨方组; E, 联合组。

OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体。

图 3 各组大鼠股骨组织中 OPG、RANKL 蛋白电泳图

3 讨论

中医学将 OP 归属于“骨痿”“骨枯”等范畴, 辨证论治时多从肾、肝、脾等脏腑入手。固本增骨方是以《黄帝内经》“骨枯髓空”“骨肉不相亲”等论述为重要基础, 从调补脾肾入手, 结合前期课题组方“增骨丸”^[11]和“补肾固本方”^[12]加以优化筛选出的配伍组方。方中君药为炙黄芪, 补气养血升阳。臣药为党参和当归, 其中党参补中益气, 与黄芪配伍增强黄芪补气升阳之效; 当归补血活血, 辅助君药黄芪, 以增气血互补之功效。淫羊藿强筋健骨、补肾壮阳, 补骨脂温肾助阳, 烫狗脊强腰膝、补肝肾, 三药合用共为佐药。诸药合用, 共奏健脾补肾、壮骨益气、活血通络之

表 3 各组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG、RANKL mRNA 表达比较

($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	下丘脑		股骨组织	
		OPG	RANKL	OPG	RANKL
空白组	10	2.77 ± 0.53	0.46 ± 0.08	2.36 ± 0.03	0.51 ± 0.04
模型组	10	0.99 ± 0.47 ^{a)}	1.02 ± 0.07 ^{a)}	1.13 ± 0.25 ^{a)}	1.09 ± 0.08 ^{a)}
高压氧组	10	1.81 ± 0.07 ^{b)}	0.83 ± 0.03 ^{b)}	1.78 ± 0.05 ^{b)}	0.91 ± 0.02 ^{b)}
固本增骨方组	10	2.26 ± 0.09 ^{b) c)}	0.59 ± 0.21 ^{b) c)}	2.21 ± 0.11 ^{b) c)}	0.70 ± 0.11 ^{b) c)}
联合组	10	2.67 ± 0.14 ^{b) c) d)}	0.47 ± 0.13 ^{b) c) d)}	2.33 ± 0.06 ^{b) c) d)}	0.53 ± 0.17 ^{b) c) d)}

注: OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与高压氧组比较, $P < 0.01$; d) 与固本增骨方组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 各组大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG、RANKL 蛋白表达灰度值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	下丘脑		股骨组织	
		OPG	RANKL	OPG	RANKL
空白组	10	0.94 ± 0.12	0.35 ± 0.06	0.88 ± 0.12	0.41 ± 0.09
模型组	10	0.51 ± 0.14 ^{a)}	0.73 ± 0.22 ^{a)}	0.54 ± 0.17 ^{a)}	0.79 ± 0.26 ^{a)}
高压氧组	10	0.62 ± 0.13 ^{b)}	0.48 ± 0.11 ^{b)}	0.62 ± 0.14 ^{b)}	0.57 ± 0.14 ^{b)}
固本增骨方组	10	0.74 ± 0.15 ^{b) c)}	0.41 ± 0.03 ^{b) c)}	0.79 ± 0.21 ^{b) c)}	0.49 ± 0.18 ^{b) c)}
联合组	10	0.89 ± 0.16 ^{b) c) d)}	0.36 ± 0.12 ^{b) c) d)}	0.86 ± 0.13 ^{b) c) d)}	0.41 ± 0.16 ^{b) c) d)}

注: OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与高压氧组比较, $P < 0.01$; d) 与固本增骨方组比较, $P < 0.01$ 。

功效,标本兼顾。高压氧疗是近年临床新兴的治疗方法,高压氧疗环境下可有效增加氧分子弥散距离,提高血氧张力,促进小血管新生并加速侧支循环^[13-14];而且在高压氧疗干预下,能够加速组织内骨痂钙沉积和骨痂胶原蛋白生成^[15-16]。故本研究选择作为对照,同时观察固本增骨方联合高压氧疗的效果。

PINP 作为 I 型前胶原细胞外分泌产物是骨形成的敏感指标,CTX-I 是骨吸收过程中 I 型胶原释放入血的产物,血液中 PINP 及 CTX-I 含量可反映 I 型胶原的合成速率、成骨细胞活动情况以及骨吸收过程,对于诊断 OP 具有很强的特异性^[17-18]。CBF- $\alpha 1$ 是决定成骨细胞分化的重要因子,由成骨细胞特异性表达,且能调控已分化成骨细胞的功能和生长因子表达,控制骨骼形成和发育的生理过程^[19]。OC 是成骨细胞分泌的一种非胶原蛋白,其含量变化是成骨细胞活动以及骨代谢变化的重要标志^[20]。在骨质疏松疾病中,CTX-I、CBF- $\alpha 1$ 以及 OC 均能特异性反映骨代谢平衡情况。

OPG/RANKL 信号通路是成骨细胞与破骨细胞相互作用机制中最重要的通路之一,OPG/RANKL 信号通路的平衡,可有效调控破骨细胞的生成,控制骨代谢,与 OP 发病密切相关^[21]。下丘脑能分泌多种因子调控破骨细胞来释放骨吸收标志物,BALP 是其中之一。研究^[22]发现,BALP 可诱导成骨细胞分泌 RANKL 转导,调控骨吸收。OPG 是由成骨细胞分泌的 RANKL 受体,OPG 在 BALP 干预下可与 RANK 竞争并结合 RANKL,从而诱导破骨细胞凋亡,抑制骨吸收。补充外源性 OPG 可提高骨密度,增强骨强度,促进骨吸收^[23],而且骨密度及骨小梁微结构改变能够预测 OP 的发生与发展,为 OP 的诊断提供重要参考。

本研究结果显示,OP 模型大鼠骨密度明显降低,骨小梁微结构严重破坏,血清中骨代谢标记物均降低,表明 OP 大鼠骨量严重丢失,骨吸收增加而骨形成下降,这与 OP 病理表现相符。本研究还发现,OP 大鼠下丘脑及股骨组织中 OPG 表达下降,而 RANKL 表达升高,这说明下丘脑可协同调控股骨组织中 OPG/RANKL 信号通路表达,间接促进骨吸收过程。与模型组相比,高压氧疗和固本增骨方干预均能够明显改善大鼠骨代谢平衡,升高骨密度,改善骨小梁微结构,以联合治疗效果更好,且固本增骨方联合高压氧疗对 OPG/RANKL 信号通路的调节作用更好。综上所述,固本增骨方联合高

压氧疗能够改善 OP 模型大鼠骨代谢水平,增加骨量,改善骨小梁微结构,其机制可能与调控 OPG/RANKL 信号通路有关。

参考文献

- [1] 智信,陈晓,苏佳灿. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(11): 1510-1513, 1534.
- [2] 马涛,王通. 运动对废用性骨质疏松大鼠骨代谢和破骨细胞分化 OPG-RANKL-RANK 系统的影响 [J]. 中国运动医学杂志,2017,36(7): 578-585.
- [3] ZHAO L, LI M, SUN H. Effects of dietary calcium to available phosphorus ratios on bone metabolism and osteoclast activity of the OPG/RANK/RANKL signalling pathway in piglets [J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2019, 103(4): 1224-1232.
- [4] 曾斌,田艳娟,匡爱华. 高压氧辅助治疗跟骨骨折术后切口愈合的临床疗效 [J]. 宁夏医科大学学报,2016,38(2): 212-213.
- [5] 巩彦龙,宋敏,董万涛,等. 固本增骨方治疗老年原发性骨质疏松的随机对照临床试验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(5): 676-679, 701.
- [6] 魏敏,宋敏,董万涛,等. 固本增骨方联合钙剂辅助治疗脾肾亏虚型骨质疏松症椎体压缩性骨折 46 例临床观察 [J]. 甘肃中医药大学学报,2019,36(6): 57-61.
- [7] 董万涛,黄凯,宋敏,等. 固本增骨方对去卵巢骨质疏松模型大鼠血清 BALP 及 NEI 网络组织中 CaM、CaMK II mRNA 表达的影响 [J]. 四川大学学报(医学版),2019,50(1): 27-33.
- [8] 董万涛,周灵通,宋敏,等. 固本增骨方对去卵巢大鼠血清钙素和 NEI 网络组织中游离子 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 [J]. 中药药理与临床,2018,34(1): 121-127.
- [9] 郭鱼波,马如凤,王丽丽,等. 骨质疏松动物模型及其评价方法的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(9): 1149-1154.
- [10] JOHNSTON BD, WARD WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women [J]. Biomed Res Int, 2015: 635023. doi: 10.1155/2015/635023.
- [11] 曾昭洋,杨光,谢兴文. 中药增骨丸对去卵巢大鼠骨质疏松症模型骨组织形态计量学指标的影响 [J]. 甘肃中医学院学报,2005,22(4): 15-19.
- [12] 黄继锋,宋敏,李泽佳,等. 补肾固本方对去卵巢大鼠骨质疏松症骨密度、骨矿盐含量及 CT 含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4): 149-152.
- [13] 高月,王国忠,郑自慧. 高压氧治疗骨折延迟愈合的临床应用及作用机制 [J]. 中华航海医学与高气压医学杂志,2016,23(1): 83-84.
- [14] 丁洁,徐天睿. 高压氧治疗胫骨中下段骨折愈合延迟的疗效观察 [J]. 华西医学,2017,32(11): 1763-1765.

- [15] BRADIC J, PETKOVIC A, SIMONOVIC N, et al. Pre-conditioning with hyperbaric oxygen and calcium and potassium channel modulators in the rat heart. [J]. Undersea Hyperb Med, 2019, 46(4) : 483-494.
- [16] JAN A, SÁNDOR GKB, BRKOVIC BBM, et al. Effect of hyperbaric oxygen on demineralized bone matrix and biphasic calcium phosphate bone substitutes [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009, 109(1) : 59-66.
- [17] KUMM J, TAMM A, LINTROP M, et al. Diagnostic and prognostic value of bone biomarkers in progressive knee osteoarthritis: a 6-year follow-up study in middle-aged subjects [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(6) : 815-822.
- [18] LEGOSZ P, PULIK L, STEPINSKI P, et al. The use of type I collagen cross-linked C-telopeptide (CTX-I) as a biomarker associated with the formation of periprosthetic ossifications following total hip joint arthroplasty [J]. Ann Clin Lab Sci, 2018, 48(2) : 183-190.
- [19] 潘小燕, 王鸿度, 岳荣超, 等. 电针足少阳经穴对去卵巢大鼠骨质疏松症骨组织 OPG、RANKL 及 CBF α 1 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11) : 5132-5134.
- [20] ZHANG X, WANG Y, MA L, et al. Uncarboxylated osteocalcin ameliorates hepatic glucose and lipid metabolism in KKAY mice via activating insulin signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(3) : 383-393.
- [21] 刘飞祥, 林子璇, 徐道明, 等. 左归丸调节 β_2 AR 介导的 RANKL/OPG 信号通路改善去卵巢大鼠骨量和显微结构水平 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18) : 1-8.
- [22] 林海鸣, 黄云梅, 吴银生, 等. 卵巢切除大鼠在不同时期 RANKL、OPG 蛋白表达的变化及与 BTMs 的相关性 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8) : 981-985.
- [23] STUSS M, SEWERYNEK E, KRÓL I, et al. Assessment of OPG, RANKL, bone turnover markers serum levels and BMD after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. Endokrynol Pol, 2016, 67(2) : 174-184.

Effect of *Guben Zenggu Formula* (固本增骨方) Combined with Hyperbaric Oxygen Therapy on Regulation of Bone Metabolism in Osteoporosis Model Rats

FENG Yiyun¹, LAI Jifang¹, SONG Min², GUO Xiaorong¹, DONG Wantao¹

1. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730020; 2. Gansu University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Guben Zenggu Formula* (固本增骨方) combined with hyperbaric oxygen therapy on imbalances in bone metabolism of osteoporosis, as well as the possible mechanism underlying the effect. **Methods** Fifty female Wistar rats were randomly divided into a blank group, a model group, a hyperbaric oxygen group, an herbal formula group, and a combination group, with 10 rats in each group. Ovariectomy method was used to establish the osteoporosis model in all groups except for blank group. After successful modeling, rats in the blank group, model group and hyperbaric oxygen group were all given 30 ml/kg normal saline by gavage; herbal suspension of *Guben Zenggu Formula* at a dose of 4.6 g/ (kg · d) by gavage and hyperbaric oxygen were administered in herbal formula group and hyperbaric oxygen group, respectively; the combination group received both herbal suspension and hyperbaric oxygen. After 12 weeks of intervention, the bone metabolism markers were detected in serum including bone-specific alkaline phosphatase (BALP), nuclear binding factor- α 1 (CBF- α 1), type I collagen carboxy-terminal peptide (CTX-I), type I procollagen amino-terminal propertied (PINP) and osteocalcin (OC); micro CT imaging was used to detect femur bone density and bone trabecular microstructure; The protein and mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) in rat hypothalamus and femoral tissue, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in rats hypothalamus and femur tissues. **Results** Compared to blank group, the model group had lower levels of bone density, BALP, CBF- α 1, CTX-I, PINP, OC, relative bone volume fraction, trabecular bone number, thickness, and connection density, as well as higher trabecular bone separation, and structural model index; the OPG protein and mRNA expression significantly decreased while the RANKL protein and mRNA expression increased ($P < 0.05$). All the outcomes showed significant improvements in hyperbaric oxygen group, herbal formula group, and combination group compared to those in model group ($P < 0.05$); the herbal formula group and combination group showed better improvements compared to hyperbaric oxygen group, and the combination group showed the biggest changes ($P < 0.01$). **Conclusion** *Guben Zenggu Formula* combined with hyperbaric oxygen therapy can regulate the imbalances in bone metabolism, increase bone mass, and improve the trabecular bone microstructure, possibly through regulating the OPG/RANKL signaling pathway.

Keywords osteoporosis; *Guben Zenggu Formula* (固本增骨方); hyperbaric oxygen therapy; bone metabolism; trabecular bone; OPG/RANKL signaling pathway

(收稿日期: 2020-04-02; 修回稿件: 2020-08-16)

[编辑: 邓 媛]