

· 药物研究 ·

淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 通过 BMP/Runx2/Osx 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究

訾慧* 范颖 蒋宁 谷丽艳 董秀

辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110847

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0690-06

摘要: **目的** 观察淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)成骨分化过程中 BMP-2/Runx2/Osx 信号通路的影响,探讨其可能的作用机制。**方法** 贴壁筛选法体外培养 BMSCs,随机分为空白对照组、阳性转化液组、抑制剂组、淫羊藿次苷 I 组及淫羊藿次苷 I + 抑制剂组、淫羊藿次苷 II 组及淫羊藿次苷 II + 抑制剂组。通过茜素红染色,对各组促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化作用进行药效学评价; ELISA 法检测各组 ALP 活性、BGP、COL-I、BMP2 蛋白分泌量; RT-PCR 法检测各组 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 mRNA 基因表达。**结果** 茜素红染色结果表明,淫羊藿次苷 I 组及淫羊藿次苷 II 组均可明显观察到大量的矿化结节的形成; ELISA 实验结果表明,与空白对照组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均能明显促进 ALP 细胞活性及 BGP、COL-I、BMP-2 蛋白分泌量,并且差异具有统计学意义($P < 0.05$);两组药物作用强度均已达到阳性转化液组的 80% 以上。同时,淫羊藿次苷 I 对 ALP 活性、BGP 蛋白表达均明显强于淫羊藿次苷 II,并且差异具有统计学意义($P < 0.05$);对 COL-I、BMP-2 的蛋白表达量,两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 实验结果表明,与空白对照组相比,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均可显著上调成骨相关转录因子 ALP、BGP、Runx2,并进一步调节其下游基因 Osterix 的转录表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照液组比较,淫羊藿次苷 II 对 ALP、Osterix 的 mRNA 表达无明显差异($P > 0.05$);淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,淫羊藿次苷 II 对 Osterix mRNA 的表达明显强于淫羊藿次苷 I,并且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对 ALP、BGP、Runx2 mRNA 的表达二者无显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 淫羊藿次苷 I 和淫羊藿次苷 II 均能促进 BMSCs 定向成骨转化,其作用机制可能与激活 BMP/Runx2/Osx 信号通路有关。淫羊藿次苷 I 和淫羊藿次苷 II 作用差异可能与淫羊藿次苷 I 在体内生物转化为淫羊藿次苷 II 有关。

关键词: 淫羊藿次苷 I; 淫羊藿次苷 II; 成骨分化; BMP-2/Runx2/OSX 信号通路; 骨髓间充质干细胞; 大鼠; 动物实验

The study of Icariside I and Icariside II on promoting osteogenic differentiation by BMSCs through BMP/Runx2/Osx signaling pathway

ZI Hui*, FAN Ying, JIANG Ning, GU Liyan, DONG Xiu

The Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

* Corresponding author: ZI Hui, Email: cihui@126.com

Abstract: Objective To study the effect of Icariside I and Icariside II on promoting osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) by activating the BMP-2/Runx2/OSX signaling pathway, and to explore its possible mechanism. **Methods** By using the adherence method, BMSCs were cultured and divided into blank control group, positive control group, inhibitor group, Icariside I control and Icariside I + inhibitor group, Icariside II and Icariside II + inhibitor group. Osteoblasts differentiation was evaluated using Alizarin red staining. The protein expression of ALP, BGP, COL-I, and BMP-2 was detected with ELISA method. The expression of ALP, BGP, Osterix, and Runx-2 genes was detected with real-Time RT-PCR. **Results**

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划项目(201602510); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室开放基金项目(zyzx1507)

* 通信作者: 訾慧, Email: cihui@126.com

The Result of Alizarin red staining showed that a large number of mineralized nodules were formed in Icariside I and Icariside II groups. The ELISA result showed that both Icariside I and Icariside II significantly promoted the activity of ALP and the secretion of BGP, COL-I, and BMP-2 proteins ($P<0.05$). The strength of action in both groups reached more than 80 % of that in the positive control group. Meanwhile, the effect of Icariside I on ALP activity and BGP protein was significantly stronger than that of Icariside II ($P<0.05$). The effect was not significantly different in the protein expression of COL-I and BMP-2 ($P>0.05$). RT-PCR result showed that Icariside I and Icariside II significantly increased ALP, BGP, RunX2, and further regulated the transcription expression of the downstream gene Osterix, with significant differences compared with the blank control group. The mRNA expression of ALP and Osterix was not significantly different between Icariside II and positive contrast group ($P>0.05$). The expression of Osterix mRNA in Icariside II group was higher than that in Icariside I group, and there was significant difference ($P<0.05$). The mRNA expression of ALP, BGP, and RunX2 was not significantly different ($P>0.05$). **Conclusion** Both Icariside I and Icariside II promote osteogenesis by BMSCs. The mechanism of action may be related to the activation of the BMP/Runx2/Osx signal pathway. The different effects between Icariside I and the Icariside II may be related to the biotransformation of Icariside I into Icariside II.

Key words: Icariside I ; Icariside II ; osteogenic differentiation; BMP/Runx2/OSX; bone marrow stromal cells; rats; animal experiments

骨质疏松症是一种增龄性病变,随着人口老龄化,增龄导致骨质疏松症及其骨折的发病率逐年上升,并成为严重的医学和社会问题。中医认为“肾藏精生髓主骨”,肾主藏精,精生髓,髓养骨。中医认为“肾藏精生髓主骨”,肾主藏精,精生髓,髓养骨。肾中精气旺盛则骨就强壮,否则反之。“肾精”也担负成年组织修复的功能。如《灵枢·海论》云:“髓海有余,则轻劲多力;自过其度,髓海不足,则脑转耳鸣,胫酸眩冒,目无所见,懈怠安卧”。现代医学研究证明,干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞,以骨髓组织中含量最为丰富。骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是一种多能间充质干细胞,在一定条件下可以向成骨方向分化,可能受多种信号通路调控,其中 BMP/Runx2/OSX 信号通路是与骨形成密切相关的通路,能促进成骨分化^[1]。骨髓间充质干细胞的分化能力与分化方向体现了骨髓的功能,因此认为补“肾”可以提高骨髓间充质干细胞的分化能力^[2-3]。

淫羊藿为中医临床补肾壮骨常用药材,淫羊藿苷为其主要有效成分,具有明显的促进骨形成、抑制骨吸收的活性^[4-6]。淫羊藿苷口服给药后,在体内会产生多种代谢产物如淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II 等,且原型药物生物利用度较低^[7]。贾晓斌等^[8]发现淫羊藿苷经口给药发挥主要功效的物质基础主要为其代谢产物,翟远坤等^[9]曾报道淫羊藿苷的代谢产物具有强于其本身的生物活性。笔者^[10]前期实验结果也表明,淫羊藿次苷 I 与其原型药物淫羊藿苷相比,有更好的促进骨髓间充质干细胞成骨分化的生理活性。本文通过体外诱导成骨细胞系统,研究淫羊藿次苷 I 和淫羊藿次苷 II 对

BMP/Runx2/OSX 信号通路的影响,探讨其可能作用机制,同时比较两者的作用强度,为开发新药和发掘中医药潜在价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

试剂:DMEM/F12 培养基(Gibco, USA);甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸(ASAP)、地塞米松、二甲基亚砷(DMSO)均购自 Sigma 公司;MEM- α 细胞培养液(GIBCO 12571-063)、碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)测定试剂盒(AE91640Ra, 批号:201512);骨钙素(BGP)检测试剂盒(AE90937Ra, 批号:201512);I 型胶原蛋白测定试剂盒(AE90739Ra, 201512);BMP-2 测定试剂盒(AE90181Ra, 201512);NOGGIN 重组蛋白(Peprotech 公司,美国); β -甘油磷酸钠和茜素红(美国 Sigma-Aldrich);类标准胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司);RNAisoReagent、TaqDNA 聚合酶、反转录试剂盒、EasyDilution 稀释液均购自 TaAaRa 公司,引物由 TaAaRa 公司设计合成。

药品:淫羊藿次苷 I(批号:121020)和淫羊藿次苷 II(批号:121117)均购自上海融禾医药科技有限公司(纯度大于 98%)。

1.2 仪器

二氧化碳细胞培养箱(THERMO FORMA 3110)、酶标仪(BIO-TECK Synergy H1);蛋白核酸分析仪(DU640, 美国贝克曼);低温高速离心机(MR1822, 法国 Jouan SA)。

1.3 方法及检测指标

1.3.1 骨髓间充质干细胞培养及分组:大鼠 BMSCs

购于广州赛业有限公司,批号:090405B01。采用胰蛋白酶消化法进行大鼠骨髓间充质干细胞的传代。

实验分组:①空白对照组:DMEM+10 mL/dL 胎牛血清(含 100 U/mL 青、链霉素),即基础培养液;②阳性转化液组:DMEM+10 mL/dL 胎牛血清(含 100 U/mL 青、链霉素)+0.1 mol/L 地塞米松+50 μg/mL 维生素 C+10 mmol/L β-甘油磷酸钠,即成骨诱导液;③抑制剂组:成骨诱导液+1 μg/mL Noggin;④淫羊藿次苷 I 组:基础培养液+淫羊藿次苷 I 1×10^{-5} mol/L;⑤抑制剂+淫羊藿次苷 I 组:基础培养液+淫羊藿次苷 I 1×10^{-5} mol/L+1 μg/mL Noggin;⑥淫羊藿次苷 II 组:基础培养液+淫羊藿次苷 II 1×10^{-5} mol/L;⑦抑制剂+淫羊藿次苷 II 组:基础培养液+淫羊藿次苷 II 1×10^{-5} mol/L+1 μg/mL Noggin。

1.3.2 ALP 活性测定:采用 ELISA 法于成骨性诱导培养第 6、9、12 天检测 ALP 水平。具体方法按试剂盒说明进行,显色后于酶联仪 450 nm 处测定光密度 D

(λ)值,空白调零,绘制标准曲线,根据样品的光密度值在回归方程上计算对应的样品浓度以 μg/L 表示。

1.3.3 矿化结节染色:将 BMSCs 细胞接种后,使用成骨诱导培养基,放置于 5.0% CO₂, 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h 后,进行上述各组药物干预,诱导 14 d 以后将待测孔的培养基吸出,用茜素红染色方法染色,在倒置显微镜下观察。

1.3.4 测定蛋白表达量:BGP、I 型胶原蛋白(COL-I)、BMP-2 蛋白浓度。采用 ELISA 法于成骨性诱导培养第 12 天,检测 BGP、COL-I、BMP-2 含量,具体方法按试剂盒说明进行。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸收度(OD 值),绘制标准曲线,计算样品的实际浓度以 μg/L 表示(按说明书进行)。

1.3.5 检测基因表达量:药物干预 48 h,提取细胞 RNA,实时定量 PCR 检测相关基因(ALP、BGP、Osterix、Runx2)表达量。RT-Real Time PCR 所用引物序列见表 1。

表 1 RT-Real Time PCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences for real time RT-PCR

物种	基因名称	GenBank 编号	引物序列(5'-3')	产物大小
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	ALP	NM_053650	F: GGCCCTAACATTCCTTTGGA R: GGGTTCACTCATGGAGGCTG	160 bp
	BGP	NM_013414	F: TCAACAATGGACTTGGAGCCC R: GCAACACATGCCCTAAACGG	161 bp
	Osterix	NM_001037632	F: GCCACTAATCTTCCTGCCAG R: TAGTGAGCTTCTTCTGGGGA	77 bp
	Runx2	NM_001278483	F: GCCTTCAAGGTTGTAGCCCT R: TGAAACTCTTGCCTCGTCCG	178 bp
	β-actin	NM_031144	F: CGCGAGTACAACCTTCTTGC R: CGTCATCCATGGCGAACTGG	70 bp

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件处理数据,运用 ST 检验和 One-Way ANOVA 进行方差分析,测定结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 ALP 活性的影响

ELISA 法检测各组在第 6、9、12 天 ALP 的水平。与空白对照组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 组细胞内 ALP 水平均有升高($P < 0.05$),随着反应时间延长,细胞裂解液中 ALP 水平逐渐上升,第 12 天达到最高水平,达到阳性转化液组的 80% 以上。相应抑制剂组, BMSCs ALP 活性明显降低。淫羊藿次苷 I 组与淫羊藿次苷 II 组比较, ALP 活性在第 9、12 天,前者明显强于后者,且差异有统计学意

义($P < 0.05$)。详见表 2。

2.2 对细胞矿化结节的影响

矿化结节的出现是鉴定成骨细胞分化成熟的特征性标志,典型的矿化结节呈红褐色。可以看到,阳性转化液组(B)的矿化结节数目最多,连接成片,且体积较大;淫羊藿次苷 I 组(C)和淫羊藿次苷 II 组(D)的矿化结节均较空白对照组(A)多,且体积明显增大,其中淫羊藿次苷 I 组的矿化结节多于淫羊藿次苷 II 组。抑制剂组(E)的矿化结节数量明显少于阳性转化液组,且体积偏小,矿化水平降低;淫羊藿次苷 I+抑制剂组(F)及淫羊藿次苷 II+抑制剂组(G)的矿化结节数量明显少于相应的淫羊藿次苷 I 组及淫羊藿次苷 II 组,且体积偏小,矿化水平降低。如图 1 所示。

表 2 各组内第 6、9、12 天的 BMSCs ALP 活性比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 2 Comparison of ALP activity between each group on day 6, 9, and 12 after osteogenic induction ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	第 6 天	第 9 天	第 12 天
①空白对照组	65.712 $\pm$ 1.306	68.124 $\pm$ 1.641	71.321 $\pm$ 1.534
②阳性转化液组	114.375 $\pm$ 7.906*	112.825 $\pm$ 2.086*	122.218 $\pm$ 2.130* [*]
③抑制剂组	62.342 $\pm$ 1.135 [^]	63.698 $\pm$ 3.918* [^]	67.198 $\pm$ 1.955* [^]
④淫羊藿次苷 I 组	91.472 $\pm$ 1.182 ^{^*}	99.161 $\pm$ 1.380* ^{^*}	115.112 $\pm$ 1.999* ^{^*}
⑤淫羊藿次苷 I + 抑制剂组	63.972 $\pm$ 2.304 ^{^*}	70.308 $\pm$ 1.585* ^{^*}	77.441 $\pm$ 2.094* ^{^*}
⑥淫羊藿次苷 II 组	87.632 $\pm$ 2.114 ^{^*}	91.285 $\pm$ 1.496* ^{^*}	104.705 $\pm$ 2.324* ^{^*}
⑦淫羊藿次苷 II + 抑制剂组	64.632 $\pm$ 1.967 ^{^*}	70.985 $\pm$ 1.885* ^{^*}	78.705 $\pm$ 2.514* ^{^*}

注:与空白对照组同期比较,* $P<0.05$;与相应各组第 6 天比较,* $P<0.05$;与阳性转化液组同期比较,[^] $P<0.05$;淫羊藿次苷 I 组与淫羊藿次苷 II 组同期比较,[^] $P<0.05$;抑制剂组与相应药物组即⑤组与④组、⑦组与⑥组相比,[^] $P<0.05$ 。

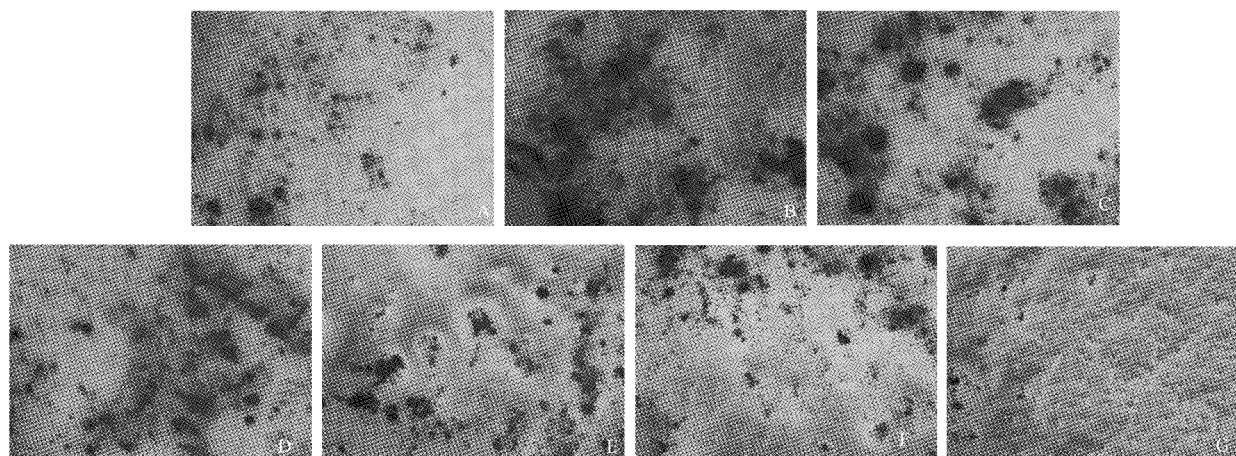


图 1 各组对细胞矿化结节的影响(茜素红染色, $\times 40$) A:空白对照组; B:阳性转化液组; C:淫羊藿次苷 I 组; D:淫羊藿次苷 II 组; E:抑制剂组; F:淫羊藿次苷 I + 抑制剂组; G:淫羊藿次苷 II + 抑制剂组(放大倍数 $\times 40$)

Fig.1 Effects on mineralized nodule in BMSCs in each group (Alizarin red staining, $\times 40$). A: Blank control group; B: Positive transformation solution group; C: Icaritin I group; D: Icaritin II group; E: Inhibitor group; F: Icaritin I + inhibitor group; G: Icaritin II + inhibitor group ($\times 40$)

2.3 对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 BGP、COL- I、BMP-2 蛋白表达的影响

BGP、COL- I、BMP-2 的蛋白表达量随着培养时间的延长而增加,在第 12 天达到了高峰值。与空白对照组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 组细胞 BGP、COL- I、BMP-2 表达量均明显增加 ($P<0.05$);与阳性对照液组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 组各因子蛋白表达量差异有统计学意义

($P<0.05$),但其活性已达到阳性转化液组的 80% 以上;相应抑制剂组细胞 BGP、COL- I、BMP-2 表达量均显著降低,即⑤组与④组相比及⑦组与⑥组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,淫羊藿次苷 I 对促进 BGP 蛋白表达明显强于淫羊藿次苷 II,且差异有统计学意义($P<0.05$),对 COL- I、BMP-2 的蛋白表达量,两者差异无统计学意义。详如表 3。

表 3 各组内第 12 天的 BMSCs 成骨相关蛋白表达水平比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 3 Comparison of BGP, COL-1, and BMP-2 secretion between each group on day12 after osteogenic induction ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	BGP	COL-1	BMP-2
①空白对照组	26.304 $\pm$ 0.245	6.121 $\pm$ 0.371	7.225 $\pm$ 0.128
②阳性转化液组	51.263 $\pm$ 0.661*	12.371 $\pm$ 0.316*	11.833 $\pm$ 0.233*
③抑制剂组	25.688 $\pm$ 0.635 [^]	5.379 $\pm$ 0.152 [^]	5.0285 $\pm$ 0.129* [^]
④淫羊藿次苷 I 组	44.879 $\pm$ 0.919* ^{^*}	10.507 $\pm$ 0.251* [^]	9.548 $\pm$ 0.193* [^]
⑤淫羊藿次苷 I + 抑制剂组	33.359 $\pm$ 1.424* ^{^*}	7.578 $\pm$ 0.259* ^{^*}	7.239 $\pm$ 0.149* ^{^*}
⑥淫羊藿次苷 II 组	40.951 $\pm$ 0.919* ^{^*}	10.145 $\pm$ 0.326* [^]	9.364 $\pm$ 0.099* [^]
⑦淫羊藿次苷 II + 抑制剂组	32.515 $\pm$ 1.233* ^{^*}	7.358 $\pm$ 0.176* ^{^*}	7.223 $\pm$ 0.091 ^{^*}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与阳性转化液组比较,[^] $P<0.05$;淫羊藿次苷 I 组与淫羊藿次苷 II 组比较,[^] $P<0.05$;抑制剂组与相应药物组即⑤组与④组、⑦组与⑥组相比,[^] $P<0.05$ 。

2.4 对 BMSCs 骨向分化过程中 BMP/RunX2/OSX 信号通路相关因子 ALP、BGP、Osterix、Runx2 mRNA 表达的影响

淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均可上调 ALP、BGP、Runx2,并进一步调节其下游基因 Osterix 的转录表达。与空白对照组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 组 ALP、BGP、Runx2 及 Osterix mRNA 表达明显增强 ($P<0.05$);与阳性对照液组比较,淫羊藿次苷 I 对各因子 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P<$

0.05),但其活性较强。淫羊藿次苷 II 对 ALP、Osterix 的 mRNA 表达与阳性对照组无明显差异;相应抑制剂组相关转录因子表达量明显降低,即⑤组与④组、⑦组与⑥组相比,差异有统计学意义 ($P<0.05$);淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,对 Osterix 因子 mRNA 的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$),后者明显强于前者,对其他各因子 mRNA 的表达二者无显著性差异。详见表 4。

表 4 各组细胞 ALP、BGP、Osterix、Runx2 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Gene expression of ALP, BGP, Osterix, and RUNX2 in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ALP	BGP	Runx-2	Osterix
①空白对照组	—	—	—	—
②阳性转化液组	8.89±0.16*	9.25±0.18*	7.05±0.20*	4.52±0.14*
③抑制剂组	1.87±0.36* [△]	3.22±0.34* [△]	2.18±0.15* [△]	1.63±0.33* [△]
④淫羊藿次苷 I 组	7.25±0.41* [△]	7.52±0.98* [△]	4.53±0.23* [△]	3.64±0.19* ^{△▲}
⑤淫羊藿次苷 I +抑制剂组	2.11±0.25* ^{△□}	3.86±0.19* ^{△□}	2.26±0.17* ^{△□}	1.34±0.22* ^{△□}
⑥淫羊藿次苷 II 组	7.96±0.31*	6.47±0.73* [△]	5.12±0.32* [△]	4.46±0.32*
⑦淫羊藿次苷 II +抑制剂组	1.74±0.37* ^{△□}	3.95±0.29* ^{△□}	1.59±0.07* ^{△□}	1.79±0.21* [□]

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与阳性转化液组比较,[△] $P<0.05$;淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,[▲] $P<0.05$;抑制剂组与相应药物组即⑤组与④、⑦组与⑥组相比,[□] $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 骨髓间充质干细胞成骨分化

骨髓间充质干细胞是骨髓中成骨细胞的祖细胞,在一定条件下可以成骨分化。BMSCs 向成骨分化的重要表现如早期出现的标志物成骨细胞早期分化程度的碱性磷酸酶及较晚出现的作为成骨细胞向新骨生成过程特异性指标的骨钙素等。

3.2 BMP/Runx2/Osx 信号通路与成骨分化

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是转化生长因子 (TGF- β) 超家族的一员,可诱导骨髓间充质干细胞向成软骨细胞,成骨细胞和成牙本质细胞分化,促进成骨细胞功能。如 BMP-2 是促进骨形成最重要的细胞外信号分子之一^[11]。成骨细胞的分化受多种信号通路调控,而其中 BMP/Smads/Runx2/Osx 信号通路与骨形成密切相关。BMP-2 通过激活 Smads 信号传导和调节成骨基因转录如 BMP-2、Runx2、Osterix 等,而发挥其成骨作用。该信号通路同时受到抑制性 smads 和细胞外 BMPs 拮抗剂 (如 Noggin) 等的调控^[12]。

Runx2 作为 BMP-2 的靶基因,直接调节成骨细胞特异性基因的表达,包括骨钙素、I 型胶原和碱性磷酸酶等,在骨形成的多个阶段起调控作用。

Osterix 是 Runx2 的下游靶基因,受到 Runx2 的转录调控。Osterix 是成骨细胞晚期分化所必需的特异性转录因子,调控多种重要的成骨基因的表达,如 OC、骨粘素、骨桥素、骨钙素和 I 型胶原蛋白等,对骨细胞的分化成熟和骨质形成有重要影响。Osterix 与 Runx2 调控成骨细胞不同的分化阶段。

本实验茜素红染色对细胞矿化结节的影响结果表明,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均具有促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化的趋势。ELISA 实验结果显示,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均能促进 ALP 细胞活性,促进 BGP、COL-I、BMP-2 的蛋白表达量,且随着干预时间延长而呈上升趋势,至第 12 天达到最高。与阳性对照液组比较,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 组仍存在显著性差异,但其活性已达到阳性转化液组的 80% 以上。淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,淫羊藿次苷 I 对 ALP 活性、BGP 蛋白表达均明显强于淫羊藿次苷 II;对 COL-I、BMP-2 的蛋白表达量,两者无显著性差异。

RT-PCR 结果显示,淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 均可显著上调成骨相关转录因子 ALP、BGP、Runx2,并进一步调节其下游基因 Osterix 的转录表达,与空白对照组比较,具有显著性差异 ($P<0.05$);

与阳性对照液组比较,淫羊藿次苷 I 对各因子蛋白表达量存在显著性差异($P<0.05$),但其活性较强。淫羊藿次苷 II 对 ALP、Osterix 的 mRNA 表达与阳性对照组无明显差异;淫羊藿次苷 I 与淫羊藿次苷 II 组比较,对 Osterix 因子 mRNA 的表达,二者具有显著性差异($P<0.05$),后者明显强于前者;对 ALP、BCP、Runx2 因子 mRNA 的表达二者无显著性差异。

本研究表明,中药淫羊藿中的主要有效成分淫羊藿苷的代谢产物淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II,在体外能通过激活 BMP/Runx2/Osx 信号通路相关基因表达,提示可能通过促进 BMP-2 蛋白,继而调控靶基因 Runx2、Osterix 的表达,进而促进 BMSCs 的成骨转化。BMP 信号通路的阻滞剂($1\text{ }\mu\text{g/mL}$ Noggin 重组蛋白)能明显抑制 $1\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 对 BMSCs 定向成骨分化的作用。本实验结果与翟远坤等^[9]研究的淫羊藿次苷 II 促进 BMSCs 成骨性分化的活性高于淫羊藿苷的实验结果具有一致性。

但是,其促进 BMSCs 定向成骨分化的信号转导通路可能含有多条且交错成网,其作用机制仍有待进一步深入研究。贺龙刚^[13]等研究结果证明,淫羊藿次苷 I 及其代谢产物淫羊藿次苷 II 在体外均能通过 AP-1/NFATc1 信号通路抑制破骨细胞生成,且淫羊藿次苷 II 作用优于淫羊藿次苷 I。翟远坤等^[14]研究表明,淫羊藿次苷 II 通过激活雌激素信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化。但通过 BMP/Runx2/Osx 信号通路研究淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究本文尚属首次。

同时研究发现,淫羊藿次苷 I 对 ALP 活性、BCP 蛋白表达促进作用显著强于淫羊藿次苷 II;淫羊藿次苷 II 对 Osterix mRNA 的表达要明显强于淫羊藿次苷 I。淫羊藿次苷 I 虽然能够促进 ALP 活性、BCP 蛋白表达,但对下游 Osterix 基因表达作用弱于淫羊藿次苷 II。该结果提示可能与两者化学结构上 3 位和 7 位取代基的不同有关。另外,淫羊藿次苷 II 为淫羊藿次苷 I 体内代谢产物,提示淫羊藿次苷 I 可能通过生物转化成淫羊藿次苷 II,进一步增强对 BMP/Runx2/Osx 信号通路下游基因的调控,

从而促进 BMSCs 定向成骨分化。这些可能是两者活性差异的主要原因,但具体机理还需做进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] 李成琳,陈书兰,任伟伟,等.骨形态发生蛋白 2/Osterix 信号通路调控的前成骨细胞分化[J].中国组织工程研究,2016,20(24):3581-3587.
- [2] 葛继荣,郑洪新,万小明,等.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.
- [3] 李佳,宋爱松,谢晚晴,等.关于补肾中药防治骨关节炎分子机制的体外实验研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(7):877-882.
- [4] 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.
- [5] 黄明炜,廖勇敢.淫羊藿总黄酮调节骨代谢作用及药理机制的研究新进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(4):452-456.
- [6] 傅淑平,杨丽,洪浩,等.淫羊藿苷促 SD 大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化作用的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2015,35(7):839-846.
- [7] Xu W, Zhang Y, Yang M, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma[J].J Pharm Biomed Anal,2007,45(4):667-672.
- [8] 贾晓斌,钱浅,孙娥,等.淫羊藿黄酮药代动力学研究进展[J].中成药,2012,34(11):2193-2197.
- [9] 翟远坤,葛宝丰,陈克明,等.淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷 II 对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究[J].中药材,2010,33(12):1896-1900.
- [10] 訾慧,孙丽,蒋宁,等.淫羊藿次苷 I 与其原型药物淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨性分化的影响比较[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(8):1011-1016.
- [11] 王霖霞,李玉冲.BMP-2 信号通路与成骨细胞分化[J].国际骨科学杂志,2009,30(2):132-136.
- [12] 徐练,孔清泉.调控成骨细胞分化及骨形成关键信号通路的研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2014,28(12):1484-1489.
- [13] 贺龙刚,高奥,邱煌沛,等.淫羊藿次苷 I 及其代谢产物淫羊藿次苷 II 通过 AP-1/NFATc1 信号通路调控破骨细胞生成[J].中华中医药杂志,2017,32(3):1299-1302.
- [14] 翟远坤,陈克明,葛宝丰,等.淫羊藿次苷 II 通过激活雌激素信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化[J].中国药理学通报,2011,27(10):1451-1457.

(收稿日期:2018-12-06;修回日期:2019-01-09)