

• 基础研究 •

补肾中药对成骨细胞 VDR、Cbfa1 mRNA 表达的影响

魏义勇¹, 石印玉², 詹红生², 冯伟³

(1. 第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 陕西 西安 710032; 2. 上海中医药大学附属曙光医院骨伤科; 3. 上海第二医科大学附属瑞金医院伤骨科研究所)

【摘要】 目的: 观察维生素 D 受体 (VDR)、核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbfa1) mRNA 在大鼠成骨细胞 (OB) 中的表达, 研究固本壮骨胶囊、金匱肾气丸、补肾益精方、知柏地黄丸四种补肾中药对大鼠成骨细胞 VDR、Cbfa1 mRNA 表达的影响, 探讨补肾中药促进骨形成的新机制。方法: 6月龄大鼠成骨细胞被分离, 采用组织块翻转方法培养。通过倒置显微镜观察细胞形态, 矿化结节染色对成骨细胞加以鉴定。采用 RT-PCR 方法检测成骨细胞 VDR、Cbfa1 mRNA 表达。结果: RT-PCR 结果表明, 在大鼠成骨细胞中, 固本壮骨胶囊、金匱肾气丸、西药萌格旺上调 VDR、Cbfa1 mRNA 表达; 知柏地黄丸下调 VDR、Cbfa1 mRNA 表达, 补肾益精方对于 VDR、Cbfa1 mRNA 表达的影响存在着差异。结论: 固本壮骨胶囊和金匱肾气丸上调成骨细胞 VDR、Cbfa1 mRNA 表达, 可促进骨形成; 知柏地黄丸下调 VDR、Cbfa1 mRNA 表达, 有抑制或是降低骨形成的作用。

【关键词】 补肾药; 成骨细胞; 基因表达

Effects of reinforcing Kidney Chinese medicine herbal (补肾中药) on expression of VDR, Cbfa1 mRNA in rat osteoblast WEI Yi-yong^{*}, SHI Yin-yu, ZHAN Hong-sheng, FENG Wei^{*} Institute of Orthopaedics Xijing Hospital, the Fourth Military University, Xi'an 710032, Shanxi, China

ABSTRACT Objective To investigate the effects of reinforcing Kidney Chinese medicine such as *Guben-Zhuanggu* (固本壮骨), *Jingui-Shenqi* (金匱肾气), *Bushen-Yijing* (补肾益精), *Zhibai-Dihuang* (知柏地黄) on expression of VDR, Cbfa1 mRNA and explore the underlying mechanisms. **Methods** Osteoblast of 6-month-old rats was isolated and cultured by the tissue fragmenting growth method. Biological characteristic was observed by phase-contrast microscope, mineralizing nodule staining technique and electromicroscope. The expression of VDR, Cbfa1 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** RT-PCR showed that *Guben-Zhuanggu* capsule, *Jingui-Shenqi* pill up-regulated the expression which was the same as Boneone and *Zhibai-Dihuang* pill down-regulated the expression of VDR, Cbfa1 mRNA in rat osteoblast but the expression was different in *Bushen-Yijing* decoction. **Conclusion** *Guben-Zhuanggu* capsule and *Jingui-Shenqi* pill promoted bone formation by up-regulating the expression of VDR, Cbfa1 mRNA but *Zhibai-Dihuang* pill inhibited the bone formation by down-regulating the expression.

Key words Kidney reinforcing drugs; Osteoblasts; Gene expression

一般认为, 骨代谢是维持骨组织不断更新, 保持生命活力的基本过程, 这一过程是依靠骨重建 (Bone remodeling) 完成的。骨质疏松症骨丢失的潜在机制是骨重建过程的失调。研究证实骨形成过程可受到多种因素的影响, 目前发现与骨形成相关的细胞核内蛋白如维生素 D 受体、核心结合因子等对骨形成有重要的影响。本实验以大鼠成骨细胞为研究对象, 探讨补肾中药对成骨细胞内核蛋白维生素 D 受体 (Vitamin D receptor, VDR)、核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbfa1)

的影响, 以期进一步提高补肾中药在骨质疏松症防治中的有效性。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 PCR 扩增仪, 紫外分光光度计 (Beckman, 德国), H6-1 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂), 紫外成像分析系统、Tanon GIS 凝胶图像处理系统 3.70 版 (上海天能科技有限公司), DMEM Ham F12 (Gibco Grand Island, NY), 胰蛋白酶 (Promega 1:250), 新生小牛血清 (杭州四季青), 青霉素 (上海第二制药厂, 100 U/ml), 链霉素 (上海第二制药厂, 100 μ g/ml), D-Hanks 平衡液。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞的培养 取 6 月龄 SD 大鼠, 雌雄各半, 用 0.3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉 (1 ml/100 g), 麻醉后在无菌条件下取双侧股骨两端, 剔除骨膜和周围结缔组织, 无菌 PBS 液反复冲洗 3 次, 剪成约 1 mm³ 大小的骨粒, PBS 液反复冲洗至骨粒呈白色, 将骨粒均匀接种于含 20% 灭活新生牛血清 DMEM Ham F12 (1:1) 培养液的培养瓶中, 用翻转培养法培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。2 周后换液, 以后每隔 2 d 换 1 次培养液, 细胞生长融合达 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 以 1.6 × 10⁴ 个 / cm² 细胞密度接种于 25 cm² 培养瓶中。实验用第 2 代培养的细胞。

1.2.2 成骨细胞功能鉴定 成骨细胞汇合达 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 以 3 × 10⁵ 个 / ml 密度接种于 6 孔板中, 每隔 2 d 换液, 矿化结节染色观察。

1.2.3 实验分组及含药血清制备 取正常 6 月龄 SD 大鼠, 共 70 只, 体质量为 (270 ± 20) g, 雌雄各半, 由上海中医药大学实验动物中心提供。将 SD 大鼠随机分为 7 组: 正常组、生理盐水组、单味补阳组、复方补阳组、复方平补组、复方补阴组和西药对照组。单味补阳组予固本壮骨粉 (主要成分是续断, 由浙江迪耳药业有限公司生产, 批号 021012); 复方补阳组予金匱肾气丸 (主要成分是熟地黄、山药等, 由兰州佛慈药厂生产, 批号 019604); 复方平补组予补肾益精方 (主要成分是牡蛎、何首乌等, 由上海中医药大学附属曙光医院制剂室生产, 批号 010521); 复方补阴组予知柏地黄丸 (主要成分是知母、黄柏等, 由兰州佛慈药厂生产, 批号 019804) 和西药对照组予萌格旺 (由日本帝人株式会社生产, 批号 5699)。根据临床用药的等效剂量, 按照体表面积折算动物的给药剂量, 给予大鼠灌胃。于首次灌胃后间隔 2 h 后再次给药, 并于末次给药后 1 h 采血。采血方法是以 1.1% 氨基甲酸乙酯腹腔注射 (1.1 ml/kg) 麻醉, 无菌条件下, 腹主动脉取血, 4℃、3 000 r/min 离心 20 min 取上清, 56℃、30 min 灭活, 经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌, 分装, -30℃ 保存备用。需加以说明的是正常组为直接取血, 而生理盐水组经 2 次给予生理盐水灌胃后取血。

1.2.4 含药血清对成骨细胞的干预 当细胞汇合达 60%, 换无血清培养液培养细胞 24 h 后, 加入含药血清 (浓度为 10%) 再继续培养 3 d。

1.2.5 VDR、Cbfa1 基因表达的检测 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法, Trizol 法提取细胞总 mRNA: VDR 引物 Sense 5'-CAACCAGTCTTTCACCATG-3'; Antisense 5'-GCTTCATGCTATTCTCGG-3' (大小 416 bp); Cbfa1 引物 Sense 5'-GGTGGCTGAGCTGGGATAC-3'; Antisense 5'-TAGGGTCAATGACACGACCA-3' (大小 205 bp); GAPDH 引物 Sense 5'-AGCTGGTCATCAATGGGAG-3'; Antisense 5'-TCAGATGCCTGCTTCATCA-3' (大小 214 bp)。

VDR 的扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共循环 35 次; 最后 72℃ 延伸 7 min。Cbfa1 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 min, 共循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 1 min。GAPDH 基因 cDNA 扩增条件为 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 1 min, 共循环 35 次; 72℃ 延伸 2 min。产物在 1.2%

琼脂糖凝胶上电泳, 应用图像分析仪对扩增条带的光密度进行测定, 并计算该基因与 GAPDH 基因的光密度比值。

2 结果

2.1 形态学的观察 大鼠骨组织块 24 h 可贴壁, 并见游离的小圆形细胞, 3~5 d 后骨粒边缘可见少量呈梭形、三角形的细胞移出。随着培养时间的延长, 游移出的细胞呈三角形等形态。体积较小, 胞体饱满, 胞浆向外伸展, 继而相邻细胞彼此贴靠或两者突起相连。

2.2 矿化结节染色 大鼠成骨细胞培养 15 d 后可见橘红色的矿化结节形成。

2.3 补肾中药对成骨细胞 VDR、Cbfa1 基因表达的影响 电泳图见图 1-3。对图 1-3 进行扫描分析, 计算待测基因 GAPDH 与基因 PCR 产物电泳条带的吸光面积积分比值, 评定 VDR、Cbfa1 基因的表达水平 (见表 1)。与正常组相比, 固本壮骨组、金匱肾气丸组和萌格旺组具有上调成骨细胞 VDR mRNA 表达的趋势; 补肾益精方组、知柏地黄丸组下调 VDR mRNA 表达的趋势。与正常组相比, 固本壮骨组、金匱肾气丸组、补肾益精方组和萌格旺组具有上调成骨细胞 Cbfa1 mRNA 表达的趋势; 知柏地黄丸组有下调 Cbfa1 mRNA 表达的趋势。

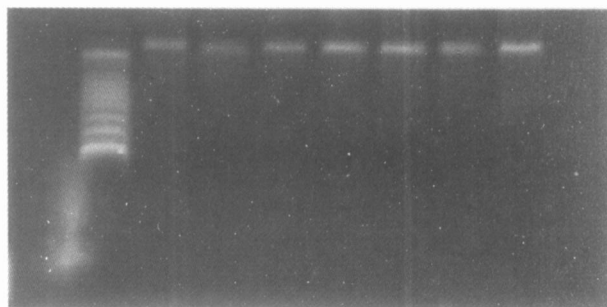


图 1 VDR RT-PCR 结果: 泳道 1 正常组, 2 生理盐水组, 3 固本壮骨组, 4 金匱肾气丸组, 5 补肾益精方组, 6 知柏地黄丸组, 7 萌格旺组

Fig 1 Result of VDR RT-PCR: Left belt was marker; belts 1 were normal group, 2 control group, 3 Guben-Zhuanggu group, 4 Jingui-Shenqi group, 5 Bushen-Yijing group, 6 Zhibai-Di Huang group, 7 Bone-one group

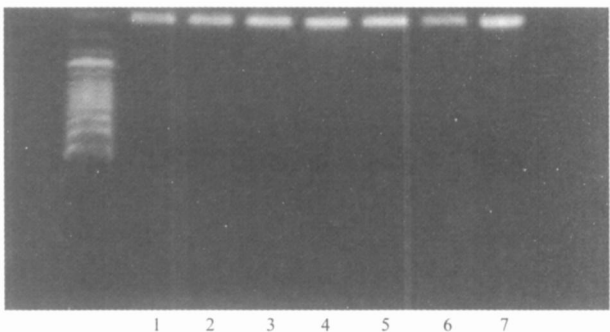


图 2 Cbfa1 RT-PCR 结果: 泳道 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别代表正常组、生理盐水组、固本壮骨组、金匱肾气丸组、补肾益精方组、知柏地黄丸组、萌格旺组

Fig 2 Result of Cbfa1 RT-PCR: Left belt was marker; belts 1 were normal group, 2 control group, 3 Guben-Zhuanggu group, 4 Jingui-Shenqi group, 5 Bushen-Yijing group, 6 Zhibai-Di Huang group, 7 Bone-one group

表 1 补肾中药干预后 VDRmRNA 与 Cbft1mRNA 的相对表达量

Tab. 1 The expression of reinforcing Kidney Chinese medicine herbal on VDRmRNA and Cbft1mRNA contents of osteoblast

项目 Item	正常组 Normal group	生理盐水组 Control group	固本壮骨组 Guben-Zhuanggu	金匮肾气丸组 Jingui-Shenqi	补肾益精方组 Bushen-Yijing	知柏地黄丸组 ZhibaiDihuang	萌格旺组 Bone-one
VDRmRNA	0.648 1	0.637 1	0.687 0	0.715 4	0.617 3	0.597 4	0.756 2
Cbft1mRNA	0.756 9	0.845 2	0.851 0	1.063 6	0.802 2	0.708 1	0.851 2

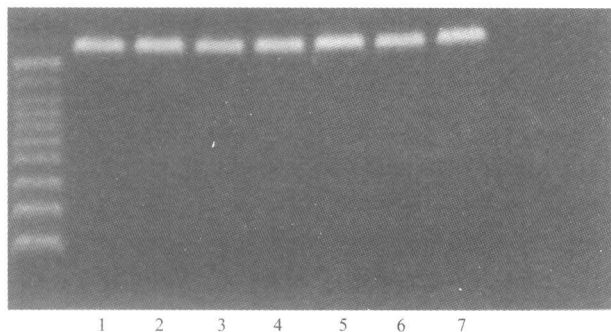


图 3 GAPDH RT-PCR 结果:泳道 1 2 3 4 5 6 7 分别代表正常组、生理盐水组、固本壮骨组、金匮肾气丸组、补肾益精方组、知柏地黄丸组、萌格旺组

Fig. 3 Result of GAPDH RT-PCR: Left belt was marker, belts 1 were normal group, 2 control group, 3 Guben-Zhuanggu group, 4 Jingui-Shenqi group, 5 Bushen-Yijing group, 6 ZhibaiDihuang group, 7 Bone one group

3 讨论

维生素 D 一直被认为是一种基本营养素,是钙平衡的重要调节因子。但随着研究的深入,发现维生素 D 属于类固醇激素家族,具有多种生理功能,如维持体内矿环境稳定,调节骨的微环境,影响骨细胞的功能,调控甲状旁腺激素的产生等^[1]。其中 1, 25-(OH)₂D₃ 是维生素 D 最具活性的代谢产物,主要作用于成熟的细胞^[2]。目前研究已证实,维生素 D 可促进骨形成,降低骨折危险因素^[3]。除此以外,1, 25-(OH)₂D₃ 还可调控 I 型胶原、金属蛋白酶等成骨细胞胞外基质成分^[4],以及影响成骨细胞的矿化、凋亡等。学者们普遍认为,1, 25-(OH)₂D₃ 之所以能够调控成骨细胞的功能,主要是通过受体介导的基因途径即 VDR 起作用的^[5]。

随着生物医学的发展,人们对骨形成机制的探索也逐渐深入。研究发现,除了内分泌调控机制外,转录机制在骨形成调控中的重要性也不容忽视。已证实,成骨细胞内核心结合因子家族 Cbft 在成骨细胞发育、分化和骨形成过程中起着至关重要的作用,尤其是其中的 Cbft1 为成骨细胞特异性转录激活因子。Ducy 等^[6]利用只在出生以后分化的成骨细胞中过度表达的 Cbft1DNA 结合区的转基因小鼠进行研究后,证明了 Cbft1 除调节成骨细胞分化外,还控制出生后骨骼的形成和发育过程。

近年来,中医药在骨质疏松防治中取得了显著的进展。中医药防治骨质疏松症的主要机制是促进骨形成,降低或是减缓骨吸收,但究竟是如何促进骨形成,降低骨吸收,还

不太清楚。本实验将含药血清方法与现代分子生物学技术结合,对其进行探讨。本研究的结果表明,西药萌格旺组能明显上调 VDRmRNA 表达,其原因是由于 1, 25-(OH)₂D₃ 具有上调自身受体表达的能力,萌格旺是 1, 25-(OH)₂D₃ 同系物,因此具有促进 VDR 表达的功能。同时实验也显示萌格旺上调 Cbft1mRNA 表达的能力要高于上调 VDR 的表达,这不仅说明成骨细胞中 Cbft1 敏感性较高,而且也证明了维生素 D 在骨质疏松防治中所具有的多靶点作用效应。补肾中药中,固本壮骨胶囊、金匮肾气丸之所以与萌格旺具有相似的作用,即上调 VDR 和 Cbft1mRNA 表达,可能与补阳中药具有促进成骨细胞增殖,激活 VDR 和 Cbft1 基因有关;知柏地黄丸下调 VDR 和 Cbft1mRNA 表达,与补阴中药抑制成骨细胞增殖有关;补肾益精方在调控 VDR 和 Cbft1mRNA 表达方面却存在着明显的差异,其差异的原因还需进一步的研究。

综上所述,补肾中药中的补阳中药之所以能够具有预防骨质疏松疾病的功能,与其上调 VDR 和 Cbft1mRNA 表达有关,从而促进骨形成,这将为拓展补肾中药在骨质疏松防治领域的应用奠定了良好的理论基础。

参考文献

- Cheung R, Erickson S, Mitchell J. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ stimulated protein kinase C phosphorylation of type VI adenylyl cyclase inhibits parathyroid hormone signal transduction in rat osteoblastic UMR 106-01 cells. *J Cell Biochem*, 2005, 94(5): 1017-1027.
- Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, et al. Membrane mediated signaling mechanisms are used differentially by metabolites of Vitamin D₃ in musculoskeletal cells. *Steroids*, 2002, 67(6): 421-427.
- Christiansen P. The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture. *APMIS (Suppl)*, 2001, 102: 1-52.
- Shearer M. J. Role of Vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000, 3(6): 433-438.
- Buitrago C, Vazquez G, De Boland AR, et al. The Vitamin D receptor mediates rapid changes in muscle protein tyrosine phosphorylation induced by 1, 25-(OH)₂D₃. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(5): 1150-1156.
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbft1 dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 1999, 13(8): 1025-1036.

(收稿日期: 2005-11-22 本文编辑: 连智华)