

· 基础研究 ·

红曲对去卵巢大鼠 BMP-2 表达及成骨细胞增殖影响的实验研究

卢建华, 吴承亮, 倪桂宝, 王维佳, 王靖, 杨林, 陈冰
(浙江中医学院附属医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的: 研究红曲对去卵巢大鼠 BMP-2 表达及成骨细胞增殖的影响。方法: 取 12 周龄的雌性 Wistar 大鼠 40 只, 其中 30 只打开腹腔去除双侧卵巢, 逐层缝合, 另 10 只予以单纯打开腹腔不切除卵巢。将大鼠分为 A 组(模型组)、B 组(治疗组)、C 组(阳性对照组)、D 组(假手术组), 饲养 12 周后, 分别予以生理盐水、红曲水提液、 α -D3 水溶液及生理盐水灌胃。灌胃 12 周后, 活杀各组动物, 取右胫骨上端做病理切片, 通过 HE 染色对成骨细胞等进行观察比较, BMP-2 免疫组化染色观察。结果: 经过 12 周的红曲水提液灌胃治疗, 成骨细胞数量明显增加, 而且通过免疫组化染色发现有 BMP-2 的棕色深染, 阳性细胞比例明显高于模型组。结论: 红曲可促进成骨细胞增殖、分化, 推测其治疗骨质疏松症的机制可能是通过提高 BMP-2 的表达来实现的。

关键词 骨质疏松, 绝经后; 骨形态发生蛋白 2; 成骨细胞; 中草药

Effects of Hongqu on BMP 2 expression and osteoblastic proliferation in ovariectomized rats LU Jianhua, WU Chengliang, NI Guibao, WANG Weijia, WANG Jing, YANG Lin, CHENG Bing. The Affiliated Hospital of Zhejiang College of TCM, Zhejiang Hangzhou, 310006, China

Abstract Objective: To study the effects of Hongqu on BMP 2 expression and osteoblastic proliferation in ovariectomized (OVX) rats. **Methods:** Laparotomy were done in 40 female Wistar rats with 12 weeks age, among them, ovaries of 30 rats were cut off, the others did not deal anything. They were divided into four groups: Model, therapy, positive control and sham operation group (group A, B, C, D). Saline, Hongqu extractant, α -D3 aqueous solution, saline were given respectively during 12 weeks after operation. All rats were killed at 12 weeks after administration. The proximal end of the right tibia were cut for pathological section, and osteoblasts were observed with HE staining and BMP 2 expression in bone tissue by immunohistochemistry staining. **Results:** Compared with group A, the expression of BMP 2 and the number of osteoblasts were significantly increased in group B. **Conclusion:** Hongqu obviously increased the number of osteoblasts in OVX rats. The results showed that high expression of BMP 2 may be an important therapeutic mechanisms in osteoporosis.

Key words Osteoporosis, postmenopausal; BMP 2; Osteoblast; Drugs, Chinese herbal

近年来随着人口的老龄化, 骨质疏松症(Osteoporosis, OP)已成为社会的主要健康问题之一, 随着 OP 患者明显增加, 其症状有明显加重的趋势, 常伴随高脂血症、高血压等。目前, 在防治高脂血症和骨质疏松症这两类疾病时, 许多老年人同时服用调脂药和抗骨质疏松制剂。为了提高老年人的生活质量、推迟衰老进程、延年益寿和节约医药费开支, 我们有必要寻找一种既能调脂、又能防治骨质疏松的理想药物。国外有文献报道他汀类调脂药物能够防

治 OP。红曲是一味传统中药材, 其代谢产物为洛伐他汀, 其调脂作用已非常明确。为验证其是否同他汀类药物一样能够提高 BMP-2 的表达, 从而达到治疗 OP 的目的, 我们进行了以下实验。

1 材料与方法

1.1 实验药物 ①红曲水提液: 由浙江中医学院附属医院中药房提供, 含生药 0.625 g/ml。② α -D3 胶丸: 以色列梯瓦制药工业有限公司生产, 批号(95)卫药准字 J10 号, 使用时配制成浓度 0.005 μ g/ml 的水溶液。③氯胺酮: 上海第一生化药业有限公司生产, 批号沪卫药准字(1995)第 001064 号。

基金项目: 浙江省教育厅科研基金资助项目(编号: 20010023)

通讯作者: 卢建华 Tel: 0571-86554021 E-mail: Lujianhua@zjcm.net

1.2 实验动物 取 12 周龄的雌性 Wistar 大鼠 40 只, 体重约 280 g。由浙江中医学院实验动物中心提供。大鼠分 8 笼予以常规饲料喂养, 自由饮水。饲养室保持良好通风, 控制室温在 (21 ± 1) °C, 湿度 63%, 噪音 < 55 分贝, 光照与黑暗时间 12 h 交替。

1.3 动物造模 腹腔注射氯胺酮 (5 mg/100 g) 麻醉条件下, 打开大鼠腹腔去除双侧卵巢, 逐层缝合; 正常对照组 (假手术组) 仅予以单纯剖腹后立即关闭。造模的前 3 d, 肌注青霉素 4 × 10⁴ U/只, 预防感染。

1.4 饲养及给药 将上述 Wistar 大鼠 40 只, 随机分为 A、B、C、D 4 组, 每组 10 只。A 组为模型组, 切除双侧卵巢; B 组为红曲治疗组, 切除双侧卵巢并予以中药红曲治疗; C 组为阳性对照组, 切除双侧卵巢并予以西药 α-D3 治疗; D 组为正常对照组 (假手术组)。造模后, 将大鼠分 8 笼予以常规饲料喂养 12 周, 第 13 周起开始给药。正常对照组、模型组每天以生理盐水 10 ml/kg 灌胃; 红曲组每天以红曲水提液 10 ml/kg 灌胃; 阳性对照组每天以 α-D3 胶丸水溶液 10 ml/kg 灌胃。整个灌胃过程持续 12 周。

1.5 观察指标 取大鼠右胫骨经 10% 的甲醛固定, 蒸馏水冲洗后, 置入 5% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 液中脱钙 10~15 d。脱钙成功后取材 (右胫骨上端纵横两个切面), 冲水 24 h, 烘干, 石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 行 S-P 法免疫组化染色及 HE 染色。S-P 染色法流程: 石蜡切片常规脱蜡脱水; 3% 过氧化氢孵育 5~10 min; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 滴加封闭用正常血清工作液, 室温孵育 10~15 min, 倾去; 滴加 I: 50 抗 BMP 单克隆抗体 (BMP-Mc Ab), 为小鼠 IgG2a, 4 °C 过夜; PBS 冲洗, 3 min × 3 次; 滴加生物素标记羊抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 10~15 min; PBS 冲洗, 3 min × 3 次; 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP), 37 °C 孵育 10~15 min; PBS 冲洗, 3 min × 3 次; 显色剂 (DAB) 显色; 自来水冲洗, 苏木素复染, 中性树胶封片。BMP-2 阳性物定位于细胞浆, 呈棕黄色。结果判断: 计算 200 个细胞, 阳性细胞小于 5% 为 (-); 5%~25% 为 (+); 26%~50% 为 (++) ; 大于 50% 为 (+++)。HE 染色观察成骨细胞并计数 (100 倍光镜下计数 10 个视野的成骨细胞, 取其均数)。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间比较

用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为非常显著性差异。

2 结果

2.1 红曲对去卵巢大鼠的 BMP-2 表达的影响 表 1 表明, 红曲治疗组去卵巢大鼠右胫骨上端, 免疫组化染色出现胞浆棕黄色深染的结果, (-) 为 0 只, (+) 为 6 只, (++) 为 4 只, 阳性率高于模型组 ($\chi^2 = 5.952, P < 0.05$) 和正常对照组 ($\chi^2 = 4.267, P < 0.05$), 与阳性对照组之间差异无显著性。

表 1 红曲水提液对去卵巢大鼠骨中 BMP-2 含量的影响 (灌胃三个月) (只)

Tab. 1 The effects of Hongqu on BMP-2 contains in bone of ovariectomized rats (sacrificed at 3 months) (Cases)

组别 Groups	阳性细胞 < 5%	阳性细胞在 5% ~ 25% 之间	阳性细胞在 26% ~ 50% 之间	阳性率 Positive rate
	Positive cells < 5%	Positive cell in 5% ~ 25%	Positive cell in 26% ~ 50%	
A	6	4	0	40%
B	0	6	4	100%
C	0	5	5	100%
D	5	3	2	50%

2.2 红曲对去卵巢大鼠成骨细胞数量的影响 HE 染色观察成骨细胞并计数, 经统计学处理, 红曲治疗组成骨细胞数量为 30.10 ± 12.51, 阳性对照组为 28.70 ± 11.98, 正常对照组为 24.90 ± 9.31, 模型组为 16.10 ± 6.01。红曲治疗组、正常对照组与模型组比较, $P < 0.05$, 阳性对照组与模型组比较, $P < 0.01$, 表明红曲治疗组、阳性对照组、正常对照组的成骨细胞数量均多于模型组; 红曲治疗组、阳性对照组、正常对照组之间的差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

红曲是一味传统中药材, 为曲霉科真菌紫色红曲霉寄生在粳米上而成的红曲米, 具有活血化瘀、健脾消食之功效。现代药理认为红曲中含有强效的血脂调节剂洛伐他汀, 其调脂作用已非常明确, 且副作用明显小于他汀类药物。他汀类药物是目前国内外流行用于降低胆固醇、预防心血管疾病的药物^[1,2], 其作用机制是抑制 HMG-CoA 还原酶来降低肝脏胆固醇的合成^[3]。

近年来, 国内外都有文献报道服用他汀类药物调脂的同时, 可增加患者的骨密度, 修复骨的显微结构, 使骨强度得以加强, 从而降低骨折的危险, 因此

可能正是人们一直在积极寻找的有助于骨重建的因子^[4]。宋纯理等^[5]通过体外培养成年小鼠的成骨细胞进行研究,结果发现洛伐他汀作用 72 h 后,成骨细胞胞浆内 BMP-2 表达水平增高,认为 BMP-2 是有效刺激成骨的细胞因子,不仅可以促进成骨细胞及其前体细胞的增殖,还促进成骨细胞的分化,甚至还促进肌细胞的前体细胞系分化为成骨细胞而抑制肌细胞的分化。Mundy 等^[6]通过实验研究发现经辛伐他汀处理的人类 MG-63 成骨细胞株培养上清液中, BMP-2 的产量增加了 27 倍。BMP 为一酸性多肽,分子量为 20 000 左右,主要存在于兔、牛、猴等动物及人的骨基质、牙骨质中。张子军等^[7]研究发现,内源性 BMP-2 主要来源于骨端坏死吸收和间充质细胞分泌两种途径,在骨缺损区存在 BMP 浓度梯度,能诱导间充质细胞分化成骨祖细胞进而形成成骨细胞,从而加速骨的形成。BMP-2 已被公认是成骨细胞的转化促进因子^[8,9],成骨细胞在体内各种调控因素的调节下发展而来, BMP-2 是主要调控因素之一。成骨细胞内 BMP-2 表达增高,细胞自分泌 BMP-2 增多,成骨细胞以自分泌的方式调节其自身的增殖、分化及代谢^[10],还可合成、分泌 20 余种胶原与非胶原蛋白和一些骨代谢局部调节因子,在骨重建中生成类骨质,修补破骨细胞骨吸收形成的陷窝,促进类骨质矿化,因而对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡与骨量维持等起着关键作用。成骨细胞功能减退导致新骨形成量减少,对骨吸收陷窝的修补能力减弱,造成骨小梁变细、薄弱、穿孔,皮质骨出现多孔性改变,从而引起骨质疏松症的发生^[11]。

本实验发现,经过 12 周的红曲水提液灌胃治

疗,通过免疫组化染色发现在胞浆中有 BMP-2 的棕色深染,染色程度明显高于模型组与正常对照组 ($P < 0.05$)。HE 染色可见红曲治疗组与阳性对照组的成骨细胞数量均明显增加。表明红曲能明显增加骨中 BMP-2 的表达,推测其途径可能为红曲能促进间充质细胞分泌 BMP-2,并促使其向成骨细胞转化,从而加速骨形成,具有治疗 OP 的作用。

参考文献

- 1 Rossouw JE, Lewis B, Rifkin BM. The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1990, 323 (16): 1112-1119.
- 2 Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease. *BM J*, 1994, 308: 367-372.
- 3 Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, et al. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139 (7): 3178-3184.
- 4 陈燕. 他汀类药物: 降脂+ 预防骨折. *中国医学论坛报*, 2000, 26 (7): 1.
- 5 宋纯理, 党耕町, 郭昭庆, 等. 洛伐他汀对成骨细胞骨形态发生蛋白 2 表达及碱性磷酸酶活性的影响. *中华老年医学杂志*, 2002, 21 (5): 362-364.
- 6 Mundy G, Garrett R, Harris S. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 1999, 286: 1946-1949.
- 7 张子军, 卢世璧, 王继芳, 等. 骨缺损中内源性 BMP 的分布及其作用. *中华外科杂志*, 1996, 34 (10): 596-598.
- 8 Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1999, 81 (4): 710-718.
- 9 Steven RC, Douglas CB. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture. *JAMA*, 2000, 283: 3255-3258.
- 10 卢卫忠, 唐康来, 杨柳, 等. TGF β 对成骨细胞的作用. *第三军医大学学报*, 2000, 22 (1): 94-96.
- 11 王洪复, 金蔚芳, 高建军. 骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5 (2): 58-62.

(收稿日期: 2004-06-08 本文编辑: 李为农)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊关于一稿两投和一稿两用等现象的处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风,我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生,我刊一直严把投稿时的审核关,要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核,附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益,凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者,我刊将择期在杂志上提出批评,刊出其作者姓名和单位,并对该文的第一作者所撰写的一切文稿两年内拒绝在本刊发表,同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

本刊编辑部