

二十五味鬼臼丸对雄性骨质疏松症大鼠骨代谢影响及作用机制研究

孙欣雨¹, 杨爱萍², 李凤辉¹, 马莉娜¹, 万雅琦³, 张立雪⁴, 李长兴^{1*}

1. 青海大学医学院 基础医学部, 青海 西宁 810016

2. 青海红十字医院, 青海 西宁 810000

3. 青海省人民医院, 青海 西宁 810007

4. 西北民族大学 医学部, 甘肃 兰州 730030

摘要: **目的** 观察二十五味鬼臼丸对睾酮缺乏引起的大鼠骨质疏松症的防治作用。**方法** 摘除双侧睾丸构建骨质疏松症动物模型, 3 月龄雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为假手术组、模型组及二十五味鬼臼丸低、中、高剂量 (200、400、800 mg/kg) 组。术后 1 周开始每天 ig 给药, 二十五味鬼臼丸 200、400、800 mg/kg 溶于 3 mL 生理盐水配制等体积混悬液, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组分别 ig 200、400、800 mg/kg 二十五味鬼臼丸, 模型组和假手术组 ig 等量生理盐水, 相同时间点连续给药 8 周, 末次给药后取材。HE 染色观察各组大鼠股骨和腓肠肌组织病理变化; ELISA 法检测血清骨钙素 (BGP)、骨保护素 (OPG)、骨碱性磷酸酶 (BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、I 型胶原 C 端肽 β 特殊序列 (β -CTX-I) 和钙离子 (Ca^{2+}) 含量; Micro-CT 检测股骨骨微结构; RT-PCR 法检测 β -连环蛋白 (β -catenin) 和矮小相关转录因子 2 (*Runx2*) 的 mRNA 表达; Western blotting 法检测 β -catenin 和 *Runx2* 的蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸中剂量组大鼠骨小梁紊乱和腓肠肌组织病理变化明显改善; 血清 BGP、BALP、OPG 和 Ca^{2+} 水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), TRAP、 β -CTX-I 水平降低 ($P < 0.01$); BMD、Tb.N 升高 ($P < 0.01$), Tb.Sp 降低 ($P < 0.05$); β -catenin 和 *Runx2* mRNA 表达上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), *Runx2* 蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。**结论** 二十五味鬼臼丸具有防治睾酮缺乏引起的大鼠骨质疏松症作用, 其作用机制可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 二十五味鬼臼丸; 睾丸切除; 骨质疏松症; 骨代谢; 骨钙素; 骨保护素; 骨碱性磷酸酶; 抗酒石酸酸性磷酸酶; I 型胶原 C 端肽 β 特殊序列; β -连环蛋白; 矮小相关转录因子 2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)03-0550-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.03.003

Effects and mechanism of the Ershiwuwei Guijiu Pills on bone metabolism in male osteoporosis rats

SUN Xinyu¹, YANG Aiping², LI Fenghui¹, MA Lina¹, WAN Yaqi³, ZHANG Lixue⁴, LI Changxing¹

1. Department of Basic Medical Science, Qinghai University Medical College, Xining 810016, China

2. Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810000, China

3. Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, China

4. Department of Medicine, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China

Abstract: Objective To observe the preventive and therapeutic effects of the Ershiwuwei Guijiu Pills on osteoporosis induced by testosterone deficiency in rats. **Methods** The animal model of osteoporosis was established by removing bilateral testicles. Thirty male SD rats of 3 months old were randomly divided into sham operation group, model group and low, medium and high dose (200,400,800 mg/kg) groups of Ershiwuwei Guijiu Pills. One week after operation, the rats were given intragastric administration every day. Ershiwuwei Guijiu Pills 200, 400 and 800 mg/kg were dissolved in 3 mL normal saline to prepare an equal volume suspension. Ershiwuwei Guijiu Pills low, medium and high dose groups were ig administered with Ershiwuwei Guijiu Pills 200, 400 and 800 mg/kg, respectively. The model group and sham operation group were ig administered with the same amount of normal saline. At the

收稿日期: 2025-01-06

基金项目: 青海省科技厅项目 (2023-ZJ-783); 青海大学青年科研基金项目 (2023-QYY-1); 青海大学医学部中青年科研基金项目 (2023-kyy)

作者简介: 孙欣雨, 男, 硕士研究生, 研究方向为中藏药药理作用机制研究。E-mail: 1563592150@qq.com

*通信作者: 李长兴, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中藏药药理作用机制研究。E-mail: Lichangxing@qhu.edu.cn

same time point, the rats were given continuous administration for 8 weeks, and the samples were taken after the last administration. HE staining was used to observe the pathological changes in the femur and gastrocnemius muscle tissues. Serum levels of osteocalcin (BGP), osteoprotegerin (OPG), bone alkaline phosphatase (BALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), type I collagen C-terminal peptide (β -CTX-I), and calcium ions (Ca^{2+}) were measured by ELISA. The bone microstructure was assessed using Micro-CT, and RT-PCR was used to detect the mRNA expression of β -catenin and runt-related transcription factor 2 (*Runx2*). Western blotting was used to measure the protein expression of β -catenin and Runx2. **Results** Compared with the model group, the medium-dose group treated with Ershiwuwei Guijiu Pills showed significant improvements in trabecular bone disorder and gastrocnemius muscle tissue pathology. Serum levels of BGP, BALP, OPG, and Ca^{2+} were increased ($P < 0.05, 0.01$), while TRAP and β -CTX-I levels were decreased ($P < 0.01$). BMD and Tb.N were increased ($P < 0.01$), while Tb.Sp were decreased ($P < 0.05$). mRNA expression of β -catenin and *Runx2* was upregulated ($P < 0.05, 0.01$), and protein expression of Runx2 was upregulated ($P < 0.01$). **Conclusion** Ershiwuwei Guijiu Pills has a preventive and therapeutic effect on osteoporosis induced by testosterone deficiency in rats, and its mechanism may be related to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Ershiwuwei Guijiu Pills; orchiectomy; osteoporosis; bone metabolism; BGP; OPG; BALP; TRAP; β -CTX-I; β -catenin; Runx2

近年来, 男性骨质疏松症逐渐成为科研人员和临床医生关注的热点^[1]。研究显示, 与女性不同, 男性骨质疏松症通常发生较晚, 多发生在 50 岁以上的老年人群中, 30%~50% 的 50 岁以上男性出现不同程度的骨量减少或骨质疏松, 且约 1/3 骨质疏松继发性骨折发生在男性患者中^[2]。研究表明, 睾酮是调节骨代谢的重要激素, 具有促进骨骼矿化、刺激骨生成以及减少骨吸收的作用。随着年龄的增长, 男性的睾酮水平会逐年下降, 通常在 30 岁之后, 睾酮水平的下降速度为每年 1% 左右, 睾酮水平的降低直接导致骨质疏松的风险增加^[3]。在卵巢切除雌激素不足骨质疏松症模型大鼠的研究中, 证明二十五味鬼臼丸能够防治雌激素缺乏导致的骨密度下降, 改善骨微细构造, 显示其对骨丢失疾病的潜在影响, 可用于绝经后骨质疏松症治疗^[4-8]。因此, 本研究通过睾丸切除构建骨质疏松症模型, 观察二十五味鬼臼丸对睾丸切除大鼠骨丢失的保护作用及可能作用机制, 为其用于男性骨质疏松症的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

30 只清洁级 3 月龄 SD 雄性大鼠, 体质量 310~330 g, 由西安交通大学医学部实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(陕)2023-002。饲养于室温(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 12 h 昼夜节律, 明暗交替环境, 自由摄食饮水。本研究方案已通过青海大学医学院实验动物伦理委员会审核(批准文号 PJ202401-33)。

1.2 主要药品与试剂

二十五味鬼臼丸由自青海省藏医院自制(青药制备字 Z20200876000, 0.35 g/丸)。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号 C0041, 北京索莱宝科技有

限公司); 血清骨钙素(BGP)、骨保护素(OPG)、骨碱性磷酸酶(BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、I 型胶原 C 端肽 β 特殊序列(β -CTX-I) ELISA 试剂盒和钙离子(Ca^{2+}) 比色法测试盒(货号为 ml002883、ml003271、ml003415、ml003177、ml038228、ml092645, 上海酶联生物科技有限公司); 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 试剂盒(货号 AQ601, 北京全式金生物技术有限公司); 全蛋白提取试剂盒(货号 KGB5303, 江苏凯基生物); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 抗体(货号 bsm-52262R, 北京博奥森生物技术有限公司); 矮小转录相关因子 2(Runx2)、 β -连环蛋白(β -catenin) 抗体(货号 WL03358、WL0962a, 沈阳万类生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

Centrifuge 5418R 离心机(德国 Eppendorf 公司); Nanodrop 2000(美国 Thermo 公司); Light Cycler96 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); xMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); WT60A 组织脱水机(德国 Leica 公司); EG1150 石蜡包埋机(德国 Leica 公司); Ci-S 荧光显微镜(日本 Nikon 公司); NMC-200 Micro-CT(德国 Nemo 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

适应性喂养 1 周后, 通过切除双侧睾丸和附睾构建睾酮缺乏骨质疏松症大鼠模型^[9]。大鼠通过小动物麻醉机深度麻醉后, 沿腹部中线切开 1~2 cm, 将睾丸推揉入腹, 夹持粉色呈卵圆形睾丸, 分离结扎睾丸血管。假手术组采取类似手术方法, 仅切除部分脂肪组织。im 青霉素, 连续 3 d 预防感染。将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及二

十五味鬼臼丸低、中、高剂量 (200、400、800 mg/kg) 组, 每组 6 只。术后观察 1 周无异常现象, 各组开始 ig 给药, 药物治疗组参照课题组前期研究结果设置浓度梯度^[6]。二十五味鬼臼丸 200、400、800 mg/kg 溶于 3 mL 生理盐水配制等体积混悬液, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组分别 ig 200、400、800 mg/kg 二十五味鬼臼丸, 模型组和假手术组 ig 等量生理盐水, 相同时间点连续 ig 8 周。

2.2 样本制备

末次给药后, 禁食 12 h, 小动物麻醉机深度麻醉, 腹主动脉取血, 4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 15 min (离心半径 9.5 cm), 取上清, 保存于 -80 ℃ 冰箱; 取左侧股骨及腓肠肌, 冻存管保存于 -80 ℃ 冰箱, 右侧股骨及腓肠肌置于 4% 多聚甲醛固定; 分离出大鼠精囊生理盐水冲洗并测定质量。

2.3 体质量及精囊监测

ig 当天记录体质量, 随后每周测量 1 次大鼠体质量变化并记录; 末次给药后取材测定精囊质量。

2.4 HE 染色观察股骨和腓肠肌组织病理形态

多聚甲醛固定 48 h 后, 生理盐水冲洗右侧股骨和腓肠肌。股骨保存于 EDTA 脱钙液, 37 ℃ 恒温脱钙, 直至骨组织能被大头针刺穿。腓肠肌仅在多聚甲醛中固定, 随后进行下一步处理。股骨和腓肠肌依次进行脱水、包埋、切片、染色和封片后在显微镜下观察形态变化。

2.5 ELISA 法检测 BGP、BALP、OPG、TRAP、 β -CTX-I 和 Ca^{2+} 水平

按照说明书要求加样, 用酶标仪在指定波长下 (450 nm) 检测吸光度 (A) 值并绘制标准曲线, 标准曲线的拟合采用线性回归法, 依据标准曲线计算样本中骨代谢指标 BGP、BALP、OPG、TRAP、 β -CTX-I 和 Ca^{2+} 浓度。

2.6 Micro-CT 测量股骨远端骨微结构

股骨远端组织用 4% 多聚甲醛固定过夜, 取股骨远端组织固定, Micro-CT 扫描参数设置为电压 80 kV、电流 0.06 mA 进行样本扫描, 使用 Recon 软件进行三维图像重建, Cruiser 软件对各组样本同一目标区域进行数据采集和分析。

2.7 RT-PCR 检测股骨 β -catenin、Runx2 mRNA 表达

引物序列如表 1 所示, 取左侧股骨远端骨组织约 100 mg 研磨匀浆提取总 RNA, 用核酸分析仪检测 RNA 浓度和纯度, 按照试剂盒说明书反转录为

cDNA, RT-PCR 法进行扩增反应, 反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 共 45 个循环, 以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

名称	引物序列 (3'-5')	长度/bp
β -catenin	上游: GAGGACAAGCCACAGGACTACAAG	94
	下游: CAGCAGTCTCATTCCAAGCCATTG	
Runx2	上游: ACTTCGTCAGCGTCCTATCAGTTC	149
	下游: CCATCAGCGTCAACACCATCATTC	
GAPDH	上游: AAGTTCAACGGCAGTCAAGG	123
	下游: GACATACTCAGCACCAGCATCAC	

2.8 Western blotting 法检测股骨 β -catenin、Runx2 蛋白表达

取左侧股骨远端骨组织约 100 mg 研磨匀浆提取总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 酶标仪测定浓度, 依次进行电泳、转膜、封闭, β -catenin (1:900)、Runx2 (1:1 000)、GAPDH (1:2 000) 一抗孵育, 使用 HRP 标记的二抗 (1:10 000) 孵育, ECL 显色, 曝光。使用 Image J 软件进行条带灰度分析, 以 GAPDH 作为内参, 计算目标蛋白相对表达量。

2.9 统计学方法

SPSS 25.0 软件进行分析, 连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若数据满足正态分布且方差齐, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验; 若方差不齐, 两组间比较采用 Dunnett's t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量和精囊质量变化情况

如图 1 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠精囊明显萎缩; 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组大鼠精囊外观无明显变化。如表 2 所示, 8 周后, 各组大鼠体质量无明显差异, 与假手术组相比, 模型组大鼠精囊质量显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量干预对大鼠精囊质量的下降无明显影响。

3.2 二十五味鬼臼丸对各组大鼠股骨和腓肠肌组织病理形态的影响

如图 2 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠骨小梁紊乱且稀疏, 肌纤维平均横截面积明显减小 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸低、中、高

剂量组大鼠骨小梁丢失程度减轻, 肌纤维横截面积均显著增高 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明药物治疗后能防治肌肉纤维萎缩。

3.3 二十五味鬼臼丸对大鼠血清 BGP、BALP、OPG、TRAP、 β -CTX-I 和 Ca^{2+} 的影响

如表 3 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠 BGP、BALP、OPG 和 Ca^{2+} 水平显著降低 ($P<0.01$), TRAP 和 β -CTX-I 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组大鼠 BGP、OPG 水平升高 ($P<0.05$ 、 0.01), TRAP 水平降低 ($P<0.05$ 、

0.01), 二十五味鬼臼丸中、高剂量组大鼠 BALP、 Ca^{2+} 水平水平升高 ($P<0.05$ 、 0.01), β -CTX-I 水平降低 ($P<0.01$)。

3.4 二十五味鬼臼丸对大鼠股骨骨微结构的影响

如图 3 和表 4 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠股骨 BMD、BS/BV、Tb.N 降低 ($P<0.05$ 、 0.01), Tb.Sp 升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸中、高剂量组大鼠 BMD 和 Tb.N 升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组大鼠 Tb.Sp 降低 ($P<0.05$)。

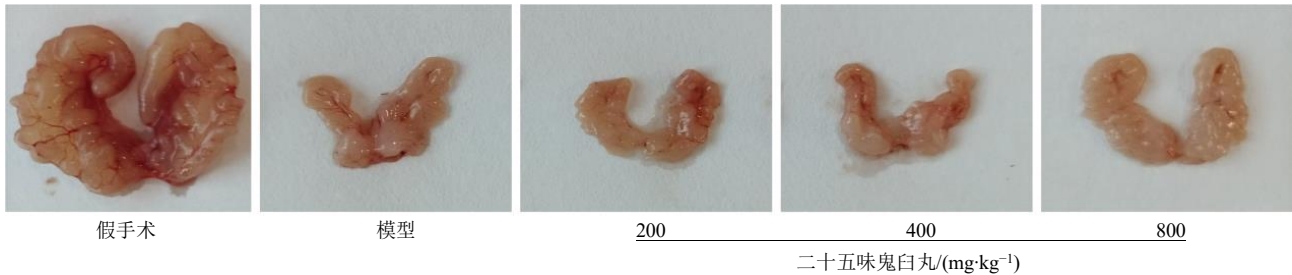


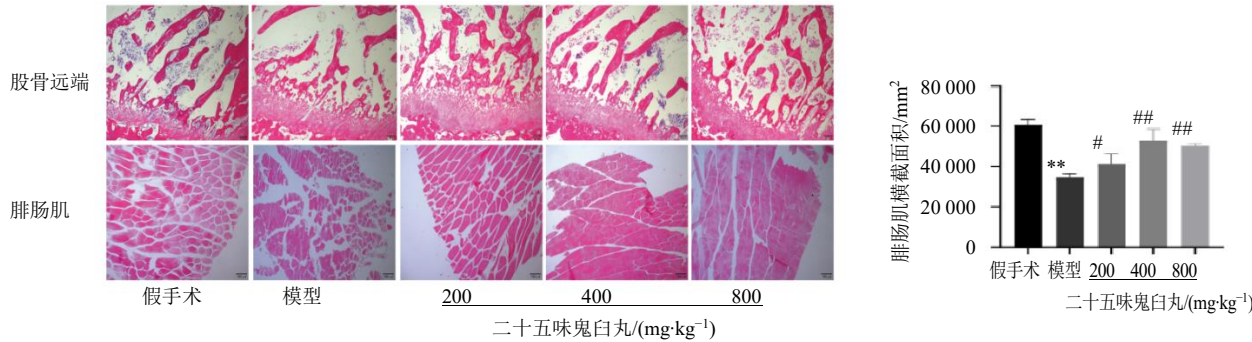
图 1 大鼠精囊展开图
Fig. 1 Schematic diagram of rat seminal vesicle

表 2 二十五味鬼臼丸对睾丸切除大鼠体质量和精囊质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effects of Ershiwuwei Guijiu Pills on body mass and seminal vesicle mass in orchietomy rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	精囊质量/g
假手术	—	418.18±32.66	1.06±0.12
模型	—	414.20±29.61	0.11±0.01**
二十五味鬼臼丸	200	408.72±23.87	0.12±0.01
	400	407.72±23.51	0.12±0.01
	800	408.62±27.98	0.11±0.01

与假手术组比较: ** $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs sham operation group.



与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs sham operation group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

图 2 各组大鼠股骨和腓肠肌 HE 染色 ($\times 100$)

Fig. 2 HE staining of femur and gastrocnemius muscles in each group ($\times 100$)

表 3 二十五味鬼臼丸对血清骨代谢指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Ershiwuwei Guijiu Pills on serum bone metabolism markers ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BGP/(ng·mL ⁻¹)	BALP/(ng·mL ⁻¹)	OPG/(ng·L ⁻¹)	TRAP/(U·L ⁻¹)	β-CTX- I /(μg·L ⁻¹)	Ca ²⁺ /(μg·mL ⁻¹)
假手术	—	1.15 ± 0.04	1.96 ± 0.06	8.92 ± 0.28	0.83 ± 0.02	0.77 ± 0.04	3.16 ± 0.59
模型	—	0.95 ± 0.04**	1.61 ± 0.04**	5.79 ± 0.24**	0.90 ± 0.01**	0.92 ± 0.06**	1.92 ± 0.19**
二十五味鬼臼丸	200	1.01 ± 0.04 [#]	1.67 ± 0.03	6.45 ± 0.25 ^{##}	0.88 ± 0.02 [#]	0.85 ± 0.08	2.22 ± 0.21
	400	1.06 ± 0.03 ^{##}	1.73 ± 0.10 [#]	7.20 ± 0.40 ^{##}	0.86 ± 0.02 ^{##}	0.81 ± 0.05 ^{##}	2.39 ± 0.34 [#]
	800	1.02 ± 0.03 ^{##}	1.72 ± 0.13 [#]	6.79 ± 0.49 ^{##}	0.87 ± 0.02 [#]	0.82 ± 0.02 ^{##}	2.61 ± 0.54 ^{##}

与假手术组比较: ***P* < 0.01; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01。

***P* < 0.01 vs sham operation group; [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs model group.

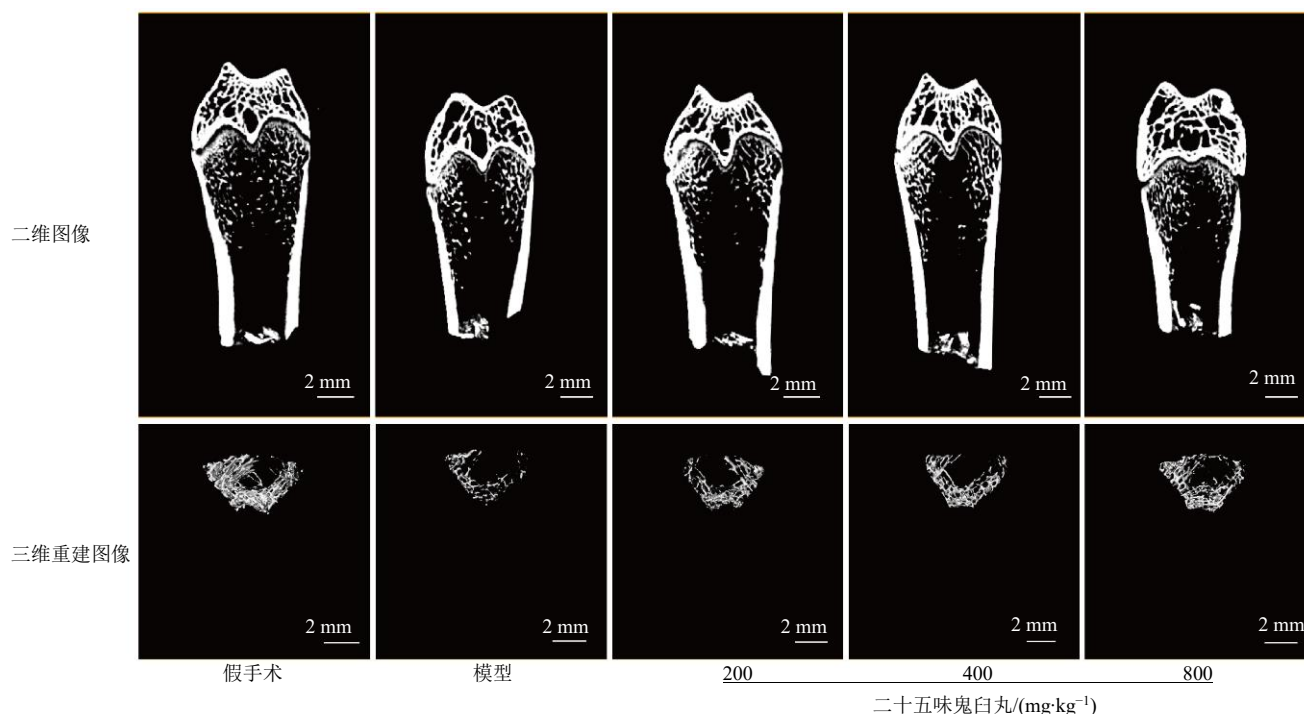


图 3 大鼠股骨断层扫描

Fig. 3 X-ray computed tomography of the femur in rats

表 4 二十五味鬼臼丸对去势大鼠股骨远端组织计量学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of Ershiwuwei Guijiu Pills on the histomorphometry of the distal femur in orchietomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BMD/(g·cm ³)	BS/BV/mm ⁻¹	Tb.N/mm ⁻¹)	Tb.Sp(avg)/mm
假手术	—	1.31 ± 0.05	22.76 ± 0.32	1.80 ± 0.28	0.43 ± 0.09
模型	—	1.21 ± 0.01**	20.61 ± 0.83*	0.87 ± 0.12**	0.88 ± 0.22**
二十五味鬼臼丸	200	1.24 ± 0.01	21.02 ± 1.05	1.10 ± 0.31	0.65 ± 0.03 [#]
	400	1.29 ± 0.03 ^{##}	21.73 ± 0.61	1.40 ± 0.11 ^{##}	0.66 ± 0.04 [#]
	800	1.26 ± 0.01 [#]	21.52 ± 1.13	1.26 ± 0.09 [#]	0.64 ± 0.04 [#]

与假手术组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05 ^{##}*P* < 0.01。

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs sham operation group; [#]*P* < 0.05 ^{##}*P* < 0.01 vs model group.

3.5 二十五味鬼臼丸对大鼠股骨 β -catenin、Runx2 mRNA 表达的影响

如图 4 所示,与假手术组相比,模型组大鼠 β -

catenin、Runx2 mRNA 表达降低 (*P* < 0.01);与模型组比较,二十五味鬼臼丸中、高剂量组大鼠组 β -catenin mRNA 表达上调 (*P* < 0.05、0.01),二十五味鬼臼丸低、

中、高剂量组大鼠 *Runx2* mRNA 表达上调 ($P < 0.01$)。

3.6 二十五味鬼臼丸对大鼠股骨 β -catenin、*Runx2* 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与假手术组相比,模型组大鼠 β -

catenin、*Runx2* 蛋白表达降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,二十五味鬼臼丸低剂量组大鼠 β -catenin 蛋白表达上调 ($P < 0.05$),二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组大鼠 *Runx2* 的蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。

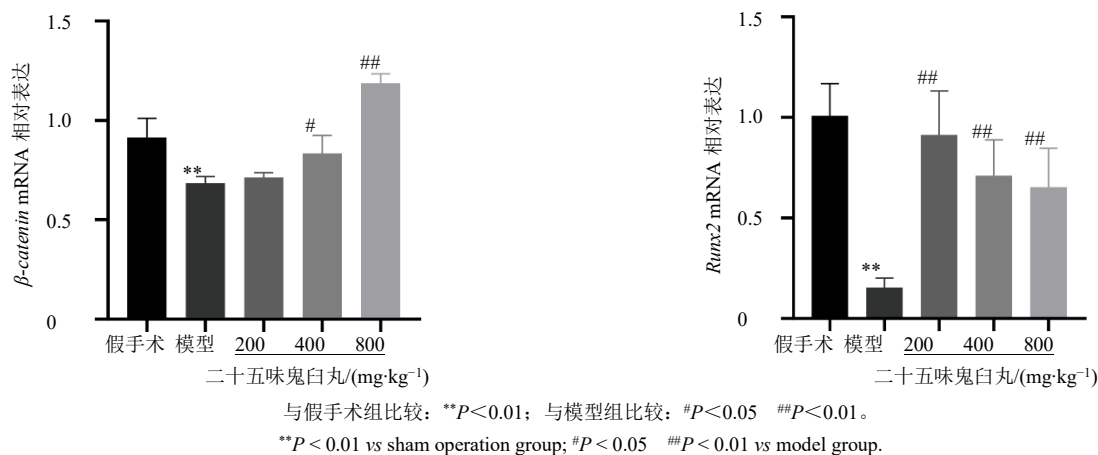


图 4 二十五味鬼臼丸对 β -catenin 和 *Runx2* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effects of Ershiwuwei Guijiu Pills on β -catenin and *Runx2* mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

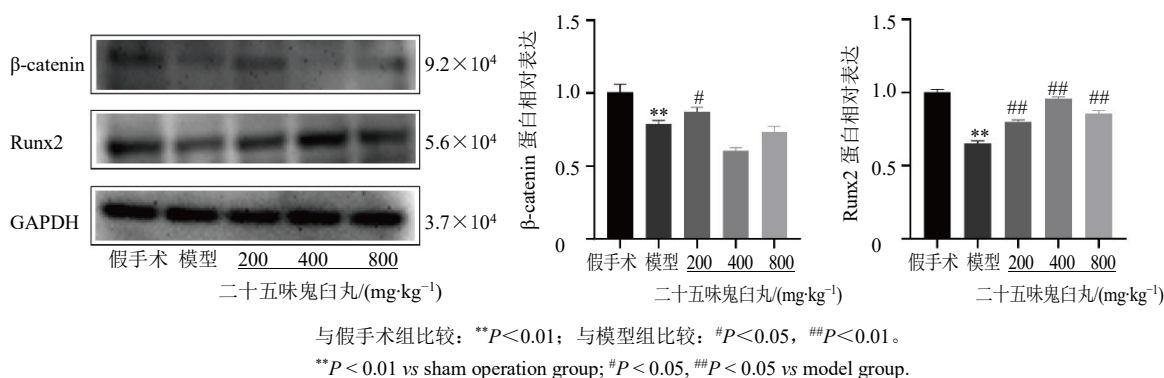


图 5 二十五味鬼臼丸对 β -catenin 和 *Runx2* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effect of Ershiwuwei Guijiu Pills on β -catenin and *Runx2* protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

研究表明,睾酮对于维持骨量具有重要意义^[10]。目前,临床防治男性骨质疏松症以睾酮替代疗法为主,但会导致患者前列腺增生、高血压等疾病风险增加,缺乏更为安全、有效的治疗手段^[11]。因此,研究人员已聚焦于寻找具有促进睾酮分泌和维持骨量的天然化合物^[12]。中医药多取材于天然化合物,研究发现二十五味鬼臼丸能通过促进骨形成、抑制骨吸收防治雌激素缺乏骨质疏松症^[4-8]。睾丸切除诱导的骨质疏松症动物模型被广泛应用于男性骨质疏松研究^[9]。为探究二十五味鬼臼丸对睾酮缺乏引起的骨质疏松症是否有防治效果,本研究通过双侧睾丸摘除构建睾酮缺乏所致的骨质疏松症大鼠模型。

BPG、BALP 是成熟且活跃的成骨细胞标志物,反映骨细胞的形成和活动状态^[13-14]。OGP 又称破骨细胞抑制因子,主要作用是增加骨强度、抑制骨吸收^[15]。TRAP、 β -CTX-I 因子表达水平能特异性反映破骨细胞的吸收活性^[16-17]。血清 Ca^{2+} 是骨转换的常见指标,是辨别骨质疏松症的有效途径^[18]。实验证明,模型组大鼠 BPG、BALP、OPG、 Ca^{2+} 水平显著降低,TRAP、 β -CTX-I 水平显著升高,二十五味鬼臼丸干预治疗后,可以调节血清中骨代谢指标趋于正常水平,反映二十五味鬼臼丸可降低破骨细胞活性,增加成骨细胞活性,与王申等^[19]的中药提取物治疗睾酮缺乏骨质疏松症研究结果一致。

研究证实, Wnt/ β -catenin 信号通路可能参与骨

重建过程,影响峰值骨量,调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对于抑制骨质疏松症发展具有重要意义^[20]。因此,对雄性动物骨质疏松症模型作用机制的研究逐渐聚焦于该信号通路。本研究发现,模型组大鼠 β -catenin 和 Runx2 的 mRNA 和蛋白表达降低,二十五味鬼臼丸干预治疗后, Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达水平明显升高,结果提示激活该通路可能与防治去势大鼠骨质疏松症有关。与阮立奇等^[21]发布的研究结果相吻合。由于 β -catenin 是 Wnt 信号通路中的关键调控因子,该通路本身的激活和抑制会受到多种因子调控。某些信号通路的激活可能通过 β -catenin 的翻译后修饰、蛋白聚集或核转运等方式,影响蛋白质的表达水平,从而出现 mRNA 与蛋白不一致的现象,需要在后期研究中深入探讨。

综上所述,二十五味鬼臼丸能够调节成骨、破骨环路,从而防治睾丸切除诱发的大鼠骨质疏松症,为二十五味鬼臼丸防治男性骨质疏松症临床运用提供了实验依据。进一步研究表明,二十五味鬼臼丸改善去势大鼠骨质疏松症作用机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路激活相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Viswanathan M, Reddy S, Berkman N, *et al.* Screening to prevent osteoporotic fractures: Updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force [J]. *JAMA*, 2018, 319(24): 2532-2551.
- [2] Bliuc D, Nguyen N D, Alarkawi D, *et al.* Accelerated bone loss and increased post-fracture mortality in elderly women and men [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(4): 1331-1339.
- [3] Ye J J, Zhai X J, Yang J X, *et al.* Association between serum testosterone levels and body composition among men 20-59 years of age [J]. *Int J Endocrinol*, 2021, 2021: 7523996.
- [4] 李淑桢,王琦,李沁园,等.基于下丘脑-垂体-卵巢轴探讨藏药二十五味鬼臼丸对绝经后骨质疏松症大鼠的干预作用 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6282-6290.
- [5] 王琦,李淑桢,代冬芳,等.二十五味鬼臼丸的植物雌激素样作用及其对雌激素受体的调控 [J]. *中成药*, 2022, 44(1): 55-60.
- [6] 申继强,代冬芳,吴佩锋,等.藏药二十五味鬼臼丸通过 OPG/RANKL/RANK 通路对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的干预作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(11): 5495-5499.
- [7] 余瑶,李沁园,代冬芳,等.藏药二十五味鬼臼丸对雌性去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢平衡的影响 [J]. *中国高*

- 原医学与生物学杂志, 2023, 44(4): 236-242.
- [8] 江宇楠,张立雪,段方林,等.二十五味鬼臼丸激活 PI3K/Akt/mTOR 介导的自噬缓解去势大鼠骨质疏松作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(22): 43-51.
- [9] 孙岩,陈冉,王小琦,等.建立雄性大鼠骨质疏松模型的方法学研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(4): 441-444.
- [10] Khosla S, Monroe D G. Regulation of bone metabolism by sex steroids [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8(1): a031211.
- [11] Halpern J A, Brannigan R E. Testosterone deficiency [J]. *JAMA*, 2019, 322(11): 1116.
- [12] Sun J, Pan Y L, Li X F, *et al.* Quercetin attenuates osteoporosis in orchietomy mice by regulating glucose and lipid metabolism via the GPRC6A/AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 849544.
- [13] Migliorini F, Maffulli N, Spiezia F, *et al.* Biomarkers as therapy monitoring for postmenopausal osteoporosis: A systematic review [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 318.
- [14] Barbonetti A, D'Andrea S, Samavat J, *et al.* Can the positive association of osteocalcin with testosterone be unmasked when the preminent hypothalamic-pituitary regulation of testosterone production is impaired? The model of spinal cord injury [J]. *J Endocrinol Investig*, 2019, 42(2): 167-173.
- [15] Nor Hashimah A M M, Sakthiswary R, Shaharir S S, *et al.* Serum pyridinoline is associated with radiographic joint erosions in rheumatoid arthritis [J]. *Arch Rheumatol*, 2019, 34(4): 387-394.
- [16] Bhattoa H P, Cavalier E, Eastell R, *et al.* Analytical considerations and plans to standardize or harmonize assays for the reference bone turnover markers PINP and β -CTX in blood [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 515: 16-20.
- [17] Song Z H, Xie W, Zhu S Y, *et al.* Effects of PEMFs on Osx, Ocn, TRAP and CTSK gene expression in postmenopausal osteoporosis model mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(3): 1784-1790.
- [18] 杨锋,孙玉华,刘佃滨,等.骨质疏松患者骨碱性磷酸酶、钙、磷代谢变化及与牙槽骨密度的相关性 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(9): 1160-1166.
- [19] 王申,耿庆贺,还涵,等.冬凌草甲素对雄激素缺乏诱导的大鼠骨质疏松症的影响 [J]. *江苏医药*, 2020, 46(3): 217-220.
- [20] Gao Y G, Chen N, Fu Z D, *et al.* Progress of Wnt signaling pathway in osteoporosis [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(3): 483.
- [21] 阮立奇,黄波. Wnt/ β -catenin 信号通路在去势小鼠骨质疏松发病中的作用 [J]. *温州医科大学学报*, 2017, 47(7): 519-522.

【责任编辑 金玉洁】