

## 补骨脂素对去势雌鼠 $E_2$ 、 $ER_\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、IL-17 的影响

杨琳<sup>1</sup> 曾英<sup>1</sup> 李劲平<sup>2\*</sup> 刘珊<sup>1</sup> 王文杰<sup>1</sup> 杨岩冰<sup>1</sup> 莫新民<sup>1</sup>

1. 湖南中医药大学, 长沙 410007

2. 中南大学药学院, 长沙 410013

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0387-07

**摘要:** 目的 观察补骨脂素对去势雌鼠  $E_2$ 、 $ER_\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、IL-17 的影响,探讨补骨脂素防治绝经后骨质疏松的机理。方法 选取3月龄雌性SD大鼠72只,随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇对照组、壮骨止痛胶囊对照组、补骨脂素高剂量组、补骨脂素低剂量组,每组12只。除假手术组外,其它大鼠造成双侧去卵巢骨质疏松症病理模型,术后5d拆线后开始给药,连续13周。最后一次给药后次日取血标本采用ELISA检测血清中雌激素( $E_2$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ ( $TNF-\alpha$ )、白细胞介素-17(IL-17)的含量。提取左股骨组织mRNA样本进行RT-PCR反应检测骨组织  $TNF-\alpha$ 、 $ER_\beta$ 、IL-17 基因的表达。取右股骨脱钙切片免疫组化检测  $ER_\beta$  表达。结果 模型组去势雌鼠血清  $E_2$  水平显著低于假手术组( $P < 0.01$ )。壮骨止痛胶囊显著升高血清  $E_2$  水平( $P < 0.01$ ),补骨脂素高剂量组血清  $E_2$  水平显著高于模型组( $P < 0.01$ ),补骨脂素低剂量组血清  $E_2$  水平与模型组相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。模型组血清  $TNF-\alpha$ 、IL-17 水平及股骨  $TNF-\alpha$ 、IL-17mRNA 表达显著高于假手术组( $P < 0.01$ ),股骨  $ER_\beta$  显著低于假手术组( $P < 0.05$ )。戊酸雌二醇组血清  $TNF-\alpha$ 、IL-17 水平及股骨  $TNF-\alpha$ 、IL-17mRNA 表达显著低于模型组,股骨  $ER_\beta$  显著高于模型组( $P < 0.05$ )。壮骨止痛胶囊组血清  $TNF-\alpha$ 、IL-17 水平显著低于模型组( $P < 0.05$ ),股骨  $TNF-\alpha$ 、IL-17mRNA 表达非常显著低于模型组( $P < 0.01$ ),而股骨  $ER_\beta$  显著高于模型组( $P < 0.05$ )。补骨脂素高剂量组血清  $TNF-\alpha$  水平及股骨  $TNF-\alpha$ mRNA 表达显著低于模型组( $P < 0.05$ ),而血清 IL-17 水平及股骨 IL-17mRNA 表达非常显著低于模型组( $P < 0.01$ ),股骨  $ER_\beta$  显著高于模型组( $P < 0.05$ )。补骨脂素低剂量组血清  $TNF-\alpha$  水平显著低于模型组( $P < 0.05$ ),但其股骨  $TNF-\alpha$ mRNA 表达与模型组相比无统计学差异,而血清 IL-17 水平及股骨 IL-17mRNA 表达显著低于模型组( $P < 0.05$ ),股骨  $ER_\beta$  与模型组相比没有统计学差异。结论 补骨脂素可通过提高去势雌鼠血清  $E_2$  水平和股骨  $ER_\beta$  水平,降低去势雌鼠骨组织  $TNF-\alpha$ 、IL-17 基因表达和血清  $TNF-\alpha$ 、IL-17 水平发挥抗绝经后骨质疏松症作用。

**关键词:** 绝经后骨质疏松症;补骨脂素;雌激素;雌激素受体  $\beta$ ;肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;白细胞介素 17

### Effect of psoralen on $E_2$ , $ER_\beta$ , $TNF-\alpha$ , and IL-17 in ovariectomized rats

YANG Lin<sup>1</sup>, ZENG Ying<sup>1</sup>, LI Jinping<sup>2\*</sup>, LIU Shan<sup>1</sup>, WANG Wenjie<sup>1</sup>, YANG Yanbing<sup>1</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007

2. College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China

Corresponding author: LI Jinping, Email: pjingli@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the anti-osteoporosis mechanism of psoralen by observing its effect on  $E_2$ ,  $ER_\beta$ ,  $TNF-\alpha$ , and IL-17 in ovariectomized rats. **Methods** Seventy-two 3-month-old SD female rats were randomly allocated into sham operation group, model group, estradiol group, Zhuanggu Zhitong (ZGZT) capsule group, the high psoralen dosage group, and the low psoralen dosage group, with 12 rats in each group. Except the rats in the sham operation group, the rats in the other groups were ovariectomized bilaterally. The medicines were given to rats via intragastric administration for 13 weeks. The levels of serum estradiol ( $E_2$ ), tumor necrosis factor alpha ( $TNF-\alpha$ ), and leukocyte mediated IL-17 (IL-17) were detected using ELISA method. The gene expressions of  $ER_\beta$ ,  $TNF-\alpha$ , and IL-17 in the left femurs were detected using RT-PCR.  $ER_\beta$  was detected in the right femurs with immunohistochemistry. **Results** The level of serum  $E_2$  in model group was significantly lower than that in sham operation rats ( $P < 0.01$ ). ZGZT capsule increased serum  $E_2$  significantly ( $P < 0.01$ ). The level of serum  $E_2$  in the high psoralen dosage group was significantly higher than that in model group ( $P < 0.01$ ). It was no difference between the low psoralen dosage

基金项目: 国家自然科学基金(81273816)

\* 通讯作者: 李劲平, Email: pjingli@163.com

group and the model group ( $P > 0.05$ ). The levels of serum TNF- $\alpha$  and IL-17 and the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-17 in the femurs in the model group were significantly higher, but the expression of ER $\beta$  was lower than those in the sham operation group ( $P < 0.01$ ). The levels of serum TNF- $\alpha$  and IL-17 and the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-17 in the femurs in the estradiol group were lower, but the expression of ER $\beta$  was higher than those in the model group ( $P < 0.01$ ). The levels of serum TNF- $\alpha$  and IL-17 and the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-17 in the femurs in the ZGZT capsule group lower, but the expression of ER $\beta$  was higher than those in the model group ( $P < 0.01$ ). The serum TNF- $\alpha$  and gene expression of TNF- $\alpha$  mRNA in the femur were lower in the high dosage of psoralen group than those in the model group, and the serum IL-17 and gene expression of IL-17 mRNA in the femur were even lower than those in the model group ( $P < 0.01$ ). ER $\beta$  in the femur was higher than that in the model group. Serum TNF- $\alpha$  in low dosage of psoralen group was lower than that in the model group, but the expression of TNF- $\alpha$  mRNA was not different comparing with model group. Serum IL-17 and the expression of IL-17 mRNA in the femur were significantly lower than those in model group ( $P < 0.05$ ). The expression of ER $\beta$  in femur was not different comparing with the model group. **Conclusion** Psoralen can improve the levels of E $_2$  and ER $\beta$  in ovariectomized rats. It also reduces the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-17 in the bone tissue and serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-17, therefore exerts its anti-postmenopausal osteoporosis function.

**Key words:** Postmenopausal osteoporosis; Psoralen; Estrogen; ER $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-17

补骨脂素为补骨脂的主要化学成分,具有促进成骨细胞增殖、分化,可用于骨质疏松症治疗<sup>[1-3]</sup>。近年有研究表明补骨脂素可与雌激素受体(ER)结合,启动雌激素受体元件,具有拟雌激素活性<sup>[4-6]</sup>。壮骨止痛胶囊是本课题组研发的治疗原发性骨质疏松的已上市六类中药新药,补骨脂是壮骨止痛胶囊中的君药,而补骨脂素是壮骨止痛胶囊的主要定量控制指标之一。课题组已有研究表明补骨脂素对于双侧去卵巢骨质疏松大鼠模型具有良好抗骨质疏松作用<sup>[7]</sup>。近年来的研究表明免疫系统在骨质疏松发生发展中发挥了重要作用,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-17(IL-17)在骨质疏松发生发展过程中扮演了重要角色,本研究通过观察补骨脂素对去势骨质疏松雌鼠血清雌激素(E $_2$ )、ER $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17水平及骨组织 ER $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17基因表达的影响,探讨补骨脂素抗绝经后骨质疏松作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级雌性SD大鼠72只,3月龄,体重210~250g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号NO.43004700005517,湖南中医药大学动物实验中心许可证号:SCXK(湘)2013-0004。

### 1.2 药品

壮骨止痛胶囊(四川美大康药业股份有限公司,批准文号:Z20050118)、补骨脂素(中国药品生物制品检定所,纯度>98%),戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批准文号:J20130009),青霉素钠(哈药集团制药总厂,批号:A1301022417)。

### 1.3 试剂

大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号:201410),大鼠白介素-17检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号:201406),大鼠 ER $\beta$ 免疫组化试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司),雌二醇 E $_2$ 检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号:201406),TRIZOL试剂(美国 Invitrogen 公司,批号:28218),Go Taq Green MasterMix(美国 Promega 公司,批号:0000110146),DNA Marker I(天能生物科技有限公司,批号:20140714),琼脂糖(天能生物科技有限公司,批号:111860),TBE液(天能生物科技有限公司,批号:20140714),水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20120110),无水乙醇(上海振兴化工一厂,批号:201408301),氯仿(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20101202),异丙醇(国药集团试剂有限公司,批号:20120627),液氮(长沙日臻气体有限公司)。

### 1.4 仪器

凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad),PCR扩增仪(北京六一仪器厂,型号:WD-9402A),核酸蛋白分析仪(Eppendorf Biophotometer plus,型号:GPS-9160MBE),立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂,型号:LDZX-30KBS),全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司,型号:IMS-30),电泳仪槽(北京六一仪器厂,型号:DYY-8c),电泳槽(北京六一仪器厂,型号:DYCP-31DN),电子天平(奥豪斯仪器有限公司,型号:CP214),-80度冰箱(Thermo scientific),-20度冰箱(Haier 低温冷柜),-4度冰箱(Haier 冷藏箱),微波炉(Midea 417-ykk),移液枪

(规格 0.5 ~ 10 ul; 20 ~ 200ul; 100 ~ 1 000 ul), 液氮生物容器(YDS-10 型 编号: 20060282)。

### 1.5 分组及造模方法

72 只雌性 SD 雌鼠, 按体重随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇对照组、壮骨止痛胶囊对照组、补骨脂素高剂量组、补骨脂素低剂量组共 6 组, 每组 12 只。每只大鼠分别用 2% 的水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35 ml/100 g)后, 在无菌条件下从距离第一腰椎两侧外 1 cm 处纵向切开, 除假手术组仅切除少许脂肪组织外, 其余各组大鼠完整摘除双侧卵巢, 彻底止血后分两层缝合切口。术后各组大鼠切口严格用络合碘消毒, 连续 3 d 肌注兽用青霉素(4 万 u/只/天)抗炎, 5 d 后拆线。

### 1.6 给药方法

各组均从术后一周开始给药, 每天灌胃 1 次, 连续 13 周。除假手术组和模型组每天灌胃相应体积蒸馏水外, 其余各组开始灌胃相应药物(1 ml/100 g)。剂量按人鼠体表面积折算, 戊酸雌二醇对照组按 0.21 mg/kg 给药, 壮骨止痛胶囊对照组按相当于生药 6.6 g/kg 给药, 补骨脂素高、低剂量组分别按 8 mg/kg 和 4 mg/kg 给药。

### 1.7 指标检测

实验过程中, 所有大鼠自由饮水摄食, 每 10 天称体重 1 次。给药 13 周后, 每组选取 10 只大鼠分别用 2% 的水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35 ml/100 g)后, 切开腹腔, 分离腹主动脉插管取血 2 ml, 待凝固后 500 g/min 离心分离血清, ELISA 法检测血清中 E<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 、IL-17 的含量。提取左股骨组织 mRNA 样本进行 RT-PCR 反应检测 TNF- $\alpha$ 、ER $\beta$ 、IL-17 的基因表达, 取右股骨脱钙切片免疫组化检测 ER $\beta$ 。

**1.7.1 RT-PCR:** (1) 总 RNA 提取: 取 -80℃ 保存的左股骨, 在研钵中加入液氮研碎, 加入 1 ml Trizol, 按 Trizol 说明书抽提总 RNA, 采用紫外分光光度计测定其浓度及纯度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均在 1.8 ~ 2.0 之间。(2) cDNA 合成: 采用 20  $\mu$ L 逆转录反应体系, 内含 2  $\mu$ g 待测 RNA, 操作严格按照逆转录合成说明书执行。(3) 引物序列及扩增条件: 按照 PCR 反应条件, 取 2  $\mu$ L cDNA 模板配成 25  $\mu$ L 反应体系进行目的基因扩增。ER $\beta$  有意义链 5'-TCACCGTCGAGCCTTAGTTC -3', 反意义链 5'-TCTGCATAGAGGAGCGATGA -3'; TNF- $\alpha$  有意义链 5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3', 反意义链 5'-CTGGGAGTAGATAAGGTACA-3'; IL-17 有意义链 5'-ATCCATGTGCCTGATGCTGT-3', 反意义链 5'-

GTTATTGGCCTCGGCGTTTG-3'; 内对照  $\beta$ -actin 有意义链 5'- CCTAGCACCATGAAGATCAA -3', 反意义链 5'- TTTCTCGCAAGTTAGGTTTT -3'。ER $\beta$  PCR 扩增循环参数: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。TNF- $\alpha$  PCR 扩增反应循环参数: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增片段 141 bp。IL-17 PCR 扩增循环参数: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增片段 106 bp。 $\beta$ -actin 扩增循环参数: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增片段 227 bp。(4) 半定量分析: 各取 PCR 产物 3  $\mu$ L, 用 2% 的琼脂糖电泳及溴化已锭染色, 经凝胶成像系统(Bio-Rad) 进行拍照, 用 Image Lab 5.0 软件进行定量分析。计算 ER $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 产物电泳条带灰度与  $\beta$ -actin 产物电泳条带灰度比值。

**1.7.2 免疫组化检测 ER $\beta$ :** 取大鼠的完整右股骨, 去除附着的肌肉和筋膜后浸泡在 10% 福尔马林 PBS 中脱钙后按常规切片、脱蜡至水洗后经抗原修复。加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS 溶液室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 滴加正常山羊血清(1:10) 室温孵育 10 min。滴加兔抗大鼠 ER $\beta$  抗体, 阴性对照切片采用正常羊血清代替一抗, 4℃ 孵育过夜。然后 PBS 浸洗 3 次, 再滴加生物素标记羊抗兔 IgG, 室温反应 30 min, PBS 浸洗 3 次, 然后滴加 HRP 链霉菌抗生物素蛋白, 室温反应 20 min; PBS 浸洗 3 次; 然后用 0.06% DAB 显色 8 min; 苏木精复染, 酒精脱水, 二甲苯透明后中性树胶封片。Olympus BX51 型显微镜下观察、拍照, 在 Image-Pro Plus 4.5 进行图像分析。

### 1.8 统计方法

所有数据先经方差齐性检验和正态性检验, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐用单因素方差分析, 方差不齐采用秩和检验。所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。

## 2 结果

### 2.1 补骨脂素对大鼠血清 E<sub>2</sub> 测定结果

与假手术组相比, 模型组大鼠血清 E<sub>2</sub> 水平非常显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 壮骨止痛胶囊显著升高血清 E<sub>2</sub> 水平 ( $P < 0.05$ ), 补骨脂素高剂量组血清 E<sub>2</sub> 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 补骨脂素低剂量组血清 E<sub>2</sub> 水平升高趋势明显, 但没有统计学差

异。见表1。

**表1** 不同组别补骨脂素对去卵巢雌鼠血清 E<sub>2</sub> 水平的影响 (n=6)

**Table 1** Effect of psoralen on the serum level of E<sub>2</sub> in ovariectomized rats of different groups (n=6).

组别	剂量	血清 E <sub>2</sub> 含量 (ng/L)
假手术组	-	8.648 ± 2.864 **
模型组	-	5.629 ± 0.764
戊酸雌二醇组	0.21 mg/kg	9.432 ± 1.282 **
壮骨止痛胶囊组	6.6 g/kg	8.046 ± 1.648 *
补骨脂素高剂量组	8 mg/kg	8.021 ± 1.770 *
补骨脂素低剂量组	4 mg/kg	6.714 ± 0.624

注:与模型组比较, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05

**2.2 补骨脂素对大鼠股骨 ER<sub>β</sub> 表达的影响**

与假手术组相比,模型组股骨 ER<sub>β</sub> 的 mRNA 转录和表达均显著降低 (P < 0.01 或 P < 0.05)。与模型组相比,戊酸雌二醇组 ER<sub>β</sub> 的表达显著升高 (P < 0.01 或 P < 0.05); 壮骨止痛胶囊组股骨 ER<sub>β</sub> 基因表达显著升高 (P < 0.05); 补骨脂素高剂量组股骨 ER<sub>β</sub> 基因表达显著升高 (P < 0.05), 补骨脂素低剂量组对股骨 ER<sub>β</sub> 基因表达没有统计学差异, 见表2。各组 ER<sub>β</sub> mRNA 表达电泳图见图1, 股骨 ER<sub>β</sub> 免疫组化染色见图2。

**2.3 补骨脂素对大鼠血清 TNF-α 水平及基因表达的影响**

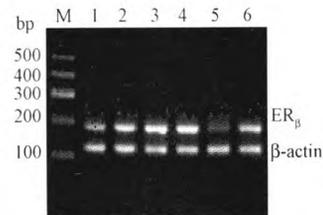
与假手术组相比,模型组血清 TNF-α 水平和股骨 TNF-α 基因表达均非常显著升高 (P < 0.01)。与模型组相比,戊酸雌二醇组血清 TNF-α 水平和股骨

**表2** 不同组别补骨脂素对去卵巢雌鼠股骨 ER<sub>β</sub> 表达的影响 (n=6)

**Table 2** Effect of psoralen on ER<sub>β</sub> in the femur in ovariectomized rats of different groups (n=6).

组别	剂量	ER <sub>β</sub> /β-actin	ER <sub>β</sub> 免疫组化 (OD)
假手术组	-	0.973 ± 0.233 **	0.25 ± 0.05 *
模型组	-	0.503 ± 0.288	0.15 ± 0.04
戊酸雌二醇组	0.21 mg/kg	0.928 ± 0.267 **	0.23 ± 0.05 *
壮骨止痛胶囊组	6.6 g/kg	0.888 ± 0.322 *	0.25 ± 0.04 *
补骨脂素高剂量组	8 mg/kg	0.845 ± 0.048 *	0.23 ± 0.05 *
补骨脂素低剂量组	4 mg/kg	0.610 ± 0.078	0.17 ± 0.04

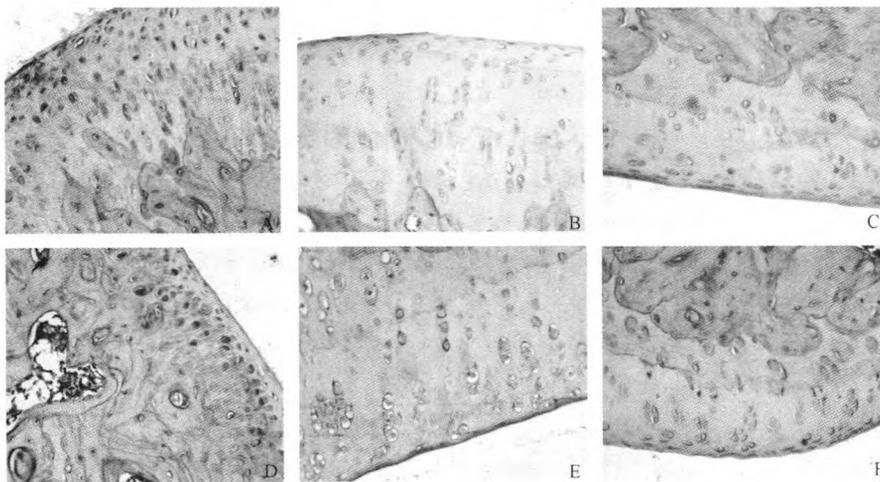
注:与模型组比较, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05



**图1** 各组 ER<sub>β</sub> mRNA 表达电泳图谱 1: 补骨脂素低剂量; 2: 补骨脂素高剂量; 3: 戊酸雌二醇; 4: 假手术组; 5: 模型组; 6: 壮骨止痛方; M = DNA Marker

**Fig. 1** The ER<sub>β</sub> mRNA expression in each group. 1: Psoralen low dose; 2: Psoralen high dose; 3: Sham operation group; 4: Estradiol group; 5: Model group; 6: ZGZT capsule group; M: DNA Marker.

TNF-α 基因表达均非常显著降低 (P < 0.01); 壮骨止痛胶囊组股骨 TNF-α 基因表达非常显著降低 (P



**图2** 股骨 ER<sub>β</sub> 免疫组化染色

A: 假手术组; B: 模型组; C: 戊酸雌二醇组; D: 壮骨止痛方组; E: 补骨脂素高剂量组; F: 补骨脂素低剂量组

**Fig. 2** The immunohistochemistry of ER<sub>β</sub> in the femurs.

A: Sham operation group; B: Model group; C: Estradiol group; D: ZGZT capsule group; E: Psoralen high dose; F: Psoralen low dose.

<0.01),血清 TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$ );补骨脂素高剂量组血清 TNF- $\alpha$  水平和股骨 TNF- $\alpha$  基因表达均显著降低( $P < 0.05$ ),补骨脂素低剂量组血清 TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$ ),而股骨 TNF- $\alpha$  基因表达没有统计学差异,见表3。各组 TNF- $\alpha$  RNA 表达电泳趋势图谱见图3。

表3 不同组别补骨脂素对去卵巢雌鼠血清 TNF- $\alpha$  水平及股骨 TNF- $\alpha$  基因表达的影响( $n = 6$ )

Table 3 Effect of psoralen on serum TNF- $\alpha$  and the gene expression of TNF- $\alpha$  in ovariectomized rats of different groups ( $n = 6$ ).

组别	剂量	血清 TNF- $\alpha$ 含量 (ng/L)	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
假手术组	-	26.690 $\pm$ 1.894 **	0.408 $\pm$ 0.152 **
模型组	-	46.899 $\pm$ 1.180	1.045 $\pm$ 0.319
戊酸雌二醇组	0.21 mg/kg	26.922 $\pm$ 1.773 **	0.428 $\pm$ 0.187 **
壮骨止痛胶囊组	6.6 g/kg	30.899 $\pm$ 2.351 *	0.478 $\pm$ 0.203 **
补骨脂素高剂量组	8 mg/kg	31.858 $\pm$ 2.333 *	0.753 $\pm$ 0.157 *
补骨脂素低剂量组	4 mg/kg	36.027 $\pm$ 1.049 *	0.957 $\pm$ 0.141

注:与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\* $P < 0.05$

### 2.4 补骨脂素对大鼠血清 IL-17 水平及其基因表达的影响

与假手术组相比,模型组血清 IL-17 水平和股骨 IL-17 基因表达均非常显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比,戊酸雌二醇组血清 IL-17 水平和股骨 IL-17 基因表达均非常显著降低( $P < 0.01$ );壮骨止痛胶囊组股骨 IL-17 基因表达非常显著降低( $P < 0.01$ ),血清 IL-17 水平显著降低( $P < 0.05$ );补骨脂素高剂量组血清 IL-17 水平非常显著降低( $P < 0.01$ ),而股骨 IL-17 基因表达显著降低( $P < 0.05$ ),补骨脂素低剂量组血清 IL-17 水平和股骨 IL-17 基因表达均显著降低( $P < 0.05$ ),见表4。各组 IL-17 mRNA 表达电泳图谱见图4。

表4 不同组别补骨脂素对去势雌鼠血清 IL-17 水平及股骨 IL-17 基因表达的影响( $n = 6$ )

Table 4 Effect of psoralen on serum IL-17 and the gene expression of IL-17 in ovariectomized rats of different groups ( $n = 6$ ).

组别	剂量	血清 IL-17 含量 (ng/L)	IL-17/ $\beta$ -actin
假手术组	-	1.854 $\pm$ 0.134 **	1.467 $\pm$ 0.887 **
模型组	-	2.579 $\pm$ 0.324	2.757 $\pm$ 0.189
戊酸雌二醇组	0.21 mg/kg	1.979 $\pm$ 0.314 **	1.630 $\pm$ 0.181 **
壮骨止痛胶囊组	6.6 g/kg	2.058 $\pm$ 0.309 *	1.639 $\pm$ 0.119 **
补骨脂素高剂量组	8 mg/kg	1.992 $\pm$ 0.293 **	2.372 $\pm$ 0.127 *
补骨脂素低剂量组	4 mg/kg	2.053 $\pm$ 0.359 *	2.440 $\pm$ 0.282 *

注:与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\* $P < 0.05$



图3 各组 TNF- $\alpha$  RNA 表达电泳趋势图谱 1:补骨脂素低剂量组;2:补骨脂素高剂量组;3:假手术组;4:阳性对照组;5:模型组;6:壮骨止痛方组;M:DNA Marker

Fig. 3 The TNF- $\alpha$  mRNA expression in each group. 1: Psoralen low dose; 2: Psoralen high dose; 3: Sham operation group; 4: Estradiol group; 5: Model group; 6: ZGZT capsule group; M: DNA Marker.

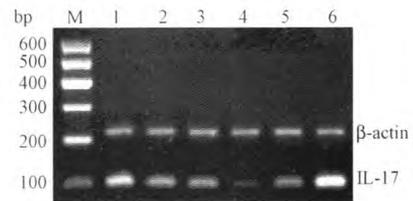


图4 各组 IL-17 mRNA 表达电泳图谱 1:补骨脂素低剂量组;2:补骨脂素高剂量组;3:壮骨止痛方组;4:假手术组;5:阳性对照组;6:模型组;M:DNA Marker

Fig. 4 The IL-17 mRNA expression in each group. 1: Psoralen low dose; 2: Psoralen high dose; 3: Sham operation group; 4: Estradiol group; 5: Model group; 6: ZGZT capsule group; M: DNA Marker.

### 3 讨论

补骨脂素是补骨脂的主要活性成分,可与雌激素受体(ER)结合,启动雌激素受体元件调控一系列基因的表达而发挥拟雌激素活性<sup>[4]</sup>。研究表明补骨脂素能促进成骨细胞增殖分化,增加成骨细胞骨保护素(OPG)的表达,抑制核因子 $\kappa$ B受体激活因子配体(RANKL)的表达而抑制破骨细胞的分化和成熟,从而抑制骨吸收发挥抗骨质疏松的作用<sup>[8]</sup>。

雌激素受体有 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种亚型,在骨组织内主要是 ER $\beta$ ,大部分分布在胞浆中,少部分分布在细胞膜。雌激素受体与雌激素结合后,雌激素受体转位到细胞核内调控一系列靶基因的表达。绝经后妇女的体内不仅雌激素水平大幅下降,而且组织细胞内的 ER 也下降<sup>[9-10]</sup>。由于 ER 是一种基因转录调控因子,其表达水平的下降必然影响到受其调控的一系列基因的表达。因此,在补充体内雌激素的同时,适当提高体内 ER 水平能更好地延缓绝经后

骨质疏松的发展。本研究结果表明,大鼠去卵巢3个月后,其体内血清 $E_2$ 水平和股骨 $ER_{\beta}$ 水平显著下降。给予戊酸雌二醇能显著提升 $ER_{\beta}$ 的表达水平。壮骨止痛胶囊不仅提高去卵巢骨质疏松大鼠体内 $E_2$ 水平,而且促进去卵巢骨质疏松大鼠股骨内 $ER_{\beta}$ 的表达。补骨脂素高剂量(8 mg/kg)也具有同时升高骨质疏松大鼠体内 $E_2$ 和 $ER_{\beta}$ 水平的作用。补骨脂素在低剂量(4 mg/kg)时对体内 $E_2$ 和 $ER_{\beta}$ 的调节作用没有显著影响。

IL-17主要由辅助性T17细胞(Th17)分泌,IL-17受体广泛存在于人体各种组织与细胞中,包括软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等。已有实验证实雌激素缺乏可以上调IL-17,促进RANKL的表达和骨的重吸收,且特异性拮抗IL-17或者IL-17受体缺失的小鼠在切除卵巢后不会发生骨质疏松<sup>[11]</sup>。因此,IL-17作为Th17细胞与骨细胞之间的调节因子,可以作为抗骨质疏松药物的一个新的作用靶点。本实验模型组大鼠血清IL-17非常显著升高( $P < 0.01$ ),而且股骨的IL-17基因表达也显著增强( $P < 0.01$ ),表明去卵巢造成体内雌激素缺乏导致股骨内的T17细胞的IL-17基因表达增强,从而提高骨微环境的IL-17水平,促进破骨细胞的骨吸收。补充戊酸雌二醇则非常显著抑制股骨内的T17细胞的IL-17基因表达,降低血清IL-17水平。补骨脂素高剂量(8 mg/kg)和低剂量(4 mg/kg)均能抑制去卵巢大鼠股骨T17细胞的IL-17基因表达和血清IL-17水平。

TNF- $\alpha$ 是目前发现的一种强有力的骨吸收诱导剂,在雌激素缺乏的小鼠中,T细胞分泌的TNF- $\alpha$ 通过与骨髓单核细胞表面的TNF受体结合,加强RANKL诱导的破骨细胞的形成<sup>[12]</sup>。雌激素缺乏时,激活和增殖T细胞,T细胞增多,TNF- $\alpha$ 、等细胞因子分泌增多<sup>[13]</sup>,促进破骨细胞的形成和活化,增强破骨细胞主导的骨吸收过程。本实验中,去卵巢模型大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平及股骨TNF- $\alpha$ 基因表达升高非常显著( $P < 0.01$ )。给予戊酸雌二醇后,去卵巢模型大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平及股骨TNF- $\alpha$ 基因表达下降非常显著( $P < 0.01$ ),这进一步证实雌激素缺乏后T细胞功能失衡在骨代谢失常中扮演了重要角色。补骨脂素高剂量(8 mg/kg)显著降低去卵巢大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05$ ),同时股骨TNF- $\alpha$ 基因表达也明显下调( $P < 0.05$ )。

本实验表明补骨脂素呈现明显的量效关系提高去卵巢大鼠血清雌激素水平,同时对去卵巢大鼠

TNF- $\alpha$ 、IL-17的调节也呈现量效关系。补骨脂素在低剂量(4 mg/kg)对 $E_2$ 和 $ER_{\beta}$ 的影响与模型组相比没有统计学差异,但其仍然能够抑制TNF- $\alpha$ 、IL-17基因表达和降低血清TNF- $\alpha$ 、IL-17水平。这种现象提示补骨脂素可能从两个方面发挥抗骨质疏松作用:一方面补骨脂素通过调节体内雌激素和雌激素受体水平对TNF- $\alpha$ 、IL-17基因表达进行调节,其中包括补骨脂素与雌激素受体结合;另一方面,补骨脂素可能通过其它非雌激素信号途径调节TNF- $\alpha$ 、IL-17基因表达。相关的具体作用细节需要借助有关转基因实验动物和体外细胞实验进一步研究。

### 【参 考 文 献】

- [1] 王建华,王艳,潘永梅. 补骨脂素对细胞增殖与分化的影响. 天然产物研究与开发,2007,19(5):844-846.  
Wang JH, Wan Y, Pan YM. Effects of psoralen on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts in vitro. Nat Prod Res Dev, 2007,19(5):844-846. (in Chinese)
- [2] 安亚兰,王建舫,许水明,等. 补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响. 畜牧兽医学报,2009,40(2):266-271.  
An YL, Wang JF, Xu SM, et al. Psoralea corylifolia L. provided liquid and Fructus Psoraleae on in vitro culture into bone cells. Storage, animal husbandry and veterinary journal, 2009,40(2):266-271. (in Chinese)
- [3] Tang DZ, Yang F, Yang Z, et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling. Biochem Biophys Res Commun, 2011,405(2):256-261.
- [4] Xin D, Wang H, Yang J. Phytoestrogens from Psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity. Phytomedicine, 2010,17(2):126-131.
- [5] 沈丽霞,赵丕文,牛建昭,等. 补骨脂素对人类乳腺癌细胞增殖作用的影响. 中国药理学通报,2007,23(11):1448-1451.  
Shen LX, Zhao PW, Niu JZ, et al. Psoralen on human breast cancer cell proliferation in vitro. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007,23(11):1448-1451. (in Chinese)
- [6] 赵丕文,牛建昭,王继峰. 补骨脂素的植物雌激素作用及其机制探讨. 中国中药杂志,2008,33(1):59-63.  
Zhao PW, Niu JZ, Wang JF. Psoralen phytoestrogenic effects and mechanism of explore. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008,33(1):59-63. (in Chinese)
- [7] 甘国兴,莫新民,李劲平. 壮骨止痛方无水乙醇提取A部位对去势雌鼠骨质疏松的疗效及机制研究. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):147-150.  
Gan GX, Mo XM, Li JP. Zhuanggu Zhitong ethanol extraction of part a of the curative effect and mechanism of osteoporosis in ovariectomized rats. Chinese Journal of experimental traditional medical formulae, 2011,17(17):147-150. (in Chinese)

(下转第395页)

因而容易出现骨质脆弱、腰膝酸软、易于骨折等症状,因此中老年人群易发原发性骨质疏松症。女性至七七后,任脉虚、太冲脉衰少、天癸竭,肾精不足而不能维持骨骼的正常功能,因此绝经后的女性也易发骨质疏松症。因此,肾虚是骨质疏松症发病的根本原因,补肾壮骨法是临床治疗该病的根本方法。

### 3.2 抗酒石酸酸性磷酸酶与骨质疏松症

破骨细胞是重要的骨吸收细胞,在骨骼的重塑中发挥着重要作用。破骨细胞一般含有4~20个核,由多个单核细胞融合而成。胞浆泡沫状含有多量空泡,内含有大量的溶酶体酶,如蛋白酶、乳酸和柠檬酸等,对骨吸收起到了重要作用<sup>[1]</sup>。TRACP是了解骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物<sup>[2]</sup>。TRACP的过度表达可表现为骨质疏松。当骨吸收增强时,破骨细胞粘附在骨表面,分泌的酸和蛋白酶在骨基质和破骨细胞之间形成一个空隙,磷酸酐酶和H<sup>+</sup>-ATP酶质子泵形成了一个酸性环境,位于破骨细胞微粒体TRACP,可通过破骨细胞波状缘分泌进入此空隙,与其他酶一起参与降解骨基质中固体钙磷矿物。

人体的整个生命过程中,骨骼通过破骨细胞去除衰老的部分,由成骨细胞形成的新骨替代,进而形成骨骼的再造循环,整个骨骼表面约有10%~15%的部分不停进行着骨骼的再造过程。骨吸收率增加的结果是骨质疏松,病人从骨质脆弱发展到骨质疏

松需要10年以上的时间<sup>[3]</sup>。

本实验结果显示,模型组大鼠血清TRACP含量升高最为显著,与正常组比较有明显差异,提示骨质疏松症大鼠骨吸收明显增强;与正常组相比,各中药治疗组均能降低骨质疏松症大鼠血清TRACP含量,其中补肾组、骨疏康组最为明显,提示补肾中药具有抑制地塞米松引起的大鼠骨吸收增强的作用,这也体现了中医学理论“肾主骨生髓”的实质。根据中医学未病先防、既病防变的思想,通过应用补肾中药可防治骨质疏松症。

### 【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚. 骨矿与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 66-96.  
Liu ZH. Bone mineral and clinical. Beijing: China Science and Technology Press, 2006:66-96. (in Chinese)
- [2] Huang JS, Tu ST, Yang TS, et al. Teriparatide vs calcitonin in the treatment of Asian postmenopausal women with established osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2006, 17(3): 373-378.
- [3] 史晓林, 朱彦昭, 宁玉梅, 等. 强骨饮对骨质疏松患者抗酒石酸酸性磷酸酶-5b影响的研究. *中国中医骨伤科杂志*, 2008; 16(1): 25-27.  
Shi XL, Zhu YZ, Ning YM, et al. Study on the effect of strong bone drink on the anti acid phosphatase-5b in osteoporosis patients. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics*, 2008, 16(1): 25-27. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-08-04)

(上接第392页)

- [8] 王建华, 郭敏, 郑丽, 等. 补骨脂素干预大鼠成骨细胞骨保护素/核因子κB受体激活因子配体mRNA的表达. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(37): 6927-6930.  
Wang JH, Guo M, Zheng L, et al. Psoralen intervention rats into bone cells and bone protection element/nuclear factor kappa B receptor activation factor ligand mRNA expression. *China tissue engineering research and clinical rehabilitation*, 2010, 14(37): 6927-6930. (in Chinese)
- [9] Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 29(5): 557-568.
- [10] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ERα) and beta (ERβ): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 2014, 90: 13-29.

- [11] DeSelm CJ, Takahata Y, WalTen J, et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. *Cell Biochem*, 2012, 113(9): 2895-2902.
- [12] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13960-13965.
- [13] 孙铁铮, 吴荣福, 陶天遵. 雌激素、细胞因子与绝经后骨质疏松症. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(4): 87-90.  
Sun TZ, Wu RF, Tao TZ. Estrogen and cytokines and postmenopausal osteoporosis. *Chinese Journal of osteoporosis*, 1998, 4(4): 87-90. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-07-11)