

· 中药药理与质量 ·

补肾活血汤含药血清对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

余丽娟¹, 罗毅文², 熊云谱³, 刘亚梅¹

(1. 广州中医药大学, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东广州 510240; 3. 广州市正骨医院, 广东广州 510045)

摘要:【目的】探讨补肾活血汤促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外成骨细胞分化的能力。【方法】用不同浓度的补肾活血汤含药血清干预BMSCs, 7 d后应用4-硝基苯基磷酸二钠盐(PNPP)偶氮法测定碱性磷酸酶(ALP)活性, 21 d后行茜素红染色(ARS)观察钙盐沉积情况判定成骨能力, 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测Runx相关转录因子2(Runx2)、骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)的基因表达以评估成骨能力。【结果】与空白血清组比较, 补肾活血汤低、中、高剂量血清组BMSCs的ALP活性、茜素红染色面积及Runx2、OCN、OPN基因表达水平平均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。【结论】补肾活血汤可促进BMSCs向成骨细胞分化, 其机制可能与上调Runx-2、OCN、OPN表达有关。

关键词: 补肾活血汤; 含药血清; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0346-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.02.023

Effect of Serum Containing Kidney-Nourishing Blood-Activating Decoction on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *in Vitro*

YU Li-Juan¹, LUO Yi-Wen², XIONG Yun-Pu³, LIU Ya-Mei¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Affiliated Hospital of Orthopedics and Traumatology of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240 Guangdong, China; 3. Guangzhou Orthopedic Hospital, Guangzhou 510045 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of Kidney-Nourishing Blood-Activating Decoction (KBD) on osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** BMSCs were intervened with serum containing different concentrations of KBD, and then alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by 4-nitrophenylphosphate disodiumsalt (PNPP) azo method 7 days later, calcium deposition was observed by alizarin red staining (ARS) 21 days later to determine osteogenic differentiation ability, and the gene expression levels of runx-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) to evaluate osteogenic ability. **Results** Compared with the blank serum group, ALP activity, ARS staining area, and gene expression levels of Runx2, OCN and OPN were increased in the serum containing various concentrations of KBD groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** KBD has an effect on promoting the differentiation of BMSCs into osteoblasts *in vitro*, whose mechanism may be related to increasing Runx-2, OCN and OPN expression.

Keywords: Kidney-Nourishing Blood-Activating Decoction; drug-containing serum; bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); osteogenic differentiation

收稿日期: 2020-03-04

作者简介: 余丽娟(1978-), 女, 医学博士, 讲师; E-mail: yulijuan@gzucm.edu.cn

通讯作者: 刘亚梅(1975-), 女, 医学博士, 教授; E-mail: gzhlym@gzucm.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81873326, 81503593); 广东省自然科学基金项目(编号: 2016A030310289)

骨质疏松的老年群体发病率不断攀升,致骨折风险大大增加^[1]。骨质疏松性骨折防治的重点在于促进骨重建,骨吸收和骨形成保持正平衡,维持骨量。而骨重建的过程是由成骨细胞、破骨细胞共同实施。成骨细胞功能与数量的异常可能是导致骨质疏松的一个原因^[2]。成骨细胞是由骨髓间充质干细胞(BMSCs)分化而来,可以分泌细胞外基质,促进骨形成。BMSCs因其多向分化潜能、低免疫原性,已是骨组织修复工程中研究和应用最多的干细胞来源^[3]。因此,寻找可以促进成骨分化的方法诱导BMSCs向成骨方向分化,是骨质疏松症干预的一个重要研究方向。本研究采用补肾活血汤体外干预BMSCs,观察其对成骨细胞定向分化的调控作用,以期为该方应用于骨质疏松症等骨代谢性疾病提供分子生物学依据,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验药物 补肾活血汤组成:熟地黄 18 g、补骨脂 18 g、菟丝子 18 g、杜仲 6 g、肉苁蓉 6 g、枸杞子 6 g、山萸肉 6 g、独活 6 g、当归 6 g、红花 3 g、没药 6 g。上述药材均购于广州中医药大学骨伤科医院中药房。将上述药材按剂量称取,传统方法煎煮后,浓缩至含生药量 0.9 g/mL,冷却后置于 4℃冰箱内保存备用。

1.2 含药血清的制备 所有大鼠均由广州中医药大学实验动物中心提供。实验环境合格证号:44005900001722。动物质量合格证号:SCXK(粤)2013-0020。将 20 只 SD 大鼠随机分为 4 组,即空白血清组,中药低、中、高剂量血清组,每组 5 只。中药低、中、高剂量血清组给予补肾活血汤灌胃。其标准体质量 60 kg 成人的临床每日常用剂量为 1.65 g/kg,大鼠给药剂量据此按照人与动物表面积换算公式^[4]所得,为 4.42 g·kg⁻¹·d⁻¹(设为中剂量),高、低剂量分别为中剂量的 2 倍和 1/2 倍,即 8.84、2.21 g·kg⁻¹·d⁻¹。空白血清组给予相同体积生理盐水灌胃。每天定时灌胃 1 次,连续 7 d。于末次给药 1 h 后,腹腔麻醉,无菌条件下行心脏采血,分离血清上清,0.22 μm 滤膜过滤除菌后于 -20℃冰箱中保存备用。

1.3 主要试剂与仪器 胎牛血清、DMEM 低糖培养基、2.5 g/L 胰蛋白酶(美国 Coring 公司);茜素红

染色(ARS)剂、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(碧云天生物技术有限公司);PE 标记的大鼠来源 CD34、CD45、CD11、CD29、CD73 和 CD44 单克隆抗体(美国 Invitrogen 公司);TRIzol 试剂、RNA 提取试剂盒、SYBR Green Premix Ex Taq II(日本 TaKaRa 公司);聚合酶链反应(PCR)引物合成(上海生工公司)。CKX31 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);SCW-HS-840 型超净工作台(苏州长春电子仪器厂);流式细胞仪(美国 BD 公司);B16UU CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 BMSCs 的分离与分组处理 取 4 周龄 SD 大鼠,颈椎脱臼法处死,无菌条件下分离出股骨和胫骨,置于 DMEM 低糖培养基中反复冲洗骨髓腔,收集冲洗液,以 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入含体积分数 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37℃、体积分数 5% CO₂、完全饱和湿度条件下常规培养。每 2 d 更换培养基,细胞生长铺满培养瓶底 80% 后,2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代,取 P3 代细胞用于实验。分为中药高、中、低剂量组和空白血清组,分别加入 10% (体积分数,下同)对应剂量补肾活血汤含药血清。

1.5 BMSCs 表面抗原的鉴定 取 P3 代细胞,2.5 g/L 胰蛋白酶消化,以 1 000 r/min 离心 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞制成单细胞悬液,1×10⁶ 个细胞分装于离心管中。分别加入 PE 标记的 CD34、CD45、CD11、CD29、CD73 和 CD44 抗体,室温避光孵育 30 min,离心弃上清,加入 400 μL PBS 重悬为单细胞悬液,利用流式细胞术进行 BMSCs 鉴定。

1.6 4-硝基苯基磷酸二钠盐(PNPP)偶氮法定量分析 BMSCs 的 ALP 活性 以 5×10⁴ 个/mL 的单细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μL,细胞贴壁后按分组更换含药血清,每隔 2 d 换液 1 次,7 d 后去除细胞培养液。PBS 洗 3 次,加入体积分数 0.5% Triton 置冰上裂解,离心后取上清,避光加入 PNPP(1 mg/mL),室温下孵育 1 h,应用酶标仪于波长 405 nm 处检测光密度(OD)值。

1.7 茜素红染色法观察钙盐沉积情况 以 5×10⁴ 个/mL 的单细胞悬液接种入 12 孔培养板,每孔 1 mL,细胞贴壁后按分组更换含药血清,每隔 2 d 换液 1 次。21 d 后去除细胞培养液,用 PBS 冲洗细胞 3 次,室温下 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min,

PBS洗2次。茜素红(0.5%)常温下染色30 min, 蒸馏水冲洗2遍后干燥, 封固, 光镜下观察钙结节染色情况, 呈红色的为钙结节。随机选取5个镜下视野拍照, 使用ImageJ图像处理软件分析结果。

1.8 实时荧光定量PCR法检测BMSCs中成骨分化相关基因Runx2、OCN、OPN mRNA表达 以 5×10^4 个/mL的单细胞悬液接种入12孔板, 细胞贴壁后按分组更换含药血清, 每隔2 d换液1次, 培养21 d。TRIzol法提取细胞总RNA, 用逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix)将RNA反转录为cDNA, 用SYBR Green Premix Ex Taq II进行检测, 在Quant Studio™ Real-Time PCR系统中根据试剂说明书设定反应参数(95 ℃ 5 min; 循环: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 共35个循环)。成骨分化相关指标引物序列如表1所示。记录CT值, 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

1.9 统计方法 采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析, 所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较, 若满足正态和方差齐性, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 若方差不齐, 采用Dunnett's T3检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs的形态观察与鉴定 BMSCs的生长方式为贴壁生长, 镜下观察P3代细胞, 多呈梭形或

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 The RT-PCR primer sequences

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
Runx2	forward: 5'-CCGATGGGACCGTGGT-3'	75
	reverse: 5'-CAGCAGAGGCATTTCTAGCT-3'	
OCN	forward: 5'-GAGCTGCCCTGACTGGGTG-3'	184
	reverse: 5'-TGGCCCAGACCTCTTCCC-3'	
OPN	forward: 5'-TCCAAGGAGTATAAGCAGCGGGCCA-3'	200
	reverse: 5'-CTCTTAGGGTCTAGACTAGCTTCT-3'	
GAPDH (内参)	forward: 5'-GTCTCTCTGACTTCAACAGCG-3'	131
	reverse: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'	

纺锤形, 胞浆丰富, 集落生长, 呈漩涡状, 同向排列, 形态一致。见图1。流式细胞仪检测结果显示, BMSCs中CD44、CD29、CD73高表达, 而CD34、CD45、CD11低表达, 表明获得的细胞符合BMSCs的特点。见图2。

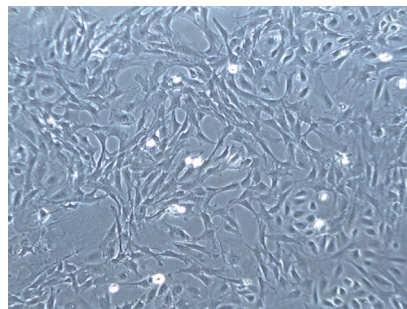


图1 BMSCs的形态学表现($\times 100$)

Figure 1 Morphological features of BMSCs ($\times 100$)

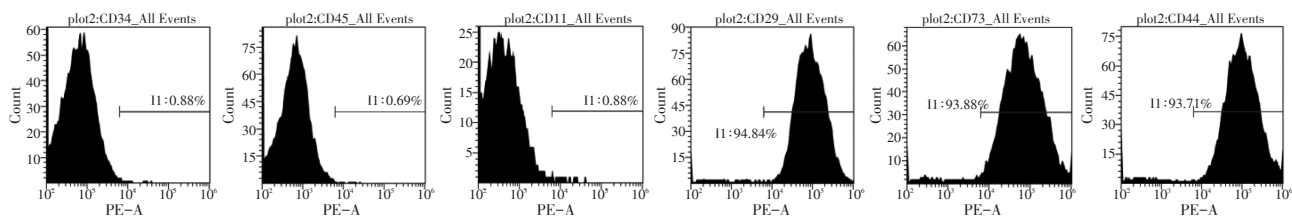


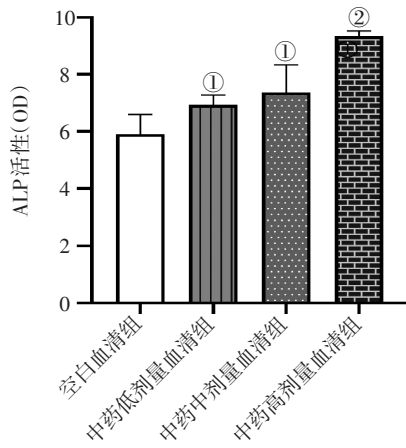
图2 BMSCs细胞表面抗原表达

Figure 2 Expression of surface antigens in BMSCs

2.2 各组BMSCs的ALP活性比较 补肾活血汤含药血清作用于BMSCs 7 d后, ALP活性检测结果显示, 各中药剂量血清组ALP活性较空白血清组明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。结果表明, 补肾活血汤能够提高BMSCs的ALP活性, 促进成骨分化。具体结果见图3。

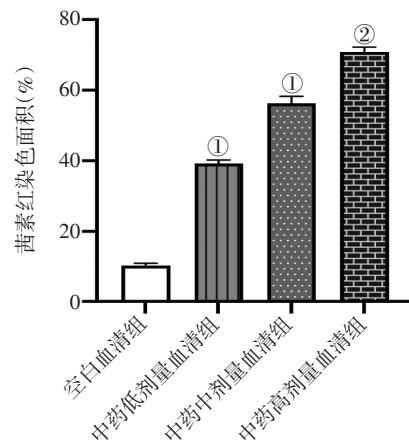
2.3 各组BMSCs钙结节情况比较 钙盐变化是骨

组织成骨潜能的标识之一。茜素红能与钙盐以螯和方式形成复合物, 故用以识别组织细胞的钙盐成分。通过茜素红染色生成的红色沉淀即为钙结节。诱导21 d后, 光镜下观察空白血清组散见红色沉淀物, 量少, 呈零星点状分布, 而中药低、中、高剂量血清组均可见明显的红色沉淀物, 较空白血清组明显增多, 尤其是中药中、高剂量血清组, 染色程度深, 且呈片状分布, 见图4。图5



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白血清组比较
图3 各组BMSCs的ALP活性比较

Figure 3 Comparison of ALP activity in BMSCs of various groups



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白血清组比较
图5 各组BMSCs的茜素红染色面积比较

Figure 5 Comparison of ARS area of BMSCs in various groups

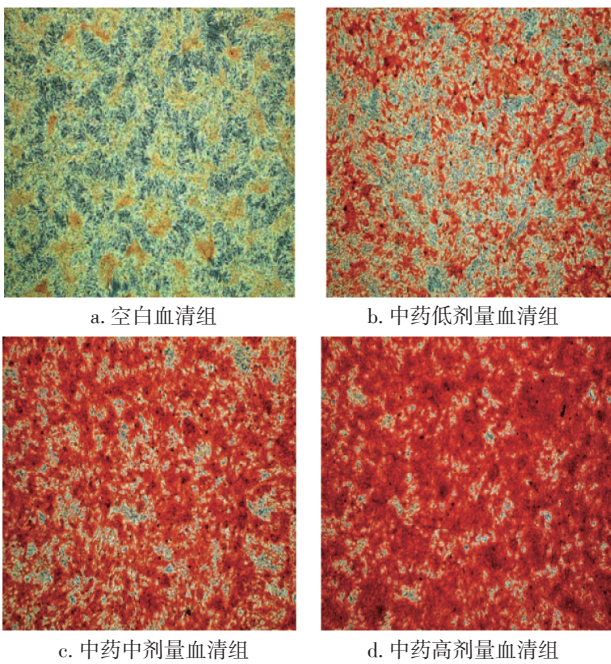


图4 各组BMSCs钙结节分布比较(茜素红染色, $\times 100$)
Figure 4 Comparison of distribution of calcium nodules in BMSCs of various groups (by ARS, $\times 100$)

结果显示, 各中药剂量血清组茜素红染色面积较空白血清组明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性, 结果表明, 补肾活血汤可有效促进BMSCs的骨向分化、矿化。

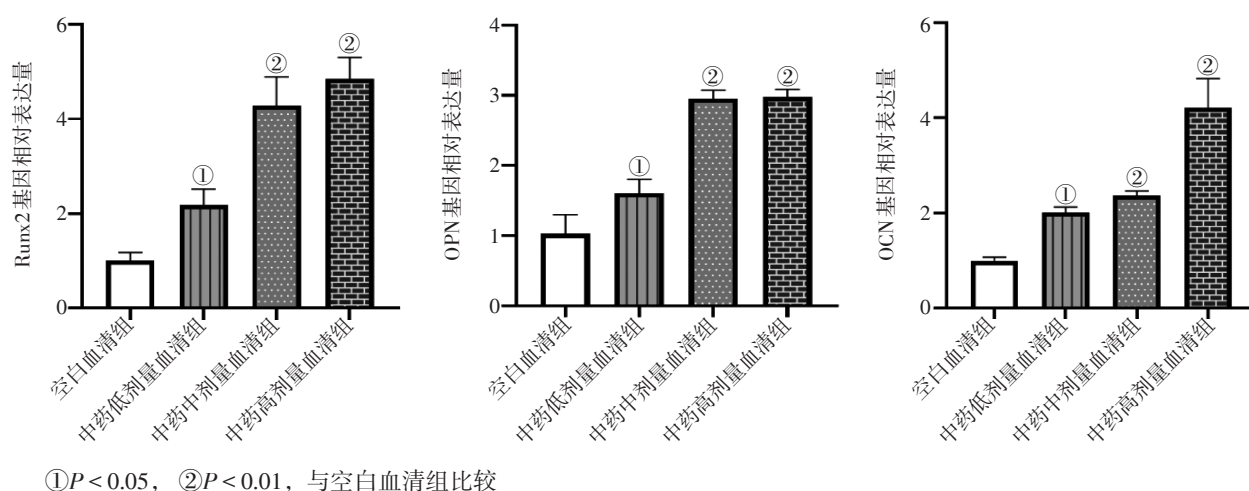
2.4 各组BMSCs中成骨分化相关基因Runx2、OCN、OPN表达比较 图6结果显示, 与空白血清组比较, 中药低、中、高剂量血清组BMSCs中Runx2、OCN、OPN基因表达水平升高, 差异均有统计学

意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。

3 讨论

骨质疏松症是与年龄直接相关的疾病。“肾藏精, 主骨, 生髓”, 骨的营养有赖于肾中精气的滋养, 而肾中精气的盛衰与年龄相关, 随着年龄的增长, 肾中精气由盛转衰, 天癸由充盛到衰竭, 肾精不足以养骨, 骨质退变疏松, 伴随腰痛, 行动、机体功能障碍, 腰膝酸软无力等症状, 中医学将这类证候归为“骨痿”。《内经》中提到“气血以流, 腠理以密, 如是则骨气以精”, 骨质疏松局部精气不足, 气血亏虚, 血运渐缓, 因此, 血瘀是骨质疏松症常见的病理改变。故骨质疏松症呈现典型的虚实夹杂、本虚标实的特点。循证医学及临床报道表明, 运用补肾活血法可以加速骨的修复, 促进成骨, 在防治骨质疏松症方面取得较好的疗效^[5]。本课题组临床治疗骨质疏松症、骨折取得满意疗效的补肾活血汤^[6-7], 是补肾活血法的代表方, 出自《伤科大成》, 方中: 熟地黄、补骨脂、菟丝子、杜仲、肉苁蓉、枸杞子、山萸肉、独活补肾强腰膝, 补益肾精以滋养骨髓, 发挥成骨功能; 当归、红花、没药活血以通络, 瘀血去, 新血得生, 可为肾气补益及促进骨骼的生长和修复营造良好的环境。

肾精源于先天, 肾“主骨”“生髓”功能与干细胞的成骨特性不谋而合, BMSCs在骨质疏松等相关骨病修复中起到的治疗作用已被证实^[8-9]。骨



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白血清组比较

图6 各组BMSCs中成骨分化相关基因Runx2、OCN、OPN表达比较

Figure 6 Comparison of the expression levels of osteogenesis-related gene Runx2, OCN and OPN in BMSCs

骨质疏松症患者骨结构的损伤,与BMSCs成骨分化作用减弱有关,植入的BMSCs能够在不同的局部环境下分化为成骨细胞,在骨修复、骨形成阶段合成新的骨基质,促进细胞外基质的矿化,发挥成骨作用,完成骨修复^[10]。对于骨质疏松和其他退行性骨病的问题,药物控制内源性间充质干细胞(MSCs)的数量和分化能力是一种潜在而有效的治疗方法^[11]。中药复方成分复杂,无论何种方式给药,入血的成分方能发挥药理作用,血清药理学更接近药物在体内生物转化的过程,增加实验结果的可信性,故本研究选择补肾活血汤含药血清直接干预BMSCs,探讨其对BMSCs在成骨分化过程中的作用。

ALP主要存在于骨组织中,是评价成骨能力的金指标之一。在成骨诱导7 d左右,ALP活性最高,21 d左右,MSCs基本分化完成,出现钙化结节。钙结节是细胞成骨分化的矿化指标,是分化成熟的最直观的标志物。本研究结果显示,补肾活血汤含药血清呈剂量依赖性地提高ALP活性,茜素红钙结节染色也验证了补肾活血汤的骨向分化作用,尤其是中药中、高剂量组呈现出较高的骨向分化程度。

Runx2、OCN、OPN是临床研究中评价成骨能力最常用的指标。Runx2是干细胞成骨分化的关键转录因子,在未分化的MSCs中表达较少,在成骨细胞中大量表达,Runx2基因突变小鼠表现为骨骼缺失^[12]。BMSCs可通过激活Runx2诱导不成熟骨细胞向成熟的成骨细胞分化,且抑制向脂肪细胞和软

骨细胞分化,亦可经由Hedgehog和Wnt信号转导将骨祖细胞直接分化为成骨细胞,涉及Runx2、OSX、OPN、Smads等转录因子。Runx2可介导Hedgehog通路上调OSX、OPN的表达,同时调节MSCs向前体成骨细胞分化过程中所必须的非胶原蛋白(如OCN)^[13-16]。OPN由成骨细胞所分泌,主要介导细胞与基质间的细胞粘附,可促进骨吸收,骨基质矿化,是骨细胞进入矿化成熟阶段的标志,OCN高表达标志着成骨细胞的分化成熟^[17-18]。本研究结果显示,中药低、中、高剂量血清组Runx2、OCN、OPN基因表达量显著高于空白血清组,且随剂量增加而增高,表明补肾活血汤可以增加BMSCs的矿化率,促进成骨。

综上所述,补肾活血汤可以发挥体外成骨作用,这可能是补肾活血汤临床抗骨质疏松症的机制之一。今后将进一步加强其机理研究,以期为临床应用补肾活血汤治疗骨质疏松症提供理论依据。

参考文献:

- [1] 罗令,孙晓峰,皮丕喆,等.近10年来我国中老年人骨质疏松症患病率的荟萃分析[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1415-1420.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2017,3(25):281-309.
- [3] KESHTKAR S, AZARPIRA N, GHAHREMANI M H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 63-73.
- [4] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理实验中动物间和动物与人

- 体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [5] 赵思怡, 黄帆, 冯子桐, 等. 补肾活血类中药复方制剂治疗绝经后骨质疏松症有效性和安全性的Meta分析[J].中国药房, 2019, 30(8): 1105-1111.
- [6] 程英雄, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤联合钙尔奇D治疗对绝经后骨质疏松症患者骨转化的影响[J].新中医, 2017, 49(10): 79-81.
- [7] 黄永铨, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤治疗老年桡骨远端骨折的临床疗效观察[J].中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(3): 5-7.
- [8] TANG K C, PAN W, DOSCHAK M R, et al. Increased FoxO3a expression prevents osteoblast differentiation and matrix calcification[J]. Bone Rep, 2019, 9(10): 1-12.
- [9] LI Q, XING W, GONG X, et al. Astragalus polysaccharide promotes proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by down-regulation of microRNA-152[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 1471-1481.
- [10] HOU Q K, HUANG Y Q, LUO Y W, et al. MiR-351 negatively regulates osteoblast differentiation of MSCs induced by (+)-cholesten-3-one through targeting VDR[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(11): 4963-4973.
- [11] KNIGHT M N, HANKENSON K D. Mesenchymal stem cells in bone regeneration[J]. Adv Wound Care(New Rochelle), 2013, 2(6): 306-316.
- [12] GAMBACURTA A, MERLINI G, RUGGIERO C, et al. Human osteogenic differentiation in Space: proteomic and epigenetic clues to better understand osteoporosis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8343.
- [13] YIN Q, WANG J, FU Q, et al. CircRUNX2 through has-miR-203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12): 6112-6121.
- [14] VIMALRAI S, ARUMUGAM B, MIRANDA P J, et al. Runx2: structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 78: 202-208.
- [15] MIRON R J. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards[J]. J Dent Res, 2012, 91(8): 736-744.
- [16] KOMORI T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1-11.
- [17] WEI-HSIEN L, YEN-WENN L, ZIH-FONG C, et al. Calophyllolide content in calophyllum inophyllum at different stages of maturity and its osteogenic activity[J]. Molecules, 2015, 20(7): 12314-12327.
- [18] LI J H, SU Z F, BAI X, et al. Effect of zoledronate on the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells CircRUNX2 through has-miR-203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis[J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2019, 37(3): 242-247.

【责任编辑：侯丽颖】