

中药调控骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展

李文雄¹, 张晶宇¹, 杨锋²

(1. 陕西中医药大学; 陕西 咸阳 712000;

2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712083)

摘要 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在一定的诱导条件下能够分化为成骨细胞、软骨细胞等成熟细胞。关于 BMSCs 定向分化的研究一直是干细胞研究领域的热点和难点。BMSCs 成骨分化与中医“肾藏精,主骨生髓”理论具有相通性,应用中药诱导干细胞分化具有良好的前景。本文从理论基础、具体的调控作用以及可能的作用机制 3 个方面,对近年来中药调控 BMSCs 成骨分化的研究进展进行了综述。

关键词 间质干细胞;干细胞研究;细胞分化;成骨细胞;软骨细胞;中草药;综述

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有自我复制和多向分化潜能,在一定的诱导条件下能够分化为成骨细胞、软骨细胞等成熟细胞^[1]。如何诱导 BMSCs 的分化,是目前干细胞研究领域的重点及热点。研究^[2-3]表明多种中药或其有效成分能调控 BMSCs 的成骨分化。这些研究为临床应用中药治疗各类骨退行性疾病提供了科学依据。本文从中药调控 BMSCs 成骨分化的理论基础、中药对 BMSCs 成骨分化的调控作用、中药调控 BMSCs 成骨分化的机制等方面,对近年来中药调控 BMSCs 成骨分化的研究进展作一综述。

1 中药调控 BMSCs 成骨分化的理论基础

中医理论认为人体之精,由禀受于父母的先天之精和后天吸收的水谷之精融合而成。父母生殖之精相互结合形成胚胎,转化为胚胎自身之精,构成脏腑组织原始生命物质即先天之精,在先天之精的基础上,不断吸取、生成后天之精,两精相合,化气、生血、生津,由婴儿发育成长为成熟的个体。从干细胞的角度来说,来自父母的精子与卵子结合形成受精卵,此即全能干细胞,它含有分化成新个体的全部遗传物质,全能干细胞进一步分化形成多能干细胞,如间充质干细胞等。这些干细胞按照一定的时间和空间顺序,在后天营养、环境等条件调控下分化成特定的终末细胞或是保持静息状态储存于人体各器官组织中,

促进人体的生长发育。因此,中医学的精气化生理论和干细胞的分化理论有着共通之处。

中医学认为肾藏人体之精,主人体生长、发育、生殖,肾藏精,精生髓,髓居于骨中,以滋养骨骼。肾精充足,骨髓充盈,骨骼得养,则骨骼刚健。《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。”明确指出机体的生、长、壮、老、已与肾中精气密切相关,并指出齿、骨、发的生长状况可作为判断肾中精气盛衰的标志。人体发育早期, BMSCs 在体内多种调控因素的作用下可分化形成成骨细胞、骨细胞,完成骨的构建过程。而随着年龄增加 BMSCs 的数量逐渐减少,骨质疏松、骨关节炎等疾病的发生增多^[4-5]。这与《素问·上古天真论篇》中肾精对骨骼状态影响的描述有相通之处。肾中精气与 BMSCs 在来源、功能上的相通性,说明 BMSCs 可能为肾精在细胞水平上的表现形式,故临床多通过补养肾精以促进 BMSCs 的成骨分化。

2 中药对 BMSCs 成骨分化的调控作用

2.1 单味中药及其提取物对 BMSCs 成骨分化的调控作用 具有“补肾”“益气”“活血”等作用的中药或中药提取物能够诱导 BMSCs 向成骨细胞定向分化。其中,具有“补肾”“壮阳”作用的中药或其提取物的正性调节作用更为显著。

巴戟天为我国“四大南药”之一,具有补肾助阳,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81102610,81473711);
陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF072);陕西省中医管理局中医药科研课题中标项目(13-JC014)

通讯作者:杨锋 E-mail: yangfengdudu@163.com

强筋壮骨等功效,对腰膝疼痛等疾病具有较好的疗效。《本经》曰其“主大风邪气,阴痿不起,强筋骨,安五脏,补中增志益气。”李丹青等^[6]的研究结果显示巴戟天多糖能提高细胞 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、氧代丙腈 (oxypropionitrile, OPN) 的蛋白表达和 p38 蛋白磷酸化表达,可在细胞分化的不同阶段促进 BMSCs 成骨分化。李楠等^[7]的研究亦发现巴戟天多糖可促进 BMSCs 成骨分化。陈林攀等^[8]对杜仲叶提取物槲皮素对 SD 大鼠 BMSCs 增殖的影响及其分子机制进行了研究,结果发现槲皮素能促进 BMSCs 增殖,认为槲皮素通过激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinas, ERK) 磷酸化促进 BMSCs 增殖。卞琴等^[3]分别采用补肾中药淫羊藿、补骨脂和女贞子的有效成分淫羊藿苷、补骨脂素和齐墩果酸培养 BMSCs,发现 3 组细胞均有较强的成骨分化潜能。张甲第等^[9]检测银杏叶提取物对细胞增殖活性变化的影响,结果显示银杏叶提取物对 BMSCs 的成骨分化具有积极意义。舒晓春等^[10]在不同糖浓度下体外诱导 BMSCs 的定向成骨分化,发现骨碎补总黄酮可促进 BMSCs 成骨分化并减轻高糖环境对成骨分化的抑制作用,说明骨碎补总黄酮对糖尿病性骨质疏松症具有一定的干预作用。

刘琳等^[11]观察黄芪多糖对多发性骨髓瘤患者 BMSCs 增殖与细胞因子表达的影响,发现黄芪多糖促 BMSCs 增殖的作用明显。大黄素可增加卵巢切除小鼠的成骨细胞数量、骨密度、骨小梁体积分数、骨小梁数量和骨连接密度,并减少骨髓脂肪组织和脂肪细胞的生成,且 Runx2、Osterix、I 型胶原、骨钙素和碱性磷酸酶 (alkaline phosphates, ALP) 等成骨标志物基因和蛋白的表达均显著上调,而与脂肪生成相关的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein alpha, CEBP α) 和脂肪酸结合蛋白 2 等标志物的基因和蛋白表达则显著下调^[12]。

2.2 中药复方对 BMSCs 成骨分化的调控作用 辨证论治是中医认识疾病和治疗疾病的基本原则,中药复方正是在辨证审因的基础上进行的药物有机配伍组合。对中药复方的实验研究目前主要采用中药复方含药血清进行体外细胞的诱导培养。杨锋等^[13]观

察右归丸含药血清对 BMSCs 成骨分化和成脂分化的影响,结果发现右归丸含药血清可显著增强成骨诱导剂诱导 BMSCs 向成骨细胞分化的作用,促进成骨细胞成熟,并抑制 BMSCs 成脂分化。左归丸含药血清则可通过去甲基化的表观遗传调控机制促进 BMSCs 向成骨细胞分化^[14]。郭杨等^[15]观察益肾通络方 (鹿角胶 20 g、骨碎补 20 g、三七粉 15 g、水蛭 15 g、土鳖虫 15 g、黄芪 15 g、当归 15 g、枸杞子 15 g、地龙 12 g、鸡血藤 12 g、杜仲 12 g、白术 10 g、白芍 10 g、桑寄生 10 g、淫羊藿 10 g、甘草 5 g 等) 对 BMSCs 增殖和成骨分化的影响,提出益肾通络复方可能是以 BMSCs 为作用靶点,通过促进其增殖和成骨分化,增加成骨细胞的数量和活性,促进骨形成。陈德强等^[16]的研究表明虎潜丸可能是通过促进 BMSCs 的成骨分化和增殖作用治疗骨质疏松症。梁祖建等^[17]观察补肾调肝方 (骨碎补 15 g、狗脊 15 g、白芍 30 g、柴胡 12 g、郁金 15 g、当归 15 g、玫瑰花 12 g、川楝子 12 g、川芎 10 g、白术 15 g、合欢皮 15 g、菊花 15 g、石菖蒲 15 g、甘草 10 g 等) 对衰老 BMSCs 成骨分化的诱导效应,以探究补肾调肝方抗骨质疏松的机制,结果发现补肾调肝方可促进衰老的 BMSCs 成骨分化。徐世红等^[18]的研究发现桃红四物汤含药血清具有促进 BMSCs 增殖、增加成骨分化活性的作用。

3 中药调控 BMSCs 成骨分化的可能机制

对中药调控 BMSCs 成骨分化的可能机制的研究已深入到细胞、分子水平,多种细胞因子和信号通路相互作用,共同调节 BMSCs 的成骨分化。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 能够诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,是发现最早和最有力的细胞因子。BMPs 主要通过经典的 Smad 信号通路传递信号,以调控 BMSCs 成骨分化^[19]。但 Katagiri 等^[20]的研究发现分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 通路也是 BMSCs 成骨分化的重要调控途径之一。MAPK 是动物细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能够被一系列的细胞外信号或刺激激活。该通路中 ERK、c - JunN 端激酶和 p38 均参与了 BMSCs 的成骨分化^[21]。MAPK 通路被激活后,一方面促进 Osterix 表达及 Runx2 磷酸化,另一方面调控 BMPs,促使 BMSCs 的成骨分化^[22]。p38MAPK 不仅在骨形成的早期至关重要,而且在维持骨代谢平衡方面发挥持续作用^[23]。研究发现一些

可以影响骨代谢的中药均可通过 p38MAPK 信号通路来影响成骨分化,如补骨脂、淫羊藿、菟丝子等^[24-26]。

Wnt 信号通路对 BMSCs 的自我更新和分化起关键性作用,在骨重建中扮演重要的角色, β -catenin 是 Wnt 信号通路中的中枢性因子,当 Wnt 蛋白与相应的受体结合后,Wnt/ β -catenin 信号通路激活, β -catenin 转移入细胞核,与核内因子相互作用,最终启动下游成骨相关基因的转录^[27]。Wnt 信号通路中的低密度脂蛋白受体相关蛋白(low-density lipoprotein related proteins 5, LRP5)能够通过上调 Runx-2 和 ALP 的表达进而促进骨形成,同时下调 CEBP α 、PPAR γ 的表达,抑制脂肪形成^[28]。许应星等^[29]发现补肾活血颗粒(熟地、山药、山茱萸、枸杞、制附子、肉桂、甘草、杜仲、桃仁、红花等)含药血清可显著上调 β -catenin、LRP5 和 T 细胞因子的蛋白表达,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路在补肾活血颗粒治疗骨质疏松症的过程中发挥着重要作用。此外,雌激素受体通路、Notch 通路等对 BMSCs 的成骨分化也存在促进作用。

4 小 结

积极探索中药对 BMSCs 成骨分化的调控作用,可为临床应用中药治疗各类骨退行性疾病提供依据。中药复方比单味中药更能体现中医辨证论治的特点,目前关于中药复方对 BMSCs 成骨分化的调控作用的研究,主要是具有补肾化痰、补肾通络、活血化瘀等功能的组方。中药调控 BMSCs 成骨分化的研究虽然取得了一些进展,但仍存在一些问题:①BMSCs 取材困难、分化不定向,随年龄增长 BMSCs 增殖分化能力下降,加之伦理限制,使如何在短时间内获取大量种子细胞成为 BMSCs 研究目前亟需解决的问题。②缺乏各类中药调控 BMSCs 成骨分化的横向对比研究。③中药成分复杂,为更好地研究调控机制,须进一步纯化中药有效成分。中药调控 BMSCs 成骨分化的作用机制尚不明确,进一步研究不同细胞因子和信号通路在中药调控 BMSCs 成骨分化中的作用,将是未来研究的重点。

5 参考文献

- [1] Arpornmaeklong P, Brown SE, Wang Z, et al. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(7):955-968.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics - recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies[J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82(3):252-264.
- [6] 李丹青,肖强兵. 巴戟天多糖通过 p38 MAPK 信号通路促进间充质干细胞成骨分化的体外研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2015,23(5):1-4.
- [7] 李楠,王和鸣,郭素华,等. 巴戟天多糖对体外培养成骨细胞核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(8):517-519.
- [8] 陈林攀,邓鸣涛,杜川,等. 杜仲叶提取物槲皮素通过激活 ERK 磷酸化促进 BMSCs 增殖的研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(12):2845-2847.
- [9] 张甲第,时舒曼,张海洋,等. 银杏叶提取物对骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 口腔医学研究,2015,31(6):575-579.
- [10] 舒晓春,朱丹华,庞天娇,等. 骨碎补总黄酮在不同糖浓度下对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中华医学杂志,2010,90(38):2708-2712.
- [11] 刘琳,白海,王存邦,等. 黄芪多糖对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖与细胞因子表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2013,13(10):1873-1877.
- [12] Yang F, Yuan PW, Hao YQ, et al. Emodin enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis[J]. BMC Complementary & Alternative Medicine, 2014, 14(1):1-9.
- [13] 杨锋,李小群,杨利学,等. 右归丸含药血清对骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(1):263-266.
- [14] 杨锋,潘乐,马秋涛,等. 左归丸对骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因甲基化的影响[J]. 中医杂志,2015,56(15):1326-1329.
- [15] 郭杨,马勇,成吉华,等. 益肾通络复方含药血清对兔骨髓间充质干细胞体外增殖和成骨分化的影响[J]. 中国

- 中医基础医学杂志, 2015, 21(5): 508 - 510.
- [16] 陈德强, 刘鹏飞, 王鑫. 虎潜丸对骨髓基质干细胞增殖及分化的影响[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(1): 50 - 54.
- [17] 梁祖建, 吴春飞, 张百挡. 补肾调肝方诱导衰老 BMSCs 成骨分化的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(3): 212 - 216.
- [18] 徐世红, 谢兴文, 李宁, 等. 桃红四物汤含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2713 - 2716.
- [19] Islam SS, Mokhtari RB, Kumar S, et al. Spatio - Temporal Distribution of Smads and Role of Smads/TGF - β /BMP - 4 in the Regulation of Mouse Bladder Organogenesis [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61340.
- [20] Katagiri T, Tsukamoto S. The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway[J]. Biol Chem, 2013, 394(6): 703 - 714.
- [21] Aenlle KK, Curtis KM, Roos BA, et al. Hepatocyte growth factor and p38 promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(5): 722 - 730.
- [22] Hoffmann A, Preobrazhenska O, Wodarczyk C, et al. Transforming growth factor - β - activated kinase - 1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors[J]. J Biol Chem, 2005, 280(29): 27271 - 27283.
- [23] Edgardo Rodríguez - Carballo, Beatriz Gámez, Lara Sedó - Cabezón, et al. The p38 α MAPK Function in Osteoprecursors Is Required for Bone Formation and Bone Homeostasis in Adult Mice[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102032.
- [24] Yang Z, Huang JH, Liu SF, et al. The osteoprotective effect of psoralen in ovariectomy - induced osteoporotic rats via stimulating the osteoblastic differentiation from bone mesenchymal stem cells[J]. Menopause, 2012, 19(10): 1156 - 1164.
- [25] 毛项颖, 卞琴, 沈自尹. 淫羊藿苷介导 MAPK 信号通路促进间充质干细胞株 C3H10T1/2 成骨分化的体外研究[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(11): 1272 - 1278.
- [26] 黄进, 张进, 徐志伟. 菟丝子含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的效应及机制[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 818 - 821.
- [27] 刘光旺, 高娟, 郭含军, 等. 补肾填精中药血清对去势小鼠骨髓干细胞 Wnt/ β - catenin 成骨分化信号通路的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(4): 324 - 329.
- [28] Fukuda T, Takeda S. Regulation of osteoblastic differentiation by Wnt signals[J]. Clin Calcium, 2013, 23(6): 825 - 830.
- [29] 许应星, 吴承亮, 吴岩, 等. Wnt/ β - catenin 信号通路相关蛋白在补肾活血颗粒含药血清影响成骨细胞过程中的表达及意义[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 537 - 541.

(2016-04-05 收稿 2016-05-04 修回)

· 通 知 ·

关于启用《科技期刊学术不端文献检测系统 (AMLC)》的通知

为了保证学术论文的真实性和原创性, 杜绝学术论文抄袭、剽窃、伪造、篡改、不当署名、一稿多投等现象的发生, 本着对本刊论文作者和读者负责的态度, 《中医正骨》编辑部于 2010 年 4 月开始启用《科技期刊学术不端文献检测系统 (AMLC)》。该系统以《中国学术文献网络出版总库》为全文比对数据库, 本刊编辑使用该系统对所有来稿的文字复制情况进行检测, 检测结果包括与已发表论文比对后的文字复制比率, 所涉及论文的题目、作者、发表期刊和发表时间。按规定文字复制比超过 20% 的来稿即视为存在学术不端行为的可能, 经人工比对后才能进入下一个审稿程序, 特此提醒广大作者, 注意所投稿件的原创性与真实性。特此通知。

关于《中医正骨》同时启用新旧版采编系统的通知

《中医正骨》的各位作者、审稿专家:

由于《中医正骨》的采编系统开发较早, 仅支持 IE 浏览器登录, 且服务器老化、运行速度不稳定, 造成部分作者和审稿专家在一些时间段无法正常上传稿件甚至无法正常打开《中医正骨》网站主页。为此, 编辑部新近购买了新的采编系统, 建立了新的投稿网站, 并于日前通过了国家工信部 ICP 审核备案, 将于 2016 年 1 月 1 日起正式上线运行。

自 2016 年 1 月 1 日起, 作者新投稿件 (或审稿专家审核 2016 年 1 月 1 日后的新稿件), 请登录 www.zyzgzz.com, 点击进入新版采编系统, 注册后进行投稿 (或审稿)。2016 年 1 月 1 日之前的作者投稿, 将继续在旧版采编系统 www.zyzgzz.cn 中运行, 进行审稿、退修、上传等操作。

感谢大家对《中医正骨》的信任、支持和厚爱!

《中医正骨》编辑部