

淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷正交配伍调控 Bmp2、Smad1、4 诱导 BMSCs 成骨分化的影响^{*}

高璐¹, 郑洪新^{1**}, 陈谊敬¹, 宗志红², 林庶茹¹

(1. 辽宁中医药大学基础医学院 沈阳 110032; 2. 中国医科大学基础医学院 沈阳 110001)

摘要:目的:观察4种补肾中药淫羊藿、补骨脂、女贞子、何首乌有效成分淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷正交配伍,两种非补肾中药川芎、黄芪有效成分川芎嗪、黄芪甲苷,对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的调控作用。方法:65只SD大鼠随机分为正常对照组、阳性转化液对照组、补肾配伍组(1组、2组、3组、4组、5组、6组、7组、8组、9组)、非补肾药对照组(黄芪甲苷组、川芎嗪组)。补肾配伍组、非补肾药对照组予灌胃给药,每日1次,连续3天。正常对照组、阳性转化液对照组予等剂量生理盐水灌胃。灌胃第3天,大鼠处死后取各组含药血清培养骨髓间充质干细胞6、12、18天;ELISA法分别定量检测6、12、18天骨形态发生蛋白2(Bmp2)活性表达及含量,评价成骨细胞分化程度。用实时定量PCR法检测含药血清培养骨髓间充质干细胞第18天Bmp2、Smad1、Smad4 mRNA表达。结果:补肾配伍药可提高体外培养骨髓间充质干细胞Bmp2的活性表达及含量,在12天达到峰值。补肾配伍组能上调Bmp2、Smad1、Smad4的mRNA表达。结论:补肾中药有效成分配伍能促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,其机制可能与上调Bmp2、Smad1、Smad4 mRNA表达量及Bmp2的活性及含量有关。

关键词: 补肾中药 骨髓间充质干细胞 成骨细胞 骨形态发生蛋白2 Smad1 Smad4

doi: 10.11842/wst.2014.05.026 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Stem Cells, BMSCs)是来源于骨髓基质中的一种间充质细胞,又称为骨髓基质干细胞,具有多向分化潜能。在特定条件下经诱导后,可向成骨细胞分化^[1]。BMSC增殖,尤其是定向分化功能发生障碍时,将直接影响成骨细胞的生成,被视为骨质疏松发生的重要机制之一^[2]。

前期研究发现补肾中药有效成分淫羊藿苷、补

骨脂素、齐墩果酸可能从增加BMSCs细胞外基质、促进生长因子相关信号通路、增加蛋白质合成等方面发挥促进BMSCs成骨分化的作用^[3]。本研究即在此基础上,观察补肾中药淫羊藿、补骨脂及其有效成分淫羊藿苷、补骨脂素偏于温补肾阳的作用;女贞子和何首乌及其有效成分齐墩果酸、二苯乙烯苷偏于滋补肾阴的作用。4药成分配伍可能对骨形态发生蛋白2(Bone Morphogenetic Protein, Bmp2)/Smad1、Smad4信号通路BMSCs成骨分化具有影响,从基因水平揭示其可能的作用机制,为临床运用补

收稿日期:2013-11-03

修回日期:2014-02-23

* 科学技术部国家重点基础研究发展(“973”)计划(2010CB53040-04)基于“肾藏精”的脏象理论研究—从骨质疏松症探讨“肾主骨”理论的研究,总课题负责人:王拥军,子课题负责人:郑洪新。

** 通讯作者:郑洪新,本刊编委教授,博士研究生导师,辽宁中医药大学中医基础理论国家重点学科带头人,主要研究方向:肾藏象理论及其应用研究。

肾中药治疗骨质疏松症提供理论依据。血清药理学概念是 1988 年由日本学者田代真一基于“人体胃肠道中寄生菌群可通过水解苷类物质以获得能量来源,中药生物活性成分可能是中药经过菌群代谢之后的产物”这一理论而提出的^[4]。

因中药成分复杂,逐一研究难度较大,而且本次研究为成分配伍,尚无前例可鉴,所以研究采用中药血清药理学方法,采用含药血清对体外培养骨髓间充质干细胞,观察其成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

6 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 65 只,体质量(200±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 实验药品和配制

淫羊藿苷(批号:110737-200415)、补骨脂素(批号:110739-201115)、齐墩果酸(批号:110709-200505)、黄芪甲苷(批号:110781-200613)均购自中国药品生物制品检定所。二苯乙烯苷(批号:FY16430226)、川芎嗪(批号:ZL20120302CXQ)购自南京泽朗医药科技有限公司。上述单体用研钵研磨,分别混悬于生理盐水中,制成 4 mg·mL⁻¹ 悬液。

培养液配制:①基础培养液:DMEM +10 mL·dL⁻¹ 胎牛血清(含 100 U·mL⁻¹ 青、链霉素)。②成骨诱导液:DMEM + 10 mL·dL⁻¹ 胎牛血清(含 100 U·mL⁻¹ 青、链霉素)+0.1 mol·L⁻¹ 地塞米松+ 50 g·mL⁻¹ 维生素 C+10 mmol·L⁻¹ B-甘油磷酸钠。用于阳性转化液对照组。

1.3 仪器和试剂

胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS),0.25%胰蛋白酶,Hank's 液[赛业(广州)生物科技有限公司],DMEM(HyClone),SANYO-MDF-382N-80℃超低温冰箱(日本 Sanyo 公司),3111 型二氧化碳培养箱(美国),CK40-F2 型倒置式生物显微镜(日本),1287 型生物安全柜(美国),DHG-9241A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),PCR 扩增仪,酶联免疫分析仪。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及用药

65 只大鼠按随机数字表随机分为 13 组,正常对照组、阳性转化液对照组(转化液组)、补肾配伍

组(正交设计 9 组)、非补肾中药对照组(黄芪甲苷组、川芎嗪组)。补肾配伍组按正交设计分高、中、低剂量,低剂量 10 mg·kg⁻¹,中剂量 20 mg·kg⁻¹,高剂量 40 mg·kg⁻¹,非补肾中药对照组按 20 mg·kg⁻¹ 体质量分别给予灌胃,连续 3 天。正常对照组、阳性转化液对照组(转化液组)给予 1 mL/100 g 体质量生理盐水灌胃。正交设计方案:4 因素 3 水平正交设计 L₉(3⁴)。见表 1。

1.4.2 含药血清的制备

大鼠末次灌胃 1 h 后麻醉取血。大鼠经 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(3 mL·kg⁻¹),行腹主动脉采血并制备血清,灭活后冻存。使用前用 DMEM 液稀释成体积分数为 10%的含药血清。

1.4.3 骨髓间充质干细胞培养

骨髓间充质干细胞(购自广州赛业有限公司),采用胰蛋白酶消化法进行大鼠的骨髓间充质干细胞的传代。

1.4.4 Bmp2 活性检测

Bmp2 活性检测(ELISA 法)按照 Bmp2 测定试剂盒的说明书进行操作。

1.4.5 Bmp2、Smad1、Smad4 mRNA 检测

对骨髓间充质干细胞诱导分化 18 天,采用实时荧光定量 PCR 方法。提取总 RNA,进行两步法扩增。PCR 反应体系为 20 μL,扩增仪中 95℃ 30 s,再扩增(95℃ 5 s,60℃ 34 s,72℃ 25 s)40 个循环,72℃延伸 10 min。用 ABI7500 软件自动进行绝对定量分析,以每一样体所含目的基因的拷贝数和其 β-actin 内参基因的拷贝数的比值表示目的基因的表达量。根据 NCBI/Genbank 公布的各基因相应 mRNA 序列,自行设计引物,引物序列见表 2。

1.5 统计分析

采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据间的比较采用正交试验多指标分析及单因素方差分析的检验方法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

表 1 因素水平表(mg·kg⁻¹)

水平	A 淫羊藿苷	B 补骨脂素	C 齐墩果酸	D 二苯乙烯苷
1	10	10	10	10
2	20	20	20	20
3	40	40	40	40

2 结果

2.1 Bmp2 活性及含量

检测含药血清在第 6、12、18 天 Bmp2 的活性及含量,其活性及含量在第 12 天达到了峰值。其结果显示:与正常对照组比较,补肾中药配伍共 9 组、阳性转化液对照组(转化液组)、非补肾中药组 Bmp2 的活性及含量显著增加($P<0.01$);与阳性转化液对照组比较,补肾中药配伍组中第 5 组、6 组 Bmp2 的活性及含量显著增加 ($P<$

0.01);与非补肾中药组比较,补肾中药配伍组(除第 1 组、2 组)Bmp2 的活性及含量显著增高 ($P<0.01$);补肾中药配伍组之间比较,第 6 组 Bmp2 的活性及含量显著高于其它组 ($P<0.01$)。见表 3。

2.2 对成骨细胞 Bmp2 mRNA 表达的影响

检测的目的基因和内参基因溶解曲线,可见一个特性峰,表明引物特异性好。基因扩增曲线呈“S”型,说明扩增效率较高,见图 1、图 2。

与正常对照组比较,补肾中药配伍第 5 组、6

表 2 Real-Time PCR 引物序列

引物名称	序列	分子量
β -actin	F 5'-ACCAACTGGGACG-3' R 5'-AGGCATACAGGGAC-3'	205 bp
Bmp2	F 5'-GGACTGCGGTCTCCTAAA-3' R 5'-CAGCCTCAACTCAAACCTCG-3'	191 bp
Smad4	F 5'-CACTATGAGCGGGTTGT-3' R 5'-TGTCTTCCGTGGGTAA-3'	137 bp
Smad1	F 5'-GCAGCACCTACCCTCAC-3' R 5'-AACCATCCACCAACACG-3'	306 bp

表 3 6、12、18 天各组 Bmp2 活性值的表达($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	6 天	12 天	18 天
正常对照组	0.31±0.04	0.27±0.01	0.45±0.07
转化液组	1.12±0.47 [*]	0.92±0.14 [*]	0.98±0.03 [*]
1 组	0.55±0.07 [#]	0.58±0.03 ^{**}	0.56±0.60 [#]
2 组	0.50±0.08 [#]	0.59±0.05 ^{**}	0.51±0.05 [#]
3 组	0.56±0.05 ^{**#}	0.62±0.09 ^{**}	0.49±0.09 [#]
4 组	0.65±0.06 ^{#△}	0.71±0.08 ^{**}	0.60±0.09 ^{#△△}
5 组	0.87±0.14 ^{**##△▲☆☆}	0.98±0.10 ^{**△▲☆☆}	0.77±0.15 ^{**#△▲☆☆}
6 组	0.82±0.13 ^{**#△▲☆☆}	1.23±0.24 ^{**#△▲☆☆○}	0.62±0.14 ^{**☆☆○}
7 组	0.49±0.02 ^{#○●}	0.66±0.03 ^{**#○●}	0.64±0.16 ^{**#▲▲☆☆○}
8 组	0.64±0.09 ^{**#○○}	0.77±0.07 ^{**△▲☆☆○●}	0.53±0.04 ^{#○}
9 组	1.03±0.11 ^{**▲☆☆◆}	0.90±0.05 ^{**△▲☆☆●◆◆}	0.70±0.03 ^{**#△▲▲☆☆◆◆}
黄芪甲苷组	0.49±0.02 ^{#○●}	0.53±0.03 ^{**#★○●◆□}	0.39±0.04 ^{#△▲★○●◆□}
川芎嗪组	0.31±0.02 ^{#△▲☆☆★○●◆□}	0.31±0.03 ^{#△▲★○●◆◆□■}	0.39±0.04 ^{#△▲★○●◆◆□}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与阳性对照组比较,[#] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与补肾中药配伍 1 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与补肾中药配伍 2 组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$;与补肾中药配伍 3 组比较,[☆] $P<0.05$,^{☆☆} $P<0.01$;与补肾中药配伍 4 组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与补肾中药配伍 5 组比较,[○] $P<0.05$,^{○○} $P<0.01$;与补肾中药配伍 6 组比较,[●] $P<0.05$;与补肾中药配伍 7 组比较,[◇] $P<0.05$;与补肾中药配伍 8 组比较,[★] $P<0.05$,^{★★} $P<0.01$;与补肾中药配伍 9 组比较,[□] $P<0.05$;与非补肾中药黄芪甲苷组比较,[■] $P<0.05$ 。下同。

组,非补肾中药黄芪甲苷组表达水平明显上调($P<0.05$);与阳性转化液对照组比较,补肾中药配伍组第5组、6组,非补肾中药黄芪甲苷组表达水平明显上调($P<0.01$);与非补肾中药川芎嗪组比较,补肾中药配伍组第5、6组 Bmp2 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$);补肾中药配伍组之间比较,第5组 Bmp2 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$)。见表4。

2.3 对成骨细胞 Smad1 mRNA 表达的影响

检测的目的基因和内参基因溶解曲线,可见一个特性峰,表明引物特异性好。基因扩增曲线呈“S”型,说明扩增效率较高,见图3、图4。

与正常对照组比较,补肾中药配伍组第3组、4组、8组和黄芪甲苷组 Smad1 mRNA 表达水平明显上调($P<0.05$);与阳性转化液对照组比较,补肾中药配伍组第8组、黄芪甲苷组 Smad1 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$);与非补肾中药川芎嗪组比较,补肾中药配伍组第4组、8组,黄芪甲苷组 Smad1 mRNA

表达水平显著上调($P<0.01$);补肾中药配伍组之间比较,第8组 Smad1 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$)。见表4。

2.4 对成骨细胞 Smad4 mRNA 表达的影响

检测的目的基因和内参基因溶解曲线可见一个特性峰,表明引物特异性好。基因扩增曲线呈“S”型,说明扩增效率较高,见图5、图6。

与正常对照组比较,补肾中药配伍组4组和阳性转化液对照组 Smad4 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$);与非补肾中药川芎嗪组比较,补肾中药配伍组第1组、4组、5组、7组,阳性转化液对照组、黄芪甲苷组 Smad4 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$);补肾中药配伍组之间比较,第4组 Smad4 mRNA 表达水平显著上调($P<0.01$)。见表4。

2.5 结果及方差分析

由表5、表6分析结果可知淫羊藿苷(A)为主要因素,依据直观分析法结合表3,各药物的主次为

$A>C>B>D$, 而且 $B2>B1>B3$, $C1>C3>C2$, $D3>D1>D2$, 所以对于主要因素淫羊藿苷(A)取中剂量水平,对于次要因素补骨脂素(B),B1和B2差异较小,根据实际成本,综合比较取低剂量,从而得到最佳试验方案淫羊藿苷中剂量、补骨脂素低剂量、齐墩果酸中剂量、二苯乙烯苷高剂量即补肾配伍第4组。

3 讨论

3.1 4种补肾中药有效成分促进骨代谢的研究现状

淫羊藿苷是小檗科淫羊藿属植物淫羊藿茎叶中提取的总黄酮的主要有效成分。现代药理学研究证明,淫羊藿苷具有抗肿瘤、增强免疫功能、改善心脑血管功能、调节内分泌、促进成骨等功能。该成分在体外可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞的增殖和分化。殷晓雪等^[5]将人骨髓基质干细胞定向诱导分化为成骨细胞,MTT法检测发现淫

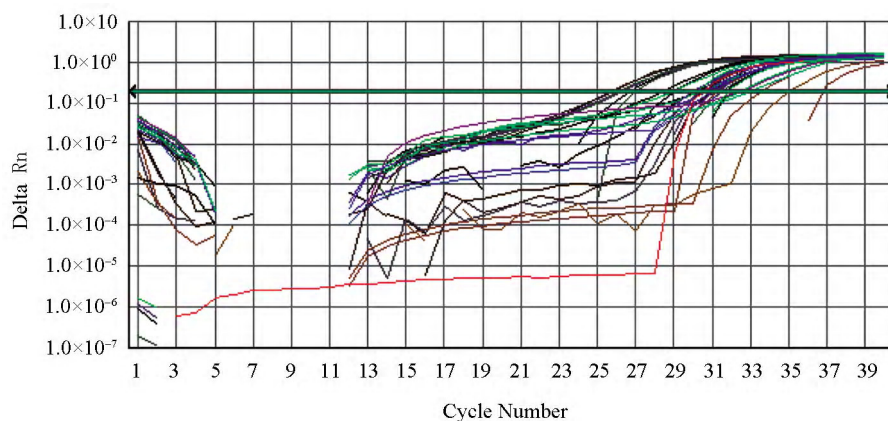


图1 成骨细胞 Bmp2 扩增曲线

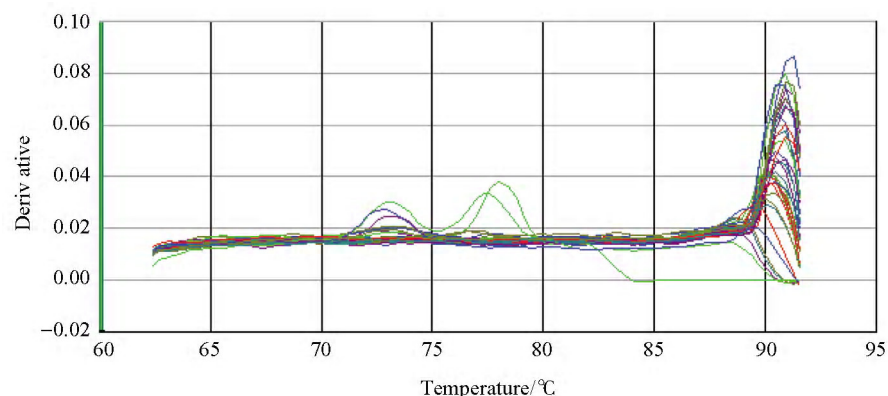


图2 成骨细胞 Bmp2 溶解曲线

表 4 各组 Bmp2、Smad1、Smad4 基因表达水平($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)

组别	Bmp2	Smad1	Smad4
正常对照组	1.11±0.53	1.00±0.04	1.01±0.15
转化液组	0.25±0.05	2.35±0.79	1.86±0.27 [*]
1 组	0.82±0.23	2.53±1.00	1.26±0.03 [#]
2 组	0.90±0.69	0.25±0.09 ^{##△△}	0.52±0.06 ^{※※△}
3 组	1.50±1.33	3.14±0.50 ^{※※▲}	1.09±0.14 ^{#▲}
4 组	1.49±0.04	4.29±0.19 ^{※▲}	1.63±0.16 ^{※▲☆}
5 组	4.63±1.98 ^{※※△▲☆☆}	1.82±0.55 ^{1**}	1.17±0.10 ^{#▲*}
6 组	3.90±2.49 ^{※※△▲☆☆**}	0.08±0.07 ^{##△△☆☆}	0.91±0.24 ^{#*}
7 组	1.27±0.42 ^{○○●●}	1.15±0.51 [*]	1.30±0.15 ^{#▲}
8 组	1.31±1.20 ^{○○●●}	6.8±3.00 ^{※※△▲☆☆★○○◆◇}	1.02±0.16 ^{#▲*}
9 组	0.72±0.44 ^{○○●}	2.38±0.41 ^{▲▲●●◆}	0.97±0.32 ^{#▲*}
黄芪甲苷组	4.84±3.34 ^{※※△▲☆☆}	16.35±2.45 ^{※※△▲☆☆★○○◆◇□}	1.38±0.29 ^{#▲●}
川芎嗪组	0.54±0.25 ^{○○■}	1.33±1.12 ^{★◆■}	0.69±0.04 ^{#△★○○■}

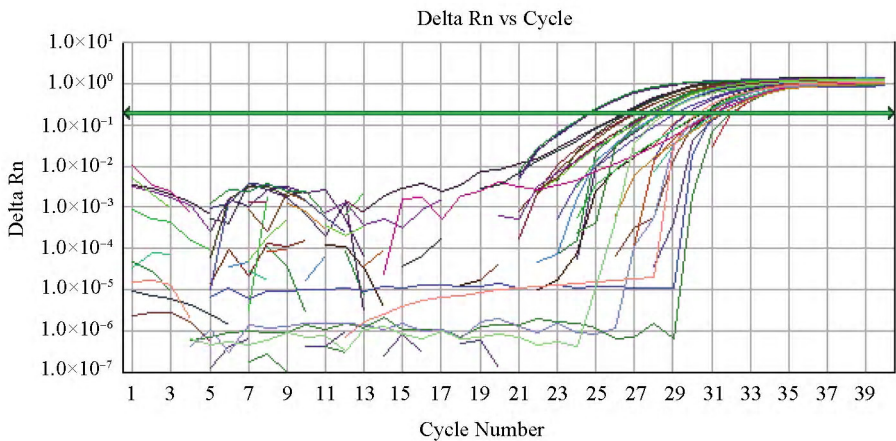


图 3 成骨细胞 Smad1 扩增曲线

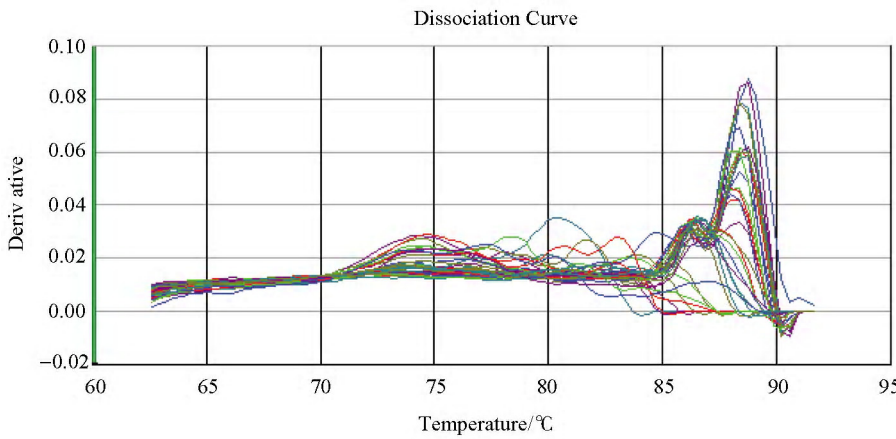


图 4 成骨细胞 Smad1 溶解曲线

羊藿苷对人成骨细胞增殖有显著促进作用，其作用可能与其升高人成骨细胞 Bmp2 mRNA 的表达有关。淫羊藿苷对于成骨细胞的作用机制尚未完全明了，现有的研究表明淫羊藿苷与促进成骨细胞胞内信号转导因子、细胞因子和某些转录因子有关，其能够通过诱导 Bmp2 和一氧化氮的合成，上调 Smad4、核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbfa1/Runx2) 和骨保护素的基因表达，下调细胞核因子 κB 受体活化因子配体 (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand, RANKL) 的基因表达，达到促进成骨细胞增殖和分化，增加骨形成的作用^[6-8]。Huang J 等^[9]采用 MTT 和 3H-TdR 掺入法研究了淫羊藿苷及其两个主要的代谢产物淫羊藿次苷 (Icariside, I-CA) 和淫羊藿素 (Icaritin) 对大鼠成骨细胞的影响，发现三者均能促进成骨细胞的增殖和分化，且呈浓度依赖性，淫羊藿次

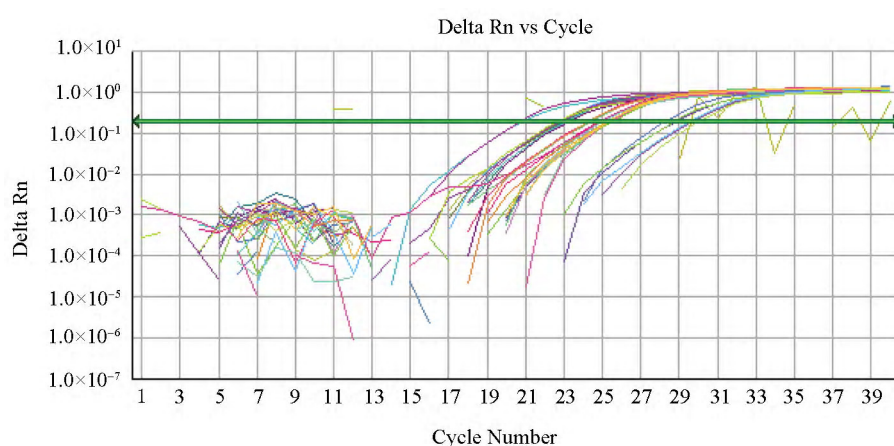


图5 成骨细胞 Smad4 扩增曲线

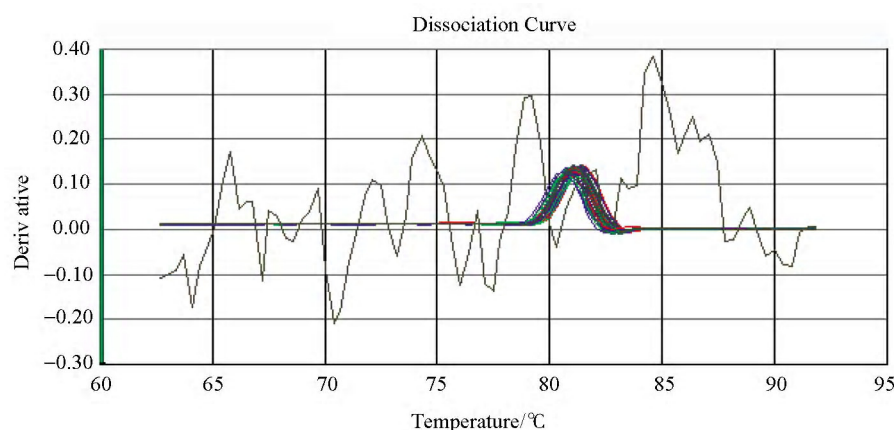


图6 成骨细胞 Smad4 溶解曲线

苷和淫羊藿素的促增殖作用优于淫羊藿苷,说明口服是正确的给药方式。邹节明等^[10]采用放射性同位素示踪技术比较研究 I-CA 在单一状态及复方状态下在 小鼠体内的动态分布,发现 ICA 在两种状态下,在动物体内的动力学行为均符合开放型二室模型。并且复方状态时,复方中的其他成分对 ICA 有促进吸收和分布,延迟消除,长时间保持体内药量,提高其生物利用度等协同增效作用。

补骨脂素是补骨脂的有效成分,属于一种香豆素类化合物。临床可用于骨质疏松症、皮肤病等多种疾病的治疗。研究报道补骨脂素对体外培养的成骨细胞具有促增殖和分化的作用,其发挥促成骨作用的机制可能与植物雌激素样作用有关^[11,12]。

齐墩果酸 (Oleanolic Acid, OA)是女贞子的有效成分之一,属于不饱和三萜化合物,具有消炎、护肝肾、解毒、降糖、降脂、调

表5 正交试验结果(*n*=3)

序号	因素				Bmp2 活性 /pg·mL ⁻¹	B mRNA /μg·mL ⁻¹	Smad1 mRNA /μg·mL ⁻¹	Sma mRNA /μg·mL ⁻¹	综合评价
	A	B	C	D					
1	1	1	1	1	0.58	0.82	2.53	1.26	24.12
2	1	2	2	2	0.59	0.9	0.25	0.52	21.19
3	1	3	3	3	0.62	1.5	3.14	1.09	25.28
4	2	1	2	3	0.71	1.49	4.29	1.63	27.05
5	2	2	3	1	0.98	4.63	1.82	1.17	27.53
6	2	3	1	2	1.23	3.9	0.08	0.91	25.05
7	3	1	3	1	0.66	1.27	1.15	1.3	23.26
8	3	2	1	3	0.77	1.31	6.8	1.02	28.78
9	3	3	2	1	0.9	0.72	2.38	0.97	24.75
K1	23.53	24.81	25.99	25.47					
K2	26.54	25.84	24.33	23.17					
K3	25.6	25.03	25.36	27.04					
Sj	3.013	1.025	1.655	3.871					

表6 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	F	P
A	14.249	2	8.152	※
B	1.748	2	1.000	
C	4.185	2	2.394	
D	2.746	2	3.013	
误差(e)	1.75	2	—	

注:※ $P<0.05$ 。

节免疫和抗氧化的作用。齐墩果酸临床常应用于骨质疏松的治疗,但尚未有确切的研究报道。收载于《部颁标准》中药成分中的祛风止痛片,以它的有效成分齐墩果酸的含量来控制质量、稳定疗效^[13]。动物实验证明,OA在剂量下未发现任何毒副作用,大白鼠连续用药50天,尿中酮类固醇水平与对照组无差异,OA急性中毒实验,测得小白鼠一次皮下给药的LD₅₀为340 mg·kg⁻¹,大白鼠分别口服1 g·kg⁻¹及静脉滴注500 mg·kg⁻¹,未见中毒和死亡,亚急性毒性试验中,大白鼠每日按180 mg·kg⁻¹剂量连续口服10天及100 mg·kg⁻¹连服50天,停药后镜检结果与对照组相似,心、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸、胃、十二指肠、小肠、子宫、膀胱等脏器未发现明显病变^[14]。

二苯乙烯苷是何首乌中特有的生物活性成分,目前已经成为何首乌药材的专属性指标,具有降血脂、抑制肿瘤、抗氧化清除自由基的功能,作为抗衰老指标的成分极具研究价值。王春英等^[15]首次建立了用HPLC法测定血浆中二苯乙烯苷含量,采用此法研究了何首乌中二苯乙烯苷在小鼠及兔体内的药代动力学行为,结果表明,静脉注射给药后药代动力学行为符合二室开放模型,同时发现二苯乙烯苷进入体内后很快消除,并转化为与原形药物紫外吸收光谱非常相似的代谢物,逐渐进行消除,提出在体内发挥药效的可能是二苯乙烯苷的代谢物。孙江浩等^[16]对二苯乙烯苷单体成分在大鼠体内的药动学进行研究,采用RP-HPLC法测定大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的浓度,发现大鼠腹腔注射100、50 mg·kg⁻¹二苯乙烯苷后药动学均符合一室模型。大鼠腹腔注射二苯乙烯苷后30 min,各组织二苯乙烯苷浓度即达高峰,单位组织中以心、肾、肝分布较高,肺、胃、脾、肠次之;睾丸、脑组织中分布较

少。实验中发现大鼠体内存在一明显的代谢物峰,其保留时间与小鼠体内的代谢物二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合物峰保留时间一致,推测其为二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合物。

3.2 Bmp2 及其 Smad 信号转导通路成骨分化

BMP属于转化生长因子(TGF- β)超家族成员,是一种多功能生长因子,其中Bmp2是重要的骨形成调节因子^[17]。Bmp2可以加速BMSCs向成骨细胞分化,有研究证明其作用机制可能为Bmp2表达量增加,能引起或激活成骨相关基因mRNA表达,从而使BMSCs向成骨方向分化,表现为ALP活性增强,Ⅰ型胶原、BGP表达增加,矿化结节形成^[18]。实验证实,不表达Bmp2的前体成骨细胞不具有分化的能力,若加入外源性的重组Bmp2或将Bmp2基因转染入这种细胞后,可促进其向成骨细胞分化^[19]。Bmp2可通过激活其下游信号转导分子Smads调节成骨基因转录而发挥其成骨作用^[20]。

迄今为止在哺乳动物已经分离鉴定的Smad蛋白有9种,用Smad1~9表示。Smad蛋白可分为3类:受体调节型Smads(R-Smad):Smad1、5、8参与BMPs信号转导;共同介导型Smads(Co-Smad):Smad4为TGF- β 信号转导过程中共同需要的介质;抑制型Smads(I-Smad):Smad-6优先抑制BMP信号转导;Smad7抑制TGF- β 和BMP信号转导。Smad1、5通过与Smad4相互结合进入细胞核内通过激活和诱导成骨细胞特异性转录因子Cbfa1的功能与表达,转导Bmp2的信号,刺激成骨细胞分化^[21]。

3.3 补肾中药有效成分配伍对 Bmp2/Smad1、Smad4 信号通路对 BMSCs 成骨分化的影响

3.3.1 补肾中药有效成分配伍对 Bmp2 的影响

本研究表明骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程中存在Bmp2的基因和蛋白表达。补肾配伍组能显著上调Bmp2的基因和蛋白表达,这可能是其促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的机制之一。以补肾中药配伍组第5组、第6组Bmp2蛋白和基因表达的上调最为显著,正交设计分析其中淫羊藿苷为主要因素,体现出淫羊藿苷对Bmp2的靶向性,与以往的研究中结论一致。

3.3.2 补肾中药有效成分配伍对 Smad1 的影响

本研究表明骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程中存在Smad1的基因表达。补肾配伍组能

显著上调 Smad1 的基因表达,可能是其促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的机制之一。补肾中药配伍组之间比较,第 8 组表达水平上调显著。

3.3.3 补肾中药有效成分配伍对 Smad4 的影响

本研究表明骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程中存在 Smad4 的基因表达。补肾配伍组能显著上调 Smad4 的基因表达,可能是其促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的机制之一。补肾中药配伍组中第 4 组 Smad4 mRNA 表达水平明显上调,正交设计分析其主要因素为补骨脂素。

综上所述,采用正交设计多指标试验分析综合平衡法,从而得到最佳试验方案淫羊藿苷中剂量、补骨脂素高剂量、齐墩果酸低剂量、二苯乙烯苷中剂量即补肾配伍第 6 组。在前期研究中,对细胞上清液采用 ELISA 法检测 ALP 和 BGP 的含量,各组比较的结果也显示补肾配伍第 6 组的显著改变,也可进一步验证最佳试验方案。

3.4 补肾成分配伍与非补肾中药对诱导 BMSCs 成骨分化机制的比较

本研究表明黄芪甲苷组和川芎嗪组能促进骨髓间充质干细胞的增殖及成骨细胞的分化,可能与其明显上调 Bmp2、Smad1 mRNA 表达量有关。而补肾中药在 Bmp2 的活性及含量、Smad4 mRNA 表达量方面明显优于黄芪甲苷组和川芎嗪组,体现出不同功效中药对成骨分化过程中靶向的差异。作为补气药物的黄芪和血之气的川芎促进骨髓间充质干细胞的增殖及成骨细胞的分化,与骨代谢过程密切相关,可能与中医“气能生精,精生髓,髓养骨”等理论有关。

4 结论

本研究基于中医“肾藏精,精生髓,髓养骨”的理论与干细胞及其微环境相关性的科学假说而设计。研究结果显示,补肾中药有效成分配伍能有效促进骨髓间充质干细胞增殖及向成骨细胞的分化,其机制可能与提高 Bmp2 的含量及上调 Bmp2、Smad1、Smad4 基因表达水平,从而促进 BMSCs 向成骨方向分化有关。成骨细胞增殖分化与多种细胞因子及其信号通路有关,补肾中药不同成分也显示出其靶向的区别,采用血清药理学的方法与直接进行体外实验其效应机制是否相同尚待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*, 2001, 226(6):507~520.
- 2 Peng S, Zhang G, He Y, et al. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone. *Bone*, 2009, 45(3):534~544.
- 3 卞琴,刘书芬,黄建华,等.3 种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用. *中华中医药杂志*, 2011, 26(5):889~891
- 4 田代真一.“血清药理学”と“血清药化学”—汉方の药理学がいはまつた药物血中浓度测定の新しい世界. *TDM 研究*, 1988, (5): 54
- 5 殷晓雪,陈仲强,党耕町,等.淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响. *中国中药杂志*, 2005, 30(4):289~291.
- 6 何伟,李自力,崔元璐,等.淫羊藿苷对大鼠成骨细胞核结合因子 $\alpha 1$ 、骨形成蛋白-2、骨形成蛋白-4 mRNA 表达的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2009, 41(6):669~673.
- 7 Zhao J, Ohba S, Shinkai M, et al. Icaritin induces osteogenic differentiation *in vitro* in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369(2):444~448.
- 8 Hsieh T P, Sheu S Y, Sun J S, et al. Icaritin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblast anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression. *Phytomedicine*, 2010, 17(6):414~423.
- 9 Huang J, Yuan L, Wang X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic differentiation and activity *in vitro*. *Life Sci*, 2007, 81(10):832~840.
- 10 邹节明,孟杰,颜正华,等.中药复方有效成分淫羊藿苷的药代动力学研究. *中草药*, 2002, 33(1):55~58.
- 11 Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal receptor-subtype selectivity. *Phytomedicine*, 2010, 17(2): 126~131.
- 12 王建华,王艳,潘永梅.补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(5):844~846.
- 13 薄显辉,杨景仁,刘君富,等.薄层扫描法测定祛风湿止痛片中齐墩果酸含量. *哈尔滨医科大学学报*, 1989, 32(6):426.
- 14 王立新,韩广轩,刘文庸,等.齐墩果酸的化学及药理研究. *药学实践杂志*, 2001, 19(2):104~107.
- 15 王春英,张兰桐,袁志芳,等.何首乌有效成分二苯乙烯苷的药代动力学研究. *药学报*, 2002, 37(12):955~958.
- 16 孙江浩,袁志芳,王春英,等.何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学. *中草药*, 2005, 36(3):407~408.
- 17 Date T, Doiuchi Y, Nobuta M, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Orthop Sci*, 2004, 9(5):503~508.
- 18 Chen D, Ji X, Harris M A, et al. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation

- and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*, 1998, 142(1):295~305.
- 19 李雪盛,孙建军.脱细胞松质骨复合骨形态发生蛋白异位成骨实验研究.生物医学工程与临床,2009,13(4):275~278.
- 20 杨丽,张荣华,朱晓峰,等.淫羊藿苷对大鼠间充质干细胞向分化过程中转化生长因子1、骨形态发生蛋白2表达的影响.中国组织工程研究与临床康复,2010,14(19):3518~3522.
- 21 Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, *et al.* A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 1999, 400(6745):687~693.

Orthogonal Compatibility of Icariin, Psoralen, Oleanolic Acid, Stilbene Glucoside on Regulation of Bmp2, Smad1, and Smad 4 Induced Osteogenic Differentiation of BMSCs

Gao Lu¹, Zheng Hongxin¹, ChenYijing¹, Zong Zhihong², Lin Shuru¹

(1. Basic Medical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: This study was aimed to observe four kinds of kidney-tonification medicine, which were Epimedium, psoralen, Ligustrum lucidum, Polygonum with the active ingredient of icariin, psoralen, oleanolic acid, stilbene glucoside and their orthogonal compatibility. There were two kinds of non-kidney tonification medicine, which were Chuanxiong and astragalus with the active ingredient of TMP and astragaloside. The observation was made on the regulatory role of rat bone marrow stem cells (BMSCs). A total of 65 SD rats were randomly divided into the normal control group, positive transformed control group, kidney-tonification compatibility group (including Group 1, Group 2, Group 3, Group 4, Group 5, Group 6, Group 7, Group 8, and Group 9), non-kidney tonification medicine control group (including TMP group and astragaloside group). Intragastric administration of medication was given to the kidney-tonification compatibility group and the non-kidney tonification medicine control group, once a day for 3 consecutive days. Intragastric administration of equal amount of normal saline was given to the normal control group and the positive transformed control group. On the third day of intragastric administration, rats in each group were sacrificed. Serum containing medication was used in the culture of BMSCs for 6, 12, or 18 days. ELISA method was used to quantitatively detect the expression activity and content of BMP2 on the 6th, 12th, or 18th day, in order to evaluate the degree of bone cell differentiation degree. Real-time quantitative PCR method was used for detection of expression of Bmp2, Smad1, Smad4 mRNA in serum containing medication in the culture of BMSCs on the 18th day. The results showed that the kidney-tonification compatibility can improve the expression activity and content of BMP2 culture *in vitro*, with the peak on the 12th day. The kidney-tonification compatibility groups can upregulate expressions of Bmp2, Smad1, Smad4 mRNA. It was concluded that the active ingredient compatibility of kidney-tonification medicine can promote BMSCs. Its mechanism may be related to the upregulation of expression of Bmp2, Smad1, Smad4 mRNA, and the activity and content of Bmp2.

Keywords: Kidney-tonification medicine, bone marrow stem cells, osteoblast, bone morphogenetic protein 2, Smad1, Smad4

(责任编辑 张丰丰 张志华,责任译审 王 晶)