

·实验研究·

本文引用:王桂云,吴结枝,雷晓明,李荣慧,曹宝丹,刘慧萍,张国民. 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠 MAPK 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 205-210.

## 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠 MAPK 信号通路的影响

王桂云,吴结枝,雷晓明,李荣慧,曹宝丹,刘慧萍,张国民\*

(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**〔摘要〕** **目的** 观察壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠骨组织 MAPK 信号通路的影响,探讨其治疗绝经后骨质疏松的机制。**方法** 将 36 只 SPF 级 SD 雌性大鼠随机分为 6 组,每组 6 只。随机选定 2 组为空白组和假手术组,其余大鼠均进行切除卵巢造模处理,即采用国内外公认的去卵巢大鼠双侧卵巢方法建立绝经后骨质疏松病理模型,将造模成功的 24 只大鼠依次分为模型组、壮骨止痛胶囊组、雷帕霉素(rapamycin, RAPA)组和 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)组。术后第 6 天开始灌胃给药,连续 3 个月。末次灌胃给药后第 2 天开始取材。HE 染色观察骨组织病理形态;ELISA 检测血清雌二醇(estradiol, E2)的含量;免疫组化法分析股骨 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白的表达。**结果** (1)空白组和假手术组骨髓腔无明显变化,模型组大鼠骨髓腔明显扩大,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组大鼠骨髓腔扩大不明显。(2)空白组和假手术组的血清 E2 含量差异无统计学意义( $P>0.05$ );与假手术组相比,模型组血清 E2 值降低,且有显著性差异( $P<0.01$ );与模型组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组血清 E2 值升高、3-MA 组血清 E2 值降低,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ );与 3-MA 组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组大鼠 E2 值升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。(3)空白组和假手术组骨组织 ERK1/2、P38MAPK 及其磷酸化蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ );与假手术组相比,模型组骨组织的 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达升高( $P<0.01$ ),3-MA 组 ERK1/2、P38 MAPK 蛋白表达降低( $P<0.01$ ),差异均具有统计学意义;与 3-MA 组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组的 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),且壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组股骨组织 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 壮骨止痛胶囊能升高血清中 E2 的表达,可能通过上调去势大鼠骨组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白表达来调控 MAPK 信号通路。

**〔关键词〕** 绝经后骨质疏松症;壮骨止痛胶囊;MAPK 信号通路;雌二醇

**〔中图分类号〕**R285.5

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.02.009

### Effect of Zhuanggu Zhitong Capsule on MAPK Signal Pathway in Ovariectomized Rats

WANG Guiyun, WU Jiezi, LEI Xiaoming, LI Ronghui, CAO Baodan, LIU Huiping, ZHANG Guomin\*

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To observe the effect of Zhuanggu Zhitong Capsule on MAPK signaling pathway in bone tissue of ovariectomized rats, and to explore the mechanism in treating postmenopausal osteoporosis. **Methods** 36 SPF female SD rats were randomly divided into 6 groups, with 6 rats in each group. Two groups were randomly selected as the blank group and the sham operation group, the other rats were ovariectomized to establish the pathological model of postmenopausal osteoporosis by removing bilateral ovaries of female rats, 24 rats with successful model were randomly divided into the model group, the Zhuanggu Zhitong Capsule group, the rapamycin (RAPA) group and the 3-methyladenine (3-MA) group. The drug was administered 6 days after operation for 3 months. The samples were taken from the second day after the last intragastric administration. The pathological morphology of bone tissue was observed by HE staining; the content of serum estradiol (E2) was detected by ELISA; the expressions of ERK1/2,

**〔收稿日期〕**2020-09-04

**〔基金项目〕**国家自然科学基金面上项目(81973920);湖南省自然科学基金面上项目(2018JJ2297);湖南省教育厅科学研究重点项目(2019A370);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2017281,2018420)。

**〔作者简介〕**王桂云,女,在读硕士研究生,研究方向:中医老年病。

**〔通讯作者〕**\*张国民,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:834095773@qq.com。

p-ERK1/2, p38 MAPK and P-P38 MAPK were analyzed by immunohistochemistry. **Results** (1) There was no significant change in the bone marrow cavity of the blank group and the sham operation group. The bone marrow cavity of the model group was significantly enlarged, while that of the Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group was not. (2) Compared with the blank group, the level of serum E2 in the sham operation group was not statistically significant ( $P>0.05$ ). Compared with the sham operation group, the level of serum E2 in the model group was significantly lower, and there was a significant difference ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the serum E2 value of Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group increased, and the serum E2 value of the 3-MA group decreased, with significant differences ( $P<0.01$ ). Compared with the 3-MA group, the E2 value in the Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group increased, there were significant differences ( $P<0.01$ ). (3) There were no significant difference in the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and phosphorylated protein of bone tissue between the sham operation group and the blank group ( $P>0.05$ ). Compared with the sham operation group, the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and their phosphorylated protein of bone tissue in the model group were significantly lower, and the differences were statistically significant ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and their phosphorylated proteins in the Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group were significantly higher, and the difference were statistically significant ( $P<0.01$ ), and the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and their phosphorylated proteins in 3-MA group were significantly lower, and the difference were statistically significant ( $P<0.01$ ). Compared with the 3-MA group, the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and their phosphorylated proteins in the Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group were significantly higher, and the difference were statistically significant ( $P<0.01$ ), there were no significant difference in the expressions of ERK1/2, p38 MAPK and phosphorylated protein between the Zhuanggu Zhitong Capsule group and the RAPA group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Zhuanggu Zhitong Capsule can increase the expression of E2 in serum, and regulate MAPK signaling pathway by up regulating the protein expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK and P-P38 MAPK in bone tissue of ovariectomized rats.

[**Keywords**] postmenopausal osteoporosis; Zhuanggu Zhitong Capsule; MAPK signaling pathway; estradiol

骨组织是一种更新的组织,由有机基质的矿化持续形成。成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收有助于骨重塑平衡<sup>[1-2]</sup>。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是由于雌激素缺乏引起的一种退行性疾病。根据 2004 年美国卫生局报告,估计 50 岁以上的女性有 50% 的患脆性骨折的风险<sup>[3]</sup>。PMOP 是一种常见的与年龄相关的退行性疾病,由于雌激素缺乏,从而影响绝经后妇女。根据 2004 年美国卫生局局长的报告,估计 50 岁以上的女性有 50% 的患脆性骨折的风险<sup>[3]</sup>。PMOP 引起的与骨折相关的发病率和死亡率,给社会带来了巨大的经济负担。长期的临床应用证实壮骨止痛胶囊<sup>[4]</sup>可以维持骨代谢平衡,增加骨密度,减少骨折发生率和死亡率。近年研究<sup>[5-6]</sup>表明激活 MAPK 信号通路相关蛋白可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化来防治 PMOP。有实验表明<sup>[7-8]</sup>,细胞自噬在骨髓间充质干细胞的成脂分化过程中起到关键作用,但尚未有明确结论。本实验采用的 RAPA 是一种与自噬相关且在进化上相对保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与壮骨止痛胶囊作为阳性对照组。3-MA 则是一种自噬抑制剂,与壮骨止痛胶囊作为阴性对照组。因此,该通路的激活可能是壮骨止痛胶囊通过细胞自噬治疗 PMOP 的方式之一。本实验通过研究壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠骨组织 ERK1/2、p38 MAPK 及

其磷酸化蛋白表达的影响,进一步探索其基于 MAPK 信号通路治疗 PMOP 的作用机制。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 36 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量 180~240 g,6~8 周龄,于湖南中医药大学动物实验中心饲养。造模前先适应性饲养 7 d。实验单位许可证号:SYXK(湘)2013-005,动物批号:SCXK(湘)2016-0002,动物分笼饲养。环境温度为(22±4)℃,湿度为 50%±10%,大鼠自由进食进水,饲料为标准普通饲料(湖南中医药大学动物实验中心提供),保持环境安静,实验过程中对动物的处置符合实验动物管理和使用委员会的要求。

### 1.2 主要仪器

Ni-U 研究型正置显微镜(尼康株式会社);YJ-840 型超净工作台(苏州苏信环境科技有限公司);MIAS 医学图像分析系统(中国北航公司);DCW-3510 恒温水浴锅(宁波新芝生物科技股份有限公司);325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司)。

### 1.3 药品与试剂

壮骨止痛胶囊(批号 181006,四川美大康华康药业有限公司);雷帕霉素(批号 38921, rapamycin,

RAPA)、3-甲基腺嘌呤(批号402143, methyladenine, 3-MA)均购自美国 Med Chem Express 公司;PBS缓冲液(批号 AD24464280, 美国 Hyclone 公司);注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司);DAB 显色试剂盒(批号K196721D, 北京中杉金桥生物技术有限公司);雌二醇试剂盒(批号 bs-0925G), ERK1/2(批号 bs-2637R)、p-ERK1/2(批号 bs-3016R)、p38 MAPK(批号 bs-0637R)及 p-p38 MAPK(批号 bs-5477R)均购自北京博奥森生物技术有限公司。

## 2 方法

### 2.1 分组造模

按照数字表法将 36 只大鼠分为 6 组, 每组 6 只。随机选定 2 组为空白组和假手术组, 其余大鼠均采用国内外公认的去卵巢大鼠双侧卵巢方法建立 PMOP 病理模型, 将造模成功的 24 只大鼠依次分为模型组、壮骨止痛胶囊组、RAPA 组和 3-MA 组。现配 10%的水合氯醛溶液, 假手术组和造模组的大鼠腹腔注射水合氯醛溶液麻醉(每 100 g 体质量注射 1 mL); 将麻醉大鼠俯卧位固定于鼠板上, 沿下腹部正中线切口打开腹腔, 拨开脂肪层找到卵巢; 造模组大鼠完整摘除双侧卵巢并结扎; 假手术组仅打开腹腔, 不切除双侧卵巢; 止血完全后分两层缝合腹腔, 切口碘伏消毒, 为防止术后感染, 术后连续 3 天在假手术组和造模组大鼠后腿肌肉内侧注射青霉素, 每只  $4 \times 10^4$  U/d, 500  $\mu$ L/只, 6 天后拆线, 空白组不做任何处理。

### 2.2 给药方法

将 RAPA、3-MA 溶解在提前配置的油相溶剂中。预实验发现 RAPA、3-MA 的适宜浓度分别为 6 mg/kg、8 mg/kg, 术后第 6 天开始给药。各药物剂量按人-大鼠体表面积折算来确定。壮骨止痛胶囊为 0.45 g/粒, 成人剂量为 12 粒/d, 换算成大鼠壮骨止痛胶囊高浓度为 1.944 g/(kg·d), 具体给药方式为: 空白组、假手术组、模型组和壮骨止痛胶囊组每天腹腔注射油相溶剂 1 mL, 其中前三组灌胃 2 mL 水, 最后一组灌胃 2 mL 壮骨止痛胶囊溶液; RAPA 组和 3-MA 组每天分别腹腔注射 RAPA 溶液 1 mL、3-MA 溶剂 1 mL, 两组均灌胃 2 mL 水; 各组大鼠连续灌喂 13 周后取材。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 骨组织病理形态学检测** 取左侧股骨, 用 4%多聚甲醛固定, 经过脱水、透明、切片、烤片、红染后, 最后封片, 待玻片干燥后送至湖南中医药大学病理检验中心检测骨组织病理形态学变化。

**2.3.2 ELISA 检测血清雌二醇(estradiol, E2)的含量** 取出保存在冰箱里的各组腹主动脉血清, 待血清融化以后进行 E2 的检测。按照双抗体夹心技术对该指标进行酶联免疫分析, 使用多功能酶标仪检测 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度, 进行统计学分析。

**2.3.3 免疫组化测定骨组织 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白表达** 取右侧股骨, 4%多聚甲醛固定, 经过脱水、透明、切片、冷修复后, 在每块载玻片上滴加配制的一抗进行孵育, 置于室温 37  $^{\circ}$ C 2 h 或置于 4  $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 再加入二抗, 置于室温 37  $^{\circ}$ C 1 h。用 PBS 清洗干净, 每块载玻片滴加 200  $\mu$ L DAB 显色液, 置于室温 37  $^{\circ}$ C 下 5~10 min 后加水终止反应。加水冲洗一遍后加入适量苏木素染液复染, 置于室温 2 min 后加水洗 3 次, 每次 3 min。最后中性树脂胶封片。干燥后在显微镜下进行切片的视野观察, 对 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白的平均灰密度值进行比较分析。

### 2.4 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件对实验数据分析, 用正态性检验和方差分析, 方差齐则组间多重比较采用 LSD 法, 若方差不齐则采用 Games-Howell 法比较。实验数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HE 染色观察各组去卵巢大鼠骨组织病理形态学变化

空白组和假手术组骨髓腔无明显变化, 模型组大鼠骨髓腔明显扩大, 骨小梁稀疏, 说明模型组大鼠出现骨质疏松症的病理形态学改变; 与模型组相比, 壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组大鼠骨髓腔扩大不明显, 骨小梁密度较均匀, 说明壮骨止痛胶囊能有效改善 PMOP 模型大鼠的骨微量结构, 防治 PMOP。见如图 1。

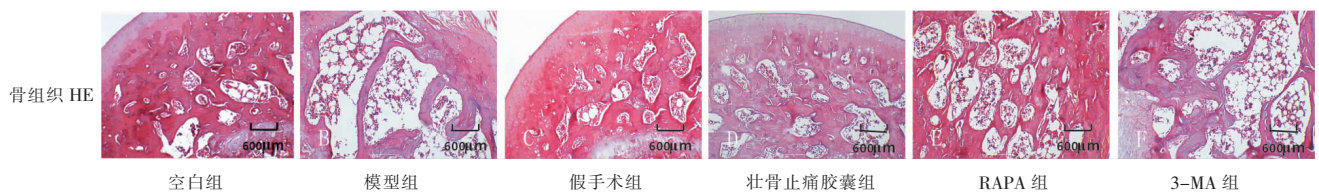


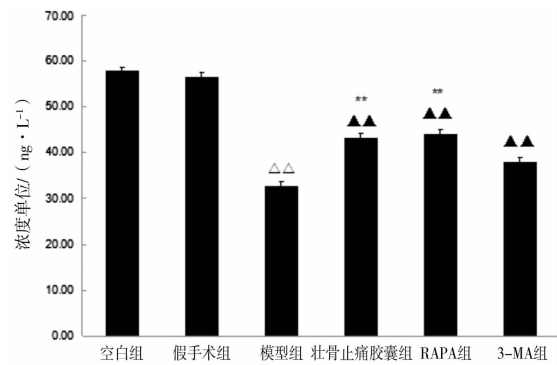
图 1 各组骨组织病理形态学(HE,  $\times 400$ )

### 3.2 ELISA 检测各组血清中 E2 含量

与空白组相比,假手术组大鼠血清 E2 含量无统计学意义( $P>0.05$ ),与假手术组相比,模型组血清 E2 值降低,且有显著性差异( $P<0.01$ )。与模型组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组血清 E2 值升高、3-MA 组血清 E2 值降低,且有显著性差异( $P<0.01$ )。与 3-MA 组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组大鼠 E2 值升高,具有显著性降低( $P<0.01$ )。结果见图 2。

### 3.3 免疫组化测定骨组织 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白表达水平

与空白组比较,假手术组骨组织 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与假手术组相比,模型组骨组织的 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),3-MA 组 ERK1/2、P38 MAPK 蛋白表达降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );与 3-MA 组相比,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组的 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),且壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组股骨组织 ERK1/2、P38 MAPK 及其磷酸化蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 3 及表 1、表 2。



注:与假手术组比较,△△ $P<0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与 3-MA 组比较,\*\* $P<0.01$

图 2 各组大鼠血清 E2 浓度

## 4 讨论

PMOP 是存在于中老年妇女中的一种高发性疾病。从中医角度来说,老年人肾气不足,筋骨失去了肾的濡养;阴精不足,血阻骨络,使得筋骨坚韧不足,故而易受外伤而骨折。骨质疏松症是老年患者骨折的主要衰弱原因,降低了患者的生活质量。骨稳态是通过骨形成成骨细胞和骨吸收破骨细胞来维持的。壮骨止痛胶囊以补骨脂、淫羊藿、牛膝、枸杞子等药物为主要成分。多项体外研究<sup>[9-10]</sup>表明,淫羊藿能促进成骨细胞增殖,增强成骨细胞的矿化能力,并且具有诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的功能;同时,补骨脂、牛膝等药材也具有促进成骨细胞增殖的功效<sup>[11-12]</sup>。在淫羊藿等药物的作用下,破骨细胞的形成和增殖受到了抑制,保持了骨小梁结构的完整,阻止了 PMOP 的发生。

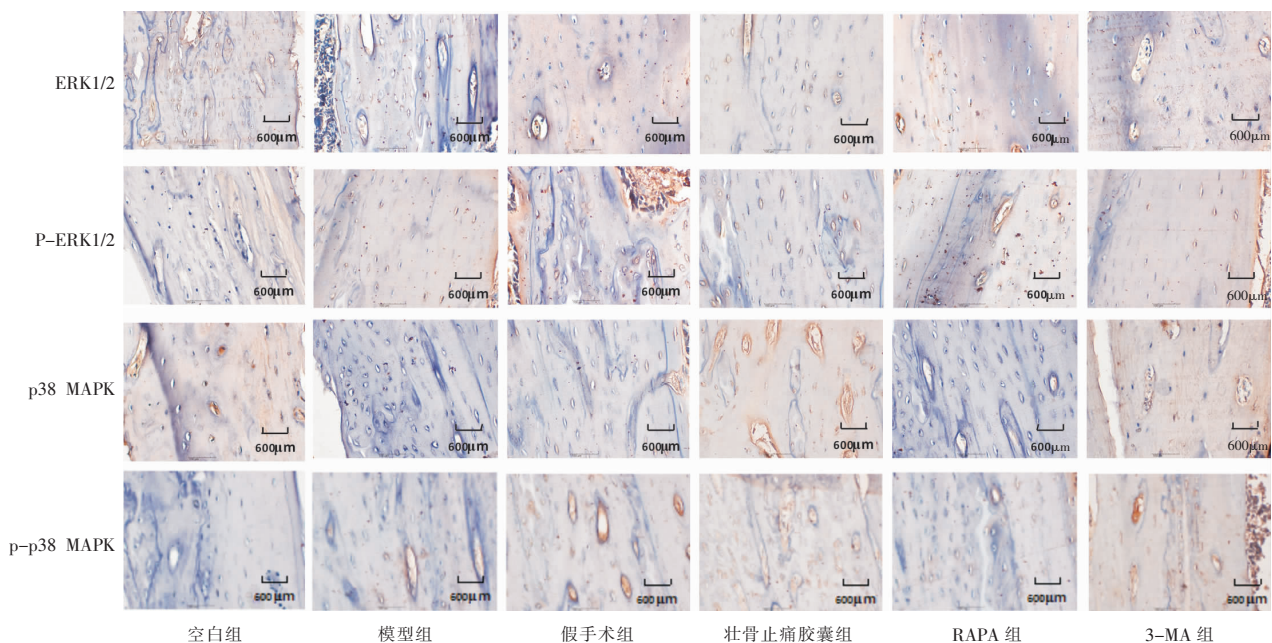


图 3 各组骨组织 ERK1/2、P-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAP 免疫组化( $\times 400$ )

表1 各组骨组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达差异

组别	ERK1/2/(ng·L <sup>-1</sup> )	P-ERK1/2/(ng·L <sup>-1</sup> )
空白组	166.06±6.05	176.67±2.12
假手术组	164.50±8.97	173.40±6.01
模型组	78.82±26.51 <sup>△△</sup>	116.20±37.82 <sup>△△</sup>
壮骨止痛胶囊组	190.38±2.16 <sup>▲▲**</sup>	177.8±10.67 <sup>▲▲**</sup>
RAPA 组	194.07±10.33 <sup>▲▲**</sup>	189.78±6.7 <sup>▲▲**</sup>
3-MA 组	126.03±2.86 <sup>▲▲</sup>	106.4±16.90 <sup>▲▲</sup>

注:与假手术组比较,<sup>△△</sup>*P*<0.01;与模型组比较,<sup>▲▲</sup>*P*<0.01;与3-MA组比较,<sup>\*\*</sup>*P*<0.01

表2 各组骨组织 p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 表达差异

组别	P38 MAPK/(ng·L <sup>-1</sup> )	P-P38 MAPK/(ng·L <sup>-1</sup> )
空白组	149.32±24.05	154.94±2.74
假手术组	148.56±9.24	147.01±7.72
模型组	90.77±17.65 <sup>△△</sup>	115.73±8.44 <sup>△△</sup>
壮骨止痛胶囊组	160.71±7.20 <sup>▲▲**</sup>	188.67±12.55 <sup>▲▲**</sup>
RAPA 组	151.43±8.41 <sup>▲▲**</sup>	183.88±8.37 <sup>▲▲**</sup>
3-MA 组	121.50±20.47 <sup>▲▲</sup>	128.13±27.44 <sup>▲▲</sup>

注:与假手术组比较,<sup>△△</sup>*P*<0.01;与模型组比较,<sup>▲▲</sup>*P*<0.01;与3-MA组比较,<sup>\*\*</sup>*P*<0.01

研究<sup>[13]</sup>表明,MAPK 信号通路在 PMOP 发病机制中发挥了重要的调节作用。ERK 是 MAPK 家族的成员,ERK1 和 ERK2 是其最主要的两种形式,其参与了许多不同的细胞事件,包括增殖、生长、分化、细胞迁移、细胞存活、代谢和转录,在维持骨结构动态平衡中起到至关重要的作用<sup>[14-15]</sup>。Prasadam I 等<sup>[16]</sup>研究表明,当骨细胞在骨关节炎的关节软骨细胞条件培养基中培养时,软骨下骨成骨细胞成骨基因的表达随着 ERK1/2 磷酸化的作用而增加;Yang Y 等<sup>[17]</sup>研究表明,趋化因子配体 2(CXCL2)在骨髓中富集,并在骨质疏松小鼠的成骨细胞中显示出丰富的表达。CXCL2 的过度表达抑制了成骨细胞的增殖和分化,相反,CXCL2 的下调促进了成骨细胞的扩张和分化。在机制上,CXCL2 抑制成骨细胞中的 ERK1/2 信号通路,ERK1/2 的激活消除了 CXCL2 对成骨细胞的抑制作用,而 ERK1/2 失活逆转了 CXCL2 抑制的成骨作用,皆表明 ERK1/2 可以促进成骨细胞分化。

MAPK 蛋白通路还包括 p38 MAPK 这一重要通路,MAPK 级联是一种广泛研究的信号通路,在骨骼发育过程中调节骨髓间充质干细胞分化<sup>[18-19]</sup>。p38 MAPK 信号通路在炎症反应、细胞周期、细胞分化及凋亡中起着至关重要的作用<sup>[20]</sup>。已证实 p38 MAPK 通路在细胞增殖和成骨分化<sup>[21-22]</sup>中起着关键作用。Shang Q

等<sup>[23]</sup>研究发现龙蛇兰提取物可以促进 p38 MAPK 及磷酸化 p38 MAPK 蛋白的表达,促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化,表明通过 p38 MAPK 通路治疗骨质疏松症具有潜在依据。Cong Q 等<sup>[24]</sup>研究表明 p38 MAPK 在充质干细胞中可被雌激素激活,从而控制骨保护素的表达。调节破骨发生和骨吸收,从而防治骨质疏松症。Thouverey C 等<sup>[25]</sup>发现,消融成骨细胞谱系细胞中的 p38 MAPK 信号路可以保护小鼠免受雌激素缺乏引起的骨丢失,其中 P38 MAPK 蛋白在骨髓中最丰富,表明 p38 MAPK 通路在维持生理性骨稳态中起着重要作用。

本实验对各组大鼠股骨组织进行了 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白的免疫组化染色,研究结果显示,壮骨止痛胶囊组和 RAPA 组 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 表达均高于模型组及 3-MA 组,表明壮骨止痛胶囊和 RAPA 能正向调节 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 的蛋白表达。E2 是女性最主要的“骨激素”,E2 水平的降低会引发骨量流失<sup>[26]</sup>。绝经期妇女卵巢功能减退,E2 分泌减少,骨形成与骨吸收偶联失衡,骨吸收大于骨形成,导致骨密度减少、骨结构破坏、增加骨折风险<sup>[27]</sup>。本研究同时检测了各组大鼠血清雌激素的含量,壮骨止痛胶囊组大鼠和 RAPA 组大鼠的雌激素水平较模型组及 3-MA 组明显升高,表明壮骨止痛胶囊和 RAPA 同雌激素功用相似,通过正向调控 MAPK 通路中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白表达,从而促进骨形成。本实验对 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白的研究,仅从免疫组化染色这一个方面来探讨,有一定的局限性,MAPK 信号通路尚有诸多分子,且壮骨止痛胶囊和细胞自噬对其作用机制尚不明确,有待后续进一步的研究。

## 参考文献

- [1] ZHOU L, LIU Q, YANG M L, et al. Dihydroartemisinin, an anti-malaria drug, suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis, osteoclast formation, and RANKL-induced signaling pathways[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2016, 31(5): 964-974.
- [2] 陶周善,周皖舒,江云云,等.骨形成蛋白联合雷奈酸锶对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2): 165-169.

- [3] 谭浩林,张润,王刚,等.绝经后骨质疏松症合并膝关节炎患者的骨代谢特征研究[J].中医正骨,2018,30(5):14-19.
- [4] 梁琼,向旺,邹佳,等.壮骨止痛胶囊调控 OSX,OPN 蛋白对去势大鼠成骨细胞分化的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):311-315.
- [5] 陈镇秋,洪郭驹,韩晓蕊,等.骨科祛痰逐瘀方经 MAPK/ERK 通路诱导血管内皮细胞迁移与血管管腔形成[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(6):747-752.
- [6] 高歌,潘晓华,高雪,等.基于系统药理学的续断治疗骨质疏松作用机制研究[J].中草药,2018,49(19):4581-4585.
- [7] ZHANG W, CAO H, ZHANG X, et al. A strontium-incorporated nanoporous titanium implant surface for rapid osseointegration[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(9): 5291-5301.
- [8] SAIDAK Z, HAYË E, MARTY C, et al. Strontium ranelate re-balances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling[J]. *Aging Cell*, 2012, 11(3): 467-474.
- [9] 李磊,郑怀亮,寇玉,等.淫羊藿苷诱导骨髓间充质干细胞成骨细胞分化的研究[J].中华中医药杂志,2018,33(6):2599-2601.
- [10] 邓宇,陈廖斌,淫羊藿苷通过激活 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J].中医学报,2017,32(12):2393-2398.
- [11] 姜涛,邵敏,陈庆真,等.牛膝甾酮干预 SD 乳鼠成骨细胞的增殖与分化[J].中国组织工程研究,2020,24(23):3636-3642.
- [12] 邱丽玲,金镇雄,赵永见,等.补骨脂素通过刺激成肌分化促进骨质疏松性骨折愈合的疗效观察[J].老年医学与保健,2020,26(5):746-749.
- [13] 张波,耿彬,谭小义,等.MAPK 信号通路与骨质疏松关系的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2014,22(23):2161-2164.
- [14] CHEN Z G, XUE J Q, SHEN T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis in vivo and in vitro[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2016, 43(2): 268-276.
- [15] HU H M, YANG L, WANG Z, et al. Overexpression of integrin  $\alpha 2$  promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2013, 6(5): 841-852.
- [16] PRASADAM I, VAN GENNIP S, FRIIS T, et al. ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2010, 62(5): 1349-1360.
- [17] YANG Y, ZHOU X Y, LI Y J, et al. CXCL2 attenuates osteoblast differentiation by inhibiting the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(16): jcs230490.
- [18] KOKAI L E, MARRA K, RUBIN J P. Adipose stem cells: Biology and clinical applications for tissue repair and regeneration[J]. *Translational Research*, 2014, 163(4): 399-408.
- [19] DU Q C, ZHANG D Z, CHEN X J, et al. The effect of p38 MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75635.
- [20] THOUVEREY C, CAVERZASIO J. Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance [J]. *Bone Reports*, 2015, 4: 711.
- [21] AYYAR K K, REDDY K V R. MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways regulate the expression of miRNA, let-7f in human endocervical epithelial cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(6): 4751-4759.
- [22] ZHOU R, O'HARA S, CHEN X M. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells[J]. *Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 8: 371-379.
- [23] SHANG Q, YU X, REN H, et al. Effect of plastrum testudinis extracts on the proliferation and osteogenic differentiation of rBMSCs by regulating p38 MAPK-related genes[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 2019: 6815620.
- [24] CONG Q, JIA H, BISWAS S, et al. p38 $\alpha$  MAPK regulates lineage commitment and OPG synthesis of bone marrow stromal cells to prevent bone loss under physiological and pathological conditions[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(4): 566-578.
- [25] THOUVEREY C, CAVERZASIO J. Ablation of p38 $\alpha$  MAPK signaling in osteoblast lineage cells protects mice from bone loss induced by estrogen deficiency [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(12): 4377-4387.
- [26] JIN W J, JIANG S D, JIANG L S, et al. Differential responsiveness to 17 $\beta$ -estradiol of mesenchymal stem cells from postmenopausal women between osteoporosis and osteoarthritis[J]. *Osteoporosis International*, 2012, 23(10): 2469-2478.
- [27] YANG X W, WANG X S, CHENG F B, et al. Elevated CCL2/MCP-1 levels are related to disease severity in postmenopausal osteoporotic patients[J]. *Clinical Laboratory*, 2016, 62(11): 2173-2181.

(本文编辑 苏维)