

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.15.015

左归丸联合温和灸对骨质疏松症模型大鼠骨密度、骨保护素 mRNA 及核因子 κ B 受体活化因子配体 mRNA 的影响

钱康¹, 范永升^{2*}

(1. 浙江中医药大学附属杭州第一医院, 浙江省杭州市上城区浣纱路 261 号, 310006; 2. 浙江中医药大学)

摘要 目的 探讨左归丸联合温和灸治疗骨质疏松症的可能作用机制。方法 40 只雌性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、左归丸组、左归丸 + 温和灸组, 每组 10 只。模型组、左归丸组、左归丸 + 温和灸组采用手术完整摘除双侧卵巢法制造骨质疏松症模型。造模 3 个月后左归丸组予左归丸 10 ml/(kg · d) 灌胃, 左归丸 + 温和灸组予左归丸 10 ml/(kg · d) 灌胃 + 长强穴艾灸治疗, 空白组和模型组予生理盐水 10 ml/(kg · d) 灌胃。各组均干预 6 周。干预前后测定大鼠股骨近端及第 2 腰椎骨密度, 干预后通过 PCR 法检测大鼠骨组织骨保护素 (OPG) mRNA 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) mRNA 表达水平。结果 与空白组比较, 模型组股骨、腰椎骨密度, 骨组织 OPG mRNA 表达及 OPG/RANKL 降低, RANKL mRNA 表达上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 左归丸组、左归丸 + 温和灸组大鼠股骨、腰椎骨密度, 骨组织 OPG mRNA 表达及 OPG/RANKL 均升高, RANKL mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且左归丸 + 温和灸组大鼠股骨、腰椎骨密度, 骨组织 OPG mRNA 表达及 OPG/RANKL 均较左归丸组升高, RANKL mRNA 表达较左归丸组降低 ($P < 0.05$)。结论 左归丸联合温和灸能明显升高骨质疏松症大鼠的骨密度, 上调 OPG mRNA 表达、下调 RANKL mRNA 表达可能是其作用机制之一。

关键词 骨质疏松症; 左归丸; 温和灸; 骨密度; 骨保护素; 核因子 κ B 受体活化因子配体

骨质疏松症是多种原因导致的以单位体积内骨量减少、骨的微观结构退化、骨脆性增加及易于发生骨折为特征的一种全身性骨骼疾病, 临床表现主要有骨折、疼痛、肌力低下及其他非特异性症状, 目前临床尚无理想的治疗方法, 为患者的生活带来极大不便^[1]。研究表明, 绝经后雌激素水平降低是导致原发性骨质疏松症的原因之一, 一般发生在绝经后 5 ~ 10 年内^[2]。雌激素替代疗法是治疗绝经后骨质疏松症较为确切有效的措施, 但长期应用外源性雌激素增加子宫肌瘤和乳腺癌的发病率, 同时也是发生深静脉血栓和肺栓塞的危险因素^[3]。中医学认为, 骨质疏松症由肾精亏虚, 骨骼失养所致, 肾阴虚证是绝经后骨质疏松症的主要证型^[4]。另外, 在绝经后骨质疏松症的治疗中, 外治方法具有廉价、操作简便、疗效好、无毒副作用等诸多优势, 患者更易接受, 其中, 温和灸是中医推崇的一种常用外

治方法, 临床应用广泛^[5]。因此, 本研究选用滋阴补肾、填精益髓之左归丸联合温和灸长强穴作为治疗方法, 观察其对骨质疏松症模型大鼠的作用及其可能机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 40 只, 雌性, 12 月龄, 体重 (428 ± 23) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SYXK (浙) 2015-0115。每笼 5 只, 喂食普通颗粒饲料, 室温 (20 ± 2) °C, 自然光照, 保持良好通风, 自由进水进食。

1.2 药品

左归丸组成: 熟地黄 18 g, 山药 18 g, 枸杞子 18 g, 茯苓 18 g, 山萸肉 12 g, 菟丝子 12 g, 牛膝 15 g, 龟甲胶 10 g, 鹿角胶 10 g, 炙甘草 6 g, 上述药材由浙江中医药大学药学院中药标准化研究实验室提供, 配制成生药 2 g/ml 的药液, 4 °C 保存备用。清艾条, 江苏康美制药有限公司, 批号: 20150318。青霉素注射液, 中诺药业 (石家庄) 有限公司, 国

基金项目: 浙江省中医药青年课题计划 (2009YA001); 浙江省自然科学基金 (LY16H270010)

* 通讯作者: fyszjtem@163.com

药准字 H13021632。

1.3 主要试剂和仪器

TRIzol, 美国 Invitrogen 公司, 货号: 12183-555; RNase-Free DNase Set, 德国 Qiagen 公司, 货号: 79254; SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, 美国 Invitrogen 公司, 货号: 11752-050; Power SYBR® Green PCR Master Mix, 美国 Applied Biosystems 公司, 货号: 4367659。

CR21 G II 低温高速离心机, 日本日立公司; Multis Kan 全自动酶标仪, 美国 Thermo 公司; FX PRO 多光谱小动物活体成像仪, 美国 Carestream Health 公司; BI-2000 医学图像分析系统, 成都泰盟科技有限公司; CFX384 多重实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将 40 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、左归丸组、左归丸 + 温和灸组, 每组 10 只。适应性喂养 1 周后, 模型组、左归丸组、左归丸 + 温和灸组采用手术完整摘除双侧卵巢法进行造模^[8], 空白组仅开腹后缝合。各组均臀肌注射青霉素注射液 5 万 U 预防感染, 每日 1 次, 共注射 3 天。造模 3 个月后检测大鼠骨密度, 30 只大鼠符合骨质疏松大鼠模型标准^[9]均造模成功。

造模 3 个月后, 左归丸组予左归丸 10 ml/(kg · d) 灌胃, 每天 1 次。左归丸 + 温和灸组予左归丸 10 ml/(kg · d) 灌胃, 每天 1 次, 同时对大鼠长强穴去毛后进行艾灸治疗, 距离大鼠长强穴表面皮肤 (45 ± 5) mm, 使其温热而无灼痛感, 每天 1 次, 每次 10 min。空白组和模型组予生理盐水 10 ml/(kg · d) 灌胃, 每天 1 次。各组均干预 6 周。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 骨密度 干预前后用 10% 水合氯醛 (0.2 ml/100 g) 将大鼠麻醉, 利用多光谱小动物活体成像仪对第 2 腰椎及股骨近端进行 X 线摄片, 利用自带软件进行股骨近端及第 2 腰椎骨密度测定。

2.2.2 骨组织骨保护素 (OPG) mRNA 和核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) mRNA 表达

TRIzol 法提取大鼠骨组织总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度后, 取相应 RNA 在逆转录酶催化下合成 cDNA, 每个标本均进行 β-actin mRNA、OPG mRNA 和 RANKL mRNA 的实时荧光定量 PCR 检测。实时荧光定量 PCR 反应选用 Power SYBR® Green PCR Master Mix 定量扩增反应体系, 反应总体积为 20 μl, 其中含有无菌蒸馏水 8.0 μl, Power SYBR® Green Master Mix 10.0 μl, 逆转录反应产物 1.0 μl, 前引物及后引物各 0.5 μl。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95℃, 1 min; 95℃, 15 sec; 63℃, 25 sec 40 个循环; 55 ~ 95℃ 度绘制熔点曲线。每个样品重复 3 次, 各个基因的相对表达水平以 $2^{-(C_t \text{ 内参基因} - C_t \text{ 目的基因})}$ 表示。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司负责合成, 引物序列: β-actin: 上游引物: 5'-TGTGTTGTCCCTGTATGCCT-3', 下游引物: 5'-GATGTCGAAGTGCTGGTGTGTC-3', 产物长度: 196 bp; OPG: 上游引物: 5'-TC-CCCATATCTGTTCCCAAA-3', 下游引物: 5'-AAAT-CAAGGATTCCGACTGA-3', 产物长度: 163 bp; RANKL: 上游引物: 5'-GAGTTGCTTGCTG-GAAAAGG-3', 下游引物: 5'-CGGAAAACATCAGAT-GGTTC-3', 产物长度: 182 bp。

2.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠股骨及腰椎骨密度比较

表 1 示, 干预前, 与空白组比较, 其他各组大鼠股骨、腰椎骨密度均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 证明造模成功。干预后, 与空白组比较, 模型组股骨、腰椎骨密度均降低 ($P < 0.05$); 干预后与模型组比较, 左归丸组、左归丸 + 温和灸组大鼠股骨、腰椎骨密度均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠干预前后股骨及腰椎骨密度比较 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	股骨		腰椎	
		干预前	干预后	干预前	干预后
空白组	10	10.67 ± 2.71	9.82 ± 2.37	4.27 ± 0.82	4.06 ± 0.67
模型组	10	7.03 ± 2.54**	5.32 ± 2.05*	3.39 ± 0.79*	2.57 ± 0.69*
左归丸组	10	7.18 ± 2.66**	6.78 ± 2.41 [△]	3.33 ± 0.71*	2.83 ± 0.63 [△]
左归丸 + 温和灸组	10	7.07 ± 2.29**	6.81 ± 2.25 ^{△△▲}	3.28 ± 0.88*	3.06 ± 0.58 ^{△△▲}

注: 与空白组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与左归丸同时时间组比较,

▲ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠骨组织 OPG 及 RANKL mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct} \times 10^5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG	RANKL	OPG/RANKL
空白组	10	7.15 ± 0.38	0.81 ± 0.15	8.84 ± 0.86
模型组	10	0.62 ± 0.46*	1.55 ± 0.37*	0.39 ± 0.12*
左归丸组	10	1.98 ± 0.48 [△]	1.04 ± 0.18 [△]	1.91 ± 0.42 [△]
左归丸 + 温和灸组	10	2.11 ± 0.32 ^{△△▲}	0.93 ± 0.31 ^{△▲}	2.26 ± 0.52 ^{△△▲}

注: OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与左归丸组比较, $\Delta P < 0.05$

0.01), 且左归丸 + 温和灸组大鼠股骨、腰椎骨密度均较左归丸组增加 ($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠骨组织 OPG 及 RANKL mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠骨组织 OPG mRNA 表达下调, RANKL mRNA 表达上调, OPG/RANKL 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 左归丸组、左归丸 + 温和灸组大鼠骨组织 OPG mRNA 表达上调, RANKL mRNA 表达下调, OPG/RANKL 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与左归丸组比较, 左归丸 + 温和灸组大鼠骨组织 OPG mRNA 表达上调, RANKL mRNA 表达下调, OPG/RANKL 升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

骨质疏松症属于中医学“骨痿”“骨痹”范畴。《素问·五运行大论》曰“肾生骨髓。”肾为先天之本, 肾藏精, 主骨生髓, 骨的强劲衰弱与肾精的盛衰具有极为密切的关系。研究发现, 女性绝经后下丘脑-垂体-性腺轴功能减退, 卵巢功能衰退, 雌激素水平下降, 导致骨代谢出现异常, 表现为骨吸收功能亢进, 成骨细胞骨形成功能代偿性增强, 骨代谢呈高转换型, 但由于骨吸收的过程较成骨过程短, 因此骨代谢呈负平衡状态, 导致骨质丢失, 造成骨质疏松^[7-8]。随着年龄的增长, 特别是绝经以后, 女性激素水平下降产生的各种生理变化与中医学范畴中女子“天癸竭”的变化一致, 而天癸的盈亏与肾精肾气的充盛与否密切相关, 因此, 肾精不足, 天癸衰少, 冲任亏虚, 骨髓失充, 骨失所养, 则骨体枯槁, 发而为病。

骨保护素/核因子 κ B 受体活化因子/核因子 κ B 受体活化因子配体 (OPG/RANK/RANKL) 信号通路是近些年来骨代谢研究领域的重大发现, 是破骨细胞分化、活化、凋亡的过程中的一个重要的信号转导通路^[9]。OPG 又称破骨细胞抑制因子, 是一种生长因子受体, OPG 具有抑制破骨细胞形成、分化、活化并诱导其凋亡的作用^[10]。RANKL 是破骨细胞分化因子, 为 OPG 的配体, 属于 TNF 配体

家族, OPG 是 RANKL 的诱导受体, 通过与 RANKL 的结合减少破骨细胞的分化、活化^[11]。正常情况下, OPG、RANKL 比例维持在动态平衡的状态, 使骨重建过程中破骨细胞和成骨细胞水平维持平衡, 在骨重建过程中发挥着重要作用。雌激素与其受体 $ER\alpha$ 结合, 促进成骨细胞的形成和分化, 使 OPG mRNA 的表达上调, RANKL mRNA 的表达下降或上调, OPG/RANKL 升高, 从而抑制破骨细胞的功能。绝经后妇女的 T 细胞、B 细胞和骨髓基质细胞上 RANKL 表达明显增加, OPG/RANKL 明显下降, 且与雌激素的水平呈负相关, 提示 OPG/RANKL 比值降低与绝经后骨质疏松有密切联系^[12]。研究发现, 去卵巢模型组小鼠的股骨内 OPG、RANKL 水平明显下降, 补充雌激素后 OPG、RANKL 表达明显上升, 说明雌激素可通过上调 OPG 和 RANKL 的表达, 从而发挥抗骨吸收效应^[13]。

温和灸是将艾条点燃端悬起而灸, 使患者皮肤有温热感而无灼痛感的一种灸法, 其作用温和, 适用范围广泛。长强穴为督脉的起始穴位, 主治与肾精相关的病症, 肾为作强之官, 长强之名也可能与此有关, 常用于治疗腰背痛、尾骶骨痛等疾病。对长强穴进行温和灸具有补肾壮骨的功效。

手术完整摘除双侧卵巢法是目前常用的绝经后骨质疏松症模型的造模方法。本研究结果显示, 与空白组比较, 其余各组大鼠骨密度明显下降, 骨组织 OPG/RANKL 比值也均降低, 说明手术完整摘除双侧卵巢法复制骨质疏松症模型可行。与模型组比较, 左归丸组、左归丸 + 温和灸组大鼠股骨、腰椎骨密度均增加, OPG mRNA 表达上调, RANKL mRNA 表达下调, OPG/RANKL 升高, 说明左归丸联合温和灸可以升高骨密度, 上调 OPG mRNA 表达, 下调 RANKL mRNA 表达, 且疗效优于单纯口服左归丸。

参考文献

- IVANOVA S, VASILEVA L, IVANOVA S, et al. Osteoporosis: therapeutic options [J]. Folia Med (Plovdiv), 2015, 57(3-4): 181-190.

- [4] CHEN SJ, CHEN YJ, CHENG CH, et al. Comparisons of different screening tools for identifying fracture/osteoporosis risk among community-dwelling older people [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(20): e3415. doi: 10.1097/MD.0000000000003415.
- [5] PRINCE M, GLUECK CJ, SHAH P, et al. Hospitalization for pulmonary embolism associated with antecedent testosterone or estrogen therapy in patients found to have familial and acquired thrombophilia [J]. *BMC Hematol*, 2016, 8(16): 6-13.
- [6] 夏炳江, 童培建, 孙燕, 等. 骨质疏松肾阴虚型小鼠病证结合模型建立的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(7): 1083-1086.
- [7] 欧阳建江, 刘庆思, 许辛寅, 等. 温和灸法对原发性骨质疏松症患者骨痛视觉模拟评分及血清骨保护素的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(10): 971-972.
- [8] 富灵杰, 汤亭亭, 戴剋戎. 骨质疏松动物模型的建立和应用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(2): 270-272.
- [9] 李晶晶, 唐蕊蕊, 黄流波, 等. 中医药对围绝经期综合征妇女下丘脑-垂体-性腺轴影响的研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(12): 90-92.
- [10] NOLLET M, SANTUCCI-DARMANIN S, BREUIL V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 1965-1977.
- [11] STUSS M, RIESKE P, CEGŁOWSKA A, et al. Assessment of OPG/RANK/RANKL gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(5): E1007-E1011.
- [12] BORD S, IRELAND DC, BEAVAN SR, et al. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts [J]. *Bone*, 2003, 32(2): 136-141.
- [13] 仲蕾蕾, 杨冰, 黄晓, 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): 1010-1012.
- [14] 商敏. OPG/RANKL/RANK 基因多态性与绝经后骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 11(1): 68-71.
- [15] 贾少杰, 贾晓静. 雌激素抗骨质疏松的 OPG/RANKL 和 ApoE 作用机制的实验研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(23): 2274-2276.

Impact of Zuogui Wan (左归丸) Combined with Mild-warm Moxibustion on Bone Mineral Density, Osteoprotegerin mRNA and Nuclear Factor κ B Receptor Activator Ligand mRNA of Osteoporosis Model Rats

QIAN Kang¹, FAN Yongsheng²

(1. Hangzhou First Hospital Affiliated to Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310006; 2. Zhejiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Zuogui Wan* (左归丸) combined with mild-warm moxibustion in treating osteoporosis. **Methods** Forty female SD rats were randomized into blank group, model group, *Zuogui Wan* group and *Zuogui Wan* + mild-warm moxibustion group, 10 rats in each group. Rats in the model group, *Zuogui Wan* group and *Zuogui Wan* + mild-warm moxibustion group were made osteoporosis models by completely removing bilateral ovaries. Three months after modeling, the *Zuogui Wan* group was given *Zuogui Wan* 10ml/(kg·d) by gavage. The *Zuogui Wan* + mild-warm moxibustion group was given *Zuogui Wan* 10ml/(kg·d) by gavage and moxibustion at "Changqiang (DU1)" point. The blank group and the model group were given normal saline 10ml/(kg·d) by gavage. All groups were treated for 6 weeks. Rats' bone mineral density of proximal femur and the second lumbar vertebra were measured before and after treatment. After treatment, mRNA expression levels of rats bone tissue osteoprotegerin (OPG) and nuclear factor κ B receptor activator ligand (RANKL) were detected by polymerase chain reaction (PCR) method. **Results** Compared with the blank group, bone mineral density of femur and lumbar vertebra, bone tissue OPG mRNA expression, as well as OPG/RANKL in the model group decreased; while RANKL mRNA expression increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, rats' bone mineral density of femur and lumbar vertebra, bone tissue OPG mRNA expression, as well as OPG/RANKL in the *Zuogui Wan* group and the *Zuogui Wan* + mild-warm moxibustion group increased; while RANKL mRNA expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, rats' bone mineral density of femur and lumbar vertebra, bone tissue OPG mRNA expression, as well as OPG/RANKL in the *Zuogui Wan* + mild-warm moxibustion group were higher than those in the *Zuogui Wan* group; while RANKL mRNA expression was lower ($P < 0.05$). **Conclusion** *Zuogui Wan* combined with mild-warm moxibustion might increase osteoporosis rats' bone mineral density. Up-regulating OPG mRNA expression and down-regulating RANKL mRNA expression seem to be one of the mechanisms.

Keywords osteoporosis; *Zuogui Wan*; mild-warm moxibustion; bone mineral density; osteoprotegerin; nuclear factor κ B receptor activator ligand

(收稿日期: 2017-02-22; 修回日期: 2017-04-25)

编辑: 王利芬