

学校编码：10384

分类号__密级__

学号：24520141153544

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

二至丸粗提液对去势骨质疏松模型鼠
RANKL/RANK/OPG 系统干预作用的实验研究

The study of the influence of the rough extract of
Er-Zhi-Wan to the RANKL/ RANK/OPG system of the
ovariectomized osteoporosis rats

刘振涛

指导教师姓名：张怡元 教授

专 业 名 称：外科学

论文提交日期：2017 年 4 月

论文答辩时间：2017 年 5 月

学位授予日期：2017 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PMOP	Postmenopausal osteoporosis	绝经后骨质疏松症
RANKL	Ligand of Receptor Activator of NF- κ B	NF- κ B 受体活化因子配体
RANK	Receptor Activator of NF- κ B	NF- κ B 受体活化因子
OPG	osteoprotegerin	骨保护素
BGP	Bone glaprotein	骨钙素
TRACP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase	抗酒石酸酸性磷酸酶
BV/TV	Bone Volume per Tissue Volume	骨小梁面积百分比
RT-PCT	Realttime-PCR	实时荧光定量
WB	Western Blot	免疫印迹法
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附法

中文摘要

一、目的:

阐明 OPG/RANKL/RANK 系统与去卵巢骨质疏松之间的关系, 以及二至丸粗提液干预去卵巢骨质疏松模型鼠对此系统重要节点的调控作用, 从 OPG/RANKL/RANK 系统方面探讨二至丸治疗 PMOP 的可能作用机制。

二、方法:

1 实验动物分组、造模、模型鉴定、药物干预及取材

在 170 只 6 月龄的 SPF 级雌性 SD 大鼠适应实验动物房环境的 3 天后, 抽签随机分成去势组 130 只与假手术组 40 只。取 2% 戊巴比妥钠对实验大鼠作腹腔内注射麻醉(40mg/kg), 在腹部正中部位作切口, 去势组大鼠进行双侧卵巢结扎切除术, 假手术组只未进行卵巢结扎切除术, 其他操作步骤均与假手术组相同。术后 12 周, 在去势组与假手术组中抽签随机各取 10 只大鼠做模型鉴定: 麻醉之后取右侧胫骨测定并比较骨密度, 取右侧子宫测定并比较其内膜厚度。模型鉴定成功后, 将去势组抽签随机分成模型组、二至丸低剂量组, 二至丸中剂量组和二至丸高剂量组各 30 只。均于术后的第 13 周开始灌胃给药, 二至丸低剂量组给予二至丸 6g/(kg.d), 以生理盐水 2ml 溶解后灌胃; 二至丸中剂量组给予二至丸 9g/(kg.d), 以生理盐水 2ml 溶解后灌胃; 二至丸高剂量组给予二至丸 12g/(kg.d), 以生理盐水 2ml 溶解后灌胃; 模型组与假手术组均只以 2ml 生理盐水灌胃, 1 次/日, 连续 12 周用药, 实验大鼠均在相同的条件下自由饮食, 用药剂量均在与人体安全剂量范围对应的大鼠剂量范围内(约 0-12g/(kg. d))。第 16、20、24 周各组抽签随机取 10 只大鼠, 腹主动脉取血并离心, 将血清分装到 EP 管中, -80℃冻存备测; 取胫骨、腰椎, -80℃冻存备测。

2、指标检测

采用 ELISA 法测定血清 OPG、TRACP、BGP 与 RANKL 的含量。胫骨上端及腰椎下端作常规病理切片并 HE 染色, 采用 Motic Med 6.0 数码图像分析系统测定骨小梁面积比, 双能 X 线骨密度仪测定骨密度, 三点弯曲法测定右胫骨生

物力学最大载荷力, RT-PCR、Western blot 法测定血清和骨组织中 OPG、TRACP、BGP 与 RANKL 基因及蛋白的表达水平。

三、结果:

1、去卵巢术后 16-24 周, 同假手术组比较, 模型组的骨密度、骨形态学和骨生物力学指标均下降($p<0.05$), 血清与骨组织中 RANKL、BGP 及 TRACP 的 mRNA 和蛋白均明显升高($p<0.05$), OPG 的表达降低($p<0.05$)。随着术后时间的延长, RANKL、BGP 及 TRACP 的增长幅度和 OPG 的降低幅度均有所减缓。

2、去卵巢术后 16-24 周, 同模型组比较, 二至丸干预可明显提高去卵巢骨质疏松大鼠骨密度($p<0.05$), 增加骨小梁面积($p<0.05$), 提升骨生物力学性能($p<0.05$), 上调去卵巢 SD 大鼠血清和骨组织 OPG 的 mRNA 和蛋白的表达($p<0.05$), 抑制 RANKL、BGP 及 TRACP 的 mRNA 和蛋白表达($p<0.05$)。随着用药浓度的增大和用药时间的延长, 二至丸低中高剂量组血清和骨组织 OPG 的表达逐渐增加, RANKL、BGP 及 TRACP 的表达逐渐降低。

四、结论:

在与人体安全剂量范围对应的大鼠剂量范围内:

1 二至丸可以提高去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度、骨小梁面积与骨生物力学性能。

2 二至丸能调节去卵巢骨质疏松大鼠血清和骨组织 OPG、TRACP、BGP 与 RANKL 的异常表达, 上调血清和骨组织中 OPG 的基因和蛋白表达, 提高成骨细胞功能和骨形成, 降低血清和骨组织 RANKL 的基因和蛋白表达, 减弱破骨细胞活性和骨吸收, 抑制血清和骨组织 TRACP 与 BGP 的基因和蛋白表达, 降低骨代谢, 发挥改善去卵巢骨质疏松的作用。

关键词: 二至丸; 骨质疏松; RANKL/RANK/OPG系统

Abstract

1.Objective

The main objective of this research was to specify the concern between osteoporosis of ovariectomized SD rats and the OPG/RANKL/RANK system, and discover the mechanism of Er-Zhi-Wan defending the postmenopausal osteoporosis from the perspective of the OPG/RANKL/RANK system.

2. Methods

2.1 Experimental animal group, building model, model identification, drug intervention and drawing materials

The amount of six months old healthy SPF female rats was 170, respectively. After feeding 3 days, the female rats were randomly divided into two groups: the ovariectomized group(n=130) and the sham operation group(n=40).All the experimental rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 2% sodium pentobarbital (40mg/kg), were taken the middle abdominal incision. All the experimental rats underwent bilateral ovariectomy ,excepte the sham operation group, the rest of steps were same in both groups. After 12 weeks of the surgery,10 rats of each group were randomly selected to do the model identification. The right hind proximal tibia of each rats were done the detection of bone mineral density and the right uterus was taken to do the detection of uterine endometrium thickness after anesthesia to identify the establishment of the model.After success of the model,the ovariectomized group was divided into 4 groups: the model group, the low-dose Er-Zhi-Wan group,the moderate-dose Er-Zhi-Wan group, and the high-dose Er-Zhi-Wan group, with 30 rats in each group.From the 13th week, the low-dose Er-Zhi-Wan group was given 6g/(kg.d) Er-Zhi-Wan lavage,which was dissolved by 2ml normal saline.The moderate-dose Er-Zhi-Wan group was given 9g/(kg.d) Er-Zhi-Wan lavage,which was dissolved by 2ml normal saline. The high-dose Er-Zhi-Wan group was given 12g/(kg.d) Er-Zhi-Wan lavage,which was dissolved by.

The model group and the ovariectomized group were both given 2ml normal saline, 1 time per day, 12 weeks of dose. All the experimental rats were raised and drank water freely in the same conditions. After lavage, In the 16th, 20th, 24th week, ten rats were selected randomly from each group, the blood was drawn from abdominal aorta and putted into EP tubes respectively and -80°C cryopreserved for measurement. The tibia and the lumbar spine were drawn, meanwhile, and -80°C cryopreserved for measurement.

2.2 Indexes detection

The purity of OPG, RANKL, TRACP and BGP in the serum was determined by the experimental method of ELISA. The tibia, the lumbar spine and the uterus were made paraffin sections and HE staining, the bone trabecula area of them were measured by Motic Med 6.0 digital medical image analysis system. BMD of the rats was determined by Dual energy X ray bone sonometers. Biomechanical testing of the right tibia was performed through the Three-point bending experiment. The protein and gene expression levels of OPG, RANKL, TRACP and BGP of tibia and the lumbar spine were determined by Western blot and Real time PCR.

3. Results

3.1 After oophorectomy, compared with the sham operation group, the bone mineral density, the bone morphology and the bone biomechanical indexes of the model group lasted to go down from 16th week and 24th week ($p < 0.05$). The protein and gene expression levels of RANKL, TRACP and BGP in the serum and the lumbar spine are both increasing ($p < 0.05$), but the OPG are decreasing at the same time ($p < 0.05$). As the time gone by, the amplification of the RANKL, TRACP and BGP was slowing down, the decreases in the OPG was also slowing down.

3.2 Compared with the model group, the Er-Zhi-Wan could elevate the bone mineral density and the bone trabecula area and the bone biomechanical properties ($p < 0.05$). The protein and gene expression levels of OPG in the serum and the lumbar spine are both increasing ($p < 0.05$), but the RANKL, TRACP and BGP are decreasing at the same time ($p < 0.05$). As the medication time gone by and the increase of drug concentration, the protein and gene expression levels of OPG in the serum and

the lumbar spine are both increasing, and the RANKL、TRACP and BGP are decreasing at the same time

4. Conclusion

During the dose range of rats corresponding to the safe dose range of the human:

4.1 Er-Zhi-Wan could lift the bone mineral density and the bone trabecula area and the bone biomechanical properties of osteoporosis of ovariectomized model rats .

4.2 Er-Zhi-Wan could regulate the abnormal expression of the protein and gene expression levels of OPG、BGP、RANKL and TRACP in the serum and the lumbar spine. Er-Zhi-Wan could promote the protein and gene expression level of OPG in the serum and the lumbar spine, improve the function of osteoblasts and bone formation, bring down the protein and gene expression level of RANKL in the serum and the lumbar spine and the function of osteoclast and the bone absorption, debase the protein and gene expression level of TRACP and BGP in the serum and the lumbar spine and bone metabolic activity. Er-Zhi-Wan can achieve the purpose of prevention and cure of the ovariectomized osteoporosis.

Keywords: Er-Zhi-Wan; osteoporosis; RANKL/RANK/OPG system

目 录

缩略词表.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
目录.....	VII
Contents.....	IX
一、前言	1
二、实验材料及实验方法	4
1、实验材料	4
1.1 实验药物.....	4
1.2 实验动物.....	4
1.3 实验耗材和试剂.....	4
1.4 主要实验仪器.....	5
2、实验方法	6
2.1 实验动物分组、造模及饲养.....	6
2.2 实验取材.....	6
3、指标检测	7
3.1 骨组织形态学检测.....	7
3.2 骨密度测定.....	7
3.3 骨生物力学性能的检测.....	7
3.4 ELISA 法检测血清中 OPG、TRACP、RANKL 和 BGP 的含量.....	7
3.5 RT-PCR 法检测骨组织中 OPG、RANKL、TRACP 和 BGPmRNA 的表达.....	8
3.6 Western Blot 法检测骨组织中 OPG、RANKL、TRACP 和 BGP 蛋白的表 达.....	10
4、统计学处理	12
三、实验结果	13
1、模型鉴定结果	13
2、二至丸粗提液对骨密度的影响	13
3、二至丸粗提液对骨组织生物力学的影响	14
4、二至丸粗提液对骨组织形态学的影响	15

5、二至丸粗提液对血清中 OPG 蛋白表达的影响	21
6、二至丸粗提液对血清中 RANKL、BGP 和 TRACP 蛋白表达的影响	21
7、二至丸粗提液对骨组织 OPGmRNA 表达的影响	23
8、二至丸粗提液对骨组织 RANKL、BGP 和 TRACPmRNA 表达的影响	24
9、二至丸粗提液对骨组织 OPG 蛋白表达的影响	26
10、二至丸粗提液对骨组织 RANKL、TRACP 和 BGP 蛋白表达的影响	27
四、讨论	29
1、去卵巢骨质疏松动物模型的建立	29
2、去卵巢骨质疏松模型鼠 OPG 和 RANKL 及骨重建的变化	30
3、二至丸有效成分治疗 PMOP 的研究基础	32
4、二至丸粗提液对去卵巢骨质疏松模型鼠 RANKL、OPG 及骨重建的影响 ...	33
五、结论	35
六、不足与展望	36
综述	37
参考文献	44

Contents

Abbreviations	I
Chinese Abstract	II
English Abstract.....	IV
Chinese Contents.....	VII
English Contents	IX
Introduction.....	1
Materials and method.....	4
1.Experimental materials	4
1.1 Experimentaldrug.....	4
1.2 Experimental animal	4
1.3 Laboratory consumables and reagents	4
1.4 Main experimental apparatuses.....	5
2.Experimental method	6
2.1 Experimental animal groups, molding and breeding	6
2.2 Drawing materials.....	6
3. Index detection	7
3.1 Bone tissue morphology detection.....	7
3.2 Bone mineral density	7
3.3 Bone biomechanical performance test.....	7
3.4 ELISA to examine the expression of the OPG, RANKL, TRACP and BGP in the serum	7
3.5 RT-PCR to examine the expression of the OPG, RANKL, TRACP and BGP in bone tissue.....	8
3.6 Western Blot to examine the expression of the OPG, RANKL, TRACP	

and BGP in bone tissue	10
4. The statistical treatment	12
Results	13
1 The result of Model identification	13
2 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on rat bone density	13
3 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on rat bone tissue biomechanics	14
4 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on rat bone tissue morphology	15
5 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the OPG protein in serum	21
6 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the RANKL, TRACP and BGP protein in the serum	21
7 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the OPGmRNA in the bone tissue	23
8 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the RANKL, TRACP and BGPmRNA in the bone tissue	24
9 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the OPG protein in the bone tissue	26
10 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the expression of the RANKL, TRACP and BGP protein in the bone tissue	27
Discussion	29
1 The establishment of the the ovariectomized osteoporosis animal model	29
2 The changes of OPG and RANKL and bone reconstruction of the ovariectomized osteoporosis rats	30
3 The research foundation of the treatment of PMOP by the active ingredient of Er-Zhi-Wan	32
4 The rough extract of Er-Zhi-Wan effect on the RANKL and OPG and bone reconstruction of the ovariectomized osteoporosis rats	33
Conclusions	35

Limitation and outlook	36
Review	37
References	44

厦门大学博硕士论文摘要库

一、前言

绝经后骨质疏松 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 多发生于 50-70 岁绝经后女性, 为最常见的 OP 类型, 由于绝经后, 女性内源性雌激素分泌不足, 破骨细胞活性增加, 导致骨吸收超过骨形成, 主要表现为骨代谢高转换率增高^[1]。据研究统计, 中国大陆地区有近 13.3 亿多人口, 其中 40 岁以上 (含 40 岁) 人群中约五分之一患有 OP, 约 2.6 亿以上人口患有不同程度的 OP, 60 岁以上的人群发病率高达 50%, 且女性发病率均高过同年龄段男性, 比例近乎 2: 1, 发病率跃居全球常见病排行榜第 7 位^[2,3]。随着 OP 引起的骨骼强度降低, 骨折的危险程度与日俱增^[4], 绝经后妇女约有 40% 以上一生至少发生一处以上骨质疏松性骨折, 并且常会导致永久性残疾, 生活质量严重受到影响, 甚至引起死亡^[5], 尤以髌部骨折与死亡率密切关联^[6]。OP 带来的医疗开支迅速增长, 高达数十亿/年, 深深地加重了社会 and 个人的经济负担, 随着人均寿命的延长, 全球老龄化速度的加快^[7], 尤其 50 岁以上绝经期后的女性, 雌激素水平下降, 骨量流失严重, PMOP 的发病率与致死率也在逐年增加, 已成为严重威胁人类身体和心理健康的重大疾病之一^[8]。由于面临着骨质疏松症嚣张的挑战, 所以, PMOP 的研究和治疗引起越来越多人们的关注和重视。

骨骼为人体重要的运动支撑系统, 其生长发育是动态的, 由成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收时刻在进行着^[9]。OP 的发生主要是由于随着年龄的增长, 骨形成与骨吸收失衡所致, 当成骨细胞功能降低, 破骨细胞功能提升时, 骨形成弱于骨吸收, 单位体积的骨量流失, 骨密度下降, 遂致 OP。骨代谢过程受到众多方面的调节, 如内分泌激素 (甲状旁腺素、雌激素与降钙素等), 生物力学因素等, 同时骨骼微环境中的许多细胞因子也会产生重要的影响作用^[10], 其中 RANKL/RANK/OPG 系统^[11,12]在骨骼疾病研究史上具有里程碑式的意义, 其成员结构的特殊性, 决定了骨代谢过程中功能特殊性, 使人们对骨质疏松症有了更深层次的认识^[13]。NF- κ B 受体活化因子配体 (ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL) 为肿瘤坏死因子受体配体超家族成员之一, 在单核/巨噬细胞、骨髓基质细胞、成骨细胞等组织细胞中均有表达, 以可溶性羧基末端和膜结合型

两种形式存在于体内^[14]，因都具有相同的同源结构域，所以均能与相同的受体结合并传递信号^[5,15]。NF- κ B 受体活化因子(Receptor Activator of NF- κ B, RANK)是 RANKL 的唯一靶受体，可于成熟破骨细胞高度表达，RANKL 与之结合后，RANK 蛋白被激活，直接启动破骨细胞的分化等信号转导途径，及抑制破骨细胞的凋亡^[16-18]，加快骨吸收。骨保护素(osteoprotegerin,OPG)由成骨细胞、血管平滑肌细胞、骨髓间质细胞等多种细胞分泌的可溶性糖蛋白，作为 RANKL 的诱饵受体，可高亲和力地与 RANKL 竞争性结合，抑制 RANK 与 RANKL 之间的信号传递^[19]，限制破骨细胞的活化，OPG 还可干扰基质细胞与破骨细胞之间的相互作用而加速破骨细胞的凋亡。因此，RANKL/RANK/OPG 系统在成骨细胞与破骨细胞的功能活性改变及骨代谢的动态变化中，发挥着枢纽性作用^[20-22]。

在骨质疏松的治疗方面，现今仍以预防为主，尽可能减少骨量丢失的因素，加强老年人群的自我保护意识，防止摔伤碰伤等，合理的搭配膳食及加强户外运动锻炼等，降低骨折发生率和预防并发症。药物治疗主要是：骨吸收抑制剂（雌激素替代疗法等）、骨形成促进剂（甲状旁腺素等）、骨矿化促进剂（如骨化三醇）等，但这些治疗方法都带有不同程度的副作用。近来新研制的抗骨质疏松药物 RANKL 单克隆抗体 Denosumab 虽然能够显著降低骨的转复速率，收获一定的疗效^[23]，但由于 RANKL 不仅存在于破骨细胞，而且是免疫系统的重要的调节因子，长期使用会否影响到免疫系统尚需大量临床试验的验证^[24]。

目前许多传统中药制剂已经广泛应用于临床治疗骨质疏松^[25,26]，尤其中药复方含有多种有效成分，多靶点结合作用于机体，调节内分泌，调整全身的功能状态，提升骨量，可以达到综合又平衡地治疗骨质疏松的目的，且长期使用副作用相对较少，为治疗 OP 提供了极具前景的中药方向^[27,28]。

二至丸为古今滋补肾气良方，最先记录于明代王三才《医便》中，由墨旱莲和女贞子二味中药等份配伍而得，为中医临床广泛应用的经典名方之一。化学分析发现，女贞子由黄酮类、萜类、木脂素类化合物及苯醇类等成分组成，墨旱莲主要含有黄酮类、香豆草醚类及三萜类等物质^[29,30]。体外研究发现，女贞子的醇提取物，齐墩果酸等可以提升骨髓间充质干细胞(MSCs)的碱性磷酸酶(ALP)的活性，加快 MSCs 的矿化进程，进而促进 MSCs 向成骨细胞的成熟分化^[31]，降低正在发育的雌性大鼠 RANKL/OPG 比率^[32]，具有促进成骨细胞和碱性磷酸酶活

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库