

鹿茸健骨滴丸对骨质疏松症大鼠肾组织 TRPV5 表达的影响

李可强^{1,2}, 郑洪新^{2*}, 朱辉², 王剑², 杨芳², 张国哲²

(1. 辽宁省中药研究所, 沈阳 110161; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**通过观察鹿茸健骨滴丸对糖皮质激素性骨质疏松症(GIO)大鼠股骨骨密度(BMD)及肾组织钙转运通路蛋白(TRPV5) mRNA和蛋白表达的影响,探讨GIO的病理机制及鹿茸健骨滴丸的疗效。**方法:**将82只Wistar大鼠随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)、鹿茸健骨滴丸组(C组)及骨疏康组(D组)。采用后肢肌注地塞米松($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周2次)造模,造模同时,C、D组分别按0.88, $2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量ig给药,造模及给药9周后,应用XR-26型双能X射线骨密度仪测定BMD,采用实时定量PCR法及Western blot法测定肾组织TRPV5 mRNA和蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠BMD明显降低($P < 0.01$),肾组织TRPV5 mRNA与蛋白表达均明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,鹿茸健骨滴丸组BMD明显升高($P < 0.01$),TRPV5 mRNA与蛋白表达亦明显上调($P < 0.01$)。**结论:**地塞米松对肾钙转运过程产生抑制作用,是其诱发GIO的重要病理机制之一,鹿茸健骨滴丸通过上调肾组织TRPV5 mRNA与蛋白表达而促进肾钙重吸收,达到治疗GIO的作用。

[关键词] 鹿茸健骨滴丸; 糖皮质激素性骨质疏松症; 骨密度; 钙转运通路蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0183-03

[doi] 10.11653/syfy2013210183

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130823.0926.004.html>

[网络出版时间] 2013-08-23 9:26

Effects of Lurong Jiangu Dripping Pills on Expression of TRPV5 in Kidney of Rats with Osteoporosis

LI Ke-qiang^{1,2}, ZHENG Hong-xin^{2*}, ZHU Hui², WANG Jian², YANG Fang², ZHANG Guo-zhe²

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine Liaoning Province, Shenyang 110161, China;

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

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Lurong Jiangu dripping pills on the bone mineral density (BMD) of femur and expression of TRPV5 in kidney of rats with glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO), explore the mechanism of GIO. **Method:** Eighty-two Wistar rats were randomly divided into normal group (A), model group (B), Lurong Jiangu dripping pills group (C) and Gushukang group (D). By intramuscular injection of dexamethasone ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) twice a week rat models was established. The treatment lasted for 9 weeks BMD of femur *in vitro* was detected with dual-energy X-ray absorptiometry, the mRNA and protein expression of TRPV5 in kidney were detected by real-time quantitative RT-PCR and Western blot methods. **Result:** Compared with the normal group, the BMD of model group rats decreased evidently ($P < 0.01$), mRNA and protein expression of TRPV5 in kidney of model group rats decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the BMD of Lurong Jiangu dripping pills group increased ($P < 0.01$), mRNA and protein expression of TRPV5 also increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The depressant effect of dexamethasone for the calcium transport in kidney was the main pathomechanism of GIO. Lurong Jiangu dripping pills can upregulate the mRNA and protein

[收稿日期] 20130311(030)

[基金项目] 中国博士后科学基金面上项目(20100471478);中国博士后科学基金特别项目(201104612);沈阳市科技计划项目(F11-264-1-77)

[第一作者] 李可强,博士,教授,从事中药品质评价教学、科研工作, Tel:024-88037004, E-mail: sylkq@sina.com

[通讯作者] * 郑洪新,博士,教授,从事中医病因病机理论研究, Tel:024-31207101, E-mail: zhenghx2002@126.com

expression of TRPV5 in kidney to promote renal calcium reabsorption.

[Key words] Lurong Jiangu dripping pills; GIO; BMD; TRPV5

鹿茸健骨滴丸由鹿茸提取物、淫羊藿提取物、纳米牡蛎等药物组成,为本课题组在前期研究成果和具有自主知识产权的发明专利的基础上,利用现代固体分散技术,而研制的纯中药滴丸剂^[1-3]。糖皮质激素性骨质疏松症(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIO),为临床常见的继发性骨质疏松症,其发病机制和防治方法的研究目前已成为各国学者关注的热点问题^[4-7]。本研究通过观察鹿茸健骨滴丸对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠骨密度(BMD)及肾组织钙转运通路蛋白(TRPV5) mRNA 和蛋白表达的影响,从分子水平探讨糖皮质激素性骨质疏松症的病理机制及鹿茸健骨滴丸的疗效。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物中心),雌雄各半,雌性体重(190 ± 10)g,雄性体重(240 ± 10)g,3 月龄,动物合格证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药品与试剂 鹿茸健骨滴丸(辽宁中医药大学自制,100326),骨疏康颗粒(辽宁康辰药业,080729)。Trizol Reagent(美国 Invitrogen Life technologies 公司),荧光定量 PCR 试剂盒(大连宝生物公司),TRPV5 引物(北京华大基因公司),DNA Marker(大连 TaKaRa 公司),羊抗 TRPV5 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG(北京中山生物公司)等。

1.3 仪器 XR-26 型双能 X 射线骨密度仪(Norland,美国),Chemi Imager 5500 凝胶电泳成像分析系统(Alphainnotech Chemi Imager,美国),UV300 型紫外分光光度计(UV-visible Spectrometer,英国),Power Pac200 型电泳仪(Bio-Rad,美国),Heidolph DIAX90 型匀浆机(Heidolph,德国),Prism 7500 型 PCR 扩增仪(美国应用生物 ABI 公司)。

2 方法

2.1 分组与处理^[8] 将大鼠按体重随机分 4 组,分别为正常对照组(A 组)、模型组(B 组)、鹿茸健骨滴丸组(C 组)及骨疏康组(D 组),各组雌雄分笼饲养。除 A 组外,其余 3 组均给予地塞米松后肢臀部 im(2.5 mg·kg⁻¹,每周 2 次)。各用药组每天上午 ig 1 次(10 mL·kg⁻¹),A, B 组给予等体积生理盐水,C 组给予鹿茸健骨滴丸 0.88 g·kg⁻¹,D 组给予骨疏康颗粒 2.1 g·kg⁻¹,造模及给药连续 9 周后,采集标本

进行指标测定。

2.2 骨密度(BMD)测定 取大鼠左后肢股骨,应用 X 射线骨密度仪进行大鼠离体股骨 BMD 检测,应用仪器所附的“The Small Subject Scout Scan”软件,进行数据分析。

2.3 肾组织 TRPV5 mRNA 表达测定 取肾组织 100 mg,制成匀浆后,Trizol 法提取总 RNA,采用紫外分光光度法测定吸光度(A)并计算 A₂₆₀/A₂₈₀,在 20 μL 反应体系中进行逆转录,合成 cDNA 并进行 PCR 扩增。先在 Gene Bank 中查找 TRPV5 基因的全序列,然后使用 Prime 5.0 软件设计引物,引物合成由北京华大基因公司完成。TRPV5 上游引物 5'-CGAGGATTCCAGATGC-3';下游引物 5'-GACCATAGCCATTAGCC-3';扩增片段 93 bp。以 β-actin 基因作为内参照,其上游引物:5'-CGTCCGTGACATTAAAGAG-3';下游引物 5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'。扩增片段 132 bp。在 20 μL PCR 反应体系中进行 PCR 扩增,扩增条件为:95 °C 5 min,94 °C 30 s,53 °C 20 s,72 °C 30 s,30 个循环,72 °C 终延伸 5 min。结果采用 2^{-ΔΔCt}法进行相对基因表达分析,计算得到的结果是通过参照基因表达水平校准的试验样本中目标基因相对于校准样本的增加或减少的倍数。

2.4 肾组织 TRPV5 蛋白表达测定 另取肾组织 100 mg,细胞裂解法提取总蛋白,酚试剂法测定蛋白浓度,100 μL 蛋白加入等体积上样缓冲液,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,NC 膜印迹。加入一抗(1:400)和二抗(1:2 000),室温下分别孵育 2 h,酶显法显色。采用 Tanon-2500R 型全自动数码凝胶成像系统成像。以 β-actin 为内参照,运用 Scion Image 软件对蛋白电泳带进行灰度值检测,以目标蛋白灰度值/β-actin 条带值来表示目标蛋白的相对含量,然后再对比值进行比较。

2.5 统计方法 采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析,先行正态及方差齐性检验,各组间比较采用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 BMD 变化 与正常组比较,模型组大鼠 BMD 明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,鹿茸健骨滴丸组 BMD 显著增加($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 各组大鼠肾组织 TRPV5 mRNA 及蛋白表达的变化 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 TRPV5 mRNA 和蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,鹿茸健骨滴丸组 TRPV5 mRNA 和蛋白表达水

平显著升高 ($P < 0.01$);骨疏康组蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),mRNA 的表达量虽有升高但无统计学意义。见表 1。

表 1 鹿茸健骨滴丸对 GIO 大鼠离体股骨 BMD 及肾组织 TRPV5 mRNA 和蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	n(只)	BMD/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	TRPV5/ β -actin	
				mRNA	蛋白
正常	-	22	0.119 \pm 0.011 ²⁾	1.008 \pm 0.161 ²⁾	0.514 \pm 0.019 ²⁾
模型	-	24	0.109 \pm 0.007 ¹⁾	0.238 \pm 0.022 ¹⁾	0.445 \pm 0.019 ¹⁾
鹿茸健骨	0.88	18	0.115 \pm 0.009 ²⁾	0.675 \pm 0.074 ^{1,2)}	0.539 \pm 0.025 ^{1,2)}
骨疏康	2.1	18	0.111 \pm 0.006	0.313 \pm 0.133 ¹⁾	0.513 \pm 0.028 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

机体内钙正常的代谢调节过程均与新型上皮钙通道 TRPV5 介导的跨膜钙转运有关。TRPV5 作为瞬时性受体电位(transient receptor potential, TRP)通道超家族成员中 TRPV 亚家族成员之一,在肾钙转运过程中,对肾 Ca^{2+} 跨膜吸收起到了门控通道的作用,其主要是在肾脏的远曲小管后半段和集合小管表达,负责 Ca^{2+} 跨膜的主动重吸收过程,由此可见,TRPV5 功能失调将与钙代谢紊乱性疾病,如骨密度降低及骨质疏松症等密切相关。因此,从 TRPV5 介导的 Ca^{2+} 跨膜转运过程来探讨骨质疏松症的病理机制已成为当今骨质疏松症研究的新的切入点^[9-10],其转运通路也必将成为药物治疗的新靶点。本次实验即着重以鹿茸健骨滴丸为干预因素,对 TRPV5 介导的肾钙转运过程进行探讨。

实验结果表明,对大鼠进行 9 周的地塞米松肌肉注射后,模型大鼠 BMD 与正常组相比显著降低 ($P < 0.01$),表明此方法可以复制理想的 GIO 动物模型,肾组织 TRPV5 的表达也较正常组明显下降 ($P < 0.01$),表明地塞米松对 TRPV5 的表达产生了明显的抑制作用,钙通道蛋白 TRPV5 表达的降低,可能是 BMD 降低、骨丢失的重要原因之一。与模型组相比,鹿茸健骨滴丸可明显上调 TRPV5 mRNA 和蛋白表达量 ($P < 0.01$)、明显增强大鼠 BMD ($P < 0.01$),进一步说明了鹿茸健骨滴丸具有防治 GIO 的作用。本研究的创新点,即是揭示了大鼠肾组织 TRPV5 表达量的降低,是诱发 GIO 的重要病理机制之一;鹿茸健骨滴丸通过上调肾组织 TRPV5 基因和蛋白表达而发挥治疗 GIO 的作用,TRPV5 是骨质疏松治疗药物的作用靶点之一。

[参考文献]

- [1] 郑洪新,何慧明,任路.一种防治骨质疏松症的纳米中药[P].中国专利:CN1557425,2004-12-29.
- [2] 关书博,郑洪新,王景刚,等.健骨滴丸成型工艺研究[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(4):56.
- [3] 谷野,郑洪新.含密骨颗粒剂血清对 UMR106 成骨样细胞增殖及 PKC 活性的影响[J].辽宁中医杂志,2003,30(7):575.
- [4] E Canalis, G Mazziotti, A Ginstina, et al. Giustina. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy [J]. Osteoporos Int, 2007,18 (10):1319.
- [5] 于海涛,鞠成国,章琦,等.狗脊生、制品不同提取部位对成骨细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):36.
- [6] 陶怡,沈涛,马晖.熟地黄及其不同配伍药对治疗糖尿病大鼠骨质疏松的药效比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):249.
- [7] 甘国兴,莫新民,李劲平,等.壮骨止痛方药效部位的筛选及其对骨质疏松雌鼠骨代谢相关激素的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):126.
- [8] 刘梅洁,潘静华,李艳,等.左归丸对糖皮质激素所致骨质疏松大鼠血清中 BGP, IGF-I 含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):133.
- [9] Hoenderop Joost G J, Nilius Bernd, Bindels René J M. Calcium absorption across epithelia [J]. Physiol Rev, 2005, 85 (1):373.
- [10] Hoenderop Joost G J, van Leeuwen Johannes P T M, van der Eerden Bram C J, et al. Renal Ca^{2+} wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV 5 [J]. J Clin Invest, 2003, 112 (12):1906.

[责任编辑 聂淑琴]