

二至丸促进围绝经期妇女成骨细胞增殖的分子机制

刘振涛 张怡元 林煜 王武炼 冯尔宥 林丽琼 肖莉莉*

厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建 福州 350007

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 04-0524-06

摘要: 目的 观察二至丸对围绝经期妇女成骨细胞分化过程的影响,并探讨其可能的分子机制。方法 随机收集临床不同年龄段符合纳入标准的围绝经期妇女松质骨,分为绝经前骨量正常组、绝经前骨量减少组、绝经后骨量正常组、绝经后骨质疏松组,分离培养体外成骨细胞,对二至丸干预前后成骨细胞的增殖分化,采用 MTT 法检测各组细胞增殖能力,比色法测 AKP, ELISA 法检测 BMP-2 和 OCN 表达,实时荧光定量 PCR-SYBR GREEN 法检测核心结合因子 BMP-2mRNA、ER- α mRNA、OCNmRNA 的表达。结果 二至丸干预后,各组成骨细胞增殖能力、AKP、BMP-2 和 OCN 的表达量及 BMP-2mRNA、OCNmRNA 和 ER- α mRNA 的表达量总体由高到低依次为绝经前骨量正常组、绝经后骨量正常组、绝经前骨量减少组、绝经后骨质疏松组,且均较同组干预前显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 二至丸能在一定程度上促进成骨细胞增殖分化,对防治骨质疏松起到积极作用。

关键词: 二至丸;骨质疏松;成骨细胞;分化

Molecular mechanism of Erzhiwan on the differentiation of human osteoblasts from perimenopausal women

LIU Zhentao, ZHANG Yiyuan, LIN Yu, WANG Wulian, FENG Eryou, LIN Liqiong, XIAO Lili*

Department of Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350007, China

Corresponding author: XIAO Lili, Email: 605231197@qq.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of Erzhiwan on the differentiation of human osteoblasts from perimenopausal women, and to analyze the possible molecular mechanism. **Methods** Cancellous bone of perimenopausal women of different ages who met the inclusion criteria were collected, and divided into four groups: premenopausal normal bone mass group, premenopausal osteopenia group, postmenopausal normal bone mass group and postmenopausal osteoporosis group. Osteoblasts were isolated and cultured in vitro and osteoblast proliferation and differentiation before and after Erzhiwan intervention were evaluated. The ability of osteoblast proliferation was measured by MTT Method. The expression of AKP was measured by color method. The expression of BMP-2 and OCN was measured by ELISA. The expression of the mRNA of BMP-2, OCN and ER- α was measured by SYBR GREEN. **Results** After Erzhiwan intervention to the osteoblasts of each group, the order of osteoblast proliferation ability, the expression of AKP, BMP-2 and OCN, and the expression of the mRNA of BMP-2, OCN and ER- α from high to low was generally the premenopausal normal bone mass group, the postmenopausal normal bone mass group, the premenopausal osteopenia group and the postmenopausal osteoporosis group. **Conclusion** To a certain degree, Erzhiwan could multiply osteoblasts and speed up cell differentiation, therefore may play a role in the prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: Erzhiwan; Osteoporosis; Osteoblast; Differentiation

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 指主要由雌激素水平降低引起的骨质疏松,为高转换型骨质疏松症,即骨形成与骨

吸收均较活跃。临床主要表现为骨折风险和骨痛增加,严重影响患者的生活质量,甚至出现死亡。

PMOP 的中医病因病机为肾虚脾虚血瘀等,尤以肾虚的关系密切^[1-2]。肾主骨生髓,骨质疏松的首责在于肾虚,治疗当以补肾为主^[3]。骨质疏松相关的肾虚证型有肾阳虚、肾阴虚和肾阴阳两虚之分,目前中药复方的基础研究大多围绕肾阳虚证展开。统

基金项目: 国家自然科学基金(81302986) 福州市卫生系统科技计划项目(2014-S-w12)

* 通讯作者: 肖莉莉, Email: 605231197@qq.com

计发现,患者除了表现为肾阳虚证外,另有相当一部分病人表现为肾阴虚证^[4-6],甚至有高达 82% 的病人比例见诸报端^[7]。

临床观察证明,滋补肾阴可对肾阴虚型 PMOP 患者有理想的治疗效果^[8-9]。相关研究证明:滋补肾阴代表方二至丸可明显提高肾阴虚骨质疏松模型大鼠骨矿含量、骨密度和骨影面积,升高血清中雌二醇水平^[10-14],进而改善骨质疏松。因此我们随机收集临床 42 至 50 岁不同年龄段符合纳入标准的围绝经期妇女松质骨,分离培养体外成骨细胞,通过观察二至丸干预前后围绝经期妇女成骨细胞数量,骨形态蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER- α)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 水平变化,来探究二至丸对骨质疏松的影响及作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和仪器

碱性磷酸酶 AKP 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),骨钙素 (OCN) 酶联免疫吸附测试试剂盒 (SC 公司),反转录试剂盒 RR037Q, SYBR®Premix Ex Taq™ PCR Kit RR42LR (TaKaRa 公司)。二氧化碳恒温培养箱 (BB16/BB5060 型,德国 Heraeus 公司),BT224 半自动生化分析仪 (意大利生物技术公司),7900 型实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 纳入标准

取自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月厦门大学附属福州第二医院关节外科新鲜股骨颈骨折行髋关节置换术患者,经知情同意后取材。患者均为女性,年龄 42~50 周岁,出现月经改变现象,伴有出汗、阵发性潮热、抑郁、记忆力减退、烦躁不安等围绝经期综合征的临床表现。符合《原发性骨质疏松诊疗指南》^[15]中骨质疏松症的诊断标准,临床表现以腰背疼痛为主,伴有全身性疼痛,腰膝酸软无力,并逐步加重,术前双能 X 射线检查骨密度减少 2 个标准差以上,血清骨转换指标 PINP 大于 41.6 ng/mL, S-CTX 大于 0.56 $\mu\text{g/L}$ 等。

1.3 排除标准

①有糖尿病、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺等内分泌疾病者;②有肾脏疾病和代谢性疾病者;③有骨关节肿瘤、结核、感染等病史者;④有长期服用影响骨代谢的药物史。

1.4 临床研究对象分组

符合纳入标准病例在测试完骨密度和血清骨转换指标 (PINP 和 S-CTX) 后,具体分组如下:绝经前骨量正常组、绝经前骨量减少组、绝经后骨量正常组、绝经后骨质疏松组。各组成骨细胞的培养条件采用预实验后选取效果最好的 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 二至丸粗提液与含体积分数为 15% 小牛血清的 DMEM-F12 培养液。

1.5 人成骨细胞的分离与培养

将手术中取下的股骨头清除骨表面结缔组织、软骨, PBS 冲洗 3 次,将松质骨剪至 1 mm³ 大小,再用 PBS 冲洗后,胰酶 37℃ 消化 30 min,弃胰蛋白酶,加入 II 型胶原酶,37℃ 消化 1h,收集上清液,转移至离心管中,1000 r/min 离心 10 min,收集细胞;加入 DMEM 培养液 (含 15% NCS),吸管反复吹打成细胞悬液,置于 37℃、体积分数为 0.95 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.6 药物提取

取 3000 g 女贞子粉碎成粗粉,10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 小时,合并提取液,减压浓缩回收乙醇,最终将提取液浓缩至 3000 mL (每 1 mL 相当于原药材 1 g), -20℃ 储藏备用。取 3000 g 墨旱莲药材,10 倍量水回流提取 2 次,每次 1 小时,合并提取液,减压浓缩回收水,最终将提取液浓缩至 3000 mL (每 1 mL 相当于原药材 1 g), -20℃ 储藏备用。临用前取同体积女贞子、墨旱莲粗提液混合均匀,得二至丸粗提液。

1.7 人成骨细胞增殖检测

根据预实验选取效果最好的 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为二至丸的最终实验浓度。各组成骨细胞以 $2\times 10^3/\text{mL}$ 孔密度接种于 96 孔板内,72 h 后采用 MTT 法分析各组成骨细胞增殖的情况,以酶标仪 570 nm 处测得 OD 值表示结果。

1.8 细胞液中 AKP、BMP-2、OCN 的测定

分别按照各试剂盒说明书。

1.9 qPCR 法检测 BMP-2、OCN 和 ER- α mRNA 的表达

收集干预 72 h 的各组成骨细胞,加入 Trizol 提取细胞总 RNA 并计算出 RNA 的浓度,根据浓度计算出需要逆转录的 RNA 的体积后,按逆转录试剂盒的步骤进行反转录。BMP-2、OCN 和 ER- α 的扩增引物由上海生工公司合成。反转录后在 ABI7900 上按照说明书进行 mRNA 扩增,在得到扩增曲线与 CT 值后,设复孔取平均值,每个样本指标重复 3 次。使用 7900 system SDS 软件计算数据,进行组间相对

量的比较。

表 1 PCR 所用引物序列

Table 1 The primer sequences for PCR

基因	上游引物	下游引物
BMP-2	5'-T GGAATGCCTACTGTTGAG-3'	5'-TGCGGACCAAGGTTAGTGT-3'
OCN	5'-TGGAGACCGAAGACACAA-3'	5'-CAGCTGATCTTATGGAACC-3'
ER α	5'-CGAGCCATCTTAGACATCA-3'	5'-GTCTCTCAAAGACGATGTGC-3'
β -actin	5'-AGGCTGTGTCTCTGTA-3'	5'-ATGTCAGCGACCAATTCC-3'

1.10 统计学处理分析

实验数据运用 SPSS17.0 软件包处理分析,参数值用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,首先比较样本是否呈正态分布,并检验方差齐性,最后组间数据比较采用 ONE-WAY ANOVA (单向方差分析)。

2 结果

2.1 二至丸对人成骨细胞增殖的影响

MTT 法检测发现干预前各组细胞增殖能力依次为绝经前骨量正常组最佳、绝经后骨量正常组次之、绝经前骨量减少组再次之、绝经后骨质疏松组最差,各组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);采用浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二至丸粗提液干预后,各组成骨细胞的增殖能力较干预前显著上升,其中绝经前骨量正常组最佳、绝经后骨量正常组次之、绝经前骨量减少组再次之、绝经后骨质疏松组最差,绝经后骨量正常组与绝经前骨量减少组比较差异无统计学意义,其余各组比较差异均有统计学意义,各组与同组干预前比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 二至丸对人成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of EZW on the proliferation of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	0.396 $\pm$ 0.014 ^{cde}	0.623 $\pm$ 0.022 ^{acde}
绝经前骨量减少组	0.245 $\pm$ 0.021 ^{bde}	0.435 $\pm$ 0.013 ^{abe}
绝经后骨量正常组	0.295 $\pm$ 0.028 ^{bce}	0.452 $\pm$ 0.025 ^{abe}
绝经后骨质疏松组	0.187 $\pm$ 0.032 ^{bed}	0.323 $\pm$ 0.019 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

2.2 二至丸对人成骨细胞细胞液中 AKP 表达的影响

采用比色法检测培养液,结果显示干预前各组细胞液中 AKP 浓度从高到低依次为:绝经前骨量正常组最高、绝经后骨量正常组次之、绝经前骨量减少

组再次之、绝经后骨质疏松组最低。绝经后骨量正常组与绝经前骨量减少组显著无统计学意义,其余各组组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);采用二至丸粗提液干预后,各组成骨细胞液中 AKP 的表达较干预前显著上升,各组与同组干预前比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 二至丸对人成骨细胞细胞液中 AKP 表达的影响 (U/gprot, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of EZW on the expression of AKP in culture fluid of osteoblasts (U/gprot, $\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	1.643 $\pm$ 0.264 ^{cde}	2.522 $\pm$ 0.122 ^{acde}
绝经前骨量减少组	1.245 $\pm$ 0.172 ^{de}	2.235 $\pm$ 0.153 ^{abde}
绝经后骨量正常组	1.332 $\pm$ 0.088 ^e	2.463 $\pm$ 0.128 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	1.164 $\pm$ 0.132 ^{bed}	1.643 $\pm$ 0.219 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

2.3 二至丸对人成骨细胞细胞液中 BMP-2、OCN 表达的影响

采用 ELISA 法检测培养液,结果显示,干预前,绝经前骨量正常组细胞液中 BMP-2、OCN 浓度最高、绝经后骨量正常组次之、绝经前骨量减少组再次之、绝经后骨质疏松组最低,各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);采用二至丸粗提液干预后,各组成骨细胞细胞液中 BMP-2、OCN 浓度较干预前显著上升,各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4、表 5。

表 4 二至丸对人成骨细胞细胞液中 BMP-2 表达的影响 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of EZW on the expression of BMP-2 in culture fluid of osteoblasts (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	11.334 $\pm$ 0.564 ^{cde}	13.654 $\pm$ 0.342 ^{acde}
绝经前骨量减少组	8.291 $\pm$ 0.479 ^{cde}	9.235 $\pm$ 0.616 ^{abde}
绝经后骨量正常组	9.332 $\pm$ 0.681 ^{bce}	11.463 $\pm$ 0.322 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	7.118 $\pm$ 0.502 ^{bed}	8.643 $\pm$ 0.336 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

2.4 二至丸对人成骨细胞 BMP-2、OCN 和 ER- α mRNA 表达的影响

结果显示:干预前,绝经前骨量正常组细胞液中 BMP-2、OCN 和 ER- α mRNA 表达最高、绝经后骨量正常组次之、绝经前骨量减少组再次之、绝经后骨质

疏松组最低,绝经后骨量正常组与绝经前骨量减少组无显著差异,其余各组组间比较较均有显著性差异($P < 0.05$),干预后各组成骨细胞 BMP-2、OCN 和 ER- α mRNA 的表达均高于干预前,各组组间比较均有显著性差异($P < 0.05$)。见表 6、表 7、表 8。

表 5 二至丸对人成骨细胞细胞液中 OCN 表达的影响($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of EZW on the expression of OCN in culture fluid of osteoblasts($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	21.047 $\pm$ 0.264 ^{cde}	25.642 $\pm$ 0.502 ^{acde}
绝经前骨量减少组	15.583 $\pm$ 0.384 ^{cde}	19.454 $\pm$ 0.633 ^{abde}
绝经后骨量正常组	16.332 $\pm$ 0.405 ^{bce}	21.536 $\pm$ 0.321 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	12.664 $\pm$ 0.332 ^{bcd}	16.049 $\pm$ 0.236 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

表 6 二至丸对人成骨细胞 BMP-2mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effects of EZW on the expression of BMP-2 mRNA in osteoblasts($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	1.014 $\pm$ 0.012 ^{cde}	1.213 $\pm$ 0.008 ^{acde}
绝经前骨量减少组	0.891 $\pm$ 0.019 ^{de}	1.035 $\pm$ 0.016 ^{abde}
绝经后骨量正常组	0.902 $\pm$ 0.011 ^{ce}	1.123 $\pm$ 0.014 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	0.614 $\pm$ 0.008 ^{bcd}	0.855 $\pm$ 0.006 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

表 7 二至丸对人成骨细胞 OCNmRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effects of EZW on the expression of OCN mRNA in osteoblasts($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	1.857 $\pm$ 0.021 ^{cde}	2.239 $\pm$ 0.028 ^{acde}
绝经前骨量减少组	1.401 $\pm$ 0.011 ^{de}	1.935 $\pm$ 0.015 ^{abde}
绝经后骨量正常组	1.392 $\pm$ 0.018 ^{ce}	1.882 $\pm$ 0.034 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	1.021 $\pm$ 0.012 ^{bcd}	1.252 $\pm$ 0.022 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

3 讨论

原发性骨质疏松症的主要发病机制在于骨吸收大于骨形成,成骨细胞在骨重建过程中发挥着主导作用。成骨细胞体外培养技术在骨代谢的研究中非常重要,不仅可为筛选骨代谢相关疾病提供细胞模

表 8 二至丸对人成骨细胞 ER- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Effects of EZW on the expression of ER- α mRNA in osteoblasts($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后
绝经前骨量正常组	1.023 $\pm$ 0.032 ^{cde}	1.335 $\pm$ 0.022 ^{acde}
绝经前骨量减少组	0.824 $\pm$ 0.025 ^{de}	1.102 $\pm$ 0.026 ^{abde}
绝经后骨量正常组	0.802 $\pm$ 0.033 ^{ce}	1.207 $\pm$ 0.044 ^{abce}
绝经后骨质疏松组	0.672 $\pm$ 0.019 ^{bcd}	0.947 $\pm$ 0.031 ^{abcd}

注:与同组干预前比较,^a $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量正常组比较,^b $P < 0.05$;与同时期绝经前骨量减少组比较,^c $P < 0.05$;与同时期绝经后骨量正常组比较,^d $P < 0.05$;与同时期绝经后骨质疏松组比较,^e $P < 0.05$

型,还是研究骨代谢机制的重要手段之一。目前,人成骨细胞的主要来源为新生儿颅骨^[13]和成人松质骨^[14],由于新生儿颅骨来源的成骨细胞增殖分化较旺盛,与骨质疏松患者的成骨能力差异较大,且取材不符合伦理学要求,因此我们选用围绝经期成人骨折后的松质骨标本,且均经患者同意,签署知情同意书。后用胰蛋白酶多次消化取得的成骨细胞,更接近于骨质疏松成骨细胞功能状态,数量较多,形态多样,生长稳定,有明显的成骨细胞特征,研究结果可能更接近于临床。本实验随机收集临床符合纳入标准的围绝经期妇女松质骨培养出原代成骨细胞,连续传代增殖,纯度较高,有稳定的细胞生物学特征,具有良好的细胞增殖分化与成骨活性^[16]。

现代医学研究证明,绝经后雌激素水平下降,骨量丢失,是公认的 PMOP 发生的关键性因素^[17],有统计显示,大于 50 岁的女性因骨质疏松所致骨折风险可增加 20%^[18]。绝经后妇女因卵巢功能减弱,雌激素水平降低,导致骨骼中钙结合能力下降,破骨细胞的骨吸收能力增强,骨质丢失速度增快,引起骨量减少、骨质疏松等^[19]。雌激素主要通过结合雌激素受体(ER)作用于骨组织,调节成骨细胞的生长,调控骨吸收和骨形成的平衡,因此,ER 在骨质疏松症的发生过程中发挥了重要的枢纽作用^[20]。雌激素受体之一 ER- α 与雌激素结合后,可发挥促进成骨细胞增殖的生物学效应^[21]。本实验的检测发现:二至丸干预后各组的 ER- α mRNA 表达明显高于干预前各组。由此推测二至丸可能通过上调成骨细胞 ER- α mRNA 的表达,基因转录活性进一步升高,直接加速成骨细胞增殖分化,或间接地激活胞外信号调控激酶,促进成骨细胞增殖分化,抑制成骨细胞凋亡。药理实验证实,滋补肾阴中药可提高血清雌二醇水平,而雌激素水平下降与骨质疏松的发生显著相关^[22-23],所以二至丸可能通过提高血清雌激素水

平,来增加骨密度、骨矿含量和骨影面积,改善绝经后骨质疏松症状。

同时,本实验还运用比色法、RT-PCR法和ELISA法检测 AKP 蛋白、BMP-2mRNA、BMP-2蛋白、OCNmRNA 和 OCN 蛋白的表达,发现:二至丸干预前后这些物质的表达均有明显改变,且干预后明显高于干预前($P < 0.05$)。骨钙素(OCN)属于一种主要由成骨细胞合成分泌的具有促进成骨作用的 γ -羧谷氨酸包含蛋白,大部分沉积于骨基质,维持骨的正常矿化,是骨基质矿化的必需因子,只有小部分释放入血^[24],骨中含量与血中含量成正相关性,可直接反映成骨细胞的活动状态和骨钙化的速率^[25-26],是成骨细胞中期的功能性标志物,可以作为骨质疏松动态变化的评价指标。骨形态发生蛋白(BMPs)由成骨细胞分泌酸性糖蛋白^[27],是唯一可以单独诱导骨组织形成的局部生长因子。其中BMP-2是诱导成骨和刺激成骨细胞分化活性最强的BMPs之一^[28],具有启动成骨的全部潜能。碱性磷酸酶(AKP)是成骨细胞分泌的一种胞外酶,主要功能是在成骨时水解磷酸脂,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,同时水解焦磷酸盐,使其对骨盐形成的抑制作用得到解除,促进细胞外基质的矿化,利于成骨^[29-30],是细胞骨化所必须的酶,其表达活性是成骨细胞增殖和早期分化的明显标志之一。由检测结果可得:二至丸能够通过某种未知的作用促进成骨基因BMP-2、OCN以及AKP蛋白的表达,促进骨形成。

药理研究发现,二至丸的主要成分女贞子和墨旱莲中含有萜类、黄酮类和香豆草醚类化合物等物质,其结构与雌二醇相似而具有雌性激素样作用^[31-32],对成骨细胞增殖和分化均有促进作用,能有效地防治骨质疏松,又可避免为机体带来其他副作用。由此,本研究结果结合相关文献推测其机制,可能是二至丸中含有类雌激素样物质能够有效促进成骨细胞中ER- α 表达并结合,继而提升BMP-2、OCN以及AKP基因和蛋白表达量,从而促进成骨细胞的增殖分化和成骨功能。

综上,本实验在细胞水平观察了二至丸对成骨细胞增殖分化的影响,发现其治疗骨质疏松的作用机制与其促进成骨细胞增殖分化的效用切实相关,为二至丸治疗骨质疏松症提供了理论和实验依据。然而其促进成骨细胞增殖分化抗骨质疏松的具体成分和分子机制并不十分清楚,在下一步的研究中,我们将从这一方面着手,为本实验所反映的现象作进

一步的论证和分析。

【参 考 文 献】

- [1] 张波,刘向前,姚共和.原发性骨质疏松症肾虚髓亏证与骨密度相关性分析[J].中医正骨,2004,16(10):9-10.
Zhang B, Liu XQ, Yao GH. The correlation analysis between Kidney Marrow Deficiency Syndrome and the bone mineral densities of primary osteoporosis[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2004,16(10):9-10. (in Chinese)
- [2] 赵玉堂,刘凯军,李金花等.骨矿含量与肾虚、肾主骨关系的研究[J].中国骨质疏松杂志,1996,2(3):19-21.
Zhao YT, Liu KJ, Liu JH, et al. Bone mineral content and kidney-asthenia[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 1996,2(3):19-21. (in Chinese)
- [3] 梁立,江正玉,刘中厚等.补肾中药治疗骨质疏松症临床观察[J].中医杂志,1992,33(11):36-37.
Liang L, Jiang ZY, Liu ZH, et al. Clinical Observation on the Treatment of Osteoporosis With Chinese nourishing kidney herbs[J]. J Tradit Chin Med, 1992,33(11):36-37. (in Chinese)
- [4] 王力群.老年性骨质疏松症的中医辨证论治[J].吉林中医药,2002,22(1):25.
Wang LQ. Senile osteoporosis treatment based on syndrome differentiation in TCM[J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2002,22(1):25. (in Chinese)
- [5] 鞠华,许秀芳,岳端亭.骨质疏松症的中医辨治[J].中医药临床杂志,2004,16(3):213-214.
Ju H, Xu XF, Yue DT. Osteoporosis treatment based on syndrome differentiation in TCM[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2004,16(3):213-214. (in Chinese)
- [6] 王宗辉,翟献斌,苏睿.辨证分型治疗原发性骨质疏松症的临床研究[J].中医正骨,2006,18(8):9-11.
Wang ZH, Zhai XB, Su R. A clinical Investigation of treating primary osteoporosis by TCM differentiation[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2006,18(8):9-11. (in Chinese)
- [7] 赵咏芳,张戈,史万忠,等.骨质疏松症中医证型的初步临床报告[J].中医正骨,1998,10(5):9-10.
Zhao YF, Zhang G, Shi WZ, et al. The preliminary clinical report of Osteoporosis TCM syndrome type[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 1998,10(5):9-10. (in Chinese)
- [8] 俞益火,陈久毅,王建.二至丸治疗绝经后骨质疏松症的疗效观察[J].中国中医骨伤科杂志,2011,19(4):42-43.
Yu YH, Chen JY, Wang J. Efficacy of ErZhiWan in the treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop, 2011,19(4):42-43. (in Chinese)
- [9] 葛继荣,郑洪新.中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(9):1023-1028.
Ge JR, Zheng HX. Expert consensus on prevention and treatment of primary osteoporosis (2015)[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015,21(9):1023-1028. (in Chinese)

- [10] 邢薇薇,张宏,吴锦忠,等. 二至丸对肾阴虚骨质疏松大鼠的影响[J]. 福建中医药,2008,39(6):45-47.
Xing WW,Zhang H,Wu JZ, et al. Efficacy of ErZhiWan in the treatment of Kidney Yin deficiency osteoporotic rats[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008,39(6):45-47. (in Chinese)
- [11] 虞巧英. 二至丸治疗更年期骨质疏松症临床疗效观察[J]. 海峡药学,2009,21(11):169-170.
Yu QY. Efficacy of ErZhiWan in the treatment of involutional osteoporosis[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2009,21(11):169-170. (in Chinese)
- [12] Zhang H,Xing WW,Li YS,et al. Effects of a traditional Chinese herbal preparation on osteoblasts and osteoclasts[J]. Maturitas, 2008,61(4):334-339.
- [13] 林雄浩,吴锦忠. 中药复方二至丸的化学成分及抗骨质疏松研究进展[J]. 解放军药科学学报,2009,25(5):421-424.
Lin XH,Wu JZ. The chemical composition and anti-osteoporosis research progress of ErZhiWan[J]. Pharm J Chin PLA,2009,25(5):421-424. (in Chinese)
- [14] Lin XH, Wu YB, Lin S. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts[J]. Molecules, 2010, 15(1):241-250.
- [15] 原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(1):2-17.
The guideline for diagnosis and management of primary osteoporosis[J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research,2011,4(1):2-17. (in Chinese)
- [16] 程浩,张延芳,许巍. 新生大鼠成骨细胞原代培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究,2013,17(41):7199-7204.
Cheng H,Zhang YF,Xu W. Primary culture and identification of neonatal rat osteoblasts[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2013, 17(41):7199-7204. (in Chinese)
- [17] 张智海,刘忠厚,李娜,等. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿 2014 版)[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,(9):1007-1010.
Zhang ZH,Liu ZH,Li N,et al. Expert consensus on the diagnosis of osteoporosis in Chinese population[J]. Chinese Journal of Osteoporosis,2014,(9):1007-1010. (in Chinese)
- [18] Liao JQ. Clinical Biochemical indicators Research on After the menopause osteoporosis Treated with Integrated Chinese and Western Medicine[J]. Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi, 2008,24(1):54-56.
- [19] 王俊玲,黄思敏,梁启瑶,等. 雌激素的来源及其在骨代谢中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(6):729-732.
Wang JL,Huang SM,Liang QY,et al. The source of estrogen and its effect on bone metabolism[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015,21(6):729-732. (in Chinese)
- [20] 侯宁宁,朱依敏,黄荷凤. 雌激素受体 α 和 β 在不同雌激素干预大鼠骨代谢中的表达[J]. 分子细胞生物学报,2006,39(4):289-296.
Hou NN,Zhu YM,Huang HF. The expression of ER α and ER β on bone metabolism of rats with the treatment of different estrogen intervention[J]. Fenzi Xibao Shengwu Xuebao,2006,39(4):289-296. (in Chinese)
- [21] Galea GL,Meakin LB,Sugiyama T,et al. Estrogen receptor alpha mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor beta[J]. The Journal of biological chemistry,2013,288(13):9035-9048.
- [22] Sun J, Bi Y, Guo L, et al. BuYang Huanwu Decotion promotes growth and differentiation of neural progenitor cells: using a serum pharmacological method[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113(2):199-203.
- [23] Luo ZG,Zhao Y, Wang AT. Effect of serum containing Chinese herb of strengthening kidney on proliferation and differentiation of human osteoblast[J]. Bone,2006,38(3):1904-1908.
- [24] 刘菊,梅群超,谢先龙. 温阳补肾方对去卵巢大鼠骨钙素及股骨显微结构的影响[J]. 中医学报,2014,29(8):1165-1167.
Liu J,Mei QC,Xie XL. Effect of Wenyangbushen prescription on BGP and microstructural structure of femur in ovariectomized rats[J]. Journal of Chinese Medicine,2014,29(8):1165-1167. (in Chinese)
- [25] Delmas PD,Bjarnason NH,Mitlak BH,et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women[J]. The New England Journal Of Medicine,1997,337(23):1641-1647.
- [26] Aonuma H,Miyakoshi N,Hongo M,et al. Low serum levels of undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women receiving an inhibitor of bone resorption[J]. The Tohoku Journal Of Experimental Medicine,2009,218(3):201-205.
- [27] Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning[J]. Cytokine & growth factor reviews,2005,16(3):265-278.
- [28] Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, et al. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts[J]. Biomaterials,2011,32(3):665-671.
- [29] Rodionova NV,Oganov VS,Zolotova NV. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions[J]. Advances in space research:the official journal of the Committee on Space Research, 2002,30(4):765-770.
- [30] 胡芯源. 骨源性碱性磷酸酶预测骨质疏松骨折患者再骨折的意义[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(6):640-643.
Hu XY. The predictive significance of bone alkaline phosphatase on the second fracture in patients with osteoporotic fractures[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 20(6):640-643. (in Chinese)
- [31] Puel C,Mathey J,Agalias A,et al. Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat[J]. Clinical nutrition,2006,25(5):859-868.
- [32] Chen X,Anderson JJ. Isoflavones and bone: animal and human evidence of efficacy[J]. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions,2002,2(4):352-359.

(收稿日期:2016-10-30,修回日期:2016-11-30)