

- determination of amides in *Piper longum* by high-performance liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass SP*, 2007, 21(9): 1497-1503.
- [15] Li K Y, Zhu W Y, Fu Q, et al. Purification of amide alkaloids from *Piper longum* L. using preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography [J]. *Analyst (Lond)*, 2013, 138(11): 3313-3320.
- [16] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [17] 阿基业, 何 骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937.

## 左归丸对卵巢切除骨质疏松症模型小鼠骨代谢的机制

李 微<sup>1</sup>, 徐红丹<sup>2</sup>, 宋 肖<sup>1</sup>, 张 博<sup>3</sup>, 赵文豪<sup>1</sup>, 邵 帅<sup>3</sup>, 黄树明<sup>3\*</sup>

(1. 湖北文理学院医学院, 湖北 襄阳 441053; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** **目的** 探究左归丸对雌激素剥夺诱导的骨质疏松症模型小鼠骨代谢的机制。**方法** 通过卵巢摘除剥夺雌激素的方法建立骨质疏松症小鼠模型, 成膜后采用左归丸干预治疗。采用免疫组织化学法测定各组小鼠胫骨近心端 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的表达, Western blot 法测定小鼠股骨中 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的蛋白表达情况。并通过雌激素受体阻断剂 ICI182780 验证左归丸通过增加雌激素受体表达调节骨代谢。**结果** 免疫组化实验显示, 与模型组比较, 左归丸高、中剂量组的小鼠 ER $\alpha$  表达均升高 ( $P < 0.05$ ), 左归丸高剂量组小鼠 ER $\beta$  的表达升高 ( $P < 0.01$ )。Western blot 实验显示, 与模型组比较, 左归丸高、中、低剂量组均可使 ER $\alpha$  表达量升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 左归丸各剂量组对 ER $\beta$  的影响均没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); ICI182780 可阻断左归丸对骨代谢的影响。**结论** 左归丸不能增加骨质疏松症模型小鼠体内的雌激素水平, 但能通过增加雌激素受体的表达进而影响骨代谢。

**关键词:** 左归丸; 骨质疏松症; 骨代谢; ER

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)12-3455-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.037

骨质疏松症是一种常见的全身系统性的骨骼退行性疾病, 多发生在老年群体, 尤其是绝经后的老年女性<sup>[1]</sup>。随着老龄人口的增多, 骨质疏松症的发病率出现了逐年攀升的趋势, 引起了社会和医学领域的广泛关注。骨质疏松症的产生有多方因素, 包括性激素的减少、钙离子的流失、身体各器官机能的减退、内分泌的失调以及其他疾病和药物诱导等因素。该病严重影响着中老年人甚至年轻人的身体健康与生活质量, 给社会造成极大的负担。因此, 急需找到预防和治疗这类疾病的有效措施。

补肾法是根据传统中医理论制定的临床预防和治疗骨

病的基本治则, 中医学认为“肾在体为骨, 骨乃肾所主”, 故“肾主骨”理论是研究人员选则用药的主要理论依据<sup>[2-3]</sup>。本课题选用补肾古方左归丸, 该方是由熟地、山药、山茱萸、枸杞、菟丝子、川牛膝、龟板胶、鹿角胶、八味中药组成, 其功效为滋阴补肾, 填精益髓, 且诸多实验研究证实, 其对骨质疏松症, 生殖、内分泌、免疫系统、神经系统等均有保护作用<sup>[4-5]</sup>。本研究采用雌激素剥夺的方法建立绝经后骨质疏松小鼠模型<sup>[6]</sup>, 探究左归丸通过雌激素/雌激素受体途径影响骨代谢的机制, 为临床上采用补肾法治疗骨质疏松症提供实验依据, 同时也为骨质疏松症的治疗提供新的思路和方向。

**收稿日期:** 2020-11-04

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (81873108); 国家自然科学基金青年项目 (82003975); 湖北省教育厅科研计划项目 (B2020137); 湖北省襄阳市科技局项目 (2020ZD22); 湖北省博士科研启动经费资助项目 (2059041); 湖北文理学院科研能力培育基金项目 (2020kypf014); 湖北文理学院学科开放基金项目 (xk2020059); 湖北文理学院大学生创新创业项目 (S202010509022, X202010519006, X202010519041, X202110519084)

**作者简介:** 李 微 (1988—), 女, 博士, 讲师, 从事中医基础理论-肾主骨研究。Tel: 15971156901, E-mail: Liweihljzy2015@126.com

\* **通信作者:** 黄树明 (1958—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医基础理论研究。Tel: (0451) 87266816, E-mail: Huangsm1958@126.com

## 1 材料

1.1 动物 清洁级未孕雌性小鼠72只, C57BL/6品系, 8~10周龄, 由黑龙江中医药大学GLP实验中心提供, 实验动物生产许可证号SCXK(黑)2013-0004。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 MUTISKANMK3型酶标仪、-80℃冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司); CT15RE型4℃低温离心机(日本Hitachi公司); PH计(上海仪电科学仪器股份有限公司); 制冰机(常熟市雪科电器有限公司); SVC-1000型全自动交流稳压器(浙江常安集团有限公司); 制胶工具、电泳仪、多层滤纸、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司); 半干转膜电泳仪、移液器(德国Eppendorf公司)。

1.2.2 试剂 小鼠雌二醇(E2)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); RIPA裂解液(货号P0013B)、PMSF(货号ST506)、超敏ECL发光液(货号P0 018 A)(上海碧云天生物技术有限公司); BCA蛋白定量试剂盒(货号PC0020)、4×蛋白上样缓冲液(货号P1015)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号P1300)(北京索莱宝科技有限公司); 5×SDS loading Buffer(货号S0137)、Western一抗稀释液(货号M3001)、Western二抗稀释液(货号M3101)(哈尔滨海基生物科技有限公司); 乙二胺四乙酸[福晨(天津)化学试剂有限公司]; 十二烷基硫酸钠、吐温80、甘氨酸、Tris-HCL、Tris-base、TRIS、Base(天津市光复精细化工研究所); PBS缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(武汉塞维尔生物科技有限公司); 甲醇(天津市富宇精细化工有限公司); 脱脂奶粉(内蒙古伊利实业集团股份有限公司); PVDF膜、预染蛋白Marker(货号26616)(美国Thermo Fisher Scientific公司); 聚合HRP标记抗兔IgG(货号SV0002)(武汉博士德生物工程有限公司); ER $\alpha$  Antibody(货号AF6058)(美国Affinity公司); ER $\beta$  Antibody(货号bs-0116R)、鼠抗 $\beta$ -actin单克隆抗体(货号bs-0061R)(北京博奥森生物技术有限公司); DAB显色试剂盒(货号WLA022a)(沈阳万类生物科技有限公司)。

1.2.3 水煎液制备及剂量确定 左归丸组方药材熟地20g、枸杞10g、牛膝7.5g、山茱萸10g、鹿角胶10g、山药10g、龟板胶10g、菟丝子10g, 均购自哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司, 经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为正品, 制成水煎液, 方法为取出鹿角胶和龟板胶, 其余药材用自来水浸泡30min后煎制2次, 合并药液, 加入打成粉的鹿角胶和龟板胶进行场化处理, 搅拌均匀后浓缩成固定体积的贮备液。阳性对照药采用戊酸雌二醇片(补佳乐)(批号214A)[拜耳医药(上海)有限公司]。成人日用量1mg, 换算成小鼠为每天0.13mg/kg, 小鼠每天灌胃容量为0.01mL/g, 雌二醇溶液含药量为0.013mg/mL, 配制好后置于4℃冰箱中贮存备用。氟维司群ICI82780(货号129453-61-8)(美国Selleck公司)。成人的临床用量为每个月肌内注射250mg, 换算成小鼠给药

剂量为每个月32mg/kg, 本实验按照2倍成人剂量给药, 即64mg/kg。

## 2 方法

2.1 分组、建模及取材 采用双侧卵巢摘除的方法制备骨质疏松症小鼠模型, 造模1个月后随机分模型组, 雌二醇组, 左归丸高、中、低剂量组, 阻断剂组, 每组12只, 按0.01mL/g体重灌胃给药, 左归丸成人临床服用的剂量为9g/次, 每天2次, 换算成小鼠给药剂量为每天2.34g/kg, 灌胃容量为0.01mL/g。左归丸高、中、低剂量组小鼠分别灌胃给予质量浓度为0.936、0.468、0.234mg/mL的左归丸水煎液, 假手术组、模型组小鼠灌胃给予等容量生理盐水, 雌二醇组小鼠灌胃给予0.013mg/mL相应溶液, 阻断剂组肌肉注射64mg/kg ICI82780后按照左归丸高剂量组剂量给药, 各组均连续给药8周。

给药8周后, 小鼠称定体质量, 摘取眼球取血, 室温下静置30min, 4℃、3000r/min离心10min, 取上层血清, 置于-80℃冰箱中保存备用, 取血后取出胫骨、股骨、L4-6段腰椎骨, 胫骨置于4℃冰箱中, 用4%多聚甲醛固定48h; 股骨迅速放置于液氮中速冻后, 移至-80℃冰箱中; L4-6段腰椎骨用浸生理盐水的纱布包裹, 置于-80℃冰箱中保存, 备用。

2.2 胫骨组织中ER表达 取出固定的小鼠胫骨组织, 放入EDTA溶液中进行脱钙处理, 用常规方法(脱水、透明、浸蜡)石蜡包埋, 切片(厚度4 $\mu$ m), 采用免疫组织化学法检测小鼠胫骨近心端ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 的表达。

2.3 股骨组织中ER蛋白表达 取出冻存的小鼠股骨组织, 采用Western blot法检测小鼠股骨中ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 蛋白表达。

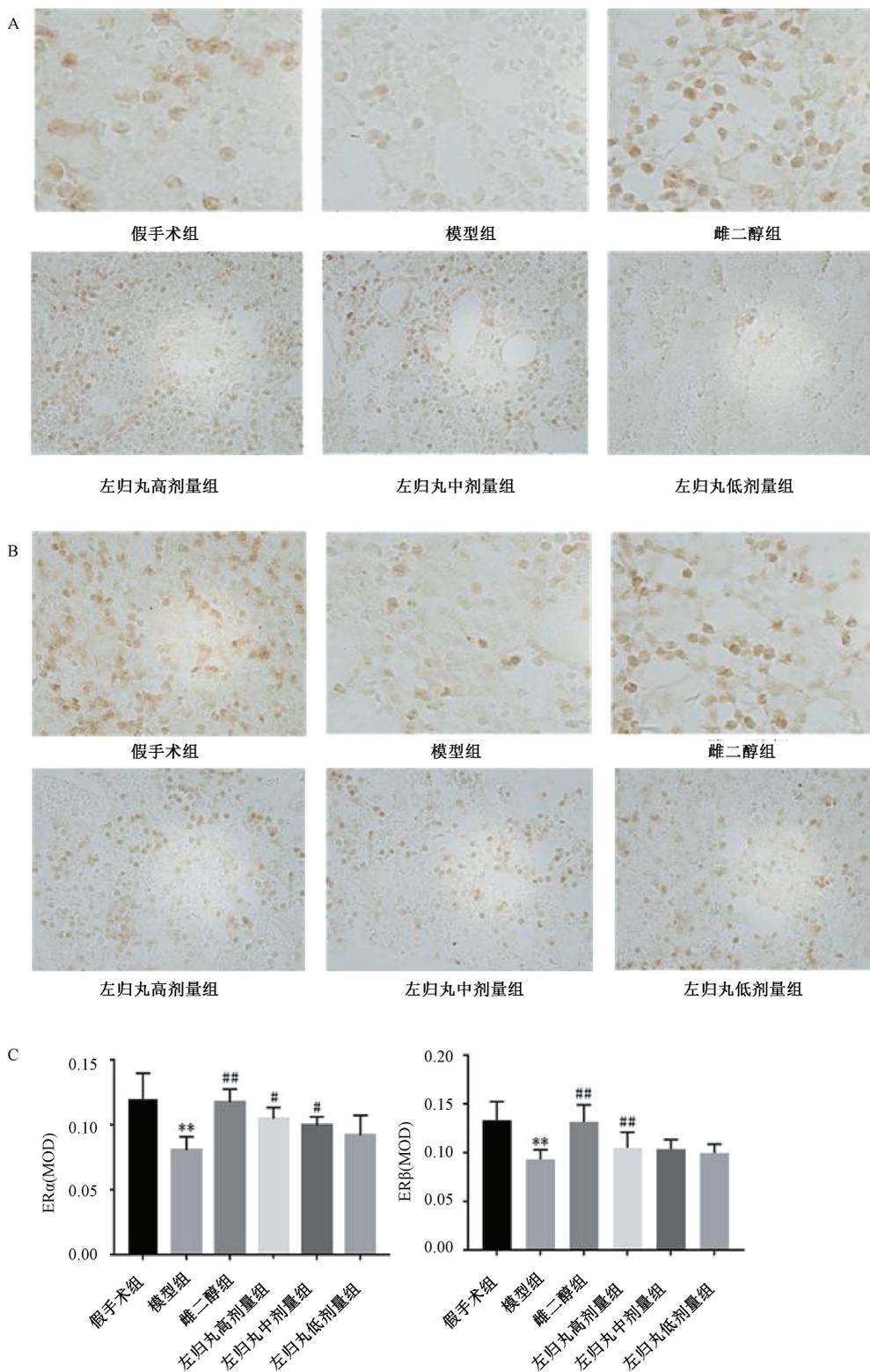
2.4 雌激素受体阻断剂对左归丸骨代谢作用的干预作用 ICI82780干预后, 测定小鼠骨密度、骨代谢相关因子、ER $\alpha$ 蛋白表达, 具体实验方法如前期报道所述<sup>[1]</sup>。

2.5 统计学分析 通过Image-Pro Plus 6.0图像处理软件测量免疫反应阳性物质的面积及积分光密度(IOD值), 计算平均积分光密度(MOD), 公式为平均积分光密度=积分光密度/面积, 每张图片取4~5个视野。通过SPSS 20.0软件进行处理, 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间差异性比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 左归丸对小鼠胫骨中ER表达的影响 电子显微镜下观察到雌激素受体阳性表达呈棕黄色或黄褐色的颗粒, 胞质和胞核均有表达, 蛋白表达量越多, 颜色越深, 见图1A~1B。模型组小鼠胫骨骨松质部分ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 表达均低于假手术组( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 雌二醇组及左归丸高、中剂量组小鼠ER $\alpha$ 表达升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 雌二醇组及左归丸高剂量组小鼠ER $\beta$ 表达升高( $P<0.01$ ), 见图1C。

3.2 蛋白质免疫印迹实验 图2显示, 模型组小鼠股骨ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 蛋白表达低于假手术组( $P<0.01$ ), 表明卵巢摘



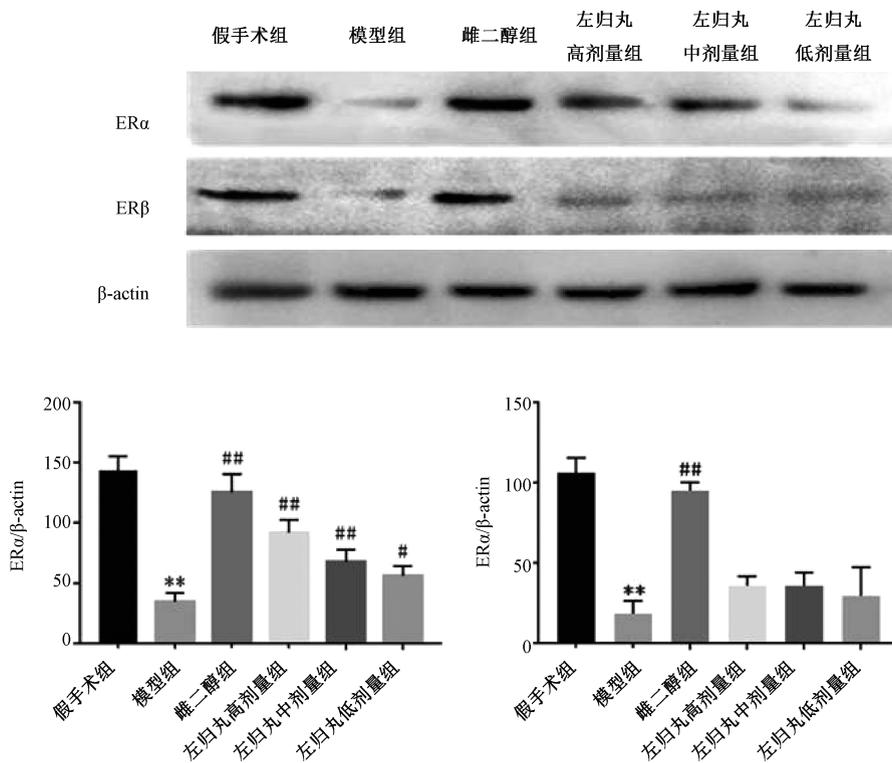
注：与假手术组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠胫骨骨松质 ER 表达 (免疫组化 DAB 染色,  $\times 400$ )

除后雌激素水平下降, 雌激素受体表达减少; 与模型组小鼠比较, 雌二醇组及左归丸高、中、低剂量组均可使小鼠 ER $\alpha$  表达增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 雌二醇组小鼠 ER $\beta$  表达升高 ( $P < 0.01$ ), 但左归丸各剂量组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

3.3 雌激素受体阻断剂对左归丸骨代谢作用的影响 表1

显示, 与左归丸组比较, 左归丸+阻断剂组小鼠骨密度减少 ( $P < 0.01$ ), ALP、StrACP 活性及 OC 水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。图3显示, 与左归丸组比较, 左归丸+阻断剂组小鼠 ER $\alpha$  受体减少, 其灰度比值与左归丸组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。



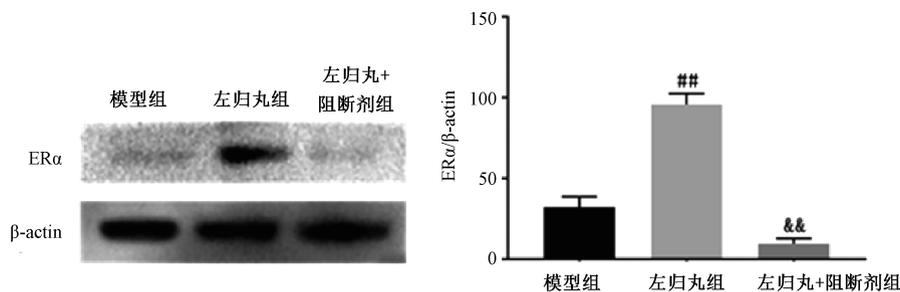
注：与假手术组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠股骨ERα、ERβ蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

表1 ICI182780干预后各组小鼠骨密度及骨代谢相关因子水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

组别	BMD/( $g \cdot cm^{-2}$ )	ALP/(金氏单位·100 mL <sup>-1</sup> )	strACP/(U·L <sup>-1</sup> )	OC/(ng·mL <sup>-1</sup> )
模型组	0.080±0.002	26.146±5.378	50.986±4.040	4.697±0.516
左归丸组	0.105±0.003**	16.771±1.488*	34.971±3.757**	2.075±0.591**
左归丸+阻断剂组	0.085±0.004###	25.891±5.331#	48.390±7.657###	4.441±0.794##

注：与模型组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与左归丸组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。



注：与模型组比较，## $P < 0.01$ ；与左归丸组比较，## $P < 0.01$ 。

图3 ICI182780干预后各组小鼠股骨ERα表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

#### 4 讨论

绝经后骨质疏松症的致病原因主要是雌激素的撤退，在中医学上认为绝经前后的诸多症状及内分泌失衡的病机均为肾虚，故补肾成为了治疗的根本所在<sup>[7-8]</sup>。雌激素作为一种重要的内源性激素，在体内的变化影响着很多生理代谢过程，包括生殖系统、中枢神经系统、心血管系统、免疫系统、骨骼等<sup>[9-10]</sup>。本研究前部分实验结果已经证明左归丸对雌激素剥夺导致的骨损伤具有保护作用<sup>[11]</sup>。因此为了探究左归丸对骨质疏松症的保护作用的机制，本实验分

析左归丸对雌激素及雌激素受体的影响。

前期研究检测了左归丸水煎液对于骨质疏松症模型小鼠血清中的雌激素水平的影响，采用酶联免疫吸附法测定了各组小鼠血清中雌二醇的水平，结果证明左归丸水煎液各剂量组均不能使卵巢摘除小鼠血清中雌激素水平升高，这说明了左归丸对骨组织的雌激素样作用并不是通过增加体内的雌激素水平而实现的<sup>[12]</sup>。本研究检测了左归丸对卵巢摘除小鼠雌激素受体表达的影响，通过免疫组织化学方法测定ERα和ERβ在胫骨近心端骨松质上的表达情况，

分析各组平均累计光密度值,结果表明左归丸对 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的表达均有明显的影响。同时利用 Western blot 技术分析了 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在股骨中的表达,统计各电泳条带的灰度结果,表明左归丸能够增加 ER $\alpha$  的表达,对 ER $\beta$  无明显影响。这个结果预示着左归丸水煎液对骨组织的作用很可能是通过增加 ER $\alpha$  表达实现的。

为了验证左归丸对骨质疏松症模型小鼠的骨保护作用机制是通过增加雌激素受体的表达而实现的,选择 ICI82780 进行干预研究。ICI82780,是一种非特异性的雌激素受体阻断剂,他不同于其他的抗雌激素药物具有类雌激素样作用(如他莫昔芬),所以可以规避很多雌激素过量导致的风险<sup>[13]</sup>。

据先前研究 ICI82780 能够完全阻断淫羊藿素、去甲基肉毒碱<sup>[14]</sup>和樟芽菜苷<sup>[15]</sup>对骨细胞的增殖和分化作用。本研究实验结果同样证明,当给小鼠注射 ICI82780 后再给予左归丸水煎液进行治疗后与左归丸给药组比较,小鼠骨组织中的 ER $\alpha$  表达降低,小鼠腰椎的骨密度下降,血清中骨代谢相关因子 ALP、StrACP 和 OC 升高,即左归丸对骨的保护作用被阻断。

总之,本研究的实验结果表明左归丸可通过增加小鼠骨骼上 ER $\alpha$  的表达而实现调节骨代谢的作用,为临床上左归丸治疗绝经后骨质疏松症提供理论支持,也为阐明“肾主骨”理论的研究提供实验依据。

#### 参考文献:

[ 1 ] 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.  
[ 2 ] 吴国庆, 皮持衡. 基于“肾主骨”理论探讨肾性骨病的中医治疗[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(6): 47-50.  
[ 3 ] 笪巍伟, 唐德志, 金镇雄, 等. 强骨胶囊对去势后小鼠骨质疏松性骨折愈合的影响[J]. 中成药, 2020, 42(4): 1044-1047.

[ 4 ] 姚建平, 牛巧能, 李琳, 等. 左归丸、右归丸对自然衰老大鼠海马组织及齿状回 NGF、FGF-2 蛋白水平的影响[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1836-1839.  
[ 5 ] 孙琳林, 康广盛, 韩海荣, 等. 左归丸实验研究概况[J]. 中成药, 2010, 32(3): 477-480.  
[ 6 ] 孙凯, 魏戎, 朱立国, 等. 病证结合模式下骨质疏松症实验动物模型的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(9): 1340-1344.  
[ 7 ] 罗元恺, 郑国平. 以补肾为主治疗更年期综合征临床研究[J]. 中国医药学报, 1990, 5(2): 23-25; 81.  
[ 8 ] 阳松威, 郭建生, 王晓倩, 等. 补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠神经内分泌功能失调的作用[J]. 中成药, 2016, 38(3): 651-654.  
[ 9 ] 吴小霞, 周则卫. 雌激素的研究进展[J]. 医药导报, 2008, 27(10): 1234-1237.  
[ 10 ] 李微, 张博, 张雨薇, 等. 雌激素调节骨代谢作用的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(2): 262-266.  
[ 11 ] 李微, 张博, 徐红丹, 等. 左归丸对卵巢切除骨质疏松症模型小鼠骨代谢的影响及机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 2807-2810.  
[ 12 ] 李微, 张博, 李炎, 等. 左归丸对卵巢摘除小鼠类雌激素样作用的实验研究[J]. 环球中医药, 2018, 11(2): 191-195.  
[ 13 ] 卢亚琼, 魏世鸿, 董方, 等. 他莫昔芬诱发 NAFLD 的发病机制及相关治疗研究[J]. 甘肃医药, 2020, 39(7): 585-588.  
[ 14 ] Luo Z Q, Liu M L, Sun L K, et al. Icarin recovers the osteogenic differentiation and bone formation of bone marrow stromal cells from a rat model of estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 382-388.  
[ 15 ] Wu Q C, Tang X Y, Dai Z Q, et al. Sweroside promotes osteoblastic differentiation and mineralization via interaction of membrane estrogen receptor- $\alpha$  and GPR30 mediated p38 signalling pathway on MC3T3-E1 cells [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153146.