

DOI:CNKI:11-3495/R.20110303.1347.004

· 药理 ·

不同治法方药对激素性股骨头坏死 鸡股骨头 OPG, RANKL mRNA 表达的影响

万蓉¹, 李莉², 孔祥英¹, 肖春生², 姜宜妮¹, 林娜^{1*}, 孔焕宇², 陈卫衡²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 观察比较健脾化痰、活血通络(简称健脾)与补肾壮骨、活血通络(简称补肾)2种治法对激素性股骨头坏死鸡股骨头骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、NF- κ B受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) mRNA表达的影响, 探讨2者防治股骨头坏死的分子机制。方法: 64只来杭鸡, 随机分为对照、模型、健脾和补肾组, 除对照组外均胸肌注射甲基泼尼松琥珀酸钠($5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 健脾及补肾组在造模同时 ig 给予相应中药($6, 9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 连续16周。给药8周和16周后, 分批处死动物, 取双侧股骨头, 原位杂交法检测股骨头内 OPG, RANKL mRNA 的表达情况, 并计算其比值。结果: 与正常组相比, 模型组8周和16周时股骨头内 OPG 阳性细胞数显著减少, 分别为(778 ± 189), (696 ± 108)个, RANKL 分别为(717 ± 164), (519 ± 162)个, 明显增多($P < 0.01$); 与模型组相比, 健脾方在8周就可以明显上调 OPG 阳性细胞数达(1049 ± 211)个, 同时也降低 RANKL 阳性细胞数至(454 ± 166)个($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 升高 OPG/RANKL 比值($P < 0.05$), 而补肾组此时作用不明显, 16周时作用比健脾组强($P < 0.05$)。结论: 健脾化痰、活血通络和补肾壮骨、活血通络2种不同治法方药均可调节股骨头内 OPG 和 RANKL 的基因表达, 这可能是其有效抑制破骨细胞分化、防治激素性股骨头坏死的作用机制之一; 健脾化痰、活血通络方药起效时间相对较早。

[关键词] 股骨头坏死; 骨保护素; NF- κ B受体活化因子配基

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0149-05

Effect of Different Treating Principles and Formulas on Expression of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand mRNA in Steroid-induced Osteonecrosis of Femoral Head in Chichen

WAN Rong¹, LI Li², KONG Xiang-ying¹, XIAO Chun-sheng², JIANG Yi-ni¹, LIN Na^{1*},
KONG Huan-yu², CHEN Wei-heng^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of two treating principles and formulas, named 'invigorating spleen to remove phlegm and promoting blood circulation to remove meridian obstruction' (Jianpi) and 'invigorate

[收稿日期] 20101222(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30472131)

[第一作者] 万蓉, 硕士, 从事中药药理研究, E-mail: wanrong2004@126.com

[通讯作者] *林娜, Tel: 010-64011692, E-mail: linna888@163.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:47

the kidney and promoting blood circulation to remove meridian obstruction' (Bushen), on the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) mRNA in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH), as well as to explore and compare their mechanism of prevention and treatment for SONFH. **Method:** Sixty-four chickens were randomly divided into control group, model group, Jianpi group and Bushen group. Except the control group, the animal model of SONFH was established with injection of methylprednisolone in chest muscle of chickens. At 8th and 16th weeks, both sides of femoral heads were taken off to observe the expression of OPG and RANKL mRNA with in situ hybridization staining. **Result:** Compared with the control group, the expression of OPG mRNA was decreased and RANKL mRNA increased significantly in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, both in Jianpi and Bushen group, the expression of OPG mRNA was increased and RANKL mRNA decreased significantly, meanwhile the ratio of OPG to RANKL was increased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). In Bushen group, the change did not obvious at the 8th weeks, however, the changes were significant compared with that in Jianpi group at the 16th weeks. **Conclusion:** Both Jianpi and Bushen formula can regulate the expression of OPG and RANKL mRNA to inhibit bone destruction, thereby exert preventive and therapeutic effect for SONFH. Jianpi take action earlier than Bushen formula.

[**Key words**] osteonecrosis of the femoral head, osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

大量应用激素不仅会导致股骨头坏死,还常常伴有局部或全身渐进性的骨量丢失。破骨细胞在骨侵蚀及骨量丢失中发挥重要作用,近年来发现骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/NF- κ B受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)/NF- κ B受体活化因子/RANK(OPG/RANKL/RANK)是破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路,其中 OPG, RANKL 的表达水平,可作为衡量破骨细胞介导的骨吸收程度的指标^[1]。本实验通过观察比较健脾化痰、活血通络(简称健脾)与补肾壮骨、活血通络(简称补肾)这 2 种不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡股骨头 OPG, RANKL mRNA 表达的变化,来探讨其防治股骨头坏死的机制。

1 材料

1.1 动物 健康来杭鸡 64 只,雌性,体重为 1.8 ~ 2.3 kg,由北京梅里来维通实验动物技术有限公司提供,合格证号 SYXK(京)1100-0022。

1.2 药物和试剂 健脾化痰、活血通络方由茯苓 15 g,白术 12 g,太子参 20 g,法半夏 10 g,赤芍 10 g,桂枝 10 g,当归 10 g,川芎 10 g 等组成;补肾壮骨、活血通络方由独活 15 g,寄生 20 g,补骨脂 15 g,肉桂 10 g,杜仲 15 g,菟丝子 15 g,当归 10 g,川芎 8 g 等组成。2 方分别用水煎煮制成含生药 1 g·mL⁻¹的粗提物备用,由中国中医科学院中药研究所提供;甲基

泼尼松琥珀酸钠(批号 MD0215,Phamacia)。OPG mRNA 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德公司,所包含探针序列为:5'-TGGAC AACCC AGGAA ACCTT TCCTC CAAAA-3'; 5'-TTTGC CTGGG ACCAA AGTGA ATGCA GAGAG-3'; 5'-AGAAA TGATA GGGAA TCAGG TTCAA TCAGT-3'。RANKL mRNA 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德公司,所包含探针序列为:5'-TACTT TCGAG CGCAG ATGGATCCTA ACAGA ATATC-3'; 5'-TTGGT ACCAT GATCG AGGCT GGGCC AAGATCTCTA-3'; 5'-GATCC GGATC AAGAT GCGAC GTACT TTGGG GCTTT-3'。

1.3 仪器 TSJ-1 型自动组织脱水机、BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-C 轮转式切片机、ZPJ-1A 展片机、KPJ-1A 烤片机均为爱华公司产品。Olympus BX60 光学显微镜,美国 MIS 图像分析仪。

2 方法

2.1 动物分组及给药 健康来杭鸡 64 只,随机分为对照、模型、健脾和补肾组,每组 16 只。参照王心生^[2]激素性股骨头坏死的造模方法,进行部分改良,即胸肌注射 5.2 mg·kg⁻¹甲基泼尼松琥珀酸钠,每周 1 次,连续 16 周。给予激素的同时,健脾和补肾组分别 ig 健脾化痰、活血通络方药(6 g·kg⁻¹·d⁻¹)及补肾壮骨、活血通络方药(9 g·kg⁻¹·d⁻¹)。所有动物均肌注青霉素 2 万 u·kg⁻¹和链霉素 50

mg·kg⁻¹,每周2次,以预防感染。分2批于给药8周和16周后处死动物,取双侧股骨头备用。

2.2 组织学观察 动物处死后在无 mRNA 酶条件下取双侧股骨头,置于4%多聚甲醛溶液(含0.1% DEPC)固定48~72 h。12.5%的EDTA脱钙,流水冲洗,系列乙醇脱水,石蜡包埋切片,切片厚度为5 μm,进行HE染色。光镜下观察其病理学改变。

2.3 OPG, RANKL mRNA 的原位杂交检测 石蜡切片脱蜡至水,3%双氧水处理,蛋白酶K消化,预杂交后,加入标记探针,40℃湿盒中杂交过夜。杂交后梯度SSC洗涤,封闭,顺序滴加一抗和二抗,PBS洗涤,DAB显色,封片后显微镜下观察 mRNA 表达分布情况。以PBS代替探针作阴性对照。采用美国MIS图像分析仪对组织切片进行分析,分析时固定光照强度和光圈,在400倍光镜下采集图像,每个切片随机取3个不同的视野,使用图像分析软件搜集每个视野中阳性细胞计数。

2.4 统计学分析 采用SPSS13.0软件进行统计分

析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

3 结果

3.1 组织病理学观察 正常组鸡股骨头骨小梁排列规则、致密、饱满,周边可见成骨细胞和少量破骨细胞,未见脂肪细胞增生及肥大。造模8周时,模型组鸡股骨头髓内脂肪细胞明显增生、肥大($P < 0.01$)。16周时骨小梁稀疏,有断裂,部分区域坏死伴增生,空骨陷窝进一步增多, ($P < 0.05$);髓内脂肪面积较正常组明显增多($P < 0.01$)。健脾组软骨细胞排列整齐,骨小梁排列尚规则、致密,周边可见大量成骨细胞及少量破骨细胞,空骨陷窝量较模型组少($P < 0.05$)。补肾组16周时空骨陷窝率明显少于模型组($P < 0.05$);髓腔内脂肪细胞零散分布,髓腔内造血细胞较丰富。健脾组、补肾组在实验8周和16周髓内脂肪面积均比模型组明显减少($P < 0.01$),见表1。

表1 鸡股骨头骨髓内脂肪面积、骨小梁内空骨陷窝率比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	髓腔内脂肪面积/μm ²		空骨陷窝率/%	
		8周	16周	8周	16周
正常	-	121.04 ± 42.4	114.6 ± 29.2	13.8 ± 6.6	9 ± 8.8
模型	-	738.8 ± 119.9 ²⁾	1 043.1 ± 225.5 ²⁾	22.3 ± 7.7 ¹⁾	27 ± 12.6 ²⁾
健脾	6	324.4 ± 161.1 ⁴⁾	302 ± 91.0 ⁴⁾	15.2 ± 5.6 ³⁾	17 ± 6.0 ³⁾
补肾	9	311.6 ± 92.6 ⁴⁾	352.5 ± 127.9 ⁴⁾	20 ± 9.6	15 ± 6.8 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⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 OPG, RANKL mRNA 表达及其比值的变化 正常股骨头组织内,骨细胞、软骨细胞、骨髓腔内造血细胞内可见OPG和RANKL阳性颗粒表达。与正常组相比,模型组8周和16周时股骨头内OPG阳性细胞数显著减少、RANKL明显增多($P < 0.01$);

与模型组相比,两个给药组均能明显上调OPG阳性细胞数同时也降低RANKL阳性细胞数($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),升高OPG/RANKL比值($P < 0.05$),其中,补肾组8周时作用不明显,但16周时作用比健脾组强($P < 0.05$),见图1~2和表2。

表2 鸡股骨头 OPG 和 RANKL 阳性细胞计数的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	OPG/个		RANKL/个		OPG/RANKL	
		8周	16周	8周	16周	8周	16周
正常	-	1 139 ± 210	1 105 ± 240	300 ± 131	340 ± 157	3.5 ± 0.9	3.3 ± 0.5
模型	-	778 ± 189 ¹⁾	696 ± 108 ¹⁾	717 ± 164 ¹⁾	519 ± 162 ¹⁾	1.0 ± 0.3 ¹⁾	1.2 ± 0.6 ¹⁾
健脾	6	1 049 ± 211 ^{3),5)}	956 ± 178 ^{2),4)}	454 ± 166 ²⁾	334 ± 124 ³⁾	2.6 ± 0.7 ^{2),4)}	2.7 ± 1.1 ²⁾
补肾	9	736 ± 226	1 184 ± 243 ³⁾	574 ± 167	321 ± 119 ³⁾	1.3 ± 0.4	3.3 ± 0.8 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与补肾组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

近年的非创伤性股骨头坏死流行病学研究表

明,激素已成为目前股骨头坏死的第一致病因素^[3],但其发病机制至今尚未明了。已知糖皮质激素可促

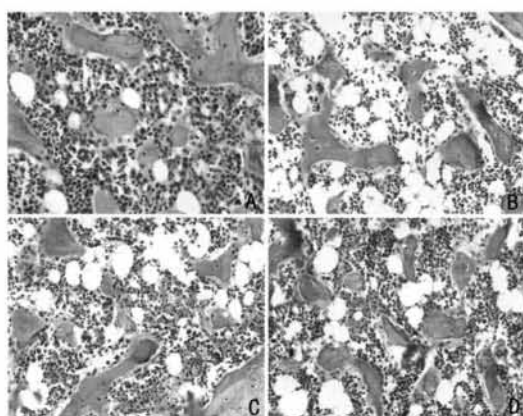


图 1 造模 16 周鸡股骨头 OPG mRNA
(原位杂交染色, ×400)

A. 正常组; B. 模型组 C. 健脾 6 g·kg⁻¹·d⁻¹组
D. 补肾 9 g·kg⁻¹·d⁻¹组(图 2 同)

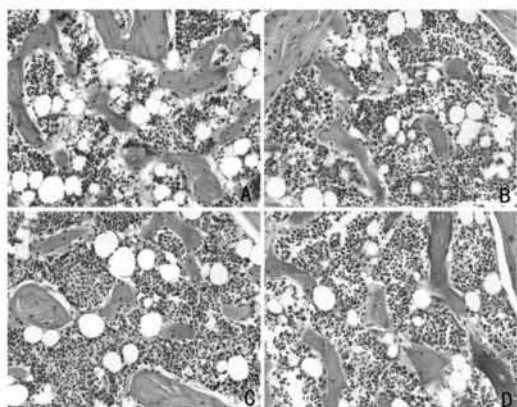


图 2 造模 16 周后鸡股骨头 RANKL mRNA
(原位杂交染色, ×400)

进成骨细胞凋亡,使骨形成降低,最终表现为骨量减少,还可能造成股骨头内骨髓脂肪化,骨细胞脂肪变性,局部脂肪栓塞,引起股骨头坏死。随着病程的进展骨破坏速率明显大于骨修复,导致后期股骨头的塌陷。维持骨的正常代谢和完整性以及骨的重建需要成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收作用间的动态平衡。许多激素及生长因子、细胞因子参与这些过程的调控,可单独或共同作用于成骨细胞和破骨细胞的增殖、活化、凋亡等各个阶段。目前认为 OPG/RANKL/RANK 系统决定了骨破坏的程度^[4]。OPG 又称破骨细胞形成抑制因子,可竞争性结合 RANKL,封闭 RANKL 与破骨细胞表面核因子 kappaB 受体激活子(RANK)结合,阻断破骨细胞的生成和活化,此外还加速破骨细胞的凋亡,抑制成骨细胞的凋亡^[5-7],从而拮抗破骨细胞的骨吸收作用。RANKL 又称破骨细胞分化因子,主要由成骨细胞表

达,通过旁分泌方式与破骨细胞前体或破骨细胞表面的 RANK 结合,促进破骨细胞的生成和活化。活体内骨代谢平衡,不仅与 OPG 或 RANKL 的绝对量相关,更取决于 OPG/RANKL 的比值^[8]。

本研究给予鸡胸肌注射甲基氢化泼尼松后,可观察到鸡股骨头内空骨陷窝和髓内脂肪面积显著增多的组织病理学变化,提示激素性股骨头坏死动物模型制作成功。在模型组可见 OPG mRNA 在股骨头骨组织的表达降低,而 RANKL mRNA 的表达增强,OPG/RANKL 比值降低,这与既往在临床激素性股骨头坏死患者所观察到的情况相近^[9]。给予健脾和补肾方药后,股骨头坏死的组织病理形态有明显改善,骨小梁周边可见大量的成骨细胞,坏死区被新生的组织替代,类骨质的形成,其骨组织的 OPG mRNA 的表达明显上调、RANKL mRNA 的表达明显下降,提示了两种治法方药可能是通过调节 OPG、RANKL mRNA 表达、抑制破骨细胞的生成和活化而促进坏死骨小梁的修复。但这两种方药作用时间稍有不同:健脾方在 8 周就可以显著增加 OPG 表达,降低 RANKL 转录,维持 OPG/RANKL 比值,而补肾方药需到 16 周才发挥上述作用。这可能是由于激素应用早期即出现体内脂代谢紊乱,而健脾方可以通过调节脂质代谢,及早改善全身血流变异常,进而提高股骨头局部的供血状态;股骨头血供改善,成骨细胞、骨髓基质细胞等生存微环境稳态化,则正常的生理功能状态逐步恢复,成骨/破骨的平衡得到维持。补肾中药虽在促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化方面具有较明显的作用^[10-11],但由于基质细胞的分化及新生成骨细胞的成熟需要较长时间,而补肾方对脂代谢的调节能力总体上不如健脾方,故到疾病的相对后期才显示出对骨细胞代谢的改善作用。

本研究借用激素性股骨头坏死鸡模型,观察到健脾化痰、活血通络和补肾壮骨、活血通络 2 种不同治法方药早期激素性股骨头坏死均有较好的防治作用,如减少破骨细胞数和空骨陷窝率,降低髓内脂肪面积等。两者的总体疗效相近,但健脾方药比补肾方药起效时间更早。

[参考文献]

- [1] Hofbauer L C, Khosla S, Dunstan C R, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. J Bone Miner Res, 2000,15(1):2.

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1350. 010

析因设计与中医补气生血方剂最佳药效配伍的研究

吴素芬,余日跃,周俊,熊玉洁,芦乾,王条敏,黄丽萍*
(江西中医学院药学院,南昌 330004)

[摘要] 目的:采用析因设计分析补气生血方剂对失血性血虚小鼠的补血作用,寻求其发挥最佳药效的方剂配伍。方法:将因素A补气药的12个水平:人参、西洋参、党参、太子参、黄芪、白术、山药、白扁豆、甘草、大枣、刺五加、灵芝与因素B补血药的6个水平:当归、熟地黄、何首乌、白芍、阿胶、龙眼肉,按 12×6 析因设计法组成72个补气生血方剂。小鼠眼眶放血0.5 mL/每只复制失血性血虚模型,测定造模后第1,4,7,10天小鼠外周血细胞值。选用RBC,HGB,HCT为指标,根据析因设计重复测量统计方法对所得数据进行分析。结果:不同时间点各补气生血方剂对RBC的作用差异有统计学意义($P < 0.01$)。补气药与补血药之间不存在交互作用。补气药各水平对RBC,HGB,HCT的影响具有统计学意义($P < 0.01$),以黄芪效果最佳。补血药各水平都有升高RBC,HGB,HCT的作用,各水平之间的差异不具有统计学意义,以当归效果最佳。黄芪当归配伍补血作用与模型组有显著性差异。结论:补气药对补气生血方剂作用的影响大于补血药,黄芪当归为最佳药效配伍。

[关键词] 析因设计;补气药;补血药;失血性血虚;最佳配伍

[中图分类号] R28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0153-04

[收稿日期] 20101102(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860350)

[第一作者] 吴素芬,药理学专业硕士在读,E-mail:Lisawu66@163.com

[通讯作者] *黄丽萍,博士,教授,硕士生导师,主要从事药理学研究工作,E-mail:jxnchlp@163.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:50

- [2] 王心生,康文成,许振华. 激素性股骨头缺血坏死动物模型的研制[J]. 中华实验外科杂志, 1993, 10(3):136.
- [3] 刘铁钢,陈卫衡. 非创伤性股骨头坏死的流行病学研究[J]. 当代医学, 2008, 14(24):64.
- [4] Teitelbaums L. Bone resorption by osteoclasts [J]. Science, 2000, 289(5484):1504.
- [5] Andeon D M, Maraskovsky E, Billingsley W L, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function [J]. Nature, 1997, 390(6656): 175.
- [6] Lacey D L, Tan H L, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Pathol, 2000, 157(2):435.
- [7] Chamoux E, Houde N, L'eriger K, Roux S. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway [J]. J Cell Physiol, 2008, 216(2):536.
- [8] Fazzalari N L, Kuliwaba J S, Atkins G J, et al. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(6):1015.
- [9] 王建忠,王坤正,时志斌,等. 激素性股骨头坏死患者股骨头骨组织骨保护素NF- κ B受体活化因子配基mRNA表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(10):1161.
- [10] 李显澎,范海蛟,樊粤光,等. 补肾法诱导骨髓间充质干细胞定向成骨分化的研究进展[J]. 中医药导报, 2007, 13(12):81.
- [11] 吴承亮,季卫锋,俞索静,等. 右归饮对家兔激素性股骨头坏死骨髓脂肪化的影响[J]. 中医正骨, 2006, 18(7):4.

[责任编辑 聂淑琴]

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110303.1347.004.html>