

左归丸对 PMOP 大鼠骨组织中 TGF- β 1/Smad4 mRNA 表达的影响

任艳玲¹, 吕海波¹, 刘立萍¹, 李娅玲²

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847;

2. 鹤壁职业技术学院医学院, 鹤壁 458030)

摘要: 目的 研究左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中 TGF- β 1/Smad4 mRNA 表达的影响, 探讨其对骨质疏松症的防治机制。方法 SD 雌性大鼠分为正常组, 假手术组, 模型空白组, 左归丸高、中、低剂量组, 及尼尔雌醇组, 采用去卵巢的方法建立绝经后骨质疏松症模型, 术后 21d 开始给药: 正常组, 假手术组 ig 生理盐水; 左归丸高、中、低剂量组分别 ig 6.4, 3.2, 1.6 g·kg⁻¹, 1 次/d; 尼尔雌醇组 ig 0.021g·kg⁻¹, 1 次/周, 连续 120 d。采用双能 X 线骨密度仪测定右后肢离体股骨近端 1/3 的骨密度 (BMD); 采用 RT-PCR 法检测左后肢股骨近端 1/3 部分的 TGF- β 1/Smad4 mRNA 表达水平。结果 与假手术组相比, 模型空白组大鼠离体股骨近端骨密度显著下降 ($P < 0.01$); 与模型空白组比较, 左归丸高、中、低剂量组及尼尔雌醇组骨密度显著升高 ($P < 0.01$)。与假手术组比较, 模型空白组大鼠骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$); 左归丸各剂量组, 骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 水平显著上升 ($P < 0.01$), 各用药组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 表达水平的下调可能是 PMOP 发生的重要机制之一, 左归丸能够上调骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 的表达, 从而有效防治骨质疏松症。

关键词: 中医学; 左归丸; 绝经后骨质疏松症; TGF- β 1; Smad4

中图分类号: R285.5

Effect of ZuoGui Pill on Expressions of TGF- β 1 /Smad4 mRNA in Ovariectomy-induced Postmenopausal Osteoporosis Rats Bone

REN Yanling¹, LU Haibo², LIU Liping², LI Yaling³

(1. 1.School of basic medicine, Liaoning university of traditional Chinese medicine, Shenyang Post 110847;

2. School of basic medicine, Liaoning university of traditional Chinese medicine, Shenyang Post 110847;

3. Hebi Institute of Technology Medical College, Hebi Post 458030)

Abstract: Objective: To investigate the mechanisms of ZuoGui pill (ZGP) to prevent and cure osteoporosis. Methods: Female Sprague-Dawley rats were distributed into seven groups. Rats ovariectomy-induced osteoporosis model were adopted. Rats were orally administrated physiological saline (negative group, sham group, OVX group), ZGP (6.4 g/kg, 3.2 g/kg, 1.6 g/kg) once a day and Nilestriol (0.021 g/kg, positive group) once a week for 120 days. The right hind proximate femur at the 1/3 side were determined the bone mineral density (BMD) by Dual-energy X-ray absorptiometry. TGF- β 1 and Smad4 mRNA expression of the left hind proximate femur at the 1/3 side were evaluated by the method of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: As compared with the Sham group, OVX group markedly decreased BMD ($P < 0.01$). ZGP (6.4 g/kg, 3.2 g/kg, 1.6 g/kg) and Nilestriol group markedly promoted BMD compared with the OVX group ($P < 0.01$). As compared with the Sham group, OVX group markedly reduced TGF- β 1 and Smad4 mRNA expression ($P < 0.01$). ZGP (6.4 g/kg, 3.2 g/kg, 1.6 g/kg) induced expression of TGF- β 1 and Smad4 mRNA in bone tissue ($P < 0.01$). But there was no difference among three dose ($P > 0.05$). Conclusion: TGF- β 1 and Smad4 mRNA expression

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (NO.20102133110001)

作者简介: 任艳玲 (1963-), 女, 教授, 主要从事方药理论及应用的研究. E-mail: yanlingren@tom.com

were downregulated in bone tissue of OVX rats. ZGP can prevent and cure osteoporosis effectively, One of the mechanisms may be related to its up-regulating the expression of TGF- β 1 / Smad4 mRNA in bone tissue.

50 **Key words:** traditional chinese medicine; ZuoGui pill.; postmenopausal osteoporosis; TGF- β 1; Smad4

0 引言

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是一种与雌激素缺乏直接
55 相关, 但亦与多种遗传因素和后天性因素关联, 以骨量减少、骨组织微结构破坏为特征, 导致骨脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。既往研究表明, 左归丸可有效防治去卵巢所致大鼠骨质疏松^[2,3]。本实验拟在此基础上, 以去卵巢骨质疏松大鼠肾组织的 TGF- β 1/Smad4 信号表达途径为切入点, 进一步探究去卵巢骨质疏松之发病机制及左归丸防治去卵巢所致骨质疏松症的作用机制。

60 1 材料

1.1 试验动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 79 只, 4.5 月龄, 体重 270~290g, 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。于辽宁中医药大学实验中心适应性喂养 1w, 室温 20~25 $^{\circ}$ C, 湿度 20~30%, 自由摄食、饮水, 饲料为全价颗粒饲料 (Ca: 0.5%)。将实验的大鼠按体重随机分层, 每层按大鼠的数量比暂分为 3 组: 正常组 13 只; 假手术组 13
65 只; 其余 65 只准备实施双侧卵巢切除术造模。

1.2 药物及试剂

左归丸中成药, 由上海雷允上封浜制药有限公司提供 (批号 090409); 尼尔雌醇片由上海医药 (集团) 有限公司新华联制药厂提供 (批号 080803); RNAiso Reagent (DRR019A)、TaKaRa
70 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂 (D9108A)、琼脂糖 (批号 D601) 由 TaKaRa 公司提供; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

BX51 型显微镜 (OLYMPUS, 日本); XR-36 型双能 X 线骨密度仪 (Norland, 美国); 550 型微孔板酶标仪 (BIO-RAD, 美国); MycyclerTM Thermal Cycler PCR 扩增仪 (美国, BIO-RAD);
75 EPS 300 电泳仪 (上海天能科技有限公司); WD-9413 凝胶成像分析仪 (北京市六一仪器厂); HE-90 小号水平电泳槽 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模

大鼠经 10% 水合氯醛 0.35ml \cdot 100g⁻¹ 腹腔注射麻醉, 从大鼠腰背部脊柱两侧入路, 切

80 除双侧卵巢；假手术组将卵巢从腹腔提出而不切除，仅切除周围少量脂肪组织。

2.2 动物分组

除正常组、假手术组外，造模 21d 后，将去卵巢存活的大鼠按体重分层随机分为 5 组，即模型空白组、尼尔雌醇组、左归丸高剂量组、左归丸中剂量组、左归丸低剂量组，并开始灌胃给药。

85 2.3 给药方法及剂量

根据人与大鼠等剂量换算公式折算大鼠左归丸的等临床剂量为 $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，并设为低剂量组。左归丸高、中、低剂量组大鼠分别给予左归丸 $6.4, 3.2, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ， $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$ ；尼尔雌醇组给予尼尔雌醇 $0.021 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ， $1 \text{ 次} \cdot \text{w}^{-1}$ ，使用前分别将左归丸和尼尔雌醇片用蒸馏水制成混悬液，定溶至所需浓度， $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，灌服；正常组、假手术组及模型空白组均灌服蒸馏水， $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ， $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$ ；灌胃期间，各组大鼠每周给予称重 1 次，并根据体重调整给药量。

2.4 标本采集

实验大鼠连续给药 120 d 后，禁食禁水 24 h。经 10% 水合氯醛 $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉。取大鼠左后肢股骨近端 1/3 部分，剔除软组织及筋膜，用 DEPC 水处理过的铝箔纸包好，做好标记后，迅速放入液氮中速冻，之后放入 -80°C 冰箱保存，以备 RT-PCR 方法检测骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 的表达；取大鼠右后肢股骨，剔除骨组织上附着的肌肉筋膜，保留骨膜，生理盐水冲洗后，用生理盐水浸湿的纱布将其包好，放入保鲜袋中，置于 -20°C 冰箱冻存，用于骨密度的检测。

2.5 观察指标

100 2.5.1 离体股骨骨密度的测量

取大鼠右后肢离体股骨近端 1/3 及股骨整体骨密度值 (g/cm^2)，批内 CV 在 0.82%~1.24%，扫描长度 1cm，宽度 1cm，扫描速度 $60 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，单位为 g/cm^2 ，表示大鼠扫描所取区域每平方厘米含的骨矿物质质量。

2.5.2 骨组织 TGF- β 1, Smad4 的 mRNA 表达

105 2.5.2.1 总 RNA 的提取及浓度测定 采用 Trizol 一步法提取肾组织总 RNA，用紫外分光光度计测定 RNA 吸光度 (A_{260}/A_{280}) 在 1.8~2.2 之间，根据测出的总 RNA 的浓度，运用公式计算出 RT 反应时的总 RNA 样本量。

2.5.2.2 引物设计 设计大鼠 TGF- β 1、Smad4 基因引物，参照 Genbank: NM021578 挪威大鼠基因编码区 cDNA 序列，利用 primer3 软件设计，由 TaKaRa 公司合成。见表 1。

110 表 1 引物序列及扩增条件

Tab. 1 Primer sequences and amplification conditions

引物	序列	扩增长度	退火温度	循环数
TGF-β1	5'-CCAAGGAGACGGAATACAGG-3'	412 bp	65 °C	30
	5'-GTGTTGGTTGTAGAGGGCAAG-3'			
Smad4	5'-TCAGCCAGCTACTTACCACCA-3'	428 bp	65 °C	30
	5'-ACACGTCCCCTTCACCTTTAC-3'			
β-actin	5'-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3'	535 bp	65 °C	30
	5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'			

2.5.2.3 基因检测 采用RT-PCR方法对TGF-β 1及Smad4 mRNA水平进行半定量分析，操作按试剂盒说明书进行。①逆转录反应：在10μ L反应体系中加入总RNA样本1μ L、Oligo dT-Adaptor Primer 0.5μ L、AMV Reverse Transcriptase XL 0.5μ L、RNase Free dH₂O 115 3.75μ L、RNase Inhibitor 0.25 μ L、dNTP Mixture 1 μ L、MgCl₂2μ L、10×RT Buffer 1μ L。反应条件：30℃,10min；50℃,30min；99℃,5min；5℃,5min。②PCR反应：在25μ L反应体系中加入RT反应液 5μ L、Primer-1与Primer-2各0.25μ L、EX Taq HS 0.15μ L、5×PCR Buffer 5 μ L、灭菌水 14.35 μ L。反应条件：94 °C,2 min预变性；94 °C,30 s变性，65 °C,30 s退火， 72 °C, 1 min延伸，30个循环；72 °C,5 min延伸。反应完成后取5μ LPCR反应液， 120 与上样缓冲液混匀，在1.5%的琼脂糖凝胶中进行恒压电泳（180 V, 20 min）。采用WD-9413B凝胶成像分析仪进行图像分析，并用Gel pro32凝胶图像分析软件对PCR产物进行半定量分析，分别用TGF-β 1/β -actin, Smad4/β -actin的吸光度比值来表示TGF-β 1, Smad4的mRNA表达水平。

2.5.3 统计学分析

125 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用统计学软件 SPSS 15.0 的 ONE-Way ANOVA 进行分析， $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸对去卵巢大鼠离体股骨近端 1/3 骨密度的影响

130 模型空白组大鼠与假手术组相比，离体股骨近端骨密度显著下降 ($P < 0.01$)，提示去卵巢后大鼠骨矿含量明显下降；去卵巢大鼠灌服左归丸及尼尔雌醇后，与模型空白组比较，左归丸高、中、低剂量组及尼尔雌醇组大鼠离体股骨近端骨密度显著升高 ($P < 0.01$)，各用药组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表2 大鼠离体股骨近端1/3骨密度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Isolated rat proximal femur 1/3 compared BMD ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	骨密度(g/cm ²)
-----	---	-------------------------

正常组	11	0.137±0.011 [▲]
假手术组	12	0.133±0.010 [▲]
模型空白组	12	0.120±0.015 [*]
尼尔雌醇组	12	0.135±0.010 [▲]
左归丸高剂量组	12	0.134±0.008 [▲]
左归丸中剂量组	11	0.136±0.010 [▲]
左归丸低剂量组	12	0.135±0.008 [▲]

135 注：与假手术组比较：^{*} $P < 0.01$ ；与模型空白组比较：[▲] $P < 0.01$

3.2 左归丸对骨组织中 TGF-β 1、Smad4 mRNA 表达的影响

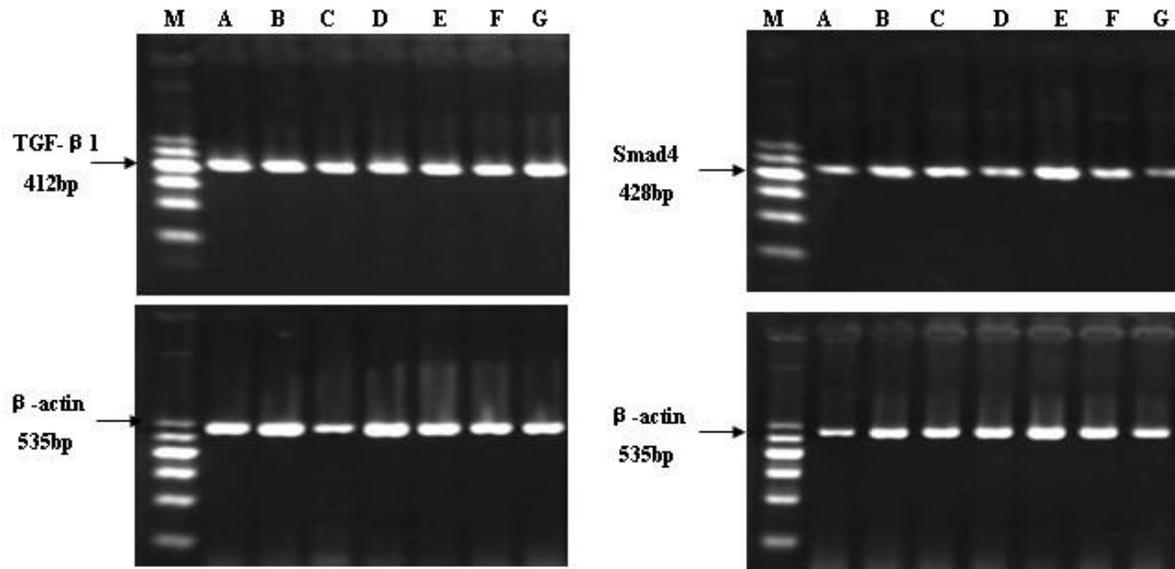
140 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后，通过图像分析软件检测，各个组分别于 412bp (TGF-β 1)、428bp (Smad4)、535bp (β-actin) 见到扩增的条带 (图 1)，表明与设计的引物相符合。经半定量 RT-PCR 检测显示：模型空白组大鼠与假手术组相比，大鼠骨组织中 TGF-β 1、Smad4 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$)；灌服左归丸各剂量组后，骨组织中 TGF-β 1、Smad4 mRNA 水平显著上升 ($P < 0.01$)，各用药组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 骨组织 TGF-β 1、Smad4 mRNA 表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Bone tissue TGF-β1, Smad4 mRNA expression level ($\bar{x} \pm s$)

组 别	TGF-β1	Smad4
正常组	0.50±0.14 [▲]	0.46±0.10 [▲]
假手术组	0.47±0.11 [▲]	0.47±0.07 [▲]
模型空白组	0.14±0.07 [*]	0.18±0.06 [*]
尼尔雌醇组	0.46±0.12 [▲]	0.45±0.06 [▲]
左归丸高剂量组	0.43±0.11 [▲]	0.45±0.07 [▲]
左归丸中剂量组	0.45±0.08 [▲]	0.45±0.09 [▲]
左归丸低剂量组	0.41±0.11 [▲]	0.41±0.03 [▲]

注：n=3；与假手术组比较：^{*} $P < 0.01$ ；与模型空白组比较：[▲] $P < 0.01$



注：A：正常组 B：假手术组 C：模型空白组 D：尼尔雌醇组
E：左归丸高剂量组 F：左归丸中剂量组 G：左归丸低剂量组 M：Marker

图1 骨组织 TGF-β1、Smad4 mRNA 表达产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Bone tissue TGF-β1, Smad4 mRNA expression agarose gel electrophoresis

145

150 4 讨论

中医学认为 PMOP 的发病与肾精亏虚有十分密切的关系。肾为先天之本，肾藏精，主生长发育与生殖；肾主骨生髓，骨骼的生长、发育、修复均依赖于肾中精气的充盈、滋养和推动。PMOP 是伴发着人体衰老，机体生理顺应性下降而出现的全身性、退行性疾病，是多种致病因素综合作用的结果；五脏虚损和气血功能紊乱与其发病密切相关，而五脏之中，肾虚是 PMOP 发病的根本原因^[4]。因此，补肾填精是防治 PMOP 的根本方法。

155

本实验研究采用的补肾名方左归丸出自《景岳全书》，《景岳全书·新方八阵》曰：“治真阴肾水不足，不能滋养营卫，渐至衰弱，或虚热往来，自汗盗汗，或神不守舍，血不归原，或虚损伤阴，或遗淋不禁，或气虚昏运，或眼花耳聋，或口燥舌干，或腰酸腿软，凡精髓内亏，津液枯涸等证，俱速宜壮水之主，以培左肾之元阴，而精血自充矣。宜此方主之。”方中熟地黄滋肾以填真阴；枸杞子益精明目；山茱萸涩精敛汗；龟、鹿二胶，为血肉有情之品，鹿胶偏于补阳，龟胶偏于滋阴，两胶合力，沟通任督二脉，益精填髓，有补阴中包涵“阳中求阴”之义；菟丝子配牛膝，强腰膝，健筋骨；山药滋益脾肾，诸药合用共收滋肾填阴，育阴潜阳之效。临床上常用于治疗真阴不足导致的头目眩晕，腰痠腿软，遗精滑泄，自汗盗汗等。

160

相比其他组织，TGF-β 在骨基质中最丰富；TGF-β 以非活化的形式存在，从骨基质释放，在骨微环境中被激活；其由成骨细胞分泌，以多种形式调控骨代谢，诱导骨骼发育和骨重建^[5]。Smad2/3 蛋白为转录因子，与通用型 Smad4 蛋白结合形成异源三聚体，将 TGF-β 超家族（包括 BMP-4）激活的细胞外信号转导进入细胞核以调控目的基因转录^[6]。

165

本实验研究结果显示，大鼠去卵巢后，骨组织中 TGF-β 1、Smad4 mRNA 水平显著降低，而左

170 归丸各剂量组能明显上调骨组织中 TGF- β 1、Smad4 mRNA 的表达, 研究表明, TGF- β /Smad 信号转导通路在骨质疏松症的发病中起着重要的作用, 此通路的异常可能是骨质疏松症发病的重要机制之一。

[参考文献] (References)

- 175 [1] 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 669.
- [2] 王艳杰, 任艳玲, 宋囡, 等. 左归丸对去卵巢大鼠股骨中 I 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(12): 5170-5172.
- [3] 吕海波, 任艳玲, 赵金茹, 等. 左归丸防治去卵巢大鼠骨质疏松症的实验研究, 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(11), 847-850, 823
- 180 [4] 睦承志. 关于绝经后骨质疏松症发病机制的中医理论探析[J]. 光明中医, 2007, 22(11): 19-22.
- [5] Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone[J]. Endocr Rev. 1994, 15: 27-39.
- [6] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. Genes Dev. 2005, (19): 2783-810.