

伤科益肾壮骨丸对成骨细胞维生素D受体与核心结合因子 $\alpha 1$ 蛋白表达的影响

朱元元

荆州市中医医院

DOI:10.32629/ffcr.v3i9.20034

[摘要] 目的：本研究旨在深入探讨伤科益肾壮骨丸如何通过其独特的药理作用机制来促进或改善骨形成过程。方法：将SD大鼠均衡分配至七组：正常对照组、生理盐水对照组及五个药物干预组（单味补阳-固本壮骨胶囊、复方补阳-伤科益肾壮骨丸、复方平补-补肾益精方、复方补阴-知柏地黄丸、西药对照-萌格旺）。各组血清含相应药物，分别处理16月龄大鼠的成骨细胞。随后，运用免疫组织化学技术精准测定这些处理后的成骨细胞中维生素D受体（VDR）与核心结合因子 $\alpha 1$ （Cbfa1）蛋白的表达水平，以探讨各药物对骨代谢关键调控因子的影响。结果：在大鼠成骨细胞的研究中，单味补肾阳组、复方补肾阳组、复方平补组及西药对照组均显著促进了维生素D受体（VDR）与核心结合因子 $\alpha 1$ （Cbfa1）蛋白的表达。相比之下，复方补肾阴组则明显抑制了VDR与Cbfa1蛋白的表达，揭示了不同中药配方对骨代谢调控机制的差异性影响。结论：伤科益肾壮骨丸的补阳与平补剂型，可能通过上调成骨细胞中维生素D受体（VDR）与核心结合因子 $\alpha 1$ （Cbfa1）的蛋白表达，有效促进骨形成过程，体现其治疗骨伤科疾病的机制。

[关键词] 伤科益肾壮骨丸；药理学维生素D受体；核心结合因子 $\alpha 1$ ；成骨细胞

中图分类号：R285.5 文献标识码：A

Effects of Shangke Yishen Zhuanggu Pill on VDR and Cbfa1 Expression in Osteoblasts
Yuanyuan Zhu

Jingzhou City Traditional Chinese Medicine Hospital

Abstract: Objective: To investigate how Shangke Yishen Zhuanggu Pill promotes bone formation. Methods: SD rats were divided into seven groups: normal control, saline control, and five drug groups. Osteoblasts from 16-month-old rats were treated with drug-containing sera. VDR and Cbfa1 protein expression was measured by immunohistochemistry. Results: Yang-tonifying, compound yang-tonifying, balanced tonifying, and western medicine groups significantly increased VDR and Cbfa1 expression. The yin-tonifying group inhibited their expression. Conclusion: Shangke Yishen Zhuanggu Pill promotes bone formation by upregulating VDR and Cbfa1 expression in osteoblasts.

Keywords: Shangke Yishen Zhuanggu Pill; vitamin D receptor; Cbfa1; osteoblasts

引言

骨代谢作为维持骨骼健康与生命活力的基石，其核心在于复杂的骨重建过程。这一过程精妙地调节着骨组织的动态平衡，确保其不断更新与强化^[1]。此过程精密调控，依赖于一系列协同作用的细胞群体，包括专司骨质溶解的破骨细胞、负责新骨生成的成骨细胞、维持骨稳态的骨细胞，以及作为骨细胞来源的骨祖细胞。这些细胞在精密的信号网络调控下，共同维系着骨骼系统的完整与活力^[2]。研究深入探索了骨形成过程的复杂调控机制，其中细胞核内蛋白如维生素D受体（VDR）与核心结合因子 $\alpha 1$ （Cbfa1）被证实为骨形成的关键调控因子。本研究聚焦于老龄大鼠的成骨细胞，通过检测伤科益肾壮骨丸对这些重要蛋白表达的影响，旨在揭示该药物对骨形成机制的潜在作用^[3]。此项研究不仅深化了对伤科

益肾壮骨丸药效机制的理解，还为其在防治骨质疏松症方面的应用提供了科学依据，为骨骼健康维护贡献新的治疗策略。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器和试剂

表1 主要仪器和试剂

仪器和试剂	来源信息
DMEN/HamF 12	Gibco-BRL, Grand Island, NY
胰蛋白酶	PROMEGA, 1:250
新生小牛血清	杭州四季青
青霉素	上海第二制药厂, 100 U/ml
链霉素	上海第二制药厂, 100ug/m
D-Hanks 平衡液, SABC 免疫组化试剂盒	武汉博士德公司
I 抗: 羊抗大鼠	Santa Cruz, Biotechnology, Inc

1.2 研究方法

1.2.1 成骨细胞的培养参照有关文献

本研究选取 16 月龄 SD 大鼠作为研究对象，首先通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液（剂量为 10ml/kg）实现无痛麻醉。在严格的无菌操作环境下，从大鼠体内取出双侧股骨的远端与近端部分，细致剔除附着的骨膜及周围结缔组织^[4]。随后，使用无菌磷酸盐缓冲液（PBS）对骨组织进行三次彻底的冲洗，确保去除残留的血液与杂质。之后，将清洁的骨组织精细剪切成约 1mm³ 大小的微小骨粒，并再次利用 PBS 进行多次冲洗，直至骨粒表面呈现纯白色，表明已充分去除了可能影响后续培养的成分^[5]。最后将这些处理好的骨粒均匀分布于含有 20% 灭活新生牛血清的 DMEM/F12 (1:1 混合) 培养基中，采用翻转培养技术，在设定为 37℃、含 5%CO₂ 的恒温培养箱中进行细胞培养，以模拟体内生理条件，促进成骨细胞的生长与分化。

1.2.2 成骨细胞功能鉴定

当成骨细胞在培养瓶中生长至汇合度达 80% 时，采用 0.25% 胰酶消化液进行消化处理。随后，以 3×10⁵/ml 的细胞密度，将细胞接种至 6 孔板中继续培养。在培养过程中，每两天更换一次培养液，以维持细胞的良好生长状态。同时，定期观察并检测矿化结节的染色情况，以评估成骨细胞的矿化能力。

1.2.3 研究分组及含药血清制备

本研究选用了健康 6 月龄 SD 大鼠共 70 只，体重范围严格控制在 (270±20) g 内，性别分布均衡，雌雄各异，全部由权威的研究动物供应机构——上海中医药大学研究动物中心提供。研究设计将这批大鼠通过随机化方法分为七大组别，具体为：正常对照组、生理盐水对照组、单味补阳药物组、复方补阳药物组、复方平补药物组、复方补阴药物组，以及西药阳性对照组。这样的分组旨在全面比较不同药物对 SD 大鼠生理机能的影响，确保研究结果的客观性与科学性。

表 2 研究分组及含药血清制备

研究分组	含药血清制备	主要成分
单味补阳组	固本壮骨粉	续断，由浙江迪耳药业有限公司生产，批号：021012
复方补阳组	伤科益肾壮骨丸	熟地黄、山药等，荆州市中医医院自制药，批号：鄂药制药 Z20210327
复方平补组	补肾益精方	牡蛎、何首乌等，由上海中医药大学附属曙光医院制剂室生产，批号：010521
复方补阴组	知柏地黄丸	知母、黄柏等，由兰州佛慈药厂生产，批号：019804
西药对照组	萌格旺	日本帝人株式会社生产，批号：5699

采血时，首先采用 1.1% 氨基甲酸乙酯以 1.1g/kg 体重的剂量腹腔注射麻醉大鼠。随后，在严格的无菌操作下，通过腹主动脉采集血液样本。采集的血液在 4℃ 条件下以 3000 转

/分钟的转速离心 20 分钟，分离上清液。接着，将上清液置于 56℃ 环境中灭活 30 分钟，再通过 0.22 微米滤膜过滤以去除微生物。处理后的血液样本分装后，储存于 -30℃ 冰箱中，以备后续研究使用。

1.2.4 含药血清对成骨细胞的干预

待细胞生长至汇合度约 60% 时，更换为无血清培养液继续培养 24 小时。之后，向培养体系中加入含药血清（浓度为 10%），并继续培养 3 天，以观察药物对细胞生长及功能的影响。

1.3 统计学方法

计量资料以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，数据输入计算机分析系统后，利用 SPSS 11.0 软件，通过 One-Way ANOVA 方法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 成骨细胞形态学的观察

在相差显微镜下观察，细胞悬液中的细胞形态多样，呈圆形且大小不一。经过 24 小时的培养液更换后，部分细胞开始贴附于培养底物，形态逐渐转变为椭圆形或梭形。随着时间推移，这些贴壁细胞进一步生长，胞体显著增大，并伸出较长的突起。当细胞增殖并相互接触时，它们汇聚成层，整体呈现出长梭形的集落形态。因此，如图 1 成骨细胞形态学的观察所示：

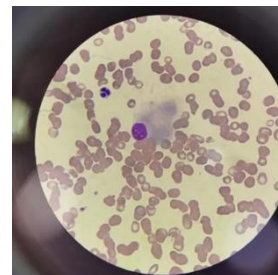


图 1 成骨细胞形态观察 (×100)

2.2 矿化结节染色

成骨细胞培养 20 天后，培养皿中可观察到明显的橘红色矿化结节生成。如图 2 的矿化结节染色如下：

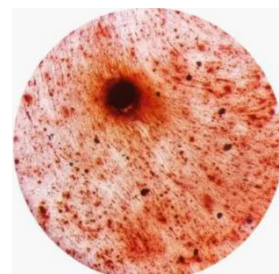


图 2 矿化结节染色 (×100)

2.3 对 VDR、Cbfa1 蛋白表达的影响

与正常组相比，研究结果显示单味补阳组、复方补阳组、复方平补组及西药对照组均显著增强了 VDR 与 Cbfa1 蛋白的

表达;而复方补阴组则明显抑制了VDR与Cbfa1蛋白的表达水平。因此,表3所示:

表3 各组大鼠成骨细胞VDR、Cbfa1蛋白测定比较(x±s)

组别	VDR (n)	VDR 灰度值	Cbfa1 (n)	Cbfa1 灰度值
正常组	6	1395.77 ± 337.06	4	1058.45 ± 214.54
生理盐水组	6	1272.63 ± 133.00	4	1187.71 ± 329.82
单味补阳组	6	2510.12 ± 288.99*△#	4	2699.23 ± 330.56*#0
复方补阳组	6	2837.62 ± 328.00*△#	4	3813.61 ± 554.08
复方平补组	6	1927.38 ± 417.02*A#	4	1273.53 ± 404.65
复方补阴组	6	1360.14 ± 302.82	4	939.46 ± 135.41
西药对照组	6	3480.71 ± 647.63*△	4	3886.30 ± 774.55*

注:与正常组、生理盐水组比较,*P<0.05;与复方养阴组比较,△P<0.05;与西药对照组比较,#P<0.05;与复方补阳组比较,OP<0.05。

3 讨论

3.1 骨重建是涉及成骨细胞与破骨细胞紧密合作的复杂生理生化过程。成骨细胞在这一过程中历经细胞增殖、细胞外基质成熟、基质矿化及凋亡四大关键阶段。此复杂流程受多重因素精细调控,以最终决定骨形成的成效。研究表明,包括甲状旁腺激素、降钙素及性激素在内的多种全身激素,均能在不同阶段影响成骨细胞的发展及功能。尤为引人注目的是,随着维生素D在骨代谢管理中的应用日益广泛,其作为骨形成调控中的关键角色逐渐显现,深刻影响着成骨细胞的各项活动,对维持骨骼健康具有不可忽视的作用。

3.2 维生素D,传统上被视为维持钙平衡的基本营养素,现经深入研究揭示其作为类固醇激素家族成员的多重生理功能。它不仅调节体内矿物质平衡,还深刻影响骨骼微环境,调控骨细胞功能。尤为关键的是,1,25(OH)₂D₃作为维生素D的活性代谢产物,对成熟细胞展现出显著作用,进一步强化了维生素D在生理调控中的核心地位。

3.3 现有研究已明确维生素D对骨健康的积极影响,它能促进骨形成并降低骨折风险。体内研究显示,给大鼠补充1,25(OH)₂D₃后,无论时间长短,均能促进成骨细胞增殖。此外,成骨细胞分化增生过程中释放的多种细胞外基质蛋白受1,25(OH)₂D₃调控,包括I型胶原、金属蛋白酶及骨唾液蛋白等,同时影响成骨细胞的矿化与凋亡过程。学者们普遍认为,1,25(OH)₂D₃通过其受体介导的基因途径,即维生素D受体(VDR),实现对成骨细胞功能的调控。

3.4 结果显示,西药萌格旺组显著提升VDR蛋白表达,这归因于1,25(OH)₂D₃能上调其自身受体的表达,而萌格旺作为1,25(OH)₂D₃的同系物,同样具有此功效。值得注意的是,萌格旺上调Cbfa1蛋白表达的效果更显著于VDR,揭示了成骨细胞对Cbfa1的高敏感性及维生素D在骨质疏松防治中的多靶点作用。相比之下,中药伤科益肾壮骨丸系列(固本壮骨胶囊、伤科益肾壮骨丸、补肾益精方)亦能上调VDR和Cbfa1蛋白表达,可能通过促进成骨细胞增殖、活化VDR和Cbfa1蛋白实现。而知柏地黄丸则下调两者表达,这与其抑制成骨细胞增殖进而抑制VDR和Cbfa1蛋白表达的特性相关。

4 总结

综上所述,伤科益肾壮骨丸中的补阳及平补两种方剂,其预防骨质疏松的功效显著,这主要得益于它们能够上调VDR和Cbfa1蛋白的表达。通过这一机制,这些方剂有效促进了成骨细胞的活性与增殖,进而推动了骨基质的形成与矿化,增强了骨骼的结构与强度。此发现不仅揭示了伤科益肾壮骨丸在骨质疏松防治中的独特作用机制,更为该类药物在临床上的广泛应用提供了坚实的理论基础与科学依据。未来,可进一步深入研究其具体作用路径与分子机制,以优化治疗方案,更好地服务于骨质疏松患者的健康需求。

[参考文献]

- [1]袁丽华,华瑞,EBRAHIMPOUR-KOUJAN S,等. Nutrition Journal|补充维生素D对代谢功能障碍相关脂肪性肝病患者肝纤维化因子、维生素D受体和肝纤维化microRNA的影响:一项探索性随机临床试验[J].临床肝胆病杂志,2024,40(8):1626.
- [2]张勉.维生素D缺乏与高血压的相关性研究进展[J].中国城乡企业卫生,2024,39(8):40-43.
- [3]王杭英,郑秀娟,朱筱丹,等.孕期维生素D缺乏孕妇胎儿宫内生长受限相关因素的前瞻性队列研究[J].中国妇幼保健,2024,39(16):3100-3103.
- [4]郭庆,罗云,徐霞,等.2型糖尿病视网膜病变与维生素D的关系研究进展[J].新乡医学院学报,2024,41(8):798-801.
- [5]孙其乐,赵祥宇,姚泓好,等.25-羟基维生素D与白癜风的相关性研究进展[J].现代医药卫生,2024,40(14):2490-2494.

作者简介:

朱元元(1987.11-),男,汉族,湖北荆州,硕士,主治医师,主要研究方向:中医骨伤。

基金项目:

湖北省荆州市中医药自主选题项目研究进展报告ZZXT2025C05,湖北省荆州市科技计划项目(指导性)2025HD151。