

· 论 著 ·

TGF- β 1/Smad4 信号通路对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓微环境的影响及针刺干预机制

白登彦^{1,2*} 王冠¹ 张海军¹ 朱涛¹ 赵志鹏¹ 尹秦³ 郭小荣³

1.西北民族大学附属医院,甘肃 兰州 730000

2.甘肃省第二人民医院,甘肃 兰州 730000

3.甘肃中医药大学附属医院,甘肃 兰州 730000

中图分类号: R274.9;R245.311 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021)08-1140-07

摘要: **目的** 研究 TGF- β 1/Smad4 信号通路对去卵巢骨质疏松大鼠的影响,并分析针刺疗法对大鼠骨髓微环境的干预机制。**方法** 选取 SPF 级雌性 Wistar 大鼠共 60 只,按照随机数字法分为空白组(A组)、模型组(B组)、针刺组(C组)和雌二醇组(D组),每组大鼠各 15 只。除 A 组外,其他大鼠均以去卵巢法建立骨质疏松症动物模型。造模成功后,C 组交替给予电针刺激“肾俞穴”“三阴交穴”“关元穴”及“足三里穴”,每次电针 15 min,1 次/d。D 组按照人鼠等效剂量给予戊酸雌二醇治疗,总计干预治疗 12 周。对比分析各组大鼠血清中骨代谢相关标志物、股骨远端骨密度水平及骨小梁微结构变化;对比各组大鼠股骨远端骨组织中 Runx 2、PPAR γ 、TGF- β 1、Smad 4 蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** 造模后,与空白组比较,各组大鼠骨密度均明显降低($P<0.05$),血清中骨代谢标志物 CBF- α 1、BALP、PINP、OC、CTX-I 含量均明显减少($P<0.05$);相对骨体积分数(BV/TV)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、连接密度(Conn.D)、结构模型指数(SMI)明显升高($P<0.05$);股骨远端骨组织中 Runx 2、PPAR γ 、TGF- β 1、Smad 4 蛋白和 mRNA 表达下降($P<0.05$)。干预 12 周后,与模型组比较,雌二醇组和针刺组大鼠骨小梁微结构明显改善,骨密度、骨代谢标志物及股骨远端骨组织中 Runx 2、PPAR γ 、TGF- β 1、Smad 4 蛋白和 mRNA 表达上升($P<0.05$),其中针刺组明显优于雌二醇组($P<0.01$)。**结论** 针刺“肾俞穴”“三阴交穴”“关元穴”及“足三里穴”能够改善去卵巢大鼠骨髓微环境,改善骨小梁微结构,增加骨量,其机制可能与针刺疗法调控 TGF- β 1/Smad 4 信号通路有关。

关键词: 骨质疏松症;针刺;TGF- β 1/Smad 4;Runx 2;PPAR γ ;骨髓微环境

Effect of TGF- β 1/Smad4 signaling pathway on bone marrow microenvironment in ovariectomized osteoporosis rats and mechanism of acupuncture intervention

BAI Dengyan^{1,2*}, WANG Guan¹, ZHANG Haijun¹, ZHU Tao¹, ZHAO Zhipeng¹, YIN Qin³, GUO Xiaorong³

1.Affiliated Hospital of Northwest University for nationalities, Lanzhou 730000

2.The second people's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000

3.Affiliated Hospital of Gansu University of traditional Chinese medicine, Lanzhou 730000, China

* Corresponding author: BAI Dengyan, Email: 2114822237@ qq.com

Abstract: Objective To study the effect of TGF- β 1/Smad4 signaling pathway on ovariectomized osteoporosis rats, and to analyze the intervention mechanism of acupuncture therapy on bone marrow microenvironment in rats. **Methods** A total of 60 SPF female Wistar rats were randomly divided into blank group (Group A), model group (Group B), acupuncture group (Group C) and estradiol group (Group D), with 15 rats in each group. Except Group A, other rats were ovariectomized to establish osteoporosis animal models. After the recipe was successfully modeled, Group C was alternately given electroacupuncture stimulation of “Shenshu” “Sanyinjiao” “Guanyuan” and “Zusanli”, 15 minutes each time, once a day. Group D was treated with estradiol valerate according to the equivalent dose of human and mice for 12 weeks. The changes of bone metabolism related markers in

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(31920160109);甘肃省中医药管理局课题(GZK-2016-53);甘肃省科技支撑计划(1304FKCA096)

* 通信作者: 白登彦, Email: 2114822237@ qq.com

serum, bone mineral density and trabecular microstructure of distal femur were compared and analyzed; the expression levels of Runx2, PPAR γ , TGF- β 1, Smad4 protein and mRNA in bone tissue of distal femur were compared. **Results** After modeling, compared with the blank group, the bone mineral density of rats in each group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the serum levels of bone metabolism markers CBF- α 1, BALP, PINP, OC, CTX-I were significantly increased ($P < 0.05$); the relative bone volume fraction (BV/TV), bone trabecular separation (Tb.Sp), trabecular thickness (Tb.Th), the number of trabeculae (TB.N), connection density (Conn.d) and structural model index (SMI) were significantly increased ($P < 0.05$); the expression of Runx 2, PPAR γ , TGF- β 1, Smad 4 protein and mRNA in distal femur decreased ($P < 0.05$). After 12 weeks of intervention, compared with the model group, the microstructure of trabecular bone in the estradiol group and the acupuncture group was significantly improved, and the expressions of Runx 2, PPAR γ , TGF- β 1, Smad 4 protein and mRNA in the bone tissue of distal femur were increased ($P < 0.05$), and the acupuncture group was significantly better than the estradiol group ($P < 0.01$). **Conclusion** Acupuncture at “Shenshu” “Sanyinjiao” “Guanyuan” and “Zusanli” can improve bone marrow microenvironment, improve bone trabecular microstructure and increase bone mass in ovariectomized rats. The mechanism may be related to the regulation of TGF- β 1/Smad 4 signaling pathway by acupuncture.

Key words: osteoporosis; acupuncture; TGF- β 1/Smad4; Runx2; PPAR γ ; bone marrow microenvironment

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨微结构退化导致的骨质变化、骨脆性增加从而极易引发骨折的全身代谢性疾病^[1]。研究^[2]发现, OP 的发生是免疫系统、神经内分泌系统以及骨髓微环境动态失衡等共同作用的结果。骨髓微环境 (bone marrow microenvironment, BMM) 由成骨细胞、成纤维细胞、破骨细胞、基质细胞及其产生的细胞外基质和细胞因子等成分组成。BMM 能够提供生理屏障, 阻断调控多种细胞的分化、凋亡的信号, 其变化与多种信号因子存在密切关系, 其中 Runx 2、PPAR γ 、TGF- β 1、Smad 4 是 BMM 动态平衡的重要指标^[3]。TGF- β 1/Smad 4 信号通路是由转化生长因子 β 1 (transforming growth factor, TGF- β 1) 和 Smad 4 构成。研究^[4,5]认为, TGF- β 1/Smad 4 信号通路对骨细胞的形成、分化及凋亡具有一定的调节作用, 但具体机制尚未完全阐明。研究^[6-7]表明, 针刺能够改善骨微结构, 调控 BMM, 但其是否通过调控 TGF- β 1 / Smad4 信号通路影响 OP 发病尚未见相关报道。因此本研究拟通过切除雌性大鼠双侧卵巢的方法建立 OP 大鼠模型, 给予电针刺激“肾俞穴”“三阴交穴”“关元穴”及“足三里穴”进行干预, 旨在观察针刺对去卵巢大鼠 TGF- β 1 / Smad4 信号通路的干预, 并分析其对 BMM 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 选取 3 月龄 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 (200 ± 20) g, 由甘肃中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (甘) 2019-0001, 适应性喂养 1 周后开始实验造模。本研究经

甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准, 实验过程及操作均遵守国家健康与医学研究委员会 (NHNRC) 动物道德准则。

1.1.2 试剂及仪器: 纤毛机械刺激针 (NC12775, 美国 Stoelting Co.), HANS-200A 电针仪 (南京济生)。戊酸雌二醇片 (国药准字 J20191038, 规格: 1 mg $\times$ 21 片, 拜耳)。Runx2 抗体 (批号: XGK100552), PPAR γ 抗体 (批号: WL01800), TGF- β 1 抗体 (批号: YS-0086R), Smad4 抗体 (批号: XY-0585R), 全部购自美国 BioVision; BALP ELISAKit (批号: E202006)、CBF- α 1 ELISAKit (批号: E202905)、CTX-I ELISAKit (批号: E202012)、PINP ELISAKit (批号: E202010)、OC ELISAKit (批号: E202014), 均购自江苏江莱生物。Benchmark Plus 酶联免疫检测仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 实验动物微型 CT 影像系统 (西门子 Inveon, 德国); 倒置相差荧光显微镜 (日本, Olympus); 骨密度仪 (韩国 osteosys)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模: 将 60 只大鼠按照随机数字法分为 4 组: 空白组 (A 组)、模型组 (B 组)、针刺组 (C 组) 及雌二醇组 (D 组), 每组各 15 只。适应性喂养 1 周后, 除空白组外, 其他大鼠均参照文献 [8] 去除卵巢, 建立 OP 模型大鼠。造模成功后^[9]进行干预治疗 12 周。

1.2.2 干预: A、B 组大鼠给予等剂量生理盐水灌胃; C 组按文献 [10] 取穴, 置于自制鼠袋固定大鼠, 暴露针刺穴位, 将毫针刺入穴位后, 接电针仪, 疏密波, 刺激强度 2 mA, 2 Hz/100 Hz, 每次 15 min, 1 次/d; D 组按照人鼠等效剂量给予戊酸雌二醇 50 μ g/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 共治疗 12 周。A、B 组大鼠常规饲

养,各组大鼠生长环境及饲养条件相同。

1.2.3 骨代谢标志物含量测定:将大鼠处死后心脏取血 2 mL,置于离心机中,离心半径 10 cm,转速 3 000 r/min,离心 10 min,取上清液,采用 ELISA 法检测血清中骨特异性碱性磷酸酶 (bone specific alkaline phosphatase, BALP)、核结合因子- $\alpha 1$ (core binding factor- $\alpha 1$, CBF- $\alpha 1$)、I 型胶原羧基末端肽 (C-terminal type I collagen telopeptide, CTX-I)、I 型前胶原氨基端前肽 (procollagen type I amino-terminal peptide, PINP)、骨钙素 (osteocalcin, OC) 含量水平。

1.2.4 骨小梁微结构及骨密度测定:采用 Micro-CT 扫描分离后的各组大鼠右侧股骨远端干骺端。所有标本从股骨远端生长板顶点至皮质部分去掉后为本次兴趣区域 (region of interest, ROI),提取图像资料,用自带骨骼分析软件 (advanced bone analysis, ABA) 测定骨组织相关计量学指标,包括:相对骨体积 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、连接密度 (Conn.D)、骨小梁分离度 (Tb.Sp)、骨小梁数量 (Tb.N)、结构模型指数 (SMI)。通过骨密度仪分析各组大鼠骨密度 (bone mineral density, BMD) 变化。所有操作分析均由同一组人完成。

1.2.5 TUNEL 法检测股骨远端细胞凋亡情况:取各组大鼠股骨组织剪碎后置于 4 % 多聚甲醛溶液内浸泡 24 h,不同浓度乙醇按顺序脱水后,进行切片操作,脱蜡后将标本置于苏木精中进行染色 15 min 后脱水透明 10 min,通过 TUNEL 试剂盒检测不同组大鼠切片标本中细胞凋亡情况,激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.6 RT-PCR 法检测 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ mRNA 表达:提取各组大鼠股骨远端部分骨组织,使用 RNA 抽提试剂盒提取不同组大鼠骨组织中总 RNA,检测 RNA 纯度含量后用 Takara 逆转录试剂盒反转录获取 cDNA,应用 Primer5.0 设计引物序列,RT-PCR 法检测各组大鼠不同组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ mRNA 表达量,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析数据。引物序列见表 1。

1.2.7 Western blot 法检测 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ 蛋白表达:将大鼠处死后,迅速取其股骨远端的部分骨组织剪碎,加入 RIPA 裂解缓冲液放置在冰上 30 min,提取各组大鼠骨组织中的总蛋白,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定各组大鼠骨组织中蛋白质的浓度。蛋白质用 SDS-PAGE 进行等量分离,然后移至 PDVF 膜上,并置于 4 °C 下添加一抗 (1 :

500) 孵育过夜。洗涤后添加辣根过氧化物酶缀合的二抗 (1 : 500),常温下孵育 2 h。ECL 试剂显影后应用软件 QuantityOne 对蛋白相对表达水平进行分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
TGF- $\beta 1$	上游 GAGCCATCACTTGTCACGCGCA	181
	下游 GCATGCTTAGAAAGCGTTCGCGTA	
Smad4	上游 CAAGAGTATCATCTTGGCGACAGCAAT	192
	下游 GTCAAGTGTGTGAGAGACATTAGGTG	
Runx2	上游 TGCTGCCTTAGAAATGTCCGA	148
	下游 GCTAGAAAGCGTCAGCCAAAG	
PPAR γ	上游 CCTGATCATCAGACTGGACT	206
	下游 GTCCGCACTGAAATGTGACG	
GAPDH	上游 GGCACCTCAAGAGGTCAATAC	137
	下游 TCACTACATCCAGCACACAGCA	

1.3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组间比较分别实施 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨代谢标志物比较

与空白组比较,各组大鼠造模后骨代谢标志物 BALP、CBF- $\alpha 1$ 、PINP、OC 含量明显降低 ($P < 0.05$),CTX-I 含量明显升高 ($P < 0.05$);干预治疗 12 周后,与模型组比较,雌二醇组大鼠和针刺组大鼠 BALP、CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 改善程度优于模型组 ($P < 0.05$),且针刺组优于雌二醇组明显 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.2 大鼠骨小梁微结构及骨密度比较

与空白组比较,模型组大鼠造模后 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D、Tb.Sp、SMI 均出现不同程度改变 ($P < 0.05$);干预 12 周后,与模型组比较,雌二醇组大鼠和针刺组大鼠 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D、Tb.Sp、SMI 参数不同程度改变 ($P < 0.05$);其中针刺组干预效果优于雌二醇组 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.3 大鼠股骨远端细胞凋亡情况比较

TUNEL 染色提示蓝色荧光为正常细胞核,绿色荧光为凋亡的成骨细胞和骨细胞。激光共聚焦显示,空白组大鼠骨组织正常,绿色荧光极少;模型组大鼠造模后绿色荧光增多,提示成骨细胞和骨细胞

凋亡增加;干预治疗后,针刺组和雌二醇组大鼠股骨远端成骨细胞和骨细胞凋亡数量减少。见图 1。

表 2 各组大鼠骨代谢标志物含量比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$, $n=15$)

Table 2 Comparison of the contents of bone metabolism markers in each group of rats($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	BALP	CBF- $\alpha 1$	CTX-I	PINP	OC
A 组	23.41 $\pm$ 12.04	49.64 $\pm$ 10.15	14.75 $\pm$ 4.09	32.67 $\pm$ 12.52	19.75 $\pm$ 10.36
B 组	15.41 $\pm$ 10.06*	20.26 $\pm$ 12.63*	20.08 $\pm$ 7.14*	21.82 $\pm$ 10.03*	10.77 $\pm$ 8.69*
C 组	20.07 $\pm$ 11.73* Δ $\blacktriangle$	37.22 $\pm$ 13.08* Δ $\blacktriangle$	15.74 $\pm$ 5.11* Δ $\blacktriangle$	28.92 $\pm$ 10.07* Δ $\blacktriangle$	17.15 $\pm$ 10.11* Δ $\blacktriangle$
D 组	17.41 $\pm$ 10.55* Δ	32.16 $\pm$ 11.75* Δ	17.45 $\pm$ 3.15* Δ	24.76 $\pm$ 11.55* Δ	13.62 $\pm$ 11.17* Δ
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较, Δ $P<0.05$;与 D 组比较, $\blacktriangle$ $P<0.01$ 。

表 3 大鼠骨小梁微结构比较($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

Table 3 Comparison of trabecular microstructure in rats($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	BMD/(g/cm^2)	BV/TV/%	Tb.N/ cm^{-1}	Tb.Th/ μm	Conn.D/ cm^{-3}	Tb.Sp/ cm^{-1}	SMI
A 组	0.187 $\pm$ 0.025	0.48 $\pm$ 0.08	7.15 $\pm$ 0.21	64.75 $\pm$ 10.56	87.71 $\pm$ 15.41	0.25 $\pm$ 0.11	0.79 $\pm$ 0.11
B 组	0.131 $\pm$ 0.009*	0.21 $\pm$ 0.11*	3.11 $\pm$ 0.14*	28.19 $\pm$ 11.45*	49.76 $\pm$ 10.35*	0.74 $\pm$ 0.06*	1.23 $\pm$ 0.03*
C 组	0.149 $\pm$ 0.012* Δ $\blacktriangle$	0.41 $\pm$ 0.12* Δ $\blacktriangle$	6.21 $\pm$ 0.17* Δ $\blacktriangle$	56.64 $\pm$ 10.48* Δ $\blacktriangle$	79.57 $\pm$ 11.58* Δ $\blacktriangle$	0.41 $\pm$ 0.17* Δ $\blacktriangle$	0.85 $\pm$ 0.18* Δ $\blacktriangle$
D 组	0.147 $\pm$ 0.015* Δ	0.27 $\pm$ 0.14* Δ	3.99 $\pm$ 0.08* Δ	41.77 $\pm$ 10.83* Δ	53.06 $\pm$ 18.78* Δ	0.55 $\pm$ 0.12* Δ	1.01 $\pm$ 0.12* Δ
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较, Δ $P<0.05$;与 D 组比较, $\blacktriangle$ $P<0.01$ 。

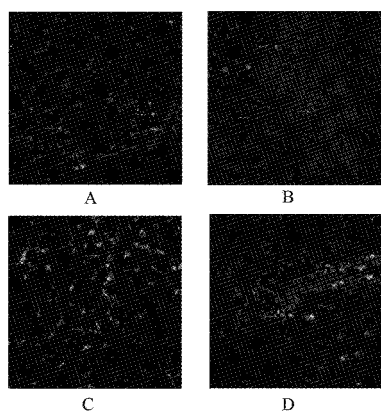


图 1 大鼠股骨远端细胞凋亡情况比较

Fig.1 Comparison of cell apoptosis in the distal femur of rats

注:A:空白组;B:模型组;C:针刺组;D:雌二醇组。

2.4 大鼠股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ mRNA 表达量比较

与空白组比较,各组大鼠造模后股骨远端骨组

织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4 mRNA 表达量明显下降($P<0.05$),Runx2、PPAR γ mRNA 表达量明显上升($P<0.05$);与模型组比较,干预 12 周后,各治疗组大鼠股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4 表达量明显上升($P<0.05$),Runx2、PPAR γ mRNA 表达量明显下降($P<0.05$);其中针刺组和雌二醇组大鼠股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ mRNA 的表达效果优于模型组($P<0.05$),针刺组明显优于雌二醇组($P<0.01$)。见表 4。

2.5 大鼠股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ 蛋白表达量比较

与空白组比较,各组大鼠造模后股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4 蛋白表达量明显下降($P<0.05$),Runx2、PPAR γ 蛋白表达量明显上升($P<0.05$);与模型组比较,干预 12 周后,各治疗组大鼠股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4 蛋白表达量明显上升($P<0.05$),Runx2、PPAR γ 蛋白表达量明显下

表 4 骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

Table 4 Comparison of mRNA expressions of TGF- $\beta 1$, Smad4, Runx2 and PPAR γ in bone tissue($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	TGF- $\beta 1$	Smad4	Runx2	PPAR γ
A 组	3.63 $\pm$ 0.15	1.26 $\pm$ 0.71	1.88 $\pm$ 0.16	0.75 $\pm$ 0.11
B 组	0.99 $\pm$ 0.57*	0.23 $\pm$ 0.78*	4.05 $\pm$ 0.22*	1.46 $\pm$ 0.13*
C 组	2.25 $\pm$ 0.35* Δ $\blacktriangle$	0.96 $\pm$ 0.14* Δ $\blacktriangle$	2.24 $\pm$ 0.15* Δ $\blacktriangle$	0.99 $\pm$ 0.14* Δ $\blacktriangle$
D 组	1.78 $\pm$ 0.54* Δ	0.71 $\pm$ 0.03* Δ	3.11 $\pm$ 0.06* Δ	1.12 $\pm$ 0.09* Δ
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较, Δ $P<0.05$;与 D 组比较, $\blacktriangle$ $P<0.01$ 。

降($P<0.05$);其中针刺组和雌二醇组大鼠股骨远端骨组织中 TGF- β 1、Smad4、Runx2、PPAR γ 蛋白的表

达效果优于模型组($P<0.05$),针刺组明显优于雌二醇组($P<0.01$)。见图 2。

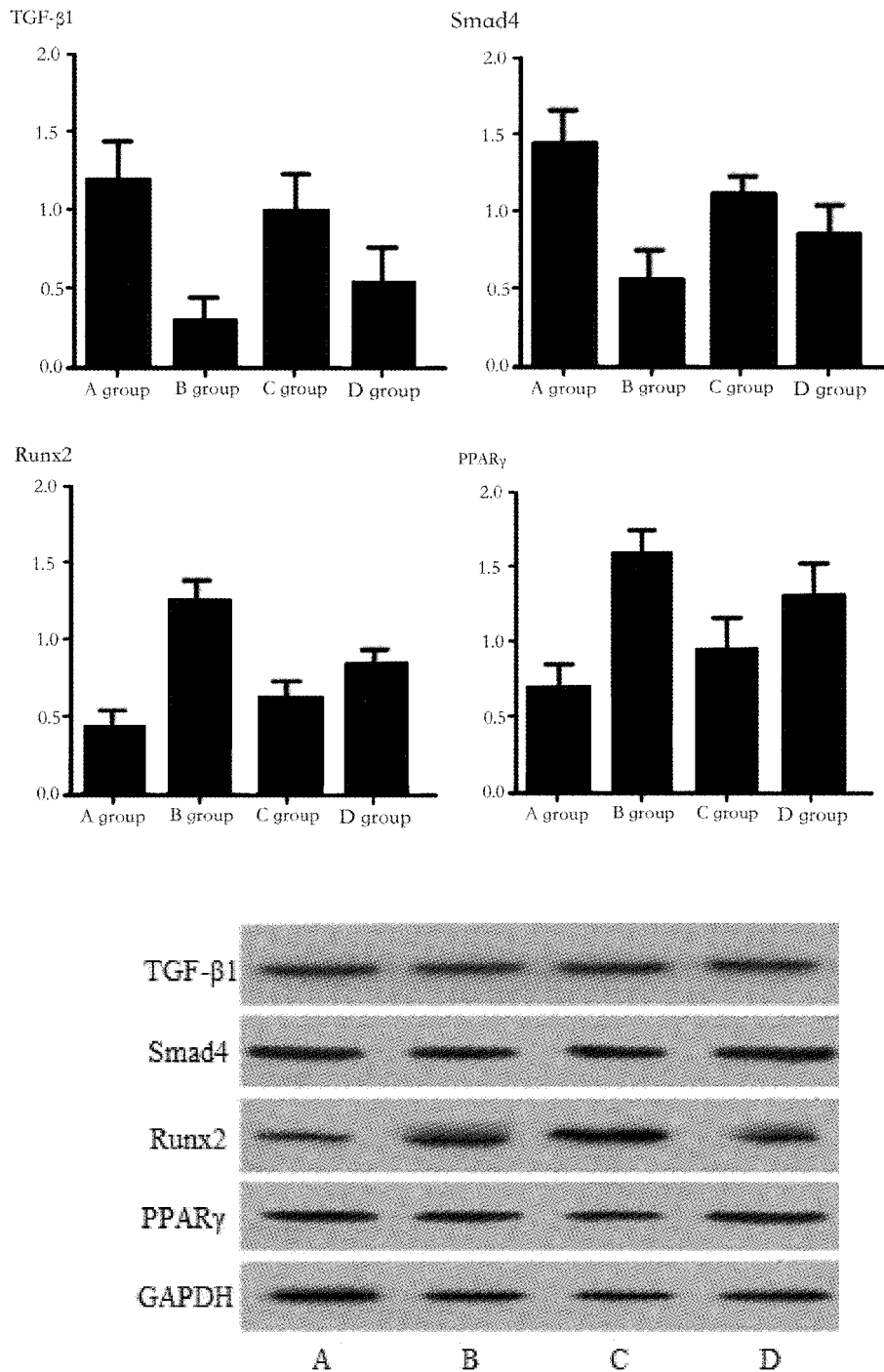


图 2 股骨远端骨组织中 TGF- β 1、Smad4、Runx2、PPAR γ 蛋白表达量比较

Fig.2 Comparison of TGF- β 1, Smad4, Runx2 and PPAR γ protein expression in distal femur

注:A:空白组;B:模型组;C:针刺组;D:雌二醇组。

3 讨论

OP 发病原因与骨组织代谢异常、骨髓微环境改变等多种因素有关^[11]。随着近几年激素使用过

多,人口老龄化加快,OP 患者正在逐年增长^[12]。中医学将骨质疏松归为“骨痿”“骨枯”范畴,辨证该病时多从肾脾等入手。张介宾^[13]指出:“水谷之海先天为之主,精血之海后天为之资……先天不足者,后

天培养之,亦可居其强半”。说明肾精气充足与脾胃功能密切相关,脾胃健旺,则水谷精微化源充盛,骨骼强盛。骨髓微环境异常时,肾主骨生髓之功能也异常,进而可至骨痿,正如《素问·脉要精微论》所述“骨者,髓之府,转摇不能,肾将惫矣”,《素问·痿论》言:“肾气热则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”,这也说明“肾将惫”与“肾气热”与脑的生理功能异常存在着密切的联系。针刺能够明显调节骨髓微环境,改善骨微结构,修复成骨细胞增长、改善骨质量,但其具体机制仍不明确^[14-16]。研究^[17-19]指出,“肾俞穴”“三阴交穴”“关元穴”及“足三里穴”是补肾健脾重要穴位,而且对于 OP 的发生发展有重要影响。因此,本次研究在此基础上选择了上述穴位。

BMD 是目前临床检测骨质疏松变化的重要指标。本研究结果显示,大鼠在卵巢摘除后,其 BMD 明显降低,骨小梁微结构严重破坏,证明成功建立 OP 模型。PINP 作为 I 型前胶原细胞外分泌产物是骨形成的敏感指标,CTX-I 是骨吸收过程中 I 型胶原释放入血的产物。血液中 PINP 及 CTX-I 含量变化与 I 型胶原的合成速率、成骨细胞活动情况以及骨吸收过程密切相关,是诊断 OP 的特异性指标^[20-21]。CBF- $\alpha 1$ 属于 Runt 结构域基因家族的转录因子,由成骨细胞特异性表达,对成骨细胞的分化的起重要作用。研究^[22]指出,CBF- $\alpha 1$ 能够调节成骨细胞分化,调控骨细胞的功能因子表达,对骨骼形成和发育有重要作用。OC 又称骨 R-羟基谷氨酸蛋白,主要由成骨细胞、成牙质细胞合成,作为成骨细胞分泌的特殊非胶原蛋白,其含量变化可用于监测骨发育以及骨代谢情况,在调节骨钙代谢中起重要作用^[23]。在 OP 中,CTX-I、CBF- $\alpha 1$ 以及 OC 均能特异性反映骨髓微环境平衡情况。本研究发现,与空白组比较,模型组大鼠血清中 BALP、CBF- $\alpha 1$ 、CTX-I、PINP、OC 等骨代谢标志物含量明显改变,这表明去卵巢大鼠造模后骨量出现丢失,这与 OP 的病理表现相符。与模型组比较,针刺干预后大鼠骨代谢相关标志物水平明显改善,BMD 含量明显增加,骨小梁微结构及骨髓微环境明显改善,这与王亚军^[24]、邵雨薇^[25]等的研究结果一致。

骨髓微环境紊乱与绝经后骨质疏松症的骨代谢特点非常相似,而骨髓微环境平衡是多种因素共同作用的结果^[26]。其中 Runx2 和 PPAR γ 能够调节骨髓间充质干细胞向成骨细胞和脂肪细胞这两种细胞方向分化,是骨髓微环境动态变化的重要指标因

子^[27-28]。TGF- $\beta 1$ 是调节骨髓微环境中骨吸收和骨形成的重要多肽类生长因子,Smad4 是 TGF- $\beta 1$ 跨膜传导多种信号所需的重要分子之一,TGF- $\beta 1$ /Smad4 信号通路在骨髓微环境的平衡调节过程中发挥着重要作用,是绝经后骨质疏松症发生的重要机制^[29-30]。但针刺是否通过调控 TGF- $\beta 1$ /Smad4 信号通路影响 OP 的骨髓微环境仍不明确。本研究结果显示,大鼠造模后股骨远端骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ 表达含量明显改变,但经针刺干预后,骨组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Runx2、PPAR γ 趋向好转,这提示针刺能够调节 OP 大鼠 TGF- $\beta 1$ /Smad4 信号通路的表达,进而影响 OP 骨髓微环境改变。

综上所述,针刺能够影响去卵巢大鼠骨髓微环境改变,改善骨代谢标志物表达,调控骨代谢平衡,其机制可能与针刺调控 TGF- $\beta 1$ /Smad4 信号通路表达有关。

【参 考 文 献】

- [1] 景少博,张建平,李建国,等.基于中医疗血理论探讨骨质疏松症中医发病机制认识及治疗进展[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(2):275-278.
- [2] 刘云,罗晓婷,李崇,等.代谢组学在骨质疏松中的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2021,29(1):55-59.
- [3] 吴钰坤,韩杰,温帅波.骨折愈合过程中 Runx2 基因的作用机制[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2274-2279.
- [4] Hoffmann A, Preobrazhenska O, Wodarczyk C, et al. Transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(29):27271-27283.
- [5] 郝皓,杨文静,倪娟.IL-31 通过调控 TGF- $\beta 1$ /Smad4 信号通路促进骨质疏松的机制研究[J].中国免疫学杂志,2019,35(5):599-603.
- [6] 虎力,温佩彤,张伟波,等.低频电针对不同月龄增龄性大鼠骨骼肌 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(9):2064-2067.
- [7] 秦玮,纪峰,林莺,等.电针命门穴对去卵巢骨质疏松大鼠下丘脑骨形成蛋白 BMP-2 及其信号转导蛋白 Smad1/5 表达的影响[J].时珍国医国药,2016,27(6):1530-1532.
- [8] 李兰,杨一秋,解继胜.去卵巢小鼠绝经后骨质疏松模型的建立和综合评定[J].右江民族医学院学报,2021,43(1):6-10.
- [9] Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women [J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 635023.
- [10] 余曙光,郭义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,2009.
- [11] 智信,陈晓,苏佳灿.绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1510-1513,1534.

- [12] 何培亮,李爱国,彭涛,等.中国南方与北方地区 2013-2018 年骨质疏松流行病学对比分析[J].中华老年病研究电子杂志, 2020,7(1):31-35.
- [13] 张景岳.景岳全书[M].太原:山西科学技术出版社,2006:203.
- [14] 彭锐,李静,李佳,等.温针灸对膝关节大鼠软骨组织 ROCK/LIMK1/Cofilin 通路的影响[J].针刺研究,2020,45(2):105-110.
- [15] 窦报敏,章明星,李鑫举,等.基于数据挖掘的电针治疗骨质疏松症腧穴谱及刺激参数研究[J].时珍国医国药,2020,31(8):2037-2039.
- [16] 魏科祥,张璇,曹华.电针肾俞、足三里联合滋肾强骨汤对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织和血清 GH/IGF-1 系统的影响[J].针灸临床杂志,2019,35(11):74-77.
- [17] 张楚穹,石娜,欧阳钢.针刺对去卵巢大鼠骨密度及肠黏膜跨膜钙转运相关受体表达的影响[J].针刺研究,2020,45(9):702-707.
- [18] 原淳淳,艾尔扎提·艾尔宝,赵英侠,等.去卵巢大鼠全身肌肉、脂肪和雌二醇含量与骨密度的相关性及补肾健脾穴位针刺的调节作用[J].中华中医药杂志,2020,35(1):434-436.
- [19] 金俊健.电针刺激后大鼠血清对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 及其蛋白表达的影响[J].上海针灸杂志,2019,38(7):798-802.
- [20] 张鹏,罗伟.从虚瘀论治对骨质疏松骨代谢指标 PINP、CTX 影响的研究[J].吉林中医药,2018,38(9):1024-1026.
- [21] 陈宇宁,魏鹏,丁怡,等.唑来膦酸联合碳酸钙 D3 及阿法骨化醇对老年高血压合并骨质疏松患者血清 CTX、PINP、OC 及炎症因子的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(15):3703-3706.
- [22] 潘小燕,王鸿度,岳荣超,等.电针足少阳经穴对去卵巢大鼠骨质疏松症骨组织 OPG、RANKL 及 CBF α 1 mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(11):5132-5134.
- [23] 刘宇彤,金侠,贾丹宁,等.绝经后女性维生素 D 和骨钙素水平与代谢综合征的关系[J].新疆医科大学学报,2020,43(2):187-192.
- [24] 王亚军,张来举,浪万英,等.电针对去卵巢大鼠 Wnt3a 和 β -catenin 的基因及蛋白表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(1):6-11.
- [25] 邵雨薇,舒晴,刘若兰,等.基于组蛋白去乙酰化酶 2 介导的成骨细胞分化通路探讨电针治疗骨质疏松症的效应机制[J].针刺研究,2020,45(6):438-445.
- [26] Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, et al. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. [J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 2009, 19(2):109-124.
- [27] Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, et al. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR γ and adiponectin [J]. Journal of Cellular Physiology, 2010, 225(3):837-845.
- [28] Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G. The balance of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by matrices that mimic stepwise tissue development [J]. Biomaterials, 2012, 33(7):2025-2031.
- [29] Ostrowska Z, Ziora K, O? wicińska J, et al. TGF- β 1, bone metabolism, osteoprotegerin, and soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in girls with anorexia nervosa [J]. Endokrynologia Polska, 2016, 67(5):493-500.
- [30] Sun X, Liu J, Zhuang C, et al. Aluminum trichloride induces bone impairment through TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. Toxicology, 2016:49-57.

(收稿日期:2021-03-08;修回日期:2021-03-28)

(上接第 1139 页)

- [10] 董万涛,巩彦龙,宋敏,等.固本增骨方对卵巢切除模型大鼠骨代谢和骨微结构的影响[J].四川大学学报(医学版), 2019, 50(5):679-683.
- [11] 凌卓彦,吴蕾,史高龙,等.红景天苷对骨折愈合 Runt 相关转录因子 2 调控机制研究[J].中华实验外科杂志,2016,33(5):1292-1294.
- [12] 胡洪凭,张洪凯,吴滨.丙泊酚通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对脑外伤大鼠的神经保护作用[J].中国药师,2019,22(7):1215-1219.
- [13] Danielle LM, Thomas JK, Kristina GB, et al. Reduced bone loss in a murine model of postmenopausal osteoporosis lacking complement component 3 [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2017, 36(1):118-128.
- [14] Yilmaz H, Uyun M, Yilmaz TS, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio may be superior to C-reactive protein for predicting the occurrence of postmenopausal osteoporosis [J]. Endocrine Regulations, 2014, 48(1):25-33.
- [15] Xu H, Qin W, Hu X, et al. Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF- κ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1):83-99.
- [16] Sheng Y, Tang J, Ren K, et al. Integrative computational approach to evaluate risk genes for postmenopausal osteoporosis [J]. IET Systems Biology, 2018, 12(3):118-122.
- [17] 梅国华,郭小芹,陈京京,等.红景天苷对成骨细胞的作用及相关分子机制研究[J].口腔医学研究,2017,33(9):9-12.
- [18] 郑红星,黄洁茹,祁珊珊,等.红景天提取物对糖尿病大鼠牙槽骨丢失的保护作用[J].中国药理学通报,2019,35(6):115-118.
- [19] Liu XD, Cai F, Liu L, et al. microRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation [J]. Biological Chemistry, 2015, 396(4):339-347.
- [20] Zhou RP, Lin SJ, Wan WB, et al. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt pathway in ovariectomized rats [J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0166751-e0166769.

(收稿日期:2020-09-09;修回日期:2020-11-12)