

牛膝含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响及其作用机制

吴秀丽¹, 阎晓霞², 任之强², 孙楠², 李金菊², 谢亚威¹, 李龙飞¹

(1. 河南中医药大学骨伤学院, 河南 郑州 450046;

2. 河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院, 河南 郑州 450016)

摘要 目的:探讨牛膝含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖、成骨分化的影响及其作用机制。**方法:**取 4 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 20 只,随机分为空白组和牛膝低、中、高剂量组,每组 5 只。牛膝低、中、高剂量组大鼠分别以相应浓度的牛膝药液灌胃,空白组大鼠以同等剂量生理盐水灌胃,每日 1 次,共灌胃 14 d。最后一次灌胃干预 2 h 后,取大鼠腹主动脉血,制备空白血清和相应浓度的牛膝含药血清。另取大鼠 4 只,处死后取出大鼠股骨和胫骨骨髓,进行 BMSCs 培养。细胞传到第 3 代时,用流式细胞仪进行细胞表型鉴定。将大鼠 BMSCs 分为胎牛血清组、空白血清组和牛膝含药血清低、中、高剂量组,分别加入胎牛血清、空白血清和牛膝低、中、高剂量含药血清进行干预,检测各组大鼠 BMSCs 的增殖活性;分别加入含相应血清的成骨诱导液进行成骨诱导,采用茜素红染色观察大鼠 BMSCs 成骨分化情况,采用荧光定量 PCR 检测大鼠 BMSCs 中成骨相关因子碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)和 Osterix 的 mRNA 相对表达量,采用蛋白质印迹法检测 BMSCs 中 Hedgehog 信号通路相关蛋白蛋白胍因子(sonic hedgehog, SHH)、Gli2 的蛋白相对表达量。**结果:**①细胞鉴定结果。细胞表型鉴定结果显示,培养的细胞为 BMSCs。②大鼠 BMSCs 增殖活性检测结果。干预 24 h、48 h、72 h、96 h 后,5 组大鼠 BMSCs 增殖活性组间总体比较,差异均有统计学意义;干预 24 h 后,牛膝含药血清高剂量组 BMSCs 的增殖活性高于胎牛血清组、空白血清组($P=0.006, P=0.008$);干预 48 h、72 h、96 h 后,牛膝含药血清高剂量组 BMSCs 的增殖活性均高于胎牛血清组、空白血清组和牛膝含药血清低、中剂量组($P=0.000, P=0.000, P=0.010, P=0.021; P=0.003, P=0.000, P=0.007, P=0.016; P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.047$)。③大鼠 BMSCs 成骨分化检测结果。茜素红染色显示,各组大鼠 BMSCs 均出现细胞外矿化结节形成与沉积,其中牛膝含药血清高剂量组阳性染色面积较大,矿化结节明显。牛膝含药血清高剂量组矿化结节面积大于胎牛血清组和空白血清组($P=0.039, P=0.015$)。④大鼠 BMSCs 中成骨相关因子的 mRNA 相对表达量检测结果。牛膝含药血清低、中、高剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量均高于胎牛血清组($P=0.003, P=0.000, P=0.000; P=0.011, P=0.001, P=0.000; P=0.009, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.005, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)和空白血清组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.005, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。牛膝含药血清中剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP 的 mRNA 相对表达量高于牛膝含药血清低剂量组($P=0.044$)。牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量均高于牛膝含药血清低剂量组($P=0.002, P=0.006, P=0.002, P=0.008$)。牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 Runx2 的 mRNA 相对表达量高于牛膝含药血清中剂量组($P=0.047$)。⑤大鼠 BMSCs 中 Hedgehog 信号通路相关蛋白的蛋白相对表达量检测结果。牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH、Gli2 高表达。牛膝含药血清低、中、高剂量组 SHH、Gli2 的蛋白相对表达量均高于胎牛血清组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.026, P=0.016, P=0.000$)和空白血清组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.018, P=0.000$)。牛膝含药血清中、高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH 的蛋白相对表达量均高于牛膝含药血清低剂量组($P=0.000, P=0.000$),牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH 的蛋白相对表达量高于牛膝含药血清中剂量组($P=0.000$)。牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 Gli2 的蛋白相对表达量高于牛膝含药血清低剂量组($P=0.001$)。**结论:**牛膝含药血清可能通过激活 Hedgehog 信号通路和上调成骨相关因子 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的表达,促进大鼠 BMSCs 的增殖和成骨分化。

关键词 牛膝(中药);间质干细胞;大鼠, Sprague-Dawley;细胞增殖;骨生成

基金项目:国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目(国中医药人教函[2022]256号);河南省中医药科学研究专项课题(2022ZYZD14, 2024ZY2115, 2024ZY2108);河南省科技发展计划项目(232102310423)

通讯作者:阎晓霞 E-mail:641594851@qq.com

Effects of *achyranthes bidentatae radix* (TCD) medicated serum on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats and its mechanism of action: an experimental study

WU Xiuli¹, YAN Xiaoxia², REN Zhiqiang², SUN Nan², LI Jinju², XIE Yawei¹, LI Longfei¹

1. College of Orthopaedics and Traumatology of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China

2. Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital, Zhengzhou 450016, Henan, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of *achyranthes bidentatae radix* (ABR) (TCD) medicated serum on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rats, and to explore its mechanism of action. **Methods:** Twenty 4-week-old specific pathogen-free (SPF)-grade female Sprague-Dawley (SD) rats were selected and randomized into blank group, low-dose ABR (L-ABR) group, medium-dose ABR (M-ABR) group, and high-dose ABR (H-ABR) group, 5 cases in each group. The rats in L-, M-, and H-ABR group were intervened by intragastric administration with ABR solution in their corresponding concentration, respectively, whereas, the ones in blank group with the same dosage of normal saline, once a day for consecutive 14 days. Two hours after the end of the last intervention, the blood was drawn from the abdominal aorta of rats in each group for making blank serum and ABR medicated serum with the corresponding concentrations. Additionally, another 4 rats were selected and executed, and the bone marrow was harvested from their femurs and tibias for BMSCs culture. The third-generation BMSCs were collected to identify the phenotypes by using flow cytometry. Furthermore, the BMSCs were divided into fetal bovine serum group, blank serum group, L-, M-, and H-ABR medicated serum groups, and were intervened by fetal bovine serum, blank serum, L-, M-, and H-ABR medicated serum, respectively. The proliferation activity of BMSCs in rats was detected, and the osteogenic induction was conducted by adding osteogenic induction medium containing the corresponding serum into the BMSCs. After 21-day induction, the osteogenic differentiation of BMSCs was observed via alizarin red staining (ARS). Besides, the relative mRNA expression levels of osteogenesis-related markers, including alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), runt-related transcription factor 2 (Runx2) and Osterix, in rat BMSCs were detected by fluorescence quantitative PCR, and the relative protein expression levels of Hedgehog signaling pathway-related proteins, including sonic hedgehog (SHH) and Gli2, in rat BMSCs were detected by Western blotting. **Results:** ①The results of BMSCs identification. The results of cell phenotype identification indicated that the cultured cells were identified as BMSCs. ②The results of detection on the proliferation activity of BMSCs in rats. After 24-, 48-, 72-, and 96-hour intervention, the difference was statistically significant in proliferation activity of rat BMSCs among the 5 groups in general. The proliferation activity of BMSCs was higher in H-ABR medicated serum group compared to fetal bovine serum group and blank serum group after 24-hour intervention ($P=0.006, P=0.008$), and was higher in H-ABR medicated serum group compared to fetal bovine serum group, blank serum group, L-, and M-ABR medicated serum groups after 48-, 72-, and 96-hour intervention ($P=0.000, P=0.000, P=0.010, P=0.021; P=0.003, P=0.000, P=0.007, P=0.016; P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.047$). ③The results of detection on osteogenic differentiation of BMSCs in rats. The ARS result showed that the extracellular mineralized nodules formed and deposited in BMSCs of rats in each group, with H-ABR medicated serum group displaying a larger positive staining area and more prominent mineralized nodules, and the area of mineralized nodules was larger in H-ABR medicated serum group compared to fetal bovine serum group and blank serum group ($P=0.039, P=0.015$). ④The results of detection on the relative mRNA expression levels of osteogenesis-related markers in rat BMSCs. The relative mRNA expression levels of ALP, OCN, Runx2 and Osterix in rat BMSCs were higher in L-, M-, and H-ABR medicated serum groups compared to fetal bovine serum group and blank serum group ($P=0.003, P=0.000, P=0.000; P=0.011, P=0.001, P=0.000; P=0.009, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.005, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), and were higher in H-ABR medicated serum group compared to L-ABR medicated serum group ($P=0.002, P=0.006, P=0.002, P=0.008$). The relative mRNA expression level of ALP in rat BMSCs was higher in M-ABR medicated serum group compared to L-ABR medicated serum group ($P=0.044$); while, the relative mRNA expression level of Runx2 was higher in H-ABR medicated serum group compared to M-ABR medicated serum group ($P=0.047$). ⑤The results of detection on the relative protein expression levels of Hedgehog signaling pathway-related proteins in rat BMSCs. The SHH and Gli2 were highly expressed in rat BMSCs in H-ABR medicated serum group. The relative protein expression levels of SHH and Gli2 in rat BMSCs were higher in L-, M-, and H-ABR medicated serum groups compared to fetal bovine serum group and blank serum group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.026, P=0.016, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.018, P=0.000$). The relative protein expression level of SHH in rat BMSCs was higher in M-, and H-ABR medicated serum groups compared to L-ABR medicated serum group ($P=0.000, P=0.000$), and was highest in H-ABR medicated serum group ($P=0.000$). The relative protein expression level of Gli2 in

rat BMSCs was higher in H-ABR medicated serum group compared to L-ABR medicated serum group ($P = 0.001$). **Conclusion:** ABR (TCD) medicated serum may promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs by activating Hedgehog signaling pathway and up-regulating the expression of ALP, OCN, Runx2 and Osterix in rats.

Keywords achyranthes bidentatae radix (TCD); mesenchymal stem cells; rats, Sprague-Dawley; cell proliferation; osteogenesis

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 骨质脆性增加、易于骨折的全身性骨代谢疾病^[1-2]。各种原因引起的成骨能力下降或骨吸收活跃都会导致 OP 的发生^[3]。OP 可归属于中医学“骨痿”的范畴, 主要病因病机为肝肾亏虚、气滞血瘀, 肝肾亏虚为本、气滞血瘀为标。因此, 中医治疗 OP 注重应用具有补益肝肾、活血化瘀作用的药物。牛膝归肝、肾经, 性平, 味苦、甘、酸, 具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行的功效^[4], 被广泛应用于 OP 的治疗。现代药理研究^[5-6]表明, 牛膝有效成分及其提取物具有调节骨代谢、改善糖代谢、改善血流变、抗炎等作用, 但牛膝抗骨质疏松作用在细胞和分子层面的具体机制尚不明确。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是成骨细胞的主要来源, 与 OP 的发生关系密切^[7-9]。相关研究^[10-12]表明, Hedgehog 信号通路可以促进体外 BMSCs 成骨分化, 并抑制其向脂肪细胞分化, 对骨修复有积极的影响, 且 Hedgehog 信号通路各种调节因子广泛存在于骨组织中, 在调节骨发育及维持骨组织稳态方面起重要作用。为进一步探讨牛膝防治 OP 的作用机制, 我们对牛膝含药血清对大鼠 BMSCs 增殖、成骨分化的影响及其作用机制进行了实验研究。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

4 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 24 只, 体质量 (100 ± 20) g, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于郑州中医骨伤病医院实验动物中心, 环境温度 $21 \sim 22$ °C, 相对湿度 50% ~ 60%, 自由饮水和摄食。本研究动物实验方案经郑州中医骨伤病医院伦理委员会审查通过, 伦理批件号: 2023020101。

1.2 试剂与仪器

牛膝颗粒剂 (河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院药剂中心), 胎牛血清 (上海双沭生物科技有限公司)、大鼠 BMSCs 成骨诱导分化培养基 (武汉普诺赛

生命科技有限公司)、四唑硝基蓝/氯化硝基四氮唑蓝碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 显色液试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司)、细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8 (上海花相生物科技有限公司)、RNA 快速提取试剂盒 (北京聚合美生物科技有限公司)、RT mix with DNase (All-in-one)、Universal SYBR Green qPCR SuPermix (苏州优逸兰迪生物科技有限公司)、CD34 抗体、CD45 抗体、CD73 抗体、CD105 抗体、CD90 抗体 (美国 Biolegend 公司)、音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 抗体、Gli2 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)、371 二氧化碳培养箱、低速离心机、PCR 热循环仪 (美国 Thermo Fisher 公司)、MI52-N 倒置显微镜 (广州市明美光电科技有限公司)、YT-110 酶标分析仪 (上海叶拓科技有限公司)、流式细胞仪 (美国 Luminex 公司)、高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 牛膝药液制备

根据 2015 年版《中国药典》中成人牛膝饮片的常规用量, 按照大鼠与成人的等效剂量换算出大鼠的牛膝饮片用量为 $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 取相应剂量的牛膝颗粒剂分别用纯净水配制低、中、高剂量的牛膝药液, 浓度分别为 $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.625 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 牛膝含药血清制备

取 20 只大鼠按照 1 ~ 20 进行编号, 从随机数字表第 8 行第 6 列开始依次取 20 个 2 位数的随机数字, 按照大鼠编号顺序依次对应。再按随机数字由小到大对大鼠进行再次编号 (随机数字相同者原编号小的在前), 编号 1 ~ 5 的大鼠归于空白组, 编号 6 ~ 10 的大鼠归于牛膝低剂量组, 编号 11 ~ 15 的大鼠归于牛膝中剂量组, 编号 16 ~ 20 的大鼠归于牛膝高剂量组。牛膝低、中、高剂量组按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量分别灌胃相应浓度的牛膝药液, 空白组按同等剂量灌胃生理盐水, 每日 1 次, 共灌胃 14 d。最后一次灌胃干预 2 h 后, 取大鼠腹主动脉血, 离心、灭活、除菌后分装, -20 °C 保存备用。

2.3 细胞培养与鉴定

取 4 只大鼠用 20% 乌拉坦麻醉后处死,取出大鼠股骨和胫骨骨髓,进行 BMSCs 培养。细胞汇拢度达 80% ~ 90% 时进行传代,倒置显微镜观察细胞形态与生长情况。细胞传到第 3 代时,用流式细胞仪进行细胞表型鉴定。

2.4 细胞分组

取第 3 代大鼠 BMSCs 制成单细胞悬液,待细胞贴壁后,分为胎牛血清组、空白血清组和牛膝低、中、高剂量含药血清组。

2.5 大鼠 BMSCs 增殖活性检测

5 组大鼠 BMSCs 分别加入胎牛血清、空白血清和牛膝低、中、高剂量含药血清进行干预,分别在干预后即刻和干预 24 h、48 h、72 h、96 h 后加入 CCK-8 溶液,在培养箱内培育 40 min,用酶联免疫检测仪 450 nm 波长测定吸光度值。

2.6 大鼠 BMSCs 成骨分化检测

5 组大鼠 BMSCs 分别加入 2 mL 含不同血清(胎牛血清组加胎牛血清,空白血清组加空白血清,牛膝低、中、高剂量含药血清组分别加牛膝低、中、高剂量含药血清)的成骨诱导液进行成骨诱导。诱导 21 d 后,采用茜素红染色观察 5 组大鼠 BMSCs 的矿化结节形成情况,并用 ImageJ 软件对矿化结节面积进行量化分析。

2.7 大鼠 BMSCs 中成骨相关因子的 mRNA 相对表达量和 Hedgehog 信号通路相关蛋白的蛋白相对表达量检测

按前述方法成骨诱导 3 d 后,采用荧光定量 PCR 检测 5 组大鼠 BMSCs 中成骨相关因子 ALP、骨钙素(osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2(runt-related

transcription factor 2, Runx2) 和 Osterix 的 mRNA 相对表达量(PCR 引物序列见表 1),采用蛋白质印迹法检测 5 组大鼠 BMSCs 中 Hedgehog 信号通路相关蛋白 SHH、Gli2 的相对表达量。

2.8 数据统计

采用 SPSS21.0 统计软件处理数据。不同时间点 5 组大鼠 BMSCs 增殖活性的比较采用重复测量数据的方差分析,5 组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量和 SHH、Gli2 的蛋白相对表达量的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验;5 组大鼠 BMSCs 矿化结节面积的组间比较采用秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞鉴定结果

细胞培养第 7 天,细胞贴壁生长,形态呈长梭形(图 1)。细胞表型鉴定结果显示,CD90、CD73、CD105 阳性率分别为 100%、99.97%、99.95%,为高表达;CD45、CD34 阳性率分别为 0.20%、0.21%,为低表达;培养的细胞为 BMSCs。见图 2。

3.2 大鼠 BMSCs 增殖活性检测结果

时间因素和分组因素存在交互效应;不同时间点之间大鼠 BMSCs 增殖活性的差异有统计学意义,即存在时间效应;各组大鼠 BMSCs 的增殖活性均随时间呈上升趋势;5 组大鼠 BMSCs 增殖活性总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应;干预后即刻,各组大鼠 BMSCs 增殖活性的组间差异,无统计学意义;干预 24 h、48 h、72 h、96 h 后 5 组大鼠 BMSCs 增殖活性组间总体比较,差异均有统计学意义;干预 24 h 后,牛膝含药血清高剂量组 BMSCs 的增殖活性高于胎牛血清组、空白血清组($P = 0.006, P = 0.008$);干

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5' - 3')	基因片段长度/bp
碱性磷酸酶	上游引物 GGAACCCAGACCCCTGAGTA	220
	下游引物 GTGTGGAGTCTCGGTGGATCT	
骨钙素	上游引物 CCACCGAGACACCATGAGA	189
	下游引物 GCTCCCAGCCATTGATACAG	
Osterix	上游引物 ACAGGTTCCAGAAAGCATCAGT	187
	下游引物 AGGCACTCGTCACAGTAGGATA	
Runt 相关转录因子 2	上游引物 AATTTTAACCCATATCAGAGTTCCA	74
	下游引物 GGCTGAATGTTATTCCACTAATCTA	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 AACAGCCTCAAGATCATCAGCAA	104
	下游引物 GTCATGAGTCCTTCCACGATACC	

预 48 h、72 h、96 h 后,牛膝含药血清高剂量组 BMSCs 的增殖活性均高于胎牛血清组、空白血清组和牛膝含药血清低、中剂量组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.010$, $P = 0.021$; $P = 0.003$, $P = 0.000$, $P = 0.007$, $P = 0.016$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$, $P = 0.047$)。见表 2。

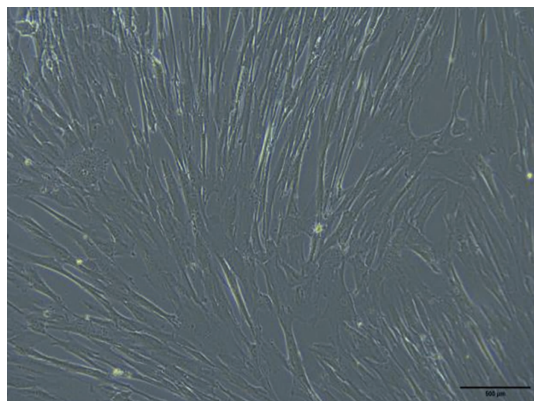


图 1 大鼠骨髓间充质干细胞镜下图片 ($\times 10$)

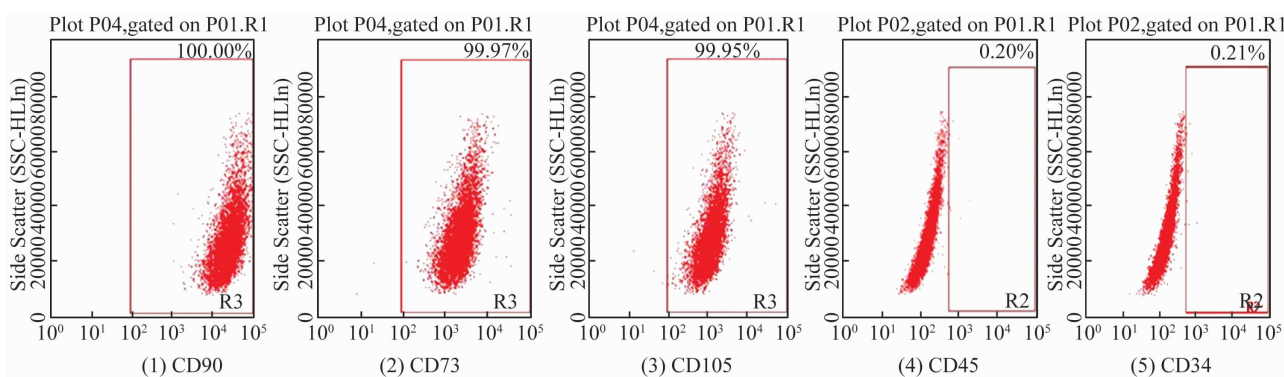


图 2 大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞仪鉴定结果

表 2 5 组大鼠骨髓间充质干细胞增殖活性检测结果

组别	样本量/ 孔	细胞增殖活性光密度值($\bar{x} \pm s$)						F 值	P 值
		干预后即刻	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	干预 96 h 后	合计		
胎牛血清组	5	0.274 \pm 0.006	0.876 \pm 0.037	1.013 \pm 0.049	1.148 \pm 0.144	1.390 \pm 0.077	0.940 \pm 0.388	151.091	0.000
空白血清组	5	0.280 \pm 0.009	0.896 \pm 0.033	1.049 \pm 0.083	1.198 \pm 0.079	1.340 \pm 0.055	0.953 \pm 0.379	232.067	0.000
牛膝含药血清 低剂量组	5	0.277 \pm 0.014	1.126 \pm 0.121	1.283 \pm 0.078	1.441 \pm 0.092	1.684 \pm 0.064	1.162 \pm 0.494	234.324	0.000
牛膝含药血清 中剂量组	5	0.274 \pm 0.017	1.134 \pm 0.036	1.315 \pm 0.039	1.485 \pm 0.090	1.768 \pm 0.085	1.195 \pm 0.519	435.504	0.000
牛膝含药血清 高剂量组	5	0.274 \pm 0.007	1.359 \pm 0.126	1.560 \pm 0.092	1.726 \pm 0.058	1.963 \pm 0.028	1.376 \pm 0.602	306.026	0.000
合计		0.276 \pm 0.011	1.078 \pm 0.197	1.244 \pm 0.213	1.400 \pm 0.232	1.629 \pm 0.247	1.125 \pm 0.504	5026.556 ¹⁾	0.000 ¹⁾
F 值		9.730	9.684	48.768	29.176	81.673	170.440 ¹⁾	$F = 217.320^{2)}$	
P 值		0.839	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 ¹⁾	$P = 0.000^{2)}$	

注:1)主效应的 F 值和 P 值;2)交互效应的 F 值和 P 值。

3.3 大鼠 BMSCs 成骨分化检测结果

茜素红染色显示,各组大鼠 BMSCs 均出现细胞外矿化结节形成与沉积,其中牛膝含药血清高剂量组阳性染色面积较大,矿化结节明显(图 3)。5 组大鼠 BMSCs 矿化结节面积组间整体比较,差异有统计学意义;牛膝含药血清高剂量组细胞外矿化结节面积大于胎牛血清组和空白血清组 ($P = 0.039$, $P = 0.015$);空白血清组细胞外矿化结节面积和胎牛血清组相比,差异无统计学意义 ($P = 1.000$);牛膝含药血清中、低剂量组细胞外矿化结节面积与空白血清组和胎牛血清组相比,差异均无统计学意义 ($P = 0.528$, $P = 0.933$; $P = 1.000$, $P = 1.000$);牛膝含药血清高、中剂量组细胞外矿化结节面积与低剂量组相比,组间差异均无统计学意义 ($P = 1.000$, $P = 1.000$);牛膝含药血清高剂量组细胞外矿化结节面积与中剂量组相比,差异无统计学意义 ($P = 1.000$)。见表 3。

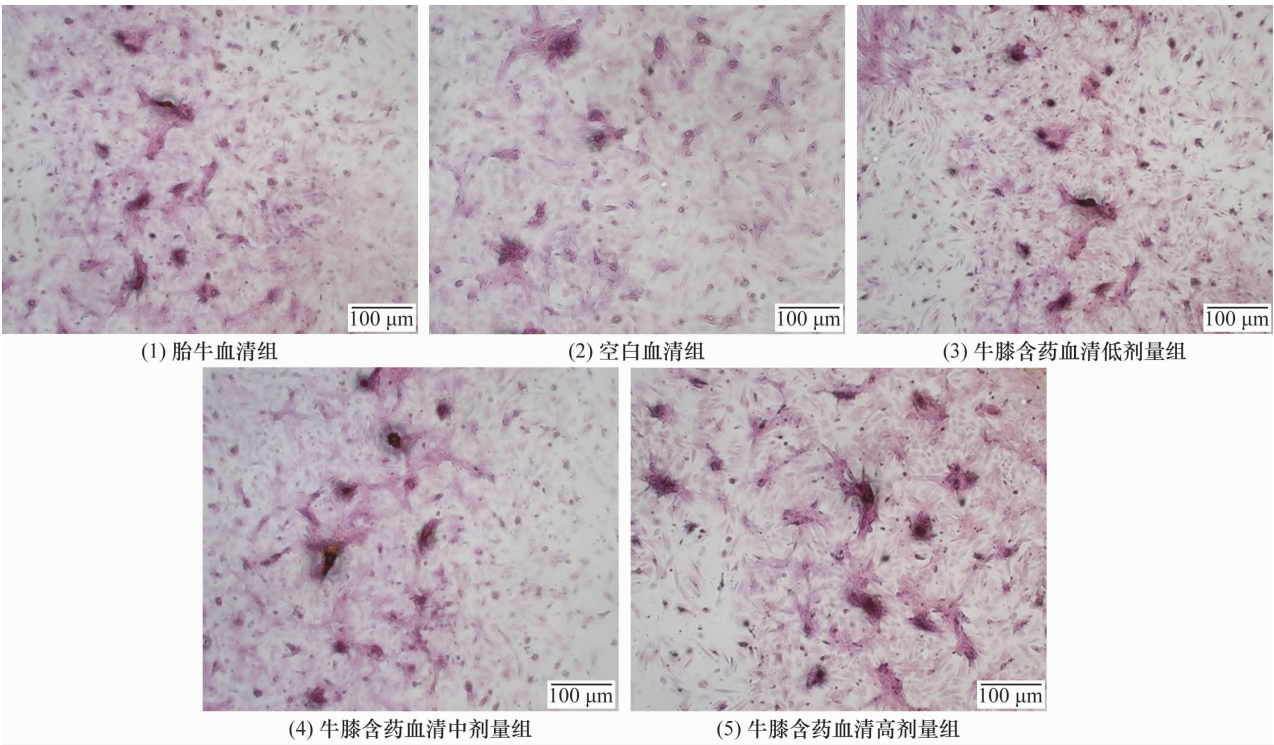


图 3 5 组大鼠骨髓间充质干细胞茜素红染色结果(×40)

表 3 5 组大鼠骨髓间充质干细胞矿化结节面积

组别	样本量/孔	矿化结节面积/ [(M,Q), %]
胎牛血清组	5	6.465, 1.223
空白血清组	5	4.610, 1.694
牛膝含药血清低剂量组	5	6.883, 3.087
牛膝含药血清中剂量组	5	7.338, 3.768
牛膝含药血清高剂量组	5	8.872, 2.175
H 值		13.430
P 值		0.009

3.4 大鼠 BMSCs 中成骨相关因子的 mRNA 相对表达量检测结果

5 组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量的组间总体比较,差异均有统计学意义。牛膝含药血清低、中、高剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量均高于胎牛血清组 ($P=0.003, P=0.000, P=0.000; P=0.011, P=0.001, P=0.000; P=0.009, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$) 和空白血清组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.005, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。空白血清组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量与胎牛血清组相比,差异均无统计学意义 ($P=0.124, P=0.621, P=0.484, P=0.986$)。与牛膝含

药血清低剂量组相比,牛膝含药血清中剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP 的 mRNA 相对表达量高 ($P=0.044$); 2 组间 OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义 ($P=0.133, P=0.078, P=0.115$)。牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的 mRNA 相对表达量均高于牛膝含药血清低剂量组 ($P=0.002, P=0.006, P=0.002, P=0.008$)。与牛膝含药血清中剂量组相比,牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 Runx2 的 mRNA 相对表达量高 ($P=0.047$); 2 组间 ALP、OCN、Osterix 的 mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义 ($P=0.081, P=0.102, P=0.150$)。见表 4。

3.5 大鼠 BMSCs 中 Hedgehog 信号通路相关蛋白的蛋白相对表达量检测结果

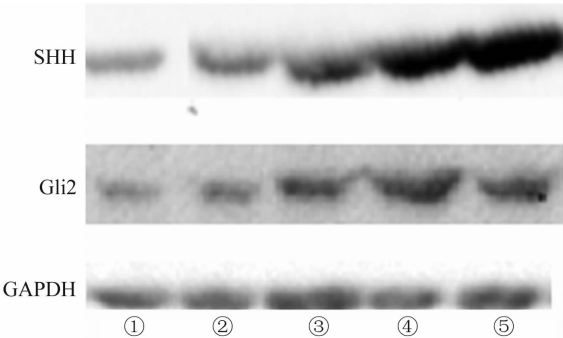
牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH、Gli2 高表达 (图 4)。5 组大鼠 BMSCs 中 SHH、Gli2 的蛋白相对表达量组间总体比较,差异有统计学意义。胎牛血清组大鼠 BMSCs 中 SHH、Gli2 的蛋白相对表达量和空白血清组相比,差异均无统计学意义 ($P=0.827, P=1.000$)。牛膝含药血清低、中、高剂量组 SHH、Gli2 的蛋白相对表达量均高于胎牛血清组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.026, P=0.016, P=0.000$) 和空白血清组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.031, P=0.018, P=0.000$)。牛膝含药

表 4 5 组大鼠骨髓间充质干细胞中成骨分化相关因子的 mRNA 相对表达量

组别	样本量/孔	ALP ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	OCN ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Runx2 ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Osterix ($\bar{x} \pm s$)
胎牛血清组	5	1.001 ± 0.068	1.001 ± 0.058	1.001 ± 0.040	1.000 ± 0.029
空白血清组	5	0.923 ± 0.089	0.982 ± 0.070	1.013 ± 0.014	0.999 ± 0.053
牛膝含药血清低剂量组	5	1.181 ± 0.008	1.117 ± 0.038	1.060 ± 0.010	1.127 ± 0.015
牛膝含药血清中剂量组	5	1.289 ± 0.054	1.178 ± 0.018	1.096 ± 0.015	1.169 ± 0.019
牛膝含药血清高剂量组	5	1.379 ± 0.026	1.245 ± 0.014	1.138 ± 0.021	1.206 ± 0.011
F 值		33.673	18.294	19.234	31.724
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)碱性磷酸酶;2)骨钙素;3)Runt 相关转录因子 2。

血清中、高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH 的蛋白相对表达量均高于牛膝含药血清低剂量组 ($P = 0.000, P = 0.000$),牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 SHH 的蛋白相对表达量高于牛膝含药血清中剂量组 ($P = 0.000$)。牛膝含药血清中剂量组大鼠 BMSCs 中 Gli2 的蛋白相对表达量与牛膝含药血清低、高剂量组相比,组间差异均无统计学意义 ($P = 0.341, P = 0.251$);牛膝含药血清高剂量组大鼠 BMSCs 中 Gli2 的蛋白相对表达量高于牛膝含药血清低剂量组 ($P = 0.001$)。见表 5。



SHH 为音猬因子,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,①为胎牛血清组,②为空白血清组,③为牛膝含药血清低剂量组,④为牛膝含药血清中剂量组,⑤为牛膝含药血清高剂量组。

图 4 5 组大鼠骨髓间充质干细胞中 Hedgehog 信号通路相关蛋白表达蛋白质印迹法检测结果

4 讨论

OP 主要是由成骨细胞与破骨细胞之间的动态平衡被打破,骨吸收大于骨形成所致^[13-15]。促进成骨细胞生成、抑制破骨细胞增殖是治疗骨质疏松症的一种有效方法。骨组织的生长发育过程主要包括骨形成和骨重塑 2 个阶段,成骨分化是骨形成过程中的关键步骤。ALP、OCN 是骨形成的标志物,可以反映成骨细胞活性^[16];Runx2、Osterix 是骨形成和成骨细胞分化的特异性转录因子,可以调控 BMSCs 的成骨分化^[17]。BMSCs 在一定条件下可以分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞等,促进 BMSCs 成骨分化、抑制其成脂分化,对预防 OP 的发生具有重要意义。中药能调节雌激素水平和钙的代谢,治疗 OP 的临床效果好、安全性高^[18]。牛膝是临床治疗 OP 的常用中药,可通过调控内源性差异代谢物相关的代谢通路改善骨质疏松^[19];其与何首乌组成的药对可抑制骨吸收、诱导骨形成^[20]。

Hedgehog 信号通路对骨骼生长发育和骨稳态有重要影响^[21-23]。Hedgehog 信号通路包括 Hedgehog 信号蛋白、膜受体 Patched (Ptc)、转膜蛋白 Smoothened (Smo) 和下游转录因子 Gli 家族,Hedgehog 信号蛋白和 Ptc 的结合可解除 Ptc 对 Smo 的抑制作用,使信号下传,通过 Gli 转录因子进入细胞核内启动靶基因

表 5 5 组大鼠骨髓间充质干细胞中 Hedgehog 信号通路相关蛋白的蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	音猬因子 ($\bar{x} \pm s$)	Gli2 ($\bar{x} \pm s$)
胎牛血清组	5	1.012 ± 0.056	1.004 ± 0.020
空白血清组	5	1.020 ± 0.016	1.006 ± 0.011
牛膝含药血清低剂量组	5	1.282 ± 0.061	1.256 ± 0.090
牛膝含药血清中剂量组	5	1.450 ± 0.064	1.434 ± 0.131
牛膝含药血清高剂量组	5	1.712 ± 0.070	1.626 ± 0.080
F 值		135.992	56.920
P 值		0.000	0.000

的转录发挥其调控作用^[24-25]。Zhang 等^[14]研究表明, Hedgehog 信号通路参与成人骨骼成骨分化过程, 在干骺端的骨祖细胞中被激活, 但随着年龄增长骨祖细胞活性下降。蔡汪洋等^[26]研究发现, 激活 Hedgehog 信号通路可以促进骨质疏松大鼠骨缺损区域的骨愈合。

本研究结果表明, 牛膝含药血清可能通过激活 Hedgehog 信号通路和上调成骨相关因子 ALP、OCN、Runx2、Osterix 的表达, 促进大鼠 BMSCs 的增殖和成骨分化。

参考文献

- [1] XIAO L, ZHONG M, HUANG Y, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy-induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS-dependent MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(21): 21706–21729.
- [2] O' KELLY J, BARTSCH R, KOSSACK N, et al. Real-world effectiveness of osteoporosis treatments in Germany [J]. Arch Osteoporos, 2022, 17(1): 119.
- [3] AIBAR-ALMAZÁN A, VOLTES-MARTÍNEZ A, CASTELLOTE-CABALLERO Y, et al. Current status of the diagnosis and management of osteoporosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9465.
- [4] 段浩瀚, 贾豪, 雷敬卫, 等. 基于颜色-成分关联分析比较不同产地牛膝炮制过程中质量变化的规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 143–151.
- [5] 赵杰, 许波, 刘金豹, 等. 基于网络药理学探讨牛膝治疗骨质疏松的潜在有效成分及作用机制 [J]. 中国药房, 2019, 30(22): 3090–3095.
- [6] 张孙正远, 李峻昊, 章喻, 等. 牛膝-杜仲药对治疗糖皮质激素性骨质疏松症的网络药理学分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(10): 1377–1385.
- [7] ZHOU X, CAO H, GUO J, et al. Effects of bmsc-derived evs on bone metabolism [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(5): 1012.
- [8] KWON D G, KIM M K, JEON Y S, et al. State of the art: the immunomodulatory role of MSCs for osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1618.
- [9] HUANG Y, YIN Y, GU Y, et al. Characterization and immunogenicity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under osteoporotic conditions [J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(3): 429–442.
- [10] 张玲莉, 杜玉香, 叶长林. Hedgehog 信号通路对骨髓间充质干细胞的调控作用 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2020, 13(6): 556–562.
- [11] KUWAHARA S T, LIU S, CHAREUNSOUK A, et al. On the horizon: Hedgehog signaling to heal broken bones [J]. Bone Res, 2022, 10(1): 13.
- [12] OHBA S. Hedgehog signaling in skeletal development: roles of indian hedgehog and the mode of its action [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6665.
- [13] AWASTHI H, MANI D, SINGH D, et al. The underlying pathophysiology and therapeutic approaches for osteoporosis [J]. Med Res Rev, 2018, 38(6): 2024–2057.
- [14] ZHANG L, FU X, NI L, et al. Hedgehog signaling controls bone homeostasis by regulating osteogenic/adipogenic fate of skeletal stem/progenitor cells in mice [J]. J Bone Miner Res, 2022, 37(3): 559–576.
- [15] LIANG B, BURLEY G, LIN S, et al. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 72.
- [16] 《中国骨质疏松杂志》骨代谢专家组, 《中国骨质疏松杂志》社. 骨代谢生化指标临床应用专家共识 (2023 修订版) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(4): 469–476.
- [17] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696–711.
- [18] 袁雨露, 杨桢, 丁薇, 等. 中药抗骨质疏松作用及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 290–298.
- [19] 韩永光, 谭雅兰, 张超云, 等. 牛膝化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(8): 1432–1444.
- [20] 石安骐, 石舒骐, 林磊婷, 等. 药对何首乌-牛膝抗骨质疏松的作用机制研究 [J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(5): 912–917.
- [21] FANG M, TANG T, QIU M, et al. Hedgehog signaling in CNS remyelination [J]. Cells, 2022, 11(14): 2260.
- [22] DOUCEAU S, DEUTSCH GUERRERO T, FERENT J, et al. Establishing hedgehog gradients during neural development [J]. Cells, 2023, 12(2): 225.
- [23] DILOWER I, NILOY A J, KUMAR V, et al. Hedgehog signaling in gonadal development and function [J]. Cells, 2023, 12(3): 358.
- [24] ZHOU H, ZHANG L, CHEN Y, et al. Research progress on the hedgehog signalling pathway in regulating bone formation and homeostasis [J]. Cell Prolif, 2022, 55(1): e13162.
- [25] NAGASE T, NAGASE M, MACHIDA M, et al. Hedgehog signalling in vascular development [J]. Angiogenesis, 2008, 11(1): 71–77.
- [26] 蔡汪洋, 戴梦婕, 周航, 等. Hedgehog 信号通路在骨折愈合中作用的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(4): 565–570.

(收稿日期: 2024-02-20 本文编辑: 杨雅)