

· 论著 ·

华山壮骨散对激素性股骨头坏死大鼠 BMP/Smad/UPP 通路的作用机制

黄春元¹ 刘英雪² 谢晚晴² 蒋宁² 林庶茹² 郑洪新^{2*} 刘海起^{1*}

1. 辽宁中医药大学附属第四医院, 辽宁 沈阳 110101

2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 11-1533-04

摘要: **目的** 基于 BMP/Smad/UPP 通路探讨华山壮骨散对糖皮质激素性股骨头坏死大鼠的作用机制。**方法** 将 SD 大鼠分成 5 组: A 组为正常组, B 组为模型组, C 组为阳性对照药壮骨关节丸组, D、E 组为华山壮骨散高剂量组、低剂量组, A 组不做任何处理, B、C、D、E 组均注射醋酸泼尼松龙 20 mg/kg, 每周两次, 复制糖皮质激素性股骨头坏死动物模型; A、B 组给予生理盐水灌胃, C、D、E 组分别给予相应药物灌胃治疗。10 周后分别取大鼠股骨头、肾脏进行 RT-PCR 检测并分析; 检测 BMP/Smad/UPP 通路中 BMP4、Smad4、Smurf1、Smurf2 的 mRNA 表达。**结果** 各组大鼠 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 的 mRNA 均有表达, 与正常组相比, 模型组各项指标显著降低 ($P < 0.05$), 提示糖皮质激素性股骨头坏死的发病机制与 BMP/Smad/UPP 通路的异常密切相关; 与模型组相比, 实验高剂量组股骨头和肾组织 BMP4、Smad4、Smurf1、Smurf2 的 mRNA 表达均明显增加 ($P < 0.05$); 壮骨关节丸组股骨头中 BMP4、Smurf1、Smurf2 表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 华山壮骨散通过提高模型大鼠股骨头和肾组织 BMP4 和 Smad4 mRNA 表达, 上调 Smurf1 和 Smurf2 mRNA 表达, 从而达到防治糖皮质激素性股骨头坏死的目的。

关键词: 中医中药; 激素性股骨头坏死; 华山壮骨散; 骨形态发生蛋白

The mechanism of action of Huashan strong bone powder on the BMP/Smad/UPP pathway in rats with steroid-induced femoral head necrosis

HUANG Chunyuan¹, LIU Yingxue², XIE Wanqing², JIANG Ning², LIN Shuru², ZHENG Hongxin^{2*}, LIU Haiqi^{1*}

1. The Fourth Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110101

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

* Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com; LIU Haiqi, Email: 13910682178@163.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Huashan strong bone powder on glucocorticoid-induced femoral head necrosis (SANFH) via BMP/Smad/UPP pathway in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 5 groups: Group A was the normal group, Group B was the model group, Group C was positive control drug strong bone and joint pill group, and Group D and E were the high-dose group and the low-dose group of Huashan strong bone powder, Rats in Group B, C, D, and E were injected with prednisolone acetate 20 mg/kg, twice a week, to create the glucocorticoid-induced femoral head necrosis animal model. Rats in Group A and B received 0.9% NaCl. Rats in Group C, D, and E were fed with corresponding drugs. After 10 weeks, the femoral head and kidney of rats were collected for RT-PCR detection and analysis. The mRNA expressions of BMP4, Smad4, Smurf1, and Smurf2 in the BMP/Smad/UPP pathway were detected. **Results** The mRNAs of BMP4, Smad4, Smurf1, and Smurf2 in all groups were expressed. Compared with the normal group, all indicators in the model group were significantly reduced ($P < 0.05$), indicating that the pathogenesis of SANFH was closely related to the abnormality of BMP/Smad/UPP pathway. Compared with the model group, the mRNA expressions of BMP4, Smad4, Smurf1, and Smurf2 in the femoral head and kidney tissues of the high-dose group increased significantly ($P < 0.05$). The expressions of BMP4, Smurf1, and Smurf2 in the femoral head of the strong bone and joint pill group increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Huashan strong bone powder improves the mRNA expressions of BMP4 and Smad4 in the femoral head and kidney of model rats, and up-regulates the mRNA expressions

基金项目: 辽宁省科学技术基金项目(2015020376)

* 通信作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com; 刘海起, Email: 13910682178@163.com

of Smurf1 and Smurf2 to prevent and to treat SANFH.

Key words: Traditional Chinese Medicine; SANFH; Huashan strong bone powder; BMP

糖皮质激素性股骨头坏死 (steroid-induced avascular necrosis of femoral head, 以下简称激素性股骨头坏死) 是由于长期、大量的使用糖皮质激素造成的股骨头缺血性坏死, 是临床常见病。根据调查发现, 激素性股骨头坏死的发病率在逐年增长, 其发病隐匿、进展快、预后差、致残率高^[1]。本实验采用华山壮骨散对其进行治疗, 华山壮骨散有补益肝肾、活血化瘀的作用, 对股骨头坏死的治疗有较好的临床效果, 通过检测 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 的表达情况来探讨华山壮骨散防治激素性股骨头坏死的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: 实验选用 120 只 SD 雄性大鼠, 体质量在 (220±20) g, 全部由辽宁长生生物有限公司提供, 进行随机分组后, 将大鼠饲养在 SPF 级实验室, 每笼 10 只, 给予普通饲料喂养, 自由饮水, 摄食。

1.1.2 实验主要试剂、仪器: QUANTITE CTSYBR green PCR kit (沈阳鑫科生物制剂中心)、TRIzol (Invitrogen, Cat no15596-026)、反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连宝生物公司合成)、低温高速离心机 (法国 Jouan, MR1822)、荧光 PCR 仪 (美国 Agilent Technologies, Stratagene Mx3000P)、微量核酸蛋白检测仪 (美国 Bio Drop E114095)。

1.1.3 实验药物: 华山壮骨散 (由九种免煎颗粒组成), 全部由辽宁中医药大学附属第四医院中药局提供, 配制成药液 4℃ 保存备用; 壮骨关节丸, 华润三九医药有限公司, 规格为 60 粒/瓶 (批号为 16030045); 醋酸泼尼松龙注射液, 浙江仙居制药股份有限公司 (批号为 160806), 规格 0.125 g/5mL。

1.2 实验方法

1.2.1 激素性股骨头坏死动物模型建立与分组: 将大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分成 5 组, 分别为正常组 (A 组)、模型组 (B 组)、壮骨关节丸组 (C 组、阳性对照组)、实验低剂量组 (D 组)、实验高剂量组 (E 组), 每组各 24 只。A 组不做任何处理, B、C、D、E 组采取臀肌注射醋酸泼尼松龙 20 mg/kg, 每周 2 次; 同时, 臀肌注射青霉素, 每周 2 次, 预防感染。

1.2.2 给药方法: A、B 组给予等量生理盐水, C 组给予中药壮骨关节丸灌胃治疗, D 组给予低浓度华山壮骨散灌胃治疗, E 组给予高浓度华山壮骨散灌胃治疗。实验期间每周称重一次, 根据体重调整用药量, 连续灌胃 10 周。灌胃结束后取大鼠的股骨头和肾脏保存备用。

1.2.3 观测指标: 观测大鼠股骨头和肾组织的 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 的 mRNA 表达情况。

1.2.4 标本制备及检测方法: 骨组织标本的制备: 取大鼠两侧股骨头, 放入已装有 TRIzol 的 Ep 管内, 做好标记, 放入 -70℃ 冰箱保存备用。肾组织标本的制备: 取大鼠肾脏, 剥离掉外层薄膜, 用刀片将肾脏分为两半, 取肾皮质, 放入已装有 TRIzol 的 Ep 管内, 做好标记, 放入 -70℃ 冰箱保存备用。按照 TRIzol 试剂说明书采取一步法提取股骨头、肾脏组织中总的 RNA。计算样品总 RNA 浓度, 完成股骨头、肾脏组织中总 RNA 的制备; 根据大鼠 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 序列, 使用 Premier 5.0 设计合成了扩增 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 片段的特异性引物 (以 β -actin 基因作为 PCR 的内参照), 进行引物序列设计 (见表 1); 再依据反转录反应体系及条件以及 PCR 反应体系及条件, 进行 RT-PCR 试验。为减少误差, 各组 BMP4、Smad4、Smurf1 和 Smurf2 的表达水平均以相对表达量来表示^[2]。

表 1 引物序列设计

Table 1 Primer sequence design

指标	上游	下游	基因片段长度
BMP4	5'-TGGGGAGGAGGAGGAAGAAG-3'	5'-TCCAGATGTTCTTCGTGATGGA-3'	111 bp
Smad4	5'-CACTATGACGGGTTGT-3'	5'-TGTCTTCCGTGGGTAA-3'	137 bp
Smurf1	5'-AAGGCTCAAGGCTCTGCAA-3'	5'-ATTAAAGCAGGTGTGGGCCT-3'	104 bp
Smurf2	5'-CGCCTCAAAGACACTGGCTA-3'	5'-GCCTTCTTCCCAACCGTCT-3'	184 bp
β -actin	5'-ACCAACTGGGACG-3'	5'-AGGCATACAGGGAC-3'	205 bp

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析, 采用

方差分析进行统计学处理,数据结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠股骨头和肾组织 BMP4 mRNA 表达情况

与正常组相比,模型组股骨头和肾组织 BMP4 mRNA 表达量均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,各组股骨头和肾组织 BMP4 mRNA 表达均有增加,但增加程度有所不同,其中实验高剂量组股骨头和肾组织中 BMP4 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);实验低剂量组股骨头和肾组织中 BMP4 mRNA 略有增加,差异无统计学意义($P>0.05$)。与壮骨关节丸组相比较,实验高剂量组股骨头和肾组织的 BMP4 mRNA 表达增加,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠股骨头和肾组织 BMP4 mRNA 表达($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Expression of BMP4 mRNA in the femoral head and kidney tissues of rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	股骨头	肾组织
正常组	1.03±0.25 ^{Δ*}	1.12±0.55 ^{Δ*}
模型组	0.22±0.07 [#]	0.20±0.07 [#]
壮骨关节丸组	0.40±0.07 ^{#Δ}	0.32±0.10 [#]
实验低剂量组	0.28±0.11 [#]	0.27±0.08 [#]
实验高剂量组	0.51±0.06 ^{#Δ}	0.56±0.19 ^{#Δ}

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^Δ $P<0.05$;与壮骨关节丸组相比,^{*} $P<0.05$ 。

2.2 大鼠股骨头和肾组织的 Smad4 mRNA 表达

与正常组相比,模型组的股骨头和肾组织 Smad4 mRNA 表达均有降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,各组股骨头和肾组织 Smad4 mRNA 表达均有增加,实验高剂量组股骨头和肾组织中 Smad4 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);实验低剂量组股骨头和肾组织中 Smad4 mRNA 有表达,差异无统计学意义($P>0.05$)。与壮骨关节丸组相比较,实验高剂量组股骨头和肾组织中 Smad4 mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.3 各组大鼠股骨头和肾组织的 Smurf1 mRNA 表达

与正常组相比,模型组的股骨头和肾组织 Smurf1 mRNA 表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,实验高剂量组股骨头和肾组织中 Smurf1 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);壮骨关节丸组股骨头中 Smurf1 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与壮骨关节丸组相比较,实验高剂量组股

表 3 大鼠股骨头和肾组织的 Smad4 mRNA 表达

Table 3 Expression of Smad4 mRNA in the femoral head and kidney tissues of rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	股骨头	肾组织
正常组	1.04±0.28 ^{Δ*}	1.03±0.24 ^{Δ*}
模型组	0.06±0.03 [#]	0.03±0.02 [#]
壮骨关节丸组	0.24±0.07 [#]	0.20±0.08 [#]
实验低剂量组	0.11±0.03 [#]	0.13±0.09 [#]
实验高剂量组	0.48±0.16 ^{#Δ*}	0.63±0.28 ^{#Δ*}

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^Δ $P<0.05$;与壮骨关节丸组相比,^{*} $P<0.05$ 。

骨头和肾组织 Smurf1 mRNA 表达增加,但在股骨头表达中差异无统计学意义($P>0.05$);在肾组织表达中差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 大鼠股骨头和肾组织的 Smurf1 mRNA 表达($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 4 Expression of Smurf1 mRNA in the femoral head and kidney tissues of rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	股骨头	肾组织
正常组	1.01±0.17 ^{Δ*}	1.01±0.15 ^{Δ*}
模型组	0.23±0.08 ^{#*}	0.22±0.08 [#]
壮骨关节丸组	0.38±0.05 ^{#Δ}	0.38±0.18 [#]
实验低剂量组	0.30±0.10 [#]	0.33±0.14 [#]
实验高剂量组	0.46±0.09 ^{#Δ}	0.70±0.17 ^{#Δ*}

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^Δ $P<0.05$;与壮骨关节丸组相比,^{*} $P<0.05$ 。

2.4 大鼠股骨头和肾组织的 Smurf2 mRNA 表达

与正常组相比,模型组股骨头和肾组织 Smurf2 mRNA 表达量都显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,各组股骨头和肾组织中 Smurf2 mRNA 表达均有增加,其中,实验高剂量组股骨头和肾组织的 Smurf2 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);壮骨关节丸组股骨头中 Smurf2 mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与壮骨关节丸组相比较,实验高剂量组股骨头和肾组织的 Smurf2 mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

表 5 大鼠股骨头和肾组织的 Smurf2 mRNA 表达($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 5 Expression of Smurf2 mRNA in the femoral head and kidney tissues of rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	股骨头	肾组织
正常组	1.01±0.15 ^{Δ*}	1.03±0.25 ^{Δ*}
模型组	0.04±0.01 ^{#*}	0.01±0.00 [#]
壮骨关节丸组	0.15±0.04 ^{#Δ}	0.04±0.01 [#]
实验低剂量组	0.07±0.04 [#]	0.02±0.00 [#]
实验高剂量组	0.28±0.03 ^{#Δ*}	0.26±0.14 ^{#Δ*}

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^Δ $P<0.05$;与壮骨关节丸组相比,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨论

股骨头坏死的病名在古代医籍中没有记载,根据其临床表现,可将其归为“骨蚀”“骨痹”等范畴,其形成主要是由于药邪侵袭股骨,经络气血郁痹,髓减骨蚀所致,内在因素则与肝肾亏虚,筋骨失养有关^[3,4]。中医治疗以补益肝肾,活血化瘀为主。华山正骨作为孙华山创始的骨伤科学术流派,在全国骨伤科具有广泛的学术影响。华山壮骨散为孙氏所创,在前期临床实践中疗效显著,其组成主要以矿物质药物自然铜为主,主要功效是散瘀止痛,续筋接骨;佐以相应植物药和动物药如骨碎补、刘寄奴、续断、土鳖虫、地龙等,能更好地发挥治疗作用,但其作用机制尚未明确。

激素性股骨头坏死是股骨头坏死的常见类型,主要由于糖皮质激素使用剂量较大、时间较长,导致骨组织的再生修复能力障碍,股骨头结构改变,股骨头塌陷、变形,关节炎症,功能障碍。有文献指出,骨组织的血液循环障碍可引起骨重建失衡^[5]。

在股骨头坏死的修复过程中,BMP/Smad/UPP通路起着关键作用。BMP4是TGF- β 超家族中的重要成员之一,其结构和功能与BMP2相似,可以诱导相关骨组织的形成,有助于骨组织的修复,是骨在发育过程中不可缺少的关键因子^[6]。Smad通路主要的功能是传递TGF- β 超家族中的信号,Smad蛋白是BMP的下游信号转导因子^[7-8],日前根据Smad蛋白的结构和功能可将其分为三类:特异型、共有型和抑制型。其中Smad4蛋白属于共有型,其功能较为重要,调控着TGF- β 超家族的所有因子在细胞内的信号转导途径,是BMP2诱导成骨细胞形成的关键蛋白^[9]。特异性降解细胞内Smads蛋白的是泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway UPP)这主要途径,Smurf1和Smurf2属于泛素连接酶E3的成员,可以选择性降解Smad蛋白和调控BMP的信号转导,进而影响成骨细胞的增殖和分化^[2]。

本研究结果表明,正常大鼠体内的BMP4、Smad4、Smurf1和Smurf2可以在基因水平正常表达。

在注射糖皮质激素以后,其表达受到影响,造成大鼠的股骨头不能正常发育,逐渐形成激素性股骨头坏死。中药复方华山壮骨散可以调节模型大鼠股骨头和肾脏中BMP4、Smad4、Smurf1和Smurf2的基因表达,与模型组相比,经过实验高、低剂量组治疗后,均可以提高模型大鼠的BMP4和Smad4的表达。与实验低剂量组相比,高剂量的华山壮骨散可以明显促进模型大鼠BMP4和Smad4的表达,加快骨细胞生成,促进骨质形成,修复骨损伤,从而延缓激素性股骨头坏死的形成。

由于股骨头坏死的修复机制非常复杂,其治疗方法多样化,但对于大多数人来说人工置换股骨头并不是最好的选择,寻找新药、新技术来治疗股骨头坏死刻不容缓。华山壮骨散治疗股骨头坏死的疗效确切,作用机制明确,便于临床使用。但其作用的具体机制还需做进一步深入探讨,才能更好的为临床防治股骨头坏死提供实验依据,开拓新的治疗药物。

【参 考 文 献】

- [1] 王傲,王金成.激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J].中国骨与关节损伤杂志,2016,31(4):445-446.
- [2] 尚德阳,邓洋洋,孙鑫,等.补肾中药对肾虚骨质疏松症大鼠骨、肾、下丘脑组织中Smurf1/Smurf2的mRNA表达影响[J].中华中医药杂志,2015,30(10):3629-3633.
- [3] 惠银银,刘又斌,王晶,等.非创伤性股骨头坏死病因的研究进展[J].中医正骨,2018,30(2):33-36,40.
- [4] 李刚,王均玉.股骨头坏死的中医认识与研究现状[J].山西中医,2010,26(5):52-54.
- [5] 李盛华,邓昶,周明旺,等.中医药防治股骨头坏死临床应用现状[J].中国中医药信息杂志,2018,25(6):137-140.
- [6] 叶娜,戚基萍,吴鹤.骨形态发生蛋白4的相关研究进展[J].医学综述,2017,23(5):872-876.
- [7] 张波,韦冰丹,甘坤宁,等.富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞对兔股骨头坏死BMP-2/Smads通路的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(2):131-134,227.
- [8] 芮丹丹,唐丽媛,陈洁,等.辛伐他汀对体外培养鼠骨形成蛋白BMP-2基因的调控[J].昆明医科大学学报,2015,36(4):23-26.
- [9] 张文岚,孙文伟,卜丽莎,等.Smud蛋白家族与骨形态发生蛋白信号传导[J].中国地方病学杂志,2002,21(4):325-327.

(收稿日期:2019-02-11;修回日期:2019-05-13)