

淫羊藿对肾阳虚雄性大鼠肾脏和股骨 BMP-7 表达的影响

周乐 崔燎 吴铁

中图分类号: R285.5; R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0090-05

摘要:目的 观察淫羊藿在醋酸泼尼松所致的肾阳虚雄性 SD 大鼠肾脏和股骨骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 的表达, 探讨淫羊藿的抗骨质疏松机制中 BMP-7 的作用。方法 3 月龄雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为正常组、肾阳虚模型组和淫羊藿组, 灌胃给药 90 d 后, ELISA 检测血清 BMP-7 含量, RT-PCR 检测肾脏和股骨 BMP-7 mRNA 的表达, 免疫组化检测肾脏和股骨 BMP-7 的表达部位及数量。结果 醋酸泼尼松致肾阳虚大鼠血清 BMP-7 含量下降 ($P < 0.05$), 肾脏和股骨 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达亦明显下降 ($P < 0.05$), 淫羊藿能提高血清 BMP-7 的含量 ($P < 0.05$), 并在 mRNA 水平 ($P < 0.05$) 和蛋白水平上增加肾脏 ($P < 0.05$) 和股骨 BMP-7 的表达。结论 醋酸泼尼松可导致肾脏和股骨 BMP-7 表达的减少, 淫羊藿可通过上调肾脏和股骨中 BMP-7 的表达, 增加诱导成骨作用, 修复骨组织损伤, 肾脏可能通过 BMP-7 的血循环途径调控骨骼疾病。

关键词: 淫羊藿; 醋酸泼尼松; BMP-7

The effects of epimedium on the expressions of renal and femoral bone morphogenetic protein-7 in male rats with kidney-YANG insufficiency ZHOU Le, CUI Liao, WU Tie. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

Abstract: **Objective** To observe epimedium on the expression of renal and femoral bone morphogenetic protein-7 in male rats with kidney-YANG insufficiency induced by prednisone and approach the role of bone morphogenetic protein-7 in epimedium anti-osteoporosis mechanism. **Methods** Twenty-four 3-months-old SD male rats were randomly divided into normal group, model group and treatment group, and each group received intragastric administration of normal saline, prednisone (3.2 mg/kg), and prednisone plus epimedium decoction (5 g/kg) for 90 days, respectively. Serum BMP-7 content was tested by ELISA, renal and femoral BMP-7 mRNA expressions were tested by RT-PCR, renal and femoral BMP-7 expressions were tested by immunohistochemistry. **Results** The serum BMP-7 content decreased ($P < 0.05$) in male rats with kidney-YANG insufficiency induced by prednisone, renal and femoral BMP-7 mRNA and BMP-7 obviously decreased also ($P < 0.05$). Epimedium increased serum BMP-7 content and increased the expressions of renal and femoral BMP-7 on the level of mRNA ($P < 0.05$) and protein. **Conclusions** Prednisone can decrease the expressions of renal and femoral BMP-7, but Epimedium can induce bone formation and rebuild injured bone by increasing serum BMP-7 content and upregulating renal and femoral BMP-7 expression. Kidney may regulate bone function by the blood circulation of BMP-7.

Key words: Epimedium; Prednisone; Bone morphogenetic protein-7

临床上接受糖皮质激素治疗的慢性疾病患者中, 最终有 30% ~ 50% 发展为骨质疏松。长期服用糖皮质激素, 可致肾虚衰, 精髓空虚, 骨骼失养, 而发

骨痿(骨质疏松)^[1]。BMP-7 是 BMP 家族中重要成员, 是多效性细胞因子, 与骨骼及肾脏疾病密切相关。淫羊藿是一种补肾壮阳中药, 有显著的防治骨质疏松的作用。本实验观察淫羊藿对醋酸泼尼松所致的肾阳虚雄性 SD 大鼠肾脏和股骨 BMP-7 的表达, 探讨淫羊藿的抗骨质疏松机制中 BMP-7 的作用。

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B30101003)

作者单位: 523808 东莞 广东医学院药学院

通讯作者: 崔燎, Email: cuiliao@163.com

1 材料和方法

1.1 药品的提取及配制

淫羊藿生药材(湛江市药材公司)用水浸泡后煎煮 1.5 h,重复 2 次,合并滤液浓缩至 1 g 生药/mL。取醋酸泼尼松原料(广东仙居制药股份有限公司) 320 mg 于研钵中,加入 1 mL 吐温-80 试剂进行研磨,再用蒸馏水稀释定容至 500 mL。

1.2 主要试剂

大鼠 BMP-7 定量 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司);one step RT-PCR 试剂盒(Qiagen 公司);BMP-7 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),specificity S-P 超敏鼠组织免疫组化试剂盒(福建迈新公司);DAB 显色剂(福建迈新公司)。

1.3 动物模型的制备与分组

3 月龄雄性 SD 大鼠 24 只[由广东医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK 粤 2004-0008,清洁级,体重(320.59 ± 20 g)]随机分为 3 组:正常组[蒸馏水 5 mL/(kg·d) + 蒸馏水 5 mL/(kg·d)];肾虚模型组(简称模型组)醋酸泼尼松 3.2 mg/(kg·d) + 蒸馏水 5 mL/(kg·d)];淫羊藿组[醋酸泼尼松 3.2 mg/(kg·d) + 淫羊藿 5 g/(kg·d)]均采用灌胃给药方式,连续 90 d。

1.4 ELISA 方法检测血清 BMP-7 含量

用 3% 戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,右心室抽血,分离血清,按照 BMP-7 定量 ELISA 试剂盒说明书进行操作,画出标准曲线,通过标本的 OD 值在标准曲线上计算出样品中 BMP-7 含量。

1.5 RT-PCR 方法检测肾脏和股骨中 BMP-7 mRNA 的表达

快速取出肾脏和股骨后置于液氮中保存。每只大鼠取出肾组织 100 mg,加入 1 mL Trizol 试剂冰上匀浆;取出股骨,置室温下 5 min,再放回液氮中,反复冻融 5 ~ 8 次^[2],于液氮下将股骨研磨至粉末,取骨粉 100 mg,加入 1 mL Trizol 试剂。按照 Trizol 试剂说明书提取 RNA,鉴定 RNA 的纯度及完整性(调整浓度为 1 μg/μL)。

引物由上海生物工程公司合成,用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照。大鼠 BMP-7 基因的引物序列参照 genebank 和文献^[3,4],BMP-7 引物上游 5'-AGACGCCAAAGAACCAAGAG-3',下游 5'-GCT-GTCGTCGAAGTAGAGGA-3',扩增片段 323 bp;GAPDH 引物上游 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3',

下游 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3',扩增片段 195 bp。参照 Qiagen one-step RT-PCR Kit 说明书进行实验操作。

RT-PCR 反应条件:①逆转录 30 min,50℃;②聚合酶链反应的激活步骤:15 min,95℃;③3 步循环:变性:0.5 min,94℃;退火:1 min,61℃;延伸:1 min,72℃;循环次数:35 次;④最后延伸:10 min,72℃。空白对照用 0.1% DEPC 处理水代替 RNA 样品进行同条件的 RT-PCR。

目的基因和 GAPDH 的 PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳后,应用凝胶图像处理系统及 Bandscan 程序对图片行总灰度扫描,用目的基因与 GAPDH 的 RT-PCR 产物总灰度比值进行半定量分析。

1.6 免疫组化检测肾脏和股骨中 BMP-7 的表达

大鼠肾脏和股骨用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,肾脏常规石蜡包埋,5 μm 切片;股骨用 15% EDTA 液(pH 值 = 7.2)4℃脱钙,隔日换液,直到以 5% 草酸钠标定到脱钙终点为止,常规石蜡包埋,5 μm 切片。按照 specificity S-P 超敏鼠组织免疫组化试剂盒说明书检测肾脏和脱钙股骨中 BMP-7 的表达。

结果判断:每一批免疫组化均设有用 PBS 代替一抗的对照片。观察切片至少 3 个具有代表性高倍视野,根据镜下观察的棕黄色阳性信号面积判断结果:阳性细胞 < 5% 为阴性表达(-);5% ~ 33.3% 为弱阳性表达(+);33.4% ~ 66.7% 为中阳性表达(++);> 66.8% 为强阳性表达(+++)。

1.7 统计学处理

计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,数据统计使用 Stata 8.0 软件进行 SNK_q 分析,等级资料采用有序多分类的 logistic 回归方法和多样本秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况

造模大鼠糖皮质激素灌胃期间相继出现精神萎靡、少动闭眼、弓背蜷缩、喜扎堆、畏寒喜暖、体毛枯疏、阴囊皱缩、睾丸回升、尾部苍白、肛周污秽等症。

2.2 血清 BMP-7 变化,见表 1

表 1 大鼠血清 BMP-7 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(n)	BMP-7 (pg/mL)
正常组	6	276.91 ± 9.26
模型组	6	257.76 ± 15.47
淫羊藿组	6	286.35 ± 12.93*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

实验过程中少量标本溶血,故以每组6只进行统计。血清BMP-7含量3组间比较有统计学意义($P = 0.0041$),方差齐($P = 0.653$),两两比较:淫羊藿组与模型组有统计学意义($P < 0.05$),而正常组与模型组、正常组与淫羊藿组均无统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 肾脏和股骨 BMP-7 mRNA 的表达

提取的RNA用分光光度计测得260 nm和280 nm波长OD值,肾脏RNA OD_{260}/OD_{280} 为 (1.950 ± 0.069) ,股骨RNA OD_{260}/OD_{280} 为 (1.995 ± 0.053) ,与RNA OD_{260}/OD_{280} 要求值2.0接近。肾脏和股骨BMP-7 mRNA和GAPDH mRNA扩增产物琼脂糖凝胶电泳条带灰度比值:见表2。本实验过程中有动物意外死亡或其他因素导致标本缺失,故每组以5只进行统计。灰度比值显示:①大鼠肾脏BMP-7 mRNA的表达组间有统计学意义($P < 0.01$),方差齐($P = 0.986$),两两比较:正常组与模型组有统计学意义($P < 0.01$),淫羊藿组与模型组有统计学意义($P < 0.01$)。②大鼠股骨BMP-7 mRNA的表达组间具有统计学意义($P = 0.001$),方差齐($P = 0.591$),两两比较:正常组与模型组有统计学意义($P = 0.001$),淫羊藿组与模型组有统计学意义($P = 0.001$)。

表2 肾脏和股骨BMP-7与GAPDH mRNA RT-PCR产物电泳条带灰度比值($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(n)	肾脏BMP-7/GAPDH mRNA灰度比值	股骨BMP-7/GAPDH mRNA灰度比值
正常组	5	$0.990 \pm 0.103^*$	$0.890 \pm 0.050^*$
模型组	5	0.619 ± 0.106	0.480 ± 0.087
淫羊藿组	5	$1.054 \pm 0.097^*$	$1.036 \pm 0.070^{**}$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

肾脏RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图像见图1,股骨RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图像见图2。

2.4 肾脏和股骨 BMP-7 的表达

正常组大鼠肾脏BMP-7表达的免疫组化显示:BMP-7为胞浆表达,呈棕黄色颗粒状或泥沙状,主要在肾髓质及皮、髓交界处的肾小管、髓祥升支厚壁段、远曲小管、集合管细胞表达,髓质间质细胞也有少量表达。并且在肾小球足突细胞、肾小球脏层和壁层的上皮细胞与毛细血管内皮细胞均有表达,系膜细胞表达很微量。各组大鼠肾脏不同部位BMP-7阳性表达的结果见表3,本实验过程中由于喂养时期较长,动物意外死亡或其他因素导致标本缺失,故

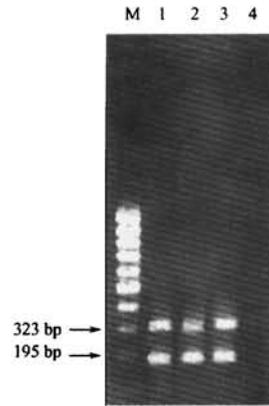


图1 肾脏BMP-7 mRNA与GAPDH mRNA RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

注:M:Marker,由上至下依次为1000 bp~100 bp
1 正常组;2 模型组;3 淫羊藿组;4 空白对照

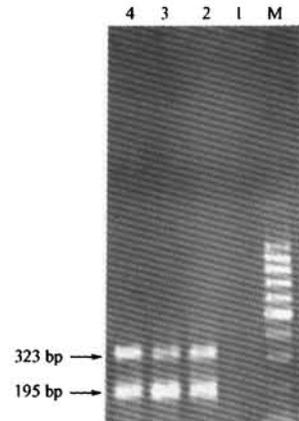


图2 股骨BMP-7 mRNA与GAPDH mRNA RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

注:M:Marker,由上至下依次为1000~100 bp
1 空白对照;2 正常组;3 模型组;4 淫羊藿组

每组以5只进行统计。

肾脏BMP-7免疫组化阳性表达中正常组与模型组有统计学意义($P < 0.01$),淫羊藿组与模型组有统计学意义($P < 0.01$),淫羊藿组与正常组无统计学意义($P = 0.812$)。各表达部位中肾髓质和肾小球有统计学意义($P < 0.01$),肾髓质和皮髓交界有统计学意义($P < 0.01$),皮髓交界和肾小球有统计学意义($P = 0.031$)。

正常组大鼠股骨BMP-7表达的免疫组化显示:BMP-7为胞浆表达,呈棕黄色颗粒状,主要在骨髓的间充质细胞和骨小梁周围的骨母细胞表达。股骨BMP-7免疫组化阳性表达秩次:正常组为80.0,模型

组为 37.0, 淫羊藿组为 54.0, 各组间有显著统计学意义($P = 0.040$), 两两比较: 正常组与模型组有统计学意义($P < 0.05$),

表3 各组大鼠肾脏不同部位 BMP-7 阳性表达的结果

组别	大鼠数 (n)	肾髓质				肾皮髓交界				肾小球			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常组	5	0	1	0	4	1	1	3	0	1	4	0	0
模型组	5	1	2	2	0	2	3	0	0	4	1	0	0
淫羊藿组	5	0	0	0	4	0	3	2	0	0	5	0	0

3 讨论

外源性糖皮质激素造成下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴抑制可模拟肾阳虚, 因此, 大剂量外源性糖皮质激素制造肾阳虚动物模型是较经典的造模方法^[5]。本研究造模大鼠糖皮质激素灌胃期间相继出现少动闭眼、弓背蜷缩等症状, 符合中医“肾阳虚”证的特点, 而肾阳虚可导致骨痿(骨质疏松)。大剂量糖皮质激素使钙磷代谢紊乱, 继发性甲状旁腺功能亢进, 促使骨吸收加强, 并抑制下丘脑-垂体-性腺轴, 促进骨髓基质细胞向脂肪细胞转化而抑制其向成骨细胞转化, 影响成骨细胞、骨细胞和破骨细胞功能及其调节因子, 使骨形成减少, 骨吸收增多^[6,7]; 此外, 大剂量糖皮质激素还可引起微脂肪栓, 骨髓微循环障碍和供血不足, 导致股骨骨质疏松和股骨头无菌性坏死^[8]。骨质疏松症患者存在骨基质 BMPs 减少或 BMPs 抗体增加, 通过测定 BMPs 抗体滴度, 发现骨质疏松症为一种自身免疫失调性疾病, 即 BMPs 抗体的产生阻碍了骨形成。

BMPs 是骨重建和修复的必要诱导因子, 由成骨细胞和骨髓基质细胞产生, 主要分布于骨胶原纤维、骨膜、骨髓基质, 并且主要与骨基质结合, 很少释放到骨外。BMP-7 是 BMPs 家族中诱导成骨作用较强成员之一, 广泛分布于胚胎的心、脑、肾、骨骼等组织中, 对多种器官的形成和发育进行调控, 并可通过胎盘屏障发挥调节作用^[9]。BMP-7 在成骨部位高表达, 具有高效骨诱导活性, 可诱导间充质细胞向成骨、软骨细胞分化, 进而产生新生骨, 修复和重建骨、软骨缺损。BMP-7 还可增加碱性磷酸酶、I 型胶原和骨钙素合成, 促进细胞外基质矿化。血液中的 BMP-7 大多是由肾脏分泌的 BMP-7 以内分泌方式入血获得, Vukicevic 等^[10]在大鼠循环血液中检测到浓度为 0.1~0.5 ng/mL 的 BMP-7。肾脏产生的 BMP-7 能通过血循环对远隔组织如骨组织的发育和修复产生作

用。随着年龄的增长, 血清 BMP-7 水平会呈下降趋势, 这是老年性骨质疏松的发病机理之一。

本实验中模型组大鼠血清 BMP-7 含量明显下降, 可能是由于长期大剂量糖皮质激素可导致肾虚和微脂肪栓影响肾功能, 使肾小球、集合管萎缩, 而肾脏 BMP-7 的表达与肾小管萎缩、血管改变呈负相关^[11], 因此肾脏 BMP-7 表达减少, 导致血液中 BMP-7 减少, 进而使骨组织中外源性 BMP-7 减少, 抑制骨形成。模型组 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达量低于正常组。可能是由于长期大剂量给予糖皮质激素可直接抑制成骨细胞功能, 而成骨细胞是 BMP-7 产生来源之一, 因而骨组织中 BMP-7 表达量减少, 从而进一步使得骨基质中未分化的间充质细胞向前成骨细胞分化减少, 导致骨量减少。糖皮质激素还可以提高 BMPs 抑制物(如卵泡抑素)编码基因的表达, 通过旁路途径来抑制 BMPs 信号引起骨质疏松^[11]。

本研究发现醋酸泼尼松可导致肾阳虚、肾脏和股骨 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 表达减少, 并且血清 BMP-7 含量明显下降。这说明糖皮质激素引起的骨质疏松很可能与肾脏、骨组织中的 BMP-7 表达减少有关, 是其发病机制之一。

淫羊藿组 BMP-7 mRNA 的表达高于模型组($P < 0.05$), 但淫羊藿组股骨 BMP-7 的表达与模型组相比无统计学意义, 可能是由于股骨脱钙时间过长, 标本抗原性易丢失, 并且 BMP-7 mRNA 翻译时或翻译后修饰等作用影响 BMP-7 的表达, 但淫羊藿组股骨 BMP-7 的表达有较模型组增加的趋势。以上结果提示淫羊藿能提高股骨 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达, 促进骨组织的修复, 拮抗糖皮质激素的骨损害。肾阳虚大鼠存在神经-内分泌-免疫网络不同程度上的功能和病理改变, 淫羊藿对下丘脑-垂体-性腺轴有直接调控作用^[12], 抑制破骨细胞的活性, 促进成骨细胞增加, 抑制骨量丢失, 提高股骨重量和基质表面观密度, 改善骨密度, 拮抗骨质疏松。淫羊藿还可

激活 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,降低红细胞聚集性及降低全血黏度,抑制血管平滑肌细胞外 Ca^{2+} 内流^[13],阻断交感神经节,扩张外周血管,增加外周血流量,改善骨组织的结构与功能。

我们的研究表明淫羊藿可以提高肾脏 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达,血液中 BMP-7 含量增加,并作用于骨组织,上调骨组织 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达,发挥其诱导成骨作用,增加骨形成,对抗糖皮质激素所引起骨损害,这可能是淫羊藿治疗骨质疏松的作用机制之一。

BMP-7 被认为是“肾主骨”理论的物质基础之一,在本实验中肾脏、血液和股骨中 BMP-7 呈同步变化,我们推测肾脏可能通过 BMP-7 的血循传送途径远程调控骨骼,这为“肾主骨”理论提供了实验依据,并为临床上研究肾性骨病及老年性骨质疏松症的发病机制及基因治疗开创了新思路。

【参 考 文 献】

- [1] 刘庆思.主编.中西医结合诊治骨质疏松症.北京:中国中医药出版社,2001.
- [2] 李丁.骨组织总 RNA 的提取.第四军医大学学报,1999,20(12):17-18.
- [3] Yaoita H, Orimo H, Shirai Y, et al. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. J Bone Miner Metab, 2000, 18(2): 63-70.
- [4] Karavanova ID, Dove LF, Resau JH, et al. Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme.

Development, 1996, 12(12): 4159-4167.

- [5] 上海中医学院正常人体学教研室. 阳虚、阴虚造型以及某些助阳药和滋阴药作用的初步研究. 新医药学杂志, 1977 (9): 33.
- [6] Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(4): 454-457.
- [7] Sasaki N, Kusano E, Ando Y, et al. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(3): 479-482.
- [8] Miyaniishi K, Yamamoto T, Irisa T, et al. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. Bone, 2002, 30(1): 185-190.
- [9] Borovecki F, Jelic M, Grgurevic L, et al. Bone morphogenetic protein-7 from serum of pregnant mice is available to the fetus through placental transfer during early stages of development. Nephron Exp Nephrol, 2004, 97(1): 26-32.
- [10] Vukicevic S, Basic V, Rogic D, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. J Clin Invest, 1998, 102(1): 202-214.
- [11] Biyikli NK, Tugtepe H, Cakalagaoglu F, et al. Downregulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 in experimental pyelonephritis. Pediatr Nephrol, 2005, 20(9): 1230-1236.
- [12] 蒋淑君, 崔存德, 许兰芝. 肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴钙调蛋白的基因表达及补肾中药的调整作用. 中国临床康复, 2004, 8(24): 5056-5057.
- [13] 杨远友, 刘宁, 莫正纪, 等. 淫羊藿对大鼠内脏器官 PDC 钙通道及其心肌缺血性损伤的影响. 四川大学学报, 2005, 42(1): 122-127.

(收稿日期:2007-07-09)