

# 增骨 II 号影响 I、II 型胶原基因表达的实验研究

魏玉玲<sup>1</sup> 王炳南<sup>1</sup> 梁克玉<sup>1</sup> 李文鑫<sup>2</sup>

(1. 湖北中医学院附属医院, 湖北 武汉 430061; 2. 武汉大学生命科学院, 湖北 武汉)

**【摘要】** 目的 从分子水平探讨增骨 III 号的作用机理。方法 取 120 只昆明小鼠造成桡骨 1.5mm 缺损骨折, 随机分为 2 组: 服药组及未服药组, 各 60 只, 在术后 2 周和 4 周, 分别进行骨痂总 RNA 的分离提取, 通过与 I、II 型胶原质粒探针 (pMCol1 $\alpha$ 1 及 pMCol2 $\alpha$ 1) 斑点杂交, 比较 I、II 型胶原 mRNA 表达的变化。结果 I 型胶原 mRNA 表达在术后 2 周明显小于 4 周, II 型胶原 mRNA 表达在术后 2 周明显大于 4 周, 提示 I 型胶原 mRNA 表达代表骨形成及塑形的特征标志, II 型胶原 mRNA 表达代表软骨修复的特征标志。I 型胶原 mRNA 表达量, 服药组大于未服药组; II 型胶原 mRNA 表达量, 服药组小于未服药组。提示服药组骨形成迅速, 由软骨修复期提早进入骨修复及塑形期。结论 增骨 III 号能促进及加快骨的修复。

**【关键词】** 骨质疏松症 中草药 基因表达

## Experimental study of the effect of Zeng gu No. III on expression of type I and type II collagen gene

WEI Yur-ling, WANG Bing-nan, LIAN G Keyu, et al. Affiliated Hospital of Hubei College of TCM (Hubei Wuhan, 430061)

**【Abstract】 Objective** CH (Chinese Herbal) Zeng gu No. III is one of a serial medicines for the treatment of osteoporosis; gene technology is applied in this experiment for the investigation of its molecular mechanism. **Methods** Models of radial fracture with bone defects of 1.5 mm were produced in 120 mice. The animals were divided into 2 groups randomly of the treatment and control groups. At the 2nd week after operation, total RNA in callus of fracture site of the two groups were extracted and were hybridized with probes of pMCol1 $\alpha$ 1 and pMCol2 $\alpha$ 1 in dot blot. The changes of mRNA expression of type I and type II collagen were compared. **Results** Whether taking CH or not, the expression level of mRNA of type I collagen at the 2nd week after operation was apparently lower than that in the 4th week, however, that of type II collagen at the 2nd week after operation was apparently higher than that at the 4th week. The experiment suggested that the expression of mRNA of type I collagen was the marker of bone formation and bone moulding, while that of type II collagen is the marker of cartilaginous repair. Compared with treatment control group, the mRNA expression level of type I collagen is lower, but that of type II collagen was higher. Apparently osteogenesis in treatment group increased rapidly. It took less time to finish the change from cartilaginous repair stage to bone repair and moulding stage. **Conclusion** Zeng gu No. III could enhance and increase bone repair.

**【Key Words】** Osteoporosis Drugs, Chinese herbal Gene expression

根据骨基质中 I、II 型胶原的 mRNA 表达在骨重建中具有优势及特异性的特点<sup>[1]</sup>, 本文采用基因技术从分子水平进行增骨 III 号对骨质疏松症作用机理的实验研究, 报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1) 细菌菌株 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (武汉大学生命科学院医学病毒室提供)。I、II 型胶原探针片段质粒 (pMCol1 $\alpha$ 1, pMCol2 $\alpha$ 1) 由芬兰 Turku 大学 Vuor-

rio E. L. 教授赠送。限制性内切酶 EcoR I、Hind III 及溶菌酶,  $\lambda$  DNA 酶切片段、PCR Marker 等均购自华美生物工程公司。

(2) 地高辛标记反应检测试剂盒及尼龙膜, 系美国 Promega 公司生产。

(3) 其它常规试剂, 包括各种缓冲液, 培养基, 显色液等。

(4) 主要仪器 超净工作台、紫外透视仪、紫外分光光度计、超速冷冻离心机、斑点杂交加样器、层

析扫描仪等。

### 1.2 方法

(1) 按李蓉等<sup>[2]</sup>方法制备感受态细胞及转化质粒 DNA。取感受态细胞悬液 200ml (DH5a 大肠杆菌) 3 管, 各加 pM Col1 $\alpha$ 1、pM Col2 $\alpha$ 1 及标准超螺旋 DNA 各 50mg, 经水溶、培养、提取质粒 DNA, 酶切。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 证实为质粒 DNA (图 1), 然后经质粒 DNA 扩增及酶切, 大量回收, 与已知分子量 PCR Marker 一起电泳, 根据在紫外光下所发出的荧光强度对比来估量 DNA 的分子量 (图 2)。

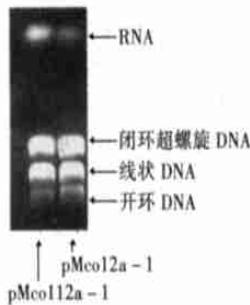
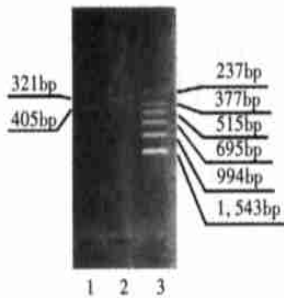


图 1 质粒电泳后鉴定



- 1. I 型胶原 mRNA 的探针 DNA 片段
- 2. II 型胶原 mRNA 的探针 DNA 片段
- 3. PCR Marker

图 2 探针 DNA 片段大小鉴定

(2) 按照 Kessler 法<sup>[3]</sup>进行 DNA 探针非放射性 Dig-dUTP 标记。将需标记的探针 DNA 2 $\mu$ l 稀释至 15 $\mu$ l, 变性后冰溶中依次加入 2 $\mu$ l 六聚核苷酸混合物, 2 $\mu$ l dUTP 标记混合物, 1 $\mu$ l 聚合酶大片混匀后于 37 $^{\circ}$ C 保温至 20h, 加入 2 $\mu$ l 0.2M EDTA (pH 8.0) 终止反应, 加入 2 $\mu$ l 4M LiCl, 75 $\mu$ l 预冷的乙醇沉淀 DNA (-20 $^{\circ}$ C 2h), 离心收集沉淀物真空干燥后, 用 50 $\mu$ l DEPC (二乙酯焦碳酸) 水溶解, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存, 备杂交时应用。

(3) 实验模型 取 120 只雄性昆明小鼠, 体重 25.0  $\pm$  1.0g, 鼠龄 12W (由湖北省医学科学院实验动物中心提供)。在乙醚麻醉下, 暴露小鼠之桡骨中

段, 用一钢锯条锯断, 造成 1.5mm 缺损骨折, 缝合皮肤。术后随机分为 2 组, I 组为服药组, II 组为未服药组。服药组在麻醉清醒后即开始灌胃给予增骨 III 号浓煎剂, 每日一次, 每只 2.6ml, 分别于术后 2W 及 4W 用颈椎脱位法处死小鼠, 在无菌操作下取出骨折处骨痂, 迅速放入液氮中。

(4) 参考 Chomczynski 等<sup>[4]</sup>方法从骨痂中提取总 RNA。取无水乙醇保存的 DEPC 水溶的 RNA 混匀液 10 $\mu$ l, 加入 3M NaAc (pH 4.5) 至终浓度为 0.3M, 充分混匀, 4 $^{\circ}$ C 12000rpm, 离心 5min 从沉淀 RNA, 加入 10 $\mu$ l DEPC 水解后, 在含甲醛的 0.8% TBE 缓冲系统中电泳, 紫外灯下鉴定 (图 3)。

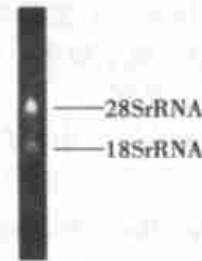


图 3 总 RNA 电泳鉴定

(5) RNA 斑点杂交及密度检测。将 2W 及 4W 样本总 RNA 标记出未服药组及服药组, 参考 Thomas<sup>[5]</sup>介绍的方法, 分别与以上制备的 I、II 型胶原 DNA 探针进行斑点杂交。最后将照片中的斑点用 CS930 扫描仪进行扫描, 以各峰的积分面积代表 mRNA 的相对含量进行比较。

### 2 结果

I、II 型胶原 DNA 探针分别与小鼠术后 2W 及 4W 之骨痂总 RNA 斑点杂交后所见, 不论服药组及未服药组, I 型胶原 mRNA 表达的图像术后 2W 均明显小于 4W (图 4), 而 II 型胶原 mRNA 表达的图像术后 2W 均明显大于 4W (图 5)。对杂交图像进行灰度扫描定量比较, 服药组 I 型胶原 mRNA 表达量均高于未服药组, 分别为 30: 20 (2W), 90: 60 (4W)。服药组 II 型胶原 mRNA 表达量均低于未服药组, 分别为 70: 100 (2W), 8: 16 (4W)。

### 3 讨论

3.1 I II 型胶原 mRNA 表达的意义 在骨基质的有机成分中, 90% 为胶原, 而胶原又是骨修复中重要的物质基础, 其基因表达具有优势及特异性特点, 故研究胶原 mRNA 表达对深入了解骨修复的机理十分重要。胶原蛋白为人体蛋白质的一大家族, 目前已鉴定出 14 种类型, 对哺乳类动物骨骼有影响的有 I、II、III

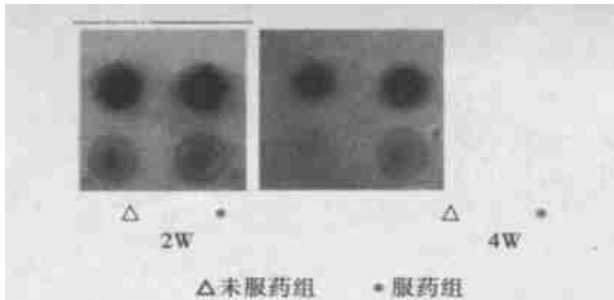


图 4 I型胶原 DNA 探针与总 RNA 斑点杂交图像

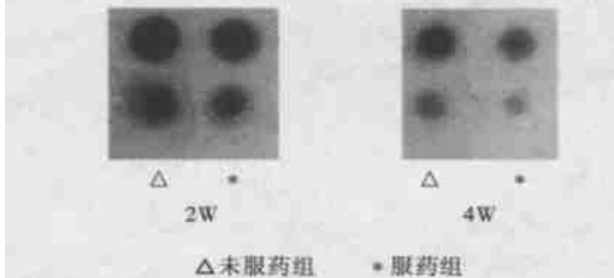


图 5 II型胶原 DNA 探针与总 RNA 斑点杂交图像

及 IX 型胶原, 其基因表达水平, 不仅表示骨转换的高低<sup>[6]</sup>, 而且还表示骨形成过程的速度<sup>[7]</sup>。

本实验采用小鼠骨折模型, 从组织学看骨折 2W 达软骨修复高峰, 之后进入骨基质骨化及塑形期, 至骨折 4 周达骨化及塑形高峰, 后者与骨质疏松症的骨形成期相类似, 故以小鼠骨折模型来分析中药对骨形成的影响是可取的。实验发现 I 型胶原 mRNA 表达在骨折后 2W 明显小于 4W, 而 II 型胶原 mRNA 表达在骨折后 2W 明显大于 4W, 提示 I 型胶原 mRNA 的表达在骨化及塑形期最明显, II 型胶原 mRNA 表达在软骨修复期最明显, 与 Hiltunen 等<sup>[6]</sup>及 Sandberg<sup>[1]</sup>报道的结果一致。若服药组与未服药组进行比较观察, 则发现 I 型胶原 mRNA 表达, 无论在骨折后 2W 或 4W, 前者均大于后者; 而 II 型胶原的 mRNA 表达, 服药组均小于未服药组, 提示服药组的骨形成增快, 已提前进入骨化及塑形期。

**3.2 中药增骨 II 号在骨形成中对 I、II 型胶原 mRNA 表达的调节机理** 近年来有关生长调节因子对骨形成胶原基因转录调控作用的研究<sup>[8]</sup>, 有助于阐明胶原蛋白的基因表达的调控机理。如  $\beta$ -转化生长因子 (TGF- $\beta$ )、血小板衍生性生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF) 等对胶原基因表达都有调节作用, 其中, TGF- $\beta$  对骨基质胶原 mRNA 表达起着主要作用, IGF 及 PDGF 均能促进胶原合成, 增加骨形成, 其作用可能是通过全身激素 (特别是甲状旁腺素

及性激素) 来调控<sup>[9]</sup>。在本实验中, 增骨 II 号明显地影响了 I、II 型胶原 mRNA 表达水平, 对骨化及塑形具有优势表达的 I 型胶原 mRNA, 服药组明显大于未服药组, 而表示软骨修复优势表达的 II 型胶原 mRNA, 骨折 2W, 服药组明显低于未服药组, 因而充分显示服药组动物软骨修复高峰迅速逝去, 骨化及塑形期提前到来, 骨形成增快。

中药增骨 II 号是我院治疗骨质疏松症序贯疗法中 3 种制剂之一 (另文发表), 由熟地、山茱萸、龙牡、续断等补肾壮骨中药组成, 是经过一系列的实验研究及长期临床应用而制定的验方。补肾中药可提高体内雌激素水平, 刺激 1, 2 羟化酶的活性, 使 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 增加, 促使钙结合蛋白合成及肠钙吸收, 骨量增加<sup>[10]</sup>。另一方面增骨 II 号可通过 cAMP 信息系统作用于生长因子对基因表达的调控<sup>[1]</sup>。由此可见, 本实验从胶原基因表达水平证明增骨 II 号治疗骨质疏松症不仅能加快骨形成速度, 而且能增加骨形成量。

#### 参考文献

- [1] Sandberg M M, Aro H J, Vuorio E. Gene expression of bone repair. Clin Orthop and related research, 1993, 289: 292-312.
- [2] 李蓉, 郭晓奎. 克隆识别. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994. 17-59.
- [3] Kessler C. Nonradioactive Labeling and detection of nucleic acids: 1. A novel DNA Labeling and detection system based on digoxigenin, antidigoxigenin ELISA Principle. J Clin Biochem, 1989, 27 (2): 130-131.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol Chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156.
- [5] Thomas P S. Hybridization of denatured RNA and Small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 5201.
- [6] Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. Clin Orthop and Related Research, 1993, 297: 23-27.
- [7] Virolamin P, Vuorio E, Aro H T. Gene expression at graft host interfaces of cortical bone allografts and autografts. Clin Orthop and Related Research, 1993, 297: 144.
- [8] Mundy G R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic Proteins and other growth factors. Clin Orthop and Related Research, 1996, 323: 24-28.
- [9] Harris SE, Bonewald LP, Harris MA, et al. Effects of TGF $\beta$  on bone nodal formation and expression of bone morphogenetic protein 2, Osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase and Type I collagen mRNA prolonged cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. J Bone Miner. Res, 1994, 9: 855-863.
- [10] 刘和娣, 李恩, 董晓旭. 补肾方药对地塞米松诱发的骨质疏松大鼠体内雌激素和 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的影响. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(9): 544.

(收稿: 1998 08 24 修回: 1998 12 25 编辑: 李为农)