

· 综述 ·

补肾中药对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究

王大伟 郑洪新*

辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0268-04

摘要: 骨髓间充质干细胞作为骨损伤后, 骨修复、重建的种子细胞, 越来越成为骨组织工程学中的研究热点。骨修复、重建的关键核心是如何能够提高骨髓间充质干细胞的高效增殖和成骨定向分化。以“肾藏精, 主骨, 生髓”的中医理论为依据, 同时实验和临床也证实, 补肾中药可以有效地促进骨髓间充质干细胞增殖、以及定向成骨分化。为骨损伤之后的修复和重建提供新的治疗途径。笔者就近年补肾中药促进骨髓间充质干细胞成骨分化的研究作一综述。

关键词: 补肾中药; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 增殖

Effect of tonifying kidney herbs on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

WANG Dawei, ZHENG Hongxin*

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

* Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), as seed cells for bone repair and reconstruction after bone injury, have become a hot research topic in bone tissue engineering. The key of bone repair and reconstruction is how to improve the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Based on the traditional Chinese medicine theory of kidney storing essence, hosting bone and regenerating marrow, and the basic research and clinical practice, the kidney tonifying Chinese medicine can effectively promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. It provides a new treatment for repair and reconstruction after bone injury. This paper reviews the recent studies on the effect of tonifying kidney herbs on osteogenic differentiation by bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: traditional Chinese medicine; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; proliferation

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是骨髓中的多能干细胞, 具有多向分化的能力, 其在体内或体外特定的诱导条件下, 可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能, 可作为理想的种子细胞用于骨损伤后的骨修复和重建^[1]。在骨髓有核细胞中, BMSCs 含量大约为 0.001% ~ 0.01%, BMSCs 免疫原性弱, 易于移植和转染等优势, 近年成为医学, 特别是再生医学研究的热门焦点。近年来随着中药现代提纯技术的快速发展, 在“肾主骨生髓”理

论指导下, 以补肾中药制剂作为促进 BMSCs 成骨分化的诱导剂来防治疾病的研究逐渐开展, 并取得很好的疗效^[2-3], 这为研究骨组织的修复及重建提供了新思路。本文从中药调控 BMSCs 成骨分化的理论基础、从单味中药、中药复方、中药有效成分及促成骨机制等角度, 对近年来补肾中药调控 BMSCs 成骨分化的研究进展作一综述。

1 肾藏精与 BMSCs 增殖、成骨分化

《灵枢·本神》曰“故生之来谓之精, 两精相搏谓之神”;《类经》注云:“太极动而生阳, 静而生阴, 阴阳二气, 各有其精。所谓精者, 天之一、地之六也。天以一生水, 地以六成之, 而为五行之最先。故万物初生, 其来皆水, 如果核未实犹水也, 胎卵未成犹水也, 即凡人之有生, 以及昆虫草木无不皆然。易曰:

基金项目: 国家自然科学基金 (81503477); 辽宁省自然科学基金 (201602497); 辽宁省教育厅一般项目 (L201630)

* 通信作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

男女构精,万物化生,此之谓也。”意思是,生命最初的状态是“精”。中医学认为“精”是构成人体和维持人体正常生命活动的最基本物质,闭藏于肾,包括广义之精和狭义之精,其中狭义之精就是指的生殖之精。男女精卵结合,形成受精卵,卵裂 32 期之前的所有细胞都是全能干细胞,全能干细胞潜能无限,可以分化多能干细胞如间充质干细胞、胚胎干细胞等;胚胎干细胞属于全能干细胞分化的一种,其特点是具有发育的全能性,可以参加整个生物体的发育,构成人体的各种组织和器官。在精卵结合的瞬间会发光(西北大学研究团队发现,并于 2014 年成功拍摄此现象,研究者发现哺乳动物精子进入卵细胞的瞬间,会释放上亿的锌原子,这个光是锌原子的作用),这可能就是中医中说的“神”。胚胎形成之初,自身之精已成,携带父母全部的遗传物质。因此,中医学的精气化生理论和干细胞的分化理论有着理论相通。

“肾藏精,主骨生髓”,肾精充足,则骨骼强硬健康有力。《素问·上古天真论篇》曰“女子七岁,肾气盛,齿更发长……四七,筋骨坚,发长极,身体盛壮……七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子。丈夫八岁,肾气实,发长齿更……四八,筋骨隆盛,肌肉满壮……七八,天癸竭,精少,肾脏衰,形体皆极。”明确论述了,人体的生命过程和年龄、肾精关系密切,并且可以通过人体外在,可以容易观察的发、骨、齿的状态来确定肾精的状态。“精足则气旺,精虚则神衰”,从受精卵到胚胎的发育过程,BMSCs 在复杂的人体各种微环境的作用下进行多方面的分化,可以形成成骨细胞、成脂细胞,二者平衡完成成骨的构建过程。随着人体年龄的增大,肾精逐渐亏虚,BMSCs 也会发生正弦曲线式过程,当肾精亏虚到一定程度,骨质疏松症、滑膜炎、骨关节退行性病呈现逐渐增多的趋势^[4-6]。BMSCs 的这一个动态变化过程与《素问·上古天真论篇》中肾气动态变化过程相似。藉此,BMSCs 可能是肾精在细胞分子水平上的表现形式,故临床多用补肾填精益髓的方法促进 BMSCs 向成骨分化。

2 补肾中药有效成分或提取物等对 BMSCs 增殖、成骨分化作用及机制

单味中药促进 BMSCs 成骨分化主要还有中药提取形式不同,包括水提取物或醇提取物和含药血清等形式;同时中药有效成分对 BMSCs 成骨分化也发挥积极的作用。使用的中药多集中在“补肾”“益

气”“活血”类。尤其以“补肾”“壮阳”类的中药效果更佳且明显。

张立超等^[7]使用杜仲叶提取物对大鼠成骨细胞增殖进行研究,发现不同浓度杜仲叶提取物明显促进大鼠成骨细胞增殖(MTT 法),呈现浓度依赖性;当浓度为 0~60 mg/mL 时,杜仲叶提取物明显促进大鼠 BMSCs 成骨细胞增殖。中药丹参提取物以浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL 加入 BMSCs 中,进行丹参不同浓度提取物对 BMSCs 增殖和成骨分化的研究。发现 5 个浓度的丹参提取物都可以促进 BMSCs 增殖和成骨分化,且 0.8 mg/mL 时 ALP 活性和钙化结节数量最多,提示丹参提取物可以促进大鼠 BMSCs 增殖和成骨分化^[8]。淫羊藿黄酮类提取物成分为朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿次苷,其 5 种成分均具有促进 BMSCs 向成骨方向分化的作用,其中朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿次苷的作用效果显著,为进一步实验验证提供参考^[9]。淫羊藿苷对 BMSCs 成骨分化进行研究,探讨在体外实验过程中有无成骨诱导剂的情况,淫羊藿苷可以上调 BMSCs 成骨分化中相关基因的表达;如果在成骨诱导剂存在的情况下,淫羊藿苷可以加速骨钙结节的形成和沉积;体内实验淫羊藿苷明显促进雄性大鼠骨小梁厚度、数目,起到促进骨小梁生成的作用^[9-10]。时舒曼^[11]使用银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)对大鼠 BMSCs 成骨分化进行干预,发现 GBE 可以促进大鼠 BMSCs 成骨分化。饶华等^[12]对 4 月龄雌性 SD 大鼠使用杜仲叶总提取物水溶液进行灌胃,灌胃 3 个月后发现杜仲叶总提取物可以改善大鼠骨质疏松症模型骨代谢的相关指标,明显促进大鼠 BMSCs 成骨细胞增殖(MTT 法),增加骨密度、促进骨形成、减少骨吸收,可以作为一种有效的防治骨质疏松症的办法。

梁广胜等^[13]发现淫羊藿总黄酮对 BMSCs 成骨分化过程中 BMP-2/RunX2/OSX 信号通路有一定的影响作用。其可以增强 ALP 活性,使骨钙结节密度增大,增加 I 型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白表达量,增加成骨相关转录因子 BMP-2、RunX2 和 OSX 的表达量。淫羊藿苷可以促进 BMSCs 增殖,其往往作用于 MC3T3-E1 细胞,使该细胞增殖比例加大,上调细胞中的 BMP-2、Smad1、Smad5 的蛋白和基因表达水平^[14]。淫羊藿苷可以增加成骨细胞中的骨钙结节,增加 ALP 的活性、RNAKL、Runx2、Smad4、BMP-2、OPG 的 mRNA 的表达,使成骨细胞增殖和分化加强^[15-16]。郭英等^[17]观察发现骨碎补总黄酮可以对

BMSCs 成骨分化中 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥作用,可以上调 β -catenin、LEF-1、cyclinD1 的基因表达,提示骨碎补总黄酮主要是参与 Wnt/ β -catenin 信号通路的早期分化。骨碎补对 OPG/RANKL/RANK 信号转导通路也具有调控作用,可以增加大鼠股骨骨密度和骨小梁数量,其总黄酮可以使去势大鼠破骨细胞 OPG 基因的表达上调,使 RANK、RANKL 的蛋白表达下调,对骨质疏松症起到一定的作用^[18-19]。杜仲醇提取物可以使 Wnt 信号通路相关基因发生改变,可以上调 Fzd2、Fzd3 和 β -catenin 的含量,下调 Wnt 抑制因子的活性。说明杜仲对 BMSCs 成骨分化具有一定的促进作用^[20-21]。李家等^[22]发现,续断皂苷可以促进 BMSCs 成骨分化,使成骨细胞中的骨钙结节数量增加,其机制为上调 BMP-2、Runx2、 β -catenin 和 OCNmRNA 的表达,当在 Wnt 通路中加入 DKK-1 时成骨基因的上调降低,说明续断皂苷可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路使 BMSCs 成骨分化加速。

蛇床子素可以上调 BMP-2 蛋白表达,刺激 BMSCs 成骨分化,增加 ALP 活性和 Ca^{2+} 含量,上调 BMP-2、Runx2、Osterix、Collagen I mRNA 的表达^[23-25]。梁晓伟等^[26]使用羟基红花黄色素 A (HSYA) 对 BMSCs 成骨分化进行研究,发现 HSYA 能促进 BMSCs 增殖 (MTT 法)、并且可以高效促进其向成骨分化。肖继杰^[27]使用香橼、佛手、当归、羌活等众多中药材的有效成分佛手柑内酯 (bergapten, BP) 对 C57BL/6 小鼠 BMSCs 成骨分化进行研究,发现 BP 促进 BMSCs 成骨分化能力呈现浓度依赖性,和浓度成正比例。当 BP 浓度以 10 倍递增的态势时,成骨分化各个相关指标 ALP、BGP、RUNX2、DSX 均表达增高,提示 BP 可以促进 BMSCs 成骨分化。蛇床子素对成骨分化 Wnt/ β -catenin 信号通路也具有一定的作用,可以上调 ERK1/2-MAPK 的活性,对 BMSCs 成骨分化起到一定的促进作用^[28]。

王磊等^[29]使用黄芪多糖对 BMSCs 成骨分化进行干预,发现其对 X 线辐射 BMSCs 向成骨方向分化的潜能具有保护作用。严芳娜^[30]使用黄精多糖对去卵巢衰老大鼠骨质疏松症模型进行研究。首先复制去卵巢大鼠骨质疏松症模型,之后诱导大鼠 BMSCs 成骨分化,在不同的时间点检测大鼠股骨骨密度、碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、钙 (Ca^{2+}) 和磷 (P^{3+}) 含量,同时观察黄精多糖对大鼠骨髓基质细胞中、间充质干细胞成骨分化过程中的 miRNA 表达,观察骨髓源性

单核巨噬细胞向成骨分化中,黄精多糖对骨髓源性单核巨噬细胞向破骨分化中的 miRNA 表达。发现黄精多糖可以明显抑制破骨细胞增殖过程。

骨碎补含药血清通过 wnt/ β -catenin 信号通路对 BMSCs 进行成骨分化的诱导,发现其可以明显促进 BMSCs 增殖和钙化结节的形成^[31]。

3 补肾中药复方对 BMSCs 增殖、成骨分化作用及机制

高璐^[32-33]采用 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、黄芪甲苷作为非补肾药对照组,对大鼠 BMSCs 进行定向成骨分化的研究。发现补肾中药有效成分不同配伍含药血清作用于体外培养骨髓间充质干细胞 72 h,可以促进骨髓间充质干细胞的增殖,ALP 在 12 d 达到峰值。认为补肾中药有效成分正交配伍能提高骨髓间充质干细胞增殖率,促进骨髓间充质干细胞成骨分化,其机制与补肾中药有效成分配伍能上调 RUNX2、OSX 的基因表达相关。Weng 等^[34]发现补骨脂酚和补骨脂黄酮可以使 Wnt 细胞通路中的 Wnt3a、LRP5 和 β -catenin 的水平提高,并且这种作用和上述两种中药成分,呈现剂量的依赖性,提示补骨脂酚和补骨脂总黄酮可以通过作用于 Wnt 细胞通路来促进 BMSCs 成骨分化。孙月娇等^[35]对补肾中药方剂左、右归丸进行拆方研究发现其可以有效提高 BMSCs 增殖,缩短细胞群体倍增时间,有效的抑制 BMSCs 的凋亡。

骨质疏松症是临床常见的一种骨代谢疾病,分为原发性和继发性两大类,其发病机制复杂、临床治疗困难,发挥中西医各自的优点为患者解除病痛,这是最终目的。中医中药是国粹,中药与西药相比总体具有物美、价廉、靶点多,不良反应小的优势。中药对 BMSCs 增殖、成骨分化方面的研究,虽然取得一定的进展,但也存在一定的问题:①对 BMSCs 增殖、成骨分化方面的研究中药多集中在单体或活性成分上,补肾的中药居多,补气活血的少;②单味中药成分复杂,复方成分更加难以搞清楚,如何更好的研究中药对 BMSCs 成骨分化的作用机制,中药有效成分的纯化和分离是本研究的大方向;③中药作用于 BMSCs 成骨分化各个细胞信号通路的分子机制还需要进一步研究,各个细胞通路之间的协同作用,通路与通路之间,因子与因子之间的协同与拮抗作用有待进一步深入研究,这些都是未来的研究方向;

④体内动物实验水平需要深入的研究,对于其他由于肾虚或是血瘀等因素导致的骨质疏松症模型,中药的作用有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999,284(5411):143-147.
- [2] 卞琴,黄建华,杨铸,等. 三种补肾中药有效成分对皮质酮致骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞基因表达谱的作用[J]. 中西医结合学报, 2011,9(2):179-185.
- [3] 胡丹,黄秋云,黎金浓,等. 中药诱导骨髓间充质干细胞多向分化研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2013,3(4):218-222.
- [4] Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers[J]. J Cell Mol Med, 2007,11(5):981-1011.
- [5] Mimeault M, Mehta PP, Hauke R, et al. Functions of normal and malignant prostatic stem/progenitor cells in tissue regeneration and cancer progression and novel targeting therapies[J]. Endocr Rev, 2008,29(2):234-252.
- [6] Kisiday JD, Goodrich LR, McIlwraith CW, et al. Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2013,74(5):801-807.
- [7] 张立超,邓鸣涛,戴鹏,等. 杜仲叶通过激活 ERK 及 AKT 磷酸化促进大鼠成骨细胞增殖的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013,19(3):217-220.
- [8] 李杨,张延辉,王云枫,等. 丹参提取物促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017,23(8):1030-1033.
- [9] 许静,张晶晶,郭非非,等. 淫羊藿黄酮类主要成分促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化作用及机制的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(14):113-120.
- [10] 鲍远,黄俊明,靖兴志,等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2016,20(24):3501-3507.
- [11] 时舒曼. 银杏叶提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 P38 信号通路的研究[D]. 长春:吉林大学, 2016.
- [12] 饶华,徐贤柱,王曼莹. 杜仲叶总提取物治疗去势大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 江西医药, 2014,49(2):100-102.
- [13] 梁广胜,陈伟才,殷嫦嫦,等. 淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程 BMP-2/RunX2/OSX 通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016,36(5):614-618.
- [14] Zhou H, Wang S, Xue Y, et al. Regulation of the levels of Smad1 and Smad5 in MC3T3-E1 cells by Icaritin in vitro[J]. Mol Med Rep, 2014,9(2):590-594.
- [15] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icaritin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF-kappaB regulated HIF-1alpha and PGE(2) synthesis[J]. Phytomedicine, 2011,18(2-3):176-185.
- [16] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icaritin isolated from Epimedium pubescens regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression[J]. Phytomedicine, 2010,17(6):414-423.
- [17] 郭英,李佩芳,邓欢,等. 骨碎补总黄酮对 BMSCs 成骨分化过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[C]. 第五届全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病论坛,北京, 2012.
- [18] 廖悦华,梁琮,王卓,等. 中药骨碎补对去势大鼠骨质疏松症动物模型的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007,13(4):277-280.
- [19] 刘康,吴凤晴,吴连国,等. 强骨胶囊对骨质疏松大鼠 OPG/RANKL/RANK 系统的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016,31(3):1071-1073.
- [20] 张贤,朱丽华,钱晓伟,等. 杜仲醇提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的 Wnt 信号途径[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(45):8520-8523.
- [21] 朱丽华,张贤,张艳红,等. 杜仲诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的有效部位[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(36):6758-6761.
- [22] 李家,林晓晨,王雅冰,等. 续断皂苷 VI 对小鼠骨髓基质干细胞成骨分化的影响[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2017,18(1):28-32.
- [23] 鲍君杰,谢梅林,朱路佳. 蛇床子素治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2011,27(4):591-592.
- [24] 鲍君杰,谢梅林,周佳,等. 蛇床子素预防去卵巢大鼠骨质疏松形成的实验研究[J]. 中国药理学杂志, 2006,41(3):193-195.
- [25] 鲍君杰,谢梅林,周佳,等. 蛇床子总香豆素对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005,25(3):387-390.
- [26] 梁晓伟,李阳飞,李璇,等. 羟基红花黄色素 A 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 口腔生物医学, 2017,8(2):90-94.
- [27] 肖继杰. 佛手柑内酯对骨髓间充质干细胞成骨分化能力影响的初步研究[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [28] Hu H, Chen M, Dai G, et al. An Inhibitory Role of Osthole in Rat MSCs Osteogenic Differentiation and Proliferation via Wnt/ β -Catenin and Erk1/2-MAPK Pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2016,38(6):2375-2388.
- [29] 王磊,卢志伟,许小敏,等. 黄芩多糖对 X 线辐射骨髓间充质干细胞向成骨方向分化的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017,24(12):47-51.
- [30] 严芳娜. 黄精多糖干预去卵巢大鼠、骨髓间充质干细胞及破骨细胞后 microRNA 的差异表达及机制研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2017.
- [31] 陈公刚,谭国庆,任维龙,等. 骨碎补含药血清经 wnt/ β -catenin 信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2017,32(6):830-836.
- [32] 高璐,郑洪新,陈道敬,等. 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[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014,16(5):1094-1102.
- [33] 高璐,郑洪新,陈道敬,等. 补肾中药成分配伍调控 RUNX2、OSX 对大鼠 BMSCs 成骨分化的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2014,9(4):425-429.
- [34] Weng Z B, Gao Q Q, Wang F, et al. Positive skeletal effect of two ingredients of Psoralea corylifolia L. on estrogen deficiency-induced osteoporosis and the possible mechanisms of action[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015,417:103-113.
- [35] 孙月娇,宋园,何文智,等. 左、右归丸对大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导中转化生长因子 β 1 及 Smad2/3 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014,18(10):1496-1501.

(收稿日期:2018-07-04;修回日期:2018-08-14)