

引用:罗娟,曾朝辉,袁尚锋,朱莹莹,罗杰,彭真灵,龙厚任.补骨膏对绝经后骨质疏松症大鼠的骨保护作用和对OPG-RANK-RANKL信号通路的影响[J].中医导报,2026,32(1):7-13.

补骨膏对绝经后骨质疏松症大鼠的骨保护作用和对OPG-RANK-RANKL信号通路的影响*

罗娟^{1,2},曾朝辉^{1,3},袁尚锋²,朱莹莹²,罗杰²,彭真灵²,龙厚任¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;

2.株洲市中医伤科医院,湖南株洲412007;

3.湖南中医药高等专科学校,湖南株洲412006)

[摘要] 目的:探究补骨膏对绝经后骨质疏松症(PMOP)大鼠的骨保护作用及其对骨保护素(OPG)-核因子 κ B受体激活蛋白(RANK)-核因子 κ B受体激活蛋白配体(RANKL)信号通路的调控作用。方法:将36只大鼠随机分为假手术组(9只)和手术组(27只),手术组采用双侧卵巢切除建立PMOP大鼠模型。造模成功后,将24只PMOP大鼠随机分为模型组、戊酸雌二醇组、补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组,然后予相应药物灌胃8周。骨密度仪检测股骨近端骨密度;Micro-CT三维重建分析股骨微结构;苏木精-伊红(HE)染色观察股骨组织病理形态;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)、OPG水平,测定血清中磷、钙水平;蛋白质印迹法(Western blotting)检测股骨组织中OPG、RANK、RANKL蛋白表达水平;RT-qPCR法检测股骨组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA、干扰素- γ (IFN- γ) mRNA、精氨酸酶-1(Arg-1) mRNA、转化生长因子- β 1(TGF- β 1) mRNA、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)mRNA、OPG mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA表达水平。结果:假手术组大鼠股骨结构连续完整,骨小梁数目较多,形态较厚,结构致密;模型组大鼠股骨近端骨密度明显降低;补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组和戊酸雌二醇组大鼠股骨近端骨小梁数量、骨组织形态结构均得到不同程度改善。模型组大鼠骨密度及血清中钙、BALP、BGP、OPG水平均低于假手术组($P<0.01$),血清磷水平高于假手术组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠骨密度及血清中钙、BALP、BGP、OPG水平均高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清磷低于模型组($P<0.01$)。模型组大鼠股骨组织OPG蛋白相对表达量低于假手术组($P<0.01$),RANK、RANKL蛋白相对表达量均高于假手术组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠股骨组织中OPG蛋白相对表达量高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),RANK、RANKL蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.01$)。模型组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA对表达量均高于假手术组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、OPG mRNA对表达量均低于假手术组($P<0.01$);补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、OPG mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.01$)。结论:补骨膏可能通过调控OPG-RANK-RANKL信号通路,抑制炎症反应,调节骨基质胶原合成与降解,从而维持骨代谢平衡,改善PMOP大鼠骨密度及骨微结构病理损伤。

[关键词] 绝经后骨质疏松症;补骨膏;OPG-RANK-RANKL信号通路;炎症反应;骨保护;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)01-0007-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.01.002

The Osteoprotective Effects of Bugugao (补骨膏) on Postmenopausal Osteoporotic Rats and Its Influence on the OPG-RANK-RANKL Signaling Pathway

LUO Juan^{1,2}, ZENG Zhaohui^{1,3}, YUAN Shangfeng², ZHU Yingying², LUO Jie², PENG Zhenling², LONG Houren¹

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.Zhuzhou Hospital of Traditional

*基金项目:国家中医药管理局2022年全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号);湖南省中医药管理局中医药科研计划项目(B2023153);湖南省中医药管理局-局市(州)联合攻关科研项目(E2023016,E2023017)

通信作者:曾朝辉,男,主任医师,研究方向为中医骨伤基础与临床研究

Chinese Medicine Orthopedics and Traumatology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 3.Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou Hunan 412006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the osteoprotective effects of Bugugao on rats with postmenopausal osteoporosis (PMOP) and its regulatory role in the osteoprotegerin (OPG)-receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)-RANK ligand (RANKL) signaling pathway. Methods: A total of 36 rats were randomly assigned to a sham-operated group ($n=9$) and an ovariectomized group ($n=27$). PMOP models were established by bilateral ovariectomy. After successful modeling, 24 PMOP rats were randomly divided into a model group, an estradiol valerate group, a low-dose Bugugao group, and a high-dose Bugugao group, followed by 8 weeks of intragastric administration of corresponding treatments. Bone mineral density (BMD) of the proximal femur was measured using a bone densitometer; femoral microstructure was analyzed by Micro-CT three-dimensional reconstruction; histopathological morphology of the femur was observed via hematoxylin-eosin (HE) staining; serum levels of bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (BGP), and OPG were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while serum phosphorus and calcium levels were measured using assay kits; protein expression levels of OPG, RANK, and RANKL in femoral tissue were determined by Western blotting; expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA, interferon- γ (IFN- γ) mRNA, arginase-1 (Arg-1) mRNA, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) mRNA, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) mRNA, OPG mRNA, RANK mRNA, and RANKL mRNA in femoral tissue were detected by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Results: The sham-operated group exhibited continuous and intact femoral structure with numerous, thick, and densely arranged trabeculae; the model group showed significantly reduced BMD in the proximal femur; the low-dose Bugugao group, high-dose Bugugao group, and estradiol valerate group all displayed varying degrees of improvement in trabecular number and bone histomorphology in the proximal femur. Compared with the sham-operated group, the model group showed lower BMD and serum levels of calcium, BALP, BGP, and OPG ($P<0.01$), but higher serum phosphorus levels ($P<0.01$). Compared with the model group, the low-dose Bugugao group, high-dose Bugugao group, and estradiol valerate group showed higher BMD and serum levels of calcium, BALP, BGP, and OPG ($P<0.05$ or $P<0.01$), and lower serum phosphorus levels ($P<0.01$). The model group showed lower relative protein expression of OPG in femoral tissue than sham-operated group ($P<0.01$), while higher expression levels of RANK and RANKL proteins than sham-operated group ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of OPG protein was increased in the low-dose Bugugao group, high-dose Bugugao group, and estradiol valerate group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the expression of RANK and RANKL proteins was decreased in the low-dose Bugugao group, high-dose Bugugao group, and estradiol valerate group ($P<0.01$). The expression levels of TNF- α mRNA, IFN- γ mRNA, MMP-9 mRNA, RANK mRNA, and RANKL mRNA in the model group were higher than that of the sham-operated group ($P<0.01$), whereas the expression levels of Arg-1 mRNA, TGF- β 1 mRNA, and OPG mRNA were lower than that of the sham-operated group ($P<0.01$). In the high-dose Bugugao group and estradiol valerate group, the expression of TNF- α mRNA, IFN- γ mRNA, MMP-9 mRNA, RANK mRNA, and RANKL mRNA was lower ($P<0.01$), while the expression of Arg-1 mRNA, TGF- β 1 mRNA, and OPG mRNA was higher ($P<0.01$) compared with the model group. Conclusion: Bugugao may maintain bone metabolic balance and improve BMD and pathological damage to bone microstructure in PMOP rats by regulating the OPG-RANK-RANKL signaling pathway, inhibiting immune-inflammatory responses, and modulating the synthesis and degradation of bone matrix collagen.

[Keywords] postmenopausal osteoporosis; Bugugao; OPG-RANK-RANKL signaling pathway; inflammatory response; osteoprotective; rats

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种与年龄相关的代谢性骨病,由骨密度降低和骨量减少所致^[1]。其中绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是原发性OP最主要的类型之一。女性绝经后卵巢功能衰退,雌激素分泌断崖式下降,导致破骨细胞生成及活性增强,骨吸收大于骨形成,引

起骨小梁和窦状毛细血管结构紊乱、骨髓腔增大、成纤维细胞增生、骨小梁缺失及皮质骨变薄等病理改变,从而导致进行性骨丢失^[2]。研究发现,50岁及以上绝经女性OP发病率是男性的4倍,骨量减少的发病率是男性的2倍,且女性出现脆性骨折的情况往往比男性早5-10年^[3]。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)

-核因子 κ B受体激活蛋白(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)-核因子 κ B受体激活蛋白配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)信号通路对于维持机体骨代谢的稳定至关重要,是研究骨代谢及OP的重要靶点^[4]。此外,机体免疫炎症反应也可通过炎症介质过量释放等因素对骨骼重塑产生不利影响,从而破坏骨骼健康。如炎症状态可导致RANKL活性过高,OPG活性降低,最终导致骨密度降低^[5]。中医学认为PMOP的基本病机为女子绝经后冲任不足,脾胃亏虚,精不养髓,髓不充骨,治疗当以补肾健脾为主。精气血充足,可充养骨髓,使骨骼强健^[6]。补骨膏具有补肾填精、益气健脾之功效,同时兼顾气血阴阳。该膏方已应用多年,临床疗效可靠,但目前尚缺乏基础实验数据支持。因此本研究基于OPG-RANK-RANKL信号通路及相关免疫炎症细胞因子,探讨补骨膏对PMOP大鼠的骨保护作用,旨在为临床推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雌性SD大鼠36只,6个月龄,体质量(240 \pm 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物公司。动物生产许可证号:SCXK(湘)2024-0038;动物质量合格证号:415840012541025。大鼠饲养于湖南中医药大学实验协同中心标准动物房,12 h/12 h明暗交替,温度(25 \pm 3) $^{\circ}$ C,湿度(55 \pm 10)%,噪声 \leq 60 dB,自由饮水进食。本研究经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准执行,伦理批号:ZYFY20240118-02。

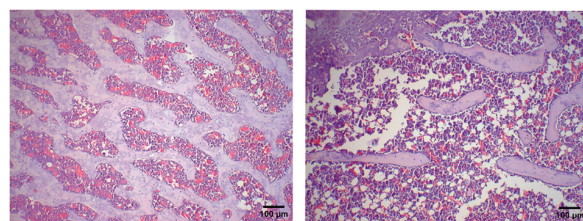
1.2 主要试剂 戊酸雌二醇(法国DELPHARM Lille S.A.S公司,批号:DL202406-01);苏木素染色试剂(批号:Aw2024-011a)、伊红染色试剂(批号:Aw2024-029a)均购自长沙艾碧维生物科技公司;兔OPG单克隆抗体(批号:Ab20240073)、兔RANK单克隆抗体(批号:Ab20240305)均购自英国Abcam公司;兔RANKL单克隆抗体(美国Proteintech公司,批号:PT2024-66610-02);OPG酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(批号:HM2024P05-28)、骨碱性磷酸酶(bone-specific alkaline phosphatase, BALP)ELISA检测试剂盒(批号:HM2024Z08-03)、骨钙素(bone gla-protein, BGP)ELISA检测试剂盒(批号:HM2024Z07-15)均购自武汉华美生物工程公司;无机磷测试盒(批号:JC20240718)、钙测试盒(批号:JC20240711)均购自南京建成生物工程研究所; mRNA逆转录试剂盒(批号:CW20240156)、miRNA逆转录试剂盒(批号:CW20240141)、Ultra SYBR Mixture(批号:CW20240117)、M2000 Plus DNA Marker(批号:CW20240132)均购自北京康为世纪公司;Trizol(美国Thermo公司,批号:T20240617)。

1.3 主要仪器 BX43光学显微镜(日本Olympus公司,型号:IX73-U);Micro CT成像系统(合肥锐视医疗科技公司,型号:IMAGING 100);荧光定量RCP仪(美国ABI公司,型号:Quant Studio1);生物样品均质仪(杭州奥盛公司,型号:BioPrep-24);高速冷冻离心机(日本日立公司,型号:CR22G II);蛋白凝胶电泳系统(美国Bio-RAD公司,型号:Gel Doc XR+);多功能酶标分析仪(深圳汇松科技公司,型号:MB-530)。

1.4 药物制备 补骨膏为株洲市中医伤科医院院内协定膏方,方药组成:龟甲胶5.0 g,莲子20.0 g,黑芝麻5.0 g,山萸肉

5.0 g,熟地黄7.5 g,阿胶珠15.0 g,鹿角胶5.0 g,牡丹皮5.0 g,核桃仁15.0 g,山药7.5 g,陈皮2.5 g,大枣(去核)5.0 g,党参5.0 g,茯苓5.0 g。龟甲胶(批号:2405261)、莲子(批号:241001)、黑芝麻(批号:230801)、山萸肉(批号:231101)、熟地黄(批号:240801)、阿胶珠(批号:240501)均购自湖南亚飞药业有限公司;鹿角胶(批号:220303)、牡丹皮(批号:240501)、核桃仁(批号:230401)、山药(批号:240901)、陈皮(批号:240801)、大枣(去核)(批号:231201)均购自湖南松龄堂中药饮片有限公司;党参(批号:240801)、茯苓(批号:24111509)均购自湖南振兴药业有限公司。上述中药经株洲市中医伤科医院药剂科李杰主任药师鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)各品种项下的相关规定。全方煎煮前加入适量饮用水浸泡30 min,再大、小火各煎煮20 min,滤除药渣,然后加热浓缩药液体积至22 mL,每1 mL溶液约含4.92 g原生药材,即得补骨膏溶液。

1.5 动物分组及造模 36只6个月龄SD雌性大鼠适应性喂养1周后,随机分为假手术组9只、手术组27只。手术组采用切除双侧卵巢法^[7]建立绝经后骨质疏松症大鼠模型。具体方法:麻醉大鼠,俯卧固定于手术台上,常规消毒,在背部两侧(离脊椎1.5~2.0 cm)切开,竖状切口。用镊子找出粉红色卵巢,结扎输卵管峡部,切除双侧卵巢,其余放回腹腔。两侧卵巢摘除后,逐层皮内缝合。术后在切口处注射青霉素1 U以防感染,连续3 d。假手术组大鼠切开皮肤后,不切除卵巢,仅摘除卵巢周围少量脂肪组织后缝合切口。术后所有大鼠均常规饲养,造模后第8周随机处死假手术组和手术组大鼠各3只,采用HE染色评估模型。HE染色显示,与假手术组比较,手术组大鼠股骨内骨小梁细短,间隙较大,可见结构断裂,连续性差且不完整(见图1)。结果显示造模成功^[8]。将手术组24只大鼠随机分为模型组、补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组、戊酸雌二醇组,每组6只。



假手术组 手术组
图1 假手术组及手术组大鼠股骨组织病理改变情况
(HE, $\times 400$)

1.6 给药 根据人与不同种实验动物间用量换算^[9],戊酸雌二醇组大鼠予戊酸雌二醇[0.1 mg/(kg \cdot d)]灌胃,补骨膏低剂量组大鼠予低剂量补骨膏溶液[12.6 g/(kg \cdot d)]灌胃,补骨膏高剂量组大鼠予高剂量补骨膏溶液[50.4 g/(kg \cdot d)]灌胃,假手术组和模型组给予生理盐水[10 mL/(kg \cdot d)]灌胃,连续灌胃8周。

1.7 取材 末次灌胃结束后,称量大鼠体质量,然后配制20%的乌拉坦溶液,腹腔注射(5 mL/kg)麻醉大鼠,腹主动脉取血,室温下静置1.5 h后离心10 min(3 000 r/min,离心半径10 cm),取上清于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。取血后对大鼠心脏灌注,待口唇变白后,分离双侧股骨,生理盐水洗净,左侧股骨行骨密

度测定,然后于4%多聚甲醛中固定,用于后续病理切片;右侧股骨于-80℃冰箱保存,用于蛋白检测及基因检测。

1.8 观察指标

1.8.1 股骨近端骨密度 取左侧股骨,按相同方向及角度排列,使用双能X线骨密度仪检测骨密度。

1.8.2 股骨微结构 使用Micro-CT对各组大鼠股骨进行扫描,设置扫描参数,电压70 kV,电流150 μA,扫描结束后使用avata软件对原始图像进行三维重建,并选取骨骺线下1~3 mm处横截面区域作为观察区域,拍照并观察股骨微结构。

1.8.3 股骨组织病理改变 将固定好的股骨标本使用10% EDTA溶液脱钙4周,然后行常规石蜡包埋和切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察各组大鼠股骨组织病理变化并拍照。

1.8.4 血清BALP、BGP、OPG、钙、磷水平 取血清,室温静置30 min,然后严格按照试剂盒说明书中的步骤进行标准品制备、加样、孵育等操作,加入终止液后用酶标仪在450 nm波长检测每孔OD值,通过标准曲线计算每个样品浓度。

1.8.5 股骨组织中OPG、RANK、RANKL蛋白表达水平 采用Western blotting法检测股骨组织中OPG、RANK、RANKL蛋白表达水平,取适量股骨组织充分锤碎,然后液氮研磨,加入裂解液(含蛋白酶抑制剂)于冰上裂解30 min,离心10 min(4℃, 12 000 r/min,离心半径10 cm),收集上清,采用BCA法蛋白定量,然后取适量蛋白样品进行电泳分离,5%浓缩胶60 V,10%分离胶90 V。电流280 mA湿转1.5 h,5%脱脂牛奶封闭1 h,加OPG一抗(1:1 000)、RANK一抗(1:1 000)、RANKL一抗(1:1000),4℃孵育过夜,TBST漂洗3次,加二抗(1:5 000)室温孵育1 h,添加ECL发光液暗室曝片。用ImageJ v1.8.0软件分析各条带灰度值,统计各组目的蛋白灰度值与β-actin灰度值的比值。

1.8.6 股骨组织肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)mRNA、干扰素-γ(interferon -γ, IFN-γ)mRNA、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)mRNA、转化生长因子-β1(trans-forming growth factor-β1, TGF-β1)mRNA、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase -9, MMP-9)mRNA、OPG mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA表达水平 采用RT-qPCR法检测股骨组织TNF-α mRNA、IFN-γ mRNA、Arg-1 mRNA、TGF-β1 mRNA、MMP-9 mRNA、OPG mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA表达水平。液氮研磨股骨组织后,Trizol法提取总RNA,测定RNA浓度,琼脂糖凝胶验证完整性。取1 μg RNA用PrimeScript RT Master Mix逆转录(37℃ 15 min→85℃ 5 s),将总RNA逆转录合成cDNA。然后从NCBI获取TNF-α、IFN-γ、Arg-1、TGF-β1、MMP-9、OPG、RANK、RANKL的基因序列,用Primer Premier 5.0设计引物(长度18~25 bp, 58~62℃,产物

100~250 bp),引物由北京擎科生物科技有限公司合成(见表1)。随后,以cDNA为模板,加入引物,混合SYBR-Green PCR试剂盒并加入ddH₂O至20 μL,进行PCR扩增反应。循环条件:95℃预变性10 min,经40个循环(95℃ 15 s, 60℃ 30 s)进行扩增,每个样本3次重复,以β-actin为内参基因进行归一化,按2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因相对表达水平。

表1 引物序列

目的基因	序列(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
TNF-α	上游引物:5'-CCCCTCTATTATAATTGCACCT-3'	167
	下游引物:5'-CTGCTAGTTAGCTCCGTTT-3'	
IFN-γ	上游引物:5'-CAACGAGGCCATCAGCAAC-3'	227
	下游引物:5'-CCCAGAATCAGCACCGACT-3'	
Arg-1	上游引物:5'-CATATCTGCCAAGGACATCGT-3'	135
	下游引物:5'-TCCATCACTTTGCCAATTCCG-3'	
TGF-β1	上游引物:5'-ACTACGCCAAAGAAGTCACC-3'	125
	下游引物:5'-CACTGCTTCCCGAATGTCT-3'	
MMP-9	上游引物:5'-GATCCCCAGAGCGTTACTCG-3'	132
	下游引物:5'-GTTGTGAAACTCACACGCC-3'	
OPG	上游引物:5'-CTGTGCTACCAAGATTATACCG-3'	106
	下游引物:5'-CTGTCTCTCCGTTTATCTCTCT-3'	
RANK	上游引物:5'-AGCCTCCAAGCAGAACTGACT-3'	125
	下游引物:5'-ACTGCCTGTGTAGCCATCCG-3'	
RANKL	上游引物:5'-CTTCATGTCTCTGCGCTCTCT-3'	196
	下游引物:5'-TGCTTCTGTCTCTGCTCTCTCC-3'	
β-actin	上游引物:5'-ACATCCGTAAGACCTCTATGCC-3'	223
	下游引物:5'-TACTCCTGCTTCTGCTATCCAC-3'	

1.9 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件分析数据。计量资料以“均数±标准差”(x±s)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,若方差齐用LSD法进行两两比较,方差不齐用Dunnett's T3。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠股骨组织病理形态比较 假手术组大鼠股骨结构连续完整,骨小梁数目较多,形态较厚,结构致密。模型组大鼠股骨近端骨密度明显降低,骨小梁稀疏变形,连接断裂,骨内红骨髓大部分转化为黄骨髓,且骨内脂肪堆积明显。补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组和戊酸雌二醇组大鼠股骨近端骨小梁数量、骨组织形态结构均不同程度改善。与戊酸雌二醇组比较,补骨膏高剂量组大鼠股骨组织的形态及结构更为连续,改善作用更明显。(见图2)

2.2 各组大鼠股骨微结构比较 假手术组大鼠股骨骨小梁结构致密,数量多。模型组大鼠骨小梁间隙增宽,数量明显减少,连续性较差。补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组和戊酸雌

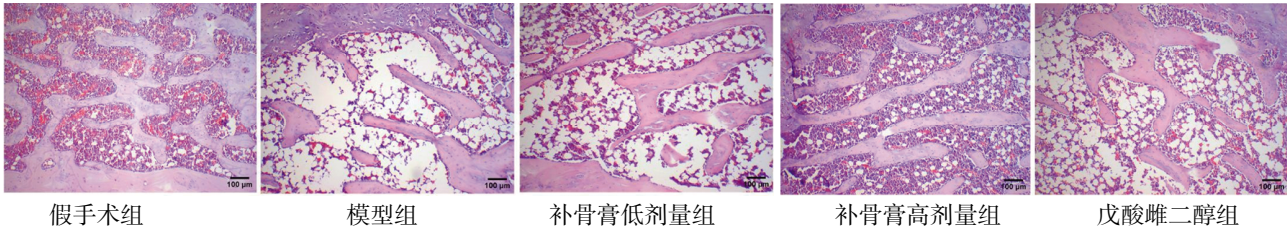


图2 各组大鼠股骨组织病变情况 (HE,×400)

二醇组骨小梁变粗,骨小梁间隙缩小,数量较多。其中补骨膏高剂量组改善较明显。(见图3)

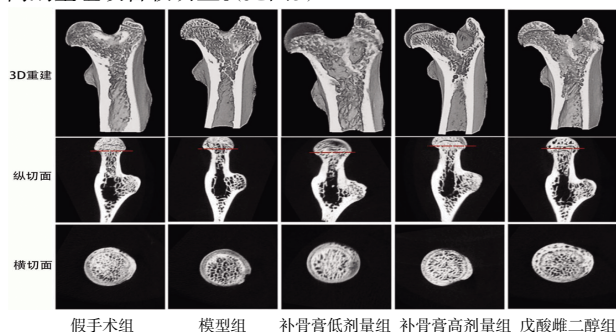


图3 各组大鼠股骨三维重建及骨微结构改变情况(Micro-CT)

2.3 各组大鼠骨密度及血清钙、磷水平比较 模型组大鼠骨密度及血清钙水平均低于假手术组($P<0.01$),血清磷水平高于假手术组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠骨密度及血清钙水平均高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清磷水平低于模型组($P<0.01$);补骨膏低剂量组大鼠骨密度及血清钙水平均低于戊酸雌二醇组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清磷水平高于戊酸雌二醇组($P<0.01$);补骨膏高剂量组大鼠血清钙水平低于戊酸雌二醇组($P<0.05$);补骨膏高剂量组大鼠骨密度及血清磷水平与戊酸雌二醇组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表2)

表2 各组大鼠骨密度及血清钙、磷水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	骨密度(g/cm^2)	血清钙水平($mmol/L$)	血清磷水平($mmol/L$)
假手术组	6	10.0 mL/(kg·d)	0.398±0.031	2.624±0.074	0.566±0.031
模型组	6	10.0 mL/(kg·d)	0.206±0.051 ^a	1.138±0.091 ^a	1.744±0.018 ^a
补骨膏低剂量组	6	12.6 g/(kg·d)	0.251±0.065 ^{b,d}	1.447±0.057 ^{b,c}	1.493±0.017 ^{c,e}
补骨膏高剂量组	6	50.4 g/(kg·d)	0.306±0.057 ^c	1.870±0.135 ^{c,d}	1.192±0.045 ^c
戊酸雌二醇组	6	0.1 mg/(kg·d)	0.296±0.038 ^c	2.267±0.059 ^c	0.912±0.024 ^c
F			33.209	92.930	520.843
P			0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与戊酸雌二醇组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠血清BALP、BGP、OPG水平比较 模型组大鼠血清BALP、BGP、OPG水平均低于假手术组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠血清BALP、BGP、OPG水平均高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组大鼠血清BALP、BGP、OPG水平均低于戊酸雌二醇组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表3)

表3 各组大鼠血清BALP、BGP、OPG水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	BALP/(U/L)	BGP/(pg/mL)	OPG/(ng/mL)
假手术组	6	10.0 mL/(kg·d)	186.30±7.26	335.91±4.72	2.38±0.11
模型组	6	10.0 mL/(kg·d)	91.89±4.76 ^a	201.77±6.82 ^a	1.26±0.05 ^a
补骨膏低剂量组	6	12.6 g/(kg·d)	110.63±3.25 ^{b,c}	228.80±7.53 ^{c,e}	1.58±0.06 ^c
补骨膏高剂量组	6	50.4 g/(kg·d)	130.59±2.48 ^{c,d}	273.18±6.21 ^{c,e}	1.86±0.04 ^{c,d}
戊酸雌二醇组	6	0.1 mg/(kg·d)	155.74±7.32 ^c	304.77±8.69 ^c	2.09±0.03 ^c
F			94.965	124.310	91.567
P			0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与戊酸雌二醇组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

2.5 各组大鼠骨组织OPG、RANK、RANKL蛋白相对表达量比较 模型组大鼠股骨组织OPG蛋白相对表达量低于假手术组($P<0.01$),RANK、RANKL蛋白相对表达量高于假手术组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠股骨组织OPG蛋白相对表达量高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),RANK、RANKL蛋白相对表达量低于模型组($P<0.01$);补骨膏低剂量组、补骨膏高剂量组大鼠股骨组织OPG蛋白相对表达量低于戊酸雌二醇组($P<0.01$),RANK、RANKL蛋白相对表达量高于戊酸雌二醇组($P<0.01$)。(见图4、表4)

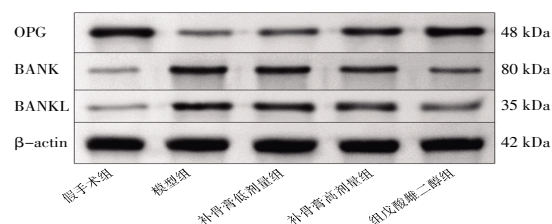


图4 各组大鼠股骨组织OPG、RANK、RANKL蛋白表达

Western blotting图

表4 各组大鼠股骨组织OPG、RANK、RANKL蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	OPG/ β -actin	RANK/ β -actin	RANKL/ β -actin
假手术组	6	10.0 mL/(kg·d)	0.603±0.032	0.067±0.015	0.063±0.015
模型组	6	10.0 mL/(kg·d)	0.093±0.025 ^a	0.560±0.010 ^a	0.493±0.021 ^a
补骨膏低剂量组	6	12.6 g/(kg·d)	0.150±0.020 ^{b,d}	0.411±0.017 ^{c,d}	0.367±0.015 ^{c,d}
补骨膏高剂量组	6	50.4 g/(kg·d)	0.353±0.021 ^{c,d}	0.306±0.031 ^{c,d}	0.290±0.026 ^{c,d}
戊酸雌二醇组	6	0.1 mg/(kg·d)	0.430±0.023 ^c	0.180±0.020 ^c	0.153±0.025 ^c
F			224.466	283.119	194.590
P			0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与戊酸雌二醇组比较,^d $P<0.01$ 。

2.6 各组大鼠骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、MMP-9 mRNA、OPG mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA相对表达量比较 模型组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA相对表达量高于假手术组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、OPG mRNA相对表达量低于假手术组($P<0.01$);补骨膏高剂量组及戊酸雌二醇组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、OPG mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.01$);补骨膏低剂量组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量低于模型组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA相对表达量高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.01$);补骨膏低剂量组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、MMP-9 mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA相对表达量高于戊酸雌二醇组($P<0.01$),Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、OPG mRNA相对表达量低于戊酸雌二醇组($P<0.01$);补骨膏高剂量组大鼠股骨组织TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、OPG mRNA相对表达量高于戊酸雌二醇组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),TGF- β 1 mRNA相对表达量低于戊酸雌二醇组($P<0.01$)。(见表5)

表 5 各组大鼠骨组织 TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA、Arg-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA、MMP-9 mRNA、OPG mRNA、RANK mRNA、RANKL mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	TNF- α mRNA	IFN- γ mRNA	Arg-1 mRNA	TGF- β 1 mRNA	MMP-9 mRNA	OPG mRNA	RANK mRNA	RANKL mRNA
假手术组	6	10.0 mL/(kg·d)	1.02 \pm 0.25	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.11
模型组	6	10.0 mL/(kg·d)	7.12 \pm 0.56 ^a	4.59 \pm 0.47 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.02 ^a	6.14 \pm 1.01 ^a	0.21 \pm 0.02 ^a	6.68 \pm 1.37 ^a	5.59 \pm 1.44 ^a
补骨膏低剂量组	6	12.6 g/(kg·d)	5.33 \pm 0.96 ^{ac}	3.50 \pm 0.32 ^{ac}	0.32 \pm 0.03 ^{bc}	0.24 \pm 0.01 ^{cc}	4.26 \pm 0.83 ^{cc}	0.31 \pm 0.02 ^c	5.91 \pm 0.71 ^c	4.21 \pm 0.47 ^{bc}
补骨膏高剂量组	6	50.4 g/(kg·d)	3.66 \pm 0.67 ^{ce}	2.64 \pm 0.24 ^{ce}	0.48 \pm 0.02 ^c	0.53 \pm 0.04 ^{ce}	2.85 \pm 0.95 ^c	0.69 \pm 0.07 ^{cd}	2.61 \pm 0.45 ^c	2.84 \pm 0.52 ^c
戊酸雌二醇组	6	0.1 mg/(kg·d)	1.72 \pm 0.14 ^c	1.89 \pm 0.13 ^c	0.57 \pm 0.07 ^c	0.64 \pm 0.05 ^c	2.68 \pm 0.52 ^c	0.52 \pm 0.08 ^c	1.68 \pm 0.42 ^c	1.54 \pm 0.19 ^c
F			53.871	70.057	67.261	383.776	221.251	40.038	35.392	20.484
P			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与戊酸雌二醇组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

3 讨 论

绝经后骨质疏松症属中医中“骨痿”范畴。中医学认为本病发病与肾藏精、肾主骨功能失常密切相关^[10]。肾藏精,精生髓,髓养骨。肾中精气充足则骨髓生化有源,骨骼强健。女子“七七”后,天癸衰竭,肾气渐衰,肾精亏虚,导致骨髓化生不足,骨失所养而发为骨质疏松症;其次,天癸衰竭,地道不通,冲任二脉气血衰少,导致骨骼失于濡养,也可发为本病。肾为先天之本,脾胃为后天之本。肾中精气有赖于脾胃运化的水谷精微充养。脾在体合肉,主四肢,为气血化生之源。脾胃强健,气血生成充足,则四肢百骸得养。若脾胃运化功能失司,一则肾中精气充养不足,二则气血化生乏源,导致筋骨肌肉失养而发为本病^[11]。可见,PMOP发病与脾、肾二脏关系密切。其中肾精亏虚为根本病因,脾胃虚弱为关键促进因素,故补肾健脾法被广泛应用于PMOP的临床治疗中^[12]。补骨膏中熟地黄、山萸肉、龟甲胶、鹿角胶为君药,补肾益精填髓;山药、党参、茯苓、莲子、大枣健脾益胃,益气养血,可增强脾胃运化之功能,以培补后天之本;阿胶、黑芝麻、核桃仁补肾固精,滋阴养血,有助于肾中阴阳平衡;牡丹皮活血化瘀,陈皮理气和中,两药配伍使用以防滋补壅滞,使补而不滞。诸药合用,补肾填精,益气健脾,兼顾气血阴阳。全方先天后天同治,契合PMOP“脾肾亏虚,精不生髓,髓枯骨萎”之病机。该膏方已临床应用多年,临床疗效可靠。本研究结果表明,补骨膏低、高剂量组大鼠股骨近端骨小梁变粗,骨小梁间隙缩小,数量增加,骨组织形态结构及骨密度均得到不同程度改善,表明补骨膏可缓解PMOP病理改变。

PMOP作为一种与年龄相关的退行性骨病,雌激素缺乏是其主要原因。雌激素缺乏会导致成骨细胞与破骨细胞的动态平衡失调,表现为破骨细胞活性增加,骨吸收增强,从而导致骨代谢失衡引发骨质疏松症,增加脆性骨折风险^[13]。RANK/RANKL/OPG信号通路是破骨细胞形成和分化的重要途径。成骨细胞释放的RANKL与破骨细胞前体细胞表面的RANK结合,从而触发破骨细胞的形成,增强骨吸收^[14]。OPG是一种重要的骨保护因子,主要由成骨细胞产生和分泌。OPG可与RANKL竞争性结合,从而抑制RANK与RANKL的结合,抑制破骨细胞形成,避免过度的骨吸收^[15]。本研究发现,经补骨膏干预后的大鼠股骨组织中OPG蛋白及OPG mRNA表达均升高,而RANK、RANKL蛋白及RANK mRNA、RANKL mRNA表达均

下降,表明补骨膏具有调节RANK/RANKL/OPG信号通路的作用。BGP和BALP均由成骨细胞合成和分泌。两者对于促进骨基质的矿化至关重要,是重要的骨形成标志物^[16]。钙和磷是骨骼的重要组成部分,血清钙和无机磷水平是评估骨质疏松症风险的重要指标^[17]。血钙水平过低可促使破骨细胞活性增强,使骨中钙质释放入血,以代偿低血钙状态;血磷水平过高可导致甲状旁腺功能亢进,促使破骨细胞活性增强,进而增加骨吸收^[18]。本研究结果表明,补骨膏可降低PMOP大鼠血清中无机磷水平,升高血钙及BALP、BGP水平,表明补骨膏对于PMOP模型大鼠血清中骨保护相关因子及钙、磷水平具有积极调节作用。

机体免疫炎症反应与骨质疏松症关系密切,主要通过影响骨形成及骨吸收相关信号通路加速病情进展^[19]。TNF- α 主要是由T淋巴细胞和B淋巴细胞在各种因素刺激下所产生的一种炎症细胞因子。围绝经期女性体内雌激素下降,会导致骨髓T淋巴细胞、B淋巴细胞数量增加,从而导致TNF- α 水平升高,进而参与多种骨组织细胞死亡过程,最终加速骨质疏松症的病理进展^[20]。体外实验显示,IFN- γ 可通过RANK/RANKL信号传导抑制破骨细胞形成,但体内实验发现,IFN- γ 可加速T细胞的增殖与活化,从而导致RANKL和TNF- α 大量产生,最终促进破骨细胞形成,加速骨吸收^[21]。Arg-1具有抗炎和免疫调节作用^[22]。研究发现,Arg-1可通过影响巨噬细胞极化调节破骨细胞的生成^[23]。本研究结果表明,补骨膏可下调PMOP大鼠骨组织中TNF- α mRNA、IFN- γ mRNA表达,上调Arg-1 mRNA表达,说明补骨膏可调节PMOP大鼠骨组织中免疫炎症反应,从而发挥骨保护作用。TGF- β 1不仅具有促进成骨细胞分化、增殖和抑制破骨细胞形成的作用,还能调节细胞外基质的合成和分泌,对于维持骨组织的结构和功能至关重要^[24]。MMP-9在破骨细胞中呈高表达,可降解细胞外基质中的胶原蛋白成分,参与破骨细胞介导的骨吸收^[25]。本研究结果表明,补骨膏可上调PMOP大鼠骨组织中TGF- β 1 mRNA表达,下调MMP-9 mRNA表达,表明补骨膏可能通过影响骨基质中胶原蛋白合成与降解相关靶点发挥抗骨质疏松作用。

综上所述,补骨膏可升高PMOP大鼠血清中骨保护相关因子水平,改善PMOP大鼠骨密度及骨微结构病理损伤,其机制可能与调控OPG-RANK-RANKL信号通路,抑制免疫炎症反应,调节骨基质胶原合成与降解,从而维持骨代谢平衡有

关。本研究仅探索了补骨膏治疗PMOP的有效性及可能机制,未来还需进一步开展体外研究、药理及毒理学实验,以为临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2022, 15(6): 573-611.
- [2] ARCEO-MENDOZAR M, CAMACHO M. Postmenopausal osteoporosis: Latest guidelines[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2): 167-178.
- [3] ALSWATK A. Gender disparities in osteoporosis[J]. J Clin Med Res, 2017, 9(5): 382-387.
- [4] SCHACTERG I, LESLIEW D. Diabetes and osteoporosis: Part I, epidemiology and pathophysiology[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2): 275-285.
- [5] CHENY W, RAMSOOKA H, COXSONH O, et al. Prevalence and risk factors for osteoporosis in individuals with COPD: A systematic review and meta-analysis[J]. Chest, 2019, 156(6): 1092-1110.
- [6] 崔正阳,徐展望.中医药治疗骨质疏松研究进展[J].中国中医药现代远程教育, 2024, 22(24): 179-182.
- [7] 江宇楠,张立雪,段方林,等.二十五味鬼臼丸激活PI3K/Akt/mTOR介导的自噬缓解去势大鼠骨质疏松作用[J].中国实验方剂学杂志, 2024, 30(22): 43-51.
- [8] 李佳慧,林楚然,闫瑞忠,等.淫羊藿、当归及其配伍用药对绝经后骨质疏松症大鼠TGF- β 1/Smads信号通路的影响[J].中医导报, 2024, 30(8): 47-52.
- [9] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用药量换算[J].畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [10] 赵玲娟,孙浩羽,周胜元,等.从肾论治绝经后骨质疏松症的中医研究进展[J].临床误诊误治, 2024, 37(15): 91-94.
- [11] 房谋昊,周航,陈天鹏,等.从“治痿独取阳明”论治绝经后骨质疏松症[J].中医正骨, 2021, 33(8): 49-50, 55.
- [12] 骞紫娟.中药复方治疗绝经后骨质疏松症的分子机制研究进展[J].中医药临床杂志, 2024, 36(9): 1816-1820.
- [13] KALKAN R, TULAY P. The interactions between bone remodelling, estrogen hormone and EPHfamily genes[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2018, 28(2): 135-138.
- [14] YASUDA H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system[J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 2-11.
- [15] 《中国骨质疏松杂志》骨代谢专家组,张萌萌,马倩倩,等.骨代谢生化指标临床应用专家共识(2023修订版)[J].中国骨质疏松杂志, 2023, 29(4): 469-476.
- [16] LI R, ZHU X Y, ZHANG M X, et al. Association of serum periostin level with classical bone turnover markers and bone mineral density in Shanghai Chinese postmenopausal women with osteoporosis[J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 7639-7646.
- [17] 寇蕊蕊,刘盈盈,王淑娥,等.骨密度联合骨微结构及骨代谢指标在大鼠骨质疏松干预实验中的应用[J].中国老年学杂志, 2025, 45(4): 952-955.
- [18] 戴小宇,黄智慧,王珂杰,等.血清钙磷乘积预测老年椎体压缩性骨折风险的意义[J].中国骨质疏松杂志, 2022, 28(4): 505-508, 539.
- [19] 吕浩,张舸,胡芷苒,等.炎症、代谢物与骨质疏松症[J].中国组织工程研究, 2025, 29(17): 3697-3704.
- [20] 赵建栋,刘贝,郭成龙,等.肿瘤坏死因子 α 介导的骨细胞程序性死亡在骨质疏松症发病机制中的作用[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2024, 17(3): 272-279.
- [21] 林适,袁嘉尧,林贤灿,等.外周血干扰素 γ 、单核细胞趋化蛋白1对绝经后骨质疏松症的预测价值[J].中国组织工程研究, 2023, 27(2): 165-170.
- [22] LIU L, ZHONG Y Y, ZHENG T, et al. Epimedin B exerts an anti-inflammatory effect by regulating the MAPK/NF- κ B/NOD-like receptor signalling pathways[J]. Fish Shellfish Immunol, 2024, 150: 109657.
- [23] 黄夏荣,周君,孙光华,等.电针对老年大鼠关节软骨及软骨下骨极化相关蛋白表达的影响[J].实用医学杂志, 2023, 39(12): 1473-1479.
- [24] GAO Y G, CHEN N, FU Z D, et al. Progress of Wntsignaling pathway in osteoporosis[J]. Biomolecules, 2023, 13(3): 483.
- [25] SABRY M, MOSTAFA S, KAMAR S, et al. The cross-talk between matrix metalloproteinase-9, RANKL/OPG system and cardiovascular risk factors in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis [J]. PLoS One, 2021, 16(10): e0258254.

(收稿日期:2025-05-26 编辑:蒋凯彪)