

补肾、活血中药及补肾活血复方 对骨髓间充质干细胞增殖、定向迁移 及成骨分化的影响及作用机制的研究进展

陆吴超¹, 钱伟宏¹, 姚志宏¹, 沈玮²

(1. 浙江省桐乡市中医医院, 浙江 桐乡 314500;

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要 骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMSC)在一定条件下具有向成骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、软骨细胞、神经细胞等多种体细胞分化的潜能,因而被广泛应用于各种组织细胞修复。骨折发生后,机体成骨修复机制随即启动, BMSC 增殖、迁移及成骨分化行为序贯发生。多种补肾、活血中药及补肾活血复方均可促进 BMSC 增殖、定向迁移及成骨分化。补肾活血复方及单纯补肾或活血中药均可促进 BMSC 增殖,而且补肾活血复方促进 BMSC 增殖的作用比单纯补肾或活血中药更强。这可能是由于补肾活血复方中包含更多活性成分,可以通过多种细胞信号传导通路,促进 G0/G1 期 BMSC 向 S 期转变。补肾活血复方促进 BMSC 迁移的作用,可能与间质衍生因子 1/CXCR4 信号轴及 MCP1/CCR2 信号轴有关,且与 Wnt5a 蛋白信号传导通路密切相关。补肾中药及补肾活血复方可通过转化生长因子- β /Smad、Wnt/ β -catenin、丝裂原活化蛋白激酶及 Notch 等信号传导通路实现成骨信号转导,上调 RUNX2、Osterix 基因的表达,使 BMSC 向成骨细胞分化,完成成骨作用,呈现出多途径、多靶点的特征。与单纯补肾或活血中药相比,补肾活血复方在临床应用更广泛,其作用机制也更为复杂,还需要进一步探索。本文就补肾、活血中药及补肾活血复方对 BMSC 增殖、定向迁移及成骨分化的影响及作用机制的研究进展进行了综述。

关键词 补肾药;活血;骨折愈合;骨髓;间质干细胞;细胞增殖;细胞运动;细胞分化;综述

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMSC)在一定条件下具有向成骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、软骨细胞、神经细胞等多种体细胞分化的潜能,因而被广泛应用于各种组织细胞修复。骨损伤时, BMSC 可诱导其周围骨膜、骨髓、软组织间充质前体细胞增生,分化为成骨细胞、成软骨细胞,从而促进骨折愈合^[1]。近年来,科研人员针对中医药对 BMSC 生物学行为的影响进行了很多研究。本文就补肾、活血中药及补肾活血复方对 BMSC 增殖、定向迁移及成骨分化的影响及作用机制的研究进展进行了综述,现总结报告如下。

1 补肾、活血中药及补肾活血复方对 BMSC 增殖的影响及作用机制

细胞增殖是生物体最重要的生命活动之一,是生物生长、发育、繁殖、遗传的基础,是创伤修复的基础生命活动^[2]。曾意荣等^[3]的实验表明,由熟地黄、杜仲、补骨脂、川牛膝、木瓜、枸杞子、丹参、广木香等组

成的补肾活血复方的含药血清能促进大鼠 BMSC 体外增殖,且效果与剂量成正比,其机制可能与细胞因子样作用有关。刘亚梅等^[4]运用补肾活血汤(熟地黄 18 g、补骨脂 18 g、菟丝子 18 g、杜仲 6 g、枸杞 6 g、当归尾 6 g、山萸肉 6 g、肉苁蓉 6 g、没药 6 g、独活 6 g、红花 3 g)含药血清干预大鼠第 3 代 BMSC,体外培养 48 h 后测得处于增殖分裂期的 BMSC 百分比高于以补肾药(熟地黄 18 g、补骨脂 18 g、菟丝子 18 g、杜仲 6 g、山萸肉 6 g、枸杞 6 g、肉苁蓉 6 g)和活血药(没药 6 g、当归尾 6 g、红花 3 g)干预的细胞,表明补肾活血汤含药血清可以促进大鼠 BMSC 增殖,且较单纯补肾及活血中药含药血清效果更明显。黄永铨等^[5]的实验发现,补肾活血汤及其拆方(方药组成与文献[4]一致)含药血清体外促 BMSC 增殖的有效部位为补肾组的乙酸乙酯提取部位,且具有一定的药物浓度依赖性,以 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为最佳药物浓度。杨丽等^[6]的实验表明,补肾活血复方含药血清中可能含有促细胞增殖分化的细胞因子,浓度过高会使 BMSC 过早分化衰老,不利于其增殖。以上研究表明,补肾、活血中药在促进 BMSC 增殖方面作用明显,且与剂量存在一定

联系。

2 补肾、活血中药及补肾活血复方对 BMSC 定向迁移的影响及作用机制

组织器官损伤后,机体能动员全身各处干细胞迁移归巢至病变处,开启自然修复模式。来源于骨膜、骨髓、周围血液、软组织中的间充质干细胞通过特定的机制迁移,对骨形成和骨折愈合至关重要^[7]。王斌等^[8]的研究表明,补肾活血汤(方药组成与文献[4]一致)可以提高大鼠骨折愈合过程中骨折端间充质干细胞的体外迁移能力,其机制可能与上调 CC 类趋化因子受体 2(C - C motif chemokine receptor 2, CCR2)的表达、激活单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP1)/CCR2 信号轴有关。罗毅文等^[9]发现,补肾活血汤(方药组成与文献[4]一致)石油醚提取部位可以促进 BMSC 的体外迁移,且呈一定的药物浓度依赖性,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为最佳药物浓度,其机制可能与上调大鼠 BMSC 的 CXCR4 蛋白表达,激活间质衍生因子 1/CXCR4 信号轴有关。吴志方等^[10]的研究表明,补肾活血汤(方药组成与文献[4]一致)石油醚提取物亦能刺激 MCP1/CCR2 信号轴,上调 Wnt5a 蛋白表达。罗辉等^[11]的研究表明,补肾活血汤(方药组成与文献[4]一致)石油醚提取物可以促进 BMSC 体外迁移,其作用机制可能与 Wnt5a/蛋白激酶 C 信号通路有关。以上的这些研究结果均表明,补肾活血汤具有促进 BMSC 体外迁移的能力,其作用与药物浓度存在一定联系;补肾活血汤促进 BMSC 体外迁移能力与上调 CCR2 及 CXCR4 的表达呈正相关,且与 Wnt5a 蛋白信号通路有关。

3 补肾、活血中药及补肾活血复方对 BMSC 成骨分化的影响及作用机制

帅波等^[12]的研究表明,补肾活血方(青娥丸加味)含药血清可通过增加重组骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)2 活性,促进大鼠 BMSC 的转化生长因子 - β (transforming growth factor - β , TGF - β) mRNA 的表达,在骨坏死的修复中起关键作用。张贤等^[13]的研究表明,杜仲有效成分可通过 BMP/Smad 信号传导通路参与 BMSC 的成骨分化过程。骨碎补提取液在诱导 BMSC 成骨分化过程中,可显著上调 TGF - β 1 和 BMP2 的表达量^[14]。淫羊藿、补骨脂、女贞子、何首乌 4 种补肾中药有效成分配伍能上调 BMP2、Smad1、Smad4 表达^[15]。这些研究说

明,多种补肾中药均通过 BMP/Smad 信号传导通路参与 BMSC 的成骨分化过程。

地黄、龟板、鹿角胶、制首乌、枸杞子、淫羊藿、蛇床子、川牛膝等补肾中药可通过上调 β - catenin、低密度脂蛋白相关蛋白 5、T 细胞因子表达促小鼠 BMSC 成骨分化^[16]。杜仲提取物诱导大鼠 BMSC 成骨分化过程中,卷曲受体 Fzd2、Fzd3 表达上升^[17]。骨碎补总黄酮可以上调 β - catenin mRNA 的表达,激活 Wnt 信号通路,使 BMSC 向成骨细胞分化^[18]。说明多种补肾中药可以通过 Wnt/ β - catenin 信号转导通路促进 BMSC 成骨分化。除此之外,丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路、Notch 信号传导通路也被证实参与了 BMSC 成骨分化^[19-20]。

细胞分子信号转导后需要目标基因的表达与转录,完成蛋白质的合成才能最终履行生物功能。核心结合蛋白因子 2(runt - related transcription factor 2, RUNX2)、成骨细胞特异性转录因子 Osterix 是已知的成骨转录因子,同处于一个转录途径,Osterix 位于下游,需要 RUNX2 的存在才能发挥作用^[21]。补肾中药有效成分(淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷不同配伍)能上调 RUNX2、Osterix 基因的表达,使 BMSC 向成骨细胞分化^[22]。程英雄等^[23]的研究表明,补肾活血汤(方药组成与文献[4]一致)水提取物干预 Cbfa1/RUNX2 基因沉默的 BMSC 后,其 RUNX2、Osterix 的表达和碱性磷酸酶活性明显增加,提示其成骨活性增加。

4 小 结

骨折发生后,机体成骨修复机制随即启动,BMSC 增殖、迁移及成骨分化行为序贯发生。在较早的 BMSC 完成成骨分化的同时,新一批 BMSC 以同样方式增生、迁移及成骨分化。多种补肾、活血中药及补肾活血复方均可促进 BMSC 增殖、定向迁移及成骨分化。补肾活血复方及单纯补肾或活血中药均可促进 BMSC 增殖,而且补肾活血复方促进 BMSC 增殖的作用比单纯补肾或活血中药更强。这可能是由于补肾活血复方中包含更多活性成分,可以通过多种细胞信号传导通路,促进 G0/G1 期 BMSC 向 S 期转变。补肾活血复方促进 BMSC 迁移的作用,可能与间质衍生因子 1/CXCR4 信号轴及 MCP1/CCR2 信号轴有关,且与 Wnt5a 蛋白信号传导通路密切相关。补肾中药及补肾活血复方可通过 TGF - β /Smad、Wnt/ β -

catenin、丝裂原活化蛋白激酶及 Notch 等信号传导通路实现成骨信号转导,上调 RUNX2、Osterix 基因的表达,使 BMSC 向成骨细胞分化,完成成骨作用,呈现出多途径、多靶点的特征。与单纯补肾或活血中药相比,补肾活血复方在临床应用更广泛,其作用机制也更为复杂,还需要进一步探索。

5 参考文献

- [1] SPAGNOLI A. Mesenchymal stem cells and fracture healing[J]. Orthopedics, 2008, 31(9): 855.
- [2] 方健康,周铁平,李玛琳. 中药对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及分化的影响研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2834-2837.
- [3] 曾意荣,樊粤光,刘红,等. 补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 93-96.
- [4] 刘亚梅,王斌,罗毅文,等. 补肾活血法调控大鼠骨髓间充质干细胞增殖活性的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(3): 1-4.
- [5] 黄永铨,罗毅文,王斌,等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1): 86-91.
- [6] 杨丽,朱晓峰,张荣华. 补肾活血复方含药血清 MSCs 增殖和骨向分化影响的时效及量效研究[J]. 中药材, 2012, 35(2): 259-263.
- [7] GOODMAN SB. Cell-based therapies for regenerating bone[J]. Minerva ortop traumatol, 2013, 64(2): 107-113.
- [8] 王斌,罗毅文,黄永铨,等. 补肾活血汤促骨折端间充质干细胞体外迁移及 CCR2 表达的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(8): 1-5.
- [9] 罗毅文,王斌,吴志方,等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 356-361.
- [10] 吴志方,罗毅文,王斌,等. 补肾活血汤石油醚提取物对骨髓间充质干细胞表达 Wnt5a/CCR2 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(7): 6-10.
- [11] 罗辉,吴志方,沈玮,等. 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 迁移过程中 Wnt5a/PKC 通路的影响[J]. 中成药, 2017, 39(12): 2462-2468.
- [12] 帅波,沈霖,杨艳萍,等. 补肾活血方对激素性股骨头坏死大鼠 BMSCs 分化影响的研究[J]. 中西医结合研究, 2012, 4(6): 297-301.
- [13] 张贤,朱丽华,程盛,等. BMP/Smad 信号途径相关基因在 5-HMF 诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的表达[J]. 江苏医药, 2016, 42(1): 1-3.
- [14] 杨丽,朱晓峰,王攀攀,等. 骨碎补水提液对大鼠 MSCs 骨向分化的影响及机制研究[J]. 中药材, 2013, 36(8): 1287-1292.
- [15] 高璐,郑洪新,陈谊敬,等. 淫羊藿苷,补骨脂素,齐墩果酸,二苯乙炔苷正交配伍调控 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.
- [16] 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.
- [17] 汤军,蔡建平,张贤. 杜仲提取物诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Fzd 受体系列相关基因表达的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(1): 37-39.
- [18] 郭英,李佩芳,舒晓春,等. 骨碎补总黄酮对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(32): 2288-2291.
- [19] 宋囡,何文智,王智民,等. 骨髓间充质干细胞在骨向分化的作用及中医药研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(1): 95-99.
- [20] 毛颖颖,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.
- [21] VIERECK V, SIGGELKOW H, TAUBER S, et al. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts[J]. J Cell Biochem, 2002, 86(2): 348-356.
- [22] 高璐,郑洪新,陈谊敬,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.
- [23] 程英雄,罗毅文,王斌,等. 补肾活血汤水提物调控 Cbfa1/RUNX2 基因沉默骨髓间充质干细胞 SP7/Osterix 及碱性磷酸酶的表达[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(13): 1987-1992.

(收稿日期:2018-04-17 本文编辑:李晓乐)