

· 药物研究 ·

补肾方药对骨质疏松大鼠骨中 LIM 矿化蛋白 1 表达的影响

刘素彩 李桃 李恩

【摘要】 目的 探讨补肾方药预防糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松发生的机理。方法 通过肌肉注射地塞米松造成骨质疏松模型,观察补肾中药对骨密度的影响,从骨骼中提取 mRNA,采用 RT-PCR 方法对 LIM 矿化蛋白(LMP-1)进行半定量。结果 病理组大鼠的骨密度及骨骼中 LMP-1 的表达明显降低($P < 0.05$),而补肾方药组的骨密度及 LMP-1 的表达明显高于地塞米松组($P < 0.05$)。结论 地塞米松抑制 LMP-1 在骨骼的表达,而补肾方药可通过提高 LMP-1 在骨的表达而预防骨质疏松的发生。

【关键词】 地塞米松; LMP-1 mRNA; 骨质疏松; 补肾方药

Effects of a Chinese traditional kidney-tonifying compound on expression of LIM mineralization protein in osteoporotic rat bone LIU Sucai, LI Tao, LI En. Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China.

【Abstract】 Objective To study the mechanism by which a traditional Chinese kidney-tonifying compound prevents dexamethasone-induced osteoporosis. Methods 36 Wistar rats were divided into three groups: control group was injected with 0.9% sodium chloride solution, dexamethasone group (DEX) and traditional Chinese medicine group (TCM) were injected with dexamethasone (0.1 mg/100 g weight) twice a week. TCM group was given kidney-tonifying compound (0.32 g/100 g weight) at the same time. After 12 weeks the rats were killed and the total mRNA was extracted from the bone. The expression of LMP-1 was semi-quantified by RT-PCR. Results The bone mineral density and the expression of LMP-1 of the rats in DEX group decreased significantly and those of the rats in TCM group did not decrease. Conclusion Traditional Chinese kidney-tonifying medicine prevents dexamethasone-induced osteoporosis by up-regulating expression of LMP-1.

【Key words】 Dexamethasone; LMP-1 mRNA; Osteoporosis; Traditional Chinese kidney-tonifying medicine

糖皮质激素在临床上应用非常广泛,如系统性红斑狼疮、皮肤病、类风湿关节炎、肾病、哮喘、器官移植等疾病的治疗。长期大剂量使用糖皮质激素的主要副作用之一就是骨质疏松症^[1,2]。对其诱发骨质疏松症的机理已进行了广泛而深入的研究,它可抑制成骨细胞的分化而影响其发挥成熟成骨细胞的功能^[3],从而减少骨形成。由于 Lin-11^[4]、IsI-1^[5]、Mec-3^[6] 3 种蛋白的 C 末端含有相似的结构,即半胱氨酸和组氨酸重复出现而形成的锌指结构,因此将具有相似结构的蛋白叫做 LIM 功能域蛋白。LIM 功能域是一种能与锌结合的结构,介导特异的蛋白与蛋白间的相互作用,在与细胞生长、分化有关的多种蛋白中出现^[7]。LMP-1 是 LIM 家族成员之一, LMP-1

在骨骼中表达,它是成骨细胞分化过程中必不可少的正调节因子,生理剂量的地塞米松可使 LMP-1 的表达增强^[8]。大剂量的地塞米松有可能通过影响 LMP-1 的表达而抑制成骨细胞的分化从而导致骨质疏松。我室研制的补肾方药可促进成骨细胞的分化,起到防治骨质疏松的作用^[9,10],此作用是否是通过对抗地塞米松对 LMP-1 的抑制而实现的,本文就这些问题进行了初步探讨。

材料和方法

一、材料

1. 中药:中药组方为熟地黄、山萸肉、山药、淫羊藿、茯苓、泽泻等,邯郸药厂制造。

2. 动物:6 月龄雌性 Wistar 大鼠 36 只,体重 250 ~ 320 g,购自天津市医学实验动物开发中心。

二、实验方法

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学生物化学教研室(刘素彩、李恩),附属第三医院骨科研究所(李桃)

1. 动物喂养:将36只大鼠随机分为3组,正常对照组12只,肌肉注射生理盐水、地塞米松模型组和中药组各12只,肌肉注射地塞米松(南京第三制药厂生产,剂量0.1 mg/100 g体重),同时正常组灌胃蒸馏水,中药组灌胃补肾方药(0.32 g/100 g体重)。喂以正常饲料,自由饮水,室温为20~25℃。12周后,禁食、禁水24 h,留尿,于-20℃存放备用,股动脉放血处死动物,留取血清,于-70℃存放备用,取3只动物的椎骨及右侧股骨做病理切片,其余右侧股骨及胫骨做骨密度检测,左侧股骨用于提取总RNA。

2. 观察指标:血清及尿钙、血清碱性磷酸酶(ALP)按试剂盒说明测定试剂盒由北京化工厂提供,无机磷、肌酐测定试剂盒由石家庄试剂公司提供,血清骨钙素(BGP)、雌二醇(E₂)用放射免疫法测定,试剂盒由中国医学科学技术中心提供,放免测定仪为F1-603井型γ闪烁探头(三六一厂生产)。骨密度用双光能X线骨密度仪测定(美国Lunar公司)。骨组织病理切片由本校组胚教研室制作。

3. 总RNA的提取:从骨干断端取样提RNA。所用方法为异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法,OD260/OD280鉴定纯度,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定完整性。异硫氰酸胍为Serva产品,琼脂糖为Sigma产品。

4. 反转录反应:反转录体系中加入5×buffer、dNTP、RNasin、Amv、mRNA等混匀,42℃水浴45 min,95℃灭活5 min。反转录酶、Random Primer、RNasin、dNTPS由北京鼎国生物工程公司提供。

5. PCR反应:反应体系中加入反转录产物、TagDNA聚合酶(Promega分装)、上游引物、下游引物。对β-actin及LMP-1进行扩增,β-actin扩增条件:95℃变性3 min;94℃变性1 min,59℃退火1 min,72℃复性1 min;72℃复性5 min。33次循环。LMP-1扩增条件:95℃变性3 min;94℃变性45 s,58℃退火45 s,72℃复性45 s;72℃复性6 min。33次循环。PCR循环仪(EquiBio)由美国生产。PCR产物于1.5%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下摄影,扫描分析结果。PCR引物由上海生物工程公司合成。

β-actin 上游 5' TCCTAGCACCATGAAGATC 3'

(190 bp) 下游 5' AAACGCAGCTCAGTAACAG 3'

LMP-1 上游 5' CCACGTATGAGCACCTCCTC 3'

(260 bp) 下游 5' CACAGCTACATACAGTTTATTG

3'

结 果

1. 大鼠血、尿生化指标的变化:DEX组大鼠血清钙、磷、雌二醇与正常组比较无差异($P > 0.05$),DEX组血清ALP较正常组明显升高($P < 0.05$),血清BGP降低($P < 0.05$),而中药组的血清BGP较DEX组明显升高($P < 0.05$)。结果见表1。DEX组尿钙/肌酐与正常组相比明显升高($P < 0.05$),尿磷/肌酐、羟脯氨酸/肌酐则降低($P < 0.05$),中药组的尿钙/肌酐较DEX组降低($P < 0.05$),尿磷/肌酐、羟脯氨酸/肌酐则升高($P < 0.05$)。结果见表2。

表1 大鼠血钙、磷、ALP、BGP、雌二醇的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	血钙 mmol/L	血磷 mmol/L	血 ALP U/L	血 BGP ng/ml	血雌二醇 pg/ml
正常组	3.277 ± 1.763	2.225 ± 0.425	2.928 ± 1.146	1.956 ± 0.556	5.810 ± 1.080
DEX 组	3.177 ± 2.930	2.574 ± 0.693	5.067 ± 1.750 [*]	1.170 ± 0.450 [*]	3.759 ± 0.760
中药组	3.057 ± 2.636	2.989 ± 0.727	3.675 ± 1.659 [#]	1.748 ± 0.628 [#]	4.410 ± 0.761

注:与正常组比较^{*} $P < 0.05$,^{*} $P < 0.01$,与DEX组比较[#] $P < 0.05$

表2 大鼠24 h尿钙/肌酐、尿磷/肌酐、羟脯氨酸/肌酐的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	尿钙/肌酐	尿磷/肌酐	羟脯氨酸/肌酐
正常组	0.394 ± 0.127	4.900 ± 1.811	17.466 ± 6.578
DEX 组	1.082 ± 0.313 [*]	2.222 ± 1.501 [*]	9.646 ± 3.810 [*]
中药组	0.525 ± 0.287 [#]	4.780 ± 1.532 [#]	16.159 ± 3.780 [#]

注:与正常组比较^{*} $P < 0.05$;与DEX组比较[#] $P < 0.05$

2. 补肾方药及糖皮质激素对大鼠骨密度、体重的影响:DEX组的胫骨骨密度、股骨骨密度、体重与正常组比较都显著降低($P < 0.05$)。而中药组的胫骨骨密度、股骨骨密度都较DEX组明显升高($P <$

0.05),体重则无明显改变($P > 0.05$)。结果见表3。

表3 大鼠骨密度、体重的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	胫骨骨密度 (g/cm ²)	股骨骨密度 (g/cm ²)	体重 (g)
对照组	0.197 ± 0.023	0.228 ± 0.025	254.55 ± 19.22
DEX 组	0.172 ± 0.032 [*]	0.197 ± 0.021 [*]	224.90 ± 14.32 [*]
中药组	0.204 ± 0.008 [#]	0.239 ± 0.017 [#]	226.818 ± 12.584

注:与正常组比较^{*} $P < 0.05$;与DEX组比较[#] $P < 0.05$

3. 大鼠股骨、椎骨组织病理改变:DEX组股骨及椎骨的骨小梁稀疏变薄,骨髓腔扩大,部分区域可见骨小梁断裂,且可见大量的脂肪细胞,而中药组与

DEX组比较,股骨及椎骨的骨小梁明显宽厚,数目也显著增加,未见骨小梁断裂,少见脂肪细胞。

4. 补肾方药与 LMP-1 表达的影响

(1) β -actin 的表达在 25 到 40 次之间都呈指数增长,40 次以后达到平台期,所以 β -actin 选择 35 次循环。LMP-1 的表达在 25 到 35 次之间都呈指数增长,35 次以后达到平台期,所以 LMP-1 选择 33 次循环。结果见图 1~3。

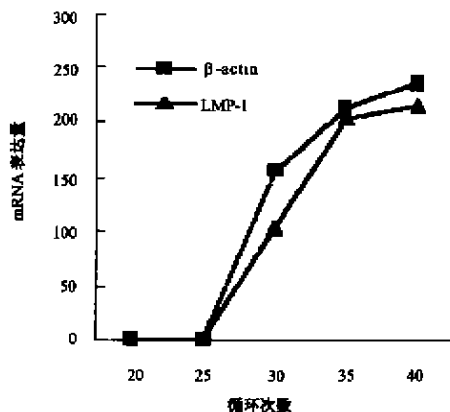


图 1 不同循环次数时 β -actin 和 LMP-1 的表达

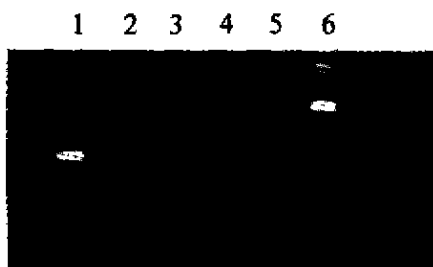


图 2 不同循环次数时 β -actin 的表达

1 泳道为 Marker, 2, 3, 4, 5, 6 泳道分别为 20, 25, 30, 35, 40 次 β -actin 循环

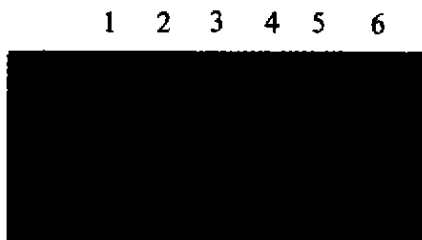


图 3 不同循环次数时 LMP-1 的表达

1 泳道为 Marker, 2, 3, 4, 5, 6 泳道分别为 20, 25, 30, 35, 40 次 LMP-1 循环

(2) 补肾方药对 LMP-1 表达的影响: 将 PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳后可以看出, DEX

组的 LMP-1 的表达明显降低, 与正常组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。中药治疗组的 LMP-1 的表达较 DEX 组显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 4~6 及表 4。

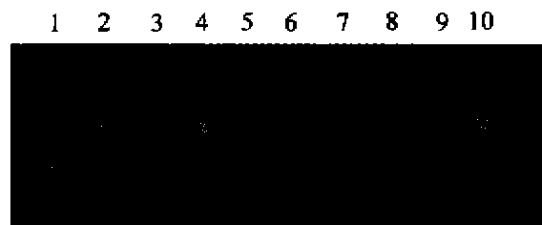


图 4 不同组别 β -actin 的表达

1 泳道为 Marker, 2, 5, 8 泳道为 DEX 组的 β -actin, 3, 6, 9 泳道为正常组的 β -actin, 4, 7, 10 泳道为中药组的 β -actin

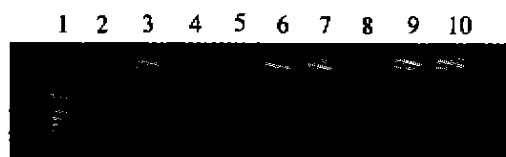


图 5 不同组别 LMP-1 的表达

1 泳道为 Marker, 2, 5, 8 泳道为 DEX 组的 LMP-1, 3, 6, 9 泳道为正常组的 LMP-1, 4, 7, 10 泳道为中药组的 LMP-1

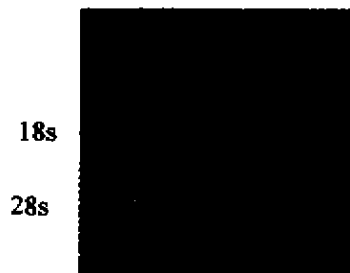


图 6 RNA

表 4 各组大鼠骨骼中 LMP-1 的表达量

组别	LMP-1 mRNA
正常组	1.028 ± 0.406
DEX 组	0.333 ± 0.104*
中药组	0.823 ± 0.209*

注: 与正常组比较 * $P < 0.01$; 与 DEX 组比较 # $P < 0.01$

讨 论

1. 地塞米松诱导的大鼠骨质疏松模型的建立

本实验中 DEX 组大鼠血清碱性磷酸酶明显升高, 但这并不能说明地塞米松能够促进骨形成, 因为实验中所测得碱性磷酸酶来源于多个脏器, 地塞米松对肝脏、小肠等的副作用而使血清中的碱性磷酸

酶升高,DEX 组大鼠血清骨钙素明显降低,尿钙/肌酐明显升高,说明地塞米松能够促进骨矿物质分解,使钙从骨骼流失增加,骨代谢紊乱,骨小梁稀疏变薄、断裂、骨髓腔扩大、脂肪细胞增加,骨密度降低,说明地塞米松已成功诱导出大鼠骨质疏松模型。

2. 地塞米松对 LMP-1 表达的抑制作用

LIM 功能域是具有半胱氨酸和组氨酸结构组件的保守序列,含有两个锌指结构^[11],介导蛋白之间的相互作用^[12]。LMP-1 是 LIM 蛋白家族的成员之一,LMP-1 以不同的水平在成年大鼠的肾脏、心脏、脑、肺及骨骼肌表达,也在胎鼠骨表达。小鼠及人的 LMP-1 的 cDNA 也已克隆出来。LMP-1 是成骨细胞分化过程中不可缺少的正调节因子,是一种细胞内的非分泌蛋白,体外实验发现,如果用反义寡核苷酸阻断 LMP-1 mRNA 的翻译,那么成骨细胞的分化就受到阻碍,相反当它过表达时可通过促使其他可溶因子的分泌而诱导成骨细胞的分化,如调节成骨细胞转录因子核结合因子 α -1 (cbfa1) 及骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 的转录,但其确切的作用机理尚不清楚,总之它在骨形成过程中的软骨骨化这一步骤起重要作用。LMP-1 是成骨细胞分化必不可少的调节因子^[8],较低浓度的地塞米松 (1nM) 可明显刺激成骨细胞的分化,并促进 LMP-1 的表达。大剂量糖皮质激素可抑制成骨细胞的分化,而过量糖皮质激素抑制成骨细胞的增殖与分化,使成熟的、具有分泌基质的成骨细胞及支撑破骨细胞产生的成骨细胞数目减少^[13],本实验发现大量应用地塞米松降低 LMP-1 在骨骼中的表达,有可能进一步抑制成骨细胞的分化,使骨形成减少而引起骨质疏松。

3. 补肾方药对 LMP-1 表达的影响

糖皮质激素常用来建造大鼠肾阳虚模型^[14]。本实验中给大鼠肌肉注射地塞米松,实验初期大鼠无明显变化,但随着地塞米松的使用时间的延长,大鼠逐渐出现肌肉消瘦、肢体倦怠、体重减轻、毛色枯黄易落等肾脾阳虚的症候表现。在“肾为先天之本,主骨生髓,脾为后天之本,主四肢肌肉”中医理论的指导下,根据中医“不治已病治未病”的原则,我室研制了补肾方药来预防糖皮质激素诱导的骨质疏松症。运用现代医学手段对此方已进行了较深入的研究,已证明它能促进成骨细胞的分化^[9,10]。本实验

结果提示补肾方药可提高 LMP-1 在骨骼的表达,所以该方药可能通过提高 LMP-1 的表达促进成骨细胞的分化,对抗糖皮质激素对成骨细胞分化的抑制作用,这是补肾方药补肾壮阳、对糖皮质激素诱发的骨质疏松起到标本兼治的机理之一。有关 LMP-1 的作用及补肾方药的作用机理仍需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med*, 1990, 112:352-364.
- 2 Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem*, 1994, 56:295-302.
- 3 Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 1998, 102:274-282.
- 4 Freyd G, Kim SK, Horvitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*, 1990, 344:876-879.
- 5 Karlsson O, Thor S, Norberg T, et al. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, 1990, 344:879-882.
- 6 Way JC, Chalfie M. *Mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*, 1988, 45:5-16.
- 7 Schneibel KL, Beckerle MC. LIM domains of cysteine-rich protein 1 (CRP1) are essential for its zyxin-binding function. *Biochem J*, 1998, 331:885-892.
- 8 Scott DB, Yunshan LIU, Gregory AH, et al. LMP-1, A LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation. *Endocrinology*, 1998, 139:5125-5134.
- 9 李芳芳,李恩,吕占军.补肾方剂及不同分离组分对成骨细胞增殖分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(3):71-73.
- 10 李芳芳,李恩.淫羊藿对大鼠成骨细胞增殖分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(2):70-71.
- 11 Wang M, Drucker DJ. The LIM domain homeobox gene *isl-1*: conservation of human, hamster, and rat complementary deoxyribonucleic acid sequences and expression in cell types of nonneuroendocrine lineage. *Endocrinology*, 1994, 134:1416-1422.
- 12 David IB, Breen JJ, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14: 156-162.
- 13 Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 1998, 102:274-282.
- 14 夏宗勤,胡镇球,胡雅,等.四种虚症模型的建立及其与环核苷酸系统的关系. *中西医结合杂志*, 1994, 4:543-545.