

补肾、活血复方对骨质疏松症模型大鼠 VEGF 表达的影响

孙宁 邓洋洋* 孙鑫 尚德阳 林庶茹 郑洪新

辽宁中医药大学 沈阳 110847

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1096-05

摘要: 目的 比较补肾、活血复方对骨质疏松症模型大鼠 VEGF 表达的影响,探讨补肾、活血复方治疗骨质疏松症的分子机制。方法 以去卵巢骨质疏松症模型大鼠为实验研究对象,不同实验药物灌胃 12 周后,双能 X 线法测定骨密度,ELISA 法测定骨、肾及血清中 VEGF 含量,定量 PCR 法测定骨、肾中 VEGF mRNA 相对表达量。结果 骨质疏松症模型大鼠骨密度、VEGF 蛋白及 mRNA 表达量显著降低,运用补肾、活血中药复方干预后,各组大鼠骨密度、VEGF 蛋白含量及 mRNA 表达量显著升高。结论 肾虚血瘀骨代谢失常与 VEGF 表达降低有关,补肾、活血复方通过调节 VEGF 表达水平,起到治疗骨质疏松症的作用。关键词: 中医中药; 补肾; 活血; 骨质疏松症; VEGF

Effect of the nourishing kidney and promoting blood circulation compound on VEGF expression in rat osteoporosis model

SUN Ning, DENG Yangyang, SUN Xin, SHANG Deyang, LIN Shuru, ZHENG Hongxin

Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: DENG Yangyang, Email: dy1981@163.com

Abstract: **Objective** To compare the effect of the nourishing kidney and promoting blood circulation compound on VEGF expression of rat osteoporosis model, and to investigate the molecular mechanism of the nourishing kidney and promoting blood circulation compound in the treatment of osteoporosis. **Methods** Ovariectomized osteoporosis rat model was used for experimental objective. The rats were given the medicines by intragastric administration for 12 weeks. Bone mineral density was measured using dual-energy X-ray absorptiometry. The content of VEGF in the bone, kidney, and the serum were determined using ELISA method. The relative expression of VEGF mRNAs in the bone and the kidney were determined using qPCR method. **Results** The expressions of VEGF protein and mRNA in osteoporosis model rats decreased significantly. After the intervention with the nourishing kidney and promoting blood circulation compound, the expressions of VEGF protein and mRNA of each group increased significantly. **Conclusion** The disorder of bone metabolism due to renal deficiency and blood stasis is related to low expression of VEGF. The nourishing kidney and promoting blood circulation compound can treat osteoporosis through regulation of the expression of VEGF.

Key words: Chinese Medicine; Nourishing kidney; Promoting blood circulation; Osteoporosis; VEGF

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨组织微细结构破坏为特征,继而导致脆性增加和骨折危险性增高的一种全身性骨骼疾病^[1]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知的对血管生成具有调节作用的

细胞生长因子中最为重要的一种,在骨组织的生长、发育与修复过程中均起着重要作用。本研究以大鼠股骨、肾及血清为研究对象,观察了补肾、活血复方对骨质疏松症模型大鼠 VEGF 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雌性 10 月龄 SD 大鼠 60 只,由北京维通利华实验动物有限公司提供。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81302879)

* 通讯作者: 邓洋洋, Email: dy1981@163.com

1.2 药物

补肾填精复方为左归丸(熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿胶、龟胶,辽宁中医药大学附属医院药房提供);活血化瘀复方为身痛逐瘀汤(秦艽、川芎、桃仁、红花、甘草、羌活、没药、当归、灵脂、香附、川牛膝、地龙,辽宁中医药大学附属医院药房提供);补肾活血复方为左归丸与身痛逐瘀汤加减(熟地、菟丝子、鹿胶、龟胶、川芎、桃仁、红花、川牛膝,辽宁中医药大学附属医院药房提供);阳性对照药为骨疏康颗粒(辽宁康辰药业有限公司,批号:20100830)。

1.3 试剂

大鼠 VEGF ELISA 试剂盒(R&D systems)、Trizol(Invitrogen)、逆转录试剂盒(Takara)、荧光定量 PCR 试剂盒(Agilent Technologies)。

1.4 仪器

多功能酶标仪(INFINITE M200)由瑞士 TECAN 公司提供。荧光定量 PCR 仪(Stratagene Mx3000P)由美国 Agilent Technologies 公司提供。双能 X 射线骨密度仪(Lunar DPX)由美国 GE 公司提供。

1.5 分组

大鼠按体重分层后随机分为 6 组:正常组、模型组、补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组、阳性对照组,每组 10 只。

1.6 造模

采用一次性手术摘除双侧卵巢造模法。除正常组外,大鼠经氯胺酮(50 g/ml)肌肉注射麻醉,0.1 ml/100 g 体重。麻醉后的大鼠从腰背部脊柱两侧做纵行切口切开皮肤及肌肉,见到呈深粉红色卵巢组织,提起后丝线结扎其周围相连组织,将其完整切除,摘除两侧卵巢组织后逐层缝合,关闭创口。术后给与青霉素肌肉注射,连续注射 3 d。

1.7 给药

手术后一周开始灌胃给药,每日 1 次。正常组、模型组给等量生理盐水,补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组、阳性对照组用量按人体公斤体重(g/kg)每日用药量的 6.3 倍计算,体积为 1 ml/100 g 给药 12 周。

1.8 取材

末次给药后,禁食 24 h,取股骨、肾及血清 -70℃ 冻存备用。

1.9 检测指标

1.9.1 通过双能 X 线骨密度分析仪对大鼠离体股骨进行检测。扫描宽度为 15 cm,扫描速度为 40

mm/sec,分辨率为 $1.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$ 。结果采用单位面积内的骨矿物质含量(g/cm^2)表示。

1.9.2 采用 ELISA 法测定骨、肾及血清中 VEGF 含量。用咬骨钳将骨组织剪成小块,转入装有液氮的研钵中。确保液氮始终浸没骨组织,将骨组织研磨成粉末状后转移至 EP 管中,加裂解液冰浴 30 min。转移上清至新 EP 管中 $12000 \times g$ 离心 15 min 后取上清。将肾组织放入预冷玻璃匀浆器壶腹冰上迅速剪碎,加入裂解液后冰上匀浆。将匀浆液转移至 EP 管中 $12000 \times g$ 离心 15 min 后取上清。全血加蛋白酶抑制剂,室温静置后离心取血清。将 320 ng/L、160 ng/L、80 ng/L、40 ng/L、20 ng/L、10 ng/L 标准品各 50 μL 依次加入 A2-A7 排 7 孔中, A1 孔只加样品稀释液作为空白对照,其余各孔加样品 50 μL 。在标准品孔和样品孔中加入 100 μL 的酶标记溶液。37℃ 孵育 60 min。洗板机清洗 5 次,每次静置 20 s。每孔加入底物 A、B 液各 50 μL 。37℃ 避光孵育 15 min。每孔加入 50 μL 中止液终止反应。用多功能酶标仪检测 450 nm OD 值。得到的数据用 Excel 作标准曲线,根据标准曲线回归方程计算样品的浓度。

1.9.3 定量 PCR 法测定骨、肾中 VEGF mRNA 相对表达量。用咬骨钳将骨组织剪成小块,转入装有液氮的研钵中。确保液氮始终浸没骨组织,将骨组织研磨成粉末状后转移至 EP 管中,加 Trizol 冰浴 30 min。转移上清至新 EP 管中 $12000 \times g$ 离心 15 min 后取上清。将肾组织放入预冷玻璃匀浆器壶腹冰上迅速剪碎,加入 Trizol 后冰上匀浆。将匀浆液转移至 EP 管中 $12000 \times g$ 离心 15 min 后取上清。常规提取 RNA,检测 RNA 浓度及纯度后反转录, cDNA 产物 4℃ 保存。使用 Primer-BLAST^[2] 设计引物。大鼠 VEGF 上游引物为: 5'-AGA AAG CCC ATG AAG TGG TGA -3', 下游引物为: 5'-TCT CAT CGG GGT ACT CCT GG -3', 产物大小为 102bp。大鼠 β -actin 作为内参,上游引物为: 5'-CGC GAG TAC AAC CTT CTT GC -3', 下游引物为: 5'-CGT CAT CCA TGG CGA ACT GG -3', 产物大小为 70bp。定量 PCR 反应条件为: ①95℃ 预变性 3 min; ②95℃ 变性 5 sec, 60℃ 退火 1 min 后采集荧光信号,重复 40 个循环; ③循环反应后,按以下条件测溶解曲线: 95℃ 15 sec, 55℃ 1 min, 95℃ 30 sec。在 55℃ 升温至 95℃ 过程中,每升高 0.5℃ 采集一次荧光信号。先以梯度稀释的 cDNA 模板,测得各引物的扩增效率。再以各组样品进行定量 PCR 检测,反应结束后,由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性。利用测得 Ct 值

及扩增效率计算相对表达量^[3]。

1.9.4 统计学分析 采用 Spss19.0 软件处理所得数据,选用 ONE-Way ANOVA 进行统计,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。当 $P < 0.05$ 时认为作比较的两组数据在统计学上具有差异。

2 结果

2.1 骨质疏松症模型大鼠离体股骨骨密度检测结果

采用双能 X 射线吸收法对各组大鼠离体股骨进行检测。检测结果见表 1,与正常组比较,模型组大鼠骨密度显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组、阳性对照组大鼠骨密度显著升高($P < 0.05$)。补肾填精组骨密度显著高于活血化瘀组($P < 0.05$)。

2.2 骨质疏松症模型大鼠骨、肾组织匀浆及血清中 VEGF 含量检测结果

与正常组比较,模型组大鼠 VEGF 含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组、阳性对照组大鼠 VEGF 含量显著升高($P < 0.05$)。骨组织中补肾填精组、补肾活血

组 VEGF 含量显著高于活血化瘀组($P < 0.05$)。肾组织与血清中补肾活血组 VEGF 含量显著高于活血化瘀组($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠离体股骨骨密度比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of BMD of the femur among rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	骨密度(g/cm^2) BMD(g/cm^2)
正常组 Normal group	0.1874 $\pm$ 0.0036
模型组 Model group	0.1360 $\pm$ 0.0057
补肾填精组 Bushentianjing group	0.1591 $\pm$ 0.0038 * Δ
活血化瘀组 Huoxuehuayu group	0.1515 $\pm$ 0.0048 *
补肾活血组 Bushenhuoxue group	0.1529 $\pm$ 0.0033 *
阳性对照组 Positive control group	0.1546 $\pm$ 0.0039 *

* : 与模型组比较: $P < 0.05$; Δ : 与活血化瘀组比较: $P < 0.05$

* : Compared with model group, $P < 0.05$; Δ : Compared with nourishing kidney and promoting blood circulation compound group: $P < 0.05$

表 2 各组大鼠骨、肾及血清中 VEGF 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of the content of VEGF in the bone, kidney, and serum among rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	骨(ng/L) Bone(ng/L)	肾(ng/L) Kidney (ng/L)	血清(ng/L) Serum (ng/L)
正常组 Normal group	158.77 $\pm$ 6.55	154.11 $\pm$ 11.22	177.62 $\pm$ 15.49
模型组 Model group	49.67 $\pm$ 4.70	48.19 $\pm$ 14.51	62.98 $\pm$ 5.21
补肾填精组 Bushentianjing group	77.33 $\pm$ 6.90 * Δ	90.37 $\pm$ 9.73 *	96.96 $\pm$ 7.43 *
活血化瘀组 Huoxuehuayu group	61.10 $\pm$ 5.72 *	80.75 $\pm$ 6.20 *	85.17 $\pm$ 5.42 *
补肾活血组 Bushenhuoxue group	74.81 $\pm$ 4.49 * Δ	99.39 $\pm$ 6.75 * Δ	99.10 $\pm$ 6.68 * Δ
阳性对照组 Positive control group	90.20 $\pm$ 17.74 * Δ	107.65 $\pm$ 6.81 * Δ	17.00 $\pm$ 13.23 * Δ

* : 与模型组比较: $P < 0.05$; Δ : 与活血化瘀组比较: $P < 0.05$

* : Compared with model group, $P < 0.05$; Δ : Compared with nourishing kidney and promoting blood circulation compound group: $P < 0.05$

2.3 骨质疏松症模型大鼠骨、肾中 VEGF mRNA 相对表达量结果

与正常组比较,模型组大鼠 VEGF mRNA 相对表达量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组、阳性对照组大鼠 VEGF mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$)。补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组之间互相比无

显著差异。

3 讨论

中医学典籍中没有“骨质疏松症”的这一病名的记载,但在《内经》等经典典籍中可以见到与骨质疏松症病理变化及临床表现相似的论述。根据其临床表现,当属中医学“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”

表 3 各组大鼠骨、肾中 VEGF mRNA 相对
表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison of the relative expression ratio
of VEGF mRNA in the bone, kidney, and serum
among rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Group	骨 Bone	肾 Kidney
正常组 Normal group	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.15
模型组 Model group	0.17 ± 0.08	0.19 ± 0.11
补肾填精组 Bushentianjing group	0.68 ± 0.12*	0.59 ± 0.14*
活血化瘀组 Huoxuehuayu group	0.77 ± 0.15*	0.63 ± 0.17*
补肾活血组 Bushenhuoxue group	0.66 ± 0.10*	0.58 ± 0.11*
阳性对照组 Positive control group	0.62 ± 0.12*	0.61 ± 0.13*

*: 与模型组比较: $P < 0.05$

*: Compared with model group: $P < 0.05$

等范畴,就其临床症状而言主要以骨痛为主,其病机主要与肾精亏虚导致不荣则痛、血行瘀滞导致不通则痛有关。

肾精不足、骨失所养是骨质疏松发病关键^[4]。肾藏精,主生长、发育、生殖,在体合骨,主骨生髓,为先天之本。骨的生长发育都有赖于肾中精气的充盈。唐宗海《中西汇通医经精义一脏腑所合》曰:“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所合也;髓者,肾精所生,精足则髓足,髓在骨内。髓足者则骨强。”若肾精亏虚,生髓乏源,骨失所养,导致骨代谢异常形成骨质疏松症。窦才《扁鹊心书·骨缩病》曰“此由肾气疲惫,肾主骨,肾水既涸,则诸骨皆枯,渐至短缩”指出骨痿病因是“肾气衰惫”,症状是“身上缩短”、疼痛,这和骨质疏松症发生之后腰椎发生挤压的症状非常的相似。由此可见,肾虚髓减、骨失所养是骨质疏松症发生的根本。

骨痛是骨质疏松症常见的症状。中医认为痛则不通,骨痛是瘀血阻络的主要临床表现之一。由于绝经后妇女脏腑功能衰退,所以多见虚证。又由于其机体功能衰退,体虚气弱,易受外邪侵袭,导致气机不利,气虚无力推动血行脉中,使经络不通、气血不畅,往往伴随血瘀的存在^[5]。瘀阻经络、经络不通则出现疼痛、功能障碍。瘀血一旦形成,不但在局部产生疼痛症状,而且使气血运行障碍,营养物质不能濡养脏腑,骨骼失养,脆性增加,加重骨质疏松症。张荣华^[6]等研究表明在骨骼系统,血瘀造成骨小梁

内微循环的障碍,不利于细胞进行物质交换,导致血液中的钙及营养物质不能正常的通过哈佛氏系统进入骨骼,而致骨骼失养,脆性增加,发生骨质疏松。眭承志^[7]等对 60 例绝经后骨质疏松症患者进行研究,发现绝经后骨质疏松症存在着血瘀的客观性病理变化,血瘀是引起绝经后骨质疏松症的主要病机之一。肾虚血瘀所致骨代谢失常可见于骨质疏松症等疾病,补肾、活血中药临床上治疗骨质疏松症调整骨代谢疗效确切。

VEGF 与骨代谢密切相关,它通过促进内皮细胞增殖、血管形成参与成骨和破骨作用^[8]。Hiltunen 等^[9]采用兔股骨远端注射 VEGF 腺病毒载体的方法,发现注射 VEGF 可以使兔股骨成骨细胞的数量及骨量显著增加,且骨吸收作用减弱。有研究表明,转染 VEGF 基因可使成骨细胞增殖更加活跃而导致成骨活性加强^[10]。在骨组织中,血管形成与骨形成是协调进行的,血管形成障碍将使骨形成减少。Pufe 等^[11]使用雌激素刺激体外培养成骨细胞后发现细胞表达 VEGF 的水平增强,提示导致绝经期骨密度减少的机制之一可能是 VEGF 表达减弱。

本实验结果表明,骨质疏松症模型大鼠骨、肾、血清中 VEGF 蛋白及 mRNA 表达量显著降低,提示 VEGF 表达的变化与骨质疏松症的发生密切相关,VEGF 表达降低是骨质疏松症的病理机制之一。运用补肾、活血中药复方干预后,各组 VEGF 蛋白含量有不同程度的显著升高,其中补肾填精组和补肾活血组效果较好。各干预组 VEGF mRNA 表达量亦显著增高,但补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组之间互相比较无显著差异,说明产生各干预组 VEGF 蛋白表达差异的调控发生在翻译阶段。综上所述,肾虚血瘀骨代谢失常与 VEGF 表达降低有关,通过补肾、活血法提高 VEGF 表达水平可能是补肾、活血中药复方治疗骨质疏松症的作用机制之一。

【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松学. 科学出版社. 第 1 版. 2001: 142.
Liu Zhong-hou. Osteoporosis. Science Press. 1st ed, 2001, 142.
- [2] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012, 13: 134.
- [3] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research. 2001, 29(9): 2002-2007.
- [4] 徐晓东, 郑洪新. 肾虚与骨质疏松症. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(4): 45-46.
Xu Xiaodong, Zheng Hongxin. Deficiency of the kidney and

- osteoporosis. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 9(4): 45-46. (in Chinese)
- [5] 陈志霞. 绝经后骨质疏松症的中医药治疗进展. 中医药导报, 2007, 13(7): 94-95.
Chen Zhixia. Therapy of TCM for postmenopausal osteoporosis. Guiding Journal of TCM, 2007, 13(7): 94-95. (in Chinese)
- [6] 张荣华, 朱晓峰. 脾肾两虚兼血瘀与原发性骨质疏松关系的探讨. 四川中医, 2003, 21(5): 11-12.
Zhang Ronghua, Zhu Xiaofeng. Relationship between pishenliangxu and xueyu and primary osteoporosis. Journal of Sichuan of Traditional Medicine, 2003, 21(5): 11-12. (in Chinese)
- [7] 睦承志, 周军, 刘志坤. 绝经后骨质疏松症血瘀病机的客观初步论证. 中医研究, 2005, 18(1): 30-33.
Gui Zhicheng, Zhou Jun, Liu Zhikun. Objective to study the pathogenesis of xueyu syndrome in postmenopausal osteoporosis. Traditional Chinese Medicinal Research, 2005, 18(1): 30-33. (in Chinese)
- [8] 于志勇, 魏启幼. 血管内皮生长因子在骨质疏松症中的研究进展. 国外医学·老年医学分册, 2008, 29(1): 15-19.
- Yu Zhiyong, Wei Qiyu. Research progress of vascular endothelial growth factor in osteoporosis. Foreign Medical Sciences(Geriatrics), 2008, 29(1): 15-19. (in Chinese)
- [9] Hiltunen M, Ruuskanen M, Huuskonen J, et al. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. FASEB, 2003, 17(19): 1147-1149.
- [10] 钟刚, 裴福兴, 李胜富. 血管内皮生长因子基因转染促进成骨细胞增殖及其功能的实验研究. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37(1): 44-47.
Zhong Gang, Pei Fuxing, Li Shengfu, et al. Experimental study on the proliferation and function of osteoblast cell induced by pBLAST49-mVEGF gene transfection. Journal of Sichuan University(Medical Science Edition), 2006, 37(1): 44-47. (in Chinese)
- [11] Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in göttingen miniature pigs and human osteoblasts. Calcified Tissue International, 2007, 80(3): 184-191.

(收稿日期: 2016-03-11; 修回日期: 2016-05-21)

(上接第 1095 页)

- Chen Jinbiao, Qin Linlin, Zhang Wei, Ge Chonghua, Ma Haibo, Xiao Yanxia. Relationship between body weight and body composition and bone mineral density [J]. China Journal of osteoporosis, 1997, 02: 15-18.
- [19] 黄淑玉, 文重远, 管晓峰. 体成分对男性 2 型糖尿病患者骨密度的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 02: 203-206 + 219.
Shu Yue Huang, Wen Qiang Zhongyuan, Xiaofeng. Effect of body composition on bone mineral density in male patients with type 2 diabetes [J]. Chinese Journal of osteoporosis, 2015, 02: 203-206 + 219.
- [20] 谢志丹. 体育舞蹈运动对女大学生骨密度和体成分的影响 [D]. 西安体育学院, 2013.
Xie Zhidan. The influence of sports dance on the bone mineral density and body composition of female college students [D]. Xi'an Physical Education University, 2013.
- [21] 刘欣, 徐亮亮. 跑步和游泳对青春期女孩骨密度的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2014, 09: 834-838.
- Liu Xin, Xu Liangliang. Effects of running and swimming on bone mineral density of adolescent girls [J]. Journal of Chinese Journal of rehabilitation medicine, 2014, 09: 834-838.
- [22] 张震宇, 侯勇, 王冠, 等. 运动对预防老年骨质疏松性骨折的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 08: 1977-1978.
Zhang Zhenyu, Hou Yong, Wang Guan, Yang Shoujun. Movement of the preventive effect of senile osteoporosis osteoporotic fractures [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 08: 1977-1978.
- [23] Seem E, Eisman JA. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat [J]. Med J Aust, 2004; 180(6): 298-303.
- [24] Laddu DR, Farr JN, Lee VR, et al. Muscle density predicts changes in bone density and strength: a prospective study in girls [J]. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions, 2014, 14(2): 195.
- [25] Chahal J, Lee R, Luo J. Loading dose of physical activity is related to muscle strength and bone density in middle-aged women [J]. Bone, 2014, 67: 41-45.

(收稿日期: 2016-01-22; 修回日期: 2016-03-18)