

淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程 BMP-2/RunX2/OSX 通路的影响

梁广胜^{1,2} 陈伟才¹ 殷娣娣³ 殷明¹ 曹雪琴¹

摘要 **目的** 探讨淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化过程中 BMP-2/RunX2/OSX 信号通路的影响。**方法** 将培养的第 3 代 BMSCs 随机分为对照组、实验组及抑制剂组, 对照组细胞予 0.2% 二甲亚砜加 OS 液加 DMEM/F12 培养基培养, 实验组加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮进行干预, 抑制剂组予 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮加 1 $\mu\text{g/mL}$ NOGGIN 重组蛋白干预, 9 天后测定碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 茜素红染色法染色并观察钙结节密度, RT-PCR 法检测成骨相关蛋白 (I 型胶原、骨钙蛋白及骨桥蛋白) 及 BMP-2/RunX2/OSX 信号通路相关因子的转录表达。**结果** 与对照组比较, 实验组经定向成骨诱导后 BMSCs ALP 活性增强, 钙结节密度显著增大, I 型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白表达量增加, 成骨相关转录因子 BMP-2、RunX2 和 OSX 的表达量亦增加 ($P < 0.05$)。与实验组比较, 抑制剂组 BMSCs ALP 活性降低 ($P < 0.05$), 钙结节密度降低, I 型胶原、骨钙蛋白及骨桥蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮能通过 BMP-2/RunX2/OSX 信号通路促进 BMSCs 定向成骨分化的进程。

关键词 骨质疏松; 淫羊藿总黄酮; 骨髓间充质干细胞; BMP-2/RunX2/OSX 信号通路; 成骨分化

Effect of Total Flavonoids of *Herba Epimedium* on BMP-2/RunX2/OSX Signaling Pathway during Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells LIANG Guang-sheng^{1,2}, CHEN Wei-cai¹, YIN Chang-chang³, YIN Ming¹, and CAO Xue-qin¹ 1 School of Medicine, Graduate School, Nanchang University, Nanchang (330006); 2 Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang (330006); 3 Center for Biochemical Research, Jiujiang College, Jiangxi (332000)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of total flavonoids of *Herba Epimedium* (FHE) on BMP-2/RunX2/OSX signaling pathway in promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Passage 3 BMSCs were randomly divided into the control group, the experimental group, and the inhibitor group. BMSCs in the control group were cultured in 0.2% dimethyl sulfoxide + Osteogenex Supplement (OS) fluid + DMEM/F12 culture media. BMSCs in the experimental group were intervened by 20 $\mu\text{g/mL}$ FHE. BMSCs in the inhibitor group were intervened by 20 $\mu\text{g/mL}$ FHE and 1 $\mu\text{g/mL}$ NOGGIN recombinant protein. At day 9 alkaline phosphatase (ALP) activity was measured. Calcium nodules were stained by alizarin red staining and the density was observed. The transcription expression of osteogenic differentiation-related proteins (type I collagen, osteocalcin, and osteopontin) and related factors of BMP-2/RunX2/OSX signaling pathway was assayed by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, ALP activities were enhanced and the density of calcium nodules significantly increased; type I collagen, osteocalcin, and osteopontin expression levels were increased in the experimental group. The expression of osteogenesis-related transcription factor was also increased in the experimental group. Noggin recombinant protein inhibited FHE promoting BMSCs osteogenesis in the inhibitor group. Compared with the experimental group, ALP activity decreased ($P < 0.05$), the density of

作者单位: 1. 南昌大学研究生院医学部 (南昌 330006); 2. 南昌大学第二附属医院骨科 (南昌 330006); 3. 九江学院生化研究中心 (江西 332000)

通讯作者: 陈伟才, Tel: 18907085148, E-mail: cwdoctor@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.05.0614

calcium nodules was lowered, expression levels of type I collagen, osteocalcin, osteopontin significantly decreased ($P < 0.05$) in the inhibitor group. Conclusion 20 $\mu\text{g/mL}$ FHE promoted osteogenic differentiation process of BMSCs by BMP-2/RunX2/OSX signaling pathway.

KEYWORDS osteoporosis; total flavonoids of *Herba Epimedium*; bone marrow mesenchymal stem cell; BMP-2/RunX2/OSX signaling pathway; osteogenic differentiation

骨质疏松症是一种以全身骨量降低和骨组织微结构破坏并造成脆性增加,进而增加诱发骨折的风险为特征的全身性疾病^[1]。性激素缺乏是造成绝经后骨质疏松症的常见原因之一,因此雌激素替代治疗成为治疗的首选方法^[2],但长期使用激素会导致心血管疾病、子宫内膜癌、乳腺癌等发生风险增加^[3]。因此,寻求一种适于长期治疗且不良反应较少的替代治疗成为热点^[4]。研究表明,淫羊藿对骨质疏松症具有明显的干预和治疗作用^[5,6]。体外研究也发现,淫羊藿总黄酮可以诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化^[7],本研究基于 BMP-2 通路研究淫羊藿总黄酮诱导 BMSCs 分化为成骨细胞的分子机制。

材料与方法

1 动物 4 周龄健康清洁级 SD 大鼠 5 只,雌雄不限,体重约 40 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,质量合格证号:HNASLKJ20122049。

2 药物 药材购自江西省九江市中医院,存放于九江学院基础医学院生化教研室实验室。提取方法:采用超声波辅助的 75% 乙醇浸提,用旋转蒸发将乙醇提取液浓缩,后用聚酰胺对其进行纯化,再经冷冻干燥得到淫羊藿总黄酮的干燥品(用淫羊藿总黄酮作标准品,采用紫外分光光度法测得所提取的淫羊藿总黄酮为 78%),其提取剂量为 22.16 mg/g。淫羊藿总黄酮呈粉末状,黄棕色或红棕色,并配制成 0.02 mg/mL 的淫羊藿总黄酮^[8](含 0.2% 二甲基亚砜)贮存液,以备相应实验组的细胞学实验。

3 试剂与仪器 DMEM/F12 (Hyclone 公司,澳大利亚),Fetal Bovine Serum (Gibco 公司,美国),0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA),PBS 粉剂、细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司),校准品及质控血清(中生北控生物科技股份有限公司),胎牛血清(Hyclone 公司,澳大利亚),二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司),Recombinant Murine NOGGIN 重组蛋白(Peprtech 公司,美国),(ALP) Assay Kit Based on IFCC(2007)(上海沪震实业有限公司,中国),Osteogenic Supplement (R&D 公司,美国),Cell

Counting Kit 及 GREENspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司),PCR 试剂盒、DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司),茜素红粉(西陇化工股份有限公司)。24 孔培养板(Corning 公司,美国),TS100-F 倒置相差显微镜(Nikon 公司,日本),L-3180 型半自动生化分析仪(上海科华实验系统有限公司),CO₂ 恒温水浴箱(SIM 公司),超净台(苏州净化设备有限公司),Model680 型酶标仪(Bio-RAD 公司,美国),超速离心机(Sigma 公司,美国),低温保存箱(Haier,中国)。

4 细胞分组及 BMSCs 成骨诱导 参照参考文献[7],采用全骨髓贴壁法培养获得原代 BMSCs。完全培养基培养细胞,待细胞长满培养瓶后按 1:3 比例传代,传至 P3 代 BMSCs,以备实验所用。选取生长良好的 P3 代 BMSCs,按 5×10^7 /孔的密度接种于 24 孔板,待细胞融合度达 80% ~ 90% 时,去除原培养基,加入含或不含有淫羊藿总黄酮的 OS 培养基进行成骨分化诱导。将细胞分为 3 组:对照组(0.2% 二甲基亚砜加 OS 液加 DMEM/F12 培养基)、实验组(20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮加 0.2% 二甲基亚砜加 OS 液加 DMEM/F12 培养基)及抑制剂组(20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮加 1 $\mu\text{g/mL}$ NOGGIN 重组蛋白加 0.2% 二甲基亚砜加 OS 液加 DMEM/F12 培养基)。以后每 2 ~ 3 天更换培养基,连续培养 9 天,用于以下检测。

5 观察指标及检测方法

5.1 ALP 活性测定 成骨诱导的第 3、6、9 天,将细胞用 PBS 漂洗 3 遍,加入细胞裂解剂 200 μL ,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 ALP Assay Kit Based on IFCC(2007)推荐的磷酸对硝基苯酚法(速率法)测定细胞裂解液的 ALP 活性,于 505 nm 波长处测定吸光度变化值 ΔA /min,计算样品中 ALP 活力:ALP(U/L) = ΔA /min $\times 2\,713$ 。

5.2 钙化结节测定 采用茜素红染色法^[9]。干预 9 天后,去除原培养瓶并用 PBS 漂洗 3 次,95% 乙醇固定 10 min,三蒸水漂洗 3 次,2% 茜素红(pH 为 4.1) 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min, PBS 漂洗 5 遍,干燥、封片和照相。镜下观察新形成的钙化结节及密度变化。

5.3 成骨相关蛋白—I 型胶原(Col1a1)、骨钙

蛋白(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)及 BMP-2/RunX2/OSX 信号通路 mRNA 表达水平测定 (1)按照 GREENspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书步骤提取细胞总 RNA:弃原培养基,0.1 mol/L PBS 清洗 2 遍,细胞裂解液进行裂解,加入等量的 70%乙醇,充分吹打,收集裂解液于吸附柱 RA 中,4℃ 13 000 r/min 离心 60 s,弃废液,加 700 μL 去蛋白液 RW1,静置 60 s,4℃ 12 000 r/min离心 30 s,弃废液,加 500 μL 漂洗液 RW,4℃ 12 000 r/min 离心 30 s,弃废液,重复漂洗 1 遍,将吸附柱 RA 放回空收集管中,4℃ 13 000 r/min 离心 60 s,去废液,将吸附柱 RA 放入 1.5 mL EP 管中,于吸附膜中间部位加入无核酶水 40 μL,室温放置 1 min,12 000 r/min,离心 1 min,收集底层液体。按照 HiFi-MML-1V cDNA 第一链合成试剂盒说明书配制 20 μL 反应体系(dNTP Mix 4 μL, Primer Mix 2 μL, RNA Template 4 μL, 5 × RT Buffer 4 μL, DTT 2 μL, HiFi-MML-1V 1 μL, RNase-Free water 3 μL),漩涡振荡混匀,短暂离心,42℃ 孵育 40 min,70℃ 孵育 15 min。(2)RT-PCR 反应:按 2 × EasyTaq PCR SuperMix 试剂盒配制 25 μL 反应体系(cDNA 模板 0.5 μL,上游、下游引物各 1 μL, PCR SuperMix 12.5 μL, ddH₂O 10 μL),最后 72℃ 延长 8 min。PCR 反应产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳 30 min。Bio-BEST200E 凝胶成像系统观察条带并拍照。同时采用 ImageJ 1.46 软件处理图像数据,并进行比较。基因引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,引物序列及产物长度见表 1。对细胞 ALP 和成骨相关蛋白及相关信号因子的相对表达量重复测量 5 次。

表 1 目的基因及引物序列		
基因	引物序列	产物大小 (bp)
GAPDH	上游:5'-TTGGCCGTATCGGACGCCTG-3'	876
	下游:5'-GAGCAATGCCAGCCCCAGCA-3'	
BMP-2	上游:5'-CCCAGACCACCGGCTGGAGA-3'	903
	下游:5'-CGACACCCGCAACCCCTCCAC-3'	
RunX2	上游:5'-TGAGCGACGTGAGCCCGGTA-3'	883
	下游:5'-CGTGTGGAAGACAGCGGCGT-3'	
OSX	上游:5'-GCCCCACTGGTGCCCAAGACC-3'	829
	下游:5'-CCCGTGGGTGCGCTGATGTT-3'	
OCN	上游:5'-CCTGGCAGGTGCAAAGCCCA-3'	800
	下游:5'-TGCCTGTGATAGCGCTCCTGG-3'	
OPN	上游:5'-TGCCTGTTCGGCCTTGCCCTC-3'	800
	下游:5'-TCCAGGCTGGCTTTGGAACTCG-3'	
Col1a1	上游:5'-GACGTCCTGGTGAAGTTGGT-3'	588
	下游:5'-AGCCACGATGACCCTTTATG-3'	

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 BMSCs ALP 活性比较(表 2) 在干预的第 3、6、9 天,与对照组比较,实验组细胞内 ALP 活性升高,随着淫羊藿总黄酮干预时间的延长,细胞裂解液中 ALP 活性呈上升趋势,且第 9 天最高,为对照组 ALP 活性的 1.36 倍。与实验组比较,抑制剂组 BMSCs ALP 活性明显降低($P < 0.05$)。

表 2 各组 BMSCs 内 ALP 活性比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	ALP 活性		
		第 3 天	第 6 天	第 9 天
对照	5	326.40 ± 4.24	397.38 ± 9.13	432.73 ± 16.97 *
实验	5	433.35 ± 7.31 [△]	535.92 ± 14.50 * [△]	588.67 ± 18.51 * [△]
抑制剂	5	287.74 ± 4.79 [▲]	360.83 ± 8.76 * [▲]	354.13 ± 7.77 * [▲]

注:与本组第 3 天比较,* $P < 0.05$;与对照组同期比较,[△] $P < 0.05$;与实验组同期比较,[▲] $P < 0.05$

2 各组钙结节密度比较(图 1) 与对照组比较,实验组钙结节密度明显增大;与实验组比较,抑制剂组钙结节密度明显减少。

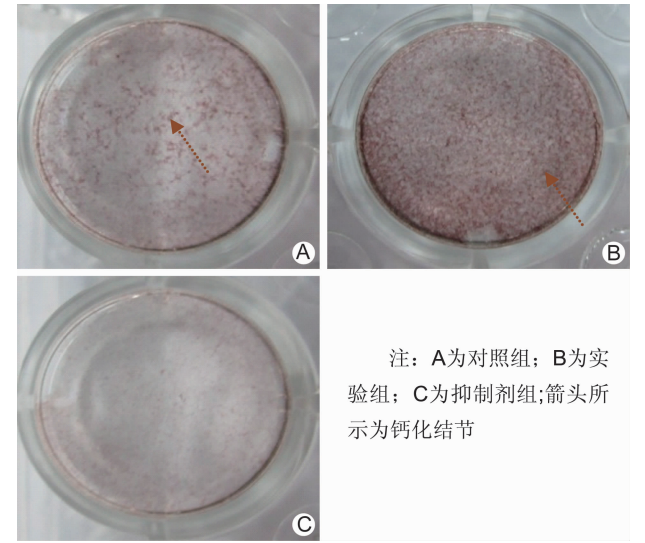


图 1 BMSCs 诱导后第 9 天各组钙化结节比较 (茜素红染色)

3 各组 BMSCs 成骨分化相关蛋白表达水平比较(表 3,图 2) 与对照组比较,实验组细胞 Col1a1、OCN 及 OPN 表达量增加($P < 0.05$);与实验组比较,抑制剂组 Col1a1、OCN 及 OPN 表达量降低($P < 0.05$)。

表 3 各组 BMSCs 成骨相关蛋白
表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Col1a1	OCN	OPN
对照	5	0.557 ± 0.002	0.648 ± 0.004	0.540 ± 0.003
实验	5	0.686 ± 0.007 *	0.813 ± 0.004 *	0.639 ± 0.004 *
抑制剂	5	0.275 ± 0.003 Δ	0.054 ± 0.001 Δ	0.194 ± 0.002 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与实验组比较, $\Delta P < 0.05$

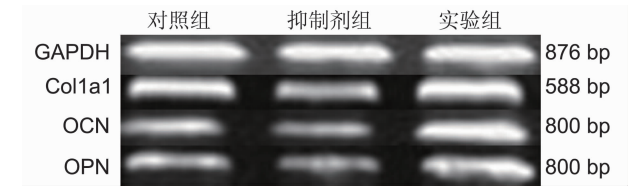


图 2 各组 BMSCs 成骨相关蛋白转录表达电泳图

4 两组 BMSCs BMP-2/RunX2/OSX 信号通路 mRNA 表达水平比较(表 4,图 3) 淫羊藿总黄酮可上调 BMP-2 和 RunX2,并进一步调节其下游基因 OSX 的转录表达,且呈现一定的时间依赖性,在诱导的第 9 天最高。与对照组比较,实验组成骨相关转录因子 BMP-2、RunX2、OSX 表达量明显增强($P < 0.05$)。

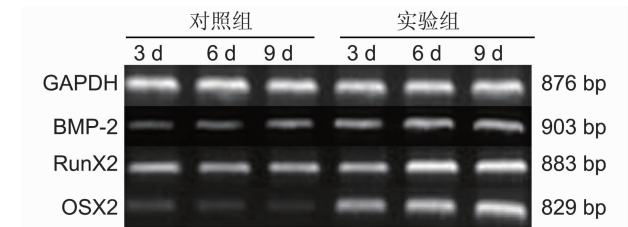


图 3 两组 BMSCs BMP-2、RunX2、OSX mRNA 表达电泳图

讨 论

淫羊藿总黄酮,该生物有效活性物质具有结构稳定、提取简单、有效、不良反应少等优点,可满足骨组织工程的客观要求,提供了一种更安全和有效地提高骨修

复和骨再生的方法和长期治疗骨科疾病的选择,如骨质疏松症^[4, 10-13]。在本研究中,实验组 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮显著地促进成骨分化前期 ALP 活性,上调成骨分化相关蛋白 mRNA 的表达,促进钙结节形成,具有促进成骨细胞的分化和恢复骨组织作用,与既往研究结果一致^[5, 14]。

作为一种外源性活性因子,天然性的植物激素能在机体内环境处于动态平衡条件下,上调内源性 BMP-2 表达,进而加速 BMSCs 成骨分化的进程^[15]。然而,淫羊藿总黄酮对 BMP-2 信号通路调节机制目前尚不清楚。本研究中,RT-PCR 结果显示,与对照组比较,淫羊藿总黄酮能明显上调 BMP-2 转录和表达。BMP-2 能与细胞膜表面的 BMP- I 型、BMP- II 型异二聚体受体特异性结合,磷酸化 Smads 蛋白,促进 R-Smads 与 Co-Smads 蛋白转入核内与成骨细胞特异性基因启动子区域的效应原件(OSE 序列)结合并调节 Cbfa1/Runx2 及其下游 OSX 基因的转录和表达^[16],进而增加骨小梁数量、矿化基质以及骨密度,并诱导成骨细胞标志物的表达,如 OCN、Col1a 1、OPN^[17]。本研究显示,BMP-2/RunX2/OSX 信号通路参与了 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮促 BMSCs 定向成骨分化的进程。1 $\mu\text{g/mL}$ NOGGIN 重组蛋白能降低细胞内 ALP 的活性,抑制淫羊藿总黄酮对细胞内 ALP 活性的促进作用;也能降低淫羊藿总黄酮促进细胞成骨分化相关基因的表达水平,如 OPN;又能抑制钙结节的形成,进而阻碍了淫羊藿总黄酮对诱导细胞形成矿化结节的促进作用。由此可知,BMP-信号通路的阻滞剂(1 $\mu\text{g/mL}$ NOGGIN 重组蛋白)能明显抑制 20 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿总黄酮对 BMSCs 定向成骨分化的作用。

淫羊藿总黄酮促进 BMSCs 定向成骨分化的信号转导通路可能含有多条,并且众多信号通路交织成网,淫羊藿总黄酮促进 BMSCs 分化为成骨细胞的分子机制有待进一步研究。

表 4 两组 BMSCs BMP-2、RunX2、OSX mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	BMP-2	RunX2	OSX
对照	5	第 3 天	0.145 ± 0.006	0.260 ± 0.003	0.107 ± 0.002
		第 6 天	0.135 ± 0.004	0.233 ± 0.004	0.082 ± 0.003
		第 9 天	0.079 ± 0.003 *	0.196 ± 0.005 *	0.078 ± 0.005 *
实验	5	第 3 天	0.224 ± 0.004 Δ	0.480 ± 0.003 Δ	0.368 ± 0.005 Δ
		第 6 天	0.254 ± 0.005 Δ	0.720 ± 0.004 Δ	0.558 ± 0.005 Δ
		第 9 天	0.345 ± 0.004 * Δ	0.727 ± 0.014 * Δ	0.752 ± 0.014 * Δ

注:与本组第 3 天比较,* $P < 0.05$;与对照组同期比较, $\Delta P < 0.05$

参 考 文 献

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. Lancet, 2011, 377 (9773): 1276-1287.
- [2] Eriksen EF. Hormone replacement therapy or SERMS in the long term treatment of osteoporosis [J]. Minerva Gynecol, 2012, 64(3): 207-221.
- [3] 李慧明. 复叶耳蕨地上部分微量元素锌铁铜锰含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 539.
- [4] Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, et al. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: an overview [J]. J Nat Sci Biol Med, 2011, 2(2): 154-163.
- [5] 许应星, 许兵, 吴岩, 等. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化中 DKK1 蛋白动态表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂与骨矿盐疾病杂志, 2010, 3(4): 276-284.
- [6] 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, (4): 452-456.
- [7] Qian G, Zhang X, Lu L, et al. Regulation of Cbfa1 expression by total flavonoids of *Herba Epimedii* [J]. Endocr J, 2006, 53(1): 87-94.
- [8] Ma MP, Jia ZP, Zhang RX, et al. Rats serum containing total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* enhances proliferation and osteogenic differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Osteopor, 2004, 10(4): 420-422.
- [9] Zhang JF, Li G, Chan CY, et al. Flavonoids of *Herba Epimedii* regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 314(1): 70-74.
- [10] Gao SG, Cheng L, Li KH, et al. Effect of *Epimedium pubescens* flavonoid on bone mineral status and bone turnover in male rats chronically exposed to cigarette smoke [J]. BMC Musculoskel-et Disord, 2012, 13: 105.
- [11] Wang ZQ, Li JL, Sun YL, et al. Chinese herbal medicine for osteoporosis: a systematic review of randomized controlled trials [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 1 (30): 356260.
- [12] Jia M, Nie Y, Cao DP, et al. Potential antiosteoporotic agents from plants: a comprehensive review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 12(31): 364604.
- [13] Abd Jalil MA, Shuid AN, Muhammad N. Role of medicinal plants and natural products on osteoporotic fracture healing [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012: 714512.
- [14] 马慧萍, 贾正平, 张汝学, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 420-422, 428.
- [15] Wang Q, Huang C, Xue M, et al. Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing [J]. Bone, 2011, 48 (3): 524-532.
- [16] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines [J]. J Cell Physiol, 2007, 211(3): 728-735.
- [17] Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency [J]. Dev Dyn, 2007, 236(7): 1876-1890.

(收稿: 2014-01-26 修回: 2015-03-17)