

补肾活血法通过 Wnt/ β -catenin 信号通路缓解绝经后骨质疏松

赖福崇¹ 王可欣² 郭润生¹

1. 南昌大学第一附属医院 江西南昌 330006

2. 宜春学院美容医学院 江西宜春 336028

摘要：目的：探讨补肾活血法是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路缓解绝经后骨质疏松症。方法：将 40 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表随机分为 4 组，每组 10 只，分别为假手术组、去势手术组、补肾活血汤低剂量组及补肾活血汤高剂量组，假手术组和去势手术组给予 0.9% 的生理盐水灌胃，低剂量组和高剂量组分别以 6.1g/kg 及 18.1g/kg，每日给药两次，12 周后将小鼠处死，取血液及骨组织进行检测。通过 ELISA 实验检测骨生化指标；通过 Micro-CT 检测骨密度参数及骨小梁参数；通过骨组织 HE 染色观察骨组织病理形态变化；通过 Western blot 检测 Wnt 及 β -catenin 蛋白。结果：实验表明相比于其他组，去势手术组小鼠的 Ca 和 P 的水平明显降低；Micro-CT 结果显示，药物组 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 显著高于去势手术组 ($P < 0.05$)，Tb.Sp 显著低于去势手术组 ($P < 0.05$)；骨组织 HE 染色显示药物组骨小梁的明显多于去势手术组；Western blot 结果显示相比于去势手术组，药物组 Wnt 蛋白及 β -catenin 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。结论：补肾活血法具有良好的防治骨丢失功效，且这种效果是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来调控，该研究为临床使用补肾活血法用于治疗骨质疏松提供理论基础。
关键词：补肾活血法；Wnt； β -catenin；绝经后骨质疏松症

骨质疏松症属于全身代谢性疾病，主要特征为骨小梁结构破坏，全身骨量减少，严重时可导致脆性骨折^[1]。据国家统计局发布的最新数据显示，2020 年我国 60 岁及以上人口占 18.7%，我国已是世界上老年人口绝对数量最多的国家，我国骨质疏松患者数量高达 8000 万左右^[2]。因此，有效的抗骨质疏松手段是至关重要的。

补肾活血汤来源于著作《伤科大成》中的经典方剂，其主要由熟地黄 15g，淫羊藿 15g，杜仲 15g，补骨脂 15g 等组成。有研究显示，补肾活血汤对多种骨科疾病的治疗具有良好的疗效，包括骨折、骨不连及骨质疏松症^[3-5]。田宁晟等人开展了一项临床研究，结果表明补肾活血汤在骨质疏松早期可减少骨代谢，促进骨形成的同时还能抑制骨吸收，具有较高的临床疗效^[6]。尽管，补肾活血法中的中多味药物在现代药理中都有深入研究，其发挥抗骨质疏松活性的内在机理并未探讨。Wnt/ β -catenin 信号通路存在着许多关键的因子，通过调控这些关键因子的表达，能进一步调控成骨细胞的分化及其相关功能，从而导致骨量的变化，因此，Wnt/ β -catenin 信号通路中的各个关键基因，已经成为治疗骨质疏松症等相关疾病的研究热点。本项目是基于前期文献研究的基础上，所开展的进一步深入研究。所以本实验研究选取检测能够在

Wnt/ β -catenin 信号通路上表达的 Wnt、 β -catenin 蛋白进行检测，以评估补肾活血汤对该信号通路的作用机制。同时使用 Micro-CT、ELISA 和 HE 染色对补肾活血法防治骨质疏松的疗效进行评估。项目的开展将进一步揭示我科经验方补肾活血法干预骨质疏松性骨折的作用机制，为骨质疏松性骨折的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

取 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 40 只，购自南昌大学第一附属医院实验动物中心，合格证号：SYXK（赣）2021-0003，小鼠购入后适应性喂养 1 周，检疫 7d 后取检疫合格小鼠，将 40 只小鼠采用随机数字表随机分为 4 组，每组 10 只，对各组小鼠分笼饲养，并且标记 4 组分别为假手术组、去势手术组、补肾活血汤高剂量组、补肾活血汤低剂量组。

1.2 去卵巢小鼠骨质疏松模型构建

术前称重，腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 溶液麻醉成功后，将大鼠卧位于手术台上。备皮后用碘伏消毒后选取大鼠肋后缘下 1.5cm、后正中线旁 15cm 处，从背侧切开皮肤，依次切开皮下组织、筋膜、肌肉组织，用钝性钳剥开皮下组织，进入腹腔，并将卵巢轻轻拖出，在卵巢根部进

行结扎，距离结扎线2毫米处摘除卵巢。假手术组仅切取卵巢旁1cm³大小脂肪组织，不结扎输卵管和切除卵巢，其余处置同上。术后进行缝合。术后3天予大鼠腹腔注射青霉素钠20万单位预防感染，在术后1周确保小鼠活动状态恢复正常后进行灌胃。

1.3 给药方式与剂量

药物剂量按照人与动物药物等效计算公式换算：成人每日给药的生药浓度为0.5g/ml，小鼠每公斤体质量1日用药量（或0.9%氧化钠溶液）=成人用量/70kg*6.3，其中高剂量=等效剂量，低剂量=等效剂量*1/3，对大鼠进行称重，记录体重，根据体重变化修正给药剂量。假手术组、去势手术组：给予0.9%生理盐水。每周称量小鼠体重，并根据体重变化进行药品剂量调整。补肾活血汤高剂量组：给药浓度为18.1g/kg·d，补肾活血汤低剂量组：给药浓度为6.1g/kg·d给药频次及时段：频次：2次/日，时段：9:00AM及5:00PM给药时间：12周。

1.4 标本的获取

注射1%戊巴比妥将小鼠麻醉，取下腔静脉的血保存，随后通过颈椎脱臼法对所有小鼠实施安乐死。分离出小鼠完整股骨。随后用4%多聚甲醛固定液浸泡24小时，保存于70%乙醇溶液中。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 ELISA 检测血清 Ca 及 P

采取各组小鼠的全血后，通过离心提取各组血清，放入-80℃冰箱保存备用，通过ELISA技术检测各组小鼠血清中Ca及P的浓度，操作方法依照说明书进行。

1.5.2 Micro-CT 检测

将获得的股骨进行高分辨率Micro-CT扫描，并进行三维重建。定量分析生长板下方0.5mm区域骨量。分析定量的参数包括以下几个不骨体积分数百分比（BV/TV;%）、小梁数量（Tb.N:mm-1）、小梁厚度（Tb.Th; mm）和小梁分离度（Tb.Sp:mm）。

1.5.3 骨组织切片染色

将股骨固定于多聚甲醛中，在EDTA缓冲液中脱钙，随后使用石蜡进行包埋。然后，使用石蜡切片机进行切片（厚度为5μm）。进行苏木精-伊红（H&E）染色分析骨小梁等结构的变化。

1.5.4 Western blot 检测各组骨组织中 Wnt 及 β-catenin

蛋白表达情况

将骨组织置于预冷的生理盐水中，剔除表面杂质，然后进行研磨。随后转移至离心管中，在100mg骨粉末滴入300μL蛋白提取试剂，混匀后进行冰浴（30min），期间每隔5min用振荡20s。最后在在高速离心机中（12000r/min）离心15min，取上清液即为蛋白。随后将获取的蛋白进行蛋白印迹实验，使用GAPDH作为参照条带。

1.6 统计学方法

获取的结果进行三次重复实验，得到的数据使用SPSS24.0软件计算，结果以均数±标准差表示。使用单因素方差分析法和t检验对结果进行分析。当P<0.05时被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组小鼠生化指标的比较

采取不同组小鼠全血后进行ELISA实验，结果表明：去势手术组小鼠血清中的Ca及P水平明显低于假手术组（p<0.05）；同时在低剂量和高剂量药物组中Ca及P水平明显高于去势手术组，差异具有统计学意义（p<0.05）。见图1

2.2 补肾活血汤对不同组小鼠骨参数的影响

将各组小鼠中获取的股骨远端标本进行Micro-CT扫描，对相关骨参数进行分析，结果表明：去势手术组BV/TV、Tb.N、Tb.Th均低于假手术组，差异具有统计学意义（p<0.05），同时去势手术组的Tb.Sp明显高于假手术组（p<0.05）；相反，在低剂量和高剂量药物组中BV/TV、Tb.N、Tb.Th明显高于去势手术组，且Tb.Sp明显低于去势手术组，差异具有统计学意义（p<0.05）。见图2

2.3 不同组小鼠骨组织 H&E 染色情况

通过对各组小鼠股骨组织切片，并行H&E染色，观察骨结构及骨小梁情况，结果表明：去势手术组小鼠中的骨小梁数量稀疏，明显少于其他三组小鼠骨组织情况。见图3

2.4 不同小鼠骨组织 Wnt、β-catenin 蛋白表达情况

将从各组小鼠骨组织中提取的蛋白进行Western blot分析，结果显示：去势手术组中Wnt和β-catenin蛋白表达明显低于假手术组，差异具有统计学差异（p<0.05）；在低剂量和高剂量药物组中Wnt和β-catenin蛋白表达明显高于趋势手术组，差异具有统计学差异（p<0.05），见图4

3 讨论

骨质疏松是一种全身代谢性骨病，其特征为骨结构破坏、骨密度下降、骨脆性增加，易导致脆性骨折。在50岁以上的人群中，约有62%的男性和72%的女性患有骨质疏松症和骨质减少症^[7]。流行病学调查显示，骨质疏松症在美国影响着超过4400万人^[8]。目前，骨质疏松症被世界卫生组织(WHO)列为仅次于心血管疾病的第二大对人类健康最危险的慢性疾病。随着骨质疏松症的日益流行，随之而来的脆性骨折治疗已成为骨科医生和社会面临的主要挑战^[11]。因此，寻找有效的骨质疏松症治疗策略是至关重要和迫切的。骨重塑依靠骨吸收和骨形成维持动态平衡状态，这两种状态主要由破骨细胞和成骨细胞介导。一旦骨重塑的平衡被破坏，就会发生各种骨疾病，如骨硬化、关节炎和骨质疏松症^[10]。在骨质疏松症的发展过程中，破骨细胞和成骨细胞活性的累积失衡可导致骨量减少。目前临床上常用的治疗骨质疏松的药物主要是双磷酸盐类、降钙素类和雌激素类药物。然而，据报道，这些药物在长期服用后会产生严重的副作用，如发热、骨痛、恶心、低钙血症、高钙血症、子宫内腺癌和乳腺癌以及心血管疾病^[11]。因此，迫切需要寻找新的替代治疗策略来治疗骨质疏松症。

我们在前期文献研究的基础上，总结提取出以补益肝肾、活血益气为治法的补肾活血法用于骨质疏松症特色治疗，以该治法凝练出补肾活血汤，目前临床中以该方治疗骨质疏松症取得良好疗效。因此，在本实验中进一步探寻该方治疗骨质疏松症的治疗效果及作用机理。众所周知，血清Ca和P能间接反应骨代谢情况，当机体处于骨质疏松状态时，Ca及P水平均下降。在本实验中发现去卵巢小鼠模型中血清Ca和P水平明显降低，而在使用补肾活血汤后，Ca和P水平明显上升，恢复到正常水平，间接说明补肾活血汤具有良好的调节骨代谢水平，对抗骨质疏松治疗具有积极作用。目前，骨参数是评估骨质疏松程度最直观的指标^[12]。在骨质疏松的病理状态下，骨重塑异常，破骨细胞过度活跃导致骨小梁数量和密度减少，骨皮质变薄，其相关骨参数包括BV/TV、Tb.N、Tb.Th明显下降，Tb.Sp上升。在我们的研究中也得到验证，在去势小鼠组中骨小梁的密度明显低于假手术组BV/TV、Tb.N、Tb.Th明显低于空白对照组，Tb.Sp则明显高于空白对照组。在药物组中，小鼠骨参数BV/TV、Tb.N、Tb.Th明显上升，Tb.Sp明显下降，表明补肾活血汤

能明显改善骨结构，增加骨小梁的数量与密度，具有明显的骨保护作用，且这种积极作用在高药物组更加明显。进一步将各组骨组织切片，进行HE染色，结果也显示补肾活血汤能明显提升骨小梁的数量。综上所述，补肾活血汤具有优良的抗骨质疏松效果。

Wnt/ β -catenin信号通路是骨代谢平衡的关键调控信号通路，影响Wnt/ β -catenin途径的因素众多，包括激活蛋白和一些抑制剂，这些因子的共同作用靶点都是 β -catenin，其在成熟的成骨细胞和骨细胞中失活可增加破骨细胞分化和骨吸收，从而导致骨量降低。激活骨细胞中的Wnt/ β -catenin信号可增加成骨细胞的增殖、分化，从而促进骨量增加^[13]。为了验证补肾活血汤是否是通过该信号通路调控骨代谢，本实验检测了各组小鼠中Wnt和 β -catenin蛋白的表达情况。结果显示，在去势小鼠中这两种蛋白表达均较假手术组低。而在药物组，Wnt和 β -catenin蛋白的表达量均增加，与假手术组的表达量接近，提示补肾活血汤可能是主要通过Wnt/ β -catenin信号通路调节骨代谢，增加成骨细胞活性，促进骨量增进，从而实现抗骨质疏松的效果。

4 结论

综上所述，补肾活血汤治疗绝经后骨质疏松效果显著，不仅能提升体内Ca和P的水平，还能增加骨小梁的数量与密度，具有良好的骨保护作用。进一步的蛋白印迹实验提示其治疗绝经后骨质疏松的机理是通过Wnt/ β -catenin信号通路介导，该实验结果为临床治疗绝经后骨质疏松症提供新的思路与想法。

参考文献：

- [1] FARDELLONE P, BARNIEH L, QUIGNOT N, et al. Exploring the treatment gap among patients with osteoporosis-related fractures in France [J]. Archives of osteoporosis, 2022, 17(1): 29.
- [2] WU H, LIN X, LONG Y, et al. Calcitonin gene-related peptide is potential therapeutic target of osteoporosis [J]. Heliyon, 2022, 8(12): e12288.
- [3] 王德, 刘森, 李阳, 等. 补肾活血汤联合骨搬运治疗胫骨骨折后感染性骨不连的临床疗效观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(3): 62.
- [4] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南 [J]. 中医正骨, 2023, 35(1): 1.

[5] 向晓东, 林玲, 刘菊. 补肾活血汤及加减方治疗骨质疏松症研究进展 [J]. 中国社区医师, 2023, 39 (26): 8.

[6] 王德, 刘森, 李阳, 等. 补肾活血汤联合骨搬运治疗胫骨骨折后感染性骨不连的临床疗效观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(03):62.

[7] LI J, AYOUB A, XIU Y, et al. TGF β -induced degradation of TRAF3 in mesenchymal progenitor cells causes age-related osteoporosis [J]. Nat Commun. 2019 Jun 26;10(1):2795.

[8] NG KW, MARTIN TJ. New therapeutics for osteoporosis [J]. Curr Opin Pharmacol. 2014 Jun;16:58-63.

[9] YE C, HOU W, CHEN M, et al. IGFBP7 acts as a negative regulator of RANKL-induced osteoclastogenesis and oestrogen deficiency-induced bone loss [J]. Cell Prolif. 2020 Feb;53(2):e12752.

[10] RODAN GA, MARTIN TJ. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. Science. 2000 Sep 1;289(5484):1508-14.

[11] WANG Q, YAO L, XU K, et al. Madecassoside inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis by suppressing RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. J Cell Mol Med. 2019 Jan;23(1):380-394.

[12] YANG X, YANG X, LUO P, et al. Novel one-pot strategy for fabrication of a pH-Responsive bone-targeted drug self-frame delivery system for treatment of osteoporosis [J]. Mater Today Bio. 2023 Jun 3;20:100688.

[13] HUANG K, CAI S, FU T, et al. Wnt10b regulates osteogenesis of adipose-derived stem cells through Wnt/ β -catenin signalling pathway in osteoporosis [J]. Cell Prolif. 2024 Jan;57(1):e13522.

作者简介:

赖福崇 (1991—), 男, 汉族中医骨伤科专业硕士, 南昌大学第一附属医院骨科医院; 医师; 研究方向: 骨质疏松;

王可欣 (2004—), 女, 汉族, 学士, 宜春学院美容医学院; 学生; 研究方向: 骨质疏松;

郭润生 (1984—), 男, 汉族, 在职硕士研究生, 南昌大学第一附属医院骨科医院; 副主任医师; 研究方向: 骨质疏松。

基金项目:

江西省中医药管理局科技计划项目, 编号 SZYYB20225191。