

本文引用:唐皓,余娜,仇湘中,王哲享.左归丸对去势大鼠钙转运通路相关蛋白的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(10):1200-1204.

左归丸对去势大鼠钙转运通路相关蛋白的影响

唐皓¹,余娜^{2*},仇湘中¹,王哲享¹

(1.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙410006;2.湖南中医药大学,湖南长沙410208)

〔摘要〕目的 探讨左归丸对去势大鼠骨密度和骨、肾组织中钙转运通路相关蛋白的影响。方法 选取48只雌性SD大鼠,随机分为正常组,假手术组,模型组,西药组,中药低、高剂量组。除假手术组和正常组,其余组切除大鼠卵巢,造模成功后3个月进行各组干预。3个月后处死大鼠,检测大鼠骨密度(BMD);Western blotting法检测钙转运通路(肾组织)蛋白表达;免疫组化检测去势大鼠骨组织中新型上皮钙通道5(TRPV5)蛋白的表达。结果 与模型组相比,左归丸高剂量组与西药组大鼠骨密度均有改善($P<0.05$);与假手术组比较,模型组各蛋白表达均有不同程度下降($P<0.01$, $P<0.05$);尼尔雌醇和左归丸均能不同程度上调去势大鼠肾组织中TRPV5蛋白、钠钙交换器(NCX1)蛋白、钙结合蛋白-D28K(CaBP-D28K)和细胞膜钙泵(PMCA1b)蛋白表达,差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);免疫组化显示模型组较假手术组的TRPV5蛋白表达率增加($P<0.05$),而西药组和中药高、低剂量组较模型组蛋白表达率均下降($P<0.05$)。结论 左归丸可通过上调肾钙转运通路中相关蛋白的表达和降低大鼠破骨细胞中TRPV5蛋白的表达,而发挥骨质疏松症治疗作用,肾、骨组织中钙转运过程相关蛋白可能成为骨质疏松症治疗的新方向、新靶点。

〔关键词〕左归丸;去势大鼠;钙转运通路

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.10.006

Effects of Zuogui Pills on Calcium Transport Pathway-related Proteins in Ovariectomized Rats

TANG Hao¹, YU Na^{2*}, QIU Xiangzhong¹, WANG Zhexiang¹

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the effects of Zuogui Pills on bone mineral density (BMD) and related proteins involved in calcium transport pathway in bone and renal tissues of ovariectomized rats. Methods A total of 48 female SD rats were randomly divided a normal group, a sham operation group, a model group, a western medicine group, and a low and high dose Zuogui Pills group. Except the sham operation group and the normal group, ovaries of the rats in the other groups were removed, and the intervention of each group was carried out 3 months after the successful establishment of the model. Three months later, the rats were killed to detect the BMD; expressions of proteins involved in calcium transport pathway (renal tissue) was detected by Western blotting; and protein expression of TRPV5 in bone tissue of ovariectomized rats was detected by immunohistochemistry. Results Compared with the model group, the BMD of rats in the high dose Zuogui Pills group and western medicine group was increased ($P<0.05$); compared with the sham operation group, the expressions of proteins in the model group were decreased in varying degrees ($P<0.01$, $P<0.05$); Nilestriol and Zuogui Pills could increase the expressions of TRPV5 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5) protein, NCX1

〔收稿日期〕2019-04-15

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2015JJ2092);湖南省中医药管理局重点课题(201623)。

〔作者简介〕唐皓,男,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合防治骨伤疾病研究。

〔通讯作者〕*余娜,女,博士,副教授,E-mail:yuna0525@163.com。

(Sodium-calcium exchanger 1), CaBP-D28K (Calcium-binding protein-D28K) and PMCA1b (Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 1b) in the renal tissue of ovariectomized rats in different degrees, and the differences were statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$); immunohistochemistry showed that the expression of TRPV5 protein in the model group was increased compared with that in the sham operation group ($P<0.05$), while the protein expression rates in the western medicine group as well as high and low dose Zuogui Pills groups were decreased compared with that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Zuogui Pills can play a therapeutic role in osteoporosis by increasing the expressions of related proteins involved in renal calcium transport pathway and decrease the expression of TRPV5 protein in rat osteoclasts. The related proteins involved in calcium transport pathway in bone and renal tissues may become a new direction and target in the treatment of osteoporosis.

[**Keywords**] Zuogui Pills; ovariectomized rats; calcium transport pathway

近几年骨质疏松的发病人数在我国已经明显上升,在 60~70 岁阶段,约 33%的女性和 20%的男性患有该疾病,骨质疏松流行病对中老年人的生命安全、身体健康等形成一定的危害与威胁^[1]。到 2050 年中国骨质疏松症或骨密度低的患者将达到 2.12 亿^[2],骨质疏松症归属于中医学“骨痿”“骨痹”范畴。中医学认为,肾主骨,肾虚是绝经后骨质疏松症发生的始动病机^[3-4],肾精盛衰直接决定机体生、长、壮、老、已的生命活动状态。而骨的生长发育状况也直接与肾精盛衰密切相关。左归丸是滋阴补肾、填精益髓的名方,实验研究证明,左归丸具有类雌激素作用,能促进成骨细胞增殖,抑制破骨细胞的活性,维持二者的动态平衡,为中医“肾主骨”理论提供了有利的实验依据^[5-6]。瞬时性受体电位通道(transient receptor potential,TRP)家族成员新型上皮钙通道 5(TRPV5)是已知 TRP 中钙离子高选择性通道^[7],它在机体钙离子跨上皮转运方面发挥重要作用,参与调节整个机体的钙平衡。其介导的肾钙及骨钙转运过程与骨质疏松症的钙代谢紊乱有着密切的联系。本研究拟基于 TRPV5 介导的钙转运通路(肾组织、骨组织)探讨补肾经典方剂左归丸对骨质疏松症模型大鼠的疗效及作用机制。

1 材料

1.1 动物与药物

6 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 48 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物治疗合格证号 43004700022760。左归丸配方:熟地黄 24 g,山药 12 g,枸杞 12 g,山茱萸 12 g,川牛膝 12 g,菟丝子 12 g,鹿胶 12 g,龟胶 12 g(由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供),将药物水煎 2 次,合并滤液并浓缩致 0.48 g(生药量)/mL(相当临床等效剂量)、

1.92 g(生药量)/mL 浓度的药液(相当于临床 4 倍量)。尼尔雌醇(购自上海医药(集团)有限公司新华联制药厂生产,国药准字:H31021647,规格 2 mg/片)。

1.2 主要试剂

TRPV5(货号 17322-1-ap)、CaBP-D_{28k}(货号 14479-1-ap)、NCX1(货号 55075-1-ap)兔抗体均由(美国)proteintech 公司提供; β -actin 鼠抗体(货号 60008-1-Ig)、PMCA1b(货号 ab190355)兔抗体购自英国 abcam 公司;HRP goat anti-mouse IgG、HRP goat anti-rabbit IgG 购自美国 Proteintech 公司;中性树胶购自 Sigma 公司;苏木素、PBS(PH7.2-7.6)和枸橼酸盐缓冲液购自 Wellbio 公司;二步法试剂盒、DBA 试剂盒购自中杉金桥公司。

1.3 主要仪器

电泳仪(美国 Bio-rad 公司);蛋白酶抑制剂(德国 Merck 公司);台式高速冷冻离心机(中国深圳黑马公司);全自动酶标洗板机和多功能酶标分析仪(汇松公司);电泳槽(中国北京六一公司);转膜仪(中国北京六一公司);包埋机(常州中威电子仪器公司)、显微镜(Motic 公司)。

2 方法

2.1 分组

将大鼠随机分成左归丸高剂量组、左归丸低剂量组、西药组、模型组、正常组及假手术组,每组 8 只。除假手术组和正常组,其余组均切除大鼠双侧卵巢复制绝经后大鼠骨质疏松动物模型。

2.2 造模

造模方法参照文献[8],10%水合氯醛溶液对大鼠按 0.33 mL/100 g 体质量腹腔注射进行麻醉,将假手术组大鼠背部切开,进入腹腔,将卵巢找到,从其旁将一定量的脂肪(1 g 左右)剪除。将切除卵巢组

大鼠距脊柱外侧约 1 cm 与背部腋中线交叉部位的皮肤切开,腹腔打开,行两侧卵巢摘除术。伤口消毒 7 d,观察伤口愈合情况。

2.3 给药剂量及方法

6 组大鼠自由摄食、饮水,术后 3 月行活体骨密度(bone mineral density, BMD)检测验证模型复制成功,进行分组治疗干预。按 70 kg 的成人一天服用左归丸的生药量为 105 g 计算,人的给药量为 1.5 g/(kg·d),按照动物与人体表面积换算法,大鼠的临床等效给药量应为 9.45 g/(kg·d)。每组大鼠的给药体积均为 20 mL/(kg·d),根据大鼠每日给药量与给药体积,制备左归丸低浓度煎剂为 0.48 g 生药/mL(相当于临床等效给药量)、左归丸高浓度煎剂 1.92 g 生药/mL(相当于临床 4 倍量)。

中药低剂量组给予左归丸低浓度煎剂(0.48 g/mL),体积为 20 mL/(kg·d);中药高剂量组给予左归丸高浓度煎剂(1.92 g/mL),体积为 20 mL/(kg·d);西药组给予尼尔雌醇 1 mL/(kg·d)灌胃,使用前配成混悬液(浓度为 0.167 mg/mL),1 次/周,其余时间予生理盐水 20 mL/(kg·d)灌胃;假手术组和模型组的大鼠给予体 20 mL/(kg·d)的生理盐水灌胃饲服。以上干预治疗均持续 3 个月。

2.4 肾样品和股骨头的标本制备

肾样品制备:剪取大鼠 0.25 g 肾组织,用冰预冷 PBS 洗组织,加入 200 μ L RIPA 裂解液于匀浆器中反复研磨组织直至看不见组织块,以备 Western Blot 法检测大鼠肾组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白的表达。

股骨样品制备:将大鼠肌肉筋膜(附着在右后肢股骨)剔掉,以便进行大鼠样本骨密度检测。剪碎大鼠样本的暴露股骨(即大鼠左后肢股骨干骺端),以备免疫组化测试骨样本骨组织中 TRPV5 蛋白的表达。

2.5 观测指标

2.5.1 大鼠离体股骨上 1/3 BMD 测定 肌肉筋膜(右后肢全股骨)剔除条件下随之需要选择生理盐水将样本的筋膜洗净,用纱布和锡纸将筋膜裹好,双能 X 线骨密度仪(XR-26 型)进行大鼠样本的骨密度测试,采用 The Small Subject Scout Scan 软件进行数据研究。

2.5.2 Western Blot 法检测大鼠肾组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白的表达 通过清洗、蛋

白裂解、离心制备好肾样品;随后绘制蛋白标准曲线,算出蛋白浓度。灌胶、上样,根据蛋白定量的结果,计算出所有样品取样量,电泳、转膜。按 TRPV5(83KD)、CaBP-D28k(28KD)、NCX1(120KD)、PMCA1b(130-250KD)、 β -actin(42KD)所在位置进行切胶;室温条件下于 TBST 溶液(含 5%脱脂奶粉)内封闭膜(载蛋白质条带)60 min。进行一抗孵育、二抗孵育;孵育洗涤后,采用 ECL 化学发光显示液曝光。

2.5.3 免疫组化测试骨样本骨组织中 TRPV5 蛋白的表达 将股骨样品切片脱蜡至水;尿素、胰酶修复抗原;加入 3% H_2O_2 ,室温 10 min 以灭活内源性酶。PBS 冲洗 3 min \times 3 次;进行孵育一抗、孵育二抗、DAB 显色;苏木素复染 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝;各级酒精(60%~100%)脱水,每级 5 min。取出后置二甲苯 10 min,2 次,中性树胶封片、显微镜观察。使用 IPP 软件分析图像。

2.6 统计学方法

分析基于 SPSS 17.0 完成。单因素方差分析多组对比, t 检验两组对比,结果用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠离体股骨上 1/3 BMD 测定

BMD 检测结果:正常组大鼠与假手术组差异无统计学意义。与假手术组相比,模型组大鼠 BMD 显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,中药高剂量组、和西药组大鼠 BMD 均得到改善($P<0.01$)。与模型组中的大鼠相比,中药低剂量组大鼠样本 BMD 升高差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠离体股骨上 1/3 BMD 测定值

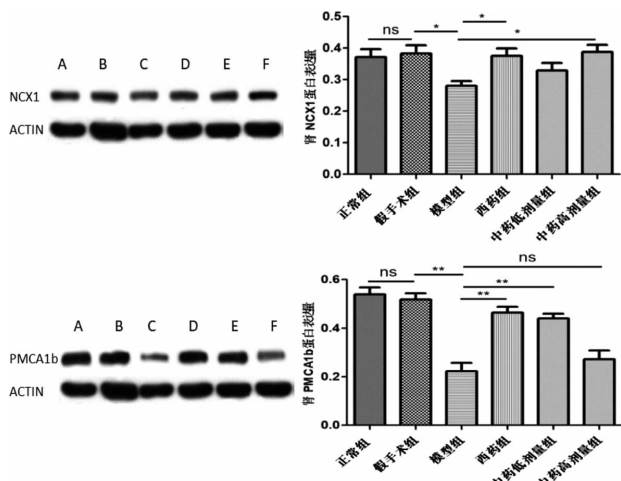
组别	n	股骨上 1/3 骨密度/(mg·cm ⁻²)
正常组	8	242.0 \pm 15.3
假手术组	8	240. \pm 18.5
模型组	8	201.0 \pm 17.7**
西药组	8	233.1 \pm 15.7###
中药低剂量组	8	214.0 \pm 17.3
中药高剂量组	8	235.66 \pm 15.1###

注:与假手术组比,** $P<0.01$;与模型组比,### $P<0.01$

3.2 大鼠肾组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白的表达

如图 1 所示 Western 法结果如下:和假手术组

比较,模型组各蛋白表达均有不同程度下调($P<0.01$ 、 $P<0.05$);与模型组相比,西药组和中药高剂量组中 TRPV5 蛋白与 NCX1 蛋白表达均有上调($P<0.05$), CaBP-D28k 蛋白表达有明显上调($P<0.01$);与模型组比较,PMCA1b 蛋白表达在西药组和中药低剂量组中均有明显上调($P<0.01$)。



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.西药组;E.中药低剂量组;F.中药高剂量组。与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,ns: $P>0.05$

图 1 各组 TRPV5、CaBP-D28K、PMCA1b 和 NCX1 的蛋白表达量

3.3 大鼠骨组织中 TRPV5 蛋白的表达

大鼠骨组织中 TRPV5 蛋白的阳性表达为细胞膜和胞浆被染成棕黄色。模型组 TRPV5 蛋白的阳性表达较假手术组的阳性细胞表达增加($P<0.05$),而西药组和中药高、低剂量组较模型组阳性细胞表达下降($P<0.05$)。见表 2 和图 2。

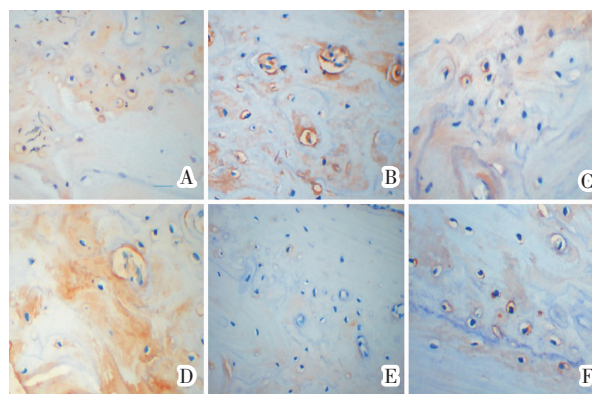
表 2 各组大鼠骨组织中 TRPV5 蛋白免疫组化结果($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	积分光密度值
正常组	0.535±0.292
假手术组	0.550±0.118
模型组	1.133±0.194*
西药组	0.685±0.134##
中药低剂量组	0.885±0.094##
中药高剂量组	0.595±0.190##

注:与假手术组比,* $P<0.05$;与模型组比较,## $P<0.05$

4 讨论

骨质疏松症属于中医学“骨痿”,骨痿中医病理本质核心是“肾虚髓亏”。中医学认为“肾藏精”即肾中精气是人体生理活动的原动力,肾精盛衰决定机体生、长、壮、老、已的生命活动状态。肾中精气不仅



注:A.西药组;B.中药低剂量组;C.中药高剂量组;D.模型组;E.假手术组;F.正常组

图 2 大鼠骨组织 TRPV5 蛋白免疫组化光镜图($\times 400$)

促进机体生长发育,同时也保证骨骼正常功能,因此,骨骼的生长发育状况也直接与肾精的盛衰密切相关。左归丸出自明代张景岳的《景岳全书·新方八阵》,主治真阴肾水不足,药物阴阳俱用,寓阳中求阴之意。补肾填精法是防治骨痿的基本大法,所以左归丸作为补肾填精的经典方,在防治骨质疏松症有很好的临床疗效。现代研究也证实左归丸具有类似雌激素样的调节作用,不仅能使血清骨钙素含量增加、降钙素含量降低^[9],升高大鼠骨量,改善骨小梁细小、稀疏和三维结构破坏的状况^[10],还能降低骨髓基质细胞 IL-1 和成骨细胞 IL-6 的表达和肾组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad4 的 mRNA 的表达^[11-12],从而达到纠正钙代谢紊乱,防治骨质疏松症的目的。

钙代谢紊乱是骨质疏松症发病的重要原因之一,钙离子通道的调控直接影响骨的代谢^[13]。现代研究证实 TRPV5 介导的钙转运通路存在于包括人与鼠类、兔等哺乳动物组织器官(如骨组织、肾脏等)。机体内钙稳态的调节主要靠肾、骨等器官的协调平衡,即肾钙滤过与重吸收,及骨钙的沉积与释放,从而达到调节血钙平衡的作用。肾钙的重吸收以及骨钙释放均与新型上皮钙通道 TRPV5 介导的钙转运通路密切相关。

肾脏是钙平衡重要器官之一,它是通过肾小球的滤过和肾小管的重吸收作用下完成的。现代研究证实 TRPV5 介导钙离子转运通道,其表达下降或缺乏可使肾小管对钙的重吸收减少^[14-15],这一过程主要是依赖浓度梯度的被动转运过程,也有少量的主动钙转运过程。肾钙重吸收过程也是以主动转运过程为主,CaBP-D28k 与钙离子有较高的亲和力,

因此在肾脏钙转运过程中发挥着非常重要的作用^[6],主要负责胞内钙离子的缓冲和向基底膜侧的运输。另外在基底膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶,在钙离子出膜转运中起钙泵的作用。位于基底膜的 NCX1 也是钙离子出胞所必需的溢出机制。而介导钙离子入膜的通道蛋白 TRPV5 是肾钙转运的主要入膜机制。PMCA 是 P 型 ATPase 家族中最大的^[7],它是钙离子的流出泵(通常具有高亲和力),钙含量(细胞中)是否能保持稳定状态主要取决于这种物质。

骨是调节钙平衡的关键器官之一,TRPV5 作为介导破骨细胞骨吸收的重要通道蛋白,其影响成骨细胞和破骨细胞活性,促进成骨方向的骨代谢转变,提高骨密度已经得到证实^[8]。

基于 TRPV5 与肾钙转运和骨钙转运的联系,本研究探讨左归丸对 TRPV5 介导的肾钙、骨钙转运通路相关蛋白的影响。研究发现,模型组去卵巢大鼠骨密度下降,标志着骨质疏松模型大鼠造模成功。采用尼尔雌醇与左归丸干预后,大鼠骨密度均有上升,提示雌激素与左归丸均有抗骨质疏松的作用。模型组大鼠肾组织中 TRPV5、CaBP-D28K、PMCA1b、NCX1 等介导肾钙转运过程重要通道蛋白均有下降,提示骨质疏松症是因为肾钙转运过程被抑制而致钙代谢紊乱引起。而尼尔雌醇及左归丸均可不同程度的上调上述蛋白的表达,提示左归丸通过上调肾钙转运过程重要通道蛋白而发挥对骨质疏松的治疗作用。而免疫组化结果显示,模型组较假手术组的 TRPV5 蛋白表达明显增加,而西药组和中药高、低剂量组较模型组 TRPV5 蛋白表达下降。提示去卵巢大鼠破骨细胞的骨吸收增强,而雌激素及左归丸的抗骨质疏松机制有可能是通过抑制 TRPV5 介导的破骨细胞的骨吸收而起作用。

参考文献

[1] 刘峰.骨质疏松流行病学及防治研究进展[J].医学理论与实践,2017,30(22):3321-3322.
[2] 白璧辉,谢兴文,李鼎鹏,等.我国近5年来骨质疏松症流行病学研究现状[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(2):253-258.

[3] 许惠娟,李生强,陈娟,等.绝经后骨质疏松症不同年龄段中医证型分布特点[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):157-161.
[4] 赖满香,林基伟,廖利平,等.基于中医传承辅助系统的治疗原发性骨质疏松症方剂组方规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(9):202-207.
[5] 李然,黄瀚,刘立萍,等.左归丸对去卵巢大鼠骨组织降钙素受体蛋白表达的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(12):2993-2995.
[6] 李微,张博,徐红丹,等.左归丸对卵巢切除骨质疏松症模型小鼠骨代谢的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(7):2807-2810.
[7] SHI D J, WANG K W. The progress of TRP channels in structural studies[J]. Progress in Physiological Science, 2014,45(6):401-409.
[8] 李昊,张西正.小鼠骨质疏松模型建立方法与评价指标选择概述[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(7):663-666.
[9] 谭峰,樊巧玲,卞玉群,等.左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):137-140.
[10] 卢建华,王维佳,陈明涛,等.补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响[J].中医正骨,2011,23(5):24-26.
[11] 陈剑磨,张胜军,夏炳江.左归丸对去势大鼠骨密度及骨组织TNF- α 、IL-1 和 IL-6 表达的影响[J].中华中医药学刊,2016,34(1):157-159.
[12] 任艳玲,李娅玲,吕海波,等.左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏 TGF- β 1/Smad4 的 mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):190-194.
[13] DIEDERICH S, FREIBERGER F, VAN GRIENSVEN M. Effects of repetitive and short time strain in human bone marrow stromal cells[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A,2009,88(4):907-915.
[14] 陈仲萍,林俊,王群,等.TRPV5 信号通路调控尿钙重吸收机制的研究[J].中国当代医药,2018,25(25):8-10.
[15] 周奕洲,王淑雯,罗嘉伟,等.金钱草提取液对大鼠肾 TRPV5 表达影响的实验研究[J].当代医学,2016,22(18):1-3.
[16] 牛煜,郑洪新.补肾中药对去势大鼠肾组织 CaBP-28 的 mRNA 蛋白表达的影响[J].中国医药研究,2012,10(24):450-451.
[17] PADANYI R, PASZTY K, HEGEDUS L, et al. Multifaceted plasma membrane Ca^{2+} pumps: From Structure to intracellular Ca^{2+} handling and cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016,1863(6 Pt B):1351-1363.
[18] 李绍烁,赵京涛,何昌强,等.山茱萸总甙干预骨质疏松模型大鼠骨代谢:TRPV6、TRPV5 通路的变化[J].中国组织工程研究,2019,23(11):1749-1754.