

左归丸干预卵巢摘除骨质疏松模型小鼠骨形态发生蛋白 2 信号通路的变化

<https://doi.org/10.12307/2022.220>李微¹, 朱汉民², 王鑫¹, 高雪¹, 崔婧¹, 刘雨昕¹, 黄树明³

投稿日期: 2021-03-26

送审日期: 2021-04-01

采用日期: 2021-05-16

在线日期: 2021-08-10

中图分类号:

R459.9; R318; R713

文章编号:

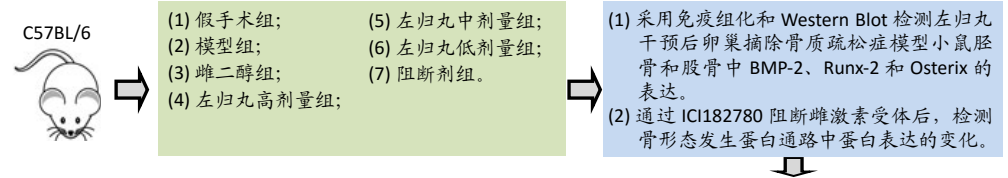
2095-4344(2022)08-01173-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章亮点—

△通过经典的双侧卵巢摘除法建立绝经后骨质疏松症小鼠模型, 选用左归丸进行干预治疗, 观察左归丸对快速代谢型绝经后骨质疏松症模型小鼠雌激素受体表达的影响;
△进而观察雌激素受体对骨代谢途径中骨形态发生蛋白 2(BMP-2)/Runx-2/Osterix 信号通路的影响, 为“肾主骨”机制研究提供实验数据支持。



结论:

- (1) 左归丸可以明显提高小鼠胫骨中 BMP-2、Runx-2 的表达;
- (2) 左归丸可以明显提高小鼠股骨中 BMP-2、Runx-2 及 Osterix 的表达;
- (3) ICI182780 干预后, 阻断了左归丸干预小鼠 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 蛋白表达增加的作用;
- (4) 左归丸可以通过雌激素受体激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路进而参与骨代谢过程, 实现骨保护的作用。

文题释义:

骨质疏松: 是由于多种原因导致的骨密度和骨质量下降, 骨微结构破坏, 造成骨脆性增加, 从而容易发生骨折的全身性骨病。此文涉及的骨质疏松是由于卵巢摘除后, 小鼠体内雌激素急速撤退导致骨质疏松发生。

卵巢摘除: 卵巢摘除后会体内雌激素急速撤退, 雌激素缺乏是导致骨质疏松的主要诱因, 可以通过这种手术方式模拟女性绝经期间体内激素变化, 建立绝经后骨质疏松小鼠模型。

摘要

背景: 绝经后骨质疏松症在中老年女性中属于高发疾病, 严重影响其生活质量, 发现并探索出一种有效的防治手段是非常必要的。中医可通过“肾主骨”理论选用补肾药治疗绝经后骨质疏松症, 但其分子机制尚不清楚。

目的: 观察左归丸对骨形态发生蛋白 2/Runx-2/Osterix 信号通路的影响。

方法: 采用卵巢摘除的方法建立绝经后骨质疏松症小鼠模型, 然后将造模成功的 84 只小鼠分为模型组、假手术组、雌二醇组、左归丸高、中、低(0.936, 0.468, 0.234 g/L)剂量组、阻断剂组, 每组 12 只。左归丸高、中、低剂量组给予相应质量浓度的左归丸水煎液; 假手术组、模型组给予等体积的生理盐水; 雌二醇组给予雌二醇水溶液; 阻断剂组给予 ICI182780+左归丸高剂量水煎液, 持续灌胃 8 周。采用免疫组化和 Western Blot 法检测左归丸干预后卵巢摘除骨质疏松症模型小鼠胫骨和股骨中骨形态发生蛋白信号通路的关键蛋白骨形态发生蛋白 2、Runx-2 和 Osterix 的表达; 通过 ICI182780 阻断雌激素受体后, 检测骨形态发生蛋白通路中蛋白表达的变化。

结果与结论: ①免疫组化结果显示, 与模型组小鼠相比, 左归丸高、中剂量均可以明显提高模型组小鼠骨形态发生蛋白 2 的表达水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 左归丸高、中、低剂量组 Runx-2 的表达水平相比差异均有显著性意义 ($P < 0.01$); ②免疫印迹实验结果显示, 与模型组小鼠相比, 左归丸高、中剂量均可以明显提高模型组小鼠骨形态发生蛋白 2 的表达水平 ($P < 0.05$); 左归丸高、中、低剂量组 Runx-2 的表达水平均显著高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 左归丸高、中剂量组 Osterix 的表达水平均显著高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); ③ ICI182780 干预后, 与左归丸高剂量组相比, 阻断剂组小鼠胫骨骨形态发生蛋白 2 和 Runx-2 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 阻断剂组小鼠股骨中骨形态发生蛋白 2、Runx-2 和 Osterix 的表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); ④提示左归丸可以通过雌激素受体激活骨形态发生蛋白 2/Runx-2/Osterix 信号通路进而参与骨代谢过程, 实现骨保护的作用。

关键词: 左归丸; 骨质疏松症; 卵巢摘除; 骨形态发生蛋白 2; Runx-2; Osterix

缩略语: 骨形态发生蛋白: bone morphogenetic protein, BMP; 累积光密度值: integrated optical density, IOD

Effect of Zuogui Wan on bone morphogenetic protein 2 signaling pathway in ovariectomized osteoporosis mice

Li Wei¹, Zhu Hanmin², Wang Xin¹, Gao Xue¹, Cui Jing¹, Liu Yuxin¹, Huang Shuming³

¹Basic Medical College, ²Personnel Office, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei Province, China; ³Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Li Wei, MD, Lecturer, Basic Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei Province, China

Corresponding author: Huang Shuming, MD, Professor, Doctoral supervisor, Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

湖北文理学院, ¹基础医学院, ²人事处, 湖北省襄阳市 441053; ³黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江省哈尔滨市 150040

第一作者: 李微, 女, 1988 年生, 黑龙江省绥化县人, 汉族, 2018 年黑龙江中医药大学毕业, 博士, 讲师, 主要从事中医基础理论-肾主骨方面的研究。

通讯作者: 黄树明, 博士, 教授, 博士生导师, 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江省哈尔滨市 150040

<https://orcid.org/0000-0001-7714-1184> (李微)

基金资助: 湖北省教育厅科研计划项目 (B2020137); 项目负责人: 李微, 课题名称: 左归丸通过雌激素受体介导 BMP-2/Runx2/Osterix 信号通路调控骨质疏松症的分子机制

引用本文: 李微, 朱汉民, 王鑫, 高雪, 崔婧, 刘雨昕, 黄树明. 左归丸干预卵巢摘除骨质疏松模型小鼠骨形态发生蛋白 2 信号通路的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8):1173-1179.



Abstract

BACKGROUND: Postmenopausal osteoporosis is a high-incidence disease in middle-aged and elderly women, which seriously affects the quality of life. It is very necessary to discover and develop an effective prevention and treatment method. Traditional Chinese medicine can treat postmenopausal osteoporosis with tonifying kidney medicines based on the theory of “kidney governs bone,” but the molecular mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To observe the effect of *Zuogui Wan* on bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)/Runx-2/Osterix signaling pathway.

METHODS: The postmenopausal osteoporosis model was established in mice by ovarian removal. Then the successfully modeled mice were divided into model group, sham operation group, estradiol group, high-, medium- and low-dose *Zuogui Wan* (0.936, 0.468, 0.234 g/L) groups, and blocker group, with 12 mice per group. In the high-, medium- and low-dose *Zuogui Wan* groups, the corresponding concentrations of *Zuogui Wan* decoction were given. Sham operation group and model group were given the equal volume of normal saline. Estradiol group was given estradiol aqueous solution. The blocker group was given ICI182780 plus high-dose *Zuogui Wan* decoction. Intervention in each group was given via gavage for 8 continuous weeks. Immunohistochemistry and western blot were used to detect the expression of key proteins BMP-2, Runx-2 and Osterix in the tibia and femur of ovariectomized osteoporosis mice after intervention by *Zuogui Wan*. Changes of protein expressions in the BMP pathway were detected after blocking estrogen receptor using ICI182780.

RESULTS AND CONCLUSION: Immunohistochemical findings indicated that compared with the model group, the high and medium doses of *Zuogui Wan* could significantly increase the expression of BMP-2 in ovariectomized osteoporosis mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$); the expression of Runx-2 in the medium- and low-dose *Zuogui Wan* groups was significantly different ($P < 0.01$). Western blot results showed that compared with the model group, the high and middle doses of *Zuogui Wan* significantly increased the expression of BMP-2 in ovariectomized osteoporosis mice ($P < 0.05$); the expression of Runx-2 was significantly higher in the high-, medium- and low-dose *Zuogui Wan* groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); and the expression of Osterix was significantly higher in the high- and medium-dose *Zuogui Wan* groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). After ICI182780 intervention, compared with the high-dose group, the expression of BMP-2 and Runx-2 in the mouse tibia was significantly reduced in the blocker group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the expression of BMP-2 and Osterix in the mouse femoral bones was significantly reduced in the blocker group ($P < 0.01$). To conclude, *Zuogui Wan* can participate in the regulation of bone metabolism by increasing the expression of important proteins in the BMP/Runx-2/Osterix signaling pathway in ovariectomized osteoporosis mice, thereby achieving the protection of bones.

Key words: *Zuogui Wan*; osteoporosis; ovariectomy; bone morphogenetic protein 2; Runx-2; Osterix

Funding: the Scientific Research Project of Hubei Provincial Department of Education, No. B2020137 (to LW)

How to cite this article: LI W, ZHU HM, WANG X, GAO X, CUI J, LIU YX, HUANG SM. Effect of *Zuogui Wan* on bone morphogenetic protein 2 signaling pathway in ovariectomized osteoporosis mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(8):1173-1179.

0 引言 Introduction

左归丸最早是出自明代著名医学家张景岳编著的《景岳全书》，其为经典补肾名方，由熟地、山药、山茱萸、枸杞、菟丝子、川牛膝、龟板胶、鹿角胶共8味中药组成，其中君药为熟地，具有滋补肾阴、填精益髓的功效；臣药为补养肝肾和并能涩精的山茱萸、健脾滋阴和固精缩尿的山药、补肾益精和养肝明目的枸杞、峻补精血龟鹿二胶，5味药物共同组成；佐药为具有补肝肾、强筋骨、壮腰膝的菟丝子和川牛膝组成；综合各药功效为滋阴补肾、填精益髓、滋养精血，维持女性的生理功能^[1-2]。左归丸在绝经后骨质疏松症领域的基础研究及临床应用也非常广泛^[3]，并且《绝经后骨质疏松症（骨痿）中医药诊疗指南（2019年版）》明确指出左归丸是治疗绝经后骨质疏松症有明显效果的中药方剂，其安全性和有效性均已得到证实^[4]。绝经后骨质疏松症主要是由雌激素缺乏导致的代谢性骨病，发病及初期症状不明显，很容易被忽视，直到骨折发生才会引起重视，严重影响着老年女性的生活质量。当前研究已证明，雌激素及其受体可通过调控与骨代谢相关的I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 、骨钙素等的表达及多个代谢途径对骨骼系统产生影响^[4-6]。骨形态发生蛋白（bone morpho-genic protein, BMP）信号通路是其中最为关键的调控通路，且相关研究已证实，BMP信号通路在成骨分化过程中起到至关重要的调节作用^[7-10]。很多中医中药相关学者都基于“肾主骨”理论开展研究，探索补肾药治疗骨质疏松症的生物学机制及相关信号通路，并希望能够阐明“肾主骨”的生物学实质。目前为止，尽管相关研究进行很深入，且关于左归丸的研究涉及到了Wnt、RANKL、BMP、MAPK等很多信号通路^[11-13]，但并未明确指出“肾主骨”的生物学实质。

此次研究从传统中医基础理论“肾主骨”出发，探究补肾经方左归丸治疗绝经后骨质疏松症的分子机制，项目组前期研究证明左归丸具有雌激素样作用，且能够增加雌激素受体的表达。故计划通过经典的双侧卵巢摘除法建立绝经后骨质疏松症小鼠模型，选用左归丸进行干预治疗，观察左归丸对快速代谢型绝经后骨质疏松症模型小鼠雌激素受体表达的影响，进而观察雌激素受体对骨代谢途径中BMP-2/Runx-2/Osterix信号通路的影响，为“肾主骨”机制研究提供实验数据支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，方差分析，两独立样本t检验。

1.2 时间及地点 于2020年3-6月在湖北文理学院基础医学院分子医学平台完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级未孕雌性小鼠100只，C57BL/6品系，8-10周龄，体质量(20±5)g，购于黑龙江中医药大学GLP实验中心，合格证号：SCXK(黑)2013-0004，动物实验科学伦理证明号：2021-008。饲养条件：开放式动物饲养室，室温控制在(25±1)℃，湿度为(45±5)%，自然光源，昼夜明暗交替为12h，自由饮水饮食。饲料为标准小鼠营养颗粒，垫料为刨花木屑，均由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

1.3.2 实验器材 组织脱水机(KD-TS1A 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)，生物组织包埋机(KD-BM 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)，转轮式切片机(KD2508 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)，电脑生物组织摊烤片机(KD-T 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)，4℃低温离心机(CT15RE

HITACHI 日本), -80 °C 冰箱 (美国赛默飞世尔科技公司), 微波炉 (格兰仕微波炉电器有限公司), pH 计 (仪电科学仪器), 制冰机 (常熟市雪科电器有限公司), 全自动交流稳压器 (SVC-1000, 常安集团有限公司), 制胶工具、电泳仪、半干转膜电泳仪、凝胶成像仪 (Bio-Rad Laboratories, 美国), 自动酶标检测仪 (Multiskan MK3, Thermo Fisher, 美国), 不同规格的移液器 (EPPENDORF, 德国)。

1.3.3 实验试剂及药品 BMP-2 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-1012R), Runx-2 抗体 (AFFINITY, 货号: AF5186), Osterix 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-1110R), RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0013B), PMSF (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: ST506), BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝科学有限公司, 货号: PC0020), 5×SDS loading Buffer (HaiGene, 货号: S0137), 4×蛋白上样缓冲液 (北京索莱宝科学有限公司, 货号: P1015), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (北京索莱宝科学有限公司, 货号: P1300), 乙二胺四乙酸 (天津市福晨化学试剂厂), 十二烷基硫酸钠 (天津市光复精细化工研究所), 甘氨酸、Tris-HCL、Tris-base、TRIS、Base (北京索莱宝科学有限公司), 甲醇 (天津市富宇精细化工有限公司), 吐温 80 (天津市光复精细化工研究所), 脱脂奶粉 (Difco, Becton, Dickinson and Company, 美国), 即用型正常山羊血清 (武汉博士德生物工程有限公司), PVDF 膜 (美国赛默飞世尔科技公司), NC 膜 (德国默克), 彩虹预染蛋白 Marker (美国赛默飞世尔科技公司, 货号: 26616), Western 一抗稀释液 (哈尔滨新海基因检测有限公司, M3001), Western 二抗稀释液 (哈尔滨新海基因检测有限公司, 货号: M3101), 超敏 ECL 发光液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0018A), 聚合 HRP 标记抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司, 货号: SV0002), 鼠抗 β-actin 单克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-0061R), DAB 显色试剂盒 (沈阳万类生物科技有限公司, 货号: WLA022a)。

左归丸组方: 熟地、山药、山茱萸、枸杞、菟丝子、川牛膝、龟板胶、鹿角胶 (哈尔滨世一堂大药房, 经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定均为正品); 阳性药戊酸雌二醇 (商品名: 补佳乐, 拜耳医药保健有限公司广州分公司, 生产批号: 214A), 阻断剂 ICI82780 (商品名: 氟维司群, Selleck Chemicals 美国, 货号: 129453-61-8)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 采用经典双侧卵巢摘除的方法建立绝经后骨质疏松症模型^[14]: 即将麻醉 (选用 20% 氨基甲酸乙酯腹腔注射, 750 mg/kg) 的小鼠双侧背部备皮, 在将一侧背部作纵行切口 (小于 1 cm), 然后切开皮肤和腹肌找到红褐色菜花样卵巢, 在输卵管处切断并摘除卵巢, 然后缝合腹肌和皮肤。另一侧采用同样方法操作。

通过阴道涂片检查判定卵巢摘除手术是否成功以及测定骨密度值判断是造模是否成功^[15-16]。取造模成功的小鼠 (造

模过程中死亡 16 只), 采用安全随机法将小鼠分为 7 组, 分别为模型组、假手术组、雌二醇组、左归丸高、中、低剂量组及阻断剂组, 每组 12 只。

组织工程实验动物造模过程的相关问题	
造模目的	探究补肾要治疗绝经后骨质疏松症的分子机制
选择动物的条件	8 周龄未经产雌性 C57BL/6 小鼠
模型与所研究疾病的关系	卵巢摘除诱导的骨质疏松可以模拟临床上绝经后骨质疏松症患者的激素水平
动物来源及品系	C57BL/6 小鼠购于黑龙江中医药大学动物实验中心
造模技术描述	将小鼠麻醉后取卧位, 分别在两侧背部备皮。先取一侧背腹部作纵行切口约 0.5 cm, 依次切开皮肤、腹肌、腹膜, 然后找到白色发亮的脂肪团, 剥开脂肪找到红褐色的菜花样卵巢, 在子宫角上用可吸收手术缝合线结扎后, 切断并摘除卵巢, 然后依次缝合腹肌和皮肤, 伤口外敷青霉素粉; 另一侧卵巢采用同样方法摘除。假手术组小鼠, 除了摘除与卵巢大小相近的脂肪组织外, 其余操作步骤均同模型组
动物数量及分组方法	造模成功的 84 只小鼠, 随机分成 7 组: 模型组、假手术组、雌二醇组、左归丸 (高、中、低) 剂量组、阻断剂组, 每组 12 只
造模成功评价指标	卵巢切除后第 4-8 天, 每天做阴道涂片, 进行苏木精-伊红染色, 观察各阶段阴道细胞形态, 确定卵巢切除是否完全。术后 1 个月, 测定腰椎骨密度
造模后观察指标	BMP-2、Runx-2、Osterix 蛋白表达情况
造模后动物处理	造模后, 左归丸高、中、低剂量组给予相应浓度的左归丸水煎液; 假手术组、模型组给予等体积的生理盐水; 雌二醇组给予雌二醇水溶液; 阻断剂组给予 ICI182780+左归丸高浓度水煎液
伦理委员会批准	实验方案经湖北文理学院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2021-008

1.4.2 给药方法 按照前期实验方法制备左归丸高、中、低质量浓度 (0.936, 0.468, 0.234 g/L) 的水煎液^[15]; 雌二醇水溶液 0.013 g/L, 置于 4 °C 冰箱中储存备用。按照体质量 10 mL/kg 灌胃给药, 左归丸高、中、低剂量组分别给予相应浓度的左归丸水煎液; 假手术组、模型组给予等体积的生理盐水; 雌二醇组给予雌二醇水溶液; 阻断剂组采用肌肉注射 ICI182780 后 (每 4 周给药 1 次, 64 mg/kg), 按照左归丸高剂量组的给药剂量给药。持续灌胃给药 8 周, 每周测量 1 次体质量, 按照体质量调整给药剂量。

小鼠连续给药结束后, 颈椎麻醉后脱臼处死, 迅速取出胫骨后 (近心端 1/2) 固定于 40 g/L 多聚甲醛中 48 h, 用于免疫组化实验; 取出完整胫骨迅速放置于液氮中速冻后移至 -80 °C 冰箱储存, 用于 Western Blot 实验。

1.4.3 免疫组织化学法检测小鼠胫骨骨松质 BMP-2、Runx-2 蛋白表达 取出固定好的胫骨组织进行脱钙处理 (100 g/L 乙二胺四乙酸磷酸盐缓冲液, 1 周左右, 隔天换液), 然后进行常规的组织脱水及石蜡包埋, 石蜡切片厚度约为 4 μm。按照常规的实验步骤进行: 脱蜡至水 (二甲苯 I 5 min、二

甲苯 II 5 min、二甲苯 III 5 min、无水乙醇 2 min、体积分数 95% 乙醇 2 min、85% 乙醇 1 min、75% 乙醇 1 min)-PBS 润洗 (5 min×3 次)-1% 过氧化氢灭活内源性酶 15 min- PBS 润洗 (5 min×3 次)- 枸橼酸缓冲液抗原修复 (微波炉高火 5 min, 中火 10 min, 高火 5 min)- PBS 润洗 (5 min×3 次)- 山羊血清封闭 1 h- 一抗 (BMP-2、Runx-2) 孵育 4 °C 过夜- PBS 润洗 (5 min×3 次)- 二抗 (聚合 HRP 标记抗兔 IgG) 孵育 37 °C 1 h- PBS 润洗 (5 min×3 次)- DAB 显色- 苏木精复染 10 s- 盐酸乙醇分化 2 s- 乙醇梯度脱水 (体积分数 75% 乙醇 2 min、85% 乙醇 2 min、95% 乙醇 1 min、无水乙醇 1 min)- 二甲苯透明 (二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III, 每缸浸泡时间均为 5 min)- 中性树脂胶封固- 显微镜拍照- 数据分析。

1.4.4 蛋白免疫印迹法检测小鼠股骨 BMP-2、Runx-2 及 Osterix 蛋白表达 取出 -80 °C 冰箱冻存的股骨组织, 称质量后再次液氮速冻, 砸碎提取蛋白, BCA 法蛋白定量, 然后蛋白变性。按照常规蛋白免疫印迹实验操作步骤进行: 制胶 (12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶)- 上样 (10 μL)- 电泳 (上层浓缩胶 80 V 30 min, 下层分离胶 100 V 90 min)- 转膜 (恒流 400 mA, 60 min)-5% 脱脂奶粉封闭 1 h-TBST 润洗 4 次- 一抗 (BMP-2、Runx-2 和 Osterix) 孵育 (1 : 100, 4 °C 过夜)- TBST 润洗 4 次- 二抗 (聚合 HRP 标记抗兔 IgG) 孵育 (1 : 500, 37 °C, 1 h)- TBST 润洗 4 次- ECL 显影- 数据分析。

1.5 主要观察指标 灌胃结束后 1 d, 选择免疫组化和 Western Blot 法测定 BMP-2、Runx-2、Osterix 蛋白表达情况, 以及 ICI182780 阻断雌激素受体后 3 种蛋白的变化情况。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 均以表示。采用两个独立样本的 *t* 检验进行数据分析, 首先应用 Levene 法进行方差齐性检验, 若 $P > 0.05$, 表明方差齐性, 若 $P < 0.05$, 表明方差不齐。根据方差是齐性与否, 确定选择哪部分分析结果。 $P < 0.05$ 表示两组样本的检验变量差异有显著性意义, $P < 0.01$ 表示差异有极显著性意义。图像采用 Image-pro-Plus (IPP) 6.0 软件进行分析。

应用 Image Pro Plus 6.0 软件系统分析阳性细胞的累积光密度值 (integrated optical density, IOD)。IOD 值主要反映待检测样品结构光密度与面积综合性的变化, IOD 值的大小反映待测蛋白表达量的高低。MOD 值为所选面积的平均累积光密度值, 更能够表明待测蛋白的表达情况。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入 100 只小鼠, 造模过程中因手术伤口感染有 16 只死亡, 剩余 84 只分为 7 组, 每组 12 只。

2.2 免疫组织化学实验结果 电子显微镜下观察, DAB 染色后 BMP-2 及 Runx-2 蛋白阳性表达呈棕黄色或黄褐色的颗粒, 蛋白表达量越多, 颜色越深, 此次研究主要观察了胫骨的骨松质部分, 见图 1A, B。同时测定各组小鼠 BMP-2 及 Runx-2 的 MOD 值, 结果显示, 左归丸对这两种蛋白表达的影响具有相同的趋势, 见表 1 及图 1C。

表 1 | 各组小鼠胫骨骨松质骨形态发生蛋白 2 及 Runx-2 的平均累计光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 | The mean integrated optical density of bone morphogenic protein 2 and Runx-2 in the tibia of mice

组别	骨形态发生蛋白 2	Runx-2
假手术组	0.102±0.010	0.116±0.011
模型组	0.074±0.007 ^a	0.085±0.011 ^a
雌二醇组	0.093±0.011 ^c	0.113±0.010 ^c
左归丸高剂量组	0.087±0.012 ^c	0.109±0.013 ^c
左归丸中剂量组	0.086±0.010 ^b	0.107±0.010 ^c
左归丸低剂量组	0.082±0.008	0.107±0.014 ^c

表注: 左归丸高、中、低剂量组给药剂量分别为 0.936, 0.468, 0.234 g/L。与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

模型组小鼠胫骨骨松质部分 BMP-2 及 Runx-2 的表达水平均明显低于假手术组 (P 均 < 0.01); 雌二醇和左归丸治疗后, 与模型组小鼠相比, 雌二醇组及左归丸高、中剂量均可以明显提高模型组小鼠 BMP-2 的表达水平 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$); 雌二醇组及左归丸高、中、低剂量组对 Runx-2 的表达差异均有极显著性意义 (P 均 < 0.01)。

2.3 蛋白免疫印迹实验结果 蛋白质免疫印迹实验结果, 见表 2 及图 2。

表 2 | 各组小鼠股骨骨形态发生蛋白 2 (BMP-2)/β-action、Runx-2/β-action、Osterix/β-action 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, %)

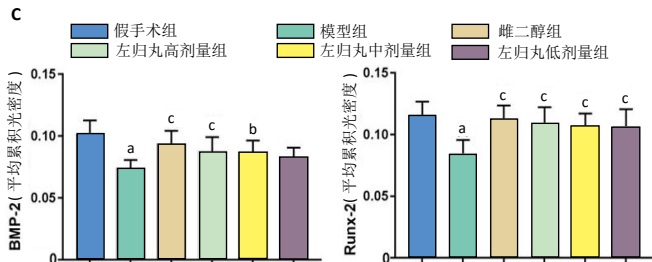
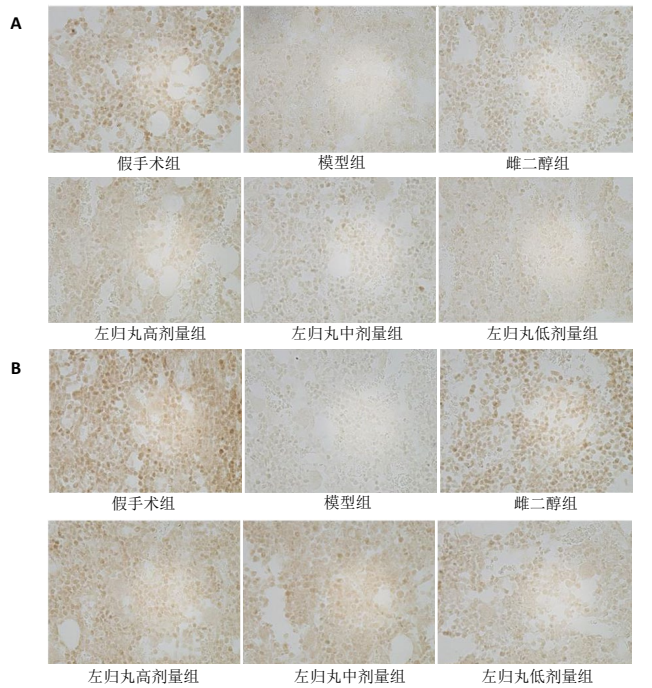
Table 2 | The values of bone morphogenic protein 2/β-action, Runx-2/β-action and Osterix/β-action in the femur of mice

组别	BMP-2/β-actin	Runx-2/β-actin	Osterix/β-actin
假手术组	69.043±15.384	171.284±43.275	135.902±26.063
模型组	7.424±1.309 ^a	25.748±4.740 ^a	39.187±3.815 ^a
雌二醇组	48.406±16.332 ^c	120.817±34.055 ^c	113.173±14.974 ^c
左归丸高剂量组	30.218±2.132 ^b	89.046±9.567 ^c	101.937±15.543 ^c
左归丸中剂量组	25.721±6.964 ^b	84.376±11.926 ^b	75.112±8.541 ^b
左归丸低剂量组	22.245±8.453	75.788±10.210 ^b	56.116±7.213

表注: 左归丸高、中、低剂量组给药剂量分别为 0.936, 0.468, 0.234 g/L。与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

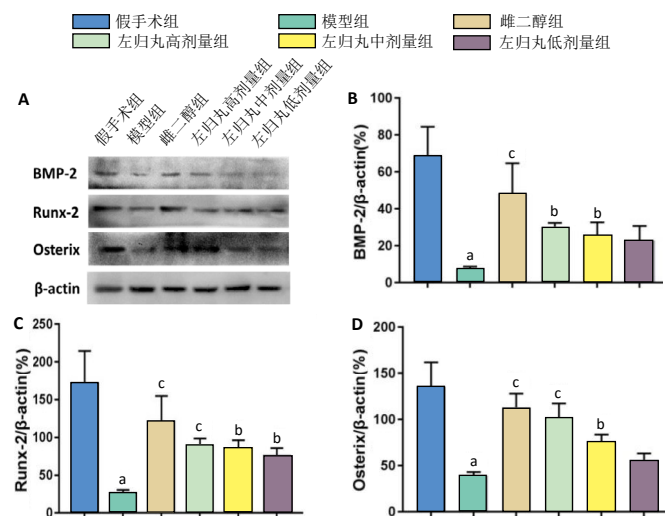
比较分析各组蛋白条带的灰度值, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果显示, 模型组小鼠股骨的 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 蛋白含量明显低于假手术组 (P 均 < 0.01), 说明卵巢摘除后, BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路被阻断。雌二醇和左归丸治疗后, 与模型组小鼠相比, 雌二醇组及左归丸高、中剂量均可以明显提高模型组小鼠 BMP-2 的表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 雌二醇组及左归丸高、中、低剂量组对 Runx-2 的表达均有显著影响 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 雌二醇组及左归丸高、中剂量组对 Osterix 的表达均有显著影响 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.4 雌激素受体阻断剂对左归丸激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路的影响 当 ICI182780 干预后, 各组小鼠胫骨骨松质部分 BMP-2 和 Runx-2 蛋白的表达结果见表 3 及图 3, 与左归丸组 (即左归丸高剂量组) 相比, 阻断剂 + 左归丸组小鼠 BMP-2 和 Runx-2 蛋白的表达明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western Blot 实验结果表明, 雌激素受体被阻断后, 与左归丸组相比, 阻断剂 + 左归丸组中小鼠股骨中 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 的表达均明显减少, 其灰度比值与左归丸组相比差异有极显著性意义 (P 均 < 0.01), 见表 4 及图 4。



图注: 图 A 为各组小鼠 BMP-2 的表达; B 为各组小鼠 Runx-2 的表达; C 为 BMP-2 和 Runx-2 的平均累积光密度值。与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。BMP-2: 骨形态发生蛋白 2

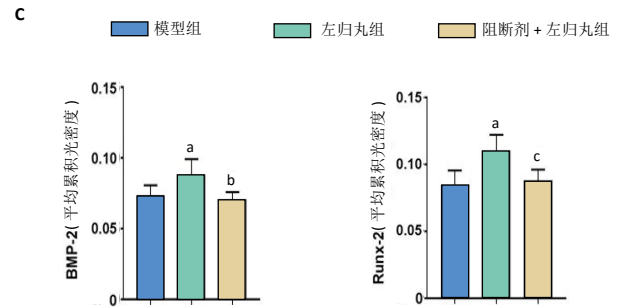
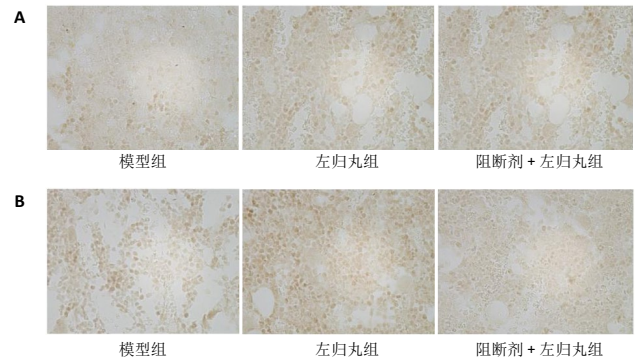
图 1 | 各组小鼠胫骨骨松质骨 BMP-2 及 Runx-2 蛋白表达 (免疫组化 DAB 染色, $\times 400$)



图注: 图 A 为电泳结果; B 为各组小鼠 BMP-2 的表达; C 为各组小鼠 Runx-2 的表达; D 为各组小鼠 Osterix 的表达。与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。BMP-2: 骨形态发生蛋白 2

图 2 | 各组小鼠股骨 BMP-2、Runx-2、Osterix 蛋白表达

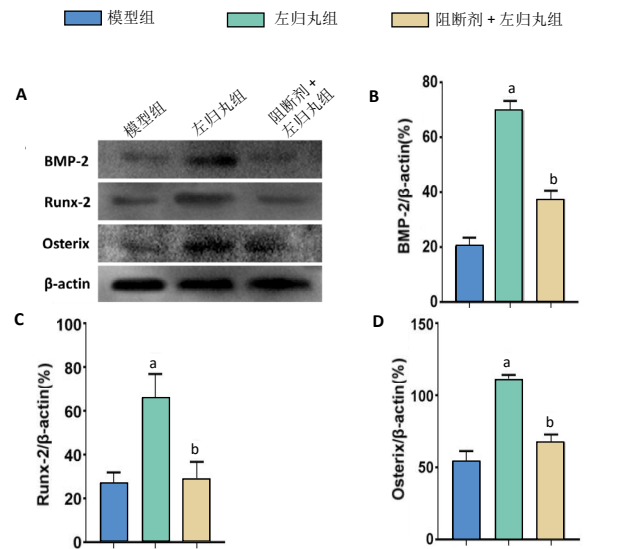
Figure 2 | The protein expression of bone morphogenic protein 2, Runx-2 and Osterix in the femur of mice



图注: 左归丸组、阻断剂 + 左归丸组中左归丸的给药剂量均为高剂量 (0.936 g/L)。图 A 为各组小鼠胫骨 BMP-2 的表达; B 为各组小鼠胫骨 Runx-2 的表达; C 为 BMP-2 和 Runx-2 的平均累积光密度值, 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与左归丸组比较, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.01$ 。BMP-2: 骨形态发生蛋白 2

图 3 | ICI182780 干预后各组小鼠胫骨 BMP-2 和 Runx2 蛋白的表达 (免疫组化 DAB 染色, $\times 400$)

Figure 3 | The expression of bone morphogenic protein 2 and Runx-2 after ICI182780 intervention (immunohistochemical DAB staining, $\times 400$)



图注: 左归丸组、阻断剂 + 左归丸组中左归丸的给药剂量均为高剂量 (0.936 g/L)。图 A 为电泳结果; B 为各组小鼠股骨 BMP-2 的表达; C 为各组小鼠股骨 Runx-2 的表达; D 为各组小鼠股骨 Osterix 的表达。与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与左归丸组比较, ^b $P < 0.01$ 。BMP-2: 骨形态发生蛋白 2

图 4 | ICI182780 干预后各组小鼠股骨中 BMP-2、Runx2 和 Osterix 蛋白的表达

Figure 4 | The protein expression of bone morphogenic protein 2, Runx-2 and Osterix in the femur of mice after ICI182780 intervention

表 3 | ICI182780 干预后各组小鼠胫骨骨形态发生蛋白 2 和 Runx2 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, 平均累积光密度值)

Table 3 | The protein expression of bone morphogenic protein 2 and Runx-2 after ICI182780 intervention

指标	模型组	左归丸组	阻断剂 + 左归丸组
骨形态发生蛋白 2	0.074±0.007	0.087±0.012 ^a	0.070±0.006 ^b
Runx-2	0.085±0.011	0.109±0.013 ^a	0.087±0.009 ^b

表注: 左归丸组、阻断剂 + 左归丸组中左归丸的给药剂量均为高剂量 (0.936 g/L)。与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与左归丸组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

表 4 | ICI182780 干预后各组小鼠股骨骨形态发生蛋白 2(BMP-2)/ β -action、Runx-2/ β -action、Osterix/ β -action 值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, %)

Table 4 | The value of bone morphogenic protein 2/ β -action, Runx-2/ β -action and Osterix/ β -action in the femur of mice after ICI182780 intervention

指标	模型组	左归丸组	阻断剂 + 左归丸组
BMP-2/ β -actin	19.748±3.694	69.135±4.191a	36.886±3.709 ^b
Runx-2/ β -actin	27.098±4.743	66.023±10.850 ^a	29.246±7.434 ^b
Osterix/ β -actin	54.287±7.016	111.578±2.586 ^a	67.531±5.321 ^b

表注: 左归丸组、阻断剂 + 左归丸组中左归丸的给药剂量均为高剂量 (0.936 g/L)。与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与左归丸组比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论 Discussion

左归丸广泛应用于绝经后骨质疏松症的治疗, 主要依据中医基础理论“肾主骨”。据《素问·上古天真论》记载: “女子七岁, 肾气盛, 齿更发长; 二七而天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子; ……七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也。即女子的生理周期与“肾气”“天癸”密切相关, 性功能随肾气的盛衰而盛衰。《素问·六节藏象论》曰“肾者, 主蛰, 封藏之本, 精之处也, 其华在发, 其充在骨, 为阴中之太阴, 通于冬气”。说明肾中之精气的盛衰决定了骨骼生长发育的强健与否。左归丸用来治疗绝经后骨质疏松症, 主要是通过补“肾精”, 进而通过调节体内激素水平或者具有激素样作用增加激素受体水平发挥影响骨骼生长发育的作用。

BMP 属于转化生长因子 β 超家族成员, 最早是在 1960 年发现了具有活性的 BMP, 但是一直到 20 世纪 80 年代末才被分离纯化得到, 到目前为止, 大约有 20 种 BMP 被发现。BMP 信号通路与骨的形成有密切的关联^[9, 17-18], BMP 是骨发育期成骨细胞生成的最初诱导者, 它首先与 II 型 BMP 受体结合使其磷酸化, 然后活化的 II 型 BMP 受体进一步磷酸化 I 型 BMP 受体, 并结合形成复合物。活化的复合物会进一步激活下游 BMP 信号转导蛋白受体 (R-Smad), 磷酸化的 R-Smad 与 Smad4 结合形成复合物, 迁移到核内, 并在核内充当转录增强子, 与相关转录因子 Runx2 和 Osterix 相互作用, 从而影响成骨相关基因的转录, 然后骨前体细胞进一步分化并启动成骨细胞特异性因子 (如碱性磷酸酶等) 的表达, 从而促进骨形成^[19]。研究证实, BMP-2 能够促使骨膜软骨越过软骨形成期, 直接完成骨形成过程, BMP-2/Smad-5/Runx-2 信号通路在成骨分化过程起到重要作用^[9, 20]。刘立萍等^[21]在以左归丸含药血清对成骨细胞 MC3T3-E 进行干预时, 发现雌激素受体的表达与 Osterix 表达密切相关, 而 Osterix 蛋白为 BMP 信号通路中对骨调节的关键蛋白, 也就

意味着在 BMP 信号通路参与代谢的过程中, 雌激素受体具有重要的激活和调节作用。

此次研究主要探究了左归丸通过增加雌激素受体表达进而影响 BMP 信号通路中关键的蛋白质 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 表达。课题组前期实验结果证实左归丸能够增加卵巢摘除小鼠的胫骨和股骨的雌激素受体表达, 此部分实验主要通过免疫组织化学方法分析了 BMP-2 和 Runx-2 的表达, 并统计了各组指标的平均累积光密度; 通过对免疫印迹实验的结果比较分析, 统计各组蛋白条带与 β -actin 的灰度比值, 结果显示, 模型组小鼠股骨的 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 蛋白含量明显低于假手术组。这一结果说明卵巢摘除后, 模型小鼠的 BMP-2/Runx-2/Osterix 骨代谢信号通路受到影响。而通过左归丸及雌二醇干预治疗后, 与模型组小鼠相比, 3 个蛋白的表达量均有明显回升, 证实了左归丸具有类似内源性雌二醇的作用, 可以通过激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路而参与骨代谢过程, 实现骨保护的作用, 而且这种作用很可能是通过增加雌激素受体表达产生的。

相关研究已证实, 左归丸等补肾中药方剂具有雌激素样作用^[22-29], 但是作者所在课题组前期研究表明左归丸对卵巢摘除小鼠血清中的雌激素水平没有明显影响^[10], 后续实验也证实左归丸减缓卵巢切除小鼠的骨组织形态学及骨代谢相关指标与增加雌激素水平无关, 而是与增加雌激素受体的表达有关。相关研究也表明, 在骨形成的过程中雌激素受体 α 的表达与 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路密切相关, 且这种信号通路能够被雌激素受体阻断剂 ICI182780 所阻断^[30]。故为了验证此次研究中左归丸是否能够通过增加卵巢摘除骨质疏松症模型小鼠骨组织雌激素受体 α 的表达来激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路, 选择了雌激素受体阻断剂 (ICI182780) 进行干预研究。在 ICI182780 干预后, 同样通过测定胫骨骨松质部分 BMP-2 和 Runx-2 蛋白的表达及股骨中 BMP-2、Runx-2 和 Osterix 的表达量来观察雌激素阻断剂对左归丸激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路的影响。此次实验结果同样证实, 雌激素阻断剂 ICI182780 能够阻断左归丸对卵巢摘除骨质疏松症模型小鼠 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路的激活作用。

综上, 此次研究发现左归丸可以通过上调雌激素受体的表达, 进而激活 BMP-2/Runx-2/Osterix 信号通路而参与骨代谢过程, 实现对卵巢摘除骨质疏松症模型小鼠的骨保护作用。

致谢: 特别感谢黑龙江中医药大学中医药研究院张博副教授、邵阳博士对此次实验实施过程中经费和人力的大力支持。

作者贡献: 黄树明、李微负责实验设计, 李微、朱汉民、王鑫负责实验实施, 高雪、崔婧、刘雨昕负责指标测定。

经费支持: 该文章接受了“湖北省教育厅科研计划项目 (B2020137)”的基金资助。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: 文章中治疗干预手段采用左归丸复方中的全部中药煎制的水煎液和戊酸雌二醇灌胃给药, 文章的全部作者声明, 没有接受任何资助, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经湖北文理学院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2021-008。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湖北文理学院专家审核。

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] 赵潘婷, 崔晓萍. 左归丸治疗妇科疾病的研究概述 [J]. 中国医药导报, 2020,17(32):40-43.
- [2] 郑鲤榕, 黄惠娟. 左归丸治疗骨质疏松症的方解及其药理研究 [J]. 中国卫生产业, 2012,9(15):152+154.
- [3] 李建国, 谢兴文, 徐世红, 等. 经方左归丸治疗绝经后骨质疏松的研究概述 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019,25(5):706-709.
- [4] 史晓林, 王和鸣, 高毅, 等. 绝经后骨质疏松症 (骨痿) 中医药诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中医正骨, 2020,32(2):1-13.
- [5] KHOSLA S, MONROE DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(1):a031211.
- [6] NARLA RR, OTT SM. Bones and the sex hormones. Kidney Int. 2018; 94(2):239-242.
- [7] GONG W, ZHENG H, LI F, et al. Preventive and therapeutic effect of Corn CerviPantotrichum on bone tissue in ovariectomized rats through activation of BMP-2/Smads/Runx2 signal transduction pathway. Biomed Res. 2018;29(12): 2602-2608.
- [8] MANIKANDAN M, ABUELREICH S, ELSAFADI M, et al. NR2F1 mediated down-regulation of osteoblast differentiation was rescued by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in human MSC. Differentiation. 2018;(104):36-41.
- [9] CAO X, CHEN D. The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene. 2005;357(1):1-8.
- [10] DAI J, LI Y, ZHOU H, et al. Genistein Promotion of Osteogenic Differentiation through BMP2/SMAD5/RUNX2 Signaling. Int J Biol Sci. 2013;9(10):1089-1098.
- [11] 牟宏亮, 吴小燕, 管强, 等. 左归丸治疗骨质疏松症的临床应用及实验研究进展 [J]. 中医学报, 2021,36(4):763-768.
- [12] 李耀洋, 尚立芝, 孙河龙, 等. 左归丸对去势骨质疏松模型大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6):15-22.
- [13] 吴佳莹, 李岳泽, 刘红, 等. “肾主骨”机理研究 — 左归丸对 Hcpidin、Fpn1 及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017,23(11):1548-1551.
- [14] 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.
- [15] 李微, 张博, 李炎, 等. 左归丸对卵巢摘除小鼠类雌激素样作用的实验研究 [J]. 环球中医药, 2018,11(2):191-195.
- [16] 李微, 张博, 徐红丹, 等. 左归丸对卵巢切除骨质疏松模型小鼠骨代谢的影响及机制探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2018,33(7):2807-2810.
- [17] 黄荣兰, 胡文彬, 詹庆昊. 中医药通过调控骨代谢相关信号通路治疗股骨头坏死的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021,27(8): 241-250.
- [18] 李洁, 孙雅楠, 解光越, 等. 熊果酸通过 BMP-2/Smad4/Wnt/ β -catenin 信号通路介导对去卵巢大鼠骨量流失的保护作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020,26(12):1810-1814.
- [19] 史册. I 型 BMP 受体介导的 BMP 信号在骨重塑中的作用及机理研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [20] DAI J, LI Y, ZHOU H, et al. Genistein Promotion of Osteogenic Differentiation through BMP2/SMAD5/RUNX2 Signaling. Int J Biol Sci. 2013;9(10):1089-1098.
- [21] 刘立萍, 白林峰, 姜波, 等. 基于 ER/ERK 信号通路研究左归丸、左归丸去补阳药含药血清对成骨细胞功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017,33(2):6-9.
- [22] 段恒, 周滢. 左归丸对未成熟大鼠子宫发育的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2014,16(2):364-367.
- [23] 王洪雪, 王杰琼, 高杰. 中药治疗围绝经期综合征的机制研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020,22(6):1822-1827.
- [24] 刘宏, 易娅静, 代巧妹, 等. 左归丸对大鼠缺血后脑损伤的神经保护机制 [J]. 中国医科大学学报, 2021,50(1):9-13.
- [25] 刘宏, 仲丽丽, 于颖, 等. 左归丸含药血清对阿尔茨海默病细胞模型雌激素受体表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021,41(1):141-143.
- [26] 蒿长英, 任艳玲, 赵金茹. 左归丸含药血清通过 ERK/Smads 信号通路干预 MC3T3-E1 细胞的功能基因表达 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6):872-876.
- [27] 叶晓平, 段恒. 左归丸对大鼠生殖器官发育与雌激素水平影响的实验研究 [J]. 河南中医, 2014,34(6):1050-1051.
- [28] 刘宏, 易娅静, 于颖, 等. 基于雌激素受体介导的神经营养因子通路探讨左归丸对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国医药导报, 2020,17(35):27-33.
- [29] 肖艳华, 张玉梅. 左归丸联合右归丸治疗卵巢早衰前期患者对其卵巢储备功能的影响 [J]. 中国保健营养, 2017,27(36):463-464.
- [30] LUO Z, LIU M, SUN L, et al. Icariin recovers the osteogenic differentiation and bone formation of bone marrow stromal cells from a rat model of estrogen deficiency-induced osteoporosis. Mol Med Rep. 2015;12(1): 382-388.

(责任编辑: GD, ZN, SX)