

## · 基础研究 ·

## 补肾舒脊颗粒对人骨髓间充质干细胞 BMP-4、Smad-4 mRNA 及蛋白表达的影响

史光耀<sup>1,2</sup> 鄢泽然<sup>1</sup> 白雯<sup>3</sup> 阎小萍<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 研究补肾舒脊颗粒对人骨髓间充质干细胞骨形态发生蛋白(BMP)通路 BMP-4、Smad-4 mRNA 及蛋白表达的影响。**方法** 体外培养人骨髓间充质干细胞,并将其分为空白组、西药组、模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组,向成骨细胞诱导,干预 28 天后提取 mRNA 及蛋白,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹试验(Western blot)检测 BMP-4、Smad-4 mRNA 及其蛋白的表达。**结果** (1)RT-PCR 结果发现,与模型组比较,中药低剂量组 BMP-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),中药中、高剂量组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ )。与西药组比较,中药低、中、高各剂量组 BMP-4、Smad-4 mRNA 水平均降低( $P < 0.05$ )。与中药低剂量组比较,中药中剂量组 BMP-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),中药高剂量组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ )。(2)Western blot 结果发现,与空白组比较,模型组 BMP-4 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药组、中药低、中剂量组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ );与西药组比较,中药中剂量组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。**结论** 补肾舒脊颗粒可能通过 BMP 通路抑制 BMP-4 及 Smad-4 的表达,从而起到延缓强直性脊柱炎异位骨化的作用。其中中药低剂量组可以降低 BMP-4 表达水平,而中、高剂量组可以降低 BMP-4、Smad-4 表达水平。

**关键词** 补肾舒脊颗粒;人骨髓间充质干细胞;骨形态发生蛋白;逆转录-聚合酶链反应;免疫印迹试验

Effects of Bushen Shuji Granule on mRNA and Protein Expressions of BMP-4 and Smad-4 in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells SHI Guang-yao<sup>1,2</sup>, YAN Ze-ran<sup>1</sup>, BAI Wen<sup>3</sup>, and YAN Xiao-ping<sup>1</sup> 1 Department of Chinese Medicine Rheumatism, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029); 2 College of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot (010059); 3 Department of Traditional Chinese Medicine Respiration, Beijing Fengtai District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing (100072)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Bushen Shuji Granule (BSG) on mRNA and protein expressions of Smad-4 and BMP-4 in human Bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Human bone marrow mesenchymal stem cells were *in vitro* cultured, and then divided into a blank control group, the Western medicine group, the model group, high, mid, and low dose BSG groups. Then they were induced to osteoblasts. mRNA and protein were extracted after 28 days INTERVENTION. mRNA and protein expressions of Smad-4 and BMP-4 were detected using RT-PCR and Western blot. **Results** (1) The results of RT-PCR showed that compared with the model group, the expression of BMP-4 mRNA-BGSGdecreased in the low dose group ( $P < 0.05$ ), and the expressions of BMP-4 and Smad-4 decreased in the middle and high dose bsg group ( $P < 0.05$ ). Compared with the Western medicine group, the expression levels of BMP-4 and Smad-4 decreased in the 3 BSG groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the low dose BSG group, the expression of BMP-4 decreased in the middle dose BSG group ( $P < 0.05$ ), and the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373562)

作者单位:1.北京中日友好医院中医风湿科(北京 100029);2.内蒙古医科大学中医学院(呼和浩特 010059);3.北京丰台中西医结合医院中医呼吸科(北京 100072)

通讯作者:阎小萍, Tel:13611193588, E-mail:yanxiaoping1688@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170426. 112

expression levels of BMP-4 and Smad-4 decreased in the high dose BSG group ( $P < 0.05$ ). (2) Results of Western blot showed that, compared with the blank control group, the expression of BMP-4 protein decreased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, protein expressions of BMP-4 and Smad-4 were decreased in the Western medicine group, the middle and low dose BSG groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the Western medicine group, the expression levels of BMP-4 and Smad-4 protein were decreased in the middle dose BSG group ( $P < 0.05$ ). Conclusions BSG could inhibit mRNA and protein expressions of Smad-4 and BMP-4 possibly through BMP pathway, thus postponing the ossification of AS patients. Of them, the expression level of BMP-4 could be decreased in the low dose SG group. And the expression levels of BMP-4 and Smad-4 could be decreased in the middle and high dose SG group.

**KEYWORDS** Bushen Shuji Granule; human bone marrow mesenchymal stem cell; bone morphogenetic protein; reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种慢性炎症性疾病, 主要侵犯骶髂关节、脊柱骨突、脊柱旁软组织及外周关节, 并可伴发关节外表现。临床主要表现为腰、背、颈、臀、髋部疼痛、僵硬以及外周关节肿痛。多数患者在疾病后期继发韧带、纤维环、关节软骨、关节囊纤维化与钙化, 使脊柱逐渐失去柔软度, 严重时发展到像竹节一样无法弯曲或伸展, 造成脊柱强直和关节畸形。钙化在骨形成过程中起着决定性的作用, 异位骨化即非钙化组织发生钙化, 造成新骨形成的现象。在 AS 中表现为附着点和骨膜关节、软骨结合处形成新骨<sup>[1]</sup>。

补肾舒脊颗粒是以骨碎补治疗为主的中药组方, 前期临床研究证实补肾舒脊颗粒对 AS 具有明显效果, 能显著改善 AS 患者疼痛、关节肿胀、晨僵时间、脊柱活动度, 且能抑制 AS 成纤维细胞纤维化, 能延缓 AS 患者异位骨化<sup>[2]</sup>。但机制尚未明确, 因此本实验通过逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和免疫印迹试验 (Western blot) 的检测方法, 以验证该药是否通过抑制骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 4、Smad-4 mRNA 及蛋白的表达, 达到抑制异位骨化的作用。同时为更好发挥中药治疗本病提供实验依据。

## 材料与方法

**1 动物及细胞株** SPF 级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 购自北京维通利华, 动物合格证号: SCXK (京) 2012 - 0001。实验动物于中日友好医院临床研究所动物实验室饲养 3 周, 温度 20 ℃, 自由进食和饮水, 动物实验经中日友好医院伦理委员会批准 (批号: 15008)。人骨髓间充质干细胞 (原代), 购自美国 ATCC 公司。

**2 药物** 补肾舒脊颗粒 [由骨碎补、狗脊、杜仲、桂枝、鹿角、秦艽、羌活、元胡、青风藤组成, 由中日友好医院生产, 每袋 6g (约含生药量 22.67g), 生产批号: 140601]。用药剂量换算: 成人每日用量 0.3g/kg (18g) 乘以人与大鼠的换算系数 6.17<sup>[3]</sup>, 得出大鼠灌胃剂量 1.851 mg/kg (0.37g/g)。洛索洛芬钠片 (乐松, 每片 60 mg, 第一三共制药 (上海) 有限公司, 生产批号: SN010LA)。用药剂量换算: 成人每日用量 3 mg/kg (180 mg) 乘以人与大鼠的换算系数 6.17<sup>[3]</sup>, 得出大鼠灌胃剂量 18.51 mg/kg (3.7 mg/g)。

**3 试剂及仪器** Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (Catalog7552), 青/链霉素 (Catalog0503), 胎牛血清 (Catalog0025), Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (Catalog7531), 均为美国 Sciencell 公司产品; 0.25% 胰蛋白酶 (CatalogR001100, 美国 Thermo 公司); TRIzol (Catalog15596026, 美国 Invitrogen 公司), iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Catalog1708890, 美国伯乐公司), FastStart Universal SYBR Green Master [Rox] (Roche, Catalog4913850001, 瑞士豪夫迈·罗氏公司), DEPC 水 (北京索莱宝科技有限公司); 引物由 Invitrogen 公司合成。30% 丙烯酰胺溶液、10% 过硫酸铵、TEMED 均为上海生工生物工程股份有限公司产品, Tris-Base、10% SDS (美国 Sigma 公司), Total protein Extraction Kit (CatalogSJ-200501, 美国 ProMad 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (CatalogP1511, 北京普利来基因技术有限公司)。一抗: Anti-BMP4 antibody (ab39973, 英国 Abcom 公司), Anti-Smad4 antibody (ab137861, 英国 Abcom 公司)。

荧光倒置显微镜(型号 CKX41,日本奥林巴斯公司);酶联免疫检测仪(型号 Spectra Max M2 SMP500-17540-JIZP,美国 Molecular Devices 公司);Bio-Rad 电泳仪(型号 165-3301,美国伯乐公司);Bio-Rad 转膜仪(型号 170-3930,美国伯乐公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(型号 3111,美国 Thermo 公司);离心机(型号 5804R,德国 Eppendorf 公司);实时荧光 PCR 仪(型号 ABI7500,美国 Invitrogen 公司)。

4 方法

4.1 人骨髓间充质干细胞培养 将冻存的人骨髓间充质干细胞进行复苏,从液氮中取出,迅速放入 37℃ 水浴中,于 1 min 内溶解,在无菌状态下将细胞移入离心管,加 20 mL 完全培养液,取 100 μL 进行苔盼蓝计数,其余进行离心。在 1 000 r/min 速度下离心 5 min,弃上清,加入 10 mL 培养液后,将细胞以 3×10<sup>5</sup> 接种于包被后的 T-25 培养瓶中,置 37℃ 温箱静置培养,次日更换 1 次培养液,继续培养,观察生长情况。待细胞 60%~70% 长满培养瓶时,进行细胞传代,使用 0.25 倍胰酶进行消化,进行离心以及苔盼蓝计数后,将细胞种于两个 T-75 培养瓶中,置 37℃ 温箱静置培养,次日更换 1 次培养液,继续培养,观察生长情况。待细胞 100% 长满培养瓶时,进行细胞传代。

4.2 血清制备 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组(每组 8 只):中药高、中、低剂量组、洛索洛芬钠(西药)组以及空白组。中药高、中、低剂量组灌胃剂量分别为 0.740、0.370、0.185 g/g 开始进行灌胃,每天 2 次,每次 1 mL,连续 7 天。末次给药后 1 h,经腹主动脉取血,室温静置 2 h 后,2 500 r/min 离心 15 min 分离血清。同组混匀,56℃ 水浴 30 min 灭活,微孔滤膜过滤除菌,-80℃ 保存使用。灌胃剂量参照《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》<sup>[3]</sup>。

4.3 细胞造模、分组及给药方法 进行扩增培养后,分为 6 组,使用基础培养液进行培养,培养 4 天后细胞长至 95%~100%,进行细胞诱导,改用含药血清的诱导培养基,中药高剂量组,加入中药高剂量含药血清(5%)共同培养;中药中剂量组,加入中药中剂量含药血清(5%)共同培养;中药低剂量组,加入中药低

剂量含药血清(5%)共同培养;模型组:加入胎牛血清(5%)共同培养;西药组,加入洛索洛芬钠含药血清(5%)共同培养;空白组,加入正常大鼠血清(5%)共同培养。每 3~4 天换液 1 次,至培养 28 天,提取细胞 RNA 及蛋白。

4.4 RNA 的提取 Life Technologies 公司的 TRIzol 法总 RNA 提取试剂盒,按照常规操作顺序提取 RNA,紫外分光光度计检测 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 计算总 RNA 的浓度及纯度,λ<sub>260</sub>/λ<sub>280</sub> 比值在 1.7~2.0 之间,达到进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的要求。

4.5 逆转录反应 用经 DNase 处理的总 RNA 为模板,使用 Bio-Rad 公司提供的 iScript cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒,进行 cDNA 的合成。依据说明书采用 20 μL 体系,依次添加 5 倍混合反应物,逆转录酶,无核酸酶水,RNA 样本,进行逆转录。添加完试剂后,轻轻混匀,轻微离心使反应聚集在 PCR 管底部。然后进行逆转录反应。反应条件:25℃,5 min,42℃,30 min,85℃,5 min,4℃,5 min。反应结束后冰育 5 min,合成 cDNA 置于-20℃ 保存备用。

4.6 荧光定量 PCR PCR 反应体系 25 μL,在 0.2 mLPCR 管内,依次加入 1 μL cDNA,各基因上游与下游引物各 1 μL,12.5 μL PCR 混合反应物,用 DEPC 水补足体积至 25 μL。混匀后立即置于 ABI 7500 中,扩增条件:预变性 95℃ 预变性 2 min,两步法循环反应(95℃ 10 s,60℃ 1 min)40 个循环,融解曲线以 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。反应结束后,样品保存于-20℃ 备用。以 β-actin 内参基因,得到目的基因 Ct 值,以 ΔCt 值表示基因相对表达量。引物由 Invitrogen 公司合成,序列如表 1。

4.7 BMP-4 和 Smad-4 蛋白表达 采用免疫印迹法检测。用细胞裂解液裂解不同培养条件下的细胞样品,提取总蛋白,按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明,测定蛋白浓度。5×Loading buffer 混合 95℃ 煮沸 5 min 充分变性蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶分离样品,400 mA 恒流 240 min 转至 PVDF 膜,加入兔抗鼠一抗(1:500~1 000),4℃ 过夜,TBST 清洗 10 min×3 次,加入羊抗兔二抗,室温 60 min,TBST 清

表 1 引物序列表

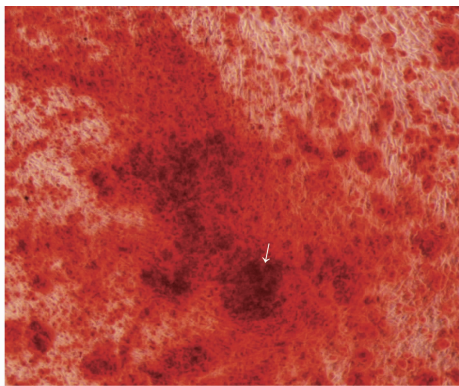
| 名称      | 上游                             | 长度(bp) | 下游                             | 长度(bp) |
|---------|--------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
| BMP-4   | 5'-CTAGGCGAGGTCGGGCGGCTGGAG-3' | 24     | 3'-CACCTTTTGCCTCGGTACACAGC-5'  | 22     |
| Smad-4  | 5'-GCTGCTGGAATTGGTGTGTGATG-3'  | 22     | 3'-AGGTGTTTCTTTGATGCTCTGTCT-5' | 24     |
| β-actin | 5'-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'      | 19     | 3'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-5'      | 19     |

洗 10 min × 3 次,将膜置于凝胶成像系统中,ECL 化学发光后成像。

4.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件对实验结果进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。所有统计检验均采用双侧检验,符合正态分布和方差齐性的资料,采用方差分析;不符合正态分布和方差齐性的资料,采用多个独立样本的秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1 人骨髓间充质干细胞鉴定 人骨髓间充质干细胞培养 4 天后,进行诱导分化,培养 28 天后,形成矿化结节。经茜素红染色,出现明显红染现象,说明细胞符合实验要求。



注:“→”示矿化结节

图 1 人骨髓间充质干细胞鉴定 (茜素红染色, ×4)

2 各组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达比较(表 2) 与空白组比较,模型组 BMP-4、Smad-4 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与模型组比较,西药组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达无统计学意义( $P > 0.05$ );中药中、高剂量组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),中药低剂量组 Smad-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ )。与西药组比较,中药低、中、高各剂量组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达水平均降低( $P < 0.05$ )。与中药低剂量组比较,中、高剂量组 BMP-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),高剂量组 Smad-4 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ )。

3 各组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达比较(表 3, 图 2、3) 与空白组比较,模型组 BMP-4 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),Smad-4 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与模型组比较,西药组、中药低、中剂量组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ );与西药组比较,中药中剂量组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达

水平降低( $P < 0.05$ ),中药低、高剂量组蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组 BMP-4、Smad-4 mRNA 表达比较 (ΔCt 值,  $\bar{x} \pm s$ )

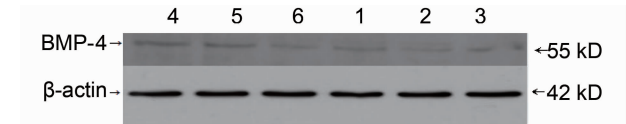
| 组别    | n | BMP-4 (2 <sup>-ΔΔCt</sup> )           | Smad-4 (2 <sup>-ΔΔCt</sup> )          |
|-------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 空白    | 9 | 1.748 ± 1.141 (1.000)                 | 2.158 ± 1.145 (1.000)                 |
| 模型    | 9 | 1.371 ± 1.124 (1.298)                 | 1.989 ± 1.159 (1.124)                 |
| 西药    | 9 | 0.731 ± 0.320 (2.024)                 | 1.511 ± 1.114 (1.566)                 |
| 中药低剂量 | 9 | 1.562 ± 1.267 (1.138) <sup>Δ</sup>    | 3.017 ± 2.327 (0.551) * <sup>Δ</sup>  |
| 中剂量   | 9 | 2.359 ± 2.544 (0.655) * <sup>ΔΔ</sup> | 3.106 ± 2.567 (0.518) * <sup>Δ</sup>  |
| 高剂量   | 9 | 4.082 ± 4.730 (0.198) * <sup>ΔΔ</sup> | 4.209 ± 2.754 (0.241) * <sup>ΔΔ</sup> |

注:与模型组比较,\*  $P < 0.05$ ;与西药组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与中药低剂量组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.05$

表 3 各组 BMP-4、Smad-4 蛋白表达量比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n | BMP-4                       | Smad-4                      |
|-------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白    | 6 | 0.410 ± 0.176               | 0.234 ± 0.081               |
| 模型    | 6 | 0.317 ± 0.118 *             | 0.196 ± 0.026               |
| 西药    | 6 | 0.201 ± 0.055 <sup>Δ</sup>  | 0.162 ± 0.032 <sup>Δ</sup>  |
| 中药低剂量 | 6 | 0.171 ± 0.035 <sup>Δ</sup>  | 0.162 ± 0.048 <sup>Δ</sup>  |
| 中剂量   | 6 | 0.153 ± 0.034 <sup>ΔΔ</sup> | 0.129 ± 0.026 <sup>ΔΔ</sup> |
| 高剂量   | 6 | 0.216 ± 0.064               | 0.229 ± 0.064               |

注:与空白组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与西药组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.05$



注:1 为中药低剂量组;2 为中药中剂量组;3 为中药高剂量组;4 为空白组;5 为西药组;6 为模型组;下图同

图 2 各组大鼠细胞 BMP-4 蛋白电泳图

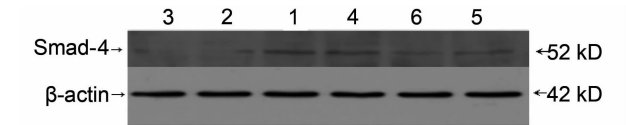


图 3 各组大鼠细胞 Smad-4 蛋白电泳图

讨 论

有研究发现在动物损伤远端的部位发现含有染料的细胞,包括炎症细胞和与纤维合成有关的成纤维细胞,并认为这些细胞来自骨髓,这是最早提出骨髓具有造血以外功能的报道<sup>[4]</sup>。1966 年 Friedenstein AJ<sup>[5]</sup> 等从骨髓中分离出了这种细胞并命名为间充质干细胞,并证明其具有多向分化的潜能,可以形成克隆。1999 年 Pittenger MF 等<sup>[6]</sup> 从人骨髓中分离出了有多向分化潜能的间充质干细胞,体外实验证实其具

有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞分化的能力。

本研究的经验方——补肾舒脊颗粒,是北京中日友好医院的院内制剂,主要是由骨碎补、狗脊、桂枝、鹿角、秦艽、羌活等药物组成,主治 AS 肾虚督寒证。方中骨碎补,味苦性温,主入肝肾二经,补肾活血、养肝荣筋、祛寒除湿;狗脊温养肝肾、通调血脉、强腰膝、坚脊骨、利关节;桂枝、鹿角、秦艽等温补肾阳、益气强督、舒脊通脉、祛风除湿、通利关节;羌活入膀胱经,能“夹脊而行”,祛风散寒除湿。诸药合之,共奏补肾舒脊、散寒除湿、活血止痛之功。补肾舒脊颗粒通过补肾精、养肝血、荣筋脉、促进筋、骨恢复正常生长发育,使僵曲的脊柱得以舒展,延缓 AS 异位骨化,正是中医肾主骨、肝主筋理论指导下中医药治疗作用的良好临床验证。

目前认为 AS 的异位骨化主要通过软骨内成骨和膜内成骨两种方式。软骨内成骨的过程为间充质干细胞通过聚集和分化形成软骨细胞,经过增生、成熟、分化和凋亡,最后形成骨组织。膜内成骨则是间充质干细胞直接分化为成骨细胞。这两种方式是间充质干细胞在多种信号分子、生长和转录因子的密切调控下完成的,研究证实 BMP 通路是调节这两种成骨过程的重要分子机制<sup>[7]</sup>。

BMP 是多功能细胞因子,属于转化生长因子,能够诱导血管周围及结缔组织中未分化的间充质细胞向骨和软骨细胞方向分化,从而形成骨组织,最早由 Urist MR 发现<sup>[8]</sup>。BMP 是一种广泛存在于骨基质中的酸性糖蛋白,可通过激活 Smads 信号传导促进间充质干细胞分化,增强成骨细胞的成熟,能够促使间充质干细胞向成骨或软骨分化<sup>[9,10]</sup>。BMP-4 与苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶受体结合,激活下游的 Smad 信号分子,使 Smad-1 和 Smad-5 磷酸化,继而激活下游 Smad-4,将 TGF- $\beta$  信号由细胞外传递至细胞内,激活核心结合因子  $\alpha$ 1,刺激多种成骨相关基因的表达,诱导间充质干细胞转化为成骨细胞<sup>[11]</sup>,其中 BMP-4 是新骨形成的重要促进因子,能够促进骨的生成。随后,BMP-4 促进这些已分化细胞分泌有机基质并不断矿化成骨。在不同的异位骨化阶段可检测到不同的 BMPs,其中 BMP-4 是软骨内成骨的必要条件。有研究表明<sup>[12]</sup>,脊柱融合的 AS 患者血清 BMP-4 升高。同时 Smad 蛋白家族在 BMP 信号转导途径中亦具有重要作用<sup>[13]</sup>,多种实验已经充分证明 Smad 是 TGF- $\beta$  和 BMP 信号转导的关键因子,直接参与骨形态发生蛋白等多个成员的信号转导<sup>[14-16]</sup>,与成骨细胞增殖分化密切相关。杨晓等<sup>[17]</sup>研究发现 Smad4 基因敲除导致成骨细胞对 BMP-2 的反应性显著降低。Smad-4 可以调

节成骨细胞基因表达,促进细胞的生长和分化<sup>[18]</sup>。

本研究结果显示:中药高、中、低各组与模型组比较,BMP-4、Smad-4 表达均降低,提示了补肾舒脊颗粒可能是通过抑制骨髓间充质干细胞在分化过程中 BMP-4 的产生,减少与苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶受体结合,促使下游的 Smad-1 和 Smad-5 磷酸化减少,进而影响 Smad-4 的表达减少,从而抑制了骨髓间充质干细胞通过 BMP 通路向成骨细胞分化,起到延缓异位骨化的作用。

综上所述,根据本实验的研究结果笔者推测补肾舒脊颗粒可能通过 BMP 通路延缓 AS 异位骨化,但是,现在研究尚不能完全揭示补肾舒脊颗粒改善 AS 异位骨化的分子机制、信号转导途径。补肾舒脊颗粒具体的作用靶点也需要进一步研究。尽管如此,通过 BMP 通路抑制 BMP-4、Smad-4 因子的生长,从而减少 AS 异位骨化的发生和发展,可能会为 AS 的预防和治疗提供崭新的思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Appel H, Loddenkemper C, Sieper J. Immunopathology of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides [J]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2008, 67(1): 25-31.
- [2] 孔维萍, 阎小萍. 补肾强督法治强直性脊柱炎 292 例临床观察 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(4): 290.
- [3] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [4] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5309): 71-74.
- [5] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells [J]. J Embryol Exp Morphol, 1966, 16(3): 381-390.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [7] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) 4 and BMP-6 gene transfer [J]. Mol Ther, 2002, 6(4): 464-70.
- [8] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965 [J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (395): 4-10.
- [9] Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, et al. Effects of

- BMP-2, BMP-4, and BMP-6, on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3. G2/PA6 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 20(2): 366-371.
- [10] Li YQ. Master stem cell transcription factors and signaling regulation [J]. Cell Reprogram, 2010, 12(1): 3-13.
- [11] Bonor J, Adams EL, Bragdon B, et al. Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane [J]. Cell Physiol, 2012, 227(7): 2880-2888.
- [12] Chen HA, Chen CH, Lin YJ, et al. Association of bone morphogenetic proteins with spinal fusion in ankylosing spondylitis [J]. J Rheumatol, 2010, 37(10): 2126-2132.
- [13] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection [J]. Poult Sci, 2000, 79(7): 978-981.
- [14] Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Reftery LA, et al. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster [J]. Genetics, 1995, 139(3): 1347-1358.
- [15] Arat T, Akiyama Y, Okabe S, et al. Genomic structure of the human smad3 gene and its infrequent alteration in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 1998, 122(2): 157-163.
- [16] Zhang Y, Feng X, Wu R, et al. Receptor associated mad homologues synergize as effectors of the TGF- $\beta$  responses [J]. Nature, 1996, 383(6596): 168-172.
- [17] 杨晓, 黄培堂, 黄翠芬. Smads 基因功能的研究进展 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2): 145-150.
- [18] Noguchi M, Kimoto A, Gierse JK, et al. Enzymologic and pharmacologic profile of loxoprofen sodium and its metabolites [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(11): 2075-2079.

(收稿: 2016-04-24 修回: 2017-05-01)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

## 第二十一次全国儿科中西医结合学术会议征文通知

由中国中西医结合学会儿科专业委员会主办, 福建中医药大学承办的第二十一次全国儿科中西医结合学术会议定于 2017 年 11 月 3—5 日在福建省福州市召开, 届时将进行有关小儿呼吸、神经、血液、泌尿、新生儿等中西医结合学术交流, 并将举行第七届中国中西医结合学会儿科专业委员会常委和全体委员会议。会议期间还将进行第二届优秀论文征文评选工作, 并设优秀论文奖。诚挚邀请全国儿科相关医务人员参会并积极投稿。现将会议有关事宜通知如下。

**征文内容** (1) 中西医结合及中医、西医各专业的临床论著、实验研究、护理经验和专题综述; (2) 临床疑难、重症、少见病例报道; (3) 中西医结合药理、药效研究; (4) 中西医结合理论及方法研究; (5) 对儿科中西医结合工作的建议等。

**征文要求:** (1) 稿件 2017 年 3 月 1 日后未公开发表; (2) 稿件需有摘要及全文; (3) 稿件一律用 Microsoft Word 文档, 摘要要求 800~1 000 字, 包括目的、方法、结果、结论等要素; (4) 稿件请注明作者单位、准确通信地址、邮政编码、电话及 E-mail 等联系信息; (5) 文档名称请注明各亚专科方向, 文件名如: “呼吸—论文题目”、“肾脏—论文题目”等便于分专业顺利审稿; (6) 稿件一律发至: bjyyyyek@sina.com; 截止日期: 2017 年 8 月 31 日; 联系人: 杨丽君 (13521771387)。

中国中西医结合学会儿科专业委员会