

· 论 著 ·

淫羊藿和女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的实验研究

李晓曦¹ 陈宇恒¹ 唐秀凤¹ 高莹莹¹ 于萍¹ 马紫童¹ 刘仁慧^{1,2*}

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1685-06

摘要: 目的 研究淫羊藿和女贞子配伍对绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 大鼠转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1/Smads 信号通路的影响。方法 将 48 只 SPF 级 8 月龄雌性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组、淫羊藿组、女贞子组、淫羊藿和女贞子配伍组 (配伍组)、雷洛昔芬组。对大鼠行双侧卵巢切除术造模, 术后 1 周开始给予相应的药物治疗至术后 13 周结束。运用酶免法检测血清 TGF- β 1 含量、蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 和免疫荧光法 (immunofluorescence staining, IF) 检测骨组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3 和 Smad7 蛋白表达, 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法检测骨组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 和 Smad7 mRNA 的表达。结果 与模型组比较, 淫羊藿、女贞子配伍组能增加大鼠血清 TGF- β 1 含量 ($P < 0.05$), 上调骨组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达和 TGF- β 1、p-Smad2/3 的蛋白表达 (P 均 < 0.01), 下调骨组织中 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达 (P 均 < 0.01), 且配伍组对上述指标的调节作用优于淫羊藿或女贞子单用。结论 淫羊藿和女贞子配伍可以调节 PMOP 大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路中细胞因子的表达, 从而调节骨代谢。

关键词: 淫羊藿/女贞子; 绝经后骨质疏松症; 转化生长因子- β 1; Smads 蛋白

Effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on TGF- β 1/Smads signaling pathways in ovariectomy-induced osteoporosis rats

LI Xiaoxi¹, CHEN Yuheng¹, TANG Xiufeng¹, GAO Yingying¹, YU Ping¹, MA Zitong¹, LIU Renhui^{1,2*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

* Corresponding author; LIU Renhui, Email: gzb1rh45@ccmu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on TGF- β 1/Smads signaling pathways in ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis of rats. **Methods** PMOP rat model was duplicated by bilateral ovariectomy. Rats were randomly divided into 6 groups, including sham group, model group, Herba Epimedii group, Fructus Ligustri Lucidi group, combination group and raloxifene group. TGF- β 1 in blood, the protein expression of TGF- β 1, p-Smad2/3 and Smad7 in bone, and the mRNA expression of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and Smad7 in bone were detected. **Results** Compared with the model group, Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi in combination could significantly up-regulated the level of serum TGF- β 1, the mRNA expression of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 and the protein expression of TGF- β 1 and p-Smad2/3 in bone tissue, and reduced the expression of mRNA and protein of Smad7 in bone tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi in combination has the anti-osteoporosis effect on PMOP by regulate the expression of cytokines in TGF- β 1/Smads signaling pathway.

Key words: Herba Epimedii/Fructus Ligustri Lucidi; postmenopausal osteoporosis; TGF- β 1; Smads

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673993); 国家中医药管理局全国名老中医专家传承工作室建设项目

* 通信作者: 刘仁慧, Email: gzb1rh45@ccmu.edu.cn

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是指妇女在绝经后由于卵巢功能衰退, 雌激素水平降低, 导致骨吸收大于骨形成而出现骨量降低、骨脆性增加的全身代谢性疾病^[1]。

随着全球人口老龄化程度的加剧,PMOP 的发病率逐年上升,已经跃居常见病榜单第七位^[2]。PMOP 发病机制的核心是雌激素水平降低^[3]。雌激素一方面对骨细胞有直接调节作用,另一方面则通过调节转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 等免疫细胞因子的表达参与骨形成与吸收过程。雌激素可以提高 TGF- β 1 的表达而促进成骨细胞的增殖^[4],刺激骨形成和类骨质矿化,又能抑制破骨细胞增殖^[5]。当雌激素水平降低时,TGF- β 1 表达减少,出现骨代谢失衡进而导致 PMOP 的发生。现代医学多采用雌激素替代疗法治疗 PMOP,双膦酸盐类药物是日前临床上防治 PMOP 的一线用药,可明显减少 PMOP 患者骨折的发生率,但是也伴随着诸如胃肠道刺激或引发流感样症状等不良反应^[6],不能长期大剂量服用。运用传统中医药防治 PMOP 是我国的独特优势,大量研究^[7-8]表明,中医药在防治 PMOP 上有着独特优势,许多补肾健骨方剂在临床和实验中均证明有很好的疗效。其中淫羊藿、女贞子是临床常用的防治 PMOP 的补肾中药。课题组前期研究证实,以“平补阴阳、益精壮骨”立法的淫羊藿和女贞子配伍可以增加糖皮质激素性骨质疏松大鼠以及维甲酸大鼠骨组织中 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 的表达,下调 Smad7 的表达,但是课题组前期所有大鼠模型都是药物诱导的骨质疏松模型,不能完全模拟妇女绝经后的生理状态。为了进一步探索 TGF- β 1/Smads 信号通路 PMOP 的关系,本研究采用双侧去卵巢手术诱导大鼠 PMOP 模型,通过观察淫羊藿和女贞子单用及配伍对血清中 TGF- β 1 水平和骨组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3、Smad7 的影响,探讨淫羊藿和女贞子配伍对 PMOP 大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 月龄健康雌性 SD 大鼠,体质量(390 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 试剂与药品

淫羊藿、女贞子水提物购自西安康威生物有限公司;盐酸雷洛昔芬片(LILLY, SA, 批号:C614454);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司, F6082102);TGF- β 1 ELISA 试剂盒(Blue Gene Biotech Co, 批号:EK3812/2);TGF- β 1-抗(SANT CRUZ, 批号:sc-130348);p-Smad2/3-抗(CST, 批号:#8828);Smad7-抗

(SANT CRUZ, 批号:sc-365846);羊抗小鼠 IgG(中杉金桥, 批号:122107);山羊抗兔 IgG(中杉金桥, 批号:ZB-2301);GAPDH 抗体(CST, 批号:#2118);PCR 引物均由北京六合通公司提供;动物组织总 RNA 提取试剂盒(TianGEN, 批号:Q5301); $2 \times$ SYBR Premix ExTaq™(TianGEN, 批号:Q6220)。

1.3 仪器

荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE 80i);电泳仪(BIO-RAD 公司, MINI PROTEAN Tetra Cell, 1658004);电转仪(BIO-RAD 公司, MINI Trans-Blot Cell MTB(CNA), 1703810);凝胶、化学发光成像分析系统(FUSION FX6 XT, 16200694);CFX-96 型 PCR 仪(BIO-RAD 公司);酶标仪(Molecular Devices 公司, SpectraMax Plus384 型);全自动生化仪(日本奥林巴斯株式会社, AU480)。

1.4 分组与模型制备

按照随机数字表法将动物分成 6 组,每组 8 只,包括假手术组、模型组、淫羊藿组、女贞子组、淫羊藿和女贞子配伍组(配伍组)、雷洛昔芬组(阳性药组)。根据参考文献[18],对大鼠行双侧卵巢切除术造模(术前 8 h 禁食)。在无菌条件下各组大鼠均用 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 行腹腔内注射麻醉,腹腔正中切口。除假手术组外,各组大鼠均行双侧卵巢摘除术,然后缝合腹部;假手术组用同样手术方法暴露卵巢,切除少量脂肪,不摘除卵巢。

1.5 给药及取材方法

术后每只大鼠给予青霉素钠盐 20 万 U/d 肌注,连续 3 d。术后 1 周内造模动物死亡 3 只,并剔除因造模后体重降低较大的大鼠,使每组动物数为 7 只。术后 1 周开始灌胃给药,淫羊藿、女贞子及配伍组(淫羊藿:女贞子=4:3)的给药量均为 0.7 g/kg^[25],雷洛昔芬组的用药量为 6.25 mg/kg。每日 1 次,共计给药 12 周。之后行腹主动脉取血,离心取血清;分离左侧胫骨,在 10%甲醛中固定;分离右侧股骨,置于液氮内,于 -80 °C 冰箱里保存。

1.6 指标检测

1.6.1 血清中 TGF- β 1 含量:按照试剂盒说明书采用酶免法检测血清中 TGF- β 1 含量。

1.6.2 蛋白免疫印迹法(western blot, WB)检测骨组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达:取胫骨组织,按 1:10 比例加入 RIPA 裂解液,匀浆后,冰上孵育 40 min,4 °C 12 000 g 离心 15 min,取上清液,即为骨组织总蛋白;采用 BCA 蛋白测定法计算蛋白浓度;蛋白样本与上样缓冲液按 3:1 比例混合,

沸水中煮 7 min 使蛋白完全变性。各取蛋白样本 40 μg 进行 10% SDS-PAGE 电泳;电泳结束后,根据目的条带的大小和电泳 marker 所指示的位置切下目的条带和内参条带,制作转膜的三明治,p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白条带于 350 mA 恒流下转膜约 1 h, TGF- β 1 蛋白条带于 100 V 恒压下转膜 90 min。整个转膜过程在冰浴中进行;5%脱脂奶粉摇床室温封闭 2 h;分别加入目的蛋白 TGF- β 1 (1:500)、p-Smad2/3 (1:500)、Smad7 (1:500) 和内参蛋白 GAPDH (1:1 000) 一抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后 (16 h),TBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次;加入辣根过氧化物酶标记的目的蛋白和内参蛋白二抗稀释液 (抗兔 1:20 000,抗小鼠 1:20 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次;滴加 ECL 发光液,于凝胶、化学发光成像分析系统中进行胶片曝光、显影和定影。通过 Image J 图像分析软件测定各蛋白条带的灰度值,以目的蛋白条带的灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值表示各蛋白的相对表达水平。

1.6.3 免疫荧光法 (immunofluorescence staining, IF) 检测骨组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达:石蜡切片常规脱蜡、水化,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;0.01 M 柠檬酸缓冲液微波高温修复 20 min,取出冷却至室温,PBS 冲洗 3 min $\times$ 5 次;滴加 10%羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 60 min,倾去;分别滴加 50 μL TGF-

β 1 (1:100)、p-Smad2/3 (1:200) 和 S7 (1:100) 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 36 h;37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 60 min,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;滴加相应荧光二抗 50 μL (1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;50 μL DAPI (1:10 000 稀释),室温孵育 5 min 染核,PBS 冲洗 3 min $\times$ 1 次;抗荧光淬灭封片剂封片,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。光学显微镜下观察 ($\times$ 100),每个骨组织切片随机选取 3 个视野,并用 NIS-Elements BR 3.2 软件测定蛋白表达的阳性面积 (Area) 和积分光密度值 (integrated optical density, IOD),进行统计学分析 (此步骤所有溶液配制均由 PBS 稀释)。

1.6.4 胫骨组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 及 Smad7 的 mRNA 表达:根据 Trizol 试剂说明提取大鼠骨组织总 RNA;酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度;按照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA;根据 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 荧光定量预混试剂说明书,进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time pCR, qRT-PCR) 检测,引物序列见表 1。具体反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,共 40 个循环。以基因 β -actin 为内参对照,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算 TGF- β 1、Smad2、Smad3 及 Smad7 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Lengthbp
TGF- β 1	GCTTATTGACCAACCTGGCAGAC	AGGATCTCCAACAGGCACAC	130
Smad2	TTACAGATCCATCGAACTCGGAGA	CACTTAGGCATCGGCAACAC	150
Smad3	GCACAGCAAGTTCCTAGTGTGTA	GCCATGCATCCACATGTTCC	98
Smad7	AGCAAGAGTCAGCACTGCCAAG	TGACAACCTGAAATGCTGATCCAAAG	78
β -actin	CACTTCTACAATCAGCTCCG	CTGCATGCTACCTACATCG	129

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较根据方差齐性检验结果选择 LSD (方差齐) 或 Tamhane's T2 (方差不齐) 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMOP 大鼠血清 TGF- β 1 水平

与假手术组比较,模型组大鼠血清 TGF- β 1 显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较,配伍组能显著增加血清 TGF- β 1 含量 ($P<0.05$)。此外,配伍组血清 TGF- β 1 含量的改善作用较淫羊藿单用组有显著差

异 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 淫羊藿和女贞子对 PMOP 大鼠血清 TGF- β 1 影响的比较 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$)

Table 2 Effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on serum TGF- β 1 in PMOP rats ($\bar{x}\pm\text{SEM}$)

组别	例数	TGF- β 1/(ng/mL)
假手术组	7	12.58 $\pm$ 0.61
模型组	7	9.09 $\pm$ 0.71**
淫羊藿组	7	8.68 $\pm$ 0.60*
女贞子组	7	9.61 $\pm$ 0.63
配伍组	7	11.05 $\pm$ 0.50 [#]
雷洛昔芬组	7	9.46 $\pm$ 0.83

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与配伍组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 PMOP 大鼠骨组织 TGF- β 1 水平

与假手术组比较,模型组骨组织中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达均显著下降(P 均 <0.01)。与模型组相比,各给药组均能显著上调 TGF- β 1 mRNA 和蛋白的表达(P 均 <0.01)。与单用比较,配伍组

对 TGF- β 1 mRNA 表达的升高作用不如淫羊藿组显著(P 均 <0.05),但配伍组对 TGF- β 1 蛋白表达的升高作用较淫羊藿、女贞子单用组有显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 3、图 1 和图 4。

表 3 淫羊藿和女贞子对 PMOP 大鼠骨组织 TGF- β 1 的比较结果($\bar{x}\pm SEM$)

Table 3 Effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on TGF- β 1 in bone tissue of PMOP rats ($\bar{x}\pm SEM$)

组别	例数	TGF- β 1 mRNA	TGF- β 1 蛋白		
			Area(μm^2 , IF)	IOD(IF)	相对表达量(WB)
假手术组	7	1.22 $\pm$ 0.07	29.52 $\pm$ 0.59	111.31 $\pm$ 2.25	0.84 $\pm$ 0.03
模型组	7	0.29 $\pm$ 0.01**	21.41 $\pm$ 0.28**	78.79 $\pm$ 1.14**	0.34 $\pm$ 0.03**
淫羊藿组	7	0.84 $\pm$ 0.04 ^{##}	26.04 $\pm$ 0.55 ^{##}	96.77 $\pm$ 2.15 ^{##}	0.61 $\pm$ 0.02 ^{##}
女贞子组	7	0.70 $\pm$ 0.04 ^{##}	27.02 $\pm$ 0.26 ^{##}	100.86 $\pm$ 1.10 ^{##}	0.70 $\pm$ 0.05 ^{##}
配伍组	7	0.70 $\pm$ 0.02 ^{##}	28.75 $\pm$ 0.38 ^{##}	107.25 $\pm$ 1.71 ^{##}	1.03 $\pm$ 0.04 ^{##}
雷洛昔芬组	7	0.77 $\pm$ 0.03 ^{##}	29.83 $\pm$ 0.61 ^{##}	110.82 $\pm$ 2.08 ^{##}	1.16 $\pm$ 0.06 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与配伍组比较,^{##} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

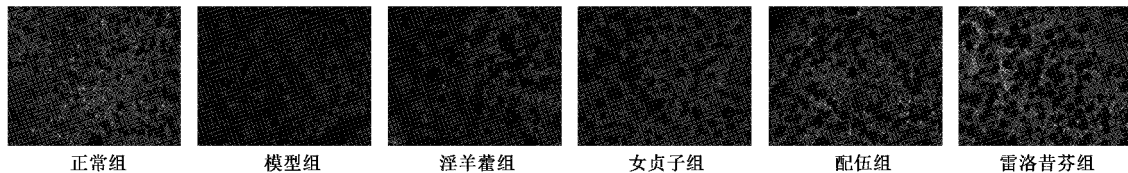


图 1 各组大鼠骨组织 TGF- β 1 免疫荧光图片($\times 100$)

Fig.1 Immunofluorescence photos of TGF- β 1 in bone tissue of PMOP rats($\times 100$)

2.3 PMOP 大鼠骨组织 Smad2/3 水平

与假手术组比较,模型组 Smad2 和 Smad3 mRNA、p-Smad2/3 蛋白均显著降低(P 均 <0.01)。与模型组相比,淫羊藿组、配伍组和雷洛昔芬组 Smad2 和 Smad3 mRNA 的表达、p-Smad2/3 蛋白均显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),女贞子组 p-Smad2/

3 蛋白均显著上升($P<0.01$)。配伍组与淫羊藿组比较,对 Smad2 mRNA 及 p-Smad2/3 蛋白(IF 法)表达显著升高($P<0.01$);与女贞子组比较,Smad2 和 Smad3 mRNA、p-Smad2/3 蛋白表达均显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)见表 4、图 2、图 4。

表 4 淫羊藿和女贞子对 PMOP 大鼠骨组织中 Smad2/3 的比较结果($\bar{x}\pm SEM$)

Table 4 Effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on Smad2/3 in bone tissue of PMOP rats ($\bar{x}\pm SEM$)

组别	例数	mRNA		p-Smad2/3 蛋白		
		Smad2	Smad3	Area(μm^2 , IF)	IOD(IF)	相对表达量(WB)
假手术组	7	0.80 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.05	96.79 $\pm$ 1.20	374.93 $\pm$ 4.30	0.70 $\pm$ 0.04
模型组	7	0.43 $\pm$ 0.04**	0.60 $\pm$ 0.03**	55.08 $\pm$ 0.90**	208.27 $\pm$ 3.47**	0.26 $\pm$ 0.01**
淫羊藿组	7	0.58 $\pm$ 0.04 ^{##}	0.72 $\pm$ 0.01 [#]	75.97 $\pm$ 0.61 ^{##}	289.62 $\pm$ 1.42 ^{##}	0.54 $\pm$ 0.05 ^{##}
女贞子组	7	0.54 $\pm$ 0.04 ^{##}	0.59 $\pm$ 0.02 ^{##}	71.76 $\pm$ 0.81 ^{##}	268.94 $\pm$ 1.98 ^{##}	0.48 $\pm$ 0.03 ^{##}
配伍组	7	0.85 $\pm$ 0.03 ^{##}	0.81 $\pm$ 0.04 ^{##}	91.72 $\pm$ 1.56 ^{##}	356.63 $\pm$ 5.59 ^{##}	0.62 $\pm$ 0.01 ^{##}
雷洛昔芬组	7	0.84 $\pm$ 0.06 ^{##}	0.94 $\pm$ 0.04 ^{##}	92.80 $\pm$ 0.60 ^{##}	355.83 $\pm$ 3.40 ^{##}	0.67 $\pm$ 0.02 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与配伍组比较,^{##} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

2.4 PMOP 大鼠骨组织 Smad7 水平

与假手术组比较,模型组 Smad7 mRNA 和蛋白表达均显著升高(P 均 <0.01)。与模型组相比,各给药组 Smad7 mRNA 和蛋白的表达均显著下降(P

均 <0.01)。与单用比较,配伍组对 Smad7 mRNA 和蛋白表达的降低作用更显著(P 均 <0.01)。见表 5、图 3、图 4。

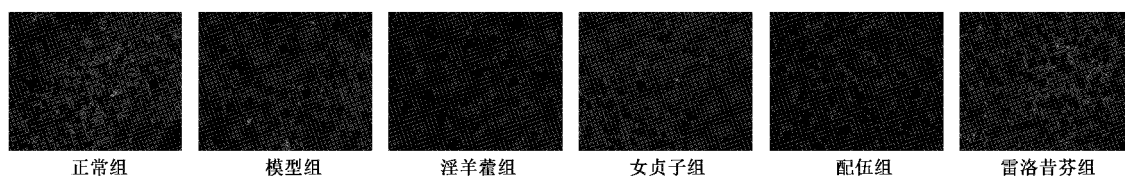


图 2 各组大鼠骨组织 p-Smad2/3 免疫荧光图片 (×100)

Fig.2 Immunofluorescence photos of p-Smad2/3 in bone tissue of PMOP rats (×100)

表 5 淫羊藿和女贞子对 PMOP 大鼠骨组织中 Smad7 的比较结果 ($\bar{x} \pm SEM$)Table 5 Effects of the combination of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on Smad7 in bone tissue of PMOP rats ($\bar{x} \pm SEM$)

组别	例数	Smad7 mRNA	Smad7 蛋白		
			Area (μm^2 , IF)	IOD (IF)	相对表达量 (WB)
假手术组	7	0.50±0.029	12.80±0.18	47.88±0.70	0.50±0.04
模型组	7	0.99±0.03**	26.04±0.26**	97.74±0.58**	1.27±0.10**
淫羊藿组	7	0.80±0.01 ^{##} &	22.39±0.13 ^{##} &	84.36±0.64 ^{##} &	0.83±0.08 ^{##} &
女贞子组	7	0.80±0.02 ^{##} &	22.05±0.27 ^{##} &	85.51±1.33 ^{##} &	0.75±0.05 ^{##}
配伍组	7	0.63±0.02 ^{##}	15.98±0.20 ^{##}	59.33±0.71 ^{##}	0.57±0.03 ^{##}
雷洛昔芬组	7	0.63±0.03 ^{##}	13.60±0.16 ^{##}	52.21±0.41 ^{##}	0.51±0.05 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与配伍组比较,& $P < 0.01$ 。

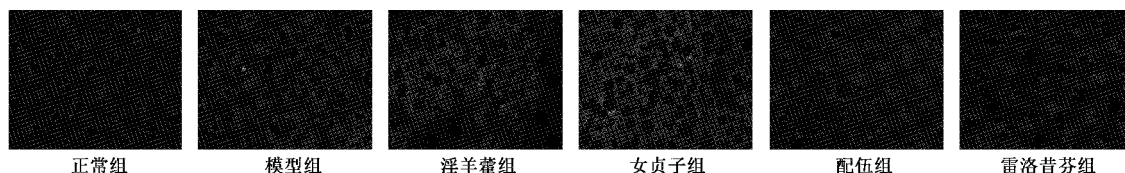


图 3 各组大鼠骨组织 Smad7 免疫荧光图片 (×100)

Fig.3 Immunofluorescence photos of Smad7 in bone tissue of PMOP rats (×100)

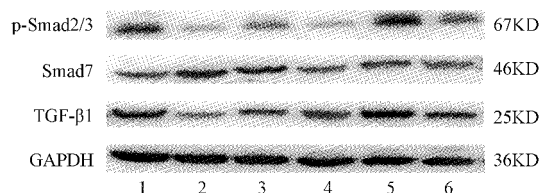


图 4 各组大鼠骨组织 WB 图片

注:1=正常组;2=模型组;3=淫羊藿组;4=女贞子组;5=配伍组;6=雷洛昔芬组。

Fig.4 WB photos in bone tissue of PMOP rats

3 讨论

PMOP 是女性常见的一种代谢性骨病,由于患者体内雌激素缺乏导致骨代谢失衡,骨吸收大于骨重建,从而出现骨质疏松^[9]。中国人群骨质疏松症防治手册 2015 版(讨论稿)^[10]指出,全球约有 2 亿人患有骨质疏松症,女性由于绝经期雌激素水平降低,患病率为 25.41%,显著高于男性的 15.33%。激素替代疗法、补充钙剂等治疗方法广泛的应用于临床,疗效显著但副作用明显^[11]。我国传统医学将 PMOP 归属为“骨痿”“骨痹”“骨枯”等范畴^[12-13],

认为 PMOP 发生原因是因肾精不足、骨失滋养所导致的。根据中医“肾主骨生髓”的理论,肾中精气充盈,骨髓化生有源则骨骼强健;肾中精气亏虚,骨髓化生不足则骨枯髓减^[14]。故中医临床多使用补肾药治疗 PMOP,能明显改善 PMOP 患者临床症状^[15-16]。大量文献报道已证实补肾方药在调节 TGF-β1/Smads 信号通路相关因子表达方面发挥着重要作用,如补阳药鹿茸可在基因和蛋白水平上显著增加 TGF-β1、Smad 2、Smad 3 的表达,促进软骨细胞增殖、分化^[17];补阴药左、右归丸及其拆方均能促进去势大鼠 TGF-β1、Smad 2、Smad 3、Smad 4 蛋白的表达,并下调抑制型 Smad7 蛋白的表达^[18],通过干预 TGF-β1/Smads 信号转导而调控骨代谢。淫羊藿温肾壮阳,女贞子补肾滋阴,是中医药防治 PMOP 的常用药物。二者合用,有平补阴阳、益肾健骨的功效,是首都国医名师李世增教授常用于防治骨质疏松的基本方。本研究发现,去势大鼠血清中 TGF-β1 表达显著降低,与研究报道一致^[19]。TGF-β1 是 TGF-β 超家族中的一种多肽生长因子,骨是 TGF-β1 的最大组织来源。生理情况下 TGF-β1 可以抑制干

细胞向破骨细胞分化,抑制破骨细胞的生成^[20];又能促进成骨细胞分化增殖,刺激骨形成^[21-22],而低浓度的 TGF- β 1 能刺激破骨细胞分化增殖^[23]。淫羊藿和女贞子配伍可以明显提高 PMOP 大鼠骨组织中 TGF- β 1 蛋白及 mRNA 的表达,说明淫羊藿和女贞子配伍能够通过调控 TGF- β 1 信号通路进而影响 PMOP 患者的骨代谢。

TGF- β 1 对骨的调节作用主要是通过转录因子 Smads 蛋白家族来传递的。Smads 蛋白是 TGF- β 1 信号通路唯一的底物蛋白。TGF- β 1 信号的传导始于 TGF- β 1 的 I 型和 II 型受体形成的异源二聚体,激活的 TGF- β I 型受体使 Smad2 和 Smad3 磷酸化,进而与 Smad 4 形成异源三聚体,移位至细胞核,完成 TGF- β 1 信号由胞浆至胞核的转导,进而调节目的基因的表达。TGF- β 1 也激活抑制性蛋白 Smad7, Smad7 通过与 Smad2/3 竞争性结合 TGF- β I 型受体,抑制其磷酸化并干预核内功能性 Smad DNA 的形成,从而阻断了 TGF- β 1/Smads 信号通路^[24]。课题组前期研究^[25-26]证实淫羊藿和女贞子对糖皮质激素性骨质疏松大鼠及维甲酸诱导的骨质疏松大鼠骨组织中 TGF- β 1/Smad 信号具有调节作用。本研究采用 PMOP 大鼠模型,发现去势大鼠骨组织中 p-smad2/3 的蛋白和 mRNA 表达均降低,Smad7 的 mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高,说明雌激素水平下降导致了 TGF- β 1/Smads 信号通路的紊乱。在给予淫羊藿女贞子治疗后,去卵巢大鼠骨组织内 TGF- β 1 升高的同时,出现 p-smad2/3 的蛋白表达、smad2 和 smad3 mRNA 表达均显著上升,抑制性蛋白 Smad7 的蛋白和 mRNA 表达均显著降低,提示淫羊藿和女贞子配伍能够发挥调节 Smads 蛋白的作用,转导 TGF- β 1 信号。

综上所述,去势大鼠体内 TGF- β 1/Smads 信号通路传导的异常改变,导致 TGF- β 1 信号不能正常传输至细胞核,进而影响了骨代谢。淫羊藿和女贞子配伍可以有效改善此信号相关细胞因子的异常表达,通过调节 TGF- β 1/Smads 信号通路对骨组织发挥保护作用。

【参 考 文 献】

- [1] 张亚军,刘忠厚,张鹏.绝经后骨质疏松症流行病学研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2010,16(3):229-234.
- [2] 刘海龙,卫荣.绝经后骨质疏松症中西医临床治疗进展[J].现代中西医结合杂志,2014,23(14):1594-1596.
- [3] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(1): 23-57.
- [4] 薛敏,董进.雌激素对成骨细胞增殖及 TGF- β 1、IGF-1 mRNA 表达的影响[J].中国医药指南,2013,11(14):88-90.
- [5] 李梅,康学,年宏蕾,等.淫羊藿-女贞子抗维甲酸致大鼠骨质疏松症的作用机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(12):81-85.
- [6] Modi A, Siris ES, Steve Fan CP, et al. Gastrointestinal events among patients initiating osteoporosis therapy: a retrospective administrative claims database analysis [J]. Clinical Therapeutics, 2015, 37(6): 1228-1234.
- [7] 于海洋,汪海燕,徐克武,等.补肾固本方治疗绝经后骨质疏松的临床研究[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(4):509-513.
- [8] 李永贤,张顺聪,梁德,等.补肾中药通过调控 Notch1 蛋白的表达治疗大鼠骨质疏松性骨折的作用研究[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(11):1425-1430.
- [9] 郑莎,马慧杰.围绝经期妇女雌激素水平与骨质疏松的关系研究[J].中国妇幼保健,2018,33(8):1806-1808.
- [10] Peng C, Li Z, Hu Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review [J]. Bmc Public Health, 2016, 16(1): 1039.
- [11] 李中万,徐绍俊,杨广钢,等.健肾方联合碳酸钙 D3 咀嚼片(II)治疗绝经后骨质疏松症肾阳虚证[J].中医正骨,2018,30(8):11-15.
- [12] 梁文娜,李西海,李灿东,等.骨免疫与绝经后骨质疏松妇女骨重建失衡[J].国际骨科学杂志,2012,33(2):103-105.
- [13] Liang W, Li X, Li Y, et al. Tongue coating microbiome regulates the changes in tongue texture and coating in patient with postmenopausal osteoporosis of Gan-shen deficiency syndrome type [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(5): 1069-1079.
- [14] 辛小玲,李兆弟,于峥,等.骨痿的病因病机[J].中国中医基础医学杂志,2012,12(5):470.
- [15] 黄付伟,孔西建,朱静栋.骨松健骨丸治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效观察[J].世界中西医结合杂志,2018,13(8):1116-1118,1122.
- [16] 宋小梅.仙灵骨葆胶囊治疗绝经期骨质疏松症临床研究[J].河南中医,2017,37(4):686-688.
- [17] 孙志涛.鹿茸归经靶向调控骨关节炎 TGF- β /Smads 信号通路机制研究[D].广州中医药大学,2013.
- [18] 艾思羽.左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠骨组织 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的影响[D].辽宁中医药大学,2017.
- [19] 杨琳,曾英,李劲平,等.补骨脂素对去势骨质疏松雌鼠 TGF- β 的影响[J].湖南中医杂志,2016,32(2):155-157.
- [20] 代光明,任磊,陈虹,等.下调骨细胞 TGF- β /Smad4 信号可抑制小鼠 BMSCs 成骨及破骨分化[J].基础医学与临床,2017,37(6):786-791.
- [21] Zheng X, Lee SK, Chun OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: a review with an emphasis on modulation of bone remodeling [J]. J Med Food, 2016, 19(1): 1-14.
- [22] Zong S, Zeng G, Zou B, et al. Effects of Polygonatum sibiricum polysaccharide on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in mice [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(6): 6169.
- [23] 杨焜,方锐.血清 I/II 型胶原、TGF- β 及 BMP 水平与绝经后女性骨关节炎、骨质疏松症患者疾病进展的关系[J].新疆中医药,2018,36(2):137-140.
- [24] 艾思羽,任艳玲,张添吴,等.补肾方药防治绝经后骨质疏松症 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的研究进展[J].河北中医,2017,39(2):304-308.
- [25] 杨燕,年宏蕾,刘仁慧,等.淫羊藿-女贞子配伍对糖皮质激素性骨质疏松大鼠 TGF- β 1/Smads 通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(9):99-104.
- [26] 李梅,康学,年宏蕾,等.淫羊藿-女贞子抗维甲酸致大鼠骨质疏松症的作用机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(12):81-85.

(收稿日期:2018-10-23;修回日期:2018-11-25)