

金匮肾气丸对糖尿病肾病性骨质疏松大鼠的影响及机制[△]

丁文君^{1*},沈明霞²,高永蕊³(1.甘肃省中医药研究院暨甘肃省中医院肾病科,兰州 730050;2.甘肃中医药大学附属医院全科医学科,兰州 730020;3.甘肃中医药大学中西医结合学院,兰州 730020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)16-2000-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.08



摘要 目的 探讨金匮肾气丸对糖尿病肾病性骨质疏松(DNOP)大鼠的影响及潜在机制。**方法** 将大鼠随机分为空白对照组,对照组,模型组,金匮肾气丸低、中、高剂量组(0.62、1.24、2.48 g/kg)和阳性对照组(地舒单抗3 mg/kg),每组12只。除空白对照组和对照组外,其余各组均以高糖高脂饲料、3%果糖溶液喂养+链脲佐菌素溶液腹腔注射的方式构建DNOP大鼠模型。造模成功后第2天,金匮肾气丸低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠分别灌胃或皮下注射相应药液,每天1次,连续8周。末次给药后,检测各组大鼠的骨密度(BMD)、血清骨代谢相关指标[骨钙素(OC)、钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)],观察其右股骨组织病理学改变,检测其左股骨组织中核因子κB受体激活蛋白配体(RANKL)/核因子κB受体激活蛋白(RANK)/护骨因子(OPG)信号通路相关mRNA及蛋白的表达情况。**结果** 与空白对照组、对照组比较,模型组大鼠骨小梁断裂及结构受损严重,骨组织间隙明显;BMD、ALP活性、OPG mRNA及蛋白的表达均显著降低或下调($P<0.05$);OC、钙、磷水平,TRAP活性,RANKL、RANK mRNA及蛋白的表达均显著升高或上调($P<0.05$)。与模型组比较,金匮肾气丸各剂量组大鼠骨小梁数有所增加,骨小梁排列趋于整齐、致密;上述指标普遍回调,且有一定的剂量依赖性($P<0.05$)。**结论** 金匮肾气丸可促进DNOP大鼠骨生成,调节骨代谢平衡;上述作用可能与下调RANKL、RANK表达,上调OPG表达有关。

关键词 金匮肾气丸;糖尿病肾病性骨质疏松;骨代谢;RANKL/RANK/OPG信号通路

Effects and its mechanism of Jingui shenqi pill on diabetic nephropathy-related osteoporosis in rats

DING Wenjun¹, SHEN Mingxia², GAO Yongrui³(1. Dept. of Nephrology, Gansu Academy of Traditional Chinese Medicine&Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 2. Dept. of General Medicine, the Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China; 3. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the effect of Jinkui shenqi pill and its potential mechanism on diabetic nephropathy-related osteoporosis (DNOP) in rats. **METHODS** The rats were randomly divided into blank control group, control group, model group, Jingui shenqi pill low-, medium- and high-dose groups (0.62, 1.24, 2.48 g/kg), and positive control group (denosumab 3 mg/kg), with 12 cases in each group. Except for the blank control group and the control group, models of DNOP were constructed in the remaining groups by high-glucose and high-fat forage, 3% fructose solution for feeding+intraperitoneal injection of streptozotocin solution. At 2 d after successful molding, Jingui shenqi pill low-, medium- and high-dose groups, and positive control group were given intragastric administration or subcutaneous injection of the corresponding drugs, once a day, for consecutive 8 weeks. After the last administration, bone mineral density (BMD) and serum bone metabolism-related indexes [osteocalcin (OC), calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)] were detected. The pathological changes of right femoral tissues were observed, and the expressions of receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)/receptor activator of NF-κB (RANK)/osteoprotegerin (OPG) pathway-related mRNAs and proteins in left femoral tissues were detected. **RESULTS** Compared with the blank control group and the control group, there was rupture of bone trabecula and severe structural damage in the model group, and tissue space was obvious. BMD and ALP activities, mRNA and protein expressions of OPG were significantly decreased or down-regulated, while the levels of OC, calcium and phosphorus, TRAP activity, mRNA and protein expressions of RANKL and RANK were significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Compared with the model group, the number of bone trabeculae was increased in all Jingui shenqi pill groups, and the arrangement of bone trabeculae was more regular and dense. The above indexes generally were improved in a certain dose-dependent manner ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Jingui shenqi pill can promote osteogenesis and regulate the balance of bone metabolism in DNOP rats, which may be related to down-regulating the expressions of RANKL and RANK, and up-regulating the expression of OPG.

△基金项目 甘肃省自然科学基金项目(No.22JR5RA642)

*第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:中西医结合糖尿病肾脏疾病的临床与基础。E-mail:dwj0821@163.com

KEYWORDS Jingui shenqi pill; diabetic nephropathy-related osteoporosis; bone metabolism; RANKL/RANK/OPG signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨密度下降、骨结构受损为主要特征的代谢性疾病,是导致全球老年群体发生骨折的主要原因之一^[1]。临床实践表明,OP起病隐匿,多数患者在发生脆性骨折后才被确诊,使得其难以得到及时的对症治疗,严重影响患者的生活质量、增加其经济负担^[2-3]。继发性OP通常由患者自身存在的其他代谢性疾病引起,其中糖尿病肾病是重要诱因之一。糖尿病肾病性OP(diabetic nephropathy-related osteoporosis, DNOP)发病机制复杂,且随着患者糖尿病肾病病程的进展,继发性OP的发生风险也随之升高,加之临床治疗困难,故DNOP是临床亟须攻克的重点问题之一^[4-5]。

中医治疗DNOP具有独特的优势,其不仅可通过辨证分型进行对症治疗,而且具有较高的安全性^[6]。金匮肾气丸由熟地黄、桂枝、炮附子、山药、山萸肉、茯苓、牡丹皮、泽泻组方而成,具有补肾固本、行气化水的功效。中医理论认为,肾主骨生髓,金匮肾气丸以补肾阳、益精血为核心,其改善骨代谢的作用可能与调节成骨细胞和破骨细胞平衡有关,但具体机制尚待验证^[7]。核因子κB受体激活蛋白配体(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)/核因子κB受体激活蛋白(receptor activator of NF-κB, RANK)/抑骨因子(osteoprotegerin, OPG)信号通路作为骨代谢的核心调控通路,在糖尿病及其并发症(如糖尿病肾病、继发性OP)的发病过程中扮演着关键角色^[8]。基于此,本研究拟建立DNOP大鼠模型,探讨金匮肾气丸对模型大鼠的干预效果及潜在机制,以期为临床DNOP的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Horizon DXA型全自动双能X线骨密度测量仪(美国Hologic公司)、CFX96型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)、Synergy H1型酶标仪(美国BioTek公司)、Cary 3500型紫外-可见分光光度计(美国Agilent公司)、BX53型显微镜(日本Olympus公司)、FreeStyle Precision Neo型血糖仪(美国Abbott公司)、Cobas e601型化学发光免疫分析仪(瑞士Roche公司)等。

1.2 主要药品与试剂

金匮肾气丸(批号为20230518,规格为每丸重6 g)购自黑龙江葵花药业股份有限公司;地舒单抗注射液[阳性对照药,批号为220711A2,规格为60 mg(1.0 mL)/支(预充式注射器)]由美国Amgen Manufacturing Limited LLC生产;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、Trizol试剂(批号分别为MKCH2674、L2022008)均购自美国Sigma-Aldrich公司;骨钙素(osteocalcin, OC)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号为20230425)购自上海江莱生物技术有限公司;钙检测试剂盒(偶氮胂Ⅲ法)、磷检测试剂盒(磷钼酸紫外法)(批号分别为20220913、20221127)均购自上海博湖生物科技有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)检测试剂盒(批号分别为20221106、20230105)均购自北京伊塔生物科技有限公司;逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒(批号分别为20221104、20230217)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔抗RANK、RANKL、OPG、β-微管蛋白(β-tubulin)抗体及辣根过氧化酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab305233、ab65024、ab73400、ab314069、ab205718)均购自英国Abcam公司;反转录酶、Taq DNA聚合酶(批号分别为AK3677、AK1085)均购自日本Takara公司;RIPA裂解液(批号为20230223)购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR所用引物由深圳华大基因股份有限公司合成。

酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)检测试剂盒(批号分别为20221106、20230105)均购自北京伊塔生物科技有限公司;逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒(批号分别为20221104、20230217)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔抗RANK、RANKL、OPG、β-微管蛋白(β-tubulin)抗体及辣根过氧化酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab305233、ab65024、ab73400、ab314069、ab205718)均购自英国Abcam公司;反转录酶、Taq DNA聚合酶(批号分别为AK3677、AK1085)均购自日本Takara公司;RIPA裂解液(批号为20230223)购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR所用引物由深圳华大基因股份有限公司合成。

1.3 实验动物与饲料

SPF级Wistar雌性大鼠84只,2月龄,体重约200 g,动物生产许可证号为SCXK(京)2024-0012,购自清华大学实验动物中心。高糖高脂饲料和标准饲料均购自北京华阜康生物科技股份有限公司。所有动物均饲养于温度20 °C左右、相对湿度(50±10)%、每12 h光暗交替的动物房内,自由摄食、饮水,适用性饲养1周后进行后续实验。本研究方案已经通过甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号SY2023-708)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将大鼠随机分为空白对照组,对照组,模型组,金匮肾气丸低、中、高剂量组(0.62、1.24、2.48 g/kg)和阳性对照组(地舒单抗3 mg/kg),每组12只。按下列方法构建DNOP模型^[9-10]:模型组和各药物组大鼠以高糖高脂饲料喂养4周,同时饮用3%果糖溶液;空白对照组和对照组以标准饲料喂养4周,同时正常饮水。随后,禁食12 h,模型组和各药物组大鼠腹腔注射STZ溶液(30 mg/kg),空白对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,对照组大鼠腹腔注射等体积柠檬酸缓冲液(0.1 mmol/L),每天1次,连续5 d。从注射的第3天起,连续3 d采集模型组和各药物组大鼠尾静脉血进行血糖检测,若血糖均不低于16.7 mmol/L,且出现多饮、多尿、体重下降等症状,则视为糖尿病模型构建成功。接下来,空白对照组和对照组大鼠以标准饲料、模型组和各药物组大鼠以高糖高脂饲料继续喂养4周,若尿蛋白≥30 mg且尿糖为阳性,则视为糖尿病肾病模型构建成功;各组大鼠继续同法喂养20周后进行骨密度(bone mineral density, BMD)检测,若模型组和各药物组大鼠BMD低于“对照组大鼠平均BMD减去2.5倍对照组BMD的标准差”这一阈值,则视为DNOP模型构建成功。在剔除造模未成功的个体后,空白对照组,对照组,模型组,金匮肾气丸低、中、高剂量组,阳性对照组各有大鼠12、12、10、11、10、11、11只。

DNOP造模成功后第2天,取各组大鼠,按如下方式进行干预^[10-12]:金匮肾气丸各剂量组大鼠灌胃相应药液[以柠檬酸缓冲液(0.1 mmol/L)为溶剂],其中中剂量

组的剂量按照 60 kg 成人日剂量, 根据人与动物体表面积折算系数计算, 为 1.24 g/kg; 分别以中剂量的 1/2 和 2 倍作为低、高剂量, 即 0.62、2.48 g/kg。阳性对照组大鼠皮下注射地舒单抗 3 mg/kg[以柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L)为溶剂]。空白对照组和模型组灌胃等体积生理盐水, 对照组大鼠灌胃等体积柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L), 每天 1 次, 连续 8 周。

2.2 考察指标

2.2.1 左股骨 BMD 测量

末次给药后, 随机选取各组大鼠 5 只, 使用全自动双能 X 线骨密度测量仪对其左股骨进行高精度扫描, 测量其 BMD。

2.2.2 血清骨代谢相关指标

取“2.2.1”项下各组大鼠, 经腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉后, 取其股动脉血, 于 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 5 min, 分离血清, 使用酶标仪检测其血清 OC、钙、磷水平, 紫外-可见分光光度计检测其血清 ALP、TRAP 活性, 严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.2.3 股骨组织病理学观察

取各组剩余大鼠, 同法麻醉后处死, 取其右股骨组织, 经 10% 乙二胺四乙酸脱钙、4% 甲醛固定后, 行常规石蜡包埋、切片。取切片, 经苏木精-伊红(HE)染色后, 使用显微镜观察大鼠股骨组织的病理学变化。

2.2.4 左股骨组织中 RANKL、RANK、OPG mRNA 表达检测

采用实时荧光定量 PCR 法检测。取“2.2.3”项下各组大鼠的左股骨组织适量, 提取其总 RNA, 经浓度、纯度检测后, 将其逆转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。所用引物由本课题组参考相关文献^[13]设计: RANKL 的正、反向引物分别为 5'-TGGAGAGCGAA-GACACAGA-3'、5'-CAGACTGACTTATGGGAACC-3', RANK 的正、反向引物分别为 5'-GGCTGGCTACCAT-TGGAAC-3'、5'-TCCTGTAGTAAACGCCGAAGA-3', OPG 的正、反向引物分别为 5'-CGAAAGCACCCCTG-TAGGAA-3'、5'-TGTCCACCAGAACACTCAGC-3', β -tubulin 的正、反向引物分别为 5'-GTTCCGGTTCAA-GTGGGTCA-3'、5'-CCACACTTCATGAGCAGGCT-3'。PCR 反应体系为: cDNA 模板 1.0 μ L, 正、反向引物各 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 10×PCR 缓冲液 2.5 μ L, 25 mmol/L 氯化镁溶液 1.5 μ L, 以 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。以 β -tubulin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 RANKL、RANK、OPG mRNA 的相对表达量, 结果以空白对照组为标准进行归一化处理。

2.2.5 左股骨组织中 RANKL、RANK、OPG 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取“2.2.4”项下各组大鼠的左股骨组织适量, 加入裂解液适量, 于 4 °C 下以

11 200 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 以 BCA 法定量后进行变性处理。取变性蛋白适量, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜、封闭; 洗膜后, 加入 RANKL、RANK、OPG、 β -tubulin 一抗(稀释比例分别为 1:1 000、1:5 000、1:2 000、1:2 000), 孵育过夜; 洗膜后, 加入相应二抗(稀释比例为 1:1 000), 孵育 2 h; 洗膜后, 以增强型 ECL 试剂显色、成像, 以目的蛋白与内参蛋白(β -tubulin)的灰度值比值作为各目的蛋白的相对表达量。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠左股骨 BMD 比较

与空白对照组、对照组大鼠比较, 模型组大鼠 BMD 显著降低($P<0.05$); 与模型组比较, 金匮肾气丸中、高剂量组和阳性对照组大鼠 BMD 均显著升高($P<0.05$), 且三者作用相当($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠 BMD 和血清骨代谢相关指标比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	BMD/(g/cm ²)	OC/(ng/L)	钙/(mmol/L)	磷/(mmol/L)	ALP/(U/mL)	TRAP/(μ g/L)
空白对照组	0.35±0.02	10.39±1.87	1.56±0.17	1.52±0.18	8.34±1.79	4.76±1.08
对照组	0.36±0.02	10.68±1.95	1.58±0.17	1.53±0.14	8.25±1.74	4.81±1.06
模型组	0.30±0.03 ^a	19.94±3.03 ^b	2.16±0.49 ^b	2.04±0.42 ^b	6.82±2.17 ^b	9.52±2.33 ^b
金匮肾气丸低剂量组	0.31±0.01	16.12±1.15 ^c	1.88±0.23	1.85±0.27	6.78±2.01	8.14±1.86
金匮肾气丸中剂量组	0.34±0.01 ^{cd}	14.07±1.06 ^{cd}	1.79±0.35 ^e	1.64±0.31 ^e	7.41±0.99 ^d	7.29±0.91 ^c
金匮肾气丸高剂量组	0.35±0.03 ^{cd}	12.62±1.31 ^{cd}	1.63±0.16 ^{cd}	1.59±0.25 ^{cd}	7.97±1.95 ^{cd}	5.76±0.83 ^{dc}
阳性对照组	0.36±0.03 ^{cd}	12.45±1.22 ^{cd}	1.61±0.11 ^{cd}	1.58±0.24 ^{cd}	7.99±1.83 ^{cd}	5.68±0.77 ^{dc}

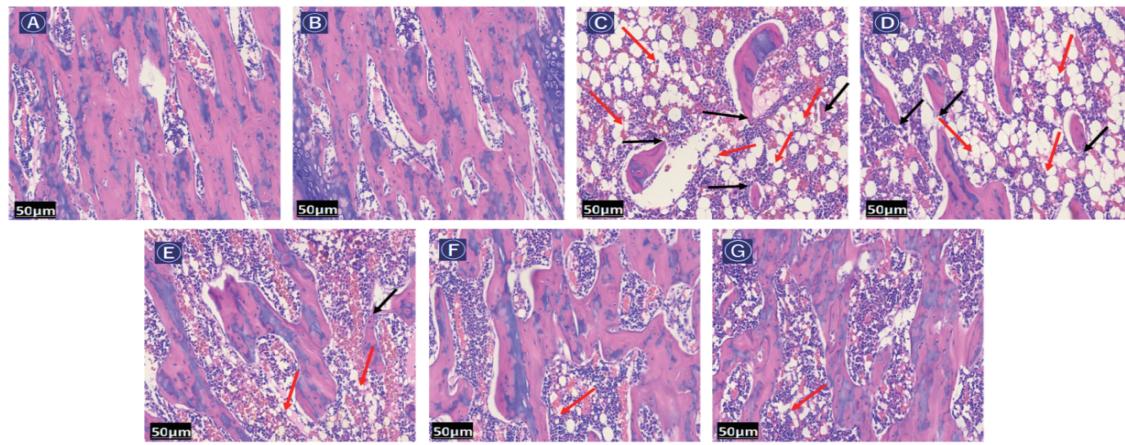
^a: 与空白对照组比较, $P<0.05$; ^b: 与对照组比较, $P<0.05$; ^c: 与模型组比较, $P<0.05$; ^d: 与金匮肾气丸低剂量组比较, $P<0.05$; ^e: 与金匮肾气丸中剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠血清骨代谢指标比较

与空白对照组、对照组比较, 模型组大鼠血清 OC、钙、磷水平及 TRAP 活性均显著升高, 而 ALP 活力显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 金匮肾气丸中、高剂量组和阳性对照组大鼠上述指标以及金匮肾气丸低剂量组大鼠血清 OC 水平均显著改善, 呈一定的剂量依赖趋势($P<0.05$), 其中高剂量金匮肾气丸的作用与阳性对照药相当($P>0.05$)。结果见表 1。

3.3 各组大鼠股骨组织病理学变化

空白对照组和对照组大鼠右股骨组织中骨小梁排列整齐, 结构完整, 呈致密网状结构。模型组和金匮肾气丸低剂量组大鼠骨小梁结构明显受损, 大量骨小梁断裂, 骨组织可见明显间隙, 但金匮肾气丸低剂量组略好于模型组。金匮肾气丸中、高剂量组和阳性对照组大鼠骨小梁数量较模型组和金匮肾气丸低剂量组有所增加, 但不及空白对照组和对照组, 骨小梁排列较为整齐、致密。结果见图 1。



A:空白对照组;B:对照组;C:模型组;D:金匮肾气丸低剂量组;E:金匮肾气丸中剂量组;F:金匮肾气丸高剂量组;G:阳性对照组;黑色箭头:骨小梁断裂;红色箭头:骨组织间隙。

图1 各组大鼠股骨组织病理学变化的显微图(HE染色)

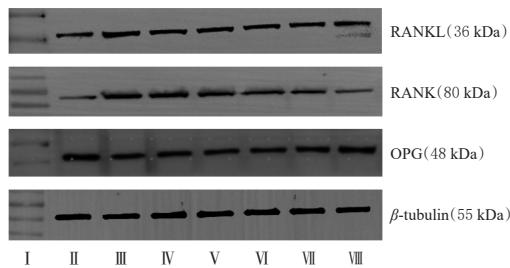
3.4 各组大鼠左股骨组织中 RANKL、RANK、OPG mRNA 及蛋白表达比较

与空白对照组、对照组比较,模型组大鼠左股骨组织中 RANKL、RANK mRNA 及蛋白的表达均显著上调,OPG mRNA 及蛋白的表达均显著下调($P<0.05$)。与模型组比较,金匮肾气丸低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠左股骨组织中 RANKL、RANK mRNA 及蛋白的表达均显著下调,OPG mRNA 及蛋白的表达均显著上调,呈剂量依赖性($P<0.05$),且高剂量金匮肾气丸的作用与阳性对照相当($P>0.05$)。结果见表2、图2。

表2 各组大鼠左股骨组织中 RANKL、RANK、OPG mRNA 及蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA			蛋白		
	RANKL	RANK	OPG	RANKL	RANK	OPG
空白对照组(n=7)	1.03±0.15	1.01±0.09	0.99±0.06	0.57±0.08	1.31±0.16	0.52±0.09
对照组(n=7)	1.05±0.16	1.02±0.11	0.98±0.05	0.56±0.08	1.29±0.18	0.51±0.08
模型组(n=5)	2.71±0.28 ^{ab}	3.78±0.35 ^{ab}	0.29±0.03 ^{ab}	1.38±0.12 ^{ab}	2.91±0.21 ^{ab}	0.17±0.03 ^{ab}
金匮肾气丸低剂量组(n=6)	2.19±0.20 ^a	2.92±0.23 ^a	0.34±0.05 ^c	1.07±0.11 ^a	2.03±0.15 ^a	0.25±0.03 ^c
金匮肾气丸中剂量组(n=5)	1.88±0.09 ^{cd}	2.64±0.32 ^{cd}	0.40±0.02 ^{cd}	0.82±0.07 ^{cd}	1.83±0.20 ^{cd}	0.36±0.04 ^{cd}
金匮肾气丸高剂量组(n=6)	1.62±0.15 ^{cde}	1.93±0.18 ^{cde}	0.53±0.04 ^{cde}	0.70±0.08 ^{cde}	1.65±0.13 ^{cde}	0.41±0.05 ^{cde}
阳性对照组(n=6)	1.59±0.17 ^{cde}	1.85±0.17 ^{cde}	0.55±0.07 ^{cde}	0.71±0.09 ^{cde}	1.62±0.11 ^{cde}	0.44±0.09 ^{cde}

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与对照组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.05$;d:与金匮肾气丸低剂量组比较, $P<0.05$;e:与金匮肾气丸中剂量组比较, $P<0.05$ 。



I : marker; II : 空白对照组; III : 模型组; IV : 金匮肾气丸低剂量组; V : 金匮肾气丸中剂量组; VI : 金匮肾气丸高剂量组; VII : 阳性对照组; VIII : 对照组。

图2 各组大鼠左股骨组织中 RANKL、RANK、OPG 蛋白表达的电泳图

4 讨论

研究表明,糖尿病是导致继发性OP发生的独立危险因素,DNOP已成为糖尿病肾患者的严重并发症之一。胰岛素抵抗引起的内分泌紊乱和糖脂代谢异常均是DNOP发生的重要原因^[14]。近年来,随着糖尿病发病率的不断上升,DNOP发生率也在增加。为改善患者预后,给予充分有效的药物治疗十分必要。本研究通过建立DNOP大鼠模型,初步探讨了金匮肾气丸对大鼠DNOP的干预效果及潜在机制。

本研究结果显示,模型组大鼠左股骨BMD显著降低;经中、高剂量的金匮肾气丸干预后,模型大鼠左股骨的BMD显著升高,说明上述剂量的金匮肾气丸可改善DNOP大鼠的骨质疏松症状。组织病理学观察结果显示,经中、高剂量的金匮肾气丸干预后,大鼠右股骨组织中骨小梁数量较模型组有所增加,骨小梁排列较为整齐、致密,且上述剂量金匮肾气丸作用与阳性对照药相当。笔者分析,这可能是因为金匮肾气丸具有补肾固本、通利经络、活血化瘀等功效,可使筋骨得养,从而改善DNOP症状。现代药理学证明,金匮肾气丸的有效成分槲皮素可通过促进成骨细胞分化、诱导破骨细胞凋亡来有效抑制骨吸收^[15];山柰酚可改善钙代谢过程,从而调节机体钙平衡、诱导骨胶原再生^[16];熟地黄、山茱萸等药材中的植物甾醇可促进成骨细胞增殖,并通过作用于卵巢颗粒细胞来促进雌二醇分泌,从而改善骨代谢平衡^[17]。此外,相关机制研究显示,金匮肾气丸可通过作用于多种信号通路来调控靶基因表达,进而发挥促进成骨细胞生成、抑制破骨细胞分化的作用,从而治疗OP^[18]。

糖尿病等代谢性疾病所致继发性OP可导致患者骨转换率降低、骨生成减少。研究指出,血清OC、钙、磷水平平均能反映骨矿化程度;ALP由成骨细胞产生,可反映机体的骨形成情况;TRAP与骨吸收水平呈正相关^[19-20]。本研究中血清骨代谢相关指标检测结果显示,与空白对照组和对照组比较,模型组大鼠血清OC、钙、磷水平和

TRAP活性均显著升高,ALP活性显著降低,提示模型大鼠的骨转化率低,对钙、磷的吸收减少,导致血清钙、磷水平异常。经中、高剂量的金匮肾气丸干预后,大鼠血清OC、钙、磷水平和TRAP活性均显著降低,ALP活性均显著升高,且中、高剂量金匮肾气丸的作用与临床常用OP治疗药物地舒单抗相当,提示中、高剂量的金匮肾气丸可增加骨对钙、磷的吸收,减少骨矿溶解,同时可增强骨生成、减少骨吸收,从而提高骨转化率。

为进一步探索金匮肾气丸改善DNOP的潜在机制,本研究对RANKL/RANK/OPG信号通路相关mRNA及蛋白的表达情况进行了检测。该信号通路与破骨细胞的增殖、分化密切相关:RANKL可通过与RANK结合来促进破骨细胞分化,从而增加骨吸收;OPG是RANK的竞争性受体,与RANKL结合后可抑制破骨细胞生成、减少骨吸收^[21]。本研究结果显示,与空白对照组和对照组比较,模型组大鼠左股骨组织中RANKL、RANK mRNA及蛋白的表达均显著上调,OPG mRNA及蛋白的表达均显著下调,提示DNOP大鼠破骨细胞活力较高,其体内骨吸收活跃、骨流失增多。与模型组比较,金匮肾气丸各剂量组大鼠左股骨组织中RANKL、RANK mRNA及蛋白的表达均显著下调,OPG mRNA及蛋白的表达均显著上调,组间比较差异有统计学意义;同时,高剂量金匮肾气丸的作用与阳性对照药相当。这提示金匮肾气丸可抑制DNOP大鼠破骨细胞的活化,调整骨代谢平衡,减少骨质流失,且这种作用具有一定的剂量依赖性。

综上所述,金匮肾气丸可促进DNOP大鼠骨生成,调节骨代谢平衡;上述作用可能与下调RANKL、RANK表达,上调OPG表达有关。

参考文献

- [1] CLYNES M A, HARVEY N C, CURTIS E M, et al. The epidemiology of osteoporosis[J]. Br Med Bull, 2020, 133 (1):105-117.
- [2] COMPSTON J. Reducing the treatment gap in osteoporosis[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2020, 8(1):7-9.
- [3] JOHNSTON C B, DAGAR M. Osteoporosis in older adults[J]. Med Clin N Am, 2020, 104(5):873-884.
- [4] QI S S, HE J, HAN H, et al. Anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa L. Japonica*) ameliorates diabetic osteoporosis in rats[J]. Food Funct, 2019, 10 (9) : 5350-5360.
- [5] JIN C, TAN K, YAO Z, et al. A novel anti-osteoporosis mechanism of VK2: interfering with ferroptosis via AMPK/SIRT1 pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(6):2745-2761.
- [6] 刘维,郭婉容,黄莉吉,等.糖尿病肾病合并骨质疏松症的中医药研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2022, 23(9):842-843.
- [7] 李伟,李春根,穆晓红,等.基于网络药理学预测金匮肾气丸治疗骨质疏松症的作用机制[J].世界中医药,2021, 16(22):3285-3291,3297.
- [8] 申继强,代冬芳,吴佩峰,等.藏药二十五味鬼臼丸通过OPG/RANKL/RANK通路对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的干预作用[J].中华中医药杂志,2023,38(11):5495-5499.
- [9] FATHY M A, ANBAIG A, ALJAFIL R, et al. Effect of liraglutide on osteoporosis in a rat model of type 2 diabetes mellitus: a histological, immunohistochemical, and biochemical study[J]. Microsc Microanal, 2023, 29(6):2053-2067.
- [10] 张倩,田升,张立娟,等.金匮肾气丸对去势大鼠骨质疏松症模型的干预研究[J].解剖学杂志,2021, 44(增刊1):229.
- [11] 张倩.金匮肾气丸通过调控BMP/Smad信号通路防治绝经后骨质疏松症的机制研究[D].济南:山东中医药大学,2021.
- [12] SHANG Q, ZHAO W H, SHEN G Y, et al. Jingui shenqi pills regulate bone-fat balance in murine ovariectomy-induced osteoporosis with kidney yang deficiency[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:1517596.
- [13] 杨晓净,邓向群,肖婷,等.基于RANKL/RANK/OPG信号通路探讨土贝母苷甲对糖尿病性骨质疏松大鼠骨质流失的影响[J].河北医药,2023,45(2):174-179.
- [14] 马素起,殷项远,王庆华,等.二甲双胍与振动干预对糖尿病伴发骨质疏松大鼠骨密度和糖代谢的作用[J].中华内分泌外科杂志,2021, 15(4):403-406.
- [15] 王龙飞,高玉海,谢高倩,等.槲皮素改善骨质疏松的作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2023, 38(3) : 714-718.
- [16] 王雪峰,杨松,曹立新,等.山柰酚对卵巢去势大鼠的促骨胶原生成和减少骨小梁丢失的保护作用研究[J].中国临床药理学杂志,2020, 36(10):1302-1305.
- [17] 耿秋东,葛海雅,王和鸣,等.基于网络药理学探讨龟鹿二仙胶治疗骨关节炎的作用及机制[J].中国组织工程研究,2021, 25(8):1229-1236.
- [18] 李伟杰,梁润英.金匮肾气丸防治骨质疏松症的机制研究[J].中国骨质疏松杂志,2022, 28(1):89-97.
- [19] ZHU S A, ZHU J X, ZHEN G H, et al. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain[J]. J Clin Invest, 2019, 129(3):1076-1093.
- [20] KIM J H, KIM M, JUNG H S, et al. *Leonurus sibiricus* L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation[J]. Int J Mol Med, 2019, 44 (3):913-926.
- [21] SEO I B, LEE K P, PARK S Y, et al. Therapeutic effect of Shinkiwhan, herbal medicine, regulates OPG/RANKL/RANK system on ovariectomy-induced bone loss rat[J]. Phys Act Nutr, 2020, 24(3):19-24.

(收稿日期:2025-04-08 修回日期:2025-07-24)

(编辑:张元媛)