

淫羊藿总黄酮对老年骨质疏松大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响

汪小飞¹ 李晶晶²

[摘要] 目的:观察淫羊藿总黄酮对老年骨质疏松大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响。方法:将 60 只老年雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型对照组、试验组(包括低、中、高剂量组)和阳性对照组共 6 组,试验组根据淫羊藿总黄酮灌胃剂量分为低剂量组、中剂量组和高剂量组,除空白对照组外,其他 5 组腹腔注射 D-半乳糖建立老年骨质疏松大鼠模型,造模 8 周后连续灌胃给药 12 周,观察各组大鼠的骨密度和股骨抗弯力,ELISA 法检测血清碱性磷酸酶(ALP)、骨保护素(OPG)及 25-羟基维生素 D (25OHD)含量,免疫组化法检测骨组织 Notch1 蛋白表达,免疫荧光法检测 Smad4 和 Smad7,并比较肝肾功能指标变化。结果:试验组和阳性对照组的骨密度、股骨抗弯力、OPG 和 25OHD 显著高于模型对照组,而 ALP 显著低于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.001$),但试验高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。试验组和阳性对照组的 Notch1 和 Smad4 蛋白表达显著高于模型对照组,而 Smad7 蛋白表达低于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.001$),但试验高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:淫羊藿总黄酮可增加老年骨质疏松大鼠骨密度,改善骨代谢,可能与上调 Notch1 和 Smad4 蛋白表达及下调 Smad7 蛋白表达有关。

[关键词] 骨质疏松;淫羊藿总黄酮;骨密度;蛋白;通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)02-0001-05

The Influence of Total Flavonoids from Herba Epimedii on the Protein Expression of Notch and Smads Signal Pathway in Senile Osteoporosis Rats Model

WANG Xiaofei¹ LI Jinjin²

¹The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;

²Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China.

Abstract Objective: To investigate the influence of total flavonoids from herba epimedii (TFHE) on the protein expression of Notch and Smads signal pathway in senile osteoporosis rats model. **Methods:** Sixty senile male SD rats were randomly divided into the blank control group, model control group, treatment group and positive control group, and the treatment group were divided into low group, middle group and high group. Excepted the blank control group, the other groups were given intraperitoneal injection of D-galactose to establish the senile osteoporosis rats model. After 8 weeks, all groups were given drugs by lavage continuous 12 weeks, the bone mineral density (BMD) and bending force of femur were observed. The levels of serum alkaline phosphatase (ALP), bone protection element (OPG), 25-hydroxy vitamin D (25OHD) were detected by ELISA method, Notch1 were detected by immunohistochemical method, and the expression of Smad4 and Smad7 were tested by immunofluorescence, the liver and kidney function index changes were compared. **Results:** The BMD, bending force of femur, OPG and 25OHD in the experimental group and positive control group were significantly higher than the model control group, the ALP was significantly lower than the model control group, the differences were statistically significant ($P<0.001$), but the experimental-H group and positive control group was no statistically significant difference ($P>0.05$). The protein expression of Notch1 and Smad4 in experimental group and positive control group were significantly higher than the model control group, and the Smad7 was lower than the model control group, the difference were statistical significance ($P<0.001$), but the Experimental-H group and positive control group was no statistically significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** TFHE can increase the senile osteoporosis rats BMD, improve bone metabolism, may be related to increase Notch1 and Smad4 protein expression, decrease Smad7 protein expression.

Keywords: osteoporosis; total flavonoids from herba epimedii; bone mineral density; Notch1 protein; Smads protein

¹ 浙江中医药大学附属第一医院药剂科(杭州, 310006)

² 浙江省立同德医院药学部

目前骨质疏松症(Osteoporosis, OP)缺乏有效的治疗手段,中医认为“肾虚精亏,阴阳两虚”为 OP 主要病机,而中药淫羊藿常用于治疗 OP,研究发现淫羊藿总黄酮是其抗骨质疏松的有效成分^[1,2]。研究发现 Notch 信号通路可调控破骨细胞的分化及功能,对骨细胞活性及骨重建起着关键作用^[3]。Smads 蛋白家族调节因子在骨重建中发挥着重要的作用,Smads 蛋白异常可抑制骨形成,加速骨破坏^[4]。本研究以腹腔注射 D-半乳糖建立老年雄性 OP 大鼠模型,通过研究淫羊藿总黄酮对老年 OP 大鼠骨密度、骨代谢指标及 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响,探讨淫羊藿总黄酮防治 OP 的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

16 周龄健康 SD 雄性大鼠,体质量(300±30)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2011-0011。

1.2 主要试剂和仪器

淫羊藿总黄酮胶囊,0.35 g/粒,江苏康缘阳光药业有限公司,生产批号 20170518;依替膦酸二钠片,0.2 g/片,正大天晴药业集团股份有限公司,生产批号 20170412;D-半乳糖购自美国 Sigma 公司;碱性磷酸酶(ALP)、骨保护素(OPG)、25-羟基维生素 D(25OHD)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所公司;Notch1,Smad4 和 Smad7 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

13R 离心机,力康集团力新仪器(上海)有限公司;7600 全自动生化分析仪,日本日立公司;Biotek aQuant 型酶标仪,上海坤肯生物化工有限公司;双能 X 线骨密度仪,美国 GE 公司;WE-1000B 型万能材料试验机,河北荣达路桥科仪器材厂。

1.3 模型的建立和给药

60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周,自由饮食,随机分为空白对照组、模型对照组、试验组(包括低、中、高剂量组)和阳性对照组共 6 组,试验组根据淫羊藿总黄酮灌胃剂量分为低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 10 只。除空白对照组外,其余 5 组均给予腹腔注射 D-半乳糖(150 mg/kg/d),连续腹腔注射 8 周,建立老年骨质疏松大鼠模型^[5,6]。8 周后,空白对照组和模型对照组给予生理盐水灌胃(等体积 0.9% NaCl),阳性对照组给予依替膦酸钠灌胃(40 mg/kg),试验低剂量组、中剂量组和高剂量组分别给予淫羊藿总黄酮(50, 100, 150 mg/kg)灌胃,连续给药 12 周后处死各组大鼠,观察并检测。

1.4 检测指标

1.4.1 骨密度和股骨抗弯力检查 试验结束后,10%水合氯醛麻醉,将大鼠右侧股骨中断置于双能 X 线骨密度仪上,测定大鼠右股骨的骨密度。取血后处死大鼠,取右股骨采用 WE-1000B 型万能材料试验机测定抗弯力。

1.4.2 骨代谢指标和肝肾功能指标测定 取各组大鼠主动脉血,离心,取上清,ELISA 法检测血清碱性磷酸酶、骨保护素、25-羟基维生素 D 含量。全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清肌酐酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平。

1.4.3 Notch1 和 Smads 蛋白表达测定 取右股骨远段且呈小块后,10%多聚甲醛固定 24 h,10% DE-TA-2Na 连续脱钙 3 周,石蜡切片包埋,取 5 μm 石蜡固定切片进行免疫组化,脱蜡,滴加 3%双氧水,5%牛血清白蛋白封闭液封闭,加入 Notch1 一抗,4℃过夜,按照说明书操作,显微镜观察,BI-2000 图象分析系统测量平均积分光密度值(IOD),IOD 值越大 Notch1 蛋白表达越强。取 3 μm 石蜡固定切片进行免疫荧光染色,常规脱蜡、水化,10%山羊血清封闭,加入 Smad4 和 Smad7 一抗,孵育过夜,洗涤,加入 TRITCFITC 和标记二抗,抗荧光衰减封片剂封片,光学显微镜观察,NIS-Elements BR3.2 软件测定 IOD 值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS19.0 进行统计数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对骨密度和股骨抗弯力的影响

与空白对照组比较,模型对照组的骨密度和股骨抗弯力显著降低,药物干预 12 周后,试验组和阳性对照组骨密度、股骨抗弯力显著高于模型对照组,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。试验高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($t = 0.445, 0.397, P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠骨密度和股骨抗弯力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	骨密度/(g·cm ⁻²)	股骨抗弯力/N
空白对照组	10	0.42±0.08	107.14±13.25
模型对照组	10	0.21±0.06	64.03±11.32
试验低剂量组	10	0.29±0.07	75.86±12.25
试验中剂量组	10	0.34±0.06	86.62±11.57
试验高剂量组	10	0.37±0.11	94.12±12.08
阳性对照组	10	0.39±0.09	96.23±11.69
<i>F</i>		16.793	22.826
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 对骨代谢指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组 OPG 和 25OHD 显著降低,ALP 显著增加,药物干预 12 周后,试验组和阳性对照组 OPG 和 25OHD 显著高于模型对照组,

而 ALP 显著低于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.001$)。试验高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($t=0.353,0.257,0.256,P>0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠骨代谢指标的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ALP/(U·L ⁻¹)	OPG/(ng·L ⁻¹)	25OHD/(ng·L ⁻¹)
空白对照组	10	116.34±10.28	11.35±2.14	20.17±3.42
模型对照组	10	213.51±18.35	5.03±1.86	9.67±2.36
试验低剂量组	10	189.64±15.26	6.75±2.11	12.57±2.64
试验中剂量组	10	163.57±13.55	8.23±2.36	15.71±2.58
试验高剂量组	10	142.06±14.08	9.67±2.25	18.69±2.71
阳性对照组	10	139.85±13.91	9.92±2.09	19.02±3.04
F		80.683	15.914	26.183
P		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 对 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型对照组 Notch1 和 Smad4 蛋白表达显著降低,而 Smad7 蛋白表达显著升高;药物干预 12 周后,试验组和阳性对照组的 Notch1 和 Smad4

蛋白表达显著高于模型对照组,而 Smad7 蛋白表达低于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);但试验高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($t=0.822,0.354,0.423,P>0.05$),见表 3 及图 1-2。

表 3 各组大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达 IOD 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Notch1	Smad4	Smad7
空白对照组	10	38.52±3.21	342.11±18.67	276.91±23.47
模型对照组	10	8.37±1.42	154.62±20.17	574.54±32.86
试验低剂量组	10	17.06±2.37	185.77±21.33	489.79±35.44
试验中剂量组	10	25.14±2.61	219.68±24.22	426.58±37.18
试验高剂量组	10	31.49±2.47	278.09±23.87	345.57±36.41
阳性对照组	10	32.51±3.05	281.70±21.66	339.25±30.17
F		265.408	150.135	147.868
P		<0.001	<0.001	<0.001

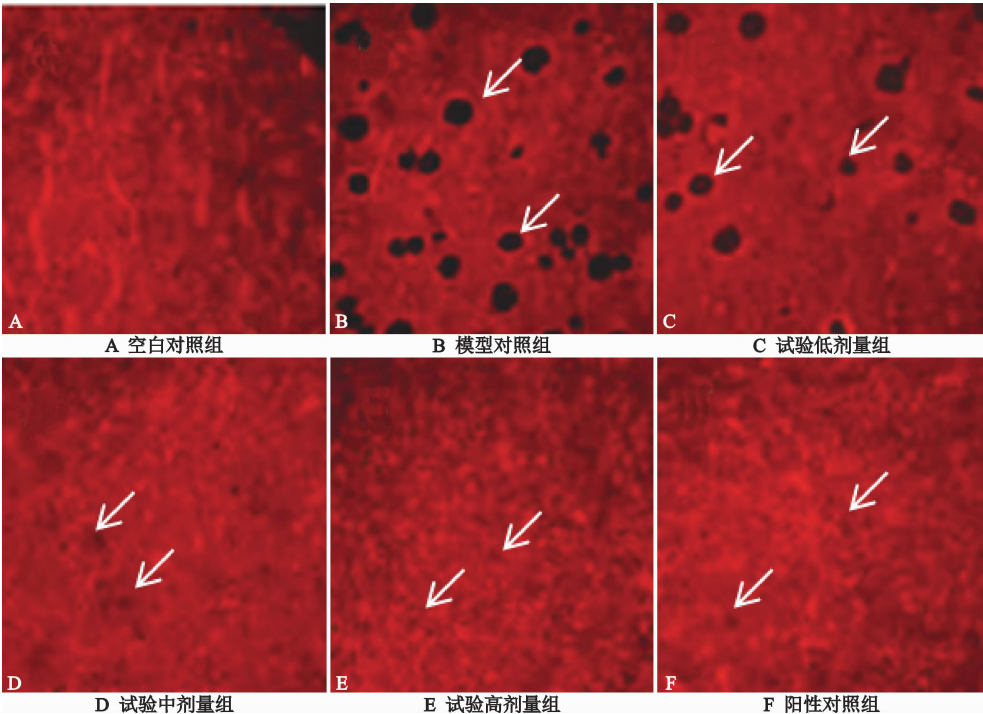


图 1 各组大鼠 Notch1 蛋白表达免疫组化图(200×)

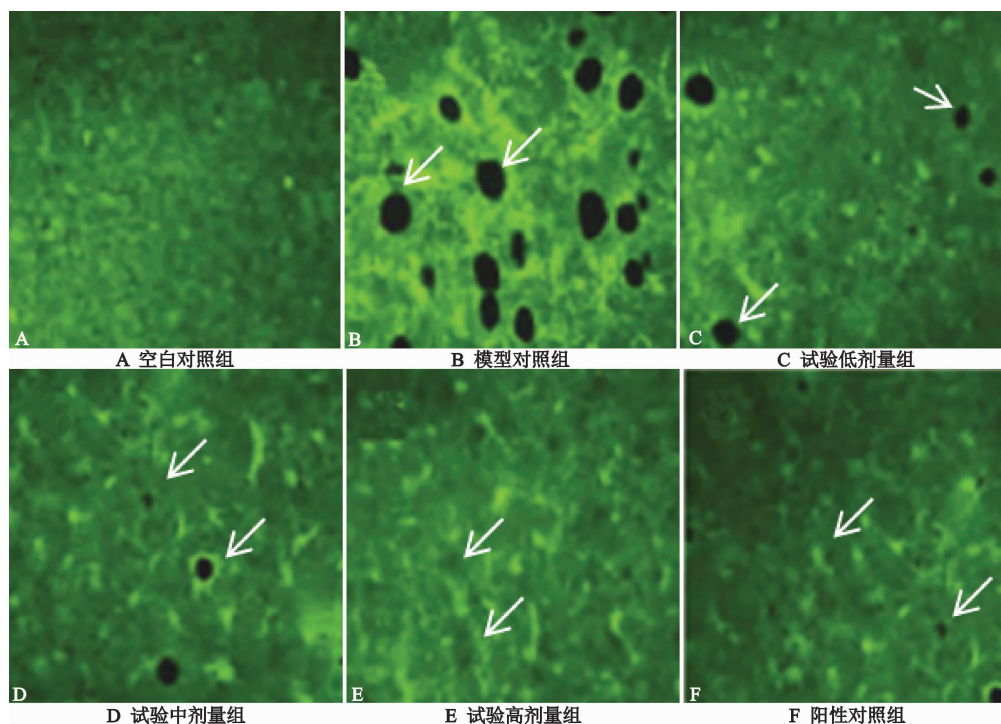


图2 各组大鼠 Smad7 蛋白表达免疫组化图(200×)

2.4 对肝肾功能的影响

与给药前比较,药物干预 12 周后,各组大鼠 ALT,AST,Scr 和 BUN 水平未见明显变化。

3 讨论

随着人口的老龄化,近年来 OP 已成为社会主要健康问题,OP 为全身性代谢性的骨骼疾病,骨形成和骨吸收动态失衡是发病关键环节,其发病与遗传、激素、营养、衰老等多因素有关,已造成沉重的医疗和社会负担,引起医疗界的广泛关注^[7]。OP 骨骼重建是通过骨组织局部区域内的多细胞实现的,诸多信号通路参与调节骨代谢过程,影响 OP 的发生发展^[8]。老年骨质疏松 SD 大鼠模型,骨吸收大于骨形成,松质骨的骨转化加快,骨强度下降,骨密度和股骨抗弯力常作为 OP 判断指标,本研究测定右股骨的骨密度和抗弯力。OP 骨代谢情况能得到反映骨转化的生化指标,以判断骨质疏松的形成及治疗疗效^[9]。研究表明 Notch 信号通路可调节多种细胞的分化、增殖和凋亡,参与 OPG 系统调控破骨细胞的分化及功能,Notch 受体 Notch1 可促进破骨细胞的分化与骨吸收能力,对骨细胞存活及骨重建起关键作用^[10]。Smad 蛋白是转化生长因子 β 家族重要的细胞因子,其中 Smad4 为通用型,参与激活素信号转导,Smad7 抑制转化生长因子 β 信号传导,共同参与 OP 的形成^[11,12]。大鼠 OP 属中医“骨痿”范畴,肾虚是骨质疏松发生的根本原因,淫羊藿具有补肾壮阳、强筋健骨功效,研究发现淫羊藿总黄酮就是淫羊藿抗骨质疏松的有效部位,但其对老年 OP 鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响尚不明确。

本研究发现老年骨质疏松大鼠骨密度、股骨抗弯力、OPG,25OHD,Notch1 和 Smad4 蛋白表达显著降低,ALP 和 Smad7 蛋白表达增加,治疗后试验组和阳性对照组的骨密度、股骨抗弯力、OPG,25OHD,Notch1 和 Smad4 蛋白表达显著升高,ALP 和 Smad7 蛋白表达降低,说明淫羊藿总黄酮可增加老年骨质疏松大鼠骨密度,改善骨代谢。淫羊藿总黄酮主要成分为淫羊藿苷、朝藿定 B,朝藿定 C 及宝藿苷-I 等,淫羊藿苷为其药效成分,常被用于抗骨质疏松作用机制研究^[13,14]。这与淫羊藿总黄酮治疗 OP 具有抑制骨吸收和促进骨形成的双重活性有关,抑制破骨细胞前体细胞的增殖,抑制破骨细胞中 p38 和 JNK 信号途径而抑制破骨细胞发生,使细胞周期停滞,诱导成熟破骨细胞凋亡,抑制破骨细胞特异性基因的表达而抑制骨吸收^[15]。淫羊藿苷通过 Notch 途径抑制 PPAR γ ,C/EBP α 和 FABP4 的表达,抑制假体磨损钛颗粒引起的炎性破骨细胞发生,提高成骨细胞和 Smad4 表达水平,刺激成骨细胞增殖及其成骨性分化,淫羊藿苷及其活性代谢产物还可提高大鼠成骨细胞的 OPG 表达水平来调控骨吸收,阻止破骨细胞前体细胞分化成熟,调节 OPG/RANKL 比值来调控骨吸收^[16,17]。此外,本研究药物干预 12 周后,各组大鼠 ALT,AST,Scr 和 BUN 水平未见明显变化,说明淫羊藿总黄酮具有较好的安全性。综上所述,淫羊藿总黄酮可增加老年骨质疏松大鼠骨密度,改善骨代谢,可能与上调 Notch1 和 Smad4 蛋白表达及下调 Smad7 蛋白表达有关。

参考文献

[1] 张禄镨,马剑雄,匡明杰,等.淫羊藿治疗骨质疏松的研究

- 进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24(4): 445-448.
- [2] WANG L, LI Y, GUO Y, et al. Herba epimedii: an ancient Chinese herbal medicine in the prevention and treatment of osteoporosis[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(3): 328-349.
- [3] FAN J Z, YANG L, MENG G L, et al. Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1/2): 85-93.
- [4] LIU J, LU C, WU X, et al. Targeting osteoblastic casein kinase-2 interacting protein-1 to enhance Smad-dependent BMP signaling and reverse bone formation reduction in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41295.
- [5] ZHU CT, LI T, ZHANG P, et al. Beneficial effects of low-level laser irradiation on senile osteoporosis in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(22): 5230-5238.
- [6] 赵亮, 张劲, 范彦博, 等. 盐炙杜仲对老年性骨质疏松模型大鼠骨组织 BMP-2 的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(5): 27-30.
- [7] PENG L, LUO Q. Efficacy and safety of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2017, 96(49): e8659.
- [8] 王洁, 王萧枫. 淫羊藿总黄酮的抗骨质疏松作用及其对调控成骨细胞分化及骨形成关键信号通路的影响[J]. 中医正骨, 2017, 29(1): 45-48.
- [9] 卢建华, 卢烨超, 金红婷, 等. 红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(9): 5-8.
- [10] 魏铂沉, 杨柳, 高博, 等. 人骨髓间充质干细胞中 Notch 信号上调对破骨细胞增殖的调控[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 466-470.
- [11] 刘平安, 戴瑜娉, 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.
- [12] 陈伟健, 谢炜星, 温龙飞, 等. Smad 与骨质疏松症[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8): 1100-1104.
- [13] 刘广飞, 程才, 王璐, 等. 淫羊藿苷治疗骨质疏松的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(26): 5185-5188.
- [14] 蒋俊, 崔莉, 孙娥, 等. 基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础[J]. 中草药, 2014, 45(5): 721-729.
- [15] LIU R, KANG X, XU L, et al. Effect of the combined extracts of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on sex hormone functional levels in osteoporosis rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med; eCAM, 2015: 184802.
- [16] 张禄锴, 马剑雄, 匡明杰, 等. 淫羊藿治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24(4): 445-448.
- [17] 冯云波, 刘小坡, 曹国龙, 等. 淫羊藿总黄酮对骨质疏松大鼠的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(15): 1425-1427.

(收稿日期: 2018-08-09)