

· 论著 ·

Ang-1 在去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织中表达变化以及中医不同治法对其影响的实验研究

邓洋洋* 李佳 孙鑫 蒋宁 郑洪新

辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032

中图分类号: R24 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 11-1426-04

摘要: **目的** 观察去卵巢骨质疏松症模型大鼠的骨组织中血管生成素 1 (Ang-1) mRNA 和蛋白含量变化, 及中药不同方剂对其影响, 探讨中药组方治疗骨质疏松的可行性。 **方法** 骨质疏松症模型的建立采用切除雌性大鼠双侧卵巢的方法。运用补肾填精中药复方、活血化瘀中药复方、补肾活血中药复方对模型大鼠灌胃 12 周, 用骨疏康作为阳性药物对照组, 还有正常组和模型空白组。RT-PCR 检测各组骨组织 Ang-1 mRNA 相对表达量; ELISA 法检测各组骨组织 Ang-1 蛋白含量。 **结果** 去卵巢骨质疏松症模型大鼠的骨组织中 Ang-1 mRNA 相对表达量与正常组比较, 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型空白组比较, 各个用药组 Ang-1 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 但各个用药组间比较无统计学意义。去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨组织中 Ang-1 蛋白含量与正常组比较, 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型空白组比较, 各个用药组 Ang-1 含量显著升高 ($P < 0.01$); 各个用药组间比较, 补肾活血组 Ang-1 含量升高最为显著, 与补肾填精组和活血化瘀组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。 **结论** 补肾活血中药复方可提高 Ang-1 mRNA 相对表达量及其蛋白含量, 且优于单纯的补肾填精和活血化瘀中药复方, 起到防止骨质疏松症的作用。

关键词: 骨质疏松症; 补肾; 活血; 血管生成素 1

Ang-1 expression in bone tissues and the effect of Chinese medicine on Ang-1 in ovariectomized osteoporotic rats

DENG Yangyang*, LI Jia, SUN Xin, JIANG Ning, ZHENG Hongxin

Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China

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

Abstract: **Objective** To observe the mRNA and protein expression of Ang-1 in bone tissues of the rats with osteoporosis and the influence of different Chinese traditional medicine prescription, and to discuss the feasibility of Chinese traditional medicine formula in the treatment of osteoporosis. **Methods** Osteoporosis rat model was established by bilateral ovariectomy of the female rats. The osteoporosis rats received promoting blood circulation for removing blood stasis and invigorating kidney and promoting blood circulation Chinese herb compounds 12 weeks. Gushukang was taken as positive control. Normal control and model control were set. mRNA and protein expressions of Ang-1 were determined with ELISA and RT-PCR method. **Results** The relative expression of Ang-1 mRNA in bone tissues of ovariectomized osteoporosis rats reduced significantly comparing with the normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the relative expression of Ang-1 mRNA in each drug group increased significantly ($P < 0.01$). The content of Ang-1 protein in bone tissues of ovariectomized osteoporosis rats was significantly lower than that of normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the content of Ang-1 in each drug group increased significantly ($P < 0.01$). The content of Ang-1 in the kidney-tonifying and blood-activating group was significantly higher than that in the kidney-nourishing and spermatogenic groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The compound prescription of invigorating kidney and promoting blood circulation can increase the relative expression amount and protein content of Ang-1 mRNA, and is superior to the compound prescription of invigorating kidney and promoting blood circulation and removing blood stasis, which can prevent osteoporosis.

Key words: osteoporosis; reinforcing the kidney; invigorate the circulation of blood; Ang-1

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81302879); 辽宁省高等学校创新人才项目(LR2016034); 辽宁省“百千万人才工程”(【2017】59)

* 通信作者: 邓洋洋, Email: dy1981@163.com

骨质疏松症的发病原因和发病机制都十分复杂。从本研究的角度来看,人体内的骨骼是具有高度血管化的组织^[1],由于骨组织微循环障碍的原因,影响到骨骼内环境的改变,导致骨形成障碍。有研究将骨质疏松症列为血管老化性老年疾病之一^[2]。因此本研究以 Ang-1 为切入点,并且观察补肾填精、活血化瘀、补肾活血三种不同治法对其的影响,以期进一步探究骨质疏松症的发病机制以及更有效的中医治法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级 SD 大鼠,雌性,3~4 月龄,60 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.1.2 实验药品:①补肾填精中药复方:左归丸出自《景岳全书》卷五十一新方八阵方。组成:熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿胶、龟胶。②活血化瘀中药复方:身痛逐瘀汤出自《医林改错》。组成:秦艽、川芎、红花、桃仁、甘草、羌活、当归、没药、灵脂、牛膝、香附、地龙。③补肾活血中药复方:由左归丸与身痛逐瘀汤加减。组成:菟丝子、熟地、龟胶、鹿胶、川芎、川牛膝、桃仁、红花。④阳性对照药:骨质疏松颗粒。主治功效:补肾益气,活血壮骨。

1.1.3 主要试剂和仪器:ELISA 试剂盒(美国 R&D systems 公司)、逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)等。双能 X 线骨密度分析仪(美国 Lunar 公司)以

及手术器械等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物饲养条件:大鼠购进后于 SPF 级实验室饲养,温度:24℃;湿度:40%,照明昼夜明暗交替。按体重分层随机分组,正常组 10 只,其余进行造模处理。

1.2.2 实验动物模型建立:采用一次性手术摘除大鼠双侧卵巢造模方法。术后给与造模大鼠青霉素肌肉注射,连续注射 3 d。存活后进行分组。

1.2.3 实验动物分组:术后 3 d 将存活大鼠,按体重分层随机分为 5 组,模型空白组,补肾填精组,活血化瘀组,补肾活血组,阳性对照组。

1.2.4 实验给药方法:实验动物分组 2 d 后开始给药,各个用药组药量按人体公斤体重(g/kg)每日用药量的 6.3 倍计算,体积为 1 mL/100 g,正常组、模型空白组给予等量生理盐水,给药 12 周。

1.2.5 标本采集与检测:给药 12 周后,各组大鼠在 24 h 禁食后采集大鼠双侧股骨。左侧股骨取出后,生理盐水冲洗,纱布包好后封于塑料保鲜密封袋,应用双能 X 线骨密度分析仪对大鼠离体左侧股骨进行骨密度检测。右侧股骨取出后,一部分用锡纸包好后,存入 -70℃ 冰箱保存,用于骨组织 Ang-1 蛋白含量测定,具体检测步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行。一部分放入有 Trizol 液的 EP 管中,用于骨组织 Ang-1 mRNA 表达测定,使用 Primer-BLAST 设计引物,引物序列见下表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequences

物种	基因名称	GenBank 编号		引物序列	产物大小
大鼠	Ang-1	NM_053546	F	5'-ACTCAGTGGCTGCAAAAAGTTG-3'	98 bp
			R	5'-GTGCCGTGTGGTTTGAAC-3'	

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,方差齐时,采用 Turkey 检验;方差不齐时,采用 Games-Howell 检验。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有非常统计学意义, $P > 0.05$ 表示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨骨密度结果

实验各组大鼠骨密度结果,见表 2,与正常组比

较,模型空白组大鼠骨密度显著降低($P < 0.01$),说明骨质疏松症模型造模成功。用药 12 周后,补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组以及阳性药物对照组均可以提高大鼠股骨骨密度,与模型空白组相比,其中补肾填精组、补肾活血组以及阳性药物对照组差异有显著统计学意义($P < 0.01$),活血化瘀组差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明补肾填精中药复方、活血化瘀中药复方、补肾活血中药复方均具有提高去卵巢骨质疏松症模型大鼠骨密度,防止骨质丢失的作用。

表 2 各组大鼠股骨骨密度检测结果比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of BMD of the femur among the groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	股骨骨密度/(g/cm ²)
正常组	10	0.187 ± 0.004 ^{##}
模型空白组	10	0.136 ± 0.006 ^{**}
补肾填精组	10	0.159 ± 0.004 ^{**##}
活血化瘀组	10	0.152 ± 0.005 ^{**#}
补肾活血组	10	0.154 ± 0.003 ^{**##}
阳性对照组	10	0.154 ± 0.005 ^{**##}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型空白组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠骨组织中 Ang-1 mRNA 及其蛋白表达

各组大鼠股骨中 Ang-1 mRNA 见表 3 和 4。与正常组比较,模型空白组大鼠 Ang-1 mRNA 相对表达量显著降低($P < 0.01$);与模型空白组比较,各个用药组即补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组以及阳性对照组均显著升高($P < 0.01$);各个用药组间比较无统计学意义。

各组大鼠股骨中 Ang-1 蛋白:与正常组比较,模型空白组大鼠 Ang-1 含量显著降低($P < 0.01$);与模型空白组比较,各个用药组即补肾填精组、活血化瘀组、补肾活血组以及阳性对照组均显著升高($P < 0.01$);各个用药组间比较,补肾活血组 Ang-1 含量升高最为显著,与补肾填精组和活血化瘀组比较有显著性差异($P < 0.01$),此外,补肾填精组 Ang-1 蛋白表达含量显著高于活血化瘀组($P < 0.01$)。

表 3 大鼠股骨中 Ang-1 mRNA 相对表达量结果($\bar{x} \pm s$)Table 3 The expression of Ang-1 mRNA of the femur in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨 PCR-Ang-1
正常组	10	1.01 ± 0.12
模型空白组	10	0.24 ± 0.13 ^{**}
补肾填精组	10	0.53 ± 0.15 ^{##}
活血化瘀组	10	0.60 ± 0.16 ^{##}
补肾活血组	10	0.65 ± 0.19 ^{##}
阳性对照组	10	0.56 ± 0.10 ^{##}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型空白组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

表 4 大鼠股骨中 Ang-1 蛋白含量结果($\bar{x} \pm s$)Table 4 The expression of Ang-1 protein of the femur in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨 ELISA-Ang-1
正常组	10	6.72 ± 0.12
模型空白组	10	2.21 ± 0.14 ^{**}
补肾填精组	10	4.84 ± 0.16 ^{##}
活血化瘀组	10	3.12 ± 0.18 ^{##●●}
补肾活血组	10	5.37 ± 0.24 ^{##●●●●}
阳性对照组	10	5.23 ± 0.24 ^{##●●●●}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与补肾填精组比较, ●● $P < 0.01$; 与活血化瘀组比较, ●●●● $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 骨质疏松症的中医病因病机——肾虚血瘀、血不养骨

中医历代文献中没有骨质疏松症的病名,但从其发病和症状上看,多属于“骨痿”、“骨枯”、“骨痹”等范畴。《素问·宣明五气》说:“肾主骨”,又《灵枢·经脉》说:“足少阴气绝,则骨枯”。中医学认为精是人体生命活动中最重要的物质基础,藏之于肾,肾精是人体生长发育及各种生理功能的源泉物质。人体的骨骼得到充足的肾精滋养才能正常的发育生长或维持坚实的状态,如果骨失去肾精的充养,可导致骨骼的生长障碍或退化,造成骨质疏松症。另一方面,《素问·五藏生成》说:“足受血而能步,掌受血而能握,指受血而能摄。”说明人体骨骼等全身各个部分必须有血液的供应才能发挥正常的生理功能。“精血同源”,即肾精化血,血又化精,故血液濡养骨骼也是“肾主骨”的重要生理表现之一。如精血不足或瘀血阻滞等各种原因,血液不养骨骼和骨髓,骨骼失于充养,也可造成骨质疏松症。由此可见,骨质疏松症的中医病因病机主要在于肾虚血瘀、血不养骨。所以针对上述病因病机本次实验采用补肾填精、活血化瘀以及补肾活血中药复方进行干预治疗,并且观察三种不同治疗方法的疗效比较。实验结果提示,补肾填精、活血化瘀以及补肾活血中药复方均可以提升大鼠股骨骨密度,促进骨骼修复,对骨质疏松症起到防止的作用。

3.2 Ang-1 和 Hedgehog 信号与骨质疏松症的关系

本实验团队前期研究发现,骨质疏松症的发生机制与 Hedgehog 信号传导通路中 SHH、GLI1 mRNA 和蛋白活性下降有关;补肾填精中药复方、活血化瘀中药复方、补肾活血中药复方通过激活 Hedgehog 信号传导通路中的 SHH、GLI1,以促进骨形成,抑制骨吸收,起到防止骨质疏松症的作用^[3]。有国外学者研究发现,Hedgehog 信号通路被激活后,可以调控其下游相关基因如血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素(Ang-1)等^[4]。在动物骨骼肌后肢缺血模型中,缺血组织处间充质干细胞中 Shh mRNA 和蛋白表达增多,Shh 诱导新生血管形成,上调血管生长因子如 VEGF 和血管形成素 Ang-1 的表达,促进缺血处肌肉再生,有利于缺血肢体功能恢复^[5]。

现代医学表明,骨是高度血管化的组织,骨新生
(下转第 1445 页)

- [13] 蔡思清, 颜丽笙, 李毅中, 等. 骨密度影像学测量与椎体骨折率评估结合提高骨质疏松的诊断率[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33): 5341-5345.
- [14] Jager PL, Jonkman S, Koolhaas W, et al. Combined vertebral fracture assessment and bone mineral density measurement: a new standard in the diagnosis of osteoporosis in academic populations[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(4): 1059-1068.
- [15] Mrgan M, Mohammed A, Gram J. Combined vertebral assessment and bone densitometry increases the prevalence and severity of osteoporosis in patients referred to DXA scanning[J]. J Clin Densitom, 2013, 16(4): 549-553.
- [16] Kanis JA, Hans D, Cooper C, et al. Interpretation and use of FRAX in clinical practice[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(9): 2395-2411.
- [17] Waterloo S, Nguyen T, Ahmed LA, et al. Important risk factors and attributable risk of vertebral fractures in the population-based tromsø study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2012, 13: 163.
- [18] Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, et al. Assessment of fracture risk[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(6): 581-589.
- [19] Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M, et al. Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(4): 716-724.
- [20] 郑昱新, 石关桐, 周吉韦, 等. 绝经后妇女骨密度、体重指数、体脂和雌激素分泌的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(1): 42-45.
- [21] Reid IR. Relationships among body mass, its components, and bone[J]. Bone, 2002, 31(5): 547-555.
- [22] Reid IR, Plank LD, Evans MC. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1992, 75(3): 779-782.
- [23] Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(1): 17-29.
- [24] Kim KC, Shin DH, Lee SY, et al. Relation between obesity and bone mineral density and vertebral fractures in Korean postmenopausal women [J]. Yonsei Med J, 2010, 51(6): 857-863.
- [25] Scott D, Chandrasekara SD, Laslett LL, et al. Associations of sarcopenic obesity and dynapenic obesity with bone mineral density and incident fractures over 5-10 years in community-dwelling older adults [J]. Calcif Tissue Int, 2016, 99(1): 30-42.

(收稿日期: 2018-02-24; 修回日期: 2018-06-05)

(上接第 1428 页)

依赖良好的血供和营养支持, 血管和骨细胞之间紧密的时空联系维持了骨骼的完整性。因此, 在骨骼发展和骨折修复期间, 血管形成起着相当重要的作用。同样, 在传统输送盘牵张成骨过程中要求各骨段上要有充足的血液供应, 以保证牵张过程中旺盛的代谢活动、超常的营养供应及各骨段组织的正常代谢^[6]。

那么, 骨质疏松症的发生是否与血管生成素的变化有关, 而骨质疏松症的中医病因病机表明肾精-骨-血之间具有紧密的联系, 因此本研究, 选取 Ang-1 作为观察指标, 试探究骨质疏松症的发病机制与其关系。实验结果提示: 正常大鼠骨组织中可以表达 Ang-1, 与正常组比较, 模型空白组大鼠 Ang-1 mRNA 相对表达量显著降低; 说明模型空白组大鼠骨骼血供能力减弱, 骨失所养, 而发生了骨质疏松症。与模型空白组比较, 各个用药组均能使 Ang-1 mRNA 相对表达量显著升高, 说明通过 12 周灌胃给药后, 补肾填精、活血化瘀、补肾活血法进行治疗可以提高大鼠骨组织中 Ang-1 的生成。正常大鼠骨组织中可以表达 Ang-1 蛋白, 与正常组比较, 模型空白组大鼠 Ang-1 含量显著降低; 与模型空白组比较, 各个用药组即 Ang-1 含量显著升高; 各个用药组间比较, 补肾活血组 Ang-1 含量升高最为显著, 与补肾填精组和

活血化瘀组比较有显著性差异。说明, 针对去卵巢骨质疏松症模型大鼠的干预治疗中, 以补肾活血中药复方疗效最为显著, 优于补肾填精组和活血化瘀组。这说明针对原发性骨质疏松症的治疗, 可以采用以补肾填精法为主, 辅以活血化瘀, 达到更优化的治疗。

【参 考 文 献】

- [1] Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone[J]. Eur Cell Mater, 2008, 15: 100-114.
- [2] 李春林, 司全金, 李大伟. 老年骨质疏松症与心血管病危险因素的相关性[J]. 军医进修学院学报, 2011, 3(6): 553-570.
- [3] 邓洋洋, 李佳, 孙鑫, 等. 中医不同治法对绝经后骨质疏松症大鼠骨组织 Hedgehog 信号通路 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(12): 1643-1647.
- [4] Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, et al. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone marrow derived pro-angiogenic cells [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8824.
- [5] Sims JR, Lee SW, Topalkara K, et al. Sonic hedgehog regulates ischemia hypoxia-induced neural progenitor proliferation [J]. Stroke, 2009, 40(11): 3618-3626.
- [6] 郭鹏. Notch、VEGF-A、Ang-1 信号通路在非血管化输送盘牵张成骨中调控血管新生的机制研究[D]. 广西医科大学, 2015.

(收稿日期: 2018-06-19; 修回日期: 2018-08-11)