

· 中(蒙)医药论坛 ·

蒙药亚森希莫-I 治疗绝经后骨质疏松症的机制研究

肖吉日本图^{1,2}, 郭 杨^{3*}

(1. 南京中医药大学 第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2. 内蒙古医科大学 蒙医药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059;
3. 南京中医药大学 骨组织修复与重建新技术实验室, 江苏 南京 210023)

【摘要】目的 本文探讨口服不同剂量的蒙药亚森希莫-I 对去势所致大鼠骨质疏松的作用机制。**方法** 选取3月龄SD大鼠60只, 均为雌性, 体质量约(220±20)g, 按随机数表法分为假手术组、模型组(均用等量生理盐水)、阳性对照组(骨肽片400 mg·kg⁻¹)、蒙药低剂量组(200 mg·kg⁻¹)、蒙药中剂量组(400 mg·kg⁻¹)、蒙药高剂量组(800 mg·kg⁻¹), 每组10只。制作模型成功后, 各组连续灌胃12周, 进行骨密度、骨生物力学、组织病理形态、Wnt1、BMP2等指标检测。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠骨密度降低, 骨质变细、断裂, BMP2蛋白和Wnt1含量明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与模型组相比, 蒙药组和阳性对照组大鼠骨密度和骨量均增高, 骨生物力学载荷与刚度增加, 骨组织形态密集, Wnt1、BMP2基因表达明显, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与阳性对照组比较, 蒙药组大鼠各项指标无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 蒙药亚森希莫-I 改善骨质疏松症可能与Wnt1/BMP2信号通路有关。

【关键词】 蒙药亚森希莫-I; 绝经后骨质疏松症; Wnt1/BMP2信号通路

中图分类号: R917

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)03-0246-05

骨质疏松症是一种以骨量减少, 骨组织显微结构退化破坏, 导致骨强度下降、骨脆性增加, 使得骨折危险性增加为特征的全身性代谢性骨病, 临床上可分为原发性、继发性、特发性骨质疏松症^[1]。流行病学调查显示, 其发病率在40岁以上女性人群中约占15.7%, 50岁以上则高达67.3%, 骨质疏松症的发病趋势与绝经年龄曲线明显呈正相关^[2]。

人体骨骼是由成骨细胞主导的骨形成和破骨细胞主导的骨吸收维持平衡。成骨细胞主要由内外骨膜和骨髓中基质内的间充质始祖细胞分化而来, 能特异性分泌多种生物活性物质, 调节并影响骨形成和重建过程。破骨细胞起源于血系单核-巨噬细胞系统, 是骨吸收的主要功能细胞, 在骨发育、生长、修复、重建中具有重要的作用^[3]。如果骨吸收大于骨形成, 则出现骨丢失, 骨皮质变薄、骨小梁结构变薄或破坏, 可引发骨质疏松症。

Wnt是促进成骨细胞祖细胞增殖和分化的合成代谢因子^[4]。Frizzled蛋白与LRP-5/6蛋白之间形成了一种特异性的受体复合物, 这种复合物可以与低密度脂蛋白受体相结合, 从而释放β连环蛋白, 并

使其变得更加稳定^[5]。β-catenin被转移到细胞核, 并在转录因子4(TCF-4)或淋巴样增强剂结合因子1(LEF-1)的帮助下调控其靶基因Runx2^[6]。还能够促使骨髓间充质干细胞(MSCs)的分化, 抑制脂类作用结合蛋白α和过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ), 从而阻止脂肪源性干细胞向肌肉蛋白质的转化^[7]。通过分泌Frizzled相关蛋白1(Sfrp1)抑制破骨细胞活性, Sfrp1竞争性结合RANKL, 减少骨吸收, β-Catenin抑制OPG水平^[8]。成骨细胞祖细胞中β-catenin水平降低导致骨丢失^[9]。胰岛素样生长因子1(IGF-1)通过影响β-catenin的稳定性和转录活性来中断β-catenin蛋白水解降解活性^[10]。已证实Notch与Wnt有关, 并通过β-catenin的降解过程起作用^[11]。硬核蛋白(Sclerostin)是Wnt信号的拮抗剂, 通过与LRP5/6结合在骨细胞中高表达^[12]。这一过程竞争性地影响Wnt和LRP5/6的结合。Wnt/β-catenin是成骨细胞分化和活动的关键信号通路。BMPs是一个蛋白质因子, 它可以影响骨形态发生, 并且属于转化生长因子β(TGF-β)的超家族分子, 在细胞内起到主要功能^[13]。因此, 本研究的主要目的是

收稿日期: 2022-12-17; 修回日期: 2023-02-21

基金项目: 2022年江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX_1922); 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2020MS08134)

第一作者: 肖吉日本图(1981—), 男, 2020级在读博士研究生。E-mail: 20203017@njucm.edu.cn

*通信作者: 郭杨, 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中医骨伤科学。E-mail: drguoyang@njucm.edu.cn

通过动物实验科学论证蒙药亚森希莫-I通过 Wnt1、BMP2蛋白抑制骨质疏松症发生发展的机制。

1 材料与分组

1.1 材料与设备

动物:3月龄 SPF级SD雌鼠共60只,体质量为 (250 ± 20) g。动物合格证书:MCAK2017-0118(南京中医药大学动物伦理委员会的批准:A311804);动物合格证书:BCSK(沪)2022-0214,由南京江宁区青龙山动物实验中心提供。

药物:蒙药亚森希莫-I[万年灰(制)100 g、萆薢60 g、紫硃砂10 g、沙棘10 g、山柰10 g粉碎,过筛,混匀,凉开水泛丸,打光,干燥即得](内蒙古蒙药股份有限公司,国药准字:MG1000451);骨肽片(南京新百药业有限公司,国药准字:H20055876);Wnt1、Bmp2引物购于中国Proteintech公司;HE染液、脱钙液、二甲苯、多聚甲醛、切片石蜡购于上海源叶生物科技有限公司。

仪器:倒置荧光显微镜AMI1100B型(德国Leica);生物力学测试系统Acumen3型(美国MTS);骨密度成像系统Quantum GX型(美国PerkinElmer);全自动硬组织切片机DR2205型(德国Leica);全自动组织染色机MB-500型(金华益迪);全能型蛋白转印系统Trans-Blot Turbo(美国Bio-Rad)。

1.2 分组

所有大鼠按随机数表法分为6组:假手术组、模型组、蒙药低剂量组、蒙药中剂量组、蒙药高剂量组、阳性对照组。每组10只大鼠。

2 模型制备及给药方法

选用异氟烷吸入式麻醉后,于脊柱两侧旁开约1.5 cm处,行3 cm左右的切口,逐层剪开后找出卵巢,结扎切除,逐层缝合。假手术组大鼠行切除肠系膜脂肪组织后缝合;其余各组,均找出卵巢,结扎切除,逐层缝合,造骨质疏松症模型。术后3 d伤口涂抹青霉素软膏预防伤口感染,8周后检测骨密度相关指标,通过观察其体质量变化、体毛是否枯疏、反应是否迟钝、动情周期,以及子宫内膜有无螺旋小动脉等指标验证造模成功与否。

大鼠给药剂量是由人体与大鼠体表换算法得出。蒙药低剂量组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、蒙药中剂量组($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、蒙药高剂量组($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性对

照组($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、假手术组与模型组(等剂量生理盐水),连续灌胃12周后,取双侧股骨放入液氮中保存。

3 样本检测方法

3.1 骨密度及骨骼力学检测

采用双能骨密度仪观察大鼠骨结构和矿物质变化。应用双能骨密度成像系统(Analyze98)进行拍摄和小梁形态分析。空间分辨率为 $11 \mu\text{m}$ (X射线源90 kV,394 μA ;用1 mm滤镜)扫描右侧股骨标本。然后分别用内置软件X-vox和XAn重建图像。将左侧股骨标本提前从生理盐水取出,使用镊子将标本固定在生物力学测试仪上,调整跨距与加载速度分别为1.5 mm、0.01 mm/s,直至股骨最终断裂为实验终点。根据仪器所记载的载荷-位移曲线,计算出最大负荷、最大挠度和刚度。

3.2 HE染色

右侧股骨4%多聚甲醛固定36 h后,PBS缓冲液冲洗2次,每次15 min,放入EDTA脱钙液中,置于室温中脱钙7周,直至大头针能刺穿股骨后停止脱钙。随后进行脱水、透明、包埋、切片等步骤,按HE染色步骤染色后,显微镜下观察骨形态变化。

3.3 PCR检测

检测各组细胞及组织Wnt1、BMP2基因表达差异,提取细胞总RNA,以BCA蛋白测定试剂盒测定样本浓度,加入上样缓冲液定量分装,进行反转录,加入相应的(Wnt1、BMP2)引物检测不同样品相应基因表达情况;经计算机图像分析仪扫描,并行ct值测定及分析。

4 统计学方法

使用SPSS 23.00统计软件对数据进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,秩和检验分析多组间差异, t 检验进行两组间比较,检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

5 结果

5.1 骨密度及骨骼力学变化

骨密度仪结果显示亚森希莫-I可明显提高大鼠骨小梁密度,同时改善骨微结构参数,其中,中、高剂量组效果优于低剂量组(见图1);亚森希莫-I可提高骨骼力学的载荷与刚度,差异有统计学意义($P < 0.05$),但其最大位移差异无统计学意义(见表1)。

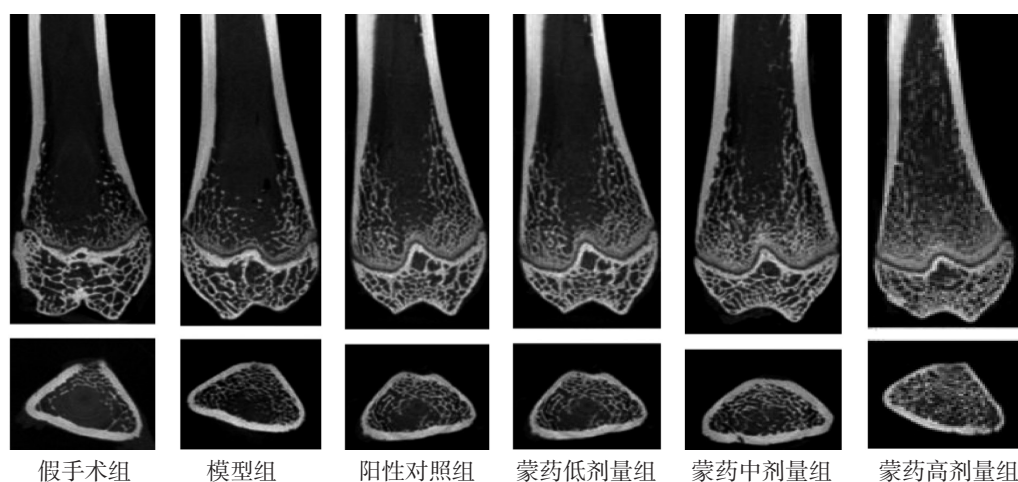


图1 骨密度矢状面与冠状面图

表1 蒙药亚森希莫-I对大鼠骨骼力学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数(n)	最大载荷(N)	最大刚度(N/mm)	最大位移(mm)
假手术组	10	215.67 ± 10.52	134.40 ± 13.87	0.56 ± 0.14
模型组	10	104.58 ± 18.65*	103.67 ± 11.35**	0.87 ± 0.23
阳性对照组	10	190.32 ± 14.05	125.00 ± 11.19	0.81 ± 0.90
蒙药低剂量组	10	174.78 ± 31.11	127.13 ± 19.41	0.65 ± 0.19
蒙药中剂量组	10	179.18 ± 15.86 [#]	128.50 ± 15.80 ^{##}	0.89 ± 0.36
蒙药高剂量组	10	189.21 ± 19.90	129.30 ± 14.91	0.91 ± 0.37
F		15.190	4.104	1.020
P		< 0.01	< 0.01	> 0.05

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

5.2 骨组织病理学形态的影响

HE染色结果显示假手术组大鼠骨小梁排列紧密, 结构清晰, 空腔较小; 模型组骨小梁断裂明显,

结构错乱, 空腔密集; 蒙药中、高剂量组可明显改善骨小梁病理变化, 与模型组相比骨小梁断裂较少, 排列较为紧密, 空腔减少(见图2)。

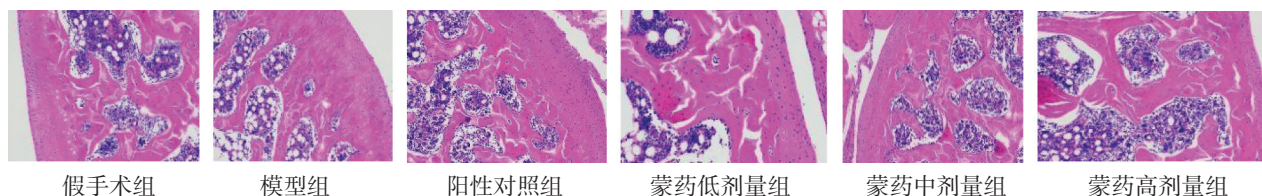


图2 各组股骨组织病理染色结果(100x)

5.3 Wnt1、BMP2基因表达情况

PCR检测各组股骨组织中Wnt1、BMP2基因表达水平结果显示, 模型组中Wnt1、BMP2基因水平较

假手术组明显减低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而蒙药组可改善这一状况, 结果差异具有显著统计学意义($P < 0.05$)(见表2, 图3)。

表2 各组大鼠Wnt1及BMP2基因水平检测结果 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	只数(n)	Wnt1/GAPDH	BMP2/GAPDH
假手术组	10	18.12 ± 0.04	18.10 ± 0.03
模型组	10	15.34 ± 0.12*	15.45 ± 0.01**
阳性对照组	10	17.12 ± 0.21	17.17 ± 0.20
蒙药低剂量组	10	17.41 ± 0.17	17.32 ± 0.16
蒙药中剂量组	10	18.91 ± 0.19 [#]	18.82 ± 0.17 ^{##}
蒙药高剂量组	10	19.01 ± 0.07	19.03 ± 0.06
Ct值		17.32	16.89
P		< 0.01	< 0.01

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

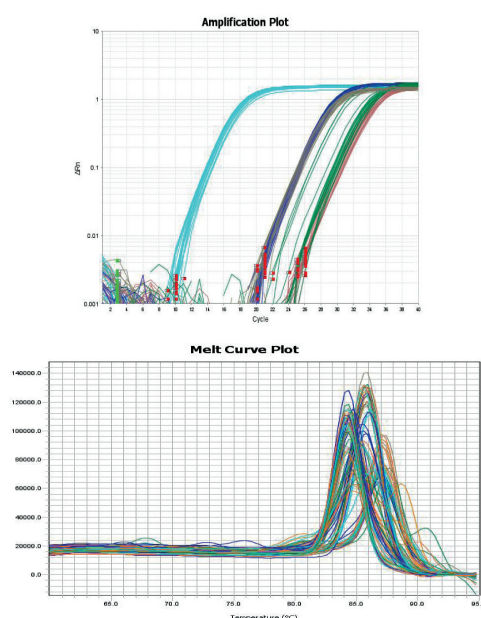


图3 大鼠Wnt1及BMP2基因水平检测结果

6 讨论

流行病学调查显示,在老龄化社会背景下,骨质疏松症越来越成为危害人类健康的重要隐患,脆性骨折是最大的并发症。现代医学研究显示,雌激素疗法或其他药物治疗该疾病的同时具有较大毒副作用,如乳腺癌、子宫内膜癌等^[14]。内蒙古气候寒冷,再加上特殊的饮食习惯,导致骨质疏松症患者数量比国内其他省份多。蒙医蒙药具有区域特色,在治疗骨质疏松症方面形成独特的理论体系,并深受广大牧民的信赖。

蒙医基础理论指出,“三根平衡,七素清浊代谢有效运行,骨精华生成顺利”是人体骨骼健康之本。若七素清浊代谢障碍,骨源不足,不能濡养骨骼,而致骨骼微结构破坏,或骨多孔,容易引发骨质疏松症。因此,研发促进清浊代谢、补精补暖、增强“希拉”功能的药物,对治疗绝经后骨质疏松具有重要意义^[15]。临床研究发现,蒙药亚森希莫-I疗效较佳,该方是以万年灰(制)为君药,萆薢、紫硃砂共为臣药,三药配伍,具有增强胃火、分解精微和糟粕、补肾健脾功效;佐以沙棘、山柰,以治其标。其具有补暖补精功效,缓解骨质疏松引起的骨骼肌肉疼痛,提高骨密度和骨骼肌肉力量。据药理学研究发现,萆薢、沙棘、山柰有效物质可改善线粒体损伤、抗氧化、提高免疫力,万年灰及萆薢及其活性化合物通过抑制破骨细胞分化和促进成骨细胞生成,在

骨质疏松症中发挥骨保护作用^[16]。从沙棘中分离出来的有效成分通过减少体内的活性氧发挥抗骨质疏松的作用^[17]。本课题研究结果显示,大鼠骨小梁矢状面与冠状面二维结构图,蒙药组大鼠骨密度和骨生物力学明显高于模型组;模型组 Wnt1、BMP2 低于假手术组,而蒙药亚森希莫-I能够改善这一现象。组织病理学检测也进一步证明该药物能够有效改善骨质含量。由于经费不足,本研究尚未完全揭示骨质疏松症的治病机制。课题组将进一步对该药物促进成骨细胞增殖、抑制破骨细胞活性方面进行比较研究,验证该药物的作用靶点,为专门治疗骨质疏松症的蒙药新药研发提供理论参考。

参考文献

- [1]景凯,刘瑞,利伟,等. 肠道微生物菌群对骨质疏松症的影响机制[J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(2): 218-220+224
- [2]Li K, Zhang X, He B, et al. Geraniin promotes osteoblast proliferation and differentiation via the activation of Wnt/ β -catenin pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99(5): 319-324
- [3]Martínez GN, Ugartondo N, Grinberg D, et al. Wnt Pathway Extracellular Components and Their Essential Roles in Bone Homeostasis [J]. Genes (Basel), 2022, 13(1): 138
- [4]Kaban I, Kaban A, Tunca AF, et al. Effect of pomegranate extract on vagina, skeleton, metabolic and endocrine profiles in an ovariectomized rat model [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(6): 1087-1091
- [5]Bachagol D, Joseph GS, Ellur G, et al. Stimulation of liver IGF-1 expression promotes peak bone mass achievement in growing rats: a study with pomegranate seed oil [J]. J Nutr Biochem, 2018, 52(5): 18-26
- [6]Huang Q, Gao B, Wang L, et al. Ophiopogonin D: A new herbal agent against osteoporosis [J]. Bone, 2015, 74(10): 18-28
- [7]Peng X, He J, Zhao J, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharide promotes osteoblastic differentiation through the ERK/GSK-3 β /Wnt/ β -catenin signaling pathway in vitro [J]. Rejuvenation Res, 2018, 21(1): 44-52
- [8]Huybrechts Y, Mortier G, Boudin E, et al. WNT signaling and bone: lessons from skeletal dysplasias and disorders[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11(3): 165
- [9]Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction[J]. Trends Genet, 2006, 22(12): 678-689
- [10]Bao Q, Chen S, Qin H, et al. Constitutive β -catenin activation in osteoblasts impairs terminal osteoblast differentiation and bone quality[J]. Exp Cell Res, 2017, 350(1): 123-131
- [11]Gupta A, Chatree S, Buo AM, et al. Connexin43 enhances Wnt and PGE2-dependent activation of β -catenin in osteoblasts[J]. Pflugers Arch, 2019, 471(9): 1235-1243

(下转第265页)

辅助就诊率偏低,也可能是少数民族人口数量远低于汉族人口数量,影响了数据,增加了结果偏差。此外,我们对混杂因素,比如不可控的卵巢储备功能因素和胚胎质量进行多变量分析时记录数据不充分。但随着我区基层信息网络覆盖面的扩大,加强辅助生殖技术的普及及宣传力度的增大,可以使少数民族地区更加有效、快速地了解辅助生殖技术,使蒙古族患者来院就诊时间提前,解决生育难题。

参考文献

- [1] Isabel G, Amelia S, Christopher W, et al. Infertility in the Midwest: perceptions and attitudes of current treatment[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2021, **225**(1):61.e1–61.e11
- [2] Shah MS, Caballes M, Lathi RB, et al. In vitro fertilization outcomes after fresh and frozen blastocyst transfer in South Asian compared with Caucasian women[J]. *Fertility and Sterility*, 2016, **105**(6):1484–1487
- [3] McQueen DB, Schufreider A, Lee SM, et al. Racial disparities in vitro fertilization outcomes[J]. *Fertil Steril*, 2015, **104**(2):398–402
- [4] Jayaprakasan K, Pandian D, Hopkisson J, et al. Effect of ethnicity on live birth rates after in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection treatment[J]. *BJOG*, 2014, **121**(3):300–306
- [5] Lamb JD, Huddleston HG, Purcell KJ, et al. Asian ethnicity is associated with decreased pregnancy rates following intrauterine insemination[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, **19**(2):252–256
- [6] Lu J, Zhang L, Zhai Q, et al. Chinese gut microbiota and its associations with staple food type, ethnicity, and urbanization[J]. *NPJ Biofilms Microbiomes Actions*, 2021, **7**(1):71
- [7] Zhang T, Li Q, Dong B, et al. Genetic Polymorphism of Drug Metabolic Gene CYPs, VKORC1, NAT2, DPYD and CHST3 of Five Ethnic Minorities in Heilongjiang Province, Northeast China[J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, **14**:1537–1547
- [8] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. *JAMA*, 2017, **317**(24):2515–2523
- [9] Duan S, Guo Y, Chen X, et al. Genetic mutations in patients with nonsyndromic hearing impairment of minority and Han Chinese ethnicities in Qinghai, China[J]. *J Int Med Res*, 2021, **49**(4):3000605211000892
- [10] 赵杰, 刘芳, 陈秀娟. 中成药对PCOS病人行体外受精-胚胎移植中的效果研究[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2018, **40**(5):461–464
- [11] 陈红, 莎如拉, 马玉珍, 等. 比较体外受精-胚胎移植中子宫内膜形态不良的两种预处理[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2022, **44**(5):502–506
- [12] 刘芳, 赵杰, 陈秀娟, 等. 不同方案和移植前激素对移植解冻后生长胚胎妊娠结局的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, **26**(23):95–98
- [13] Dhillon RK, Smith PP, Malhas R, et al. Investigating the effect of ethnicity on IVF outcome [J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2015, **31**(3):356–363
- [14] Meera SS, Marissa C, Ruth BL, et al. In vitro fertilization outcomes after fresh and frozen blastocyst transfer in South Asian compared with Caucasian women[J]. *Fertil Steril*, 2016, **105**(6):1484–1487
- [15] Jain T. Racial disparities and in vitro fertilization (IVF) treatment outcomes: time to close the gap[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, **18**(1):112
- [16] Richardson AL, Baskind NE, Karuppusami R, et al. Effect of deprivation on in vitro fertilization outcome: a cohort study[J]. *BJOG*, 2020, **127**(4):458–465
- [17] 李斌业, 张永田, 曾湘晖, 等. 青海地区不同民族辅助生殖技术结局分析[J]. *中国妇幼保健*, 2019, **34**(13):3031–3033
- [18] 林锦丽, 张林昊. 民族差异对辅助生殖治疗结局的影响: 单中心回顾分析[J]. *生殖医学杂志*, 2018, **27**(7):685–688
- [19] 内蒙古人民政府网. https://www.nmg.gov.cn/asnmng/yxnmng/mzrk/202105/t20210520_1594676.html. 2021.5.20

(上接第249页)

- [12] Jin Z, Da W, Zhao Y, et al. Role of skeletal muscle satellite cells in the repair of osteoporotic fractures mediated by β -catenin[J]. *Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, **13**(2):1403–1417
- [13] Hilton MJ, Tu X, Cook J, et al. Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development[J]. *Development*, 2005, **132**(19):4339–4251
- [14] 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
- [15] 图布新, 色·色日道尔吉, 色·道尔吉巴图, 等. 基于蒙医整体观探析原发性骨质疏松症的防治[J]. *中国民族医药杂志*, 2020, **26**(2):68–69
- [16] 肖吉日本图, 宁吉德玛. 基于wnt1-catenin-bmp2信号通路蒙药治疗骨质疏松症的作用及机制[J]. *中国蒙医药杂志*, 2019, **4**(15):97–101
- [17] 王财吉拉夫, 白音夫. 蒙药亚森特吉格勒抗骨痛的治疗体会[J]. *中国蒙医药杂志*, 2021, **11**(9):23–25