

五味子对去卵巢致骨质疏松大鼠胫骨护骨素、核因子- κ B 受体活化因子配体蛋白表达的影响

李 艳¹ 董佳梓¹ 贾朝娟¹ 赵宏艳¹ 赵红霞¹ 张治国¹
刘梅洁¹ 李 湧¹ 王 震¹ 刘铭福¹ 查青林² 鞠大宏¹

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京市东直门南小街 16 号, 100700; 2. 江西中医学院)

[摘要] **目的** 探讨五味子对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理。**方法** 将 59 只雌性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、阳性对照组及五味子组, 其中五味子组 11 只, 其余每组 12 只。摘除大鼠双侧卵巢 1 个月后, 五味子组灌服五味子水煎剂(1g/ml), 阳性对照组予己烯雌酚(0.008mg/ml)灌胃 3 个月(5.6ml/kg)。对不脱钙骨切片进行形态计量并检测胫骨成骨细胞(OB)和骨髓基质细胞(MSC)中护骨素(OPG)、核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)蛋白表达。**结果** 五味子组大鼠胫骨骨小梁体积百分比模型组显著增高, 除骨皮质类骨质平均宽度外, 骨小梁吸收表面百分比、骨小梁形成表面百分比、骨小梁矿化率术较模型组均显著降低, OB 及 MSC 中 OPG 蛋白表达明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), OB 中 RANKL 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。**结论** 五味子对卵巢切除大鼠骨质疏松症治疗作用机理之一是通过促进 OB 和 MSC 中 OPG 的分泌, 使之与 RANKL 的结合增多, 进而抑制破骨细胞的活性。

[关键词] 五味子; 骨质疏松症; 护骨素; 核因子- κ B 受体活化因子配体

Influence of Fructus Schisandrae Chinensis on Expressions of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand in Ovariectomized Rats

LI Yan¹, DONG Jiazi¹, JIA Chaojuan¹, ZHAO Hongyan¹, ZHAO Hongxia¹, ZHANG Zhiguo¹, LIU Meijie¹, LI Yun¹, WANG Zhen¹, LIU Mingfu¹, ZHA Qinglin², JU Dahong¹

(1. Institute of Basic Theories, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Fructus Schisandrae Chinensis on ovariectomy-induced osteoporosis in rats and its functional mechanism. **Methods** Fifty-nine female Wistar rats were divided into five groups randomly: twelve in the normal control group, twelve in the pseudo-operation group, twelve in the ovariectomy model group, twelve in positive control group, and eleven in the Fructus Schisandrae Chinensis group. One month after bilateral ovariectomy, the rats in the Fructus Schisandrae Chinensis group were administered the decoction of Fructus Schisandrae Chinensis(1g/ml), and those in the positive control group were administered diethylstilbestrol(0.008mg/ml). The treatment lasted 3 months with the dosage of 5.6ml/kg. The bone histomorphometric examination was conducted for the bone histomorphometric analysis with the undecalcified sections made from tibia of rats, and the immunocytochemistry method was applied to detect the expression of osteoprotegerin (OPG) of osteoblast (OB) and marrow stromal cells (MSC) and the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL). **Results** The percentage of tibial trabecular bone volume in the Fructus Schisandrae Chinensis group was significantly higher than that in the model group. Except for the bony cortex osteoid width, the trabecular bone resorption surface percentage, trabecular bone formation surface percentage, trabecular bone mineralization rate and bony cortex mineralization rate were all significantly lowered than those in the model group; the expression of OPG in OB and MSC was significantly heightened ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); while the expression of RANKL in OB was significantly lowered ($P < 0.05$). **Conclusion** One of the functional mechanisms of Fructus Schisandrae Chinensis in the treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in rats is to promote the increase of OPG in OB and in MSC secretion to strengthen their combination with RANKL to inhibit the activity of osteoclast.

Key Words Fructus Schisandrae Chinensis; Osteoporosis syndrome; Osteoprotegerin (OPG); Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

研究发现, 护骨素/核因子- κ B 受体活化因子配体/核因子- κ B 受体活化因子(OPG/RANKL/RANK)系统在绝经后骨质疏松症(Postmenopausal osteoporosis, PMO)发生机制中有重要作用, 特别是

OPG/RANKL 比例的改变可直接影响破骨细胞的发育、活性, 从而影响骨代谢^[1]。中医理论认为, “肾藏精主骨生髓”, 肾精充实, 则骨髓化生有源; 若肾精亏虚, 则骨髓化生乏源, 骨失其养, 会出现骨脆易折, 腰背疼痛等症, 与 PMO 表现相符, 因此, 肾虚是 PMO 发生的根本。基于以上认识, 本实验从成骨细胞(OB)和骨髓

基质细胞(MSC)和OPG、RANKL的角度,探讨五味子对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理。

1 材料与方法

1.1 动物

选用健康 Wistar 大鼠 59 只,雌性,体重 240~270g,清洁级,许可证号:SCXK-(军) 2002-001,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所清洁级实验动物室[许可证号:SYXK(京)-2005-0024]。

1.2 药物

购自广东省药材公司中药饮片厂,经中国中医科学院中药研究所生药室鉴定,为木兰科多年生落叶木质藤本植物五味子 *Schisandra chinensis*(tyrcz.) Bail.干燥成熟果实。加水煎煮,药液浓缩至 1g/ml 的浓度。

1.3 主要试剂及仪器

大鼠 OPG、RANKL 免疫组化一抗:购自美国 Santacruz 公司(批号:D1701、D2406),二抗二步法免疫组化检测试剂:购自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号:K106634B),DAB 显色试剂盒:购自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号:614646A);盐酸四环素:由欣惠泽奥科技有限公司公司提供(批号:20070901)。Reichert-Jung 2040 切片机:德国;OM 2563 冰冻切片机:美国 TBS 公司;Qwin 图像分析仪系统:德国 Leica 公司。

1.4 动物分组及处理

将 59 只 Wistar 大鼠按随机数字表分为 3 组:空白对照组(12 只)、假手术组(12 只)、造模组(35 只)。参照文献[2]的方法,摘除造模组大鼠双侧卵巢;假手术组只摘取少许脂肪组织。术后 1 个月,再将造模组大鼠按随机数字表分为 3 组:模型组、阳性对照组各 12 只,五味子组 11 只。

在摘除大鼠卵巢 1 个月后,开始灌胃给药。五味子组灌胃给予浓度为 1g/ml 的五味子水煎剂;阳性对照组灌胃给予药液浓度为 0.008mg/ml 的己烯雌酚。以上给药体积均为 5.6ml/kg 体重。连续 6d,休息 1d 后,再连续灌胃 6d,如此给药 3 个月。空白对照组、假手术组、模型组则按同法灌服等体积的蒸馏水。

各组大鼠处死前 15d 和前 3d 分别腹腔注射盐酸四环素 30mg/kg,以对骨进行荧光标记。给药结束后,将各组大鼠迅速处死,取右侧胫骨制作不脱钙骨切片,用于骨组织形态计量学指标的检测;取左侧胫骨制作冰冻切片,以检测 OB 和 MSC 中 OPG、RANKL 的蛋白表达。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 骨组织形态计量学指标的测定

取右侧胫骨近端 1/3,采用塑料包埋方法,制作不脱钙骨切片;其中一张切片进行甲苯胺蓝染色,另一张切片则直接用于荧光观察。采用 Leica Qwin 图像分析仪系统,对不脱钙骨切片进行形态学计量^[3]。

1.5.2 OB 和 MSC 中 OPG、RANKL 蛋白表达的检测

取左侧胫骨近端 1/3,按照文献[4]的方法进行标本处理,采用免疫组化的方法按照所附说明书进行检测,并用 Leica Qwin 图像分析系统对 OPG、RANKL 蛋白表达阳性密度进行计量。

1.6 统计学方法

采用 SAS 9.1.3 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异性比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 五味子对卵巢切除大鼠骨质疏松症骨组织形态计量学指标的影响

表 1 示,与假手术组相比,模型组大鼠胫骨骨小梁体积百分比(TBV%)明显降低,骨小梁吸收表面百分比(TRS%)、骨小梁形成表面百分比(TFS%)、骨小梁矿化率(MAR)、骨皮质类骨质平均宽度(OSW)和骨皮质矿化率(mAR)均显著升高。与模型组相比,五味子组的 TBV%显著增高,但低于假手术组和阳性对照组;TRS%、TFS%和 MAR 明显降低,而高于假手术组和阳性对照组;mAR 亦明显降低,与假手术组和阳性对照组相比,无统计学差异;OSW 与模型组、假手术组和阳性对照组相比,均无统计学差异。阳性对照组的 TBV%显著高于模型组,而与假手术组比较,无统计学差异;TRS%、TFS%、MAR、OSW 和 mAR 均明显低于模型组,与假手术组比较无统计学差异。

2.2 五味子对卵巢切除大鼠胫骨 OB 和 MSC 中 OPG、RANKL 蛋白表达的影响

表 2 示,与假手术组相比,模型组大鼠胫骨 OB 和 MSC 中 OPG 蛋白表达阳性密度均明显降低。与模型组比较,五味子组 OB 和 MSC 中 OPG 蛋白表达阳性密度均显著增高;而与假手术组相比,MSC 中 OPG 蛋白表达的阳性密度明显降低,OB 的则无统计学差异;与阳性对照组比较,MSC 中 OPG 蛋白表达的阳性密度降低,OB 的则无统计学差异。阳性对照组 OB 和 MSC 的阳性密度均明显高于模型组;而与假手术组比较,无统计学差异。

模型组大鼠胫骨 OB 和 MSC 中 RANKL 蛋白表达阳性密度较假手术组均明显升高。五味子组 OB 中 RANKL 阳性密度与模型组比较明显降低;而 MSC 中 RANKL 阳性密度有降低的趋势,但无统计学差异(*P* > 0.05)。与假手术组和阳性对照组比较,五味子组

表1 各组大鼠胫骨TBV %、TRS %、TFS %、MAR、OSW 和mAR 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TBV %	TRS%	TFS %	MAR($\mu\text{m}/\text{d}$)	OSW(μm)	mAR($\mu\text{m}/\text{d}$)
空白对照组	12	25.87±6.63	3.47±1.31	7.83±2.67	1.26±0.16	5.76±1.12	2.17±0.71
假手术组	12	25.10±5.55	3.66±1.40	8.12±2.58	1.20±0.15	6.06±1.23	2.36±0.64
模型组	12	10.32±4.52**	10.75±2.80**	15.31±4.08**	1.64±0.20**	7.63±1.72*	3.11±0.68*
阳性对照组	12	22.89±5.32△△	4.07±1.35△△	7.17±2.75△△	1.18±0.17△△	6.23±1.48△	2.46±0.76△
五味子组	11	17.57±4.36**△△▲	6.16±1.50**△△▲	10.63±3.02**△△▲	1.40±0.22**△▲	6.42±1.30	2.48±0.52△

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与阳性对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表2 各组大鼠胫骨OB 和MSC 中OPG、RANKL 蛋白表达的阳性密度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG		RANKL	
		OB	MSC	OB	MSC
空白对照组	12	1.51±0.48	6.15±1.85	1.16±0.29	4.28±1.72
假手术组	12	1.43±0.43	6.66±2.05	1.20±0.36	4.92±1.82
模型组	12	0.89±0.32**	2.62±1.30**	1.67±0.42**	8.75±2.18**
阳性对照组	12	1.48±0.41△△	6.04±1.91△△	1.09±0.32△△	5.23±1.49△△
五味子组	11	1.26±0.35△	4.42±1.51**△△▲	1.26±0.35△	6.94±2.06*▲

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与阳性对照组比较,▲ $P<0.05$

OB 中 RANKL 阳性密度无统计学差异;MSC 中 RANKL 阳性密度增高。与模型组相比,阳性对照组 OB 和 MSC 中 RANKL 阳性密度均明显降低;而与假手术组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

PMO 是目前发病率较高的骨代谢性疾病,其发生的主要因素是雌激素缺乏,特点是骨吸收和骨形成都亢进的同时,骨吸收更为活跃,是一种骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松症。本实验结果显示,切除大鼠卵巢后,作为骨量主要标志的TBV %显著降低,而骨吸收参数TRS %以及骨形成参数TFS %、MAR、OSW 和mAR 均显著增高,从而进一步证明了这一点。给卵巢切除大鼠灌服五味子后,除OSW 外,上述其余指标在一定程度上均发生了逆转,但均达不到假手术组和阳性对照组的水平。提示五味子对PMO 具有一定的治疗作用。

研究表明,OPG/RANK/RANKL 系统是破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路。OPG 是缺乏跨膜区和胞浆区的肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员,主要由成骨细胞前体和间质细胞产生,是目前已知惟一与定位于成骨细胞膜上的RANKL 结合的受体^[1]。RANKL 主要为骨及骨髓的多种细胞产生,与破骨细胞膜上特异性受体RANK 结合,启动破骨细胞的分化、成熟和活化过程;OPG 竞争性RANKL 结合,阻断RANKL 与RANK 的结合,从而阻断破骨细胞的一系列生物学活性。OPG 通过阻断RANKL 的作用成为整个OPG/RANKL/RANK 系统的闸门,这确保了成骨细胞形成与破骨细胞形成的紧密耦联^[5]。

本实验结果显示,切除大鼠卵巢后,模型组OB 和 MSC 中 OPG 蛋白表达显著降低,RANKL 蛋白表达显著增高;五味子组OB 和 MSC 中 OPG 蛋白表达均显

著增多,OB 中RANKL 与模型组比较明显降低。此提示五味子对OB 和 MSC 中 OPG 的分泌具有促进作用,而对RANKL 的分泌具有抑制作用。

《医经精义》指出:“肾藏精,精生髓,髓养骨,故骨者,肾之合也,髓者,精之所生也,精足则髓足,髓在骨内,髓足则骨强。”本实验对切除大鼠卵巢所致骨质疏松症给予五味子补肾填精,以求“精足则髓足……,髓足则骨强”之功效。结果显示,五味子对切除大鼠卵巢所致的骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松症产生了明显地抑制作用,其作用机理之一是通过促进OB 和 MSC 中 OPG 的分泌,使之与RANKL 的结合增多,导致RANKL 的减少,进而抑制破骨细胞的活性,防止骨量的进一步丢失,达到治疗骨质疏松症的作用。

参考文献

[1] Hofbauer, Lorenz C, Heufelder, et al. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone disease[J]. Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(7):2355.
[2] 鞠大宏,张春英,王安民,等.温补肾阳方对去卵巢所致骨质疏松症大鼠IL-1 和IL-6 活性的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2000,6(4):29-32.
[3] 章明放,张乃鑫,谭郁彬.运动对雌性大鼠去势后骨质疏松症的作用[J]. 中华骨科杂志,1994,14(6):365-369.
[4] 鞠大宏,于福祿,张丽坤,等.滋阴补肾法对卵巢切除所致骨质疏松大鼠成骨细胞COX-2 蛋白和mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(12):918-920.
[5] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator osteoclastogenesis, lymphocyte development and Lymph-node organogenesis[J]. Nature, 1999, 397(6717):315.

(收稿日期:2010-02-04;修回日期:2010-06-02)

[编辑:行之]