

基于 IL-6/JAK2/STAT3 通路探讨补肾化痰方改善去势大鼠骨丢失的作用机制

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

1. 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北 武汉 430065

3. 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北 武汉 430065

摘要:目的 探究补肾化痰方对去势大鼠骨丢失和 IL-6/Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导与转录活化因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 通路的影响。方法 SD 雌性大鼠随机分为对照组、模型组、戊酸雌二醇 (0.184 mg/kg) 组以及补肾化痰方低、中、高剂量 (4.7、9.4、18.8 g/kg) 组, 除对照组外, 其他组均采用手术切除卵巢, 制作绝经后骨质疏松症模型。术后 1 周给予戊酸雌二醇和补肾化痰方进行干预, 给药 12 周后取材。采用 Micro CT 检测各组大鼠肱骨骨密度和骨矿物质含量; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠股骨组织病理变化; 采用碱性磷酸酶染色法考察各组大鼠骨髓成骨细胞数量; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-17 水平; 采用 qRT-PCR 法检测各组大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达情况。结果 与对照组比较, 模型组大鼠肱骨骨密度和骨矿物质含量显著降低 ($P < 0.01$); 骨小梁减少、稀疏, 脂肪细胞增多; 血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-17 水平显著升高 ($P < 0.01$); 股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); IL-6、IL-6R、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组骨密度和骨矿物质含量显著增加 ($P < 0.05, 0.01$); 骨小梁增多, 且结构较完整, 脂肪细胞减少; 补肾化痰方中、高剂量组大鼠骨髓成骨细胞数显著增多 ($P < 0.05, 0.01$); 各给药组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$), 戊酸雌二醇组以及补肾化痰方中、高剂量组大鼠血清中 IL-17 水平显著降低 ($P < 0.01$); 股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-6、IL-6R、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 补肾化痰方能够改善去势大鼠骨丢失, 其机制可能与抑制 IL-6/JAK2/STAT3 通路有关。

关键词: 补肾化痰方; 骨丢失; 绝经后骨质疏松症; 去势大鼠; IL-6/JAK2/STAT3 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4904-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.015

Mechanism of Bushen Huatan Recipe on improving bone loss of ovariectomized rats based on IL-6/JAK2/STAT3 pathway

TAN Zhang-kui¹, XIANG Nan², ZHANG Yan¹, XIONG Meng-xin¹, XUE Yao-jun¹, HUANG Shi-yi¹, ZHOU Guang-wen³

1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. The First Clinical College, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To explore the effect of Bushen Huatan Recipe (补肾化痰方) on bone loss and IL-6/Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) pathway in ovariectomized rats. **Methods** SD female rats were

收稿日期: 2021-03-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074416); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81904267); 湖北省自然科学基金资助项目 (2019CFB232); 武汉市卫生健康委员会武汉市医学科研项目 (WZ19Q03, WZ20C28); 湖北中医名师向楠工作室建设项目 (鄂卫生计生通报[2018]15号)

作者简介: 谭张奎 (1990—), 男, 博士研究生, 研究方向为中医药防治内分泌疾病。Tel: 13545072800 E-mail: tzhongkui@163.com

*通信作者: 周广文 (1987—), 女, 讲师, 主治医师, 博士, 研究方向为中医药防治骨代谢相关疾病及退行性骨病的研究。

Tel: 15827547190 E-mail: 609053257@qq.com

randomly divided into control group, model group, estradiol valerate (0.184 mg/kg) group, low-, medium- and high-dose (4.7, 9.4, 18.8 g/kg) Bushen Huatan Recipe groups. Except for control group, the ovaries of all other groups were surgically removed to make a postmenopausal osteoporosis model. One week after operation, estradiol valerate and Bushen Huatan Recipe were given for intervention, and samples were obtained 12 weeks after administration. Micro CT was used to detect humerus bone mineral density and bone mineral content of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of femur of rats in each group; Alkaline phosphatase staining method was used to examine the number of osteoblasts in rats of each group; ELISA method was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-17 in serum of rats in each group; qRT-PCR method was used to detect *IL-6*, *IL-6R*, *JAK2* and *STAT3* mRNA expressions in femur of rats in each group; Western blotting method was used to detect IL-6, IL-6R, JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 protein expressions in femur of rats in each group. **Results** Compared with control group, the bone mineral density and bone mineral content of humerus in model group were significantly reduced ($P < 0.01$); Bone trabecula was reduced and sparse, and fat cells were increased; Levels of IL-6, TNF- α and IL-17 in serum were significantly increased ($P < 0.01$); *IL-6*, *IL-6R*, *JAK2* and *STAT3* mRNA expressions of femur were significantly increased ($P < 0.01$); IL-6, IL-6R, p-JAK2 and p-STAT3 protein expressions were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the bone mineral density and bone mineral content of rats in each treatment group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); Bone trabecula were increased, structure was more complete, and fat cells were decreased; Number of bone marrow osteoblasts in rats of medium- and high-dose Bushen Huatan Recipe groups were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); Levels of IL-6 and TNF- α in serum of rats in each administration group were significantly reduced ($P < 0.01$), IL-17 level in serum of rats in estradiol valerate group and medium-, high-dose Bushen Huatan Recipe groups were significantly reduced ($P < 0.01$); *IL-6*, *IL-6R*, *JAK2* and *STAT3* mRNA expressions of femur were significantly reduced ($P < 0.01$), IL-6, IL-6R, p-JAK2 and p-STAT3 protein expressions were significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** Bushen Huatan Recipe can improve bone loss in ovariectomized rats, and its mechanism may be related to the inhibition of IL-6/JAK2/STAT3 pathway.

Key words: Bushen Huatan recipe; bone loss; postmenopausal osteoporosis; ovariectomized rats; IL-6/JAK2/STAT3 pathway

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是指绝经后女性卵巢功能衰退且雌激素水平降低, 骨形成减少, 骨吸收增强, 骨吸收大于骨形成失去平衡, 出现以骨量减少、骨强度降低、骨显微结构退变、骨脆性增加为特征的一种代谢性骨疾病^[1], 临床上常表现为骨痛、脊柱变形甚至骨折等。据我国最新的骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 流行病学调查显示, 50 岁以上和 65 岁以上人群 OP 患病率分别为 19.2%、32.0%。随着我国人口老龄化日益严重, 低骨量人群即 OP 的高危人群数量逐年上升, 50 岁以上人群低骨量率为 46.4%, 且 PMOP 患病率显著高于欧美国家^[2]。目前治疗 PMOP 的药物主要有抗骨吸收剂 (如双膦酸盐、迪诺塞麦、降钙素、雌激素、选择性雌激素受体调节剂)、促骨形成剂 (如特立帕肽) 等。

中医将 PMOP 归属为“骨痿”“骨痹”“骨枯”等范畴, 骨碎补总黄酮、淫羊藿苷和人工虎骨粉等均具有一定的抗骨质疏松作用。湖北中医名师向楠教授从“肾主骨生髓”的理论出发, 结合多年临床经验, 认为本病在肾精不足前提下, 易滋生痰浊之邪^[3-6], 提出补肾化痰的治则; 并结合《本草纲目》补骨脂丸与《丹溪心法》黄瓜萎丸加减而成补肾化

痰方^[7], 其临床疗效显著。本课题组前期研究发现, 补肾化痰方可以提高 PMOP 模型大鼠的骨密度, 促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 抑制成脂分化^[8-9], 改善 PMOP 大鼠骨免疫失衡状态^[10], 降低大鼠血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平^[11]。研究发现, IL-6 对于雌激素缺乏的小鼠骨丢失是不可避免的, 表明 IL-6 在骨稳态中发挥着关键作用^[12]。本研究考察补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6/Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号转导与转录活化因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 通路的影响, 为其机制探究奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 90 只, 体质量 (220 \pm 30) g, 6 月龄, 购自湖北省实验动物研究中心, 动物许可证号 SCXK (鄂) 2015-0018。动物饲养于湖北中医药大学动物实验中心, 室温 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 光照通风适宜, 自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学实验动物伦理审查委员会批准 (批准号 201909005)。

1.2 药材

补肾化痰方由菟丝子 30 g、淫羊藿 10 g、补骨脂 15 g、全瓜蒌 15 g、红曲 12 g、净山楂 20 g 组成；以上药材采购于湖北省中医院药房，经湖北中医药大学陶春晖副教授鉴定分别为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的种子、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 的干燥叶、葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实、真菌类子囊菌纲曲霉目曲霉科红曲 *Monascus purpureus* Went.、蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实，均符合《中国药典》2015 年版规定。

1.3 药品与试剂

戊酸雌二醇（批号 374A，2 mg/片）购自拜耳医药保健有限公司广州分公司；Trizol（批号 15596-026）购自美国 Ambion 公司；RIPA 裂解液（批号 P0013B）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 P0010）购自上海碧云天；HiScript Reverse Transcriptase (RNase H)、5×HiScript Buffer、50×ROX Reference Dye 2（批号 R101-01/02）、SYBR Green Master Mix（批号 Q111-02）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；甲醇、NaCl、KCl（批号分别为 10014118、10019318、10016318）购自国药集团化学试剂有限公司；兔多抗 IL-6、IL-6R、STAT3、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 抗体（批号分别为 Df6087、Df2530、Af6494、Af3295）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；兔单抗 JAK2、p-JAK2 抗体（批号分别为 3230、3776）购自美国 CST 公司；HRP 标记的羊抗小鼠抗体、HRP 标记的羊抗兔抗体、HRP 标记的兔抗大鼠抗体（批号分别为 BA1051、BA1054、BA1058）购自武汉博士德生物工程有限公司；大鼠 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒（批号分别为 E-EL-R0019c、E-EL-R0015c）购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司；BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒（批号 PR1100）购自北京索莱宝科技有限公司。

1.4 仪器

Micro CT（瑞士 Scanco 公司）；QuantStudio™ 6 型 qRT-PCR 仪（美国 ABI 公司）；JY300 型水平电泳仪、JY02S 型紫外分析仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；DYCZ-40 型电转仪、DYCZ-24DN 型垂直电泳槽（北京六一仪器厂）；酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；HI650 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）。

2 方法

2.1 补肾化痰方的制备

称取补肾化痰方全方药材混合，加入 5 倍量蒸馏水浸泡 2 h，先武火再文火煎 1 h，滤过；重复上述步骤，再次提取滤液，合并 2 次滤液，采用旋转蒸发器浓缩至最终药物质量浓度为 0.94 g/mL（以生药量计）^[10]，于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 分组、造模与给药

SD 大鼠适应性饲养 7 d 后，随机分为对照组、模型组、戊酸雌二醇（0.184 mg/kg）组以及补肾化痰方低、中、高剂量（4.7、9.4、18.8 g/kg）^[13]组，每组 15 只。除对照组外，其他组行卵巢切除术造模，大鼠 ip 1%戊巴比妥钠（0.03 g/kg）麻醉，固定于手术操作台，在大鼠背部正中两侧 1~2 cm 处行纵行切口，进入腹腔在脂肪堆积处找到卵巢，结扎并摘除双侧卵巢，分层缝合收口；对照组不摘除卵巢，只切除卵巢周围同等质量的脂肪组织。术后大鼠 im 青霉素（1.6 mL/kg），1 次/d，连续 3 d，术后禁食不禁水 1 d。戊酸雌二醇研碎后，用纯净水配制成质量浓度为 0.018 4 mg/mL 的混悬液，术后 1 周各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液，1 次/d，连续 12 周。

2.3 标本采集与处理

给药结束后，大鼠 ip 1%戊巴比妥钠麻醉，采用负压采血管于腹主动脉采血，3000 r/min 离心 20 min，取上层血清，于 -80 °C 保存备用。分离肱骨及股骨，清除肌肉组织与结缔组织。骨组织一部分采用 4%多聚甲醛固定用于染色及骨密度检测，一部分用纱布包裹于 -80 °C 保存用于后续检测。用于染色的骨组织在染色前，将骨组织从 4%多聚甲醛中取出，于 15 倍量 10% EDTA 脱钙液中脱钙处理 4 周，每 3 天更换 1 次脱钙液，至骨组织变软（以使用针扎骨组织能够顺利刺入为验证），脱钙后以蒸馏水清洗，于乙醇溶液中固定。

2.4 补肾化痰方对去势大鼠肱骨微结构、骨密度及骨矿含量的影响

解冻肱骨样本，将组织固定在 Micro CT 载物台上，以 360° 扫描角度、分辨率为 14.8 μ m，扫描肱骨近端获取连续平面图像。扫描后，选取生长板远端 1.0 mm、层厚 2.0 mm 的骨组织为松质骨感兴趣区域进行三维重组，提取图像信息。获取重组图像后，使用 Micro CT 自带分析软件进行定量分析，检测骨密度和骨矿含量。

2.5 补肾化痰方对去势大鼠股骨病理变化的影响

取左侧股骨,以 10% 甲醛固定,再用 20% EDTA 脱钙液进行脱钙,然后脱水 60 min;用二甲苯 I 和 II 分别处理 60 min,常规浸蜡、包埋后切片(厚 4 μm),进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察股骨病理变化。

2.6 补肾化痰方对去势大鼠骨髓成骨细胞数量的影响

取出脱钙处理的骨组织,进行脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片和烤片处理,切片脱蜡,加入碱性磷酸酶染色工作液,室温避光染色,去除工作液,以蒸馏水洗涤 2 次终止显色反应;无水乙醇脱水,二甲苯透明,于通风柜中风干,中性树脂封片,于显微镜下观察,各组每张切片随机挑选 6 个视野进行拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件计数每个视野下的骨髓成骨细胞并取平均值。

2.7 补肾化痰方对去势大鼠血清中 IL-6、TNF-α 和 IL-17 水平的影响

取制备好的血清样本,按 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 IL-6、TNF-α 和 IL-17 水平。

2.8 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响

取新鲜冰冻骨组织组织,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.9 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

股骨剪碎后,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,分别加入 IL-6、IL-6R、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 抗体(1:1000)和 β-actin 抗体(1:500),4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 5 次,5 min/次,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
IL-6	F: GTTGCCTTCTTGGGACTGATG R: TACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
IL-6R	F: GGACTACCACGGGAAACAC R: GGATGCCACTCACAAAAGG
JAK2	F: AGTGACCCAACCTTCAGTGG R: AGCCCAACGTGTTCTTCACT
STAT3	F: TGGGCATCAATCCTGTGGTAT R: TAGTTCACACCAGGCCCTAAG
β-actin	F: CACGATGGAGGGCCGGACTCATC R: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

加入 HRP 标记的抗体 (1:50 000),室温孵育 2 h, TBST 洗涤后,加入 ECL 发光液,X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影,冲洗胶片,采用 BandScan 软件分析胶片灰度值。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经过校验,数据符合正态分布且方差齐。多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 补肾化痰方对去势大鼠肱骨微结构、骨密度及骨矿含量的影响

如图 1 所示,与对照组相比,模型组大鼠肱骨皮质骨变薄,骨小梁稀疏、减少;与模型组相比,各给药组大鼠肱骨骨小梁增多,结构较完整。如图 2 所示,与对照组比较,模型组骨密度和骨矿含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组骨密度和骨矿含量显著增加 ($P < 0.05、0.01$)。

3.2 补肾化痰方对去势大鼠股骨病理变化的影响

如图 3 所示,对照组骨小梁结构均匀,形态结构完整,骨髓腔相对较小;与对照组比较,模型组骨小梁数目减少、稀疏,骨小梁间隙增大,骨髓腔

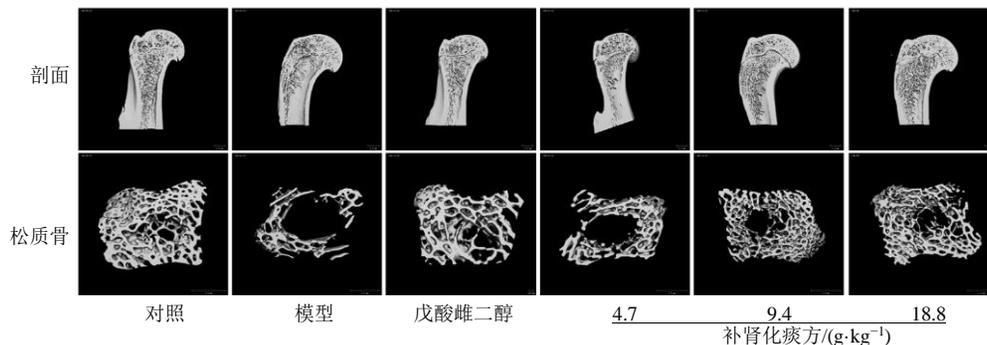


图 1 补肾化痰方对去势大鼠肱骨微结构的影响

Fig. 1 Effect of Bushen Huatan Recipe on microstructure of humerus in ovariectomized rats

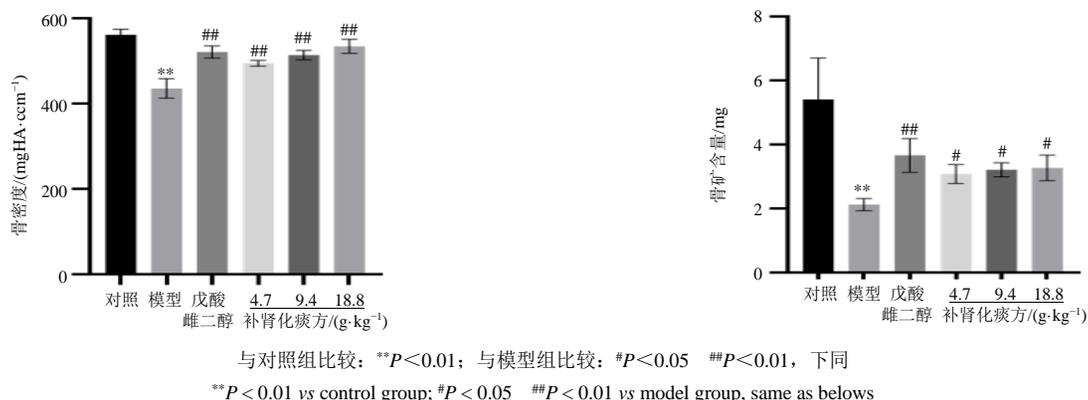


图2 补肾化痰方对去势大鼠肱骨密度和骨矿含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Bushen Huatan Recipe on bone mineral density and bone mineral content of humerus in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

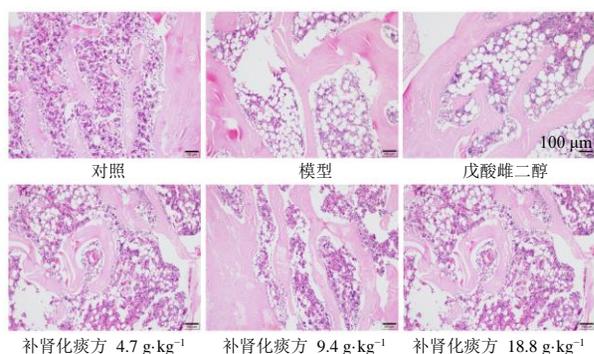


图3 补肾化痰方对去势大鼠股骨病理变化的影响 (HE, ×100)
 Fig. 3 Effect of Bushen Huatan Recipe on pathological changes of femur in ovariectomized rats (HE, ×100)

明显增宽, 脂肪空泡多; 与模型组比较, 各给药组骨小梁数量稍增加, 排列尚整齐, 骨髓脂肪组织减少。

3.3 补肾化痰方对去势大鼠骨髓成骨细胞数量的影响

碱性磷酸酶染色后骨髓成骨细胞呈蓝紫色。如图4所示, 与模型组比较, 补肾化痰方中、高剂量组大鼠骨髓成骨细胞数显著增多 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 补肾化痰方对去势大鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-17 水平的影响

如图5所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-17 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α

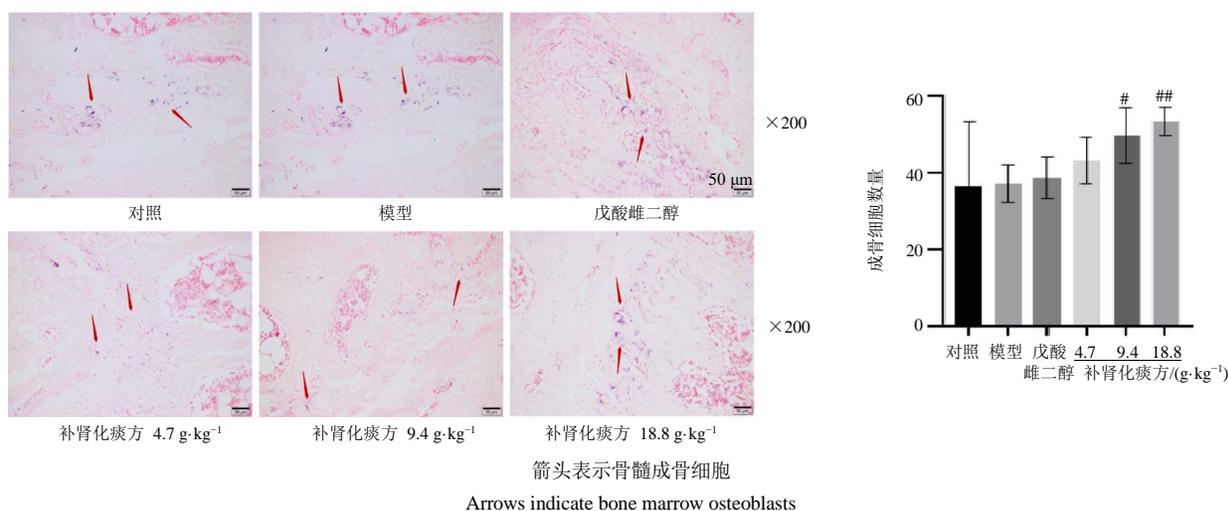


图4 补肾化痰方对去势大鼠骨髓成骨细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of Bushen Huatan Recipe on number of bone marrow osteoblasts in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

水平显著降低 ($P < 0.01$), 戊酸雌二醇组以及补肾化痰方中、高剂量组大鼠血清中 IL-17 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响

如图6所示, 与对照组比较, 模型组大鼠股骨

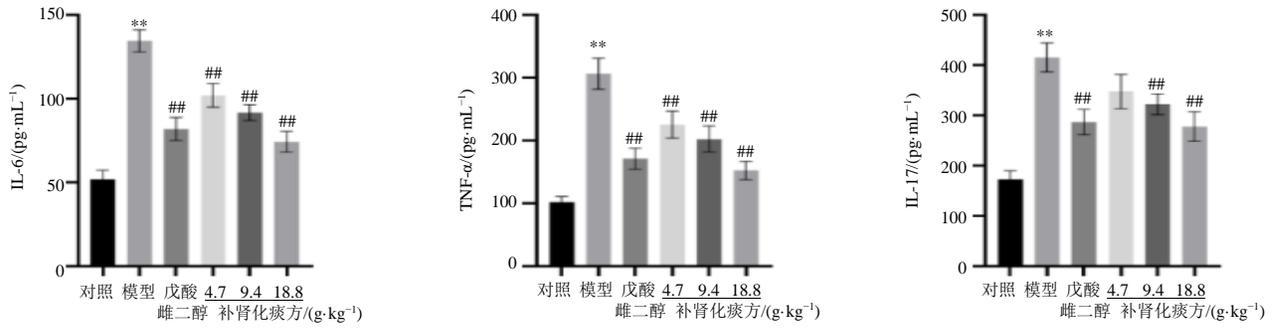


图5 补肾化痰方对去势大鼠血清中 IL-6、TNF-α 和 IL-17 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of Bushen Huatan Recipe on levels of IL-6, TNF-α and IL-17 in serum of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

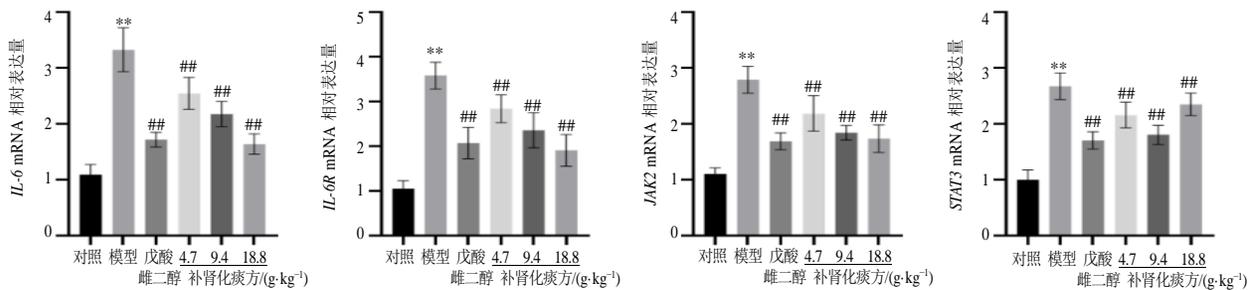


图6 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of Bushen Huatan Recipe on expressions of IL-6, IL-6R, JAK2 and STAT3 mRNA in femur of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响
如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水

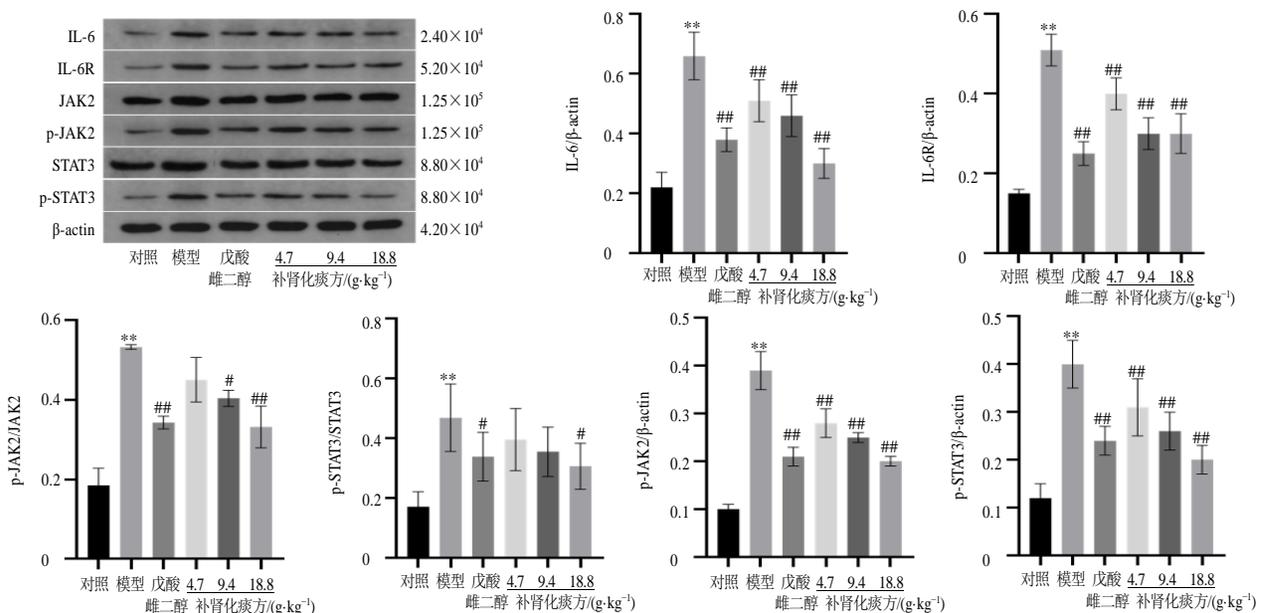


图7 补肾化痰方对去势大鼠股骨组织 IL-6/JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of Bushen Huatan Recipe on expressions of IL-6/JAK2/STAT3 pathway related proteins in femur of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

平显著升高 ($P < 0.01$), p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠股骨组织 IL-6、IL-6R、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 戊酸雌二醇组以及补肾化痰方中、高剂量组 p-JAK2/JAK2 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 戊酸雌二醇组以及补肾化痰方高剂量组 p-STAT3/STAT3 显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

PMOP 主要是由于女性绝经后卵巢功能衰退, 雌激素水平降低, 对破骨细胞的抑制作用减弱, 破骨细胞的数量增加、凋亡减少而寿命延长, 导致其骨吸收功能增强。虽然成骨细胞介导的骨形成亦有增加, 但不足以代偿过度骨吸收, 这与本次关于成骨细胞数量研究相符合。骨重建活跃和失衡致使小梁骨变细或断裂, 皮质骨孔隙度增加, 导致骨强度下降。雌激素减少降低骨骼对力学刺激的敏感性, 使骨骼呈现类似于废用性骨丢失的病理变化^[13]。中医学文献中无 PMOP 之名, 按其临床表现, 对应中医相近的病症, 可以归属于以下几类: 对于临床表现不明显, 或仅感觉腰背酸软乏力的 OP 患者, 如“腰背不举, 骨枯而髓减”, 归属于骨痿; 对于临床有腰背疼痛沉重患者, 如“腰背疼痛, 全身骨痛, 身重、四肢沉重难举”, 可归属于骨痹。根据中医药“肾主骨生髓”“脾主四肢肌肉”及“不通则痛”的理论, 以补肾益精、健脾益气、活血祛瘀为 OP 的主要治法。向楠教授在此基础上, 根据“肾虚水泛为痰”结合现代研究骨髓间充质干细胞在 OP 状态下成脂分化, 提出了“补肾化痰”的新治法。

《本草纲目》中补骨脂丸记载:“补骨脂 4 两(炒香), 菟丝子 4 两(酒蒸), 胡桃肉 1 两(去皮), 乳香 2 钱半, 没药 2 钱半, 沉香 2 钱半; 主治壮筋骨, 益元气”。《丹溪心法》中黄瓜萎丸记载:“栝蒌仁、半夏、山楂、神曲(炒, 各等分), 治食积, 痰壅滞”。补肾化痰方是从补骨脂丸中选取补骨脂、菟丝子加淫羊藿, 从黄瓜萎丸选取瓜蒌, 山楂, 改神曲为红曲, 2 方融合而成, 方中淫羊藿与补骨脂合用, 同为君药, 具益肾壮阳、强筋健骨的功效; 菟丝子滋补肝肾、固精缩尿, 全瓜蒌清热化痰, 共为臣药; 山楂善于消食化积、行气散瘀; 红曲长于健脾消食、活血化痰, 2 药协同为佐药, 全方共奏补肾益髓、化痰调脂之功。淫羊藿苷是中药淫羊藿的主要药效成分, 可有效预防骨质疏松症^[14-15]。补骨脂素与异

补骨脂素均为补骨脂中的主要有效成分, 具有多种生物活性, 对骨质疏松症有很好的治疗作用^[16-18]。菟丝子主要活性成分为黄酮类化合物, 山柰酚和金丝桃苷为其提取物中发挥成骨作用的活性成分, 可用于治疗骨质疏松症^[19-20]。山楂、瓜蒌、红曲提取物可调脂抗炎^[21-22]。红曲能够促进大鼠骨形成, 其提取物含辅酶 Q10 和洛伐他汀, 能够改善骨质疏松症^[23-24]。

PMOP 被认为是炎症疾病, 甚至是一种自身免疫状态。绝经后雌激素缺乏及 T 细胞免疫功能减退可引起血清 IL-6、TNF- α 等细胞因子水平上升^[25]。IL-6 和 TNF- α 可作用于破骨细胞, 刺激骨吸收作用; 同时还能增加骨胶原酶分泌, 促进骨基质降解而影响成骨细胞活性, 进而影响骨形成作用, 因此被称为溶骨性细胞因子^[26]。IL-6 的受体由特异性的 IL-6 结合蛋白 (IL-6 受体) 和糖蛋白 130 (gp130) 2 部分组成。gp130 是一种激活蛋白, 是许多 IL-6 家族细胞因子共同的受体。可溶性 IL-6 受体与 IL-6 结合后, 激活含有 gp130 信号肽的细胞^[27]。在骨髓中, IL-6 首先与靶细胞膜上 IL-6 特异性受体结构链即 IL-6R 结合形成复合物, 再与 IL-6 受体信号传导链即 gp130 相关联后, 促使其二聚化。胞内 JAK2 通过 FERM 结构域与 IL-6 特异性受体 (IL-6R/gp130) 相结合并被磷酸化激活, 进一步磷酸化 STAT3, 活化的 STAT3 形成二聚体并暴露其核定位信号, 从而由胞质转移到胞核, 启动下游转录因子 ROR γ t 和 ROR α 的表达来影响 Th17 细胞的分化^[28]。骨髓中 Th17 细胞数量增加, 并分泌高水平的 IL-17、TNF- α 。而骨微环境 IL-17 水平的提高, 可直接诱导成骨细胞和骨髓基质细胞表达核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligands, RANKL)、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 易位, 从而促进破骨细胞成熟和骨吸收。IL-17 及 TNF- α 作为促炎因子, 其释放又会进一步加重机体炎性反应。研究发现, 用 IL-6/sIL-6R 处理成骨细胞可以诱导 RANKL 产生, 从而刺激破骨细胞形成和骨吸收, 而 STAT3 信号通路介导了这一生物学过程^[29]。可见在骨髓中, 炎性因子通过 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路介导 Th17 细胞活化, 引发炎性级联反应, 最终导致破骨细胞活性增强, 骨吸收增加, 导致 PMOP 的发生与发展。

本研究发现, 模型组骨小梁稀疏, 结构破坏, 骨髓脂肪细胞增多, 骨密度降低; 补肾化痰方能够

显著提高模型大鼠骨密度,改善骨小梁形态,降低脂肪细胞数,增加成骨细胞数。研究发现^[30-32],痰浊证患者炎症因子 IL-6、TNF- α 水平升高,给予中药化痰浊后 IL-6、TNF- α 水平显著降低,表明炎症反应与痰浊关系密切。而采用补肾法治疗肾虚夹痰证患者,发现相关炎症因子水平降低,表明肾虚与痰浊存在联系^[33]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-17 水平显著升高,表明去势大鼠血清中出现炎症反应;进一步在骨组织发现 IL-6、IL-6R mRNA 和蛋白表达水平显著升高,表明骨组织同样有炎症反应。骨组织中 JAK2、STAT3 mRNA 及 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著升高,表明 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路被激活;补肾化痰方干预后血清炎症因子水平降低,骨组织 IL-6/JAK2/STAT3 通路相关蛋白 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,大鼠骨丢失改善,表明其作用机制可能与抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路有关。本课题组前期研究发现,补肾化痰方能够降低骨髓中 Th17 数量^[10],其与 IL-6 水平的降低及 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的关系仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li J, Chen X, Lu L Y, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 52: 88-98.
- [2] Kataoka Y, Luo Y, Chaimani A, et al. Cumulative network meta-analyses, practice guidelines, and actual prescriptions for postmenopausal osteoporosis: A meta-epidemiological study [J]. *Arch Osteoporos*, 2020, 15(1): 21.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 张妍, 胡娅, 向楠, 等. 向楠基于络病学说从“痰”论治骨质疏松症经验 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(3): 109-112.
- [6] 李章青, 向楠, 周广文, 等. 向楠治疗肾虚痰浊型绝经后骨质疏松症的经验 [J]. *湖北中医杂志*, 2020, 42(8): 27-29.
- [7] 周亚娜, 周广文, 张麟, 等. 补肾化痰方对绝经后骨质疏松模型大鼠骨重建平衡的影响 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(11): 8-11.
- [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, 陈辉, 向楠. 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]. *时珍国医国药*, 2015, 26(10): 2325-2327.
- [10] 谭张奎, 周广文, 张妍, 等. 补肾化痰方对去势骨质疏松模型大鼠 Th17/Treg 平衡机制的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 33-40.
- [11] 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.
- [12] Hadji P, Colli E, Regidor P A. Bone health in estrogen-free contraception [J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(12): 2391-2400.
- [13] 葛继荣, 王和鸣, 郑洪新, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2020) [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(12): 1717-25.
- [14] 姜涛, 凌翠敏, 陈庆真, 等. 淫羊藿苷通过提高自噬促进成骨细胞分化防治骨质疏松 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(17): 2643-2649.
- [15] 赵金龙, 曾令烽, 梁桂洪, 等. 基于信号通路的中药有效成分治疗骨质疏松机制研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(23): 6084-6094.
- [16] 杨阔, 高茸, 马亚中, 等. 补骨脂素药理作用及肝毒性机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(1): 289-298.
- [17] 陈露华, 唐宏宇. 补骨脂素对绝经后大鼠骨质疏松及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国药房*, 2021, 32(6): 697-701.
- [18] 尚延春, 张海英, 柴巍巍. 异补骨脂素改善骨质疏松大鼠骨代谢的作用探讨 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(2): 220-224.
- [19] 孙奇华, 蔡红慧, 何爱玉, 等. 菟丝子黄酮通过调控 ZBED3-AS1 影响成骨细胞凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(2): 306-314.
- [20] 刘博男, 宋辉, 薛屹, 等. 基于网络药理学探讨菟丝子治疗骨质疏松症的作用机制 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(7): 2399-2406.
- [21] 宁素云, 滕丹, 慕杨娜, 等. 基于肠道微生态研究山楂粉调节高脂膳食小鼠血脂的机制 [J]. *中成药*, 2020, 42(11): 3062-3069.
- [22] 马晨欢, 邵建柱, 王青, 等. 红曲的临床应用及其用量探究 [J]. *吉林中医药*, 2020, 40(10): 1368-1371.
- [23] 冷明昊, 张卫华, 陈东, 等. 红曲通过激活腺苷酸活化蛋白激酶上调骨形态发生蛋白 2 表达对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2021, 29(3): 7-11.
- [24] 吕思敏, 于琼, 司徒永立, 等. 含辅酶 Q₁₀ 和洛伐他汀的红曲提取物对大鼠胫骨形态的骨计量学观察 [J]. 中

- 国骨质疏松杂志, 2016, 22(11): 1469-1476.
- [25] Wang T, He C. TNF- α and IL-6: The link between immune and bone system [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(3): 213-227.
- [26] Fischer J, Hans D, Lamy O, *et al.* "Inflammaging" and bone in the OsteoLaus cohort [J]. *Immun Ageing*, 2020, 17: 5.
- [27] Ilesanmi-Oyelere B L, Schollum L, Kuhn-Sherlock B, *et al.* Inflammatory markers and bone health in postmenopausal women: A cross-sectional overview [J]. *Immun Ageing*, 2019, 16: 15.
- [28] Luo P C, Wang Y N, Zhao C Q, *et al.* Bazedoxifene exhibits anti-inflammation and anti-atherosclerotic effects via inhibition of IL-6/IL-6R/STAT3 signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 893: 173822.
- [29] Li Y J, Lu L Y, Xie Y, *et al.* Interleukin-6 knockout inhibits senescence of bone mesenchymal stem cells in high-fat diet-induced bone loss [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 622950.
- [30] 吴旻. 化浊法对冠心病痰浊证患者 IL-6、TNF- α 、MCP-1、hs-CRP 的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [31] 韩景波, 吕艳杭, 吴姗姗, 等. 化痰开痹汤对冠心病心绞痛(痰浊痹阻型)患者疗效及血脂、血清炎症因子水平的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(10): 3696-3701.
- [32] 张玉. 自拟宣肺化痰方合痰热清注射液治疗支气管扩张症急性加重期痰热郁肺证疗效及对血气分析指标、炎症因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(20): 2250-2253.
- [33] 吴炎. 阳和平喘颗粒治疗 AECOPD 危险窗(肾虚夹痰证)患者的临床疗效观察及其对 IL-8/TNF- α 的影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.

[责任编辑 李亚楠]