

· 药理 ·

补肾化痰方对去势骨质疏松模型大鼠 Th17/Treg 平衡机制的影响

谭张奎¹, 周广文¹, 张妍¹, 朱伟¹, 吴小雪², 熊梦欣¹, 黄诗怡¹, 向楠^{3*}

(1. 湖北中医药大学 中医临床学院, 武汉 430065; 2. 湖北省妇幼保健院, 武汉 430065;
3. 湖北中医药大学 第一临床学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:研究补肾化痰方在防治绝经后骨质疏松症中对免疫T细胞亚群辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)平衡的影响。方法:6月龄SD雌性大鼠60只,按随机数字表分为假手术组,模型组,戊酸雌二醇组($0.184\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),补肾化痰方低、中、高剂量组($4.7, 9.4, 18.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),除假手术组外,其他组均采用手术切除卵巢,制作绝经后骨质疏松症模型。术后1周灌胃给药,模型组和假手术组以等体积的生理盐水灌胃,1次/d,灌胃12周后取材。运用微计算机断层扫描技术(Micro CT)检测大鼠骨量及骨微结构;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中叉头框蛋白p3(Foxp3),维甲酸相关核受体 γ t(ROR γ t)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测骨组织中Foxp3, ROR γ t mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织中Foxp3, ROR γ t蛋白表达量;运用流式细胞抗原检测,分析并比较各组Th17, Treg细胞的数量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠骨量降低、骨小梁显著减少($P<0.01$);骨微结构破坏,血清中Foxp3浓度显著降低, ROR γ t浓度显著升高($P<0.01$),骨组织中Foxp3 mRNA及蛋白表达降低, ROR γ t mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$),骨组织中Treg细胞数量减少($P<0.01$), Th17细胞数量增加,且Th17/Treg值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组骨量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),血清中Foxp3浓度升高, ROR γ t浓度显著降低($P<0.01$),骨组织中Foxp3 mRNA及蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),但低剂量组mRNA差异无统计学意义, ROR γ t mRNA及蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),骨组织中Treg细胞数明显升高, Th17细胞数量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),且Th17/Treg显著降低($P<0.01$)。结论:补肾化痰方可以提高去卵巢大鼠骨量,改善骨微结构,并使骨组织中Treg细胞数量增加而Th17细胞数量减少。进而推论补肾化痰方可能通过调节Th17/Treg平衡,而发挥防治绝经后骨质疏松症的作用。

[关键词] 绝经后骨质疏松症; 补肾化痰方; 骨免疫; 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg); 微计算机断层扫描技术

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)05-0033-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210102

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201222.1623.003.html>

[网络出版日期] 2020-12-22 16:26

Mechanism of Bushen Huatan Prescription in Regulating Th17/Treg Balance in Ovariectomized Osteoporosis Rats

TAN Zhang-kui¹, ZHOU Guang-wen¹, ZHANG Yan¹, ZHU Wei¹, WU Xiao-xue², XIONG Meng-xin¹,
HUANG Shi-yi¹, XIANG Nan^{3*}

(1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hubei University of TCM, Wuhan 430065,
China; 2. Hubei Maternal and Child Health Care Hospital, Wuhan 430065, China;
3. First Clinical College of Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

[收稿日期] 20201015(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82074416);国家自然科学基金青年科学基金项目(81904267);湖北省自然科学基金项目(2019CFB232);湖北中医名师向楠工作室建设项目(鄂卫生计生通报(2018)15号)

[第一作者] 谭张奎,在读博士,从事中医药防治内分泌及相关代谢疾病研究, E-mail: tzhongkui@163.com

[通信作者] *向楠,博士,教授,博士生导师,从事中药防治内分泌及相关代谢性、老年性疾病研究, E-mail: xiangnan61@sina.com

[Abstract] Objective: To study the effect of Bushen Huatan prescription on helper T cell 17 (Th17)/T regulatory cells (Treg) balance of immune T cell subsets in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Method:** Sixty 6-month-old female SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, estradiol valerate group ($0.184 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Bushen Huatan prescription low, medium and high groups ($4.7, 9.4, 18.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) according to the random number table. All the groups except the sham operation group received ovariectomy to make postmenopausal osteoporosis model. Intragastric administration was started 1 week after operation, and the rats in model group and sham operation group received equal volume of normal saline, once a day for 12 weeks. Microcomputed tomography (Micro CT) was then used to detect bone mass and microstructure of rats, the contents of Forkhead box protein (Foxp3) and retinoic acid related nuclear orphan receptor (ROR γ t) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the mRNA expression levels of Foxp3 and ROR γ t in bone tissues were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot was used to detect the protein expression of Foxp3 and ROR γ t in bone tissues, the number of Th17 and Treg cells in each group was analyzed and compared by flow cytometry. **Result:** Compared with the sham operation group, the bone mass and trabeculae of the model group decreased ($P < 0.01$), the bone microstructure was destroyed, the concentration of Foxp3 in serum decreased, the concentration of ROR γ t increased ($P < 0.01$), the mRNA and protein expression levels of Foxp3 in bone tissues decreased, ROR γ t increased, the number of Treg cells in bone tissues decreased, number of Th17 cells increased ($P < 0.01$), and Th17/Treg ratio increased ($P < 0.01$) in model group. Compared with the model group, the bone mass in each treatment group increased ($P < 0.05, P < 0.01$), Foxp3 concentration in serum increased, ROR γ t concentration decreased ($P < 0.01$), the mRNA and protein expression levels of Foxp3 in bone tissues increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$), but no statistical difference was shown in mRNA expression between low dose group and the model group. In addition, the mRNA and protein expression of ROR γ t decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), number of Treg cells increased, number of Th17 cells decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), and Th17/Treg ratio decreased in treatment groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bushen Huatan prescription can increase bone mass, improve bone microstructure, increase the number of Treg cells and decrease the number of Th17 cells in ovariectomized rats. It is concluded that Bushen Huatan prescription may play a role in preventing and treating postmenopausal osteoporosis by regulating Th17/Treg balance.

[Key words] postmenopausal osteoporosis; Bushen Huatan prescription; osteoimmunology; helper T cell 17 (Th17)/T regulatory cells (Treg); microcomputed tomography (Micro CT)

绝经后骨质疏松症(PMOP),属于I型原发性骨质疏松症。PMOP是绝经后女性骨量减少、骨微结构破坏及骨脆性增加的一种代谢性骨骼疾病。现认为雌激素衰退为主要原因,当雌激素下降时对破骨细胞(OC)的抑制作用减弱,OC的数量增加、寿命延长,进而骨吸收功能增强,骨重建的活跃和失衡致使小梁骨变细或断裂,皮质骨孔隙度增加导致骨强度下降^[1]。女性绝经后5~10年骨量流失严重,最易发生PMOP。随着我国人口老龄化进程不断加剧,骨质疏松患病率日益增高,我国50岁以上女性人群骨质疏松症患病率为32.1%,65岁以上女性人群骨质疏松症患病率达51.6%^[2]。免疫系统通过分泌炎症因子和相关配体来调节骨细胞,进而影响骨形成和骨吸收^[3],T细胞在骨重建的调控中起着关

键作用^[4],研究表明增龄和雌激素缺乏使免疫系统持续低度活化,处于促炎性反应状态,炎症反应介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1(IL-1),IL-6,IL-17等均诱导巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和核转录因子- κ B受体活化配体(RANKL)的表达,刺激破骨细胞并抑制成骨细胞造成骨量减少^[1]。致炎因子IL-6可调节Th17细胞极化,导致先天免疫所致的骨丢失^[5]。湖北中医名师向楠教授团队,长期致力于绝经后骨质疏松症的基础研究^[6-11],提出了“补肾化痰”的治疗思想。前期研究发现去势模型大鼠骨组织TNF- α 与IL-6水平升高,而补肾化痰方有效降低TNF- α 与IL-6水平,起到防止PMOP作用^[11]。基于此,本课题组进一步研究补肾化痰方对T细胞亚群辅助性T细胞

(Th17)/调节性T细胞(Treg)平衡的影响,探讨其治疗机制,为下一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级6月龄雌性SD大鼠60只,体重(270±30)g,购于三峡大学,许可证号SYXK(鄂)2017-0012。饲养于湖北中医药大学动物实验中心,随机分为6组,每笼10只,喂食普通颗粒饲料,室温(20±2)℃,自然光照,保持良好通风,常规进食。实验由湖北中医药大学实验动物伦理审查委员会审查通过。

1.2 药物与试剂 补肾化痰方:菟丝子30g(山东,批号181102501),淫羊藿10g(四川,批号181005871),补骨脂15g(四川,批号180805841),全瓜蒌15g(浙江,批号180903661),红曲12g(福建,批号180903773),净山楂20g(山东,批号181000111);生药采购于湖北省中医院药房,执行标准为2015年版《中华人民共和国药典》,由湖北省中医院周亚娜副教授鉴定均为正品。经水煮浓缩成相当于含有0.94 g·mL⁻¹的原中药材药液,4℃冰箱保存备用。戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号374A),将药片研碎用纯净水配置成质量浓度为0.018 4 g·L⁻¹的混悬液。trizol(北京艾德莱生物科技有限公司,批号252250AX);HiScript Reverse Transcriptase (RNase H), 50×ROX Reference Dye 2, SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为R101-01/02, Q111-02, Q111-02);Taq Plus DNA Polymerase(北京天根生化科技有限公司,批号ET105-01);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0013B);小鼠单抗β-肌动蛋白(β-actin),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗,HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BM0627, BA1051, BA1054);兔多克隆抗体叉头框蛋白p3(Foxp3)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号22228-1-ap);兔多克隆抗体维甲酸相关核孤受体γt(RORγt,北京博奥森生物技术有限公司,批号Bs-23109);ECL底物液(北京普利莱基因技术有限公司,批号P1050);CD4-异硫氰酸荧光素(FITC), CD25-别藻青蛋白(APC), Foxp3-藻红蛋白(PE), IL-17A-PE(美国eBioscience公司,批号分别为4277359, 4300566, 4307350, 4306419);Foxp3, RORγ酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,批号分别为SEB877Ra, SED949Ra)。

1.3 仪器 IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司);5702R型低速离心机(德国Eppendorf公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司);ICV-450型电热恒温培养箱(日本Asone公司);Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo scientific公司);μ100型Micro CT(瑞士Scanco公司);QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);DYY-7C型电泳仪, DYCZ-40型转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药 常规饲养7d后,按随机数字表分为假手术组(Sham),模型组(OVX),戊酸雌二醇组(EV),补肾化痰高剂量组(BH),补肾化痰方中剂量组(BM),补肾化痰方低剂量组(BL),每组10只。除假手术组外,其他各组行卵巢切除术造模^[12]。1%戊巴比妥钠(0.03 g·kg⁻¹体质量)腹腔注射麻醉,俯卧,用手术操作台固定。手术过程保持无菌,在背侧正中两侧1~2 cm处行纵行切口,进入腹腔找到卵巢(卵巢附着于白色脂肪组织),用4号线结扎并摘除双侧卵巢,分层缝合收口。假手术组不摘除卵巢,只切除卵巢周围等同重量的脂肪组织,其他步骤一致。术后肌肉注射青霉素1.6 mL·kg⁻¹(2×10⁵ U·mL⁻¹生理盐水),连续注射3d,术后禁食不禁水1d。术后1周灌胃给药,参考《中药药理研究方法学》,按人与大鼠体表面积换算系数确定给药剂量^[13]。补肾化痰方低、中、高剂量组分别给(4.7, 9.4, 18.8 g·kg⁻¹)中药药液,戊酸雌二醇组给予0.184 mg·kg⁻¹药液,模型组和假手术组以等体积的生理盐水灌胃,每天1次,灌胃12周后取材。

2.2 指标检测

2.2.1 大鼠一般情况观察 麻醉术后大鼠在2 h左右全部苏醒。3 d后进食正常,活动渐正常,切口无红肿、无裂开、无感染征象。1周后,切口愈合。

2.2.2 样本采集 大鼠给药12周后,1%戊巴比妥钠行腹腔注射麻醉,采用无添加负压采血管进行腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心20 min,取上层血清,保存于-80℃备用。采集血样后颈部脱臼法处死大鼠,分离股骨、胫骨和肱骨,清除肌肉组织与结缔组织后称质量,生理盐水浸泡的纱布包裹肱骨,保存于-80℃环境中用于骨密度检测;股骨、胫骨直接分离骨髓细胞,用于流式检测。

2.2.3 微计算机断层扫描技术(Micro CT)检测大鼠肱骨骨量、骨小梁及骨微结构 常温静置解冻股骨标本,取肱骨组织固定在Micro CT载物台上,

以360°扫描角度,14.8 μm分辨率扫描肱骨端获取连续平面图像。扫描完成后,选取生长板远端1.0 mm,层厚2.0 mm的骨组织为松质骨感兴趣区域进行三维重组,提取图像信息。获取重组图像后,使用Micro CT分析软件进行定量分析,检测参数包括骨密度(BMD),骨矿物含量(BMC),组织矿物质密度(TMD),组织矿物含量(TMC),连接密度(Conn.D.),骨体积分数(BV/TV),骨小梁数量(Tb.N),骨小梁厚度(Tb.Th),骨小梁分离度(Tb.Sp)等。

2.2.4 ELISA检测大鼠血清中Foxp3,RORγt含量
常温解冻血清样本,按照ELISA试剂盒步骤检测Foxp3,RORγt的含量。

2.2.5 Real-time PCR检测大鼠骨组织中Foxp3,RORγt mRNA表达 采用trizol法提取RNA,将总RNA转录成cDNA,反应条件为25℃ 5 min,50℃ 15 min,85℃ 5 min,4℃ 10 min。再将cDNA做4倍稀释进行Real-time PCR检测,cDNA 4 μL,100 μmol·L⁻¹的上游引物与下游引物各0.4 μL,SYBR Green/Master Mix 10 μL,H₂O 5.2 μL,共20 μL。反应条件为50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,40个循环,绘制溶解曲线,最终数据以2^{-ΔΔC_t}进行分析。引物由武汉巴菲尔生物技术服务公司设计及提供,其引物序列及产物大小见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
Foxp3	上游 5'-GCACTTCTCCAGGACAGACC-3'	209
	下游 5'-CTGGACACCCATTCCAGACT-3'	
RORγt	上游 5'-ACCAACCTCTTCTCACGGG-3'	190
	下游 5'-CTTCCATTGCTCCTGCTTTC-3'	
β-actin	上游 5'-CACGATGGAGGGGCCGGAAGTCAATC-3'	240
	下游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	

2.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠骨组织中Foxp3,RORγt蛋白表达 将骨组织研磨,加入裂解液充分裂解,提取总蛋白,测定蛋白浓度。电泳分离及电转移后,用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2 h。用封闭液稀释相应的一抗(β-actin 1:500,Foxp3 1:1000,RORγt 1:500),将PVDF膜浸泡于一抗稀释液中,4℃孵育过夜。TBST充分洗涤PVDF膜5次,5 min/次。用TBST稀释相应的HRP标记二抗(1:5万),使PVDF膜浸泡于二抗稀释液中,室温摇

床孵育2 h。再次TBST充分洗涤PVDF膜5次,5 min/次。将ECL试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按1:1比例混匀后滴加于PVDF膜上,反应数分钟待荧光带明显后,用滤纸吸去多余的底物液,覆上保鲜膜,X光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影,冲洗胶片。用BandScan分析胶片灰度值。

2.2.7 流式细胞术检测骨组织中Th17,Treg细胞数量 取分离后的股骨和胫骨骨髓细胞,计数后每组接种1×10⁶个/孔于24孔板中,在细胞悬液中加入佛波酯(50 μg·L⁻¹),离子霉素(1 mg·L⁻¹)和莫能菌素(2 μmol·L⁻¹),37℃ 5%CO₂培养箱中刺激培养6 h;收集每孔刺激后的细胞于流式小管中,2 000 r·min⁻¹离心3 min后以含0.5%牛血清白蛋白(BSA)的PBS重悬漂洗两遍;每管100 μL细胞悬液分别添加抗体FITC-CD4,APC-CD25,4℃避光孵育30 min;2 000 r·min⁻¹离心3 min,PBS重悬漂洗2遍;每管加入2%多聚甲醛0.5 mL,室温固定20 min;5 000 r·min⁻¹离心15 min,弃上清,加含0.1%皂素的PBS 1 mL,室温孵育10 min;离心,弃上清,加入PBS 100 μL重悬;每管分别加入PE-Foxp3或IL-17A,4℃避光孵育30 min;2 000 r·min⁻¹离心3 min后以含0.5% BSA的PBS重悬漂洗1遍;最终以0.2 mL含0.5% BSA的PBS重悬细胞后进行流式细胞仪检测分析。

2.3 统计学方法 采用SPSS 26.0统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经过校验,数据符合正态分布且方差齐。多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用LSD法,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 术后1周,伤口基本愈合,大鼠状态良好,毛发顺,无弓背,排便正常。灌胃持续12周,常规进食进水。

3.2 对OVX大鼠肱骨骨量、骨小梁及骨微结构的影响 与Sham组比较,OVX组BMD,TMD,BMC,TMC,BV/TV,Tb.N,Tb.Th显著降低($P < 0.01$),Conn.D.,Tb.Sp显著升高($P < 0.01$);与OVX组比较,EV,BL,BM,BH组中BMD,TMD,BMC,TMC,BV/TV,Tb.N,Tb.Th升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),Conn.D.,Tb.Sp降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表2,3。从图1,大鼠显微结构可以清晰看出OVX模型组松质骨减少、稀疏,各给药组相应恢复。

3.3 对OVX大鼠血清中Foxp3,RORγt含量的影响 与Sham比较,OVX组Foxp3浓度降低($P <$

表 2 补肾化痰方对 OVX 大鼠肱骨骨量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Bushen Huatan prescription on bone mass of humerus in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/mg·HA·ccm ⁻¹	TMD/mg·HA·ccm ⁻¹	BMC/mg	TMC/mg
Sham		977.29±21.95	343.94±30.45	5.42±1.30	3.75±0.54
OVX		871.54±10.46 ¹⁾	192.86±24.14 ¹⁾	2.12±0.19 ¹⁾	1.67±0.14 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	918.33±7.96 ³⁾	325.77±28.04 ³⁾	3.66±0.53 ³⁾	2.38±0.28 ³⁾
BL	4.7	928.61±15.80 ³⁾	294.32±21.82 ³⁾	3.08±0.30 ²⁾	2.14±0.16 ²⁾
BM	9.4	939.85±9.84 ³⁾	339.21±8.45 ³⁾	3.21±0.22 ²⁾	2.17±0.13 ²⁾
BH	18.8	977.16±10.70 ³⁾	321.30±29.26 ³⁾	3.27±0.40 ²⁾	2.22±0.35 ²⁾

注:与 Sham 组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与 OVX 组比较 ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表 3~7 同)。

表 3 补肾化痰方对 OVX 大鼠肱骨骨小梁的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of Bushen Huatan prescription on trabeculae of humerus in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BV/TV/%	Conn.D./mm ⁻³	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Th/mm	Tb.Sp/mm
Sham		0.51±0.11	40.32±6.38	4.89±0.63	0.10±0.01	0.20±0.06
OVX		0.28±0.02 ¹⁾	94.08±16.81 ¹⁾	2.32±0.24 ¹⁾	0.08±0.01 ¹⁾	0.65±0.11 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	0.55±0.11 ³⁾	77.68±7.49 ²⁾	4.11±0.76 ³⁾	0.09±0.01 ³⁾	0.42±0.04 ³⁾
BL	4.7	0.45±0.04 ³⁾	47.28±7.11 ³⁾	3.16±0.21 ²⁾	0.09±0.01 ³⁾	0.46±0.06 ³⁾
BM	9.4	0.54±0.02 ³⁾	54.69±6.91 ³⁾	3.87±0.21 ³⁾	0.11±0.01 ³⁾	0.27±0.06 ³⁾
BH	18.8	0.47±0.12 ³⁾	43.10±3.70 ³⁾	3.83±0.53 ³⁾	0.11±0.01 ³⁾	0.28±0.07 ³⁾

0.01), RORγt 浓度增加 ($P<0.01$)。与 OVX 组比较, EV, BL, BM, BH 中 Foxp3 浓度增加 ($P<0.01$), RORγt 浓度降低 ($P<0.01$)。见表 4。

3.4 对 OVX 大鼠骨组织中 Foxp3, RORγt mRNA 表达的影响 与 Sham 组比较, OVX 组中大鼠骨组织中 Foxp3 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), RORγt mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与 OVX 组比较, EV, BM, BH 组 Foxp3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), BL 组升高但差异无统计学意义, EV, BL, BM, BH 组中 RORγt mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。见表 5。

3.5 对 OVX 大鼠骨组织中 Foxp3, RORγt 蛋白表达的影响 与 Sham 组比较, OVX 组中大鼠骨组织中 Foxp3 蛋白表达降低 ($P<0.01$), RORγt 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与 OVX 组比较, EV, BL, BM, BH 组 Foxp3 蛋白表达升高 ($P<0.01$), RORγt 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 6, 图 2。

3.6 对 OVX 大鼠骨组织 Th17, Treg 数量的影响 与 Sham 组比较, OVX 组中 CD4⁺CD25⁺Foxp3 (Treg) 率降低 ($P<0.01$), CD4⁺IL-17A (Th17) 率升高, 但差异无统计学意义; Th17/Treg 升高 ($P<0.01$)。与 OVX 组比较, EV, BL, BM, BH 组中 CD4⁺CD25⁺Foxp3 (Treg) 率升高 ($P<0.01$); CD4⁺IL-17A (Th17) 率降低 ($P<0.05$), 但 EV 组差异无统计学意义; Th17/Treg 降

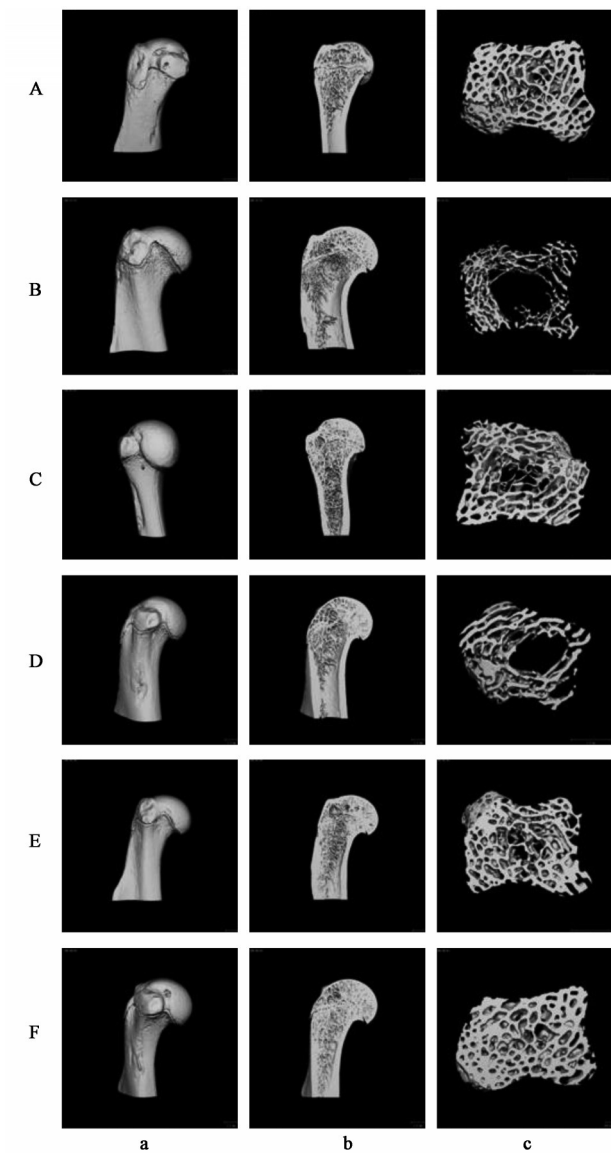
低 ($P<0.01$)。见表 7。

4 讨论

中医无“骨质疏松”病名记载, 但依据其症状特征有“骨痿”“骨痹”等相类似病名。中医学认为骨与肾关系密切, “肾主骨生髓”^[14]。绝经后女性“天癸竭”, 肾精气匮乏, 化髓无源, 骨髓不充, 髓消骨枯。故历代中医名家多以补肾为基本治法, 随着医学进步, 又进一步提出“瘀血”等致病因素^[15], 导师向楠教授根据骨髓间充质干细胞成骨成脂分化特点结合传统中医痰浊致病思想, 提出了“补肾化痰”, 进一步丰富了 PMOP 治疗思路。

“骨免疫学”一词由 Nature 杂志在 2000 年首次提出, 强调骨与免疫的相互作用^[16-17]。传统观点认为骨质疏松症是破骨细胞 (OC) 和成骨细胞 (OB) 之间的骨重建失衡^[18]。近年来研究指出, 免疫系统对骨系统具有调节作用, 促进了骨免疫学跨学科领域的出现^[19-20]。免疫系统和骨骼系统共享相同的微环境, 免疫系统通过分泌炎症因子和相关配体来调节骨细胞, 进而影响骨形成和骨吸收^[3, 21]。

T 细胞是骨吸收的重要调节因子。在绝经后妇女中, 雌激素缺乏刺激 CD4⁺T 细胞失调, 并诱导循环中炎性细胞因子水平升高, 如 TNF-α, INF-γ, IL-17 等^[22-23]。CD4⁺T 细胞激活后, 发育成不同的 T 细胞 (Th) 亚群, 辅助性 T 细胞 (Th17) 与调节性 T 细



A. Sham 组; B. OVX 组; C. EV 组; D. BL 组; E. BM 组; F. BH 组; a. 肱骨整体; b. 剖面; c. 松质骨骨量
图 1 补肾化痰方对 OVX 大鼠肱骨微结构的影响
Fig. 1 Effect of Bushen Huatan prescription on cancellous bone of humerus in OVX rats

表 4 补肾化痰方对 OVX 大鼠血清 Foxp3, RORγt 浓度的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Bushen Huatan prescription on expression of Foxp3 and RORγt in serum of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Foxp3	RORγt
Sham		12.02±0.56	0.89±0.10
OVX		5.62±0.49 ¹⁾	2.41±0.13 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	9.19±0.58 ³⁾	1.34±0.11 ³⁾
BL	4.7	7.27±0.70 ³⁾	1.70±0.10 ³⁾
BM	9.4	7.88±0.51 ³⁾	1.46±0.09 ³⁾
BH	18.8	9.88±0.61 ³⁾	1.19±0.07 ³⁾

表 5 补肾化痰方对 OVX 大鼠骨组织 Foxp3, RORγt mRNA 表达量的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

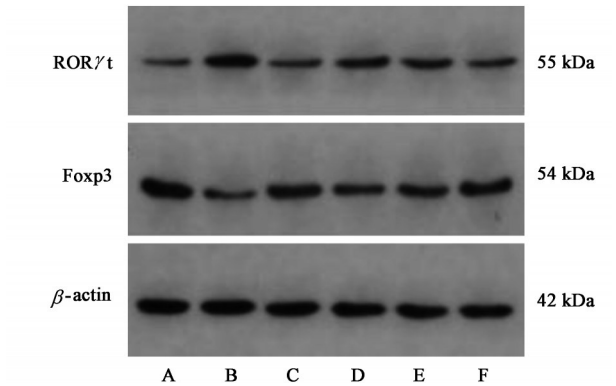
Table 5 Effect of Bushen Huatan prescription on texpression of Foxp3 and RORγt mRNA in bone tissue of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Foxp3	RORγt
Sham		1.00±0.14	0.96±0.14
OVX		0.38±0.06 ¹⁾	3.19±0.32 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	0.75±0.11 ³⁾	2.04±0.17 ³⁾
BL	4.7	0.49±0.06	2.57±0.25 ³⁾
BM	9.4	0.62±0.08 ²⁾	2.04±0.19 ³⁾
BH	18.8	0.80±0.08 ³⁾	1.80±0.18 ³⁾

表 6 补肾化痰方对 OVX 大鼠骨组织 Foxp3, RORγt 蛋白表达量的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Bushen Huatan prescription on expression of Foxp3 and RORγt protein in bone tissue of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Foxp3/β-actin	RORγt/β-actin
Sham		0.98±0.07	0.33±0.04
OVX		0.44±0.03 ¹⁾	0.86±0.14 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	0.82±0.03 ³⁾	0.51±0.07 ³⁾
BL	4.7	0.59±0.08 ³⁾	0.69±0.11 ²⁾
BM	9.4	0.74±0.04 ³⁾	0.62±0.10 ³⁾
BH	18.8	0.86±0.08 ³⁾	0.47±0.08 ³⁾



A. Sham 组; B. OVX 组; C. EV 组; D. BL 组; E. BM 组; F. BH 组
图 2 各组大鼠骨组织 Foxp3, RORγt 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Foxp3 and RORγt protein expression in bone tissue of each group rats

胞(Treg)最具代表性。Th17(CD⁺IL-17)是在转录因子 RORγt 调控下以分泌 IL-17 等促炎因子的致炎细胞^[24]; Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)能有效地抑制效应 T 细胞的功能^[25], 通过分泌 IL-10 抑制炎症反应, 起到免疫负性调节功能^[26], 且特异性表达转录因子 Foxp3, 降低 RORγt 表达, 从而抑制 Th17 细胞功能。大量研究表明, IL-17 参与了破骨细胞(OC)的分化和骨吸收, 而转化生长因子-β(TGF-β)在骨代谢机

表7 补肾化痰方对OVX大鼠骨组织Th17, Treg数量的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 7 Effect of Bushen Huatan prescription on Th17 and Treg in bone tissue of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3/%	CD4 ⁺ IL-17A/%	Th17/Treg
Sham		17.32±0.80	2.02±0.45	0.14±0.03
OVX		7.17±0.42 ¹⁾	2.32±0.57	0.26±0.03 ¹⁾
EV	1.84×10 ⁻⁴	15.01±0.24 ³⁾	1.63±0.75	0.13±0.07 ³⁾
BL	4.7	10.63±0.02 ³⁾	1.50±0.44 ²⁾	0.17±0.04 ³⁾
BM	9.4	11.32±0.03 ³⁾	1.51±0.39 ²⁾	0.16±0.00 ³⁾
BH	18.8	15.93±0.27 ³⁾	1.25±0.26 ²⁾	0.09±0.02 ³⁾

制中发挥了相反的作用,提示Th17/Treg在骨重建具有潜在的作用^[5]。雌激素缺乏对分泌IL-17的Th17细胞具有诱导分化作用^[27]。推测雌激素缺乏性骨丢失与免疫亚群Th17/Treg失衡可能有关,可作为临床治疗的潜在靶点。

经过前期大量的基础研究发现补肾化痰方能够防治PMOP,能够提高雌激素水平,改善炎症状态。本次研究,通过Micro CT扫描骨组织,OVX组骨量及骨小梁参数差异具有统计学意义,模型成功制作,EV组及补肾化痰方低中高组均能有效改善骨量及骨小梁状态。Th17细胞数量与其转录因子ROR γ t表达在OVX组中均升高,Treg细胞数量及其转录因子Foxp3表达均降低,补肾化痰方低中高剂量组均能降低Th17,升高Treg表达,Th17/Treg中趋势一致。从实验结果看出,低中高剂量组具有一定的效果递增趋势,高剂量组更效果明显。综合分析,补肾化痰方可能通过调节免疫T细胞亚群Th17/Treg的平衡,起到预防及治疗PMOP。

[参考文献]

[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(5):413-444.

[2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2019,12(4):317-318.

[3] KAZUO O, HIROSHI T. Osteoimmunology[J]. Cold Spring Harb Perspect Med,2019,9(1):1-28.

[4] RUPESH K S, HAMID Y D, PRADYUMNA K M, et al. Immunoporosis: immunology of osteoporosis-role of T cells[J]. Front Immunol,2018,9:657.

[5] SHEN X, DU J, GUAN W X, et al. The balance of

intestinal Foxp3⁺ regulatory T cells and Th17 cells and its biological significance [J]. Expert Rev Clin Immunol,2014,10(3):353-362.

[6] 周亚娜,周广文,张麟,等. 补肾化痰方对绝经后骨质疏松模型大鼠骨重建平衡的影响[J]. 中国医药导报,2020,17(11):20-24.

[7] 周广文,向楠,周亚娜,等. 补肾化痰方对去势骨质疏松大鼠钙沉积的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(3):366-370.

[8] 周广文,向楠,周亚娜,等. 基于钙沉积异常探讨原发性骨质疏松症“痰邪”的理论研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(4):497-501.

[9] 周广文,向楠,沈霖,等. 加味青娥丸对绝经后骨质疏松症患者的骨密度、骨代谢标志物及血清MGP水平的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(3):4-8,13.

[10] 周广文,向楠,沈霖,等. 血清基质Gla蛋白与绝经后骨质疏松症的相关性[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2015,8(4):294-299.

[11] 胡娅,唐曦,向楠,等. 补肾化痰方对去卵巢大鼠骨组织TNF- α 和IL-6的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):173-176.

[12] 郭文清,何保丽. 中医药防治骨质疏松症动物模型研究进展[J]. 中华中医药杂志,2017,32(2):666-668.

[13] ZHENG Q, YANG H, LIU W, et al. Comparative efficacy of 13 immunosuppressive agents for idiopathic membranous nephropathy in adults with nephrotic syndrome: a systematic review and network Meta-analysis[J]. BMJ Open,2019,9(9):1-10.

[14] 葛继荣,郑洪新,万小明,等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(9):1023-1028.

[15] 于冬冬,李泽,李鑫,等. 绝经后骨质疏松症中医辨证分型和治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(3):61-63.

[16] MARAHLEH A, KITaura H, OHORI F, et al. TNF- α directly enhances osteocyte RANKL expression and promotes osteoclast formation[J]. Front Immunol,2019,10:2925.

[17] ILESANMI-OYELERE B L, SCHOLLUM L, KUHN-SHERLOCK B, et al. Inflammatory markers and bone health in postmenopausal women: a cross-sectional overview[J]. Immun Ageing,2019,16:15.

[18] LI S, LIU Q, WU D, et al. PKC- δ deficiency in B cells displays osteopenia accompanied with upregulation of RANKL expression and osteoclast-osteoblast uncoupling[J]. Cell Death Dis,2020,11(9):762.

[19] OKAMOTO K, NAKASHIMA T, SHINOHARA M, et

- al. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4):1295-1349.
- [20] DAR H Y, AZAM Z, ANUPAM R, et al. Osteoimmunology: the nexus between bone and immune system [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23:464-492.
- [21] ONO T, HAYASHI M, SASAKI F, et al. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond[J]. *Inflamm Regen*, 2020, 40:2.
- [22] MORI G, D'AMELIO P, FACCIO R, et al. Bone-immune cell crosstalk: bone diseases [J]. *J Immunol Res*, 2015, doi:10. 1155/2015/108451.
- [23] ZHANG J, FU Q, REN Z, et al. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(3):183-190.
- [24] YOU L, CHEN L, PAN L, et al. SOST gene inhibits osteogenesis from adipose-derived mesenchymal stem cells by inducing Th17 cell differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(3):1030-1040.
- [25] ZHAO J, CHEN J, HUANG F, et al. Human gingiva tissue-derived MSC ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells differentiation [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(12):7627-7643.
- [26] 阳玉洁, 卢祖能, 王云甫, 等. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与神经系统自身免疫性疾病研究进展[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2018, 25(3):212-215.
- [27] CHEN X, ZHANG Z, HU Y, et al. Lactulose suppresses osteoclastogenesis and ameliorates estrogen deficiency-induced bone loss in mice [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(3):629-641.

[责任编辑 周冰冰]