

黄芪含药血清对衰老骨髓间充质干细胞 CYP24A1, CYP27B1 mRNA 和蛋白的影响

李倩¹, 吴雍真¹, 管连城², 高洁¹, 李文¹, 秦忠¹, 陈云志¹, 柴艺汇^{1*}

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025;

2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:通过探讨不同浓度黄芪含药血清对衰老骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化过程中24-羟基化酶(CYP24A1), 1α 羟化酶(CYP27B1)mRNA及蛋白表达的影响,初步探讨其治疗原发性骨质疏松症作用机制。方法:将SD大鼠随机分为6组,正常组、模型组、黄芪含药血清低、中、高质量分数组(20%,40%,60%),维生素D组。细胞增殖毒性检测(CCK-8)法检测不同浓度黄芪含药血清对衰老BMSCs成骨分化细胞存活率的影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同浓度黄芪含药血清对衰老BMSCs成骨分化细胞CYP24A1,CYP27B1 mRNA和蛋白的表达情况。结果:CCK-8法显示,与正常组比较,模型组BMSCs成骨分化细胞经D-半乳糖诱导后细胞增殖存活率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄芪含药血清中、高质量分数组及维生素D组均可在不同程度上提高衰老BMSCs成骨分化细胞增殖存活率($P<0.01$);Real-time PCR和Western blot结果显示,与正常组比较,模型组CYP27B1 mRNA和蛋白相对表达量显著降低,CYP24A1 mRNA和蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芪高质量分数组均可升高CYP27B1 mRNA和蛋白相对表达量($P<0.01$),降低CYP24A1 mRNA和蛋白相对表达量($P<0.01$),呈质量分数依赖性。结论:不同浓度黄芪含药血清可治疗骨质疏松症,其机制可能与调节衰老骨髓间充质干细胞成骨分化过程中CYP24A1,CYP27B1 mRNA及蛋白表达水平有关。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;黄芪含药血清;骨质疏松;24-羟基化酶; 1α 羟化酶

[中图分类号] R2-0;R289;R274;R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0049-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201738

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200701.1017.002.html>

[网络出版日期] 2020-7-1 10:50

Effect of Different Concentrations of Astragali Radix Containing Serum on CYP24A1, CYP27B1 mRNA and Protein in Osteogenic Differentiation of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

LI Qian¹, WU Yong-zhen¹, GUAN Lian-cheng², GAO Jie¹, LI Wen¹, QIN Zhong¹,
CHEN Yun-zhi¹, CHAI Yi-Hui^{1*}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different concentrations of Astragali Radix containing serum on the expression of 24-hydroxylase(CYP24A1), 1α -OHase(CYP27B1) mRNA and protein in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and to explore the mechanism of primary osteoporosis (OP). **Method:** The experiment was divided into 6 groups, like normal group, model group, low, middle and

[收稿日期] 20200619(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660762,81874376);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2017]1401);贵州省教育厅创新群体重大项目(黔教合KY字[2017]041);贵阳中医学院研究生教育创新计划项目(YFYJSCX2018-33号)

[第一作者] 李倩,在读硕士,从事中医证候物质基础研究,E-mail:1037541016@qq.com

[通信作者] *柴艺汇,硕士,从事中西医结合基础研究,E-mail:yihuichai@163.com

high dose group of Astragali Radix containing serum (20%, 40%, 60%), Vitamin D group. Cell proliferation toxicity assay (CCK-8) was used to detect the effect of different concentrations of Astragali Radix containing serum on survival rate of aging BMSCs. Real-time quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot was used to detect the expression of CYP24A1 CYP27B1 mRNA and protein in senile BMSCs osteogenic differentiation cells by different concentrations of Astragali Radix containing serum. **Result:** Compared with normal group, the proliferation and survival rate of BMSCs osteoblasts induced by *D*-galactose in model group was significantly lower than that in normal group ($P < 0.01$). Compared with model group, medium and high dose groups and Vitamin D group could improve the proliferation and differentiation of aging BMSCs into osteoblasts in different degrees ($P < 0.01$). The relative expression of CYP27B1 mRNA and protein in model group was significantly lower than that in normal group, while the relative expression of CYP24A1 mRNA and protein in model group was significantly higher than that in normal group. Compared with model group, high dose Astragali Radix containing serum group could increase the relative expression of CYP27B1 mRNA and protein, and decrease the relative expression of CYP24A1 mRNA and protein in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion:** The mechanism of different concentrations of Astragali Radix containing serum in the treatment of osteoporosis may be related to the regulation of CYP24A1, CYP27B1 mRNA and protein in the osteogenic differentiation of aging BMSCs.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); Astragali Radix containing serum; osteoporosis; 24-hydroxylase (CYP24A1); 1α -OHase (CYP27B1)

骨质疏松症(OP)是一种常见的骨骼疾病,常以骨量丢失、骨骼矿化异常、骨吸收与骨合成失衡、易发生全身骨折为主要特征^[1]。随着我国人口向老龄化逐渐发展,OP已严重影响生活质量、威胁人类健康。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种主要存在于人体骨髓的多潜能成体干细胞,能够在特定环境下能向成骨细胞转化,主要由转化期、细胞增殖期、细胞聚集分泌期以及细胞外基质钙化期这几个阶段构成^[2-3]。当BMSCs向成骨分化的能力下降时,会造成成骨细胞的不足,从而出现骨形成下降,最终导致OP的发生。维生素D为脂溶性维生素,在骨质疏松中起重要作用^[4],其不仅可增加骨矿化防止骨丢失、优化骨重建、增加肌力、降低骨折风险,还对BMSCs在骨形成中的转化具有加速作用^[5]。研究表明,可通过调节维生素D活化、失活关键酶24-羟化酶(CYP24A1), 1α 羟化酶(CYP27B1)表达量达到治疗骨质疏松的目的^[6]。中药黄芪具有补肾益气、益卫固表之功效,也可一定程度改善骨质疏松的相关症状^[7]。研究发现,黄芪散含药血清随着质量分数增大,可提高BMSCs向成骨分化的能力^[8]。并且黄芪可通过调节骨质疏松模型大鼠维生素D水平发挥抗骨质疏松作用^[9]。因此,本研究拟通过黄芪高、中、低质量分数含药血清与维生素D对衰老BMSCs中CYP24A1, CYP27B1 mRNA和蛋白的影响初步探讨补肾中药黄芪防治骨质疏松症

的机制,为中药治疗原发性骨质疏松症(退行性骨质疏松)的临床实践提供理论依据。

1 材料

1.1 动物和细胞 SPF级雄性SD大鼠48只,体重(180±20)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,合格证号SCXK(湘)2014-0011,动物实验获得贵州中医药大学动物伦理委员会批准;BMSCs购买于中国科学院上海细胞库,批号190201-2。

1.2 药物 黄芪购自贵州同济堂药房连锁有限公司,黄芪药材经贵州中医药大学药学教研室孙庆文教授鉴定为正品。黄芪烘干后称取1kg,加入蒸馏水10L,浸泡30min后煎煮,煮沸后文火煎煮1h,用纱布过滤药物,药渣8L的蒸馏水,煎煮1h,过滤药液,合并2次药液,以3000 r·min⁻¹,离心10min,用旋转蒸发器浓缩药液,生药含量为1.0 g·mL⁻¹,过滤除菌,置于4℃冰箱中备用。

1.3 试剂 *D*-半乳糖,细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为210E052,1016k021);胎牛血清(美国Gibco公司,批号1828728);DMEM培养基(美国Hyclon公司,批号AC10232461);OriCellTMSD大鼠BMSCs成骨诱导分化培养基试剂盒(广州赛业生物科技有限公司,批号T180428G001);trizol总RNA提取试剂(美国Invitrogen公司,批号17596-026);PrimeScript RT reagent Kit, SYBR Premix Ex Taq II Kit(大连宝生

物工程有限公司,批号分别为RR047A,RR820A);组织蛋白抽提试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒,ECL高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为04108,40326,30330); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Santa Cruz公司,批号85116);CYP24A1抗体(英国Abcam公司,批号B6376);CYP27B1抗体(北京博奥森生物有限公司,批号GR846521-1)。

1.4 仪器 MCO-175型二氧化碳培养箱(日本Sanyo公司);CKX-41型显微镜(日本Olympus公司);PIKORed 96型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher公司);EPS-300型电泳仪(上海天能科技有限公司);Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System型蛋白电泳槽,Mini Trans-Blot型蛋白转印系统和ChemiDoc™ XRS⁺型化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 制备黄芪含药血清 将48只正常健康的雄性SD大鼠,随机分为黄芪煎剂组和空白血清组,每组24只。黄芪煎剂组按照2015年版《中国药典》规定黄芪临床用药质量分数及《实验动物方法学》(第三版)换算大鼠用量为 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,药物质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,空白血清组以等量生理盐水灌胃,给药前禁食8 h,2次/d,连续给药7 d,最后1次给药后2 h,乙醚麻醉,腹主动脉采血,37℃温孵30 min后,离心分离血清。同组血清合并,经56℃,30 min灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌制得100%含药血清,-20℃保存备用。黄芪高、中、低质量分数含药血清是通过空白血清与100%含药血清按比例分别进行稀释制得:低质量分数含药血清(空白血清-含药血清-培养基16:4:80),中质量分数含药血清(空白血清-含药血清-培养基12:8:80),高质量分数含药血清(空白血清-含药血清-培养基8:12:80),各组培养液中血清比例均为20%,含药血清浓度=含药血清比例/(空白血清比例+含药血清比例)。

2.2 BMSCs细胞培养及D-半乳糖诱导的衰老BMSCs模型建立 BMSCs单层贴壁生长在含有10%胎牛血清的DMEM基础培养基中,置于37℃,5% CO₂培养箱中传代培养。将第3代细胞以 1×10^5 个/mL接种于6孔板后改用成骨分化诱导液进行成骨分化诱导^[10],每2 d更换1次诱导液。分为正常组(空白血清),模型组($0.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,D-半乳糖),模型+黄芪低质量分数组(20%含药血清),模型+黄芪含药血清中质量分数组(40%含药血清),模型+黄

芪含药血清高质量分数组(60%含药血清),模型+维生素D组($1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。药物干预后在培养12,24,48,72 h,7,14 d后收集细胞标本。

2.3 CCK-8法检测衰老BMSCs的细胞存活率 在96孔板中配置100 μL 的BMSCs细胞悬液(1×10^3 个/孔),将培养板在37℃,5% CO₂的培养箱预培养24 h。吸弃原培养液,向培养板中加入100 μL 含不同浓度D-半乳糖的成骨诱导分化培养基。在培养箱孵育7 d(隔天换液)。向每孔加入CCK-8溶液10 μL 。将培养板在培养箱内孵育1~4 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A,计算细胞存活率。实验重复3次,计算平均值。

2.4 Real-time PCR检测CYP27B1,CYP24A1 mRNA的表达 收集上述分组细胞,采用trizol法提取总RNA,制得RNA母液100 μL ;检测RNA纯度和浓度确定在D260/D280在1.80~2.00,根据cDNA反转录试剂盒要求步骤进行逆转录。PCR扩增以 β -actin为内参照。引物设计为美国Invitrogen公司,PCR反应体系为20 μL ,内参引物为 β -actin,上游引物序列5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3',下游引物序列5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3',片段长度111 bp;CYP24A1上游引物序列5'-TGGATGAGCTGTGCGATGA-3',下游引物序列5'-TGCTTTCAAAGGACCACTTGTTTC-3',片段长度75 bp;CYP27B1上游引物序列5'-CAGGTGCTCTTCCAGTCAAA-3',下游引物序列5'-AAAGGATCCTGGTTCTGTGG-3',片段长度253 bp。逆转录合成的cDNA进行PCR扩增。PCR反应条件为预变性95℃30 s,变性95℃5 s,退火温度55℃30 s,延伸72℃30 s,循环次数45个。分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增,同时在60~99℃进行融解曲线分析,仪器自动绘制出对应的内参基因标准曲线和目的基因的标准曲线。Real-time PCR实验重复3次,每次3个复孔,根据PCR原始数据C_t值,根据Real-time PCR原始数据C_t值,计算相对定量值。

2.5 Western blot检测CYP27B1,CYP24A1蛋白的表达 收集上述分组细胞,按细胞蛋白提取试剂盒说明进行BMSCs细胞蛋白提取,冰上孵育20 min后1万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,收集上清,用BCA试剂盒,指标BSA标准曲线,用酶标仪测定562 nm处吸光值A,计算蛋白含量。将制备好的蛋白样品加入10%的凝胶中电泳,转膜,于封闭液中封闭后,加入CYP24A1一抗(1:100),CYP27B1一抗(1:500)4℃

过夜, TBST洗膜, 加入HRP标记二抗(1:200)孵育, TBST洗膜3次, 每次5 min。在反应盒内加入高灵敏度化学发光检测试剂盒A液及B液各1 mL, 混匀, 放入PDF膜, ECL化学发光显影曝光, 采用Gel-Pro analyzer4软件分析结果。

2.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件, 实验中各计量参数均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组间数据采用单因素方差分析比较, 组间两两比较采用LSD检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对D-半乳糖诱导的衰老BMSCs成骨分化细胞存活率的影响 与正常组比较, 模型组BMSCs成骨分化细胞经D-半乳糖诱导12, 24, 48, 72 h, 7, 14 d后细胞增殖存活率显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪含药血清中、高质量分数组及维生素D组均可在不同程度上提高衰老BMSCs成骨分化细胞增殖存活率($P < 0.01$)。见表1, 2。

表1 黄芪含药血清对D-半乳糖诱导的衰老BMSCs成骨分化细胞12, 24, 48 h存活率的影响($n=3$)

Table 1 Effect of Astragali Radix containing serum on survival rate of aging BMSCs osteoblasts induced by D-galactose for 12, 24, 48 h ($n=3$)

组别	质量分数/%	12 h		24 h		48 h	
		$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%
正常	-	0.125 0±0.001 7	100.00	0.232 0±0.003 5	100.00	0.288 3±0.006 7	100.00
模型	-	0.083 7±0.004 9 ²⁾	48.97	0.130 7±0.012 5 ²⁾	46.10	0.173 3±0.015 7 ²⁾	52.93
黄芪含药血清	20	0.105 0±0.004 4 ^{2,4)}	75.31	0.154 3±0.012 3 ^{2,3)}	58.69	0.207 3±0.017 4 ^{2,3)}	66.85
	40	0.116 0±0.006 6 ^{1,4)}	88.89	0.178 0±0.008 9 ^{2,4)}	71.28	0.236 0±0.010 6 ^{2,4)}	78.58
	60	0.126 0±0.001 7 ⁴⁾	101.23	0.199 3±0.019 6 ^{2,4)}	82.62	0.268 3±0.016 9 ⁴⁾	91.81
维生素D	100 ⁵⁾	0.122 7±0.001 2 ⁴⁾	97.12	0.203 7±0.012 1 ^{1,4)}	84.93	0.248 7±0.019 5 ^{2,4)}	83.77

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾表示浓度单位为 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表2~4同)。

表2 黄芪含药血清对D-半乳糖诱导的衰老BMSCs成骨分化细胞72 h, 7, 14 d存活率的影响($n=3$)

Table 2 Effect of Astragali Radix containing serum on survival rate of aging BMSCs osteoblasts induced by D-galactose for 72 h, 7, 14 d ($n=3$)

组别	质量分数/%	72 h		7 d		14 d	
		$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率/%
正常	-	0.503 0±0.011 5	100.00	1.558 0±0.110 5	100.00	2.132 0±0.120 2	100.00
模型	-	0.298 3±0.033 1 ²⁾	55.41	0.927 3±0.043 4 ²⁾	58.34	1.043 0±0.093 1 ²⁾	47.84
黄芪含药血清	20	0.361 7±0.040 2 ²⁾	69.21	1.200 0±0.077 8 ^{2,4)}	76.35	1.594 3±0.147 6 ^{2,4)}	74.25
	40	0.439 3±0.051 7 ⁴⁾	86.13	1.275 7±0.075 2 ^{2,4)}	81.35	1.915 3±0.020 8 ^{1,4)}	89.62
	60	0.453 7±0.044 7 ⁴⁾	89.25	1.362 0±0.048 7 ^{2,4)}	87.05	1.936 0±0.131 0 ^{1,4)}	90.61
维生素D	100 ⁵⁾	0.432 7±0.017 8 ^{1,4)}	84.68	1.251 0±0.077 1 ^{2,4)}	79.72	1.827 3±0.068 1 ^{2,4)}	85.41

3.2 对D-半乳糖诱导的衰老BMSCs成骨分化细胞中CYP27B1, CYP24A1 mRNA的影响 与正常组比较, 模型组CYP27B1 mRNA表达显著降低($P < 0.01$), CYP24A1 mRNA表达明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芪含药血清各质量分数组均可显著升高CYP27B1 mRNA表达($P < 0.01$), 且呈质量分数依赖性; 黄芪含药血清各质量分数组均可降低CYP24A1 mRNA相对表达量, 以黄芪含药血清高质量分数组较为显著($P < 0.01$)。维生素D组亦可显著提高D-半乳糖诱导大鼠衰老BMSCs成骨分化细胞

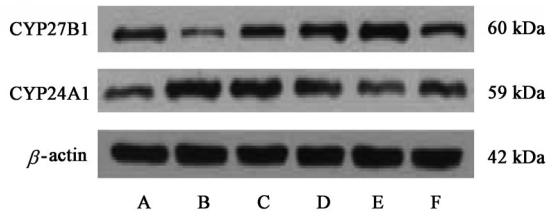
CYP27B1 mRNA的表达($P < 0.01$), 但对CYP24A1 mRNA相对表达量无明显影响。见表3。

3.3 对D-半乳糖诱导的衰老BMSCs成骨分化细胞中CYP27B1, CYP24A1蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组CYP27B1蛋白表达明显降低($P < 0.05$), CYP24A1蛋白表达显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪含药血清中、高质量分数组均可显著升高CYP27B1蛋白表达($P < 0.01$), 且呈质量分数依赖性; 黄芪含药血清高质量分数组可显著降低CYP24A1蛋白表达($P < 0.01$)。见图1, 表4。

表3 黄芪含药血清对D-半乳糖诱导大鼠衰老BMSCs CYP27B1, CYP24A1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Astragali Radix containing serum on expression of BMSCs CYP27B1 and CYP24A1 mRNA in aging rats induced by D-galactose($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量分数/%	CYP27B1	CYP24A1
正常	-	1.000±0.026	1.000±0.032
模型	-	0.374±0.021 ²⁾	1.258±0.016 ¹⁾
黄芪含药血清	20	0.630±0.019 ^{2,4)}	1.162±0.012
	40	0.977±0.047 ⁴⁾	1.058±0.043
	60	1.222±0.054 ^{2,4)}	0.893±0.013 ⁴⁾
维生素D	100 ⁵⁾	0.665±0.026 ^{2,4)}	1.235±0.195



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪含药血清低质量分数组; D. 黄芪含药血清中质量分数组; E. 黄芪含药血清高质量分数组; F. 维生素D组

图1 D-半乳糖诱导大鼠衰老BMSCs细胞CYP27B1, CYP24A1蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of CYP27B1, CYP24A1 protein expression in aging BMSCs cells induced by D-galactose

表4 黄芪含药血清对D-半乳糖诱导大鼠衰老BMSCs CYP27B1, CYP24A1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Astragali Radix containing serum on expression of BMSCs CYP27B1 and CYP24A1 proteins in aging rats induced by D-galactose($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量分数/%	CYP27B1/ β -actin	CYP24A1/ β -actin
正常	-	0.457±0.155	0.309±0.025
模型	-	0.158±0.051 ¹⁾	0.617±0.168 ²⁾
黄芪含药血清	20	0.376±0.117	0.562±0.135 ¹⁾
	40	0.637±0.133 ⁴⁾	0.499±0.015
	60	0.848±0.148 ^{2,4)}	0.330±0.030 ⁴⁾
维生素D	100 ⁵⁾	0.369±0.121	0.602±0.129 ²⁾

4 讨论

BMSCs是一种主要起源于中胚层,在骨组织修复中的重要种子细胞,其具有自我更新和多向分化能力,在体外能向成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞分化^[11];研究发现,BMSCs随着年龄的增加也在发生改变,是影响退行性疾病骨重建的重要因素之一。退行性骨质疏松是随着年龄增长而引起的以骨吸收大于骨生成为特征的进行性代谢性疾病,其

患者BMSCs中的骨脂分化失常,以成脂肪分化能力增强、成骨分化能力减弱为主要表现^[12],是导致骨量下降、骨骼矿化异常、骨吸收与骨合成失衡、易发生全身骨折的关键因素。衰老的BMSCs通常也会出现一系列增龄性变化,如数量减少、凋亡水平升高、增殖能力下降、成骨能力下降、成脂能力升高等,进而造成骨代谢失常,最终形成退行性骨质疏松^[13]。BMSCs在治疗骨质疏松方面已有大量研究,但其衰老供体的细胞及培养在临床上研究尚少^[14]。因此,调控衰老BMSCs向成骨分化的过程对防治退行性骨质疏松具有重要意义。

维生素D作为一种脂溶性维生素,在骨骼和矿物质代谢过程中起关键作用,既可促进钙、磷代谢,也对骨细胞产生直接作用^[15-16]。人体可通过食物获取或皮肤合成维生素D。其中皮肤通过阳光照射后其7-脱氢胆固醇生成维生素D前体,再与维生素D结合蛋白的 α -球蛋白特异性结合迅速进入肝脏,在肝细胞内质网和线粒体中经25-羟化酶(CYP27A1)作用转化为25-羟维生素D₃[25(OH)D₃],再于肾脏经维生素D活化酶CYP27B1作用转换为1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]。1,25(OH)₂D₃发挥生物学效应后,通过维生素D灭活关键酶CYP24A1在肝脏和小肠中转化为1,24,25(OH)₂D₃而失活^[17]。而1,25(OH)₂D₃作为维生素D主要活性形式,与维生素D受体(维生素DR)结合产生相应的生物学效应^[18]。研究发现,维生素D缺乏或维生素DR缺陷会增加骨质疏松的风险^[19]。血清中25(OH)D₃水平也与骨质疏松程度呈正相关,并且可为临床诊断骨质疏松提供参考,其含量可作为衡量维生素D营养状况的标准^[20]。骨质疏松患者多伴有维生素D不足,补充普通维生素D治疗可增加其血清25(OH)D₃,25(OH)₂D₃水平,有益骨骼;对于肾脏器质性损害的患者,因其CYP27B1水平低下无法被激活或受到抑制应合理补充活性维生素D^[21]。

中医将退行性骨质疏松归属于“骨痹”“骨痿”“肾虚腰痛”等范畴,中医认为肾藏精且主骨生髓,髓藏于骨腔滋养骨骼,骨的生长发育依赖于肾中精气的滋养与温煦。肾为先天之本,肾精充足,骨有滋养而强健有力;肾精亏虚,骨失充养则骨骼脆弱无力,易于发生骨折致骨质疏松^[22]。因此退行性骨质疏松与中医肾虚具有密切联系。黄芪为豆科黄耆属植物,具有补益肾气、固表生肌之功效。研究发现,黄芪及其复方含药血清可通过抑制大鼠系膜细胞增殖,达到延缓肾脏病进展、保护肾脏的功

效^[23]。黄芪多糖可有效保护受X射线辐射的BMSCs向成骨细胞分化的潜能,使其钙结节面积增加从而有效缓解骨质疏松^[24]。动物实验研究显示,运用黄芪散作用于骨质疏松大鼠,可明显提高其胫骨松质骨骨量、增强骨小梁结构^[25]。黄芪配伍熟地能够增加去卵巢骨质疏松大鼠骨密度、促进骨形成,使骨结构得到改善,对骨质疏松的治疗具有一定作用^[26]。课题组前期实验研究发现,黄芪有效化学成分黄芪多糖治疗骨质疏松症其机制与提高成骨细胞活性及调节维生素D相关基因与蛋白表达相关^[5,27]。本研究通过黄芪干预衰老BMSCs成骨分化细胞模型,通过比较不同浓度黄芪含药血清与维生素D对衰老BMSCs向成骨分化过程中CYP24A1, CYP27B1的影响探讨补肾中药抗BMSCs衰老及防治骨质疏松症的机制。

本实验结果显示,黄芪含药血清中、高质量分数组可显著提高衰老BMSCs成骨分化细胞增殖存活率,并可显著升高CYP27B1 mRNA和蛋白相对表达量,且呈质量分数依赖性;黄芪含药血清高质量分数组可显著降低CYP24A1 mRNA和蛋白相对表达量。由此推测,黄芪对衰老BMSCs向成骨细胞分化的调控可能是基于调节维生素D中两个关键酶CYP24A1, CYP27B1来实现的,其可能是防治骨质疏松的作用靶点。综上,本研究发现黄芪在衰老BMSCs向成骨细胞分化过程中可能是通过上调CYP27B1,下调CYP24A1的表达来有效改善骨质疏松的症状,为中药治疗原发性骨质疏松症的临床应用提供理论依据。

[参考文献]

[1] NAKAMICHI Y, TAKAHASHI N. Current topics on Vitamin D. The role of active forms of Vitamin D in regulation of bone remodeling[J]. Clin Calcium, 2015, 25(3):395-402.

[2] 卞琴,沈自尹,王拥军.骨髓间充质干细胞在中医理论中的归属[J].中国中医基础医学杂志,2011,17(7):794-797.

[3] 傅淑平,杨丽,洪浩,等.淫羊藿苷促SD大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化作用的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2015,35(7):839-846.

[4] 陈金锋,张海玲,肖春苟,等.维生素D调控电板提取物促骨髓间充质干细胞增殖分化的研究[J].局解手术学杂志,2017,26(10):714-718.

[5] 柳逸博,王佐林.浓缩生长因子与1,25二羟基维生素D3对骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响[J].

口腔颌面外科杂志,2016,26(1):13-18.

[6] 柴艺汇,高洁,田兴中,等.黄芪多糖对MC-3T3-E1成骨细胞CYP27B, CYP24A mRNA及蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):147-151.

[7] 柴艺汇,管连城,高洁,等.基于“肾藏精,主骨”理论探讨黄芪补肾治疗骨质疏松症的机理[J].时珍国医国药,2018,29(3):671-673.

[8] 王芳,曾煦欣,毛建文,等.黄芪散含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和分化功能的影响[J].中成药,2017,39(7):1478-1482.

[9] 王瑶瑶,陈云志,秦忠,等.黄芪对维生素D缺乏大鼠骨质的保护作用[J].世界科学技术—中医药现代化,2014,16(8):1827-1830.

[10] 鲍远,黄俊明,靖兴志,等.淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J].中国组织工程研究,2016,20(24):3501-3507.

[11] 李兆峰,王鹏,谢中瑜,等.TLN1-PI3K/Akt通路调控骨髓间充质干细胞成骨分化[J].岭南现代临床外科,2019,19(4):1-5.

[12] DEVLIN M J, ROSEN C J. The bone-fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity[J]. Lancet Diabetes Endo, 2015, 3(2):141-147.

[13] 马洋.衰老性骨质疏松中自噬与骨髓间充质干细胞增龄性变化的关系的研究[D].西安:第四军医大学,2014.

[14] 陈裕浩,朱向情,潘兴华.骨髓间充质干细胞的衰老特征及其与治疗的相关性[J].中国组织工程研究,2017,21(17):2746-2752.

[15] 周建烈,刘忠厚.补充钙和维生素D防治骨质疏松症的全球临床指南进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(3):371-380.

[16] DANIEL B. Vitamin D and bone[J]. Curr Osteoporos Rep, 2012, 10(2):151-159.

[17] HOLICK M F, BINKLEY N C, BISCHOFFFERRARI H A, et al. Evaluation, treatment, and prevention of Vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocr Metab, 2012, 96(7):1911-1930.

[18] 陈云志,管连城,高洁,等.维生素D轴:中医补肾方药的潜在靶点[J].时珍国医国药,2017,28(9):2210-2212.

[19] TUOHIMAA P. Vitamin D and aging [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 114(12):78-84.

[20] 王荣锋,郁昊,蒋新建.老年糖尿病患者血清25羟维生素D水平与骨质疏松相关性研究[J].陕西医学杂志,2019(8):1032-1034,1041.

[21] 薛青,张礼超,周奕.骨化三醇对比普通维生素D₃治疗骨质疏松症的临床研究[J].广州医药,2019,50

- (4):62-65.
- [22] 李宁,谢兴文,陈欣.“肾主骨、生髓”理论在骨质疏松症研究中的应用[J].中国中医骨伤科杂志,2011,19(4):70-72.
- [23] 王广洋,任现志.黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠肾小球系膜细胞NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA表达的影响[J].中医杂志,2015,56(1):59-62.
- [24] 王磊,卢志伟,许小敏,等.黄芪多糖对X线辐射骨髓间充质干细胞向成骨方向分化的影响[J].中国中医药信息杂志,2017,24(12):47-51.
- [25] 王芳,陈珺,曾煦欣,等.黄芪散对糖皮质激素性骨质疏松大鼠股骨和胫骨的影响[J].中成药,2017,39(6):1109-1114.
- [26] 欧莉,卫培峰,苗彦霞.黄芪配伍熟地对去势大鼠骨质疏松的治疗作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):363-366.
- [27] 柴艺汇,高洁,陈云志,等.黄芪多糖对小鼠MC-3T3-E1成骨细胞维生素D受体mRNA及蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2018,29(6):1281-1283.

[责任编辑 孙丛丛]