

补肾、健脾、活血中药对地塞米松诱导骨质疏松大鼠骨组织 TRPV5 表达的影响

朱辉, 郑洪新*, 杨芳, 王剑, 张国哲
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**观察地塞米松诱导的骨质疏松大鼠骨组织新型上皮钙通道(TRPV5)基因和蛋白表达的变化,探讨糖皮质激素性骨质疏松症(GIO)的发病机制,并比较补肾、健脾、活血中药的疗效及其调控作用。**方法:**Wistar大鼠132只,雌雄各半,随机分为正常组、模型组、补肾组($1.139\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、健脾组($0.945\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、活血组($0.504\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和骨疏康组($2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。地塞米松im造模($2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每周2次,造模及给药连续9周。测定离体股骨骨密度(BMD),生化法测定血清骨代谢指标,实时定量PCR与Western-blot法测定骨组织TRPV5 mRNA和蛋白表达。**结果:**模型组大鼠BMD明显降低($P < 0.01$),血清骨吸收标记物TRAP含量明显升高($P < 0.01$),骨组织TRPV5 mRNA与蛋白表达均上升($P < 0.01$);补肾中药能明显增加模型大鼠股骨BMD($P < 0.01$),降低大鼠血清TRAP含量($P < 0.01$),下调骨组织TRPV5 mRNA与蛋白表达水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**补肾中药通过下调骨组织TRPV5 mRNA与蛋白表达而抑制破骨细胞骨吸收,从而起到抗骨质疏松的作用,其疗效优于健脾与活血中药。

[关键词] 糖皮质激素性骨质疏松症; 补肾; 健脾; 活血; 新型上皮钙通道 TRPV5

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0166-04

Effects of Herbs with Functions of Nourishing-kidney, Strengthening-spleen and Promoting-blood Circulation on Expression of TRPV5 in Bone Tissue of Rats with Dexamethasone-induced Osteoporosis

ZHU Hui, ZHENG Hong-xin*, YANG Fang, WANG Jian, ZHANG Guo-zhe
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe gene and protein expression of TRPV5 in bone tissue of rats with dexamethasone induced osteoporosis, and to explain pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO), meanwhile to compare the effects of herbs with functions of nourishing-kidney, strengthening-spleen and promoting-blood circulation. **Method:** One hundred and thirty two Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, nourishing-kidney herb group ($1.139\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), strengthening-spleen herb group ($0.945\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), activating-blood herb group ($0.504\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and Gushukang group ($2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The rat osteoporosis models was replicate by intramuscular injection of dexamethasone ($2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) twice a week, lasted for 9 weeks. The BMD of femur *in vitro* was detected to determine the bone metabolism marker in serum by biochemical process. The mRNA and protein expression of TRPV5 in bone tissue was detected by real-time quantified PCR and Western blot. **Result:** The BMD of model group decreased obviously ($P < 0.01$), the content of TRAP in serum increased evidently ($P < 0.01$), mRNA and protein expression of TRPV5 in bone tissue

[收稿日期] 20111020(011)

[基金项目] 国家“973”计划课题项目(2010CB530401);国家教育部博士点科研基金项目(200801620003);沈阳市科学技术计划项目(1081238-1-01)

[第一作者] 朱辉,从事“肾”藏象理论研究,Tel:13940269230,E-mail:lynn-zh@163.com

[通讯作者] *郑洪新,教授,博士生导师,从事中医老年病及“肾”藏象理论研究,Tel:024-31207101,E-mail:zhenghx2002@126.com

of model group rats increased. In nourishing-kidney herb group, the BMD up-regulated ($P < 0.01$), TRAP down-regulated ($P < 0.01$), and the expression of TRPV5 down-regulated evidently compared with the model group.

Conclusion: Nourishing-kidney herbs can inhibit bone resorption of osteoclast through down-regulating mRNA and protein expression of TRPV5 in bone tissue, so have the effect of anti-osteoporosis, which is superior to strengthening-spleen and promoting-blood circulation herbs.

[**Key words**] glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO); nourishing-kidney; strengthening-spleen; promoting-blood circulation; TRPV5

糖皮质激素性骨质疏松症(GIO)是临床常见的继发性骨质疏松症,其发病早期往往由于骨吸收增强而致骨密度降低,到后期,由于糖皮质激素直接抑制成骨细胞的成骨活性而造成骨形成减少,骨重建降低而引发骨量丢失^[1]。而且,应用糖皮质激素5年以上的患者,其骨折的发生率高达30%~50%^[2],因此,有效的防治本病具有非常重要的临床意义。

钙代谢紊乱是其发病机制之一,本研究以新型上皮钙通道 TRPV5 为效应指标,探讨 GIO 大鼠模型骨组织 TRPV5 mRNA 及蛋白表达变化,并比较补肾、健脾、活血中药的疗效及其调控作用,为中医药疗法防治本病提供确切的实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 132 只,雌雄各半,雌性体重(190 ± 10)g,雄性体重(240 ± 10)g,3 月龄。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药品与试剂 补肾中药由鹿茸、牡蛎、淫羊藿组成。鹿茸经冻干、脱毛、切片、粉碎处理,并过 80 目筛。淫羊藿水煎煮后,将提取物浓缩,再上大孔树脂精制而成淫羊藿苷。牡蛎洗净后晒干,采用纳米技术粉碎,制成纳米钙,平均粒径 780 nm 左右。补肾中药复方即鹿茸冻干粉与淫羊藿苷微粉及纳米钙微粒混合而成(剂量按成人每日用药量的 6.3 倍折算)。补中益气颗粒(北京汉典制药,批号 080601),血府逐瘀胶囊(天津宏仁堂药业,批号 103015),骨疏康颗粒(辽宁康辰药业,批号 080729)。荧光定量 PCR 试剂盒(大连宝生物),羊抗 TRPV5 多克隆抗体(santa cruz),抗酒石酸酸性磷酸酶 ELISA 试剂盒(ADL)等。

1.3 仪器 XR-26 型双能 X 射线骨密度仪(美国, NORLAND),7600-020 型全自动生化分析仪(日本,日立),UV300 型紫外分光光度计(英国,UV-visible Spectrometer),PowerPac200 型电泳仪(美国,BIO-RAD),Prism7500 型 PCR 扩增仪(美国,ABI),核酸蛋白分析仪(英国,PYE-UNICAM/SPECTRONIC)等。

2 方法

2.1 分组 将大鼠按体重分层,随机分为正常组、模型组、补肾组($1.139 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、健脾组(补中益气颗粒/ $0.945 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、活血组(血府逐瘀胶囊/ $0.504 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和骨疏康组($2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 22 只,雌、雄分笼饲养。

2.2 造模与给药方法 除正常组外,其余各组均给予地塞米松后肢臀部 im($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每周 2 次。各用组每日上午 ig 1 次($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),模型组以等量生理盐水 ig。造模及给药持续 9 周,每周称重 1 次,根据体重变化调整给药剂量。

2.3 指标检测 末次 ig 后,禁食 24 h,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),腹主动脉取血($3 \text{ mL}/\text{只}$),取血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏待检。取右后肢全股骨,剔除附着的肌肉筋膜,用医用纱布包裹,外层裹以锡纸,置于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存待检。取左后肢股骨干骺端,充分暴露股骨头,用老虎钳将其剪碎,取一半股骨头放入盛有 Trizol 的 EP 管中,另一半放入高压灭菌的 EP 管内,分别做好标记,放入 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存待检。

2.3.1 血清骨代谢指标检测 应用全自动生化分析仪,检测血清碱性磷酸酶(ALP)、Ca 和 P 含量。采用 ELISA 法,检测血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)含量。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.3.2 骨密度(BMD)检测 应用 X 射线骨密度仪进行大鼠离体股骨 BMD 检测,应用仪器自带的“The Small Subject Scout Scan”小动物软件进行数据分析。

2.3.3 骨组织 TRPV5 mRNA 表达测定 Trizol 法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。取逆转录产物,进行 PCR 扩增。先在 Gene Bank 中查找 TRPV5 基因的全序列,然后使用 Prime5.0 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';扩增片段长

93 bp。以 β -actin 基因作为内参照,其上游引物: 5'-CGTGCCTGACATTAAAGAG-3'; 下游引物: 5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'; 扩增片段长 132 bp。在 20 μ L PCR 反应体系中进行 PCR 扩增,扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。结果采用相对基因表达分析法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), 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。

2.3.4 骨组织 TRPV5 蛋白表达测定 常规提取总蛋白, 酚试剂法测定蛋白浓度。100 μ L 蛋白加入等体积上样缓冲液, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, NC 膜印迹。分别加入一抗 (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, 目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值, 即得到目的蛋白的相对含量, 然后再对比值进行比较。

2.4 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统

计学处理, 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 各组大鼠体重变化 实验结束时, 模型组大鼠出现不同程度的弓腰塌背体态, 活动减少, 反应迟钝, 喜蜷缩聚堆。除正常组外, 其余各组大鼠体重增长速度慢, 以模型组最明显 ($P < 0.01$)。补肾、健脾、活血等中药及骨疏康颗粒均有不同程度的拮抗地塞米松对大鼠体重增重的抑制作用, 其中补肾中药效果较为突出 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 各组大鼠血清 TRAP, ALP, Ca, P 含量的变化 与正常组比较, 模型组大鼠血清 TRAP 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各用药组大鼠血清 TRAP 含量均明显降低, 以补肾组和骨疏康组降低作用明显优于其他组 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠血钙含量升高, 但无统计学意义; 与模型组比较, 各治疗组大鼠血钙含量均升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠血磷及 ALP 变化无统计学意义。见表 2。

表 1 各组大鼠实验前后体重变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	雄性体重/g		雌性体重/g	
		第 1 周	第 9 周	第 1 周	第 9 周
正常	-	246.69 \pm 1.25	349.85 \pm 4.12	189.00 \pm 7.94	218.86 \pm 10.63
模型	-	249.36 \pm 1.43	270.64 \pm 3.49 ²⁾	190.43 \pm 6.11	184.11 \pm 8.90 ²⁾
补肾	1.139	247.27 \pm 1.77	293.27 \pm 4.32 ^{2,4)}	191.36 \pm 7.26	193.45 \pm 10.09 ^{2,3)}
健脾	0.945	248.09 \pm 1.93	279.00 \pm 4.02 ²⁾	186.73 \pm 5.04	192.09 \pm 10.57 ^{2,3)}
活血	0.504	248.09 \pm 2.52	274.45 \pm 7.05 ²⁾	191.45 \pm 6.15	190.73 \pm 9.50 ²⁾
骨疏康	2.1	249.36 \pm 1.79	278.18 \pm 6.53 ²⁾	189.00 \pm 5.87	192.91 \pm 7.84 ^{2,3)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 各组大鼠血清骨代谢生化标志物含量 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	TRAP/ $g \cdot L^{-1}$	Ca/ $mmol \cdot L^{-1}$	P/ $mmol \cdot L^{-1}$
正常	-	71.17 \pm 27.86	4.86 \pm 0.30	2.56 \pm 0.17	2.49 \pm 0.18
模型	-	78.83 \pm 28.10	9.96 \pm 1.15 ²⁾	2.60 \pm 0.29	2.67 \pm 0.33
补肾	1.139	96.25 \pm 26.01 ¹⁾	5.76 \pm 0.85 ⁴⁾	2.81 \pm 0.23 ^{2,3)}	2.72 \pm 0.19
健脾	0.945	92.58 \pm 33.84	6.78 \pm 0.96 ^{2,4)}	2.78 \pm 0.11 ^{2,3)}	2.68 \pm 0.36
活血	0.504	100.67 \pm 26.37 ^{2,3)}	8.34 \pm 1.06 ^{2,3)}	2.77 \pm 0.12 ^{1,3)}	2.47 \pm 0.29
骨疏康	2.1	92.33 \pm 17.13	5.37 \pm 1.14 ⁴⁾	2.80 \pm 0.20 ^{2,3)}	2.88 \pm 0.28 ²⁾

3.3 各组大鼠股骨 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, 各用药组大鼠 BMD 均有不同程度的升高, 其中以补肾组升高程度最为显著 ($P < 0.01$), 其余各用药组升高程度无统计学意义。见表 3。

3.4 各组大鼠骨组织 TRPV5 mRNA 与蛋白表达的变化 与正常组比较, 模型组大鼠骨组织 TRPV5 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与

表 3 各组大鼠离体股骨骨密度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	n	股骨骨密度/ $g \cdot cm^{-2}$
正常组	-	22	0.119 \pm 0.011
模型组	-	21	0.109 \pm 0.007 ²⁾
补肾组	1.139	18	0.116 \pm 0.007 ⁴⁾
健脾组	0.945	21	0.112 \pm 0.005 ²⁾
活血组	0.504	20	0.112 \pm 0.007 ²⁾
骨疏康组	2.1	18	0.111 \pm 0.006 ²⁾

模型组比较,补肾组与骨疏康组 TRPV5 mRNA 与蛋白表达水平均有不同程度的下调,有统计学意义。见表 4。

表 4 各组大鼠骨组织 TRPV5 mRNA 和蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	mRNA ($n=6$)	蛋白 ($n=10$)
正常组	-	1.00 ± 0.00	0.458 ± 0.011
模型组	-	2.96 ± 0.59 ²⁾	0.809 ± 0.019 ²⁾
补肾组	1.139	1.59 ± 0.23 ^{1,3)}	0.531 ± 0.013 ^{2,4)}
健脾组	0.945	1.99 ± 0.14 ²⁾	0.700 ± 0.024 ^{2,4)}
活血组	0.504	2.08 ± 0.24 ²⁾	0.639 ± 0.014 ^{2,4)}
骨疏康组	2.1	1.62 ± 0.25 ^{1,3)}	0.565 ± 0.013 ^{2,4)}

4 讨论

骨质疏松症属中医学“骨痿”、“骨痹”范畴,中医理论认为“肾藏精,主骨生髓”,肾中精气是机体诸多功能活动的原动力,“肾主骨”是肾中精气在保证骨骼正常机能方面所起的主导作用。根据中医学“审证求因”的原则,糖皮质激素长期应用所产生的骨骼副作用,从病因学角度属于“药邪”伤肾,造成肾中精气损伤,致使骨髓失养而引发骨质疏松。而肾虚精亏,脾运失职,气血生化乏源,肾精失于化生而益虚,气虚则血行无力,致血液瘀滞,经脉不畅,水谷精微失于布散,骨髓失于充润,均可加重骨质疏松。因此,本病中医发病机制主要责之肾虚,亦与脾虚、血瘀密切相关,治疗应以补肾为主,兼顾健脾与活血。故本研究设补肾与单纯健脾、活血法相比较的实验方案,并以骨疏康颗粒作为阳性对照药,以阐发中医学对 GIO 病机的认识,为临床防治本病提供科学的实验依据。

TRPV5 是瞬时性受体电位通道超家族成员中 TRPV 亚族成员之一,是介导 Ca^{2+} 跨膜转运的重要通道蛋白^[3-4]。TRPV5 基因在人类和鼠类的破骨细胞(osteoclast, OC)中表达,存在于 OC 吸收面的微绒毛形成的刷状缘,并伴随其他钙转运相关蛋白, CaBP-D_{9K}, CaBP-D_{28K}, NCX1 和 PMCA1b 而共同存在,而成骨细胞中并无 TRPV5 的表达^[5]。对 TRPV5 基因敲除鼠股骨片段分析显示,OC 的数量和面积增加,而尿中的骨吸收标志物脱氧吡啶诺林的含量却明显下降,提示骨吸收减弱^[6]。由此可见,TRPV5 可能介导 OC 骨吸收过程,与 OC 骨吸收和在 OC 中 Ca^{2+} 运输功能有密切关系。因此,改变 TRPV5 的功

能状态,对骨代谢疾病的防治具有重要意义。

本实验研究表明,地塞米松给药 9 周后,大鼠体重增长缓慢,BMD 显著降低,骨质丢失增加,此方法可以复制较理想的 GIO 动物模型。从血清 ALP 和 TRAP 的改变来看,考虑糖皮质激素首先促进骨吸收过程,致使骨钙释放增加,长期应用有可能对骨形成过程产生影响。模型组大鼠骨组织 TRPV5 基因和蛋白表达均升高,伴随骨吸收标志物 TRAP 含量的升高以及 BMD 的下降,提示 TRPV5 介导的骨吸收增强,是骨丢失的可能原因之一。本实验补肾复方,以鹿茸为君,取其壮肾阳、益精血、强筋骨之功效,配以臣药淫羊藿以增强补肾益髓、强筋健骨的作用,并以富含钙剂、具有“强骨节”作用的牡蛎作为佐使药,共同组成补肾填精壮骨中药复方。结果表明,补肾复方具有下调模型大鼠骨组织 TRPV5 基因和蛋白表达的作用,从而有效抑制骨吸收,减少骨量丢失,其作用明显优于健脾及活血中药。由此可见,本研究结果不支持单纯应用健脾、活血方药治疗,临床防治本病当以补肾法为主,根据临床表现,适当兼以健脾及活血治疗。

[参考文献]

- [1] Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathophysiology and therapy [J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(10): 1319.
- [2] Gherardo Mazziotti, Andrea Giustina, Ernesto Canalis, et al. Treatment of glucocorticoid-induced Osteoporosis [J]. *Ther Adv Musculoskel Dis*, 2009, 1(1): 27.
- [3] Clapham D E. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426(4): 517.
- [4] Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family [J]. *Cell*, 2002, 108(5): 595.
- [5] Hoenderop J G, Leeuwen J P, Eerden B C, et al. Renal Ca^{2+} wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5 [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1906.
- [6] Bram C J van der Eerden, Joost G J Hoenderop, Teun J de Vries, et al. The epithelial Ca^{2+} channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(48): 17507.

[责任编辑 聂淑琴]