

益骨汤对骨质疏松大鼠骨密度及 BMP-2 信号通路的影响*

李 威, 姚新苗[△], 李晓亚, 俞 斌, 董正超

(浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 研究益骨汤对骨质疏松大鼠 BMP-2 信号通路上 BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2)、Smads、Runx2(Runt-related transcription factor 2)、OSX(Osterix)、Noggin 基因转录及蛋白表达的影响,探究益骨汤防治骨质疏松症作用机制。方法 采用去除大鼠卵巢方法,建立骨质疏松症模型。分空白组、模型组、补佳乐组、益骨汤组、Noggin 反义寡核苷酸组。以实时定量 PCR 检测 BMP-2 通路基因转录,WesternBlot 法检测 BMP-2 通路蛋白表达。结果 ①模型组骨密度值明显低于空白组($P<0.01$),益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组骨密度值明显高于模型组($P<0.01$)。②益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组大鼠 BMP-2、Smads、Runx2、OSXmRNA 表达明显高于模型组($P<0.05$);而益骨汤组 Noggin 表达明显低于模型组($P<0.05$)。③益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组大鼠 BMP-2、Smads、Runx2、OSX 蛋白条带明显深于模型组,而益骨汤组 Noggin 蛋白条带明显浅于模型组。结论 益骨汤防治骨质疏松症机制与上调 BMP-2、Smads、Runx2、OSX 表达,同时抑制 Noggin 过度表达以及增加骨密度有关。推测 BMPs 抑制剂 Noggin 可能是新的抗骨质疏松靶点。

关键词: 益骨汤; 骨质疏松; BMP-2 信号通路; Noggin

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)06-0005-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.002

骨质疏松症已日渐成为全球性最棘手的公共卫生问题之一,严重威胁老年人的健康。据统计全球有 2 亿人受骨质疏松症困扰,其中 80%为绝经后妇女^[1]。文献报道^[2]近半数的 65 岁以上绝经后妇女一生中至少发生一次骨质疏松性骨折,目前我国骨质疏松症的患者已有约 8 400 万,预计到 21 世纪中叶会增至 2.2 亿,由骨质疏松造成的骨折将达 130~160 万之多^[3]。近年来运用补肾活血法治疗绝经后骨质疏松症突显优势,研究表明^[4]补肾活血法能改善骨质疏松大鼠的骨质量及骨强度,有效的防治骨质疏松症。姚新苗教授致力于骨质疏松症的中医治疗多年,创立的益骨汤取得了良好的临床疗效。本实验通过研究益骨汤对骨质疏松大鼠骨密度、BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 基因转录及蛋白表达的影响,目的在于揭示益骨汤防治骨质疏松症的作用机制,探寻抗骨质疏松新靶点。

1 材料

1.1 动物

清洁级 12 周龄 Wistar 雌性大鼠 65 只,体质量(220 ± 10)g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。大鼠以常规饲料喂养,自由饮水,屏障环境饲养。

1.2 主要仪器与试剂

DPX-L 型双能 X 线骨密度仪,购自美国 LUNAR 公司;定量 PCR 仪,购自安捷伦公司,型号:Agilent Stratagene Mx3005P;微型离心机,购自美国 AndyBio 公司,型号:AndyBio M-centrifuge;电泳仪和转膜仪,购自 Bio-RAD 公司,型号:Mini-PROTEAN;总蛋白提取试剂盒,购自南京凯基生物公司,型号:KGP250;总 RNA 提取试剂盒,购自杭州宝赛生物科技有限公司,型号:RE02050;反转录试剂盒,购自杭州宝赛生物科技有限公司,型号:RT02020;荧光定量试剂盒,购自杭州宝赛生物科技

* 基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(LZ15H270001)

收稿日期:2016-09-30

作者简介:李威(1990-),男,河南安阳人,在读硕士研究生,研究方向:中医骨伤科基础与临床。

[△]通信作者:姚新苗,E-mail:fengxiejing10yang@163.com

有限公司, 型号: PM10003; DnaseI 购自 Promega 公司, 型号: M6101; 第二抗体, 购自 Abcam 公司, 型号: Goat anti-Rabbit IgG (HRP) secondary antibody (ab97200)。

1.3 药品

补佳乐戊酸雌二醇片, 购自拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号: J20130009; 益骨汤包含补骨脂、骨碎补、生地、丹参、山药、仙灵脾等 6 味中药, 均购于浙江中医药大学滨江中医门诊部, 经鉴定为合格药材, 熬制成按原生药计 2g/mL 的口服液; Noggin 反义寡核苷酸序列如下: 5'-GCCAACAT-TATCTGCACATCAGAC-3', 由上海生物工程合成。

2 方法

2.1 实验分组

大鼠适应性饲养 1 周, 随机分为空白组(A)、模型组(B)、补佳乐组(C)、益骨汤组(D)、Noggin 反义寡核苷酸组(E)。模型组 15 只, 其余每组 10 只。

2.2 绝经后骨质疏松动物模型制备

大鼠采用浓度为 10% 水合氯醛按 0.3mL/100g 进行腹腔麻醉, 打开大鼠腹腔, 去除双侧卵巢, 逐层缝合。术后予青霉素肌注预防感染, 用量按照每只每天 5 万 U, 持续 3d。

2.3 饲养与给药

造模后将大鼠分笼予以常规饲料喂养 12 周, 第 13 周起开始每天给药, A 组、B 组以蒸馏水 10mL/kg 灌胃; C 组以浓度为 0.36mg/kg 补佳乐水溶液灌胃; D 组以 10mL/kg 的益骨汤水提液灌胃, 整个灌胃过程持续 12 周; E 组予腹腔内注射 Noggin 反义寡核苷酸 20 μ g/kg, 持续 12 周。

2.4 骨密度检测

将大鼠用颈椎脱臼法处死, 取大鼠右股骨, 用美国 LUNAR 公司 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪测定大鼠右股骨上干骺端骨密度。

2.5 检测 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin mRNA 表达

采用 RT-PCR 法, 按照 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA, 紫外分析和琼脂糖电泳法检测总 RNA 纯度、浓度以及完整性。以随机引物和 Oligo(dt)18 引物将总 RNA 反转录为 cDNA。BMP-2 的引物序列: forward: 5'-TCCACTCCACAAACGA GAAA-3'; reverse: 5'-CCACATCACTGAAGTCCACA-

TA-3'; Smads 的引物序列: forward: 5'-CCTCAGT-GACAGCAGCATCT-3'; reverse: 5'-GCCAACTCTT-GGTGTGTTGAA-3'; Runx2 的引物序列: forward: 5'-TGGTGTTGACGCTGATGGA-3'; reverse: 5'-TAGGG-TCGCCAGACAGACTCAT-3'; OSX 的引物序列: forward: 5'-GCCTACTTACCCGTCTGACTTT-3'; reverse: 5'-CCACTATTGCCAACTGCCTT-3'; Noggin 的引物序列: forward: 5'-ACTATCTACACATCCGCC-CA-3'; reverse: 5'-AGCAGCGTCTCGTTCAGA-3'; 内参 actin 的引物序列: forward: 5'-GCTCTCTT-CCAGCCTTCCTT-3'; reverse: 5'-GGTCTTTACG-GATGTCAACG-3'。反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 1min, 变性 95 $^{\circ}$ C 10s, 退火 58 $^{\circ}$ C 10s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 10s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 每个标本做 3 个复孔。反应结束后, 分析样本的 CT 值, 并计算平均值, 最后采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各基因的相对定量分析。

2.6 检测 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 蛋白表达

按照凯基生物全蛋白提取试剂盒提取样品总蛋白, 用天根生物公司的 BCA 蛋白定量试剂盒, 测定各样品浓度。制备聚丙烯酰胺凝胶, 5% 的浓缩胶, 12% 的分离胶, 调整点样量, 使每个胶孔的点样量都是 20 μ g, 60mA 横流电泳。100V 恒压电泳 65min 转膜。5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。取出 PVDF 膜放入含适当浓度的第一抗体的封闭液(一抗稀释比例 1:500), 置室温摇床轻摇 2h。废弃封闭液和抗体, 用 PBST 漂洗滤膜 3 次, 每次 10min; 再用 TBS 洗涤 1 次 10min。PVDF 膜放入含适当浓度的第二抗体封闭液中, 置室温摇床轻摇 1h。TBST 洗涤液洗涤 3 次, 每次 10min, 再用 TBS 洗涤 1 次 10min。DAB 显色液临用时配制。洗净后的 PVDF 膜放入显色液中反应 3min(注意观察), 用水终止反应, 成像仪摄片。

2.7 统计学方法

计量数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 组间用 SNK 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 骨密度测定结果

表 1 结果显示: 模型组骨密度值明显低于空白组, 差异有统计学意义($P<0.01$); 益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组骨密度值明显高于模型

表 1 各组大鼠骨密度结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	股骨骨密度(g/cm ²)
空白组	10	0.207±0.01 ^{△△}
模型组	15	0.144±0.0008 ^{**}
补佳乐组	10	0.182±0.0007 ^{△△}
益骨汤组	10	0.186±0.01 ^{△△}
Noggin 反义寡核苷酸组	10	0.180±0.01 ^{△△}

注:与空白组比,^{**} $P<0.01$;与模型组比,^{△△} $P<0.01$

组,差异有统计学意义($P<0.01$),且益骨汤组骨密度值在三组中最高。提示:骨质疏松症实验动物模型成功,益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组

均可增加大鼠骨密度,且益骨汤组效果最强。

3.2 RT-PCR 检测骨组织中 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 表达结果

表 2 结果显示:与模型组比,益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组大鼠 BMP-2、Smads、Runx2、OSX mRNA 表达明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$),益骨汤组 Noggin 表达与模型组比明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示:益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组可上调 BMP-2、Smads、Runx2、OSX mRNA 表达,抑制 Noggin 表达,且益骨汤组效果最明显。

表 2 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 的表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

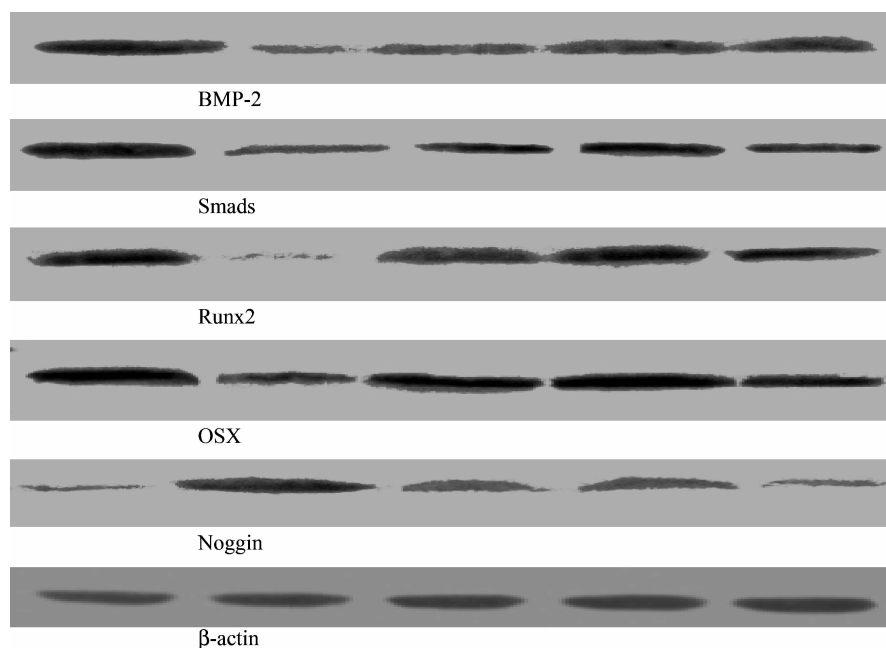
组别	数量	BMP-2	Smads	Runx-2	OSX	Noggin
空白组	10	1.05±0.40 ^{△△}	1.06±0.47 ^{△△}	1.00±0.03 ^{△△}	1.06±0.45 ^{△△}	1.01±0.17
模型组	15	0.28±0.01 ^{**}	0.18±0.01 ^{**}	0.23±0.09 ^{**}	0.20±0.06 ^{**}	2.69±0.29 ^{**}
补佳乐组	10	0.63±0.05 [△]	0.57±0.08 [△]	0.68±0.06 ^{△△}	0.70±0.05 ^{△△}	2.14±0.25
益骨汤	10	0.83±0.04 ^{△△}	0.70±0.10 [△]	0.78±0.04 ^{△△}	0.80±0.04 [△]	1.68±0.18 ^{△△}
Noggin 反义寡核苷酸组	10	0.74±0.06 [△]	0.58±0.05 [△]	0.67±0.04 ^{△△}	0.66±0.06 [△]	1.50±0.30

注:与空白组比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

3.3 Western 印迹法检测 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 蛋白表达结果

图 1 结果显示,骨组织中可检测到 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin 蛋白表达。益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组大鼠 BMP-2、

Smads、Runx2、OSX 蛋白条带明显深于模型组;益骨汤组 Noggin 蛋白条带明显浅于模型组。提示:益骨汤组、补佳乐组、Noggin 反义寡核苷酸组可增强 BMP-2、Smads、Runx2、OSX 蛋白表达,抑制 Noggin 蛋白表达。



从左到右依次:空白组、模型组、补佳乐组、益骨汤组、Noggin 反义寡核苷酸组

图 1 BMP-2、Smads、Runx2、OSX、Noggin Western Blot 结果

4 讨论

中医学对骨质疏松症认识,病变在骨,本质在肾。《素问·痿论》云:“肾主身之骨髓,肾气热,则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”^[5]。骨质疏松病因病机可归纳为 3 点:①肾虚是骨质疏松根本原因;②脾肾亏虚为重要病机;③血瘀是骨质疏松的病理产物和促进因素。益骨汤选用补骨脂、骨碎补、仙灵脾补肾填精、强筋壮骨,怀山药健脾益气,丹参活血化瘀,生地滋阴清热,符合中医治疗骨质疏松症补肾壮骨、活血化瘀的指导原则。既往研究证明:补骨脂能够促进骨密度增加^[6],骨碎补黄体酮可以有效提高骨质疏松症患者腰椎和髋关节骨密度^[7],仙灵脾、丹参能减少骨吸收率,防治激素致骨质疏松症^[8-10]。

益骨汤前期研究结果证明:益骨汤能促进成骨细胞分化、增殖,提高其活性,抑制骨吸收^[11],提高去势大鼠痛域,抑制疼痛^[12],改变骨质疏松血瘀病理状态^[13],益骨汤含药血清能明显增加成骨细胞 BMP-mRNA 表达量,提高对骨吸收环节抑制^[14],促进早期成骨细胞增殖与分化^[15]。

已有研究证实 BMP-2 信号通路能调控成骨细胞生命周期各个方面,包括 Msc 向成骨细胞分化、骨原细胞扩增、成骨细胞矿化的活力以及其与破骨细胞的偶联^[16]。有研究表明^[17]BMP2 基因敲除小鼠,骨骼发育和成骨细胞的功能均有缺陷,表现为骨质减少、成骨细胞数量减少及分化和矿化的缺陷。Smads 家族是 BMP 信号传导蛋白,其主要将 TGF- β 信号由细胞膜传至细胞核,BMP 激活 Smads 从而诱导核内成骨基因的表达^[18]。Runx2 是 BMP-2 的靶基因是成骨细胞分化、骨发育的重要调节因子,在成骨细胞分化过程中起重要作用^[19]。因此,如何通过促进骨组织中 BMPs 的表达来增加骨量成为了目前的研究重点。BMPs 受到细胞外相关因子的调控,目前研究得较多的三种调控 BMPs 的细胞因子包括 Noggin、Gremlin 和 Twisted gastrulation^[20],都可以与 BMPs 特异性结合,从而阻断 BMPs 对骨量的改善作用。

本实验研究结果说明益骨汤能够促进 BMP-2、Smads、Runx2、OSX mRNA 转录及蛋白表达上调,抑制 Noggin 的过度表达,增加骨质疏松大鼠骨密度,从而推断益骨汤防治骨质疏松机制与上调 BMP-2、Smads、Runx2、OSX 的表达,抑制 Noggin 过度表达有关;Noggin 这种 BMPs 抑制剂可能是新的抗骨质

疏松靶点,从分子生物角度阐释了“肾主骨,生髓”理论。

参考文献:

- [1] Roush K. Prevention and treatment of osteoporosis in post-menopausal women:a review[J]. Am J Nurs,2011,111(8):26-35.
- [2] Adachi JD,Adami S,Gehlbach S,et al. GLOW Investigators. Impact of prevalent fractures on quality of life:baseline results from the global longitudinal study of osteoporosis in women[J]. Mayo Clin Proc,2010,85(9):806-813.
- [3] 郎名丽,尉双玲. 骨质疏松的药物治疗进展[J]. 中国卫生产业,2014,59(9):93-94.
- [4] 张鑫,肖鲁伟,童培建. 补肾活血汤防治绝经后骨质疏松症的实验研究[J]. 中医正骨,2010,22(2):3-6.
- [5] 金珉庭,郑洪新,朱辉. 补肾中医药对骨质疏松症大鼠下丘脑 BMP-4、Smad6 mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(8):556-560.
- [6] 蔡玉霞,张剑宇. 补骨脂水煎剂对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(2):268-271.
- [7] 丁小刚,覃勇,鄂建设,等. 骨碎补总黄酮对老年性骨质疏松症患者血清骨钙素水平及骨密度影响 [J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(5):519-521.
- [8] 李青南,吴铁,谢华,等. 淫羊藿提取液对去睾丸大鼠骨代谢的影响[J]. 中草药,1993,24(12):637.
- [9] 李青南,廖进民,吴铁,等. 淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 中国药理学杂志,1996,31(8):467-470.
- [10] 肖柳斌,刘国雄,王晖. 丹参水提液对抗大鼠泼尼松性骨质疏松的作用研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(1):94-98.
- [11] 杨林,姚新苗,黄竞,等. 益骨汤对去卵巢大鼠血清激素及成骨细胞增殖的影响 [J]. 中医正骨杂志,2006,18(12):8-9.
- [12] 姚新苗,朱胤晟,应建伟. 益骨汤口服液抑制去势大鼠骨质疏松疼痛的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(8):1005-1009.
- [13] 朱胤晟,姚新苗,吕一. 益骨汤口服液对去势大鼠骨质疏松症血瘀病机微观分子的影响[J]. 江苏中医药,2013,45(5):71-72.
- [14] 姚新苗,朱胤晟,平佃辉,等. 益骨汤对去势大鼠骨质疏松症外周血清炎症因子的影响 [J]. 中医正骨,2012,24(11):7-8.
- [15] 姚新苗,陈于东,方芳. 益骨汤含药血清对成骨细胞增殖和 ALP 影响的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报,2007,31(2):158-159.

- [16] Cao X., Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. Gene, 2005, 357(1): 1-8.
- [17] K. Miyazono, Y. Kamiya, M. Morikawa. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction [J]. Journal of biochemistry, 2010, 147(1): 35-51.
- [18] Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors [J]. Cell Signal, 2004, 16(3): 291-299.
- [19] Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(24): 16502-16511.
- [20] Canalis E. Update in new anabolic the rapides for osteoporosis [J]. J Clin Endocrinol metab, 2010, 95 (4): 1496-1504.

(编辑:徐建平)

Effects of YiGu Recipe on the Expression of BMP-2 Signaling Pathways in Rats with Osteoporosis

LI Wei, YAO Xinmiao, LI Xiaoya, YU Bin, DONG Zhengchao

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of YiGu Recipe on the mRNA transcription and protein expression of BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2), Smads, Runx2(Runt-related transcription factor 2), OSX(Osterix), Noggin on BMP-2 signaling pathways in rats with osteoporosis, analyze the mechanism of Yigu Recipe in the prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** The osteoporosis rats model was built by the ovariectomy. All rats were divided into normal control, blank model, progynova, YiGu Recipe, anti-Noggin group. RT-PCR and WesternBlotting methods was applied to measure the mRNA and protein expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX, Noggin mRNA in bone homogenate. **Results** First, the BMD (Bone mineral density) of the model group significantly decreased compared with the blank group ($P < 0.01$), the BMD significantly increased compared with the model group ($P < 0.01$). Second, the expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX mRNA significantly increased compared with the model group ($P < 0.05$), the expression of Noggin mRNA significantly decreased compared with the model group ($P < 0.05$). At last, the expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX protein significantly increased compared with the model group, the expression of Noggin protein significantly decreased compared with the model group. **Conclusion** The mechanism of Yigu Recipe in the prevention and treatment of osteoporosis was increase the BMD, inhibiting the expression of Noggin and up-regulating the expression of the BMP-2, Smads, Runx2, OSX. Noggin as an inhibitor of MMPs may be a novel anti-osteoporosis target.

KEY WORDS: Yigu Recipe; Osteoporosis; BMP-2 signaling pathway; Noggin

(原文见第1页)

The Effects of the Aqueous Extracts of Huatan Tongyu Jiedu Decoction on Expression of E-cadherin and MMP-2 in Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

LIU Lei¹, PENG Jia¹, HUANG Jinlin², SHI Hui¹, HONG Xinghui², FANG Haiyan³, LIU Yayun¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

3. Department of Science and Technology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of the aqueous extracts of Huatan Tongyu Jiedu Decoction on expression of E-cadherin and MMP-2 in gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** Gastric cancer cell SGC-7901 was intervened for 24h by the extract of different concentrations of 5、10、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL, respectively. Wounding-healing assay test was adopted to detect gastric cancer cell SGC-7901's capacity of invasion and metastasis. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) is operated to detect the protein expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and E-cadherin in cells. **Results** The difference of cells' healing width between the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL and the blank group showed statistically significant($P < 0.05$, $P < 0.01$); the amount of E-cadherin of the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL was higher than that of the blank group($P < 0.05$); the amount of MMP-2 in cell supernatant of the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL was obviously lower than that of the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** HTJD repress the capacity of gastric cancer cell line SGC-7901 on invasion and metastasis. Its mechanism is likely related to down-regulating the expression level of MMP-2 and increasing the expression level of E-cadherin.

KEY WORDS: Huatan Tongyu Jiedu decoction; gastric cancer cell SGC-7901; invasion and metastasis; E-cadherin; MMP-2