

## 二至丸提取物干预去势骨质疏松雌性模型大鼠的骨重建特点

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2975>

李平, 林煜, 陈翔, 刘振涛, 肖莉莉, 林学义, 华鹏

2095-4344.2975

投稿日期: 2019-11-21

送审日期: 2019-12-16

采用日期: 2020-03-13

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R453; R362; R364

文章编号:

2095-4344(2021)02-00191-05

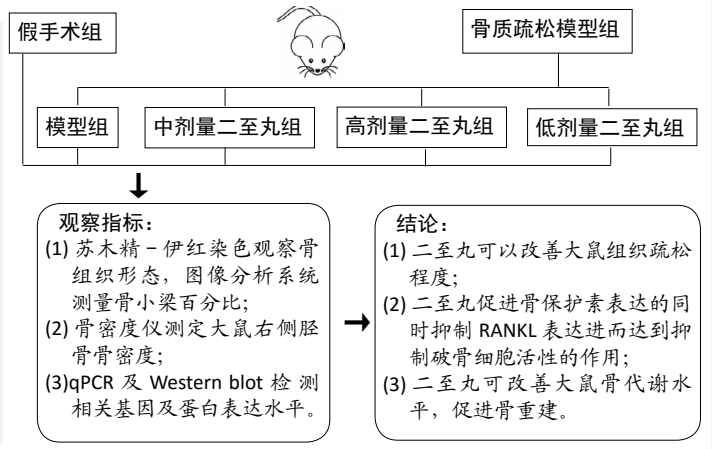
文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

△实验以去势雌性SD大鼠为实验对象,在二至丸醇提液干预下,观察骨小梁、骨密度、骨保护素、RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶和骨钙素等指标的表达变化;

△二至丸醇提物改善了去势大鼠高转化型骨质疏松状态,促进骨保护素表达的同时抑制RANKL表达进而达到抑制破骨细胞活性的作用,最终起到改善去势大鼠骨质量的目的。



## 文题释义:

二至丸: 明代名医王三才在其著作《医便》中第一次记载了补益肝肾, 滋阴止血的二至丸, 该方由女贞子及墨旱莲配伍而成。

## 摘要

背景: 研究表明二至丸可改善去势大鼠的骨密度、骨影区、骨矿物质含量以及血清雌二醇水平, 但未对其可能的机制进行探讨。

目的: 二至丸干预去势骨质疏松雌性模型大鼠的骨重建特点。

方法: 建立绝经后骨质疏松症大鼠模型, 采用6, 9, 12 g/(kg·d)二至丸提取物灌胃, 灌胃每日1次。各组于术后第13周开始给药, 分别于第16, 20, 24周取材。通过苏木精-伊红染色观察骨组织形态, Motic 6.0光谱图像分析系统测量骨小梁百分比, 骨密度仪测定大鼠右侧胫骨骨密度, 采用qPCR检测第一腰椎骨组织中骨保护素、细胞核因子κB受体活化因子配体、抗酒石酸酸性磷酸酶和骨钙素 mRNA表达水平。

结果与结论: 相对同期模型大鼠, 各剂量二至丸组大鼠的骨小梁形态结构较好, 骨小梁数量、骨密度及骨组织骨保护素水平增加, 而骨钙素、细胞核因子κB受体活化因子配体、抗酒石酸酸性磷酸酶mRNA水平降低( $P < 0.05$ ), 并均呈剂量依赖性。上述数据证实, 二至丸醇提物可通过改善去势大鼠高转化型骨质疏松状态, 促进骨保护素表达, 同时抑制细胞核因子κB受体活化因子配体表达, 而发挥抑制破骨细胞活性的作用, 最终促进去势骨质疏松雌性模型大鼠的骨重建。

关键词: 二至丸; 绝经后骨质疏松症; 大鼠; 去势; 骨钙素; 骨保护素; 骨形态; 骨重建

## Characteristics of bone remodeling in female ovariectomized rat models of osteoporosis undergoing Erzhi Pill extract intervention

Li Ping, Lin Yu, Chen Xiang, Liu Zhentao, Xiao Lili, Lin Xueyi, Hua Peng

Department of Orthopedics, Fuzhou No. 2 Hospital affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Li Ping, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Fuzhou No. 2 Hospital affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

Corresponding author: Lin Yu, MD, Attending physician, Lecturer, Department of Orthopedics, Fuzhou No. 2 Hospital affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Some studies have shown that *Erzhi* Pill can improve the bone density, bone shadow area, bone mineral content and serum estradiol level of ovariectomized rats, but the possible mechanism has not been explored.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of *Erzhi* Pill on bone remodeling in an ovariectomized rat model of osteoporosis.

**METHODS:** A rat model of post-menopausal osteoporosis was established, and the extracts of *Erzhi* Pills of 6, 9, and 12 g/kg per day were administered intragastrically. Administration in each group began at the 13<sup>th</sup> week after surgery, and the samples were taken at 16, 20, and 24 weeks after surgery. The bone tissue morphology was observed by hematoxylin-eosin staining, the percentage of trabecular bone was measured by Motic 6.0 system, and the bone density of the rat right tibial bone was detected by a bone densitometer. Expressions of osteoprotegerin, nuclear factor κB receptor activating factor ligand (RANKL), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and osteocalcin mRNAs in the first lumbar vertebrae were detected by qPCR.

厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007

第一作者: 李平, 男, 1974年生, 汉族, 副主任医师。

通讯作者: 林煜, 博士, 主治医师, 讲师, 厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建省福州市 350007

<https://orcid.org/0000-0002-8957-4777> (李平)

基金资助: 福建省自然科学基金(2017J01332), 项目负责人: 林煜

引用本文: 李平, 林煜, 陈翔, 刘振涛, 肖莉莉, 林学义, 华鹏. 二至丸提取物干预去势骨质疏松雌性模型大鼠的骨重建特点[J].

中国组织工程研究, 2021, 25(2):191-195.



**RESULTS AND CONCLUSION:** The trabecular bone had a better morphological structure, and the number of trabeculae, bone miner density, and bone tissue osteoprotegerin level were significantly increased in a dose-dependent manner after treatment with *Erzhi* Pill, whereas the mRNA levels of RANKL and TRAP decreased in a dose-dependent manner after treatment with *Erzhi* Pill ( $P < 0.05$ ). Therefore, the alcohol extract of *Erzhi* Pill can improve the status of high-transformation osteoporosis in ovariectomized rats, promote the expression of osteoprotegerin and inhibit the expression of RANKL, so as to inhibit the activity of osteoclasts and ultimately improve the bone remodeling in female osteoporotic rats.

**Key words:** *Erzhi* Pills; postmenopausal osteoporosis; rat; castration; osteocalcin; osteoprotegerin; bone morphology; bone remodeling

**Funding:** the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2017J01332 (to LY)

**How to cite this article:** LI P, LIN Y, CHEN X, LIU ZT, XIAO LL, LIN XY, HUA P. Characteristics of bone remodeling in female ovariectomized rat models of osteoporosis undergoing *Erzhi* Pill extract intervention. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):191-195.

## 0 引言 Introduction

当前骨质疏松症已成为全球人口所要面临的重要健康问题,世界拥有庞大的骨质疏松症群体,全球每年因骨质疏松并发骨折的人数达到 900 万人,而至 2050 年骨折发生率会增加至 240%–310%<sup>[1-2]</sup>,而绝经后骨质疏松症患者又在其中占据 75% 左右<sup>[3]</sup>。有统计显示:至 2016 年中国绝经后骨质疏松症在老年人口中的患病率高达 36%<sup>[4]</sup>。已知当成骨细胞功能不断减低并且破骨细胞功能持续增强,骨吸收速率超过骨形成速率便导致骨量流失,因此骨重建和骨塑建是 2 个既对立又统一的过程,如何保持一定程度的骨稳态是防治骨质疏松的重要问题。目前认为绝经后雌激素下降导致的破骨细胞分化大于成骨细胞的分化,致使骨稳态被破坏,是导致绝经后骨质疏松发生的重要因素<sup>[5]</sup>。而破骨细胞的分化受到多种细胞因子和机体自身分泌激素的调控。研究证实集落抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acidphosphatase, TRACP)、细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANK ligand, RANKL)为破骨细胞分化所必需的细胞因子。RANKL 与破骨细胞膜上受体 RANK 结合,激活下游信号分子调控破骨细胞的分化<sup>[6-7]</sup>。此外,成骨细胞的活化因子骨保护素和骨钙素也参与破骨细胞分化的调控<sup>[8-10]</sup>。因此,探索成骨细胞和破骨细胞在骨质疏松的作用机制,对建立骨质疏松症临床治疗策略至关重要。

明代名医王三才在其著作《医便》中首次记载了补益肝肾、滋阴止血的二至丸,该方由女贞子及墨旱莲配伍而成。二至丸中的女贞子及墨旱莲主要含有黄酮类、萜类及苯醇类等成分以及挥发油和甾体类物质,可以发挥类雌激素的作用<sup>[11-13]</sup>。课题组以往相关实验发现,二至丸可改善去势大鼠的骨密度、骨影区、骨矿物质含量及血清雌二醇水平<sup>[14-16]</sup>。因此文章旨在以去势雌性 SD 大鼠为实验对象,在二至丸醇提液干预下,通过形态学及 qPCR 等相关技术方法,检测骨小梁、骨密度、骨保护素、RANKL、TRACP 和骨钙素等指标的表达变化,从 RANKL/RANK/骨保护素系统角度进一步探求二至丸对去势大鼠骨代谢水平影响,进而探究二至丸有效成分发挥作用的可能机制,为探寻绝经后骨质疏松症的中药治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于 2017 年 3 月至 2018 年 6 月在福建中医药大学实验实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 从上海斯莱克实验动物有限责任公司购置健康 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 150 只,体质量(300±20) g,

许可证号: SCXK(沪)2012-0002。所有大鼠在福建中医药大学动物实验中心鼠类实验室进行饲养和灌胃等实验操作。实验方案经厦门大学附属福州第二医院实验伦理委员会批准,批准号: 201605021。

1.3.2 药物 二至丸根据《中国药典》中的药物剂量<sup>[14]</sup>,通过体表面积计算方法估算实验动物的用量。女贞子及墨旱莲饮片购于福建中医药大学国医堂,由福建中医药大学附属第二人民医院药剂科制备。

**药物制备方法:** 将墨旱莲和女贞子等剂量混合,通过体积分数 75% 乙醇对生药回流提取 3 次,提取时间为 2 h/次,随后将醇提物浓缩干燥备用。

1.4 实验方法

1.4.1 分组、造模、灌胃及取材

**分组:** 将 SD 大鼠 150 只随机分成假手术组 30 只和去势组 120 只,去势组再随机分成模型组、低剂量二至丸组、中剂量二至丸组及高剂量二至丸组,每组 30 只。

**造模:** 用体积分数 2% 戊巴比妥钠进行麻醉。其中去势组大鼠于麻醉后,取腹部正中切口,寻找双侧卵巢予以结扎切除,术毕予以切口缝合,擦拭切口周围血迹<sup>[8]</sup>。假手术组除未切除卵巢外其他操作步骤同去势组。造模成功评价标准:去势组骨密度呈现不同程度的降低,胫骨近端骨小梁数量逐渐减少,排布疏散,出现骨小梁断裂,且骨小梁孔隙变大即为造模成功。

组织工程实验动物造模过程的相关问题:

造模目的	观察二至丸干预去势骨质疏松雌性模型大鼠的骨重建的影响
选择动物的条件	① SD 大鼠 150 只; ② 鼠龄 6 个月; ③ 体质量(300±20) g; ④ 雌性
模型与所研究疾病的关系	骨密度、骨影区、骨矿物质含量以及血清雌二醇水平
动物来源及品系	SD 大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供
造模技术描述	大鼠于麻醉后,取腹部正中切口,寻找双侧卵巢予以结扎切除,建立大鼠绝经后骨质疏松症模型
动物数量及分组方法	SD 大鼠 150 只随机分成假手术组 30 只和去势组 120 只,去势组再随机分成模型组、低剂量二至丸组、中剂量二至丸组及高剂量二至丸组,每组 30 只
造模后观察指标	① 左侧胫骨苏木精-伊红染色观察; ② 右侧胫骨骨密度; ③ qRT-PCR 检测大鼠第一腰椎骨组织中骨保护素、RANKL、TRACP 和骨钙素 mRNA 表达
造模后动物处理	分别于灌胃后第 16, 20, 24 周各组随机取 10 只大鼠,麻醉后取血清、腰椎和胫骨作指标检测
伦理委员会批准	实验方案经厦门大学附属福州第二医院动物实验伦理委员会批准(批准号: 201605021)

**灌胃:** 药物灌胃剂量根据人和动物体表面积折算的等效剂量换算, 并根据每周称重结果修改灌胃剂量。低、中、高剂量二至丸组: 给予二至丸醇提物 6, 9, 12 g/(kg·d) 灌胃。各剂量二至丸组药物均溶解于生理盐水 2 mL 后灌胃。假手术组及模型组均用 2 mL 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 持续 12 周。

**取材:** 分别于灌胃后第 16, 20, 24 周各组随机取 10 只大鼠, 麻醉后取血清、腰椎和胫骨作指标检测。所有大鼠均饲养于 SPF 级学校动物实验中心, 每 5 只 1 组饲养于鼠笼。

**1.4.2 骨组织形态学检测** 取材后的左侧胫骨通过脱钙处理后进行苏木精-伊红染色, 并对骨组织形态学进行观察分析。通过 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统, 选取苏木精-伊红染色切片中骨骺线下方 4 mm 范围内骨松质区域进行计算, 并统计骨小梁面积百分比 [骨小梁面积百分比 = 测量框内骨小梁面积 / 测量框总面积] × 100%]。

**1.4.3 骨密度测定** 通过双能 X 射线 4 500 W 骨密度仪 (美国 Hologic 公司) 检测取材后大鼠右侧胫骨骨密度。

**1.4.4 qPCR 法检测骨代谢指标** 将取材后的大鼠第一腰椎通过液氮研磨, Trizol 法提取 RNA, qPCR 法检测其中骨保护素、RANKL、TRACP 和骨钙素 mRNA 的表达。用 1 μg RNA 液体按照试剂盒组分比例置于冰上配制 RT 反应液 (20 μL 反应体系): Total RNA 1 μg/ 浓度, 5×PrimeScript™ Buffer (for Real Time) 6 μL, Oligo dT Primer 1.5 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 1.5 μL, 最后将 DEPC 水配至 20 μL, 在 9600DNA 扩增仪美国 PE 公司上按试剂盒说明书进行反转录反应, 后所得的 cDNA 置于 -20 °C 冰箱中储存备用。PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成, 见表 1。q-PCR 步骤按照大连宝生公司 SYBR Premix Ex Taq™ PCR Kit 步骤行进操作, 各目的基因的表达量用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算得出结果。

**1.5 主要观察指标** 各组 qPCR 法检测骨代谢指标 mRNA 表达、骨密度及骨组织形态学变化。

**1.6 统计学分析** 实验数据用 SPSS 22.0 软件分析, 所有数据均进行正态性分布检验和方差齐性检验, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据比较采取单因素方差分析和 LSD 检验,  $P < 0.05$  差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用 SD 大鼠 150 只, 实验过程中各组均无脱失, 全部进入结果分析。

**2.2 各组骨密度变化** 与同期假手术组对比, 去势组骨密度呈现不同程度的降低, 其中各期模型组及灌胃 24 周低剂量二至丸组骨密度下降程度最大 ( $P < 0.05$ )。组间比较显示, 与同期模型组比较, 各二至丸用药物组骨密度均有不同程度升高, 其中以中、高剂量二至丸组升高程度最大 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

**2.3 各组骨形态学检测结果变化** 胫骨近端骨组织采用苏木精-伊红染色后骨小梁呈现粉红色, 骨髓细胞呈现蓝紫色。假手术组: 各期骨小梁形态完整, 排布均匀、致密。模型组: 时随着手术后间, 模型组骨小梁数量逐渐减少, 排布疏松, 出现骨小梁断裂, 且骨小梁孔隙变大。与模型组对比, 同期各剂量二至丸组骨小梁数量有所增多, 且相对完整, 但均不

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
骨钙素	正义: TGA CAC CCT AGT GCA ACA G 反义: CGG AGT CCT TTC AGT CTT AC	204
TRACP	正义: CCT CTG AGC GCC ATC AGC TA 反义: TAT GCC GAC ACA CGA ACG CT	231
RANKL	正义: TGG AGA GCG AAG ACA CAG A 反义: CAA CCT TAC CCT TAG AGA CC	195
GAPDH	正义: GCG ACT GTC ACG GAT GCG ACT 反义: ATA GTC ATC GAT ACG CGA GCA	189

表注: TRACP: 集落抗酒石酸酸性磷酸酶; RANKL: 细胞核因子 κB 受体活化因子配体

表 2 | 各组胫骨近端骨密度

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ , g/cm<sup>3</sup>)

Table 2 | Bone mineral density of the proximal tibia in each group

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	0.228±0.023 <sup>a</sup>	0.230±0.013 <sup>a</sup>	0.231±0.019 <sup>ac</sup>
模型组	0.208±0.021 <sup>b</sup>	0.203±0.018 <sup>b</sup>	0.198±0.012 <sup>bde</sup>
低剂量二至丸组	0.211±0.021	0.213±0.016	0.213±0.010
中剂量二至丸组	0.212±0.017	0.215±0.022	0.217±0.012 <sup>ab</sup>
高剂量二至丸组	0.215±0.019	0.219±0.011	0.220±0.016 <sup>ab</sup>

表注: 与同期模型组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同期假手术组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同期低剂量二至丸组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同期中剂量二至丸组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与同期高剂量二至丸组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$

表 3 | 胫骨近端骨小梁面积比

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ , %)

Table 3 | Area ratio of proximal tibial trabecular bone

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	31.53±1.23 <sup>acde</sup>	31.66±0.45 <sup>acde</sup>	31.97±1.33 <sup>acde</sup>
模型组	15.22±0.41 <sup>bde</sup>	15.03±1.37 <sup>bde</sup>	14.79±0.52 <sup>bde</sup>
低剂量二至丸组	16.09±0.74 <sup>bde</sup>	16.85±0.81 <sup>be</sup>	17.42±1.47 <sup>abde</sup>
中剂量二至丸组	18.95±0.98 <sup>abc</sup>	19.32±1.18 <sup>ab</sup>	19.88±0.9 <sup>abc</sup>
高剂量二至丸组	19.71±0.45 <sup>abcde</sup>	20.30±1.75 <sup>abc</sup>	21.13±0.56 <sup>abc</sup>

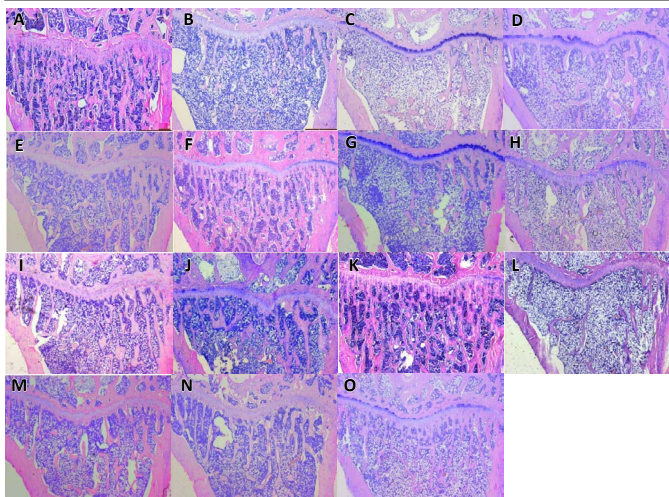
表注: 与同期模型组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同期假手术组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同期低剂量二至丸组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同期中剂量二至丸组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与同期高剂量二至丸组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$

及假手术组, 见图 1 及表 3。

骨小梁百分比结果显示, 各去势组骨小梁百分比与假手术组对比呈现不同程度减少 ( $P < 0.05$ )。组间比较显示, 与同期模型组对比, 各剂量二至丸组均有不同程度升高, 其中除灌胃 16, 20 周低剂量二至丸组外, 其他各组结果均升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

**2.4 各组骨代谢指标 mRNA 的表达** qPCR 检测结果发现, 与同期假手术组对比, 各去势组骨保护素 mRNA 均呈现不同程度下降 ( $P < 0.05$ )。与同期的模型组比较显示, 各剂量二至丸组骨保护素 mRNA 水平有升高, 除灌胃 16 周低剂量二至丸组外均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 同期各剂量二至丸组比较显示, 随着二至丸药物浓度的增加大鼠骨保护素 mRNA 也随之升高, 其中高剂量二至丸组与低、中剂量二至丸组比升高最为明显 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

与同期假手术组对比, 各去势组 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 水平均呈现不同程度提高 ( $P < 0.05$ )。与同期的模型组对比显示, 各剂量二至丸组 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 水平均有不同程度下降 ( $P < 0.05$ ); 同期各剂量二至丸组对比显示, 随着二至丸药物浓度的增加大鼠 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 也呈现不同程度降低, 见表 5-7。



图注：图 A-E 为灌胃后 16 周假手术组、模型组及低、中、高剂量二至丸组胫骨组织形态；F-J 为灌胃后 20 周假手术组、模型组及低、中、高剂量二至丸组胫骨组织形态；K-O 为灌胃后 24 周假手术组、模型组及低、中、高剂量二至丸组胫骨组织形态

图 1 | 各组近端骨小梁组织变化 (苏木精 - 伊红染色,  $\times 40$ )

Figure 1 | Changes of proximal trabecular bone tissues in each group (hematoxylin-eosin staining,  $\times 40$ )

表 4 | 二至丸骨保护素 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Table 4 | Osteoprotegerin mRNA expression after treatment with Erzhi Pills

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	1.382±0.013 <sup>acde</sup>	1.412±0.015 <sup>acde</sup>	1.462±0.012 <sup>acde</sup>
模型组	1 <sup>be</sup>	0.985±0.014 <sup>bce</sup>	0.985±0.014 <sup>bce</sup>
低剂量二至丸组	1.013±0.026 <sup>be</sup>	1.032±0.011 <sup>abde</sup>	1.115±0.023 <sup>abe</sup>
中剂量二至丸组	1.021±0.018 <sup>abe</sup>	1.107±0.017 <sup>abce</sup>	1.116±0.014 <sup>abe</sup>
高剂量二至丸组	1.055±0.016 <sup>abcd</sup>	1.127±0.012 <sup>abcd</sup>	1.204±0.011 <sup>abcd</sup>

表注：与同期模型组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与同期假手术组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与同期低剂量二至丸组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与同期中剂量二至丸组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与同期高剂量二至丸组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论 Discussion

骨稳态是指破骨细胞和成骨细胞的功能和活性处于平衡的状态，而人体的骨骼代谢是一个动态的过程，当骨骼损伤时，通过骨形成和骨吸收来重建骨骼，以确保机体结构的完整性及骨骼质量的平衡<sup>[16-18]</sup>。绝经后骨质疏松症是目前中老年女患者常见性疾病，其主要原因是由于绝经后雌激素水平突然降低引起骨代谢紊乱最终导致骨吸收速率超过骨形成速率，破坏了骨稳态。

目前骨保护素/RANKL/RANK 系统是已发现的能同时调控成骨细胞和破骨细胞分化过程的重要通路，对维持骨稳态起到重要作用<sup>[13]</sup>。骨保护素及 RANKL 均可由成骨细胞表达，其中 RANKL 可与 RANK 结合，进而促进破骨细胞活性，加强骨吸收，抑制破骨细胞凋亡，而骨保护素可阻断 RANKL 的上述作用。一般情况下人体的骨重建处于平衡状态，骨保护素与 RANKL 在此过程中就扮演杠杆作用。而雌激素可刺激机体对骨保护素的表达，当绝经后骨质疏松症发生时，人体雌激素明显下降，因而骨保护素随之减少，骨保护素与 RANKL 的比值发生明显改变，最终导致破骨细胞活性及骨吸收的增强。另外，TRACP 是由破骨细胞分泌，能够特异性地反映破骨细胞活性，是辅助评价绝经后骨质疏松症的指标之一。骨钙素

表 5 | 二至丸干预后各组大鼠 RANKL mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Table 5 | RANKL mRNA expression in rats after treatment with Erzhi Pills

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	0.635±0.015 <sup>acde</sup>	0.625±0.017 <sup>acde</sup>	0.633±0.021 <sup>acde</sup>
模型组	1 <sup>bde</sup>	0.985±0.014 <sup>bde</sup>	1.004±0.012 <sup>bde</sup>
低剂量二至丸组	0.938±0.016 <sup>abe</sup>	0.911±0.021 <sup>abe</sup>	0.895±0.019 <sup>ade</sup>
中剂量二至丸组	0.927±0.018 <sup>ab</sup>	0.907±0.009 <sup>ac</sup>	0.865±0.013 <sup>a</sup>
高剂量二至丸组	0.912±0.019 <sup>abc</sup>	0.882±0.016 <sup>abcd</sup>	0.854±0.011 <sup>abc</sup>

表注：与同期模型组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与同期假手术组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与同期低剂量二至丸组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与同期中剂量二至丸组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与同期高剂量二至丸组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$

表 6 | 二至丸干预后各组大鼠 TRACP mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Table 6 | TRACP mRNA expression in rats after treatment with Erzhi Pills

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	0.772±0.020 <sup>acde</sup>	0.783±0.016 <sup>acde</sup>	0.779±0.025 <sup>acde</sup>
模型组	1 <sup>bde</sup>	1.085±0.020 <sup>bce</sup>	1.074±0.016 <sup>bde</sup>
低剂量二至丸组	0.912±0.012 <sup>abe</sup>	0.902±0.018 <sup>abe</sup>	0.884±0.012 <sup>ade</sup>
中剂量二至丸组	0.906±0.018 <sup>ab</sup>	0.877±0.012 <sup>ac</sup>	0.855±0.016 <sup>abc</sup>
高剂量二至丸组	0.894±0.013 <sup>abc</sup>	0.872±0.016 <sup>abcd</sup>	0.832±0.021 <sup>abc</sup>

表注：与同期模型组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与同期假手术组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与同期低剂量二至丸组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与同期中剂量二至丸组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与同期高剂量二至丸组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$

表 7 | 二至丸干预后各组大鼠骨钙素 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Table 7 | Osteocalcin mRNA expression in rats after treatment with Erzhi Pills

组别	灌胃后 16 周	灌胃后 20 周	灌胃后 24 周
假手术组	1 <sup>acde</sup>	1.012±0.015 <sup>acde</sup>	1.019±0.016 <sup>acde</sup>
模型组	1.323±0.019 <sup>bcd</sup>	1.328±0.014 <sup>bce</sup>	1.346±0.012 <sup>bde</sup>
低剂量二至丸组	1.221±0.026 <sup>abde</sup>	1.212±0.016 <sup>abe</sup>	1.205±0.015 <sup>abde</sup>
中剂量二至丸组	1.208±0.018 <sup>ab</sup>	1.187±0.017 <sup>abc</sup>	1.166±0.011 <sup>abce</sup>
高剂量二至丸组	1.127±0.011 <sup>abc</sup>	1.112±0.020 <sup>abc</sup>	1.104±0.013 <sup>abcd</sup>

表注：与同期模型组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与同期假手术组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与同期低剂量二至丸组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与同期中剂量二至丸组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与同期高剂量二至丸组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$

则由成骨细胞分泌，可很好地评价骨形成能力<sup>[19-21]</sup>。在绝经后骨质疏松症模型成立后，苏木精 - 伊红染色显示：模型组骨密度、骨小梁面积百分比与同期假手术组对比有不同程度的下降；模型组的骨小梁出现严重的破坏，呈现疏松、断裂的现象。而通过此次 qPCR 结果显示，模型组较同期假手术组骨保护素 mRNA 水平明显降低，而 RANKL、TRACP 及骨钙素 mRNA 水平均呈现不同程度提高。由于绝经后骨质疏松症表现为高转换状态<sup>[22]</sup>，其主要表现为成骨细胞与破骨细胞活性均明显提高，但成骨细胞活性任大于破骨细胞活性。结合上述的结果，可推断，由于去势大鼠机体的雌激素水平迅速下降，机体呈现出高转化型骨质疏松表现，故 RANKL、TRACP 及骨钙素 mRNA 水平出现明显升高，而骨保护素 mRNA 水平未见明显升高考虑是由于雌激素水平的急剧下降引起的。

具有补益肝肾、滋阴止血功效的二至丸，该方由女贞子及墨旱莲配伍而成，该方主治因绝经后“天癸竭”“肝肾阴虚”引起的腰细酸软、骨萎。而现代药理研究显示：构成二至丸的女贞子及墨旱莲含有酪醇和鞣酸等有效成分<sup>[23]</sup>，而这些成分可以促进维生素 D3 生成，进而加强钙的摄取，降低钙的排泄，增强骨骼的密度<sup>[24-25]</sup>。二至丸含有的萜类可抑制破骨细胞样多核细胞的生成，同时激活骨保护素和骨钙

素, 并刺激成骨细胞使其分化与成熟<sup>[26-28]</sup>, 其含有的黄酮类化合物与雌二醇的结构类似, 可发挥类似雌激素样功能<sup>[29]</sup>。通过课题实验发现, 模型组骨密度及骨小梁面积百分比与同期假手术组对比有不同程度的下降; 苏木精-伊红染色显示, 模型组的骨小梁出现严重的破坏, 呈现疏松、断裂的现象。与同期模型组比较显示, 各剂量二至丸组骨密度、骨小梁面积百分比均呈现不同程度提高, 尤以中、高剂量二至丸组改善最为明显; 苏木精-伊红染色结果显示, 与同期模型组比较, 各剂量二至丸组骨小梁形态相对完整, 断裂、不连续现象有所改善。目前形态学及骨密度检测是评价骨质疏松最有效的指标, 因此根据实验结果可明确二至丸醇提物能有效改善去势大鼠骨质疏松状态。另一方面, 与同期模型组比较, 各剂量二至丸组骨保护素 mRNA 水平均有明显升高, 且随着二至丸浓度的升高骨保护素 mRNA 水平也随之升高; 同时各剂量二至丸组 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 水平则呈现不同程度的降低, 且也随着二至丸浓度的升高 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 水平出现下降。结合上述实验结果可推断, 二至丸醇提物可能通过类雌激素的有效成分改善去势大鼠低雌激素水平的状态, 继而促进骨保护素 mRNA 水平的升高, 而 RANKL, TRACP 及骨钙素 mRNA 水平则表明成骨细胞与破骨细胞活性得到抑制, 说明二至丸醇提物能有效改善去势大鼠高转化型骨质疏松状态。

综上所述, 二至丸醇提物可通过改善去势大鼠高转化型骨质疏松状态, 促进骨保护素表达的同时抑制 RANKL 表达进而达到抑制破骨细胞活性的作用, 最终起到改善去势大鼠骨质量的目的。

**作者贡献:** 实验设计及评估为第一作者和通讯作者。实验实施为全部作者。资料收集为第一、四作者。

**经费支持:** 该文章接受了“福建省自然科学基金(2017J01332)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经厦门大学附属福州第二医院实验伦理委员会批准, 批准号: 201605021。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过厦门大学附属福州第二医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] CURTIS EM, MOON RJ, HARVEY NC, et al. Reprint of: the impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. *Bone*. 2017;104:29-38.
- [2] BORRELLI J. Taking control: the osteoporosis epidemic. *Injury*. 2012; 43(8):1235-1236.
- [3] BALLANE G, CAULEY JA, LUCKEY MM, et al. Secular trends in hip fractures worldwide: opposing trends East versus West. *J Bone Miner Res*. 2014;29(8):1745-1755.

- [4] CHEN P, LI Z, HU Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review. *BMC Public Health*. 2016;16(1):1039.
- [5] MARINI F, CIANFEROTTI L, BRANDI ML. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: can they drive therapeutic choices? *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1329.
- [6] CHEN K, YUAN Y, WANG Z, et al. Helvolic acid attenuates osteoclast formation and function via suppressing RANKL-induced NFATc1 activation. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):6477-6488.
- [7] KIM B, LEE KY, PARK B. Icarin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF-kappaB/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells. *Phytomedicine*. 2018;51:181-190.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部):2010年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:351-352.
- [9] 黄新苹, 王武朝. 中药女贞子的化学成分研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(1):47-51.
- [10] 林雄浩, 吴锦忠. 中药复方二至丸的化学成分及抗骨质疏松研究进展[J]. 解放军药学报, 2009, 25(5):421-424.
- [11] IKEDA Y, YONEMITSU I, TAKEI M, et al. Mechanical loading leads to osteoarthritis-like changes in the hypofunctional temporomandibular joint in rats. *Arch Oral Biol*. 2014;59(12):1368-1376.
- [12] WOLSKI H, DREWS K, BOGACZ A, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis. *Ginekol Polska*. 2016;87(5):347-352.
- [13] SUN X, WEI B, PENG ZH, et al. Protective effects of Dipsacus asper polysaccharide on osteoporosis in vivo by regulating RANKL/RANK/OPG/VEGF and PI3K/Akt/eNOS pathway. *Int J Biol macromol*. 2019;129(15):579-587.
- [14] 李冠慧, 黄明芳, 李西海, 等. 基于肾主骨生髓探讨骨髓基质干细胞与绝经后骨质疏松肾虚证的关系[J]. 中国老年学, 2016, 36(15): 3846-3848.
- [15] 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展[J]. 药物评价研究, 2014, 37(6):566-571.
- [16] ZHANG Y, LAI WP, LEUNG PC, et al. Effects of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(2):291-296.
- [17] CROCKETT JC, ROGERS MJ, COXON FP, et al. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(7):991-998.
- [18] MATSUO K, OTAKI N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adh Migr*. 2012;30:148-156.
- [19] GOSSIEL F, PAGGIOSI MA, NAYLOR KE, et al. The effect of bisphosphonates on bone turnover and bone balance in postmenopausal women with osteoporosis: the T-score bone marker approach in the TRIO study. *Bone*. 2020;131:115158.
- [20] SAMPSON TG. Arthroscopic treatment for chondral lesions of the hip. *Clin Sports Med*. 2011;30(2):331-348.
- [21] LI XL, LIU DQ, LI J, et al. Wnt3a involved in the mechanical loading on improvement of bone remodeling and angiogenesis in a postmenopausal osteoporosis mouse model. *FASEB J*. 2019;33(8): 8913-8924.
- [22] ZHOU L, LIU Q, YANG M, et al. Dihydroartemisinin, an anti-malaria drug, suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis, osteoclast formation, and RANKL-induced signaling pathways. *J Bone Miner Res*. 2016;31(5):964-974.
- [23] 陈楠, 李晓莉, 张岩. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松作用及途径研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(8):1057-1060.
- [24] 李晓曦, 陈宇恒, 唐秀凤, 等. 基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, (9):1-6, 10.
- [25] FELLAH F, DJENIDI R, CHEBOUT I. Protective effect of sphaerococcus coronopifolius crude extract in combination with bacillus calmette-guerin on ligature-induced depression in female wistar rats. *Psychiatry Investig*. 2020;17(2):130-139.
- [26] SONG DZ, CAO Z, HUANG S, et al. Achyranthes bidentata polysaccharide suppresses osteoclastogenesis and bone resorption via inhibiting RANKL signaling. *J Cell Biochem*. 2018;18:266-282.
- [27] ZHANG Y, LI J X, ZHAO J, et al. Synthesis and activity of oleanolic acid derivatives, a novel class of inhibitors of osteoclast formation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(6):1629-1632.
- [28] MENG YQ, KUIAI ZY, ZHAN SW, et al. Design, synthesis, and antitumor activity of oleanolic acid derivatives. *J Asian Nat Prod Res*. 2018;21(7): 633-651.
- [29] 肖宗崇. 二至丸配方颗粒汤剂与其传统汤剂化学成分及药效学比较研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.