

绝经后骨质疏松症肾阴虚证的免疫蛋白相关研究

许惠娟 陈娟 李生强 谢丽华 陈赛楠 葛继荣*

福建省中医药研究院, 骨质疏松证候基因组学重点研究室, 福建 福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 12-1509-04

摘要: 目的 探讨绝经后骨质疏松症肾阴虚证与 LRG1、SRC 蛋白表达变化的关联性。方法 随机选择绝经后骨质疏松症患者, 中医辨证肾阴虚证组 25 例, 30 例健康绝经后妇女为对照组, Western-blot 法检测外周血 LRG1、SRC 的蛋白表达。结果 肾阴虚证组 LRG1 蛋白表达水平 (1.2391 ± 1.5860) 高于对照组 (0.8033 ± 0.7485), 有升高趋势, 差异无统计学意义 ($Z = -0.085$, $P = 0.933$), 肾阴虚证组 SRC 蛋白表达水平 (0.7873 ± 0.6275) 与对照组 (0.3712 ± 0.4064) 比较, 差异有统计学意义 ($Z = -2.874$, $P = 0.004$)。结论 骨质疏松症肾阴虚证与 SRC 蛋白表达升高相关联。

关键词: 中医中药; 绝经后骨质疏松症; 肾阴虚证; 免疫蛋白质类

Analysis of immunoprotein expression in postmenopausal osteoporosis patients with Kidney Yin deficiency

XU Huijuan, CHEN Juan, LI Shengqiang, XIE Lihua, CHEN Sainang, GE Jirong*

Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Corresponding author: GE Jirong, Email: gjrjgcy@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the protein expression of LRG1 and SRC in postmenopausal osteoporosis patients with Kidney Yin deficiency. **Methods** Postmenopausal osteoporosis patients were randomly selected. Thirty women with normal bone mineral density acted as controls, and 25 women with Kidney Yin deficiency syndrome group were the study group. The protein expression of LRG1 and SRC in peripheral blood was detected by Western-blot method. **Results** The expression level of LRG1 protein in Kidney Yin deficiency group ($1.2391 + 1.5860$) was higher than that of the control group ($0.8033 + 0.7485$), but the trend of increase did not reach statistical significance level ($Z = -0.085$, $P = 0.933$). The expression level of SRC protein was significantly higher in Kidney Yin deficiency patients ($0.7873 + 0.6275$) than the controls ($0.3712 + 0.4064$) ($Z = -2.874$, $P = 0.004$). **Conclusion** Osteoporosis patients with Kidney Yin deficiency have increased expression of SRC protein.

Key words: Traditional Chinese medicine; Postmenopausal osteoporosis; Kidney Yin deficiency; Immunoproteins

骨质疏松症目前已成为世界性问题。随着我国老年人口的增加, 骨质疏松症发病率也在不断增加。骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征, 导致骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。骨质疏松在任何年龄均可发病, 但常见于老年人, 尤其是绝经后的老年女性。最近研究提出了“骨免疫学”的观点, 认为在骨质疏松症的发生发展过程中, 免疫系统和免疫因素起了重要的

调节作用^[1]。雌激素水平下降是导致绝经后骨质疏松症发病的重要原因之一, 其关键在于雌激素减少引起相应的免疫功能增强, 促进细胞的激活和增殖, 引起体内免疫应答因子的变化, 导致骨偶联失衡, 从而引发骨重建失衡^[2]。

中医学尽管没有绝经后骨质疏松症的病名, 究其病因病机, 将骨质疏松症归属为“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”等范畴, 主要是由于肾精不足、骨失滋养导致的全身骨骼慢性退行性疾病^[3]。对于其病理变化、临床症状及体征等的描述, 古代医籍中亦有相关描述。“骨痿”始见于《黄帝内经》。宋代医家窦材的《扁鹊心书》提出的骨痿病与骨质疏松症非常相似: “此由肾气虚惫, 肾主骨, 肾水既涸, 则诸骨皆

基金项目: 国家自然科学基金(81302995); 福建省科技厅省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1035-4); 福建省卫生计生委青年科研课题(2013-1-41)

* 通讯作者: 葛继荣, Email: gjrjgcy@sohu.com

枯,渐至短缩,治迟则死”^[4]。临床以肾阴虚证为主要常见^[5]。课题组前期采用以药测证的方式,发现六味地黄丸治疗绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)肾阴虚证免疫机制与其调控 JAK/STAT 信号通路相关^[6],通过 JAK/STAT 信号通路芯片筛选出相关免疫基因:富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白 1 (leucine-rich- $\alpha 2$ -glycoprotein1, LRG1)、酪氨酸激酶蛋白 SRC (SRC non-receptor tyrosine kinase, SRC)。本课题采用 Western-blot 技术检测 PMOP 肾阴虚证患者 LRG1、SRC 蛋白,旨在从蛋白水平探讨 PMOP 肾阴虚证与 LRG1、SRC 参与的功能之间的关系,并为后续深入研究 PMOP 肾阴虚证的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013 年 8 月至 2016 年 4 月在福建省中医药研究院骨科门诊就诊的福州地区常住、汉族绝经后妇女中随机选择 PMOP 受试者,问卷方式调查受试者生活方式和健康状况等情况,血常规、尿常规、肝胆胰脾肾 B 超和心电图检查排除严重疾病者,肝、肾功能检测正常。用双能 X 线骨密度仪检测正位腰椎(L2-4)和左侧股骨颈、大转子和 Ward's 区骨密度。中医辨证:PMOP 肾阴虚证 25 例,健康绝经后妇女 25 名。

1.1.1 诊断标准:①骨质疏松症诊断标准:参照《中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿)》^[7];②中医证候诊断标准:参照全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会 1986 年制定的《中医虚证辨证参考标准》^[8]。

1.1.2 纳入标准:①符合骨质疏松症诊断标准者;②符合中医证候诊断标准者;③自愿作为受试对象,签署知情同意书。

1.1.3 排除标准:①不符合上述西医诊断及中医辨证标准;②有甲状旁腺功能亢进、骨软化症、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤等继发性骨质疏松症及其它严重合并症者,或晚期畸形、残废、丧失劳动力者;③继发性骨质疏松症者;④合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重疾病者;⑤近 3 个月内采用激素替代治疗(hormone replacement therapy, HRT)和服用降钙素(如:密钙息和益钙宁),近 6 个月内有连续 15d 应用双膦酸盐者等。

1.2 试剂

Anti-LRG1 抗体购买于 abcam 公司; Anti-SRC 抗体购买于 abcam 公司;二抗购于 Thermo scientific 公司;ECL 化学发光工作液购买于 Thermo scientific 公司;PVDF 膜购买于 Invitrogen 公司;人外周血淋巴细胞分离液购买于北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

双能 X 射线骨密度仪(法国 MEDILINK 公司), PowerPac 电泳仪(BioRAD 公司), L-530 低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific 公司), 多色荧光、化学发光凝胶成像系统(ProteinSimple 公司)。

1.4 研究方法

1.4.1 外周血白细胞:真空采血管取外周血,淋巴细胞分离液分离白细胞。

1.4.2 骨密度测定方法:采用法国 MEDILINK 公司 Osteocore 型双能 X 线骨密度仪(精度: <1%)检测患者腰椎正位(L2-4)、股骨颈、大转子和 Ward's 区骨密度(g/cm^2)。

1.4.3 Western-blot 检测:将细胞进行消化离心后以预冷的 PBS 清洗细胞两次,转至 EP 管离心弃上清后加入适量蛋白裂解液及 1% 体积的蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 15 min 得到总蛋白。测蛋白浓度,取总蛋白 150 μg , 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后加一定比例稀释的一抗, 4℃ 孵育过夜后 TBST 室温摇床洗膜 3 $\times$ 10 min, 加入相应稀释的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 室温摇床洗膜 3 $\times$ 10 min, 加 ECL 发光试剂后凝胶成像显色, β -actin 为内参, 采用超敏 ECL 化学发光试剂盒并用凝胶成像系统检测结果, 对条带进行统计分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。满足正态分布, 组间比较采用 t 检验, 非正态分布, 组间比较用 Wilcoxon 检验, 双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基础资料

PMOP 肾阴虚证组与健康对照组受试者的年龄、初潮年龄、绝经年龄、怀孕次数, 经 Wilcoxon 检验, 组间差异没有统计学意义。体重指数(body mass index, BMI)经 t 检验, 组间差异没有统计学意义。见表 1。

表 1 研究对象基础资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The comparison of two groups' basic characteristics($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄(岁)	初潮年龄(岁)	绝经年龄(岁)	怀孕次数(次)	BMI(kg/m ²)
PMOP 肾阴虚证组	25	61.40 ± 6.08	14.92 ± 2.16	50.28 ± 4.03	2.68 ± 1.28	24.03 ± 2.14
健康对照组	30	58.77 ± 5.31	15.13 ± 1.57	50.00 ± 4.10	2.40 ± 1.10	22.56 ± 2.64

2.2 骨质疏松症肾阴虚证与健康对照组 LRG1、SRC 蛋白表达水平的比较(表 2)

表 2 两组 LRG1、SRC 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The comparison of two groups in their LRG1 and SRC protein expression level($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LRG1/ β -actin	SRC/ β -actin
PMOP 肾阴虚证组	25	1.2391 ± 1.5860	0.7873 ± 0.6275 **
健康对照组	30	0.8033 ± 0.7485	0.3712 ± 0.4064

注: ** 表示与健康对照组比较,经 Wilcoxon 检验, $P < 0.01$ 。

内参 β -actin 的 Western Blot 表达较为一致(图 1),PMOP 肾阴虚证组 SRC 表达水平明显高于健康对照组(Wilcoxon 检验, $Z = -2.874$, $P = 0.004$),差异有统计学意义。

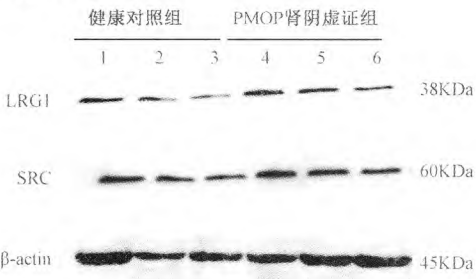


图 1 Western blot 检测各组蛋白表达

Fig.1 Detecting the expression of proteins in each group by Western blot

3 讨论

中医证候实质的研究,其目的就是要用现代医学理论揭示中医证理论中蕴藏的科学内涵,阐明中医诊断和治疗各种证及其相关疾病的微观机制,近年学者们提出了利用基因组学、蛋白质组学研究证候的设想,通过分子水平描绘中医证候本质的全貌,就分子水平而言,证候不一,基因、蛋白表达也不一样。本研究结合临床辨证分型,对 PMOP 肾阴虚证进行研究,通过基因芯片分析,对 mRNA 生物学标志物筛选,然而有文献报道 mRNA 与蛋白质常常表达不一致^[9],因此细胞中 mRNA 的水平并不能全面代表蛋白质表达水平。蛋白质复杂的翻译后修饰、蛋白质的亚细胞定位或迁移无法从 mRNA 水平来判断,蛋白质是生物生理功能的直接执行者,对其研

究能够有助于发现生命在生理或病理条件下的变化规律,所以从蛋白质水平来探讨骨质疏松的发病机制,阐明其变化机制可以更深入地研究 PMOP 肾阴虚证的发生机制^[10-12]。现代医学认为,正常骨代谢周期,其骨吸收和骨形成维持在一种动态平衡状态。破骨细胞的骨吸收活动和成骨细胞的骨形成活动相互偶联,不断进行着骨重建。一旦偶联被打破,平衡失衡,破骨细胞的骨吸收活动相对增强或成骨细胞的骨形成活动相对减弱,骨吸收大于骨形成发生骨质丢失,导致骨质疏松。本试验在前期芯片结果中,发现六味地黄丸治疗绝经后骨质疏松症肾阴虚证,在治疗前后, SRC、LRG1 基因的表达变化明显,提示六味地黄丸治疗 PMOP 肾阴虚与 SRC、LRG1 相关,由于芯片存在样本量低,容易存在假阳性和假阴性结果,笔者采用 Western-blot 技术扩大样本,从蛋白质水平进行验证讨论。

LRG1 是富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白 1, Serada 等^[13]研究表明 LRG 与炎症发生相关,LRG 可以作为自身免疫疾病活动中的血清生物标志物,在实验结果中,变化趋势升高,差异没有统计学意义。SRC 在肾阴虚证组与健康对照组比较中,变化显著,差异有统计学意义。SRC 基因是第一个被发现的具有诱导细胞发生转化的病毒原癌基因,属于非受体酪氨酸激酶家族成员,在细胞外信号分子激活及信号转导通路中发挥重要作用。SRC 蛋白主要以两种形式存在:病毒癌基因表达蛋白 v-SRC 和细胞癌基因表达蛋白 c-SRC,它们共同表达 60KDa 蛋白。近年的研究发现, c-SRC 蛋白高度活化或过量表达可促进骨质疏松症的发生和发展。人 SRC 基因位于 20 号染色体 q12-l3,全长 1608 bp,相对分子量约为 60000,蛋白编码 536 个氨基酸,由 14 个外显子和 13 个内含子组成^[14]。SRC 的表达在成熟细胞中可引起多种生理功能发生改变。SRC 的高表达与骨质疏松密切相关,而有研究表明 SRC 抑制剂对骨质疏松患者有效^[15],然而有研究报道小鼠 SRC 基因敲除可引起骨质疏松症的发生。研究结果表明, SRC 在正常破骨细胞分化及信号传导中发挥相关的生理功能^[16],在体内 SRC 要保持一定的平衡,才能使成骨细胞与破骨细胞保持平衡。

综上所述,本研究发现 LRG1 在两组蛋白表达差异,肾阴虚组有升高趋势,差异无统计学意义,提示 LRG1 有可能是在 mRNA 水平上进行调控,在转录、翻译成蛋白质经过加工、修饰,蛋白质的变化趋势与基因不一致,具体的相关机制有待进一步探讨。在蛋白水平观察了 SRC 在 PMOP 肾阴虚证的表达状态, SRC 蛋白表达在 PMOP 肾阴虚证高于健康对照组,提示 SRC 的蛋白表达可能参与 PMOP 肾阴虚证发生的过程,然而本部分研究只是从现象上阐述了 SRC 在 PMOP 肾阴虚证中的变化,下一步研究将继续探索 SRC 在骨代谢中的功能和调控机制,为深入理解 PMOP 的发病机理和探索新的治疗方法提供依据。相信随着 SRC 与绝经后妇女骨质疏松症肾阴虚证关系研究的深入,会对其作用机制有进一步的认识,并最终为中医药治疗绝经后骨质疏松基因治疗和药物的研制开发提供新的思路。

【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚. 骨内科学. 北京: 化学工业出版社, 2015: 201-202.
Liu ZH. Osteopathic internal medicine. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 201-202. (in Chinese)
- [2] Sugiyama N, Nakashima A, Takasugi N, et al. Endogenous estrogen may prevent bone loss in postmenopausal hemodialysis patients throughout life. *Osteoporosis Int*, 2011, 22(5): 1573-1579.
- [3] 葛继荣, 郑洪新, 万小明, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015). *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(9): 1023-1028.
Ge JR, Zheng HX, Wan XM, et al. Expert consensus on the prevention and treatment for primary osteoporosis with traditional Chinese medicine (2015). *Chin J Osteoporosis*, 2015, 21(9): 1023-1028. (in Chinese)
- [4] 郭文清, 杜义斌. 中医论治绝经后骨质疏松症的研究进展. *中国民族民间医药*, 2016, 25(5): 29-31.
Guo WQ, Du YB. Progress of research on the prevention and treatment of postmenopausal by Traditional Chinese Medicine. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2016, 25(5): 29-31. (in Chinese)
- [5] 陈娟, 谢丽华, 李生强, 等. 绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 mRNA 的表达研究. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(6): 618-622.
Chen J, Xie LH, Li SQ, et al. Study of the expression of CLCF1 mRNA in postmenopausal osteoporosis patients with the kidney Yin deficiency. *Chin J Osteoporosis*, 2014, 20(6): 618-622. (in Chinese)
- [6] 谢丽华, 陈娟, 李生强, 等. 六味地黄丸对绝经后骨质疏松症肾阴虚证 JAK/STAT 信号通路基因的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(7): 741-746.
Xie LH, Chen J, Li SQ, et al. Effect of Liuweidihuang pill on JAK/STAT signaling pathway gene expression in postmenopausal osteoporosis with the kidney yin deficiency. *Chin J Osteoporosis*, 2014, 20(7): 741-746. (in Chinese)
- [7] 刘忠厚, 杨定焯, 朱汉民, 等. 中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿). *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(1): 1-3.
Liu ZH, Yang DZ, Zhu HM, et al. Chinese osteoporosis recommended diagnostic criteria (second draft). *Chin J Osteoporosis*, 2000, 6(1): 1-3. (in Chinese)
- [8] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准. *中西医结合杂志*, 1986, 6(10): 598.
Shen ZY, Wang WJ. Deficiency syndrome differentiation of TCM reference standards. *Chinese Journal of Integrated Traditional And Western Medicine*, 1986, 6(10): 598. (in Chinese)
- [9] Yuan W, Yan YX, Zhang Y, et al. The effect of substrate-stretching strain on the expression of Runx2 in mouse osteoblasts. *Chin J Osteoporosis*, 2011, 17(3): 185-189.
- [10] 张志强, 李春雯, 潘定权, 等. 蛋白组学在骨质疏松中的应用. *中华中医药学刊*, 2014, 32(6): 1316-1319.
Zhang ZQ, Li CW, Pan DQ, et al. Proteomics in osteoporosis. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 32(6): 1316-1319. (in Chinese)
- [11] 谢丽华, 陈娟, 许惠娟, 等. 绝经后骨质疏松症肾阴虚证差异表达基因 CLCF1 蛋白表达研究. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(12): 1425-1428.
Xie LH, Chen J, Xu HJ, et al. Analysis of the differential expression of the genetic protein CLCF1 in postmenopausal osteoporosis patients with kidney Yin deficiency. *Chin J Osteoporosis*, 2015, 21(12): 1425-1428. (in Chinese)
- [12] 许惠娟, 陈娟, 谢丽华, 等. 绝经后妇女骨质疏松症肾阳虚证的关联蛋白 LTBPI 的表达及其 cDNA 测序的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(8): 905-909.
Xu HJ, Chen J, Xie LH, et al. Analysis of the protein and cDNA expression of LTBPI in postmenopausal osteoporosis patients with kidney Yang deficiency. *Chin J Osteoporosis*, 2015, 21(8): 905-909. (in Chinese)
- [13] Serada S, Fujimoto M, Terabe F, et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(11): 2169-2179.
- [14] Bonham K, Ritchie SA. Dehm SMAn alternative, human SRC promoter and its regulation by hepatic nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37604-37611.
- [15] 郭世明, 林燕萍. c-Src 蛋白在骨质疏松中的作用. *中国中医骨伤科杂志*, 2014, 22(8): 72-75.
Guo SM, Lin YP. The effects of c-Src protein on the development of osteoporosis. *Chinese J Trad Feb Traum&Orthop*, 2014, 22(8): 72-75. (in Chinese)
- [16] Kamath JR, Liu R, Enstrom AM, et al. Development and characterization of potent and specific peptide inhibitors of p60c-sreprotein tyrosine kinase using pseudosubstrate-based inhibitor design approach. *J Pept Res*, 2003, 62(6): 260-268.
(收稿日期: 2016-06-23; 修回日期: 2016-07-26)