

淫羊藿对骨质疏松型骨折局部骨形成蛋白 mRNA 表达的影响

尹宏 钱卫庆

中图分类号: R681;R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)08-0717-04

摘要: **目的** 研究淫羊藿对骨质疏松型骨折局部骨形成蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 表达的影响。**方法** 取 4 月龄雌性大鼠 78 只, 随机分成实验组(切除双侧卵巢)57 只, 对照组(切除卵巢周围少许脂肪组织)21 只, 术后 10 周, 电镜观察证实实验组骨质疏松动物模型已制备成功后, 取实验组 54 只及对照组 18 只大鼠, 制作右侧股骨远端骨折, 共分为 4 组, 即: (1) 磷酸钙骨水泥 (Calcium Phosphate Cement, CPC) 治疗组(简称 A 组); (2) CPC-淫羊藿复合物治疗组(以下简称 C 组); (3) CPC + 口服淫羊藿组(简称 B 组); (4) 非骨质疏松组(简称 D 组) 分别于术后第 4、8、12 周行实时荧光定量 RT-PCR 检测骨折局部 BMP-2 mRNA 的表达。**结果** 实验组各时间点 BMP-2 的 mRNA 表达水平均低于非骨质疏松组, 但淫羊藿治疗组第 4、8 周的表达量高于 CPC 组, 其中尤以 CPC-Y 组增高明显。**结论** 局部应用淫羊藿能更为有效诱导骨质疏松型骨折局部内源性 BMP-2 mRNA 的表达。

关键词: 骨质疏松症; 磷酸钙骨水泥; 淫羊藿; 骨形成蛋白-2

Effect of epimedium on the local mRNA expression of BMP2 in osteoporotic fractures YIN Hong, QIAN Weiqing. Department of Orthopedics and Traumatology, The Third Affiliated Hospital of Nanjing Chinese Traditional Medicine College, Nanjing 210009, China
Corresponding author: QIAN Weiqing, Email: qwq68@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of epimedium on the local mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP2) in osteoporotic fractures. **Methods** Seventy-eight 4-month-old female rats were randomly divided into the experimental group (performed bilateral ovariectomy, $n = 57$) and the control group (cut off fat tissue around the ovaries, $n = 21$). After osteoporotic model was verified using electorator microscope in 10 weeks after the surgery, 54 cases in experimental group and 18 cases in the control group were chosen to induce the fracture of the right femur. These rats were divided into 4 groups: calcium phosphate cement (CPC) as group A; CPC and epimedium as group C; CPC and oral epimedium as group B; and non-osteoporosis as group D. The local expression of BMP2 was measured using real-time PCR in 4, 8, and 12 weeks after the surgery. **Results** The mRNA expression of BMP-2 of rats in experimental group was lower than that in control groups. The expressions in 4 and 8 weeks after the surgery of rats in the icariin treatment group were higher than those in CPC group, more significant in CPC-Y group. **Conclusion** Local application of epimedium can induce the mRNA expression of endogenous BMP2 in the OVX rats.

Key words: Osteoporosis; Calcium phosphate cement; Epimedium; Bone morphogenetic protein-2

骨质疏松症是以骨量减少, 骨的微观结构退化为特征的, 致使骨的脆性增加, 易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[1-2]。中药淫羊藿促进成骨的作用已日益受到关注, 一般认为, 这一作用主要是通过增加 BMP-2 的表达来实现^[3-5]。本研究主要目的是将其有效提取成份与 CPC 一起建立缓释体系后, 直接植入骨折局部, 以探讨淫羊藿对骨质疏松型骨折局

基金项目: 南京市医学科技发展资金资助项目(YKK08126)
作者单位: 210009 南京, 南京中医药大学附属第三临床学院
南京市中医院骨伤科
通讯作者 尹宏, E-mail: qwq68@126.com

万方数据

部 BMP-2 mRNA 表达的影响,进而为临床治疗骨质疏松型骨折提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与材料

4 月龄雌性清洁大鼠,由南京中医药大学动物中心提供。CPC 系上海瑞帮生物材料有限公司生产。

1.2 淫羊藿水提液的制取

提取工艺具体详见参考文献^[6]。

1.3 骨质疏松动物模型建立及检测

取 4 月龄雌性清洁大鼠 78 只,体重 210 g ~ 250 g。随机分成实验组 57 只,对照组 21 只。实验组麻醉后,进腹找到并完整切除双侧卵巢,切除物用 10% 甲醛固定,送病检,以便进一步确认切除组织的确为卵巢。对照组麻醉、消毒及进腹方式同实验组,找到卵巢但不切除,仅切除卵巢周围少许脂肪组织。术后大鼠分笼饲养 3d,每只动物腹腔注射青霉素 40 万单位,每日 1 次,连续 3d。所有动物均予相同饲料饲养 10 周,自由摄食、水。术后 10 周,从实验组随机抽取 7 只大鼠、对照组 7 只大鼠,应用配有小动物测量软件的 Lunar 型双能 X 线骨密度测定仪检测大鼠全身骨密度(Bone mineral density, BMD)。每个标本测量 3 次,每次测量后均重新摆放体位,3 次测量结果取均值,测量值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行统计学分析,两组差异具有显著性意义($P < 0.05$)。证明实验组骨质疏松动物模型已制备成功。另外术后 10 周,分别从实验组和对照组随机抽取 3 只大鼠处死取其股骨远端行松质骨扫描电镜观察。

1.4 骨折动物模型的建立

将剩余 72 只大鼠仍按前述方法麻醉、消毒、备皮后,取右侧股骨远端外侧切口,切开皮肤、浅、深筋膜,钝性分离股外侧肌,显露股骨远端外侧,切开膝关节囊,显露髌间窝。用厚度为 1.0 mm 的钢锯在距离股骨远端 0.5 cm 处锯断骨干外侧,深度达 2 mm,骨折动物模型制备完成。

1.5 动物分组与骨折治疗方法

将上述造模成功 72 只大鼠分成 4 组,即:(1) CPC 治疗组(以下简称 A 组);(2) CPC-淫羊藿复合物治疗组(以下简称 B 组);(3)口服淫羊藿组(以下简称 C 组);(4)非骨质疏松组(以下简称 D 组)。每组 18 只。CPC 组先用克氏针从髌间窝穿入股骨髓腔,再拔出克氏针,将 CPC 固、液相按照说明书调和好后(固相:液相 = 2 g:1 ml),注入骨髓腔,注射

完毕后,待 15 分钟左右操作台上的 CPC 固化后,逐层缝合切口。CPC-淫羊藿复合物治疗组操作步骤同 CPC 治疗组,只是将 CPC 换为 CPC-淫羊藿复合物(CPC-淫羊藿复合物的配置方法为:将 2 g CPC 固相与 1 ml 淫羊藿提取液均匀混合,CPC 固相:淫羊藿 = 2 g:1 g)。在整个实验过程中口服淫羊藿组及 CPC-淫羊藿复合物治疗组每只大鼠均给予相同剂量(1 g)的淫羊藿。术后大鼠分笼饲养 3d,自由摄食水。每只大鼠腹腔注射 40 万单位青霉素,每天 1 次连续 3d。

1.6 取材

喂药后 4、8、12 周分批以空气栓塞法处死动物,每批 18 只,每组 6 只。于无菌条件下截取大鼠骨折局部骨组织 100 mg 液氮中磨研成粉末。

1.7 RNA 提取、纯化及反转录

将液氮中磨研成的粉末,转入 EP 管中,以改良 Trizol 法提取骨组织总 RNA。反转录操作按 Superscript II (Invi-trogen 公司)提供操作说明书进行,所得 cDNA -20℃ 保存。

1.8 实时荧光定量 RT-PCR 扩增效率检测

用 EASY Dilution 将 cDNA 液按 100、101、102、103 和 104 梯度稀释后,各取 2 μ l 进行荧光定量 PCR 反应,检测目的基因的扩增效率和 β -actin 的扩增效率的一致性,ct 值为荧光信号强度超过设置的阈值强度时所经历的循环数。 $\Delta Ct = Ct(\text{BMP}) - Ct(\beta\text{-actin})$ 。

1.9 实时荧光定量 PCR

25 μ l 反应体系中含 cDNA 样品 2.0 μ l, SYBR Premix Ex TaqTM(2 $\times$) 12.5 μ l, 上、下游引物(20 pmol/ μ l)各 0.5 μ l, Rox Reference Dye 0.5 μ l, 去离子水补足 25 μ l。设置 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 共进行 30 个循环。以 β -actin 做内对照,上游引物为 5'-CGTTGACATCCGTAAGA-3', 下游引物为 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3', 扩增产物是 173 bp。采用比较循环阈值法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)分析样本中 BMP 的相对含量。具体计算方法如下:以正常骨组织作为对照因子,设为 1, 分别将各实验组骨折局部组织与正常组骨组织做比较,得倍数为 $N(N = 2^{-\Delta\Delta Ct})$, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{正常组})$ 。

2 统计学处理

实验数据用 SPSS12.0 软件进行统计学处理分析,测量值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料

采用 *t* 检验;三组资料采用单因素方差分析,均数两两比较。以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 骨质疏松动物模型检测

3.1.1 大鼠骨密度测定:骨质疏松造模术后 10 周,从实验组随机抽取 7 只大鼠,与对照组 7 只大鼠,应用配有小动物测量软件的 Lunar 型双能 x 线骨密度测定仪检测全身 BMD,结果显示骨质疏松模型组股骨骨密度显著低于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 造模后大鼠骨密度的检测($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	BMD($\text{d/g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
对照组	7	0.2340 ± 0.0043
模型组	7	$0.1963 \pm 0.0050^{\Delta}$

与对照组相比^Δ $P < 0.01$

3.1.2 造模后松质骨扫描电镜观察:(1)对照组:低倍观察显示,各大鼠股骨干骺端骨小梁分布广泛,充满干垢端直至与骨干交界处。骨小梁排列以纵向为主,纵向的骨小梁之间有横向的骨小梁连接,互相

连接成立体网状结构,网眼即为骨髓腔。骨小梁分布密集,骨髓腔因之较小。未见骨小梁缺损和破坏。高倍观察显示,骨小梁表面光滑,胶原纤维排列整齐,密集,取向有规则,亦未见骨小梁微骨折形成(见图 1)。

(2)模型组:低倍观察显示,各大鼠股骨干骺端骨小梁分布区域明显减少,只占骺线下很少区域。骨小梁排列稀疏,直径变细,骨髓腔因之显得较空旷。有的地方骨小梁变细变尖、终于断裂,使网状结构遭到破坏、缺损。可见到骨小梁微骨折存在(见图 2)。

3.2 对骨组织骨形成蛋白 mRNA 表达的影响

3.2.1 总 RNA 完整性检测:对获得的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。紫外下观察电泳结果,可见 28S、18S、5S 三条清晰的条带,其中 28S 和 18S 条带明亮(见图 3),表明提取的总 RNA 完整性好、降解低、无 DNA 污染,可以用于后续实验。可用于实时荧光定量 PCR。

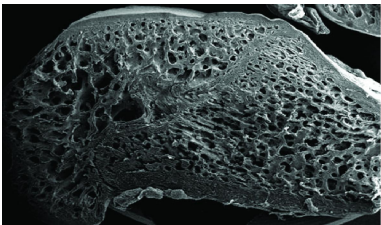


图 1 骨小梁网状结构分布密集,充满干垢端

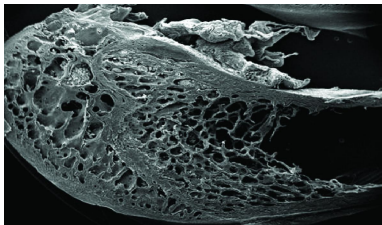


图 2 骨小梁排列稀疏,骺线下方有较大片的缺损

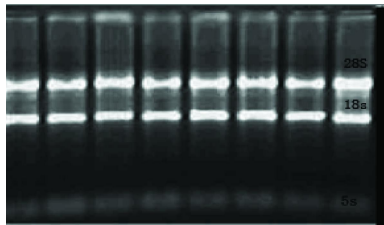


图 3 大鼠骨组织总 RNA 电泳图谱

3.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 扩增效率检测结果:骨折局部骨组织中 BMP 和 β -actin 的 cDNA 经梯度稀释后,其相对关系数分别为 0.9996 和 0.9997,斜率分别为 -4.75 和 -4.34,扩增效率分别为 1.94 和 1.95。可以认为目的基因的扩增效率与管家基因的扩增效率相同,浓度改变时样本的扩增效率可保持稳定,误差在可容许的范围内,故可用 $\Delta\Delta C_t$ 方法进行相对定量。

3.2.3 实时荧光定量 PCR 对 BMPmRNA 表达的检测:根据实时定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法,正常组各时相点 BMP-2 的表达量设定为 1(组内比较 $P < 0.01$),C 组、B 组和 A 组的相对表达量如表 1 所示。BMP-2mRNA 在 B 组的表达高于 C 组和 A 组,差异有显著性 ($P < 0.05$),与 A 组相比,C 组仅在术后 8、12 周 BMPmRNA 表达增高,差异有显著性。(见表 2)。

万方数据

表 2 各组骨组织内骨形成蛋白-2 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
A 组	6	0.19 ± 0.02	0.68 ± 0.21	0.29 ± 0.06
B 组	6	$0.34 \pm 0.04^*$	$0.95 \pm 0.24^*$	$0.60 \pm 0.03^*$
C 组	6	$0.22 \pm 0.03^{\Delta}$	$0.84 \pm 0.47^{\Delta}$	$0.42 \pm 0.04^{\Delta}$

注:与其他两组相比 * $P < 0.05$,与 A 组相比^Δ $P < 0.05$,^Δ $P > 0.05$

4 讨论

骨质疏松症的发病率以及随之而来的骨折并发症逐年提高。病变特点是骨量减少,骨矿盐密度减低,骨皮质变薄,骨小梁变细,髓腔增宽,骨的脆性变大。容易发生自发性骨折,或轻微的外伤即可引起骨折。骨折后由于骨皮质极薄,骨结构疏松,骨的脆性大,采用通常的骨折治疗方法难以达到满意复位、可靠固定、良好愈合以及早期功能锻炼的目的。

中医认为,“肾主骨生髓”,肾虚则髓减骨枯;“肾藏精,精生髓”,精气的盛衰,决定筋骨的强弱,因而补肾是治疗骨质疏松的根本。淫羊藿

(Epimedium) 为小檗科植物, 又名仙灵脾、三枝九叶草等, 是中药治疗骨折复方制剂中的常用成份, 中医理论认为其具有“补肾壮阳, 益精健骨”之功效。现代研究发现其主要成份为淫羊藿多糖、淫羊藿苷、淫羊藿甙和黄酮类等, 近代对淫羊藿作了大量研究, 发现该药具有雄激素样作用, 能促进骨髓细胞 DNA 合成, 促进骨组织蛋白质合成及促进成骨细胞生长等作用, 并且还对破骨细胞有直接的抑制作用, 因而能够对抗动物去卵巢、去睾丸及长期大剂量服用肾上腺皮质激素所引起的骨质疏松症。在临床上, 淫羊藿也倍受重视, 许多治疗骨质疏松症的方剂中均含有淫羊藿。但是目前对淫羊藿总黄酮防治骨质疏松症的研究主要是以淫羊藿煎液口服对骨质疏松症进行干预, 或将其有效提取成份作用于体外培养的成骨细胞及破骨细胞, 而将其有效提取成份直接植入骨折局部, 以探讨其在骨质疏松型骨折局部促进骨折愈合的机理尚未见报道, 本实验将 CPC 与淫羊藿水提液按照一定比例复合后, 注射至骨质疏松大鼠骨折局部, 通过对不同时间点局部骨形成蛋白 m R N A 表达的动态观测, 以探讨局部使用淫羊藿对骨质疏松骨折局部内源性 BMP-2 的影响, 进而为临床治疗骨质疏松性骨折提供新的思路及理论基础。

骨形态发生蛋白属于转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员 (BMP-1 除外), 是一组具有诱导成骨活性的酸性糖蛋白。其中 BMP-2 与 BMP-4 是具有高效骨诱导活性的细胞因子, 能诱导异位成骨, 有效的促进骨折愈合, 加速骨缺损修复。这一结论已经被国内外广大学者的研究证实。

目前利用外源性 BMP-2 来修复激素性股骨头坏死虽取得了一定成效, 但外源性 BMP-2 制备较复杂, 来源有限, 加之植入体内时必须复合理想的载体。因此, 利用药物上调机体内源性 BMP-2 的表达来促进骨质疏松性骨折修复是一项有益的探索。体外细胞培养发现淫羊藿甙可明显促进大鼠成骨细胞中 OPG (osteoprotegerin, OPG) mRNA 和 BMP-2 mRNA 的表达, 并可提高大鼠成骨细胞 MC3T3-E1 中 Smad4 mRNA 的表达, 抑制核因子 κ B 受体活化因子配体 (ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL) mRNA 的表达, 从而调节骨吸收^[7-8]。淫羊藿苷也可以通过促进成骨细胞增殖、分化、矿化, 增强成骨细胞成骨活性从而促进骨形成^[9-10]; 淫羊藿总黄酮可减少破骨细胞数目, 减弱破骨细胞吸收功能, 且与药物作用时间有关。本实验发现: 造模后各

期模型组和淫羊藿治疗组的 BMP-2 mRNA 表达均低于正常组, 表明切除双侧卵巢造成骨质疏松症能抑制成骨细胞的 BMP-2 表达。实验组大鼠分别予 CPC、CPC + 口服淫羊藿及 CPC-淫羊藿复合物干预。结果显示 4 周后 B、C 组骨折局部骨组织 BMP-2 表达较 A 组明显增加, 至用药后 8 周达到高峰, 给药后 12 周 BMP-2 表达量虽较给药后 8 周时有所降低, 但仍高于同时点 A 组 BMP-2 mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。尤其在 B 组中, BMP-2mRNA 表达增高更为明显且持久。这可能是由于将 CPC 与淫羊藿复合直接应用于骨折局部, 克服了既往口服很难使骨折局部获得足够的药物浓度, 同时, 借助 CPC 缓慢降解, 淫羊藿在骨折局部缓慢释放发挥持久生物活性。实验提示 CPC-淫羊藿复合物的局部使用能上调骨折局部骨组织内源性 BMP-2 的表达, 从而有效促进骨质疏松性骨折的修复。

【参 考 文 献】

- [1] Hilgsmann M, Bruyere O, Ethgen O, et al. Lifetime absolute risk of hip and other osteoporotic fracture in Belgian women. *Bone*, 2008, 43(6):991-994.
- [2] 李跃华, 薛李, 赵芳芳, 等. 原发性骨质疏松症中医证型分布及其与骨折关系研究. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(5):493-495.
- [3] Hui-Ping Ma, Lei-Guo Ming, Bao-Feng Ge, et al. Icaritin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro. *A Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(3):916-923.
- [4] 刘洪江, 刘海全, 秦佳佳, 等. 不同浓度淫羊藿含药血清干预骨髓基质干细胞的成脂分化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14):2583-2586.
- [5] 何伟, 李自力, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞核结合因子 α 1、骨形成蛋白-2、骨形成蛋白-4 mRNA 表达的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2009, 41(6):669-673.
- [6] 赵小妹, 聂其霞, 张保献. 不同方法精制淫羊藿水提液对淫羊藿苷含量的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2000, 6(6):3-5.
- [7] Tsai-Pei Hsieh, Shiow-Yunn Sheu, Jui-Sheng Sun, et al. Icaritin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE2 synthesis. *Phytomedicine*, 2011, 18(2):176-185.
- [8] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icaritin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa₁ expression. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2010, 17(6):414-423.
- [9] Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine*, 2008, 15(1-2):55-61.
- [10] 张立娟, 雷涛, 张秀珍, 等. 淫羊藿甙对成骨细胞凋亡的影响. *同济大学学报(医学版)*, 2008, 29(1):30-33.

(收稿日期:2012-03-20)

淫羊藿对骨质疏松型骨折局部骨形成蛋白mRNA表达的影响

作者: 尹宏, 钱卫庆, YIN Hong, QIAN Weiqing
作者单位: 南京中医药大学附属第三临床学院南京市中医院骨伤科, 南京, 210009
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年, 卷(期): 2012, 18(8)

参考文献(10条)

1. Hiligsmann M;Bruyere O;Ethgen O [Lifetime absolute risk of hip and other osteoporotic fracture in Belgian women](#)[外文期刊] 2008(06)
2. 李跃华;薛李;赵芳芳 [原发性骨质疏松症中医证型分布及其与骨折关系研究](#)[期刊论文]-[中国中西医结合杂志](#) 2010(05)
3. Hui-Ping Ma;Lei-Guo Ming;Bao-Feng Ge [Icariin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro](#) 2011(03)
4. 刘洪江;刘海全;秦佳佳 [不同浓度淫羊藿含药血清干预骨髓基质干细胞的成脂分化](#)[期刊论文]-[中国组织工程研究与临床康复](#) 2011(14)
5. 何伟;李自力;崔元璐 [淫羊藿苷对大鼠成骨细胞核结合因子 \$\alpha\$ 1、骨形成蛋白-2、骨形成蛋白-4 mRNA表达的影响](#)[期刊论文]-[北京大学学报\(医学版\)](#) 2009(06)
6. 赵小妹;聂其霞;张保献 [不同方法精制淫羊藿水提液对淫羊藿苷含量的影响](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2000(06)
7. Tsai-Pei Hsieh;Shiow-Yunn Sheu;Jui-Sheng Sun [Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF-KB regulated HIF-1 \$\alpha\$ and PGE2 synthesis](#) 2011(02)
8. Hsieh TP;Sheu SY;Sun JS [Icariin isolated from Epimedium pubescens regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression](#)[外文期刊] 2010(06)
9. Zhang DW;Cheng Y;Wang NL [Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from Epimedium koreanum Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts](#) 2008(1-2)
10. 张立娟;雷涛;张秀珍 [淫羊藿甙对成骨细胞凋亡的影响](#)[期刊论文]-[同济大学学报\(医学版\)](#) 2008(01)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201208009.aspx