

补肾中药对增龄成骨细胞 VDR 蛋白表达的影响

魏义勇 石印玉 冯伟 詹红生

摘要：目的 观察维生素 D 受体(VDR)蛋白在增龄大鼠成骨细胞中的表达,研究补肾中药对增龄大鼠成骨细胞 VDR 蛋白的影响,探讨补肾中药促进骨形成的新机制。方法 来源于不同年龄的大鼠成骨细胞被分离,采用组织块翻转方法培养。通过倒置显微镜观察细胞形态、矿化结节染色对成骨细胞加以鉴定。采用免疫组化和 western blot 方法检测成骨细胞 VDR 蛋白表达。结果 免疫组化和 western blot 结果表明,在增龄大鼠成骨细胞中,补肾益精方、固本壮骨胶囊、金匱肾气丸可上调 VDR 蛋白表达,但是知柏地黄丸对于 VDR 蛋白表达的影响却存在着差异。结论 补肾益精方、固本壮骨胶囊、金匱肾气丸上调增龄成骨细胞 VDR 蛋白的表达,但知柏地黄丸对于 VDR 蛋白表达的影响却存在着明显的差异。

关键词：补肾中药；维生素 D 受体；成骨细胞

Effects of Chinese medicine(Bushen) on expression of VDR protein in aging osteoblast WEI Yiyong^{*}, SHI Yinyu, FENG Wei, et al. ^{*} Institute of Orthopedics, Xijing Hospital, The Fourth Military University, Xi'an 710032, China

Abstract : Objective To observe the expression of vitamin D receptor (VDR) protein in aging osteoblast , investigate the effects of Bushen(Chinese medicine) on the expression of VDR and try to provide new mechanisms of Chinese medicine on bone formation. **Methods** Rat osteoblast from different age donors(6 months and 16 months) were isolated and cultured by the tissue-fragment-migrating-growth method. Their biological characteristic were observed by phase-contrast microscope , mineralizing nodule staining and electromicroscope. VDR protein staining was performed with immunohistochemistry , and the expression of VDR protein was examined through Western blot. **Results** Immunohistochemistry and Western blot showed that Bushenyijing , Gubenzhuanggu , Jinkuishenqi upregulated the expression of VDR protein among Bushen Chinese medicine in aging osteoblast , but the expression was different in Zhibaidihuang. **Conclusions** The expression of VDR protein was upregulated by Bushenyijing , Gubenzhuanggu , Jinkuishenqi with aging osteoblast , which was different in Zhibaidihuang.

Key words : Bushen Chinese medicine ; Vitamin D receptor ; Rat osteoblast

一般认为,骨代谢是维持骨组织不断更新,保持生命活力的基本过程,这一过程是依靠骨重建(bone remodeling)完成的。骨质疏松症骨量丢失的潜在机理是骨重建过程的失调。研究证实骨形成过程可受到多种因素的影响,目前发现与骨形成相关的细胞核内蛋白如维生素 D 受体、Cbf α 1 等对骨形成有重要的影响。本实验以增龄大鼠成骨细胞为研究对象,探讨补肾中药对成骨细胞内核蛋白维生素 D 受体的影响,以期为进一步提高补肾中药在骨质疏松

症防治的有效性^[1]。

1 材料和方法

1.1 实验分组

取正常 6 月龄 SD 大鼠,共 70 只,体重为(270 $\pm$ 20)g,雌雄各半,由上海中医药大学实验动物中心提供。将 SD 大鼠随机分为 7 组,即:正常组、生理盐水组、单味补阳组、复方补阳组、复方平补组、复方补阴组和西药对照组。

1.2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪,紫外分光光度计(Beckman,德国),H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂),紫外成像分析系统(上海天能科技有限公司),Tanon GIS 凝胶图像处理系统 3.70 版(上海天能科技有限

作者单位:710033 第四军医大学西京医院全军骨科研究所(魏义勇);上海中医药大学附属曙光医院骨伤科(石印玉、詹红生);上海第二医科大学伤骨科研究所(冯伟)

通讯作者:魏义勇,Email:weiyiyong@fmmu.edu.cn

公司), DMEM/Ham F 12(GibcoBRL, 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, 100 μ g/mL), D-Hanks 平衡液, SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士得公司), I 抗: 羊抗大鼠(Santa Cruz Biotechnology, Inc)

1.3 实验方法

1.3.1 不同龄大鼠成骨细胞的培养: 分别取 6 月龄和 16 月龄 SD 大鼠, 用 0.3% 戊巴比妥钠麻醉(1 mL/100 g) 腹腔麻醉后在无菌条件下取双侧股骨两端, 剔除骨膜和周围结缔组织, 无菌 PBS 液反复冲洗 3 次, 剪成约 1 mm³ 大小的骨粒, PBS 液反复冲洗至骨粒呈白色, 将骨粒均匀接种于含 20% 灭活新生牛血清 DMEM/F 12(1:1) 培养液的培养瓶中, 用翻转培养法培养于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中。两周后换液, 以后每隔 2 d 换一次培养液, 细胞生长融合达 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 以 1.6×10^4 个/cm² 细胞密度接种于 25 cm² 培养瓶中。实验用第 2 代培养的细胞。

1.3.2 不同龄大鼠成骨细胞功能鉴定: 成骨细胞汇合达 80% 后, 用 0.25% 胰酶消化液消化, 以 3×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板中, 每隔 2 d 换液, 观察矿化结节染色, 橘红色为阳性。

1.3.3 含药血清的制备: 每组均按体表面积折算动物等效剂量的方法给予复方补阴中药知柏地黄丸(兰州佛慈药厂生产, 批号 019804) 复方平补中药补肾益精方(上海中医药大学附属曙光医院制剂室生产, 批号 010521) 单味补阳中药固本壮骨胶囊(浙江迪耳药业有限公司生产, 批号 021012) 复方补阳中药金匮肾气丸(兰州佛慈药厂生产, 批号 019604) 和西药阿法骨化醇(日本帝人株氏会社生产, 批号 5699), 于首次灌胃后间隔两小时后再次给药, 并于末次给药后 1 h 采血, 对照组是给予等量生理盐水灌胃后取血, 正常组则是在未灌胃的情况下直接采血。采血方法是以 1.1% 氨基甲酸乙酯腹腔注射(1.1/kg) 麻醉, 无菌条件下, 腹主动脉取血, 4 $^{\circ}$ C 离心 3000 r/min 20 min, 取上清, 56 $^{\circ}$ C、30 min 灭活, 经 0.22 μ m 滤膜抽滤除菌, 分装, -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.4 含药血清对成骨细胞的干预: 当细胞汇合达 60%, 换无血清培养液培养细胞 24 h 后, 加入含药血清(浓度为 10%) 再继续培养 3 d。

1.3.5 VDR 免疫组化染色: 纯丙酮室温固定 20~30 min, 蒸馏水洗, 纯甲醇加 H₂O₂ 室温至 0.5%, 室温浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3

次, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min; 甩去多余液体, 不洗; 滴加适当稀释(1:200) 的一抗(rat IgG) 4 $^{\circ}$ C 过夜; 0.1 M PBS 洗 2 min, 3 次; 滴加生物素化山羊抗大鼠 IgG, 20 min; 0.1 M PBS 洗 2 min, 3 次; 滴加试剂 SABC, 20 $^{\circ}$ C, 20 min; 0.1 M PBS 洗 5 min, 4 次; DAB 显色, 蒸馏水洗。染色结果应用莱卡计算机图像分析系统对各组细胞进行光密度测定, 检测细胞核灰度值。每组细胞平均取 6 个视野, 每个检测视野均将背景灰度值确定为 0~65。

1.3.6 Western blot 检测 VDR 蛋白表达: 提取蛋白并检测蛋白的含量, 加样后行水平电泳, 转膜、染色、封闭、结合 VDR 抗体(1:400) 显色、用 Image pro-plus 图像分析系统对蛋白条带进行处理分析。

1.3.7 统计学方法: 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 将所得数据输入计算机分析系统, 应用 SPSS 11.0 软件, 采用 One-Way ANOVA 进行检验。

2 结果

2.1 形态学的观察(图 1)

6 月龄大鼠骨组织块 24 h 可贴壁, 并见游离的小圆形细胞, 3~5 d 后骨粒边缘可见少量呈梭形、三角形的细胞移出。随着培养时间的延长, 游移出的细胞呈三角形等形态。体积较小, 胞体饱满, 胞浆向外伸展, 继而相邻细胞彼此贴靠或两者突起相连。16 月龄大鼠镜下可见细胞悬液中的细胞呈圆形, 大小不一。24 h 后更换培养液可隐约看到部分细胞开始贴壁, 变成椭圆形或梭形等。随着时间的延长, 胞体逐渐增大, 突起较长, 汇合后呈长梭形。

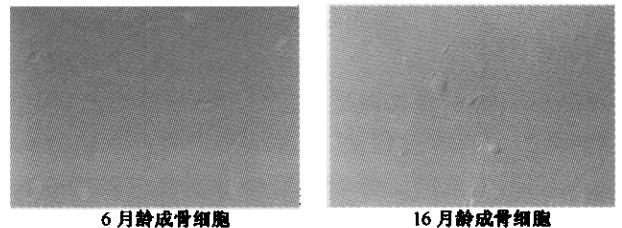


图 1 不同龄大鼠成骨细胞形态观察($\times 100$)

2.2 矿化结节染色(图 2)

大鼠成骨细胞培养 15 d 后可见橘红色的矿化结节形成。

2.3 VDR 蛋白含量的表达(图 3、图 4)

2.4 不同补肾中药对 VDR 蛋白表达影响的分析(表 1 和表 2)

表 1 可以看出, 知柏地黄丸组、补肾益精方组、固本壮骨胶囊组、金匮肾气丸组和阿法骨化醇组均

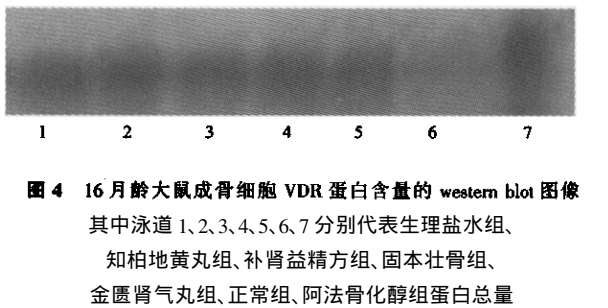
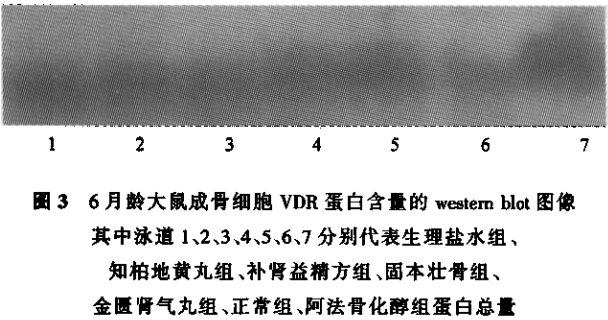
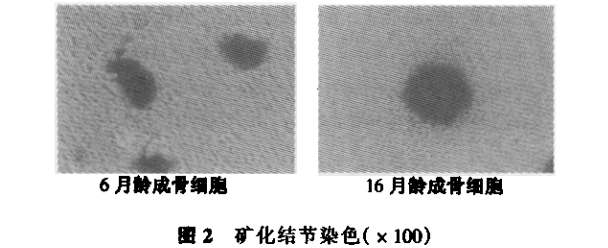


表 1 各组 6 月龄大鼠成骨细胞 VDR 蛋白测定的结果

组 别	例数	灰度值
A 正常组	6	1956.19 ± 580.65
B 生理盐水组	6	1778.63 ± 319.41
C 固本壮骨组	6	3676.78 ± 796.20 [#] *
D 金匱肾气丸组	6	3879.82 ± 981.49 [#] *
E 补肾益精方组	6	3360.72 ± 770.44 [#]
F 知柏地黄丸组	6	2826.80 ± 659.82 [#]
G 阿法骨化醇组	6	5017.62 ± 433.58 [*]

注 :与 A、B 组比较 ,[#]、* $P < 0.05$;* 与 # 比较 $P < 0.05$;※ 与 F 组比较 $P < 0.05$;C 与 D 比较 $P > 0.05$

表 2 各组 16 月龄大鼠成骨细胞 VDR 蛋白测定的结果

组 别	例数	灰度值
A 正常组	6	1395.77 ± 337.06
B 生理盐水组	6	1272.63 ± 133.00
C 固本壮骨组	6	2510.12 ± 288.99 [#]
D 金匱肾气丸组	6	2837.62 ± 328.00 [#]
E 补肾益精方组	6	1927.38 ± 417.02 [#]
F 知柏地黄丸组	6	1360.14 ± 302.82
G 阿法骨化醇组	6	3480.71 ± 647.63 [*]

注 :与 A、B、F 组比较 ,[#]、* $P < 0.05$;* 与 # 比较 $P < 0.05$;C 与 D 组比较 $P > 0.05$

能上调 6 月龄大鼠成骨细胞 VDR 蛋白的表达 ,以阿法骨化醇组上调最为明显 ,其次为金匱肾气丸组、固

本壮骨胶囊组、补肾益精方组和知柏地黄丸组。表 2 可以看出 ,补肾益精方组、固本壮骨胶囊组、金匱肾气丸组和阿法骨化醇组均能上调 16 月龄大鼠成骨细胞 VDR 蛋白的表达 ,以西药组上调最为明显 ,其次为金匱肾气丸组、固本壮骨胶囊组和补肾益精方组。

3 讨论

长期以来 ,维生素 D 一直被认为是一种基本营养素 ,是钙平衡的重要调节因子。但随着研究地逐渐深入 ,人们发现维生素 D 属于类固醇激素家族 ,具有多种生理功能如维持体内矿环境稳定 ,调节骨的微环境 ,影响骨细胞的功能 ,促进小肠钙的吸收 ,调控甲状旁腺激素的产生等^[2]。其中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是维生素 D 最具活性的代谢产物 ,主要作用于成熟的细胞^[3]。目前的研究已证实 ,维生素 D 可促进骨形成 ,降低骨折危险因素^[4]。体内实验证实 ,若给大鼠服用 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,无论服药时间长短 ,均可增加成骨细胞数量。除此以外 ,成骨细胞在分化、增生过程中 ,不断产生多种细胞外基质蛋白如骨钙素 (OCN) 、骨桥蛋白 (OPN) 等 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对于 OPN 和 OCN 的长期作用 ,将直接影响到新骨形成区域的非胶原蛋白的组成 ,同时 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 还可调控 I 型胶原、金属蛋白酶、骨唾液蛋白^[5]等成骨细胞胞外基质成分 ,以及影响成骨细胞的矿化、凋亡等。学者们普遍认为 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 之所以能够调控成骨细胞的功能 ,主要是通过受体介导的基因途径即维生素 D 受体 (vitamin D receptor ,VDR) 起作用的^[6]。

近年来 ,中医药在骨质疏松防治中取得了显著的进展。中医药防治骨质疏松症的主要机理是促进骨形成 ,降低或是减缓骨吸收 ,但究竟是如何促进骨形成 ,降低骨吸收 ,还不太清楚。本实验将含药血清方法与现代分子生物学技术结合 ,对其进行探讨。本研究发现 ,随着年龄的增加 ,大鼠成骨细胞 VDR 蛋白水平表达是下降的 ,补肾益精方组、固本壮骨胶囊组、金匱肾气丸组和西药阿法骨化醇组均可上调不同龄成骨细胞 VDR 蛋白水平的表达 ,但知柏地黄丸组对 VDR 蛋白水平表达的调控却存在着明显的差异。实验所揭示的随着增龄 ,大鼠成骨细胞 VDR 蛋白水平表达下降 ,这个结果与国外有关文献的报道是一致的。Martinez 等^[7]的研究表明 ,体外培养的成骨细胞由于增龄导致 VDR 表达量随之降低 ,同时也导致经生理剂量 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 所刺激骨钙素的分

泌随着供体年龄增长而降低,从而影响骨的形成功能。西药阿法骨化醇组可明显上调 VDR 蛋白表达,其原因是由于 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 具有上调自身受体表达的能力^[8],阿法骨化醇是 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 同系物,因此促进了 VDR 蛋白的表达。补肾中药中,补肾益精方、固本壮骨胶囊、金匱肾气丸之所以与阿法骨化醇具有相似的作用,即上调 VDR 蛋白表达,可能与这些中药具有促进成骨细胞增殖,或是活化了 VDR 蛋白有关。知柏地黄丸在调控 VDR 蛋白水平方面却存在着明显的差异,其差异的原因还需进一步的研究。除此以外,本实验结果也表明,单味补阳中药与复方补阳中药对 VDR 蛋白表达的作用效果是相似的(两者在统计学上无明显差异, $P > 0.05$)。这说明单味中药可以代替中药复方制剂,同时由于其质量易于控制,可为中医药的药物治疗开创一条新途径。

综上所述,补肾中药尤其是平补和补阳中药,之所以能够具有预防骨质疏松疾病的功能,与其上调 VDR 蛋白表达,促进骨形成有关,从而为拓展补肾中药在骨质疏松防治领域的应用奠定了良好的理论基础。

【参 考 文 献】

- [1] Shi Ying, Shi Guangtong, Shi Yinyu. A Clinical Study on Osteoporosis with Guben Zhuanggu Capsule. Chinese J Trad Med Trauma & Orthop, 2005, 13(4): 11-15.

- [2] Cheung R, Erclik MS, Mitchell J. $1,25$ -dihydroxyvitamin $\text{D}(3)$ stimulated protein kinase C phosphorylation of type VI adenyl cyclase inhibits parathyroid hormone signal transduction in rat osteoblastic UMR 106-01 cells. J Cell Biochem 2005, 94(5): 1017-1027.
- [3] Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, et al. Membrane mediated signaling mechanisms are used differentially by metabolites of vitamin $\text{D}(3)$ in musculoskeletal cells. Steroids, 2002, 67(6): 421-427.
- [4] Christiansen P. The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture. APMIS Suppl, 2001 (102): 1-52.
- [5] Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2000, 3(6): 433-4438.
- [6] Buitrago C, Vazquez G, De Boland AR, et al. The vitamin D receptor mediates rapid changes in muscle protein tyrosine phosphorylation induced by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(5): 1150-1156.
- [7] Martinez P, Moreno I, Meiguel DE, et al. Changes in osteocalcin response to vitamin D stimulation and basal vitamin D receptor expression in human osteoblastic cells according to donor age and skeletal origin. Bone, 2001, 29(1): 35-41.
- [8] Li XY, Boudjelal M, Xiao JH, et al. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 increases nuclear vitamin D_3 receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. Mol Endocrinol, 1999, 13(10): 1686-1694.

(收稿日期:2005-07-14)