

肾素抑制剂阿利吉仑对低钙喂饲小鼠松质骨的作用

张方怡¹, Gebru Yoseph¹, 黄文秀², 张岩¹

(1. 上海理工大学系统生物医学研究中心, 上海 200093; 2. 香港理工大学应用生物及化学科技学系, 香港)

Effects of renin inhibitor aliskiren on trabecular bone of mice fed with low calcium diet

ZHANG Fang-yi¹, GEBRU Yoseph¹, WONG Man-sau², ZHANG Yan¹

(1. Center for Systems Biomedical Sciences, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Dept of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2014.10.032

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2014)10-1477-02

中国图书分类号: R-332; R336; R348.2; R681; R972.4

关键词: 阿利吉仑; 肾素-血管紧张素系统; 肾素抑制剂; 松质骨; 低钙饮食; 骨损伤

Key words: aliskiren; renin-angiotensin system; renin inhibitor; trabecular bone; low calcium diet; bone injury

低钙饮食导致骨吸收增强,可诱发骨量的流失^[1],严重的则可导致骨质疏松。近年来有研究发现,肾素-血管紧张素系统(RAS)存在于骨组织并参与骨代谢疾病的发病过

程^[2-3]。由于骨组织 RAS 的活性升高,其活性肽血管紧张素 II(AngII)的生成增加,Ang II 作为 RAS 的最重要的活性物质^[4]通过调控骨代谢致骨量流失^[5]。阿利吉仑(Aliskiren)是一种新研制的可口服的具有直接抑制肾素活性的新型长效降压药物^[6]。阿利吉仑通过抑制 RAS 首步肾素的活性,可以有效抑制血管紧张素原向血管紧张素 I 的转化^[7]继而有效减少 RAS 活性肽 AngII 的生成^[8]。本实验以肾素抑制剂阿利吉仑为研究对象,探讨其对低钙饮食小鼠松质骨的作用。

1 材料

1.1 实验动物 8 周龄 ♂ ICR 小鼠共 20 只,由上海实验动物中心提供,合格证书编号: SCXK (Shanghai) 2007000510114。

1.2 动物饲料 适应期饲料钙含量 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (中国上海世林生物科技有限公司),低钙饲料钙含量 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Harlan Teklad, Madison, WI, USA)。

1.3 药物与试剂 阿利吉仑(诺华公司),150 mg/片。甲状旁腺激素 ELISA 试剂盒、骨钙素 ELISA 试剂盒(Immutopics, California, 美国);钙、磷、肌酐检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,北京,中国)。

2 方法

2.1 模型建立与样本收集 动物随机分为 3 组,全部以低钙饮食(LCD)饲养,包括 LCD 组;LCD + 低剂量($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)阿利吉仑组(LCD + LA)、LCD + 高剂量($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)阿利吉仑组(LCD + HA),并按照小鼠的体重持续给药 8 周后,收集尿液。处死动物时,收集血清、胫骨、腰椎等样本,待生物学分析。

收稿日期: 2014-06-04 修回日期: 2014-07-20

基金项目: 上海市教委科研创新重点项目(No 11ZZ137)

作者简介: 张方怡(1990-),女,硕士生,研究方向:药理学, Tel: 021-65710369, E-mail: zhangfangyi@163.com;
张岩(1978-),男,博士,副研究员,博士生导师,研究方向:骨代谢疾病、分子药理学,通讯作者, Tel: 021-65710368, E-mail: medicineyan@aliyun.com

作为 L 型钙通道的拮抗剂,但是对其具体作用微观机制我们还将进一步证实和深入研究。

参考文献:

- [1] Bhat S, Dao D T, Terrillion C E, et al. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease [J]. *Progr Neurobiol*, 2012, **99**(1): 1-14.
- [2] Gingnell M, Comasco E, Orelund L, et al. Neuroticism-related personality traits are related to symptom severity in patients with premenstrual dysphoric disorder and to the serotonin transporter gene-linked polymorphism 5-HTTLPR [J]. *Arch Women's mental health*, 2010, **13**(5): 417-23.
- [3] 魏盛,王海苹,乔明琦. 慢性束缚应激及居住入侵法制备经前期综合征肝气郁证大鼠模型的行为学观测与分析 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, **14**(4): 1848-52.
- [3] Wei S, Wang H P, Qiao M Q. Behavioral observation and analysis of PMS liver-qi depression rat model established by chronic re-

straint stress and resident-intruder paradigm [J]. *World Sci Technol Modernizat Tradit Chin Med*, 2012, **14**(4): 1848-52.

- [4] Dao D T, Mahon P B, Cai X, et al. Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans [J]. *Biol Psych*, 2010, **68**(9): 801-10.
- [5] Cairrão E, Alvarez E, Carvas J M, et al. Non-genomic vasorelaxant effects of 17 β -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca^{2+} current inhibition [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, **33**(5): 615-24.
- [6] 张广钦,郝雪梅,陈世忠. 芍药苷对大鼠心肌细胞 L 钙通道的阻断作用 [J]. 中国药理学通报, 2003, **19**(8): 863-6.
- [6] Zhang G Q, He X M, Chen S Z, et al. Blockade of paeoniflorin on L-type calcium channel in isolated rat ventricular myocytes [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, **19**(8): 863-6.
- [7] Wang P. Estrogen-like activities of saikosaponin-d *in vitro*: A pilot study [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, **626**(2): 159-65.

Tab 1 Serum & urine biochemistries among groups

Group	Serum calcium /mg · dL ⁻¹	Serum phosphate /mg · dL ⁻¹	Serum osteocalcin/ μg · L ⁻¹	Serum parathyroid hormone/ng · L ⁻¹	Urine calcium/urine creatinine/g · g ⁻¹
LCD	10.05 ± 0.28	11.01 ± 0.77	10.6 ± 1.5	235 ± 59	0.057 ± 0.002
LCD + LA	10.78 ± 0.53	11.60 ± 0.51	18.0 ± 1.7*	256 ± 54	0.059 ± 0.010
LCD + HA	10.79 ± 0.29	14.62 ± 0.43**	15.9 ± 1.4*	384 ± 60	0.068 ± 0.013

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs LCD

Tab 2 Trabecular bone biological parameters of lumbar vertebra-2 & vertebra-5

	Vertebra-2			Vertebra-5		
	LCD	LCD + LA	LCD + HA	LCD	LCD + LA	LCD + HA
BV/TV	0.410 ± 0.025	0.370 ± 0.030	0.386 ± 0.022	0.482 ± 0.018	0.384 ± 0.036	0.389 ± 0.031
Tb. N/ · mm ⁻¹	10.60 ± 0.71	9.72 ± 0.80	9.95 ± 0.38	11.33 ± 0.59	9.61 ± 0.88	9.37 ± 1.09
Tb. Th/μm	61.6 ± 0.7	62.6 ± 1.0	62.8 ± 1.3	66.7 ± 1.1	66.9 ± 1.0	67.2 ± 1.6
Tb. Sp/μm	106.0 ± 7.9	119.1 ± 10.7	111.6 ± 4.0	101.2 ± 6.3	122.7 ± 10.6	130.5 ± 17.9
BMD/TV/mgHA · cm ⁻³	291.7 ± 13.8	282.3 ± 19.3	281.4 ± 16.5	328.9 ± 12.8	291.3 ± 22.9	283.4 ± 24.5
BMD/BV/mgHA · cm ⁻³	721.2 ± 12.4	785.4 ± 7.5**	761.5 ± 19.3*	706.8 ± 11.0	781.7 ± 13.1**	762.6 ± 8.4**

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs LCD

2.2 指标检测 使用试剂盒检测血清、尿液生化指标。对腰椎第2节和第5节进行微焦点定量CT扫描分析。利用蛋白免疫印迹技术对目标蛋白血管紧张素II(Ang II)、血管紧张素转化酶(ACE)、肾素(renin)进行精确定量分析。

2.3 数据分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用双尾 Student's *t* 检验组间差异。

3 结果

3.1 血清和尿液的生化指标 相对于低钙饮食组,阿利吉仑给药组小鼠血钙、血甲状旁腺激素水平虽有升高,但差异未有统计学意义,而高剂量组可明显提高血磷水平(Tab 1, P < 0.01)。此外,阿利吉仑明显提高血清骨钙素水平(P < 0.05)(Tab 1)。

3.2 腰椎骨小梁的骨密度和结构参数 本实验通过微焦点定量CT技术检测了各组小鼠腰椎第2节和第5节的松质骨微观结构参数、松质骨的骨量(Tab 2)。各实验组间松质骨的微观结构参数没有差异,然而,阿利吉仑明显提高小鼠腰椎第2节(P < 0.05)、第5节(P < 0.01)骨小梁的体积骨密度。

3.3 蛋白结果分析 通过对小鼠胫骨RAS组分的蛋白表达的定量分析,结果表明,在LCD + LA组中,ACE和Ang II表达都明显降低(P < 0.05)。同样,在LCD + HA组中,Renin、ACE、Ang II蛋白表达都明显下调(P < 0.05)。

4 讨论

通过微焦点定量CT测定腰椎骨小梁生物学参数,发现阿利吉仑对骨小梁微观结构参数无明显作用,但可以明显提高小鼠腰椎小梁骨矿物质密度,这可以作为阿利吉仑具有防治骨质流失作用的有力证据。

通过对骨代谢生化指标的结果分析,发现阿利吉仑可明显提高血磷和血清骨钙素(骨形成指标)水平,说明阿利吉仑具有潜在的调控骨转换速率的作用,但是阿利吉仑对骨吸收是否具有调控作用,还需要进一步研究。

通过对骨组织RAS组分蛋白表达结果分析,发现在阿利吉仑药物处理组中,骨组织ACE、AngII、肾素等RAS组分的蛋白表达水平都明显降低,说明阿利吉仑可以有效调控RAS活性,从而减少骨损伤。因此,综合本实验结果可知,不

难看出,肾素抑制剂阿利吉仑可以通过对骨组织RAS的调控,减少骨矿流失。

本实验研究了药物对低钙饮食小鼠发生骨质疏松的预防作用,如果需要研究其治疗作用,需要在低钙喂食8~12周后,再进行药物干预。肾素抑制剂阿利吉仑对其它原因致骨质疏松症的改善作用以及其临床疗效还有待进一步的研究加以揭示,这将对高血压病人、尤其合并骨量丢失高风险的高血压患者具有重要临床意义。

参考文献:

[1] Zhang Y, Dong X L, Leung P C, et al. Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet[J]. *Bone*, 2009, **44**(1): 46-52.

[2] Zhang Y, Deng H W. Research progression of the bone biological activity of renin-angiotensin system[J]. *Chin J Osteoporos*, 2010, **16**(1): 64-66.

[3] Ghosh M, Majumdar S R. Antihypertensive medications, bone mineral density, and fractures: a review of old cardiac drugs that provides new insights into osteoporosis[J]. *Endocrine*, 2014, **46**(3): 397-405.

[4] 魏凯, 徐添颖, 管云枫, 等. β-抑制蛋白在AT1受体信号通路中的作用及意义[J]. *中国药理学通报* 2012, **28**(4): 461-5.

[4] Wei K, Xu T Y, Guan Y F, et al. Roles of β-arrestins in signaling pathway of AT1 receptor[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, **28**(4): 461-5.

[5] Diao T Y, Pan H, Gu S S, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes[J]. *J Bone Miner Metab*, 2014, **32**(3): 261-70.

[6] Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited[J]. *J Intern Med*, 2008, **264**(3): 224-36.

[7] Phillips M I, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, **3**(4): 569-77.

[8] Touyz R M, Chen X, Tabet F, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II[J]. *Circ Res*, 2002, **90**(11): 1205-13.