

左归丸对去势大鼠钙转运通路相关蛋白的影响

唐皓¹, 余娜^{2*}, 仇湘中¹, 王哲亭¹

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] **目的:** 探讨左归丸对去势大鼠骨密度和骨组织中钙转运通路相关蛋白的影响。**方法:** 选取 48 只雌性 SD 大鼠, 随机分为正常组, 假手术组, 模型组, 尼尔雌醇组(0.167 mg·kg⁻¹), 左归丸低、高剂量组(9.6, 38.4 g·kg⁻¹)。除假手术组和正常组, 其余组切除大鼠卵巢, 造模成功后 3 个月进行各组干预。3 个月后处死大鼠, 检测大鼠骨密度(BMD)和骨代谢标志物; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测钙转运通路(骨组织)瞬时受体电位通道 V5(TRPV5), 钙结合蛋白_{-D28K}(CaBP_{-D28K}), 钠钙交换器 1(NCX1)和细胞膜钙泵(PMCA1b)蛋白表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组血钙降低($P < 0.01$), 与模型组比较, 左归丸高剂量组和尼尔雌醇组大鼠血钙显著升高($P < 0.01$); 与正常组比较, 模型组 BMD 显著降低($P < 0.01$), 与模型组比较, 左归丸高剂量组和尼尔雌醇组大鼠 BMD 均有改善($P < 0.05$); 与假手术组和正常组比较, 模型组各蛋白表达均有不同程度上调($P < 0.05, P < 0.01$), 与模型组比较, 左归丸高剂量组中 TRPV5 蛋白表达有显著下调($P < 0.01$), 各干预组中的 CaBP_{-D28K} 与 NCX1 蛋白表达均有不同程度的下调($P < 0.05, P < 0.01$), PMCA1b 蛋白表达在左归丸低剂量组和尼尔雌醇组内表达均有不同程度下调($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 左归丸可不同程度的降低大鼠破骨细胞中 TRPV5, CaBP_{-D28K}, PMCA1b, NCX1 等介导破骨细胞吸收钙离子的重要通道蛋白的表达, 左归丸的抗骨质疏松机理有可能是通过抑制 TRPV5 介导的破骨细胞的骨吸收而起作用。

[关键词] 左归丸; 去势大鼠; 瞬时受体电位通道 V5 (TRPV5); 钙结合蛋白_{-D28K} (CaBP_{-D28K}); 钠钙交换器 1 (NCX1); 质膜钙离子 ATP 酶 1b (PMCA1b)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0013-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192206

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190802.1310.009.html>

[网络出版时间] 2019-08-02 15:22

Effect of Zuoguiwan on Expression of Ca²⁺ Transport Pathway-related Protein in Ovariectomized Rats

TANG Hao¹, YU Na^{2*}, QIU Xiang-zhong¹, WANG Zhe-xiang¹

(1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Zuoguiwan on the bone mineral density (BMD) and the expressions of Ca²⁺ transport-associated protein in ovariectomized rats. **Method:** The 48 female SD rats were randomly divided into six groups: normal group, model group, sham operation group, estrogen group (0.167 mg·kg⁻¹) and low and high-dose Zuoguiwan groups (9.6, 38.4 g·kg⁻¹), with 10 rats in each group. Except for the sham-operated group, the ovariectomized rats in the other groups received the bilateral ovariectomy. Therapeutic intervention was given in each group for 3 months after the establishment of the model. After 12 weeks, BMD was measured using dualenergy X-ray absorptiometry. Tartrated presistant acid phosphatase (TRACP) and serum calcium were detected by biochemical kits. Protein expression in Ca²⁺ transport (Bone tissue) was detected

[收稿日期] 20190401(005)

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2015JJ2092); 湖南省中医药管理局重点科题项目(201623)

[第一作者] 唐皓, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合骨伤研究, E-mail: 125883398@qq.com

[通信作者] *余娜, 博士, 讲师, 从事中药药理研究, E-mail: yuna0525@163.com

by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the serum calcium of the model group was decreased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, BMD of the model group was decreased ($P < 0.01$). The serum calcium of rats in high-dose group and western medicine group was higher than that of model group ($P < 0.01$). BMD in model group was lower than that of Zuoguiwan groups and estrogen group ($P < 0.05$). There was no significant difference in TRACP among the groups. Nilestriol and Zuoguiwan can down-regulate the expressions of TRPV5, NCX1, CaBP_{D28K} and PMCA1b in bone tissue of castrated rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Zuoguiwan can down-regulate the expressions of Ca²⁺ transport-associated proteins (Bone tissues) in rat osteoclasts, with an efficacy on osteoporosis.

[Key words] Zuoguiwan; osteoporosis; transient receptor potential vanilloid receptor V5 (TRPV5); calcium-binding protein (CaBP)_{D28K}; Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 (NCX1); plasma membrane Ca²⁺-ATPase 1b (PMCA1b)

骨质疏松症(OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨骼脆性增加和易发生骨折的全身性疾病。随着人口老龄化进程的加速,骨质疏松症的发病率仅次于心血管疾病、糖尿病,跃居慢性疾病的第3位。近几年骨质疏松的发病人数在我国已经明显上升,在60~70岁阶段,约33%的女性和20%的男性患有该疾病,对中老年人的生命安全、身体健康等形成一定的危害与威胁^[1]。到2050年中国骨质疏松症或骨密度低的患者将达到2.12亿^[2],也就是说,全球骨质疏松病人总量中有超过1/2患者来自中国大陆地区。中医学有“肾藏精,主骨生髓”的理论,骨质疏松症可归属于“肾虚”“虚劳”“骨痹”“骨痿”等疾病范畴^[3]。中医学认为,肾主骨,肾虚是绝经后骨质疏松症发生的始动病机^[4-5],因此治疗骨质疏松因从补肾益精着手,左归丸出自张景岳的《景岳全书》,作为补肾的经典代表方剂符合骨质疏松症可归属于“肾虚”“虚劳”“骨痹”“骨痿”等疾病范畴的中医治疗法。左归丸治疗骨质疏松症的疗效明确,且对于一些基本的机制研究亦取得一定进展^[6]。大量的实验研究证明现代研究也证实左归丸具有类似刺激素样的调节作用,不仅能调节骨代谢标志物,如增加骨钙素含量、降低降钙素含量^[7-8],升高大鼠骨量,改善骨小梁细小、稀疏和三维结构破坏的状况^[9-10],降低骨髓基质细胞白细胞介素-1(IL-1)和成骨细胞IL-6的表达^[11],还能通过调节Notch信号通路,转化生长因子-β₁/Smad信号通路途径,分泌型糖蛋白(Wnt)/β-链蛋白信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路^[12-15],从而达到纠正钙代谢紊乱,防治骨质疏松症的目的。新型上皮钙通道瞬时受体电位通道V5(TRPV5)作为TRP超家族中钙离子高选择性阳离子通道,在机体钙离子跨上皮转运方面发挥重要

作用,参与调节整个机体的钙平衡^[16]。其介导的肾钙及骨钙转运过程与骨质疏松症的钙代谢紊乱有着密切的联系。本研究拟基于TRPV5介导的肾钙、骨钙转运通路探讨补肾经典方剂左归丸对骨质疏松症模型大鼠的疗效及作用机制。

1 材料

1.1 动物 6月龄雌性SPF级SD大鼠48只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号43004700022760,许可证号SYXK(湘)2015-0003。所有动物实验设计和方案均获得湖南中医药研究院动物伦理委员会的同意和批准,伦理号2016-0019。

1.2 药物与试剂 左归丸配方由熟地24g,山药12g,枸杞12g,山茱萸12g,川牛膝12g,菟丝子12g,鹿胶12g,龟胶12g(药材由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供,湖南省中医药研究院附属医院蔡敏荣主管中药师鉴定)。尼尔雌醇[上海医药(集团)有限公司新华联制药厂,国药准字H31021647,2mg/片];钙(Ca),碱性磷酸酶(AKP)生物化学试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20170801,20170729);TRPV5,钙结合蛋白_{D28K}(CaBP_{D28K}),钠钙交换体(NCX1)兔抗体,β-肌动蛋白(β-actin)鼠抗体,辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP山羊抗兔IgG(美国Proteintech公司,批号分别为00008699,00005713,09000095,10004413,20000002,20000003);质膜钙离子ATP酶(PMCA1b)兔抗体(英国Abcam公司,批号GR174287-1);蛋白酶抑制剂(北京金泰宏达生物科技有限公司,批号583794)。

1.3 仪器 XR-26型双能骨密度仪(美国North-Land公司);164-5050型制造电泳仪(美国Bio-Rad

公司);H165R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);PW-812 型全自动酶标洗板机,MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司);DYCP-31DN 型电泳仪,DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制 采用背侧入路双侧卵巢切除法进行造模^[17]。10% 水合氯醛溶液对大鼠按 $3.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射进行麻醉,将假手术组大鼠样本背部切开,进入腹腔,将卵巢找到,从其旁将一定量的脂肪(1 g 左右)剪除。将切除卵巢组大鼠距脊柱外侧约 1 cm 与背部腋中线交叉部位的皮肤切开,腹腔打开,行两侧卵巢摘除术。伤口消毒 7 d,观察伤口愈合情况。

2.2 动物分组及给药 随机将大鼠分成左归丸高、低剂量组、西药组、模型组、正常组及假手术组,每组 8 只。6 组大鼠自由摄食、饮水。术后 3 月行骨密度检测验证模型复制成功,进行分组治疗干预。按 70 kg 的成人 1 d 服用左归丸的生药量为 105 g 计算,人的给药量为即 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,按照动物与人体的表面积换算法,大鼠的临床等效给药量应为 $9.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每组大鼠的给药体积均为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,根据大鼠每日给药量与给药体积,将药物水煎 2 次,合并过滤浓缩制备左归丸低浓度煎剂为 $0.48 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于临床等效给药量)、左归丸高浓度煎剂 $1.92 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于临床 4 倍量)。中药低剂量组给予左归丸低浓度煎剂,给药剂量为 $9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;中药高剂量组给予左归丸高浓度煎剂,给药剂量为 $38.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;西药组给予尼尔雌醇 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,使用前配成混悬液(质量浓度为 $0.167 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),1 次/周,其余时间予生理盐水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;假手术组和模型组的大鼠给予体 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的生理盐水灌胃饲服。以上干预治疗均持续 3 个月。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠一般状态观测 对样本大鼠体态、皮毛及活动每日状态进行观测,观测大便状态,肛门颜色,做好样本饮水量、食量、体质量波动记录。

2.3.2 大鼠离体股骨上 1/3 骨密度(BMD)测定 采用双能 X 射线骨密度仪进行大鼠样本股骨上 1/3 BMD 测试,采用 The Small Subject Scout Scan 软件进行数据研究。具体检测分析过程中需要采用 $1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$ 分辨率及 $60 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速度进行,而对于扫描长度来说则可以根本实际需要进

行调节,扫描的宽度通常应控制于 10 cm, CV = 0.82% ~ 1.24% (组内)。

2.3.3 苏木素-伊红(HE)染色观察骨组织病理学变化 常规石蜡包埋 $5 \mu\text{m}$ 切片后进行 HE 染色,光镜下观察 60 °C 烤片 1 ~ 2 h;切片脱蜡至水:先将切片置于二甲苯中 10 min,2 次。然后依次在 100%, 100%, 95%, 85% 和 75% 乙醇,每级放置 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min;苏木素染 5 ~ 10 min,蒸馏水冲洗,返蓝;伊红染 3 ~ 5 min,蒸馏水冲洗;梯度乙醇(95% ~ 100%)脱水,每级 5 min(或者直接把片子烤干)。取出后置于二甲苯 10 min,2 次,中性树脂胶封片、显微镜观察。

2.3.4 骨代谢标志物检测 腹主动脉血提取出来静置,于 $6000 \sim 1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,血清随之重新提取出来,待测骨代谢标志物。按 Ca 测试盒和碱性磷酸酶测试盒说明书步骤,采用血清生化检测(微板法)检测血清中 AKP 和血清 Ca 的含量。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠骨组织中钙转运通路相关蛋白的表达 用锡箔纸包好股骨标本,放入液氮中,30 s 后取出,将其敲碎,并将碎末转移到研钵中,加入适量液氮研磨成粉末,将研磨好的粉末放入试管中,并加入冰预冷的 RIPA 裂解液 300 μL ,反复吹打直至看不见组织块。将裂解完毕的细胞 $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分装上清,向离心管(规格为 0.5 mL)之中移入细胞。绘制蛋白标准曲线,计算蛋白浓度。灌胶、上样,根据蛋白定量的结果,计算出所有样品取样量,计算的基本标准为 50 ~ 100 μg (各种样品总蛋白),电泳、转膜。按 TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, PMCA1b, β -actin 所在位置进行切胶。室温条件下于 TBST 溶液(含 5% 脱脂奶粉)内封闭膜(载蛋白质条带)60 min。然后加入含有稀释一抗(β -actin 1:5 000, PMCA1b 1:1 000, TRPV5 1:1 000, NCX1 与 CaBP_{D28K} 1:500),振荡孵育并且要求应保持 4 °C 这一基本温度不变前提下过夜,清洗采用 TBST 液进行,加入用 TBST 稀释 HRP 标记的二抗,兔抗稀释比例 1:6 000,鼠抗稀释比例 1:5 000,将稀释后的二抗与膜共同孵育 90 min。洗涤后,采用 ECL 化学发光显示液曝光。将曝光后的底片扫描,并用 Quantity One 专业灰度分析软件进行分析。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析,单因素方差分析多组对比, *t* 检验两组对比,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对去势大鼠一般状态的影响 正常组皮毛光泽,反应迅速,饮食正常,好动,体质量渐增。造模后 4 周,模型组大鼠弓腰塌背体态,皮毛粗糙,反应慢,开始出现活动和进食减少等。尼尔雌醇组、左归丸各组中,前述症状全部出现相应改善,改善效果最理想的为高剂量组。

3.2 对去势大鼠离体股骨上 1/3 BMD 的影响 正常组和假手术组差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组大鼠 BMD 显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,左归丸高剂量组和尼尔雌醇组大鼠 BMD 均得到改善 ($P < 0.01$)。与模型组比较,左归丸低剂量组大鼠样本 BMD 升高无统计学意义。见表 1。

表 1 左归丸对去势大鼠离体股骨上 1/3 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of Zuoguiwan on 1/3 BMD of isolated femur in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

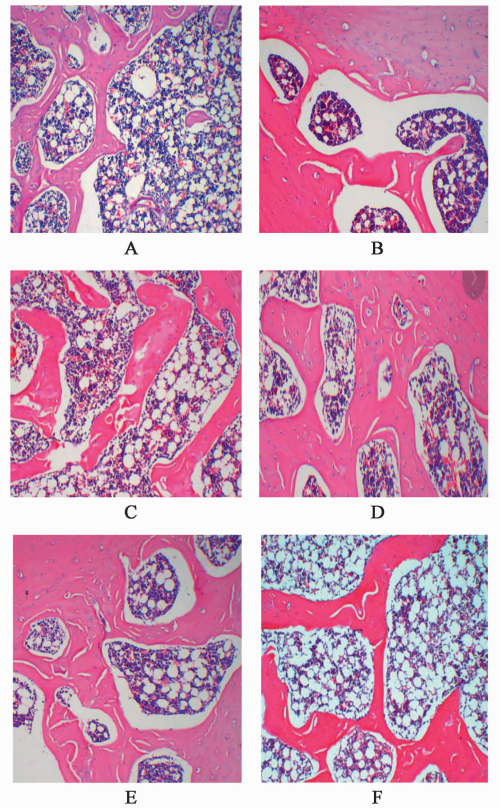
组别	剂量/g·kg ⁻¹	1/3BMD/mg·cm ⁻²
正常	-	242.0 ± 15.3
假手术	-	240.0 ± 18.5
模型	-	201.0 ± 17.7 ¹⁾
尼尔雌醇	0.001 67	233.1 ± 15.7 ²⁾
左归丸	9.6	214.0 ± 17.3
	38.4	235.7 ± 15.1 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对去势大鼠股骨病理组织的影响 正常组大鼠骨质疏松样改变不明显,骨小梁粗细均匀,结构完整,骨小梁之间的连接较好,脂肪细胞和骨细胞形态清晰。模型组大鼠可见骨松质结构改变,部分骨小梁明显纤细或出现断裂现象,相里间的连接不完整,符合骨质形态学破坏表现,提示造模成功。而左归丸高剂量组和尼尔雌醇组可见骨松质骨小梁改变不明显,骨小梁间隔稍增宽,髓腔稍扩大但未见明显纤细、断裂,相互连接较好,结构完整。见图 1。

3.4 对去势大鼠骨代谢标志物的影响 正常组和假手术组差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组血钙显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,左归丸高剂量组和尼尔雌醇组血 Ca 均显著上升 ($P < 0.01$);各组 TRACP 值差异无统计学意义。见表 2。

3.5 对去势大鼠骨组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白的影响 与正常组比较,假手术组大鼠各蛋白表达差异无统计学意义;与假手术组比较,模型组各蛋白表达均上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 尼尔雌醇组;E. 左归丸低剂量组;F. 左归丸高剂量组(图 2 同)

图 1 左归丸对去势大鼠股骨病理组织的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effect of Zuoguiwan on femoral pathology in ovariectomized rats(HE, ×100)

表 2 左归丸对去势大鼠骨代谢标志物的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Zuoguiwan on TRACP and serum calcium in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ca 值	TRACP 值
正常	-	2.77 ± 0.14	0.66 ± 0.12
假手术	-	2.88 ± 0.26	0.54 ± 0.16
模型	-	1.36 ± 0.12 ¹⁾	0.68 ± 0.09
尼尔雌醇	0.001 67	1.86 ± 0.24 ²⁾	0.52 ± 0.13
左归丸	9.6	1.74 ± 0.40	0.73 ± 0.14
	38.4	1.75 ± 0.26 ²⁾	0.64 ± 0.13

型组比较,左归丸高剂量组中 TRPV5 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$),各干预组中的 CaBP_{D28K} 与 NCX1 蛋白表达均有不同程度的下调 ($P < 0.05, P < 0.01$),PMCA1b 蛋白表达在左归丸低剂量组和尼尔雌醇组内表达均有不同程度下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3 和图 2。

表 3 左归丸对去势大鼠骨组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Zuoguiwan on expression of pathway of Ca^{2+} transport related proteins in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TRPV5/ β -actin	CaBP _{-D28K} / β -actin	NCX1/ β -actin	PMCA1b/ β -actin
正常	-	0.14 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.09 ± 0.03
假手术	-	0.15 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.03
模型	-	0.25 ± 0.02 ²⁾	0.48 ± 0.06 ¹⁾	0.20 ± 0.01 ¹⁾	0.26 ± 0.06 ²⁾
尼尔雌醇	0.001 67	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.05 ⁴⁾	0.16 ± 0.01 ³⁾	0.13 ± 0.03 ³⁾
左归丸	9.6	0.24 ± 0.02	0.29 ± 0.05 ³⁾	0.16 ± 0.02 ³⁾	0.12 ± 0.02 ⁴⁾
	38.4	0.17 ± 0.02 ⁴⁾	0.34 ± 0.03 ³⁾	0.15 ± 0.02 ⁴⁾	0.18 ± 0.02

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

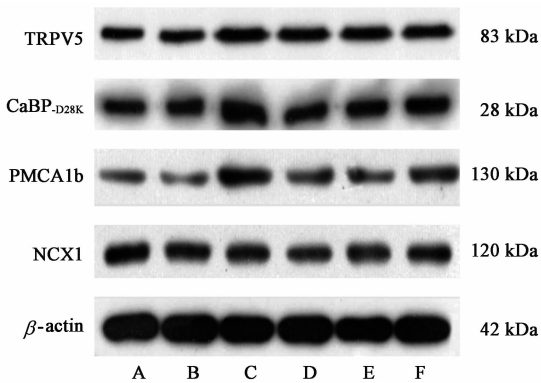


图 2 各组大鼠骨组织中 TRPV5 介导的钙转运通路相关蛋白表达
Fig. 2 Expression of pathway of Ca^{2+} transport related proteins in bone tissue of each group rats

4 讨论

女性的雌激素水平以及她们的卵巢功能在闭经条件下全部会出现下降,骨形成因此滞后于骨吸收,骨代谢会因此失衡。骨质疏松症(绝经女性)骨代谢特征可以通过去势大鼠动物模型样本进行有效模拟。Ca 水平调节(主要是指体内关键就在于骨组织,表现在骨吸收与骨形成过程中,骨吸收(破骨细胞)的重点在于钙离子跨膜转运,由 3 个紧密偶联(流入、胞质扩散、挤出)组成,研究表明新型钙通道 TRPV5 因子几乎在所有具有钙离子膜转运的组织及器官当中表达,是介导破骨细胞分化过程中重要的“钥匙”^[18],且有其他钙转运相关蛋白(于人、鼠破骨细胞)相伴,PMCA1b 等共同表达。吸收面(破骨细胞)刷状缘(微绒毛形成)为 TRPV5 主要分布区,破骨细胞(含 TRPV5)会导致骨吸收陷窝,其实质上属于能对破骨细胞钙离子吸收进行介导的一个基本通道蛋白。

人、鼠破骨细胞内均有钙通道 CaBP_{D28K} 表达。学者指出,破骨细胞骨吸收过程中会有 CaBP_{D28K} 参与,就此在某种程度上影响钙代谢。NCX1 是位于

细胞基底侧膜的钙离子转运体,是一种基本转出机制(对钙离子跨膜转运有介导作用),也是介导破骨细胞骨吸收和破骨细胞内钙离子运输的重要蛋白^[19]。NCX1 通过催化钠与钙离子的跨膜交换,实现其在骨吸收过程中介导钙离子的转运作用,对调控细胞内的 Ca^{2+} 浓度具有重要意义^[20-21]。骨吸收(NCX1 介导)增强会丢失骨量,就此导致骨质疏松,对 NCX1 功能状态(破骨细胞)进行抑制时会阻碍骨吸收。PMCA 的相对分子质量是 140 kDa,是 P 型 ATPase 家族中最大的^[22],他是钙离子的流出泵(通常具有高亲和力),Ca 含量(细胞中)是否能保持稳定状态主要取决于这种物质,真核细胞中全部有 PMCA。其 PMCA1-4 这类基因编码亚型(4 个)已被发现。人、鼠破骨细胞内有 PMCA1b 表达表明,PMCA1b 在破骨细胞骨吸收时可能同样也参与其中了。

本研究发现,模型组去卵巢大鼠血 Ca 浓度和 BMD 均下降,标志着骨质疏松模型大鼠造模成功。采用尼尔雌醇与左归丸干预后,大鼠 BMD 与血 Ca 浓度均有上升,提示雌激素与左归丸均有一定抗骨质疏松的作用。模型组大鼠破骨细胞中 TRPV5, CaBP_{D28K}, PMCA1b, NCX1 等介导破骨细胞吸收钙离子的重要通道蛋白均有升高,而尼尔雌醇及左归丸均可不同程度的降低上述蛋白的表达,提示去卵巢大鼠破骨细胞的骨吸收增强,而雌激素及左归丸的抗骨质疏松机制有可能是通过抑制 TRPV5 介导的破骨细胞的骨吸收而起作用。

[参考文献]

- [1] 刘峰. 骨质疏松流行病学及防治研究进展[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(22): 3321-3322.
- [2] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018,

- 24(2):253.
- [3] 许惠娟,李生强,陈娟,等.绝经后骨质疏松症不同年龄段中医证型分布特点[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):157-161.
- [4] 赖满香,林基伟,廖利平,等.基于中医传承辅助系统的治疗原发性骨质疏松症方剂组方规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(9):202-207.
- [5] 杜旭召,邓素玲,杨豪.补肾活血通络汤治疗糖皮质激素致骨质疏松症临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(4):193-197.
- [6] 柴毅,樊巧玲.左归丸治疗骨质疏松症相关机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):201-208.
- [7] 李然,黄瀚,刘立萍,等.左归丸对去卵巢大鼠骨组织降钙素受体蛋白表达的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(12):2993-2995.
- [8] 谭峰,樊巧玲,卞玉群,等.左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):137-140.
- [9] 卢建华,王维佳,陈明涛,等.补肾方对去卵巢大鼠腰椎骨形态计量学的影响[J].中医正骨,2011,23(5):24-26.
- [10] 李微,张博,徐红丹,等.左归丸对卵巢切除骨质疏松症模型小鼠骨代谢的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(7):2807-2810.
- [11] 陈剑磨,张胜军,夏炳江.左归丸对去势大鼠骨密度及骨组织 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 表达的影响[J].中华中医药学刊,2016,34(1):157-159.
- [12] 周强,孙鑫,邓洋洋,等.左归丸对去卵巢致绝经后骨质疏松症大鼠骨组织中 Notch1、BMP9 表达的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(7):2782-2784.
- [13] 任艳玲,李娅玲,吕海波,等.左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏 TGF- β_1 /Smad4 的 mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):190-194.
- [14] 章建华,邢婧,范连霞,等.骨质疏松肾阳虚和肾阴虚证型下左归丸含药血清干预成骨细胞 ERK1/2、Wnt/ β -catenin 信号通路的研究[J].中国中药杂志,2017,42(20):3983-3989.
- [15] 曲宁宁,何丽娟,何文智,等.左、右归丸含药血清通过 p38MAPK 信号通路干预 BMSCs 成骨诱导的研究[J].中华中医药学刊,2016,34(6):1326-1329.
- [16] SHI D J, WANG K W. The progress of TRP channels in structural studies[J]. Prog Physiol Sci, 2014, 45(6): 401-409.
- [17] 李昊,张西正.小鼠骨质疏松模型建立方法与评价指标选择概述[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(7):663-666.
- [18] 彭菲,宋玲,戚向敏,等.间歇性张应力对小鼠破骨细胞 TRPV5 基因表达的影响[J].山东大学学报,2017,55(11):22-26.
- [19] van der Eerden B C, Hoenderop J G, de Vries T J, et al. The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(48): 17507-17512.
- [20] 李京平,梁洁,付云.小鼠破骨细胞钠/钙交换体亚型 1 的表达与功能[J].解剖学研究,2010,32(5):368-373.
- [21] 王发生.钠钙交换体 1 型通道蛋白在人牙髓成牙本细胞和神经纤维组织中的表达[J].中国民康医学,2016,28(17):38-40.
- [22] Padanyi R, Paszty K, Hegedus L, et al. Multifaceted plasmamembrane Ca²⁺ pumps: from structure to intracellular Ca²⁺ handling and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(6 Pt B): 1351-1363.

[责任编辑 周冰冰]