

- 脏,2018,23(6):546.
- [25] 张海涛,张雨晴.复方鳖甲软肝片对乙型肝炎肝硬化患者疗效及血清 TGF- β_1 、TNF- α 、IL-6 水平的影响[J].山东医药,2017,57(34):36.
- [26] 齐书妍,黄 华,李永坤,等.莪术醇对非酒精性脂肪性肝大鼠肝功能和肝纤维化的影响及机制[J].中国应用生理学杂志,2021,37(6):611.
- [27] Chang Y, Li H. Hepatic Antifibrotic Pharmacotherapy: Are We Approaching Success[J]. J Clin Transl Hepatol,2020,8(2):222.
- [28] 刘俊宏,李欣瑜,王森蕾,等.中医药治疗肝纤维化的优势与特色[J].临床肝胆病杂志,2023,39(2):267.
- [29] 李开杨,杨 梅,赵 琦,等.从虚、郁、瘀病机探讨非酒精性脂肪性肝炎的中医治疗[J].中西医结合肝病杂志,2023,33(8):745.
- [30] 李开杨,赵 琦,杨 梅.赵琦基于“脾虚邪郁”理论运用祛脂愈肝汤治疗代谢相关脂肪性肝病经验采撷[J].贵州中医药大学学报,2023,45(1):9.
- [31] Francisco V, Sanz MJ, Real JT, et al. Adipokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Are We on the Road toward New Biomarkers and Therapeutic Targets[J]. Biology (Basel),2022,11(8):1237.
- [32] Wen F, Shi Z, Liu X, et al. Acute Elevated Resistin Exacerbates Mitochondrial Damage and Aggravates Liver Steatosis Through AMPK/PGC-1 α Signaling Pathway in Male NAFLD Mice[J]. Horm Metab Res,2021,53(2):132.
- [33] Petrescu M, Vlaicu SI, Ciumean L, et al. Chronic Inflammation - A Link between Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Dysfunctional Adipose Tissue[J]. Medicina (Kaunas),2022,58(5):641.

补益肝肾汤对骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型的影响研究

王 羿¹,徐远坤²,袁云飞³,孙 权²,郑明慧²,郑曙光^{2*}

(1. 贵州中医药大学,贵州 贵阳 550025;

2. 贵州中医药大学第一附属医院,贵州 贵阳 550001;

3. 北京积水潭医院贵州医院,贵州 贵阳 550002)

摘要:目的 探究补益肝肾汤对骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型的影响研究。方法 构建小鼠膝关节关节炎模型,模型构建成功后,采用卵巢摘除法构建骨质疏松模型。模型构建成功后,补益肝肾汤灌胃给药,连续 30d,每天 1 次。给药结束,颈椎脱臼法对小鼠进行处死,取膝关节骨组织行 microCT 检测骨密度变化情况,HE 染色、免疫组化检测其中 TGF- β_1 、smad2、smad3、ALK5、Sox9、AKT、p70S6K、PI3K、mTOR 的表达情况。取外周血样本,ELISA 法检测血清骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(OC)、I 型原胶原 N-端前肽(PINP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP-5b)、I 型胶原交联 C-末端肽(CTX)、雌二醇(E₂)的表达情况,WB 检测其中 TGF- β_1 、ALK5、Sox9、PI3K、AKT 的表达情况。结果 与空白对照组相比,骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型组小鼠骨体积分数 BV/TV 减少,其软骨组织退变程度显著增加、炎性细胞浸润程度升高、嗜复红蛋白沉积升高;BALP、OC、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达明显升高,雌二醇 E₂ 的表达明显下降,TGF- β_1 、ALK5、smad2、smad3、Sox9、p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 的表达发生显著下调($P < 0.05$);相较于模型组,补益肝肾汤治疗后小鼠膝关节骨密度显著增加;小鼠软骨组织退变程度减弱、炎性细胞浸润数目减少、嗜复红蛋白沉积减轻;BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达明显下降,雌二醇 E₂ 的表达明显升高,TGF- β_1 、ALK5、smad2、smad3、Sox9、p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 的表达发生显著上调($P < 0.05$)。结论 小鼠骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型下,TGF β_1 -SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路的调节具有重要作用,并且补益肝肾汤可以通过激活 TGF β_1 -SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路进而影响骨代谢的水平,最终对骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症起治疗作用。

关键词:补益肝肾汤; 骨关节炎; 肝肾不足; 骨质疏松症; TGF β_1 -SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.05.10

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2024)05-1067-05

骨质疏松症(OP)主要特征是单位体积内骨量低下、骨组织破坏、骨骼强度下降,骨脆性增加为主要临床特征的一种退行性骨骼疾病^[1];骨性关节炎(OA)是以关节软骨变性、退变,软骨破坏和骨质增生为主要临床特征的一种退行性骨关节疾病^[2]。

收稿日期:2023-11-21; 修订日期:2024-05-11

基金项目:国家自然科学基金(81860855);

贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术课题(QZYY-2023-133)

作者简介:王 羿(1979-),男(汉族),贵州桐梓人,贵州中医药大学在读博士研究生,硕士研究生导师,硕士学位,主要从事中医药、民族医药理论及防治骨关节疾病研究工作。

* 通讯作者简介:郑曙光(1966-),男(汉族),四川乐至人,贵州中医药大学教授,博士研究生导师,学士学位,主要从事中医药、民族医药理论及防治骨关节疾病研究工作。

Popli 通过研究发现,骨质疏松症整个疾病发生、发展变化的过程中,人体内诸多炎症因子的含量整体出现异常升高,不同炎症因子通过对成骨细胞、破骨细胞的影响,骨转换的平衡状态被打破,最终致使骨质疏松症的发生^[3];而骨性关节炎的发生、发展主要因为基因表达的变化和活性氧产生的刺激,改变了关节内组织的代谢和软骨下骨、以及软骨下骨组织的骨吸收状态,致使膝关节的关节软骨和软骨下骨内部多种促炎性细胞因子的反应水平升高^[4],国内外研究者研究发现炎症与 OP 及 AO 的发展有着密切的关系^[5,6]。

骨质疏松症在祖国医学中属于“骨痹”“骨痿”的范畴,是一种以脾肾亏虚为本,瘀血阻络为标的本虚标实的疾病。中医认为“肾主骨”“肝主筋”“脾主肌肉”,故治疗本病以补益肝肾、健脾益气 and 活血通络为主。补益肝肾汤具有补肝肾,祛风湿,强筋骨,舒筋活血,通络止痛的作用。本方在补益肝肾的同时,兼用祛风化湿的中药材,达到补肾柔肝,舒筋活络、祛风除湿,止痹痛的作用。

根据现代药理研究,本方具有抗骨质疏松、推动成骨细胞、改善滑膜组织病理变化、抗风湿、消炎镇痛等多种作用,通过对人体的整体调节,实现改善关节肿痛、屈伸不利等关节症状的目的。同时能降低 ESR、CRP、RF、CCP、ALP,提高血钙浓度和骨密度水平,达到改善患者病情和机体状态,预防病情反复发作的效果。众多临床研究发现补益肝肾汤对骨质疏松症和骨关节炎具有确切的疗效,能有效减轻骨质疏松症和骨性关节炎患者的疼痛,因此本研究试图探讨补益肝肾汤对骨质疏松症合并骨关节炎的影响,从代谢因子方面为补益肝肾汤治疗该型疾病(共病)提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 动物 24 只 C57BL/6j 小鼠,雌性 6~8 周。饲养条件:温度 18~25℃,相对湿度:30%~60%。许可证号:SCXK(湘)2022-0004,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.2 试剂 TGF- β 1(bs-0086R, Bioss); ALK5(bs-0638R, Bioss); smad3(af6362, Affinity); smad2(bs-0718R, Bioss); SOX9(bs-4117R, Bioss); P70S6K(14484-1-ap, Proteintech); PI3K(21739-1-AP, Proteintech); AKT(ab8805, abcam); MTOR(66888-1-Ig, Proteintech); 小鼠 I 型前胶原 N 端前肽(PINP)试剂盒(ED-20072, 仑昌硕); 小鼠 I 型胶原 C-末端肽交联(S-CTX)试剂盒(ED-23481, 仑昌硕); 小鼠骨钙素(BGP; OCN)试剂盒(ED-20334, 仑昌硕); 小鼠骨碱性磷酸酶(BALP)试剂盒(ED-20335, 仑昌硕); 小鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP-5b)试剂盒(ED-28127, 仑昌硕); 小鼠雌二醇(E₂)(MM-0566M2, 酶免); 目的一抗:Rabbit Anti TGF- β 1(bs-0086R, Bioss, 1/1000); 目的一抗:Rabbit Anti ALK5(bs-0638R, Bioss, 1/500); 目的一抗:Rabbit Anti Sox9(bs-4177R, Bioss, 1/500); 目的一抗:Rabbit Anti PI3K(AF6241, Affinity, 1/1000); 目的一抗:Rabbit Anti AKT(AF4718, Affinity, 1/1000)。

1.3 仪器 BX43 显微镜(OLYMPUS); 2235 切片机(Leica); DYY-6C 蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂); Chemi DocTM XRS+ 超高灵敏度化学发光成像系统(伯乐生命医学产品(上海)有限公司); Skyscan1276 X-Ray Microtomograph(Micro CT)(美国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型建立及分组 小鼠称取重量,然后用 1% 戊巴比妥钠通过腹腔注射的方式麻醉,150mg/kg 的剂量。待小鼠完全麻醉后,其膝关节的毛发剃除完全,消毒皮肤。在小鼠膝关节处用手术刀做平滑的切口,皮肤与肌肉钝性分离,暴露膝关节,再把肌肉向反方向翻转,膝关节滑车沟充分显现,最后使用显微镊子对关节腔脂肪垫进行充分分离,弯曲小鼠膝关节至 90°,显露出交叉韧带。用显微剪刀切断韧带,并且做抽屉试验验证造模成功。卵巢切除骨质疏松模型:小鼠背部开口备皮消毒,在双侧肾部开口分离脂肪找到菜花形状结扎切除。术后护理:缝合皮肤,严格无菌管理,彻底消毒。小鼠放到电热毯上面,防寒保暖,等到小鼠完全苏醒,然后放置于清洁鼠笼之中。给药:造模 1 个月后,高剂量(0.15ml/10g)的补益肝肾汤进行 1 天 1 次灌胃,连续 30d。(1)空白对照组(Control);(2)骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型组(Model);(3)模型+补益肝肾汤给药组(0.15ml/10g)。

2.2 Micro CT 检测 电压 55 kV,电流 200 μ A,以 9.8 μ m 扫描分辨率,2016 $\times$ 1344 视野大小对小鼠膝关节进行扫描。以胫骨为准,将样品进行较直,分别选取两个感兴趣区域(ROI),ROI 1:以胫骨近心端关节面最高点为基线,向下选取厚度为 1mm 的关节软骨区域,检测胫骨关节面的侵蚀情况;ROI 2:以胫骨近心端生长板最低点为基线,向下选择厚度为 1mm 的骨髓腔区域,检测骨髓腔内骨小梁的分布情况。用 N-Recon 软件进行三维图像重建,CT-AN 软件进行三维分析。

2.3 HE 染色 组织取出后,持续冲洗 2h,用 70%、80%、90% 乙醇溶液脱水,二甲苯和纯酒精等量混合液、二甲苯 I、II 各 15min,直至透明。然后放进二甲苯和石蜡等量的混合液 15min,再放进石蜡 I、II,各透蜡 50~60min,包埋,切片。首先,对样本进行烤片处理,然后脱去蜡并进行水化处理。接着将切片放入蒸馏水后的苏木精水溶液中染色 3min,随后用盐酸乙醇分化液分化 15s,轻微水洗,再放入返蓝液中返蓝 15s,流水持续冲洗。随后进行伊红染色 3min,脱水,使样本透明,最后封片并进行镜检。

2.4 免疫组化 65℃烤箱中将组织切片烤 2h;再在二甲苯静置 10 min,二次更换二甲苯继续静置 10 min;最后把切片放到 100% 乙醇 5min,100% 乙醇 5min,95% 乙醇 5min,80% 乙醇 5min,纯化水 5min。抗原修复:首先把切片放到修复盒中,加入胃蛋白酶抗原修复液,37℃ 修复 45min,磷酸缓冲盐溶液充分淋洗。再把切片移动到湿盒,加入刚配制的 3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶,最后将溶液密封,室温下 10 min 孵育,磷酸缓冲盐溶液充分淋洗。磷酸缓冲盐溶液配制的 0.5% Triton X-100 室温通透 20min。磷酸缓冲盐溶液浸洗玻片 3 次,每次 5 min,吸水纸吸收周围的磷酸缓冲盐溶液,然后在玻片上加入 5% 的牛血清白蛋白,37℃ 下封闭 30min。接着,用吸水纸去掉周围的封闭液,每张玻片滴加稀释的一抗,放进湿盒,4℃ 下孵育过夜。取出湿盒,室温下静置 45min,用磷酸缓冲盐溶液清洗玻片 3 次,每次 5min。然后滴加辣根酶标记的 IgG(H+L)(1:100),37℃ 下孵育 30min,用磷酸缓冲盐溶液彻底冲洗。进行 DAB 显色 5~10min,观察显微镜下的染色程度,用磷酸缓冲盐溶液冲洗 1min。接着,苏木精复染 3min,盐酸酒精分化,返蓝;自来水冲洗 1min,脱水、透明、封片、镜检。

2.5 ELISA 检测 根据实验要求,准备标准孔、样本孔以及空白孔。将不同浓度的标准品加入标准品孔,加入待测样本到样本孔,加入样本稀释液到空白孔,每孔均加入 50 μ L。接下来,向每个孔中加入辣根过氧化物酶(100 μ L)标记的检测抗体,用封板膜封闭孔口,然后在 37℃ 的水浴锅中孵育 60min。孵育结束,废液丢弃,用吸水纸吸干,每孔加入洗涤液(350 μ L),静置 20s,甩干洗涤液,继续用吸水纸吸干,洗板动作重复 5 次。将底物 A50 μ L、B50 μ L 加到各个孔,37℃ 避光孵育 15 min。最后终止液 50 μ L 加到各个孔,在 15 min 内,用 450nm 波长测得各个孔的 OD 值。

2.6 Western blot(WB) 将组织加入裂解液中,放置于冰上 10min 后,使用高速离心机(12000 r/min)行离心操作 8min。上清液吸取,加入缓冲溶液,煮沸液体 4min,然后在 -20℃ 保存。蛋白质浓度的检测过程使用 BCA 蛋白定量试剂盒,并绘出标准曲线。制作 SDS-PAGE 胶,上样后开始电泳,使用 60V 压缩蛋白,80V 分离蛋白,持续 2h。跑完以后,分割含有内参或目的条带的胶。然后按顺序把海绵、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵摆放整齐,将胶复合物浸泡在 1 $\times$ 转膜液,然后恒流(300mA)转膜。使用 1 $\times$ TBST 配置 3% 的脱脂牛奶封闭液封闭 1h,将 PVDF 膜孵育一抗过夜。次日洗膜,1 $\times$ TBST 浸泡 10min 后废液弃之,如此反复 3 次。然后将 PVDF 膜孵育二抗 2h,步骤重复一抗。用发光液浸湿 PVDF 膜,再将其放置到超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区,最后,运行程序进行显影成像。

2.7 统计学分析 应用 IBM SPSS 27.0 软件进行数据分析。所有实验操作重复 3 次,定量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于两组之间定量数据比较,则采用独立样本 student t 检验(T 检验);三组之间定量数据比较,采用单因素方差分析;两两比较则采用 S-N-K 法。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异显著。

3 结果

3.1 Micro-CT 检测结果 相较于空白对照组,骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型组小鼠骨体积分数 BV/TV 减少,而在补益肝肾汤治疗后这一下降趋势被显著逆转,且相较于模型组小鼠膝关节骨密度发生显著上调($P<0.05$)。结果见表 1~2,图 1。

表 1 ROI 1 结果 ($\bar{x} \pm s$)

样本分组	BV/mm ³	BS/mm ²	BS/BV/mm ⁻¹
Control	2.2277 ± 0.19	50.5989 ± 2.36	22.7715 ± 1.14
Model	1.5367 ± 0.35	43.8366 ± 9.72	28.5606 ± 0.40
OP + Dose	1.3795 ± 0.73	35.9890 ± 19.48	25.6440 ± 4.71

n = 8

表 2 ROI 2 结果 ($\bar{x} \pm s$)

样本分组	BV/TV/%	Tb.Th/mm	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Sp/mm	SMI
Control	5.4208 ± 1.43	0.0637 ± 0.00	0.8473 ± 0.20	0.4864 ± 0.08	2.6394 ± 0.13
Model	12.4999 ± 1.47	0.0674 ± 0.01	0.3531 ± 0.16	0.7854 ± 0.05	2.6630 ± 0.06
OP + Dose	2.6158 ± 1.03	0.0721 ± 0.01	0.3543 ± 0.96	0.6487 ± 0.24	2.7783 ± 0.22

骨体积 BV (mm³)、感兴趣区的骨体积、骨表面积 BS (mm²)、BS/BV (mm⁻¹)、骨体积分数 BV/TV (%)、骨小梁厚度 Tb.Th (mm)、骨小梁数量 Tb.N (1/mm)、骨小梁分离度 Tb.Sp (mm) 以及结构模型指数 SMI, 这些参数描述了感兴趣区内骨组织的特性。其中, BS/BV 值反映了骨表面积与骨体积的比值, Tb.Th、Tb.N 和 Tb.Sp 分别描述了骨小梁的厚度、数量和分离度, 而 SMI 则体现了骨小梁的结构特征。如果发生骨质疏松, 骨小梁会发生改变, 板状结构变为棒状结构, 同时 SMI 数值也会变大。n = 8

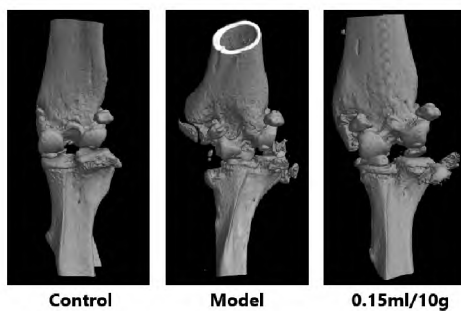


图 1 Micro-CT 检测结果

3.2 HE 染色检测结果 相较于空白对照组, 骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型组小鼠软骨组织退变程度增高、嗜复红蛋白沉积增多, 参与炎症反应的炎性细胞结果显示浸润数目增多; 而补益肝肾汤治疗组相较于模型组小鼠软骨组织退变程度显著减弱、嗜复红蛋白沉积减轻, 参与炎症反应的炎性细胞结果显示浸润数目减少。结果见图 2。

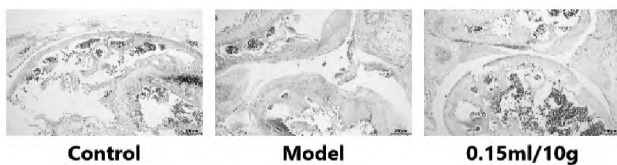


图 2 HE 染色检测补益肝肾汤对 OP 模型小鼠病理的影响 (×100)

3.3 ELISA 检测 BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX、雌二醇 E₂ 的表达结果 如图 3 所示, 相较于空白对照组, 骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症模型组小鼠的 BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达升高, 雌二醇 E₂ 的表达下降, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 相较于模型组, 治疗组的 BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达下降, 雌二醇 E₂ 的表达升高, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

3.4 免疫组化检测结果 相较于空白对照组, 模型组小鼠软骨组织中 TGF-β1、ALK5、smad2、smad3、Sox9、p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 的表达发生显著下调 ($P < 0.05$); 相较于模型组, 治疗组小鼠软骨组织中 TGF-β1、ALK5、smad2、smad3、Sox9、p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 的表达均显著上调 ($P < 0.05$); 见图 4。

3.5 Western blot 检测结果 相较于空白对照组, 模型组小鼠软骨组织中 TGF-β1、ALK5、Sox9、PI3K、AKT 的蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$); 相较于模型组, 治疗组的小鼠软骨组织中 TGF-β1、ALK5、Sox9、PI3K、AKT 的蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$)。见图 5。

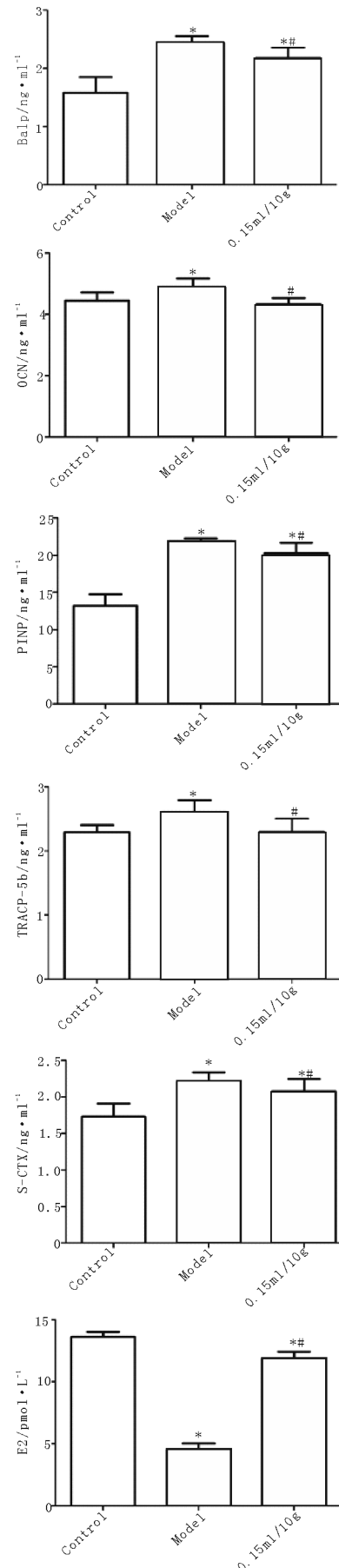
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较# $P < 0.05$

图 3 ELISA 检测

BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX、雌二醇 E₂ 的表达结果

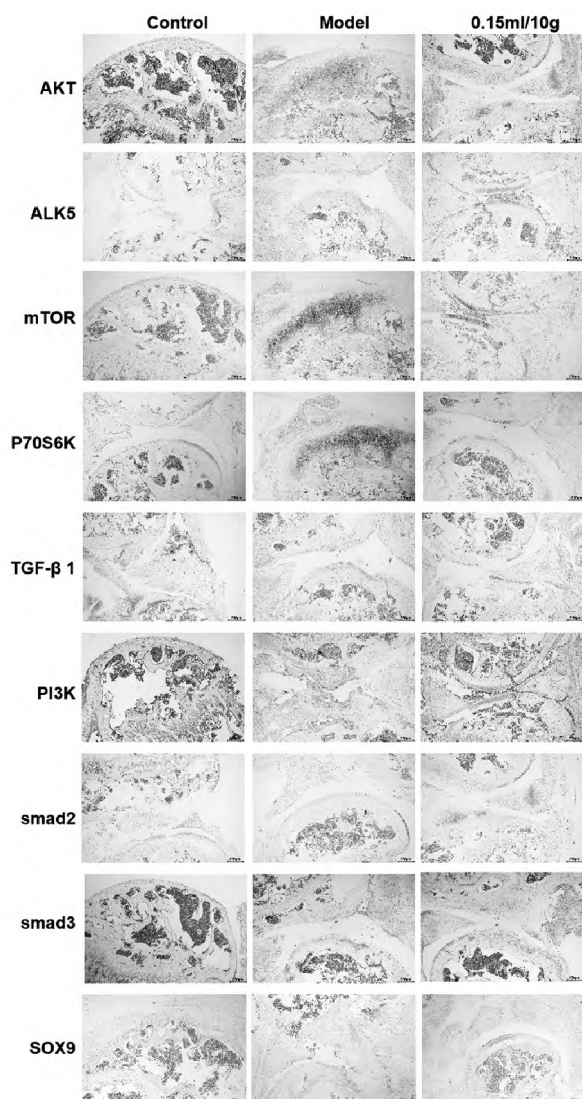
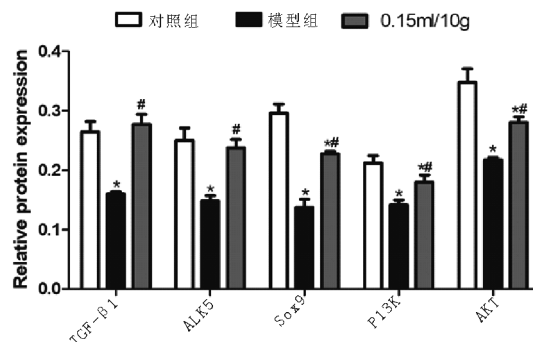
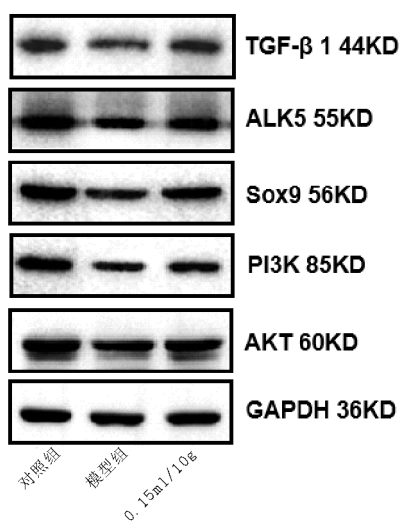


图 4 免疫组化检测 各组小鼠膝关节组织
TGF-β1、ALK5、smad2、smad3、Sox9、
p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 表达情况



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较# $P < 0.05$

图 5 Western blot 检测 各组小鼠膝关节组织
TGF-β 1、ALK5、Sox9、PI3K、AKT 的表达情况

4 讨论

本研究探讨了骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症的中医治疗原则。主要目的是减轻软骨和软骨下骨结构损伤,减缓骨密度降低,缓解疼痛,促进恢复关节软骨功能。中医治疗该证型主要采取补益肝肾的方法,叶雪英研究发现,补益肝肾能使炎症反应减轻,软骨细胞的超微结构得到改善,软骨基质退变减缓,从而改善免疫功能^[7];同时也可以促进气血化生,改善微循环,改善骨小梁微结构,增加骨骼的抗压能力和骨密度^[8]。研究结果显示,经过补益肝肾汤治疗后,骨组织微结构得到改善,骨赘较小,骨小梁较有序排列,BV/TV 显著升高。此外,病理结果也表明,治疗组小鼠软骨组织退变程度较弱,炎性细胞浸润减少。总之,中医治疗通过补益肝肾的方法有望成为骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症的有效治疗方案。

骨组织的结构与质量因骨代谢水平的变化而变化。碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 是提示骨形成重要敏感指标,而 TRACP-5b 对骨吸收更具有敏感性,二者是骨骼形成和破坏的良好标志物^[9,10]。雌二醇 (E_2) 在软骨细胞代谢过程中发挥至关重要作用。 E_2 水平下降后,形态学镜下观察膝关节软骨发现其软骨表面和软骨细胞受到不同程度的损坏^[11]。 E_2 水平的下降会引起血清、尿液中的 CTX 含量增加,从而软骨的代谢被其影响^[12]。CTX 是稳定性较强具有代表性的软骨代谢标记物,以小肽形式通过血液,再进入尿液中^[13]。实验证明,去卵巢大鼠 E_2 的下降会使 CTX 含量提升,导致膝关节软骨降解产生代谢和病理变化,而诱发炎症^[14]。OCN 在抑制破骨细胞活化和诱导成熟破骨细胞凋亡方面发挥关键作用^[15]。PINP 不受激素的影响,而且受昼夜节律和饮食的影响较小,是反映骨形成更为敏感和特异的指标^[16]。本研究结果显示,模型组的 BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达明显升高,雌二醇 E_2 的表达明显下降;而采用补益肝肾汤治疗后 BALP、OCN、PINP、TRACP-5b、CTX 的表达明显下降,雌二醇 E_2 的表达明显升高;中药补益肝肾汤能够同时调节骨形成和骨吸收水平^[17],并且更强烈地抑制骨吸收的过程。这种作用使得骨形成与骨吸收实现新的稳态,骨转换率下降,骨量的丢失降低,软骨下骨小梁结构得到改善。这有望减轻骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症的症状。

TGF-β1 通过 β-catenin 信号通路既能维持软骨细胞表型,又能调控软骨细胞增殖^[18]。另外,ALK5 的活化是激活 Smad2、smad3 分子磷酸化的关键^[19]。SOX9 经过与 Smad2、Smad4 结合,新的复合物又能激活 Smad3,Smad3 的激活又增强了 II 型胶原的合成^[20]。Smad2/3 的信号通路既能抑制软骨细胞的成熟,且制约其肥大性分化。Smad3 基因缺乏使小鼠易发生软骨退变,再合并 TGF-β1 分子的病变会更易导致骨关节炎的发生^[21]。另一

方面,TGF- β 1 参与的分子信号通路除抑制软骨细胞衰老、维持软骨细胞表型的 TGF- β 1-ALK5-Smad2,3-Sox9 通路外,也包括 TGF- β 1-PI3-Akt-mTor-p70S6 通路,这些通路激活的终末效应促进 II 型胶原分泌和多糖蛋白形成^[22,23]。研究结果显示,补益肝肾汤治疗应用后,小鼠软骨组织中 TGF- β 1、ALK5、smad2、smad3、Sox9、p70S6K、PI3K、AKT、mTOR 的表达水平均升高^[24],说明其对骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症具有治疗作用,并且这种作用是通过 TGF β 1-SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路产生的。

综上所述,在小鼠骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症病型下,TGF β 1-SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路的调节具有重要作用,并且中药复方补益肝肾汤可以通过激活 GFB1-SOX9/p70S6-细胞外基质信号通路而影响骨代谢的水平,最终对骨关节炎合并肝肾不足型骨质疏松症起治疗作用。

参考文献:

- [1] Taubmann J, Krishnacoumar B, Bhm C, et al. Metabolic reprogramming of osteoclasts represents a therapeutic target during the treatment of osteoporosis[J]. *Sci Rep*,2020,10(1):21020.
- [2] Pincus T, Castrejon I, Yazici Y, et al. Osteoarthritis is as severe as rheumatoid arthritis: evidence over 40 years according to the same measure in each disease[J]. *Clin Exp Rheumatol*,2019, 120(5):7.
- [3] Popli R. Abstract #806618: Milk - Alkali Syndrome in a Patient with Gastroesophageal Reflux Disease and Osteoporosis[J]. *Endocr Pract*, 2020,26:69.
- [4] DellIsola A, Jnsson T, Ranstam J, et al. Education, Home Exercise, and Supervised Exercise for People With Hip and Knee Osteoarthritis As Part of a Nationwide Implementation Program: Data From the Better Management of Patients With Osteoarthritis Registry[J]. *Arthritis Care Res*,2020,72(2):201.
- [5] Yamada EF, Stein C, Moresco RN, et al. Photobiomodulation and Sida tuberculata combination declines the inflammation's markers in knee - induced osteoarthritis[J]. *Laser Med Sci*,2021,(5):207.
- [6] Monajemi M, Fisk S, Pang Y, et al. Malt1 deficient mice develop osteoporosis independent of osteoclast ntrinsic effects of Malt1 deficiency [J]. *J Leukocyte Biol*,2019,106(4):863.
- [7] 叶雪英,彭剑虹,尹晓霞.补益肝肾法联合维生素 D 对肝肾阴虚型类风湿关节炎的影响[J]. *中医临床研究*. 2020,12(14):111.
- [8] 李 烨,童 杰,周衍晶,等.补肾壮骨中药抗骨质疏松有效成分及其药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*. 2015,40(6):1038.
- [9] 罗小玲,张 群.补肝益肾汤对肝肾阴虚型绝经后骨质疏松症患者血清性激素及 BALP, β -CTX,N-MID 水平的影响[J]. *四川中医*. 2019,37(3):166.
- [10] Du X, Ye F, Li J, et al. Altered levels of BMD, PRL, BAP and TRACP-5b in male chronic patients with schizophrenia[J]. *Sci Rep*, 2020,10(1):13598.
- [11] Nethrapalli IS, Singh M, Guan X, et al. Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade Endocrinology[J]. *Endocrinology*,2019,142(12):5145.
- [12] Tiedeken M, Westhoff CL, Cohen A, et al. Bone turnover markers in women participating in a dose - finding trial of a contraceptive vaginal ring releasing Nestorone and estradio[J]. *Contraception*,2019,99(6):329.
- [13] Almstedt HC, Cook MM, Bramble LF, et al. Oral contraceptive use, bone mineral density, and bone turnover markers over 12months in college - aged females[J]. *J Bone Miner Res*,2020,38(4):544.
- [14] Yang K, Tian N, Liu H, et al. LncRNAp21 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the rat model of osteoporosis by the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmac*,2019,23(10):4303.
- [15] Du R, Chen P, Zhang Q, et al. The degradation of enrofloxacin by a non - metallic heptazine - based OCN polymer: Kinetics, mechanism and effect of water constituents[J]. *Chemosphere*,2020,273(15):128435.
- [16] Cavalier E, Eastell R, Jorgensen N, et al. A multicenter study to evaluate harmonization of assays for N - terminal propeptide of type I procollagen (PINP): a report from the IFCC - IOF Joint Committee for Bone Metabolism[J]. *Clin Chem Lab Med*,2019,14(4):174.
- [17] 张佳慧.透骨消痛胶囊干预兔膝骨质疏松性骨关节炎的软骨与软骨下骨结构研究[D].福建中医药大学硕士学位论文,2018.
- [18] Li T F, Chen D, Wu Q, et al. Transforming growth factor - β stimulates cyclin D1 expression through activation of β - catenin signaling in chondrocytes[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(30):21296.
- [19] Henning L, Steinhuser C, Bedner P. Initiation of Experimental Temporal Lobe Epilepsy by Early Astrocyte Uncoupling Is Independent of TGF β 1/ALK5 Signaling[J]. *Front Neurol*,2021,12(7):660591.
- [20] Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, et al. Smad3 Induces Chondrogenesis through the Activation of SOX9 via CREB - binding Protein/p300 Recruitment[J]. *J Biol Chem*,2005,280(9):8343.
- [21] Shen J, Li J, Wang B, et al. Deletion of the Transforming Growth Factor Receptor Type II Gene in Articular Chondrocytes Leads to a Progressive Osteoarthritis - like Phenotype in Mice[J]. *Arthritis Rheum*, 2013,65(12):3107.
- [22] Caam AV, Madej W, Vinuesa A. TGF β 1 - induced SMAD2/3 and SMAD1/5 phosphorylation are both ALK5 - kinase - dependent in primary chondrocytes and mediated by TAK1 kinase activity[J]. *Arthritis Res Ther*,2017,19(1):112.
- [23] Brown RE, Zotalis G, Ping LZ, et al. Morphoproteomic Confirmation of a Constitutively Activated mTOR Pathway in High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008,1(4):333.
- [24] 彭 福,刘 洋,孙 权,等.补益肝肾汤对小鼠骨关节炎模型的影响及其机制[J]. *实用医学杂志*,2022,38(18):2289.