

左归丸对去卵巢大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响

叶素敏¹, 谭峰¹, 刘飞祥¹, 徐道明², 柴毅¹, 张明玥¹, 樊巧玲^{1*}

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210029; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

【摘要】 目的:观察去卵巢骨质疏松症大鼠下丘脑食欲素(Orexin)及其受体 mRNA 水平,探讨绝经后骨质疏松症(PMOP)的发病机制以及左归丸的作用机制。**方法:**去势法建立骨质疏松症模型,32 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、雌二醇组和左归丸组,每组 8 只。灌胃给药 12 周后,通过显微 CT(μ -CT)检测股骨骨密度(BMD)和骨小梁微观三维形态结构,苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠骨组织形态学变化,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清骨转换标志物骨钙素(OCN),I 型前胶原氨基端前肽(PINP),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠下丘脑 Orexin,食欲素受体 1(OX1R)和食欲素受体 2(OX2R)mRNA 表达水平。**结果:**与假手术组比较, μ -CT 示模型组大鼠 BMD,骨体积分数(BV/TV),骨小梁厚度(Tb. Th)和骨小梁数量(Tb. N)显著下降($P < 0.01$)而骨小梁间隙(Tb. Sp)升高($P < 0.01$),骨小梁明显稀疏,间距加宽,结构出现较大的空白区域;HE 染色示骨小梁明显稀少,结构不完整,排列疏松,间距变宽;ELISA 示血清 OCN, PINP 含量降低, TRAP 含量升高($P < 0.01$);下丘脑 Orexin, OX1R, OX2R mRNA 表达下调($P < 0.01$)。经左归丸治疗后,大鼠 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N 升高($P < 0.05, P < 0.01$), Tb. Sp 降低($P < 0.01$),骨小梁变密,空隙率下降,分布均匀,排列尚可,微观结构明显改善;血清 OCN, PINP 含量增加($P < 0.05, P < 0.01$)而 TRAP 含量降低($P < 0.01$);下丘脑 Orexin, OX1R, OX2R mRNA 表达明显上调($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 水平降低可能是 PMOP 发病的机制之一。左归丸可通过上调下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达,从而纠正骨代谢失衡,改善骨小梁微结构,提高骨密度,发挥治疗 PMOP 的作用。

【关键词】 左归丸; 绝经后骨质疏松症; 食欲素; 食欲素受体 1; 食欲素受体 2
【中图分类号】 R22;R242;R2-031;R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2019)18-0009-07
【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20191021
【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190212.1835.005.html>
【网络出版时间】 2019-02-13 14:08

Effect of Zuoguiwan on mRNA Expression of Orexin and Its Receptors in Hypothalamus of Ovariectomized Rats

YE Su-min¹, TAN Feng¹, LIU Fei-xiang¹, XU Dao-ming², CHAI Yi¹, ZHANG Ming-yue¹, FAN Qiao-ling^{1*}

(1. College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective: To observe the mRNA levels of Orexin and its receptors in the hypothalamus of ovariectomized osteoporosis rats, in order to explore the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis (PMOP) and the mechanism Zuoguiwan. **Method:** An osteoporosis model induced by ovariectomy was established in rats. Totally 32 female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operated group, ovariectomized model group, 17 β -estradiol treated positive group, and Zuoguiwan group, with 8 rates in each group. After 12 weeks of intragastric administration, the bone mineral density (BMD) and trabecular microstructural changes of

【收稿日期】 20180909(008)
【基金项目】 国家自然科学基金项目(81573874);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX18-1525)
【第一作者】 叶素敏,在读硕士,从事方剂的配伍理论与临床应用研究,E-mail:269917375@qq.com
【通信作者】 * 樊巧玲,教授,博士生导师,从事方剂的配伍理论与临床应用研究,E-mail:fjxfql@163.com

femur were detected by micro-CT (μ -CT), and the morphological changes of bone tissue were observed by hematoxylin-eosin staining (HE) staining. The markers of bone turnover in serum osteocalcin (OCN), *N*-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of orexin, orexin receptor 1 (OX1R) and orexin receptor 2 (OX2R) were measured by Real-time PCR. **Result:** Compared with sham-operated group, the μ -CT showed that BMD, bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th) and trabecular number (Tb. N) in ovariectomized model group were significantly decreased ($P < 0.01$), while Trabecular Separation (Tb. Sp) was increased ($P < 0.01$), and the bone trabeculae were obviously sparse, and the spacing was widened. HE staining showed that the trabecular bone was significantly rare, the structure was incomplete, the arrangement was loose, and the spacing was widened. ELISA showed that serum osteocalcin (OCN), and *N*-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) levels decreased, whereas tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) content increased ($P < 0.01$), and hypothalamic Orexin, OX1R, OX2R mRNA expressions were down-regulated ($P < 0.01$). After treatment, BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N in Zuoguiwan group increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while Tb. Sp decreased ($P < 0.01$), bone trabeculae became dense, void fraction decreased, distribution was uniform, arrangement was acceptable, and the microstructure was significantly improved. serum OCN and PINP increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while TRAP content decreased ($P < 0.01$), the mRNA expressions of Orexin, OX1R and OX2R in the hypothalamus were significantly up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Decreased mRNA levels of Orexin and its receptors in the hypothalamus may be one of the mechanisms of PMOP. Zuoguiwan may correct the imbalance of bone metabolism, improve the trabecular microstructure and improve bone by up-regulating the mRNA expressions of Orexin and its receptors in the hypothalamus, density, so as to show a therapeutic effect on PMOP.

[**Key words**] Zuoguiwan; postmenopausal osteoporosis (PMOP); orexin; orexin receptor 1 (OX1R); orexin receptor 2 (OX2R)

绝经后骨质疏松症 (PMOP) 是由于绝经后雌激素迅速减少所导致的以骨量减少和骨组织显微结构退行性改变为特征,骨脆性增加,骨折发生率高的一种全身性代谢性骨病^[1-2],其导致的脆性骨折严重降低患者生活质量,更给社会带来沉重的经济负担。对于 PMOP 发病机制及防治的研究已成为当今重要的公共健康问题。左归丸出自《景岳全书·新方八阵·补阵》,是经典的补肾方剂^[3],在 PMOP 的防治上具有较为理想的效果,但其作用机制涉及多方面,至今尚未被完全阐明。

近年来,神经系统调控骨的发育和修复的研究有加无已。不少研究发现,一些神经肽如神经肽降钙素基因相关肽 (CGRP),神经肽 Y (NPY),P 物质 (SP) 等与其受体构成的神经肽网络介导了神经系统与骨组织间信号的传导影响骨代谢^[4-6]。新的研究显示,神经肽食欲素 (Orexin) 也参与骨代谢的调节过程^[7],然而关于其与 PMOP 之间的关系以及补肾方药的作用机制的相关研究却鲜有报道。目前已发现左归丸可提高骨质疏松症模型大鼠的神经肽水平^[8-9],但具体的作用环节尚不完全清楚。本课题

组前期研究证实左归丸不仅可促进骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 骨向分化,还可通过交感神经系统调控护骨素 (OPG)/核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 信号通路,从而提高去卵巢大鼠的骨密度 (BMD),增加骨质量,纠正骨耦联失衡^[10-13]。因此,本研究拟在中医“肾藏精主骨生髓”理论指导下,从基因水平上探讨去卵巢骨质疏松症大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 水平变化,以及左归丸的疗效及其作用机制,为左归丸防治 PMOP 提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 动物 40 只 4 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠,体重 (341 $\pm$ 22) g,购自陕西省第四军医大学动物实验中心,合格证号 SCXK (军) 2012-0007;饲养于南京中医药大学动物实验中心,许可证号 SYXK (苏) 2012-0042。在实验室温度 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 (58 $\pm$ 4) % 的条件下,将大鼠置于通风笼中,自由进食饮水。所有研究方案均获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号 ACU-07-20151113。

1.2 药物及试剂 熟地黄、山萸肉、山药、枸杞子、

怀牛膝、菟丝子、龟甲胶、鹿角胶,购自南京中医药大学国医堂,经南京中医药大学吴德康教授鉴定均为正品,样本存储于南京中医药大学标本馆。雌二醇(美国 Sigma 公司,批号 E2758);骨转换标志物骨钙素(OCN),I 型前胶原氨基端前肽(PINP),抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物研究所,批号均为 20170103);RNA 抽提试剂盒,逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 ER501, AT341, AQ131-03);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司,批号 YFYFG1120-10);trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026)。

1.3 仪器 Freezone-12L 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),micro-CT 型小动物成像仪(德国 Bruker 公司),Eclipse 80i 型光学显微镜(日本 Nikon 公司),EnSPire 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 仪器有限公司),ABI 7500Veriti 型 PCR(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 左归丸冻干粉的制备参照 LIU 等^[12]的方法,熟地黄(480 g),山药(240 g),山萸肉(240 g),枸杞子(240 g),川牛膝(180 g),菟丝子(240 g),龟甲胶(240 g)和鹿角胶(240 g),除胶类外,将上药用水 10 L 分别煎煮 2 次,每次 120 min。将 2 次萃取物混合,过滤并浓缩,装进 500 mL 的冷冻干燥机专用瓶中,液氮迅速冷冻,上冷冻干燥机,在 -50 ℃ 的条件下冷冻干燥 24 h 以上,每瓶不超过 300 mL,以免液体过多冷冻不彻底影响进程,得药率为 48.5%。

2.2 动物模型制作及分组给药 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组(10 只)和手术组(30 只),常规饲养至第 7 天,所有大鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液(2 g·L⁻¹)麻醉后,从腰背部摘除双侧卵巢或摘除卵巢周围脂肪,以建立骨质疏松症模型^[14]。术后连续 3 d 青霉素肌注以预防感染。1 个月后 2 组随机选取 8 只进行骨密度测定以验证造模成功。造模成功后,假手术组剩 8 只,手术组剩 24 只,将手术组随机分为模型组,雌二醇组和左归丸组,每组各 8 只。左归丸组给予 4.6 g·kg⁻¹左归丸冻干粉(大鼠剂量 4.6 g·kg⁻¹相当于成人 60 kg 每日给药量 81 g,经前期实验证实为有效剂量^[12]),雌二醇组给予 25 μg·kg⁻¹·d⁻¹雌二醇(先用无水乙醇配制成 1 g·L⁻¹母液,给药前用生理盐水稀释),假手术组和

模型组给予等体积的纯净水,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,各组均采用灌胃给药,每天 1 次,1 周 6 次。12 周后,所有大鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液 2 mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,采血后放血处死,取下丘脑和股骨作进一步研究。

2.3 指标检测

2.3.1 股骨远端 μ-CT 取大鼠右侧股骨,剔除周围附着的软组织和肌肉,通过 Micro-CT 测量和扫描右侧股骨的局部 BMD(g·cm⁻²)及骨小梁微观三维形态结构。扫描参数,电压 60 kV,电流 384 mA,分辨率 9 μm。CT 扫描后以生长板作为参考层面选择感兴趣区域(ROI)进行三维重建及分析,获得空间结构参数骨体积/组织体积(BV/TV),骨小梁厚度(TV. Th),骨小梁数目(TB. N),骨小梁间隙(TB. Sp)。

2.3.2 股骨组织切片 HE 染色 取大鼠左侧股骨,剔除周围附着的软组织和肌肉,用乙二胺四乙酸溶液(EDTA)与 10% 甲醛脱钙 4 周,然后包埋在石蜡中。将石蜡包埋的股骨组织切成 4 μm 厚的样本用于 HE 染色。然后将染色的股骨置于光学显微镜成像并观察。

2.3.3 骨转换标志物 OCN, PINP, TRAP 检测 根据 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 OCN, PINP, TRAP 的含量,使用酶联免疫检测仪在 450 nm 的吸光度 A 处评估所有骨转换标志物的浓度。

2.3.4 下丘脑 Orexin, OX1R, OX2R mRNA 检测 将下丘脑组织放入冰盒中的玻璃匀浆器中,用 trizol 法提取下丘脑总 RNA,进行 PCR 扩增。引物序列由生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。扩增条件:94 ℃ 30 s,94 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s(40 循环)。结果采用相对定量法 2^{-ΔΔC_t}表示,确定目的基因在待测组中的含量与对照组比较升高或降低的倍数^[15-16]。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence		
引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp
Orexin	上游 TCCTGCCGTCTCTACGAACT	133
	下游 GGTTACCGTTGGCCTGAAG	
OX1R	上游 GACCCTCAGAGCAACTGGAA	120
	下游 GCATCTTGGCACTCTTCCTC	
OX2R	上游 CATCGTTGTCTATCTGGATCG	124
	下游 GCGTTCATCGCAGACTGTAA	
GAPDH	上游 TGAACGGGAAGCTCACTGG	307
	下游 TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐采用单因素方差分析(多组间)和 T 检验(两组间),方差不齐进行变量变换后采用单因素方差分析(多组间)和 T 检验(两组间),其中 Tb. Sp 进行对数变换,PINP 进行平方根变换, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢大鼠骨密度的影响 与假手术组比较,模型组大鼠股骨 BMD 显著下降($P < 0.01$),提示造模后骨矿含量丢失严重;与模型组比较,左归丸组大鼠的 BMD 显著升高($P < 0.01$);左归丸组和雌二醇组之间差异无统计学意义。见表 2。

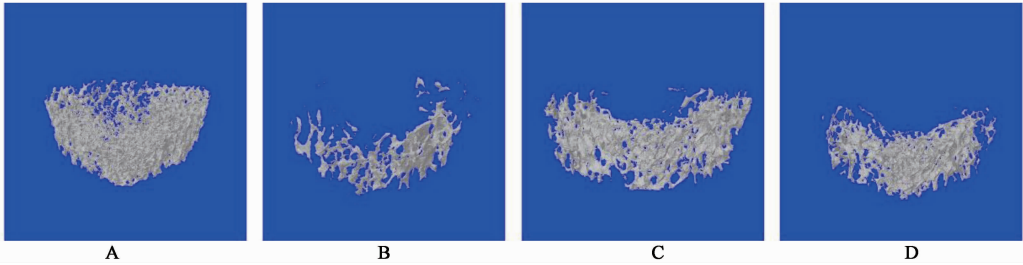
3.2 对去卵巢大鼠股骨骨小梁的影响 μ -CT 三维图像显示,模型组大鼠骨小梁相对假手术组明显稀疏,数目减少,变细,间距加宽,骨小梁结构出现较大的空白区域。经左归丸组或雌二醇组治疗后骨小梁变密,连续性增加,空隙率下降,微观结构明显改善

表 2 左归丸对去卵巢大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of Zuoguiwan on femoral bone mineral density in ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	BMD/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
假手术	—	0.27 ± 0.03
模型	—	$0.19 \pm 0.02^{1)}$
雌二醇	0.025	$0.23 \pm 0.02^{2)}$
左归丸	4.6	$0.23 \pm 0.03^{3)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与雌二醇组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

(图 1)。骨小梁各空间结构参数统计结果显示,与假手术组比较,模型组骨小梁 BV/TV, Tb. Th, Tb. N 均显著降低($P < 0.01$), Tb. Sp 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,雌二醇组、左归丸组骨小梁 BV/TV, Tb. Th, Tb. N 均明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$), Tb. Sp 显著降低($P < 0.01$)。见表 3。



A. 假手术组;B. 模型组;B. 雌二醇组;D. 左归丸组(图 2 同)

图 1 左归丸对去卵巢大鼠股骨骨小梁三维重建图像的影响

Fig.1 Effect of Zuoguiwan on three-dimensional reconstruction of femoral trabeculae in ovariectomized rats

表 3 左归丸对去卵巢大鼠股骨骨小梁空间结构参数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	BV/TV/%	Tb. Th/mm	Tb. N/个/mm	Tb. Sp/mm
假手术	—	55.89 ± 8.23	0.07 ± 0.01	7.95 ± 0.18	0.24 ± 0.03
模型	—	$14.31 \pm 2.97^{1)}$	$0.04 \pm 0.01^{1)}$	$2.95 \pm 0.73^{1)}$	$0.55 \pm 0.10^{1)}$
雌二醇	0.025	$27.30 \pm 1.95^{3)}$	$0.05 \pm 0.01^{3)}$	$5.60 \pm 0.29^{3)}$	$0.36 \pm 0.01^{3)}$
左归丸	4.6	$25.59 \pm 1.90^{3)}$	$0.06 \pm 0.01^{3)}$	$4.64 \pm 0.32^{2)}$	$0.40 \pm 0.02^{3)}$

3.3 对去卵巢大鼠股骨组织病理形态的影响 与假手术组比较,模型组大鼠骨小梁明显稀少,变细,结构不完整,排列疏松,间距变宽。经左归丸或雌二醇组治疗后,大鼠骨小梁与模型组比较数量明显增多,分布均匀,排列尚可。见图 2。

3.4 对去卵巢大鼠血清骨代谢指标的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清 OCN, PINP 水平显著下降($P < 0.01$), TRAP 显著升高($P < 0.01$);与模

型组比较,左归丸组大鼠血清 OCN, PINP 水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), TRAP 含量显著降低($P < 0.01$);左归丸组与雌二醇组比较差异无统计学意义。见表 4。

3.5 对去卵巢大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠下丘脑 Orexin, OX1R, OX2R mRNA 表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,左归丸组大鼠下丘脑 Orexin,

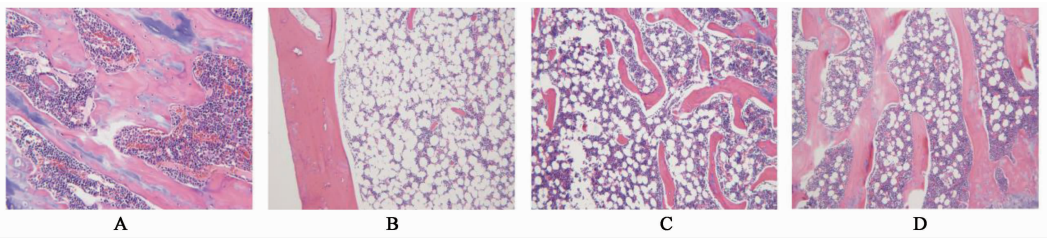


图 2 左归丸对去卵巢大鼠股骨组织病理形态的影响 (HE, ×100)

Fig.2 Effect of Zuoguiwan on femur tissue sections of ovariectomized rats(HE, ×100)

表 4 左归丸对去卵巢大鼠血清骨代谢指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Zuoguiwan on serum bone metabolism in ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	OCN	PINP	TRAP
假手术	-	9.03 ± 1.02	0.94 ± 0.03	1.83 ± 0.10
模型	-	7.62 ± 0.97 ¹⁾	0.84 ± 0.04 ¹⁾	2.26 ± 0.18 ¹⁾
雌二醇	0.025	8.75 ± 0.65 ²⁾	0.88 ± 0.02	1.70 ± 0.17 ³⁾
左归丸	4.6	8.87 ± 0.51 ²⁾	0.97 ± 0.05 ³⁾	1.62 ± 0.27 ³⁾

OX1R, OX2R mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与雌二醇组比较, 左归丸组大鼠下丘脑 Orexin, OX2R mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 左归丸对去卵巢大鼠下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Zuoguiwan on mRNA expressions of Orexin and its receptor in hypothalamus of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Orexin	OX1R	OX2R
假手术	-	4.88 ± 0.85	10.26 ± 0.94	5.33 ± 0.26
模型	-	1.24 ± 0.09 ¹⁾	0.88 ± 0.14 ¹⁾	1.34 ± 0.29 ¹⁾
雌二醇	0.025	1.85 ± 0.14	3.62 ± 0.89 ³⁾	0.78 ± 0.02 ²⁾
左归丸	4.6	7.40 ± 0.88 ^{3,4)}	2.66 ± 0.23 ²⁾	2.41 ± 0.02 ^{3,4)}

4 讨论

PMOP 在中国古籍中归属于“骨痿”“骨枯”“骨痹”等范畴。中医理论认为“肾藏精主骨生髓”, 骨骼的生长、发育、强劲和衰弱与肾精的盛衰关系密切。《黄帝内经·素问·上古天真论》云:“女子七岁, 肾气盛, 齿更发长……三七, 肾气平均, 故真牙生而长极; 四七, 筋骨坚, 发长极, 身体盛壮……七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也。”《黄帝内经·素问·痿论》云:“肾主身之骨髓……肾气热, 则腰脊不举, 骨枯而髓减, 发为骨痿……肾者, 水脏也, 今水不胜火, 则骨枯而髓虚, 故

足不能任身、发为骨痿。”可见, 肾精充盈则骨髓化生有源, 骨骼强劲; 肾精亏虚则骨髓不足以充养骨骼, 骨矿物质含量下降, 则发为“骨痿”“骨枯”。因此, 骨质疏松的发生主要与肾精亏虚, 骨失充养有关。

左归丸出自《景岳全书·新方八阵·补阵》, 原书曰其治真阴肾水不足, 不能滋溉营卫, 渐至衰羸, 或虚热往来, 自汗盗汗, 或神不守舍, 血不归原, 或劳损伤阴, 或遗淋不禁, 或气虚昏运, 或眼花耳聋, 或口燥舌干, 或腰酸腿软。凡精髓内竭, 津液枯涸等证, 俱速宜壮水之主, 以培左肾之元阴^[3]。熟地黄、山萸肉、山药、枸杞子补肾填精, 大补真阴; 龟甲胶、鹿角胶为血肉有情之品, 峻补精髓, 龟甲胶偏于补阴, 鹿角胶偏于补阳, 在补阴之中配伍补阳药, 取“阳中求阴”之意, 阴得阳升而源泉不竭。诸药合用, 共奏滋阴补肾, 填精益髓之效。

左归丸防治 PMOP 具有多通路, 多靶点的干预特点, 目前尚未被完全挖掘。随着神经系统对骨代谢调控的研究不断深入, 有研究发现, SP, CGRP, NPY 等神经肽可与骨组织中的成骨细胞, 破骨细胞, 骨细胞, BMSCs 上的神经肽受体结合, 对骨组织的生长, 代谢和骨重建发挥调节作用^[4, 17-18]。而王双磊等^[19]通过构建去卵巢大鼠模型, 发现 SP, CGRP 在去卵巢组大鼠骨组织中表达降低, NPY 在去卵巢组大鼠骨组织中表达升高, 认为其可能参与了去卵巢大鼠骨质疏松的发病过程。杨锋等^[8]则基于对肾主骨理论的研究, 再次提出神经肽缺乏是骨质疏松症发生的原因之一, 并证明左、右归丸可以作用于神经内分泌轴, 从而调节骨代谢。Orexin 作为一种脑内神经肽, 其对骨量的调节作用也被逐渐发现。Orexin 是下丘脑外侧产生的与睡眠, 觉醒, 摄食, 能量消耗及奖励行为等相关的神经肽, 包括食欲素 A (OXA) 和食欲素 B (OXB) 2 种亚型^[20-21]。它们通过 OX1R 和 OX2R 起作用。其中, OXA 与 OX1R 具有高度亲和力, OX2R 是 OXA 和 OXB 的非选择性受体。最初的研究发现, 人和大鼠缺乏 Orexin 会

导致发作性睡病,食欲不振,抑郁症和肥胖^[22-23],而这些也是绝经后女性低骨量和骨质疏松性骨折发病率增加的重要危险因素^[24-27]。此后,有学者在培养的大鼠颅盖骨成骨样细胞中发现有 OX1R mRNA 表达。WEI 等^[7]继而通过基因敲除大鼠实验,发现 Orexin 可通过激活大脑中枢的 OX2R 进而降低体循环中瘦素的水平来增加骨形成。Orexin 也可与大脑中 OX2R 结合,抑制交感神经到骨的信号,促进 BMSCs 向成骨细胞分化,增加骨形成,对骨量起到正向调节作用;此外, Orexin 激活外周骨中的 OX1R,通过降低生长激素的表达抑制骨形成,促进骨吸收,并与骨髓中 MSCs 以及成骨细胞表面的 OX1R 结合,抑制 MSCs 成骨分化,增强其成脂分化,促进骨吸收,对骨量起到负向调节的作用。这些研究均表明 Orexin 可通过中枢及外周作用调控骨重建,维持骨量的稳定。张丽媛等^[28-29]进一步发现, OXA 受体抑制剂能促进大鼠 MSCs 向成骨细胞方向分化,这可能与调控 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路有关。然而,关于下丘脑 OX1R 与 PMOP 发病的关系以及左归丸防治 PMOP 的机制是否涉及 Orexin 及其受体对骨代谢的调控,国内外文献尚未见报道。

本研究显示,模型组大鼠 BMD 较假手术组明显降低,相对骨体积,骨小梁厚度,数目下降,间距变宽,排列疏松,结构不完整,且血清骨形成标志物 PINP,OCN 含量明显下降,而骨吸收标志物 TRAP 含量则明显升高,这提示去势大鼠骨矿含量丢失严重,骨吸收增加而骨形成降低,骨代谢失衡,与绝经后骨质疏松症病理状态相符。模型组大鼠下丘脑 Orexin,OX2R mRNA 表达水平较之假手术组显著下调,表明下丘脑 Orexin 及 OX2R 可正向调节骨代谢,促进骨形成,提高骨密度,与既往研究相符。此外,下丘脑 OX1R mRNA 表达趋势与 Orexin,OX2R mRNA 一致,这提示大鼠下丘脑 OX1R 也参与了对骨代谢的正向调节。左归丸干预可显著上调模型大鼠 Orexin,OX1R,OX2R mRNA 水平,促进骨形成,抑制骨吸收,明显改善骨小梁的微结构,增加大鼠的骨密度,延缓骨量流失。

本次研究通过构建去卵巢骨质疏松症大鼠模型,观察左归丸对下丘脑 Orexin 及其受体 mRNA 表达的影响,研究结果表明下丘脑 Orexin,OX1R,OX2R mRNA 水平降低可能是 PMOP 的发病机制之一;左归丸可通过上调下丘脑 Orexin 及其相关受体的 mRNA 水平,从而有效防治 PMOP。

[参考文献]

[1]

Al-Subaie A E, Laurenti M, Abdallah M N, et al. Propranolol enhances bone healing and implant osseointegration in rats tibiae[J]. J Clin Periodontol, 2016,43(12):1160-1170.

[2]

Santen R J, Kagan R, Altomare C J, et al. Current and evolving approaches to individualizing estrogen receptor-based therapy approaches for menopausal women[J]. J Clin Endocr Metab, 2014,99(3):733-747.

[3]

明·张介宾. 景岳全书·下册[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:1283.

[4]

DING W G, ZHANG Z M, ZHANG Y H, et al. Changes of substance P during fracture healing in ovariectomized mice[J]. Regul Peptides, 2010,159(1/3):28-34.

[5]

Sample S J, Collins R J, Wilson A P, et al. Systemic effects of ulna loading in male rats during functional adaptation[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(9):2016-2028.

[6]

Sample S J, Behan M, Smith L, et al. Functional adaptation to loading of a single bone is neuronally regulated and involves multiple bones[J]. J Bone Miner Res, 2008,23(9):1369-1371.

[7]

WEI W, Motoike T, Krzeszinski J Y, et al. Orexin regulates bone remodeling via a dominant positive central action and a subordinate negative peripheral action[J]. Cell Metab, 2014,19(6):927-940.

[8]

杨锋,杨利学,李小群,等. 左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(6):761-765.

[9]

付海尔,李建民,刘玉红. 左归丸对肾阴虚模型大鼠神经-内分泌-免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):155-159.

[10]

谭峰,樊巧玲,卞玉群,等. 左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):137-140.

[11]

谭峰,樊巧玲,卞玉群,等. 补肾方对 SD 大鼠 rBMSCs Runx2 mRNA 表达的影响[J]. 海峡药学,2015, 27(6),40-41.

[12]

LIU F, TAN F, TONG W, et al. Effect of Zuoguiwan on osteoporosis in ovariectomized rats through RANKL/OPG pathway mediated by β_2 AR[J]. Biomed Pharmacoth, 2018,103:1052-1060.

[13]

柴毅,樊巧玲. 左归丸治疗骨质疏松症相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):201-208.

[14]

LI X, NIU Q T, Warmington K S, et al. Progressive increases in bone mass and bone strength in an ovariectomized rat model of osteoporosis after 26 weeks of treatment with a sclerostin antibody [J].

Endocrinology, 2014, 155(12) : 4785-4797.

[15] 孟玥,任艳玲,孙月娇,等. 左归丸、右归丸及其拆方对去卵巢骨质疏松症模型大鼠肾脏碱性磷酸酶、骨钙素表达的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(5) : 423-427.

[16] 张添昊,任艳玲,艾思羽,等. 左归丸与右归丸对去卵巢大鼠股骨骨髓 RUNX2、COL1 基因与蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(5) : 1090-1092.

[17] FAN W, Bouwense S A, Crawford R, et al. Structural and cellular features in metaphyseal and diaphyseal periosteum of osteoporotic rats[J]. J Mol Histol, 2010, 41(1) : 51-60.

[18] JIE X, YU W, WANG X, et al. Correlation between neuropeptide distribution, cancellous bone microstructure and joint pain in postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis[J]. Neuropeptides, 2015, 56: 97.

[19] 王双磊,韩焱,谢玮鑫,等. 神经肽在去卵巢大鼠骨组织中表达差异的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4) : 437-440, 457.

[20] Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki Y Y, et al. Differential roles of orexin receptor-1 and-2 in the regulation of non-REM and REM sleep[J]. J Neurosci, 2011, 31(17) : 6518-6526.

[21] Sakurai T, Mieda M. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal[J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(8) : 451-462.

[22] Chemelli R M, Willie J T, Sinton C M, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation[J]. Cell, 1999, 98(4) : 437-451.

[23] Hara J, Beuckmann C T, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity[J]. Neuron, 2001, 30(2) : 345-354.

[24] 陈妍妍,廖晖,贺松平,等. 绝经后骨质疏松性椎体骨折患者生活质量调查及相关因素分析[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(8) : 634-638.

[25] Stone K L, Ewing S K, Lui L Y, et al. Self - reported sleep and Nap habits and risk of falls and fractures in older women: the study of osteoporotic fractures[J]. J Am Geriatr Soc, 2006, 54(8) : 1177-1183.

[26] Bab I A, Raz Y. Depression and bone mass[J]. Ann Ny Acad Sci, 2010, 1192(1) : 170-175.

[27] Raz Y, Inbal G, Alon B, et al. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(45) : 16876-16881.

[28] 张丽媛,纳青青,吴天秀,等. Orexin-1 受体抑制剂通过 Wnt 通路促进骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5) : 606-611.

[27] 张丽媛,纳青青,吴天秀. Orexin-1 受体抑制剂对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 医药导报, 2017, 36(10) : 1103-1107.

[责任编辑 张丰丰]