

· 基础研究 ·

淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPGL mRNA 表达的影响

陈柏龄¹, 谢登辉¹, 王宗伟², 李佛保¹, 徐栋梁¹, 黎艺强¹

(1.中山大学附属第一医院骨科, 广东 广州 510080; 2.广州中医药大学中药学院)

【摘要】 目的:探讨淫羊藿总黄酮(total flavone of epimedium, TFE)治疗骨质疏松症的分子机制,为传统中药的现代化和二次开发提供实验依据。方法:将 60 只 4 月龄健康雌性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组(A 组, 20 只,行假手术处理),去卵巢组(OVX 组, 20 只,切除卵巢后不给予淫羊藿处理),淫羊藿组(TFE 组, 20 只,切除卵巢后给予淫羊藿灌胃)。所有大鼠术前及术后 4 周以 DEXA 骨密度仪检测 L₄ 骨密度变化(若 BMD 下降>20%, 则骨质疏松模型建立)。模型建立后 TFE 组大鼠给予淫羊藿总黄酮(浓度 30 mg/ml, 10 ml/kg, 1 次/d)灌胃 4 周。所有大鼠处死前再行 DEXA 骨密度检测,过量麻醉法处死后取其股骨下部,切片匀浆提取骨组织中 RNA,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测骨组织护骨素(osteoprotegerin, OPG)、护骨素配体(OPGL) mRNA 的表达。结果:①TFE 组大鼠切除卵巢 4 周后,腰椎 BMD 均值降至(0.084±0.020) g/cm²,降幅>20%证明骨质疏松模型建立。TFE 灌胃 4 周后其腰椎 BMD 提高至(0.112±0.009) g/cm²,与给药前比较有明显改善,差异有统计学意义(P<0.05);②TFE 组大鼠骨组织中 OPG mRNA 的表达较 OVX 组相比,明显增强,且有统计学差异(P<0.05),但对 OPGL mRNA 表达促进作用不明显,组间无统计学差异(P>0.05)。结论:TFE 是通过促进骨组织中 OPG mRNA 的表达来抑制破骨细胞的分化和成熟,从而达到治疗骨质疏松症的目的。

【关键词】 淫羊藿; 骨质疏松; 护骨素; 动物实验

Effect of total flavone of epimedium on expression of bone OPG, OPGL mRNA in ovariectomized rats CHEN Bai-ling*, XIE Deng-hui, WANG Zong-wei, LI Fo-bao, XU Dong-liang, LI Yi-qiang. *Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of TFE(total flavone of epimedium) in the treatment of osteoporosis, and then provide experimental evidence for modernization and further development of TFE as an traditional Chinese medicine. **Methods:** Sixty healthy female SD rats with aged 4 months were randomly divided into three groups (including control group in which rats received sham surgery, OVX group in which ovariectomized rats didn't give any medicine after the removal of ovaries and TFE group in which ovariectomized rats administrated TFE), 20 rats in each group. Compared bone mineral density (BMD) between before operation and at 4th week after operation in order to verify the establishment of osteoporotic model (criteria: BMD decreased more than 20% at 4th week after operation). The rats in TEF group were administrated total flavone of epimedium (concentration 30 mg/ml, 10 ml/kg, qd) orally for 4 weeks. After this, killed rats to harvest the lower part of the femur and detected BMD again. Applying the reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique (RT-PCR) to detect expression of OPG, OPGL mRNA in bone tissue. **Results:** ①At 4th week after ovariectomy, the mean BMD of lumbar vertebra in TFE group fell to (0.084 ± 0.020) g/cm². Administrated with TFE for 4 weeks, the BMD increased to (0.112 ± 0.009) g/cm². There was significant improvement compare with the OVX group (P<0.05). ②Compared between OVX group and TFE group, The OPG mRNA expression of TFE group obviously enhanced. There was significant difference in statistics (P<0.05). However, the promotion for OPGL mRNA expression were detected between OVX group and TFE group, there was no significant difference in statistics (P>0.05). **Conclusion:** This study showed that TFE could inhibit differentiation and maturation of osteoclast through enhancing OPG mRNA expression, accordingly, to treat osteoporosis.

Key word Epimedium; Osteoporosis; Osteoprotegerin; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(4): 271-273 www.zggszz.com

基金项目:广东省中医药局基金资助(编号:1040059)

通讯作者: 陈柏龄 E-mail:berlinch2007@yahoo.com.cn

骨质疏松症的严重危害早已成为共识,二磷酸盐、降钙素及雌激素等治疗骨质疏松药物在临床上已广泛应用且效果确

实,但其昂贵的价格和可能引起的刺激性食道炎(二磷酸盐)、抗原反应(降钙素)、生殖腺肿瘤(雌激素)等并发症使众多患者望而生畏。故近来许多学者热衷于对中医中药的研究和开发。国内已对传统补肾中药——淫羊藿作了较多的研究^[1-2],发现该药能促进骨髓细胞 DNA 及骨组织蛋白质合成,利于成骨细胞生长,并且对破骨细胞有直接的抑制作用,因而能够对抗动物去卵巢后及长期大剂量服用糖皮质激素所引起的骨质疏松症。本实验直接从骨组织中提取 RNA,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测淫羊藿对去卵巢(ovariectomy, OVX)大鼠骨组织护骨素(osteoprotegerin, OPG)、护骨素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL) mRNA 表达的影响,探讨其治疗骨质疏松症的分子生物学机制。

1 材料与方

1.1 主要仪器与试剂 DEXA 骨密度(BMD)仪,美国 LUNAR 公司。紫外分光光度计,日本岛津公司。激光密度扫描仪,瑞典 LKB 公司。RT-PCR 逆转录试剂盒,Promega 公司。

1.2 淫羊藿总黄酮(TFE, total flavone of epemedium)的提取 淫羊藿生药材由贵州仙灵药业公司提供。将生药材通过水浸泡后煎煮、滤液浓缩、石油醚及乙酸乙酯萃取、真空干燥,得到 TFE 提取物(广州中医药大学中医药实验室)。然后以淫羊藿甙(icariin, 批号:0737-9508,中国药品生物制品检定所)作标准品检测所得提取物中 TFE 含量并配成溶液(浓度 30 mg/ml)。

1.3 动物分组与模型建立 将 60 只 4 月龄健康雌性 SD 大鼠按随机数字表分为 3 组:对照组(A 组,20 只),去卵巢组(OVX 组,20 只),淫羊藿组(TFE 组,20 只)。其中 OVX、TFE 组大鼠采用背部脊柱旁切口行双侧卵巢切除术^[3],A 组行假手术作为对照。所有大鼠术前均以 DEXA 骨密度仪测定第 4 腰椎 BMD,4 周后再次测定相同部位的 BMD,若均值下降 20%(除 A 组外),则说明骨质疏松模型已建立。

1.4 处理因素 骨质疏松模型建立后,各组动物分别给予以下灌胃处理,A 组、OVX 组均给予自来水 10 ml/kg·d;TFE 组:TFE 溶液(浓度 30 mg/ml) 10 ml/kg·d。共 4 周。

1.5 骨组织的取材及保存 各组予不同处理因素 4 周后采用过量麻醉法处死。无菌条件下迅速完整取出双侧股骨,剥离、去除肌肉和软组织,刮除骨膜,置-70℃低温冰箱保存。

1.6 骨组织 RNA 的提取 实验前提取 RNA 的实验器材(中山大学分子实验室)按要求^[4]严格处理防止 RNA 酶污染骨组织。配制 GITC 变性液(4 mol/L 异硫氰酸胍,0.125 mol/Lβ 巯基乙醇,0.5%十二烷基肌氨酸钠,26 mmol/L 柠檬酸钠)。在-70℃低温冰箱内取股骨中下 1/3 段骨组织,用 GITC 变性液包埋,冷冻变硬后,于-25℃用冰冻切片机将骨组织切为厚约 20 μm 的切片,匀浆器将切片匀浆并收集匀浆,按异硫氰酸胍-酚-氯仿-异戊醇一步法提取 RNA。用紫外分光光度计于

230、260、280 nm 处测定 RNA 样品吸光度(A)值;A260/A280 比值在 1.170~2.100 之间,A260/A230 比值约为 2.100,说明 RNA 纯度较高。

1.7 RNA 完整性检测 取 RNA 样品行 1%甲醛变性胶电泳,在紫外灯下观察结果并拍照,激光密度扫描仪扫描 28 s 和 18 s 条带,计算密度比值,依比值评估 RNA 完整性(密度比值约为 2.0:1,提示 RNA 完整)。

1.8 观察项目及方法

1.8.1 腰椎 BMD 测定 用 DEXA 骨密度仪测定各组大鼠手术前后及灌胃处理后的腰椎 BMD 变化。淫羊藿给药前后骨密度对比证实抗骨质疏松效果。

1.8.2 RT-PCR 检测骨组织 OPG、OPGL mRNA 的表达 取 2 μg 总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,再取 1 μl cDNA 行 PCR 扩增 OPG、OPGL 基因,以 β-actin 基因为内对照,引物序列及扩增条件见表 1。PCR 扩增产物于 15%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,拍照,用 Imagemaster VDS 成像分析系统检测条带吸光度(V 值=平均吸光度值×条带面积)以及 OPG、OPGL 表达强度 Rv 值:OPG Rv=VOPG/Vβ-actin,OPGL Rv=VOPGL/Vβ-actin。以评估骨组织 OPG、OPGL mRNA 的表达。

1.9 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),两两比较采用 Student Newman Keuls 检验,组内给药前后 BMD 比较采用配对 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术及药物处理前后腰椎 BMD 的变化 见表 2,手术 4 周后 OVX、TFE 组大鼠腰椎 BMD 均值分别为 (0.086±0.019) g/cm² 和(0.084±0.020) g/cm²,下降超过 20%证明骨质疏松模型已建立。TFE 组大鼠给药 4 周后其腰椎 BMD 提高至(0.112±0.009) g/cm²,较本组手术后 4 周 BMD 明显提高,差异有统计学意义(t=2.734 45, P<0.05),说明淫羊藿可有效提高骨质疏松大鼠腰椎 BMD,提高骨质骨量。

2.2 淫羊藿总黄酮对成骨细胞 OPG、OPGL mRNA 表达的影响 淫羊藿总黄酮对 4 月龄大鼠成骨细胞 OPG、OPGL mRNA 表达水平的影响(见图 1-2),各组 OPGL mRNA 均有表达,组间无明显差异;各组间 OPG mRNA 均有表达,A 组表达最强,TFE 组其次,均强于 OVX 组。OPG、OPGL 基因表达 Rv 值见表 3。由表 3 可见,TFE 组有 OPG、OPGL mRNA 的表达,与 OVX 组比较,TFE 显著增强了 OPG mRNA 的表达,且差异有统计学意义(P<0.05),但对 OPGL mRNA 表达无统计学差异。

3 讨论

3.1 OPG 及其配体与骨质疏松症的发病机制 骨质疏松症是以骨量减少,骨小梁变细、断裂、数量减少,骨皮质多孔、变薄为特征,以致骨的脆性增高及骨折危险性增加的一种全身

表 1 各基因引物序列及扩增条件
Tab.1 Gene primer sequence and condition for amplification

基因产物长(bp)	引物序列(5'3')	退火温度(℃)	Mg-2 浓度(nmol/L)	循环次数(次)
OPG 30	正向:AACCCAGAGCGAAATAC 反向:AAGAATGCCTCCTCACAC	57	1.5	219
OPGL 38	正向:GCCAGTGGGAGATGTTG 反向:TTAGCTGCAAGTTTTCCC	58	1.6	468
β-actin 30	正向:CCTCGCCTTTGCCGATCC 反向:GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC	57	1.5	620

表 2 手术前后及药物处理后腰椎 BMD 值 ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

Tab.2 The BMD values of lumbar vertebra before and after surgery and drugs ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

组别	鼠数	术前	术后	给药后
A 组	20	0.122±0.013	0.120±0.015	0.118±0.011
OVX 组	20	0.121±0.015	0.086±0.019	0.084±0.017
TFE 组	20	0.120±0.016*	0.084±0.020***	0.112±0.009***#▲

注:与 OVX 组相比, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.05$;与 A 组比较, # $P < 0.05$, # $P < 0.05$;与术后比较, ▲ $P < 0.05$

Note: Compared with the OVX group, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.05$; compared with A group, # $P < 0.05$, # $P < 0.05$; compared with the postoperative, ▲ $P < 0.05$

表 3 OPG、OPGL 基因表达 Rv 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 The Rv value of OPG、OPGL gene ($\bar{x} \pm s$)

组别	OPG	OPGL
OVX 组	5.349 ± 0.531	2.552 ± 0.251
TFE 组	8.183 ± 0.294*	2.354 ± 0.259**

注:与 OVX 组相比较, * $P < 0.05$, ** $P > 0.05$

Note: Compared with the OVX group, * $P < 0.05$, ** $P > 0.05$

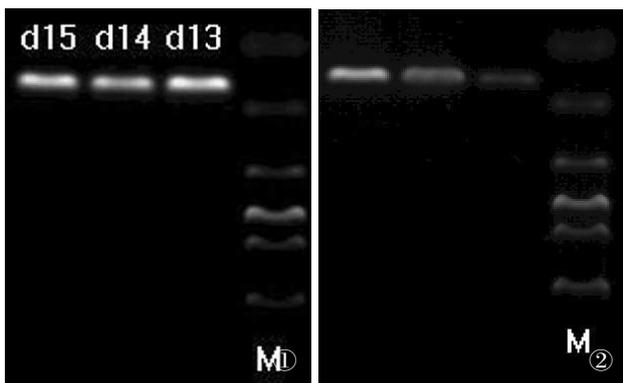


图 1 OPGL mRNA 扩增后凝胶电泳,溴化乙锭染色(由左至右排列: A 组,TFE 组,OVX 组, β -actin 内参) 图 2 OPG mRNA 扩增后琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色(由左至右排列: A 组,TFE 组,OVX 组, β -actin 内参)

Fig.1 After OPGL mRNA amplification, do agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining showed OPGL mRNA expression in each group (from left to right: A group, TFE group, OVX group, β -actin reference) Fig.2 After OPG mRNA amplification, do agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining showed OPG mRNA expressed in each group (from left to right: A group, TFE group, OVX group, β -actin reference)

性疾病,与骨吸收和骨形成的动态平衡被破坏,骨吸收大于骨形成有关。但其确切的细胞分子生物学机制尚不清楚。而近年来发现的两种蛋白质——OPG 及其配体(OPGL)被认为是揭开骨质疏松症发病机制的突破口。当前研究表明^[5-8],OPG 作为一种诱饵受体,属肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员,其本身无传导信号的作用,但在与其配体 OPGL 结合后,可阻

止核因子 kB 受体激活物 (receptor activator of nuclear factor-kB, RANKL) 与 OPGL 的结合,使 RANKL 活化受阻,不能发挥其破骨作用。OPG、OPGL 与 RANKL 三者共同组成一个直接影响破骨细胞分化和功能,调节骨重建的枢轴旁分泌系统。基于上述,目前许多研究^[6,8]着重探究各种药物对该系统的调节机制,进而探索药物的分子机制。

3.2 淫羊藿治疗骨质疏松症的分子机制 本实验应用 RT-PCR 技术探究淫羊藿对 OVX 大鼠骨组织 OPG 及其配体(OPGL) mRNA 表达的影响,进而探查其分子机制,目的是为补肾中药的现代化和二次开发提供实验依据。淫羊藿为国内传统补肾中药,有“益精气、坚筋骨、补腰膝、强心力”等作用。近来对淫羊藿已作了较多的研究^[1-2],发现该药具有雄激素样作用,能促进骨髓细胞 DNA 合成,促进骨组织蛋白质合成及促进成骨细胞生长等作用,并且还对破骨细胞有直接的抑制作用,因而能够对抗动物去卵巢、去睾丸及长期大剂量服用肾上腺皮质激素所引起的骨质疏松症。本实验结果说明 TFE 组与 OVX 组比较,TFE 增强了 OPG mRNA 的表达,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而对 OPGL mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

综上所述,本实验在分子水平观察了淫羊藿总黄酮对去卵巢成骨细胞代谢调控的影响,发现其主要是通过增加 OPG mRNA 的表达来抑制破骨细胞的分化和成熟,从而达到其抑制骨吸收,治疗骨质疏松症的目的。

参考文献

- [1] 马慧萍,贾正平,白孟海,等.淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响.中国药理学通报,2003,19 (2):187-190.
- [2] 李勇,季晖,李萍,等.淫羊藿总黄酮对体外培养成骨细胞的影响.中国药科大学学报,2002,33(1):48-51.
- [3] 陈柏龄,廖威明,李佛保,等.轻度承重活动对去卵巢大鼠骨密度组织计量和生物力学的影响.中山医科大学学报,2001,22 (3):187-191.
- [4] 赵亚力,马学斌,韩为东.分子生物学基本实验技术.北京:清华大学出版社,2006.49-50.
- [5] Loser K, Mehling A, Loeser S, et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. Nat Med, 2006, 12(12):1372-1379.
- [6] Mueller RJ, Richards RG. Immunohistological identification of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human, ovine and bovine bone tissues. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15(4):367-372.
- [7] Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor-kB ligand and MAPK. Biochim Biophys Acta, 2004, 1644 (1):1-7.
- [8] Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, et al. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities. Exp Cell Res, 2004, 293(2):292-301.

(收稿日期:2008-12-10 本文编辑:王宏)