

补肾化痰方对OVX诱导的骨质疏松大鼠血清LPS及TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响

黄诗怡¹, 周广文¹, 朱伟², 谭张奎¹, 张妍¹, 熊梦欣¹, 薛瑶珺¹, 张麟³, 向楠^{1*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 武汉大学, 武汉 430072;

3. 武汉市中西医结合医院, 武汉 430022)

[摘要] 目的:研究补肾化痰方对双侧卵巢切除术(OVX)诱导的骨质疏松大鼠脂多糖(LPS)及Toll样受体4(TLR4)/髓样细胞分化蛋白88(MyD88)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的影响。方法:将60只SPF级6月龄的雌性大鼠随机分为假手术组,模型组,戊酸雌二醇组,补肾化痰方低、中、高剂量组,使用双侧OVX造模,造模后1周,每组中挑选8只,戊酸雌二醇组按0.184 mg·kg⁻¹,补肾化痰方低、中、高剂量组分别按4.7, 9.4, 18.8 g·kg⁻¹灌胃,假手术与模型组给予0.9%生理盐水4 mL灌胃,干预12周后处死取材。运用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清LPS含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织中TLR4, MyD88, 磷酸化(p)-NF- κ B p65的蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测骨组织中TLR4, MyD88, NF- κ B p65 mRNA水平及通路相关炎症因子白细胞介素(IL)-1 β , IL-6 mRNA的表达。结果:与假手术组比较,模型组的血清LPS水平,骨组织中TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65蛋白表达水平, TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 mRNA水平均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,戊酸雌二醇组和补肾化痰方高剂量组血清LPS水平,骨组织中TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65的蛋白表达, TLR4, MyD88, NF- κ B p65 mRNA水平,以及下游炎症因子IL-1 β , IL-6 mRNA水平有不同程度降低($P < 0.05$)。结论:补肾化痰方可以降低血清LPS含量,调控TLR4/MyD88/NF- κ B通路中TLR4, MyD88, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65的mRNA水平及蛋白表达,降低骨组织中IL-1 β , IL-6 mRNA水平,改善骨微结构,抑制绝经后骨质疏松症的病情发展。

[关键词] 补肾化痰方; 绝经后骨质疏松症(PMOP); 脂多糖; Toll样受体4(TLR4)/髓样细胞分化蛋白88(MyD88)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路; 骨微环境; 炎症细胞因子; 骨免疫学

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R27.11 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)09-0070-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210990

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210315.1141.001.html>

[网络出版日期] 2021-3-15 17:18

Effect of Bushen Huatan Prescription on Serum LPS and TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway in Rats with Ovariectomy-induced Osteoporosis

HUANG Shi-yi¹, ZHOU Guang-wen¹, ZHU Wei², TAN Zhang-kui¹, ZHANG Yan¹, XIONG Meng-xin¹,

XUE Yao-jun¹, ZHANG Lin², XIANG Nan^{1*}

(1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Wuhan University, Wuhan 430072, China;

3. Wuhan Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Bushen Huatan prescription on serum

[收稿日期] 20201231(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074416, 81904267);湖北省自然科学基金青年项目(2019CFB232),湖北省卫生健康委员会中医药科研青年人才项目(ZY2019Q006);湖北省卫生和计划生育委员会湖北中医名师向楠工作室项目(鄂卫生计生办通[2018]32号);武汉市卫生健康委员会武汉市医学科研项目(WZ19Q03, WZ20C28)

[第一作者] 黄诗怡,在读硕士,从事中医药防治内分泌及相关代谢疾病相关研究, E-mail: 425604008@qq.com

[通信作者] * 向楠,二级教授,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, Tel: 027-68889402, E-mail: xiangnan61@sina.com

lipopolysaccharide (LPS) and Toll-like receptor 4 (TLR4)/ myeloid cell differentiation protein 88 (MyD88)/ nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. **Method:** Sixty SPF 6-month-old female rats were randomly divided into sham operation group, model group, estradiol valerate group and Bushen Huatan prescription low, medium and high dose groups. One week after modeling by bilateral ovariectomy, 8 rats in each group were selected to receive intragastric administration. The estradiol valerate group was given $0.184 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, and Bushen Huatan prescription low, middle and high dose groups were given 4.7, 9.4 and $18.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, sham operation group and model group were given 0.9% saline 4 mL by gavage respectively. After 12 weeks of intervention, the rats were sacrificed for detection. Serum LPS was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), while protein expressions of TLR4, MyD88 and phosphorylated (p)-NF- κ B p65 in bone tissue were detected by Western blot, and the mRNA expressions of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , and IL-6 in bone tissue were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). **Result:** Compared with sham operation group, the serum LPS level as well as protein expression of TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65 and mRNA expression of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , and IL-6 significantly increased in model group ($P<0.05$). Compared with the model group, serum LPS level, protein expression of TLR4, MyD88, and p-NF- κ B p65, mRNA levels of TLR4, MyD88, and NF- κ B p65 in bone tissues as well as downstream inflammatory factors IL-1 β , IL-6 mRNA expression decreased to different degrees in estradiol valerate group and Bushen Huatan prescription high dose group ($P<0.05$). **Conclusion:** Bushen Huatan prescription can reduce serum LPS content, regulate mRNA and protein expression of TLR4, MyD88, NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 in TLR4/MyD88/NF- κ B pathway, and down-regulate mRNA levels of IL-1 β and IL-6 in bone tissues to improve bone microstructure and inhibit the development of postmenopausal osteoporosis (PMOP).

[Key words] Bushen Huatan prescription; postmenopausal osteoporosis (PMOP); lipopolysaccharide; Toll-like receptor 4 (TLR4)/ myeloid cell differentiation protein 88 (MyD88) / nuclear transcription factor (NF- κ B) signaling pathway; bone microenvironment; inflammatory cytokines; osteoimmunology

绝经后骨质疏松症 (PMOP) 是一种全身性代谢性骨病, 其主要因为女性围绝经期性激素水平下降, 导致骨量丢失, 骨微结构变化, 骨脆性增加, 以骨吸收大于骨形成的高转换型骨重建为特点^[1]。根据 2018 年卫生健康委员会发布的中国居民骨质疏松症流行病学调查, 我国 50 岁以上居民患骨质疏松症发病率为 19.2%, 其中女性发病率为 32.1%, 约是男性发病率的 5 倍^[2]。PMOP 已经成为威胁 50 岁以上女性健康的重要疾病之一。

PMOP 的发病因素众多, 研究认为, 绝经后全身的慢性炎症状态和骨微环境中炎症因子水平的增加是重要原因之一^[3-4]。有研究发现, 绝经后肠道菌群紊乱导致肠屏障受损, 肠道中革兰氏阴性杆菌细胞外壁上的脂多糖 (LPS) 越过肠上皮细胞, 可以导致全身的慢性炎症状态, 引发远端骨组织中骨微环境的改变, 影响骨代谢^[5]。其中, 骨组织中 Toll 样受体 4 (TLR4) 与 LPS 结合, 诱导炎症细胞因子的增加, 激活骨免疫, 是 PMOP 中间重要的一环^[6-7]。

向楠教授多年来一直从事 PMOP 的中医药防

治的临床实践, 提出“补肾化痰”的治疗法则, 其团队长期致力于中医药防治 PMOP 的科学研究^[8-11]。课题组的前期研究发现, 补肾化痰方可以调节肠道菌群保护肠道稳态^[12], 降低去势大鼠骨组织中白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症细胞因子的表达^[13]和免疫 T 细胞亚群辅助性 T 细胞 17 (Th17)/ 调节性 T 细胞 (Treg) 的值。为进一步明确补肾化痰方对去势雌性大鼠肠道微生态和骨微环境的调节作用及其机制, 本研究拟采用双侧卵巢切除术 (OVX) 建立 PMOP 模型, 通过观察、对比补肾化痰方对肠屏障相关指标血清 LPS, 骨组织中 TLR4, 髓样细胞分化蛋白 88 (MyD88), 核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65), 以及通路下游炎症因子 IL-1 β , IL-6 的变化, 探讨补肾化痰方对 OVX 大鼠的骨微环境调节作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 雌性 SPF 级 6 月龄 SD 大鼠 60 只, 购自三峡大学, 合格证号 SCXK (鄂) 2017-0012, 体质量 (278 ± 26) g, 饲养于湖北中医药大学实验动物中心, 温度 (21 ± 1.5) °C, 相对湿度 $55\%\pm 5\%$, 大鼠自由饮

水,进食普通饲料。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(批号201909006)。

1.2 试剂和药品 补肾化痰方组成为菟丝子30 g,淫羊藿10 g,补骨脂15 g,全瓜蒌15 g,红曲12 g,山楂20 g,加水煎制浓缩为质量浓度 $0.94\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液(药材由湖北省中医院药房提供并加工制备,皆依据2015年版《中华人民共和国药典》炮制,由湖北省中医院周亚娜副教授鉴定为正品,并符合要求);戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号374A);LPS酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(武汉Cusabio公司,批号CSB-E14247r);磷酸酶抑制剂,RIPA裂解液,聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为S1873,P0013B,P0010);苯甲磺酰氟(PMSF)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号P105539);蛋白Marker(南京海利克斯信息技术有限公司,批号P12103-3);小鼠单克隆抗体 β -肌动蛋白(β -actin),TLR4兔抗大鼠一抗,MyD88兔抗大鼠一抗,磷酸化(p)-NF- κ B p65兔抗大鼠一抗(美国CST公司,批号分别为3700S,14358S,50010S,6956T);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BA1051,BA1054);增强化学发光(ECL)底物液(北京普利莱基因技术有限公司,批号P1050);trizol(北京艾德莱生物科技有限公司,批号252250AX);HiScript转录酶试剂,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);脱氧核苷三磷酸(dNTP),DNA聚合酶(天根生化科技有限公司,批号分别为LOT#P4325,ET105-01)。

1.3 仪器 C2500-R-230V型高速离心机(美国Labnet公司);Flexstation3型酶标仪(美国Molecular Devices公司); μ 100型微小骨密度检测仪(瑞士ScancoMedical公司);DYCZ-40型电泳仪(北京六一仪器厂);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)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 将大鼠适应性喂养1周后,按体质量随机分为假手术组,模型组,戊酸雌二醇组,补肾化痰组低、中、高剂量组,每组10只。在无菌环境下行造模手术,假手术组在卵巢周围切除同等体积的脂肪组织,其他组均行双侧OVX。参考文献[13]进行造模,术前大鼠饮水不限制,禁食过夜后,予10%水合氯醛 $30\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射进行麻醉,

麻醉后将大鼠俯卧位固定四肢,用背部双切口术式去卵巢造模,假手术组在卵巢附近切除同等体积的脂肪组织。分层缝合伤口后,每只连续3 d行腹腔注射青霉素 $20\text{ 万 U}\cdot\text{kg}^{-1}$,并分笼饲养,密切观察大鼠的饮食、活动和伤口愈合情况。

2.2 干预方法 术后1周内造模大鼠死亡4只,剔除伤口愈合不佳、体质量降低严重的个别大鼠,每组选取8只,开始给药。延续本课题组给药方法^[13],戊酸雌二醇组予戊酸雌二醇 $0.184\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,补肾化痰方低、中、高各剂量组分别予 $4.7, 9.4, 18.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 补肾化痰方,假手术与模型组组予0.9%生理盐水4 mL灌胃。以上各组,每日灌胃给药1次,共给药12周。在第12周,予10%水合氯醛 $30\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后麻醉处死大鼠,腹主动脉采取血液;取大鼠肱骨置于冻存管中 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.3 检测指标

2.3.1 血清LPS含量 常温全血 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心10 min,离心半径16 cm。取血清100 μL ,按照LPS试剂盒说明书检测其中LPS含量。

2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨组织中TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65蛋白表达 用PMSF,磷酸酶抑制剂和RIPA裂解液按1:1:100的比例制成200 μL 裂解液,加入装有骨组织碎块的环氧树脂(EP)管,匀浆后置于冰上30 min充分裂解。取裂解液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心5 min,离心半径12 cm,得到测试样品。测试样品用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释20倍后,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,沸水浴法煮样获得蛋白样品。取蛋白样品40 μg ,与Marker加入上样孔,先后恒压80,120 V约1.5 h待蛋白分离,分别在不同条件下转移至PVDF膜,TLR4(200 mA,120 min;300 mA,15 min), β -actin, MyD88(200 mA,90 min),p-NF- κ B p65(200 mA,120 min)。用含有5%脱脂奶粉的TBST浸泡PVDF膜2 h,用封闭液按照不同比例稀释一抗(TLR4,1:1 000; MyD88, p-NF- κ B p65,1:2 000; β -actin,1:500),将PVDF膜浸泡其中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。第2天用TBST洗膜5次,每次5 min。再用TBST按1:5万稀释二抗,温室摇床孵育2 h后用TBST充分洗涤。用ECL试剂使PVDV膜上荧光带色,用保鲜膜覆盖,X光胶片压片后加入显影液、定影液后冲洗胶片。晾干后,用BandScan分析胶片灰度值。

2.3.3 Real-time PCR检测骨组织中TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 mRNA的表达 取冰冻骨组织质量约100 mg,用trizol法提取骨组织中RNA,逆转录成cDNA,将得到的cDNA稀释

10倍,取4 μL先后加入100 μmol的上游、下游引物各0.4 μL, SYBR Green/FlouresceinqPCR Master Mix 10 μL, H₂O 5.2 μL, 循环程序设定为50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 重复40个循环。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,得到的数据以2^{-ΔΔC_t}法进行分析,计算各基因相对表达量。引物序列由北京擎科新业生物公司提供,见表1。

表1 PCR引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GAAGCTGGTCATCAACGGGA	175
	下游 GGCGGAGATGATGACCCCTTT	
TLR4	上游 GAGGACTGGGTGAGAAACGA	169
	下游 AGATACACCAACGGCTCTGG	
MyD88	上游 TCGACGCCTTCATCTGCTAC	177
	下游 CCATGCGACGACACCTTTTC	
NF-κB p65	上游 CATAAGCTGACCCCTAGCCTG	135
	下游 TTTCTTCAATCCGGTGGCGA	
IL-6	上游 GTTGCCCTTCTGGGACTGATG	102
	下游 TACTGGTCTGTTGTTGGGTGGT	
IL-1β	上游 CTGTGACTCGTGGGATGATG	117
	下游 AGGGATTTTGTCTGTTGCTTG	

2.4 统计学方法 采用SPSS 23.0进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾化痰方对OVX大鼠血清LPS的影响 与假手术组比较,模型组大鼠的血清LPS浓度明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,戊酸雌二醇组与补肾化痰方各剂量组的血清LPS的浓度出现不同程度的降低($P < 0.05$);呈一定的浓度依赖性。见表2。

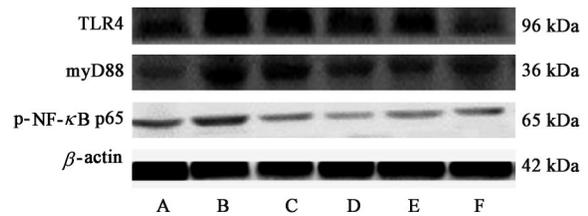
表2 补肾化痰方对OVX大鼠血清LPS的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Bushen Huatan prescription on serum LPS of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LPS μg·L ⁻¹
假手术		1.22±0.12
模型		2.11±0.19 ¹⁾
戊酸雌二醇	1.84×10 ⁻⁴	1.60±0.14 ²⁾
补肾化痰方	4.7	1.81±0.11 ²⁾
	9.4	1.67±0.16 ²⁾
	18.8	1.62±0.35 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表3,4同)。

3.2 补肾化痰方对OVX大鼠骨组织中TLR4, MyD88, p-NF-κB p65的蛋白表达 与假手术组比较,模型组大鼠骨组织中TLR4, MyD88, p-NF-κB p65蛋白量表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,戊酸雌二醇组TLR4, MyD88, p-NF-κB p65的蛋白表达量明显降低($P < 0.05$),补肾化痰方各剂量组TLR4, MyD88, p-NF-κB p65蛋白表达均有不同程度的降低,其中中、高剂量组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图1,表3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 戊酸雌二醇组; D-F. 补肾化痰方低、中、高剂量组

图1 补肾化痰方对OVX大鼠骨组织中TLR4, MyD88, p-NF-κB p65蛋白表达电泳的影响

Fig. 1 Electrophoresis of TLR4, MyD88, p-NF-κB p65 proteins in bone tissue of OVX rats with intrinsic involvement

表3 补肾化痰方对OVX大鼠骨组织中TLR4, MyD88, p-NF-κB p65蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Bushen Huatan prescription on protein expressions of TLR4, MyD88, p-NF-κB p65 in bone tissue of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/ β-actin	MyD88/ β-actin	p-NF-κB p65/β-actin
假手术		0.42±0.07	0.36±0.06	0.16±0.02
模型		1.09±0.11 ¹⁾	0.87±0.07 ¹⁾	0.53±0.08 ¹⁾
戊酸雌二醇	1.84×10 ⁻⁴	0.70±0.09 ²⁾	0.58±0.05 ²⁾	0.20±0.02 ²⁾
补肾化痰方	4.7	0.88±0.05 ²⁾	0.71±0.07	0.21±0.06
	9.4	0.84±0.07 ²⁾	0.69±0.04 ²⁾	0.24±0.07 ²⁾
	18.8	0.72±0.06 ²⁾	0.68±0.02 ²⁾	0.29±0.06 ²⁾

3.3 补肾化痰方对OVX大鼠骨组织中TLR4, MyD88, NF-κB p65, IL-1β, IL-6 mRNA表达影响 与假手术组比较,模型组骨组织中TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNA水平明显上升($P < 0.05$)。与模型组比较,戊酸雌二醇组的TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNA水平明显下降($P < 0.05$);补肾化痰中剂量组TLR4, NF-κB p65 mRNA水平明显下降($P < 0.05$);补肾化痰高剂量组TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNA水平明显下降($P < 0.05$),差异具有统计学意义。补肾化痰方各剂量组TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNA水平均有下降趋势,呈一

定的浓度依赖性。见表4。

研究结果显示,与假手术组比较,模型组骨组织中 IL-1 β , IL-6 mRNA 的表达水平明显上升 ($P < 0.05$)。与模型组比较,戊酸雌二醇组骨组织中 IL-1 β , IL-6 mRNA 的表达水平均明显下降 ($P < 0.05$);

补肾化痰方低剂量组 IL-6 mRNA 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$);补肾化痰方中、高剂量组 IL-1 β , IL-6 mRNA 水平明显下降 ($P < 0.05$)。补肾化痰方各剂量组 IL-1 β , IL-6 mRNA 水平均有下降趋势,呈一定的剂量依赖性。见表4。

表4 补肾化痰方对 OVX 大鼠骨组织中 TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Bushen Huatan prescription on protein expressions of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 mRNA in bone tissue of OVX rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	MyD88	NF- κ B p65	IL-1 β	IL-6
假手术		1.36 \pm 0.22	4.51 \pm 0.11	3.12 \pm 0.38	1.03 \pm 0.18	1.09 \pm 0.18
模型		2.99 \pm 0.36 ¹⁾	7.98 \pm 0.12 ¹⁾	3.89 \pm 0.27 ¹⁾	2.39 \pm 0.37 ¹⁾	3.33 \pm 0.39 ¹⁾
戊酸雌二醇	1.84 \times 10 ⁻⁴	1.68 \pm 0.13 ²⁾	5.56 \pm 0.09 ²⁾	3.27 \pm 0.28 ²⁾	1.54 \pm 0.11 ^{1,2)}	1.72 \pm 0.13 ^{1,2)}
补肾化痰方	4.7	2.65 \pm 0.28	6.83 \pm 0.15	3.75 \pm 0.49	1.96 \pm 0.26	2.96 \pm 0.32 ²⁾
	9.4	2.21 \pm 0.32 ²⁾	6.72 \pm 0.08	3.73 \pm 0.53 ²⁾	1.66 \pm 0.18 ²⁾	2.18 \pm 0.23 ²⁾
	18.8	1.90 \pm 0.13 ²⁾	5.93 \pm 0.10 ²⁾	3.34 \pm 0.43 ²⁾	1.64 \pm 0.21 ²⁾	1.95 \pm 0.28 ²⁾

4 讨论

我国有数量庞大的 PMOP 患者,其治疗药物主要为骨吸收抑制剂和骨形成促进剂,如双膦酸盐类、甲状旁腺激素类似物等,这些药物均有其各自的禁忌证和窗口期,如服用双膦酸盐类的药物3年以上会增加患者非典型股骨骨折的风险,长时间使用鼻喷剂型的鲑降钙素有增加潜在肿瘤风险的可能^[14],而中医药作为我国独具特色和优势的治疗方式,在改善 PMOP 患者临床症状方面疗效显著^[15],可参与并完善 PMOP 患者的治疗方案。PMOP 无对应的中医病名,根据其病机和症状,可归属于中医“骨痿”“骨枯”范畴,病机多以肾虚为本,或兼脾虚、血瘀等^[16],但总体为本虚标实。向楠教授基于临床经验,根据骨微环境内,骨髓间充质干细胞(BMSC)的分化特点,结合中医痰浊致病的理论,提出补肾化痰法治疗 PMOP,融合《本草纲目》中补骨脂丸与《丹溪心法》中黄瓜萎丸,加减化裁而成补肾化痰方,方中以淫羊藿、补骨脂为君,以益肾阳,健筋骨,重用菟丝子,以益精填髓,佐红曲、山楂以健脾活血,益胃消积,全瓜蒌行气宽胸。全方共奏补肾化痰之用,既往研究已经证实补肾化痰方可以促进骨组织中 BMSC 成骨分化^[6],降低骨组织中致炎因子的水平^[13],改善骨代谢,防治 PMOP。

既往研究认为,骨微环境中炎症因子水平增高是导致骨吸收大于骨形成的重要原因^[17-18]。近年关于骨免疫学的研究表明,雌激素缺乏状态下,会引起肠道菌群紊乱,导致肠道屏障受损,肠腔中的革兰氏阴性细菌突破肠道上皮屏障^[19-20],其细胞壁外膜中的主要成分 LPS 可以保护细菌不轻易受包括

抗生素在内的化合物的干扰,当细菌被免疫细胞吞噬后,LPS 被肝脏和肠道上皮细胞分泌的脂多糖结合蛋白识别。脂多糖结合蛋白不仅加快 LPS 复合体的解聚,还与 LPS 单体结合,以便于被 TLR4 识别。TLR4 作为先天免疫应答的模式识别受体,广泛分布于人体中(如成骨细胞、破骨细胞、破骨前体细胞、骨巨噬细胞、骨髓间充质干细胞等),TLR4 能够介导骨髓细胞产生炎症因子作用于骨代谢。LPS 与脂多糖结合蛋白的聚体,在糖基磷酸酰基醇-Toll 锚定蛋白 CD14 的帮助下,与细胞膜上的 TLR4/MD-2 受体复合物识别并结合,将 TLR4 寡聚化^[21]。寡聚化之后的 TLR4 与 Toll/IL-1 受体相关蛋白(TIRAP)的结构域相互作用,与 MyD88 的羧基端结合,启动依赖 MyD88 的下游信号传导,MyD88 募集 IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4) 并使其磷酸化,IRAK 磷酸化后与受体复合物亲和力下降,从而与受体分离,与肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6) 结合,使 TRAF-6 泛素化,与转化生长因子激活激酶 1 (TAK1),转化生长因子 β 活化激酶结合蛋白 1 (TAB1)形成 IRAK-TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 复合物,然后,复合物中的 IRAK 因 TAB1, TAB2 的磷酸化而解离,形成的 TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 复合物进入胞质^[22],激活下游 NF- κ B 抑制物激酶 (IKK)。IKK β /IKK γ /NEMO 形成的复合物将核转录因子 κ B 抑制蛋白(I κ B α)的亚基调节位点的丝氨酸磷酸化,使 I κ B α 解离^[23],释放被抑制的 p50-p65 所形成的二聚体,NF- κ B 二聚体核移位后,结合靶基因并刺激转录,引起 IL-1 β , TNF- α ^[6]等致炎因子的增加。从而引发先天免疫反应^[24],改变骨微环境,影响骨形成

和骨吸收。

本研究发现大鼠去势后,血清LPS含量相对上升,这与JIA等^[25]的研究结果一致;同时,骨组织中的TLR4,MyD88,p-NF- κ B p65蛋白表达与NF- κ B p65 mRNA,通路下游炎症因子IL-1 β ,IL-6 mRNA的表达均明显增加,证实了绝经后在雌激素缺乏状态下,TLR4/MyD88/NF- κ B通路会被过度激活。研究已证实,骨微环境中IL-1 β 与IL-6炎症因子可作用于巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞,引起骨骼系统和免疫系统的交互^[26]。IL-1 β 和IL-6可诱导骨微环境中成骨细胞、骨髓基质细胞和T细胞等分泌更多NF- κ B受体活化因子配体和巨噬细胞集落刺激因子^[27-28],还可刺激CD4⁺T细胞的增殖^[29],从而促进破骨细胞的生成和融合,同时,还通过减少骨钙素和II型胶原的合成,抑制成骨活动^[30-31],最终使骨重建失去平衡,引发PMOP。可见,PMOP的发生发展与TLR4/MyD88/NF- κ B通路的过度激活密切相关,调控这条通路可成为有效防治PMOP的重要靶点之一。

课题组前期的研究已经表明补肾化痰方能够维护肠道稳态,降低炎症因子水平^[13],调节骨微环境中T细胞介导的免疫反应,本次研究进一步证实补肾化痰方可能是通过影响LPS和TLR4/MyD88/NF- κ B这一条连接免疫与炎症因子的重要通路发挥作用的。本次研究证实补肾化痰方能明显降低OVX大鼠的LPS水平,抑制过度激活的TLR4/MyD88/NF- κ B通路,降低促炎因子IL-1 β ,IL-6的mRNA表达,改善骨微环境,达到防治PMOP的效果,为临床的用药提供了一定理论和实验支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BLACK D M, ROSEN C J. Postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(21): 2096-2097.

[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] PIETSCHMANN P, MECHTCHERIAKOVA D, MESHCHERYAKOVA A, et al. Immunology of osteoporosis: a mini-review[J]. Gerontology, 2016, 62(2): 128-137.

[4] WEITZMANN M N. Bone and the immune system[J]. Toxicol Pathol, 2017, 45(7): 911-924.

[5] OHLSSON C, SJÖGREN K. Effects of the gut

microbiota on bone mass [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(2): 69-74.

[6] TAO X, QI Y, XU L, et al. Dioscin reduces ovariectomy-induced bone loss by enhancing osteoblastogenesis and inhibiting osteoclastogenesis [J]. Pharmacol Res, 2016, 108: 90-101.

[7] VIJAYAN V, KHANDELWAL M, MANGLANI K, et al. Methionine down-regulates TLR4/MyD88/NF- κ B signalling in osteoclast precursors to reduce bone loss during osteoporosis [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(1): 107-121.

[8] 周亚娜, 向楠, 陈辉. 补肾化痰法影响骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(3): 275-277.

[9] 周亚娜, 向楠. 从“痰”论治骨质疏松症[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(12): 36-38.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 周广文, 向楠, 张妍, 等. 高通量测序研究补肾化痰方对去势骨质疏松大鼠肠道菌群结构与多样性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3305-3310.

[13] 胡娅, 唐曦, 向楠. 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.

[14] 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]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.

[15] 安玉兰, 曹昌霞, 田玉梅, 等. 金匱肾气丸合补中益气汤加减治疗绝经后骨质疏松症的疗效及对免疫炎症因子的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20202429.

[16] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(2): 1-13.

[17] JILKA R L, HANGOC G, GIRASOLE G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6 [J]. Science, 1992, 257(5066): 88-91.

[18] VAN BEZOOIJEN R L, FARIH-SIPS H C, PAPAPOULOS S E, et al. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α steady-state mRNA levels analyzed by reverse transcription-competitive pcr in bone marrow of gonadectomized mice [J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(2): 185-194.

- [19] WALSH M C, TAKEGAHARA N, KIM H, et al. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(3):146-156.
- [20] LI J Y, CHASSAING B, TYAGI A M, et al. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6):2049-2063.
- [21] LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42 (2) : 145-151.
- [22] 贾国泉, 沈桂权, 张权, 等. Toll受体介导的MyD88/ TRAF6/NF- κ B研究[J]. *新发传染病电子杂志*, 2017, 2(2):104-107.
- [23] ZHENG J, FAN R, WU H, et al. Directed self-assembly of herbal small molecules into sustained release hydrogels for treating neural inflammation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1604.
- [24] PŁÓCIENNIKOWSKA A, HRMADA-JUDYCKA A, BORZECKA K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3):557-581.
- [25] JIA X, JIA L, MO L, et al. Berberine ameliorates periodontal bone loss by regulating gut microbiota [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(1):107-116.
- [26] CHARLES J F, NAKAMURA M C. Bone and the innate immune system [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12(1):1-8.
- [27] YANG D H, YANG M Y. The role of macrophage in the pathogenesis of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2093.
- [28] ZHAO R. Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective [J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9 (9):825-832.
- [29] PASARE C, MEDZHITOV R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells [J]. *Science*, 2003, 299(5609):1033-1036.
- [30] PHILLIPS F C, GURUNG P, KANNEGANTI T D. Microbiota and caspase-1/caspase-8 regulate IL-1 β -mediated bone disease [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(4):334-341.
- [31] HARMER D, FALANK C, REAGAN M R. Interleukin-6 Interweaves the bone marrow microenvironment, bone loss, and multiple myeloma [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9:788.

[责任编辑 王鑫]