

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.14.014

左归丸对绝经后骨质疏松症合并骨关节炎模型大鼠下丘脑神经肽 P 物质及其受体的影响

麦聪英, 谭峰, 李星, 张明玥, 柴毅, 樊巧玲[✉]

南京中医药大学中医学院中西医结合学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023



[摘要] **目的** 探讨左归丸治疗绝经后骨质疏松症合并骨关节炎的可能作用机制。 **方法** 60 只雌性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组, 模型组, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组大鼠用去卵巢法建立绝经后骨质疏松症合并骨关节炎模型。造模 2 周后, 假手术组、模型组给予蒸馏水 1 ml/(kg·d) 灌胃; 阿仑膦酸钠组给予阿仑膦酸钠混悬液 63 mg/(kg·d) 灌胃; 左归丸低、中、高剂量组分别给予 2.42、4.84、9.68 g/(kg·d) 左归丸灌胃, 每日 1 次, 每周 6 次。12 周后观察大鼠软骨组织形态学变化, 检测左侧股骨远端软骨下骨骨密度 (BMD), 血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 含量, 股骨中 P 物质 (SP) 和 Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 蛋白表达, 下丘脑 SP 及其受体神经激肽 1 受体 (NK1-R) 蛋白及 mRNA 表达。 **结果** 与假手术组比较, 病理显示模型组大鼠软骨表面破坏、有裂隙, 软骨细胞排列混乱; 软骨下骨 BMD 降低, 血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平升高, 下丘脑 SP 和 NK1-R 蛋白及 mRNA 表达水平下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Runx2、SP 表达量减少。与模型组比较, 病理显示阿仑膦酸钠组及左归丸中、高剂量组大鼠软骨损伤明显改善; 软骨下骨 BMD 明显升高, 血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低, 下丘脑 SP 和 NK1-R 蛋白及 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.01$); 阿仑膦酸钠组及左归丸低剂量组 Runx2、SP 表达量增多。与左归丸低剂量组比较, 左归丸中、高剂量组大鼠下丘脑 NK1-R mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。左归丸高剂量组 IL-1 β 水平显著低于左归丸低、中剂量组 ($P < 0.01$)。 **结论** 左归丸可能通过上调下丘脑神经肽 SP 及其受体蛋白、mRNA 水平, 提高软骨下骨骨密度, 进而纠正骨代谢失衡, 是其防治绝经后骨质疏松症合并骨关节炎的作用机制之一。

[关键词] 左归丸; 绝经后骨质疏松症; 骨关节炎; 骨密度; 神经肽; P 物质; 神经激肽 1 受体

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是由于绝经后雌激素水平迅速降低引起的一种以骨量低下、骨组织微结构损坏、导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。骨关节炎 (osteoporosis, OA) 是多种因素引起关节软骨纤维化、皲裂、溃疡、脱失而导致的以关节疼痛为主要症状的退行性疾病^[2]。PMOP 合并 OA 是老年妇女常见慢性疾病, 同时也给家庭和社会带来沉重的经济负担。左归丸是经典的补肾方剂, 源自《景岳全书·新方八阵》, 具有补肾填精益髓之效, 临床上用其防治 PMOP 或 OA 具有较好的疗

效^[3-5], 但其作用机制仍需进一步探索。本课题组前期研究^[6-8]发现, 左归丸可以促进骨形成, 抑制骨吸收, 明显改善骨小梁的微结构, 增加大鼠的骨密度, 从而纠正骨代谢的紊乱。另有研究发现, 感觉神经系统是影响骨细胞分化、骨代谢和骨重建的重要因素之一, 其分泌的神经肽类物质 P 物质 (SP) 在骨代谢过程中发挥着重要的调节作用^[9], 具有补肾功效的方药能够上调去卵巢骨质疏松模型大鼠神经肽的表达水平^[10-12]。本研究观察左归丸对 PMOP 合并 OA 模型大鼠下丘脑 SP 及其受体表达水平的影响, 探讨左归丸防治 PMOP 合并 OA 的疗效及可能作用机制。本研究方案通过南京中医药大学动物伦理委员会批准 (批件号 201901A001)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81573874, 81873229); 江苏高校品牌专业建设工程二期项目

* 通讯作者: scienceuser@163.com, (025) 85811929

1 材料与方法

1.1 动物

雌性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 3 月龄, 体质量 (240 ± 20) g, 购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 实验动物使用合格证号 SCXK (浙) 2019-0002。饲养于南京中医药大学动物中心, 每笼 5 只, 室温 (23.5 ± 0.5) °C, 相对湿度 (68.3 ± 2.6) %, 自由摄食进水。

1.2 药物和试剂

左归丸组成: 熟地黄 (批号 191230)、山药 (批号 191110)、枸杞子 (批号 191020)、山萸肉 (批号 190708)、菟丝子 (批号 191213)、川牛膝 (批号 190815)、鹿角胶 (批号 18010202)、龟甲胶 (批号 1908081), 依次按 8 : 4 : 4 : 4 : 4 : 3 : 4 : 4 称重。饮片购自南京中医药大学国医堂, 经南京中医药大学鉴定。前 6 味药物经粉碎至 40 目, 加超纯水煎煮 2 次, 第 1 次加入 10 倍量水回流提取 2 h, 第 2 次加入 8 倍量水回流提取 1.5 h, 合并两次提取液; 将后两味药物烱化溶于其中, 用旋转蒸发仪浓缩至相当于生药含量为 0.968 g/ml, 4 °C 冷藏备用, 使用前恢复至室温, 摇匀备用。阿仑膦酸钠片 [Sd Pharma (Singapore) Pte. Ltd, 批号 S009850], 用超纯水制成浓度为 6.3 mg/ml 的混悬液。

伊红染液 (批号 G1001-500ML)、苏木素染液 (批号 G1004)、番红染液 (批号 G1053-1)、固绿染液 (批号 G1053-2), Servicebio 公司; 乙二胺四乙酸溶液 (EDTA, 批号 G68915B)、甲醛 (批号 G60216A), Greagent 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 YFXM0013) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号 YFXER00038)、白细胞介素 1 β (IL-1 β , 批号 YFXER00022) ELISA 试剂盒, 南京翼飞雪生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (批号 11123ES10)、聚合酶链式反应 (PCR) 扩增试剂盒 (批号 11202ES08)、超灵敏化学发光液 (ECL, 批号 36208ES60), 翊圣生物科技有限公司; SP 抗体 (南京金益柏生物科技有限公司, 批号 orb215527); 神经激肽 1 受体 (NK1-R) 抗体 (Biorbyt 公司, 批号 orb223463); Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 抗体 (南京拜睿生物科技有限公司, 批号 BR76956S); 羊抗兔绿 (批号 SA0013-2)、羊抗鼠红 (批号 SA00006-3), Proteintech 公司; 抗 β 肌动蛋白 (β -actin, Abcam 公司, 批号 ab8226); 山

羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG, 碧云天生物科技有限公司, 批号 A0208); BCA 蛋白定量试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0014S); 3% 戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 批号 P3761); 青霉素 (哈尔滨制药二厂, 批号 910751); RIPA 裂解液 (Beyotime 公司, 批号 P0013B); DAPI 染液 (Solarbio 公司, 批号 C0060); RIPA 裂解液 (Beyotime 公司, 批号 P0013B)。

1.3 仪器

micro-CT 型小动物成像仪 (德国 Bruker 公司); En Spire 型酶联免疫检测仪 (美国 Perkin Elmer 公司); Eclipse80i 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司); TG16W 型微量高速离心机 (湘仪集团); RM2235 型石蜡切片机、SP5 型激光共聚焦显微镜, 德国徕卡公司; Bio Photometer plus 型核酸蛋白检测仪 (德国 Eppendorf 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); PowerpachHC 型电泳仪、Powerpac Basic 型湿转仪 (美国伯乐公司); Imagequant LAS4000 型超灵敏成像仪 (美国 GE 公司)。

1.4 造模、分组及给药

60 只大鼠按随机数字表法分为假手术组, 模型组, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组, 每组 10 只。适应性喂养 1 周后, 以 3% 戊巴比妥钠溶液 2 ml/kg 腹腔注射麻醉, 除假手术组外, 其余各组参照文献 [13-14] 构建绝经后骨质疏松症合并骨关节炎模型, 由大鼠背部进入完整摘除双侧卵巢, 假手术组大鼠仅将卵巢从腹腔提出而不切除 (仅切除卵巢周围少量脂肪组织), 然后止血缝合。术后每只大鼠每日肌注青霉素 2 万 U/kg, 连用 3 天。通过 HE、番红-固绿染色观察软骨损伤, 软骨下骨密度较假手术组降低, 血清炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 较假手术组升高, 差异有统计学意义, 则证明造模成功。

造模 2 周后, 假手术组、模型组给予蒸馏水 1 ml/(kg · d) 灌胃; 阿仑膦酸钠组给予阿仑膦酸钠混悬液 63 mg/(kg · d) 灌胃; 左归丸低、中、高剂量组分别给予 2.42、4.84、9.68 g/(kg · d) 左归丸灌胃, 灌胃剂量经人与大鼠体表面积比值折算, 中剂量为人的等效剂量。各组均每日灌胃 1 次, 每周 6 次, 共 12 周。

1.5 观察指标及方法

末次给药后 24 h 大鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液 2 ml/kg 腹腔注射麻醉, 腹主动脉采血后处死, 每

组按随机数字表法选取 6 周大鼠进行指标观察, 取下丘脑、股骨、软骨。

1.5.1 软骨组织病理形态 取右侧股骨远端软骨, 用 EDTA 和 10% 甲醛脱钙 4 周, 脱钙后用石蜡包埋, 切成 4 μm 厚的样本, HE、番红-固绿染色后于光学显微镜成像观察。

1.5.2 软骨下骨骨密度 (BMD) 取大鼠左侧股骨, 剔除其周围附着的软组织和肌肉, 用 Micro-CT 测量股骨远端软骨下骨的局部骨密度。扫描参数: 扫描电压 90 kV, 电流 270 μA , 扫描层厚 18 μm 。

1.5.3 血清炎症因子浓度 腹主动脉采血, 全血 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min, 离心半径 13.5 cm, 离心 20 min, 取 100 μl 上清液, 根据 ELISA 试剂盒说明书按 450 nm 波长检测吸光度 A, 以吸光度为横坐标、浓度为纵坐标建立标准曲线, 并计算血清中 TNF- α 、IL-1 β 的浓度。

1.5.4 股骨中 SP、Runx2 蛋白表达 采用免疫荧光法检测。取右侧股骨, 用 EDTA 和 10% 甲醛脱钙 4 周, 脱钙后用石蜡包埋, 切成 4 μm 厚的样本, 0.3% Triton $\times$ 100 处理 20 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每次 5 min; 抗原修复, 自然冷却, PBS 洗 3 次, 切片放入 3% H_2O_2 溶液, 室温孵育 10 min; PBS 洗 3 次后, 用 5% BSA 封闭 20 min, 去除 BSA 液, 每张切片加入 50 μl 稀释的一抗覆盖组织, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次, 加二抗避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 加 DAPI 染液, 10 min, PBS 洗 3 次, 加甘油封片。于激光共聚焦显微镜镜下观察。

1.5.5 下丘脑中 SP、NK1-R mRNA 表达 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time PCR) 检测, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参。参照总 RNA 提取试剂盒说明书对下丘脑组织进行总 RNA 提取。逆转录条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。引物序列由上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, SP: 上游 TTGGTCCGACTGGTC-CGACAG, 下游 GAACTGCTGAGGCTTGGGTCTTC, 103 bp; NK1-R: 上游 CCAACATCTCCACCAACAC-CTCTG, 下游 CACCACGGAAGTCACCACGATG, 107 bp; GAPDH: 上游 AGTTCAACGGCACAGT-CAAGG, 下游 ACATACTCAGCACCAGCATCAC, 121 bp。根据 PCR 扩增试剂盒说明书进行操作, PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (40 个循环)。应用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行结果分析。

1.5.6 下丘脑中 SP、NK1-R 蛋白表达 采用蛋白

免疫印迹法 (Western blot) 检测。取下丘脑组织, 用 RIPA 裂解液进行总蛋白提取, 根据 BCA 试剂盒说明书检测蛋白浓度, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中变性 5 min, 10% SDS-PAGE 分离出蛋白后转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。于 3% BSA 溶液室温封闭 1 h, 分别于兔抗 β -actin、SP、NK1-R (1 : 1000) 一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。山羊抗兔 IgG (1 : 2000) 中室温孵育 1 h。PVDF 膜将浸于 ECL 后曝光。应用 Image J 1.8 软件进行灰度值分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布且方差齐以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨远端软骨病理形态结果

2.1.1 各组大鼠股骨远端软骨病理 HE 染色结果

各组大鼠股骨远端软骨病理形态 HE 染色结果详见图 1, 请扫描本文二维码获取。假手术组大鼠软骨表面平滑, 结构清晰, 软骨细胞排列整齐; 模型组大鼠软骨表面破坏, 有裂隙, 结构不清晰, 软骨细胞排列混乱; 阿仑膦酸钠组大鼠软骨表面较光滑, 软骨细胞排列较整齐; 左归丸低剂量组大鼠软骨表面略有破坏, 稍欠光滑, 软骨细胞排列尚整齐; 左归丸中、高剂量组大鼠软骨表面较完整、光滑, 各层次及结构较清晰, 软骨细胞排列较规则。

2.1.2 各组大鼠股骨远端软骨病理番红-固绿染色结果

各组大鼠股骨远端软骨病理形态番红-固绿染色详见图 2, 请扫描本文二维码获取。假手术组大鼠软骨表面完整, 软骨细胞分布规则, 软骨基质红染区较多; 模型组大鼠软骨表面欠完整、粗糙, 软骨基质红染区减少; 阿仑膦酸钠组大鼠软骨表面尚完整、较光滑, 软骨细胞排列较规则, 软骨基质红染区较多; 左归丸低剂量组大鼠软骨表面完整、光滑, 软骨细胞排列有序, 软骨基质红染区较多; 左归丸中、高剂量组大鼠软骨表面尚完整、略欠光滑, 软骨细胞排列尚有序, 软骨基质红染区较多。

2.2 各组大鼠股骨远端软骨下骨 BMD 比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨下骨 BMD 下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组 BMD 升高 ($P < 0.01$); 与阿仑膦酸钠组比较, 左归丸高剂量组大鼠 BMD 升高 ($P < 0.01$), 左归丸低、中剂量组大

表 1 各组大鼠股骨远端软骨下骨 BMD 及血清 TNF- α 、IL-1 β 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BMD/mg · cm ⁻²	TNF- α /ng · L ⁻¹	IL-1 β /ng · L ⁻¹
假手术组	6	335.15 ± 15.21	199.40 ± 2.17	34.21 ± 0.57
模型组	6	183.47 ± 21.54 ^{a)}	334.87 ± 7.15 ^{a)}	39.31 ± 0.19 ^{a)}
阿仑膦酸钠组	6	286.11 ± 12.00 ^{b)}	263.76 ± 2.70 ^{b)}	36.31 ± 0.12 ^{b)}
左归丸低剂量组	6	263.68 ± 16.28 ^{b)}	232.48 ± 7.82 ^{b) c)}	38.31 ± 0.32 ^{b) c)}
左归丸中剂量组	6	314.98 ± 4.01 ^{b) d)}	289.19 ± 6.13 ^{b) c) d)}	37.44 ± 0.09 ^{b) c) d)}
左归丸高剂量组	6	351.20 ± 22.88 ^{b) c) d) e)}	239.01 ± 3.46 ^{b) c) d) e)}	33.61 ± 0.39 ^{b) c) d) e)}

注: BMD, 骨密度; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β 。a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与阿仑膦酸钠组比较, $P < 0.01$; d) 与左归丸低剂量组比较, $P < 0.01$; e) 与左归丸中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

鼠软骨下骨 BMD 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与左归丸低剂量组比较, 左归丸中、高剂量组大鼠 BMD 升高 ($P < 0.01$); 与左归丸中剂量组比较, 左归丸高剂量组大鼠 BMD 升高 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 浓度比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与阿仑膦酸钠组比较, 左归丸低、高剂量组大鼠血清 TNF- α 水平及左归丸高剂量组 IL-1 β 水平显著降低, 左归丸中剂量组大鼠血清 TNF- α 水平及左归丸低、中剂量组 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与左归丸低剂量组比较, 左归丸中剂量组大鼠血清 TNF- α 水平显著升高、IL-1 β 水平显著降低, 左归丸高剂量组大鼠血清 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与左归丸中剂量组比较, 左归丸高剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠股骨 SP 及 Runx2 蛋白表达情况

各组大鼠股骨 SP 及 Runx2 蛋白表达免疫荧光染色详见图 3, 请扫描本文二维码获取。DAPI 染细胞核为蓝色, 红色荧光表示 Runx2 表达, 绿色荧光表示 SP 表达。假手术组 Runx2、SP 表达量较多。与假手术组比较, 模型组 Runx2、SP 表达量减少。与模型组比较, 阿仑膦酸钠组及左归丸低剂量组 Runx2、SP 表达量增多; 左归丸中剂量组 Runx2 表达量略增多, SP 表达量略减少; 左归丸高剂量组 Runx2 表达量无明显变化, SP 表达量略增多。与阿仑膦酸钠组比较, 左归丸低剂量组 Runx2、SP 表达量增多; 左归丸中、高剂量组 Runx2、SP 表达量减少。

2.5 各组大鼠下丘脑 SP、NK1-R mRNA 表达比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠下丘脑 SP、NK1-R mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组大鼠下丘脑 SP、NK1-R mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与阿仑膦酸钠组比较, 左归丸低、中、高剂量组大鼠下丘脑 SP、NK1-R mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。左归丸低、中、高剂量组各组间大鼠下丘脑 SP mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与左归丸低剂量组比较, 左归丸中、高剂量组大鼠下丘脑 NK1-R mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但两组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠下丘脑 SP、NK1-R mRNA 表达比较

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

组别	鼠数	SP	NK1-R
假手术组	6	0.65 ± 0.07	2.78 ± 0.96
模型组	6	0.12 ± 0.02 ^{b)}	0.80 ± 0.13 ^{a)}
阿仑膦酸钠组	6	0.36 ± 0.08 ^{c)}	1.95 ± 0.20 ^{c)}
左归丸低剂量组	6	0.39 ± 0.08 ^{c)}	1.60 ± 0.31 ^{c)}
左归丸中剂量组	6	0.46 ± 0.05 ^{c)}	2.43 ± 0.34 ^{c) e)}
左归丸高剂量组	6	0.38 ± 0.11 ^{c)}	2.33 ± 0.15 ^{c) d)}

注: SP, P 物质; NK1-R, 神经激肽 1 受体。

a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与假手术组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与左归丸低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与左归丸低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

2.6 各组大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白表达比较

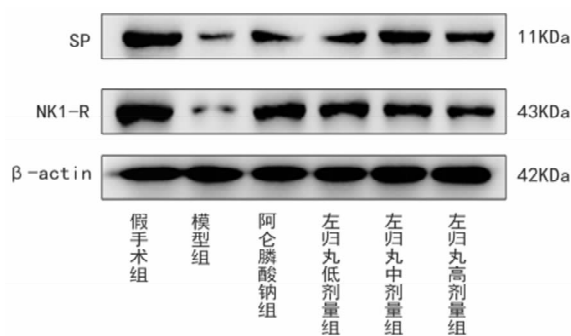
表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 阿仑膦酸钠组及左归丸低、中、高剂量组各组间大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白电泳图见图 4。

表 3 各组大鼠下丘脑 SP、NK1-R 蛋白表达比较
(灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SP	NK1-R
假手术组	6	0.67 ± 0.07	0.49 ± 0.07
模型组	6	0.12 ± 0.22 ^{a)}	0.07 ± 0.01 ^{a)}
阿仑膦酸钠组	6	0.36 ± 0.08 ^{b)}	0.37 ± 0.07 ^{b)}
左归丸低剂量组	6	0.39 ± 0.08 ^{b)}	0.36 ± 0.06 ^{b)}
左归丸中剂量组	6	0.46 ± 0.05 ^{b)}	0.40 ± 0.05 ^{b)}
左归丸高剂量组	6	0.38 ± 0.11 ^{b)}	0.36 ± 0.06 ^{b)}

注: SP, P 物质; NK1-R, 神经激肽 1 受体。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$;
c) 与阿仑膦酸钠组比较, $P < 0.01$; d) 与左归丸低剂量组比较,
 $P < 0.01$; e) 与左归丸中剂量组比较, $P < 0.01$ 。



注: SP, P 物质; NK1-R, 神经激肽 1 受体。

图 4 各组大鼠下丘脑 SP 及其受体蛋白表达电泳图

3 讨论

中医理论认为,肾在体为骨,凡是与骨相关的疾病都与肾密不可分,如《中西汇通医经精义》云:“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所主也;髓者,肾精所生,精足则髓足,髓足者则骨强”。女子至七七之年,肾精渐虚,天癸亦竭,则骨髓化源不足,髓海失充,髓不生骨,故出现髓枯骨痿;骨痿日久,气血日渐衰败,筋脉肌肉失养,则发为骨痹^[15]。PMOP 合并 OA 属于退行性骨相关疾病^[16],以肾虚精亏为本,故可从肾治,重在滋阴补肾,填精益髓。左归丸具有滋阴补肾、填精益髓的功效,方中熟地黄、山萸肉、山药、枸杞子补肾益精;鹿角胶、龟甲胶均为血肉有情之品,峻补阴阳精血,龟甲胶偏于补阴,鹿角胶长于补阳,二药合用一阴一阳,体现了“阳中求阴”的思想;菟丝子平补肾之阴阳,固肾涩精,更助诸药补肾固精之功;牛膝补肝肾、强腰膝、健筋骨。诸药合用,使阴得阳生而泉源不竭,阳得阴助而生化无穷。

现代研究^[17]发现,感觉神经系统对骨代谢的调节是多层次的,神经肽 SP 在骨细胞分化、骨代谢和骨重建中发挥了重要的作用。下丘脑、骨中均

含有感觉神经递质 SP,以下丘脑中含量最为丰富,而 SP 通过 NK1-R 起作用^[18-19]。亦有研究^[20-22]发现,SP 可刺激成骨细胞前体细胞增殖,增强成骨细胞分化过程中的细胞活性和骨形成。王双磊等^[23]将大鼠去卵巢后检测骨组织中神经肽 SP 的表达,发现其水平下调,故推测神经肽 SP 的降低与骨质疏松的形成可能存在一定的关系。Runx2 是骨发育所必需的关键基因,可促进成骨细胞 (OB)、破骨细胞 (OC) 分化及软骨细胞成熟,Runx2 缺失会抑制 OB 分化及软骨细胞成熟^[24]。老年骨质疏松患者股骨中 Runx2 表达水平降低,前成骨细胞分化为 OB 的能力亦下降^[25]。

本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠股骨远端软骨下骨骨密度降低,骨组织形态破坏,血清炎症因子水平升高,股骨 SP 和 Runx2 蛋白表达降低,下丘脑神经肽 SP 和 NK1-R 蛋白及 mRNA 表达均明显降低,说明 PMOP 合并 OA 发病可能与 SP、NK1-R 及 Runx2 表达降低有关。给予阿仑膦酸钠和不同剂量左归丸干预后,大鼠骨密度、骨形态改善,血清炎症因子水平降低,股骨 SP 和 Runx2 蛋白表达升高,下丘脑神经肽 SP 和 NK1-R mRNA 与蛋白表达均升高,提示阿仑膦酸钠和左归丸可能通过调控 SP 及 NK1-R 的表达,抑制血清炎症因子水平,从而改善骨重建失衡、减轻软骨损伤。并且在提高骨密度、抑制血清炎症因子方面,左归丸高剂量组效果最佳。因此,左归丸防治 PMOP 合并 OA 的机制可能是通过上调下丘脑神经肽 SP 和 NK1-R 的表达,从而逆转绝经后软骨下骨重塑失衡的状态,但其通过神经肽网络调控骨代谢的机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019 年版) [J]. 中医正骨, 2020, 32(2): 1-13.
- [2] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018 版) [J]. 中华骨科杂志 2018, 38(12): 705-715.
- [3] 宋献文, 计佩芳, 郭颂铭. 加味左归丸治疗肾阴虚型绝经后骨质疏松症的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(5): 55-57.
- [4] 李明超, 张前德. 左归丸治疗老年性骨质疏松症临床观察 [J]. 河北中医, 2018, 40(5): 673-676.
- [5] 汪勤. 左归丸加减内服配合玻璃酸钠关节内注射治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎近期效果 [J]. 中外医学研究,

- 2019, 17(12): 46–47.
- [6] LIU FX, TAN F, TONG WW, et al. Effect of Zuoguiwan on osteoporosis in ovariectomized rats through RANKL/OPG pathway mediated by $\beta 2$ -AR [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1052–1060. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.102.
- [7] 叶素敏. 基于交感神经抑制作用探讨左归丸治疗 PMOP 的理论基础和疗效机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [8] 叶素敏, 谭峰, 刘飞祥, 等. 左归丸对去卵巢大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 9–15.
- [9] GRSEL S, MUSCHTER D. Peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in osteoarthritis pathology [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 931–954.
- [10] 朱晓峰, 王廷春, 张荣华, 等. 益骨胶囊对去卵巢大鼠骨密度及血浆和骨组织 CGRP 和 SP 含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1054–1056.
- [11] 杨锋, 杨利学, 李小群, 等. 左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(6): 761–765.
- [12] 付海尔, 李建民, 刘玉红. 左归丸对肾阴虚模型大鼠神经-内分泌-免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 155–159.
- [13] 李楠, 王猛, 刘永明, 等. 卵巢切除术构建大鼠骨关节炎合并骨质疏松模型的可行性 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(13): 2413–2416.
- [14] FONTINELE RG, MARIOTTI VB, VAZZOLERÉ AM, et al. Menopause, exercise, and knee. What happens? [J]. Microsc Res Tech, 2013, 76(4): 381–387.
- [15] 谭旭仪, 邝高艳, 卢敏. 膝骨关节炎的“虚、瘀、毒”病机特点探析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 201–206.
- [16] 段王平, 卫小春. 绝经妇女骨关节炎与骨质疏松症的关系 [J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(3): 200–202.
- [17] NIEDERMAIR T, SCHIRNER S, SEEBRÖKER R, et al. Substance P modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9199. doi: 10.1038/s41598-018-27432-y.
- [18] 董孝国. P 物质研究进展 [J]. 商丘师范学院学报, 2012, 28(6): 86–89.
- [19] GOTO T, NAKAO K, GUNJIGAKE KK, et al. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors [J]. Neuropeptides, 2007, 41(1): 25–31.
- [20] GRÄSSEL SG. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(6): 485. doi: 10.1186/s13075-014-0485-1.
- [21] WANG L, ZHAO R, SHI X, et al. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro [J]. Bone, 2009, 45(2): 309–320.
- [22] MORI T, OGATA T, OKUMURA H, et al. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 262(2): 418–422.
- [23] 王双磊, 韩焱, 谢玮鑫, 等. 神经肽在去卵巢大鼠骨组织中表达差异的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4): 437–440, 457.
- [24] 李娜, 代晓霞. Runx2 在骨形成中的作用及调控 [J]. 国外医学(医学地理分册), 2018, 39(4): 353–356.
- [25] 解光越, 侯晓华, 张志勇, 等. 老年骨质疏松患者股骨 Runt 相关转录因子 2 水平与骨密度的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(8): 1962–1963.

Effect of Zuogui Pills (左归丸) on Hypothalamus Neuropeptide Substance P and Its Receptor in Rats Model with Postmenopausal Osteoporosis and Osteoarthritis

MAI Congying, TAN Feng, LI Xing, ZHANG Mingyue, CHAI Yi, FAN Qiaoling

School of Traditional Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Zuogui Pills* (左归丸) in the treatment of postmenopausal osteoporosis with osteoarthritis. **Methods** Sixty female SD rats were randomised into sham operation group, model group, alendronate sodium group and *Zuogui Pills* low, medium and high dose groups, with 10 rats in each group. Ovariectomy was used to establish the model of postmenopausal osteoporosis and osteoarthritis in rats of all groups except for sham operation group. Two weeks after modeling, the rats in the sham operation group and the model group were given 1 ml/ (kg · d) of distilled water by gavage; the alendronate sodium group was given 63 mg/ (kg · d) of alendronate sodium suspension by gavage; *Zuogui Pills* low, medium and high dose groups were given

2.42, 4.84, 9.68 g/ (kg · d) of *Zuogui Pills* by gavage, respectively; the interventions in all the groups were administered once daily, six times a week. After 12 weeks, the morphological changes of cartilage tissues in rats were assessed; the subchondral bone mineral density (BMD) of the left distal femur, the serum tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) contents, the femur substance P (SP) and Runt-related transcription factor 2 (Runx2) protein expression, hypothalamic SP and its receptor neurokinin 1 receptor (NK1-R) protein and mRNA expression were evaluated. **Results** The pathological results showed that compared to the sham operation group, the model group's cartilage surface was damaged and cracked; the chondrocytes arranged disorderly; the BMD level of subchondral bone decreased; serum TNF- α and IL-1 β levels increased; hypothalamus SP and NK1-R protein and mRNA expression levels decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression of Runx2 and SP decreased. Compared to those of the model group, the cartilage damage of the alendronate sodium group and *Zuogui Pills* medium and high dose groups were significantly improved; the BMD level of subchondral bone significantly increased; the serum TNF- α and IL-1 β levels significantly decreased; thalamus SP and NK1-R protein and mRNA expression levels increased ($P < 0.01$); the expression of Runx2 and SP of alendronate sodium group and *Zuogui Pills* low dose group increased. Compared to the *Zuogui Pills* low group, the medium dose and the high dose groups had significantly higher expression of NK1-R mRNA in the hypothalamus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The IL-1 β level of the high dose group was significantly lower than that of the low and middle dose group ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of *Zuogui Pills* in preventing and treating postmenopausal osteoporosis and osteoarthritis may be related to the regulation of the imbalance of bone metabolism through increasing levels of hypothalamic neuropeptide SP and its receptor protein and mRNA, as well as raising subchondral bone density.

Keywords *Zuogui Pills* (左归丸); postmenopausal osteoporosis; osteoarthritis; bone density; neuropeptides; substance P; neurokinin 1 receptor

(收稿日期: 2021-01-03; 修回日期: 2021-04-29)

[编辑: 王利芬]