

· 基础研究 ·

金刚健骨片调节整合素 β_1 和 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平的实验研究

杨少锋¹, 李玲慧², 陈青¹, 姚共和¹, 邓博¹, 向剑锋¹, 聂颖¹, 罗振华¹, 郭彦涛¹

(1. 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南 长沙 410007; 2. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203)

【摘要】 目的: 通过对去势大鼠整合素表达水平的观察, 揭示金刚健骨片治疗骨质疏松症的作用机制。方法: 将 50 只 10 月龄 Wistar 雌性大鼠随机分为 5 组: 福善美组(FSM)、金刚健骨片组(JGJG)、骨松宝颗粒组(GSB)、模型组(OVX)、假手术组(SHAM)。治疗组及模型组行卵巢摘除术, 假手术组切除相同重量的肠系膜。统一饲养 13 周造模成功后, 治疗组分别以相应药物连续给药 13 周, JGJG 组每只大鼠每天给药 0.13 g, GSB 组每只每天给药 0.86 g, FSM 组每只每天给药 0.28 mg, 模型组及假手术组以生理盐水替代。治疗结束后处死动物取出骨组织, 进行骨密度测定, 并利用免疫组化法测定整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 β_1 表达水平。结果: 骨密度测定结果显示, 治疗组的股骨密度、整合素 β_1 均较 OVX 组有明显提高; 治疗组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 明显低于 OVX 组。结论: 金刚健骨片能显著提高去势大鼠的股骨密度、整合素 β_1 的表达水平, 并可降低整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的阳性表达率, 从而干预成骨-破骨细胞偶联, 达到治疗目的。

【关键词】 骨质疏松; 整合素类; 卵巢切除术; 骨密度

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.02.014

Effect of *Jingang Jiangu* pill (金刚健片) on expression of integrin β_1 and $\alpha_v\beta_3$ in ovariectomized osteoporosis model rats YANG Shao-feng, LI Ling-hui, CHEN Qing, YAO Gong-he*, DENG Bo, XIANG Jian-feng, NIE Ying, LUO Zhen-hua, and GUO Yan-tao. *The First Hospital Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory effect of *Jingang Jiangu* pill (金刚健片, JGJG) on expression of integrin in ovariectomized rats. **Methods:** Fifty ovariectomized 10 months old female rats were randomly divided into 5 groups: Fushanmei group (FSM), *Jingang Jiangu* pill (金刚健片) group (JGJG), *Gusongbao* granule group (GSB), Model group (OVX), Sham group. After ovariectomized, the rats were raised in the same environment for 13 weeks. The rats in JGJG group took 0.13 g JGJG pill orally each day for each rat; the rats in GSB group took 0.86 g GSB granule orally each day for each rat; the rats in FSM group took 0.28 mg FSM orally each day for each rat; and the rats in OVX and sham groups took sodium. The treatment duration of rats in above 5 groups was 13 weeks. Bone mineral density (BMD) and the expression of integrin β_1 and $\alpha_v\beta_3$ were detected in each group after the treatment. **Results:** The BMD and the expression of integrin β_1 in FSM group, JGJG group and GSB group improved obviously than that of OVX group. There were statistical difference between these groups ($P < 0.05$). The expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ of the three treating groups significantly depressed. **Conclusion:** The JGJG pill improves BMD and express of integrin β_1 in ovariectomized rats and reduces express of integrin $\alpha_v\beta_3$ through the regulation of the coupling of osteoblasts and osteoclasts.

KEYWORDS Osteoporosis; Integrins; Ovariectomy; Bone density

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(2): 138-141 www.zggszz.com

近年来研究发现成骨细胞、破骨细胞表面均有整合素的表达, 且与骨形成及骨吸收的调控有关, 整合素与骨质疏松症的关系已成为目前的研究热点^[1]。本实验选取成骨、破骨细胞各自的代表受体 β_1 、 $\alpha_v\beta_3$ 进行观察^[2]。“肾虚髓亏”是绝经后骨质疏松

发病的中医病理本质, 补肾法是中医药治疗骨质疏松症的核心治法。故本研究选用了补肾法的代表方金刚健骨片, 该方为我院的经验方, 临床疗效满意。在此基础上进行实验研究, 并从成骨-破骨细胞偶联及整合素表达水平的角度出发, 力求从更深层次揭示金刚健骨片治疗骨质疏松的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 10 月龄清洁级 Wistar 雌性大鼠, 体质量(350±20) g, 共 50 只, 由湖南中医药大学实

基金项目: 国家教育部新教师基金项目资助 (编号: 20094323120005)
Fund programs; Supported by Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No.20094323120005)
通讯作者: 姚共和 E-mail: proygh@163.com

验动物中心提供。

1.2 实验药物及试剂 金刚健骨片：由补骨脂、熟地黄、川牛膝、鹿角胶、菟丝子、肉苁蓉、杜仲、粉萆、山药等 9 味中药组成，湖南中医药大学第一附属医院药剂科生产成片剂，(院)卫生剂 08-043 号，每片 0.3 g，成人剂量每次 1.5 g，每日 3 次。骨松宝颗粒：主要由淫羊藿、生地黄、牡蛎等 9 味中药制成，贵州富华药业有限责任公司生产，黔卫药准字(1996)第山西亚宝药业(集团)100079 号，成人剂量每次 10 g，每日 3 次。福善美：由默沙东中国有限公司生产，每片 10.0 mg，成人剂量为每次 1 片，每日 1 次。抗 Itgβ₁ 单克隆抗体(Pharmingen 公司产品)，链亲和素-AB 复合物(Sigma 公司产品)。

1.3 动物模型的建立 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉，常规手术消毒，俯卧位固定，约在肋下 1.5 cm、脊柱旁开 1 cm 处做长约 2 cm 的纵向切口，完整摘除双侧卵巢。彻底止血后，分 2 层依次缝合肌肉、皮肤。假手术组(SHAM)以同样切口切除左右两侧肠系膜各 1 段，其重量与卵巢重量相同。术后常规肌注青霉素，连续 3 d。所有动物在相同条件、环境下分笼饲养 13 周。

1.4 动物分组与治疗 采用完全随机法将去势大鼠分为 5 组：福善美组(FSM)、金刚健骨片组(JGJG)、骨松宝颗粒组(GSB)、模型组(OVX)和假手术组(SHAM)。从去势术后第 14 周起开始对 5 组大鼠分别以不同药物连续灌胃 13 周，模型组及假手术组的药物以生理盐水替代。根据《药理实验方法学》(第 3 版)进行人与动物剂量换算，灌胃剂量分别为：金刚健骨片(每只大鼠每日 0.13 g)；骨松宝颗粒(每只大鼠每日 0.86 g)；福善美(每只大鼠每日 0.28 mg)。所有大鼠每周测量体重 1 次，并按体重变化调整给药量。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 骨密度测定 将大鼠颈椎脱臼处死后，取下大鼠右侧股骨，剔净附着的软组织，用双能 X 线骨

密度测定仪(DXA)测定股骨的骨矿密度。测量时选用小动物模式进行扫描，设定速度为 60 mm/s，分辨率为 1.0 mm×1.0 mm。

1.5.2 整合素 α_vβ₃ 及 β₁ 测定 取 L₁ 椎体于 4%多聚甲醛中固定 12 h，脱钙脱水，石蜡包埋，切成 5 μm 厚薄片，于体积分数为 3%过氧化氢中浸泡 25 min，以阻断内源性过氧化物酶活性。自来水冲，蒸馏水洗；10 g/L 胰蛋白酶溶液(pH 7.2)抗原修复，37℃，10 min。蒸馏水洗，PBS 5 min 2 次；滴加生物素标记的抗 Itgα_vβ₃(或 Itgβ₁)单克隆抗体(Pharmingen 公司产品)，抗体稀释度 1:50，37℃孵箱 35 min，PBS 5 min 2 次；滴加链亲和素-AB 复合物(Sigma 公司产品)，稀释度 1:200，37℃，40 min，PBS 5 min 2 次；DAB 显色，适时终止；苏木素复染，加拿大胶封片。阴性对照片不加一抗，改加 1 mol/L PBS 缓冲液，其余操作步骤不变。

1.6 统计学处理 数据均采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析，所得数据定量资料均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较方差齐时用单因素方差分析，两两比较时用 *t* 检验，方差不齐时用秩和检验；计数资料采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度测定 假手术组骨密度为 (0.243±0.006)，3 个治疗组和模型组骨密度结果见表 1。3 个治疗组的骨密度均高于模型组，其中福善美组与金刚健骨片组骨密度均高于骨松宝颗粒组，而福善美组与金刚健骨片组骨密度差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.2 整合素表达 结果见图 1-2。将切片于高倍镜视野(×200)下观察并摄片，整合素 β₁ 的阳性表达信号为棕黄色团块，骨基质中的表达较弱，该受体在成骨细胞中的表达较为明显。观察结果显示：假手术组(图 1a)可见大量棕褐色团块，表达最为显著；金刚健骨片组(图 1b)可见棕黄色团块，但密度不及假手

表 1 不同治疗组及模型组去势大鼠骨密度和整合素比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of integrin levels of ovariectomized rats in different treatment groups($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数(个)	骨密度(g/cm ²)	平均光密度值	
			整合素 β ₁	整合素 α _v β ₃
福善美组	10	0.218±0.008**	0.027±0.003*□	0.012±0.004**
金刚健骨片组	10	0.214±0.009**	0.036±0.003**	0.016±0.004**
骨松宝颗粒组	10	0.206±0.006*	0.026±0.004*	0.029±0.006*
模型组	10	0.183±0.007	0.010±0.002	0.073±0.010
<i>F</i> 值	-	46.604	126.44	48.02
<i>P</i> 值	-	<0.05	<0.05	<0.05

注：与模型组比较，**P*<0.05；与骨松宝颗粒组比较，#*P*<0.05；与金刚健骨片组比较，□*P*<0.05

Note: Compared to OVX group, **P*<0.05; Compared to GSB group, #*P*<0.05; Compared to JGJG group, □*P*<0.05

术组;福善美组(图 1c)、骨松宝颗粒组(图 1d)可见少量淡黄色团块;模型组(图 1e)整体呈现蓝紫色改变。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的阳性表达的信号亦为棕黄色团块,假手术组(图 2a)基本呈现蓝紫色;金刚健骨片组(图 2b)、福善美组(图 2c)可见少量棕黄色团块;骨松宝颗粒组(图 2d)亦可见棕色表达,但密度不及模型组;模型组(图 2e)骨组织呈棕黄色。

运用图像分析软件 Image-Pro Plus 5.0 计算每个视野下阳性表达的平均光密度值。平均光密度值=阳性表达的积分光密度值/视野总面积(不计空白),假手术组整合素 β_1 平均光密度值为 0.088 ± 0.005 ,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 平均光密度值为 0.007 ± 0.003 ,3 个治疗组和模型组整合素 β_1 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 平均光密度值结果见表 1。由表 1 可见,3 个治疗组的整合素 β_1 水平

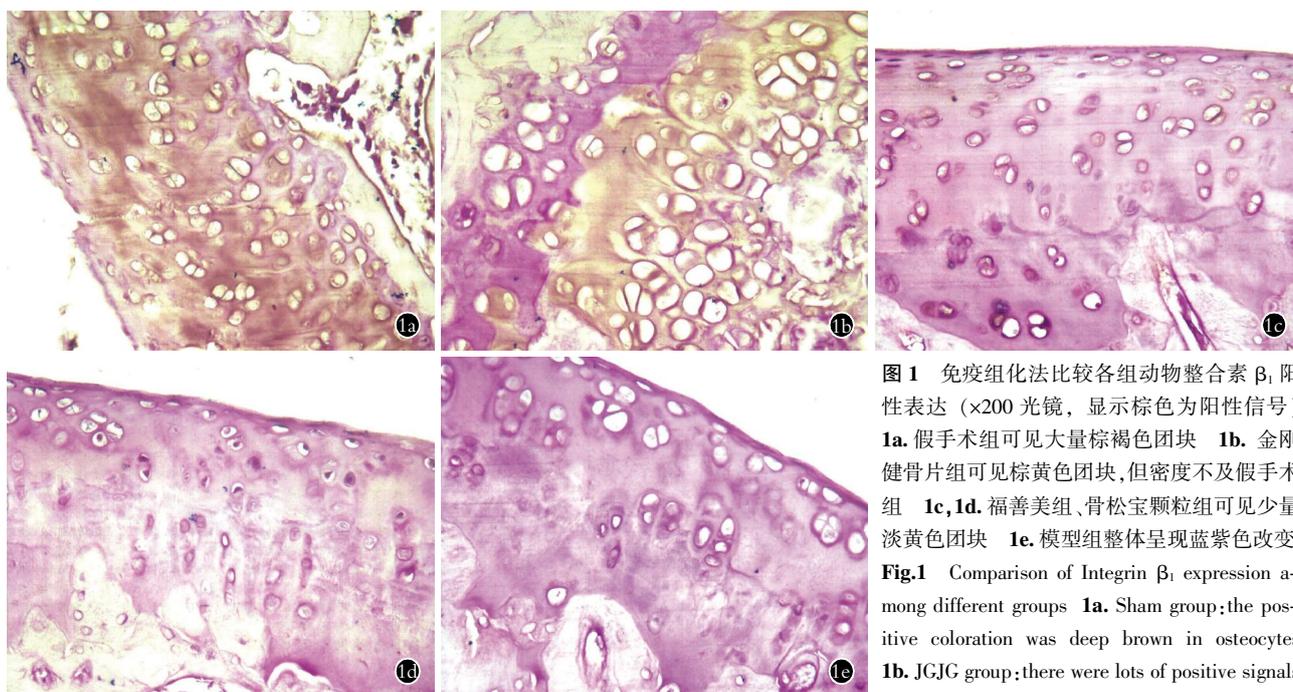


图 1 免疫组化法比较各组动物整合素 β_1 阳性表达 ($\times 200$ 光镜,显示棕色为阳性信号)
1a. 假手术组可见大量棕褐色团块 1b. 金刚健骨片组可见棕黄色团块,但密度不及假手术组 1c,1d. 福善美组、骨松宝颗粒组可见少量淡黄色团块 1e. 模型组整体呈现蓝紫色改变

Fig.1 Comparison of Integrin β_1 expression among different groups 1a. Sham group;the positive coloration was deep brown in osteocytes 1b. JGJG group;there were lots of positive signals in bone tissue and the positive coloration was relatively deep brown in bone tissue 1c,1d. FSM group and GSB group;there were less positive signals comparing with JGJG group 1e. OVX group;there were little positive signals

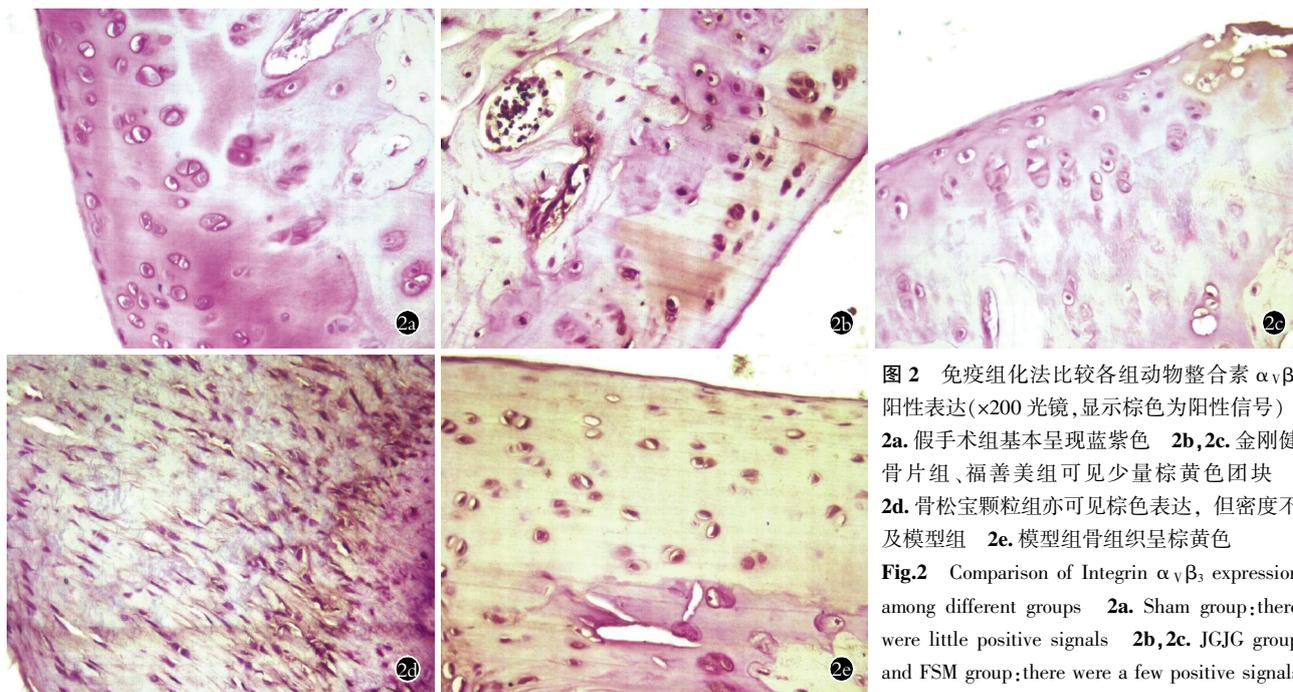


图 2 免疫组化法比较各组动物整合素 $\alpha_v\beta_3$ 阳性表达 ($\times 200$ 光镜,显示棕色为阳性信号)
2a. 假手术组基本呈现蓝紫色 2b,2c. 金刚健骨片组、福善美组可见少量棕黄色团块 2d. 骨松宝颗粒组亦可见棕色表达,但密度不及模型组 2e. 模型组骨组织呈棕黄色

Fig.2 Comparison of Integrin $\alpha_v\beta_3$ expression among different groups 2a. Sham group;there were little positive signals 2b,2c. JGJG group and FSM group;there were a few positive signals in bone tissue 2d. GSB group;there were lots of positive signals comparing with JGJG group 2e. OVX group;the positive coloration was deep brown in osteocytes

均高于模型组,其中金刚健骨片组高于福善美组及骨松宝颗粒组;福善美组及骨松宝颗粒组差异无统计学意义($P>0.05$)。3个治疗组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平低于模型组,其中福善美组及金刚健骨片组均低于骨松宝颗粒组,而两者差异无统计学意义,福善美组与假手术组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

骨质疏松症在祖国医学中属于“骨痿”范畴。补肾法是中医药治疗骨质疏松症的核心治法,补肾中药对于骨质疏松症治疗效果已被大量的实验研究和临床应用证实。

金刚健骨片用于老年或妇女绝经后骨质疏松症。方中熟地黄、鹿角胶为君药,有补肾生髓之功;研究表明熟地黄可促进体内钙沉积,提高患者骨密度^[3];鹿角胶可增加去势大鼠成骨细胞数,同时减少破骨细胞^[4]。补骨脂、肉苁蓉、杜仲、菟丝子为臣药,可补肾益精、强筋健骨;现在药理学研究证实^[5-6]补骨脂可促进骨形成,具有雌激素样作用;肉苁蓉可诱导 BMSCs 向成骨细胞分化;杜仲总黄酮可通过促进成骨细胞增殖而具抗骨质疏松作用。全方配以川牛膝、粉萆、山药祛风除痹,引药下行;于大永等^[7]研究发现牛膝可抑制骨吸收。

近年来普遍认为^[8]在骨重建过程中,成骨-破骨细胞的偶联是骨重建的核心。以往的研究由于条件的限制,无论是促性激素,成骨细胞、破骨细胞活性,还是调节钙、微量元素及相关细胞因子,都很少从根本上涉及到成骨-破骨细胞偶联的关键问题,而要研究成骨-破骨细胞偶联问题,就必须涉及到整合素这一关键受体。整合素是破骨细胞上的一类跨膜蛋白,可引导生长因子激活信号通路,刺激成骨细胞表达和分泌 OPG^[9],从而使 OPG 在破骨细胞分化环路中发挥重要的负调节作用。代表 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的玻璃黏连蛋白受体(VnR)在许多组织广泛表达,但仅在破骨细胞上特异性地高表达,表明 $\alpha_v\beta_3$ 整合素对破骨细胞的功能有重要影响^[10]。 β_1 是成骨细胞所表达的整合素的最主要的受体,促进成骨细胞分化、成熟^[11]。故本研究选取整合素 β_1 及 $\alpha_v\beta_3$ 分别作为成骨、破骨细胞的代表进行观察。

本研究结果显示:①金刚健骨片具有预防和治疗骨质疏松症的作用。②金刚健骨片能显著提高成骨细胞上的整合素 β_1 的表达水平。③金刚健骨片可降低破骨细胞上的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的阳性表达率。据此可以推测,金刚健骨片有可能是通过干预成骨-破骨细胞的偶联,从而完成骨重建而达到治疗目的。在今

后的研究工作中,将进一步探索补肾中药对整合素受体的调控途径,明确其对相关的细胞信号通路的调控作用及各靶向蛋白的变化规律。

参考文献

- [1] Shiraki M. Pathogenesis of fracture will be important in the research work of osteoporosis[J]. Nippon Rinsho, 2006, 64(9): 1597-1604.
- [2] Hsiao EC, Boudignon BM, Chang WC, et al. Osteoblast expression of an engineered Gs-coupled receptor dramatically increases bone mass[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(4): 1209-1214.
- [3] 欧莉, 曾小红, 赵鹏. 熟地、黄芪为主药治疗绝经后骨质疏松症的临床观察[J]. 北京中医药, 2011, 30(8): 605-606.
Ou L, Zeng XH, Zhao P. Clinical observation of Rehmannia and Astragalus in treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. Bei Jing Zhong Yi Yao, 2011, 30(8): 605-606. Chinese.
- [4] 蒙海燕, 曲晓波, 李娜, 等. 鹿茸及鹿角胶对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J]. 中药材, 2009, 32(2): 179-182.
Meng HY, Qu XB, Li N, et al. Effects of Pilose Antler and Antler Glue on osteoporosis of ovariectomized rats[J]. Zhong Yao Cai, 2009, 32(2): 179-182. Chinese.
- [5] Wong RW, Rabie AB. Effect of psoralen on bone formation[J]. J Orthop Res, 2011, 29(2): 158-164.
- [6] 曾建春, 樊粤光, 刘建仁, 等. 肉苁蓉含药血清诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. 中国骨伤, 2010, 23(8): 606-608.
Zeng JC, Fan YG, Liu JR, et al. Experimental study of directional differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) to osteoblasts guided by serum containing cistanche deserticola[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(8): 606-608. Chinese with abstract in English.
- [7] 于大永, 吕晓超, 史丽颖, 等. 牛膝中三萜皂苷抑制破骨细胞分化作用的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(3): 9-13.
Yu DY, Lü XC, Shi LY, et al. Inhibitory effect of triterpenoidal saponins from achyranthes bidentata Bl. on osteoclast differentiation [J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2011, 19(3): 9-13. Chinese.
- [8] Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, et al. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1126: 166-172.
- [9] Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(2): 348-360.
- [10] Faccio R, Grano M, Colucci S, et al. Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 14): 2919-2929.
- [11] Nakayama S, Okada Y, Saito K, et al. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(46): 45368-45374.

(收稿日期: 2012-06-25 本文编辑: 连智华)