

益肾填精中药对骨质疏松症模型大鼠的骨组织中 Smad1/5 的表达影响

邓洋洋 郑洪新 林庶茹 夏淑杰 蒋宁

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)08-0563-05

摘要:目的 通过观察去卵巢骨质疏松症模型大鼠股骨中 Smad1/5 在细胞中的表达,探索肾虚骨质疏松症的发病机理。方法 实验采用切除大鼠双侧卵巢的方法复制骨质疏松症模型,同时应用益肾填精作用的纳米钙补肾中药低、高剂量组,对模型大鼠给药干预 12 周,用骨质疏松康颗粒剂、盖天力作为阳性对照组,以及正常对照组、假手术对照组和模型空白组,并与补脾中药补中益气汤作比较,应用双能 X 线骨密度仪检测离体股骨的骨密度;HE 染色光镜下观察股骨形态;免疫组化 SABC 法检测股骨中的 Smad1/5 蛋白活性表达。结果 与正常组比较,模型组大鼠股骨头的骨密度显著降低, $P < 0.01$;与模型组比较,用药 12 周之后各用药组均可提高模型大鼠股骨的骨密度值;HE 染色光镜下观察各组大鼠右侧股骨头病理切片,模型组骨髓腔增大,骨小梁断裂,各用药组可见骨髓腔较小,形态结构较完整;与正常组相比较,模型组 Smad1/5 阳性表达显著下降, $P < 0.01$;用药 12 周后,与模型组相比较,各用药组均可上调其表达情况, $P < 0.01$ 。结论 骨组织中 Smad1/5 阳性表达降低可能是骨质疏松症发生的机制之一,纳米钙补肾填精中药可能通过改善和调控股骨中 Smad1/5 的表达,而起到防治肾虚骨质疏松症的作用。

关键词: 骨质疏松;免疫组化;Smad1/5

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.08.003

Regulative effect of some Chinese herbal drugs on expression of signal transduction molecules Smad1/5 in the femur tissues of osteoporosis in rats after ovariectomy DENG Yangyang, ZHENG Hongxin, LIN Zheru, et al. Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China

Abstract: Objective To investigate the regulative effect of nanometer calcium kidney-tonifying herbs (with the effects of reinforce kidney, replenishing qi and strengthening essence) on the expression of signal transduction molecules-Smad1/5 in the bone tissue of rats after ovariectomy and the mechanism of osteoporosis occurrence.

Methods Using the method of ovariectomy, we established the rat model of osteoporosis due to Kidney-deficiency; treated the osteoporosis rat with experimental drugs (high, low dose group) for 12 weeks, which is notifying the kidney to consolidate the essence and strengthening bone and marrow, invigorating the kidney to make the bone strong. Simultaneously, used Gushukang granule and Gaitianli tablets and Buzhong yiqi decoction as positive control groups. And rats in the normal group and model group were not given any treatment. We had used dual energy X-ray bone density instrument to detect the bone mineral density of the rats. Observed configuration of the femur tissue with the method of HE stain, we had used the IHC method to investigate the expression of smad1/5 proteins in the femur of the rats. **Results** Model group got an obviously decrease of the level of BMD ($P < 0.01$); and the medicines groups have increased the level of BMD compared with the model groups. Observed the HE stain femur parts of the rats: In the model group, the arrangement of bone trabecula structure is rarefaction, the bone trabecula thickness, the medicines groups' the shape and structure of the bone trabecula are more complete, and the arrangement are more normal. Model groups got a obviously decreased in Smad1/5 protein expression compared

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672570)

作者单位: 110032 沈阳 辽宁中医药大学基础医学院

通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

with normal groups $P < 0.01$. All medicine groups increased Smad1/5 protein expression to different level compared with model groups. **Conclusion** The decreasing of Smad1/5 protein expression in femur of rats may be one of the mechanisms of osteoporosis, The level of Smad1/5 protein expression in the femur of rats can obviously be increased by nanometer calcium kidney-tonifying herbs.

Key words: Osteoporosis; Immunohistochemical method; Smad1/5 protein

骨质疏松症(osteoporosis, OP)为影响人们健康生存的常见疾病,是以骨量减少和骨组织显微结构退行性改变为特征,致使脆性增加,易发骨折的一种全身代谢性骨骼疾病。女性由于峰骨量较低及绝经后的雌激素水平降低,发病率是男性的3倍^[1]。在我国老年女性发病率高达90.48%,已成为严重的社会问题^[2]。本研究探讨Smad1/5蛋白在去卵巢大鼠骨组织中的表达,为阐明其在绝经后骨质疏松症中的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级Wistar大鼠,雌性,169只,4~5月龄,购于中国医学科学院实验动物中心。动物合格证书号SCSK京2005-0013。

1.1.2 主要药品及试剂

纳米钙益肾填精中药(牡蛎,鹿茸)。骨疏康颗粒 辽宁康辰药业有限公司,国药准字Z20033255,产品批号060907,盖天力片(牡蛎碳酸钙咀嚼片):东盛科技启动盖天力制药股份有限公司,国药准字H32025396,产品批号FD041,补中益气汤:黄芪,人参,当归,白术,陈皮,升麻,柴胡,炙甘草,由辽宁中医药大学附属医院药房提供。

兔抗大鼠Smad1/5一抗BA1394(武汉博士德公司),抗体稀释液(武汉博士德公司),即用型SABC免疫组化试剂盒SA102X(武汉博士德公司),即用型SABC免疫组化试剂盒SA1028(武汉博士德公司),DAB显色试剂盒AR102X(武汉博士德公司),多聚赖氨酸(武汉博士德公司),0.1MPBS缓冲液(武汉博士德公司),枸橼酸盐(武汉博士德公司),免疫组化笔(北京中衫金桥生物技术有限公司),过氧化氢、甲醇、二甲苯、无水乙醇、EDTA等均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

双能X线骨密度分析仪:美国Lunar公司,型号prodigy SM2000R石蜡滑动式切片机(德国,LEICA),1110H展片机(德国,LEICA),1120H烘片机(德国,LEICA),DHG-9071A电热鼓风干燥器(上海精宏实

验设备有限公司),BX51反射光荧光观察显微镜(日本,OLYMPUS,DP70),BI-2000数字图像分析系统(成都泰盟公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立

按体重分层随机分组,正常组16只,余者进行造模处理。除正常组外,大鼠经氯胺酮(100 g/2 ml)肌肉注射麻醉,0.1 ml/100 g体重。将麻醉后的大鼠以俯卧位姿势固定于自制的手术台上,从腰背部脊柱两侧做纵行切口,切开皮肤及肌肉,摘除两侧卵巢组织后逐层缝合,关闭创口。其中假手术组只行切口切开,并不摘除卵巢组织,然后逐层缝合。术后给予青霉素(80万单位/4 ml生理盐水)肌肉注射,0.4 ml/250 g,连续注射3 d。

1.2.2 动物分组及给药方法

术后7 d将存活大鼠按体重分层随机分为6组,即模型空白组、补肾中药低剂量组、补肾中药高剂量组、骨疏康组、盖天力组、补脾组。

动物分组3 d后开始给药,每日上午灌胃1次,正常组、假手术组、模型空白组以等量的生理盐水灌胃,连续12周。实验期间,各组大鼠每周称重1次,并根据体重变化调整给药剂量。实验存活大鼠在最后1次灌胃后,禁食24 h。经10%水合氯醛注射麻醉(0.3 ml/100 g体重),麻醉后用碘伏消毒手术部位,采集标本。

1.2.3 大鼠离体股骨骨密度(BMD)测定

取大鼠左后肢股骨,剔除附着的肌肉筋膜,保留骨膜,生理盐水冲洗后,用塑料保鲜袋装好,应用双能X线骨密度分析仪,美国Lunar公司,及其所附带的“The Small Subject Scout Scan”软件,测定大鼠离体股骨的骨密度(g/cm^2)。骨密度值采用单位面积内的骨矿物质含量表示(g/cm^2)。

1.2.4 实验动物股骨头的石蜡病理切片制作

右后肢股骨头部分,剔除附着的肌肉筋膜,保留骨膜,置于10%多聚甲醛/0.01M PBS缓冲液中固定48 h后,放入10% EDTA脱钙液中,每日更换脱钙液,至大头针可轻轻刺进,约3周。然后经乙醇逐级脱水,石蜡包埋后进行切片,切片厚度为5 μm ,HE

染色后光镜下观察。

1.2.5 Smad1/5 在股骨中的免疫组化的检测

①石蜡切片按常规经二甲苯Ⅰ、Ⅱ和梯度乙醇脱蜡至水。②组织切片置于装有新鲜配置的 3%过氧化氢溶液的玻璃容器中,于 24℃ 10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次,吸去组织切片旁多余液体。③滴加 5% BSA 封闭液,24℃ 20 min,甩去多余液体,不洗。④滴加稀释后的兔抗大鼠一抗,稀释度为 1:50,放入湿盒内,4℃ 冰箱孵育过夜,次日取出,PBS 洗 2 min×3 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。⑤滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 20 min,PBS 洗 2 min×3 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。⑥滴加试剂 SABC,37℃ 20 min,PBS 洗 5 min×4 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。⑦DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒(AR1022),室温显色 10 min,蒸馏水洗涤 2 次。⑧脱水梯度乙醇,每一级 5 min。透明,二甲苯Ⅰ、Ⅱ各 10 min,中性树胶封片。显微镜观察。⑨其中阴性对照用 PBS 代替一抗。其他步骤相同。

取各组免疫组化的片子 2 张,随机取 15 个视野,BI-2000 数字图像分析系统进行灰度值分析。

1.2.6 统计学处理

实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理,多样本均数比较采用单因素 ONE-WAY ANOVA(方差分析)进行分析,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物左后肢离体股骨头骨密度比较

与正常组相比,各组大鼠骨密度均下降,其中模

空组、低剂量组、骨疏康组、补脾组差异有显著性, $P < 0.01$,假手术组、高剂量组、盖天力组,无统计学意义, $P > 0.05$ 。用药 12 周后,与模空组比较,高剂量组差异有显著性, $P < 0.01$,低剂量组、盖天力组、骨疏康组有统计学意义, $P < 0.05$ 。实验组间比较,高剂量组高于低剂量组, $P < 0.05$,高剂量组高于骨疏康组、补脾组,差异有显著性, $P < 0.01$,见表 1。

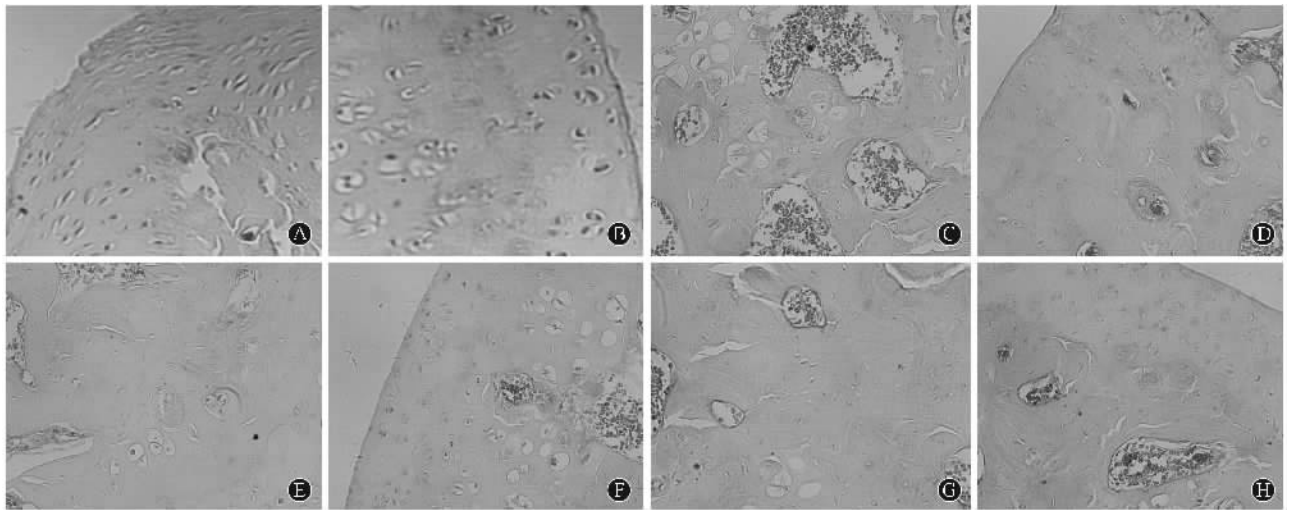
表 1 各组大鼠左后肢离体股骨头骨密度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	股骨头骨密度(g/cm^2)
正常组	15	0.16433±0.01466★★
假手术组	17	0.15582±0.01138★★
模空组	21	0.14700±0.01035○○※
低剂量组	21	0.15186±0.01285○○☆
高剂量组	20	0.16095±0.01593★★△
骨疏康组	20	0.14835±0.01483○○☆☆
盖天力组	19	0.15695±0.00778★
补脾组	19	0.14211±0.01127○○△☆☆

注:与正常组比较,○ $P < 0.05$;与正常组比较,○○ $P < 0.01$;与假手术组比较,* $P < 0.05$;与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模空组比较,★ $P < 0.05$;与模空组比较,★★ $P < 0.01$;与低剂量组比较,△ $P < 0.05$;与低剂量组比较,△△ $P < 0.01$;与高剂量组比较,☆ $P < 0.05$;与高剂量组比较,☆☆ $P < 0.01$

2.2 实验动物股骨头的病理切片结果(图 1)

光镜下观察股骨头切片显示,正常组可见骨髓腔相对较小,骨小梁粗壮,形态结构完整,骨小梁表面可见单行排列的成骨细胞,胞质嗜弱碱性。



A 正常组 B 假手术组 C 模空组 D 低剂量组 E 高剂量组 F 骨疏康组 G 盖天力组 H 补脾组

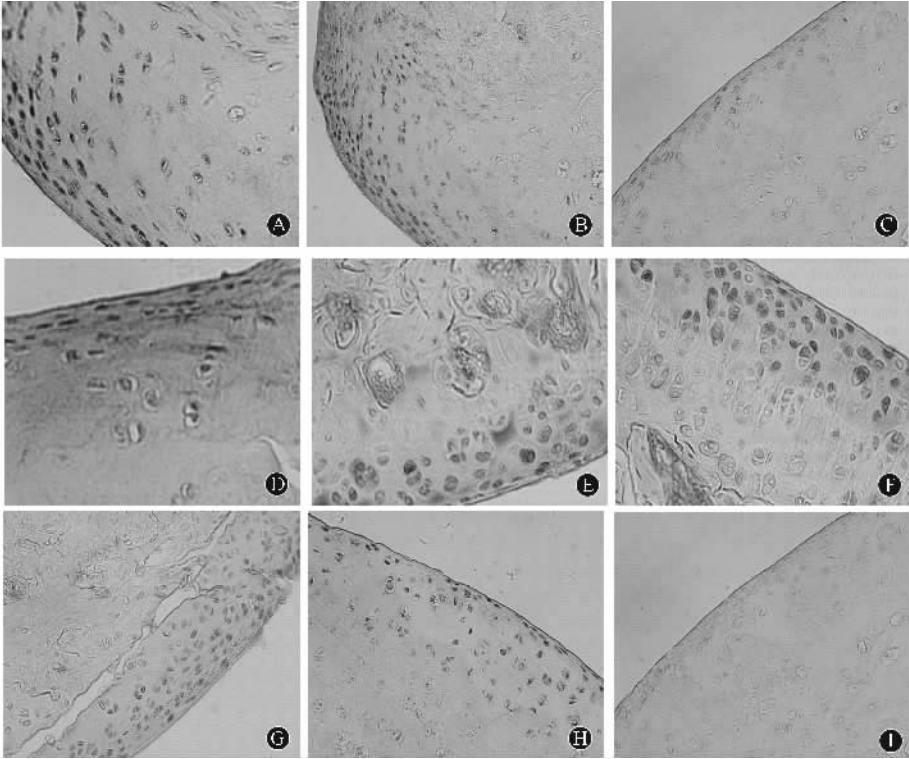
图 1 正常组股骨头 HE(×40)

假手术组和正常组相类似 ,骨外膜可见骨原细胞和较多的软骨细胞。模空组骨髓腔增大 ,骨小梁断裂。可见骨小梁厚度增宽 ,结构较模空组紧密 ,骨髓腔缩小 ,骨外膜可见骨原细胞 和大量的软骨细胞。

2.3 各组大鼠股骨中的 Smad1/5 免疫组化结果

2.3.1 光镜下观察结果(图 2):正常组和假手术组 Smad1/5 主要表达在骨外膜的骨原细胞和软骨细胞、

骨基质 ,其胞质胞核均有阳性染色 ,呈深棕黄色弥漫成片。与正常组比较 ,模空组 Smad1/5 主要表达在骨小梁周围的骨细胞、间充质细胞、软骨细胞 ,其中软骨细胞染色程度下降。用药 12 周后 ,与模空组比较 ,实验低、高剂量组及各阳性对照组 ,Smad1/5 表达范围未变 ,在骨小梁周围的骨细胞、骨基质、软骨细胞 ,但软骨细胞染色增强。阴性对照组未见棕黄色颗粒。



A 正常组 ;B 假手术组 ;C 模空组 ;D 低剂量组 ;E 高剂量组 ;F 骨质疏松组 ;G 盖天力组 ;H 补脾组 ;I 阴性对照
图 2 各组股骨光镜下观察 IHC(× 40)

2.3.2 免疫组化图像灰度值分析结果 :BI-2000 数字图像分析系统分析切片灰度值 ,数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理 ,多样本均数比较采用单因素 ONE-WAY ANOVA(方差分析)进行分析 ,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。见表 2。

表 2 Smad1/5 在股骨中的表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	视野数	平均灰度
正常组	15	127.0004 ± 4.4108**
假手术组	15	129.2973 ± 3.9099**
模空组	15	144.3421 ± 5.5079★★☆☆
低剂量组	15	128.1386 ± 5.1851**
高剂量组	15	128.0147 ± 4.5574**
骨质疏松组	15	130.2473 ± 4.4760**
盖天力组	15	128.6047 ± 4.7714**
补脾组	15	131.7362 ± 4.6114**

注 :与模空组比较 :* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较 :★ $P < 0.05$,★★ $P < 0.01$;与假手术比较 :☆ $P < 0.05$,☆☆ $P < 0.01$

3 讨论

3.1 绝经后骨质疏松症

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis , PMOP)是原发性骨质疏松症中的 I 型 ,主要由于妇女更年期雌激素水平下降 ,破骨细胞活性增加 ,骨吸收强于骨形成的过程 ,呈高转换型骨代谢 ,使骨量减少 ,骨的显微结构异常。绝经后骨质疏松的动物模型于 1969 年首先由 Saville 用大鼠建立 ,后经反复证实 ,现在去势雌鼠骨质疏松模型已成为标准化的公认的绝经后骨质疏松症经典病理模型。此模型常选用雌性动物去除双侧卵巢建立。这种模型有很多优点 ,能很好的模拟出绝经后所表现出来的骨量丢失与骨结构的一系列变化 ,故美国国立卫生研究院、世界卫生组织都推荐用此模型来作为研究骨质疏松的最佳模型^[3]。本实验采用手术摘除双侧卵巢的大

鼠实验研究发现在大鼠摘除双侧卵巢 13 周后,离体股骨头骨密度显著降低,HE 染色显微镜下观察发现骨组织的微细结构受损,提示发生骨质疏松改变,实验造模成功。

3.2 肾主骨理论

中医认为肾藏精,主生长、发育、生殖,在体合骨,主骨生髓。骨的生长发育都有赖于肾中精气的充盈。《医经精义》指出:“肾藏精,精生髓,髓养骨,故骨者,肾之合也,髓者,精之所生也,精足则髓足,髓在骨内,髓足则骨强。”充分说明骨髓的生长、发育、修复等,均有赖于肾精滋润与濡养。现代研究发现,肾主骨,其实质主要是指肾脏 1α 羟化酶的活性及肾脏对钙磷代谢的调控,肾对钙、磷代谢具有调节作用,其调节机制是通过肾小管加强对钙的重吸收,并从尿内排出大量的磷,以维持血浆内钙、磷的动态平衡,这种排磷保钙的生理调节功能,可适应骨骼的生长发育和骨损伤修复的需要,当这种调节功能发生障碍时,可因体内钙的大量丢失、骨骼钙的不断减少,而导致骨质疏松症^[4]。此外,“肾”对骨代谢的复杂调控网络还包括对下丘脑-垂体-性腺轴不同环节、不同层面功能的概括,也包括骨骼组织局部微环境各种调节因子的功能^[5]。

本实验研究采用海洋生物中药——牡蛎,应用纳米技术研制成纳米钙,颗粒微小,更容易被人体吸收,并将补肾填精之中药鹿茸微粉与之混合,形成具有补肾填精、补钙壮骨功效的纳米钙补肾中药复方,达到防治肾虚骨质疏松症的目的。

3.3 Smad1/5 在骨质疏松症中的调控

骨代谢的过程主要为骨吸收与骨形成,其过程受众多生长因子、信号转导分子和转录因子的调节。其中 TGF- β 超家族(transforming growth factor- β , TGF- β) 在骨细胞增殖、分化和凋亡过程中起着重要的作用^[6],其家族成员包括转化生长因子- β 和骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)等。任艳玲等^[7]实验研究结果表明:去卵巢肾虚骨质疏松大鼠骨组织中 TGF- β 1 的 mRNA、蛋白表达水平的下调,以及成骨细胞对其反应性降低可能是肾虚骨质疏松症发生的重要机制之一。通过研究转化生长因子超家族及其信号通路,可以进一步揭示骨质疏松症的内在机制。目前已知, BMP 和 TGF- β 发挥作用是通过跨膜的两个丝氨酸和苏氨酸激酶受体复合体和细胞内 Smads 通路(Smad pathway)介导。而目前发现哺乳动物 Smads 有 8 种(Smad1 ~ Smad8)。根据其结

构和功能的不同分为三类:第一类是 R-Smads (Receptor-activated Smads)包括 Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8;第二类 Co-Smads (Common Smads)即 Smad4/DPC4(deleted in pancreatic carcinoma4);第三类为 Anti-Smads 包括 Smad6、Smad7。R-Smads 分子 C 末端含有特征性丝氨酸基序(SSXS motif),该基序后两个丝氨酸可被活化的 I 型受体磷酸化,而 Co-Smads 和 Anti-Smads 无此序列,不能被 I 型受体磷酸化^[8]。

在细胞浆内受 BMP 受体调节的 R-Smads 有: Smad1、Smad5 和 Smad8。磷酸化的 R-Smads 又和公共 Smad (common Smad) Smad4 结合成 R-Smad-Smad4 复合体。此复合体进入细胞核后联合其他一些 DNA 结合因子一起调节下游因子的转录,促使细胞向成骨细胞转化^[9]。

本研究发现,正常大鼠骨组织中存在有丰富的 Smad1/5 蛋白的表达,主要表达在骨外膜的骨原细胞和软骨细胞,而在摘除大鼠卵巢 13 周后, Smad1/5 蛋白表达显著下降。结果表明 Smad1/5 蛋白可能在绝经后骨质疏松症形成中起重要作用。益肾填精,补钙壮骨中药可改善和调控摘除卵巢对大鼠股骨中 Smad1/5 的影响,这可能是其防治骨质疏松症的机制之一。

【参考文献】

- [1] Genant HK, Cooper C, Poor G, et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporosis Int*, 1999, 10: 259-264.
- [2] 郭世绂. 骨质疏松基础与临床. 天津:天津科学技术出版社, 2001: 1-2.
- [3] Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products: Food and Drug Administration, USA, 1994.
- [4] 刘忠厚. 骨矿与临床. 北京:中国科学技术出版社, 2006: 241.
- [5] 朱飞鹏, 李冬华. 肾主骨理论的现代理解与补肾法研究. *上海中医药杂志*, 2003, 37(6): 9-11.
- [6] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113(6): 685-700.
- [7] 任艳玲, 郑洪新, 杜松, 等. 密骨颗粒对去卵巢大鼠 TGF- β 1 表达的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(2): 221-225.
- [8] Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 2001, 187(3): 265-276.
- [9] Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, 2002, 13(6): 1.

(收稿日期: 2009-04-03)