

壮骨伸筋胶囊对泼尼松致骨质疏松模型大鼠的改善作用及其机制研究[△]

李丽娟*, 孙晓丽, 苏海峰, 段重高, 周亚伟[#](北大世佳科技开发有限公司, 北京 100084)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1788-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.17

摘要 目的:研究壮骨伸筋胶囊对骨质疏松模型大鼠的改善作用及其机制。方法:将72只SD大鼠随机分为6组,即空白对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、骨疏康颗粒组[阳性药物,3g(生药)/kg]和壮骨伸筋胶囊低、中、高剂量组[1.4、2.7、5.4g(生药)/kg]。除空白对照组ig生理盐水外,其余各组大鼠于每周一、四ig醋酸泼尼松片(4.5mg/kg)复制骨质疏松模型,并同时于每周一至六ig相应药物,连续13周。测定大鼠股骨骨密度、骨形态计量指标[骨小梁体积百分比、骨小梁矿化率(MAR)和骨皮质矿化率(mAR)]、肾组织中肌节同源盒基因Msx-2 mRNA及其蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠骨密度、骨小梁体积百分比降低,mAR升高,肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,骨疏康颗粒组和壮骨伸筋胶囊高剂量组大鼠骨小梁体积百分比升高,mAR降低,肾组织中Msx-2 mRNA表达增强;各给药组大鼠骨密度增加、Msx-2蛋白表达增强;中剂量组骨小梁体积百分比升高,以上差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);MAR差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:壮骨伸筋胶囊对泼尼松致大鼠骨质疏松有一定的改善作用,其机制可能与上调肾组织中Msx-2基因的表达有关。

关键词 壮骨伸筋胶囊;骨质疏松;醋酸泼尼松;骨组织形态计量;肌节同源盒基因Msx-2;大鼠

Study on Improvement Effects of Zhuanggu Shenjin Capsules on Prednisone-induced Osteoporosis Model Rats and Its Mechanism

LI Lijuan, SUN Xiaoli, SU Haifeng, DUAN Chonggao, ZHOU Yawei (Beijing University Bescholor Bio-tech Development Company, Beijing 100084, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of Zhuanggu shenjin capsules (ZGSJC) on prednisone-induced osteoporosis model rats and its mechanism. METHODS: 72 SD rats were randomly divided into 6 groups as blank control group (normal saline), model group (normal saline), Gushukang granule group [positive drug, 3 g(crude drug)/kg] and ZGSJC low-dose, medium-dose and high-dose groups [1.4, 2.7, 5.4 g (crude drug)/kg]. Except for intragastric administration of normal saline in blank control group, other groups were given Prednisone acetate tablet 4.5 mg/kg intragastrically every Monday and Thursday to induce osteoporosis model, and given relevant medicine intragastrically from Monday to Saturday for consecutive 13 weeks. Bone density (BMD), bone histomorphometry indicators [volume percentage of bone trabecula, mineralization rate of bone trabecular (MAR) and mineralization rate of bone cortical (mAR)] and the expression of muscle segment homeobox gene Msx-2 mRNA and protein were all determined. RESULTS: Compared with blank control group, BMD, volume percentage of bone trabecula and the expression of Msx-2 mRNA and protein in renal tissue decreased, while mAR increased in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, volume percentage of bone trabecula and the expression of Msx-2 mRNA in renal tissue increased in Gushukang granule group and ZGSJC high-dose group, while mAR decreased; BMD and the expression of Msx-2 protein increased in treatment groups, as well as the volume percentage of bone trabecula increased in ZGSJC medium-dose group, with statistical significance ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the difference of MAR without statistic significance ($P>0.05$). CONCLUSIONS: ZGSJC can protect rats against prednisone-induced osteoporosis, and its mechanism may be associated with the up-regulation of Msx-2 expression in renal tissue.

KEYWORDS Zhuanggu shenjin capsules; Osteoporosis; Prednisone acetate; Bone histomorphometry; Muscle segment homeobox gene Msx-2; Rat

骨质疏松症是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,会导致骨质脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1],严重影响患者生活。随着人们生活水平的不断提高,骨质疏松症患者的数量也不断增加。目前,骨质疏松的治疗主要采用药物治疗。壮骨伸筋胶囊由淫羊藿、熟地黄、鹿衔草、骨碎补、肉苁蓉、鸡血藤等15味中药组成,具有补益肝肾、强筋健骨、活络止

痛的作用,多用于肝肾两虚、寒湿阻络所致的神经根型颈椎病^[2]。前期实验结果显示,壮骨伸筋胶囊对泼尼松所致大鼠骨质疏松具有明显的防治作用。在本研究中,笔者以肾组织肌节同源盒基因Msx-2等为指标,对壮骨伸筋胶囊的疗效及机制进行研究,为该药治疗骨质疏松提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Leica-Qwin 图像分析仪系统、CTR6000 显微镜(德国Leica公司); Lightcyler 480 荧光定量聚合酶链免疫(PCR)仪(瑞士罗氏公司);KMS-151 恒温磁力搅拌器(上海精骐科技有限公司);Prodigy-BX IL 双能X线骨密度测量仪(美国Lunar公司)。

[△] 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20130302025YY)

* 研究员,硕士。研究方向:药理与毒理学。电话:010-62537997。E-mail:lijuan19870129@126.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:中药新药研究。电话:010-62538007。E-mail:ywzhou@pku.edu.cn

1.2 动物

SD大鼠, ♂, 体质量290~300 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 动物合格证号为SCXK(京)-2009-0007。

1.3 药品与试剂

壮骨伸筋胶囊(通化金马药业股份有限公司, 批号: 20140302, 规格: 0.3 g/粒); 骨疏康颗粒(辽宁康辰药业有限公司, 批号: 131103, 规格: 10 g/袋); 四环素片(成都锦华药业有限责任公司, 批号: 140103, 规格: 0.25 g/片); 醋酸泼尼松片(天津力生制药股份有限公司, 批号: 131123, 规格: 5 mg/片); 水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 30037517); 总RNA提取溶剂Trizol Reagent(美国Life Technology公司, 批号: DP405-02); 反转录-PCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 批号: 00178716); 内参 β -actin抗体、肾组织肌节同源盒基因Msx-2抗体和超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天生物技术公司); Msx-2引物由北京华大基因公司合成。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药

将72只SD大鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、骨疏康颗粒组[阳性药物, 3 g(生药)/kg](根据体表面积换算, 相当于人临床等效剂量)和壮骨伸筋胶囊高、中、低剂量组[5.4、2.7、1.4 g(生药)/kg](根据体表面积法换算, 分别相当于人临床用量的4、2、1倍), 每组12只。除空白对照组大鼠ig等体积生理盐水外, 其余各组大鼠分别于每周一、四ig醋酸泼尼松片(4.5 mg/kg)复制骨质疏松模型。同时, 于每周一至六ig相应药物, 每天1次, 空白对照组和模型组ig等体积生理盐水(0.5 ml/100 g)。每周称大鼠体质量1次, 根据体质量调整给药量。各组大鼠分别于处死(实验结束)前16、6 d, ip四环素30 mg/kg, 以对骨进行荧光标记。

2.2 股骨骨密度的测定

各组大鼠于处死前3 d, ip 10%水合氯醛溶液(0.3 ml/100 g), 取俯卧位置, 采用双能X线骨密度测量仪进行全身扫描, 进行两侧股骨骨密度测定。

2.3 标本采集

大鼠于处死前禁食14 h后, ip 10%水合氯醛溶液(0.3 ml/100 g)。待大鼠麻醉后, 腹主动脉取血; 处死大鼠, 取大鼠右侧胫骨制作不脱钙骨切片, 用于骨组织形态计量指标的检测; 取大鼠左侧肾脏, 剥离外层包膜, 消毒刀片将其分为两半, 分别置于高压灭菌的空白离心管内, -80 °C冰箱冻存, 备用。

2.4 骨组织形态计量指标的测定

2.4.1 不脱钙骨切片的制作及染色 取大鼠右侧胫骨近端1/3, 置于4%多聚甲醛溶液(pH7.4)中固定24 h, 脱水(80%乙醇2 d、95%乙醇2 d、100%乙醇2 d、二甲苯2 d), 标本依次在塑料聚合液I液、II液、III液中各浸泡3 d进行固定(固定、脱水和浸泡过程均在4 °C条件下进行)。然后将400 μ l N,N-二甲基对甲苯胺加至100 ml预冷(4 °C)的III液中, 用磁力搅拌器(1 000 r/min, 37 °C)搅拌10 min后, 在青霉素小瓶中注入7 ml III液, 将骨标本按同一方向放入瓶底, 用注射器抽空包埋瓶中空气, 然后置于-20 °C冰箱中聚合1周, 变为无色透明的坚硬包埋块。修块后, 在Reichert-Jung 2040切片机上, 每块骨组织用钨钢刀切出5 μ m的纵向不脱钙骨切片各2张, 其中1张用于甲苯胺蓝染色, 1张直接用于荧光观察。

2.4.2 骨组织形态计量方法 采用Leica-Qwin图像分析系统, 对不脱钙骨切片进行形态计量。骨小梁体积百分比: 骨小梁体积占被测骨髓腔总体积的百分比; 骨小梁矿化率(MAR):

骨小梁表面荧光双标记带的平均距离除以2次标记相隔的天数; 骨皮质矿化率(mAR): 皮质内表面荧光双标记带的平均距离除以2次标记相隔的天数。

2.5 Western blot法检测肾组织中Msx-2蛋白表达

采用细胞裂解法提取大鼠肾组织总蛋白, 考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 加聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液, 在沸水中煮沸5 min进行蛋白变性。按照试剂盒说明书制备5%的浓缩胶和10%的分离胶, 进行上样, 先恒压80 V, 待样品跑至分离胶与浓缩胶交界处时, 调电压为100 V, 待样品跑至分离胶底部时, 关闭电源。根据胶的大小进行裁胶, 进行SDS-PAGE电泳, 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转印, 加5%脱脂奶粉溶液于37 °C封闭1 h, 抗体稀释液PBST洗涤3次; 分别加入Msx-2和 β -actin一抗, 于4 °C孵育过夜, PBST洗涤5次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h, 再用洗涤缓冲液TBST室温下洗涤5次; ECL反应液A和B混合后滴加至膜上约1 min, 进行显色。应用Bio-imaging System图象处理系统分析内参 β -actin及目的基因条带的光密度值, 以目的条带光密度值/ β -actin光密度值来表示目的蛋白的相对表达水平。

2.6 RT-PCR法检测肾组织中Msx-2 mRNA表达

采用Trizol法提取肾组织中的总RNA, 分光光度法测260、280 nm波长处的吸光度(OD)值。RNA的 λ 值(OD₂₆₀/OD₂₈₀)为2.0左右, 提示RNA样品为纯品。采用RT-PCR法检测肾组织Msx-2 mRNA的表达。引物序列根据Primer 3软件设计, 经美国国立生物技术信息中心NCBI数据库检测所得Msx-2引物序列, 由北京华大基因公司合成(引物序列见表1)。反应条件: 94 °C、5 min; 94 °C、20 s, 58 °C、30 s, 68 °C、45 s, 35个循环; 68 °C、10 min。应用Lightcycler 480荧光定量PCR仪自身所携带的计算软件进行样品灰度值的计算^[9], 以 β -actin为内参照基因进行定量分析, 以目的基因灰度值/ β -actin灰度值来表示目的基因Msx-2 mRNA的相对表达水平。

表1 引物序列及产物大小

Tab 1 Primer sequences and product size

基因	引物序列	产物大小, bp
Msx-2	上游: GGGCACAGAGGATG	294
	下游: GGGGAAGAGTGGACAGG	
β -actin	上游: CGTGCGTGACATTAAGAG	132
	下游: TTGCCGATAGTGATGACCT	

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 壮骨伸筋胶囊对模型大鼠股骨骨密度的影响

与空白对照组比较, 模型组大鼠股骨骨密度明显降低(P<0.01); 与模型组比较, 骨疏康颗粒组及壮骨伸筋胶囊低、中、高剂量组大鼠股骨骨密度明显增加(P<0.01)。各组大鼠股骨骨密度测定结果见表2。

3.2 壮骨伸筋胶囊对模型大鼠骨组织形态计量指标的影响

与空白对照组比较, 模型组大鼠骨小梁体积百分比明显降低、mAR明显升高(P<0.01), MAR差异无统计学意义(P>0.05); 与模型组比较, 骨疏康颗粒组和壮骨伸筋胶囊中、高剂量组大鼠骨小梁体积百分比升高(P<0.05或P<0.01), 且骨疏康颗粒组和壮骨伸筋胶囊高剂量组大鼠mAR降低(P<0.05), MAR差异无统计学意义(P>0.05)。各组大鼠骨小梁

体积百分比、MAR、mAR测定结果见表3。

表2 各组大鼠骨密度测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量,g(生药)/kg	骨密度,g/cm ³
空白对照组		0.279±0.034
模型组		0.236±0.027*
骨疏康颗粒组	3	0.296±0.023#
壮骨伸筋胶囊高剂量组	5.4	0.274±0.02#
壮骨伸筋胶囊中剂量组	2.7	0.269±0.021#
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.4	0.280±0.018#

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$

Note:vs. blank control group,* $P<0.01$;vs. model group,# $P<0.01$

表3 各组大鼠骨小梁体积百分比、MAR、mAR测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Volume percentage of bone trabecula, MAR and mAR of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量,g(生药)/kg	骨小梁体积百分比,%	MAR, $\mu\text{m}/\text{d}$	mAR, $\mu\text{m}/\text{d}$
空白对照组		24.1±5.0	2.2±0.6	7.1±1.2
模型组		16.5±4.2*	2.2±0.3	8.5±1.2*
骨疏康颗粒组	3	22.7±6.0##	2.0±0.3	6.8±1.3##
壮骨伸筋胶囊高剂量组	5.4	21.7±5.5#	2.0±0.4	7.3±1.1#
壮骨伸筋胶囊中剂量组	2.7	20.6±4.5#	2.0±0.3	7.6±1.1
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.4	16.7±3.7	2.1±0.3	7.8±0.9

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

Note:vs. blank control group,* $P<0.01$;vs. model group,# $P<0.05$,## $P<0.01$

3.3 壮骨伸筋胶囊对模型大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,骨疏康颗粒组和壮骨伸筋胶囊高剂量组大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达明显上调,且壮骨伸筋胶囊中、低剂量组大鼠肾组织中Msx-2蛋白表达明显上调($P<0.05$)。各组大鼠肾组织中Msx-2蛋白表达电泳图见图1、Msx-2 mRNA及其蛋白表达测定结果见表4。

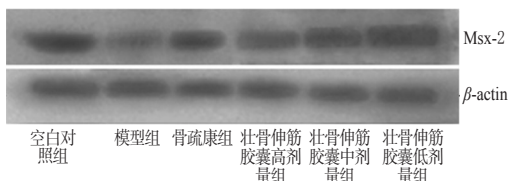


图1 各组大鼠肾组织中Msx-2蛋白表达电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expression of Msx-2 protein in renal tissue of rats in each group

4 讨论

现代中医理论认为骨质疏松的发病关键是“肾虚”。由于各种原因导致的肾气、肾阳或肾阴的不足,会影响骨髓和血之化源,精不生髓,发生骨骼脆弱无力之症^[4]。泼尼松为常见的糖皮质激素^[5],能促进骨吸收、抑制骨形成,同时能促进骨髓脂肪化,增加骨内压,长期ig泼尼松可造成明显的骨质丢失^[6-7],进而导致骨质疏松的形成^[8]。

Msx-2基因是肌节同源框基因家族中的一员,其编码的蛋白可通过级联反应调控一系列基因表达,调节肾小管对钙的重吸收,从而间接影响骨吸收^[9-10]。骨密度是单位面积骨中矿物质含量^[11],骨密度减少是骨质疏松症的主要病理表现,也是

表4 各组大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Expression of Msx-2 mRNA and its protein in renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量,g(生药)/kg	Msx-2蛋白	Msx-2 mRNA
空白对照组		1.45±0.016	0.903±0.012
模型组		0.95±0.035*	0.717±0.013**
骨疏康颗粒组	3	1.41±0.021#	1.072±0.024#
壮骨伸筋胶囊高剂量组	5.42	1.14±0.016#	1.075±0.068#
壮骨伸筋胶囊中剂量组	2.71	1.02±0.019#	1.061±0.191
壮骨伸筋胶囊低剂量组	1.36	0.99±0.027#	0.886±0.170

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

Note:vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. model group,# $P<0.05$

目前诊断和评价骨质疏松症的重要指标。本试验结果显示,ig泼尼松13周后,与空白对照组比较,模型组大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达明显下调,提示骨吸收增强,进而可导致大鼠骨质疏松症。从股骨骨密度及骨形态计量指标分析,模型组大鼠股骨骨密度明显减少、骨小梁体积百分比明显降低、mAR明显升高,这说明骨质疏松模型大鼠造模成功。ig壮骨伸筋胶囊13周后,壮骨伸筋胶囊给药组大鼠肾组织中Msx-2 mRNA及其蛋白表达上调;从股骨骨密度及骨形态计量指标分析,壮骨伸筋胶囊给药组大鼠股骨骨密度增加、骨小梁体积百分比升高、mAR降低,表明其有效防治了泼尼松所致的大鼠骨质疏松。

综上所述,壮骨伸筋胶囊可能是通过上调Msx-2 mRNA及其蛋白的表达而发挥对泼尼松所致的大鼠骨质疏松症的防治作用,但其具体、确切的作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 渠海波,张朝,吴刚.骨质疏松的研究进展[J].包头医学院学报,2013,29(3):119.
- [2] 李熔.壮骨伸筋胶囊治疗根型颈椎病疗效观察[J].中医正骨,2005,17(8):58.
- [3] 王林.在医学检验中应用实时荧光定量PCR技术的研究进展[J].当代医药论丛,2015,13(3):8.
- [4] 邹丽宜,许碧莲,陈文双,等.仙珍骨宝对骨质疏松模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(23):2130.
- [5] 张丽丽,傅晓敏,刘敏燕,等.药源性骨质疏松综述[J].中国药物应用与监测,2015,12(6):383.
- [6] 贾经汉,邱新建,陈志坚.骨质疏松动物模型的研究进展[J].中国康复医学杂志,2007,22(8):765.
- [7] 刘盛业,付勤.糖皮质激素性骨质疏松致病机制最新研究进展[J].中国骨与关节杂志,2015,4(11):877.
- [8] 邹丽宜,吴铁,崔燎.复方司坦唑醇抗泼尼松性大鼠骨质疏松作用研究[J].中国药理学通报,2004,20(9):1045.
- [9] 王剑.基于Runx2相关基因表达级联调控对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠肾虚证候病机的研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [10] 明磊国,陈克明.骨形成过程两条重要的信号传导通路[J].中国骨质疏松杂志,2011,17(3):275.
- [11] 陈露,赵琳.维生素D受体及骨密度的研究进展[J].医学综述,2014,20(23):4351.

(收稿日期:2015-09-19 修回日期:2016-01-20)

(编辑:林静)