

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

刘平安,戴瑜婷,孟小莎,柳诗雨,高凡,张国民*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探究壮骨止痛方能否通过 TGF- β -Smad 通路治疗绝经后骨质疏松症,并探索其作用机制。**方法** 60 只雌性大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组和壮骨止痛方组并提取相应含药血清,提取培养原代成骨细胞并添加相应的含药血清继续培养,先后进行碱性磷酸酶、茜素红染色、免疫组化等一系列的指标检测。**结果** 见大量被染成了蓝紫色的成骨细胞以及橘红色钙化结节;TGF- β 、Smad 蛋白在壮骨止痛方组中表达水平明显高于空白对照组和假手术组,模型组中的蛋白表达水平最低,具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 壮骨止痛方可以通过 TGF- β -Smad 信号转导通路治疗绝经后骨质疏松症并可大量提高该通路的表达水平。

[关键词] 绝经后骨质疏松症;TGF- β -Smad;壮骨止痛方

[中图分类号] R285.5;R271.11*6

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.07.007

Effect of Zhuanggu Zhitong Decoction on the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis based on TGF- β -Smad Pathway

LIU Pingan, DAI Yuping, MENG Xiaosha, LIU Shiyu, GAO Fan, ZHANG Guomin*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the Zhuanggu Zhitong prescription on postmenopausal osteoporosis by TGF- β -Smad pathway, and to explore its mechanism. **Methods** Sixty female rats were randomly divided into blank control group, sham operation group, model group and Zhuanggu Zhitong Fang group and extract the corresponding serum, the primary into bone cells were extracted and cultured, and added with the corresponding serum to culture. A series of indexes on the cells, such as alkaline phosphatase, alizarin red staining and immunohistochemical staining were determined. **Results** A lot of cells were dyed blue purple and with orange red nodules of calcification. The TGF- β and Smad protein expression in Zhuanggu Zhitong Fang group was significantly higher than those in the blank control group and sham operation group. The protein expression level in model group was the lowest, with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** Zhuanggu Zhitong prescription can treat postmenopausal osteoporosis by TGF- β -Smad signaling transduction pathway and show a significant increase in the expression level of the pathway.

[Keywords] postmenopausal osteoporosis; TGF- β -Smad; Zhuanggu Zhitong decoction

绝经后骨质疏松症又称之为 I 型骨质疏松症,好发生在绝经后妇女,严重影响了生活质量。绝经后骨质疏松症主要是雌性激素分泌减少等原因而

导致单位体积内骨量减少、骨密度及骨强度降低、骨组织显微结构退化的一种全身代谢性疾病^[1]。据目前研究表明,TGF- β 在软骨内成骨过程中具有十分

[收稿日期] 2016-03-24

[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] 刘平安,男,副教授,硕士研究生导师,从事中药制剂与教学管理研究。

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

重要的作用,而 Smads 蛋白广泛表达于骨组织干骺端^[2],因此推测 TGF- β -Smad 信号转导通路可能通过影响成骨细胞的分化,从而来影响骨质疏松症的发生。本文拟对 TGF- β -Smad 信号转导通路在成骨过程中产生的作用,探讨壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的作用及机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 雌性大鼠 60 只,体质量(200 \pm 10) g,SPF 级(广东省医学实验动物中心提供),许可证号:SCXK(粤)2008-0002;新生 72 h 内 SD 乳鼠 10 只(湖南中医药大学实验动物中心提供),合格证号:SCXK(湘)2009-0004;饲料:标准普通饲料(湖南中医药大学实验动物中心提供)。

1.2 实验药物与试剂

实验药物:壮骨止痛方全方提取液(由中南大学天然药物系煎制);油相和水相的混合物。实验试剂:胰酶(PYG0068)、TGF- β 抗体及引物,Smad4 抗体(BM1637)及引物,山羊抗兔抗体(BA1040);DEME 低糖溶液,青霉素-链霉素混合溶液、II 型胶原酶(均由上海立菲生物科技公司提供);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);碱性磷酸酶染液,茜素红染液(均由 progema 生物科技公司提供)。

1.3 实验器材

低温离心机,37 $^{\circ}$ C 恒温箱,DNP-9162 型电热恒温培养箱,LEICA DM LB2 型双目显微镜。

2 实验方法

2.1 分组造模

将雌性大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、壮骨止痛方组各 15 只,称质量并作记录。根据文献方法^[3]进行造模,将雌性大鼠称质量并作记录。处理过程:2%的戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉。后背位固定,下腹部备皮,消毒。于腰椎两侧做约 1 cm 切口摘取卵巢。假手术组仅切取等量脂肪,分层缝合腹壁并乙醇消毒。处理后 3 d 内每日给予 80 万 U 青霉素。通过双能 X 线吸收法测定骨密度,选取骨密度有一定程度降低的大鼠做为造模成功的绝经后骨质疏松症的模型,进行下一步的实验。

2.2 含药血清的制备

造模后第 3 周开始按照人鼠比例折合灌胃,壮骨止痛方组使用骨质疏松症模型每天给予壮骨止痛方药物 1.5 mL/只,其他组给予生理盐水 1.5 mL/只,连续 12 周,药物剂量每周按体质量校正 1 次。末次给药 24 h 后,腹腔注射 2%戊巴比妥钠,腹主动脉取血 8 mL/只。4 $^{\circ}$ C 条件下放置 4 h,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,56 $^{\circ}$ C 条件下灭活 30 min。同组血清混合,经 0.22 μ L 滤菌器过滤分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 成骨细胞的提取与培养

取新生(24 h)SD 乳鼠 10 只放入无水乙醇中浸泡 20 s,待其死后置于 PBS 缓冲液中无菌剪分离颅骨并剔除冲洗干净,剪成 1 mm \times 1 mm 骨片置于 4 mL 0.25%胰蛋白酶内 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min 并离心,将骨片移入含 0.1%I 型胶原酶的离心管中,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴消化 1 h(30 min 震荡 1 次),1 000 r/min 离心 10 min 两次。分装加入培养液,置于体积分数为 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下培养,3 d 后首次换液,以后每 3 天换液 1 次。细胞融合后,用 0.25%胰蛋白酶进行消化,以 1:1 的方式将细胞传代,取第 3 代细胞用于实验指标的检测。

2.4 含药血清的添加

取第 3 代成骨细胞,经 0.25%胰酶消化,将细胞悬液以终浓度 2 \times 10⁴/mL 接种到 24 孔培养板中,分为 4 \times 4 孔,24 h 细胞贴壁后分别加入 1 mL 的各自血清,其间培养 3 d 换液 1 次。首次换液时收集培养上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存备用,用于免疫组化法检测。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

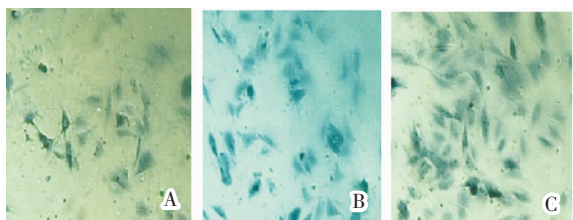
3 指标检测与结果分析

3.1 碱性磷酸酶染色(NAP)

在成骨细胞培养 6 d 后,使用碱性磷酸酶染液(偶氮偶连法)对成骨细胞进行染色,测定碱性磷酸酶活性。

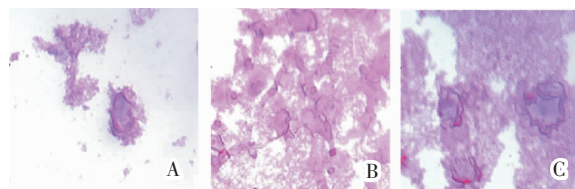
碱性磷酸酶染色细胞质染成蓝色,细胞核染成绿色,细胞呈阳性反应,说明该细胞可能为成骨细胞。见图 1。

3.2 茜素红染色(ARS)

图1 成骨细胞碱性磷酸酶染色($\times 400$)

成骨细胞培养 18 d 后进行茜素红染色。选择出现钙化结节较多的细胞培养组,使用 0.1% 茜素红-Tris-HCL 在 37 $^{\circ}$ C 条件下染色 30 min。茜素红为阴性染液,可与钙盐沉积物结合形成大量边界清晰的橘红色结节,以橘红色结节和边界清晰为标准,在 400 倍光学显微镜下观察并进行分化增殖计数。

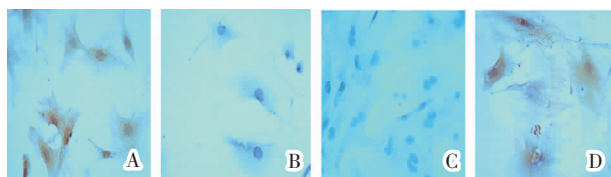
图中可见大量橘红色的结节,进一步证实该细胞为成骨细胞,并有大量的钙盐沉积,见图 2。

图2 成骨细胞茜素红染色($\times 400$)

3.3 免疫组化(IHC)

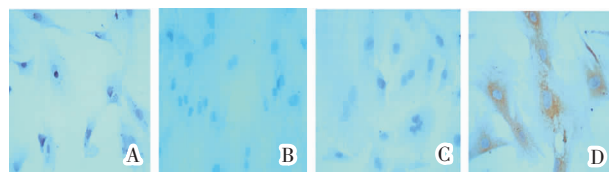
运用免疫组化法检测 TGF- β 、Smad4 蛋白的表达及分布情况。待细胞使用含药血清培养到第 3 代后,分别添加 Smad4 蛋白抗体、山羊抗兔抗体,然后通过 DAB 显色试剂盒显色,400 倍显微镜下观察成骨细胞形态。

3.3.1 TGF- β 蛋白表达 将爬片置于 400 倍光镜下可见壮骨止痛方组和空白对照组细胞呈阳性表达,细胞膜及细胞质被染成棕黄色,与其他组细胞的阴性表达形成鲜明对比,说明壮骨止痛方可以有效提高成骨细胞内 TGF- β 蛋白的含量。见图 3。

图3 TGF- β 蛋白免疫组化染色($\times 400$)

3.3.2 Smad 蛋白表达 400 倍光镜下放大观察。结

果显示,壮骨止痛组及空白对照组中有大量被染成棕黄色的成骨细胞,与他组成骨细胞的阴性表达对比明显(见图 4)。说明壮骨止痛方可以提高成骨细胞内 Smad 蛋白的含量。

图4 Smad 蛋白免疫组化染色($\times 400$)

使用免疫组化法检测成骨细胞内 TGF- β 蛋白、Smad 蛋白。爬片于 400 倍光镜下通过显微摄像系统随机选取 5 个视野进行图像分析,分别检测每个视野内 TGF- β 蛋白、Smad 蛋白含量并取其平均数,所得数据进行统计处理。结果见表 1。

通过数据分析可见,壮骨止痛方组内的 TGF- β 、Smad4 蛋白的表达水平明显高于空白对照组和假手术组,而模型组内的表达水平最低,说明壮骨止痛方可以帮助提高成骨细胞内 TGF- β 蛋白以及 Smad 蛋白的含量。结合前面的图片分析,得出壮骨止痛方可以通过提高 TGF- β -Smad 信号转导通路的表达水平来促进成骨细胞的成长与分化,从而积极发挥抗骨质疏松的作用。

表1 壮骨止痛方对 TGF- β 、Smad 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β (μ mol/L)	Smad 蛋白(μ mol/L)
空白对照区	15	35.22 \pm 1.48 [▲]	53.31 \pm 1.22 [▲]
假手术组	15	36.38 \pm 1.55 ^{▲▲}	48.42 \pm 1.25 ^{▲▲}
模型组	15	21.21 \pm 1.33	42.15 \pm 1.33
壮骨止痛方组	15	43.28 \pm 1.29 [▲]	47.25 \pm 1.47 [▲]
F 值		20.53	17.28
P 值		<0.001	<0.001

注:与模型组比较:▲ P <0.05;▲▲ P <0.01。

4 讨论

TGF- β -Smad 信号转导通路组成包括 TGF- β 信号分子和 Smad 蛋白。TGF- β 信号分子通过跨膜的受体复合物进行信号转导^[4],TGF- β 受体(T β R)主要有 I 和 II 型两种,是其传导过程所必需的^[5],其功能涉及细胞外基质沉积、生长抑制和细胞凋亡。TGF- β 基因通过调节骨沉积和破骨细胞的功能来

发挥抗骨质疏松,而其所表达的 TGF- β 蛋白通过促进成骨细胞的增殖分化、促进合成细胞外基质等机制来影响骨质的形成^[6],此外,TGF- β 也具有积极的骨质修复的功能,研究发现其与雌性激素浓度高度相关^[7]。Smad 信号蛋白是一种在 TGF- β 超家族成员细胞内信号转导中起重要作用的转录因子^[8],所有的 TGF- β 信号分子必须通过 Smad4 蛋白的介导才能进入到细胞核^[9],Smad6,7 为该通路的抑制剂。TGF- β -Smad 是 TGF 信号传导的一个经典途径。壮骨止痛方前期研究已证实对治疗骨质疏松症有良好疗效,已获国家新药证书(国药准字 Z20050125)^[10],壮骨止痛方通过提高 TGF- β -Smad 信号转导通路的表达水平来发挥治疗作用。在壮骨止痛方的作用下,TGF- β -Smad 信号通路大量表达,Smad 介导 TGF- β 信号通路活化结合、重组分离以及转移,涉及细胞膜一直到细胞核,调节成骨细胞与破骨细胞之间的相互作用,从而发挥积极的抗骨质疏松的作用。通过现代药理研究发现,其发挥正常作用的物质主要是一些化学物质和微量元素。

现代从 TGF- β -Smad 信号转导通路探讨其与骨质疏松症的相关性研究还处于起步阶段。本课题通过使用空白对照组、假手术组、模型组以及壮骨止痛方四个组相应的含药血清培养成骨细胞,从而来探讨壮骨止痛方治疗作用的实验设计思路,根据指标检测结果(结果可见壮骨止痛方组内成骨细胞的 TGF- β -Smad 信号转导通路表达水平明显高于其他组),证明 TGF- β -Smad 为壮骨止痛方治疗绝经后

骨质疏松症的一个重要通路,并且壮骨止痛方可以提高该通路的表达水平。这为治疗绝经后骨质疏松症提供了更精确的研究思路和依据。

参考文献:

- [1] 邓士琳.绝经后骨质疏松症运动疗法的研究进展[J].武汉体育学院学报,2009,43(1):59.
- [2] 任艳玲,郑洪新,杜松,等.补肾益气生精中药对去卵巢大鼠骨组织 Smad4 表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(5):42-46.
- [3] 沈薇,隋璐,苏禄晖.实验性骨质疏松症小鼠模型的建立[J].沈阳医学院学报,2006,8(4):245-250.
- [4] 代群.TGF- β -Smad 信号转导通路与骨质疏松症相关性研究进展[J].中外健康文摘,2010,7(33):2.
- [5] 王启伟,朴英杰.Smad 蛋白与 TGF- β 超家族[J].解剖科学进展,2003,9(4):339-342.
- [6] Li X, Li N, Ban C J, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in relation to gene polymorphisms of transforming growth factor- β 1 and plasminogen activator inhibitor 1 [J]. 2011, 124(13): 1 923-1 927.
- [7] 叶纯,苏进,王凡.淫羊藿影响去势大鼠椎骨微环境中 TNF- α 、TGF- β 1 表达的研究[J].中国临床解剖学杂志,2006,24(6):687-690.
- [8] 黄晓丹,吕辉珍,勒思思,等.雷奈酸锶通过 TGF- β 1/Smad 通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 [J]. 中国病理生理杂志,2013,29(2):302-307.
- [9] 胡金辉,周青,黄艳茹,等.前癯通胶囊抑制良性前列腺增生基质细胞 TGF- β 1 表达的体外实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(7):12-14.
- [10] 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.

(本文编辑 李杰)