

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.09.015

实验研究

左归丸对骨质疏松症模型大鼠铁过载的影响

刘梅洁¹, 吴佳莹², 李艳¹, 王少君¹, 赵宏艳¹, 刘红¹,
潘静华¹, 张治国², 汪文来², 鞠大宏[✉]

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所)

摘要 目的 探讨左归丸治疗骨质疏松症的可能作用机理。方法 将 60 只雌性 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、西药组、左归丸组各 12 只。模型组、西药组和左归丸组大鼠行双侧卵巢切除术以制作骨质疏松症模型。造模后左归丸组给予左归丸 0.968 g/100 g 灌胃, 西药组给予戊酸雌二醇片 0.018 mg/100 g 灌胃, 空白对照组、假手术组和模型组给予纯净水 1 ml/100 g 灌胃。每日 1 次, 每周连续给药 6 次, 休息 1 天, 共给药 3 个月。给药结束后检测各组大鼠腰椎骨密度, 股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量, 肝组织中铁离子水平及铁调素蛋白表达, 胫骨骨髓中骨保护素 (OPG) 及细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠腰椎骨密度及股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量水平均降低; 肝组织中铁离子水平升高, 铁调素蛋白降低; 胫骨骨髓中 OPG 蛋白表达降低, RANKL 蛋白表达增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 左归丸组和西药组大鼠腰椎骨密度及股骨的最大载荷、弯曲强度、弹性模量升高, 肝组织铁离子水平降低, 铁调素蛋白表达升高; 胫骨骨髓中 OPG 蛋白表达升高, RANKL 蛋白表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 左归丸可提高肝脏分泌铁调素水平, 进而对 OPG/RANKL 信号通路进行调节, 最终降低破骨细胞活性, 减少骨量丢失, 保护骨组织, 这可能是其治疗骨质疏松症的作用机理之一。

关键词 骨质疏松症; 左归丸; 铁调素; 铁过载; 骨密度; 肾主骨

骨质疏松症属于中医学“骨痹”“骨痿”范畴。肾为先天之本, 藏精、主骨、生髓, 因此, “肾主骨”是中医药防治骨质疏松症的重要理论基础。在中医肾主骨理论的指导下, 临床采用补肾为主的治法治疗骨质疏松症均取得了较好的疗效^[1-3]。我们既往研究表明, 作为补肾法代表方剂的左归丸对去卵巢所致的大鼠骨质疏松症具有良好的治疗作用^[4-6]。近年研究发现, 铁过载在骨质疏松症的发生中起着重要作用^[7-9]。因此, 本研究从左归丸对铁过载的调节作用这一角度, 探讨左归丸治疗骨质疏松症的可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雌性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 12 周龄, 体

质量 (240 ± 20) g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK-(军) 2012-0004, 在中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心屏障环境内饲养。

1.2 药物

左归丸组成: 熟地黄 24 g, 山药 12 g, 山萸肉 12 g, 枸杞子 12 g, 菟丝子 12 g, 川牛膝 9 g, 鹿角胶 12 g, 龟甲胶 12 g, 常规水煎制备成含药量为 0.968 g 生药/ml 溶液; 戊酸雌二醇片: 拜耳医药保健有限公司广州分公司产品, 批号: 175A, 规格: 1 mg/片, 使用时将药片研碎后用纯净水配制成浓度为 0.018 mg/ml 的混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠 (德国 MERCK 公司, 批号: 20131206); 兔多克隆铁调素抗体 (批号: GR122753-41)、兔多克隆 OPG 抗体 (批号: GR187782-2)、兔多克隆 RANKL 抗体 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81473551)

* 通讯作者: judahong@sohu.com

GR10701-40)、山羊抗兔 IgG H&L 抗体(批号: GR188916-44),均为美国 Abcam 公司产品; DAB 显色试剂盒(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号: 0002); 普鲁士蓝染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号: 20160823)。

CRYOTOME FSE 冰冻切片机、Finesse ME + 全自动石蜡切片机,美国 Thermo 公司; DM6000B 显微镜、Qwin Pro V3.5.0 图像分析系统,德国 Leica 公司; Osteocore-3 Digital 2D 骨密度仪(双能 X 线),法国 Medilink 公司; RGWT-4005 微机控制电子万能试验机,深圳瑞格尔仪器有限公司。

1.4 动物分组及干预方法

60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为空白对照组 12 只,假手术组 12 只,造模组 36 只。所有大鼠适应性喂养 1 周后,对造模组大鼠施以双侧卵巢切除手术制作骨质疏松症模型^[4]。假手术组大鼠仅切除卵巢周围脂肪组织,不摘除卵巢。造模完成后,将造模组大鼠按随机数字表法分成模型组、西药组、左归丸组,每组 12 只。左归丸组大鼠给予左归丸 0.968 g/100 g 灌胃;西药组大鼠给予戊酸雌二醇片 0.018 mg/100 g 灌胃;空白对照组、假手术组和模型组大鼠灌服纯净水 1 ml/100 g。每日灌胃 1 次,每周连续给药 6 次,休息 1 天,共给药 3 个月。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 骨密度检测 给药结束后将大鼠处死,取脊椎骨,用生理盐水浸湿的纱布包裹,置于 -80℃ 冰箱,用于骨密度检测。采用 Osteocore3 Digital 2D 骨密度仪,检测各组大鼠腰椎 1-6 (L1-L6) 的骨密度。

1.5.2 肝脏铁离子及铁调素蛋白检测 取肝组织,制作石蜡切片。采用普鲁士蓝染色(核固红法),按照说明书对肝组织铁离子水平进行检测,以普鲁士蓝着色面积百分比表示。采用免疫组化法检测肝组织中铁调素蛋白,按照试剂盒说明书步骤操作。

1.5.3 骨生物力学指标检测 取左侧股骨,剔除骨骼表面附着的软组织,用生理盐水浸湿的纱布包裹,放于 -80℃ 冰箱保存,用于骨生物力学检测。应用微机控制电子万能试验机,检测股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量骨生物力学参数。

1.5.4 胫骨骨髓中骨保护素(OPG)及细胞核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)蛋白检测 取右侧胫骨,脱钙后,制作冰冻切片,采用免疫组化法检测胫骨骨髓中 OPG、RANKL 蛋白。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理。计

量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,正态分布且方差齐性的数据采用单因素方差分析,组间两两比较,采用 LSD 检验;方差差不齐的则采用其项下的 Dunnett's T3 检验。非正态分布数据采用非参数检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠腰椎骨密度比较

表 1 示,假手术组和空白对照组大鼠腰椎骨密度差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组、西药组和左归丸组大鼠腰椎骨密度均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,西药组和左归丸组大鼠腰椎骨密度显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠腰椎骨密度比较 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	骨密度
空白对照组	12	0.3472 ± 0.0369
假手术组	12	0.3523 ± 0.0361
模型组	12	0.2174 ± 0.0262 **
西药组	12	0.2984 ± 0.0251 *△△
左归丸组	12	0.2590 ± 0.0267 **△

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠肝组织中铁离子水平和铁调素蛋白比较

表 2 示,假手术组和空白对照组大鼠肝组织中铁离子水平和铁调素蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组、西药组和左归丸组大鼠肝组织中铁离子水平升高,铁调素蛋白降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,西药组、左归丸组大鼠肝组织中铁离子水平降低,铁调素蛋白升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肝组织中铁离子水平和铁调素蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	铁离子水平 (%)	铁调素 (IOD)
空白对照组	12	2.83 ± 0.93	4883.13 ± 705.57
假手术组	12	2.63 ± 0.73	5006.58 ± 735.70
模型组	12	6.21 ± 1.47 **	1842.78 ± 306.95 **
西药组	12	3.91 ± 0.71 **△	3963.02 ± 503.32 *△
左归丸组	12	4.49 ± 0.97 **△	3551.02 ± 490.31 **△

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.01$

2.3 各组大鼠股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量比较

表 3 示,假手术组和空白对照组大鼠股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量差异无统计学意义

表 3 各组大鼠股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	最大载荷 (N)	弯曲强度 (MPa)	弹性模量 (GPa)
空白对照组	12	142.37 ± 15.93	194.79 ± 21.62	5.74 ± 1.13
假手术组	12	137.32 ± 15.29	188.52 ± 25.52	5.62 ± 1.08
模型组	12	102.85 ± 11.18 **	127.28 ± 22.43 **	3.44 ± 0.96 **
西药组	12	125.47 ± 9.13 * [△]	175.20 ± 25.81 [△]	5.37 ± 1.01 [△]
左归丸组	12	119.56 ± 22.70 ** [△]	162.38 ± 32.79 * [△]	5.07 ± 1.02 [△]

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

($P > 0.05$); 模型组大鼠股骨的最大载荷、弯曲强度、弹性模量水平均显著低于假手术组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组、左归丸组大鼠股骨最大载荷、弯曲强度、弹性模量水平都显著升高 ($P < 0.01$), 且西药组大鼠股骨的弯曲强度和弹性模量以及左归丸组大鼠股骨的弹性模量与假手术组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 但左归丸组大鼠股骨的最大载荷和弯曲强度以及西药组大鼠股骨的最大载荷仍明显低于假手术组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠胫骨骨髓中 OPG、RANKL 蛋白表达比较

表 4 示, 假手术组和空白对照组大鼠胫骨骨髓中 OPG、RANKL 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与假手术组比较, 模型组、西药组和左归丸组大鼠的胫骨骨髓中 OPG 蛋白表达降低, RANKL 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组、左归丸组 OPG 蛋白表达增高, RANKL 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠胫骨骨髓中 OPG、RANKL 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG	RANKL
空白对照组	12	2802.65 ± 487.93	972.84 ± 209.27
假手术组	12	2962.46 ± 534.29	1058.10 ± 233.61
模型组	12	1149.31 ± 305.23*	2979.33 ± 502.98*
西药组	12	2565.61 ± 448.60* [△]	1509.32 ± 320.33* [△]
左归丸组	12	2178.23 ± 475.92* [△]	1980.94 ± 358.16* [△]

注: OPG, 骨保护素; RANKL, 细胞核因子 κB 受体活化因子配体; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

中医学认为, 骨骼的生长、营养、功能与肾密切相关。肾为先天之本, 藏精、主骨生髓。肾精充实方能骨髓充盈, 骨化生有源故而强劲有力。若肾精亏虚则骨髓空虚, 骨失濡养故而脆弱无力。因此, 补肾法作为中医治疗骨质疏松症的主要方法。左归丸是中医补肾法的代表方剂, 具有滋阴补肾、填精益髓之效。临床研究证实, 加味左归丸治疗肾

阴虚型绝经后骨质疏松症, 发现该方可显著提高骨密度, 减轻患者疼痛程度, 改善腰膝酸软等临床症状^[11-12]。本研究结果表明, 左归丸组大鼠的腰椎骨密度以及股骨的最大载荷、弯曲强度、弹性模量水平均较模型组明显增高, 说明左归丸对去卵巢所致的大鼠骨质疏松症有明显治疗作用。

近年研究发现, 铁过载与骨质疏松症发生密切相关。铁过载可提高破骨细胞活性, 促进骨吸收, 加速骨量丢失, 最终形成骨质疏松症^[13-15]。Weinberg 等^[16]研究认为, 铁过载影响骨代谢的机制在于铁能抑制垂体前叶分泌促性腺激素 (黄体生成素和卵泡刺激素), 这导致了性激素的合成和分泌减少。铁调素是维持机体铁稳态、纠正铁过载的关键物质, 研究证实, 铁调素基因敲除小鼠的心脏和肝脏等组织会出现严重铁沉积^[17], 这说明铁调素基因缺陷或表达下调会导致铁过载。本研究结果显示, 左归丸组较模型组大鼠肝组织中铁离子水平下降, 铁调素水平上升, 说明去卵巢后大鼠铁调素分泌减少, 出现了铁过载, 经过左归丸治疗后肝细胞分泌铁调素增多, 一定程度上纠正了铁过载状态。OPG/RANKL 是非常重要的骨代谢调控通路, 是机体众多因子调节骨代谢的最终环节。研究发现, 用铁调素干预小鼠成骨细胞株后, OPG 及骨钙素表达量明显增多^[18]。本研究亦显示, 左归丸组的 OPG 蛋白表达较模型组增高, 而 RANKL 蛋白表达水平下降。综上所述, 切除大鼠卵巢可使肝脏分泌铁调素减少, 从而出现铁过载, 左归丸则可纠正这种铁过载现象, 可能是通过对 OPG/RANKL 信号通路进行调节, 最终降低破骨细胞活性, 减少骨量丢失, 保护骨组织。

参考文献

- 梁涛. 健脾补肾法治疗骨质疏松症 100 例疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(4): 103-104.
- 宋献文, 李昊, 计佩芳. 左归丸治疗女性肾阴虚型骨质疏松症 38 例 [J]. 河南中医, 2013, 33(6): 971-972.
- 严炜, 吕荣, 李道鸿, 等. 左归丸治疗肝肾亏虚型老年性骨质疏松症临床观察 [J]. 吉林医学, 2012, 33(35): 7670-7671.

- ④ 鞠大宏,赵宏艳,刘梅洁,等. 左归丸含药血清对成骨细胞 IL-1、IL-6 和 COX-2 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 96-99.
- ⑤ 鞠大宏,张丽坤,赵宏艳,等. 滋阴补肾法对卵巢切除所致骨质疏松大鼠骨髓基质细胞 IL-1 和成骨细胞 IL-6 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(7): 20-23.
- ⑥ 刘梅洁,鞠大宏,赵宏艳,等. “肾主骨”的机理研究: 左归丸含药血清对破骨细胞分化调控因子 OPG、RANKL 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(3): 184-187, 196.
- ⑦ 徐又佳. 降低“铁过载”: 一个防治绝经后骨质疏松的新方案 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2012, 5(1): 1-6.
- ⑧ 冯玉爽,徐又佳,马勇,等. 高龄女性骨质疏松性骨折与血清铁过载的关系 [J]. 江苏医药, 2011, 37(8): 896-898.
- ⑨ 李光飞,徐又佳,钱忠明. 铁过载与骨质疏松关系的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(10): 794-797.
- ⑩ 富灵杰,汤亭亭,戴冠戎. 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 欧阳峰松. 左归丸加减治疗肝肾阴虚型老年性骨质疏松症 50 例临床观察 [J]. 中医药导报, 2015, 21(20): 54-55.
- ⑬ ISHII KA, FUMOTO T, IWAI K, et al. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation [J]. Nat Med, 2009, 15(3): 259-266.
- ⑭ TSAY J, YANG Z, ROSS FP, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress [J]. Blood, 2010, 116(14): 2582-2589.
- ⑮ 王兵,赵环,姜习凤,等. 绝经后女性股骨头铁含量与骨密度的相关性 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2013, 6(1): 9-14.
- ⑯ WEINBERG ED. Role of iron in osteoporosis [J]. Pediatric Endocrinol Rev, 2008, 6(Suppl 1): 81-85.
- ⑰ LESBORDES-BRION JC, VIATTE L, BENNOUN M, et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis [J]. Blood, 2006, 108(4): 1402-1405.
- ⑱ 刘虎,徐又佳,张基森,等. 铁调素对 MC3T3-E1 小鼠成骨细胞骨保护素和骨钙素基因表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(1): 1-4.

Effects of Zuogui Pills (左归丸) on Iron Overload in Osteoporosis Model Rats

LIU Meijie¹, WU Jiaying², LI Yan¹, WANG Shaojun¹, ZHAO Hongyan¹, LIU Hong¹, PAN Jinghua¹, ZHANG Zhiguo², WANG Wenlai², JU Dahong¹

(1. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Zuogui Pills* (左归丸) in the treatment of osteoporosis. **Methods** Sixty female Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, sham operation group, model group, western medicine group and *Zuogui Pills* group, with 12 rats in each. Rats in the model group, western medicine group, and *Zuogui Pills* group were subjected to bilateral oophorectomy to establish osteoporosis model. After modeling, *Zuogui Pills* group was given *Zuogui Pills* 0.968 g/100 g gavage, and western medicine group was given 0.018 mg/100 g gavage estradiol valerate tablets. Blank control group, sham operation group and model group were given purified water 1 ml/100 g gavage. Once a day, 6 days in every week for 3 months. The lumbar vertebral bone density, femur maximum load, flexural strength, elastic modulus, iron ion levels and hepcidin protein expression in rat liver, osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in tibia bone marrow were measured after medication finished. **Results** Compared with the sham operation group, the bone mineral density and femur maximum load, flexural strength, and elastic modulus of the lumbar vertebrae in the model group were decreased. The level of iron in the hepatic tissue was increased and Hepcidin protein was decreased. The expression of OPG protein in the tibia bone marrow was decreased, and RANKL protein expression increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the lumbar bone mineral density and femur maximum load, flexural strength, and elastic modulus of the *Zuogui Pills* group and the western medicine group increased. The iron ion level in the liver tissue decreased, and Hepcidin protein expression increased. OPG protein expression in the tibia bone marrow was increased, and RANKL protein expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Zuogui Pills* can increase the level of Hepcidin secreted by the liver, then regulate the OPG/RANKL signaling pathway, ultimately reduce osteoclast activity, reduce bone loss and protect bone tissue. This may be one of the mechanism in treating osteoporosis.

Keywords osteoporosis; *Zuogui Pills*; hepcidin; iron overload; bone mineral density; the kidney governs the bone (投稿日期: 2017-08-17; 修回日期: 2017-11-06)

编辑: 邓 媛