

复方芪麝片对直立大鼠腰椎成骨作用的观察

卞 琴, 梁倩倩, 侯 炜, 卢 盛, 赵永见, 施 杞, 王拥军

(上海中医药大学附属龙华医院 上海中医药大学脊柱病研究所 200032 上海市徐汇区宛平南路 725 号)

【摘要】目的:观察复方芪麝片(FFQSP)对直立位大鼠腰椎骨形成的作用,探讨可能的作用机制。**方法:**90 只 SD 大鼠随机分为三大组,正常组不进行处理,普通饲养笼喂养;模型组和 FFQSP 组,建立长期直立位大鼠模型。每组再随机分为 5、7 和 9 个月组,FFQSP 组分别在造模后 4、6、8 个月开始应用 FFQSP(将片剂研磨溶于生理盐水)灌胃,连续灌胃 1 个月;模型组和正常组用同量生理盐水灌胃 1 个月。所有动物于相应时间点取整个腰椎进行检测,行 L5 椎体藏红-固绿染色及 I 型胶原(type I collagen, Col I)免疫组织化学染色,余下腰椎椎体应用实时荧光定量聚合酶链反应(real time reverse transcription polymerase chain reaction, real time RT-PCR)技术检测 I 型胶原 $\alpha 2$ (type I collagen $\alpha 2$, Col1 $\alpha 2$)、转化生长因子 $\beta 1$ (transform growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)和 runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)基因的表达。**结果:**藏红染色显示,与正常组比较,三个时间点模型组及 FFQSP 组椎体骨小梁均增加,FFQSP 组在 5 个月和 7 个月时较模型组略有增加;在 9 个月时较模型组略有减少。Col I 免疫组织化学染色显示三个时期模型组骨小梁阳性染色数目较正常组均增加,FFQSP 组骨小梁阳性染色范围较正常组、模型组均增加。Real time RT-PCR 示,与模型组比,5 个月 FFQSP 组 Col1 $\alpha 2$ 、TGF- $\beta 1$ 基因表达显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),与正常组比,仅上调 Runx2 的表达($P < 0.01$)。7 个月 FFQSP 组 Col1 $\alpha 2$ 、TGF- $\beta 1$ 、Runx2 基因表达较正常组和模型组都显著上调。9 个月 FFQSP 组与模型组比较,Col1 $\alpha 2$ 基因表达显著下调($P < 0.05$),而 TGF- $\beta 1$ 和 Runx2 基因表达均显著上调($P < 0.05$);与正常组比,三个基因表达均显著上调($P < 0.01$)。**结论:**复方芪麝片对直立大鼠的椎体成骨有增强作用,以中后期(7 个月、9 个月)效应显著,其疗效可能与 TGF- $\beta 1$ 基因水平的上调有关。

【关键词】 复方芪麝片;腰椎;成骨;气血

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.12

中图分类号: R965, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-04-0311-06

Effect of FU FANG Qi She Pian on bone formation of upright posture rats' vertebral/BIAN Qin, LIANG Qianqian, HOU Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4): 311~316

【Abstract】Objective: To investigate the effect and potential mechanism of Fu Fang Qi She Pian(FFQSP) on upright rats' lumbar vertebral bone formation. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into three groups. The rats in the normal control group were raised in normal cage with no intervention. The rats in untreated and FFQSP groups were induced to upright posture. Every group was randomly divided into three subgroups: 5 months, 7 months and 9 months group. Rats in FFQSP groups were gastroenterically administrated with FFQSP at 4, 6, 8 months for one month after surgery while those in model and control group were treated with normal saline. Ten rats were sacrificed at 5, 7 and 9 months after surgery and all lumbar vertebrae were harvested for detection. Safranin O/fast green staining and Col I immunohistostaining were performed on L5 vertebrae. Col1 $\alpha 2$, TGF- $\beta 1$ and Runx2 mRNA expression in other vertebrae were detected by real time reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Result:** Safranin O/Fast green staining showed bone trabecular density increased in untreated groups. BV/TV rate raised in 9 months of untreated group compared to normal control group, and it went up in 5, 7 months of FFQSP groups compared to untreated groups. Trabecular numbers increased in 5 and 9 months of untreated groups compared to those in the normal group when it increased in 5 and 7 months of FFQSP groups compared to those in untreated groups. Immunohistostaining showed in

基金资助: 国家杰出青年科学基金(No.30625043); 国家自然科学基金(No.30572398); 上海市优秀学科带头人计划(No.08XD1404000)

第一作者简介: 女(1980-), 实习研究员, 医学博士, 研究方向: 中医药防治骨退行性病变

电话: (021)54232325 E-mail: bianqin213@126.com

通讯作者: 王拥军

creased numbers of bone trabeculae with Col I positive staining after surgery, which extended in FFQSP groups compared to that in control and model groups at each time points. Real time RT-PCR showed Col1 α 2 and TGF- β 1 mRNA expression significantly down-regulated in FFQSP group compared to those in model group at 5 months ($P<0.05$, $P<0.01$). However, only Runx2 expression was up-regulated compared with normal group ($P<0.01$). Col1 α 2, TGF- β 1 and Runx2 gene expression increased in FFQSP groups at 7 months compared with those in control and model groups at the same time point. Col1 α 2 mRNA expression lowered down in 9 months of FFQSP group compared with that in the model group ($P<0.05$). While compared with control group, up-regulation expression of all three genes significantly were evidenced ($P<0.01$). **Conclusion:** Upright posture may increase rats' vertebral bone formation which may be strengthened by FFQSP especially at mid-late phase (7- and 9-month groups). The mechanism may be related to the upregulation of TGF- β 1 gene level.

[Key words] Fu Fang Qi She Pian; Lumbar vertebrae; Bone formation; Qi and blood

[Author's address] Longhua Hospital, Shanghai University of Traditionl Chinese Medicine Institute of Spine, Shanghai University of Traditionl Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

我们生命活动中每时每刻都在进行成骨,成骨对维持骨量和骨的正常生理功能起着重要作用。在失重和废用的情况下,会发生骨丢失,出现骨质疏松^[1]。临床防治多采用适量运动或加压负荷,配合药物治疗。因此,我们应用具有“调和气血”功效的复方芪麝片,从中医气血角度进一步观察中药联合加压对大鼠腰椎椎体成骨的效应。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选择 1 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只,由上海中医药大学动物中心提供,合格证号:“SYXK (沪)2003-0002”;动物实验环境等级:SPF 级。随机分为正常对照组、模型组、复方芪麝片(FFQSP)组。各大组再分为 5 个月、7 个月、9 个月组,共计 9 组,每组 10 只。

1.2 实验药品及试剂

复方芪麝片(由黄芪、川芎、人工麝香等 6 味中药组方而成)由上海现代中医药技术发展有限公司提供(生产日期:031201,新药临床研究批件号:国家药品监督管理局 2003L04416,0.15g/片,含生药 1.0226g)。盐酸氯胺酮注射液,批准文号:H32022820(江苏恒瑞医药股份有限公司);免疫组化试剂盒(用于检测 Col I 蛋白)(晶美生物工程有限公司)。总 RNA 抽提试剂 TRIzol(晶美生物工程有限公司),TaKaRa 逆转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)。高质纯化 DNA 胶回收试剂盒(GENMEN 公司)。

1.3 动物模型建立方法

将模型组和 FFQSP 组大鼠双前肢剪毛和清

洁后,用碘伏消毒大鼠前肢皮肤,按盐酸氯氨酮 0.1g/kg 体重行肌肉注射麻醉,取前肢近端 1/3 处横向切开皮肤,剥离筋膜和肌肉,暴露三角肌下血管神经束(肱动、静脉、肌皮神经、尺神经、前臂内侧皮神经、正中神经等),并用丝线结扎,在结扎处远端用咬骨钳咬断肱骨,再用剪刀剪断皮肤、肌肉、血管和神经,使前肢截断。建立去前肢直立大鼠模型^[2-3]。用盐酸庆大霉素消毒后,再将肌肉、筋膜、皮肤逐层缝合,最后在缝合处涂金霉素眼膏防止感染。

术后先在普通饲养笼内饲养 14d,然后改用特制饲养笼饲养。特制饲养笼较普通饲养笼高度增加,其长、宽、高分别为 51cm、42.6cm、31cm,且饲料槽和饮水瓶高度可上下调节。每周测量大鼠直立高度,按平均值调节食物槽和水瓶高度,迫使大鼠通过身体直立来获取食物和水。正常组大鼠喂养在普通饲养笼中。术后 5、7、9 个月时各组分别过量麻醉处死 10 只大鼠,取整个腰椎进行检测,第 4、5 腰椎多聚甲醛固定,进行形态学检测。余下腰椎-80℃保存,进行 RNA 抽提。

1.4 给药时间和方法

分别于术后 4、6、8 个月,即处死前 1 个月,对 FFQSP 组大鼠进行 FFQSP 灌胃给药,连续灌胃 1 个月。大鼠所用生药剂量按照人与动物千克体重换算,FFQSP 10mg/(kg·d)(对照临床:8 片/次,一天 3 次),灌胃给药,1 次/d,相当于临床 60kg 体重人的等效剂量。模型组和正常组给予等剂量生理盐水。

1.5 形态学检测

第 5 腰椎标本在 4%多聚甲醛浸泡 24h 后,

清水冲洗 2h, 10% EDTA 脱钙 4 周, 每周换脱钙液一次。标本经过脱水后石蜡包埋。7 μ m 冠状位连续切片, 取椎体中央部位切片(以椎间盘髓核最大时为中央部位的标准, 取前后切片, 每只大鼠取 3 张切片), 进行藏红-固绿染色。常规脱蜡至水, 苏木素染液染 2min 后, 自来水冲洗, 盐酸乙醇分化 5s, 氨水蓝化 10min, 固绿染液染 5min, 冰醋酸快速漂洗, 清水快速漂洗, 藏红染液染 5min, 蒸馏水洗, 常规脱水透明封片。

藏红染色部分(红色)表示软骨(蛋白多糖), 固绿染色部分(蓝绿色)表示骨组织。

1.6 I 型胶原免疫组化检测

将椎体中央部位切片(以椎间盘髓核最大时为中央部位的标准, 取前后切片, 每只大鼠取 3 张切片)常规脱蜡后在 3% H_2O_2 与甲醇 1:50 溶液中孵育 15min 去除内源性过氧化物酶, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 蛋白酶 K 消化 10min, 加 5% BSA 封闭液。加兔多克隆抗体 I 型胶原 (type I collegan, Col I) (1:200 稀释, 美国 Abcam 公司产品)一抗, 4 $^{\circ}C$ 过夜。PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 37 $^{\circ}C$ 孵育 15min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 抗生蛋白链菌素-HRP, 37 $^{\circ}C$ 孵育 10min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, DAB 显色剂显色, 苏木素复染, 常规脱水透明, 中性树胶封片。阳性结果判断: 染色阳性表达为棕黄色, 无着色为阴性。阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.7 Col1 α 2、TGF- β 1、Runx2 基因检测

1.7.1 细胞总 RNA 抽提 将保存于液氮罐中的第 1~3 腰椎组织, 取含上下软骨终板的椎体组织放入烧杯中剪碎, 加入 TRIzol 试剂 1ml, 研磨成浆液, 将浆液移入 1.5ml Eppendorf 管中, 室温静置 5min。加氯仿 200 μ l, 颠倒混匀 15s, 室温静置 3min, 4 $^{\circ}C$ 离心 (12000 转/分钟) 15min, 吸取上清液 0.5ml, 移入新 Eppendorf 管中, 弃沉淀。以 1:1 体积比例加异丙醇 0.5ml, 混匀, 室温静置 10min, 4 $^{\circ}C$ 离心 (12000 转/分钟) 10min, 弃上清。加 1ml 4 $^{\circ}C$ 75%乙醇 (DEPC 水配制), 混匀后 4 $^{\circ}C$ 离心

(10000 转/分钟) 5min, 弃上清。干燥 5min, 每管加 0.1% DEPC 水 30 μ l。得组织总 RNA 溶液。

1.7.2 RNA 鉴定 加去离子水 200 μ l 到石英比色杯中, 作空白对照。再取 2 μ l RNA 溶解液加入盛有水的比色杯(充分混匀), 用紫外分光光度计选择波长 260nm 和 280nm 分别检测 OD 值(即光吸收值), 测得样本 A260/A280 比值在 1.6~2.0 后进行逆转录和扩增。此外样品用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 以检测 RNA 的完整性。

1.7.3 引物设计 引物由 Genbank 数据库中检索 rat gene 名, 然后委托上海皓嘉公司根据引物长度、温度、GC% 等因素设计最适合引物, 并由该公司合成。引物信息见表 1 所示。

1.7.4 逆转录反应 将 EP 管置于冰上依次加下成分: 5 $\times$ RT prime Script Buffer 4 μ l、Oligo dT Primers 1 μ l、Random 6mer 1 μ l、RNA 溶液 1 μ l、RNase free water 12 μ l 及 prime Script RT Enzyme 1 μ l, 轻轻将上述混合液振荡混匀, 短暂离心以收集管壁残留液体。37 $^{\circ}C$ 孵育 15min, 85 $^{\circ}C$ 5s, 终止反应, 此时 RNA 已被逆转录为 cDNA, -20 $^{\circ}C$ 保存。

1.7.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time reverse transcription polymerase chain reaction, Real time RT-PCR) 将所有样本进行荧光定量 PCR 反应, 同一样本同时作 β -actin 内参 PCR 反应。待反应结束后, 用 Rotor Gene6.0 软件自动进行绝对定量分析, 并计算结果, 以每一样本所含各基因的拷贝数和其 β -actin 内参基因的拷贝数的比值进行比较。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行处理, 计量资料数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 各组数据间的比较采用单因素方差分析的检验方法。对各数值变量进行方差齐性和正态性检验, 检验水准取 $\alpha=0.10$, $P>0.10$ 为数据方差齐、资料呈正态分布。方差齐时, 采用 LSD 法检验, 方差不齐时, 采用 Turkey 法检验。

表 1 大鼠 β -actin、Col1 α 2、TGF- β 1 和 Runx2 引物名称、序列及长度

基因名称	正义链	反义链	产物长度(bp)
β -actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	150
Col1- α 2	5'-TCCTGGCAATCGTGGTTCAA-3'	5'-ACCAGCTGGGCCAACATTTC-3'	133
TGF- β 1	5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3'	5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'	82
Runx2	5'-CCATAACGGTCTTCACAAATCCT-3'	5'-TCTGTCTGTGCCTTCTTGTTTC-3'	99

2 结果

2.1 藏红染色结果

三个时间点正常组腰椎骨小梁均较稀疏,模型组骨小梁数目明显增加,尤其是在软骨终板附近,5个月和7个月时,FFQSP组较模型组略有增加。9个月时,FFQSP组较模型组略有减少,但仍较正常组明显增加(图1)。

2.2 Col I 免疫组织化学染色结果

三个时间点正常组 L5 椎体骨小梁均呈阳性染色,着色平均,数目稀疏。模型组呈阳性染色的骨小梁数目均增加,5和7个月时,模型组染色均匀;9个月模型组个别部位呈强阳性。5个月 FFQSP 组阳性染色范围增加,骨小梁较正常组和模型组略有增粗,在一处骨小梁上呈现中间淡染,边缘深染的现象;7个月 FFQSP 组骨小梁数目增加,呈现中间淡染,边缘深染;9个月 FFQSP 组阳性染色范围增加(图2)。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测基因表达结果

5个月模型组 Col1 α 2 表达较正常组上调($P<0.01$),而 FFQSP 组较模型组下调($P<0.01$),与正常组比较没有显著差异;7个月模型组 Col1 α 2 表达较正常组上调($P<0.01$),FFQSP 组较模型组和正常组均有上调($P<0.01$);9个月模型组 Col1 α 2 表达较正常组上调($P<0.01$),而 FFQSP 组较模型

组下调($P<0.01$),但仍较正常组上调($P<0.01$)。5个月模型组 TGF- β 1 表达较正常组上调($P<0.01$),而 FFQSP 组较模型组下调($P<0.05$),与正常组比较没有显著统计学差异;7个月模型组较正常组上调($P<0.01$),FFQSP 组较模型组和正常组均有上调($P<0.01$);9个月模型组表达较正常组上调,FFQSP 组较模型组($P<0.05$)和正常组($P<0.01$)均进一步上调。5个月模型组 Runx2 表达较正常组上调($P<0.01$),FFQSP 组较模型组有进一步上调趋势,但无统计学差异,与正常组比较上调有统计学差异($P<0.01$);7个月模型组与正常组无显著差异,而 FFQSP 组较模型组和正常组均上调($P<0.01$);9个月 FFQSP 组较模型组和正常组均上调(表2)。

3 讨论

3.1 FFQSP 对成骨细胞外基质的影响

骨组织由 1/3 有机物及 2/3 无机物构成, I 型胶原蛋白约占有机成分的 80%~90%^[4], 定向分化的前成骨细胞和成熟的成骨细胞都会分泌基质蛋白 I 型胶原,属于成纤维胶原,由两条 α 1 及一条 α 2 链构成。I 型胶原对维持骨结构的完整及骨生物力学特性非常重要^[5]。我们的实验中 ColI 免疫组化结果显示, I 型胶原在骨小梁的位置呈

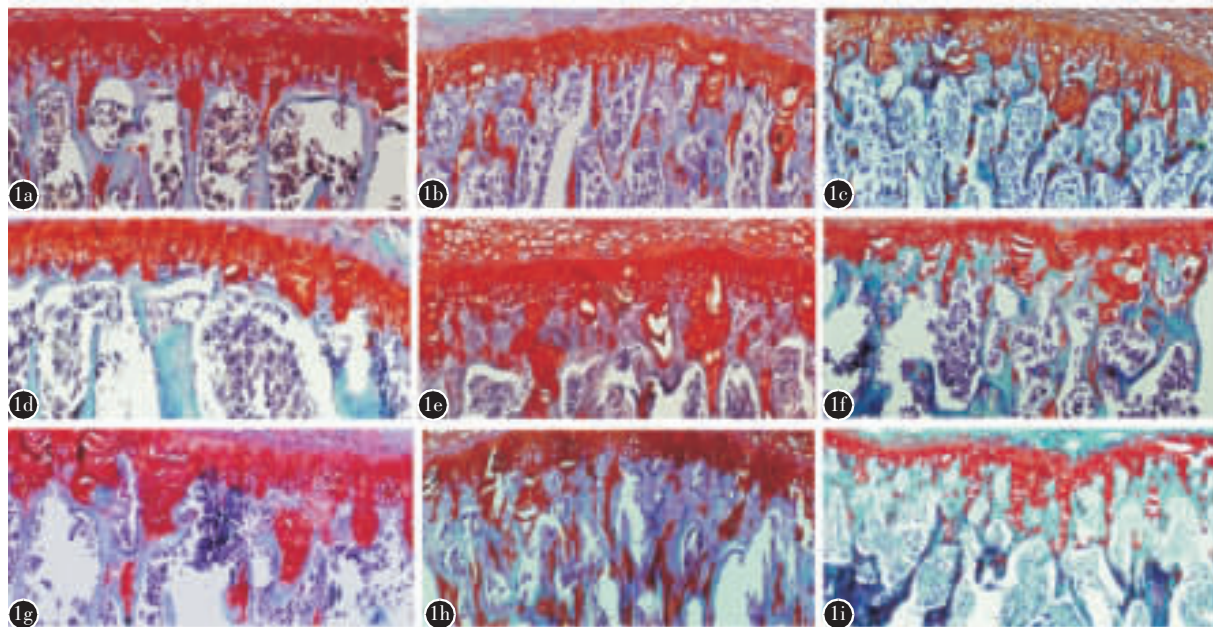


图1 各组 L5 椎体冠状面藏红-固绿染色 a 5个月正常组腰椎骨小梁呈蓝绿染色,较稀疏 b 5个月模型组骨小梁数目明显增加 c 5个月 FFQSP 组较模型组略有增加 d 7个月正常组腰椎骨小梁稀疏 e 7个月模型组较正常组增加,尤其是在软骨终板附近 f 7个月 FFQSP 组较模型组略有增加 g 9个月正常组骨小梁稀疏 h 9个月模型组骨小梁数目明显增加 i 9个月 FFQSP 组较模型组略有减少,但仍较正常组明显增加(光镜 $\times 100$)

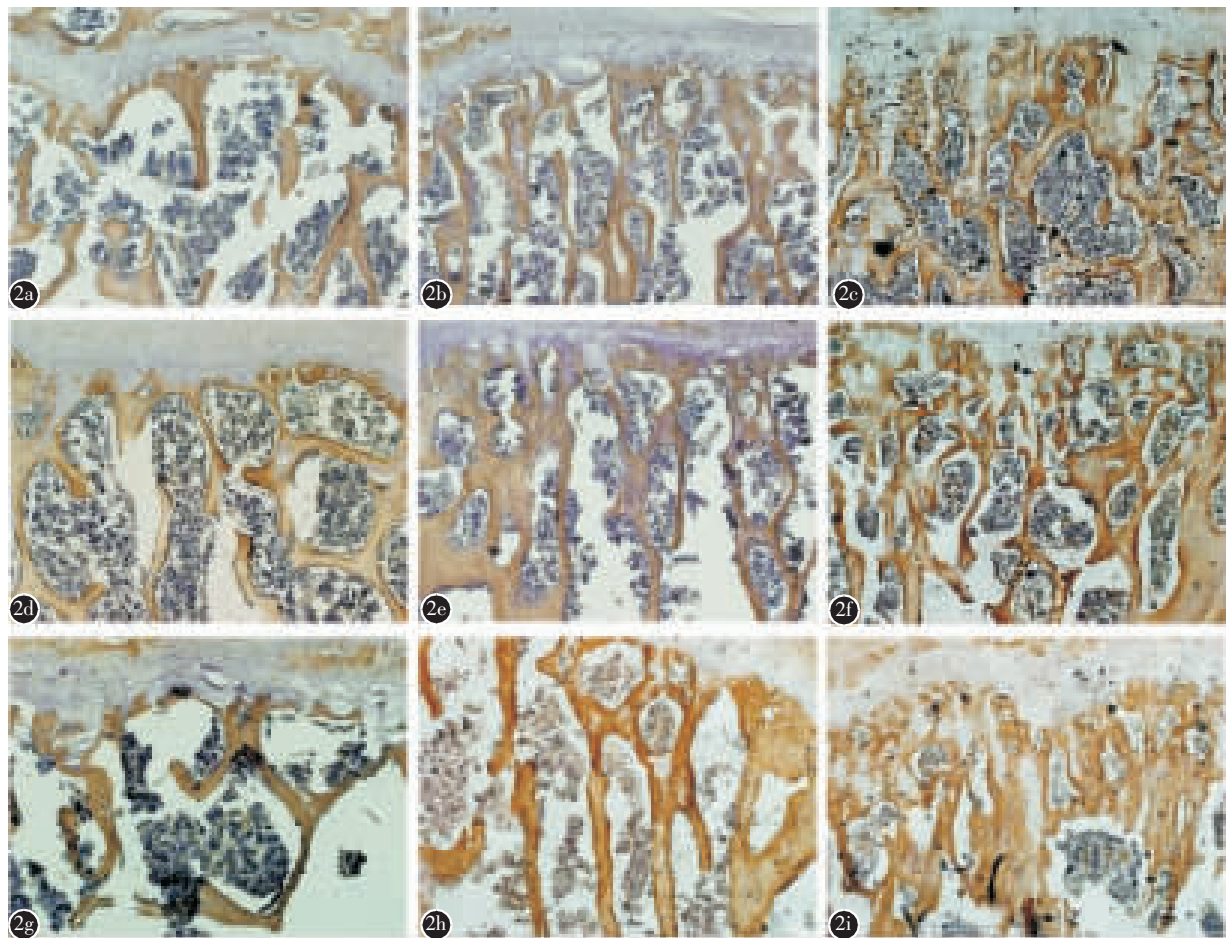


图 2 L5 椎体 Col I 免疫组化染色:骨小梁(bone trabeculae, bt)呈棕色阳性染色,软骨终板(cartilage end-plate, cp)呈阴性染色 5、7、9 个月正常组 L5 椎体骨小梁着色平均,数目稀疏(a、d、g) 三个时期模型组呈阳性染色的骨小梁数目增加,5、7 个月组染色较均匀(b、e),9 个月组个别部位呈强阳性(h) 三个时期 FFQSP 组阳性染色范围增加,骨小梁较正常组和模型组略有增粗,在一处骨小梁上呈现中间阴性,边缘阳性染色的现象,阴性染色部位靠近软骨终板部位(c、f、i)(光镜 $\times 100$)

表 2 各组大鼠椎体组织 Col1 α 2、TGF- β 1、Runx2 基因表达量

	Col1 α 2	TGF- β 1	Runx2
5个月			
正常组	1.34 $\pm$ 0.23	2.98 $\pm$ 0.40	0.72 $\pm$ 0.12
模型组	7.69 $\pm$ 1.10 ^①	5.92 $\pm$ 0.86 ^①	5.98 $\pm$ 1.58 ^①
FFQSP 组	2.43 $\pm$ 0.94 ^②	3.93 $\pm$ 0.64 ^②	7.37 $\pm$ 1.17 ^①
7个月			
正常组	0.28 $\pm$ 0.22	0.37 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.01
模型组	1.45 $\pm$ 0.14 ^①	0.98 $\pm$ 0.05 ^①	0.37 $\pm$ 0.02
FFQSP 组	4.18 $\pm$ 0.75 ^{①②}	9.17 $\pm$ 0.31 ^{①②}	0.76 $\pm$ 0.04 ^{①②}
9个月			
正常组	1.67 $\pm$ 0.27	0.39 $\pm$ 0.14	1.22 $\pm$ 0.33
模型组	38.03 $\pm$ 6.33 ^①	1.68 $\pm$ 0.25 ^①	1.75 $\pm$ 0.29
FFQSP 组	7.68 $\pm$ 0.68 ^{①②}	2.72 $\pm$ 0.49 ^{①②}	5.01 $\pm$ 0.90 ^{①②}

注:①与正常组比较 $P < 0.01$;②与模型组比较 $P < 0.01$

现阳性染色,并且正常组和模型组就染色的深浅而言,无明显差异。说明单位面积上骨小梁上的 I 型胶原蛋白表达强度是一致的,但因为模型组骨小梁数目增加,因此染色范围有所增加。FFQSP 组的骨小梁厚度增加,因此染色范围进一步增加。有趣的是,FFQSP 组三个时期都出现骨小梁中间阴性,边缘阳性染色的现象,尤其阴性染色部位与软骨终板相连接,提示这部分骨小梁上软骨内成骨活跃。在 mRNA 水平,我们观察到与模型组比,7 个月时 FFQSP 组 Col1 α 2 基因表达显著上调,而 5 个月和 9 个月时显著下调。说明 FFQSP 联合直立体位的加压后,在直立中期(7 个月)才促进 Col I 的分泌。而在 9 个月时,蛋白和基因水平结果不一致的可能原因是:FFQSP 在直立 7 个月时增加 Col I 转录水平,继而增强 Col I 蛋白合成。当 Col

I 蛋白合成后,这种形态学上的改变是很难在短时间内逆转的,因而会出现直立 9 个月时 Col I 蛋白有所增加。然而,由于直立联合中药带来的骨量增加使骨细胞对后期刺激敏感度减弱,细胞活性相应减弱,因此在转录水平检测到 9 个月 FFQSP 组 Col I mRNA 反而较模型组减少。

3.2 FFQSP 对转化生长因子 $\beta 1$ 的影响

TGF- $\beta 1$ 是 TGF- β 超家族的典型代表,是一种具有多种功能的生长因子,调控广泛的生物过程,包括细胞增殖、生存、分化、迁移等。TGF- $\beta 1$ 参与介导骨形成,并且这种介导还受多因素影响:体内如成骨细胞聚集促进该介导作用,而成骨细胞增殖与早期分化、细胞外基质蛋白产物、软骨前细胞表达的 I 型胶原、蛋白多糖合成加强、造血前细胞增殖等抑制了上述介导作用^[6]。在体内成骨细胞紧密排列,故在生理浓度下,TGF- $\beta 1$ 是促进成骨细胞分化的。此外,TGF- $\beta 1$ 与骨修复也密切相关。本研究中 Real time RT-PCR 示,与模型组比,TGF- $\beta 1$ mRNA 表达在 7 个月和 9 个月 FFQSP 组显著上调,5 个月 FFQSP 组显著下调。说明 FFQSP 在直立的中后期对该生长因子发挥一定促进作用,从而加强骨形成。

3.3 FFQSP 对核转录因子 Runx2 的影响

Runx2 是成骨系特异性核转录因子。多种骨形成标记物如 Col I、骨桥蛋白等的启动子都存在 Runx2 的结合位点。Runx2 又是 TGF- $\beta 1$ 的靶点,成骨分化早期,TGF- $\beta 1$ 与 BMP-2 通过 Smad1/5 诱导 Runx2 表达,而分化晚期及成骨细胞成熟期,则起对抗作用^[7]。本次实验结果中,7 个月和 9 个月 FFQSP 组 Runx2 基因表达都较模型组显著上调,而在 5 个月 FFQSP 组则变化不显著。该变化趋势与 TGF- $\beta 1$ 的变化基本一致。说明 FFQSP 可能对成骨分化中后期具有一定促分化作用。

3.4 对 FFQSP 促成骨机制的认识

在不考虑直立因素的情况下,FFQSP 对 5 个月和 7 个月(即 6 月龄和 8 月龄)大鼠椎体的 Col1 $\alpha 2$,TGF- $\beta 1$ 和 Runx2 均有上调作用;联合直立因素后,这两个时期 3 个基因的表达进一步上调。然而在 5 个月,FFQSP 反而削弱直立增加的 Col1 $\alpha 2$,TGF- $\beta 1$ 基因表达,仅上调了 Runx2 的表达。文献报道,TGF- $\beta 1$ 对 I 型胶原基因表达有调控作用,且主要发生在转录水平^[8]。TGF- $\beta 1$ 通过

提高多种核转录因子与 I 型胶原基因相应 DNA 调控序列的结合活性,促使 I 型胶原基因激活并高水平转录^[9]。我们的实验提示 FFQSP 可能通过调节 TGF- $\beta 1$ 的表达来调控 I 型胶原的表达,Runx2 是其中一个重要的核转录因子,但在直立早期,可能还有其他核转录因子的参与,因此出现 FFQSP 作用后,三个基因变化不同步的结果。FFQSP 与直立加压是一种双向协同的作用,在直立中晚期,增加成骨相关基因的表达;而在直立早期,机体处于适应应力改变状态时,FFQSP 主要是缓解这种应力造成的基因改变。

本实验也为中老年骨质疏松的防治提供了借鉴:适当的负荷运动可以在早期促进椎体成骨,运动持续一段时间后,若能联合“调和气血”的中药,促进成骨的效应将得到更好的维持。

4 参考文献

1. Lang T, LeBlance A, Evans H, et al. Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(6): 1006-1012.
2. 侯炜, 梁倩倩, 何建新, 等. 益气化瘀方对膝关节炎大鼠关节软骨退变的防治作用[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(2): 163-168.
3. Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs in rat lumbar spine[J]. Spine, 2008, 33(19): 2052-2058.
4. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 1996, 11(3): 337-349.
5. 李梅孟, 孟迅吾, 周学瀛. I 型胶原蛋白与骨质疏松症研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2000, 20(1): 14-17.
6. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, et al. Transforming Growth Factor $\beta 1$ to the bone[J]. Endocr Rev, 2005, 26(6): 743-774.
7. Alliston T, Choy L, Ducy P, et al. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast [J]. EMBO J, 2001, 20(9): 2254-2272.
8. Jimenez SA, Varga J, Olsen A, et al. Functional analysis of human $\alpha 1(I)$ procollagen gene promoter [J]. J Biol Chem, 1994, 269(17): 12684-12691.
9. Inagaki Y, Truter S, Tanaka S, et al. Overlapping pathways mediate the opposing actions of TNF alpha and TGF beta on alpha 2(I) collagen transcription [J]. J Biol Chem, 1995, 270(7): 3353-3358.

(收稿日期: 2009-09-18 修回日期: 2010-01-13)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 彭向峰)