

左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的影响

杨锋* 杨利学 李小群 李彦民
陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 06-0761-05

摘要: 目的 观察补肾药左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠神经肽的影响, 阐明补肾法治疗骨质疏松症的神经调节机制。方法 建立去卵巢骨质疏松模型, 分别采用 ELISA、免疫组化以及 PCR 观察补肾药干预后骨组织及骨髓间充质干细胞中神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的变化。结果 切除卵巢后大鼠骨组织及骨髓间充质干细胞中神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的水平明显下降, 补肾药干预后 CGRP、SP、VIP、NPY 的水平明显上升, 但仍低于假手术组。结论 补肾药可以提高骨质疏松大鼠神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY, 这可能是补肾药治疗骨质疏松症的机制之一。

关键词: 中医中药; 骨质疏松; 神经肽

Effect of Zuogui and Yougui pills on neuropeptide CGRP, SP, VIP, and NPY in osteoporotic rats after ovariectomy

YANG Feng, YANG Lixue, LI Xiaoqun, LI Yanmin
The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China
Corresponding author: YANG Feng, Email: yangfengdudu@163.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of Zuogui and Yougui pills on the neuropeptides in ovariectomy-induced osteoporotic rats, and to clarify the neural regulation mechanism of kidney tonic medicine in the treatment of osteoporosis. **Methods** Osteoporosis model was established by ovariectomy. The change of neuropeptides CGRP, SP, VIP, and NPY in the bone and bone marrow mesenchymal stem cells was observed using ELISA, immunohistochemistry, and PCR method after kidney tonic medicine intervention. **Results** After ovariectomy, the levels of neuropeptides CGRP, SP, VIP, and NPY in the bone tissue and bone marrow mesenchymal stem cells declined obviously. After the intervention of kidney tonic medicine, the levels of CGRP, SP, VIP, and NPY increased obviously, but were still lower than those in sham operation group. **Conclusion** Kidney tonic medicine improves neuropeptides CGRP, SP, VIP, and NPY in osteoporotic rats. It may be one of the mechanisms of treating osteoporosis.

Key words: Chinese medicine; Osteoporosis; Neuropeptides

神经系统调控骨的发育、修复的研究日益增多, 业已证实神经肽降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、P 物质 (substance P, SP)、血管活性肠肽 (vasoactive intestinal polypeptide, VIP)、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 与其受体构成神经肽网络介导了神经系统与骨组织间信号的传导, 影响着骨的各种代谢变化, 但它们与绝经后骨质疏松

症 (osteoporosis, OP) 关系以及补肾中药调控机制的相关研究仍较少。左、右归丸均出自《景岳全书》, 是补肾阴和补肾阳的代表方剂。左归丸由六味地黄丸化裁而成, 去“三泻” (泽泻, 茯苓, 丹皮), 加入枸杞、龟板胶、牛膝加强滋补肾阴之力; 又加入鹿角胶、菟丝子温润之品补阳益阴, 阳中求阴。右归丸是将左归丸去掉部分滋阴药龟板胶和牛膝, 再增加几种辛温补阳药附子、杜仲、肉桂、当归而成。即张介宾所谓: “善补阴者, 必于阳中求阴, 则阴得阳升而泉源不竭。善补阳者, 必于阴中求阳, 则阳得阴助而生化无穷” 之义。中医在“肾主骨” 理论指导下应用左、右归丸治疗骨质疏松症取得了较好的疗效。本

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102610, 81473711); 陕西省中医管理局科研项目 (13-JC014); 陕西省科技计划项目 (2015SF072)

* 通讯作者: 杨锋, E-mail: yangfengdudu@163.com

文拟采用去卵巢方法诱导 OP, 分别观察雌激素缺乏状态下模型 OP 大鼠骨组织及骨髓间充质干细胞中神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 及它们受体的分布与表达变化, 并观察左、右归丸对神经肽的干预作用, 进一步阐明补肾中药复方的整体调节机理。

1 材料和方法

1.1 材料

选择 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌性 8 月龄, 体重 200 ± 20 g, 购自西安交通大学动物实验中心(陕动质 2013492)。DMEM(L) (Gibco, invitrogen, USA)、胎牛血清(FBS, Gibco, invitrogen, USA)、Total RNA 提取试剂盒 (Promega)、RT-PCR Kit (invitrogen, USA)、mRNA 引物(华大基因)、胰蛋白酶(Gibco, USA)、CO₂ 孵箱(thermo, USA)

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组: 动物称重后随机分组, 将 60 只大鼠随机分为 4 组, 假手术组, 模型组, 左归丸组、右归丸组, 每组 15 只。

1.2.2 造模方法: 模型组采用手术切除双侧卵巢的方法诱导 OP 模型, 称重, 麻醉后固定, 术区消毒, 取大鼠下腹部正中沿腹白线纵行切口约 1 cm, 打开腹腔, 查找卵巢, 结扎后切除两侧卵巢后缝合, 假手术组开腹后切除少量脂肪保留卵巢。骨密度检测: 造模 12 w 应用双能 X 线骨密度仪检测大鼠的骨密度, 3% 戊巴比妥钠麻醉, 双能 X 线骨密度仪(美国 Hologic 公司制造, Discovery ASY-00409 型)检测, 采用小动物骨密度分析软件分析。测定的部位选择腰椎、股骨近侧干骺端。药物干预 12 w 后用同样方法测量各组骨密度。

1.2.3 给药方法: 左归丸组成: 熟地黄 24 g、山萸肉 12 g、枸杞子 12 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、龟甲胶 12 g、山药 12 g、牛膝 9 g。右归丸处方组成: 熟地 24 g、山萸肉 9 g、枸杞子 9 g、当归 9 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、山药 12 g、杜仲 12 g、附子 6 g、肉桂 6 g。分别加水煎制, 并根据“人与动物体表面积折算等效剂量比率表”计算临床等效剂量, 左、右归丸组每天两次灌胃给药, 每次 1 mL, 连续灌胃 12 w 周治疗。模型组和假手术组给予等量的蒸馏水。

1.2.4 BMSCs 的分离、培养: 采用全骨髓培养法取 SD 大鼠骨髓冲洗液, 第 2 代培养细胞进行流式细胞仪检测, 结果显示细胞均一性较好, 其中 CD₃₄、CD₄₅ 表达呈阴性, 而 CD₉₀、CD₁₀₅ 表达呈阳性, 阳性率分别为 93.136% 和 93.182%, 提示培养所得细胞为主要是骨髓间质干细胞(BMSCs), 非造血性细胞。用细胞计数板作有核细胞计数, 调整细胞浓度为 5×10^4 /mL, 以备实验之用。

1.2.5 骨组织中 CGRP、SP、VIP、NPY 表达量的检测: 取左侧股骨近端相同部位的骨组织, 称重, 研磨器液氮中匀浆, ELISA 检测 CGRP、SP、VIP、NPY 的表达量, 采用免疫组化法观察骨组织中 CGRP、SP、VIP、NPY 肽能神经分布。

1.2.6 BMSCs 中 CGRP、SP、VIP、NPY 受体 mRNA 的表达检测: 采用 realtime 荧光定量 RT-PCR 检测, 骨组织称重, 研磨器液氮中匀浆, TRIZOL 法提取总 RNA; 根据 GenBank 注册的大鼠基因序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计 CGRP、SP、VIP、NPY 的荧光定量 PCR 引物; 提取的 RNA 浓度测定; 引物的合成; 逆转录; 定量 PCR 实验。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the genes

基因名称 The name of the gene		引物序列(5'to3') Primer sequences	引物长度(bps) the length of the primer	扩增长度(bps) amplification length
CGRP	F	ACTTGAACGCCATCACCTAC	20bP	115bP
CGRP	R	GTCAGCTTGTGGCTCTTCAT	20bP	
NPY	F	GGCGAACAGACGGATTCTT	19bP	196bP
NPY	R	CCTGGAGAACAGAGTTGA	18bP	
SP	F	GGCCTTCGACAGATACATGG	20Bp	140bP
SP	R	TCTCTGTGGTGGAGTAGTAG	20bP	
VIP	F	AGCCTCAAGATCATCAGC	18bP	96bP
VIP	R	GAGTCTTCCACGATACC	18bP	

1.3 统计学处理

数据录入与处理采用 SPSS18.0 统计软件包, 数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用秩和检验, 计量资料和对照组比较用 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, 采

用双侧检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

模型组与假手术组比较, 有非常显著性差异, 说明造模成功。左、右归丸组与模型组比较有统计学差异, 左归丸与右归丸组比较无统计学差异。说明补肾药左归丸和右归丸可以提高去卵巢大鼠的骨密度, 见表2。

ELISA 测定各组大鼠骨组织中神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 结果显示, 模型组大鼠神经肽水平明显下降, 与假手术组比较有统计学意义。左归丸和右归丸组神经肽水平较模型组显著上升, 与模型组比较有统计学意义。左归丸与右归丸组比较无统计学差异。见表3。

表2 各组大鼠骨密度测定结果($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

Table 2 Results of bone mineral density in each group($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

组别 (group)	腰椎 (lumbar)	股骨近端 (proximal femur)
假手术组 (sham operation)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.001
模型组 (model group)	0.11 ± 0.13 [▼]	0.10 ± 0.004 [▼]
左归丸组 (Zuogui pill group)	0.15 ± 0.003 [*]	0.17 ± 0.002 [*]
右归丸组 (Yougui pill group)	0.16 ± 0.001 ^{*▼}	0.18 ± 0.005 ^{*▼}

注: 与假手术组比较, $^{\nabla}P < 0.001$; 与模型组比较, $^*P < 0.001$; 与左归丸组比较, $^{\nabla}P > 0.05$

表3 各组大鼠神经肽测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Results of neuropeptides in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 (group)	CGRP (mmol/L)	SP (mmol/L)	VIP (U/L)	NPY (mmol/L)
假手术组 (sham operation)	2.18 ± 0.20	1.15 ± 0.12	1.28 ± 0.10	1.25 ± 0.17
模型组 (model group)	2.12 ± 0.13 [▼]	1.07 ± 0.18 [▼]	1.11 ± 0.14 [▼]	1.08 ± 0.11 [▼]
左归丸组 (Zuogui pill group)	2.15 ± 0.08 [*]	1.16 ± 0.06 [*]	1.24 ± 0.12 [*]	1.19 ± 0.07 [*]
右归丸组 (Yougui pill group)	2.16 ± 0.11 ^{*▼}	1.18 ± 0.10 ^{*▼}	1.28 ± 0.15 ^{*▼}	1.20 ± 0.09 ^{*▼}

注: 与假手术组比较, $^{\nabla}P < 0.001$; 与模型组比较, $^*P < 0.001$; 与左归丸组比较, $^{\nabla}P > 0.05$

去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中 CGRP、SP、VIP、NPY 肽能神经分布明显减少, 左、右归丸干预后 CGRP、SP、VIP、NPY 肽能神经分布与模型组比较显著增加。见图1、2、3、4。

模型组与假手术组比较, 有非常显著性差异,

说明去卵巢模型大鼠神经肽水平显著下调。左、右归丸组与模型组比较有统计学差异, 左归丸与右归丸组比较无统计学差异。说明补肾药左归丸和右归丸可以上调去卵巢大鼠的神经肽基因表达水平。见表4。

表4 BMSCs 中 CGRP、SP、VIP、NPY mRNA 的表达

Table 4 mRNA expression of CGRP, SP, VIP, and NPY in BMSCs

组别 (group)	CGRP	SP	VIP	NPY
假手术组 (sham operation)	1.969 ± 0.049	0.222 ± 0.062	0.136 ± 0.074	0.118 ± 0.012
模型组 (model group)	1.068 ± 0.032 [▼]	0.105 ± 0.034 [▼]	0.067 ± 0.004 [▼]	0.074 ± 0.001 [▼]
左归丸组 (Zuogui pill group)	1.735 ± 0.071 [*]	0.201 ± 0.025 [*]	0.130 ± 0.066 [*]	0.108 ± 0.007 [*]
右归丸组 (Yougui pill group)	1.698 ± 0.055 ^{*▼}	0.214 ± 0.023 ^{*▼}	0.127 ± 0.049 ^{*▼}	0.111 ± 0.002 ^{*▼}

注: 与假手术组比较, $^{\nabla}P < 0.001$; 与模型组比较, $^*P < 0.001$; 与左归丸组比较, $^{\nabla}P > 0.05$

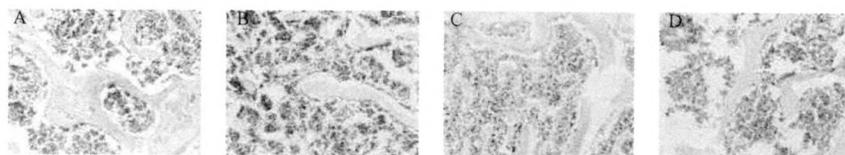


图1 骨细胞 CGRP 蛋白 $\times 200$

A 假手术组弱阳性表达; B 模型组弱阳性表达; C 左归丸组阳性表达; D 右归丸组阳性表达

Fig.1 Expression of CGRP protein, $\times 200$

A. Weak positive expression in sham operation group, B. Weak positive expression in model group, C. Positive expression in Zuogui pill group, D. Positive expression in Yougui pill group

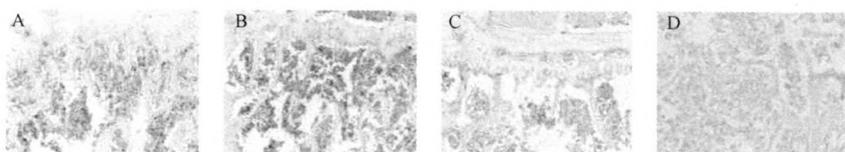


图2 SP 蛋白表达 $\times 200$

A 假手术组弱阳性表达; B 模型组弱阳性表达; C 左归丸组阳性表达; D 右归丸组阳性表达

Fig.2 Expression of SP protein, $\times 200$

A. Weak positive expression in sham operation group, B. Weak positive expression in model group, C. Positive expression in Zuogui pill group, D. Positive expression in Yougui pill group

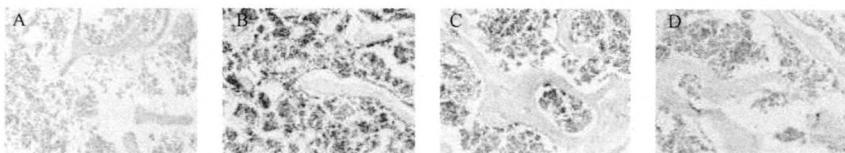


图3 VIP 蛋白表达 $\times 200$

A 假手术组弱阳性表达; B 模型组弱阳性表达; C 左归丸组阳性表达; D 右归丸组阳性表达

Fig.3 Expression of VIP protein, $\times 200$

A. Weak positive expression in sham operation group, B. Weak positive expression in model group, C. Positive expression in Zuogui pill group, D. Positive expression in Yougui pill group

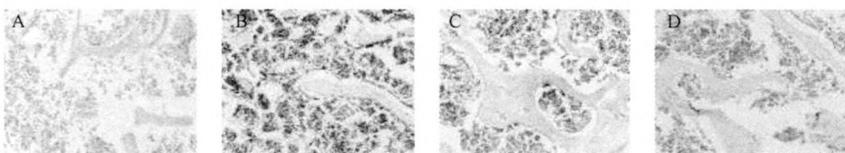


图4 NPY 蛋白表达 $\times 200$

A 假手术组弱阳性表达; B 模型组弱阳性表达; C 左归丸组阳性表达; D 右归丸组阳性表达

Fig.4 Expression of NPY protein, $\times 200$

A. Weak positive expression in sham operation group, B. Weak positive expression in model group, C. Positive expression in Zuogui pill group, D. Positive expression in Yougui pill group

3 讨论

神经系统对骨组织内环境调节是多层次、多元和复杂的, CGRP、SP、VIP、NPY 作为骨代谢调节中重要的神经肽及营养因子,在骨吸收和骨形成耦联机制中发挥了极其重要的作用,特别是近年来对神

经源性骨质疏松、神经损伤后骨折愈合和异位骨化等深入研究,逐步认识到神经化因素对骨代谢影响的重要性,并提出神经-内分泌-骨的轴线调节理论^[1,2]。骨组织 CGRP、SP、VIP、NPY 的降低与骨质疏松的形成存在着一定的联系。神经肽的减少可能导致其促进骨形成功能的减弱,进一步刺激骨质疏

松的形成,这可能是骨质疏松形成的机制之一^[3]。

中医药在“肾主骨”理论指导下应用补肾药物治疗骨质疏松症取得了较好的疗效。而随着中医肾本质研究的不断深入,已经认识到肾虚与衰老具有相同的神经内分泌免疫网络功能低下的特征,而补肾药可以恢复此网络功能^[5]。同时,更具创新性的研究表明肾所藏之精可相应于胚胎干细胞及它分化为各种组织器官的成体干细胞。干细胞具有先天之精的属性^[6]。补肾药对干细胞神经肽基因表达的调控更有助于对肾本质的理解。左、右归丸对肾虚证所取得的疗效与其减轻下丘脑-垂体-靶腺的功能损害及修复其功能相关^[7]。

基于以上研究成果,本研究选择左、右归丸来干预去卵巢骨质疏松大鼠,观察补肾药对神经肽网络以及干细胞中神经肽基因表达的影响,力图更进一步探索“肾主骨”理论的科学内涵。研究结果表明切除卵巢后大鼠骨组织以及骨髓间充质干细胞中神经肽水平与假手术组比较明显下降,这表明神经肽的缺乏是骨质疏松症发生的原因之一。我们在“肾主骨”理论指导下应用补肾经典名方左、右归丸干预骨质疏松症模型,则干预后神经肽水平显著上升,但仍未达到假手术组的水平,左、右归丸两组之间神经肽水平无明显差异。证明了补肾中药左、右归丸可以作用于神经内分泌轴,从而调节骨代谢。无论滋肾阴还是补肾阳药物均具有调控神经肽网络的作用。大量研究也证实补肾药物可以通过神经-内分泌-免疫(NEI)网络来调节骨代谢^[8]。至于左归丸和右归丸调控神经系统与骨组织间信号传导的通路有无不同,仍需进一步研究。补肾药通过提高骨量、调节骨代谢等环节治疗骨质疏松症的疗效已得到证实,本研究结果初步证明补肾药左归丸、右归丸可以提高骨质疏松模型大鼠的神经肽水平,但其通过神经肽网络调控骨代谢的机制仍需深入研究。

【参 考 文 献】

[1] Tsujimoto T, Kumo ML. Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals. *J*

Neurosci, 1988, 8:3951.

[2] 刘勇,裴国献. 周围神经因素与骨和组织工程骨. *国际骨科学杂志*, 2006, 1(27): 12-14.

Liu Y, Pei GX. Peripheral nerve and bone and tissue engineering bone. *International Journal of Bone Science*, 2006, 1 (27): 12-14.

[3] 吕辰鹏,杨丽,孙影,等. 去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织CGRP及其1型受体的表达. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(5): 976-979.

Lv CP, Yang L, Sun Y, et al. Expression of CGRP and its type 1 receptor in the bone tissue of ovariectomy osteoporosis model rats. *Chinese Journal of Pathology Physiology*, 2011, 27 (5): 976-979.

[4] 朱晓峰,王廷春,张荣华,等. 益骨胶囊对去卵巢大鼠骨密度及血浆和骨组CGRP和SP含量的影响. *时珍国医国药*, 2012, 23(5): 1054-1056.

Zhu XF, Wang TC, Zhang RH, et al. Good bone capsule on bone density contents of CGRP and SP in plasma and bone of ovariectomy rats. *Shizhen Traditional Chinese Medicine*, 2012, 23 (5): 1054-1056.

[5] 沈自尹. 肾的研究续集. 上海: 上海科学技术出版社, 1990, 142-147.

Shen ZY. *Kidney research sequel*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1990, 142-147.

[6] 沈自尹,黄建华. 从淫羊藿激活内源性干细胞探讨“肾藏精”的科学涵义. *中医杂志*, 2010, 51(1): 8-10.

Shen ZY, Huang JH. From epimedium activation of endogenous stem cells to explore the scientific meaning of “the kidney stores essence”. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 51 (1): 8-10.

[7] 刘天成. 右归丸对肾虚大鼠下丘脑-垂体性腺轴影响的实验研究. *吉林中医药*, 2007, 27(4): 56-57.

Liu TC. Experimental research on Yougui pill to hypothalamus pituitary gonadal axis of kidney Yang deficiency rats. *Jilin Traditional Chinese Medicine*, 2007, 27(4): 56-57.

[8] 肖炜. 中药对去势大鼠神经内分泌免疫网络的影响. *浙江中医药大学学报*, 2008, 32(4): 443-445.

Xiao W. Effect of traditional chinese medicine on neuro-endocrine-immune network in ovariectomized rats. *Journal of Zhejiang University of Chinese Medicine*, 2008, 32 (4): 443-445.

(收稿日期: 2015-11-07, 修回日期: 2016-01-16)