

健腰密骨片延缓 OPG 基因敲除小鼠椎间盘退变的研究

薛纯纯^{1,2} 王拥军^{2,3} 梁倩倩^{2,3} 施杞^{2,3} 李晓锋^{1,2,△}

[摘要] 目的:观察健腰密骨片对 OPG 基因敲除小鼠椎间盘退变的影响。方法:30 只 12 周龄小鼠随机分为 WT, OPG^{-/-}, 健腰密骨片组, 每组 10 只, 健腰密骨片组采用含药饲料干预 3 个月, 3 月后取材获得各组颈椎, 以颈 5-6 椎间盘为观察对象, 甲苯胺蓝染色观察椎间盘形态, 免疫组化染色观察 I、II、X 型胶原的表达变化, qPCR 分析椎间盘组织中 Aggrecan 和 Col10α1 的表达。结果:甲苯胺蓝染色显示健腰密骨片组椎间盘软骨终板中部分缺损和钙化明显减少。免疫组化显示健腰密骨片促进 OPG^{-/-} 小鼠椎间盘 II 型胶原的表达, 降低 X、I 型胶原的表达, qPCR 结果显示健腰密骨片上调 OPG^{-/-} 小鼠椎间盘 Aggrecan mRNA 的表达水平, 下调 Col10α1 mRNA 水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:健腰密骨片可能通过改善椎间盘软骨细胞代谢延缓 OPG^{-/-} 小鼠的椎间盘退变。

[关键词] 健腰密骨片; 椎间盘退变; 骨保护素; 软骨细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)08-0008-04

Study of Jianyaomigu Tablet for Delaying Intervertebral Disc Degeneration in OPG Knockout Mice

XUE Chunchun^{1,2} WANG Yongjun^{2,3} LIANG Qianqian^{2,3} SHI Qi^{2,3} LI Xiaofeng^{1,2,△}

¹ Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China;

² Institute of Spinal Diseases of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200023, China;

³ Longhua Hospital Affiliated of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200023, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Jianyaomigu tablet (JYMGT) on intervertebral disc degeneration in osteoprotegerin(OPG)-deficient mice. **Methods:** Thirty 12-weeks-old mice were randomly divided into WT, OPG^{-/-} and JYMGT group ($n=10$). In JYMGT group, OPG^{-/-} mice were administrated with medicated drug diet for 3 months, after 3 months, the cervical intervertebral disc were collected from each group for analyses including toluidine blue staining for morphological, immunostaining for type I, II, X collagen changes. The intervertebral disc were also subjected to qPCR for mRNA expression of genes for chondrocytes-Aggrecan, Col10α1. **Results:** JYMGT could reduced the ossification and defect in the

endplate of the intervertebral discs in OPG^{-/-} mice.

Immunohisto-chemistry showed that JYMGT promoted expression of type II collagen, and decreased the expression of type X and I collagen. In addition, qPCR results investigated that JYMGT increased the expression of Aggrecan and decreased Col10α1 mRNA in the cartilage matrix of intervertebral disc in OPG^{-/-} mice. **Conclusion:** JYMGT may delay the intervertebral disc degeneration in OPG^{-/-} mice by regulating the chondrocytes metabolism of intervertebral disc.

Keywords: Jianyaomigu tablet; intervertebral disc degeneration; osteoprotegerin; chondrocyte

基金项目:国家自然科学基金项目(81973881, 81804122)

上海市卫生计生系统优秀青年人才培养项目
(2018YQ27)

上海高校青年骨干教师国内访问学者计划
上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划
(沪卫计人事[2019]72)

上海中医药大学“杏林百人”计划(上中医人字
[2020]23)

上海中医药大学后备卓越中医人才(上中医医管
字[2020]10)

¹ 上海中医药大学附属市中医医院(上海, 200071)

² 上海中医药大学脊柱病研究所

³ 上海中医药大学附属龙华医院

△通信作者 E-mail:lixiaofeng0409@163.com

骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)在骨代谢调控过程中具有重要的作用^[1], 全身性 OPG 基因敲除小鼠

(OPG^{-/-}小鼠)出现严重的骨质疏松表型^[2],因此后续的研究以该模式动物为研究对象,主要聚焦于以骨质疏松为主的骨代谢疾病中^[3-5],关于软骨退行性疾病(如椎间盘退变)的研究较少。

多种细胞表达和分泌 OPG,软骨细胞和纤维环细胞同样表达 OPG^[6],笔者发现 OPG^{-/-}小鼠随着增龄椎间盘退变逐渐加重,软骨终板部分骨化^[7],炎症因子表达,新生血管形成^[8]。健腰密骨片是上海市名中医施杞教授治疗骨质疏松症的经验方,原发性骨质疏松症和椎间盘退变均属于骨或/和关节的退行性疾病,基于中医“肾主骨”和异病同治原则,采用健腰密骨片早期干预 OPG^{-/-}小鼠,观察该方是否具有延缓 OPG^{-/-}小鼠椎间盘退变的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级 10 周龄雄性 OPG^{-/-}小鼠和 WT 小鼠购自上海南方模式生物中心(合格证号:SCXK(沪)2005-0002),其中 OPG^{-/-}小鼠 20 只,WT 小鼠 10 只,饲养在 SPF 级动物房,自由进食及饮水。适应性饲养 2 周后,30 只小鼠随机分为 3 组,分别为 WT、OPG^{-/-}、健腰密骨片组,每组各 10 只。

1.2 主要试剂

免疫组化试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Trizol(美国 Sigma 公司),逆转录试剂盒和荧光定量试剂(大连宝生物工程有限公司),蛋白酶 K(德国 Merck 公司),多克隆兔抗 I 型胶原抗体(美国 Abcam 公司),多克隆兔抗 II 型和 X 型胶原抗体(美国 Sata Cruz Biotechnology 公司),甲苯胺蓝染液、苏木素染液(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 主要仪器

离心机(德国 Eppendorf 公司,5417R),组织脱水机(德国 LEICA 公司,TP1020),轮转式切片(德国 LEICA 公司,RM2135),光学显微镜(日本 Olympus, BH-20),紫外分光光度计(美国 Beckman 公司,DU 800),荧光定量 PCR 仪器(美国 BIO-RED 公司, CFX96)。

1.4 药物制备及给药方法

由于 OPG^{-/-}小鼠为转基因小鼠,耐受性较差,本实验给药周期共 3 个月,周期较长,故采用含药饲料给药。

健腰密骨片由上海中医药大学附属龙华医院药剂科提供(炙黄芪 15 g,川芎 12 g,丹参 9 g,秦艽 12 g,蛇床子 15 g,女贞子 12 g,淫羊藿 12 g)。含药饲料按照文献^[9]制备,按照小鼠与人的体型系数换算等效剂量,每只小鼠按 5 g/d 计算,共 10 只,90 d 共需 4 500 g,考虑动物进食中的损耗,按 5 000 g 饲料制作。中药共 4 付煎成水煎剂,浓缩至 500 mL,加入到

5 000 g 饲料中,做成含药饲料。动物 2~3 只/笼,每 2 d 添加 1 次含药饲料,持续 90 d。

1.5 观察指标及检测方法

给药结束后,获得各组小鼠颈椎,其中各组 5 只固定进行组织学检测,5 只放于液氮固定以备后续 RNA 提取。组织学检测的标本在中性固定液 24 h 后,PBS 清洗 5 min×3 次,10%EDTA 进行脱钙,每 3 d 更换 1 次脱钙液,脱钙 4 周。标本脱水及石蜡包埋。冠状位连续切片,厚度为 7 μm,以椎间盘髓核最大时为中央部位的标准,取前后连续切片进行组织学检测。所有组织染色及 RNA 抽提取颈 5-6 椎间盘,用于 RNA 检测的标本采用 Trizol 法提取,方法具体如下。

1)甲苯胺蓝染色:组织常规脱蜡复水,甲苯胺蓝染液 15 s,蒸馏水洗,常规脱水透明及封片。2)免疫组化染色方法:组织常规脱蜡复水,3% H₂O₂ 孵育 10 min,PBS 浸洗 2 min×3 次,蛋白酶 K 进行抗原修复 15 min,PBS 浸洗 5 min×3 次,滴入 5%BSA 封闭 1 h。吸走 BSA 直分别滴加兔多克隆抗 X、II、I 型胶原一抗,4 ℃过夜。PBS 浸洗 5 min×3 次,加入二抗,37 ℃孵育 15 min,PBS 浸洗 5 min×3 次,抗生物蛋白链菌素-HRP,37 ℃孵育 10 min,PBS 浸洗 5 min×3 次,DAB 显色,苏木精染色 2 min,盐酸乙醇分化 5 s,氨水返蓝,脱水透明及封片。其中棕黄色着色为阳性表达。3)实时荧光定量 RT-PCR 方法:将椎间盘组织放入研钵中,按照 Trizol 法^[9]提取 RNA,随后按照 Takara 逆转录试剂盒说明书进行 RNA 的逆转录,反转录 1 μg,体系为 20 μL,条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,结束后加入 80 μL ddH₂O 将逆转录的 DNA 进行稀释。取各组样品 cDNA 2 μL,按照荧光定量 PCR 试剂说明配置 20 μL 反应体系进行 qPCR,β-actin 作为内参。条件为 95 ℃ 5 min 预变性,进入循环,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环,进入延伸,72 ℃ 30 s,4 ℃ 保持。程序结束后进行数值的计算与分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因		引物序列
β-actin	正向	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
	反向	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-G-3'
Col10α1	正向	5'-ACCCCAAGGACCTAAAGGAA-3'
	反向	5'-CCCCAGGATACCCTGTTTTT-3'
Aggrecan	正向	5'-CGCCACTTTCATGACCGAGA-3'
	反向	5'-TCATTTCAGACCGATCCACTGGTA-G-3'

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,计量资料以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲苯胺蓝染色

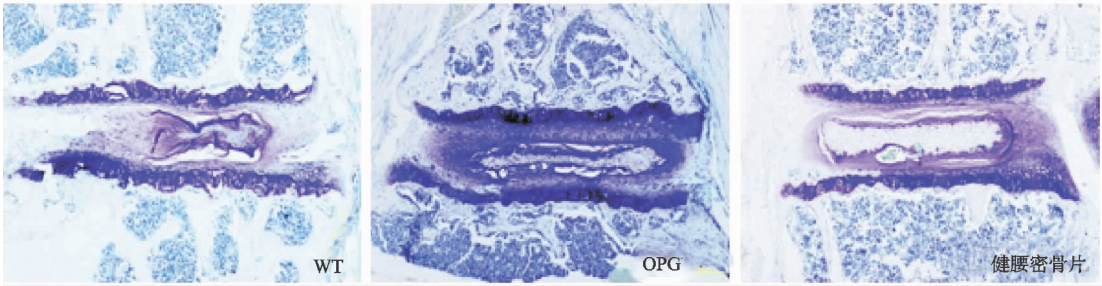


图 1 各组椎间盘甲苯胺蓝染色(×100)

2.2 椎间盘中 I、II、X 型胶原的表达

与 WT 小鼠比较, OPG^{-/-} 小鼠椎间盘 II 型胶原表达明显减少, I 型胶原和 X 型胶原表达增加; 与

与 WT 小鼠比较, OPG^{-/-} 小鼠椎间盘软骨终板中出现部分缺损, 缺损的部位被病理性新骨所代替; 与 OPG^{-/-} 小鼠相比, 健康密骨片组椎间盘软骨终板中的缺损和异位骨化明显减轻, 见图 1。

OPG^{-/-} 小鼠相比, 健康密骨片组的 II 型胶原蛋白表达增加, I 型胶原和 X 型胶原蛋白表达降低, 见图 2。

2.3 椎间盘组织中 AggreCan 及 Col10α1 的表达

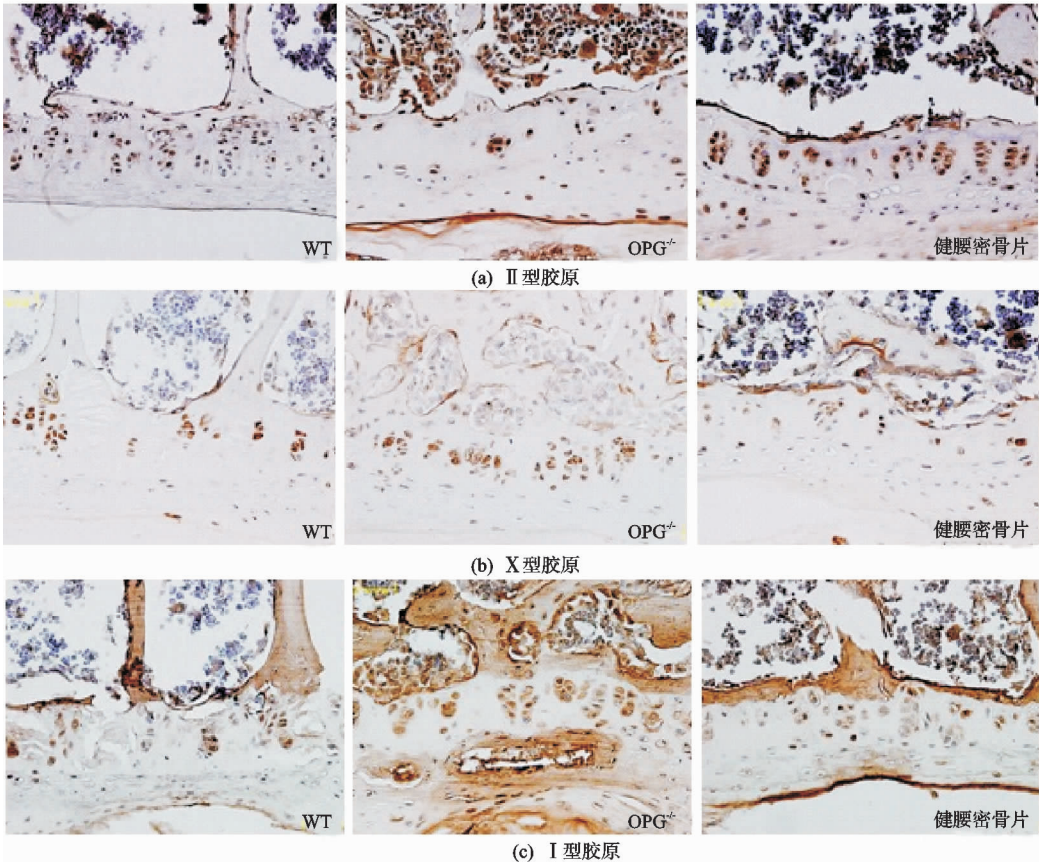
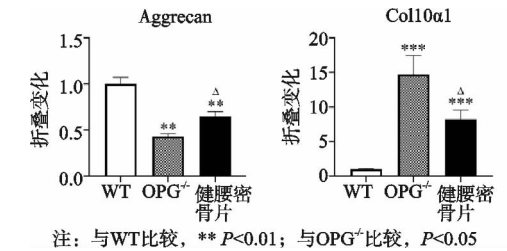


图 2 各组椎间盘软骨终板 II、X、I 型胶原蛋白的表达(×400)

与 WT 小鼠比较, OPG^{-/-} 小鼠椎间盘中 AggreCan 的水平明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 反之, Col10α1 表达明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 OPG^{-/-} 组相比, 健康密骨片上调 OPG^{-/-} 小鼠椎间盘组织 AggreCan 的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 下调 Col10α1 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。



注: 与WT比较, ** $P < 0.01$; 与OPG^{-/-}比较, $P < 0.05$

图 3 各组椎间盘组织中 AggreCan 和 Col10α1 mRNA 表达

3 讨论

健腰密骨片是上海市名中医施杞教授治疗骨质疏松症的经验方,由炙黄芪、川芎、秦艽、丹参、淫羊藿、补骨脂、蛇床子 7 味中药组成。诸药配伍,共奏补肾填精、强筋壮骨、益气化瘀之效。课题组前期实验研究证明该方能明显提高小鼠椎体骨量,促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,促进骨形成^[10]。原发性骨质疏松症和椎间盘退变性疾病的主要中医病机为肾虚,基于中医“肾主骨”理论和“异病同治”的原则,OPG^{-/-}小鼠出现的椎间盘退变同样可以补肾论治。因此笔者采用健腰密骨片来治疗 OPG^{-/-}小鼠出现的椎间盘退变,观察该方是否可以代偿 OPG 延缓 OPG^{-/-}小鼠的椎间盘退变,结果显示与 WT 组相比,甲苯胺蓝染色发现 OPG^{-/-}小鼠软骨终板部位出现一定比例的软骨缺失,而缺失的部位又被病理性新骨所替代。软骨终板是椎间盘的组成结构之一,对维持椎间盘的正常生理功能具有重要作用^[11],其表面分布有细小孔隙,相邻椎体内血管的营养物质可以通过软骨终板孔隙弥散至髓核内层及纤维环,同时髓核及纤维环分泌的一些因子及代谢产物可经软骨终板通道运输出去,完成椎间盘的代谢^[12],软骨终板结构改变将影响椎间盘的营养供应,最终引起椎间盘退变。健腰密骨片组椎间盘软骨终板部位的骨化和缺损明显减少,说明健腰密骨片对维持 OPG^{-/-}小鼠椎间盘软骨终板的完整性具有一定的作用。

椎间盘软骨细胞分泌 II 型胶原及蛋白多糖 (Aggrecan), II 型胶原呈丝状的胶原蛋白纤维可与 Aggrecan 相互交织成网状纤维结构,维持椎间盘的弹性及力学性能^[13],当软骨细胞外基质 II 型胶原及 Aggrecan 过度丢失,胶原纤维网破坏,胶原蛋白的组成将由 II 型胶原转变为 I 型胶原^[14]。研究发现椎间盘退变过程中,软骨细胞内 II 型胶原表达下降及 I 型胶原合成的增加将打破椎间盘内胶原组成的比例平衡,导致椎间盘原有的生理功能下降^[15]。X 型胶原是肥大软骨细胞(终末端软骨细胞)的标志性分子,免疫组化结果发现健腰密骨片能够促进 OPG^{-/-}小鼠椎间盘软骨终板 II 型胶原蛋白的表达,下调 X、I 型胶原蛋白表达。另一方面,健腰密骨片促进 OPG^{-/-}小鼠椎间盘组织 Aggrecan mRNA 的表达,抑制 Col10α1 mRNA 表达,说明健腰密骨片具有促进软骨细胞基质分泌、抑制软骨细胞肥大、改善软骨细胞代谢的作用。

以上研究提示健腰密骨片可能通过干预软骨细胞的基质代谢延缓 OPG^{-/-}小鼠出现的椎间盘退变,但是具体通过何种途径代偿 OPG 并不清楚,后续将进一步深入研究。以上结果提示健腰密骨片不仅可以治疗骨质疏松症,还可以延缓椎间盘退变,为临床应用该方治疗椎间盘退变性疾病提供实验数据,还提示补肾法是治疗骨代谢与脊柱退行性疾病的重要方法。

参考文献

[1] 向益,郑烽,王显. 基于 OPG/RANKL/RANK 通路探讨

单味中药治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(2):86-88.

- [2] BUCAY N, SAROSI I, DUNSTAN C R, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(9): 1260-1268.
- [3] LI X F, XU H, ZHAO Y J, et al. Icaritin augments bone formation and reverses the phenotypes of osteoprotegerin-deficient mice through the activation of Wnt/β-catenin-BMP signaling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 652317.
- [4] 赵永见,唐德志,程少丹,等. 不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢骨质疏松大鼠作用疗效的比较研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(2):147-151.
- [5] JIN Z X, LIAO X Y, DA W W, et al. Osteon enhances the bone mass of senile osteoporosis and stimulates the expression of osteoprotegerin by activating β-catenin signaling[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 154.
- [6] SPAHNI A I, SCHAWALDER P, ROTHEN B, et al. Immunohistochemical localization of RANK, RANKL and OPG in healthy and arthritic canine elbow joints[J]. *Vet Surg*, 2009, 38(6): 780-786.
- [7] LIANG Q Q, LI X F, ZHOU Q, et al. The expression of osteoprotegerin is required for maintaining the intervertebral disc endplate of aged mice[J]. *Bone*, 2011, 48(6): 1362-1369.
- [8] LI X F, XUE C C, ZHAO Y J, et al. Deletion of OPG leads to increased neovascularization and expression of inflammatory cytokines in the lumbar intervertebral disc of mice[J]. *Spine*, 2017, 42(1): E8-E14.
- [9] 马娜,赵海霞,陈茜,等. 五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(14):2985-2990.
- [10] 唐德志,杨洲,笪巍伟,等. 不同剂量健腰密骨片对骨形成和小鼠骨髓间充质干细胞中 BMP-7 表达的影响[J]. 上海中医药杂志,2016,50(7): 72-75.
- [11] 曹旺烽,陈长贤. 椎间盘软骨终板退变的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(10):70-74.
- [12] DELUCCA J F, CORTES D H, JACOBS N T, et al. Human cartilage endplate permeability varies with degeneration and intervertebral disc site[J]. *J Biomech*, 2016, 49(4):550-557.
- [13] WANG W J, YU X H. MMPs and ADAMTS in intervertebral disc degeneration[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448: 238-246.
- [14] URITS I, CAPUCO A, SHARMA M, et al. Stem cell therapies for treatment of discogenic low back pain: a comprehensive review[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2019, 23(9):65.
- [15] KIM J W, JEON N, SHIN D E, et al. Regeneration in spinal disease; therapeutic role of hypoxia-inducible factor-1α in regeneration of degenerative intervertebral disc[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10):5281.

(收稿日期:2021-03-01)