

补骨脂水提取物对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏组织中 TGF- β 1/Smad4 信号通路转导的影响

金剑飞^{1△} 何维英¹ 孙可¹ 周钰龙¹

[摘要] 目的:探讨补骨脂水提取物(PCE)对绝经后骨质疏松症的作用及分子机制。方法:采用双侧卵巢切除法建立绝经后骨质疏松(OVX)大鼠模型,评估 OVX 大鼠的体质量变化,采用双能 X 线吸收测量仪测量全身骨密度值,采用 ELISA 法检测血清碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)及雌激素 E₂ 分泌水平,采用苏木精-伊红(HE)染色检测股骨病理变化,采用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测肾脏 TGF- β 1/Smad4 信号分子 mRNA 和蛋白的表达水平。结果:补骨脂水提取物对绝经后骨质疏松症具有潜在的保护作用,能够显著减小术后大鼠体质量的增加($P>0.05$),且增加 OVX 大鼠的全身骨密度值($P<0.05$);同时其呈剂量依赖性下调 ALP 和 ACP 水平及上调 E₂ 水平($P<0.05$),显著减小骨髓腔面积($P<0.05$);除此之外,其呈剂量依赖性下调 OVX 大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 及 Smad4 的 mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$)。结论:补骨脂水提取物对绝经后骨质疏松症具有潜在的保护作用,且与 TGF- β 1/Smad4 信号通路介导骨代谢紊乱有关。

[关键词] 补骨脂水提取物;骨质疏松症;信号通路;去卵巢大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)06-0001-05

The Effects of Water Extract from Psoralea Corylifolia Linn on the TGF- β 1/Smad4 Signaling Pathway in Ovariectomized Rats

JIN Jianfei^{1△} HE Weiying¹ SUN Ke¹ ZHOU Yulong¹

¹Department of Orthopedics, Zhuji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuji 311800, Zhejiang China.

Abstract Objective: To investigate the effect of water extract from psoralea corylifolia linn(PCE) on postmenopausal osteoporosis and related molecular mechanisms. **Methods:** Postmenopausal osteoporosis (OVX) rat model was established by bilateral ovariectomy. The bone mineral density was measured by dual-energy X-ray absorptiometry. ELISA method was used to detect the secretion levels of ALP, ACP and E₂ in rat serum. HE staining was used to detect the pathological changes of rat femur. RT-PCR and Western Blot were used to detect TGF- β 1/Smad4 pathway-related molecules at mRNA and protein expression levels in rat kidney tissue. **Results:** PCE had a potential protective effect on postmenopausal osteoporosis, and it could significantly reduce the weight gain of postoperative rats and increased the whole body bone density value of OVX rats ($P<0.05$). At the same time, it dose-dependently reduced the levels of ALP and ACP and up-regulated the level of E₂ ($P<0.05$), as well as significantly reducing the area of the bone marrow cavity ($P<0.05$). In addition, it dose-dependently down-regulated the kidney of OVX rats mRNA and protein expression levels of TGF- β 1 and Smad4 in tissues ($P<0.05$). **Conclusion:** PCE relieves osteoporosis by inhibiting bone metabolism disorders mediated TGF- β 1/Smad4 signaling pathway, and has potential effects in treating postmenopausal osteoporosis.

Keywords: psoralea corylifolia linn.; osteoporosis; TGF- β 1/Smad4 signal; ovariectomized rats

骨质疏松症是一种以骨密度降低及骨微结构退化为特征的慢性骨骼代谢性疾病,会增加骨脆性及骨折风

险^[1-4]。中药补骨脂有补肾壮阳、补脾健胃之功能,主治肾虚腰痛、骨萎、骨枯及骨痹。研究表明补骨脂的活性成分具有促进成骨细胞分化、增殖的作用^[5],但补骨脂水提取物(PCE)对骨质疏松症的作用及其机制依然不太清晰。因此,本研究使用去卵巢骨质疏松大鼠模型,探讨 PCE 对绝经后骨质疏松症的作用及相关分子机制。

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2018ZB132)

¹ 浙江诸暨市中医院骨二科(浙江 诸暨,311800)

[△]通信作者 E-mail: km2001xj@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

TGF-β1、Smad4 及 β-Actin 抗体 (CST, 美国); HRP 标记山羊抗兔 IG (Abcam, 英国); RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (碧云天); 尼尔雌醇片 (上海医药有限公司); 氨苄青霉素 (威仕特, 加拿大); 苏木精-伊红染色液 (碧云天); 碱性磷酸酶 (ACP)、酸性磷酸酶 (ALP) 及雌激素 (E₂) 大鼠 ELISA 试剂盒 (达科为)。

1.2 药物制备

称取 1 kg 的干燥补骨脂生药, 加入 1 L 水, 浸泡 30 min, 加热提取 2 h, 收集滤液, 再次向药渣加入 1 L 水, 加热提取 2 h, 收集滤液, 合并两次滤液, 浓缩, 然后用 65% 乙醇沉淀, 干燥, 得补骨脂水提取物 (PCE, 50.5 g 生药/g), 4 °C 保存。

1.3 动物分组及给药

所有动物实验均通过动物伦理委员会的同意和批准, 将体质量为 (250±5)g 的雌性 SD 大鼠 60 只随机分为假手术组、模型组、阳性对照组及 PCE 组 (PCE 50, 100, 200 mg/kg), n=10, 术后 8 周开始灌胃给药 PCE, 1 次/d, 连续 8 周, 假手术组和模型组均灌胃给予等体积的生理盐水, 阳性对照组灌胃给予尼尔雌醇 (20 mg/kg)。

1.4 方法

1.4.1 去卵巢骨质疏松 (OVX) 大鼠模型建立 采用双侧卵巢切除法建立去卵巢骨质疏松 (OVX) 大鼠模型, 造模前, 大鼠禁食 12 h, 腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 从大鼠背部脊柱两侧, 分离并切除双侧卵巢; 假手术组仅切除卵巢附近的脂肪组织, 术后缝合伤口, 计手术当周为第 0 周, 连续肌肉注射 4 d 抗生素 (氨苄青霉素, 4×10⁴ U/d)。

1.4.2 体质量和骨密度检测 体质量测量: 术前和术后使用体重秤测量大鼠的体质量, 每周 1 次, 连续测量 16 周。

骨密度检测: 腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉大鼠, 平放于双能 X 线吸收测量仪上, 测量大鼠全身的骨密度。

1.4.3 血液指标检测 采用 ELISA 法检测大鼠血清中 ACP, ALP 及 E₂ 的分泌水平, 大鼠眼球取血, 用 1.5 mL EP 管收集, 4 °C 静置 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清立即检测或置于 -80 °C 保存。

1.4.4 苏木精-伊红病理染色 大鼠脱颈椎处死, 分离收集实验大鼠的股骨组织, 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 然后用 EDTA 脱钙液 (10%, pH 8.0) 脱钙 15 d, 每 3 d 更换 1 次, 石蜡包埋, 切成 4 μm 薄片, 苏木精-伊红染色, 观察大鼠股骨的病理变化。

1.4.5 RT-PCR 检测 大鼠脱颈椎处死, 分离收集实

验大鼠的肾脏组织, 称取约 50 mg, 加入 1 mL TRIzol (诺唯赞) 提取组织总 RNA, 用 NanoDrop 2000 Spectrophotometer (赛默飞, 美国) 检测总 RNA 的纯度和浓度, 用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser (宝日医生物技术有限公司, 日本) 将 RNA (1 μg) 逆转录为 cDNA, 使用配有 SYBRs Green Master Mix (诺唯赞) 的 CFX Connect™ Real-Time 系统 (BioRad, 美国) 进行 qRT-PCR 定量分析, 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 30 s, 重复 40 个循环, 最后根据 2^{-ΔΔCt} 法计算 TGF-β1, Smad4, β-Actin mRNA 的表达水平, RT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列
TGF-β1	5'-CCAAGGAGACGGAATACAGG-3'
	5'-GTGTTGGTTGTAGAGGGCAAG-3'
Smad4	5'-TCAGCCAGCTACTTACCACCA-3'
	5'-ACACGTCCCCTTCACCTTTAC-3'
β-Actin	5'-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3'
	5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'

1.4.6 蛋白印迹免疫分析 (Western Blot) 大鼠脱颈椎处死, 分离收集实验大鼠的肾脏组织, 称取 50 mg, 采用 Western Blot 检测肾脏组织中 TGF-β1, Smad4 的蛋白表达水平。根据制造商说明操作提取组织总蛋白, 采用 BCA 法 (碧云天, 中国) 对蛋白进行定量, 加入 Loading buffer (4×) 于 100 °C 煮沸 5 min, 然后进行 SDS-PAGE 电泳来达到分离蛋白的目的, 电泳条件: 80 V, 30 min; 120 V, 60 min。随后采用 100 V, 90 min 将电泳分离后的蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, 美国), 用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, TBST 洗涤 5 次, 5 min/次, 用一抗 (TGF-β1, Smad4 及 β-Actin, 按 1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次, 5 min/次, 用二抗 (HRP 标记山羊抗兔 IG, 按 1:10 000 稀释) 孵育 90 min, TBST 洗涤 5 次, 5 min/次, 用 ECL 试剂 (Millipore, MA) 化学发光显影检测, ImageJ 分析灰度值。

1.5 统计学方法

所有数据均采用 GraphPad Prism 6.0 软件分析, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 用 One-Way ANOVA 进行多组数据的检验, P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCE 对 OVX 大鼠体质量和骨密度的影响

体质量结果表明术前实验大鼠的体质量差异均无统计学意义; 与假手术组相比, 从术后 3 周开始, 模型组、PCE 组及阳性对照组大鼠的体质量显著增加, 模型组持续至第 16 周实验结束; 第 8 周给药, 从第 9 周开始与模型组相比, PCE 组 (50, 100, 200 mg/kg) 和阳性对照组大鼠的体质量显著减轻 (见图 1a)。骨密度

检测结果表明与假手术组相比,模型组大鼠的骨密度值显著减小;与模型组相比,PCE 组(50,100,200 mg/kg)和阳性对照组大鼠的骨密度值显著增加(见图

1b),上述结果表明本研究成功建立了 OVX 大鼠模型,同时表明 PCE 对 OVX 大鼠的体质量和骨密度具有潜在的调节作用。

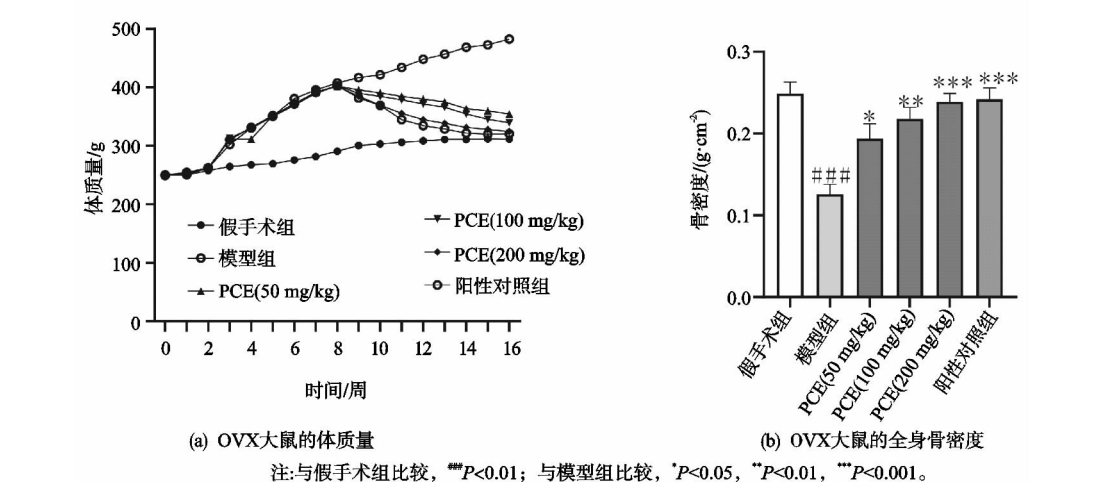


图 1 补骨脂水提取物对 OVX 大鼠体质量和骨密度的影响

2.2 PCE 对 OVX 大鼠骨代谢相关血液指标的影响

采用 ELISA 法检测 OVX 大鼠血清中骨代谢相关血液指标的分泌水平,结果表明与假手术组相比,模型组大鼠血清中雌激素(E₂)的含量显著降低,ACP 及

ALP 的含量显著增加;与模型组相比,PCE 组(50,100,200 mg/kg)与阳性对照组大鼠血清中 E₂ 的含量显著增加,ACP 和 ALP 的含量显著减少(见图 2),上述结果表明 PCE 能够影响 OVX 大鼠的骨代谢相关血液指标。

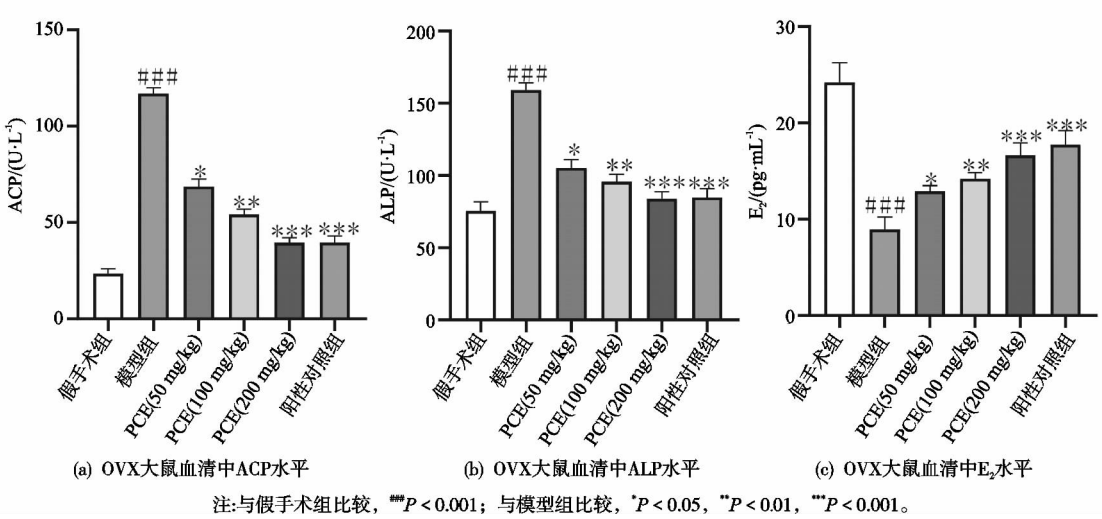


图 2 补骨脂水提取物对 OVX 大鼠骨代谢相关血液指标的影响

2.3 PCE 对 OVX 大鼠股骨骨髓腔面积的影响

采用苏木精-伊红染色检测 OVX 大鼠股骨的骨髓腔的变化,结果表明与假手术组相比,模型组大鼠的骨髓腔面积显著增加;与模型组相比,PCE 组(50,100,200 mg/kg)大鼠的骨髓腔面积有所减少,但依然大于假手术组(见图 3),上述结果表明 PCE 对 OVX 大鼠的骨髓腔变化具有一定的调节作用。

2.4 PCE 对 OVX 大鼠 TGF-β1/Smad4 通路相关分子 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 法检测大鼠肾脏组织中 TGF-β1/Smad4 通路相关分子的 mRNA 表达水平,结果表明与假

手术组相比,模型组大鼠肾脏组织中的 TGF-β1 及 Smad4 mRNA 的表达水平显著上调;与模型组相比,PCE(50,100,200 mg/kg)能显著抑制 OVX 大鼠肾脏组织中 TGF-β1 及 Smad4 mRNA 的表达水平(见图 4)。

2.5 PCE 对 TGF-β1/Smad4 蛋白表达的影响

采用 Western Blot 法检测大鼠肾脏组织中 TGF-β1/Smad4 通路相关分子的蛋白表达水平,结果表明与假手术组相比,模型组大鼠肾脏组织中的 TGF-β1 及 Smad4 的蛋白表达水平显著上调;与模型组相比,PCE(50,100,200 mg/kg)能显著抑制 OVX 大鼠肾脏组织中 TGF-β1 及 Smad4 的蛋白表达水平(见图 5),上述

结果表明 PCE 能够影响 OVX 大鼠肾脏组织中的 TGF- β 1/Smad4 通路。

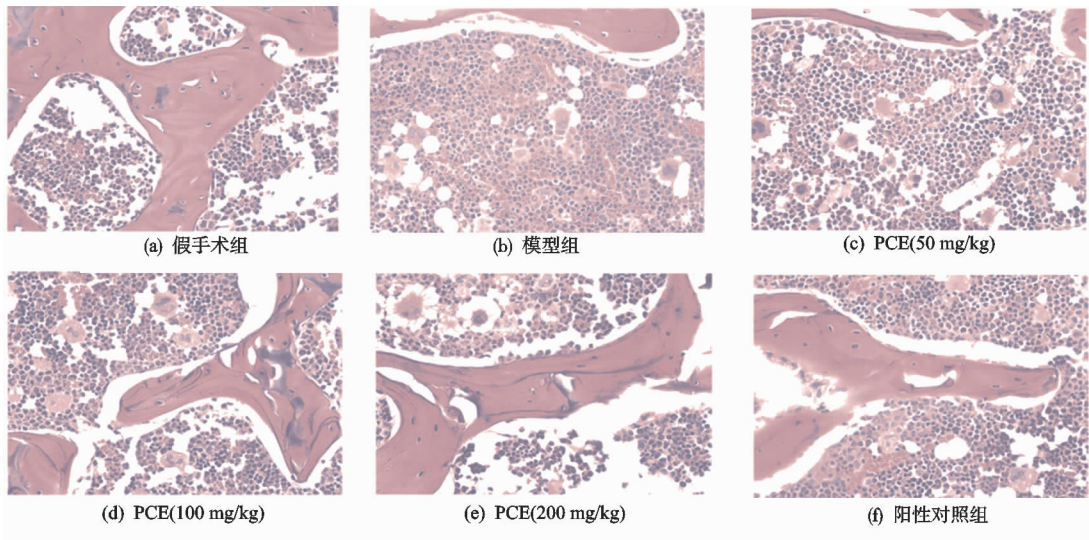
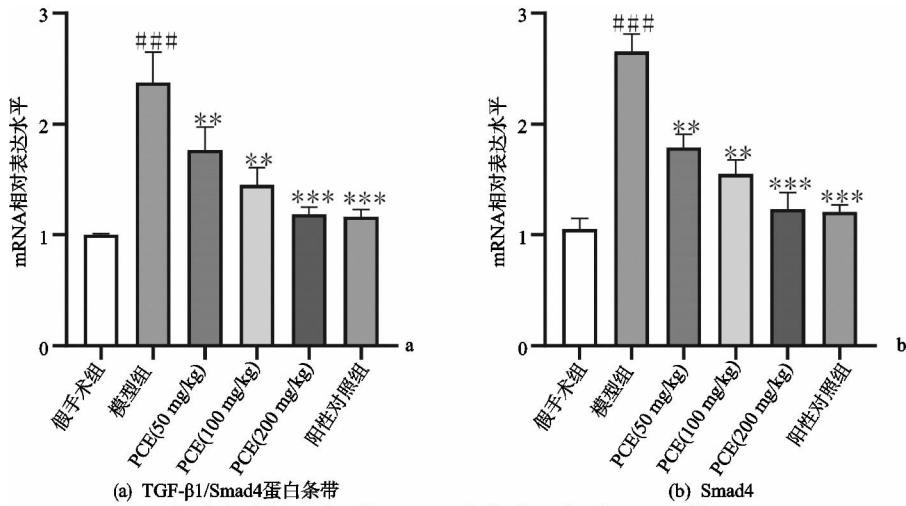
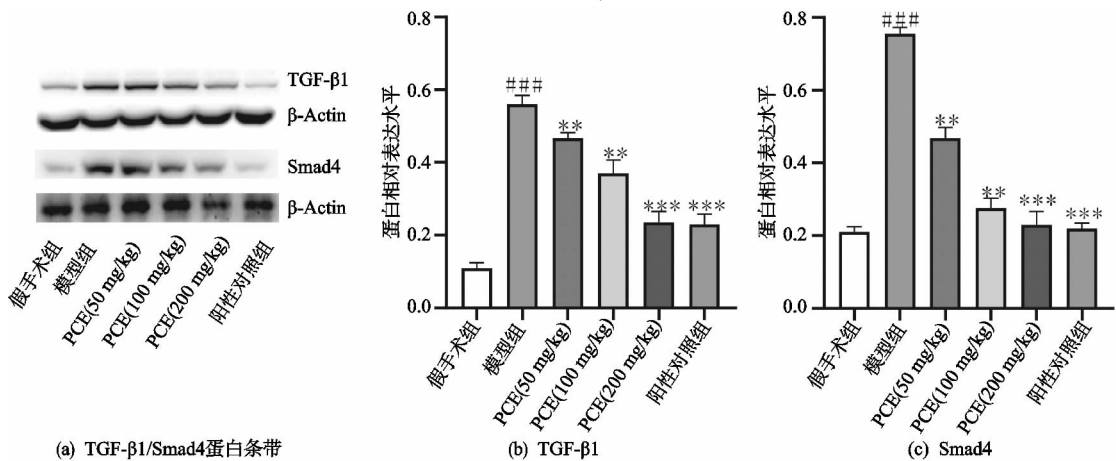


图3 补骨脂提取物对 OVX 大鼠股骨髓腔面积的影响(40 \times)



注:与假手术组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图4 补骨脂水提取物对 OVX 大鼠 TGF- β 1/Smad4 mRNA 表达水平的影响



注:与假手术组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图5 补骨脂水提取物对 OVX 大鼠肾脏中 TGF- β 1/Smad4 蛋白表达的影响

3 讨论

补骨脂作为一种传统中药其活性成分具有抗氧化、抗肿瘤及抗炎等多种活性,并且对于成骨细胞和破骨细胞的分化及增殖具有调节作用^[6]。

体质量增加是去卵巢骨质疏松大鼠的一种普遍症

状,其与绝经后妇女骨质疏松患者的临床症状相符合,因此,体质量增加作为判断 OVX 大鼠模型建立是否成功的标志之一^[7]。除此之外,骨质疏松患者的另一重要特点是全身骨密度值减小,因此骨密度减小作为判断模型建立是否成功的另一标志^[8]。本研究首先采

用去卵巢手术建立 OVX 大鼠模型,结果表明术后 3 周,与假手术组大鼠相比,模型组大鼠的体质量显著增加,且模型组大鼠的骨密度值显著减小,表明成功建立了 OVX 大鼠模型,为药物干预研究提供了实验基础。PCE 呈剂量和时间依赖性降低 OVX 大鼠的体质量,增加骨密度,表明 PCE 对绝经后骨质疏松症具有潜在的治疗作用。

骨重塑是一个动态的代谢过程,在骨骼的结构和功能调节方面发挥着重要作用,成骨细胞和破骨细胞是骨重塑的重要参与者^[9]。骨代谢血液标记物 ALP, ACP, E_2 被广泛用来评价骨重塑过程,研究表明去卵巢大鼠血清中 E_2 的水平下调,ACP 和 ALP 水平显著上调^[9-11],本研究的结果与其一致。同时,本研究结果表明 PCE 呈剂量依赖性下调血清中 ALP 和 ACP 的水平,上调 E_2 的水平。临床上骨质疏松症患者由于骨质流失的增加,最终导致骨髓腔面积显著增加^[12],本研究病理学结果表明模型组大鼠的骨髓腔面积显著增加,同时灌胃给予 OVX 大鼠 PCE 能够减小骨髓腔面积。上述结果表明 PCE 能够改善骨代谢相关的血液学指标,且对骨质疏松治疗具有潜在的价值。

传统中医理论认为肾虚是骨质疏松症的重要原因,肾脏与骨之间的关系密切相关,绝经后的女性肾精亏损,无力壮骨生髓,导致骨质疏松症的发生^[13]。补骨脂为治疗肾虚的传统中药,因此本研究从肾脏入手探讨 PCE 对治疗骨质疏松症的潜在分子机制。

TGF- β 1 是骨代谢过程中骨吸收和骨形成间的一种重要多肽类生长因子,其在骨代谢的平衡调节过程中发挥着重要作用^[14]。Smads 蛋白家族是 TGF- β 1 细胞内传导信号的唯一转导分子,Smads 能够与其他转录分子结合将应答信号由细胞膜转至细胞核,Smad4 是 TGF- β 1 各种信号转导所需的共同分子^[15]。研究表明 TGF- β 1/ Smad4 通路相关分子高表达于肾脏组织,且其信号转导异常是绝经后骨质疏松症发生的重要机制^[16]。因此,本研究通过观察 OVX 大鼠肾脏中 TGF- β 1/Smad4 的表达水平,进一步从肾精亏虚角度讨论补骨脂治疗骨质疏松症的分子机制。实验结果表明 OVX 大鼠肾脏中 TGF- β 1 和 Smad4 mRNA 及蛋白的表达水平均显著升高,灌胃给予 PCE 呈剂量依赖性下调 TGF- β 1 和 Smad4 mRNA 及蛋白的表达。

综上所述,本研究表明灌胃给予 OVX 大鼠 PCE 能够缓解绝经后骨质疏松症,且其与调节 TGF- β 1/Smad4 信号通路介导骨代谢紊乱有关。

参考文献

[1] SHEN C L, CHYU M C, WANG J S. Tea and bone health: steps forward in translational nutrition[J]. *AM J Clin Nutr*, 2013, 98(6): 1694-1699.

[2] COSTA A L D, BRITO L M O, NASCIMENTO A C B, et al. Osteoporosis in primary care: an opportunity to approach risk factors[J]. *Rev Bras De Reumatol*, 2016, 56(2): 111-116.

[3] SANDRA M S, MARIE N O, LLE H, et al. Phytonutrients for bone health during ageing[J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2013, 75(3): 697-707.

[4] BOOTHBY L A, DOERING P L, KIPERSZTOK S. Bioidentical hormone therapy: a review[J]. *Menopause*, 2004, 11(3): 356.

[5] 杨荣平, 寿清耀, 涂永勤, 等. 补骨脂提取物对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(1): 32-34.

[6] 张红莲, 王雅楠, 王建华. 补骨脂的化学成分及药理活性研究概况[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(5): 909-913.

[7] TABATABAEI-MALAZY O, SALARI P, KHASHA-YAR P, et al. New horizons in treatment of osteoporosis[J]. *Daru*, 2017, 25(1): 2.

[8] 任志帅, 程招军, 孙和军, 等. 膝关节关节炎全膝关节置换前骨质疏松的相关因素分析[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(22): 3212-3218.

[9] REMMERIEA A, SCOTTA C L. Macrophages and lipid metabolism[J]. *Cell Immunol*, 2018, 330: 27-42.

[10] LIU T T, XIANG Z M, CHEN F, et al. Theabrownin suppresses, in vitro, osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1339-1347.

[11] LIU T T, DING S H, YIN D, et al. Pu-erh tea extract ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis in rats and suppresses osteoclastogenesis in vitro[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 324.

[12] YANG Y, FAN X, TAO J, et al. Impact of prenatal hypoxia on fetal bone growth and osteoporosis in ovariectomized offspring rats[J]. *Reprod Toxicol*, 2018, 78: 1-8.

[13] 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 mRNA 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 190-194.

[14] LINDEN G J, HAWORTH S E, MAXWELL A P, et al. The influence of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker[J]. *J Periodontol*, 2017, 72(6): 808-814.

[15] HUMBERTO H, CAMERON M J, CURRY S M, et al. BMP and activin membrane bound inhibitor regulates the extracellular matrix in the trabecular meshwork[J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2018, 59(5): 2154-2166.

[16] SAKOU T, ONISHI T, YAMAMOTO T, et al. Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 14(7): 1145-1152.