

壮骨止痛方对骨质疏松大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路、血清 Sclerostin 水平的影响[※]

● 杨 军^{1*} 莫新民²

摘 要 目的:探讨壮骨止痛方对骨质疏松大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路以及 Sclerostin 含量的影响。方法:将实验动物分为假手术组、模型组、壮骨止痛方高剂量治疗组、壮骨止痛方低剂量治疗组、雌二醇组 5 组,用酶联免疫法测定大鼠血清中 β -catenin、Sclerostin 的水平。结果:模型组大鼠血清 β -catenin 降低、Sclerostin 水平上升,经壮骨止痛方药物干预后,大鼠血清 β -catenin 水平明显升高、Sclerostin 水平明显下降。结论:壮骨止痛方药物可以提升 Wnt/ β -catenin 信号通路的表达,降低血清 Sclerostin 的水平,达到预防治疗骨质疏松的作用。

关键词 壮骨止痛方 β -链蛋白 骨硬化蛋白

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是以骨量减少,骨小梁变细、断裂、数量减少,皮质骨多孔、变薄等骨的微观结构退化为特征,以致骨的脆性增高及骨折危险性增高的一种全身性骨病^[1]。随着人口老龄化的迅速到来,骨质疏松症已成为严重的社会问题,其发病率已经跃居世界各种常见病的第 7 位。壮骨止痛方是湖南省名中医、吾之业师莫新民教授研发而成,为治疗骨质疏松症的新药,已经获得国家新药证书[国药证字 Z20050125],对绝经后骨质疏松症有良好疗效^[2-5]。本研究以经典的骨质疏松动物模型,用壮骨止痛方药物进行干预治疗,分别检测不同组别大鼠血清中的 β -catenin、Sclerostin 的比率,从而探讨壮骨止痛方预防治疗骨质疏松的作用机制,为再次临床开发应用提供依据。

1 材料

1.1 实验药物 壮骨止痛方药物由陕西中医药大学附属医院药剂科提供,动物灌胃前制备成混悬液,戊

酸雌二醇(生产企业:拜耳医药保健有限公司广州分公司,药品批准文号:国药准字 J20130009)。

1.2 实验动物 SD 大鼠 50 只,SPF 级,体重(200 ± 20)g,雌鼠,购自第四军医大学实验动物中心,合格证号:SCXK-(军)2012-0007。动物饲养于清洁级饲养室,期间自由饮水、摄食,室温 20 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期 12h/12h,通风良好。

1.3 试剂与仪器 青霉素(华北制药股份有限公司,国药准字 H13020655);大鼠硬骨素(SOST)ELISA 检测试剂盒,大鼠 β -链蛋白(β -catenin)ELISA 检测试剂盒均购自(E20160801A,苏州尔卡文生物科技有限公司)。ELX808-IU 酶标仪(美国宝特);BT-25S 型电子天平(上海),0.5 ~ 10 μ l、2 ~ 20 μ l、1 ~ 200 μ l,200 ~ 1000 μ l 移液枪。

2 方法

2.1 动物造模 采用国内外公认的雌性大鼠去卵巢 3 个月造成绝经后骨质疏松症病理模型^[6],取同批次 250g 左右的雌性 SD 大白鼠共 40 只,月龄 10 ~ 12 个月。按体重将大鼠随机分为假手术组、模型组、壮骨止痛方高剂量治疗组(13.2g/kg/d)、壮骨止痛方低剂量治疗组(3.3g/kg/d)、雌二醇组(0.167mg/kg/d)共 5 组,每组 10 只。除假手术组外,其余 4 组均切除双侧卵巢造成绝经后骨质疏松症病理模型,术后在大鼠

※基金项目 陕西省教育厅自然专项计划基金项目(No. 15JK1212)

* 作者简介 杨军,男,医学博士,副教授、副主任医师。主要从事经方治疗老年病的研究。

• 作者单位 1. 陕西中医药大学(712046);2. 湖南中医药大学(410007)

大腿肌肉内侧,注射青霉素,每只 4 万 u/d,防止术后感染。

2.2 给药方法 假手术组和模型组每天灌胃以相应体积冷开水,壮骨止痛方治疗组、己烯雌酚组灌胃以相应药物,剂量按成人剂量及大鼠体表面积折算确定。各组均从第 5 天拆线后开始给药,每天灌胃一次,连续 12 周。(实验过程中,可能由于术后处理不当,模型组和低剂量组各有一只肠胀气死亡)。

2.3 标本采集 给药 12 周,最后一次灌胃后 2 小时,腹腔注射 2% 的戊巴比妥钠(0.2ml/100g 体重)麻醉,腹部切口,从腹主动脉取血,人道主义处死大鼠,分离血清后,再转放入 - 80℃ 冰箱中保存备用待分析。

2.4 指标检测 指标检测前,严格按试剂盒说明书进行相关项目的测定。主要测定大鼠血清 β - catenin, Sclerostin 比率变化,方法为酶联免疫分析。

2.5 统计学方法 用 SPSS16.0 软件包分析,实验设计为多因素非平衡的组合类型,将组别拆分成两个组合进行比较,即模型组与空白组进行比较,模型组与观察组、对照组进行比较,实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,先进行正态分析,符合要求后各组间差异分别采用单因素方差分析和 t 检验, P 值小于 0.05 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 壮骨止痛方药物对绝经后骨质疏松症大鼠血清 β - catenin 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 β - catenin 含量明显下降 ($P < 0.01$),说明绝经后骨质疏松症大鼠造模成功;与模型组比较,雌二醇阳性药组大鼠血清中 β - catenin 含量明显升高 ($P < 0.01$),壮骨止痛方高、低剂量给药组血清中 β - catenin 含量也显著升高 ($P < 0.05$),均有统计学差异,提示壮骨止痛方药物对升高绝经后骨质疏松症大鼠血清 β - catenin 含量有较好作用。见表 1。

3.2 壮骨止痛方药物对绝经后骨质疏松症大鼠血清 Sclerostin 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 Sclerostin 含量明显升高 ($P < 0.01$),有显著差异;与模型组比较,壮骨止痛方高剂量给药组和雌二醇阳性药组大鼠血清中 Sclerostin 含量明显下降 ($P < 0.01$),壮骨止痛方低剂量给药组血清中 Sclerostin 含量显著下降 ($P < 0.05$),提示壮骨止痛方药物对降低绝经后骨质疏松症大鼠血清 SOST 含量有较好作用。见表 2。

表 1 各组大鼠血清中 β - catenin 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β - catenin/(pg/ml)
假手术组	10	227.39 \pm 35.10
模型组	9	117.80 \pm 25.9 ^{##}
壮骨止痛方高剂量组	10	166.76 \pm 17.43 [*]
壮骨止痛方低剂量组	9	148.20 \pm 23.08 [*]
雌二醇阳性药组	10	185.17 \pm 36.57 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠血清中 Sclerostin 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Sclerostin/(pg/ml)
假手术组	10	218.38 \pm 23.69
模型组	9	321.02 \pm 25.76 ^{##}
壮骨止痛方高剂量组	10	268.20 \pm 20.97 ^{**}
壮骨止痛方低剂量组	9	284.40 \pm 29.69 [*]
雌二醇阳性药组	10	248.84 \pm 23.3 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

壮骨止痛方由补骨脂、淫羊藿、枸杞、党参、白术、芍药、骨碎补、丹参、甘草等九味药物组成,方中补骨脂、淫羊藿补肾气,温肾阳,善治腰脚疼痛之疾,淫羊藿又能“壮腰膝,通经络”,为君药;党参、白术益气健脾,补益后天,为肝肾提供生化之源;枸杞在《景岳全书·本草正》中云其“味重而纯,故能补阴,阴中有阳,故能补气……其功则明耳目,添精益髓,健骨强筋”,以上共为臣药;芍药、甘草组合,为芍药甘草汤,《伤寒论》云其具有“脚挛急”,可以治疗、缓解骨质疏松疼痛症状,为佐药;丹参,不仅能补肝血以强筋骨,尚能在滋腻之群中轻疏灵动,通调经脉而活血祛瘀,兼有“调血”之职,为使药。总之,壮骨止痛方既着重补肾气、温肾阳,又兼顾滋补肝肾阴精,以冀阳中求阴,阴中求阳,阴阳互生,加用丹参等通经活络之品,标本兼顾,补而不滞,是该方具有补益肝肾、壮骨止痛之功,为治疗骨质疏松症的良药。

现代研究证实,Wnt 信号通路有 3 条,其中之一经典信号通路即 Wnt/ β - catenin 信号对骨生物学显得尤为重要^[7-8],其通过多种途径增加骨量,包括更

抑制成骨细胞和骨细胞凋亡等。Wnt/ β -catenin 信号通路作用的关键分子是血清 β -catenin (β -catenin), 它和骨骼的发育联系密切; Hu^[9] 等人报道了 β -catenin 通路在骨生成中的重要性, 评估了 β -catenin 基因敲除的小鼠的骨发育; 证明了 β -catenin 信号对成骨细胞完成分化过程是必要的。Hill 等人^[10] 利用小鼠模型研究 β -catenin 在肢体和头间质中的作用, 发现 β -catenin 在成骨细胞分化的早期也是必需的。本次实验表明, 在模型组大鼠组中, 因为成功复制了雌鼠骨质疏松的模型, 与假手术组相比, 模型组大鼠血清 β -catenin 含量的明显下降, 但是通过壮骨止痛方药物的干预, 尤其是高剂量组的药物, 大鼠血清中 β -catenin 的含量明显升高, 与模型组比较 $P < 0.05$, 有显著的疗效, 说明壮骨止痛方药物可以有效提升雌鼠骨质疏松症的血清 β -catenin 的含量, 从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而达到治疗骨质疏松症的临床作用。

骨硬化蛋白 (Sclerostin), 又称硬骨素, 是近年来发现的一种由基因编码、骨源性细胞分泌的具有抑制骨形成作用的糖蛋白, 已有研究显示, 在很多疾病中骨硬化蛋白水平高于正常人, 如固定导致的骨质疏松、血液透析、类风湿关节炎、原发性甲状腺功能亢进等。Huang QY 等人研究表明, 绝经后女性骨硬化蛋白水平高于绝经前女性^[11]。因此提示骨硬化蛋白具有抑制骨形成的作用。本次实验表明, 与假手术组相比较, 模型组大鼠的 Sclerostin 的水平明显升高, 说明造模骨质疏松大鼠的骨质在骨硬化蛋白的作用下发生变化, 但是经过壮骨止痛方药物 (特别是高剂量组) 干预后, Sclerostin 的水平明显下降, $P < 0.01$, 从而说

明壮骨止痛方能够降低 Sclerostin 水平的表达, 达到预防治疗骨质疏松的作用。

总之, 壮骨止痛方可以抑制大鼠血清 Sclerostin 水平的表达、提高大鼠血清 β -catenin 水平的表达, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 达到干预骨质疏松症的作用。

参考文献

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京: 科技出版社, 1998: 142.
- [2] 杨 军, 张小莉, 刘仕杰, 等. 齐墩果酸对去卵巢骨质疏松症雌鼠的疗效及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1564-1566.
- [3] 刘仕杰, 莫新民, 李劲平, 等. 淫羊藿苷对去卵巢骨质疏松症雌鼠的疗效及机理初步研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(3): 271-272.
- [4] 杨 军, 张小莉, 莫新民. 基于蛋白质组学壮骨止痛方治疗骨质疏松症的作用机理研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 817-820.
- [5] 莫新民, 曾 英, 洪 净. 去卵巢后雌鼠骨质疏松症模型相关局部因子检测[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(4): 37-38.
- [6] 李素萍. 骨质疏松动物模型的研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3767-3770.
- [7] Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J]. Gene, 2004, 341: 19-39.
- [8] Rawadi Q, Roman S, Roman S. Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2005, (5): 1063-1077.
- [9] Hu H, Hilton MJ, Tu X, et al. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development[J]. Development, 2005, 132(1): 49-60.
- [10] Hill TP, Spater D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes[J]. Dev Cell, 2005, 8(5): 727-38.
- [11] Huang QY, GHY, Kung, AWC. The -9247 T/C Polymorphism in the SOST upstream regulator region that potentially affects GEBP α and FOXA1 binding is associated with osteoporosis[J]. Bone, 2009, 45(2): 289-94.

中医文化

中草药的文化张力(二)

茴香, 别名“怀香”。味辛, 性温, 能开胃进食、理气散寒。常常被用来作为依恋的亲人、多情的土地、不改的乡音之同义语。《西游记》第三十六回, 唐僧以中药名抒发情怀、表达心境, 其中有“茴香何日拜朝廷”之句。

丹棘, 又名“忘忧草”。味甘, 性凉, 能清热利尿、凉血止痛、健胃消食, 民间有“欲忘人之忧, 则赠以丹棘”之说。相传秦朝末年, 农民起义领袖陈胜家境贫寒, 又身患疾病, 时常乞食度日。一老妇不时送上萱草给陈胜充饥, 久之, 陈胜病愈, 身体也强壮起来, 忧愁顿减。后来, 陈胜将萱草称之为忘忧草。丹棘的象征性意义是忘忧无愁, 心绪舒畅。赠送丹棘, 与送去愉悦有异曲同工之妙。

青裳, 也称“合欢”。味甘, 性平, 能安神、活血、消肿止痛。“欲蠲人之忿, 则赠之青裳, 合欢则忘忿。”传说, 曾有一秀才用合欢花治愈员外女儿的相思病, 最终赢得芳心, 娶得佳丽归。合欢树叶昼开夜合, 相依相偎, 被衍化成为“爱情忠贞不渝”“合家欢乐”之意。

百合, 又叫“家百合”。味甘, 性微寒, 归心、肺经, 能养阴润肺、清心安神。它象征着纯洁爱情、百年好合, 有“云裳仙子”之誉, 已经成为婚礼上表达美好情感的常备之物。

柳枝, 另称“杨柳条”。味苦, 性寒, 入足阳明、厥阴经, 能祛风利尿、止痛消肿。古时候, 折柳送别是一种非常普遍的文化习俗, 蕴含挽留、惜别、怀远之意。

(摘自《中国中医药报》)