

·论著·

## 补骨益髓饮治疗骨质疏松大鼠的作用机理研究

王文建<sup>1</sup>, 陈志勇<sup>2</sup>, 王博韬<sup>1</sup>, 李昊辰<sup>1</sup>

(天津市北辰区中医医院骨科<sup>1</sup>, 药剂科<sup>2</sup>, 天津 300400)

**摘要:**目的 研究补骨益髓饮对骨质疏松大鼠治疗的作用机理。方法 取60只大鼠建立骨质疏松性骨折大鼠模型,采用随机数字表法分为试药组、阳性对照组、模型组,各组30只。试药组灌胃给予补骨益髓饮,阳性对照组灌胃给予睾酮,模型组给予等体积蒸馏水,另选取20只作为空白组。比较各组大鼠左侧胫骨骨折部位骨密度值,观察骨组织形态学变化。并检测大鼠血清中前列腺素E2、前列环素变化、胫骨组织中基因和蛋白表达。结果 模型组大鼠胫骨组织状态较空白组变差,组织病理改变严重;与空白组比较,模型组大鼠血清中PGE2与PGI2均升高( $P<0.05$ );与模型组比较,试药组大鼠血清中PGE2和PGI2含量均降低( $P<0.05$ )。阳性对照组与试药组大鼠血清PGE2和PGI2水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );与空白组比较,模型组大鼠胫骨组织BMP2、TIMP1蛋白表达降低,试药组大鼠胫骨组织TIMP1蛋白表达与模型组比较呈上升趋势( $P<0.05$ );与阳性对照组比较,蛋白表达增高( $P<0.05$ );试药组大鼠胫骨组织BMP2蛋白表达相对于模型组增加( $P<0.05$ ),与阳性对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );与空白组比较,模型组大鼠胫骨组织BMP2、TIMP1基因表达下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );试药组大鼠胫骨组织BMP2和TIMP1基因表达高于模型组和阳性对照组( $P<0.05$ ),阳性对照组大鼠胫骨组织BMP2和TIMP1基因表达均高于模型组( $P<0.05$ )。结论 补骨益髓饮对骨质疏松大鼠模型有一定的治疗作用,相关机制可能与其抑制大鼠血清PGE2/PGI2水平,促进BMP2/TIMP1基因及蛋白表达,改善骨质量有关。

**关键词:**补骨益髓饮;骨质疏松大鼠;骨折

中图分类号:R274

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.24.006

文章编号:1006-1959(2023)24-0037-05

### Study on the Mechanism of Bugu Yisui Decoction in the Treatment of Osteoporosis Rats

WANG Wen-jian<sup>1</sup>, CHEN Zhi-yong<sup>2</sup>, WANG Bo-tao<sup>1</sup>, LI Hao-chen<sup>1</sup>

(Department of Orthopaedics<sup>1</sup>, Department of Pharmacy<sup>2</sup>, Tianjin Beichen Traditional Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300400, China)

**Abstract:** **Objective** To study the mechanism of Bugu Yisui decoction in the treatment of osteoporosis rats. **Methods** A total of 60 rats were used to establish a rat model of osteoporotic fracture. They were divided into test group, positive control group and model group by random number table method, with 30 rats in each group. The test group was given Bugu Yisui decoction by gavage, the positive control group was given testosterone by gavage, and the model group was given equal volume of distilled water. Another 20 rats were selected as the blank group. The bone mineral density of the left tibia fracture site of each group was compared, and the morphological changes of bone tissue were observed. The changes of prostaglandin E2 and prostacyclin in serum, gene and protein expression in tibia tissue were detected. **Results** The tibial tissue status of the model group was worse than that of the blank group, and the histopathological changes were serious. Compared with the blank group, PGE2 and PGI2 in the serum of the model group were increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the contents of serum PGE2 and PGI2 of rats in the test group were decreased ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in serum PGE2 and PGI2 levels between the positive control group and the test group ( $P>0.05$ ). Compared with the blank group, the expression of BMP2 and TIMP1 protein in the tibial tissue of the model group decreased, and the expression of TIMP1 protein in the tibial tissue of the test group increased compared with the model group ( $P<0.05$ ). Compared with the positive control group, the protein expression was increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the expression of BMP2 protein in the tibia tissue of the rats in the test group was increased ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference compared with the positive control group ( $P>0.05$ ). Compared with the blank group, the expression of BMP2 and TIMP1 genes in the tibia tissue of the model group decreased, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The gene expression of BMP2 and TIMP1 in tibia tissue of rats in the test drug group was higher than that in the model group and the positive control group ( $P<0.05$ ), and the gene expression of BMP2 and TIMP1 in tibia tissue of rats in the positive control group was higher than that in the model group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Bugu Yisui decoction has a certain therapeutic effect on osteoporosis rat model, and the related mechanism may be related to its inhibition of serum PGE2/PGI2 level, promotion of BMP2/TIMP1 gene and protein expression, and improvement of bone quality.

**Key words:** Bugu Yisui decoction; Osteoporosis rats; Fracture

基金项目:天津市北辰区科学技术局·天津市北辰区卫生健康委科研项目(编号:SHGY-2020047)

作者简介:王文建(1979.4-),男,河北廊坊人,本科,主治医师,主要从事骨科疾病的临床工作

通讯作者:陈志勇(1978.11-),男,天津人,硕士,主管药师,主要从事中药学的研究

骨质疏松症(Osteoporosis)被称为“骨重塑”,是一种全身性骨骼疾病,包括骨量减少和骨组织微结构退化,导致骨衰弱和骨折易感性增加。女性在50岁或以上时开始失去骨量,骨质疏松症的发生率是男性的4倍,骨质减少的发生率是男性的2倍,骨折年龄比男性年轻5~10岁<sup>[1-2]</sup>。安全有效的治疗方法有助于减轻社会骨骼健康疾病日益加重的公共负担。中医药在治疗骨质疏松性骨折方面具有一定的优势。有研究表明<sup>[3]</sup>,补骨益髓饮对围绝经期妇女骨质疏松有很好的治疗效果,但对治疗骨质疏松性骨折鲜有报道。本研究建立了骨质疏松性骨折大鼠模型,以观察本方的治疗效果及机理,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠80只,平均体重(180±20)g,鼠龄6~8周,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008/动物质量合格证号110322221104126610。在光照12 h/d的环境中喂养大鼠1周。实验经北辰中医院动物实验伦理委员会批准,批准文号为BS20210510-1。

1.2 主要试剂与仪器 中药材均购自北辰中医院;Masson染色试剂盒、HE染色试剂盒、PEG 2 Elisa试剂盒、RIPA裂解液购自索莱宝科技有限公司;PGI 2 Elisa试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;mRNA逆转录引物购自金唯智生物科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物;荧光定量PCR检测系统来自博日科技有限公司;超微量分光光度计NanoPhotometer NP80来自德国IMPLEN;PCR仪Arhat 96来自Monad。

## 1.3 方法

1.3.1 补骨益髓饮制备 补骨益髓饮为天津市北辰区中医医院研发的院内协议处方,由丹参30 g,淫羊藿、煅龙骨、煅牡蛎各20 g,鹿角胶、怀牛膝、续断、熟地、补骨脂、骨碎补、乳香、没药、山药各10 g组成,按方称取,常规水煎后去渣取汁。

1.3.2 建模分组及处理 随机抽取60只大鼠建立骨质疏松性骨折大鼠模型,同时选取20只大鼠作为空白组。经腹腔麻醉,暴露大鼠双侧睾丸并手术切除,同时于颈部皮下注射D-半乳糖(100 mg/kg),8周后将大鼠随机分为3组,其中试药组20只,灌胃给予补骨益髓饮[5 ml/(kg·d)];阳性对照组20只,灌胃给予睾酮[2 ml/(kg·d)];模型组20只,同一时间给

于等体积蒸馏水,共干预18周。暴露18周后,腹腔注射水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,分离血清备用,取骨折处胫骨组织备用。

1.3.3 HE及Masson染色观察 取部分骨折处胫骨,液氮速冻15 s,石蜡包埋固定,冷冻切片机切片。取股骨组织切片固定,苏木素-伊红染色,乙醇脱水,二甲苯透明,干燥,中性树胶封片,光学显微镜下观察大鼠股骨组织细胞形态并拍摄照片。取股骨组织切片,乙醇脱蜡至水,苏木素-丽春红染色,磷钼酸处理,苯胺蓝染色,分化脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下镜检<sup>[4-5]</sup>。

1.3.4 ELISA检测 血清前列腺素E<sub>2</sub>、前列环素含量取大鼠血清,按照PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>试剂盒说明书进行操作。用酶标仪在波长450 nm处测定吸光度(OD值),通过标准曲线计算各组大鼠血清样本中PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>的浓度<sup>[6]</sup>。

1.3.5 Western blot分析 TIMP 1、BMP 2蛋白的表达情况 称取各组大鼠的左侧股骨组织100 mg,加入1 ml RIPA裂解液,组织研磨进行匀浆得到组织匀浆液,TRIzol提取组织总蛋白,BCA法进行蛋白定量,上样,凝胶电泳30 min,转膜,封闭,加入一抗4℃孵育过夜,洗膜,室温孵育二抗,显色成像,用Image J进行灰度值分析,内参对照为β-actin。

1.3.6 RT-qPCR实验 TIMP 1、BMP 2 mRNA转录水平检测 称取各组大鼠的左侧股骨组织100 mg,液氮急冻,加入TRIzol,氯仿抽提,取水相,异丙醇沉淀,晾干<sup>[7]</sup>。稀释RNA(约1000 ng/μl),作为PCR反应模板,严格按照MonScript™ RTIII ALL-in-One MIX with dsDNase试剂盒说明书进行逆转录。使用Stepone软件读取各PCR反应Ct值,使用目的基因的Ct值减去内参基因的Ct值,得到 $\Delta Ct$ ;用试药组 $\Delta Ct$ 减去空白组的 $\Delta Ct$ 均值,得到 $\Delta\Delta Ct$ 。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对于空白组,试药组基因的表达变化,见表1。

表1 TIMP 1、BMP 2和β-actin引物

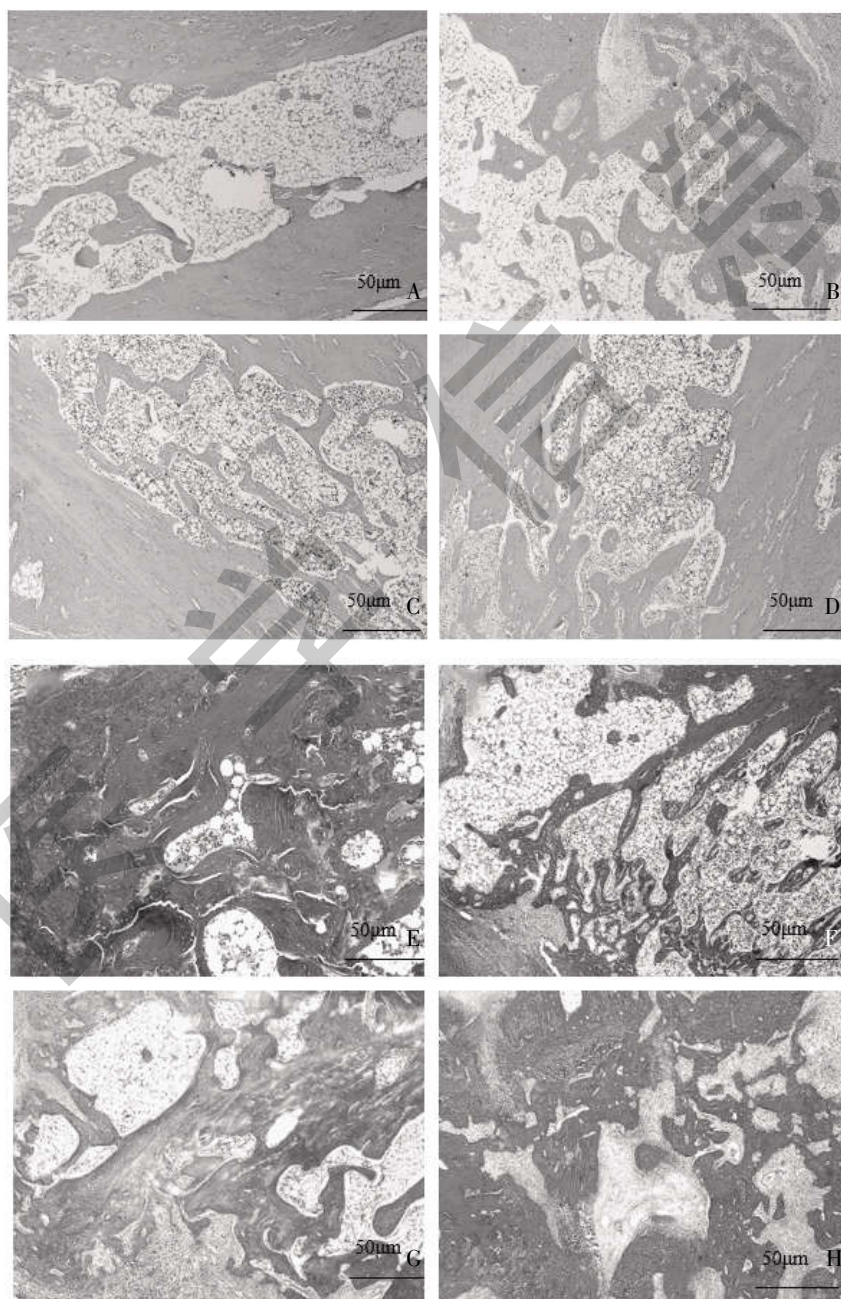
引物名称	类型	序列(5'-3')	Size(bp)
TIMP1	F	TGCAACTCGGACCTGGTTAT	117
	R	AGCGTCGAATCCTTTGAGCA	
BMP2	F	CTTCCATCACGAAGAAGCCA	146
	R	CTTCCTGCATTTGTTCCCGA	
β-actin	F	GCCTTCCTTCCTGGGTATGG	139
	R	AATGCCTGGGTACATGCTGG	

1.4 统计学方法 采用 Quantity one 4.6.8 软件对 Western blotting、RT-PCR 等实验结果进行灰度值分析,采用方差分析法对实验数据进行统计学差异检测。使用 SPSS 22.0 对相关数据施以统计分析,计量资料的表达采用( $\bar{x} \pm s$ ),使用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 病理学检测 HE/Masson 染色结果见图 1, 空白

组大鼠模型胫骨组织整体结构基本正常,骨皮质较厚。模型组大鼠模型胫骨组织整体结构异常,骨皮质变薄,网状骨骨小梁数目及体积减少,空隙增加,胶原纤维明显变少。试药组和阳性对照组大鼠模型胫骨组织整体结构轻度异常,部分骨小梁生长,骨皮质和骨小梁形态特征较好,且胶原纤维有明显的改善且排列有序。



注:A、E:空白组,B、F:模型组,C、G:试药组,D、H:阳性对照组

图 1 建模大鼠胫骨组织 HE 和 Mssson 染色结果( $\times 200$ )

2.2 补骨益髓饮对去势骨质疏松性骨折模型大鼠血清中 PGE2 和 PGI2 的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中 PGE2 与 PGI2 均升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),说明造模成功。与模型组比较,试药组大鼠血清中 PGE2 和 PGI2 含量均降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与阳性对照组比较,试药组大鼠血清中 PGE2 和 PGI2 水平均比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 模型大鼠血清中 PGE2 和 PGI2 的变化情况  
( $\bar{x}\pm s$ ,pg/ml)

组别	n	PGE2	PGI2
空白组	3	210.44±20.81	133.81±28.77
模型组	3	530.44±38.61 <sup>a</sup>	264.37±18.41 <sup>a</sup>
试药组	3	425.87±36.77 <sup>b</sup>	185.42±8.16 <sup>b</sup>
阳性对照组	3	416.79±54.61 <sup>b</sup>	171.07±8.57 <sup>b</sup>

注:与空白组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P<0.05$

2.3 补骨益髓饮对胫骨组织 BMP 2、TIMP 1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠胫骨组织 BMP 2、TIMP 1 蛋白表达降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示造模成功。试药组大鼠胫骨组织 TIMP 1 蛋白表达与模型组比较呈上升趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与阳性对照组比较,蛋白表达增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );试药组大鼠胫骨组织 BMP 2 蛋白表达相对于模型组增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与阳性对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3、图 2。

表 3 大鼠胫骨 TIMP 1 和 BMP 2 的表达情况( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TIMP 1	BMP 2
空白组	3	0.67±0.03	1.01±0.03
模型组	3	0.26±0.04 <sup>a</sup>	0.51±0.02 <sup>ac</sup>
试药组	3	0.48±0.03 <sup>bc</sup>	1.07±0.02 <sup>b</sup>
阳性对照组	3	0.35±0.03 <sup>b</sup>	0.85±0.10 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$

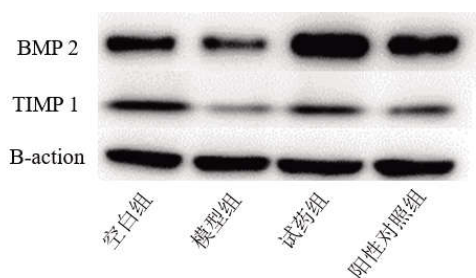


图 2 大鼠胫骨组织 BMP 2、TIMP 1 蛋白表达水平比较

2.4 补骨益髓饮对大鼠胫骨组织 BMP 2、TIMP 1 基因表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠胫骨组织 BMP 2、TIMP 1 基因表达下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示造模成功。试药组大鼠胫骨组织 BMP2 和 TIMP1 基因表达,相对于模型组和睾酮组,有明显增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。睾酮组大鼠胫骨组织 BMP 2 和 TIMP 1 基因表达与模型组比较均呈升高趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

表 4 大鼠胫骨 TIMP 1 和 BMP 2 基因的表达比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TIMP 1	BMP 2
空白组	3	1.00±0.09	1.00±0.08
模型组	3	0.18±0.01 <sup>b</sup>	0.30±0.03 <sup>b</sup>
试药组	3	0.63±0.08 <sup>abc</sup>	0.99±0.07 <sup>abc</sup>
阳性对照组	3	0.34±0.03 <sup>bc</sup>	0.63±0.04 <sup>bc</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

补骨益髓饮方以补肝益肾、健脾益髓、强筋壮骨、活血化瘀、通经活络为治疗原则<sup>[8]</sup>。其中多项中药的成分分别具有成骨活性,可调节成骨细胞生成和破骨细胞生成,或可调节免疫系统和炎症疾病<sup>[9]</sup>,或达到滋阴补血、消肿生肌的作用<sup>[10-12]</sup>。因此本研究观察补骨益髓饮治疗骨质疏松骨折模型大鼠具有可行性。

本研究通过切除大鼠双侧睾丸构建骨质疏松骨折大鼠模型。通过对大鼠骨密度检测及骨组织形态观察,提示大鼠模型构建成功。进行干预后病理结果显示,经补骨益髓饮和睾酮治疗的大鼠,胫骨组织整体结构状态好转,骨皮质加厚,网状骨骨小梁数目及体积有增加,胶原纤维增加,提示补骨益髓饮治疗大鼠骨质疏松有确切作用。

前列腺素是影响骨代谢的关键调节因素,PGE2 可以激活感觉神经中的 PGE2 受体 4(EP4),通过中枢神经系统抑制交感神经活动来调节骨吸收和骨形成,PGI2 是花生四烯酸在环加氧酶和 PGI 的作用下衍生的主要产物之一,也通过激活 PGI 上调 cAMP 2 受体,有促进骨形成作用<sup>[13-15]</sup>。同时 PGI2 也可能在维持正常骨量和微结构方面起到调节作用,其均在骨密度降低时增加。本研究对各组大鼠血清中 PGE2、PGI2 含量进行测定,模型组含量均高于空白



组,提示造模成功。经过治疗后,补骨益髓饮组大鼠PGE2、PGI2水平平均产生的抑制作用,含量相对于模型组均下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。说明补骨益髓饮可通过调节PGE2、PGI2表达来影响骨组织的形成。

BMP 2在成年期的骨重塑和体内平衡中起重要作用,BMP 2可形成同源或异二聚体,然后通过相应的受体、BMP I型和BMP II型受体的复合物结合,激活导致成骨细胞的信号通路,对成骨细胞向成熟成骨细胞的分化有积极影响<sup>[16-18]</sup>。TIMP 1在多种人体细胞和组织中普遍表达,在成骨细胞和间充质干细胞的成骨中起重要作用,是成骨细胞或间充质干细胞成骨分化的正调节因子<sup>[19]</sup>。TIMP 1和BMP 2刺激的成骨细胞前的成骨分化增加可以在基因表达或蛋白质水平上显示<sup>[20]</sup>。本研究中,相对于空白组,模型组BMP 2和TIMP 1的蛋白及基因表达水平均下降,表明造模成功。经补骨益髓饮治疗后,大鼠胫骨组织中BMP 2和TIMP 1表达水平上升,甚至达到优于阳性对照药物睾酮的效果,初步阐明补骨益髓饮对骨质疏松大鼠模型的治疗作用较明显,但其更为详细的机制阐明还需要更深入的展开。

综上所述,补骨益髓饮能显著抑制骨质疏松模型PGE2/PGI2的水平,促进BMP 2/TIMP 1基因及蛋白表达,对骨质疏松大鼠模型有一定的治疗作用,相关机制可能与其抑制炎症,改善骨质量有关。

#### 参考文献:

- [1]Elonheimo H,Lange R,Tolonen H,et al.Environmental substances associated with osteoporosis—A scoping review[J].International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021,18(2):738.
- [2]Laskou F,Patel HP,Cooper C,et al.A pas de deux of osteoporosis and sarcopenia: osteosarcopenia [J].Climacteric,2022,25(1):88-95.
- [3]孙凯,魏戌,谢雁鸣.补骨生髓方对去势骨质疏松大鼠 Smad/ERK 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志,2019,20(11): 250-253.
- [4]Bi Z,Zhang W,Yan X.Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of icariin and icaritin [J].Biomedicine & Pharmacotherapy,2022,151:113180.
- [5]郭文清.骨疏颗粒对骨质疏松大鼠骨代谢指标及炎症因子的影响[D].昆明:云南中医学院,2016.
- [6]Ren Y,Song X,Tan L,et al.A Review of the Pharmacological Properties of Psoralen[J].Front Pharmacol,2020,11:571535.
- [7]章轶立,魏戌,谢雁鸣,等.基于整合药理学策略探究补肾活血法治疗骨质疏松症作用机制——以补骨脂-三七药对为例[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(21):163-169.
- [8]Li ZM,Xu SW,PQ L.Salvia miltiorrhiza Burge (Danshen): a golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics [J].Acta Pharmacol Sin,2018,39(5):802-824.
- [9]刘明玉.二仙补骨汤治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效及对BGP的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2021.
- [10]Tay J,Barbier V,Helwani FM,et al.Prostacyclin is an endosteal bone marrow niche component and its clinical analog iloprost protects hematopoietic stem cell potential during stress [J].Stem Cells,2021,39(11):1532-1545.
- [11]章轶立,唐彬,姜俊杰,等.整合药理学视角下的骨碎补治疗骨质疏松症作用机制研究 [J]. 中国中药杂志,2018,43(20): 4125-4131.
- [12]Ingwersen LC,Frank M,Naujokat H,et al.BMP-2 long-term stimulation of human pre-osteoblasts induces osteogenic differentiation and promotes transdifferentiation and bone remodeling processes [J].International Journal of Molecular Sciences,2022,23(6):3077.
- [13]刘梅洁,吴佳莹,李艳,等.左归丸对骨质疏松症模型大鼠铁过载的影响[J].中医杂志,2018,59(9):777-780.
- [14]黄思敏,陈志,张丽,等.加味补阳还五汤对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J].中药新药与临床药理,2021,32(7):932-938.
- [15]张峻玮,李琰,薛海鹏,等.骨碎补经骨髓间充质干细胞调节OPG/RANKL/RANK通路抑制破骨细胞的实验研究 [J].中国骨质疏松杂志,2019,25(5):617-624.
- [16]Liu GF,Wang ZQ,Liu L,et al.A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different antiosteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis[J].Journal of Cell Biochemistry,2018,119(6):4469-4481.
- [17]仝昭方,王庆志,唐洪涛,等.GM6001对激素性股骨头坏死大鼠组织形态学与基因表达的影响[J].海南医学,2017,28(15): 2409-2413.
- [18]刘志文.艾可清颗粒抑制破骨细胞分化改善去卵巢大鼠骨丢失的作用机制研究[D].广州:广州中医药大学,2021.
- [19]曹端广.加味阳和汤对肾虚型骨质疏松模型鼠的抗骨质疏松作用及机制研究[D].南昌:江西中医药大学,2020.
- [20]Oichi T,Taniguchi Y,Soma K,et al.Adams17 is involved in skeletogenesis through modulation of BMP-Smad1/5/8 pathway[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2019,76(23):4795-4809.

收稿日期:2023-02-10;修回日期:2023-02-19

编辑/肖婷婷