

淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化缓解小鼠骨质疏松的机制

<https://doi.org/10.12307/2022.376>张锦明¹, 田滢舟², 赵玲¹, 熊莉华¹, 王丘平¹, 宋薇¹, 温建炫¹

投稿日期: 2020-11-30

采用日期: 2021-02-18

修回日期: 2021-09-14

在线日期: 2021-10-09

中图分类号:

R459.9; R318; R285.5

文章编号:

2095-4344(2022)19-02991-06

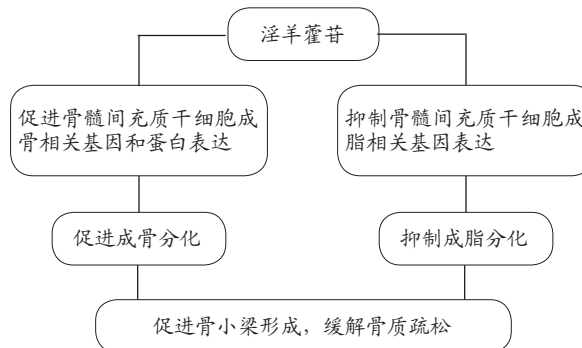
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△验证淫羊藿苷对小鼠骨质疏松的治疗作用;

△阐明淫羊藿苷促进小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的分子机制。



文题释义:

淫羊藿苷: 是传统中草药淫羊藿的主要有效成分, 具有雌激素样结构, 主要由黄酮类化合物、木质素、生物碱等组成, 传统中医认为其具有强筋健骨、补肾助阳的疗效, 作为骨性营养因子具有抑制破骨细胞生长、促进间充质干细胞成骨分化的作用, 常用于骨质疏松的治疗。

骨髓间充质干细胞: 是来源于中胚层具有多向分化潜能的干细胞, 在骨髓组织含量最为丰富。作为成骨细胞的主要来源, 其成骨分化减弱、成脂分化能力增强是导致骨质疏松的重要原因之一。骨髓间充质干细胞是机体内骨组织更新的唯一途径, 因此调控骨髓间充质干细胞的成骨分化将会有助于骨质疏松的治疗。

摘要

背景: 淫羊藿苷是临床用于治疗骨质疏松的常用中草药淫羊藿的主要活性成分, 但是其分子机制尚待深入研究。

目的: 探究淫羊藿苷缓解小鼠骨质疏松的效果和作用机制。

方法: 通过皮下连续注射地塞米松5周构建C57BL/6小鼠骨质疏松模型, 将20只造模成功的小鼠随机分成模型组和治疗组, 每组10只, 另选择10只未经造模的C57BL/6小鼠作为对照组, 治疗组灌胃给淫羊藿苷和生理盐水的混悬液, 模型组和对照组灌胃等量生理盐水, 每天给药1次, 给药期间每天监测小鼠状态, 并称重体质量。给药治疗2个月后, 采用Micro-CT机对胫骨近端干骺端进行扫描, 分析小鼠骨组织微观结构, 研究淫羊藿苷对小鼠骨质疏松的治疗效果。同时, 分离培养各组小鼠骨髓间充质干细胞, 流式细胞术检测其碱性磷酸酶、成骨特异性转录因子、骨钙素、转化生长因子 β 及RUNX家族转录因子2的表达量, qRT-PCR检测骨桥蛋白、骨涎蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ mRNA的表达水平, 茜素红和油红O染色检测成骨和成脂分化能力。

结果与结论: ①与对照组相比, 模型组小鼠胫骨和股骨总湿质量、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目明显下降($P < 0.01$), 骨小梁分离度变大($P < 0.001$), 骨皮质厚度变薄($P < 0.001$); 与模型组相比, 治疗组小鼠上述指标均明显改善($P < 0.05$); ②与模型组相比, 治疗组小鼠骨髓间充质干细胞中成骨相关基因或者相关蛋白的表达明显升高($P < 0.05$), 而成脂相关基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ mRNA的表达则显著下降; ③与模型组相比, 治疗组小鼠骨髓间充质干细胞茜素红染色吸光度值明显升高($P < 0.05$), 而油红O染色吸光度值明显降低($P < 0.05$); ④结果表明, 淫羊藿苷可能通过促进小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化, 抑制其成脂分化, 改善骨髓微环境, 促进骨小梁形成, 缓解骨质疏松。

关键词: 淫羊藿苷; 骨质疏松; 骨小梁; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

Icariin alleviates osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in mice

Zhang Jinming¹, Tian Yingzhou², Zhao Ling¹, Xiong Lihua¹, Wang Qiuping¹, Song Wei¹, Wen Jianxuan¹

¹Department of Endocrinology, ²Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Zhang Jinming, Master, Attending physician, Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Corresponding author: Tian Yingzhou, Master, Attending physician, Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院), ¹内分泌科, ²妇科, 广东省广州市 510120

第一作者: 张锦明, 男, 1984年生, 广东省梅州市人, 2011年广州中医药大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事糖尿病及其并发症、肥胖、骨质疏松症等内分泌代谢性疾病的中西医结合临床与基础研究。

通讯作者: 田滢舟, 硕士, 主治医师, 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)妇科, 广东省广州市 510120

<https://orcid.org/0000-0002-2695-2822>(张锦明)

基金资助: 广东省社会发展领域科技计划项目(2011KT1994), 项目负责人: 熊莉华

引用本文: 张锦明, 田滢舟, 赵玲, 熊莉华, 王丘平, 宋薇, 温建炫. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化缓解小鼠骨质疏松的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):2991-2996.



Abstract

BACKGROUND: Icaritin is the main active ingredient of epimedium, a commonly used Chinese herbal medicine for the treatment of osteoporosis, but its molecular mechanism needs to be studied in depth.

OBJECTIVE: To explore the effect and mechanism of icaritin on osteoporosis in mice.

METHODS: The osteoporosis models of C57BL/6 mice were constructed by subcutaneous injection of dexamethasone for 5 weeks. Totally 20 successfully modeled mice were randomly divided into a model group and a treatment group ($n=10$). An additional 10 non-modeled C57BL/6 mice were used as a control group. The treatment group was given a suspension of icaritin and saline by intragastric administration; the model group and the control group were given the same amount of saline, once a day. The state of the mice was monitored every day during the administration, and the body weight was measured. Two months after the treatment, Micro-CT machine was used to scan the proximal tibia metaphysis to analyze the microstructure of the bone tissue in mice, and to study the therapeutic effect of icaritin on osteoporosis in mice. Simultaneously, bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured in each group. The expression levels of alkaline phosphatase, osteogenic specific transcription factor, osteocalcin, transforming growth factor β , and RUNX family transcription factor 2 were detected by flow cytometry. The expression levels of osteopontin, bone sialoprotein, and peroxisome proliferator activated receptor γ mRNA were determined using qRT-PCR. Alizarin red staining and oil red O staining were applied to detect osteogenic and adipogenic differentiation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the bone wet weight, bone volume fraction, trabecular thickness, and trabecular number significantly decreased ($P < 0.01$), trabecular separation became larger ($P < 0.001$), and bone cortical thickness became thinner in the model group ($P < 0.001$). Compared with the model group, above indicators of mice in the treatment group were significantly improved ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, the expression of osteogenic related genes or proteins was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of lipogenic related gene peroxisome proliferator activated receptor gamma mRNA was significantly decreased in the treatment group. (3) Compared with the model group, the absorbance value of alizarin red staining was significantly increased in mouse bone marrow mesenchymal stem cells of the treatment group ($P < 0.05$), while the absorbance value of oil red O staining was significantly reduced ($P < 0.05$). (4) The results suggest that icaritin may relieve osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells, inhibiting their adipogenic differentiation, improving bone marrow microenvironment, and finally promoting trabecular bone formation.

Key words: icaritin; osteoporosis; trabecular bone; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

Funding: Social Development Field Science and Technology Project of Guangdong Province, No. 2011KT1994 (to XLH)

How to cite this article: ZHANG JM, TIAN YZ, ZHAO L, XIONG LH, WANG QP, SONG W, WEN JX. Icaritin alleviates osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(19):2991-2996.

0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种以骨组织量减少、骨质吸收增多、骨质微观结构退化、骨脆性增加为主要特征的全身代谢性疾病^[1]。骨质疏松症由于骨强度下降,易发生骨质疏松性骨折,而骨质疏松性骨折及其并发症的致残和致死率明显增加,给家庭和社会带来很大的经济负担,严重影响了生活质量^[2]。骨质疏松症病因十分复杂,包括雌激素水平下降、年龄增长导致的衰老、糖皮质激素类药物的过量使用等都会导致骨质疏松症发病^[3-4]。尽管骨质疏松的发病机制不尽相同,但是都主要表现为骨形成减少、骨吸收增加的骨重建平衡破坏^[5]。因此,促进骨形成、抑制骨吸收从而补充丢失的骨组织,是治疗骨质疏松症的关键。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为成骨细胞的主要来源,其成骨分化能力减弱、成脂分化能力增强是导致骨质疏松的重要原因之一^[6-7]。骨髓间充质干细胞是机体内骨组织更新的唯一途径,因此调控骨髓间充质干细胞的成骨分化将会有助于骨质疏松的治疗^[8-9]。

淫羊藿苷(Icaritin, ICA)是传统中草药淫羊藿的主要有效成分,主要由黄酮类化合物、木质素、生物碱等组成,传统中医认为其具有强筋健骨、补肾助阳的疗效,常用于骨质疏松的治疗^[10]。近年来的研究表明,淫羊藿苷具有促进骨髓间充质干细胞成骨分化的潜力,是一种效果良好的骨诱导活性因子^[8]。为此,该实验研究淫羊藿苷对骨质疏松小鼠的治疗效果和作用机制,为其在骨质疏松的临床治疗上提供更多更充分的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验,组间均数差异采用单因素方差分析(One Way ANOVA),进一步采用最小显著性差异法(LSD法)进行多重两两比较。

1.2 时间及地点 实验于2019年2-9月在广东省中医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性C57BL/6小鼠30只,6周龄,体质量18g左右,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0008,饲养温度25℃,湿度50%。

1.3.2 实验试剂 淫羊藿苷(成都曼斯特生物科技有限公司);地塞米松(Sigma公司);PBS、DMEM/F12培养基(Hyclone公司);牛血清白蛋白、红细胞裂解液(Biosharp公司);Percoll分离液(GE公司);Trizol、反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司);抗小鼠碱性磷酸酶、成骨特异性转录因子(Osterix)、骨钙素(Osteocalcin)、转化生长因子 β 及RUNX家族转录因子2(RUNX family transcription factor 2, RUNX2)抗体(BioLegend公司);核内转录因子染色试剂盒(上海优宁维公司);茜素红染液、油红O染料(Solarbio公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨质疏松症造模、分组与治疗 小鼠适应性培养1周后开始造模。取20只小鼠按40 mg/kg皮下注射地塞米松,1次/d,连续给药5周,另取10只小鼠注射等体积生理盐水,

1 次/d, 给药 5 周。造模成功后, 将 20 只骨质疏松症小鼠随机分成模型组和治疗组, 每组 10 只, 另 10 只未造模的小鼠作为对照组。按下列方式给药: 治疗组灌胃淫羊藿苷和生理盐水的混悬液, 0.5 mL/d(对应 3 mg 淫羊藿苷), 对照组、模型组灌胃等体积生理盐水。连续给药 2 个月, 每天监测其体质量变化。

1.4.2 骨组织结构分析 治疗结束后, 麻醉后将小鼠用脊柱脱臼法处死, 取仰卧位固定, 使用 Micro-CT 扫描机对胫骨近端干骺端进行扫描, 选取的感兴趣区大小为 0.6 mm×0.6 mm×0.6 mm。通过重构骨骼三维结构图, 观察分析骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目、骨小梁分离度、骨皮质厚度等结构参数。

1.4.3 骨组织称质量 将上述处死后小鼠的双侧股骨和胫骨取出, 剔除附着的肌肉和软组织, 用电子天平称量骨组织湿质量。

1.4.4 骨髓间充质干细胞分离 剪去胫骨和股骨的骨骺两端, 用 1 mL 无菌注射器吸取 DMEM/F12 培养基, 插入骨髓腔中将骨髓冲出, 多次冲洗至骨髓腔变成白色, 经 40 μm 细胞筛过滤、红细胞裂解液裂解红细胞后, 离心, 获得骨髓细胞。将骨髓细胞用 PBS 重悬, 缓慢加至 Percoll 分离液上 (1.082 g/mL), 500×g 离心 30 min, 吸取界面层细胞, 再以 PBS 洗涤 2 次, 获得骨髓间充质干细胞。使用 DMEM/F12 完全培养基 (含体积分数为 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素) 培养 72 h 后用于实验。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源: 小鼠胫骨和股骨骨髓

原代培养方法: 密度梯度离心法

基础培养基: DMEM/F12 培养基

添加材料: 体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素

原代培养时间: 原代细胞培养 72 h 后换液并用于实验

细胞鉴定: 流式细胞术鉴定

伦理学批准: 该实验经广东省中医院动物实验伦理委员会批准

1.4.5 流式细胞术检测相关蛋白表达量 取培养 72 h 的原代细胞, 用含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 于 4 °C 封闭 30 min, 将 1×10⁶ 细胞 (100 μL 细胞悬液) 按核内转录因子染色试剂盒说明书进行固定、破膜, 加入适量抗小鼠碱性磷酸酶、成骨相关转录因子 (Osterix)、骨钙素 (Osteocalcin)、转化生长因子 β 及 RUNX 家族转录因子 2 (RUNX2) 抗体, 4 °C 避光孵育 45 min, 离心, 使用核内转录因子染色试剂盒中的染色缓冲液重悬, 上流式细胞仪检测上述蛋白的表达量。

1.4.6 RT-PCR 检测相关基因表达量 取 1×10⁶ 培养 72 h 的原代骨髓间充质干细胞, 使用 Trizol 法提取细胞总 mRNA, 取 1 μg mRNA 用诺唯赞反转录试剂盒反转录成 cDNA。qPCR 反应体系为 20 μL, 其中 SYBR Green Mix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 1.6 μL, ddH₂O 7.4 μL。反应条件为: 95 °C 预变

性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火、延伸 30 s, 反应 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析目的基因骨桥蛋白、骨涎蛋白和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的相对表达量。引物序列, 见表 1。

表 1 | 各基因引物序列

Table 1 | Primer sequences of each gene

基因	引物序列 (5'→3')
β-actin	Forward: GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG Reverse: CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T
骨桥蛋白	Forward: AGC AAG AAA CTC TTC CAA GCA A Reverse: GTG AGA TTC GTC AGA TTC ATC CG
骨涎蛋白	Forward: CAG GGA GGC AGT GAC TCT TC Reverse: AGT GTG GAA AGT GTG GCG TT
过氧化物酶体增殖物 激活受体 γ	Forward: TCG CTG ATG CAC TGC CTA TG Reverse: GAG AGG TCC ACA GAG CTG ATT

1.4.7 茜素红和油红 O 染色 将分离得到的原代骨髓间充质干细胞浓度调整至 1×10⁸ L⁻¹, 接种至 12 孔板, 每孔 1.5×10⁵ 个细胞, 每组 5 个复孔。培养 72 h 后, 吸去 DMEM/F12 完全培养基, PBS 洗 3 遍, 加入 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗 3 次, 加茜素红染液避光染色 30 min, 吸除染料, PBS 再次冲洗 3 次, 加入 10% 氯化十六烷基吡啶洗脱结合到钙结节上的染料, 使用酶标仪在 540 nm 处测定吸光度值。

同样的, 将骨髓间充质干细胞培养 72 h 后, 吸去 DMEM/F12 完全培养基, PBS 洗 3 遍, 加入 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗 3 次, 按油红 O 染液 (60% 异丙醇配制, 浓度 0.5%) : 蒸馏水 = 3 : 2 的比例染色 10 min, 弃去染料, 体积分数为 75% 乙醇漂洗至溶液无色, 加入 150 μL 异丙醇抽提油红染料, 使用酶标仪在 510 nm 处测定吸光度值。

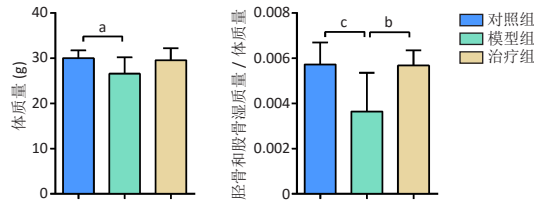
1.5 主要观察指标 ①碱性磷酸酶、成骨特异性转录因子、骨钙素、转化生长因子 β 及 RUNX 家族转录因子 2 阳性细胞率; ②骨桥蛋白、骨涎蛋白及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的 mRNA 表达量。

1.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 20.0 统计学软件分析各组数据之间的统计学差异。采用单因素方差分析 (One Way ANOVA) 比较组间均数的差异, 进一步采用最小显著性差异法 (LSD 法) 进行多重两两比较。P < 0.05 为差异有显著性意义, P < 0.01 及 P < 0.001 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验 C57BL/6 小鼠 30 只, 进入结果分析 30 只, 中途无脱落。

2.2 淫羊藿苷对骨质疏松小鼠体质量和股骨、胫骨湿质量的影响 使用地塞米松对小鼠进行皮下给药诱导骨质疏松发生后, 模型组小鼠的体质量及股骨、胫骨湿质量明显低于对照组 (P < 0.05)。与模型组比较, 治疗组小鼠经淫羊藿苷治疗 2 个月后, 其体质量有一定程度恢复, 而股骨和胫骨的总湿质量显著升高 (P < 0.01), 见图 1, 说明淫羊藿苷有助于缓解小鼠骨质疏松的进展。

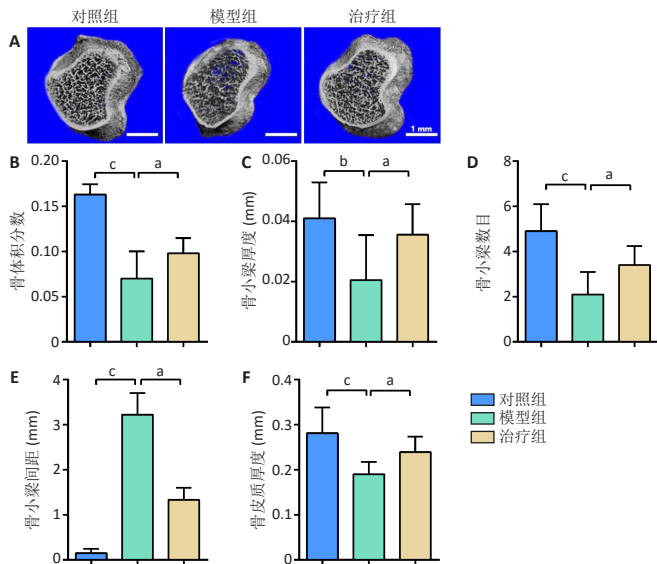


图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 1 | 各组小鼠体重及胫骨、股骨总湿质量变化

Figure 1 | Mouse body weight and tibia and femur wet weight in each group

2.3 淫羊藿苷对骨质疏松小鼠骨组织形态的影响 治疗结束后使用 Micro-CT 对小鼠胫骨进行扫描分析。与对照组相比,模型组骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目明显下降 ($P < 0.01$),骨小梁分离度变大 ($P < 0.001$),骨皮质厚度变薄 ($P < 0.001$)。经淫羊藿苷灌胃给药后,治疗组骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目均比模型组有显著增加 ($P < 0.05$),骨小梁分离度明显减小 ($P < 0.05$),骨皮质厚度明显增加 ($P < 0.05$),见图 2。



图注: 图 A 为各组小鼠 Micro-CT 图片; B-F 分别为各组小鼠骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数目 (Tb.N)、骨小梁间距 (Tb.Sp) 及骨皮质厚度 (CW)。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

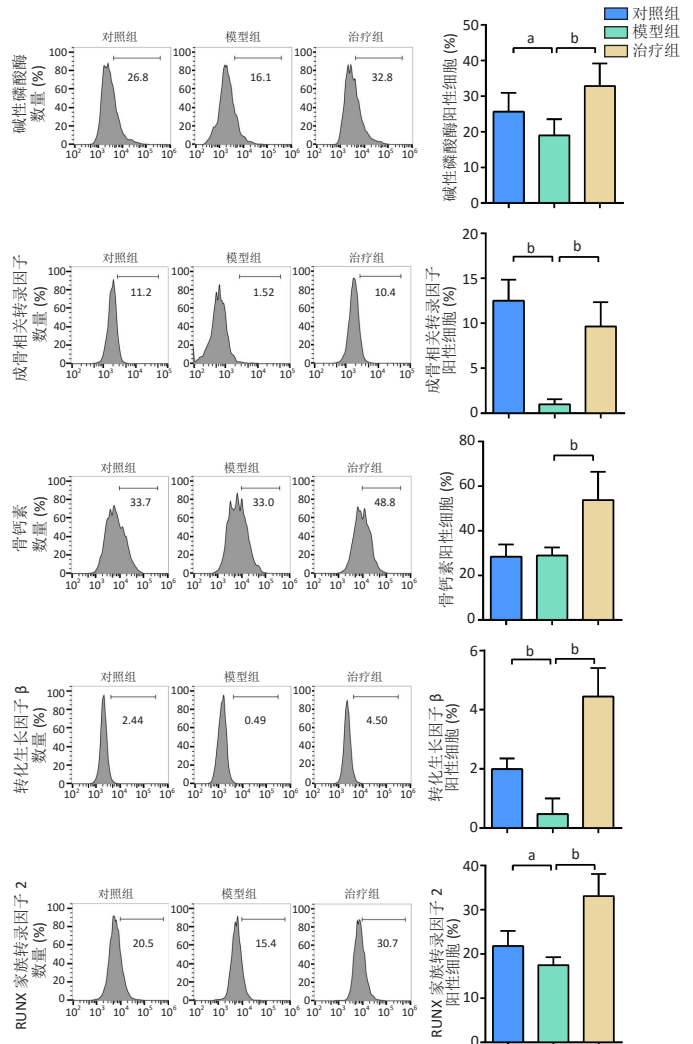
图 2 | 各组小鼠骨组织形态相关系数变化

Figure 2 | Changes in correlation coefficients of mouse bone tissue morphology in each group

以上结果说明,淫羊藿苷能够明显促进小鼠骨小梁的生成,促进小鼠骨组织微观结构的恢复,有助于缓解骨质疏松。

2.4 淫羊藿苷调控骨髓间充质干细胞成骨分化 流式细胞术检测结果见图 3,与对照组比较,模型组小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化相关指标碱性磷酸酶、成骨相关转录因子、骨钙素、转化生长因子 β 及 RUNX 家族转录因子 2 表达量均有不同程度下降,而经淫羊藿苷治疗后,这些成骨分化相关指标的表达量明显提高 ($P < 0.01$)。

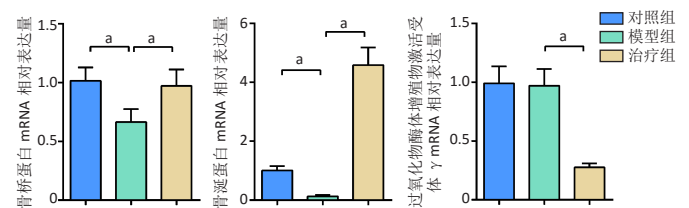
RT-PCR 检测结果见图 4,与模型组比较,治疗组小鼠骨髓间充质干细胞中骨桥蛋白、骨涎蛋白的表达水平均有显著上调,而成脂分化相关基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的表达量明显下降 ($P < 0.05$)。



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$

图 3 | 流式细胞术检测小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化相关指标变化

Figure 3 | Changes of markers related to osteogenic differentiation in mouse bone marrow mesenchymal stem cells detected by flow cytometry

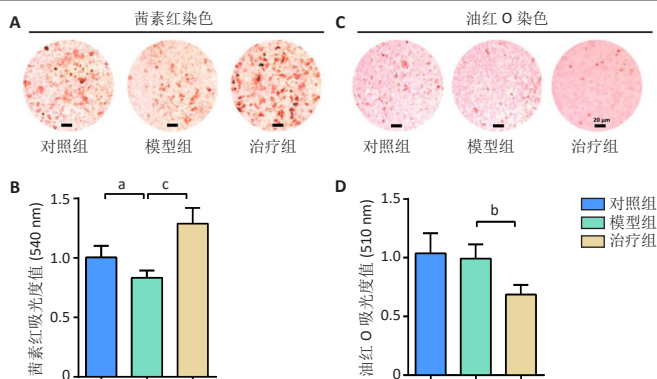


图注: ^a $P < 0.001$

图 4 | RT-PCR 检测各组小鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化相关指标的 mRNA 表达量

Figure 4 | RT-PCR detection of mRNA expression of osteogenic and adipogenic differentiation related indexes of mouse bone marrow mesenchymal stem cells in each group

为了进一步验证淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响,使用茜素红染色和油红 O 染色检测钙结节形成和脂滴形成情况,见图 5,与模型组比较,治疗组小鼠骨髓间充质干细胞的茜素红染色吸光度值显著升高 ($P < 0.001$),说明其成骨能力增强,而治疗组小鼠骨髓间充质干细胞油红 O 染色吸光度值显著下降 ($P < 0.001$)。以上结果说明,淫羊藿苷可能通过促进骨髓间充质干细胞成骨分化、抑制其成脂分化,发挥缓解小鼠骨质疏松症的疗效。



图注: 图 A, B 为茜素红染色检测各组小鼠骨髓间充质干细胞钙结节形成情况 (标尺为 20 μm); C, D 为油红 O 染色检测各组小鼠骨髓间充质干细胞脂滴形成情况 (标尺为 20 μm)。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 5 | 各组小鼠骨髓间充质干细胞钙结节、脂滴形成情况

Figure 5 | Calcium nodules and lipid droplet formation in mouse bone marrow mesenchymal stem cells in each group

2.5 生物相容性 淫羊藿苷具有较好的生物相容性, 对小鼠无明显毒性。

3 讨论 Discussion

骨质疏松症是骨强度降低导致骨折危险性显著增加的骨骼疾病^[11]。很大比例人群在 30 岁后体内骨量会以 1% 的速度逐年递减, 最终导致骨质疏松的人数占中国总人口的 7% 左右^[12-13]。骨质疏松的致病因素很复杂, 遗传、环境、营养状况等作用下, 破坏了原本处于动态平衡的骨形成和骨吸收, 从而导致了骨质疏松的发生^[5, 9]。

在中医临床看来, 骨质疏松症属于“骨痹”“骨痿”“骨枯”的范畴, 肝肾虚衰导致筋骨失养, 而肾虚是骨质疏松的根源^[5, 14]。因此, 主要以补肾壮骨类中药对骨质疏松症进行调理治疗。淫羊藿是中国传统的中草药, 为小檗科淫羊藿属植物, 具有强筋健骨、补肾助阳的功效^[10], 是中医治疗骨质疏松症方剂中常用的中草药^[15]。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分, 具有雌激素样结构, 近年来作为骨性营养因子广泛应用于骨质疏松的治疗, 具有抑制破骨细胞生长、促进间充质干细胞成骨分化的作用^[16-18], 但是对其机制的研究大部分集中于体外实验, 鲜有进一步体内实验研究其给药后的作用机制。

骨髓间充质干细胞是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞, 在骨髓组织中含量为最丰富^[19]。骨髓间充质干细胞具有自我复制和多向分化的干细胞共性, 在合适的培养条件下, 能够向成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、软骨细胞等多种细胞分化, 为骨修复提供了重要的细胞来源^[17, 20]。有大量的研究表明, 骨髓间充质干细胞与骨质疏松症之间存在密切联系, 其向成骨分化能力减弱或者成脂分化能力加强都会导致骨质疏松的发生^[21-22]。因此, 从干细胞角度着手, 调控骨髓间充质干细胞的成骨分化, 是目前治疗骨质疏松症的研究热点之一^[17-19]。

骨髓间充质干细胞在一定条件下分化为成骨细胞, 成

骨细胞是发挥骨形成功能的主要细胞, 可以合成分泌细胞外基质成分, 负责骨基质的合成和矿化^[21, 23]。成骨细胞鉴定指标包括碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白、骨涎蛋白、转化生长因子 β 、成骨相关转录因子及 RUNX 家族转录因子 2 等^[9, 17]。碱性磷酸酶是骨代谢过程中的重要蛋白, 是细胞外基质成熟的早期标志之一, 是骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的重要指标, 其表达量随着成骨细胞分化程度的加深而升高^[24]。碱性磷酸酶能够分解有机磷酸酯, 释放出无机磷, 为羟基磷灰石的沉积提供必要的无机磷酸, 促进骨组织矿化^[25]。骨钙素是骨基质中首要的非胶原蛋白成分, 是成骨细胞成熟和发挥功能的特异性标志^[26]。骨桥蛋白和骨涎蛋白都是磷酸化硫化的糖蛋白, 能够有效吸附羟基磷灰石, 引导矿化, 促进骨形成, 也都是成骨细胞分化的标志^[17, 27]。在成骨细胞和破骨细胞参与的骨形成和骨吸收动态平衡中, 转化生长因子 β 通过多种途径促进成骨细胞分化, 促进胞外基质合成^[17]。成骨相关转录因子和 RUNX 家族转录因子 2 是在成骨细胞分化过程中起决定作用的 2 个转录因子^[28], 影响着间充质干细胞、脂肪干细胞等干细胞的成骨向分化^[29]。许多体外研究都表明, 淫羊藿苷能够通过调控 PI3K/AKT-eNOS^[30]、Notch^[31]、Wnt^[32]、MAPK 等信号通路^[33], 增加碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白、骨涎蛋白的表达量, 上调成骨相关转录因子和 RUNX 家族转录因子 2 的表达水平, 促进间充质干细胞成骨分化^[34-35]。该实验结果也表明, 淫羊藿苷可以在体内促进骨髓间充质干细胞的成骨分化, 促进骨生长, 缓解骨质疏松, 而且淫羊藿苷能够明显抑制骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的 mRNA 表达水平。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 是脂肪分化的重要调控因子, 对间充质干细胞的成脂分化起到关键性调控作用^[36]。治疗组油红 O 染色程度下降, 脂滴形成能力减弱, 说明淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞成脂分化能力削弱。综上, 淫羊藿苷可能通过抑制骨髓间充质干细胞成脂分化来发挥缓解骨质疏松的作用。

总而言之, 通过灌胃淫羊藿苷对骨质疏松小鼠进行给药治疗, 能够上调小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化相关指标的表达, 抑制成脂分化指标的表达, 改善骨髓微环境, 促进骨形成, 增加骨质疏松小鼠骨体积分数、骨皮质厚度、骨小梁厚度、骨小梁数目, 减小骨小梁间距, 显著改善骨质疏松症状。该研究为淫羊藿苷的临床应用提供了强有力的理论依据, 为中医药与干细胞疗法相结合展示了新的可能性。

作者贡献: 实验设计为熊莉华, 实验实施为张锦明、田滢舟, 实验评估为赵玲, 资料收集为温建炫、宋薇、王丘平。

经费支持: 该文章接受了“广东省社会发展领域科技计划项目(2011KT1994)”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。

机构伦理问题: 实验方案经广东省中医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2019047。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

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: 文章统计学方法已经通过广东省中医院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] LEWIECKI EM. New and emerging concepts in the use of denosumab for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2018; 10(11):209-223.
- [2] 周圆媛. 维甲酸诱发 C57 小鼠骨质疏松模型的形态学和骨密度变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2019,39(17):4312-4314.
- [3] BACCARO LF, CONDE DM, COSTA-PAIVA L, et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging.* 2015;10:583-591.
- [4] 余海, 徐晓娟, 沈霖, 等. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度、骨转换标志物及骨桥蛋白的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2016, 24(1):21-23.
- [5] 朱静栋, 孔西建, 吴丹, 等. 骨松强骨方治疗肾阳虚血瘀型原发性骨质疏松症疗效观察 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2017,26(4): 343-345,349.
- [6] GNECCHI M, MELO LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol.* 2009;482: 281-294.
- [7] AURICH I, MUELLER LP, AURICH H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut.* 2007;56(3):405-415.
- [8] 李焯, 肖亚平, 李晶晶, 等. 淫羊藿对骨髓间充质干细胞影响的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2017,52(24):2137-2140.
- [9] 李焯, 董杰, 周衍晶, 等. 补肾壮骨中药抗骨质疏松有效成分及其药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015,40(6):1038-1043.
- [10] 黄明炜, 廖勇敢. 淫羊藿总黄酮调节骨代谢作用及药理机制的研究新进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014,20(4):452-456.
- [11] HADJIDAKIS DJ, ANDROULAKIS II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396.
- [12] 蒋凤艳. 原发性骨质疏松症的发病机制和预防 [J]. *广西医科大学学报*, 2004,21(3):457-459.
- [13] 施晓红, 周连华, 李益明. 细胞因子与 2 型糖尿病周围神经病变的相关性研究 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2012,12(1):27-29.
- [14] 刘宝忠. 中医治疗骨质疏松症的研究和进展 [J]. *内蒙古中医药*, 2014, 33(2):116-118.
- [15] 马慧萍, 贾正平, 白孟海, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2003,19(2):187-190.
- [16] 张帆. 淫羊藿苷诱导人脐带间充质干细胞分化为成骨细胞的实验研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [17] 李会珍, 李蒙, 李瑞玉, 等. 淫羊藿对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2014,18(6):979-984.
- [18] 陈震东, 高辉, 徐房添. 淫羊藿苷促进间充质干细胞成骨分化: 为治疗骨缺损提供一个良好的方向 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(50):7594-7600.
- [19] 李磊, 郑怀亮, 寇玉, 等. 淫羊藿苷诱导骨髓间充质干细胞成骨细胞分化的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018,33(6):2599-2601.
- [20] 池玉磊, 卜宪敏, 查玉梅, 等. 骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损: 研究现状及前景展望 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(29): 4749-4756.
- [21] 卞琴, 刘书芬, 黄建华, 等. 3 种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(5):889-893.
- [22] ZORN AM. Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol.* 2001; 11(15):R592-595.
- [23] BIAN Q, HUANG JH, YANG Z, et al. Effects of active ingredients in three kidney-tonifying Chinese herbal drugs on gene expression profile of bone marrow stromal cells from a rat model of corticosterone-induced osteoporosis. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2011;9(2):179-185.
- [24] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识 (2019)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(10):1357-1372.
- [25] ŠTEFKOVÁ K, PROCHÁZKOVÁ J, PACHERNÍK J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int.* 2015;2015:628368.
- [26] SATO S, TAKEDA S. The regulation of various organs by osteoblasts. *Clin Calcium.* 2016;26(5):721-727.
- [27] KLEIN A, BARANOWSKI A, RITZ U, et al. Effect of bone sialoprotein coating on progression of bone formation in a femoral defect model in rats. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2020;46(2):277-286.
- [28] 杨光正, 张文杰, 丁迅, 等. Runx2、Osterix 转录因子过表达驱动内皮细胞成骨分化的机制探讨 [J]. *上海口腔医学*, 2017,26(4): 353-357.
- [29] BAGLIO SR, DEVESCOVI V, GRANCHI D, et al. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene.* 2013;527(1):321-331.
- [30] 郭晓宇, 李唯, 陈克明, 等. 淫羊藿苷通过 PI3K/AKT-eNOS 信号途径促进大鼠骨髓基质细胞的成骨性分化 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7):966-970.
- [31] BIAN Q, HUANG JH, LIU SF, et al. Different molecular targets of Icaritin on bMSCs in CORT and OVX-rats. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4: 1224-1236.
- [32] 涂艳, 熊莉娜, 柳湘洁, 等. 淫羊藿苷对成骨细胞成骨分化的影响及 Wnt/catenin 信号系统的关系研究 [J]. *中国中医急症*, 2017,26(3): 448-450,466.
- [33] 龚一听. 淫羊藿次苷 II 通过 p38 MAPK 信号通路调控成骨细胞护骨素表达和成骨分化研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [34] 吴曦, 彭锐. 不同浓度淫羊藿苷对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(5):669-674.
- [35] 翟远坤, 王鸣刚, 李志忠, 等. 淫羊藿苷含药血清对体外培养骨髓间充质干细胞增殖及成骨性分化的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(2):480-484.
- [36] 刘中胜, 杨建虹. 未羧化骨钙素对高糖条件下小鼠骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的调控效应 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(13): 2039-2046.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)