中图分类号:R932;R285.5　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2023)07－0056－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.07.012

坚骨胶囊调控Wnt/β－联蛋白信号通路对骨质疏松症模型大鼠的作用及机制*

金颖慧,闫国强,张　倩,张俊艳,董晶晶

(河北省沧州中西医结合医院,河北 沧州　061000)

摘要:目的　基于Wnt/β－联蛋白(β－catenin)信号通路探讨坚骨胶囊对骨质疏松症模型大鼠的作用及机制。**方法**　将50只Wistar雌性大鼠随机分为正常对照组,模型对照组,坚骨胶囊高、中、低剂量组[2 184,1 092,546 mg/(kg•d)],各10只。除正常对照组外,其余各组大鼠均灌胃100 mg/kg维甲酸复制骨质疏松症模型,每天1次,连续30 d。坚骨胶囊高、中、低剂量组大鼠灌胃相应剂量药物,正常对照组和模型对照组大鼠均灌胃纯化水8 mL/kg,每天1次,连续30 d。检测各组大鼠血清的生化指标Ca^{2+}、Mg^{2+}、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH－Px)、总抗氧化能力(T－AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(ALP)水平;利用Micro－CT仪记录骨微结构,并检测大鼠股骨微结构指标[远心端感兴趣区结构模型指数(SMI)、骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨表面与骨体积比(BS/BV)、骨小梁数量(TbN)、骨小梁厚度(TbTh)、骨小梁分离度(TbSp)];采用免疫印迹(Western blot)法检测股骨组织中细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、β－catenin、低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5)、淋巴增强因子(LEF)的蛋白表达水平。**结果**　Micro－CT仪检测结果显示,坚骨胶囊高剂量组大鼠骨小梁结构最完整,与正常对照组股骨远心端骨小梁多呈板状、致密均匀接近。与模型对照组比较,坚骨胶囊中、高剂量组大鼠血清中MDA,GSH－Px,SOD水平均明显升高($P<0.05$),ALP水平均明显降低($P<0.05$);坚骨胶囊高剂量组大鼠股骨微结构中BMD,BV/TV,BS/BV,TbN,TbTh均明显升高,SMI和TbSp均明显降低($P<0.05$);坚骨胶囊高剂量组大鼠股骨组织中LRP5,β－catenin,LEF,CyclinD1蛋白表达均明显上调($P<0.05$)。**结论**　坚骨胶囊能预防维甲酸诱导的大鼠骨质疏松,其作用机制可能与激活Wnt/β－catenin信号通路及其基因蛋白表达有关。

关键词:坚骨胶囊;骨质疏松症;Wnt/β－联蛋白信号通路;维甲酸;作用机制

Effect and Mechanism of Jiangu Capsules on Osteoporosis Model Rats by Regulating Wnt/β－Catenin Signaling Pathway

JIN Yinghui, YAN Guoqiang, ZHANG Qian, ZHANG Junyan, DONG Jingjing

(Hebei Cangzhou Hosptial of Integrated TCM－WM, Cangzhou, Hebei, China　061000)

Abstract: Objective　To investigate the effect and mechanism of Jiangu Capsules on the osteoporosis model rats based on the Wnt/β－catenin signaling pathway. **Methods**　A total of 50 female Wistar rats were randomly divided into the normal control group, the model control group, the Jiangu Capsules high－, medium－ and low－ dose groups [2 184, 1 092, 546 mg/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for the normal control group, the rats in the other groups were given 100 mg/kg of tretinoin by gavage to replicate the osteoporosis model, once a day, for 30 d. The rats in the Jiangu Capsules high－, medium－ and low－ dose groups were given corresponding doses of drugs by gavage, and the rats in the normal control group and the model control group were given 8 mL/kg of purified water by gavage, once a day, for 30 d. The levels of serum biochemical indexes Ca^{2+}, Mg^{2+}, malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH－Px), total antioxidant capacity (T－AOC), superoxide dismutase (SOD) and alkaline phosphatase (ALP) in each group were detected. The Micro－CT was used to record the femoral microstructure and detect the related indexes [structural model index (SMI), bone mineral density (BMD), bone volume/total volume (BV/TV), bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular number (TbN), trabecular thickness (TbTh), trabecular separation (TbSp) at distal region of interest]. The Western blot was used to detect the expression levels of CyclinD1, β－catenin, low－density lipoprotein receptor－related protein 5 (LRP5) and lymphoid enhancing factor (LEF). **Results**　The results of Micro－CT showed that the trabecular structure was the most complete, and the trabecular at the distal end of the femur in the Jiangu Capsules high－dose group was mostly plate－like, dense and uniform, which was similar to that in the normal control group. Compared with those in the model control group, the levels of MDA, GSH－Px and SOD in serum of rats in the Jiangu Capsules medium－ and high－ dose groups were significantly higher ($P<0.05$), the ALP level in the Jiangu Capsules medium－ and high－dose groups was significantly lower ($P<0.05$). Compared with those in the model control group, BMD, BV/TV, BS/BV, TbN and TbTh in the femoral microstructure of rats in the Jiangu Capsules high－dose group were significantly higher, while SMI and TbSp in the Jiangu

*基金项目:河北省中医药管理局[2020518]。

第一作者:金颖慧,女,满族,硕士,主管中药师,研究方向为中药制剂开发,(电子信箱)394307477@qq.com。

Capsules high - dose group were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in the model control group, the expression levels of LRP5, β - catenin, LEF and CyclinD1 proteins in femoral tissue of rats in the Jiangu Capsules high - dose group were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Jiangu Capsules can prevent the osteoporosis of rats induced by tretinoin, and its mechanism may be related to the activation of Wnt / β - catenin signaling pathway and the expression of related proteins.

Key words: Jiangu Capsules; osteoporosis; Wnt / β - catenin signaling pathway; tretinoin; mechanism

骨质疏松症是一种全身慢性代谢疾病，主要分为原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症和特发性骨质疏松症，主要特征为骨量减少、骨微结构损坏和骨脆性增加[1]，多见于中老年人，尤其是绝经后女性。原发性骨质疏松症最常见，包括绝经后骨质疏松症（PMOP）及老年性骨质疏松症，其中 PMOP 占大多数[2]。研究发现，Wnt / β - 联蛋白（β - catenin）信号通路是治疗骨质疏松症的潜在靶点，是平衡骨形成和骨吸收、刺激成骨细胞增殖、维持骨组织内部稳态的关键信号通路[3]。坚骨胶囊由黄芪、三七、制川乌、制草乌、醋乳香、醋没药、川芎、红花等组方，具有补肾益气、祛瘀止痛功效，对气虚血瘀、肝肾亏损引起的骨质疏松、髌骨劳损、髌骨软化等症有较好的临床疗效。本研究中以维甲酸复制了骨质疏松模型大鼠，考察坚骨胶囊对大鼠骨质疏松的预防作用，并基于 Wnt / β - catenin 信号通路探讨相关作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器：Cobas 6000 型全自动生化免疫分析仪（德国罗氏公司）；056 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；GENIUS 5K 型电动组织匀浆器（美国 Fluka 公司）；Fresco 型低温冷冻离心机（美国 Thermo 公司）；Sky can1076 型 Micro - CT 仪（上海赛新生物科技有限公司）。

试药：坚骨胶囊（医院制剂，批号为 191107，规格为每粒 0.35 g）；维甲酸（大连美伦生物科技有限公司，批号 170510）；细胞周期蛋白 D1（CyclinD1，批号 YM3463）、β - catenin（批号 YM3403）、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5（LRP5，批号 YN2128）、淋巴增强因子（LEF）检测试剂盒（批号 YT4577），购于美国 Immuno-Way 公司。

动物：SPF 级 Wistar 雌性大鼠 50 只，体质量（200 ± 20）g，均购于河北医科大学实验动物中心（实验动物合格证号为 SCXK < 冀 > 2018 - 004）。饲养于温度 22 ℃、相对湿度 60%、自然光源的环境中，标准饲养、自由饮水 1 周，以适应环境。经医院实验动物伦理委员会批准（批件号为 2020KY038）。

1.2 方法

分组、造模与给药：将 50 只 Wistar 雌性大鼠随机分为正常对照组（Control 组）、模型对照组（Model 组）及坚骨胶囊高、中、低剂量组（JG - H 组、JG - M 组、JG - L 组），各 10 只。除 Control 组大鼠外，其余各组大鼠均灌胃 100 mg / kg 维甲酸造模，每天 1 次，连续 30 d。以大鼠与人的体表面积计算坚骨胶囊给药剂量，成人用量为 5.25 g / d，故 JG - L 组、JG - M 组、JG - H 组大鼠分别灌胃 546，1 092，2 184 mg /（kg·d）坚骨胶囊，给药体积为 8 mL / kg；Control 组和 Model 组大鼠均灌胃纯化水 8 mL / kg。每天 1 次，连续 30 d。

生化指标检测：检测各组大鼠血清中 Ca^{2+}、Mg^{2+}、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH - Px）、总抗氧化能力（T - AOC）、超氧化物歧化酶（SOD）、碱性磷酸酶（ALP）水平变化。

股骨微结构指标测定：将各组大鼠取血后脱颈处死，取左侧股骨，以浸润生理盐水的纱布包裹，冷冻保存。对股骨进行 Micro - CT 仪扫描重建，记录股骨微结构，并对远心端感兴趣区（ROI）结构模型指数（SMI）、骨密度（BMD）、骨体积分数（BV / TV）、骨表面与骨体积比（BS / BV）、骨小梁数量（TbN）、骨小梁厚度（TbTh）、骨小梁分离度（TbSp）进行检测。

股骨组织中 Wnt / β - catenin 信号通路相关蛋白测定：采用免疫印迹（Western blot）法。取各组大鼠右侧股骨，剔净附着的软组织和软骨，冻存于 - 80 ℃冰箱。用 RIPA 蛋白抽提试剂提取组织蛋白，蛋白定量后加入缓冲液煮沸变性，取 20 μg 上样。300 mA 横流转模 3 h，3% 牛血清白蛋白（BSA）封闭 30 min，加入 LRP5，β - catenin，LEF，CyclinD1 一抗，室温孵育 10 min，4 ℃过夜，室温孵育 30 min。TBST 洗模 3 min，清洗 5 次。加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗（均为 1∶10 000），室温封闭 2 h，TBST 洗模 3 min，清洗 6 次。增强型化学发光试剂盒显色，曝光定影后用凝胶定量分析软件 TotalLab Quant 读取条带的积分光密度（IOD）值，以 β - 肌动蛋白（β - actin）为内参，采用 Image 1.8.0 软件分析并计算其蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示，行 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠血清生化指标的影响

与 Control 组比较，Model 组大鼠 Ca^{2+}，Mg^{2+}，MDA，

GSH－Px，T－AOC，SOD水平均明显降低（$P<0.01$），ALP水平明显升高（$P<0.01$）。与Model组比较，JG－H组大鼠Ca^{2+}，Mg^{2+}，MDA，GSH－Px，T－AOC，SOD水平均明显升高（$P<0.01$），ALP水平明显降低（$P<0.01$），坚骨胶囊中剂量组MDA，GSH－Px，SOD水平均明显升高（$P<0.05$），ALP水平明显降低（$P<0.01$）。详见表1。

2.2 对大鼠股骨微结构的影响

Control组大鼠股骨远心端骨小梁多呈板状，致密均匀；Model组大鼠股骨远心端骨小梁多呈杆状，稀疏；各给药组均有不同程度改善，JG－H组大鼠组骨小梁结构最完整，与Control组结果接近。详见图1。

Control组比较，Model组大鼠SMI，TbSp均明显升高，BMD，BV/TV，BS/BV，TbN，TbTh均明显降低（$P<0.05$）。与Model组比较，JG－H组、JG－M组大鼠SMI均明显降低（$P<0.05$）；JG－H组大鼠BMD，BV/TV，BS/BV，TbN，TbTh均明显升高（$P<0.05$），TbSp明显降低（$P<0.05$）。详见表2。

2.3 对股骨组织中LRP5，β－catenin，LEF，CyclinD1蛋白相对表达的影响

与Control组比较，Model组大鼠股骨组织中LRP5，β－catenin，LEF，CyclinD1蛋白表达水平均明显降低（$P<0.01$）；与Model组比较，JG－H组、JG－M组大鼠股骨组织中LRP5，β－catenin，LEF，CyclinD1蛋白表达水平均不同程度升高，JG－H组差异显著（$P<0.01$）。

3 讨论

骨质疏松症虽病位在骨骼，但存在脏腑、肾脏及脾胃功能失调，病因病机有虚有实，多以虚为主，以气虚及肾气不足为根本，脾胃虚损、脉络瘀阻是发病的重要因素，防治宜采用补肾益气法。

坚骨胶囊为我院院内制剂，重用黄芪补气升阳、健脾益肾，制草乌、制川乌散寒止痛，乳香、没药活血止痛，三七活血化瘀定痛、止血不留瘀，红花活血祛瘀，川芎活血行气止痛，胆南星祛经络风痰，鳖甲补益肝肾、滋阴潜阳、软坚散结，珍珠收敛生肌。诸药合用，共奏补肾益气、温经散寒、活血止痛之功[4]。

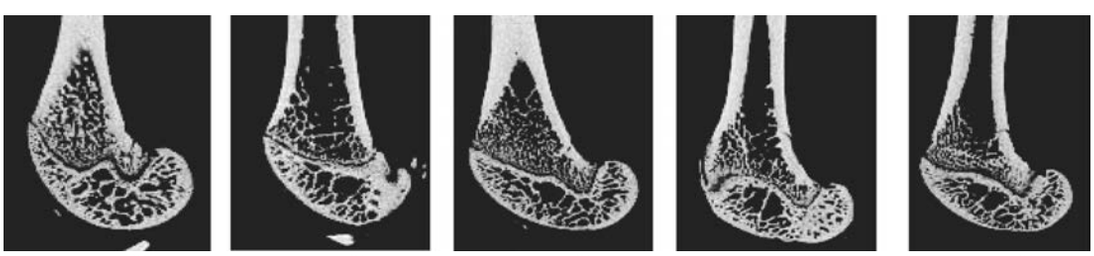
表1 坚骨胶囊对大鼠血清生化指标的影响（$\bar{X}\pm s$，$n=10$）

Tab. 1 Effect of Jiangu Capsules on the serum biochemical indexes of rats（$\bar{X}\pm s$，$n=10$）

组别	剂量（mg/kg）	Ca^{2+}（mmol/L）	Mg^{2+}（mmol/L）	MDA（nmol/mL）	GSH－Px（U/mL）	T－AOC（U/mL）	SOD（U/mL）	ALP（U/100 mL）
Control组		2.73±0.17	1.45±0.08	14.80±1.97	645.52±24.15	26.88±7.48	197.60±11.45	8.90±3.75
Model组		2.41±0.11▲▲	1.08±0.17▲▲	6.07±1.32▲▲	530.07±36.06▲▲	11.03±1.82▲▲	160.57±12.61▲▲	33.49±4.58▲▲
JG－H组	2 184	2.65±0.09**	1.41±0.09**	13.36±2.09**	630.41±35.26**	20.06±4.04**	180.00±14.20**	11.83±4.56**
JG－M组	1 092	2.53±0.07	1.26±0.15	10.53±2.17**	601.87±28.33**	16.61±3.02	170.60±11.54*	14.38±5.06**
JG－L组	546	2.50±0.07	1.10±0.16	7.05±1.18	557.62±30.88	12.46±1.44	164.13±9.66	28.76±2.62

注：与Control组比较，▲▲$P<0.01$；与Model组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$。表2和图2同。

Note: Compared with those in the Control group, ▲▲$P<0.01$; Compared with those in the Model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$ (for Tab. 1－2 and Fig. 2).



Control组　Model组　JG－H组　JG－M组　JG－L组

图1 坚骨胶囊对大鼠股骨微结构的影响（$n=10$）

Fig. 1 Effect of Jiangu Capsules on the femoral microstructure of rats（$n=10$）

表2 坚骨胶囊对大鼠股骨微结构指标的影响（$\bar{X}\pm s$，$n=10$）

Tab. 2 Effect of Jiangu Capsules on the femoral microstructure－related indexes of rats（$\bar{X}\pm s$，$n=10$）

组别	SMI	BMD（g/cm）	BV/TV（%）	BS/BV（%）	TbN（mm^{-1}）	TbTh（μm）	TbSp（μm）
Control组	1.34±0.01	0.24±0.04	24.32±2.70	0.05±0.01	1.91±0.60	100.73±10.82	621.39±82.69
Model组	2.44±0.38▲▲	0.14±0.03▲▲	13.28±2.58▲▲	0.03±0.01▲▲	1.27±0.41▲	89.85±4.41▲	892.69±82.80▲▲
JG－H组	1.59±0.40**	0.20±0.03**	17.21±3.85*	0.04±0.01*	1.67±0.30*	96.68±4.92*	658.28±73.30**
JG－M组	2.16±0.45*	0.19±0.05	14.65±3.48	0.03±0.02	1.32±0.48	95.39±6.42	842.99±98.87
JG－L组	2.24±0.29	0.15±0.03	13.45±3.05	0.03±0.01	1.28±0.28	92.38±3.78	878.23±96.59

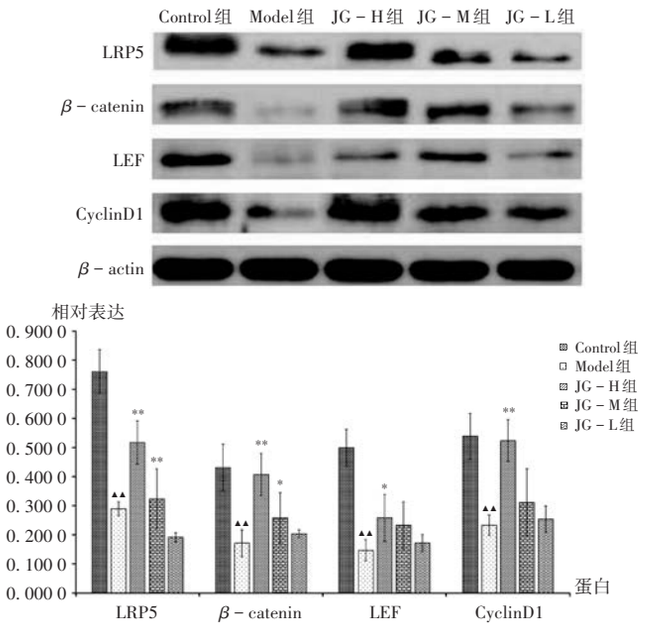


图2　坚骨胶囊对大鼠股骨组织中LRP5，β－catenin，LEF，CyclinD1蛋白相对表达的影响（$n=10$）

Fig. 2　Effect of Jiangu Capsules on the relative expression of LRP5，β－catenin，LEF and CyclinD1 proteins in femoral tissue of rats（$n=10$）

骨质疏松症的主要发病机制为骨代谢失衡，以破骨细胞活动过盛、成骨细胞活动不足、成骨性刺激不够等为主要因素[5]。雌激素缺乏是PMO发生的主要因素[6]。在动物实验研究中，卵巢切除和维甲酸诱导是制备PMO模型的常用方法，维甲酸诱导法操作简单、重复性高、动物死亡率低。本研究中参考文献[7－8]的方法，以维甲酸诱导成功制备骨质疏松症模型大鼠。

机体表现为氧化应激反应会抑制成骨细胞增殖、分化，减弱成骨细胞的矿化作用，刺激破骨细胞的形成、分化，进而诱发骨质疏松症[9－10]。在正常生理条件下，机体本身存在的抗氧化成分可抵御氧化应激对机体的损伤，如SOD，GSH－Px等抗氧化酶可促进氧自由基清除，拮抗或阻断氧自由基对细胞的氧化损伤，并及时恢复受损细胞的功能，减轻自由基对细胞的伤害。MDA是机体脂质过氧化产物，其含量与细胞氧化损伤的程度呈正相关，是评价氧化应激损伤程度的常用指标。T－AOC是反映机体抗氧化及清除氧自由基能力的重要指标。骨代谢指标ALP与骨矿化密切相关，通过水解磷脂释放无机磷，使局部磷浓度增加，促进骨矿化，有利于骨形成，为临床常用评价骨形成的指标[11]。

Wnt/β－catenin通路主要由细胞外Wnt配体蛋白（Wnt1，Wnt3，Wnt3a，Wnt7b，Wnt8等），细胞膜上的受体［Frizzled家族分子和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6（LRP5/6）］，细胞质内的信号传导部分［β－catenin、Dsh蛋白（Dsh）、APC蛋白（APC）、轴蛋白（Axin），糖原合成激酶3β（GSK－3β）等］、细胞核内转录因子［T细胞因子（TCF）/LEF］等组成[12]。Wnt/β－catenin信号通路被激活时，Wnt则会引起一系列下游事件的级联反应，会使β－catenin位进入细胞核，启动许多靶基因的转录[13]。β－catenin与核内转录因子（TCF/LEF）的DNA结合而改变DNA结构，启动下游靶基因的转录，促进成骨细胞分化、增殖，其缺失可使成骨细胞的数量减少，破骨细胞的数量增加，从而影响骨的生理功能，导致骨质疏松[14]。LRP5是该通路重要的下游靶因子，可促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞，激活细胞外基质磷酸化糖蛋白（ME－PE）基因启动因子，从而诱发细胞外基质（ECM）矿化[15－16]。CyclinD1为细胞周期G1期关键调控蛋白，驱动细胞向S期过渡，从而合成更多DNA物质，为细胞分裂做准备，又为Wnt/β－catenin信号通路下游调节成骨细胞增殖的关键靶因子。另外，Wnt/β－catenin信号通路可提高成骨细胞活性，抑制成骨细胞凋亡，调节骨组织代谢，增加BMD，在骨形成过程中发挥重要作用[17]。

本研究结果显示，坚骨胶囊可促进维甲酸诱导的骨质疏松模型大鼠血清中Ca^{2+}，Mg^{2+}，MDA，GSH－Px，T－AOC，SOD的分泌，拮抗ALP的分泌。以Micro－CT对大鼠左股骨远心端扫描重建，发现坚骨胶囊高剂量组大鼠BMD升高、TbSp降低。由图1可知，坚骨胶囊高剂量组大鼠骨小梁呈板状，与Control组接近，表明坚骨胶囊不仅可提高骨质疏松症模型大鼠的骨密度，还可改善骨小梁结构。通过Western blot法检测股骨组织中Wnt/β－catenin信号通路相关蛋白的表达，结果显示，坚骨胶囊可促进LRP5，β－catenin，LEF，CyclinD1的表达。

综上所述，坚骨胶囊可预防维甲酸诱导的大鼠骨质疏松，作用机制可能与激活Wnt/β－catenin信号通路有关。

参考文献

[1] RACHNER TD, KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276.
[2] 朱　冰，徐慧兰. 原发性骨质疏松症可控危险因素的流行病学研究进展[J]. 中国医师杂志，2005(S1)：473－476.
[3] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/β－catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 69(6): 985－999.
[4] 武　晔，王晓磊，平利峰，等. 坚骨胶囊治疗强直性脊柱炎伴骨质疏松临床观察[J]. 风湿病与关节炎，2016，5(4)：21－27.
[5] 李　杨，关雪峰. 中药对骨质疏松症骨代谢影响研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21(5)：5－8.
[6] 邸学士，陈　昭，贾育松，等. 基于网络药理学探讨青娥丸治疗绝经后骨质疏松症的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志，2021，27(3)：364－371.
[7] 孙世栋，梁其彬，范为之，等. 不同剂量维甲酸诱导骨质疏