

· 论 著 ·

固本增骨方含药血清对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

宋敏¹ 巩彦龙¹ 董万涛^{2*} 刘小钰¹ 董平^{1,3} 黄凯¹ 王凯¹

1.甘肃中医药大学,甘肃 兰州 730000

2.甘肃中医药大学附属医院,甘肃 兰州 730020

3.内蒙古医科大学,内蒙古 呼和浩特 010010

中图分类号: R289.9;R332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0511-05

摘要: **目的** 观察固本增骨方含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的作用并探讨其可能的作用机制。**方法** 制备固本增骨方含药血清,将大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分为空白血清组、5%、10%、20%、30%浓度含药血清组及传统诱导组,分别对各组大鼠 BMSCs 进行成骨诱导。4周后进行茜素红染色镜下观察各组红色钙结节数量,Western blotting 法分析各组 BGP、Runx2 的蛋白相对表达量,Real-Time PCR 检测各组中 BGP、Runx2 mRNA 的相对表达量。**结果** 各组 BMSCs 成骨诱导分化后的形态变化各有特点,茜素红染色后镜下观察,红色钙结节数量随含药血清浓度增加而增加,并且浓度为 20%时钙结节数量明显多于其他各组($P<0.01$);BGP、Runx2 的蛋白及 mRNA 相对表达量在 20%浓度含药血清组达最高,且与其他各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 固本增骨方含药血清能通过 BGP、Runx2 的转录与表达促进大鼠 BMSCs 成骨分化,且在 20%浓度为最佳。

关键词: 骨质疏松;固本增骨方;含药血清;骨髓间充质干细胞;成骨分化;大鼠;动物实验

Effect of Guben Zenggu drug-containing serum on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells

SONG Min¹, GONG Yanlong¹, DONG Wantao^{2*}, LIU Xiaoyu¹, DONG Ping^{1,3}, HUANG Kai¹, WANG Kai¹

1. Gansu University of TCM, Lanzhou 730000

2. The Second Affiliated Hospital of Gansu University of TCM, Lanzhou 730020

3. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China

* Corresponding author; DONG Wantao, Email: dwt130@126.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of Guben Zenggu Recipe on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells and explore its possible mechanism. **Methods** The serum containing Guben Zenggu Recipe was prepared. The BMSCs of rats were divided into blank serum group, 5%, 10%, 20% and 30% concentration drug-containing serum group and traditional induction group for osteoinduction. After 4 weeks, the number of red calcium nodules in each group was observed under alizarin red staining. The relative expression of BGP and Runx2 protein in each group was analyzed by Western blotting. The relative expression of BGP and Runx2 mRNA in each group was detected by Real-Time PCR. **Results** The morphological changes of BMSCs after osteogenic induction and differentiation were different in each group. After staining with alizarin red, the number of red calcium nodules increased with the concentration of drug-containing serum, and the number of calcium nodules was the highest at 20% concentration. Compared with other groups ($P<0.01$), the 20% concentration drug-containing serum group had the highest relative expression levels of BGP and Runx2 protein and mRNA, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The serum containing Guben Zenggu Formula could promote the osteogenic differentiation of BMSCs in rats through the transcription and expression of BGP and Runx2, and the best concentration is 20%.

基金项目: 甘肃省自然科学基金计划(17JR5RA056, 1506RJZA048); 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放基金项目(GSMBKY2015-07); 甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2016-17); 甘肃省中药现代制药工程研究院项目(YWW-2015049)

* 通信作者: 董万涛, Email: dwt130@126.com

Key words: osteoporosis; Gubenzenngu; drug-containing serum; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; rats; animal experimentation

在全世界老龄化的背景下,老年性骨质疏松症(osteoporosis, OP)的发病率呈递增趋势,其中绝经后 OP 性骨折的终生风险可能在 13%~25%,并且随着寿命的增长而增加了骨折的风险^[1]。多种因素影响了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨细胞(osteoblast, OB)的分化^[2],而 OP 发生、发展与 OB 及破骨细胞(osteoclast, OC)调控的骨代谢动态平衡失调密切相关。目前,治疗 OP 的西药在治疗的同时又有某种不理想因素;而中医药通过中医药理论的指导,对人体机能的全方位调节防治 OP,疗效显著、副作用小,对 OP 的防治有积极作用。本研究通过定向诱导 BMSCs 向 OB 分化模型,运用固本增骨方含药血清对其定向分化过程的干预,以观察固本增骨方含药血清对该过程的影响并阐明影响该过程的可能机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞:SPF 级 3 月龄 Wistar 大鼠 30 只,体重(200±20)g;Wistar 大鼠 BMSCs(货号:RAWMX-01001,规格:1×10⁶ 个细胞/管;冻存代次:P1;保存条件:液氮)。

1.1.2 主要药品与试剂:购于甘肃中医药大学附属医院的固本增骨方,制成药粉后配成 25 g/L 混悬液。浓度为 0.1% 的明胶(货号:RAWMX-90011, RAWMX-90021, T170313G001)。SDS-PAGE 试剂盒、茜素红(批号:20170802, p1200, T170512G001)。购于 GeneTex 公司的 BGP 兔多克隆抗体(批号:821703974),购于 ImmunoWay 公司的 Runx2 兔多克隆抗体、GAPDH(批号:B4135, B5601)。

1.1.3 主要仪器:凝胶电泳仪、凝胶成像分析仪(美国 Bio-rad 公司生产, PowerPoc Basic, ChemiDoc™ XRS+)及 PCR 荧光定量仪(C1000)。

1.2 方法

1.2.1 固本增骨方含药血清的制备:上述动物按随机表法分为空白血清组和含药血清组(各 15 只),后者以 10 mL/kg 剂量、2 次/d 灌胃,前者给予等量生理盐水,干预一周后心脏取血,离心取上清灭火、除菌后备用。

1.2.2 Wistar 大鼠 BMSCs 的培养:BMSCs 经复苏,

培养后重悬,台盼蓝染色观察适宜密度为 3.0×10⁴ 个活细胞/cm²,将细胞接种分瓶后在条件适宜的培养箱中传代,最终培养出符合实验要求 BMSCs。

1.2.3 分组与造模:将传至 P3 代 BMSCs 分为空白血清组、传统成骨诱导组、传统成骨诱导+不同浓度(5%、10%、20%、30%)含药血清组。将上述细胞接种于相应培养基上培养 24 h,弃去培养基,并依次按实验分组分别加入空白血清、传统成骨诱导液及传统成骨诱导液+各浓度含药血清继续培养。从 24 h 后开始连续 5 d 测量各组细胞计数。

1.2.4 茜素红染色:4 周后甲醛固经茜素红染色后,光镜下观察钙结节数。

1.2.5 细胞 BGP、Runx2 蛋白表达检测:提取各组细胞总蛋白保存后备用,每组 BGP、Runx2 蛋白检测均按照 WB 标注操作步骤进行,并分析各组条带,所得灰度值与内参比较得到 BGP、Runx2 的蛋白相对表达量。

1.2.6 细胞 BGP、Runx2 mRNA 表达的检测:TRIZOL 法提取各组总 RNA、测定含量。取总 RNA 2μg,逆转录合成规范操作第一链 cDNA。扩增片段长度 150 bp、86 bp、51 bp 分别对应 GAPDH、BGP、Runx2。按荧光定量试剂盒操作流程行 RT-PCR 反应及 PCR 扩增。将所得数据统计分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件包进行数据统计与分析。用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料,用 ANOVA 单因素方差分析法分析组间差异、多组间比较采用 LSD 方法,设置 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 培养结果

细胞传至第三代时可见其呈顺向排列生长,并且生长良好,见图 1。

2.2 各组细胞茜素红染色结果比较

镜下观察可见传统成骨诱导组红色钙结节数量明显多于空白组;含药血清组(5%、10%、20%)随着浓度增加,红色钙结节数量也逐渐增加,尤其浓度在 20%时,红色钙结节数量最为显著,且显著高于空白组与传统成骨诱导组,当浓度增加到 30%时,钙结节数量呈下降趋势,结果见图 2。

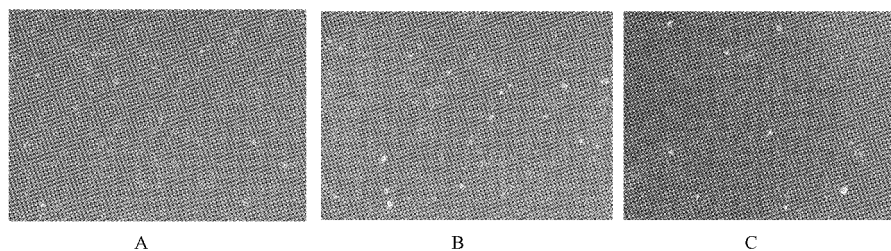


图 1 P1、P2、P3 代 BMSCs 镜下形态 A: P1 代 BMSCs 培养 5 d($\times 10$); B: P2 代 BMSCs 培养 5 d($\times 10$); C: P3 代 BMSCs 培养 5 d($\times 10$)。

Fig.1 Microscopic morphology of P1, P2 and P3 BMSCs. A: P1 BMSCs were cultured for 5 days ($\times 10$); B: P2 BMSCs were cultured for 5 days ($\times 10$); C: P3 BMSCs were cultured for 5 days ($\times 10$).

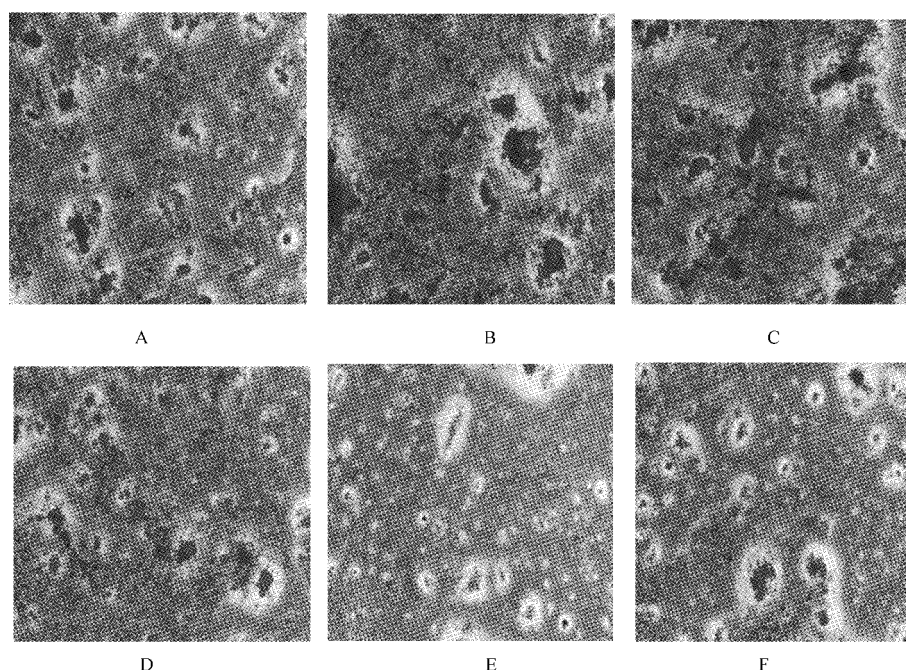


图 2 各组细胞茜素红染色结果($\times 40$) A: 5% 含药血清组; B: 10% 含药血清组; C: 20% 含药血清组; D: 30% 含药血清组; E: 空白血清组; F: 传统成骨诱导组。

Fig.2 Alizarin red staining results of cells in each group ($\times 40$). A: 5% drug-containing serum group; B: 10% drug-containing serum group; C: 20% drug-containing serum group; D: 30% drug-containing serum group; E: Blank serum group; F: Traditional osteogenesis induction group.

2.3 各组细胞 BGP、Runx2 蛋白表达比较(图 3, 表 1)

2.4 各组细胞 BGP、BGP mRNA 表达比较(表 2)

3 讨论

年龄增长骨量和骨骼强度下降,在老年以后伴随着量减少和骨骼强度下降后骨细胞死亡增快而骨细胞新生相对减少,这包括 OC 导致的破骨细胞作用占主要地位,而 OB 的成骨作用减低,并且导致骨

细胞死亡是多因素作用的结果^[3]。老年妇女中的 OP 患者因 OP 可直接导致髌部骨折及椎体压缩性骨折,对于大多数患有骨质疏松症的妇女来说,早起治疗具有积极的意义^[4]。BMSCs 是有多向分化潜能的干细胞,在细胞因子、基因等因素的作用下其可以分化为 OB^[5],而调上述因素对 BMSCs 调节异常将导致骨量丢失和 OP 发生^[6]。研究显示, BMSCs 的异常分化能促进或抑制骨质疏松症的发生^[7]。

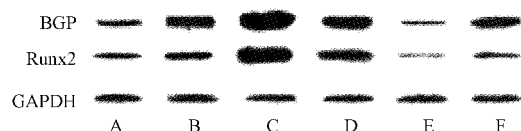


图 3 各组细胞 BGP、Runx2 蛋白表达

注: A、B、C、D 分别为 5%、10%、20%、30% 含药血清组; E 为空白血清组; F 为传统成骨诱导组

Fig.3 Expression of BGP and Runx2 in cells of each group

表 1 各组细胞 BGP、Runx2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of BGP and Runx2 protein expression in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	BGP/GAPDH	Runx2/GAPDH
5% 含药血清组	0.76±0.04 ^Δ	0.88±0.08 ^Δ
10% 含药血清组	0.85±0.07 ^Δ	1.00±0.03 ^Δ
20% 含药血清组	1.04±0.11 ^{Δ▲}	1.10±0.05 ^{Δ▲}
30% 含药血清组	0.82±0.02 ^Δ	0.85±0.09 ^Δ
空白组	0.72±0.05	0.81±0.14
传统成骨诱导组	0.74±0.04 ^Δ	0.83±0.01 ^Δ
F 值	10.051	5.770
P 值	0.001	0.006

注: 与空白组比较, ^Δ $P < 0.01$; 与 5%、10%、30% 含药血清组及传统成骨诱导组比较, [▲] $P < 0.01$ 。

表 2 各组细胞 BGP、Runx2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of BGP and Runx2 mRNA expression in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	BGP	Runx2
5% 含药血清组	1.82±0.24 ^Δ	1.24±0.29 ^Δ
10% 含药血清组	2.05±0.32 ^Δ	1.6±0.18 ^Δ
20% 含药血清组	2.95±0.22 ^{Δ▲}	2.18±0.20 ^{Δ▲}
30% 含药血清组	1.68±0.19	1.06±0.15 ^Δ
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00
传统成骨诱导组	1.63±0.30 ^Δ	1.02±0.27 ^Δ
F 值	10.510	11.898
P 值	0.000	0.000

注: 与空白组比较, ^Δ $P < 0.01$; 与 5%、10%、30% 含药血清组及传统成骨诱导组比较, [▲] $P < 0.01$ 。

本实验研究结果显示,大鼠 P1 代 BMSCs 复苏后镜下观察可见呈短梭形贴壁生长;BMSCs 培养符合实验要求。茜素红可识别细胞内的钙盐^[8],本实验中 BMSCs 经 28 d 成骨诱导培养后行茜素红染色,镜下见红色钙结节数量随含药血清浓度增加(5%、10%、20%)而增加,在浓度为 20% 时红色钙结节数量最多,并且明显多于空白组与传统成骨诱导组,但当含药血清浓度为 30% 时,红色钙结节数量下降,这与最佳药物浓度有关。非胶原蛋白 BGP 可特异性地标志骨形成,在骨形成、维持骨量、骨重塑时,BGP 的重要作用是一方面其能抑制异常羟磷灰

石结晶的形成,另一方面其能促进软骨的矿化速率^[9]。Komori 等^[10]首次报道了由于缺乏 Runx2 因子而引起成骨细胞不成熟,进而缺乏膜内和软骨内骨化。Runx2 在骨形成期间调节成骨细胞和软骨细胞的分化,是 BMSCs 成骨分化的关键因子及骨形成的标志基因^[11]。本实验研究结果显示,BGP、Runx2 基因及蛋白的表达在 20% 浓度含药血清组达水平呈现峰值。由本研究结果可见,固本增骨方含药血清能通过促进 BMSCs 中 BGP、Runx2 基因转录及蛋白的表达,诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,并且当含药血清浓度为 20% 时这种诱导作用较明显。

从 20 世纪 60 年代,更年期和骨质疏松之间的联系首次被确认,此后雌激素治疗 OP 成为预防骨丢失的重要措施之一^[12]。截至目前,基于对骨生物学的理解,西医对 OP 的治疗主要包括抑制骨吸收药及促进骨形成药,对因治疗方法单一并且在一定方面不理想。中药在“整体观、辨证论治”指导治疗 OP 时,着眼于对机体整个机能的调节,标本兼顾,取得了良好的疗效。固本增骨方是甘肃中医药大学宋敏教授基于中医理论从“脾肾”论治而治疗 OP 多年的经验方,由炙黄芪、白芍党参、岷当归、炙淫羊藿、烫狗脊、盐补骨脂组成,诸药合用,能益气健脾、补肾壮骨、活血通络之功效,标本兼顾^[13],能有效缓解老年脾肾两虚型骨质疏松症状。

【参 考 文 献】

- [1] Adler RA. Update on osteoporosis in men[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2018, 32(5): 759-772.
- [2] Hu BT, Chen WZ. MOTSC-c improves osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via TGF- β /Smad pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7156-7163.
- [3] Wang L, Heckmann BL, Yang X, et al. Osteoblast autophagy in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 3207-3215.
- [4] Black DM, Rosen CJ. Clinical practice, postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(3): 254-262.
- [5] 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.
- [6] Wu CC, Wang F, Rong S, et al. Enhancement of osteogenesis of rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells by transfection of human BMP-2 and EGFP recombinant adenovirus via Wnt signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4030-4036.

(下转第 538 页)

本研究的局限之一是回顾性研究。此外,大多数数据来自基于记忆回忆的问卷调查。虽然已知母乳喂养史是骨质疏松症的危险因素,但由于缺失数据,无法在分析中包括母乳喂养史或持续时间。以前的母乳喂养史和骨质疏松症应该进一步研究,尽管我们不能包括在日前的研究中。由于首次分娩时的年龄可能是一个社会条件因素,因此该因素的影响可能很难解释。因此,调整年龄可能会消除首次较小年龄怀孕的影响(<23 岁)。同样,参与者的首次怀孕较大年龄为 30 岁,参与者相对较少。需要进一步研究来确认骨量增加中断与绝经后骨质疏松症之间的关系。

总之,生育因素,包括月经初潮、更年期、怀孕和激素的使用,是绝经后妇女骨质疏松症发展的重要因素。特别是,首次分娩的年龄可能通过中断峰值骨量的获取而影响未来骨质疏松症的发展。这也强调了在具有上述风险因素的女性中考虑使用 HT 的必要性,并且要解决这些女性骨质流失的问题,例如维生素 D 补充剂或生产期间的运动。

【参 考 文 献】

- [1] Kasperk C. Screening for osteoporosis [J]. *Radiologe*, 2008,48(1): 63-70.
 - [2] Jiang X, Good LE, Spinka R, et al. Osteoporosis screening in postmenopausal women aged 50-64 years: BMI alone compared with current screening tools [J]. *Maturitas*, 2016,83: 59.
 - [3] Olmos JM, Hernández JL, Martínez J, et al. Prevalence of vertebral fracture and densitometric osteoporosis in Spanish adult men: The Camargo Cohort Study [J]. *J Bone Miner Metabol*, 2017,36(1): 1-8.
 - [4] 姜剑魁,宋晓燕.绝经后妇女的生殖特征和骨密度相关性研究[J].*中国骨质疏松杂志*,2019,25(3):330-333,365.
 - [5] Ferrari S, Eisman JA, Foldes AJ, et al. Osteoporosis in young adults: pathophysiology, diagnosis, and management [J]. *Osteoporos Int*, 2012,23(12): 2735-2748.
 - [6] Collieran HL, Hiatt A, Wideman L, et al. The effects of diet and exercise on bone mineral density during the first year postpartum [J]. *J Phys Act Health*, 2019,16(3):197-204.
 - [7] Cho GJ, Shin JH, Yi KW, et al. Adolescent pregnancy is associated with osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2012,19(4): 456-460.
 - [8] Lu J, Shin Y, Yen MS, et al. Peak bone mass and patterns of change in total bone mineral density and bone mineral contents from childhood into young adulthood [J]. *J Clin Densitom*, 2016,19(2): 180-191.
 - [9] Schnatz PF, Barker KG, Marakovits KA, et al. Effects of age at first pregnancy and breast-feeding on the development of postmenopausal osteoporosis [J]. *Menopause*, 2010, 17(6): 1161-1166.
 - [10] Brannon PM, Picciano MF. Vitamin D in pregnancy and lactation in humans [J]. *Ann Rev Nutrit*, 2011,31(1): 89.
 - [11] Liu X, Wang X, Tian Y, et al. Reduced maternal calcium intake through nutrition and supplementation is associated with adverse conditions for both the women and their infants in a Chinese population [J]. *Medicine*, 2017,96(18): e6609.
 - [12] Carani C, Qin K, Simoni M, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2016,337(2): 91-95.
 - [13] Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations [J]. *Osteoporos Int*, 2016,27(4): 1281-1386.
 - [14] Henderson NK, Price RI, Cole JH, et al. Bone density in young women is associated with body weight and muscle strength but not dietary intakes [J]. *J Bone Miner Res*, 2010,10(3): 384-393.
 - [15] Seung Joo C, Hyon YB, Yeon Soo J, et al. Association between vitamin D status and risk of metabolic syndrome among Korean postmenopausal women [J]. *PLoS One*, 2014,9(2): e89721.
- (收稿日期: 2019-04-15;修回日期: 2019-05-19)
-
- (上接第 514 页)
- [7] Shen G, Zhang H, Jia P, et al. GDM1 stimulation of glutamine metabolism promotes osteoporosis via inhibiting osteogenic differentiation of BMSCs [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1916-1928.
 - [8] Sha Y, Lv Y, Xu Z, et al. MGF E peptide pretreatment improves the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs via MEK-ERK1/2 and PI3K-Akt pathway under severe hypoxia [J]. *Life Sci*, 2017,189(11): 52-62.
 - [9] Liu KG, He QH, Tan JW, et al. Expression of TNF- α , VEGF, and MMP-3 mRNAs in synovial tissues and their roles in fibroblast-mediated osteogenesis in ankylosing spondylitis [J]. *Genet Mol Res*, 2015,14(2): 6852-6858.
 - [10] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. *Cell*, 1997,89(5): 755-764.
 - [11] Wu T, Cheng N, Xu C, et al. The effect of mesoporous bioglass on osteogenesis and adipogenesis of osteoporotic BMSCs [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016,104(12): 3004-3014.
 - [12] Tella SH, Callaghan JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014,142(6): 155-170.
 - [13] 董万涛,周灵通,宋敏,等.固本增骨方对去卵巢大鼠血清钙素和 NEI 网络组织中游离[Ca²⁺](i)的影响[J].*中药药理与临床*, 2018,34(1): 121-127.
- (收稿日期: 2018-11-30;修回日期: 2019-04-15)