

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.21.018

云南白药对牙龈卟啉单胞菌诱导骨破坏中 RANK/RANKL/OPG 系统的影响*

陈玉华¹,任晓斌²,朱房勇³,凌厉¹,和红兵^{2△}

(1. 江苏省无锡市精神卫生中心口腔科 214151; 2. 昆明医科大学附属口腔医院口腔科, 昆明 650031; 3. 江苏省无锡市第三人民医院口腔科 214000)

摘要:目的 建立昆明小鼠头颅骨接种牙龈卟啉单胞菌(Pg)的动物模型,客观评价云南白药对Pg诱导的骨破坏中核因子- κ B受体活化因子(RANK)/RANK配体(RANKL)/骨保护素(OPG)系统的影响。方法 72只雄性昆明小鼠分为模型组、云南白药治疗组、对照组。模型组和云南白药治疗组在小鼠两耳中间颅顶至枕部骨的骨上接种Pg,同时云南白药治疗组在建模的当天开始给予云南白药灌胃。在建模的第5、8、14天各组分别处死8只小鼠。检测头颅骨中破骨细胞的含量及头颅骨中RANKL、OPG mRNA的表达。结果 在术后3个时间点模型组的破骨细胞数目及头颅骨中RANKL mRNA的表达均明显高于云南白药治疗组($P<0.05$);模型组、云南白药治疗组也明显高于对照组($P<0.05$)。OPG mRNA的表达在各组之间进行比较则发现在术后3个时间点中云南白药治疗组均明显高于模型组和对照组($P<0.05$);而在第5天模型组低于对照组($P<0.05$),第8、14天模型组高于对照组($P<0.05$)。结论 云南白药可下调RANKL mRNA的表达,上调OPG mRNA的表达,以抑制破骨细胞的形成,提高骨的修复能力,从而抑制骨的吸收,促进骨的修复。

关键词:云南白药;牙龈卟啉单胞菌;骨保护素;核因子- κ B受体活化因子配体;破骨细胞

中图分类号:R781.4

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)21-2739-04

Effects of Yunnan Baiyao on RANK/RANKL/OPG system in porphyromonas gingivalis induced bone destruction*

Chen Yuhua¹, Ren Xiaobin², Zhu Fangyong³, Ling Li¹, He Hongbing^{2△}

(1. Department of Stomatology, Mental Health Center of Wuxi, Wuxi, Jiangsu 214151, China; 2. Department of Oral Medicine, the Affiliated Stomatological Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China; 3. Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Wuxi, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

Abstract: Objective To detect the effects of Yunnan Baiyao on receptor activator of NF- κ B(RANK)/receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)/osteoprotegerin(OPG) system by means of animal model that use Porphyromonas gingivalis(Pg) induce calvarial to induce bone destroy. **Methods** Seventy-two male Kunming mice were selected and randomly divided into model group, Yunnan Baiyao treatment group and control group. The animals of model group and Yunnan Baiyao treatment group were inoculated Pg at the midline of the scalp between the ears and the animals of the Yunnan Baiyao treatment group gastric perfusion Yunnan Baiyao after them inoculated Pg. Mice were killed at 5, 8 and 14 days after inoculation. For each data point, killed eight mice($n=8$), then detected the number of osteoclast of the calvaria and the change of RANKL mRNA, OPG mRNA expression. **Results** On the 5th, 8th and 14th day the number of osteoclast and the content of RANKL mRNA expression in the model group apparently higher than in the Yunnan Baiyao treatment group($P<0.05$), two groups also apparently higher than in the control group($P<0.05$). About OPG mRNA expression on the 5th, 8th and 14th day in the Yunnan Baiyao treatment group apparently higher than in the control group and model group($P<0.05$), but on the 5th day the model group lower than the control group($P<0.05$) and on the 8th, 14 day the model group higher than the control group($P<0.05$). **Conclusion** Yunnan Baiyao can cut regulation RANKL mRNA expression and raise regulation OPG mRNA expression to inhibit bone destruction and improve bone repair and inhibiting osteoclast product so as to inhibit bone destroy and improve bone repair.

Key words: Yunnan Baiyao; porphyromonas gingivalis; osteoprotegerin; ligand of receptor activator of NK- κ B; osteoclast

牙槽骨的丧失是导致口腔中牙齿松动脱落的主要原因之一^[1],而骨丧失又是由于骨的重建失衡所致。骨重建是骨组织的一种替换机制,其基本过程包括骨形成和骨吸收^[2]。近年发现的肿瘤坏死因子超家族新成员,核因子- κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)/RANK配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)/骨保护素(osteoprote-

gerin, OPG)系统在骨重建当中起着重要的调控作用:当RANKL/OPG的含量比值发生改变时将直接影响骨的重建。而牙龈卟啉单胞菌(porphyromonas gingivalis, Pg)作为口腔中牙周炎病最主要的优势菌,具有多种生物学活性,可促进和导致骨吸收。

云南白药作为我国著名的中草药之一,在促进骨缺损修复

及引导骨再生中具有重要的作用,其作用机制可能有:抑制炎症介质释放和白细胞游走^[4],促进骨缺损修复及引导骨再生等^[5]。为了进一步了解云南白药在分子水平上的药理作用及对 RANK/RANKL/OPG 系统的影响,本研究建立了 Pg 模型并进行相应研究。

1 材料与与方法

1.1 材料 50 d 的雄性昆明小鼠,体质量 20~25 g,昆明医学院实验动物中心提供;Pg,四川大学华西口腔医学重点实验室提供;云南白药,云南白药集团股份有限公司提供;TRAP 试剂盒,中国医学科学院血研所科技公司;柱式小量总 RNA 提取试剂盒 W7001,上海华舜公司;PCR 引物,生工生物工程(上海)有限公司合成;一步法逆转录-PCR(reverse transcription polymerase,RT-PCR)反应体系,宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 72 只 50 d 雄性昆明小鼠分为 3 组:模型组 24 只,云南白药治疗组 24 只,对照组 24 只,于术后第 5、8、14 天各组分别处死 8 只。

1.2.2 动物模型的建立 在乙醚麻醉下,在云南白药治疗组和模型组的小鼠两耳中间颅顶至枕部骨的骨上,分两次接种 200 μ L Pg(浓度 1×10^8 CFU/mL)于小鼠头颅骨膜下^[6],每次 100 μ L,隔天注射;对照组则注射等量的生理盐水。在建模的当天,云南白药治疗组则开始运用小鼠灌胃针每天给予灌胃 0.5 mL(浓度 12.5 g/mL)云南白药稀释液;模型组和对照组则给予同等剂量的生理盐水^[7]。

1.2.3 标本采集 在相对无菌的条件下,将处死的小鼠头颅骨沿正中矢状面一分为二;一半用 4% 多聚甲醛固定液常温下固定 24 h,10% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)脱钙液脱钙 4 d(每天换脱钙液),梯度乙醇脱水,二甲苯置换至石蜡包埋,矢状向连续 5 μ m 厚石蜡切片备用;另一半去除头颅骨表面的软组织后将头颅骨存于 RNA 保存液中-4 $^{\circ}$ C 保存,然后在无菌的条件下将头颅骨从 RNA 保存液中取出,甩干,放入研钵中,在液氮中研磨头颅骨,提取总 RNA,并保存于-80 $^{\circ}$ C。

1.2.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色(tartrate-resistant acid phosphates,TRAP) 通过多核破骨细胞内酶活性部位呈现红色沉淀,胞核染呈蓝色的特点进行染色。采用 Nikon 光学显微镜,每一样本选取一张切片,每张切片选取 10 个高倍视野,从而计数出颅骨单位毫米长度中表面破骨细胞的数量。

1.2.5 RANKL 和 OPG mRNA 表达检测 取 7 μ L RNA 溶液经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度和完整性,紫外灯下观察;另取 7 μ L RNA 溶液稀释后于 260 nm、280 nm 测定光密度(OD),计算 RNA 含量及 OD260 nm/OD280 nm 比值以确定其纯度。选 OD260 nm/OD280 nm 比值在 1.8~2.0 的 RNA 作 RT-PCR;检测基因、引物序列及大小见表 1。运用一步法 RT-PCR 反应体系:模板 RNA 2 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L、Prime Script 1 Step Enzyme Min 2 μ L、2 \times 1 Step Buffer 25 μ L,补去离子水 19 μ L 至 50 μ L 体系,对 RANKL 和 OPG 进行转录和扩增。RANKL 和 GAPDH 的反应条件是:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、53 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 次循环;72 $^{\circ}$ C 优化 10 min;-4 $^{\circ}$ C 冷却、-20 $^{\circ}$ C 保存。OPG 的反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、54 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 次循环;72 $^{\circ}$ C 优化 10 min;-4 $^{\circ}$ C

冷却、-20 $^{\circ}$ C 保存。将 RT-PCR 产物 7 μ L 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。紫外灯下观察,运用 Pharmacia Biotech 成像系统拍照,并用 Tatallab v1.10 软件系统分析各样本和內参 GAPDH 的灰度值。计算每一样本和其內参照的比值,以 OPG/GAPDH、RANKL/GAPDH 作为目的基因 RNA 的相对表达量。见表 1。

表 1 扩增片断所用引物序列

基因	引物	扩增产物(bp)
OPG	上游引物:5'-TTG GCT GAG TGT TCT GGT GGA-3'	431
	下游引物:5'-TGA CGG TTT TGG GAA AGT GGT AT-3'	
RANKL	上游引物:5'-CTA TGA TGG AAG GTT CGT GGC T-3'	319
	下游引物:5'-CTT GGG ATT TTG ATG CTG GTT T-3'	
GAPDH	上游引物:5'-GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC G-3'	200
	下游引物:5'-GTG GTG CAG GAT GCA TTG CTC TGA-3'	

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 q 检验比较各组各项指标之间的差异。对每项指标的各组数据进行正态检验和方差齐性检验,数据符合正态分布和方差齐性,采用方差分析对相应指标的均数进行显著性检验,并通过 q 检验进行样本均数的两两比较。如果方差不齐,采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAP 染色结果 通过计数颅骨单位毫米长度中表面破骨细胞的数量分析发现模型组、云南白药治疗组、对照组 3 组之间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且在第 5 天模型组的数目达到最高,而后持续下降;在每个时间点上模型组都比云南白药治疗组高($P < 0.05$),见表 2、图 1。

表 2 3 组术后各时间点破骨细胞计数($\bar{x} \pm s$,个/mm, $n=8$)

组别	第 5 天	第 8 天	第 14 天
模型组	5.61 \pm 0.24 ^a	4.43 \pm 0.19 ^a	2.58 \pm 0.13 ^a
云南白药治疗组	4.54 \pm 0.17 ^{ab}	3.06 \pm 0.16 ^{ab}	1.39 \pm 0.14 ^{ab}
对照组	0.79 \pm 0.15	0.88 \pm 0.13	0.85 \pm 0.16

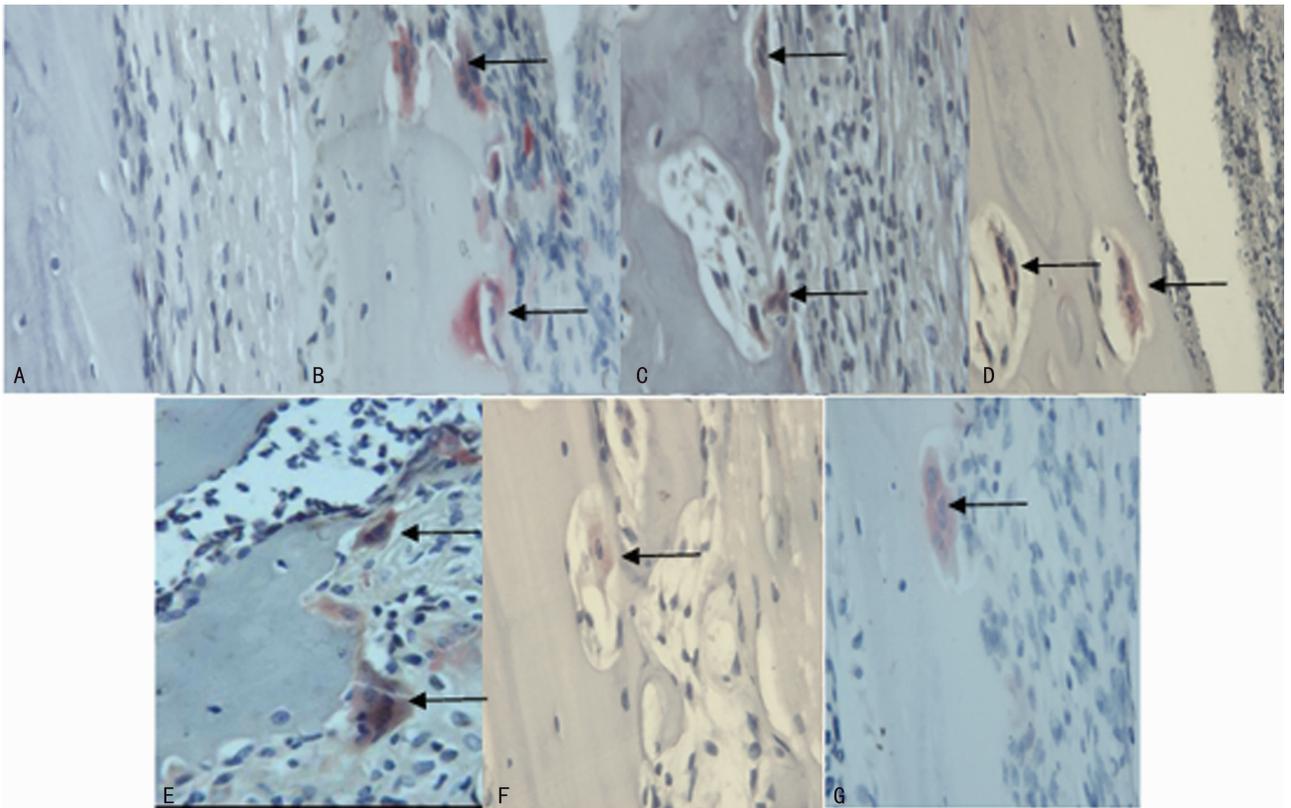
^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

2.2 OPG、RANKL mRNA 的表达 对于 OPG mRNA 的相对表达量在各组之间进行比较发现在术后 3 个时间点中云南白药治疗组都明显高于模型组和对照组($P < 0.05$)。术后 3 个时间点模型组头颅骨中 RANKL mRNA 的相对表达量均明显高于云南白药治疗组($P < 0.05$);两组也明显高于对照组($P < 0.05$)。见表 3、4、图 2。

表 3 3 组术后各时间点 OPG mRNA 相对表达量的变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

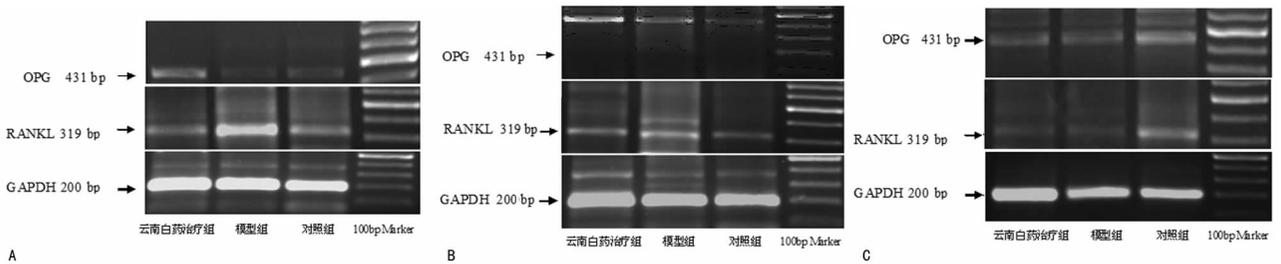
组别	第 5 天	第 8 天	第 14 天
模型组	0.20 \pm 0.03 ^a	0.35 \pm 0.05 ^a	0.29 \pm 0.02
云南白药治疗组	0.43 \pm 0.03 ^{ab}	0.57 \pm 0.04 ^{ab}	0.44 \pm 0.03 ^{ab}
对照组	0.27 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。



A: 对照组; B、C、D: 模型组第 5、8、14 天; E、F、G: 云南白药治疗组第 5、8、14 天。

图 1 各组不同时间点破骨细胞数量变化 (TRAP×400)



A: 第 5 天; B 第 8 天; C 第 14 天。

图 2 各组 OPG、RANKL mRNA 在第 5、8、14 天的表达情况

表 4 3 组术后各时间点 RANKL mRNA 相对表达量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	第 5 天	第 8 天	第 14 天
模型组	0.78±0.04 ^a	0.63±0.04 ^a	0.45±0.03 ^a
云南白药治疗组	0.38±0.01 ^{ab}	0.31±0.02 ^{ab}	0.26±0.01 ^{ab}
对照组	0.18±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较。

通过对 3 组中 OPG、RANKL 相对表达量进行对比分析发现, OPG 在第 5、8、14 天时云南白药治疗组都明显高于模型组和对照组 ($P < 0.05$), 而 RANKL 在第 5、8、14 天时进行对比差异都有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在第 5 天模型组和云南白药治疗组的 RANKL 相对表达量达到高峰, 可见云南白药可以通过上调 OPG mRNA 的表达, 下调 RANKL mRNA 的表达来抑制破骨细胞的形成、抑制骨的吸收, 从而促进骨的形成。

3 讨论

骨具有重新塑造的能力, 改建开始时由破骨细胞吸收骨而

后由成骨细胞产生新骨^[8]。成骨细胞和破骨细胞维持着骨的平衡, 当受到外界的刺激引起内部机构的改变如 OPG/RANKL 值的改变都将打破这个平衡使骨吸收加快或骨过度增生导致骨质疏松、牙周炎、骨硬化症等。近年发现当成骨细胞接受到外界骨吸收信号时成骨细胞可以通过分泌 RANKL 和 OPG 来调控破骨细胞的分化和功能^[9]。RANKL 由成骨细胞谱系细胞分泌, 是骨改建过程中关键的调节因子, 是破骨细胞形成和激活的下游调节因子^[10]; RANK 位于破骨细胞前体细胞的膜表面, 是一种膜受体, 同时又是 RANKL 的惟一受体, 当 RANKL 和 RANK 结合时激发了信号级联反应, 包括 NF- κ B 的活化, 激活的 RANK 将信号转入细胞内, 可加快破骨细胞分化、成熟, 增加破骨细胞的活性, 并抑制破骨细胞凋亡, 帮助破骨细胞成活, 增强破骨细胞骨吸收。OPG 是成骨细胞合成的一种分泌蛋白, 是骨代谢的一个重要负调控因子, 是一种诱导假受体, 能结合 RANKL, 通过与这些配体的竞争性结合从而封闭 RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合从而抑制破骨细胞分化、成熟, 诱导破骨细胞凋亡, 减弱破骨细胞介导的骨

吸收^[11-12]。因此,RANKL 和 OPG 的浓度比是调节破骨细胞分化、成熟的决定性因素。OPG 浓度下降或基因缺失,将不能抑制 RANKL 与 RANK 的结合,最终导致破骨细胞生成过多而发生骨质疏松。1998 年 4 月,Mizuno 等^[13]和 Bucay 等^[14]分别报道了 OPG 基因敲除纯合子小鼠表现出严重的骨质疏松症。相反 OPG 的浓度升高或 RANKL 基因的缺失则会引起骨的过度增生,如 OPG 过量表达导致骨硬化病,骨髓腔缩小,骨组织学分析显示矿化的小梁骨增加和小梁骨破骨细胞数量显著减少^[15],同样还发现小鼠敲除 RANKL 基因后表现为严重的大理石样骨病和出牙障碍^[3]。

目前对于成骨细胞、破骨细胞与中药的研究大多都是通过体外研究含药血清对成骨细胞、破骨细胞的影响。基于云南白药的组成成分复杂,不易提纯,不易溶解等原因及头颅骨接种 Pg 建立炎性骨病模型的可行性^[6]。本实验运用在昆明小鼠的头颅骨上接种 Pg 建立炎性骨病模型,并给予云南白药灌胃进行干预治疗,研究云南白药对骨的影响。

对于 RANK/RANKL/OPG 系统的研究目前发现某些中药如补肾复方含药^[16]、葛根素^[17]、蛇床子^[18]等都能上调成骨细胞 OPG mRNA 的表达,下调 RANKL mRNA 的表达从而减少破骨细胞的生成,抑制破骨细胞的活化,降低破骨细胞的骨吸收功能。本研究对模型组、云南白药治疗组、对照组在第 5、8、14 天头颅骨 OPG 和 RANKL mRNA 的相对表达量进行分析发现云南白药治疗组的 OPG mRNA 相对表达量明显高于模型组且在第 5、8 天时也明显高于对照组,云南白药治疗组在第 8 天时比值达到高峰;RANKL mRNA 相对表达量则是模型组明显高于云南白药治疗组和对照组,在第 5 天时达到高峰。可见云南白药可通过上调 OPG mRNA 的表达,下调 RANKL mRNA 来促进骨的修复;同时还发现 Pg 诱导的炎性骨病模型中第 5 天时骨破坏是最严重的,这和 TRAP 染色的结果是一致的。

在 Pg 诱导的炎性骨病模型中给予云南白药灌胃治疗可上调炎症部位 OPG mRNA 的表达,下调 RANKL mRNA 的表达,升高 OPG/RANKL 值,从而抑制破骨细胞的形成和功能的表达,抑制骨的破坏,促进骨的形成。进一步验证了云南白药在修复骨破坏当中的作用,也为进一步研究云南白药对促进骨修复的机制提供指导。

参考文献:

[1] 于世风,史凤芹,章魁华. 骨质疏松与颌骨[J]. 现代口腔医学杂志,1995,9(1):38-39.

[2] Parfitt A. The coupling of bone formation to bone resorption:a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis[J]. *Metab Bone Dis Relate Res*,1982,4(1):1-6.

[3] Suda T, Takahashi N, Udaqawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand fam-

ilies[J]. *Endocrine Rev*,1999,20(3):345-357.

[4] 蔡锡麟. 云南白药的药理研究[J]. *中成药研究*,1982(8):37.

[5] 王彦亭. 云南白药主要成分的骨形成作用研究[J]. *昆明医学院学报*,2008,6(12):12-15.

[6] He H, Liu R, Desta T, et al. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cell in bacteria stimulated bone loss[J]. *Endocrinology*,2004,145(1):447-452.

[7] Gaspersic R, Stiblar Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats[J]. *Eur J Oral Sci*,2002,110(2):125-129.

[8] Mundy GR. Local factors in bone remodeling[J]. *Recent Prog Horn Res*,1989,45:507-527.

[9] Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system[J]. *Endocrinology*,2001,142(12):5050-5055.

[10] Jones DH, Kong YY, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*,2002,61(2):32-39.

[11] 刘继中,胡蕴玉,纪宗玲,等. 骨保护素对破骨细胞分化和骨吸收活性的抑制作用[J]. *中国临床康复*,2004,9(14):2737-2740.

[12] Hofbauer CL, Khosla S, Dunstan C. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. *Bone Miner Res*,2000,15(3):2-12.

[13] Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor osteoprotegerin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1998,247(3):610-615.

[14] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin deficiency mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[J]. *Genes Dev*,1998,12(9):1260-1268.

[15] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin;a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. *Cell*,1997,89(2):309-319.

[16] 肖鲁伟,王伟东,童培建,等. 补肾复方含药血清对大鼠成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响[J]. *中医正骨*,2006,18(9):1-3.

[17] 吴乃中,李红丽,崔淑云. 葛根对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响[J]. *中华医学研究杂志*,2006,6(1):6-9.

[18] 杨庆秋,王少飞,胡侦明,等. 云南白药促进骨缺损修复及引导性骨再生的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*,2002,7(10):293-295.