

本文引用:李迎秋,蒋艳菲,张叔琦,赵雪君,曹卉,杨雪,卓海燕,张国民.壮骨止痛胶囊含药血清对成骨细胞 CDK4 和 p21 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1078-1081.

壮骨止痛胶囊含药血清对成骨细胞 CDK4 和 p21 表达的影响

李迎秋,蒋艳菲,张叔琦,赵雪君,曹卉,杨雪,卓海燕,张国民*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 观察壮骨止痛胶囊含药血清对成骨细胞 CDK4 和 p21 表达的影响,探讨壮骨止痛胶囊治疗骨质疏松症的机制。**方法** 40 只 SD 雌性大鼠随机分为模型组、阳性对照组、壮骨止痛胶囊组、假手术组,每组 10 只。模型组、阳性对照组以及壮骨止痛胶囊组的 SD 大鼠制作骨质疏松大鼠模型,假手术组 SD 大鼠作为对照。不同组 SD 大鼠喂养不同药物,假手术组和模型组大鼠灌胃生理盐水,阳性对照组灌胃尼尔雌醇,壮骨止痛胶囊组灌胃壮骨止痛胶囊药物,连续喂养 13 周之后,处死大鼠,提取各组大鼠含药血清备用。另取 5 只新生 SD 小鼠颅骨的成骨细胞,应用上述各组含药血清进行细胞培养,连续培养 3 代后,采用碱性磷酸酶染色和茜素红染色法鉴定成骨细胞,细胞免疫组化法检测各组含药血清培养的成骨细胞 CDK4 蛋白和 p21 蛋白的表达。**结果** CDK4 和 p21 蛋白阳性表达主要在成骨细胞的细胞核。与假手术组比较,模型组 CDK4 表达轻度降低,p21 表达轻度升高($P>0.05$);与模型组比较,阳性对照组和壮骨止痛胶囊组 CDK4 表达均升高,p21 表达均下降($P<0.01$);与阳性对照组比较,壮骨止痛胶囊组 CDK4 表达升高,p21 表达下降($P<0.01$)。**结论** 壮骨止痛胶囊可通过提高成骨细胞 CDK4 的表达,抑制 p21 的表达,从而增加成骨细胞 G1 期调节蛋白的表达,推动增殖周期的完成,达到治疗骨质疏松症的目的。

〔关键词〕 CDK4;p21;壮骨止痛胶囊;骨质疏松症

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.007

Effect of Zhuanggu Zhitong Capsule Medicated Serum on the CDK4 and p21 Expression of Osteoblasts

LI Yingqiu, JIANG Yanfei, ZHANG Shuqi, ZHAO Xuejun, CAO Hui, YANG Xue, ZHUO Haiyan, ZHANG Guomin*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Zhuanggu Zhitong capsule medicated serum on the CDK4 and p21 expression of osteoblasts, and investigate its mechanism of action on osteoporosis. **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into model group, positive control group, Zhuanggu Zhitong capsule group and sham-operation group, 10 rats in each group. The SD osteoblasts model rats excluding rats in sham-operation group were built, and sham-operation group as the control. Rats in sham-operation and model groups were given normal saline by gavage, rats in the positive control group were administrated with nylestriol, and rats in Zhuanggu Zhitong capsule group were received with Zhuanggu Zhitong capsule. After continuous feeding for 13 weeks, the rats were executed, and then the medicated serum from all rats were prepared. Osteoblasts which obtained from five newborn SD neonatal rats were cultured with the medicated serum to the third generation. The osteoblasts were identified by the alkaline phosphatase dye and the alizarin red dye. The expression of CDK4 protein and p21 protein was detected by immunohistochemistry. **Results** The positive expressions of CDK4 and p21 were mainly in the nucleus of osteoblasts. In comparison with the sham-operation group, the expression of CDK4 in the model group decreased slightly, and the expression of p21 increased slightly ($P>0.05$). Compared with the model group, CDK4 expression increased and p21 expression decreased in the positive control group and Zhuanggu Zhitong capsule group ($P<0.01$). The CDK4 expressions in Zhuanggu Zhitong capsule group were higher than those in the positive control group, while the p21 expression in Zhuanggu Zhitong capsule group were significantly lower than those in the positive control group ($P<0.01$). **Conclusion** Zhuanggu Zhitong capsule could improve

〔收稿日期〕2016-10-12

〔基金项目〕2014 年湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(14B130);2015 年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2015217,2015220);2016 年度湖南省中医药科研计划重点项目(201612)。

〔作者简介〕李迎秋,女,博士,讲师,主要从事中医老年病研究。

〔通讯作者〕* 张国民,男,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:834095773@qq.com。

CDK4 expression of osteoblasts, and inhibit the expression of p21, thereby increase the expression of osteoblast G1 phase regulatory protein, promote the proliferation cycle, and then achieve the purpose of treatment of osteoporosis.

[**Keywords**] CDK4; p21; Zhuanggu Zhitong capsule; osteoporosis

骨质疏松症是指由于单位体积内骨量减少、骨组织显微结构明显衰退、骨密度降低等引起骨折危险性增加的全身性骨代谢疾病^[1]。有关资料显示^[2-3],随着社会人口老龄化趋势,骨质疏松症患者日益剧增。骨质疏松症在中医学认识上近似于中医学“骨痿”病。多属虚证,病位在骨,与肝肾脾密切相关^[4]。治疗原则是补肝肾、强筋骨。壮骨止痛胶囊,具有补益肝肾、壮骨止痛功效,能有效治疗骨质疏松症^[5]。但其具体作用机制尚无文献完全阐明。本试验拟通过研究壮骨止痛胶囊对体外成骨细胞 G1 期调节蛋白 CDK4 和 p21 表达的影响及其作用,探讨其抗骨质疏松症的具体作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 6 月龄的雌性 SD 大鼠 40 只,新生 SD 小鼠 5 只。湖南斯莱克景达有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2011-0003。大鼠饲养在湖南中医药大学实验动物中心清洁级屏障系统动物房里,室温 18~25 ℃,湿度 40%~70%,标准普通饲料喂养(湖南中医药大学实验动物中心提供)。

1.2 实验药品

壮骨止痛胶囊(由补骨脂、淫羊藿、女贞子、川牛膝、枸杞子、狗脊、骨碎补组成)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备,批号 980305,含药剂量相当于生药 13.2 g/(kg·d)。阳性对照药物为尼尔雌醇片(北京四环制药有限公司生产,国药准字 H11020124),剂量为 0.117 mg/(kg·d)。

1.3 主要实验试剂与仪器

即用型兔抗大鼠 CDK4 多克隆抗体,小鼠抗大鼠 p21 多克隆抗体;山羊抗兔抗体;0.25%胰蛋白酶、II 型胶原酶、低糖 DMEM 培养基、小牛血清、青/链霉素、SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司);50 mm 细胞培养瓶、巴式管、24 孔板、15 mmBD 管、5 mL 冻存管、50 mmBD 管均购自武汉博士德生物工程有限公司;电热恒温培养箱(长沙实验电炉厂),电热恒温干燥箱(上海市实验仪器总厂),离心机、倒置相差显微镜(MOTIC)、酶标仪、电泳仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 制备含药血清

取 40 只 SD 雌性大鼠随机分为模型组、阳性对

照组、壮骨止痛胶囊组和假手术组,每组 10 只。模型组、阳性对照组以及壮骨止痛胶囊组的 SD 大鼠按照文献^[6]制作骨质疏松大鼠模型,假手术组 SD 大鼠作为对照。不同组 SD 大鼠喂养不同药物,假手术组和模型组大鼠灌胃生理盐水、阳性对照组灌胃尼尔雌醇、壮骨止痛胶囊组灌胃壮骨止痛胶囊药物。给药剂量及方法:灌胃给药剂量按人-鼠体表面积折算成相当于人日用临床剂量,壮骨止痛胶囊给药剂量相当于生药 13.2 g/(kg·d),用 2 mL 生理盐水溶解,给壮骨止痛胶囊组大鼠灌胃;尼尔雌醇片给药剂量为 0.117 mg/(kg·d),用 2 mL 生理盐水溶解后给阳性对照组大鼠灌胃;模型组、假手术组大鼠灌胃等量生理盐水 2 mL;每天上午 8:00~9:00 灌胃给药 1 次,每次 2 mL。其余食物及饮水按需喂养,连续给药 13 周后,在大鼠腹主动脉无菌取血,取得的血液在 4 ℃下静置 30 min 后离心 30 min。取离心后的上层血清,于 56 ℃水浴 30 min 灭活,同组血清混匀,经 0.45 μm、0.22 μm 一次性滤膜抽滤除菌,每管 5 mL 分装,-20 ℃保存备用。

2.2 成骨细胞的分离和培养

取新生 SD 小鼠 5 只,在 75%乙醇溶液中浸泡 5 min 消毒后取出小鼠头骨,在 PBS 缓冲液中处理至骨片透明,剪碎为 1 mm³ 骨碎片,0.25%胰酶预消化 30 min,放入离心机中离心 10 min,去上清液,加入 PBS 液洗涤 1 次,再加入 0.1% II 型胶原酶,37 ℃水浴消化 1 h,每 30 min 振荡 1 次,紧接着离心 3 min,去上清液,再加 PBS 液洗涤 1 次,移入培养瓶中加入培养液在 5% CO₂,37 ℃条件继续培养。每日定时定次观察细胞生长和污染状况,每 4 天换液 1 次。待细胞融合后,用 25%胰蛋白酶消化细胞,制成细胞悬液,取悬浮液于培养瓶中贴壁培养,多次重复操作,取第 3 代细胞进行实验。

2.3 含药血清的添加

取第 3 代成骨细胞经 0.25%胰酶消化后,将细胞悬液以终浓度 2×10⁴/mL 接种到 24 孔培养板中进行贴壁培养;细胞贴壁后,弃去含血清的培养基,单纯 DMEM 培养基培养饥饿 24 h,24 h 后将细胞培养液换为含 15%各组含药血清的培养液,根据所更换的含药血清的不同将培养的成骨细胞分为模型组、阳性对照组、壮骨止痛胶囊组、假手术组,每组 12 孔,每 3 天换含药血清的培养液 1 次,连续培养 18 d 后,弃去上清液,收集各组成骨细胞用于碱性磷酸酶染色和茜素红染色,并应用细胞免疫组化法

检测各组成骨细胞 CDK4 和 p21 蛋白的表达。

3 结果

3.1 成骨细胞鉴定

3.1.1 碱性磷酸酶染色结果 各组体外培养的成骨细胞具有碱性磷酸酶活性,经重氮盐法碱性磷酸酶染色后,细胞浆着色呈墨绿色,细胞呈多角形,是典型的成骨细胞形态,如图 1。

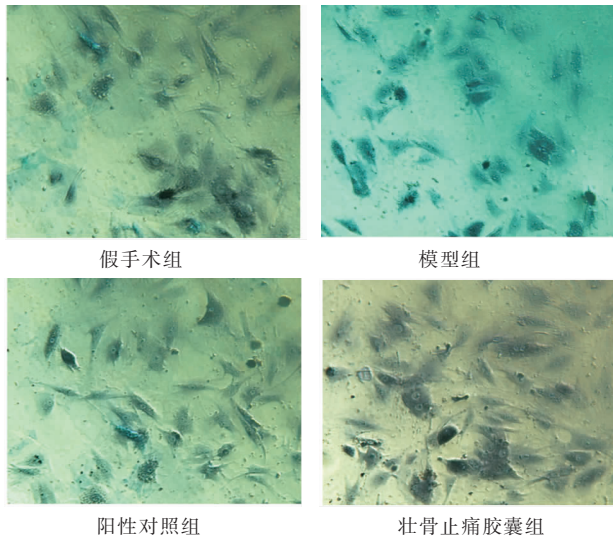


图 1 成骨细胞碱性磷酸酶染色结果($\times 100$)

3.1.2 茜素红染色结果 各组体外培养的成骨细胞进行茜素红染色后,呈红色的钙化结节,其中假手术组、阳性对照组、壮骨止痛胶囊组的钙化结节明显多于模型组,如图 2。

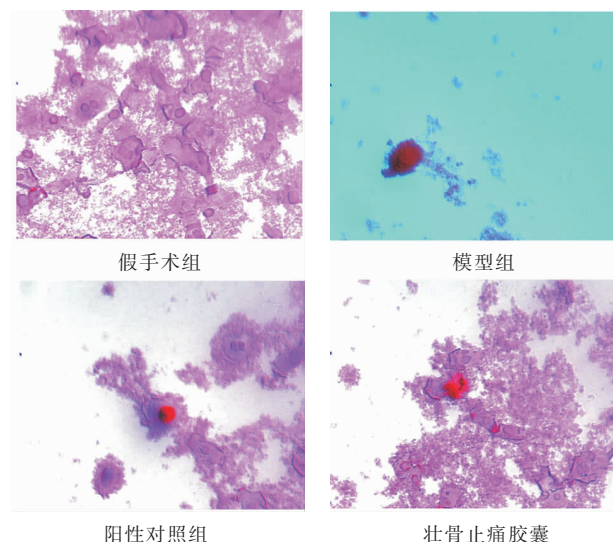


图 2 成骨细胞茜素红染色结果($\times 100$)

3.2 各组大鼠 CDK4 和 p21 蛋白的表达水平

CDK4 和 p21 蛋白检测结果显示, CDK4 和 p21 蛋白阳性表达主要在成骨细胞的细胞核,见图

3、图 4。与假手术组比较,模型组 CDK4 表达降低, p21 表达升高;与模型组比较,阳性对照组和壮骨止痛胶囊组 CDK4 表达均升高, p21 表达均下降 ($P < 0.01$);与阳性对照组比较,壮骨止痛方组 CDK4 表达升高, p21 表达下降 ($P < 0.01$)。见表 1。

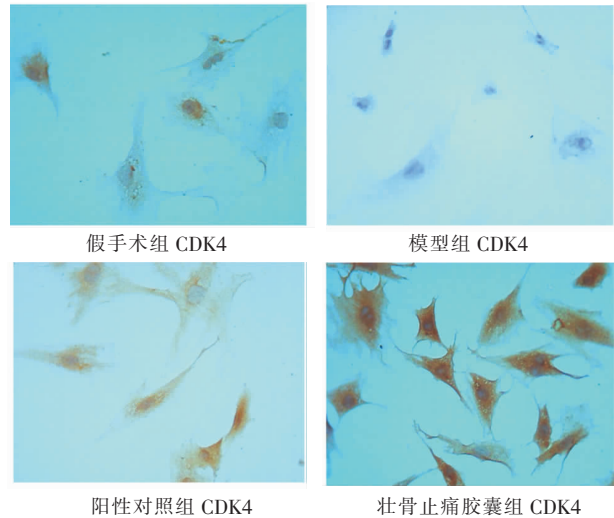


图 3 各组大鼠成骨细胞 CDK4 蛋白的表达光镜图 (免疫组化 $\times 400$)

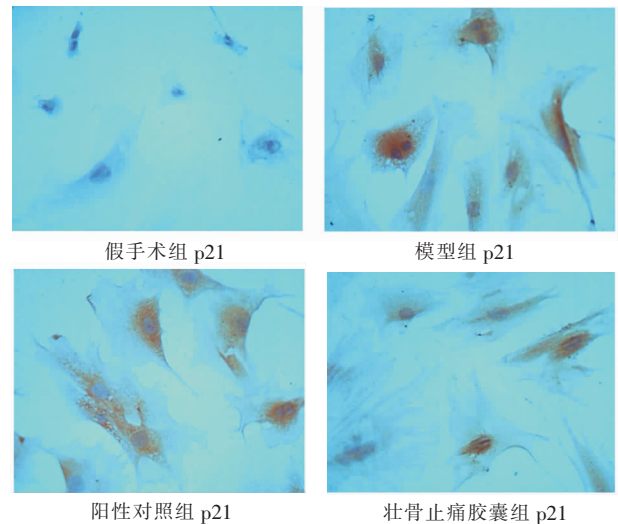


图 4 各组大鼠成骨细胞 p21 蛋白的表达光镜图(免疫组化 $\times 400$)

表 1 各组大鼠 CDK4 和 p21 蛋白的表达 ($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	CDK4 蛋白	p21 蛋白
模型组	11.35 \pm 1.48	18.30 \pm 1.87
假手术组	11.97 \pm 1.56*	18.01 \pm 1.92*
阳性对照组	17.96 \pm 1.89 Δ	11.98 \pm 1.56 Δ
壮骨止痛胶囊组	18.30 \pm 1.93 $\Delta\#$	11.35 \pm 1.49 $\Delta\#$

注:与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\# P < 0.01$ 。

4 讨论

原发性骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨脆性增加以及易于发生骨折

的一种全身性骨骼疾病^[6-7]。目前,骨质疏松症是一个全世界范围内越来越重要的社会健康问题,骨质疏松症已成为世界十大常见病。因此,预防和治疗骨质疏松症的药物开发与研究已成为医药研究的热点和重点。随着年龄的增长,中、老年人激素分泌日益减少,如雌激素、雄激素、甲状腺素、皮质类固醇激素、钙调节激素、生长激素等缺乏是导致骨质疏松症的重要原因。近年来,关于细胞周期的研究有许多重大突破,现已发现并确立了 Cyclin、CDK 和 CKI 的细胞周期 G1 期蛋白调控机制,核心是 CDK-Cyclin 系统,即细胞的生长过程中进入 G1 期后,是继续进入 S 期还是停滞于 G1 期,这取决于 CDK4/6-Cyclin D1 复合体的形成与活性,有研究已证明^[7], Cyclin D1 是 G1 期蛋白增殖的关键蛋白。有国外学者 Fujita^[8]在研究大鼠雌激素对成骨细胞的影响机制中发现雌激素诱导能提高 CDK4/6 的活性进而促进骨细胞的生长。国内学者祝颂松等^[9]在研究下颌牵张成骨的实验中发现了血清 CDK4 水平明显升高。吴银生等^[10-11]研究发现,在去卵巢骨质疏松大鼠的各个时期的监测中,发现成骨细胞调节蛋白 Cyclin D1、CDK4 蛋白的阳性高表达,提示雌激素严重缺乏时,进入增殖周期的成骨细胞增多且增殖加快;p21 的阳性高表达则更为显著,阻滞成骨细胞增殖周期 G1 期进程。故通过研制保证成骨细胞正常功能的药物来防治骨质疏松症,并在细胞水平探讨治疗骨质疏松症这一类药物的作用环节与机制,是预防和治疗骨质疏松症的重要医学研究和防治途径。在中医学理论中,骨质疏松症为“骨痿”“骨枯”“骨痹”“腰背痛”等^[12-13]。中医学理论认为,骨质疏松症的病因病机为肾亏脾虚,认为肾藏精主骨,肾精减少,骨髓化源不足,不能营养骨骼而致骨髓空虚,从而导致骨质疏松症的发生;《素问·痿论》曰:“脾主身之肌肉”,肌肉丰满壮实,则骨骼健壮有力,脾虚则致“骨枯”。壮骨止痛胶囊是由壮骨止痛方结合现代中药药理研究,并遵循传统中医理论研制而成的中成药,具有壮骨止痛方同样的功效^[14-17]。本试验通过观察壮骨止痛胶囊对体外成骨细胞 G1 期调节蛋白 CDK4 和 p21 表达的影响及其作用。结果表明,壮骨止痛胶囊组成骨细胞的 CDK4 蛋白阳性表达高于其他组,p21 的表达低于其他组,且主要在成骨细胞的细胞核。说明壮骨止痛胶囊通过调节成骨细胞周期 G1 期 CDK4 和 p21 蛋白的表达,调节成骨细胞 G1

期蛋白,推进细胞周期进程,促进成骨细胞增殖分化,达到治疗骨质疏松的效果。以上可能是壮骨止痛胶囊治疗骨质疏松症的基本作用机制。

参考文献:

- [1] 丽 荣.浅谈绝经后骨质疏松症的中医药治疗[J].内蒙古中医药,2014,33(29):9.
- [2] 何春江,张德洲,李君诚.桡远骨折、髌部骨折、胸腰段压缩性骨折在门、急诊骨折患者中 40 岁以上人群的发病情况分析报告[A].第十八届全国中西医结合骨伤科学术研讨会论文汇编[C].中国中西医结合学会、中国中西医结合学会骨伤科专业委员会,2011:1.
- [3] 瞿宁厚,杨晓清,张进陶,等.门、急诊骨折病人中 40 岁及以上人群桡远和髌部骨折的发病情况报告[A].2012 年四川省中医骨伤科学术年会论文集[C].四川中医骨伤科专业委员会,2012:227-228.
- [4] 黄雪青,李 芮.从肝肾脾论治老年性骨质疏松症[J].大家健康(学术版),2015,9(3):34-35.
- [5] 彭琼辉,黄艳华,严 超,等.壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症 50 例临床观察[J].湖南中医杂志,2016,32(8):16-17.
- [6] 邢志军,陈德喜,赵景明.壮骨颗粒对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J].中国当代医药,2014,21(6):8-10,14.
- [7] Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, et al. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclin during the G1 phase of the cell cycle[J]. Cell, 1991,65(4):701-713.
- [8] Fujita M, Urano T, Horie K, et al. Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2002,299(2):222-228.
- [9] 祝颂松,胡 静,李继华,等.细胞周期调节蛋白在下颌牵张成骨过程中的表达及作用[J].口腔医学研究,2005,21(5):498-500.
- [10] 吴银生,林燕萍,卢天祥,等.去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞 G1 期调节蛋白的改变[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(15):2675-2679.
- [11] 吴银生.成骨细胞 G1 期调节蛋白与绝经后骨质疏松症关系及中药干预作用的实验研究[D].福州:福建中医学院,2008:30-51.
- [12] 曾 英,李伟娟,章文娟,等.壮骨止痛胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用[J].北京中医药大学学报,2016,39(7):555-561.
- [13] 李东涛,王 剑,姜洪洋,等.骨质疏松症常见中医定性证候轻重程度量化评价[J].中西医结合学报,2012,10(11):1254-1262.
- [14] 李东涛,李富玉,王 剑,等.骨质疏松症中医证候疗效评价方法研究[J].中医杂志,2013,54(13):1110-1114.
- [15] 刘平安,戴瑜婷,孟小莎,等.基于 TGF- β -Smad 通路探讨壮骨止痛方对绝经后骨质疏松症的治疗[J].湖南中医药大学学报,2016,36(7):31-34.
- [16] 莫新民,曾 英,彭琼辉,等.壮骨止痛胶囊治疗去卵巢大鼠骨质疏松症疗效的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(3):195-198.
- [17] 章才干.壮骨止痛胶囊治疗骨质疏松症 40 例[J].中医杂志,2013,54(16):1417-1418.

(本文编辑 李 杰)