# 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B，CYP24A mRNA 及蛋白表达的影响

柴艺汇[1]，高洁[2]，田兴中[3]，吴大梅[2]，管连城[4]，李静[1]，李文[2]，陈云志[2*]

(1. 贵阳中医学院 实验中心，贵阳 550025；2. 贵阳中医学院 基础医学院，贵阳 550025；3. 张家口市第五医院，河北 张家口 075000；4. 贵阳中医学院 研究生院，贵阳 550025)

［摘要］ **目的**:通过研究黄芪多糖对成骨细胞增殖及 1α 羟化酶(CYP27B),24-羟基化酶(CYP24A)基因与蛋白表达情况的影响对其治疗骨质疏松症(OP)作用机制进行初步探讨。**方法**:以 MC-3T3-E1 成骨细胞为研究对象,实验分为 5 组,分别为正常组,维生素 D 组($1\times10^{-5}$ mmol·$L^{-1}$),黄芪多糖高、中、低剂量组(10,1,0.1 mg·$L^{-1}$)。用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度的黄芪多糖在不同时间(24,36,48 h)对 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖率的影响。实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP24A,CYP27B mRNA 的表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP24A,CYP27B 蛋白的表达情况。**结果**:MTT 比色法显示黄芪多糖的质量浓度在 0.1,1,10 mg·$L^{-1}$时可以提高 MC-3T3-E1 成骨细胞的增殖率,且在 48 h 促增殖作用最佳。Real-time PCR,Western blot 检测结果显示,与正常组比较,维生素 D 组 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B mRNA 表达量、蛋白表达量有显著促进作用($P<0.05$);与维生素 D 组比较,黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 mg·$L^{-1}$时对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP24A mRNA 表达量、蛋白表达量有显著抑制作用($P<0.05$)。**结论**:黄芪多糖能够治疗骨质疏松症其机制与提高成骨细胞活性及调节 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP24A,CYP27B mRNA 及蛋白表达水平有关。

［关键词］ 黄芪多糖；成骨细胞；24-羟基化酶（CYP24A）；1α 羟化酶（CYP27B）

［中图分类号］ R22;R24;R285.5　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1005-9903(2018)13-0147-05

［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20181327

［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1057.013.html

［网络出版时间］ 2018-04-12 17:14

# Effect of Astragali Radix Polysaccharide on mRNA and Protein Expression of CYP27B, CYP24A in MC-3T3-E1 Osteoblasts

CHAI Yi-hui[1], GAO Jie[2], TIAN Xing-zhong[3], WU Da-mei[2], GUAN Lian-cheng[4], LI Jing[1], LI Wen[2], CHEN Yun-zhi[2*]

(1. *Experimental Center of Guiyang University of Traditional Chinese Medicine (TCM)*, *Guiyang* 550025, *China*; 2. *Basic Medical College of Guiyang University of TCM*, *Guiyan* 550025, *China*; 3. *The Fifth Hospital of Zhangjiakou City*, *Zhangjiakou* 075000, *China*; 4. *The graduate College of Guiyang University of TCM*, *Guiyang* 550025, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To investigate the effects of Astragali Radix polysaccharides on osteoblast proliferation, 1α hydroxylase (CYP27B) and 24-hydroxylase (CYP24A) gene and protein expression and

［收稿日期］ 20180101(004)

［基金项目］ 国家自然科学基金项目(81660762);贵州省科技厅联合基金项目(2015GZ53841);贵州省教育厅创新群体重大研究项目(黔教合 KY 字(2017)041);贵州省国内一流学科建设项目(GNYL(2017)008)

［第一作者］ 柴艺汇,硕士,实验师,从事中西医结合基础研究,E-mail:yihuichai@163.com

［通信作者］ * 陈云志,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合基础研究, E-mail: 1239638026@qq.com

preliminarily explore its mechanism in the treatment of osteoporosis (OP). **Method**: The MC-3T3-E1 osteoblasts were divided into 5 groups: normal group, vitamin D group ($1 \times 10^{-5}$ mmol·L$^{-1}$), Astragali Radix polysaccharide high dose (10 mg·L$^{-1}$) group, Astragali Radix polysaccharide middle dose (1 mg·L$^{-1}$) group and Astragali Radix polysaccharide low dose (0.1 mg·L$^{-1}$) group. The effect of different concentrations of Astragali Radix polysaccharides on the proliferation of MC-3T3-E1 osteoblasts at different time points (24, 36, 48 h) was detected by methylthiazoletetrazolium colorimetry method (MTT). The mRNA expression of CYP24A and CYP27B in MC-3T3-E1 osteoblasts was detected by real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the protein expression of CYP24A and CYP27B in asthmatic rat MC-3T3-E1 osteoblasts was detected by Western blot. **Result**: MTT assay showed that the proliferation rate of MC-3T3-E1 osteoblasts could be enhanced by Astragali Radix polysaccharide at the concentrations of 0.1, 1, 10 mg·L$^{-1}$, and the effect was best at 48 h. The results of Real-time PCR and Western blot showed that the mRNA and protein expression levels of CYP27B in MC-3T3-E1 osteoblasts were significantly promoted in vitamin D group as compared with the normal group ($P < 0.05$). As compared with vitamin D group, the Astragali Radix polysaccharides (10, 1, 0.1 mg·L$^{-1}$) significantly inhibited the mRNA and protein expression of CYP24A in MC-3T3-E1 osteoblast ($P < 0.05$). **Conclusion**: The mechanism of Astragali Radix polysaccharide to treat osteoporosis is related to the improvement of osteoblast activity and the regulation of CYP24A, CYP27B mRNA and protein expression levels in MC-3T3-E1 osteoblast.

[**Key words**] Astragali Radix polysaccharide; osteoblast; 24-hydroxylase (CYP24A); 1$\alpha$-hydroxylase (CYP27B)

骨质疏松(osteoporosis,OP)是与老龄化相关的一组临床常见骨病,是一种以骨量低下、骨微结构破坏、骨脆性增加、容易发生骨折为特征的退行性病变。随着人类寿命的延长和老龄化社会的到来,骨质疏松症已成为一个严峻的社会和医学问题。我国大陆地区 40 岁以上(含 40 岁)患有骨质疏松症的人群达到约 1.1 亿[1]。骨质疏松性骨折危害大,致残率及病死率高[2]。同时,骨质疏松症和骨质疏松性骨折及其他伴随并发症的治疗和护理,需要投入巨大人力、物力及高昂费用,造成沉重的家庭和社会经济负担。骨质疏松发病的病理机制的核心是成骨细胞数量的减少和功能的下降,因此寻找能促进成骨细胞增殖分化的药物是骨质疏松症防治的重要方向[3]。目前研究表明,维生素 D 缺乏是原发性骨质疏松发生的重要因素[4],维生素 D 缺乏,使肠道钙吸收减少,血钙降低,继发甲状旁腺分泌甲状腺激素(PTH)增多,破骨细胞被激活,骨溶解增加,骨钙流失增多,致骨量减少、骨质疏松。黄芪作为一味传统的应用广泛的中药,味甘,微温,归脾肺经,具有补气升阳,益卫固表,托毒生肌,利水退肿之功效[5]。据中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析,黄芪的使用频率超过 25%[6]。同时文献研究显示,黄芪在骨质疏松性骨折组方用药中使用频率较高[7]。目前许多学者把黄芪应用于临床和实验中,在骨质疏松的治疗中均取得理想效果。本课题组在前期动物实验研究中表明黄芪可通过调节维生素 D 缺乏大鼠维生素 D-FGF-23-Klotho 轴而发挥抗骨质疏松作用[8]。基于前期研究基础,本实验采用离体实验探讨黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 24-羟基化酶(CYP24A),1$\alpha$-羟化酶(CYP27B) mRNA 及蛋白表达的影响,初步探讨黄芪多糖治疗骨质疏松的作用机制。

## 1 材料

**1.1** MC-3T3-E1 成骨细胞(购买于中国科学院上海细胞库)。

**1.2** 药物及试剂 黄芪多糖,二甲基亚砜(DMSO),噻唑蓝(MTT)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20161122,302A0332,303H057);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1828728);DMEM 培养基(美国 Hyclon 公司,批号 AC10232461);trnzol 总 RNA 提取试剂(天根生化科技北京有限公司,批号 Q5222);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser;DL2 000 DNA Marker(大连宝生物工程有限公司,批号分别为 AK4401,A2201C);引物设计由美国 Invitrogen 公司合成;CYP27 一抗(英国 Abcam 公司,批号 GR846521-1);$\beta$-肌动蛋白($\beta$-actin),CYP24(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 85116,B6376);二抗(HRP 兔),二抗(HRP 鼠)(康为世纪生物科技

有限公司,批号分别为 03803/40202,03803/40202)。

**1.3** 仪器 CUSA31311 型二氧化碳培养箱(美国 Sheldon 公司);TS-100F 型倒置相差显微镜(日本尼康公司);ELX808IU 型自动酶标读仪(美国 Bio-Tek 公司);Centrifuge 5415D 型号离心机(德国 Eppendorf 公司);164-5052 型垂直电泳仪,转膜仪,Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳槽,ChemiDoc™ XRS + 型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);ABI7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

## 2 方法

**2.1** MC-3T3-E1 成骨细胞培养与分组 MC-3T3-E1 成骨细胞单层贴壁生长在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃ 5% $CO_2$ 培养箱中传代培养。将对数生长期的细胞随机分为 5 组,分别为正常组(使用培养基正常培养且无其他干预因素),黄芪多糖 10,1,0.1 $mg \cdot L^{-1}$组和维生素 D 组(浓度 $1 \times 10^{-5}$ $mmol \cdot L^{-1}$)。

**2.2** MTT 比色法检测 MC-3T3-E1 成骨细胞的增殖情况 取对数生长期细胞,用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液重悬,细胞密度成 $3 \times 10^4$ 个/mL。分别接种于 3 块无菌 96 孔培养板,每孔100 μL,待细胞贴壁,同步 24 h 去除全培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,加入稀释于培养液的不同浓度的药物。实验分 5 组,每组 6 个复孔,3 块板分别培养 24,36,48 h 后各取出 1 块培养板,加入 MTT 溶液($5\ g \cdot L^{-1}$)20 μL,37 ℃继续培养 4 h 以上,终止培养,弃上清液。每孔加入 DMSO 150 μL,室温振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度 $A$,计算细胞增殖率。实验重复 3 次,计算平均值。

**2.3** Real-time PCR 检测 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A mRNA 表达 按上述分组的细胞,给药培养 48 h 后收集细胞,按超纯 RNA 提取试剂盒说明提取 MC-3T3-E1 成骨细胞总 RNA,超微量光谱仪检测 RNA 纯度和浓度确定在 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 1.80~2.00,并进行琼脂凝胶电泳检测 RNA 片段完整性。根据 cDNA 反转录试剂盒要求,取总 RNA 1 μg进行逆转录,逆转录条件为 37 ℃孵育 15 min,85 ℃ 5 min。以 $\beta$-actin 为内参照。PCR 反应体系为18 μL,引物序列为 $\beta$-actin 上游引物序列 5′-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3′,下游引物序列 5′-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3′,扩增产物长度 159 bp;CYP24A 上游引物序列 5′-TATCGGGACCATCGCAAC-3′,下游引物序列 5′-CATAAAATCAGCCAAGACCTCA-3′,扩增产物长度 157 bp;CYP27B 上游引物序列 5′-GGGCGTCCCTATTCACTTG-3′,下游引物序列 5′-GTGCGTCTTAGCCTTCTCCA-3′,扩增产物长度175 bp。通过逆转录合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 40 min,60 ℃延伸 1 min。循环次数为 40 个。稀释后样品各取 2 μL作模板,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。PCR 实验重复 3 次,每次 3 个复孔,根据 Real-time PCR 原始数据 $C_t$ 值,利用$2^{-\Delta\Delta C_t}$计算相对定量值。

**2.4** 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A 蛋白表达 按上述分组的细胞,给药培养 48 h 后收集细胞,按细胞蛋白提取试剂盒说明进行 MC-3T3-E1 成骨细胞蛋白提取,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,将制备好的蛋白样品加入 10% 的凝胶中电泳、转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2.5 h,CYP27B 加入一抗(1∶1 000),CYP24A 加入一抗(1∶100)4 ℃过夜,洗涤缓冲液(TBST)洗膜,加入 CYP27B 二抗(1∶5 000),CYP24A 二抗(1∶5 000);室温孵育 1~1.5 h,TBST 洗膜,ECL 发光显影。将胶片进行扫描,凝胶成像系统分析结果。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量/同一样本内参表达量。

**2.5** 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,组间比较 $t$ 检验进行统计学处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1** 对 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖的影响 与正常组比较,黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 $mg \cdot L^{-1}$时在 24,36,48 h 3 个时间点均可显著促进 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖($P<0.05$),且在 48 h 时促细胞增殖作用最佳。见表 1。

**3.2** 对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A mRNA 表达的影响 与正常组比较,黄芪多糖质量浓度在 10,1,0.1 $mg \cdot L^{-1}$时均可以上调 CYP27B mRNA 的表达,且在质量浓度为 1,0.1 $mg \cdot L^{-1}$时与正常组和维生素 D 组比较均有显著性差异($P<0.05$);黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 $mg \cdot L^{-1}$时均可下调 CYP24A mRNA 表达,且与维生素 D 组比较有显著性差异($P<0.05$)。见表 2。

表 1 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞的增殖率的影响($n=3$)

Table 1 Effect of Astragali Radix polysaccharides on proliferation rate of MC-3T3-E1 osteoblasts($n=3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L$^{-1}$ | 24 h | | 36 h | | 48 h | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $A(\bar{x}\pm s)$ | 增殖率/% | $A(\bar{x}\pm s)$ | 增殖率/% | $A(\bar{x}\pm s)$ | 增殖率/% |
| 正常 | - | 0.188 7 ±0.013 2 | - | 0.201 3 ±0.015 1 | - | 0.185 3 ±0.020 4 | - |
| 黄芪多糖 | 0.001 | 0.185 5 ±0.010 8 | -1.68 | 0.208 2 ±0.033 9 | 3.39 | 0.190 8 ±0.017 1 | 2.97 |
| | 0.01 | 0.195 5 ±0.018 0 | 3.62 | 0.217 3 ±0.028 5 | 7.95 | 0.199 7 ±0.017 2 | 7.73 |
| | 0.1 | 0.212 3 ±0.019 1$^{1)}$ | 12.54 | 0.234 8 ±0.019 2$^{1)}$ | 16.64 | 0.220 0 ±0.014 0$^{1)}$ | 18.71 |
| | 1 | 0.226 0 ±0.018 6$^{1)}$ | 19.79 | 0.246 0 ±0.016 3$^{1)}$ | 22.19 | 0.235 0 ±0.016 3$^{1)}$ | 26.80 |
| | 10 | 0.229 0 ±0.015 0$^{1)}$ | 21.38 | 0.249 0 ±0.038 5$^{1)}$ | 23.68 | 0.233 7 ±0.019 7$^{1)}$ | 26.08 |

注:与正常组比较$^{1)}$ $P<0.05$。

表 2 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

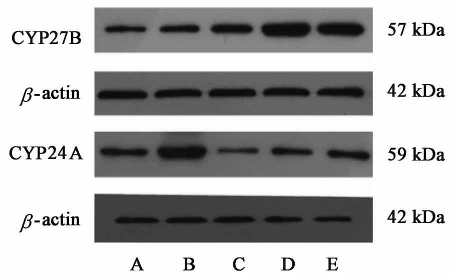
Table 2 Effect of Astragali Radix polysaccharides on expression of CYP27B and CYP24A mRNA in MC-3T3-E1 osteoblasts($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L$^{-1}$ | CPY24A | CYP27B |
|---|---|---|---|
| 正常 | - | 100.00 ±23.73 | 100.00 ±18.27 |
| 维生素 D | - | 180.07 ±14.75$^{1)}$ | 135.75 ±19.77 |
| 黄芪多糖 | 10 | 41.19 ±10.14$^{2)}$ | 152.82 ±11.79 |
| | 1 | 55.29 ±6.37$^{2)}$ | 286.84 ±44.66$^{1,2)}$ |
| | 0.1 | 89.98 ±15.99$^{2)}$ | 237.25 ±13.36$^{1,2)}$ |

注:与正常组比较$^{1)}$ $P<0.05$;与维生素 D 组比较$^{2)}$ $P<0.05$(表 3 同)。

### 3.3 对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A 蛋白表达

与正常组比较,黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 mg·L$^{-1}$时均可促进 CYP27B 蛋白表达($P<0.05$),且质量浓度为 1 mg·L$^{-1}$时表达量最高;与正常组比较,黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 mg·L$^{-1}$时均可抑制 CYP24A 蛋白表达,且当质量浓度为 10,1 mg·L$^{-1}$时抑制作用明显($P<0.05$)。见图 1,表 3。




A. 正常组;B. 维生素 D 组;C. 黄芪多糖 10 mg·L$^{-1}$组;D. 黄芪多糖 1 mg·L$^{-1}$组;E. 黄芪多糖 0.1 mg·L$^{-1}$组

图 1 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of Astragali Radix polysaccharides on expression of CYP27B and CYP24A protein in MC-3T3-E1 osteoblasts

表 3 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B,CYP24A 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Table 3 Effect of Astragali Radix polysaccharides on expression of CYP27B and CYP24A protein in MC-3T3-E1 osteoblasts($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L$^{-1}$ | CPY24A/β-actin | CYP27B/β-actin |
|---|---|---|---|
| 正常 | - | 0.62 ±0.06 | 0.50 ±0.08 |
| 维生素 D | - | 1.07 ±0.12$^{1)}$ | 0.63 ±0.10 |
| 黄芪多糖 | 10 | 0.24 ±0.09$^{1,2)}$ | 0.86 ±0.15$^{1)}$ |
| | 1 | 0.33 ±0.08$^{1,2)}$ | 1.55 ±0.12$^{1,2)}$ |
| | 0.1 | 0.53 ±0.07$^{1,2)}$ | 0.87 ±0.08$^{1)}$ |

## 4 讨论

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,主要参与骨基质的合成、分泌和矿化,对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量维持和损伤修复起到关键作用。当成骨细胞生成不足或功能降低时,就不能及时补充由于破骨细胞活动导致的骨吸收、骨量丢失,最终发生骨质疏松。因此提高成骨细胞的数量或活性是防治骨质疏松症的主要方法之一。

维生素 D 是一种脂溶性类固醇衍生物,不仅能直接促进钙、磷吸收,为骨骼矿化提供原料,还可通过促进成骨细胞形成、抑制成骨细胞凋亡等多种作用维持骨骼的正常生长发育[9],且作为一种重要的骨代谢调节激素,在骨质疏松症发生进程中发挥着重要作用。在正常生理情况下,体内维生素 D 主要有 2 种存在形式,即 25(OH)$D_3$ 与 1,25(OH)$_2D_3$。其中,1,25(OH)$_2D_3$ 是由 25(OH)$D_3$ 经肝、肾 2 次羟化作用转化成的可与维生素 D 受体(Vitamin D receptor,VDR)结合发挥相应效应的活性维生素 D。CYP27B 基因编码的羟化酶是维生素 D 活化的关键酶,而将 1,25(OH)$_2D_3$ 灭活的酶则为 CYP24A 基因编码的羟化酶。维生素 D,VDR,CYP27B,CYP24A

共同组成维生素 D 轴能在骨骼局部以自分泌形式发挥对骨的保护作用[10]。本次实验结果中,成骨细胞经维生素 D 干预后,分别对维生素 D 存在活化和失衡功能的两个关键酶 CYP27B 和 CYP24A 均发生表达上调,提示生理状态的成骨细胞对维生素 D 活化与失活的代谢水平及利用率上升,维生素 D 轴整体活性升高。推测可能与细胞本身的反馈性适应调节有关。

中医学虽无骨质疏松这一病名,但依据其症状及发病机制,当属中医"肾虚腰痛"、"骨萎"、"骨枯"、"骨痹"的范畴。中医认为肾为先天之本,藏精主骨生髓,髓藏于骨腔滋养骨骼,骨的生长发育依赖肾中精气的滋养与推动,"肾精充足则骨髓生化有源,骨得滋养而强健有力,肾精亏虚则骨髓乏源,骨失充养而致骨骼脆弱无力,易于发生骨折"[11]。肾虚与骨质疏松症的发生发展有着密切的联系。

黄芪性微温,味甘,归脾、肺经,具有补气升阳、益卫固表、托毒生肌、利水退肿之功效,另有文献记载黄芪还有补益肾气的作用。现代药理学研究表明,黄芪的主要化学成分有黄芪多糖、黄酮类等,其药理作用为提高免疫功能、抗菌、抗病毒、保护心脑血管等作用,且在治疗骨质疏松方面有明显的疗效。短期低浓度黄芪多糖能促进诱导培养的 BM-SCS 的代谢和蛋白质的合成,有利于细胞增殖以及向成骨细胞的分化[12]。刘豫蓉等[13]实验表明适宜质量浓度的黄芪多糖水溶液在短期内对体外成骨细胞的增殖与分化具有一定的促进作用。高田林[14]研究表明黄芪多糖表现出了一定的促进 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖和分化的作用,进而说明黄芪多糖能够促进骨组织的再生。另有研究表明,黄芪可通过活化成骨细胞分化成熟的重要标志物 AKP 来达到改善骨质疏松症的效果[15]。

课题组前期的实验研究表明,黄芪可通过调节维生素 D 缺乏大鼠维生素 D-FGF-23-Klotho 轴而发挥抗骨质疏松作用[6]。本实验从细胞分子水平研究显示黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞有一定促增殖作用,且在 48 h 时促增殖作用最佳。与正常组比较,黄芪多糖在质量浓度为 1,0.1 $mg\cdot L^{-1}$时对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B mRNA 及蛋白表达量有显著促进作用;与维生素 D 组比较,黄芪多糖在质量浓度为 10,1,0.1 $mg\cdot L^{-1}$时对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP24A mRNA 及蛋白表达量有显著抑制作用。因此,通过本实验研究结果可提示黄芪多糖防治骨质疏松的机制与通过调控涉及维生素 D 相关代谢的 CYP24A 与 CYP27B 基因与蛋白表达有一定的关联性,这为中医药防治骨质疏松发生提供一个的新靶点,其相关机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 张智海,刘忠厚,石少辉,等. 中国大陆地区以-2. 5SD 为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(1):1-7.

[2] 邱贵兴,裴福兴,胡侦明,等. 中国骨质疏松性骨折诊疗指南(骨质疏松性骨折诊断及治疗原则)[J]. 中华骨与关节外科杂志,2015,8(5):371-374.

[3] Huangfu D, Maehr R, GUO W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds [J]. Nat Biotechnol, 2008,26(7):795-797.

[4] Brincat M, Gambin J, Brincat M, et al. The role of vitamin D in osteoporosis[J]. Maturitas, 2015, 80(3): 329-332.

[5] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:428.

[6] 郭杨,马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):188-191.

[7] 庞坚,王翔,陈元川,等. 中药治疗骨质疏松性骨折的组方用药研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(1):238-239.

[8] 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.

[9] Lanske B, Razzaque M S. Vitamin D and aging: old concepts and new insights[J]. J Nutr Biochem,2007,18(12):771-777.

[10] Ormsby R T, Findlay D M, Kogawa M, et al. Analysis of vitamin D metabolism gene expression in human bone: Evidence for autocrine control of bone remodelling[J]. J Steroid Biochem,2014,144,110-113.

[11] 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.

[12] 许春姣,蒯新春,郭峰,等. 黄芪对犬骨髓基质干细胞增殖及超微结构的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2007,25(5):432-436.

[13] 刘豫蓉,张朝良,孔祥丽,等. 黄芪多糖对成骨细胞增殖分化和结构的影响[J]. 国际口腔医学杂志,2010,37(2):133-137.

[14] 高田林. 黄芪多糖三维立体培养小鼠 MC-3T3-E1 成骨细胞的生物学效应研究[D]. 长春:吉林大学,2016.

[15] 胡杨洋,陈锐娥,王胜鹏,等. 中药药对的系统研究(Ⅵ)-黄芪当归药对研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2012,14(2):1349-1356.

[责任编辑 周冰冰]