

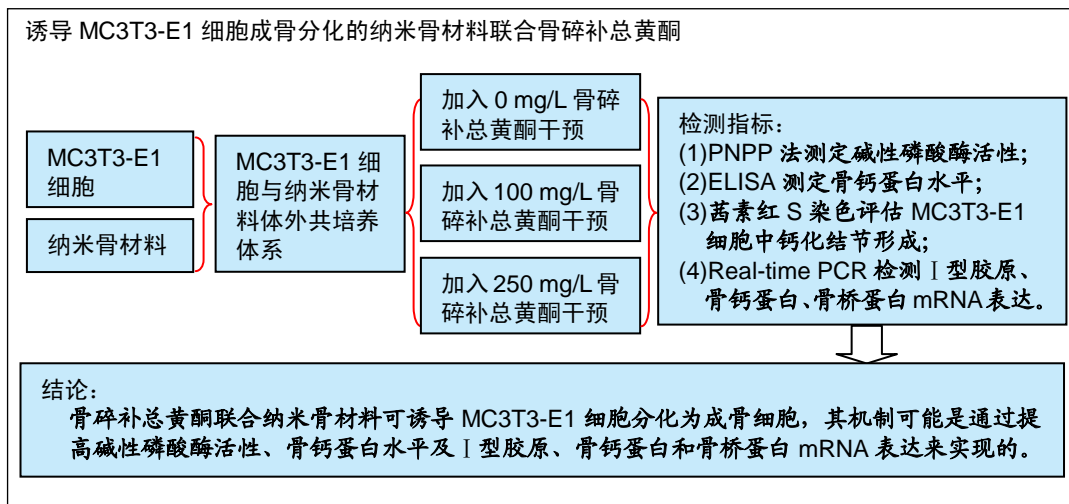
# 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料诱导MC3T3-E1细胞的成骨分化及其机制

李晋玉<sup>1</sup>, 俞兴<sup>1</sup>, 姜俊杰<sup>2</sup>, 徐林<sup>1</sup>, 赵学干<sup>1</sup>, 孙旗<sup>1</sup>, 郑晨颖<sup>1</sup>, 白春晓<sup>1</sup>, 刘楚吟<sup>1</sup>, 张喆<sup>1</sup>, 贾育松<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北京中医药大学东直门医院骨科, 北京市 100700; <sup>2</sup>中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京市 100700)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1713

ORCID: 0000-0002-2031-8644(李晋玉)

文章快速阅读:



李晋玉, 男, 1984 年生, 山西省晋城市人, 汉族, 2018 年北京中医药大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事中医药在骨组织工程中的应用研究。

通讯作者: 贾育松, 主任医师, 北京中医药大学东直门医院骨一科, 北京市 100700

文献标识码:A

稿件接受: 2019-01-22



## 文题释义:

**骨碎补总黄酮:** 是由水龙骨科植物槲蕨干燥根茎中提取的有效成分, 实验证明骨碎补总黄酮能够促进成骨细胞的增殖, 抑制破骨细胞的成熟分化。

**骨桥蛋白:** 一种含有 Arg-Gly-Asp(RGD)结构的酸性糖蛋白, 存在于矿化和活性沉积区, 它与诱导成骨细胞成熟表型表达和矿化骨基质形成的活性蛋白密切相关; 在成矿阶段, 骨连接素、纤连蛋白与骨桥蛋白的表达高度相关。

## 摘要

**背景:** 前期研究发现, 骨碎补总黄酮可促进纳米骨材料表面 MC3T3-E1 细胞的成骨分化, 其作用机制有待进一步研究。

**目的:** 探讨骨碎补总黄酮联合纳米骨材料对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响及作用机制。

**方法:** 将 MC3T3-E1 细胞接种于纳米骨材料表面, 分别加入含 0, 100, 250 mg/L 骨碎补总黄酮的培养基培养。培养第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 天, 检测细胞碱性磷酸酶活性; 培养第 1, 2, 3, 4 周, ELISA 法检测培养上清中骨钙蛋白水平; 培养第 7, 14, 21 天, 茜素红 S 染色观察细胞钙化结节形成情况; 培养第 14 天, PCR 检测成骨相关基因表达。

**结果与结论:** ①第 1, 3, 14 天, 3 组细胞碱性磷酸酶活性比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 培养第 5, 7, 9 天, 100, 250 mg/L 组碱性磷酸酶活性均高于 0 mg/L 组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L 组、250 mg/L 组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ②培养第 1, 2, 3, 4 周, 100, 250 mg/L 组骨钙蛋白质量浓度均高于 0 mg/L 组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L 组、250 mg/L 组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ③培养第 7, 14, 21 天, 100, 250 mg/L 组可见明显的钙化结节; ④培养第 14 天, 100, 250 mg/L 组骨钙蛋白、I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达水平均高于 0 mg/L 组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L 组、250 mg/L 组间骨钙蛋白、I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ⑤结果表明, 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料可诱导 MC3T3-E1 细胞分化为成骨细胞, 其机制可能是通过提高碱性磷酸酶活性、骨钙蛋白水平及 I 型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白 mRNA 表达来实现的。

**关键词:**

纳米骨材料; 骨碎补总黄酮; MC3T3-E1 细胞; 成骨分化; 骨桥蛋白; 骨钙蛋白; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R336

**基金资助:**

国家自然科学基金项目(81503601), 项目负责人: 李晋玉; 国家自然科学基金项目(81603517), 项目负责人: 姜俊杰; 北京中医药大学东直门医院青苗人才项目(DZMYS-201802), 项目负责人: 李晋玉

Li Jinyu, MD, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: Jia Yusong, Chief physician, Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

## Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells induced by osteopractic total flavone and nano-hydroxyapatite/collagen composite and the underlying mechanism

Li Jinyu<sup>1</sup>, Yu Xing<sup>1</sup>, Jiang Junjie<sup>2</sup>, Xu Lin<sup>1</sup>, Zhao Xueqian<sup>1</sup>, Sun Qi<sup>1</sup>, Zheng Chenying<sup>1</sup>, Bai Chunxiao<sup>1</sup>, Liu Chuyin<sup>1</sup>, Zhang Zhe<sup>1</sup>, Jia Yusong<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; <sup>2</sup>Institute for Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary study has found that osteopractic total flavone can promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on the surface of nano-hydroxyapatite/collagen composite, but the underlying mechanism needs to be studied in depth.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of osteopractic total flavone combined with nano-hydroxyapatite/collagen composite on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and its mechanism.

**METHODS:** MC3T3-E1 cells were seeded on the surface of nano-hydroxyapatite/collagen composite and cultured in culture media containing 0, 100 and 250 mg/L osteopractic total flavone, respectively. After 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 14 days of culture, the activity of alkaline phosphatase was detected. After 1, 2, 3 and 4 weeks of culture, the level of osteocalcin in the culture supernatant was detected by ELISA. Alizarin red staining was used to observe the formation of calcified nodules at 7, 14 and 21 days of culture. At 14 days of culture, the expression of osteogenic related genes was detected by PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) There was no significant difference in the alkaline phosphatase activity at 1, 3 and 14 days among groups ( $P > 0.05$ ). At 5, 7 and 9 days of culture, the alkaline phosphatase activity in the 100 and 250 mg/L groups was higher than that in the 0 mg/L group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between 100 and 250 mg/L groups ( $P > 0.05$ ). (2) The mass concentration of osteocalcin in the 100 and 250 mg/L groups was higher than that in the 0 mg/L group at 1, 2, 3 and 4 weeks of culture ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between 100 and 250 mg/L groups ( $P > 0.05$ ). (3) At 7, 14 and 21 days of culture, obvious calcified nodules were visible in the 100 and 250 mg/L groups. (4) At 14 days of culture, the mRNA expression levels of osteocalcin, type I collagen and osteopontin in the 100 and 250 mg/L groups were higher than that in the 0 mg/L group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between 100 and 250 mg/L groups ( $P > 0.05$ ). (5) These results imply that osteopractic total flavone combined with nano-hydroxyapatite/collagen composite can induce MC3T3-E1 cells to differentiate into osteoblasts, which may be by increasing alkaline phosphatase activity, osteocalcin level and mRNA expression of type I collagen, osteocalcin and osteopontin.

**Key words:** nano-hydroxyapatite/collagen composite; osteopractic total flavone; MC3T3-E1 cells; osteogenic differentiation; osteopontin; osteocalcin; the National Natural Science Foundation of China

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81503601 (to LJY) and 81603517 (to JJJ); the Young Talent Project of Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, No. DZMYS-201802 (to LJY)

## 0 引言 Introduction

骨组织工程是使用生物、化学和工程方法修复、重建活体组织，联合使用再生材料、种子细胞、生长因子促进骨组织的再生，如今骨组织工程技术已成为临床治疗骨缺损的有效方法之一，组织工程骨的应用将有效缓解临床对自体移植和同种异体移植的需求<sup>[1-2]</sup>。在骨组织工程研究中，三维多孔支架复合骨细胞作为一种有吸引力的方法，已被广泛研究用来治疗骨缺损。中医药在骨愈合方面独具优势，中药干预支架材料复合的骨细胞，一直是中西医结合治疗骨缺损的重点。骨碎补总黄酮是从中药骨碎补中提取的有效成分，具有促进成骨、抑制骨溶解、促进血管再生、抑制炎症反应等不同的作用<sup>[3]</sup>。由清华大学研发的纳米骨材料，是在仿生思路和既有胶原-钙磷盐复合材料基础上制备的一种新型纳米复合骨材料，以胶原分子为模板，通过生物自组装钙磷盐沉积到有序排列的胶原纤维上，具有与天然骨相似的分级结构和特性，具备很好的生物组织相容性和优异的骨传导性能，同时其也是一种生物可降解材料<sup>[4]</sup>。前期实验采用含骨碎补总黄酮的培养基体外培养MC3T3-E1细胞与纳米骨材料复合体，发现培养后的MC3T3-E1细胞具有成骨细胞活性及生物学特性，与纳米骨材料具有很好的细胞相容性<sup>[5]</sup>。MC3T3-E1细胞适宜作为构建组织工程骨的种子细胞和三维条件下进行细胞实验的研究对象。实验探究骨碎补总黄酮联合纳米骨材料对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响及其作用机制，为中医药

在组织工程中的应用提供借鉴。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年5至12月在北京中医药大学教育部中医内科学重点实验室完成。

1.3 材料 小鼠MC3T3-E1成骨细胞株(中国北京协和医院细胞生物中心); 骨碎补总黄酮(北京岐黄医药股份有限公司); 纳米骨材料由清华大学材料科学与工程系提供，是在仿生思路和既有胶原-钙磷盐复合材料的基础上制备的一种新型纳米复合骨材料，以胶原分子为模板，通过生物自组装，钙磷盐沉积到有序排列的胶原纤维上，合成过程保持常温，具有与天然骨相似的分级结构和特性，具有均一的孔隙和孔间连接，单个晶体尺寸4-6 nm，孔径集中在50-300 μm，孔隙率为70%-80%<sup>[2]</sup>，见表1。

**实验用试剂:** BOP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒(中国北京碧云天生物公司); Alizarin Red染色剂(中国北京索莱宝科技有限公司); 茜素红S染液(中国北京谷歌生物科技有限公司); Trizol RNA提取试剂(日本Takara公司); RNeasy试剂盒(美国Qiagen公司); Col-I、OCN、OPN抗体(美国Sigma); RNA isoPlus(中国大连Takara宝生物工程有限公司); Primescript RT Reagent Kit(中国大连Takara宝生物工程有限公司); Light Cycler 480 SYBR GREEN I Master(美国Roche诊断); Donkey Anti-Goat IgG H&L抗体(美国

eBiosecince公司); Goat Anti-Rabbit IgG H&L 抗体(美国 eBiosecince公司);  $\alpha$ -MEM培养基(美国Gibco公司); 胎牛血清(美国Sciencell公司)。

表 1 纳米骨材料介绍

Table 1 Introduction of nano-hydroxyapatite/collagen composite

项目	纳米骨材料
来源	清华大学材料科学与工程系
组成成分	以胶原分子为模板, 通过生物自组装, 钙磷盐沉积到有序排列的胶原纤维上
制备方法	取 1 g 羟基磷灰石粉末溶于 150 mL、0.1 mol/L HCl 中; 取 450 mg I 型胶原蛋白加入上述溶液中搅拌均匀; 上述溶液用去离子水稀释至 2 000 mL, 然后溶于 23.37g NaCl 以提高溶液的稳定性, 这样得到了钙离子浓度为 5 mol/L、pH=3.0 的中间液; 室温下向溶液中边搅拌边滴入 0.05 mol/L 的 KOH 溶液, 当 pH 值升至 7.0 以上时, 溶液中开始出现乳白色沉淀, 将溶液 pH 值控制在 7.4 左右, 保持 10 min, 离心除去上清, 再用去离子水清洗 1 次, 样品冷冻干燥, 得到纳米骨材料
理化性质	成分与微结构具有同天然骨类类似的某些特征, 复合材料的矿物含量约为 50%, 矿物相为含有碳酸根的羟基磷灰石, 结晶度低, 晶粒尺寸为纳米量级
与人体的生物相容性	与人体具有很好的生物相容性

## 1.4 实验方法

**1.4.1 骨碎补总黄酮溶液的配制** 用含体积分数3%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基, 将骨碎补总黄酮配成500 g/L的溶液, 4 °C保存; 用含体积分数3%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基, 将骨碎补总黄酮溶液浓度稀释成250, 100, 0 mg/L, 现用现配。

**1.4.2 小鼠MC3T3-E1细胞与纳米骨材料共培养** 将纳米骨材料切成厚度均匀的薄片, 铺满培养皿的底部, 尽量保持骨材料的完整性。将MC3T3-E1细胞吹打均匀, 制成细胞浓度为 $2.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种于纳米骨材料上, 每孔接种细胞悬液50  $\mu\text{L}$ , 30 min后翻转, 继续接种等量细胞液, 1 h后移入直径10 mm的培养皿内, 加入含体积分数3%胎牛血清的培养液10 mL, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

按相同的方法, 将小鼠MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度接种在含纳米骨材料的24或96孔板上, 待细胞达到70%汇合时, 加入不同质量浓度(0, 100, 250 mg/L)骨碎补总黄酮的培养基培养。

**1.4.3 碱性磷酸酶活性检测** 中药干预第1, 3, 5, 7, 9, 11, 14天时, 胰酶消化, 离心收集细胞, 超声裂解细胞, 吸取细胞裂解液200  $\mu\text{L}$ , 按碱性磷酸酶试剂盒说明书操作, 依次加入缓冲液和基质液, 孵育, 加入显色剂, 收集细胞培养基, 采用紫外分光光度仪测各管吸光度值, 按公式计算出细胞内碱性磷酸酶水平, 实验重复测定3次。

**1.4.4 ELISA法测定骨钙蛋白** 中药干预第1, 2, 3, 4周, 收集培养上清, 按照说明加入准备好的样品、标准品、酶标试剂, 37 °C反应60 min, 洗板6次, 加入显色液A、B,

37 °C显色15 min, 加入终止液, 终止反应, 检测样本中骨钙素浓度, 空白调零, 450 nm波长依序测量各孔的吸光度, 测定应在加终止液后15 min以内进行; 用标准物的浓度与吸光度值计算出标准曲线的直线回归方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。实验重复测定3次。

**1.4.5 茜素红S染色评估钙化结节水平** 中药干预7, 14, 21 d, 取各组小鼠MC3T3-E1成骨细胞, 去培养基, 用DPBS将细胞洗涤3次, 每次5 min, 以新鲜解冻的40 g/L多聚甲醛将细胞在室温下固定20 min, 使用2%茜素红S溶液(pH=4.2)在室温下染色细胞10 min, 同时将光照最小。染色的细胞再次用DPBS洗涤, 并使用光学显微镜评估。因小鼠MC3T3-E1成骨细胞属于小鼠成骨细胞的早期细胞或者成骨前体细胞, 在常规培养早期, 不会出现较为明显或者肉眼可见的大块红色沉淀, 故选择中药干预7, 14, 21 d进行实验观察。

**1.4.6 Real-time PCR检测成骨相关基因表达** 中药干预14 d, 提取MC3T3-E1细胞RNA, 根据反转录试剂盒说明书操作, 反转录为cDNA, 采用实时定量PCR检测成骨基因I型胶原、骨钙蛋白、骨桥蛋白的表达, 设计的PCR引物序列见表2,  $\beta$ -Actin作为内参, 待反应结束后, 在PCR仪上获取Ct值, 通过计算机软件得出基因的相对表达量。

表 2 荧光定量 PCR 引物的碱基序列

Table 2 Primer sequences for fluorescent quantitative PCR

目的基因	上游 5'-3'	下游 3'-5'
$\beta$ -Actin	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	GGG GTG TTG AAG GTC TCAA AA
I型胶原	GGC AAA GAT GGA GAA GCT GG	GGA AAC CTC TCT CGC CTC TT
骨钙蛋白	GGA CCA TCT TTC TGC TCA CTC	CTG CTT GGA CAT GAA GGC TT
骨桥蛋白	TCA CTC CAA TCG TCC CTA CA	GAC TCC TTA GAC TCA CCG CT

**1.5 主要观察指标** ①骨碎补总黄酮联合纳米骨材料干预后, MC3T3-E1细胞的增殖能力; ②骨碎补总黄酮联合纳米骨材料干预后, MC3T3-E1细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶的表达; ③骨碎补总黄酮联合纳米骨材料干预后, MC3T3-E1细胞成骨分化过程中骨钙蛋白的表达; ④骨碎补总黄酮联合纳米骨材料干预后, MC3T3-E1细胞成骨分化过程中钙化结节水平; ⑤骨碎补总黄酮联合纳米骨材料干预后, MC3T3-E1细胞成骨分化基因I型胶原、骨钙蛋白、骨桥蛋白的mRNA表达。

**1.6 统计学分析** 实验数据运用SPSS 20.0软件进行统计和分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对数据先做正态和方差齐检验, 符合者用单因素方差分析比较, 组间比较用LSD分析法。若不符合正态分布或方差不齐者, 用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 碱性磷酸酶活性检测结果** 分析碱性磷酸酶活性以评估成骨细胞分化水平。各组细胞碱性磷酸酶活性随培养时间的变化趋势,见图1所示。中药干预第 1, 3, 14天时, 3组间成骨细胞碱性磷酸酶活性比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 中药干预第5, 7, 9天时, 100, 250 mg/L组成骨细胞碱性磷酸酶活性均高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L组、250 mg/L组成骨细胞碱性磷酸酶活性比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 骨钙蛋白检测结果** 如图2所示, 中药干预2, 3, 4周时间点, 100, 250 mg/L组骨钙蛋白质量浓度显著高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L组、250 mg/L组骨钙蛋白质量浓度比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 中药干预2周后, 各组骨钙蛋白质量浓度达到峰值, 随后其质量浓度有不同程度下降趋势, 但各组在第4周的骨钙蛋白质量浓度仍要比1周时高。

**2.3 茜素红S染色鉴定结果** 对3组进行茜素红S染色, 来评估MC3T3-E1细胞中钙化结节形成的水平, 并在光学显微镜下进一步观察结节情况。如图3A所示, 大体宏观观察显示, 中药干预7, 14, 21 d, 0 mg/L组染色最小, 但在100, 250 mg/L组中观察到增加的染色, 100 mg/L组和250 mg/L组间的视觉差异不显著, 并且两组均显示随着时间的推移染色水平增加。如图3B所示, 光学显微镜下茜素红S染色可见钙化结节形成, 小鼠MC3T3-E1成骨细胞的细胞质内有明显染色改变, 呈现较深红色, 提示茜素红S溶液可与细胞质钙离子相结合, 250 mg/L组中钙化结节形成在分化的初始阶段(7 d)比100 mg/L组更显著, 在中药干预14, 21 d时, 两组均表现出钙化结节的数量和大小增加, 但大体观察看不到这种差异。

**2.4 成骨基因表达检测结果** 100, 250 mg/L组的I型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白 mRNA表达水平均显著高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ), 100 mg/L组和250 mg/L组I型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白mRNA表达水平比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图4。

## 3 讨论 Discussion

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨的干燥根茎, 是一味常用的传统中药, 中医认为骨碎补性温, 味苦, 归肝、肾经, 具有强骨补肾、止痛续伤之功效, 临床用于筋骨折伤、肾虚腰痛、跌扑闪挫、耳鸣耳聋、牙齿松动的治疗, 外治白癜风、斑秃<sup>[6]</sup>。骨碎补的主要生物活性成分是黄酮类化合物, 因其潜在的药用价值而备受关注, 在基础及临床研究中被广泛应用。体外实验证实, 骨碎补总黄酮能促进大鼠间充质干细胞向成骨细胞增殖、分化<sup>[7-12]</sup>。动物实验研究显示, 骨碎补总黄酮能增加去卵巢大鼠股骨密度和机械强度, 改善骨小梁微结构<sup>[13]</sup>。临床研究表明, 骨碎补总黄酮治疗骨质疏松性骨折<sup>[14-18]</sup>、骨不连<sup>[19]</sup>、股骨头坏死<sup>[20-23]</sup>。因此,

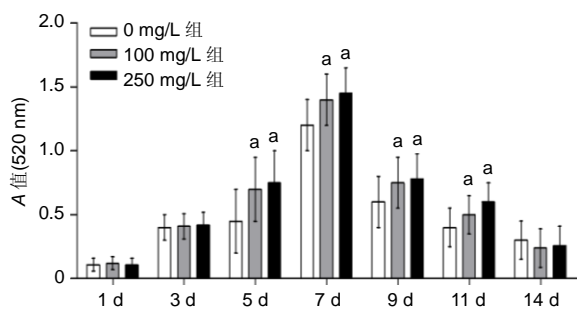
实验研究采用骨碎补总黄酮作为促进细胞增殖、分化的研究对象。

纳米骨材料骨植体表面可提供适宜的环境, 促进胶原和矿物的沉积及成骨细胞的黏附, 一旦细胞黏附于种植体表面, 随后的骨生长便在细胞的调节下进行。纳米骨材料除了具有生物活性和优异的骨传导性能, 也是一种生物可降解材料, 可作为骨组织工程理想的支架材料。

在成骨化过程中, 碱性磷酸酶是成骨化的特异性因子<sup>[24]</sup>, 可调节骨形态发生<sup>[25]</sup>。碱性磷酸酶的激活在细胞外基质形成的早期阶段以高水平发生, 但随着时间的推移而降低<sup>[26]</sup>。此次实验结果表明在培养细胞到第7-9天时, 100, 250 mg/L组碱性磷酸酶活性高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ); 在第11天时, 3组碱性磷酸酶活性无明显差异( $P > 0.05$ ), 说明100, 250 mg/L的骨碎补总黄酮联合纳米骨材料, 能够增强体外成骨细胞的碱性磷酸酶活性, 主要是对MC3T3-E1细胞早期分化的影响。骨钙蛋白的生理功能是保持骨的正常矿化, 调节羟基磷灰石结晶的形成和增长, 是成骨细胞分化的中期敏感标志物<sup>[27]</sup>。实验结果表明, 100, 250 mg/L组骨钙蛋白质量浓度显著高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ), 由此可知, 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料可促进MC3T3-E1细胞的中期分化。在实验后期时, 采用茜素红S染色后观察骨结节的形成和矿化, 因小鼠MC3T3-E1成骨细胞属于小鼠成骨细胞的早期细胞或者成骨前体细胞, 在常规培养早期不会出现较为明显或者大体可见的大块红色沉淀, 故选择7, 14, 21 d进行实验观察。此次研究中, 100, 250 mg/L组之间的矿化水平无差异, 但两组相比0 mg/L组相同时间点的钙化水平更高。因此, 如果将骨碎补总黄酮与骨移植支架材料植入骨缺损, 可以促进局部引导骨再生期间较早的钙化结节形成, 改善一般骨生成过程的效率。

骨桥蛋白是存在于矿化和活性沉积区、一种含有Arg-Gly-Asp(RGD)结构的酸性糖蛋白, 它与诱导成骨细胞成熟表型表达和矿化骨基质形成的活性蛋白密切相关。在成矿阶段, 骨连接素、纤连蛋白与骨桥蛋白的表达高度相关<sup>[28]</sup>。I型胶原是钙盐沉积和细胞附着的支架, 可促进细胞附着并刺激细胞分化<sup>[29]</sup>。实验采用不同质量浓度的骨碎补总黄酮培养基诱导MC3T3-E1细胞14 d, 随着骨碎补总黄酮质量浓度的增加, MC3T3-E1细胞培养物中的骨钙蛋白、I型胶原和骨桥蛋白mRNA表达水平逐渐增加, 100, 250 mg/L组所有成骨细胞标志物mRNA均显著高于0 mg/L组( $P < 0.05$ ), 说明在矿化期, 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料可促进成骨细胞相关基因表达, 更有利于新骨组织的矿化, 以利于新骨的形成。

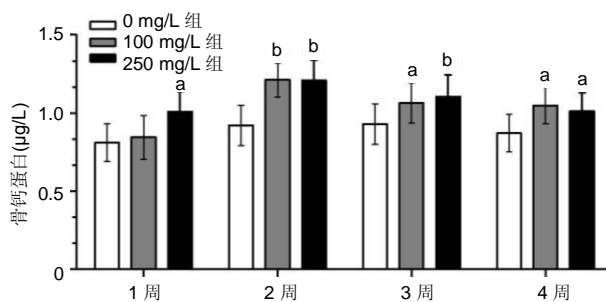
此次研究结果表明, 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料能够促进MC3T3-E1细胞向成骨细胞转化, 主要作用机制是通过提高碱性磷酸酶的活性和骨钙蛋白质量浓度, 升高MC3T3-E1细胞培养物中I型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白



图注: 相同时间点, 与 0 mg/L 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 不同质量浓度骨碎补总黄酮干预后纳米骨材料上 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性的比较

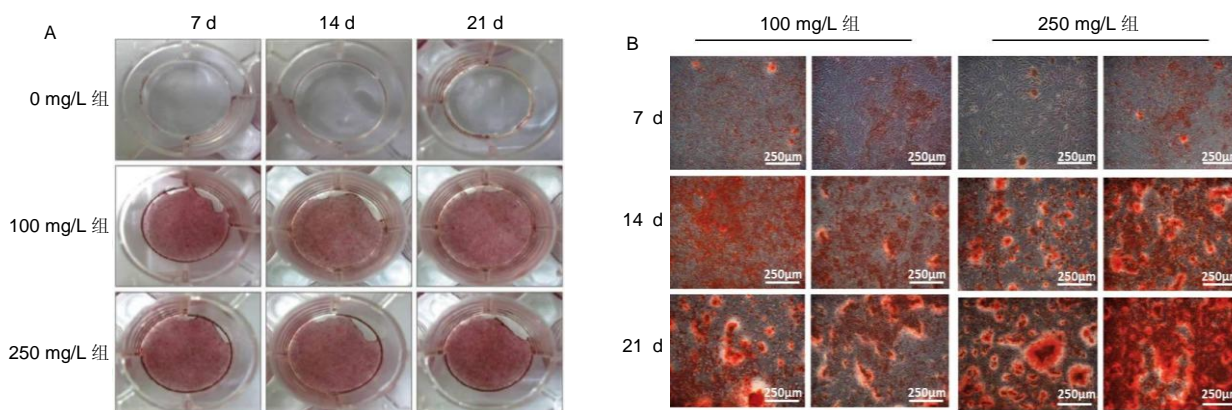
Figure 1 Alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells on the nano-hydroxyapatite/collagen composite after treated by different mass concentrations of osteopractic total flavone



图注: 相同时间点, 与 0 mg/L 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同组 1 周时比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 不同质量浓度骨碎补总黄酮干预后纳米骨材料上 MC3T3-E1 细胞培养上清内的骨钙蛋白水平

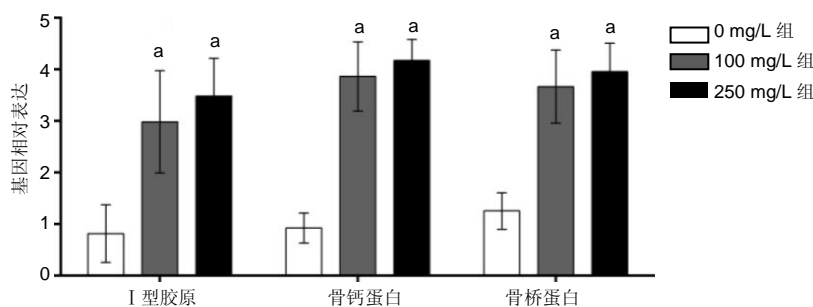
Figure 2 Level of osteocalcin in the culture supernatant of MC3T3-E1 cells on the nano-hydroxyapatite/collagen composite after treated by different mass concentrations of osteopractic total flavone



图注: 图中 A 为大体宏观观察结果, 中药干预 7, 14, 21 d, 0 mg/L 组染色最小, 但在 100, 250 mg/L 组中观察到增加的染色; B 为光学显微镜( $\times 40$ )观察结果, 250 mg/L 组中药干预 7 d 的钙化结节形成较 100 mg/L 组显著。

图 3 不同质量浓度骨碎补总黄酮干预后纳米骨材料上 MC3T3-E1 细胞的钙化结节形成

Figure 3 Formation of calcified nodules of MC3T3-E1 cells on the nano-hydroxyapatite/collagen composite after treated by different mass concentrations of osteopractic total flavone



图注: 与 0 mg/L 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 不同质量浓度骨碎补总黄酮干预 14 d 后纳米骨材料上 MC3T3-E1 细胞成骨基因的表达

Figure 4 Expression of osteogenic related genes of MC3T3-E1 cells on the nano-hydroxyapatite/collagen composite after treated by different mass concentrations of osteopractic total flavone

mRNA 的表达水平。100, 250 mg/L 组成骨能力无差异, 但显著高于 0 mg/L 组的成骨能力, 结果表明骨碎补总黄酮可有效促进 MC3T3-E1 细胞的分化、矿化。骨碎补总黄酮联合纳米骨材料培养的 MC3T3-E1 细胞, 具备良好的功能状态及生物学特性, 具备成骨效应。但实验在给药方面仍有不足, 后期研究将采用骨碎补总黄酮药物缓释体系缓慢释放药物, 以减少药物突释对细胞的影响。

**作者贡献:** 李晋玉、俞兴、蒋俊杰进行实验设计, 实验实施为白春晓、刘楚吟、张喆, 实验评估为孙旗, 资料收集为郑晨颖, 赵学千成文, 徐林、贾育松审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81503601, 81603517)、北京中医药大学东直门医院青苗人才项目(DZMYS-201802)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经北京中医药大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Shakir M, Jolly R, Khan AA, et al. Resol based chitosan/nanohydroxyapatite nanoensemble for effective bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2017;139:317-327.
- [2] 周静,冯卓卓,罗洁,等.纳米支架材料在骨组织工程应用中的优势[J].临床口腔医学杂志,2018,34(10):633-635.
- [3] 李晋玉,赵学千,孙旗,等.骨碎补总黄酮的实验及临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1357-1364.
- [4] 冯庆玲,崔福斋,张伟.纳米羟基磷灰石胶原骨修复材料[J].中国医学科学院学报,2002,24(2):124-128.
- [5] 李晋玉.骨碎补总黄酮联合纳米骨材料对成骨细胞增殖分化及血管新生的影响[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:121.
- [7] 史岩,马秋野,喻一东,等.骨碎补总黄酮促进骨质疏松性骨折愈合中参与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的初步研究[J].中医学报,2018,46(2):49-52.
- [8] 尹文哲,张小玲,叶义杰,等.骨碎补对微重力下共培养骨细胞中成骨细胞分化的影响[J].中医学报,2017,45(4):16-20.
- [9] 齐鹏飞,尹文哲,孙奇峰,等.失重下骨碎补总黄酮抑制JNK通路促进间充质干细胞增殖的研究[J].中医学报,2016,31(11):1742-1745.
- [10] 孙奇峰,尹文哲,高原,等.失重下骨碎补总黄酮经MAPK通路促进间充质干细胞向成骨细胞分化研究[J].中医学报,2016,44(4):10-13.
- [11] 刘伟,赵劲民,苏伟,等.骨碎补总黄酮可促进兔骨髓间充质干细胞的增殖和分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(32):6021-6026.
- [12] 舒晓春,刘君静,朱丹华,等.不同浓度的骨碎补总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J].中国病理生理杂志,2010,26(7):1261-1264.
- [13] Song S, Gao Z, Lei X, et al. Total Flavonoids of *Drynariae Rhizoma* Prevent Bone Loss Induced by Hindlimb Unloading in Rats. *Molecules*. 2017;22(7):1033.
- [14] 王鑫众,张利恒,罗浩,等.强骨胶囊与骨瓜提取物注射液治疗骨质疏松性股骨骨折的价值分析[J].中国药物经济学,2019,14(1):44-47.
- [15] 李刚建,闵奇,赵鑫.强骨胶囊联合骨瓜提取物注射液治疗骨质疏松性股骨骨折的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(5):1135-1139.
- [16] 翟景艳.强骨胶囊治疗老年Colles骨折术后的临床疗效[J].中国民康医学,2017,29(12):53-54.
- [17] 栾小红.强骨胶囊结合仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松性股骨骨折34例[J].河南中医,2014,34(10):1949-1950.
- [18] 刘国辉,陈东,杨述华,等.强骨胶囊治疗骨质疏松性股骨转子间骨折的临床观察[J].中西医结合研究,2010,2(1):4-6.
- [19] 高焱.骨碎补总黄酮治疗骨折延迟愈合和骨不连[J].中医正骨,2007,19(7):11-12,82.
- [20] 李慧英,孟东方,阮志磊.骨碎补总黄酮对激素性股骨头坏死血钙、血磷及空骨陷窝率的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(12):5352-5354.
- [21] 阮志磊.骨碎补总黄酮对激素性股骨头坏死的实验研究[D].郑州:河南中医学院,2015.
- [22] 王月芬.强骨胶囊治疗成人股骨头缺血性坏死216例[J].河南中医,2009,29(6):572-573.
- [23] 杨成.钻孔减压术配合强骨胶囊治疗成人股骨头缺血性坏死疗效观察[J].实用中医药杂志,2017,33(5):493-494.
- [24] 赵秀敏,艾红军,常新.成骨细胞和破骨细胞的传导通路和相关因子[J].中国实用口腔科杂志,2009,2(3):176-179.
- [25] 李彬,张柳.RUNX2与骨代谢的调控[J].中国骨质疏松杂志,2009,15(1):63-67.
- [26] 徐成峰,胡大海,赵周婷,张万福,白晓智,蔡维霞.兔骨髓间充质干细胞体外分离培养及多向诱导分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):1002-1005.
- [27] Zhang L, Hu Y, Sun, CY, et al. Lentiviral sh RNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu. *Cancer Sci*. 2010;101(5):1117-1124.
- [28] 张贤,朱丽华,钱晓伟,等.杜仲醇提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的Wnt信号途径[J].中国组织工程研究,2012,16(45):8520-8523.
- [29] Zhou PR, Liu HJ, Liao EY, et al. LRP5 polymorphisms and response to alendronate treatment in Chinese postmenopausal women with osteoporosis. *Pharmacogenomics*. 2014;15(6):821-831.