

# 温肾固疏方干预绝经后骨质疏松药理研究

沈蕴茹 郭海英\*  
南京中医药大学第二临床医学院,江苏 南京 210023

中图分类号: R589 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 04-0503-06

**摘要:** **目的** 观察温肾固疏方对骨代谢造成的影响。**方法** 将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、雌激素组、温肾固疏方高、中、低剂量组。假手术组仅切除卵巢周围脂肪组织,不切除卵巢,其余大鼠切除双侧卵巢,建立绝经后骨质疏松模型。造模 1 m 后,中药汤剂灌胃干预 8 w,末次给药结束后放血处死。双能 X 射线法测定去势大鼠离体股骨、腰椎骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨矿含量 (bone mineral content, BMC),电子式双柱万能材料试验机测定股骨弹性模型、最大承载力、刚性、最大应力,全自动生物仪测 HDL-C、LDL-C、TG、TC,计算动脉粥样硬化指数 (atherogen icindex, AI),采用酶联免疫吸附测定 (Elisa) 法测量大鼠血清 OT/BGP、Lipid、ApoE、sRANKL、OPG、BMPs。**结果** 与假手术组对比,模型组 BMD、BMC 下降 ( $P < 0.05$ ); 股骨弹性模型、最大承载力、刚性、最大应力皆下 ( $P < 0.05$ ); OPG、BMPs 下降 ( $P < 0.05$ ); Lip 上升 ( $P < 0.05$ ); ApoE 上升 ( $P < 0.01$ ); LDL-C 上升 ( $P < 0.05$ )。与模型组对比,雌激素、低、高剂量组大鼠股骨 BMD、BMC 上升 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、中剂量组弹性模型增高 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、高剂量组最大承载力增高 ( $P < 0.05$ ); 低、高剂量组刚性增高 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、低、高剂量组最大应力增高 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、低、高剂量组血清 OT/BGP 上升 ( $P < 0.05$ ); 低、高剂量组 sRANKL 下降 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、低剂量组血清 OPG 上升 ( $P < 0.05$ ); 雌激素组、低、高剂量组 BMPs 上升 ( $P < 0.05$ ); 高、中、低剂量组血清 Lip 下降 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组 ApoE 下降 ( $P < 0.05$ ); 低、高剂量组 LDL-C 下降; 低剂量组 TG 下降 ( $P < 0.05$ ); 低、高剂量组动脉粥样硬化指数下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 去势大鼠骨质疏松模型的脂代谢是重要调节点,温肾固疏方可以通过调控 ApoE 水平影响血清脂代谢与骨代谢,对绝经后骨质疏松有一定防治效果,不同剂量的温肾固疏方汤剂对绝经后骨质疏松症的防治效果不同,高剂量组较为明显。

**关键词:** 绝经后骨质疏松;脂代谢;骨代谢;载脂蛋白 E

## Pharmacological research on the effect and mechanism of WenShenGuShu formula in postmenopausal osteoporosis

SHEN Yunru, GUO Haiying\*  
The Second Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023  
\* Corresponding author: GUO Haiying, Email: guohy@163.com

**Abstract: Objective** The objective of this study is to examine the effect of WenShenGuShu formula on bone metabolism of ovariectomized Rats. **Methods** Firstly the ovariectomized (OVX) model of SD rats was established, and after 1 month of successful modeling, 40 modeling rats were randomly divided into different groups: WenShenGuShu formula groups with different doses, model group, estradiol valerate group, and sham group with resection of adipose tissue. Then decoction of Chinese medicine was taken orally for 8 weeks, and the blood was sacrificed after the last administration. In this experiment, dual energy x-ray absorptiometry method was used to determine the in vitro BMD and BMC of femur and lumbar vertebra of castrated rats, and femoral biomechanics were measured by electronic double column universal material test. Atherosclerosis index was calculated using automatic biological measurements of HDL-C, LDL-C, TG and TC, and the rat serum OT/BGP, lipid, ApoE, sRANKL, OPG, and BMPs were measured by ELISA. **Results** The experimental result were as follows: compared with the sham group, in the model group BMD and BMC decreased ( $P < 0.05$ ), and the femoral elastic model, maximum bearing capacity, rigidity and the maximum stress all decreased ( $P < 0.05$ ). The levels of OPG and BMPs also decreased ( $P < 0.05$ ), but the levels of Lip ( $P < 0.05$ ), ApoE ( $P < 0.05$ ) and LDL-C ( $P < 0.01$ ) all increased. Compared with the model group, femoral BMD and BMC of the

基金项目: 江苏省研究生科研创新计划项目(KYZZ15-0272)  
\* 通讯作者: 郭海英,Email:guohy@163.com

estrogen and low and high dose groups all increased ( $P < 0.05$ ). The elastic model of the estrogen group and the medium dose group increased ( $P < 0.05$ ), the maximum capacity of the estrogen group and high dose group increased ( $P < 0.05$ ), rigidity of low and high dose groups increased ( $P < 0.05$ ), and the maximum stress of the estrogen group and low and high dose groups increased ( $P < 0.05$ ). Serum OT/BGP of estrogen group and low and high dose groups increased ( $P < 0.05$ ), sRANKL of low and high dose groups decreased ( $P < 0.05$ ), OPG of estrogen group and low dose group increased ( $P < 0.05$ ), and BMPs of estrogen group and low and high dose groups increased ( $P < 0.05$ ). The serum Lip of high, medium and low dose groups decreased ( $P < 0.05$ ). ApoE of low dose group decreased ( $P < 0.05$ ), LDL-C of low and high dose groups decreased, TG of low dose group decreased ( $P < 0.05$ ), and the atherosclerosis index of the low and high dose groups decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Through the analysis of these experimental parameters, the important conclusion could be reached that lipid metabolism in ovariectomized rat model of osteoporosis is an important regulator. WenShenGuShu formula has certain effect on the prevention of postmenopausal osteoporosis through influencing serum lipid metabolism and bone metabolism by regulating ApoE level. Different doses of WenShenGuShu formula have different control effects on postmenopausal osteoporosis and the effect was greater in the high dose group.

**Key words:** Postmenopausal osteoporosis; Lipid metabolism; Bone metabolism; Apolipoprotein E

绝经后骨质疏松症 (post menopausal osteoporosis, PMOP) 是一种受多种因素影响的代谢性疾病, 妇女绝经后体内雌激素降低, 骨质疏松症常与脂代谢紊乱导致的心血管疾病伴随发生。绝经后骨质疏松严重影响中老年妇女的日常生活甚至生命安全。近年来多项新研究阐明<sup>[1]</sup>, 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 不仅作为重要角色参与脂代谢, 也会同时会影响骨代谢, 雌激素水平也被证实对 ApoE 有影响<sup>[2]</sup>。国内外学者多将绝经后妇女骨质疏松与脂代谢异常的着重点放于 ApoE, 集中研究 ApoE 对骨代谢与脂代谢的调节作用。温肾固疏方具有温阳补骨、补肾健脾的功效, 本研究通过建立大鼠骨质疏松模型, 观察温肾固疏方对大鼠的以 ApoE 为连接点的骨质量、强度以及脂代谢指标的改变, 寻找 PMOP 新的发病机制, 并从此得到更加长期有效, 易于推广普及的 PMOP 防治手段。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

健康 9 月龄未孕 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 雌性, 体重 ( $250 \pm 30$ ) g, 由南京中医药大学实验中心提供, 合格证号 SYXK(苏)2014-0001-201508662。

### 1.2 仪器、药物及试剂

温肾固疏方各药物组成由南京中医药大学百草堂药房提供, 方药组成: 熟地 20 g、淫羊藿 20 g、党参 10 g、丹参 10 g、枸杞 10 g、骨碎补 10 g、补骨脂 5 g、茯苓 10 g、白术 10 g, 两次煎液过滤合并浓缩。戊酸雌二醇 (补佳乐, 德国拜耳医药保健有限公司广州分公司, 180 A)。10% 水合氯醛溶液 (中国人民解放军第一医院, 20130312)。青霉素 (山东鲁抗医

药股份有限公司, B140808)。Elisa 试剂盒购自于南京森贝伽生物, 大鼠 OT/BGP 试剂盒 (20161212), 大鼠 ApoE 试剂盒 (20161212), 大鼠 Lip 试剂 (20161212), 大鼠 sRANKL 试剂盒 (20161212), 大鼠 BMPs 试剂盒 (20161212), 大鼠 OPG 试剂盒 (20161212)。数字化双能 X 线骨密度仪 (MEDIX-90, 法国 MEDILINK 公司)。CHD-1001 电子式双柱万能材料试验机 CHD-1001 (东莞诚鼎)。全自动生化分析仪 (日本东芝 TBA-120FR)。

## 2 研究方法

### 2.1 去卵巢大鼠骨质疏松症模型的建立

采用双侧性腺 (卵巢) 摘除法<sup>[3]</sup> 制备绝经后骨质疏松模型。饲养环境: 室温 ( $22 \pm 2$ ) °C、湿度控制于 50%, 恒温、恒湿、清洁、通风环境, 自由饮食、饮水, 饲养 1 w 后根据体重将 SD 大鼠随机分为两组: 假手术组 (Sham,  $n = 6$ )、模型组 ( $n = 34$ )。模型组首先腹腔注射 35 mg/kg 的 10% 水合氯醛溶液麻醉, 然后背部切口行去势手术, 剪除双侧卵巢, 分层缝合。Sham 组大鼠背部切口手术后, 仅切除卵巢旁约 1 g 重的脂肪, 不切除卵巢, 最后每只大鼠经后肢肌肉注射 80000 U 青霉素, 连续 7 d 观察。

### 2.2 分组及干预

造模过程中无因感染等原因而不适合继续干预的大鼠。将摘除双侧卵巢的模型组大鼠 ( $n = 34$ ) 随机分组, 分为: 模型组 (OVX,  $n = 6$ ), 温肾固疏方高剂量组 ( $n = 6$ )、中剂量组 ( $n = 6$ )、低剂量组 ( $n = 6$ ) 及雌激素组 ( $n = 6$ ), 剩余 4 只放血处死。大鼠于上述饲养环境中自由摄食、饮水, 每周称量体重一次。各组大鼠均于手术后 3 w 切口愈合后开始分组治疗

干预。用临床拟用计量法(ACD 法)拟定大鼠同类药等效剂量,按成人 6.30 倍计算,给药容积 0.5 mL/100 g。温肾固疏方治疗组先计算出中剂量组计量,高剂量组为中剂量组 2 倍,低剂量组为中剂量组 1/2。高剂量组:温肾固疏方,21.21 g 生药/(kg·d);中剂量组:温肾固疏方,10.605 g 生药/(kg·d);低剂量组:温肾固疏方,5.3 025 g 生药/(kg·d)。雌激素组:戊酸雌二醇,10μg/(kg·d)。模型组:给予生理盐水 0.5 mL/100 g 灌胃;假手术组给予生理盐水 0.5 mL/100 g 灌胃。各组灌胃持续 8 w。

2.3 标本采集及测定

大鼠末次施治后,禁食 24 h,次日取材。处死前称量大鼠体质量,用 10% 水合氯醛溶液(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,右心室抽血处死。血液收集后,4 ℃ 静置 3 h,3 000 r/min,离心 10 min,分离血清。酶联免疫法(ELISA)测定 OT/BGP、sRANKL、OPG、BMPs、ApoE、Lip。全自动生化仪测定血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、TG、TC,计算 AI(AI = LDL-C/HDL-C)。骨质量测定:取大鼠右侧股骨、腰椎全段,放在有机玻璃盒支架上固定,以 MEDIX-90 骨密度测定仪扫描测定

离体大鼠骨密度(bone mineral density,BMD)、骨矿含量(bone mineral content,BMC)。骨强度测定:取大鼠左侧股骨,固定于电子式双柱万能材料试验机上,测定股骨弹性模型、最大承载力、刚性、最大应力。

2.4 统计学方法

实验结果用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用统计软件 SPSS 23.0 进行分析,组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),以  $P < 0.05$  定为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)变化

模型组与假手术组对比,模型组大鼠股骨、腰椎 BMD、BMC 明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比,雌激素组、高、中、低计量组大鼠股骨、腰椎 BMD、BMC 皆有增高,其中股骨 BMD、BMC 的雌激素组、低、高剂量组增高明显( $P < 0.05$ )。腰椎 BMD、BMC 雌激素组增高明显( $P < 0.05$ ),BMC 高剂量组增高明显( $P < 0.05$ ),雌激素组与温肾固疏方各剂量组的股骨、腰椎 BMD、BMC 皆高于模型组。见表 1。

表 1 温肾固疏方对不同组别去势大鼠股骨骨密度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 1 Effects of WenShenGuShu formula on BMD and BMC of rat with osteoporosis ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 股骨                          |                             | 腰椎                          |                             |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|      | BMD (mg/cm <sup>2</sup> )   | BMC(mg)                     | BMD (mg/cm <sup>2</sup> )   | BMC(mg)                     |
| Sham | 234.30 ± 31.72              | 487.20 ± 12.44              | 142.12 ± 13.44              | 236.64 ± 7.63               |
| OVX  | 206.47 ± 10.00 <sup>▲</sup> | 401.46 ± 32.30 <sup>▲</sup> | 119.78 ± 32.30 <sup>▲</sup> | 217.13 ± 13.32 <sup>▲</sup> |
| 雌激素  | 227.62 ± 21.37 <sup>*</sup> | 467.57 ± 20.20 <sup>*</sup> | 138.78 ± 22.98 <sup>*</sup> | 227.27 ± 6.68 <sup>*</sup>  |
| 低剂量  | 233.30 ± 19.42 <sup>*</sup> | 441.33 ± 27.25 <sup>*</sup> | 127.64 ± 17.71              | 223.57 ± 14.42              |
| 中剂量  | 219.50 ± 10.30              | 423.47 ± 31.14              | 121.47 ± 23.22              | 220.04 ± 23.47              |
| 高剂量  | 234.66 ± 27.33 <sup>*</sup> | 482.14 ± 28.10 <sup>*</sup> | 126.42 ± 31.14              | 224.39 ± 17.42 <sup>*</sup> |

注:与假手术组相比,▲ $P < 0.05$ 。与模型组相比,\* $P < 0.05$ ,<sup>△</sup> $P < 0.01$ 。

3.2 大鼠股骨生物力学的变化

模型组与假手术组相比,模型组弹性模量、最大承载力、刚性、最大应力皆显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比,雌激素组、低、中、高剂量弹性模量、最大承载力、刚性、最大应力皆高于模型组,其中,雌激素组、中剂量组弹性模型显著增高( $P < 0.05$ ),雌激素组、高剂量组最大承载力显著增高( $P < 0.05$ ),低剂量组与高剂量组刚性显著增高( $P < 0.05$ ),雌激素组、低剂量组与高剂量组最大应力显著增高( $P < 0.05$ ),高剂量组最为明显( $P < 0.05$ )。见表 2。

3.3 大鼠血清骨代谢的变化

模型组与假手术相比,模型组血清骨谷胺蛋白/骨钙素(OT/BGP)、OPG、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein,BMPs)下降,sRANKL 上升。治疗组与模型组相比,OT/BGP 皆有上升,其中雌激素、中剂量组有统计学意义( $P < 0.05$ ),高、低剂量组上升明显( $P < 0.01$ );sRANKL 皆下降,其中高、低剂量组具有统计学意义( $P < 0.05$ );OPG 各组均上升,其中雌激素组、低剂量组具有统计学意义( $P < 0.05$ );BMPs 各组均上升,雌激素组、高、低剂量组有统计学意义( $P < 0.05$ )。温肾固疏方高、低剂量灌胃对大鼠骨代谢作用明显。见表 3。

表 2 大鼠股骨生物动力学变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of WenShenGuShu formula on biomechanics of femur in rats with osteoporosis ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 弹性模量<br>(Mpa)                  | 最大承载力<br>(N)                | 刚性<br>(N/mm)                | 最大应力<br>(N/mm <sup>2</sup> ) |
|------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Sham | 5739.40 ± 1177.57              | 103.28 ± 9.82               | 204.43 ± 57.42              | 135.57 ± 18.94               |
| OVX  | 4870.27 ± 1457.82 <sup>▲</sup> | 89.10 ± 37.25 <sup>▲</sup>  | 191.15 ± 38.46 <sup>▲</sup> | 112.75 ± 32.50 <sup>▲</sup>  |
| 雌激素  | 5445.57 ± 1575.70 <sup>*</sup> | 107.20 ± 12.40 <sup>*</sup> | 227.33 ± 21.65              | 131.36 ± 11.28 <sup>*</sup>  |
| 低剂量组 | 5214.54 ± 987.14               | 107.54 ± 15.46              | 231.87 ± 43.75 <sup>*</sup> | 139.49 ± 12.32 <sup>*</sup>  |
| 中剂量组 | 5397.45 ± 1043.39 <sup>*</sup> | 103.32 ± 6.58               | 201.57 ± 36.93              | 129.53 ± 7.62                |
| 高剂量组 | 5333.12 ± 1208.23              | 112.45 ± 24.50 <sup>*</sup> | 222.75 ± 86.80 <sup>*</sup> | 141.57 ± 18.84 <sup>△</sup>  |

注:与假手术组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>△</sup> $P < 0.01$ 。

表 3 温肾固疏方对去势大鼠骨代谢的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of WenShenGuShu formula on bone metabolism of rats with osteoporosis ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | OT/BGP (ng/L)              | sRANKL (ng/L)               | OPG (μg/L)               | BMPs (ng/L)                 |
|------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Sham | 258.18 ± 7.93              | 263.30 ± 6.73               | 1.51 ± 0.48              | 257.57 ± 45.30              |
| OVX  | 208.81 ± 7.91              | 321.62 ± 2.44               | 1.29 ± 0.32 <sup>▲</sup> | 214.27 ± 18.55 <sup>▲</sup> |
| 雌激素  | 274.6 ± 2.75 <sup>*</sup>  | 303.77 ± 6.81               | 1.48 ± 0.19 <sup>*</sup> | 251.81 ± 19.66 <sup>*</sup> |
| 低剂量组 | 214.54 ± 7.77              | 296.24 ± 6.03 <sup>*</sup>  | 1.49 ± 0.60 <sup>*</sup> | 253.97 ± 23.42 <sup>*</sup> |
| 中剂量组 | 282.64 ± 4.01 <sup>*</sup> | 314.07 ± 7.82               | 1.29 ± 0.54              | 229.70 ± 11.13              |
| 高剂量组 | 280.64 ± 1.56 <sup>△</sup> | 282.30 ± 13.20 <sup>*</sup> | 1.38 ± 0.37              | 247.23 ± 7.58 <sup>*</sup>  |

注:与假手术组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>△</sup> $P < 0.01$ 。

3.4 各组大鼠血清脂代谢的变化

模型组与假手术组对比,模型组 Lipids、ApoE、LDL-C、TC 均上升, HDL-C、TG 均下降, Lipids、ApoE、LDL-C 变化具有统计学意义( $P < 0.05$ ),动脉硬化指数 AI 上升( $P < 0.05$ )。与模型组对比,雌激素组、低、中、高剂量组血清 Lipids 下降,低、中、高剂量组有统计学意义( $P < 0.05$ ),低、高剂量组下降效

果明显( $P < 0.01$ ),雌激素组、低、高剂量组 ApoE 下降,低剂量组具有统计学意( $P < 0.05$ )。低、高剂量组 LDL-C 下降明显( $P < 0.05$ )。低剂量组 TG 下降明显( $P < 0.05$ )。雌激素组、低、中、高剂量组 AI 均有下降,低、高剂量组有统计学意义( $P < 0.05$ ),且温肾固疏方低、高剂量组 AI 低于雌激素组。见表 4。

表 4 温肾固疏方对去势大鼠脂代谢以及 ApoE 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effects of WenShenGuShu formula on lipid metabolism and ApoE in rats with osteoporosis ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | Lipids<br>(ng/mL)           | ApoE<br>(ng/mL)             | HDL-C<br>(mmol/L) | LDL-C<br>(mmol/L)        | TC<br>(mmol/L) | TG<br>(mmol/L)           | AI<br>(LDL/HDL)          |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Sham | 139.96 ± 4.31               | 120.32 ± 10.10              | 1.49 ± 0.48       | 0.52 ± 0.22              | 2.54 ± 0.10    | 0.66 ± 0.08              | 0.35 ± 0.26              |
| OVX  | 204.9 ± 20.91 <sup>▲</sup>  | 167.33 ± 10.10 <sup>▲</sup> | 1.47 ± 0.32       | 0.97 ± 0.31 <sup>▲</sup> | 2.87 ± 0.42    | 0.60 ± 0.29              | 0.66 ± 0.01 <sup>▲</sup> |
| 雌激素  | 148.32 ± 19.38              | 132.30 ± 2.14               | 1.98 ± 0.23       | 0.58 ± 0.12              | 2.66 ± 0.07    | 0.89 ± 0.14              | 0.29 ± 0.11              |
| 低剂量组 | 93.02 ± 4.75 <sup>△</sup>   | 134.55 ± 6.00 <sup>*</sup>  | 1.53 ± 0.19       | 0.37 ± 0.13 <sup>*</sup> | 2.69 ± 0.53    | 0.69 ± 0.12 <sup>*</sup> | 0.24 ± 0.06 <sup>*</sup> |
| 中剂量组 | 132.88 ± 4.82 <sup>*</sup>  | 169.89 ± 9.87               | 1.50 ± 0.23       | 0.49 ± 0.16              | 2.77 ± 0.03    | 0.68 ± 0.07              | 0.33 ± 0.07              |
| 高剂量组 | 107.66 ± 28.27 <sup>△</sup> | 114.12 ± 13.67              | 1.76 ± 0.60       | 0.33 ± 0.48 <sup>*</sup> | 2.60 ± 0.72    | 0.76 ± 0.82              | 0.19 ± 0.12 <sup>*</sup> |

注:与假手术组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>△</sup> $P < 0.01$ 。

4 讨论

前期研究表明<sup>[4]</sup>,骨质疏松大鼠模型构建后大鼠雌激素水平迅速下降,光镜下观察模型组大鼠病理切片,可见骨松质骨小梁纤细明显,数量减少,部分骨小梁断裂呈典型骨质疏松模型,提示该实验造模成功。本课题研究进一步探讨绝经后骨质疏松的新发病机制以及治疗方案,参照绝经后妇女骨质疏

松导致骨折的多发部位,测定大鼠股骨、腰椎的 BMD、BMC,温肾固疏方高、中、低剂量组与模型组比较,低、高剂量组大鼠股骨 BMD、BMC 上升明显( $P < 0.05$ ),高剂量组大鼠腰椎 BMC 上升明显( $P < 0.05$ )。测定股骨弹性模型、最大承载力、刚性、最大应力,中剂量组弹性模型显著增高( $P < 0.05$ ),高剂量组最大承载力显著增高( $P < 0.05$ ),低剂量组与高剂量组刚性显著增高( $P < 0.05$ ),低剂量组与

高剂量组最大应力显著增高( $P < 0.05$ )。上述实验结果证明经温肾固疏方治疗后,去势大鼠的骨质量与骨强度皆有提升,有防治绝经后骨质疏松症的作用。

近年来研究发现,脂肪细胞与骨细胞两者由骨髓间充质干细胞分化而来,基于双向分化原理,骨髓间充质干细胞细胞会向脂肪细胞与骨细胞两个方向分化。现阶段研究证明<sup>[5]</sup>, ApoE 与 Wnt 信号通路的 LRP 受体结合,并能抑制 PPAR $\gamma$  的活化, ApoE 能够通过调节 Wnt 通路与 PPAR $\gamma$  从而影响  $\beta$ -catennin 的表达,诱导骨髓间充质干细胞分化。OPG 与 sRANKL 联合说明 Wnt 信号通路的改变, sRANKL 表达增高说明骨量流失。ApoE 通过运输脂溶性维生素 K 参与骨细胞的生成,维生素 K 大部分由饮食供给,去势大鼠正常饮食,说明维生素 K 的结合受到影响,维生素 K 作为特别的脂溶性维生素只能与受体结合力较强的 ApoE 相结合运输<sup>[6-8]</sup>,维生素 K 能将骨钙素中残留的 3 谷氨酸羧化,该修饰过程对于维持  $\gamma$ -骨钙素的完整性是必不可少的,骨钙素水平下降会导致骨密度下降与骨脆性增加,OT/BGP 下降说明去势大鼠骨生成受到影响<sup>[9]</sup>。BMPs(骨形成蛋白)促进骨代谢作用与 Smad 蛋白相偶联,影响骨重建与骨吸收,参与骨髓间充质干细胞的双向分化,抑制内源性 BMP-4 可以抑制 PPAR $\gamma$  的表达,在前脂细胞分化中维持其状态。本研究结果提示温肾固疏方治疗后模型大鼠各项骨代谢指标与上述理论相吻合,低、高剂量组血清 OT/BGP 上升( $P < 0.05$ );低、高剂量组 sRANKL 下降( $P < 0.05$ );低剂量组血清 OPG 上升( $P < 0.05$ );低、高剂量组 BMPs 上升( $P < 0.05$ );高、中、低剂量组血清 Lip 下降( $P < 0.05$ ),低剂量组 ApoE 下降( $P < 0.05$ );低、高剂量组 LDL-C 下降;低剂量组 TG 下降( $P < 0.05$ )。低、高剂量组 AI 下降( $P < 0.05$ ),且 AI 低于雌激素治疗组。上述实验结果提示温肾固疏方通过调控 ApoE,改善 Wnt/PPAY $\gamma$  的拮抗作用从而诱导  $\beta$ -catennin 的表达,促使骨髓间充质干细胞向骨细胞分化,促进骨形成,防止脂细胞形成,改善脂代谢异常,并促进骨吸收,防止骨变异流失,进而改善绝经后骨质疏松情况。

在中医理论中,“肾主骨”,肾与骨的关系密切,《内经》指出妇女在绝经前后,即“天癸衰”后会出现毛发枯黄,牙齿松动,骨质脆弱等表现。补肾一直以来作为中医治疗骨质疏松的主要方向。国内学者研究认为,ApoE 在中医理论中与痰证关系紧密,《仁

斋直指方》中提出“肥人气虚生痰,故多痰湿”,说明早于几百年前就有临床经验研究指出脂代谢异常与痰湿体质、证候互相作用。痰湿证候会导致脂代谢异常,脂代谢异常也会反作用于痰湿证候,使痰淤体内,湿气不排,进而导致湿浊在体内堆积,脾胃功能失调。脾胃与肾在藏象关系中联系紧密,先天后天精微互相充养,脾胃功能失调,则后天之精运化失调,后天之精不能充养先天之精,故导致肾气不充,肾脏功能失司,肾精与水谷精微不能充养骨骼,便会进一步引发骨枯、骨萎,也就是现代的骨质疏松症。ApoE 在脂代谢与骨代谢调节中起到至关重要的作用,中医理论中也与痰湿证候相关<sup>[10-12]</sup>,影响肾精充养骨的作用。大量临床报告显示绝经前后妇女常同时伴有骨质疏松和脂代谢异常导致的心血管系统疾病、阿尔茨海默病等,单一的他汀类药物或雌激素替代疗法都未能取得更好的疗效,长期服用雌激素可能导致静脉血栓和心血管疾病<sup>[13-15]</sup>,长期服用雌激素的女性患有此类疾病的可能性要较一般女性高出 2 倍左右<sup>[6]</sup>,并且会导致体重增加与明显的情绪变化<sup>[16]</sup>,故持续使用雌激素替代疗法并非相对完善的治疗 PMOP 手段。温肾固疏方由熟地 20 g、淫羊藿 20 g、党参 10 g、丹参 10 g、枸杞 10 g、骨碎补 10 g、补骨脂 5 g、茯苓 10 g、白术 10 g 按比例配伍制成。根据现代中药研究,骨碎补<sup>[17]</sup>、熟地<sup>[18]</sup>、淫羊藿<sup>[19]</sup>皆有通过调节 ApoE 对骨髓间充质干细胞的双向诱导分化作用,淫羊藿同时具有保护心血管的功能<sup>[20]</sup>。温肾固疏方以温肾健脾为治疗原则,具有能够长期服用、副作用小、能在一副汤药中通过草药配伍整体治疗的优越点,并且具有中医的整体治疗观念,能够整体调节绝经后妇女的激素代谢。

本实验通过对去势大鼠骨质量、骨强度、骨代谢以及脂代谢指标的研究,证实温肾固疏方通过调控 ApoE 从而改善骨代谢,防止骨流失,并能有效改善脂代谢,通过温肾健脾法达到补骨的效果。但由于绝经后骨质疏松症是一种机制复杂的综合代谢性疾病,其机制尚不明确,且实验依旧有改进空间,如大鼠与人类在生物形态学的不同导致部分结论不显著、样本量偏少、大鼠个体差异性等,对 ApoE 调控绝经后骨质疏松症的机制依旧需要进一步探讨,希望能从中寻找新的防治思路。

## 【参 考 文 献】

- [1] Liu HW, Zhang F, Fan P, et al. Effects of apolipoprotein E genotypes on metabolic profile and oxidative stress in South-West

- Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 170 (1): 146-151.
- [2] Chen Y, Zhao H, Ren X. Estrogen and progesterone inhibit NF-kappa B in atherosclerotic tissues of ovariectomized ApoE ( - / - ) mice. *Climacteric*, 2016, 19 (4): 357-363.
- [3] Qi SS, Yang YQ, Pang TT, et al. A successful surgical procedure of rat ovariectomy for establishing an animal model of women's postmenopausal osteoporosis. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 2 (3): 100-103.
- [4] 孙振双, 徐道明, 朱媛媛, 等. 温肾固疏方调控去卵巢大鼠氧化应激及骨代谢指标的机制研究. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23 (6): 740-744, 750.  
Sun ZS, Xu DM, Zhu YY, et al. Study on the mechanism of WenShenGuShu formula on oxidative stress and Bone Metabolism of Ovariectomized Rats with Osteoporosis. *Chin J Osteopor*, 2017, 23 (6): 740-744, 750. (in Chinese)
- [5] Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, et al. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (2): 501-512.
- [6] Niemeier A, Kassem M, Toedter K, et al. Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 283-293.
- [7] Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 1996, 382: 448.
- [8] Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, et al. Vitamin K2 efficacy prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2000 (15): 515-521.
- [9] Sharma AR, Choi BS, Park JM, et al. Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. *Indian J Biochem Biophys*, 2013, 50 (1): 19-25.
- [10] 宋剑南, 陈杲. 论载脂蛋白 E 及其基因多态性与中医痰证候的关系. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8 (12): 13-15.  
Song JN, Chen G. The relationship between apolipoprotein E and its gene polymorphism and TCM syndrome of phlegm syndrome. *China Journal of traditional Chinese medicine and medicine*, 2002, 8 (12): 13-15. (In Chinese).
- [11] 刘健, 李七一, 韩旭. 冠心病患者中医体质类型与 ApoE 基因多样性的相关研究. *临床与药物*, 2013 (10): 21-30.  
Liu J, Li QY, Han X. Coronary heart disease patients with TCM Constitution Types and ApoE gene diversity of the related research. *Clinical and Drug*, 2013 (10): 21-30. (In Chinese).
- [12] 梁莉, 黄李平, 余敏英. ApoE 基因多态性及血脂水平与不同体质缺血性脑卒中的研究进展. *辽宁中医杂志*, 2012 (02): 372-374.  
Liang L, Huang LP, Yu MY. ApoE gene polymorphism and blood lipid levels and the research progress of ischemic stroke in different constitutions. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012 (02): 372-374. (in Chinese).
- [13] Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, 2002, 288 (1): 49-57.
- [14] Jick H, Derby LE, Myers MW, et al. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogen. *Lancet*, 1996, 348: 981 - 983.
- [15] Sidelmann JJ, Jespersen J, Andersen LF, et al. Hormone replacement therapy and hypercoagulability. Results from the Prospective Danish Climacteric Study. *Bjog An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2003, 110 (6): 541 - 547.
- [16] Wimberly YH, Cotton S, Wanchick AM, et al. Attitudes and experiences with levonorgestrel 100 microg/ethinyl estradiol 20 microg among women during a 3-month trial. *Contraception*, 2002, 65 (6): 403-406.
- [17] 刘国岩, 徐展望, 徐婉梨, 等. 骨碎补提取物对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 Cbfa-1 表达的影响及意义. *中国骨质疏松杂志*, 2013, 19 (12): 1224-1227, 1249.  
Liu GY, Xu ZW, Xu WL, et al. Effect and significance of expressions of Cbfa-1 with drynaria extract on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cell. *Chin J Osteopor*, 2013, 19 (12): 1224-1227, 1249. (in Chinese)
- [18] 黄勇, 吴建军, 刘凯, 等. 熟地含药血清对骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的影响. *中国老年学杂志*, 2011, 31 (20): 3979-3981.  
Huang Y, Wu JJ, Liu K, et al. Effect of rehmannia drug-containing serum on mesenchymal stem cells into neural cells in vitro. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31 (20): 3979-3981. (in Chinese).
- [19] 毛项颖, 卞琴, 沈自尹. 淫羊藿苷介导 MAPK 信号通路促进间充质干细胞株 C3H10T1/2 成骨分化的体外研究. *中西医结合学报*, 2012, 10 (11): 1272-1278.  
Mao XY, Bian Q, Shen ZY. Analysis of the osteogenic effects exerted on mesenchymal stem cell strain C3H10T1/2BY icariin via MAPK signaling pathway in vitro. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2012, 10 (11): 1272-1278. (in Chinese).
- [20] 胡彦武, 刘凯, 闫梦彤, 等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷的心血管保护作用及机制研究进展. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (13): 227-230.  
Hu YW, Liu K, Yan MT, et al. Research Advances of Cardiovascular Protection and Their Mechanisms of Total Flavonoids and Icarin from Epimedium Folium. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2015, 21 (13): 227-230. (in Chinese).

(收稿日期: 2017-08-31; 修回日期: 2017-11-22)