

# 当归补血汤调控中性粒细胞胞外诱捕网改善卵巢早衰大鼠骨质疏松的机制研究<sup>△</sup>

黄垂巧\*,陈 帅,李 倩,管连城,高 洁,秦 忠,陈云志<sup>#</sup>(贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R965;R285

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)06-0655-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.06.03



**摘要** 目的 探讨当归补血汤调控中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)改善卵巢早衰(POF)大鼠骨质疏松(OP)的机制。方法 将雌性SD大鼠随机分成正常组、模型组、骨化三醇组及当归补血汤低、中、高剂量组,每组9只。除正常组外,其余各组大鼠于第1、8天以6 mg/kg的剂量腹腔注射顺铂溶液建立POF并发OP模型。从造模第5天开始,各组大鼠灌胃相应药液或生理盐水,每天1次,连续4周。末次给药后,检测各组大鼠血清中雌二醇(E<sub>2</sub>)、NETs、25-羟维生素D<sub>3</sub>[25(OH)D<sub>3</sub>]、核因子κB受体激活蛋白配体(RANKL)、骨钙蛋白(BGP)水平,观察其骨组织病理学改变,并检测其骨组织中维生素D受体(VDR)、髓过氧化物酶(MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)、25-羟基维生素D-1α-羟化酶(CYP27B1)、1α,25-二羟维生素D<sub>3</sub>-24-羟化酶(CYP24A1)蛋白的表达情况。结果 与正常组相比,模型组大鼠骨组织骨小梁数量减少、变细及断裂且连接不完整,网状结构明显受损,骨髓腔增大;血清中NETs、RANKL水平和骨组织中MPO、NE、CitH3、CYP24A1蛋白的表达均显著升高或上调,血清中E<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub>、BGP水平和骨组织中VDR、CYP27B1蛋白的表达均显著降低或下调( $P<0.05$ )。与模型组相比,各药物组大鼠骨组织病理学改变均有所恢复,多数定量指标显著改善( $P<0.05$ )。结论 当归补血汤能够恢复POF并发OP大鼠的E<sub>2</sub>水平,改善OP,其机制可能与上调VD水平、抑制NETs形成有关。

**关键词** 当归补血汤;卵巢早衰;骨质疏松;中性粒细胞胞外诱捕网;维生素D

## Study on the mechanism of Danggui buxue decoction regulating neutrophil extracellular traps to improve osteoporosis in rats with premature ovarian failure

HUANG Chuiqiao, CHEN Shuai, LI Qian, GUAN Liancheng, GAO Jie, QIN Zhong, CHEN Yunzhi (School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the mechanism through which Danggui buxue decoction regulates neutrophil extracellular traps (NETs) to improve osteoporosis (OP) in rats with premature ovarian failure (POF). **METHODS** Female SD rats were randomly divided into normal group, model group, calcitriol group, and Danggui buxue decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 9 rats in each group. Except for the normal group, all other groups were administered cisplatin via intraperitoneal injection on days 1 and 8 to establish a POF complicated with OP model. Each group received the corresponding drugs or normal saline intragastrically starting from day 5, once a day, for 4 consecutive weeks. After the last medication, serum levels of estradiol (E<sub>2</sub>), NETs, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>], receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL), and osteocalcin (BGP) were measured. The histopathological changes in bone tissue were observed. The expressions of vitamin D receptor (VDR), myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE) and citrullinated histone H3 (CitH3) in bone tissue were detected; the protein expressions of 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase (CYP27B1) and 1α, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase (CYP24A1) were also determined. **RESULTS** Compared with the normal group, the bone tissue of rats in the model group showed a significant reduction in the number of trabeculae, which was thinner broken and poorly connected, with significant destruction of the reticular structure, and an enlarged marrow cavity. Serum levels of NETs and RANKL, the protein expressions of MPO, NE, CitH3 and CYP24A1 in bone tissue were significantly increased or upregulated, while serum levels of E<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> and BGP as well as protein expressions of VDR and CYP27B1 were significantly decreased or downregulated ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the histopathological changes in the bone tissue of rats in each administration group showed some degree of recovery, with significant improvements observed in most quantitative indicators ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Danggui buxue decoction can restore the

E<sub>2</sub> level in POF complicated with OP rats, and improve OP. The mechanism may be related to its ability to upregulate VD level and inhibit the formation of NETs.

**KEYWORDS** Danggui buxue decoction; premature ovarian failure; osteoporosis; neutrophil extracellular traps; vitamin D

<sup>△</sup>基金项目 国家自然科学基金项目(No.82260890);贵州省教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目(No.黔教技[2022]023号)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中医证候物质基础。E-mail:1065183702@qq.com

<sup>#</sup>通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中医证候物质基础。E-mail:chenyunzhi270@gzy.edu.cn

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种因骨形成与骨吸收失衡而导致的代谢性疾病,表现为骨量减少和骨微结构受损,可使患者骨折风险增加<sup>[1]</sup>。卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指女性在40岁前卵巢功能异常衰退,主要特征是雌激素水平显著降低而促性腺激素水平异常升高,表现为闭经、不孕等症状,严重影响女性生育和整体健康<sup>[2]</sup>。研究指出,卵巢功能衰退引起的雌激素水平显著下降会导致骨形成与骨吸收平衡失调,加速骨质受损和骨量流失,促进OP的发生发展<sup>[3]</sup>;此外,炎症反应也是OP的重要致病因素之一,可通过影响骨骼系统来干扰成骨细胞和破骨细胞之间的平衡,从而导致骨量流失<sup>[4]</sup>。中性粒细胞在炎症反应中会释放一种特殊的网状结构,即中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),其由DNA、组蛋白、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等成分构成,能够捕获并消灭病原微生物,是先天性免疫系统的重要胞外防御屏障<sup>[5]</sup>。然而,若NETs过度活化或长期存在则可能会对机体产生负面影响,上述过程伴随大量炎症介质的释放,可激活破骨细胞、增加骨吸收,从而破坏骨代谢平衡,导致骨量流失<sup>[4,6]</sup>。维生素D(vitamin D, VD)作为关键的免疫调节因子,不仅可通过促进钙、磷吸收来维持骨骼健康,而且能通过降低MPO、NE、瓜氨酸化组蛋白H3(citrullinated histone H3, CitH3)水平来抑制NETs生成,在多种炎症性疾病的治疗中具有重要作用<sup>[7-8]</sup>。

当归补血汤源于李东垣的《内外伤辨惑论》,由当归、黄芪组方而成,具有补气生血之效。本课题组前期研究发现,当归补血汤能有效降低POF大鼠血清促卵泡激素和促黄体生成素水平,提升血清雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)和抗米勒管激素水平;同时,该方还可恢复OP大鼠骨小梁结构,并通过抑制VD限速酶1 $\alpha$ ,25-二羟维生素D<sub>3</sub>-24-羟化酶(又称CYP24A1)的表达、维持体内VD水平来降低骨钙蛋白(osteocalcin, 又称BGP)的表达,从而改善POF和OP<sup>[9-10]</sup>。基于此,本研究通过建立POF并发OP大鼠模型,拟从VD调控NETs的角度出发,探讨当归补血汤改善POF大鼠OP的作用机制,以期为当归补血汤的临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX53型正置显微镜(日本Olympus公司)、Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司)、ChemiDoc型化学发光凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)、RM 2016型转轮式切片机(德国Leica公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

当归、黄芪饮片(产地均为甘肃,批号分别为20230301、20231101)均购自北京同仁堂贵阳药店有限公司,由贵州中医药大学基础医学院方剂学教研室蒋志

滨副教授鉴定均为真品。

骨化三醇软胶囊(批号2110051,规格0.25  $\mu$ g)购自青岛正大制药有限公司;顺铂对照品(批号HY-17394,纯度99.70%)购自美国MCE公司;免疫组化显色试剂盒(批号K5007)购自美国Agilent公司;E<sub>2</sub>、核因子 $\kappa$ B受体激活蛋白配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)、NETs、25-羟维生素D<sub>3</sub>[25(OH)D<sub>3</sub>]、BGP酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为JM-01981R1、JM-01911R1、JM-10980R1、JM-01918R1、JM-02028R1)均购自江苏晶美生物科技有限公司;鼠抗维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)抗体、兔抗MPO抗体、兔抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(批号分别为67192-1-Ig、22225-1-AP、20536-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗25-羟基维生素D-1 $\alpha$ -羟化酶(又称CYP27B1)抗体、兔抗CYP24A1抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为A1716、A1805、AS014)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔抗NE抗体(批号AF0010)购自美国Affinity公司;兔抗CitH3抗体(批号NB100-57135)购自美国Novus Biologicals公司;HRP标记的羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号BS12478)购自美国Bioworld Technology公司。

### 1.3 实验动物

SPF级雌性SD大鼠54只,体重190~210 g,8~9周龄,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010]。大鼠均饲养于温度、湿度适宜的动物房内,自由摄食、饮水。本实验已获得贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(伦理号20230100)。

## 2 方法

### 2.1 药液的配制

根据《内外伤辨惑论》原文记载的组方药材用量“黄芪一两,当归二钱”(即两者质量比5:1)称取黄芪60 g、当归12 g,混合,以水浸泡1 h后,煎煮30 min $\times$ 2次;合并煎煮液,浓缩,得质量浓度为0.72 g/mL(以生药量计)的当归补血汤药液。取骨化三醇胶囊内容物,以橄榄油为溶剂,制得质量浓度为0.025  $\mu$ g/mL的骨化三醇药液,备用。取顺铂对照品适量,以生理盐水为溶剂,制得质量浓度为1 mg/mL的顺铂溶液,备用。

### 2.2 分组、造模与给药

将所有大鼠适应性喂养7 d后随机分为正常组、模型组、骨化三醇组(0.1  $\mu$ g/kg)及当归补血汤低、中、高剂量组(1.8、3.6、7.2 g/kg,以生药量计,剂量参考本课题组前期研究设置<sup>[11]</sup>),每组9只。除正常组外,其余各组大鼠均参考相关文献<sup>[12]</sup>的方法于第1、8天以6 mg/kg的剂量腹腔注射顺铂溶液以建立POF并发OP模型。从造模(顺铂首次注射时,下同)第5天开始,给予骨化三醇组及当归补血汤各剂量组大鼠灌胃相应药液,正常组及模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续4周。

## 2.3 大鼠动情周期变化观察

自造模第1天起,每组随机选取3只大鼠进行标记,于每天上午9点进行阴道脱落细胞涂片检查,观察大鼠在整个造模期间的动情周期变化:抓取大鼠,暴露阴道,轻柔地将经生理盐水浸润的无菌棉签插入其阴道,旋转2~3圈以刮取阴道分泌物;将分泌物均匀涂抹在载玻片上,用0.1%亚甲基蓝染色液染色,随后使用显微镜观察并拍照。根据观察到的细胞类型和数量,判断大鼠所处的动情阶段——若存在有核上皮细胞且偶见无核角化细胞,记为动情前期;若主要为无核角化细胞,记为动情期;若同时可见白细胞、无核角化细胞、有核上皮细胞,记为动情后期;若为大量白细胞伴少量角化细胞,记为动情间期<sup>[13]</sup>。如果大鼠在整个观察期内持续处于某一时期,则判断其动情周期出现了紊乱,提示POF模型建立成功。

## 2.4 标本采集与处理

末次给药后,所有大鼠禁食、不禁水24 h,腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,从腹主动脉采集血样,静置2 h后以3 000 r/min离心15 min,得到上层血清,分装后于-80℃下保存,备用。采血后,以颈椎脱臼法将大鼠处死,迅速收集其两侧股骨并剥离软组织。将左侧股骨组织放入4%多聚甲醛溶液中固定保存,右侧股骨组织则于-80℃下保存,备用。

## 2.5 大鼠血清E<sub>2</sub>、NETs、25(OH)D<sub>3</sub>、RANKL、BGP水平检测

取“2.4”项下冻存的各组大鼠(每组随机选取6只)的血清样品,严格按照相应试剂盒说明书操作,采用ELISA法以酶标仪检测其血清E<sub>2</sub>、NETs、25(OH)D<sub>3</sub>、RANKL、BGP水平。

## 2.6 大鼠骨组织病理变化观察

取“2.4”项下经4%多聚甲醛溶液固定的各组大鼠(每组随机选取3只)股骨组织样本,放入15%乙二胺四乙酸脱钙液中进行脱钙处理;确保骨质软化后,进行梯度乙醇脱水、常规石蜡包埋后切片;取切片,依次进行苏木精、伊红染色,再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,以中性树胶封片,使用显微镜观察其骨组织病理变化。

## 2.7 大鼠骨组织中VDR、MPO、NE、CitH3蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.6”项下各组大鼠的骨组织切片,经梯度乙醇脱水后,滴加0.01 mmol/L Tris-乙二胺四乙酸修复液(pH9.0),孵育15 min;以磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后,滴加3%过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶,于室温下静置15 min;以PBS再次漂洗后,加入山羊血清于37℃下孵育30 min;滴加VDR、MPO、NE、CitH3一抗(稀释比例均为1:100),在4℃下孵育过夜;以PBS漂洗后,滴加适量二抗(即免疫组化显色试剂中的A液),室温孵育30 min;以PBS漂洗后,滴加DAB显色液显色,再以苏木精复染10 s,用梯度乙醇脱水、二甲

苯透明后,以中性树胶封片,使用显微镜观察并采集图像。采用Image-Pro Plus 6.0软件对上述蛋白阳性表达区域(呈黄褐色或棕黄色)进行光密度分析,用以反映其表达水平。

## 2.8 大鼠骨组织中VDR、CYP27B1、CYP24A1、MPO、NE蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下冻存的各组大鼠(每组随机选取3只)股骨组织样本,研磨,置于含有组织蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂的1.5 mL微量离心管中,匀浆,在冰上裂解30 min,再以14 000 r/min离心15 min,收集上清液,并使用BCA法测定蛋白浓度。向蛋白样品中加入5×loading buffer适量,在95℃下加热15 min使蛋白变性。取适量变性蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转膜,用5%牛血清白蛋白溶液封闭1 h;弃去封闭液,加入VDR、CYP27B1、CYP24A1、MPO、NE、 $\beta$ -actin一抗(稀释比例分别为1:5 000、1:2 000、1:1 000、1:5 000、1:2 000、1:5 000),在4℃下孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜后,加入相应二抗[稀释比例分别为1:2 000(羊抗兔)、1:5 000(羊抗鼠)],在室温下孵育1 h;以TBST缓冲液洗膜后,使用化学发光试剂进行显影,并置于化学发光凝胶成像仪下成像。使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平,结果以正常组为参照进行归一化处理。

## 2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.2软件对数据进行统计分析。对于符合正态分布的数据,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(方差齐)或Welch方差分析(方差不齐),进一步两两比较采用Tukey's事后检验(方差齐)或Tamhane's T2事后检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

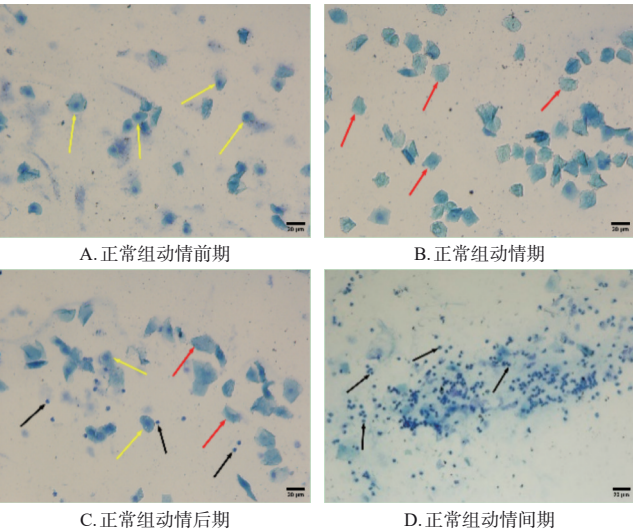
## 3 结果

### 3.1 大鼠动情周期变化

正常组大鼠动情前期、动情期、动情后期、动情间期循环可见,动情周期正常(图1)。与正常组比较,其余各组大鼠动情周期紊乱,多数处于动情前期,甚至未见完整的动情周期,表明大鼠卵巢受损,其功能受到抑制,提示POF模型复制成功。

### 3.2 当归补血汤对模型大鼠血清E<sub>2</sub>、NETs、25(OH)D<sub>3</sub>、RANKL、BGP水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清NETs、RANKL水平均显著升高,而E<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub>、BGP水平均显著降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,骨化三醇组、当归补血汤各剂量组大鼠血清NETs水平以及骨化三醇组、当归补血汤高剂量组大鼠血清RANKL水平均显著降低,骨化三醇组、当归补血汤各剂量组大鼠血清E<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub>、BGP水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表1。



黄色箭头:有核上皮细胞;红色箭头:无核角化细胞;黑色箭头:白细胞。

图1 大鼠不同动情周期阴道脱落细胞(亚甲基蓝染色,标尺:20  $\mu\text{m}$ )

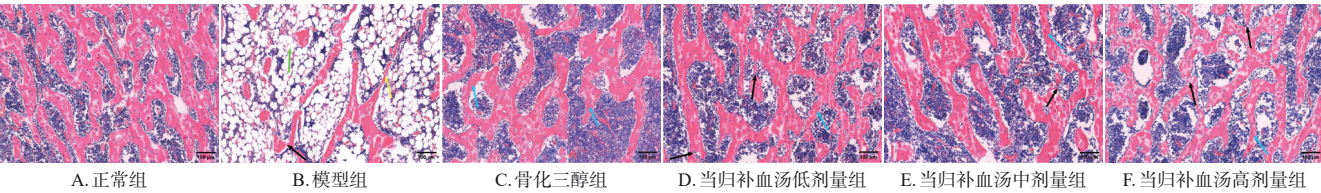
表1 各组大鼠血清  $\text{E}_2$ 、NETs、25(OH)  $\text{D}_3$ 、RANKL、BGP水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别        | $\text{E}_2$ /(pmol/L)         | NETs/(ng/mL)                    | 25(OH) $\text{D}_3$ /(ng/mL)  | RANKL/(pg/mL)                 | BGP/(ng/mL)                  |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 正常组       | 74.60 $\pm$ 6.77               | 117.69 $\pm$ 16.23              | 53.31 $\pm$ 4.65              | 18.41 $\pm$ 4.48              | 8.38 $\pm$ 0.76              |
| 模型组       | 55.95 $\pm$ 5.71 <sup>a</sup>  | 310.69 $\pm$ 31.63 <sup>a</sup> | 21.68 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup> | 43.56 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup> | 3.40 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup> |
| 骨化三醇组     | 72.02 $\pm$ 9.33 <sup>b</sup>  | 177.11 $\pm$ 25.52 <sup>b</sup> | 43.54 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup> | 24.83 $\pm$ 5.23 <sup>b</sup> | 7.16 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤低剂量组 | 83.82 $\pm$ 8.67 <sup>b</sup>  | 259.88 $\pm$ 24.49 <sup>b</sup> | 28.58 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup> | 39.04 $\pm$ 3.19              | 4.90 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤中剂量组 | 86.27 $\pm$ 7.62 <sup>b</sup>  | 243.25 $\pm$ 27.30 <sup>b</sup> | 30.78 $\pm$ 3.29 <sup>b</sup> | 37.64 $\pm$ 4.35              | 5.24 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤高剂量组 | 95.30 $\pm$ 12.59 <sup>b</sup> | 198.23 $\pm$ 30.24 <sup>b</sup> | 35.71 $\pm$ 3.85 <sup>b</sup> | 32.33 $\pm$ 3.57 <sup>b</sup> | 6.09 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup> |

a:与正常组相比, $P<0.05$ ;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

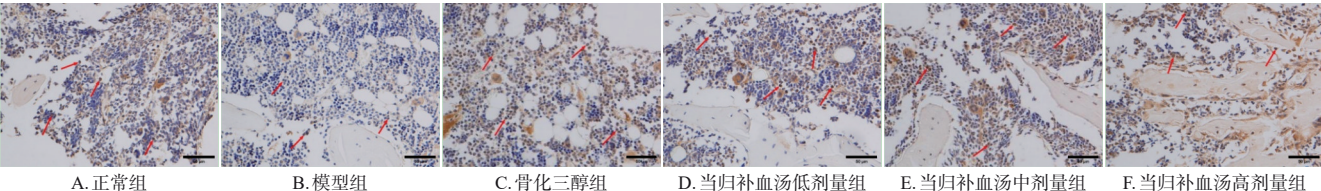
3.3 当归补血汤对模型大鼠骨组织病理特征的影响

正常组大鼠骨组织结构清晰,骨小梁排列紧密,骨干部位骨组织完整、连续,骨髓腔内可见丰富的骨髓细胞。相比之下,模型组大鼠骨组织内可见骨小梁数量减少、变细、断裂且连接不完整;网状结构明显受损,骨髓腔增大且融合明显,并伴有脂肪细胞增多。与模型组相比,骨化三醇组和当归补血汤各剂量组大鼠骨组织的上述病理改变均有不同程度恢复。结果见图2。



绿色箭头:脂肪细胞增多;黄色箭头:骨小梁变细;黑色箭头:骨小梁断裂;蓝色箭头:骨小梁稀疏变薄。

图2 各组大鼠骨组织病理改变的显微图(苏木精-伊红染色,标尺:100  $\mu\text{m}$ )



红色箭头:阳性表达细胞。

图3 当归补血汤对大鼠骨组织VDR蛋白表达的影响(免疫组化染色,标尺:50  $\mu\text{m}$ )

3.4 当归补血汤对模型大鼠骨组织中VDR、MPO、NE、CitH3蛋白阳性表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠骨组织中VDR蛋白阳性表达显著减少,MPO、NE、CitH3蛋白阳性表达显著增加( $P<0.05$ )。与模型组相比,骨化三醇组、当归补血汤各剂量组大鼠骨组织中VDR蛋白阳性表达均显著增加,MPO、NE、CitH3蛋白阳性表达均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图3(以VDR蛋白为例)、表2。

表2 各组大鼠骨组织VDR、MPO、NE、CitH3蛋白阳性表达比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别        | VDR                          | MPO                          | NE                           | CitH3                        |
|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常组       | 0.51 $\pm$ 0.03              | 0.31 $\pm$ 0.03              | 0.30 $\pm$ 0.01              | 0.16 $\pm$ 0.03              |
| 模型组       | 0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 0.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 0.38 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> | 0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> |
| 骨化三醇组     | 0.46 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.39 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤低剂量组 | 0.45 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.39 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.29 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤中剂量组 | 0.46 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.40 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.28 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.17 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤高剂量组 | 0.44 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.41 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 0.27 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |

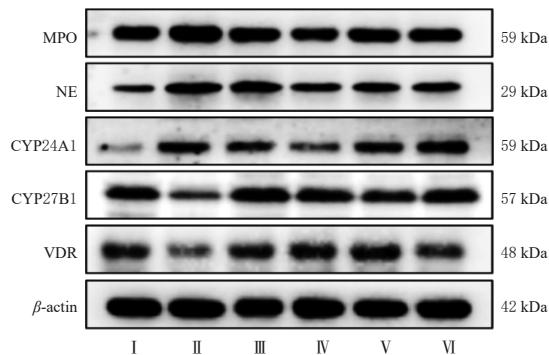
a:与正常组相比, $P<0.05$ ;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

3.5 当归补血汤对模型大鼠骨组织中VDR、CYP27B1、CYP24A1、MPO、NE蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠骨组织中VDR、CYP27B1蛋白的表达均显著下调,而CYP24A1、MPO、NE蛋白的表达则显著上调( $P<0.05$ );与模型组比较,骨化三醇组、当归补血汤各剂量组大鼠骨组织中VDR、CYP27B1蛋白的表达均显著上调,而CYP24A1、MPO、NE蛋白的表达均显著下调( $P<0.05$ )。结果见图4、表3。

4 讨论

破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成是骨代谢的基本过程,正常状态下两者保持着动态平衡的状态。POF具有低雌激素水平的特征,雌激素水平异常降低可促使骨细胞凋亡,凋亡的骨细胞可引起RANKL表达上调,从而使破骨细胞活性有所增强,而成骨细胞功能受到抑制,导致骨吸收大于骨形成,最终引发骨量流失<sup>[14-15]</sup>。BGP由成骨细胞合成后释放入血,其水平高低反映了成骨细胞的活动状态与骨更新的速



I: 正常组; II: 模型组; III: 骨化三醇组; IV: 当归补血汤低剂量组; V: 当归补血汤中剂量组; VI: 当归补血汤高剂量组。

图4 各组大鼠骨组织中VDR、CYP27B1、CYP24A1、MPO、NE蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠骨组织中VDR、CYP27B1、CYP24A1、MPO、NE蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别        | VDR/ $\beta$ -actin          | CYP27B1/ $\beta$ -actin      | CYP24A1/ $\beta$ -actin      | MPO/ $\beta$ -actin          | NE/ $\beta$ -actin           |
|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常组       | I                            | I                            | I                            | I                            | I                            |
| 模型组       | 0.52 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> | 0.50 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> | 1.87 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup> | 2.14 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup> | 1.66 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> |
| 骨化三醇组     | 1.16 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup> | 1.13 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> | 0.89 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup> | 1.39 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup> | 1.21 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤低剂量组 | 1.09 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> | 0.94 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> | 0.78 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup> | 1.32 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup> | 1.03 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤中剂量组 | 1.07 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> | 0.91 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup> | 1.17 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 1.33 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup> | 0.94 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup> |
| 当归补血汤高剂量组 | 0.91 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup> | 0.97 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup> | 1.08 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> | 1.09 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup> | 0.96 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> |

a: 与正常组相比,  $P<0.05$ ; b: 与模型组相比,  $P<0.05$ 。

率<sup>[16]</sup>。研究表明,当归补血汤能有效调节体内骨代谢平衡,修复骨小梁破碎情况,对OP具有显著的改善作用<sup>[17]</sup>。本研究通过观察大鼠骨组织切片发现,与正常组相比,模型组大鼠骨小梁数量减少,甚至变细、断裂,网状结构明显受损,骨髓腔增大且融合明显,符合OP的经典病理表现;用骨化三醇及当归补血汤干预后,大鼠骨组织中骨小梁数量增多、结构完整,网状结构明显恢复,表明骨化三醇和当归补血汤对OP均有改善作用。此外,低、中、高剂量当归补血汤均能显著升高模型组大鼠血清E<sub>2</sub>和BGP水平,并且高剂量当归补血汤能显著降低血清RANKL水平,提示其对OP的改善作用可能是通过恢复雌激素水平,调节RANKL介导的成骨细胞和破骨细胞分化,加速骨形成而实现的。然而,低、中剂量当归补血汤对RANKL水平的影响并无统计学意义,故其量效关系尚有待进一步探索。

炎症是引起OP的重要因素之一,与骨生成和骨吸收失衡密切相关<sup>[5]</sup>。NETs是中性粒细胞受到炎症刺激时所释放的网状结构,依赖肽酰基精氨酸脱亚氨酶4(peptidylarginine deiminase 4, PAD4)活化及组蛋白H3瓜氨酸化形成<sup>[18]</sup>。其中,组蛋白H3瓜氨酸化的产物CitH3是NETs的标志物之一,可参与调节炎症的发生及严重程度<sup>[18]</sup>。研究指出,NETs可显著抑制RANKL介导的破骨细胞分化,从而参与骨稳态的调节<sup>[19]</sup>;而使用PAD4抑制剂则可显著减少NETs的形成,进而减弱RANKL诱导的破骨细胞生成和骨侵蚀<sup>[20]</sup>。研究表明,NETs的主要成分MPO可通过调节活性氧水平来抑制破

骨细胞分化和骨吸收,而敲除MPO编码基因则可导致小鼠OP表型增加、骨吸收增强<sup>[21]</sup>;NE可通过降解骨保护素来促进由VD<sub>3</sub>诱导的破骨细胞分化,参与炎症部位破骨细胞的生成和骨吸收<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠血清NETs水平及骨组织中CitH3、MPO、NE蛋白的表达水平均显著高于正常组;经当归补血汤干预后,上述指标的表达受到显著抑制,提示当归补血汤均能够减少NETs形成,这可能是该方改善OP的潜在机制。

VD是一种脂溶性类固醇激素,有VD<sub>2</sub>和VD<sub>3</sub>两种主要形式。人体所需的VD<sub>3</sub>主要借助紫外线照射在皮肤内合成,在体内经25-羟化酶羟化为25(OH)D<sub>3</sub>,后经CYP27B1作用合成为活性形式的1,25-二羟维生素D<sub>3</sub>,后者通过结合靶器官中的VDR来发挥生物学效应<sup>[23]</sup>。血清25(OH)D<sub>3</sub>水平是评价体内VD水平的主要指标,已被证实其可促进钙盐沉积、骨小梁再生,其水平降低可导致骨质中硫酸盐、碳酸盐沉积减少,从而诱发骨量流失<sup>[24]</sup>。研究指出,OP患者普遍处于低25(OH)D<sub>3</sub>状态,补充25(OH)D<sub>3</sub>能够有效提升骨密度,具有良好的临床应用效果<sup>[25]</sup>。CYP24A1编码基因是对1,25-二羟维生素D<sub>3</sub>转录反应最强的基因,参与1,25-二羟维生素D<sub>3</sub>的代谢失活,从而维持1,25-二羟维生素D<sub>3</sub>的生理水平<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠血清25(OH)D<sub>3</sub>水平及骨组织中VDR、CYP27B1蛋白表达水平显著降低,CYP24A1蛋白表达水平显著上升;经当归补血汤干预后,大鼠血清25(OH)D<sub>3</sub>水平及骨组织中VDR、CYP27B1蛋白表达水平均显著升高,而CYP24A1蛋白表达水平显著降低,表明该方具有调控VD表达的作用。

综上所述,当归补血汤能够恢复POF并发OP大鼠的E<sub>2</sub>水平,改善OP,其机制可能与上调VD水平、抑制NETs形成有关。

### 参考文献

- [1] YOU R X, LIU J Y, KE L, et al. Cost-effectiveness of sequential denosumab/zoledronic acid compared with zoledronic acid monotherapy for postmenopausal osteoporotic women in China[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 816248.
- [2] HAN S Y, LI H X, LU R, et al. Effect and mechanism of pearl on ovarian function of rats with premature ovarian failure induced by *Tripterygium* glycosides[J]. J Tradit Complement Med, 2023, 13(4): 368-378.
- [3] CHENG C H, CHEN L R, CHEN K H. Osteoporosis due to hormone imbalance: an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1376.
- [4] LI X, XIAO S H, FILIPCZAK N, et al. Role and therapeutic targeting strategies of neutrophil extracellular traps in inflammation[J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 5265-5287.
- [5] KIM T S, SILVA L M, THEOFILOU V I, et al. Neutrophil extracellular traps and extracellular histones potentiate IL-17 inflammation in periodontitis[J]. J Exp Med, 2023, 220

(9):e20221751.

- [6] IANTOMASI T, ROMAGNOLI C, PALMINI G, et al. Oxidative stress and inflammation in osteoporosis: molecular mechanisms involved and the relationship with microRNAs[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3772.
- [7] 李月兴, 陈波洋, 李倩, 等. 飞龙掌血对胶原诱发关节炎大鼠心血管损害的干预作用及机制[J]. 中国药房, 2023, 34(24): 2987-2994.
- LI Y X, CHEN B Y, LI Q, et al. Intervention effects and mechanism of *Toddalia asiatica* on cardiovascular damage in rats with collagen-induced arthritis[J]. China Pharm, 2023, 34(24): 2987-2994.
- [8] 董右青, 朱星, 沈俊希, 等. 补肺汤对COPD大鼠模型中性粒细胞胞外诱捕网及维生素D的影响[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(4): 47-53.
- DONG Y Q, ZHU X, SHEN J X, et al. Effects of Bufei decoction on extracellular neutrophil traps and vitamin D in COPD rats[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(4): 47-53.
- [9] LIU H Q, YANG H, QIN Z, et al. Exploration of the Danggui buxue decoction mechanism regulating the balance of ESR and AR in the TP53-AKT signaling pathway in the prevention and treatment of POF[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 4862164.
- [10] 张孟之, 柴艺汇, 管连城, 等. 当归补血汤对维甲酸致大鼠骨质疏松模型CYP24A1和骨钙素表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 10-14.
- ZHANG M Z, CHAI Y H, GUAN L C, et al. Effect of Danggui buxue decoction on the expression of CYP24A1 and osteocalcin in rat osteoporosis model induced by retinoic acid[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(1): 10-14.
- [11] 张孟之, 管连城, 秦忠, 等. 当归补血汤对维甲酸致骨质疏松模型大鼠卵巢CYP24A1和ER $\alpha$ 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 502-507.
- ZHANG M Z, GUAN L C, QIN Z, et al. Effect of Danggui buxue decoction on the expression of CYP24A1 and ER $\alpha$  in ovaries of osteoporosis rats induced by retinoic acid[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(5): 502-507.
- [12] 巴鑫, 陈哲, 黄谣, 等. 归肾丸对卵巢早衰大鼠骨密度及骨微结构的影响及其机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(3): 390-396.
- BA X, CHEN Z, HUANG Y, et al. The mechanism and effect of Guishen pill on bone mineral density and microstructure of bone tissue in rats with premature ovarian failure[J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(3): 390-396.
- [13] 范雅祺, 郑燕鹏, 周子婷, 等. 雷公藤建立卵巢早衰大鼠模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 355-364.
- FAN Y Q, ZHENG Y P, ZHOU Z T, et al. Establishment of a rat model of premature ovarian failure induced by *Tripterygium wilfordii*[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(3): 355-364.
- [14] PENG X L, WANG T H, WANG Q, et al. Pan-histone deacetylase inhibitor vorinostat suppresses osteoclastic bone resorption through modulation of RANKL-evoked signaling and ameliorates ovariectomy-induced bone loss[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 160.
- [15] YANG S L, ZHANG X C, LIAO X F, et al. Icaritin regulates RANKL-induced osteoclast differentiation via the ER $\alpha$ /c-Src/RANK signaling[J]. Biomed Mater, 2024, 19(2): 025049.
- [16] YANG Y M, TSENG W J, WANG B. Abaloparatide maintains normal rat blood calcium level in part via 1, 25-dihydroxyvitamin D/osteocalcin signaling pathway[J]. Endocrinology, 2023, 164(9): bqad117.
- [17] ZHOU L P, WONG K Y, YEUNG H T, et al. Bone protective effects of Danggui buxue tang alone and in combination with tamoxifen or raloxifene *in vivo* and *in vitro*[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 779.
- [18] THIAM H R, WONG S L, WAGNER D D, et al. Cellular mechanisms of NETosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2020, 36: 191-218.
- [19] NUMAZAKI K, TADA H, NISHIOKA T, et al. Neutrophil extracellular traps inhibit osteoclastogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 705: 149743.
- [20] SCHNEIDER A H, TAIRA T M, PÚBLIO G A, et al. Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(3): 429-446.
- [21] ZHAO X L, LIN S, LI H Y, et al. Myeloperoxidase controls bone turnover by suppressing osteoclast differentiation through modulating reactive oxygen species level[J]. J Bone Miner Res, 2021, 36(3): 591-603.
- [22] SUGISAKI R, MIYAMOTO Y, YOSHIMURA K, et al. Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin[J]. Bone, 2020, 132: 115216.
- [23] DELRUE C, SPEECKAERT M M. Vitamin D and vitamin D-binding protein in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4642.
- [24] THOMAS R L, JIANG L J, ADAMS J S, et al. Vitamin D metabolites and the gut microbiome in older men[J]. Nat Commun, 2020, 11: 5997.
- [25] WANG D M, YANG Y M. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D levels and osteoporosis in postmenopausal women[J]. Clinical interventions in aging, 2023, 18: 619-627.
- [26] MADY L J, ZHONG Y, DHAWAN P, et al. Role of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) in the regulation of the biological function of 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$ [J]. Cells, 2023, 12(10): 1407.

(收稿日期: 2024-07-29 修回日期: 2024-11-15)

(编辑: 张元媛)