

补肾强骨膏补益肝肾法在调控骨组织中 Runx2 及 Osterix 对绝经后骨质疏松的影响

于曦, 杨柳, 金志宏, 付明立, 吴翰, 万欢, 李辉, 林文
黄浦区中医医院, 湖北 武汉 430300

摘要 : 目的: 探讨补肾强骨膏补益肝肾法在调控骨组织中 Runx2 及 Osterix 对绝经后骨质疏松后骨质疏松的影响。方法: 选择 50 只 3 月龄雌性未交配的 SPF 级 SD 大鼠展开研究, 通过随机数字表法将其分为空白组 (正常大鼠)、模型组 (去卵巢骨质疏松模型)、补肾强骨膏低剂量组 (去卵巢骨质疏松模型 + 小剂量补肾强骨膏)、补肾强骨膏中剂量组 (去卵巢骨质疏松模型 + 中剂量补肾强骨膏)、补肾强骨膏高剂量组 (去卵巢骨质疏松模型 + 大剂量补肾强骨膏), 各组 10 只, 使用 Micro-CT 检测大鼠股骨纤维结构参数, 使用 Western Blot 检测大鼠的 Runx2、Osterix 蛋白表达水平, 使用 qPCR 检测大鼠 Runx2、Osterix mRNA 表达水平。结果: 相较于空白组而言, 模型组大鼠的骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数明显降低, 低剂量组、中剂量组、高剂量组的骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数高于模型组, 中剂量组、高剂量组的骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数高于低剂量组 ($P < 0.05$); 经 Western Blot 检测, 发现高剂量组、中剂量组、低剂量组的 Runx2、Osterix 蛋白表达水平明显高于模型组, 中剂量组、高剂量组的 Runx2、Osterix 蛋白表达水平明显高于低剂量组 ($P < 0.05$); 经 qPCR 检测发现, 空白组 Runx2、Osterix mRNA 明显高于其他组, 高剂量组、中剂量组、低剂量组的 Runx2、Osterix mRNA 明显高于模型组, 中剂量、高剂量组的 Runx2、Osterix mRNA 明显高于低剂量组。结论: 补肾强骨膏补益肝肾法可对骨组织当中的 Runx2、Osterix 蛋白产生调控作用, 并对骨质疏松产生一定影响, 经补肾强骨膏补益肝肾法可有效增加 Runx2、Osterix 蛋白的表达, 这或将在未来成为治疗绝经后骨质疏松的潜在治疗靶点之一。

关键词 : 补肾强骨膏; 骨组织; Runx2; Osterix; 蛋白表达; 绝经后; 骨质疏松

The Effect of Tonifying Liver and Kidney with Bushen Qianggu Ointment on the Regulation of Runx2 and Osterix in Bone Tissue for Postmenopausal Osteoporosis

Yu Xi, Yang Liu, Jin Zhihong, Fu Mingli, Wu Han, Wan Huan, Li Hui, Lin Wen
Huangpu District Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhan, Hubei 430300

Abstract : Objective: To investigate the effect of Bushen Qianggu Ointment, a traditional Chinese medicine formula for tonifying liver and kidney, on the regulation of Runx2 and Osterix in bone tissue and its impact on postmenopausal osteoporosis. Methods: Fifty 3-month-old female unmated SPF-grade SD rats were selected for the study. They were randomly divided into five groups: a blank group (normal rats), a model group (ovariectomized osteoporosis model), a low-dose Bushen Qianggu Ointment group (ovariectomized osteoporosis model + low-dose Bushen Qianggu Ointment), a medium-dose Bushen Qianggu Ointment group (ovariectomized osteoporosis model + medium-dose Bushen Qianggu Ointment), and a high-dose Bushen Qianggu Ointment group (ovariectomized osteoporosis model + high-dose Bushen Qianggu Ointment), with 10 rats in each group. Micro-CT was used to measure the fibrous structural parameters of the rats' femurs. Western Blot was employed to detect the protein expression levels of Runx2 and Osterix, and qPCR was utilized to examine the mRNA expression levels of Runx2 and Osterix in the rats. Results: Compared to the blank group, the model group showed significant reductions in bone density, tissue mineral density, and bone volume fraction. The low-dose, medium-dose, and high-dose Bushen Qianggu Ointment groups had higher bone density, tissue mineral density, and bone volume fraction than the model group. The medium-dose and high-dose groups exhibited even higher values than the low-dose group ($P < 0.05$). Western Blot analysis revealed that the protein expression levels of Runx2 and Osterix were significantly higher in the high-dose, medium-dose, and low-dose Bushen Qianggu Ointment groups compared to the model group. Moreover, the medium-dose and high-dose groups had higher protein expression levels than the low-dose group ($P < 0.05$). qPCR results indicated that the blank group had significantly

higher Runx2 and Osterix mRNA levels than the other groups. The high-dose, medium-dose, and low-dose Bushen Qianggu Ointment groups showed higher Runx2 and Osterix mRNA levels compared to the model group, with the medium-dose and high-dose groups demonstrating higher levels than the low-dose group. Conclusion: Bushen Qianggu Ointment, through its method of tonifying liver and kidney, can regulate the expression of Runx2 and Osterix proteins in bone tissue and exert a certain influence on osteoporosis. The use of Bushen Qianggu Ointment effectively increases the expression of Runx2 and Osterix proteins, suggesting that it may become a potential therapeutic target for the treatment of postmenopausal osteoporosis in the future.

Keywords : bushen qianggu ointment; bone tissue; runx2; osterix; protein expression; postmenopausal; osteoporosis

引言

绝经后骨质疏松症 (Postmenopausal Osteoporosis, PMOP) 属于原发性骨质疏松, 随着我国人口老龄化越来越重, 患病率也越来越高。有研究直接指出^[1], 骨质疏松发病机制为成骨细胞、破骨细胞的功能失衡造成的, 破骨细胞具有骨吸收功能, 成骨细胞则是在机体内对骨吸收陷窝进行修复, 形成动态平衡。关于骨质疏松症的调控机制, 有研究发现^[2], 性激素对于骨质疏松具有重要的作用, 当雌性激素分泌不足时, 就有可能造成骨质疏松症的发生。对于绝经后的女性, 雌二醇分泌明显减少, 骨质疏松症发生率会明显增加。Runx2 和 Osterix 作为调控成骨细胞分化和骨形成的关键转录因子^[3], 在骨代谢中发挥核心作用。Runx2 是成骨细胞分化的早期标志物, 可激活下游骨基质蛋白基因的转录; Osterix 则进一步调控成骨细胞终末分化及矿化过程。研究证实^[4], 绝经后骨质疏松症患者骨组织中 Runx2 和 Osterix 的表达显著下调, 导致成骨细胞功能受损, 骨形成能力减弱。因此, 恢复 Runx2 和 Osterix 的正常表达水平, 成为防治绝经后骨质疏松症的重要靶点。本文基于此, 将通过大鼠实验的方式, 探讨补肾强骨膏补益肝肾法在调控骨组织中 Runx2 及 Osterix 对绝经后骨质疏松的影响, 具体报告如下。

一、材料与方法

(一) 实验动物及分组

将 50 只 3 月龄的 SPF 级 SD 雌性未交配大鼠作为研究对象, 购买自上海凯学生物科技有限公司。饲养条件: 室温: 20-25°C, 湿度: 35-65%, 通过常规的饲养方法进行为期一周的适应性饲养。随后通过随机数字表达法将大鼠分为空白组、模型组、补肾强骨膏低剂量组、补肾强骨膏中剂量组、补肾强骨膏高剂量组, 各组 10 只。除了空白组之外, 其他四组均建立绝经后骨质疏松模型, 并在建立模型 1 周之后进行药物干预。

(二) 模型建立

10% 水合氯醛腹腔麻醉, 消毒无菌下在背部双侧切开皮肤, 钝性分离, 切除双侧卵巢, 切口逐层缝合, 对照组不切除两侧卵巢, 仅将卵巢周围的脂肪切除。

(三) 实验药品及给药剂量

补肾强骨膏成分组成: 10g 熟地、10g 山药、10g 山茱萸、10g 三七、10g 鹿角胶、12g 丹参、10g 菟丝子、6g 肉桂、10g 砂仁、10g 山楂、30g 生黄芪、6g 知母、6g 生地、10 淫羊藿、12g 补骨脂。

给药剂量: 对于空白组和模型组给予同等剂量的生理盐水, 给药剂量中, 等效剂量按照承认的 6.3 倍进行计算。高剂量: $0.315\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 中剂量: $0.15\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 低剂量:

$0.05\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 在术后一周之后, 每周进行 6 次灌胃, 休息 1 日。为期十四周。

(四) 指标检测方法

1. Micro-CT 检测方法

在完成治疗后, 将大鼠处死, 并且在无菌的条件下完成股骨剥离, 将全长股骨进行收集, 使用 Micro-CT 对大鼠的股骨纤维结构参数进行扫描和检测, 其中包括的指标为骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数 (BV/TV)。

2. Western Blot 检测方法

通过蛋白提取试剂盒对骨组织标本蛋白进行提取, 其标本位于骨折端上下 5cm, 蛋白浓度测定中, 在样品当中, 按照 1:4 比例加入 $5 \times \text{SDS}$ 蛋白上样缓冲液, 在沸水当中完成 5min 的加热, 将 30ug 样品吸取, 缓慢介入样品孔完成电泳。当溴酚蓝跑出之后即可停止电泳, 完成转膜。转膜后, 于室温之下通过 5% 脱脂牛奶进行脱色摇床, 封闭时间为 1h。一抗的赋予中, 使用 Runx2 单克隆抗体、Osterix 单克隆抗体、 β -actin 单克隆抗体在温度为 4°C 的条件下进行过夜。洗涤次数为 3 次, 每次为 5min。通过 ECL 显色液进行相应, 并经 Image J 图像完成数据处理, 获取结果。

3. qPCR 检测方法

根据 Trizol 试剂说明书获取组织标本的总 RNA, 并对各组大鼠的 Runx2、Osterix mRNA 进行记录。

(五) 统计学方法

本次研究的数据统计主要是通过统计学软件 SPSS23.00 进行数据分析, 数据以 $x \pm s$ 表示, 多组计量资料数据两两组间比较用 one-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异显著。

二、结果

(一) 各组股骨纤维结构参数结果对比

经研究表明, 在骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数数据对比中, 空白组明显高于其他四组, 低剂量组、中剂量组、高剂量组明显高于模型组, 中剂量组、高剂量组明显高于低剂量组 ($P < 0.05$), 如表1所示。

表1- 各组骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数结果对比

组别	例数	骨密度 (g/cm ²)	组织矿物质密度 (g/cm ²)	BV/TV (%)
空白组	10	0.23 ± 0.04	0.26 ± 0.05	50.41 ± 9.26
模型组	10	0.04 ± 0.01*	0.03 ± 0.01*	26.46 ± 6.24*
低剂量组	10	0.08 ± 0.01*#	0.09 ± 0.02*#	31.20 ± 5.80*#
中剂量组	10	0.13 ± 0.02*#&	0.14 ± 0.04*#&	37.22 ± 5.98*#&
高剂量组	10	0.14 ± 0.03*#&	0.15 ± 0.04*#&	38.90 ± 6.52*#&

注: “*”表示相较于空白组, $P < 0.05$, “#”表示相较于模型组, $P < 0.05$, “&”表示相较于低剂量组, $P < 0.05$, “~”表示相较于中剂量组, $P < 0.05$, 下同

(二) 各组 Runx2、Osterix 蛋白表达结果对比

经研究表明, 在 Runx2、Osterix 蛋白表达水平结果对比中, 空白组明显高于其他四组, 高剂量组、中剂量组、低剂量组明显高于模型组, 中剂量组、高剂量组明显高于低剂量组 ($P < 0.05$), 具体如表2所示。

表2- 各组 Runx2、Osterix 蛋白表达结果对比

组别	例数	Runx2 蛋白表达	Osterix 蛋白表达
空白组	10	156.12 ± 10.88	145.82 ± 13.59
模型组	10	81.60 ± 7.91*	82.66 ± 6.85*
低剂量组	10	102.52 ± 8.41*#	105.66 ± 7.23*#
中剂量组	10	115.41 ± 10.23*#&	118.11 ± 9.51*#&
高剂量组	10	117.95 ± 11.36*#&	121.84 ± 10.69*#&

(三) 各组 Runx2、Osterix mRNA 结果对比

经研究表明, 在 Runx2、Osterix mRNA 结果对比中, 空白组明显高于其他四组, 高剂量组、中剂量组、低剂量组明显高于模型组, 中剂量组、高剂量组明显高于低剂量组 ($P < 0.05$), 具体如表3所示。

表3- 各组 Runx2、Osterix mRNA 结果对比

组别	例数	Runx2 mRNA	Osterix mRNA
空白组	10	11.53 ± 2.43	13.63 ± 3.09
模型组	10	6.12 ± 1.58*	6.01 ± 1.44*
低剂量组	10	7.91 ± 1.96*#	7.24 ± 1.98*#
中剂量组	10	9.37 ± 2.11*#&	9.53 ± 2.30*#&
高剂量组	10	9.53 ± 2.02*#&	9.68 ± 2.26*#&

三、讨论

骨质疏松 (Osteoporosis, OP) 是临床常见的一种代谢性骨

骼疾病, 临床表现主要为疼痛、脆性骨折、活动受限为主, 严重影响患者生活质量, 也对患者及其家庭形成了一定的经济负担^[5]。一般来说, 骨质疏松主要包括原发性骨质疏松和继发性骨质疏松。近年来, 随着我国人口老龄化不断加重, 骨质疏松发病率明显上升。就目前而言, 临床治疗以药物治疗为主, 其中包括双磷酸盐、雌激素替代疗法、选择性雌激素受体调节剂及钙剂等^[6]。可是, 此类药物的疗效并不佳, 其中的主要原因就是与雌性激素的缺乏密切相关, 且在长期的应用可能会降低焱凉, 严重时还会对肾脏造成伤害。从中医的角度来说, 骨骼的疾病与肾脏功能息息相关。肾主骨, 藏精, 肾中精气依赖水谷精微滋养, 才能不断充盛和成熟^[7]。补肾强骨膏作为一种传统的中药膏方, 具有补肾填精壮骨的功效。其药物组成通常包括多种具有补肾益精、强筋健骨作用的中药材, 能够补益肝肾, 调节机体的阴阳平衡, 促进骨骼的生长和修复^[8], 从而对骨质疏松症起到治疗作用。骨代谢时, Runx2 和 Osterix 是两种关键转录因子, 在骨形成及代谢中十分关键。

本文基于此, 通过大鼠实验的方法, 探讨补肾强骨膏补益肝肾法在调控骨组织中 Runx2 及 Osterix 对绝经后骨质疏松的影响, 分别通过 Micro-CT、Western Blot、qPCR 进行检测, 经研究表明, 骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数结果对比中, 空白组明显高于其他四组, 且高剂量组、中剂量组、低剂量组高于模型组, 中、高剂量组高于低剂量组 ($P < 0.05$)。提示补肾强骨膏可有效提高大鼠骨密度、组织矿物质密度计骨体积分数, 剂量控制在 0.15-0.315 之间最佳; 在 Runx2、Osterix 蛋白表达水平对比中, 空白组明显高于其他四组, 模型组明显低于其他四组, 高剂量、中剂量组高于低剂量组 ($P < 0.05$)。提示补肾强骨膏可有效提高大鼠 Runx2、Osterix 蛋白表达水平; 在 Runx2、Osterix mRNA 结果对比中, 空白组明显高于其他四组, 模型组明显低于其他四组, 高剂量组、中剂量组高于低剂量组 ($P < 0.05$), 提示补肾强骨膏可有效提高大鼠 Runx2、Osterix mRNA ($P < 0.05$)。

综上所述, 补肾强骨膏补益肝肾法可以通过调控 Runx2、Osterix 蛋白, 从而对骨质疏松产生治疗作用, 在临床上应引起重视。

参考文献

- [1] 李仕斌, 朱慧雯. 肾阳虚型骨质疏松症应用补肾强骨膏治疗对中医证候积分及血清相关指标的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(9): 10-12.
- [2] 高春鹏, 翟轶凡, 韩耀辉, 等. 补肾还少膏联合常规抗骨质疏松方案治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折经皮穿刺椎体成形术后患者疗效观察 [J]. 河北中医, 2024, 46(8): 1258-1261.
- [3] Fan N, Wang T, Xi Y, et al. Vertebral CT Hounsfield units in postmenopausal women with osteoporotic vertebral compression fracture: identification and validation of reference intervals [J]. European Spine Journal, 2025, (prepublish): 1-10.
- [4] 王斌, 麦彩园, 谢胜德, 等. Wnt/ β -catenin、BMP-2/Runx2/Osterix、OPG/RANKL、LGR4/RANKL 通路的相关因子在绝经后骨质疏松性骨折中的表达 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(11): 1577-1583, 1658.
- [5] 徐众华, 莫雨晴, 周驰. 基于 BMP/Runx2/Osx 信号通路研究淫羊藿总黄酮改善绝经后骨质疏松模型大鼠的作用机制 [J]. 中国药房, 2020, 31(19): 2333-2338.
- [6] Fuzhu Tan, Cui X, Ren S, et al. Role and Validation of Lactylation-Related Gene Markers in Postmenopausal Osteoporosis [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2025, (prepublish): 1-20.
- [7] 纪元元, 李劲峰, 寇红伟, 等. 微小 RNA-23a-3p 负调控 Runx2 基因抑制骨髓间充质干细胞成骨分化诱导绝经后骨质疏松的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(1): 112-115.
- [8] 邢尚曼, 郭超, 宋冰, 等. 芙蓉壮骨膏调控 EZH2/Wnt3a/ β -catenin 通路促进绝经后骨质疏松大鼠成骨分化 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(6): 818-823, 894.