

· 基础研究 ·

中药干预模拟失重大鼠股骨 I 型胶原表达的研究

胡素敏¹, 周鹏^{1,2}, 傅骞¹, 杨佳佳¹, 高学敏¹

(1.北京中医药大学基础医学院,北京 100029;2.天津中医药大学中药学院)

【摘要】 目的:研究 3 周模拟失重大鼠股骨 I 型胶原表达的影响和中药复方的干预作用。方法:雄性 Wistar 大鼠,30 只,随机分为空白组、悬尾模型组和悬尾中药组;后两组不悬吊适应 1 周,悬尾吊 3 周模拟失重,中药组予中药复方(含熟地黄、怀牛膝、黄芪、当归、牡蛎醋酸水解物等)水煎剂灌胃。实验结束取左股骨,免疫组化法观察股骨颈骨组织中 I 型胶原表达。结果:经过 3 周尾吊模拟失重,与空白组比较,模型组股骨 I 型胶原阳性计数和 IOD 值均出现显著下降($P<0.001$);中药组股骨 I 型胶原阳性计数和 IOD 值较空白组变化不显著($P>0.05$),较模型组则有显著增加($P<0.001$)。结论:3 周模拟失重可造成模型动物股骨 I 型胶原蛋白合成严重障碍,受试中药复方对此有显著的改善作用。

【关键词】 中草药; 失重模拟; 胶原 I 型; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2010.02.013

Effect of a Chinese herbal prescription on collagen I in rat's femur under simulated weightlessness HU Su-min*, ZHOU Peng, FU Qian, YANG Jia-jia, GAO Xue-min. *School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of a Chinese herbal prescription on collagen I in rat's femur under simulated weightlessness. **Methods:** Thirty Wistar rats were randomly divided into 3 groups: blank control group (10 rats), tail suspension group (TS, 10 rats), TS with Chinese medicine group (10 rats). Rats in TS with Chinese medicine group took a Chinese herbal prescription (contains Radix Rehmanniae Praeparata, Radix Achyranthis Bidentatae, Radix Astragali, Radix Angelicae Sinesis, Concha Ostreae prepared by acetic acid) by oral administration. After 1 week adaption and 3 weeks tail suspending, rat's left femur was collected, and collagen I in femur neck was detected by immunohistochemical method. **Results:** Counts and integral optical density (IOD) of collagen I coloration decreased significantly in TS group ($P<0.001$), but no significant change in TS with Chinese medicine group ($P>0.05$), as compared with control group. **Conclusion:** Generation of collagen I become weaken under simulated weightlessness, while the Chinese herbal prescription is effective to prevent the change, thus biochemistry environment of bone calcium deposition may be improved by this Chinese herbal prescription under simulated weightlessness.

Key words Drugs, Chinese Herbal; Weightlessness simulation; Collagen type I; Rats

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(2): 117-119 www.zggszz.com

近半个世纪的航天实践表明,失重可造成骨质进行性丢失,并由此引发一系列严重后果,成为影响航天员健康的重要问题^[1-2]。本课题运用中医药理论对失重骨质丢失进行辨证分析,探索了较全面针对失重生理紊乱的中药复方,并在前期实验中初步验证了其模拟失重骨量丢失的干预作用^[3-4]。本实验从骨矿化的结构环境着手,进一步研究了受试药对承重骨胶原的影响,拟探讨受试中药复方发挥作用

的部分机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 健康 Wistar 雄性大鼠,清洁级,初始体重 180~200 g,合格证号:SCXK(京)200-0003,北京维通利华实验动物中心提供。

1.1.2 受试药物 由熟地黄、怀牛膝、黄芪、当归、牡蛎等按照一定比例组成,全部药材购自安国药材市场,经北京中医药大学基础医学院临床中药室鉴定。其中牡蛎以醋酸水解,全方按严格中药提取工艺制成等 0.704 g 生药/ml 的供试药液(合临床成人日用量的 8 倍)。

1.1.3 空白对照 去离子水。

通讯作者:胡素敏 Tel:010-64287006 E-mail:cinndyhu@yahoo.com.cn 地址:北京中医药大学 68 信箱)

基金项目:1.国家自然科学基金(30500663);2.2006 年教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0124);3.2006 年北京市科技新星(A)类计划(2006A49)

1.1.4 主要试剂 乙醇 AR,10%水合氯醛, I 型胶原单克隆抗体 (小鼠抗大鼠, abcam 公司产品), SP9002 抗小鼠试剂盒(博士德公司产品)。

1.1.5 主要仪器 QPJ-1C 生理病理切片机 (天津天利航空机电有限公司), KPJ-1A 烤片机(天津天利航空机电有限公司), OLYMPUS B×51 光学显微镜 (OLYMPUS 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 造模 采用尾吊法模拟失重时承重骨去负荷及体液头向转移的生理效应。大鼠尾部无水乙醇脱脂,吹干。以医用胶布从尾根部沿一侧面向远端纵向粘贴约 5 cm,绕至另一侧面反向粘贴至尾根,间隔横向加固,使胶布在鼠尾远端形成半环,勾挂于悬吊笼横梁所连的铰链上。调整高度使鼠前肢承重,后肢悬空去负荷,鼠体与水平面成 30°角;大鼠可 360°活动,自由觅食饮水。

1.2.2 分组与给药 正常大鼠 30 只,按体重随机分为 3 组,每组 10 只;悬吊笼单笼饲养。①空白组:不悬吊,大鼠自由活动。每日以去离子水 1 ml/100 g 体重灌胃。②模型组:不悬吊适应 1 周,尾吊 3 周模拟失重。每日以去离子水 1 ml/100 g 体重灌胃。③中药组:不悬吊适应 1 周,尾吊 3 周模拟失重。每日以受试药 1 ml/100 g 体重灌胃。

1.2.3 取材及免疫组化方法 给药结束,动物经 10%水合氯醛 350 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,剥取左股骨,剔净周围软组织,4%多聚甲醛中固定 24 h。固定结束,流水冲洗,换甲酸-盐酸脱钙液,密切观察脱钙进度。脱钙完成,流水冲洗过夜,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制备 5 μm 切片。切片经二甲苯脱蜡,乙醇梯度处理,水化后继续按以下步骤进行。①3% H_2O_2 封闭,室温 10 min,以消除内源性

过氧化物酶的活性;②蒸馏水洗 2 min×3 次,PBS (pH7.4,下同) 5 min×3 次;③酶消化,37 °C 10 min;④PBS 洗,5 min×3 次;⑤后修复,37 °C 10 min;⑥PBS 洗,5 min×3 次;⑦血清封闭,37 °C 15 min;⑧滴加一抗(1:50),37 °C 2 h;⑨PBS 洗,5 min×3 次;⑩滴加二抗工作液,37 °C,15 min;⑪PBS 洗,5 min×3 次;⑫滴加三抗,37 °C,15 min;⑬PBS 洗,5 min×3 次;⑭DAB 显色,室温,避光 10 min。充分漂洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,甘油明胶封片。阴性对照:分别以正常羊血清和 PBS 代替一抗孵育,其他步骤相同。在对照实验中未发现阳性物出现,即无特异性反应。

1.3 观察指标与方法 测定股骨 I 型胶原含量。光镜下观察,免疫组化切片中呈棕色为阳性信号。10×20 倍光镜下,每张切片选取 6 个不重叠视野,以 DP70 图像分析系统进行分析,避开骨髓所在部位,取 6 个 80 181.66 μm² 面积。软件自动分析该面积骨组织内的阳性信号数和积分光密度,取平均值,表示每张切片骨组织中 I 型胶原蛋白水平的相对含量。

1.4 数据处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS8.2 统计软件作组间单因素方差分析及两均数间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

图 1 中分别是空白组、模型组、中药组大鼠股骨颈 I 型胶原免疫组化阳性显色。从图 1 可见各组骨组织中骨细胞和髓细胞均显示不同程度的阳性染色,棕色点即是 I 型胶原阳性显色,见图中箭头所指。从图 1 可见,空白组骨组织中阳性信号计数多,骨细胞阳性显色深;模型组骨组织中阳性计数少,骨细胞阳性显色浅;中药组骨组织中阳性信号较多,骨细胞阳性显色较深。

各组动物股骨组织中 I 型胶原阳性信号数和积

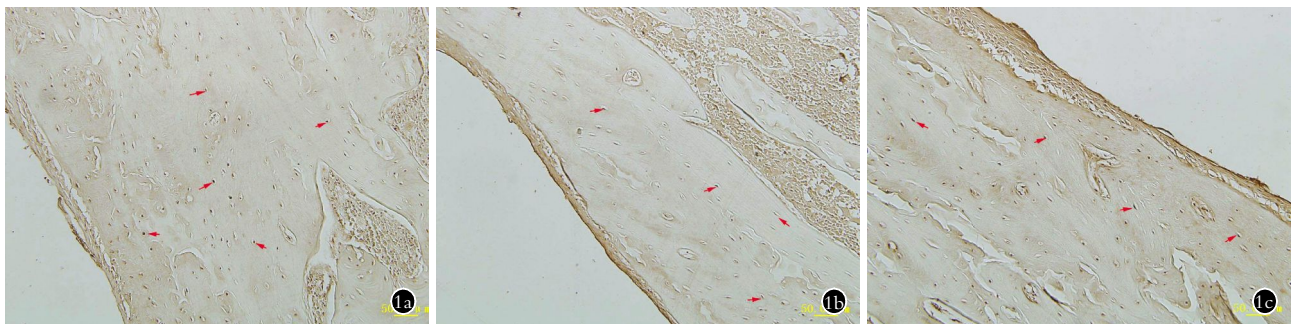


图 1 免疫组化法比较各组动物股骨颈 I 型胶原阳性表达(10×20 倍光镜,显色棕色为阳性信号) **1a.**空白组 骨组织中阳性信号计数多,骨细胞阳性显色深 **1b.**模型组 骨组织中阳性计数少,骨细胞阳性显色浅 **1c.**中药组 骨组织中阳性信号较多,骨细胞阳性显色较深

Fig.1 Comparison of Collagen I expression in rat's femur neck of different groups **1a.**Control group;there were many positive signals in bone tissue and the positive coloration was deep brown in osteocytes **1b.**TS group;as compared with control group,there were less positive signals in bone tissue and the positive coloration was deep brown in osteocytes **1c.**TS and Chinese medicine group;as compared with TS group,there were more positive signals in bone tissue and the positive coloration was relatively deep brown in osteocytes

分光密度值见表 1。经过 3 周尾吊模拟失重,与空白组比较,模型组股骨 I 型胶原阳性计数和 IOD 值均出现显著下降($P < 0.001$);中药组股骨 I 型胶原阳性计数和 IOD 值较空白组变化不显著($P > 0.05$),较模型组则有显著增加($P < 0.001$)。

表 1 各组动物股骨颈 I 型胶原表达情况

Tab.1 Expression of Collagen I in rat's femur neck of different groups

组别	动物数	阳性信号数	IOD
空白组	10	32.56±10.23 [#]	175.70±40.40 [#]
模型组	10	12.19±4.59 [*]	35.84±22.75 [*]
中药组	10	33.37±8.28 [#]	141.62±56.79 [#]

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.001$;与模型组比较,[#] $P < 0.001$

Note: Compared with control group, ^{*} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.001$

3 讨论

I 型胶原占骨基质蛋白的 80%~90%,是骨有机质的主要成分,构成了骨钙盐的主要生化环境和骨钙化的基本结构场所。羟基磷灰石与骨胶原结合是形成骨质的基本要素。骨的 I 型胶原之间相互交联,形成骨基质框架,骨胶原纤维空隙区域间距离约为 0.5 nm,这与羟基磷灰石钙离子间的距离是一致的。骨钙盐呈细针状结晶,长 20~40 nm,宽 2~3 nm,沉积于胶原纤维中,结晶连接成链,沿纤维长轴平行排列。研究发现在胶原纤维的洞带之间,有大量的钙颗粒的沉积,其沉积的原理和纤维的独特结构有关^[5]。骨胶原的质量、数量与钙化密切相关,一定量无机盐成分只能沉积于一定量的有机成分中^[6]。骨组织不断进行着旧骨吸收及新骨形成的骨转换过程,伴随骨钙盐的溶出和沉积代谢,I 型胶原相应进行合成与分解代谢,临床上通过其代谢产物尿胶原吡啶交联(Pyr)、脱氧吡啶交联(D-Pyr)、I 型原胶原羧基端及氨基端前肽(PICP 及 PINP)、I 型胶原交联羧基端肽(ICTP)、I 型胶原交联氨基端肽(NTX)等可反映出骨转换率^[7-11]。

在航天飞行中人体实验发现,伴随尿钙的增加,尿中 NTX、pyr、D-pyr 含量也出现显著上升^[12],表明失重时骨钙溶出相对增加,同时胶原分解相对亢盛。搭载于飞船上的正常培养鸡胚颅骨成骨细胞,其胶原的 mRNA 和蛋白表达均下降^[13]。在地面上利用回转器对 ROS17/2.8 细胞进行模拟失重实验,72 h 内观察到细胞中 I 型胶原的基因和蛋白表达下降^[14]。

本课题通过挖掘中医药理论^[15],对失重时骨及全身变化进行整体分析,确立了符合中医理论的中药复方。前期实验已观察到受试药对于提高骨密度和骨力学强度,改善尾吊大鼠整体状况有积极作用。

实验采用免疫组化法研究了尾吊模拟失重下大鼠股骨 I 型胶原含量及受试药干预作用。结果表明 3 周模拟失重可造成模型动物股骨 I 型胶原蛋白含量显著下降,胶原合成严重障碍,而受试药对此有显著的改善作用。参考受试药干预下股骨骨矿含量增加等结果^[16],分析受试药可通过增强 I 型胶原合成,改善钙化环境,增强骨钙沉积,起到部分调节骨钙代谢的作用。

参考文献

- [1] 李轶,徐冰心,岳茂兴.航天员因失重致废用性骨质疏松的机制及对策.中国康复医学杂志,2005,20(2):150-152.
- [2] White RJ, Averner M. Humans in space. Nature, 2001, 409: 1115-1118.
- [3] 周鹏,胡素敏,佟海英,等.中药对模拟失重大鼠骨骼-肌肉系统干预的初步研究.中国中医药信息杂志,2008,15(5):23-25.
- [4] 佟海英,胡素敏,周鹏,等.中药复方对模拟失重大鼠骨代谢的影响.中国中药杂志,2008,33(7):797-801.
- [5] Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, et al. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. J Cell Biol, 1988, 106(3): 979-989.
- [6] 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998.
- [7] Charles P, Mosekilde L, Risteli L, et al. Assessment of bone remodeling using biochemical indicators of type I collagen synthesis and degradation: relation to calcium kinetics. Bone Miner, 1994, 24(2): 81-94.
- [8] Fledelius C, Riis BJ, Overgaard K, et al. The diagnostic validity of urinary free pyridinolines to identify women at risk of osteoporosis. Calcif Tissue Int, 1994, 54(5): 381-384.
- [9] Gertz BJ, Shao P, Hanson DA, et al. Monitoring bone resorption in early postmenopausal women by an immunoassay for cross-linked collagen peptides in urine. J Bone Miner Res, 1994, 9(2): 135-142.
- [10] Hoshino H, Takahashi M, Kushidea K, et al. Urinary excretion of type I collagen degradation products in healthy women and osteoporotic patients with vertebral and hip fractures. Calcif Tissue Int, 1998, 62(1): 36-39.
- [11] Cosman F, Nieves J, Wilkinson C, et al. Bone density change and biochemical indices of skeletal turnover. Calcif Tissu Int, 1996, 58(4): 236-243.
- [12] Smith SM, Wastney ME, O'Brien KO, et al. Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 208-218.
- [13] Landis WJ, Hodgins KJ, Block D, et al. Spaceflight effects on cultured embryonic chick bone cells. J Bone Miner Res, 2000, 15(6): 1099-1112.
- [14] 王冰,张舒,吴兴裕.模拟失重对大鼠骨肉瘤细胞内 I 型胶原表达的影响.中华航空航天医学杂志,2003,14(1):5-7.
- [15] 周鹏,胡素敏,高学敏,等.失重骨质丢失的中医病机探讨.中华中医药学刊,2008,26(5):967-969.
- [16] 周鹏,胡素敏,佟海英,等.中药复方干预 3 周模拟失重大鼠骨丢失的初步研究.中国骨伤,2008,21(9):658-661.

(收稿日期:2008-10-13 本文编辑:李为农)