

补肾壮骨中药对大鼠去卵巢后早期白细胞介素 6 介导的骨髓源性破骨细胞形成的影响

曾天舒 陈璐璐 夏文芳 黎慧清 周 慤

摘要 目的 观察补肾壮骨中药对大鼠去卵巢后早期骨髓源性破骨细胞形成能力和骨髓细胞表达白细胞介素 6(IL-6)、IL-6 受体(IL-6R)、gp130 基因的影响。方法 健康 3 月龄雌性 SD 大鼠 72 只,其中 24 只为假手术对照组;48 只去卵巢,随机分为去卵巢组和中药组,每组 24 只。分别于去卵巢后 2、4、6、12 周每组各取 6 只大鼠骨髓细胞作细胞培养和提取 RNA,培养第 6 天分别作瑞氏-吉姆萨染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,骨髓细胞 TRIZOL 提取总 RNA。结果 去卵巢后 2 周,去卵巢组破骨细胞形成数即多于对照组($P < 0.05$),骨髓细胞 IL-6 和 IL-6R 基因表达均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),第 4~6 周,上述改变达高峰,并持续至第 12 周;从 4~12 周,上述各指标中药组均明显低于去卵巢组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上各组全程未见 gp130 基因表达水平有明显变化。结论 本方所用补肾壮骨中药可以抑制大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞的生成,这一效应至少部分与其抑制骨髓细胞在去卵巢后过度表达 IL-6、IL-6R 有关。

关键词 补肾壮骨中药;骨髓源性破骨细胞;白细胞介素 6;白细胞介素 6 受体

Effects of Chinese Herbs for Supplementing Shen and Strengthening Bone on IL-6 Mediated Myelogenic Osteoclasts Formation of Ovariectomized Rats in Early Stage ZENG Tian-shu, CHEN Lu-lu, XIA Wen-fang, et al
Department of Endocrinology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430022)

Objective To observe the effect of Chinese herbs for supplementing Shen and strengthening bone (HB) on myelogenic osteoclasts formation, and gene expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor (IL-6R) and gp130 in bone marrow. **Methods** Seventy-two healthy female SD rats of 3 months, were randomly divided into three groups, 24 in the sham-operated group (A), 24 in the ovariectomized group (B) and 24 in the after ovariectomy HB treated group (C). Bone marrow cells of 6 rats from each group were respectively collected and cultured at four time points (2nd, 4th, 6th and 12th weeks after operation). After 6 days of culture, the bone marrow cells were differentiated by Wright-Giemsa stain and TRAP stain, and total RNA in them was extracted by TRIZOL. **Results** Beginning from the 2nd week, the osteoclasts formation in Group B was higher than that in Group A ($P < 0.05$), and IL-6, IL-6R gene expression significantly increased in Group B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). These changes reached the peak in the 4th to 6th week, with the level maintained to the 12th week. As for comparison of Group B and C, the above-mentioned changes were significantly weakened in the latter ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). No significant change of gp130 gene expression revealed in the whole course in either group. **Conclusion** HB could inhibit the myelogenic osteoclasts formation in ovariectomized rats, this effect may be correlated with, partially at least, its inhibitory effect on the over-expressed IL-6 and IL-6R gene expression in myelocytes after ovariectomy.

Key words Chinese herbs for supplementing Shen; myelogenic osteoclast; interleukin-6; interleukin-6 receptor

根据中医“肾主骨”理论,近年来许多学者采用补

肾中药治疗骨质疏松症取得了较为满意的疗效,但是从细胞和分子水平认识补肾中药防治骨质疏松的机理还远远不够。本研究应用的补肾中药由我科开发,以往的整体动物研究显示其具有抑制去卵巢大鼠骨吸收的作用^[1],但是其深入的作用机制不详。本研究着重探讨其对去卵巢大鼠骨髓白细胞介素 6(IL-6)介导的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.39770930)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科(武汉 430022)

通讯作者:曾天舒, Tel: 027-85726130, E-mail: tszeng@126.com

破骨活性的影响,试图从一个侧面在细胞与分子水平阐明其作用机制。

材料与方 法

1 主要试剂 DMEM 培养基(GIBCO);20%的胎牛血清(FCS,美国 GIBCO 公司);粒单核细胞克隆刺激因子(GM-CSF, Sigma 公司);1,25(OH)₂ 维生素 D₃(美国雅培公司);地塞米松(Sigma 公司);抗酒石酸性磷酸酶染色(TRAP)试剂盒购自中国医学科学院血液病研究所;Wright-Giemsa 混合染色剂由我院血液病研究所提供。

2 去卵巢大鼠模型的建立 健康 3 月龄雌性 SD 大鼠 72 只,体重 210~230 g(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),24 只作为假手术对照组;48 只经腹手术去卵巢后随机分为 2 组,分别为去卵巢组和中药组,各 24 只。

3 药物治疗 补肾壮骨中药主要组成:熟地黄、淫羊藿、补骨脂、山茱萸、骨碎补等。由我院药剂科制成水溶液浓缩物,相当于生药 4 g/ml。中药组每只动物每日灌喂 2 ml,中药浓缩液(约 32 g 生药/kg 体重);假手术对照组、去卵巢组均每只动物每日灌喂生理盐水 2 ml。分别于去卵巢后 2、4、6、12 周取每组各 6 只大鼠骨髓细胞作细胞培养和提取总 RNA。

4 细胞培养 骨髓干细胞来源破骨细胞培养方法参照文献^[2],主要步骤包括:无菌操作下完整取出一侧股骨,剪断两侧骨骺端,用 5 ml DMEM(含 10% FCS,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 mg/L)反复冲洗骨髓腔 3 次,收集骨髓细胞悬液,加入预先配好的培养体系,其内含 20% FCS, GM-CSF(1.25 ng/ml)、1,25(OH)₂ 维生素 D₃(10⁻⁸ mol/L)、地塞米松(10⁻⁷ mol/L);调整细胞数为 1 × 10⁷/ml。混匀后加入预置盖玻片的 6 孔板或预置骨片的 24 孔板内,置 CO₂ 培养箱,在 5% CO₂, 37℃ 条件下培养,每 2~3 天换液 1 次,6 天后,取出玻片进行固定及染色。

5 破骨细胞染色及鉴定 分别作瑞氏-吉姆萨染色和 TRAP 染色;以 TRAP 染色(+),细胞核 ≥ 3 个的细胞为破骨样细胞(osleoclast, OLC),对每个玻片上 10 个随机视野(200 倍)中的 OLC 计数,取其均值为每

张玻片的 OLC 数。每组大鼠计数 10 张玻片,取均值,结果以细胞数/玻片表示。

6 骨髓细胞基因表达的检测 如上法从另一侧股骨获得细胞悬液后用 TRIZOL(美国 GIBCO 公司)提取总 RNA,oligo(dT)作为引物,进行逆转录,逆转录酶为 Roche 公司产品;按参考文献^[3]设计 IL-6、IL-6R、gp130 以及内参照 LP-19(大鼠核糖体蛋白)的 PCR 引物序列,由大连 Takara 生物技术公司合成。引物序列如下:IL-6 引物:上游 5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC-3',下游 5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3';IL-6R 引物:上游 5'-TCACAGAGCAGAGAATGGACT-3',下游 5'-GTATGGCTGATACCACA-AGGT-3';gp130 引物:上游 5'-TCAACTTGTGGAACCATGTGG-3',下游 5'-TCCAAGTACACAGCATGTTCC-3';LP-19 引物:上游 5'-CTGAAGTCAAAGGG-AATGTG-3',下游 5'-CTCTAGTAGTTCTAGGACAGG-3'。

PCR 反应体系总体积为 20 μl,其中 cDNA50ng, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTP 1 μl(10mmol/L),引物各 20 pmol, Taq 酶(Roche 公司)1.5u/管。按下列条件进行扩增循环:首先 95℃ 预变性 4 min;然后 94℃ 变性 30 s,各对引物分别 61℃(引物 IL-6R)、62℃(引物 IL-6、gp130、LP-19),复性 45 s,71℃ 延伸 45 s,共 24 个循环。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描,并以 LP-19 为内参照校正作相对量分析,以 LP-19 光密度扫描数值为 100%,以两者之积分吸光度比值百分数表示(IMAGE1 图像分析系统,同济医学院千屏医学影像分司)。

7 统计学方法 各组间差异显著性检验用方差分析,组间两两比较用 q 检验。

结 果

1 各组大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成的比较 见表 1。去卵巢后 2 周,去卵巢组破骨细胞形成数即多于对照组(P < 0.05);中药虽有抑制作用但尚不显著(与去卵巢组比较,P > 0.05)。第 4 周时,去卵巢组破骨细胞形成达高峰,中药对破骨细胞形成亢进的抑制作用已十分明显(P < 0.01),第 6 周中药的抑制作用进一步加强,与破骨细胞数保持高峰水平的

表 1 各组大鼠去卵巢后不同时间破骨细胞形成的比较 (x̄ ± s)

组别	鼠数	去卵巢后不同时间骨髓源性破骨细胞数(个/玻片)			
		2 周	4 周	6 周	12 周
对照	24(6 只/次)	9.01 ± 1.41	14.01 ± 2.33	15.03 ± 2.63	14.61 ± 2.99
去卵巢	24(6 只/次)	14.50 ± 1.69*	27.63 ± 3.20**	29.63 ± 2.83**	20.51 ± 2.69**
中药	24(6 只/次)	12.50 ± 1.60*	19.50 ± 2.67**△△	17.38 ± 1.77*△△	15.87 ± 1.91*△

注:与对照组同期比较,* P < 0.05,** P < 0.01;与去卵巢组比较,△ P < 0.05,△△ P < 0.01

去卵巢组比较差异有显著性($P < 0.01$)。中药的抑制效应一直延续到去卵巢后的 12 周。

2 各组去卵巢大鼠骨髓 IL-6 及 IL-6R 基因表达的比较 见图 1、2。去卵巢后 2 周时,去卵巢组和中药组 IL-6 和 IL-6R mRNA 表达水平均与对照组比较有明显升高($P < 0.01$);而与去卵巢组比较,中药对 IL-6 和 IL-6R mRNA 表达增高没有明显抑制作用($P > 0.05$),与其对破骨细胞形成的作用相似。第 4 周时,尽管中药组和去卵巢组上述基因表达仍明显较对照组高,但是与去卵巢组比较,中药开始显示出抑制作用,对 IL-6 和 IL-6R 表达增高的抑制分别为 15%、27%,差异均有显著性($P < 0.01$)。第 6 周两者基因表达均达高峰水平,中药对 IL-6 的抑制比第 4 周更强,达到 24%,而对 IL-6R 的作用与第 4 周相似,为 26%。中药对去卵巢组 IL-6、IL-6R 基因表达的抑制作用持续到第 12 周($P < 0.05$),此时中药对 IL-6R 的作用更明显,12 周时其表达水平接近对照组($P > 0.05$)。以上各组全程未见 gp130 基因表达水平有明显变化。

讨 论

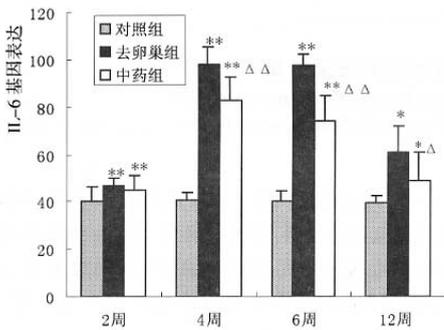
传统中医学本无骨质疏松症这一疾病名词,从其临床表现看当属中医学“骨痹、骨痿”范畴,其病因主要归为肾虚,因肾为先天之本,藏精、主骨生髓,其精髓直接充灌营养着骨。肾精充足,则骨髓充盈,骨骼充实健壮;一旦肾气衰弱,精不生髓,骨失所养,则骨质脆弱。早在《内经》中就已提出以补肾为主治疗骨病,近年来中药防治骨质疏松症亦不外乎补肾益精、补肾益肝、补肾健脾、补肾活血益气等方法。

本方所用补肾壮骨药物在以往的整体研究中体现出明显的抗骨质疏松作用,组织形态学参数显示其可以抑制去卵巢后的过度骨吸收^[1],但是其机制尚不明了。

绝经后骨质疏松症的发生主要因为雌激素水平下降导致骨吸收亢进。而骨吸收亢进与破骨细胞数量增加和活性增强有关。在本研究中,与人类在绝经的头 3~5 年发生快速骨丢失相似,大鼠去卵巢后早期(2 周)即出现破骨细胞生成亢进,此时中药的作用还不明显,而持续治疗第 4 周即可以明显抑制骨髓源性破骨细胞的生成,且效果随治疗时间延长而增强,在破骨细胞形成处于高峰的第 6 周也几乎到达最大抑制效应并持续到 12 周。这一结果提示补肾中药抑制去卵巢后的过度骨吸收是通过抑制破骨细胞的形成达到的,而早期和坚持用药可能收到更大益处。

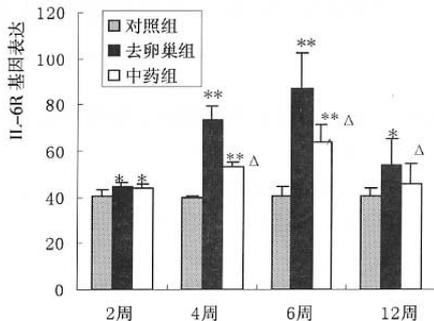
目前认为,IL-6 在绝经后骨质疏松的发生中扮演了重要的角色。最近的流行病学研究发现,血 IL-6 水平是女性绝经后 10 年骨丢失的主要预测因子,对于椎骨则更只在前 6 年有显著关系,表明 IL-6 与绝经后早期阶段骨丢失关系密切^[4]。雌激素水平下降使得机体产生 IL-6 和介导其效应的 IL-6R 数量增加,导致 IL-6 信号增强。我们曾报道补肾中药可以明显抑制去卵巢大鼠骨组织中 IL-6 的水平,提示中药抑制骨吸收的作用与抑制 IL-6 的生物效应有关^[5]。骨髓微环境中骨髓基质细胞和成骨细胞是骨组织中 IL-6 的主要来源,本实验进一步证实补肾中药能明显抑制大鼠去卵巢后早期骨髓细胞 IL-6、IL-6R 基因的过度表达。因此,补肾中药抑制大鼠去卵巢后早期骨髓微环境中增强的 IL-6 信号介导的破骨细胞生成亢进是其抑制过度骨吸收发挥抗骨质疏松作用的重要原因。

补肾中药如何调节 IL-6 及其受体基因表达水平还不清楚。有报道补肾中药治疗具有与性激素类似的效应,这可能是通过调节垂体-性腺轴发挥作用,也可能某些中药本身即具有性激素样作用。如某些植物中



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与去卵巢组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

图 1 各组大鼠不同时间骨髓 IL-6 基因表达



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与去卵巢组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图 2 各组大鼠不同时间骨髓 IL-6R 基因表达

含有具雌激素样作用的物质,即植物雌激素(phytoestrogens)^[6]。现在研究较多的包括异黄酮(isoflavones)和木脂素(lignans),尤其是异黄酮具有骨保护作用。本研究所用中药组方所含淫羊藿等即含有异黄酮成分,这可能是其作用的基础之一。但是由于中药组方的复杂性,其在细胞以及分子水平产生生物效应的基础有待更进一步的认识。

参 考 文 献

1 丁桂芝,周 勇,李 榕,等. 补肾法对骨质疏松大鼠骨代谢影响的作用机理探讨. 中国中医骨伤科杂志 1995;3(1): 1-4.
Ding GZ, Zhou Y, Li R, et al. Mechanism of study on bone metabolism of osteoporosis rats with effect of renal tonie. Chin J Tradit Med Traumatol Orthopedics 1995;3(3):1-4.

2 夏文芳,陈璐璐,曾天舒,等. 改良的成年大鼠骨髓源性破骨细胞诱导培养体系. 华中科技大学学报(医学版) 2002; 32(5):534-536.
Xia WF, Chen LL, Zeng TS, et al. Modified culture system for induction of osteoclasts from bone marrow stem cells in rats. J Huazhong Univ Sci Technol (Health Science) 2002;

32(5):534-536.

3 Deb S, Tessier C, Prigent-tessier A, et al. The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 Receptor, and gp130-Kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17 beta-estradiol and prolactin. Endocrinol 1999;140 (10):4442-4450.

4 Scheidt Nave C, Bismar H, Leidig Bruckner G, et al. Serum interleukin-6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(5):2023-2042.

5 黎慧清,陈璐璐,曾天舒,等. 补肾壮骨中药对去卵巢大鼠骨组织及血清白细胞介素-6 水平的影响. 中国中西医结合杂志 2003;23(2):116-119.
Li HQ, Chen LL, Zeng TS, et al. Effect of Bushen Zhuanggu drugs on interleukin-6 in serum and bone tissue of ovariectomized rats. Chin J Integ Tradit West Med 2003; 23(2): 116-119.

6 Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr 1998; 68(6 Suppl):1333S-1346S.

(收稿:2004-06-30 修回:2004-11-10)

2005 年全国中西医结合耳鼻咽喉科学会议征文通知

由中国中西医结合学会耳鼻咽喉科专业委员会主办的“全国中西医结合耳鼻咽喉科学会议”拟于 2005 年 5 月中旬在重庆市召开,现将征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 (1)有关耳鼻咽喉科基础理论方面的中西医结合研究成果及信息。(2)有关中西医结合治疗耳鼻咽喉科常见病、多发病的临床研究、经验、医案以及新技术、新疗法。(3)耳鼻咽喉科急重症、疑难病症的诊断、治疗研究。(4)有关中药单方、复方、验方在治疗耳鼻咽喉科疾病中的基础研究与临床应用。(5)嗓音及言语医学领域中的基础研究、临床观察。(6)有关阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的临床治疗及基础研究。(7)有关中西医结合诊断、治疗耳鼻咽喉科肿瘤的基础实验研究、治疗经验以及康复治疗经验。

2 征文要求 (1)来稿请寄 3 000 字左右全文及务必附有 400~600 字摘要各 1 份,论文请打印,并且未在杂志公开发表过,请附单位介绍信。投稿时最好能附软盘。

3 论文被会议录用并参加会议交流者,将颁发论文证书及国家继续教育学分证书。会议期间将邀请专家进行学术讲座交流。

4 截稿日期 2005 年 3 月 31 日(以当地邮戳为准)。

5 寄稿地址 北京市宣武区永安路 95 号首都医科大学附属北京友谊医院耳鼻咽喉科,李明玉收,邮编:100050;电话:010-63014411 转 3417。