

· 药物研究 ·

补肾、健脾、活血法对去卵巢致骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌 I κ B α 含量影响的对比研究金成日¹ 姜奥² 杨芳^{3*}

1. 辽宁中医药大学附属第四医院, 辽宁 沈阳 110100

2. 沈阳市第五人民医院, 辽宁 沈阳 110023

3. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

中图分类号: R25 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 02-0244-04

摘要: **目的** 观察补肾、健脾、活血法对去卵巢致骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌 I κ B α 含量变化的影响,探讨中医防治骨质疏松症的作用机制。**方法** 将SD雌性大鼠随机分为正常组、模型组、补肾组、健脾组、活血组。采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠骨骼、骨骼肌 I κ B α 含量变化。**结果** ①与正常组比较,模型组大鼠骨骼的 I κ B α 含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组大鼠骨骼的 I κ B α 含量明显升高($P < 0.01$),其中补肾组升高程度比较明显,其次为健脾组。②与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌的 I κ B α 含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组大鼠骨骼肌的 I κ B α 含量均有升高,但与模型组比较无统计学意义。**结论** ①骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌的 I κ B α 含量均降低,提示骨质疏松症发生可能与骨骼、骨骼肌协调性下降有关。②补肾法和健脾法提高骨质疏松症大鼠的骨骼、骨骼肌 I κ B α 含量,对骨质疏松症具有一定的防治作用。③补肾法是防治骨质疏松症的基本治法,健脾法是辅助补肾法治疗骨质疏松症的一个重要治法。

关键词: 中医中药;骨质疏松症;I κ B α ;补肾;健脾;活血**Effect of tonifying kidney, invigorating the spleen, and promoting blood circulation on the protein expression of I κ B α in bone and skeletal muscle tissues of the rats with osteoporosis**JIN Chengri¹, JIANG Ao², YANG Fang^{3*}

1. The Fourth Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110100, China

2. The Fifth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110023, China

3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: YANG Fang, Email: yangfang163@sina.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of tonifying kidney, invigorating the spleen, and promoting blood circulation on the protein expression of I κ B α in bone and skeletal muscle tissues of the rats with ovariectomy-induced osteoporosis, and to explore the mechanism of TCM in the prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** Rats were randomly divided into normal control group, model control group, tonifying kidney group, invigorating the spleen group, and promoting blood circulation group. The protein expression of I κ B α was determined with ELISA method. **Results** (1) Compared with that in normal control group, the content of I κ B α enzyme in bone tissues of model control group decreased ($P < 0.01$). Compared with that in model control group, the content of I κ B α enzyme in bone tissues of tonifying kidney group and invigorating the spleen group increased. (2) Compared with that in normal control group, the content of I κ B α enzyme in skeletal muscle tissues of model control group decreased ($P < 0.01$), and the content of I κ B α enzyme in skeletal muscle tissues of tonifying kidney group and invigorating the spleen group increased, but there was no statistics difference compared with model control group. **Conclusion** (1) I κ B α decreases in both bone and skeletal muscle in osteoporosis rats, indication that osteoporosis may be related to the disharmony of bone and skeletal muscle. (2) The method of tonifying kidney and invigorating the spleen have certain preventive effect on osteoporosis by regulating the protein expression of I κ B α in bone and skeletal muscle. (3) The method of tonifying kidney is fundamental in prevention and

基金项目: 沈阳市科技局一般项目(F10-149-9-36)

* 通讯作者: 杨芳, Email: yangfang163@sina.com

treatment of osteoporosis, while the method of invigorating the spleen is also an important complimentary treatment.

Key words: Chinese medicine; Osteoporosis; $I\kappa B\alpha$; Tonifying kidney; Invigorating the spleen; Promoting blood circulation

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨组织显微结构受损,骨矿成分和骨基质等比例不断减少,骨质变薄,骨小梁数量减少,骨脆性增加和骨折危险度升高的一种全身骨代谢障碍的疾病,是中老年人群最常见的骨骼疾病。2001年美国国立卫生研究院(NIH)提出的“骨质疏松症”的定义为,以骨强度下降、骨折风险增加为特征的骨骼系统疾病。随着我国人口老龄化日趋明显,骨质疏松症必将成为老龄化社会需面对的公共健康问题。

目前,针对骨质疏松症的中医研究多是基于“肾藏精主骨”理论论述其病因病机,而从“脾主四肢肌肉”探讨其病因病机的较少。本实验研究采用分子生物学实验方法,以骨质疏松症大鼠的骨骼、骨骼肌 $I\kappa B\alpha$ 为检测指标,观察骨骼肌收缩与骨骼协调性对骨质疏松症形成的影响,同时探讨中医不同治法对骨质疏松症的防治效果和作用机制的异同。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备

Infinite M200 多功能酶标仪、MR1822 低温高速离心机。

1.2 主要试剂

$I\kappa B\alpha$ 试剂盒(AMEKO 公司)内含:96 微孔板、一抗液、样品稀释液、酶标抗体液、底物稀释液、洗涤液。

1.3 实验动物

选用清洁级 Wistar 大鼠 60 只,雌性且未曾交配,体重(200 ± 50)g,4~5 月龄。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物质量合格证号:1100170659。

术前将大鼠按照随机分组的方法分为正常组(8 只)、手术组(52 只)。采用摘除大鼠双侧卵巢的方法致骨质疏松症模型。术后 7d 将手术组存活的大鼠随机分为 4 组(每组 8 只),即:模型组、补肾方组、健脾方组和活血方组。

1.4 药品

补肾组选用左归丸,制备方法:按大鼠每千克体重一日药量计算,熟地 2.52 g、山药 1.26 g、枸杞子 1.26 g、山茱萸 1.26 g、川牛膝 1.26 g、菟丝子 1.26 g、鹿角胶(河南老君堂制药有限公司,国药准字 241020792) 1.26 g、龟板胶(河南老君堂制药有

限公司,国药准字 241020792) 1.26 g 打碎、烊化,混合上述颗粒剂,加 20 mL 水。健脾组选用补中益气颗粒(北京汉典制药有限公司)。活血组选用身痛逐瘀汤(辽宁中医药大学药厂)。

1.5 实验方法

1.5.1 造模:用 10% 水合氯醛将通过肌肉注射麻醉大鼠,麻醉后的大鼠采用俯卧位姿势固定于自制的手术台上,从腰背部脊柱两侧作纵行切口切开皮肤及肌肉,摘除两侧卵巢组织后逐层缝合,关闭创口。正常组不手术。

1.5.2 给药:术后第 7 d 开始给药,每日上午灌胃 1 次,连续灌胃 12 w。补肾组、健脾组和活血组的大鼠,每日用量按成人用药量的 6.3 倍计算,大鼠胃容量为 0.875 mL/100 g。正常组和模型组以等量生理盐水注射灌胃。灌胃期间,每周一对大鼠称重 1 次,按照体重调整给药剂量。

1.5.3 取材:第 12 周大鼠灌胃结束,禁食 24 h 后取材。用 10% 水合氯醛将大鼠肌肉注射麻醉后取材。无菌条件下取大鼠右后肢腓肠肌的白肌部分和左后肢的全股骨,放入高压灭菌的 EP 管内,做好标记后放入 -70°C 冰箱保存备用。

1.6 检测指标及方法

用 ELISA 方法检测实验大鼠骨骼、骨骼肌 $I\kappa B\alpha$ 含量,用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值),绘制标准曲线,计算样品的实际浓度。具体操作方法按试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据处理,组间比较选用单因素方差分析(ONE-Way ANOVA)进行统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与正常组比较,模型组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度极显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠股骨上 1/3 骨密度均有不同程度的升高($P < 0.01$),其中以补肾中药组升高最为显著(表 1)。

与正常组比较,模型组大鼠骨骼的 $I\kappa B\alpha$ 含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组大鼠骨骼的 $I\kappa B\alpha$ 含量明显升高($P < 0.01$),其中补肾组升高程度比较明显,其次为健脾组(表

2)。

与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌的 $I\kappa B\alpha$ 含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,补肾组、健脾组、活血组大鼠骨骼肌的 $I\kappa B\alpha$ 含量均有升高,但与模型组比较无统计学意义(表 3)。

表 1 各组大鼠离体股骨上 1/3 骨密度值的比较 ($\bar{x} \pm s$, g/cm^3)

Table 1 Comparison of BMD of upper 1/3 of the femurs among rats of each group ($\bar{x} \pm s$, g/cm^3)

组别	n	骨组织
正常组	8	0.177 ± 0.007
模型组	8	$0.132 \pm 0.018^*$
补肾组	8	$0.165 \pm 0.006^{*\Delta}$
健脾组	8	$0.153 \pm 0.003^{*\Delta}$
活血组	8	$0.157 \pm 0.005^{*\Delta}$

注:与正常组比较, $^* P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

表 2 各组大鼠骨组织 $I\kappa B\alpha$ 含量 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

Table 2 $I\kappa B\alpha$ content in bone tissue in each group ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

组别	n	骨组织
正常组	8	7.090 ± 0.09
模型组	8	$3.102 \pm 0.27^*$
补肾组	8	$4.585 \pm 0.18^{*\Delta}$
健脾组	8	$4.350 \pm 0.34^{*\Delta}$
活血组	8	$3.515 \pm 0.13^{*\Delta}$

注:与正常组比较, $^* P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

表 3 各组大鼠骨骼肌 $I\kappa B\alpha$ 含量 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

Table 3 $I\kappa B\alpha$ content in skeletal muscle in each group ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

组别	n	骨骼肌
正常组	8	7.078 ± 0.18
模型组	8	$4.325 \pm 0.55^*$
补肾组	8	$4.325 \pm 0.26^*$
健脾组	8	$4.591 \pm 0.44^*$
活血组	8	$4.257 \pm 0.16^*$

注:与正常组比较, $^* P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

3 讨论

3.1 “脾肾相关”与骨骼、肌肉的关系

中医学认为肾为先天之本,“肾在体合骨”,指骨的生长发育,有赖于骨髓的充盈及其所提供的营养,肾精充足,骨髓生化有源,骨骼得到髓的滋养,才能坚固有力。若肾精不足,骨髓生化乏源,骨骼失去营养,而骨质脆弱无力。清代医家唐容川在《医经精义》中说到:“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者,肾之所合也;髓者,肾精所生,精足则髓足;髓在骨内,髓足者则骨强”。人到了中老年时期,肾中精气开

始逐渐亏虚,骨髓化源不足,骨骼失去滋养而骨质脆弱疏松,容易出现骨质脆弱、腰膝酸软、易于骨折等症状,因此中老年人群易发原发性骨质疏松症。女性至七七后,任脉虚、太冲脉衰少、天癸竭,肾精不足而不能维持骨骼的正常功能,因此绝经后的女性也易发骨质疏松症。因此,肾虚是骨质疏松症发病的根本原因,补肾方法是临床治疗该病的根本方法。

中医学认为脾为后天之本,主四肢肌肉,为气血生化之源。脾对骨骼的生长也具有一定的作用,若脾失健运,四肢肌肉得不到充分的营养,同时肾失所藏,后天之精又不得以补充,肾精不足,筋骨失养,则骨痿不用。在《素问·生气通天论》中提到:“是故谨和五味,骨正筋柔,气血以流,腠理以密,如是则骨气以精,谨道如法,长有天命。”《灵枢·本神》也提到:“脾气虚则四肢不用”。“金元四大家”之李东垣在《脾胃论》中亦提到“大抵脾胃虚弱,阳气不能生长,是春夏之令不行,五脏之气不生。脾胃则下流乘肾,……则骨乏无力,是为骨痿。令人骨髓空虚,足不能履地,是阴气重叠,此阴盛阳虚之症。”可见,“脾肾相关”而肌肉和骨骼的关系十分密切。

3.2 $I\kappa B\alpha$ 含量的变化对骨质疏松症影响

核因子 κB (NF- κB) 是一种能与免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子 κB 序列特异结合并调节 κ 轻链转录的核蛋白因子。NF- κB 可以参与细胞生长、分化及炎症反应等基因表达调控,在很多常见的情况下出现 NF- κB 的异常激活或抑制,如肿瘤、糖尿病、动脉粥样硬化等^[1-3]。NF- κB 在基因的调节表达的功能是多方面的, NF- κB 二聚体与其 NF- κB 抑制因子 ($I\kappa B$) 家族的成员结合,以无活性的三聚体形式存在于胞浆中。经典的 $I\kappa B$ 家族成员有 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 、 $I\kappa B\epsilon$ 。 $I\kappa B\alpha$ 主要通过经典旁途径调节 Rel/p50 异源二聚体。

成骨细胞增殖分化的抑制或成骨细胞凋亡进程的加速,能使骨形成少于骨吸收从而导致 OP 的发生,而 NF- κB 信号通路在成骨细胞的增殖分化和凋亡过程中都有着重要的作用。研究^[4]表明导致骨质疏松症 NF- κB 异常活化的途径有:①正常情况下,雌激素与雌激素受体结合能抑制 NF- κB 的表达,在去卵巢所致的 OP 模型中,由于缺乏足够的雌激素与雌激素受体结合导致 NF- κB 的异常活化^[5];②OP 时, T 细胞和其他细胞高度表达炎症细胞因子,能促进成骨细胞中 NF- κB 活化,活化的 NF- κB 同时能促进 TNF- α 、IL-6、IL-1 的转录,使其表达增加, NF- κB 与炎症细胞因子形成一个循环放大的过

程^[6]。大量 NF- κ B 的活化,使骨形成受抑制,导致 OP 发生。

3.3 中医不同治法对骨质疏松症大鼠骨骼、骨骼肌 I κ B α 含量影响的比较研究

从本实验结果来看,与模型组比较,经中医不同治法治疗的骨质疏松症大鼠骨骼的 I κ B α 含量明显升高,其中补肾组升高程度比较明显,其次为健脾组;说明补肾和健脾方法,通过提高骨骼的 I κ B α 含量可以抑制 NF- κ B 异常活化,减缓成骨细胞的凋亡过程,使骨形成多于骨吸收,有效的防治骨质疏松症。经中医不同治法治疗的骨质疏松症大鼠骨骼肌的 I κ B α 含量虽然与与模型组比较无统计学意义,但可以看到补肾组和健脾组有升高的趋势,说明补肾和健脾方法,通过提高骨骼肌的 I κ B α 含量可以抑制 NF- κ B 表达,从而提高肌肉的能量。

从上述结果来看,补肾和健脾方法,通过提高骨骼、骨骼肌的 I κ B α 含量,提高骨骼和肌肉的协调性,从而有效的防治骨质疏松症,说明提示补肾方法是临床治疗骨质疏松症的根本方法。健脾方法是辅助补肾方法治疗骨质疏松症的一个重要治法。

【参 考 文 献】

- [1] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(10): 749-759.
 - [2] Courtis G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 2006, 25(5): 6831-6843.
 - [3] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(4): 693-733.
 - [4] 吴昆鹏,戴永武,杨巧珠,等. NF- κ B 信号通路与骨质疏松. *中国老年学杂志*, 2011, 31(19): 3852-3855.
Wu KP, Dai YW, Yang QZ, et al. NF- κ B signaling pathway and osteoporosis. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31(19): 3852-3855.
 - [5] Harnish DC. Estrogen receptor ligands in the control of pathogenic inflammation. *Cur Opin Inv Drug*, 2006, 7(11): 997-1001.
 - [6] Xing L, Carlson L, Story B, et al. Expression of either NF-kappaB p50 or p52 in osteoclast precursors is required for IL-1-induced bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(2): 260-269.
- (收稿日期: 2016-06-12; 修回日期: 2016-07-28)
-
- (上接第 230 页)
- [4] Eastell R, Nagase S, Small M, et al. Effect of ONO-5334 on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the OCEAN study. *J Bone Miner Res*, 2014, 29: 458-466.
 - [5] Williams DS, McCracken PJ, Purcell M, et al. Effect of odanacatib on bone turnover markers, bone density and geometry of the spine and hip of ovariectomized monkeys: a head-to-head comparison with alendronate. *Bone*, 2013, 56: 489-496.
 - [6] Kawate H, Takayanagi R. Efficacy and safety of bazedoxifene for postmenopausal osteoporosis. *Clin Interv Aging*, 2011, 6: 151-160.
 - [7] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475.
 - [8] Warriner AH, Saag KG. Osteoporosis diagnosis and medical treatment. *Orthopedic Clinics of North America*, 2013, 44(2): 125-135.
 - [9] Yee AJ, Raje NS. Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *Clinical Interventions in Aging*, 2012, 7(12): 331-338.
 - [10] Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, et al. Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 865-875.
 - [11] Pennypacker B, Shea M, Liu Q, et al. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice. *Bone*, 2009, 44: 199-207.
 - [12] Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, et al. Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 865-875.
- (收稿日期: 2016-06-10; 修回日期: 2016-08-05)