

# 淫羊藿黄酮类主要成分促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化作用及机制的影响

许静<sup>1</sup>, 张晶晶<sup>2</sup>, 郭非非<sup>2</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 张毅<sup>2</sup>, 杨洪军<sup>2</sup>, 吴宏伟<sup>2\*</sup>, 张琼<sup>1\*</sup>

(1. 山西医科大学 药学院, 太原 030001; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**探讨淫羊藿黄酮类主要成分朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷, 淫羊藿次苷对骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化的促进作用, 并对其作用机制进行预测。**方法:**采用全骨髓细胞贴壁法分离纯化 SD 大鼠 BMSCs 做原代培养。实验分为朝藿定 A + 成骨诱导培养基( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组, 朝藿定 B + 成骨诱导培养基( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组, 朝藿定 C + 成骨诱导培养基( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组, 淫羊藿苷 + 成骨诱导培养基( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组, 淫羊藿次苷 + 成骨诱导培养基组及成骨诱导培养基组(空白组)6 组。加入药物进行干预 14 d 后, 采用定性与定量相结合的方法, 通过茜素红染色、细胞骨架染色、碱性磷酸酶定量分析, 对淫羊藿 5 种黄酮类主要成分促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化作用进行药理学评价; 在此基础上, 基于 BATMAN-TCM 网络药理学研究平台, 对相关靶点和通路进行预测分析, 探讨其潜在作用机制。**结果:** BMSCs 在作用浓度为  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的药物浓度作用下诱导 14 d, 通过细胞骨架染色, 各给药组均可明显观察到多角形成骨细胞增多; 通过茜素红染色, 各给药组可明显观察到大量的矿化结节的形成; 通过碱性磷酸酶含量测定, 与空白组比较, 各给药组碱性磷酸酶含量升高, 其中朝藿定 C, 淫羊藿苷组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 淫羊藿次苷组具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。同时网络药理学分析表明, 5 种黄酮类成分在促进增殖和分化方面共得到 33 个潜在作用靶点, 并富集分析得到 8 条信号通路, 其中 activation of MAPK activity, estrogen signaling pathway 已有实验报道。**结论:**淫羊藿黄酮类主要成分朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷, 淫羊藿次苷均具有促进 BMSCs 向成骨方向分化的作用, 其中朝藿定 C, 淫羊藿苷, 淫羊藿次苷的作用效果显著, 网络药理学分析结果从整体上阐释了多成分的作用机制, 为进一步实验验证提供参考。

**[关键词]** 淫羊藿; 淫羊藿黄酮; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 分子机制; 网络药理学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0113-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140113

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1131.042.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-27 11:31

## Promotive Effect of Epimedii Folium Flavonoids on Proliferation and Differentiation of BMSCs into Osteoblasts

XU Jing<sup>1</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>2</sup>, GUO Fei-fei<sup>2</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>,  
YANG Hong-jun<sup>2</sup>, WU Hong-wei<sup>2\*</sup>, ZHANG Qiong<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of main Epimedii Folium flavonoids (epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and icarisid I) on promoting BMSCs proliferation and differentiation into osteoblasts and to predict the mechanism of them. **Method:** BMSCs in SD rats were isolated and purified by whole bone marrow adherence method for primary culture. The experiment was divided into 6 groups: epimedin A +

**[收稿日期]** 20170301(009)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B08)

**[第一作者]** 许静, 在读硕士, 从事中药药理研究, Tel:15536230676, E-mail: xujing930@sina.cn

**[通讯作者]** \*张琼, 博士, 副教授, 从事天然产物研究工作, Tel:0351-4012311, E-mail: 5109402@qq.com;

\*吴宏伟, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制及中医药代谢组学研究, Tel:010-64032656, E-mail: whw9905012@163.com

osteogenic medium ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), epimedin B + osteogenic medium ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), epimedin C + osteogenic medium ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), icariin + osteogenic medium ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), icaricide group + osteogenic medium (blank group). After drug intervention for 14 days, qualitative and quantitative methods were combined for pharmacodynamic evaluation, of the above 5 kinds of Epimedii Folium flavonoids by alizarin red staining, cytoskeleton staining and alkaline phosphatase assay. Meanwhile, the potential targets and pathways were predicted and analyzed based on BATMAN-TCM network pharmacology research platform to investigate the action mechanisms. **Result:** BMSCs were treated with  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  drugs for 14 d, and polygonal osteoblasts were increased in various groups by cytoskeleton staining; in alizarin red staining, a large number of mineralized nodules were formed in various treatment groups; in Alkaline phosphatase assay, the content of alkaline phosphatase was increased in various treatment groups as compared with the blank group, particularly, the groups of epimedin C ( $P < 0.05$ ), icariin ( $P < 0.05$ ), and icaricidin I ( $P < 0.01$ ) showed significant changes. As for network pharmacology analysis, 33 potential targets and 8 pathways about proliferation and differentiation were obtained. Among them, activation of MAPK activity and estrogen signaling pathway had been verified by the relative experimental reports. **Conclusion:** All of the above 5 kinds of Epimedii Folium flavonoids could promote BMSCs proliferation and differentiation into osteoblasts. especially, epimedin C, icariin, and icaricidin I had significant effects. The results of network pharmacology analysis interpreted the overall mechanism of the Epimedii Folium flavonoids, providing a reference for further research.

**[Key words]** Epimedii Folium; Epimedii Folium flavonoids; bone marrow mesenchymal stem cells; osteoblasts; molecular mechanisms; network pharmacology

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种常见的多种因素造成的骨代谢疾病。其以骨量减少, 骨组织结构受损为特征, 会引起骨脆性的增加和骨组织强度的降低<sup>[1]</sup>, 从而提高骨折的风险性和致残率。近年来研究发现, 骨髓间充质干细胞与骨质疏松密切相关, 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 分化为成骨细胞的能力减弱或向脂肪细胞分化能力的增强是造成骨质疏松的重要原因之一<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞作为一种来源于骨髓基质的可以向多种组织分化的细胞, 在不同条件下可以诱导成为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、基质细胞、造血细胞及神经元等细胞系<sup>[3]</sup>; 骨髓间充质干细胞具有自我更新能力强、易于扩散、分化能力强等特点, 在骨代谢中具有十分重要的作用, 对于骨坏死有着很强的修复能力<sup>[4]</sup>。因此, 加强 BMSCs 向成骨细胞分化, 对骨质疏松的治疗具有重要意义, 已经成为研究开发抗骨质疏松药物的热点。

淫羊藿, 又称仙灵脾, 为小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿或朝鲜淫羊藿的干燥叶, 中医传统认为具有补肾阳, 强筋骨, 祛风湿的作用, 临床常用于治疗肾阳虚衰, 阳痿遗精, 筋骨痿软, 风湿痹痛, 麻木拘挛<sup>[5]</sup>。现代药理学研究表明, 淫羊藿的主要活性成分为黄酮类成分, 其中以朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷, 淫羊藿次苷最具代表性且含

量较高, 5 个成分的总量约占淫羊藿总黄酮的 10% ~ 20%, 并且淫羊藿苷为 2015 年版《中国药典》的质控成分<sup>[6-8]</sup>。基于淫羊藿“补肾阳, 强筋骨”的传统功效, 临床常应用淫羊藿或含有淫羊藿的中药复方治疗骨质疏松, 并且疗效确切<sup>[9]</sup>。目前现有文献研究表明淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷、淫羊藿次苷具有促进骨髓间充质干细胞的向成骨性分化的作用<sup>[10-12]</sup>, 但是其机制仍有待深入研究, 并且对于其他主要黄酮类成分如朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C 的相关研究罕有报道。

为了进一步探讨淫羊藿黄酮类成分对 BMSCs 向成骨方向分化的促进作用, 本实验采用细胞培养技术, 通过茜素红染色, 细胞骨架染色, 碱性磷酸酶定量分析, 观察淫羊藿黄酮类主要成分 (朝藿定 A, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷, 淫羊藿次苷) 促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨方向增殖分化的作用, 比较不同化合物间的作用差异; 在此基础上, 采用网络药理学的方法, 预测这些成分产生诱导分化增殖作用的相关靶点并进行通路富集分析, 为进一步的实验验证奠定基础; 与此同时, 通过成分-靶标-信号通路间的网络分析从整体上阐释淫羊藿多种黄酮类成分在诱导 BMSCs 向成骨方向分化方面的协同机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠, 购自北京大学动物实

验中心,动物质量合格证号 SCXK(晋)2012-0004。实验过程中对动物的处理符合动物伦理学标准,动物伦理委员会编号 201606110。

**1.2 药物及试剂** 淫羊藿苷(批号 150321),朝藿定 A(批号 140512),朝藿定 B(批号 140515),朝藿定 C(批号 140511),宝藿苷 I 对照品(批号 150321)购于成都克洛玛生物科技有限公司,纯度经归一化法测定均 >98%。 $\beta$ -磷酸甘油钠,地塞米松,维生素(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBN8622V,BCBP9963V,BCBR0505V);DMEM 低糖培养基,胎牛血清(FBS),胰蛋白酶,青/链霉素(美国 Gibco 公司,批号分别为 11885084,16000044,25300054,15140122);碱性磷酸酶测试试剂盒,BCA 试剂盒(南京建成公司,批号分别为 A059-3,A045-3);茜素红(国药集团化学试剂有限公司,批号 71001954);罗丹明-鬼笔环肽(美国 Cytoskeleton 公司,批号 PHDR1)。

**1.3 仪器** MCO-18AIC 型二氧化碳培养箱(日本 Sanyo 公司),CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),5810R 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司),SpectraMax Pro-5 型酶标仪(美国 SpectraMax 公司),92-11N 型超声破碎仪(中国宁波新芝公司),LSM 710 型荧光激光共聚焦扫描显微镜(德国 Zeiss 公司)。

## 2 方法

**2.1 BMSCs 的提取及培养** 采用全骨髓细胞贴壁法<sup>[13]</sup>,取 6 周的 SPF 级 SD 大鼠,脱颈处死后用 75% 乙醇浸泡 15 min,保证无菌的情况下暴露骨髓腔,用 5 mL 的一次性注射器抽取磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗骨髓腔,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,并用含有 10% FBS 的 DMEM 重悬,置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,12 h 半换液,24 h 全换液,后每 3 d 换一次液。待细胞长至 80% 融合后消化传代,采用第 3 代细胞进行实验。根据预实验结果,选用诱导效果更好的淫羊藿黄酮类主要成分+成骨诱导培养基的给药方式。实验分组为朝藿定 A+成骨诱导培养基组、朝藿定 B+成骨诱导培养基组、朝藿定 C+成骨诱导培养基组、淫羊藿苷+成骨诱导培养基组、淫羊藿次苷+成骨诱导培养基组及成骨诱导培养基组(空白组)。

**2.2 促进成骨分化安全浓度筛选** 96 孔板按密度  $5 \times 10^4$  个/孔接种 BMSCs 细胞,培养 12 h 后分别加入含有浓度为  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> 的朝藿定 A,朝

藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷,淫羊藿次苷的成骨诱导培养基 2 mL,3 d 一换液在诱导 14 d 后弃掉原有培养基,噻唑蓝(MTT)法测定细胞活力,确定各成分的安全浓度。

**2.3 细胞骨架染色** 96 孔板按密度  $5 \times 10^4$  个/孔接种 BMSCs 细胞,培养 12 h 后加 1 mmol·L<sup>-1</sup> 朝藿定 A,朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷,淫羊藿次苷的成骨诱导培养基 2 mL,3 d 一换液,在诱导 14 d 后弃掉原有培养基,PBS 清洗 2 遍,4% 的多聚甲醛室温固定 30 min,弃掉多聚甲醛,用 PBS 清洗。0.5% 的 TritonX-100 室温处理 5 min,PBS 清洗后加入罗丹明-鬼笔环肽避光室温染色 30 min,加入 DAPI 染色 3 min,PBS 清洗后在激光共聚焦扫描显微镜下观察染色结果。

**2.4 矿化结节染色** 96 孔板每孔接种  $5 \times 10^4$  个 BMSCs 细胞,培养 12 h 后进行上述药物干预,诱导 14 d 以后将待测孔的培养基吸出,用茜素红染色方法染色,在倒置显微镜下观察。

**2.5 碱性磷酸酶活性测定** 6 孔板每孔接种  $2.5 \times 10^5$  个 BMSCs 细胞,培养 12 h 后加入上述药物进行干预,3 d 一换液在诱导 14 d 后收集细胞,4 ℃ 超声破碎,采用碱性磷酸酶测试试剂盒和 BCA 试剂盒分析细胞中碱性磷酸酶的活性和总的蛋白浓度。各组中碱性磷酸酶的活性用碱性磷酸酶/蛋白浓度来表示。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *T*-test,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2.7 网络药理学分析** 网络药理学分析主要基于 BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 分析平台进行<sup>[14-17]</sup>。该分析平台在自主研发的药物靶标预测方法基础上整合了 DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>),KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 和 TTD (<https://en.wikipedia.org/wiki/Therapeutic-Targets-Database>) 等已知药物靶标数据库,用于中药化学成分潜在靶点的预测,并基于 GO (<http://geneontology.org/>),KEGG,OMIM (<http://omim.org/>) 以及 TTD 等基因功能注释数据库进行潜在靶点的通路富集分析和功能预测分析。

**2.7.1 淫羊藿 5 种黄酮类有效成分潜在作用靶标预测** 将 5 种淫羊藿成分(\*.inchi)的二维结构导入 BATMAN-TCM 数据分析平台,该网络药理学数据分析平台通过比较药物间的化学结构、副作用及

蛋白的表达水平等信息,获得与淫羊藿 5 种化学成分可能发生相互作用的靶标蛋白,并选择其中高可信度的蛋白作为淫羊藿的候选靶点(Prediction Score cutoff > 20)。

**2.7.2 相关通路的富集分析** 基于 BATMAN-TCM 分析平台,根据 GO, KEGG, OMIM 数据库利用 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)<sup>[18-19]</sup>进行通路富集分析,对利用 Benjamini and Hochberg (BH test)的方法对于超几何分布检验得到的 *P* 进行校正,选取校正后 *P* < 0.05 的条目认为是淫羊藿可能作用的生物学功能和通路。

**2.7.3 淫羊藿 5 个单体成分-靶点-通路网络分析** 根据淫羊藿 5 个黄酮类有效成分靶标预测结果以及通路富集分析结果,利用 Cytoscape 3.1 软件构建成分-靶点-通路网络模型,整体上展示成分-靶点-通

路间的相互关系,说明淫羊藿多种黄酮类成分在促进诱导 BMSCs 向成骨细胞分化方面的潜在协同机制。

### 3 结果

**3.1 淫羊藿黄酮促进 BMSCs 向成骨细胞分化给药浓度的确定** 结合前期文献调研<sup>[20-22]</sup>,设置药物浓度为  $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  进行安全浓度筛选。通过 MTT 测定细胞活力发现,与空白组比较,朝藿定 A 和淫羊藿次苷在  $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  这一浓度细胞活力显著降低,其余化合物均无明显的细胞损伤作用。见表 1。基于 5 种淫羊藿黄酮类成分的安全浓度范围,筛选各成分的最佳给药浓度。为了平行比较各成分的作用差异、突显各成分在促进诱导分化方面的作用,淫羊藿各成分给药浓度最终均设为  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 淫羊藿黄酮类主要成分不同浓度对 BMSCs 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Epimedii Folium flavonoids on BMSCs' cell( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	$1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	1	1	1	1	1	1	1
朝藿定 A	$0.85 \pm 0.09^{1)}$	$0.75 \pm 0.09^{2)}$	$0.90 \pm 0.06$	$0.85 \pm 0.14^{1)}$	$0.92 \pm 0.08$	$0.90 \pm 0.09$	$0.91 \pm 0.11$
朝藿定 B	$0.91 \pm 0.05$	$0.94 \pm 0.10$	$0.96 \pm 0.10$	$0.96 \pm 0.07$	$0.93 \pm 0.06$	$0.91 \pm 0.09$	$0.90 \pm 0.05$
朝藿定 C	$0.93 \pm 0.09$	$0.91 \pm 0.09$	$0.92 \pm 0.10$	$0.94 \pm 0.05$	$0.95 \pm 0.05$	$0.94 \pm 0.04$	$0.94 \pm 0.10$
淫羊藿苷	$0.67 \pm 0.09^{1)}$	$0.80 \pm 0.17$	$0.97 \pm 0.19$	$0.93 \pm 0.07$	$0.95 \pm 0.10$	$0.90 \pm 0.07$	$0.89 \pm 0.08$
淫羊藿次苷	$0.79 \pm 0.08^{2)}$	$0.80 \pm 0.1^{2)}$	$0.80 \pm 0.09^{2)}$	$0.83 \pm 0.07^{1)}$	$0.89 \pm 0.06$	$0.82 \pm 0.06$	$0.83 \pm 0.06$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2 同)。

**3.2 对细胞形态的影响** 从细胞骨架染色结果可以看出, BMSCs 细胞形态以梭形为主,而典型的成骨细胞的细胞形态以立方形、多角形为主,细胞核位于细胞的一端。各组均可观察到多角形细胞,与空白组相比较,给药组多角形细胞的数量有增多趋势,尤其在朝藿定 C,淫羊藿苷,淫羊藿次苷给药组中可观察到大量的多角形细胞。见图 1。

**3.3 淫羊藿黄酮类有效成分对细胞矿化结节的影响** 矿化结节的出现是鉴定成骨细胞分化成熟的特征性标志<sup>[23]</sup>,典型的矿化结节呈红褐色。可以看到,各组均可观察到红褐色的矿化结节。与空白组比较,给药组的矿化结节有明显增多的趋势。见图 2。

**3.4 淫羊藿黄酮类主要成分对 BMSCs 碱性磷酸酶含量的影响** 在加入药物干预培养 14 d 后,与空白组比较,5 种淫羊藿黄酮类成分干预组的碱性磷酸酶的活性均具有增加趋势,其中与空白组相比朝藿定 C 和淫羊藿苷具有显著差异(*P* < 0.05),淫羊藿

次苷具有极显著性差异(*P* < 0.01)。以上结果说明,朝藿定 A,朝藿定 B 具有促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化的作用,朝藿定 C,淫羊藿苷,淫羊藿次苷能够显著地促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化,其中淫羊藿次苷作用最强,为空白组碱性磷酸酶活性的 2.4 倍。见表 2。

**3.5 淫羊藿 5 种黄酮类有效成分潜在作用靶点** 对淫羊藿 5 种黄酮类有效成分潜在作用靶标预测,共得到 290 个靶点,通过对这些靶点进行功能检索,从中筛选出和细胞增殖分化有关的作用靶点 33 个,其中 25 为独立靶点(仅与一个化学成分相关),8 个为共同靶点(与 2~3 个化学成分相关)。淫羊藿苷涉及的靶点最多(16 个靶点),其余依次为:淫羊藿次苷(涉及 13 个靶点),朝藿定 B(涉及 10 个靶点),朝藿定 A(涉及 2 个靶点)而朝藿定 C 并没有符合打分的靶点。见表 3。

网络药理学结果表明淫羊藿苷、淫羊藿次苷涉

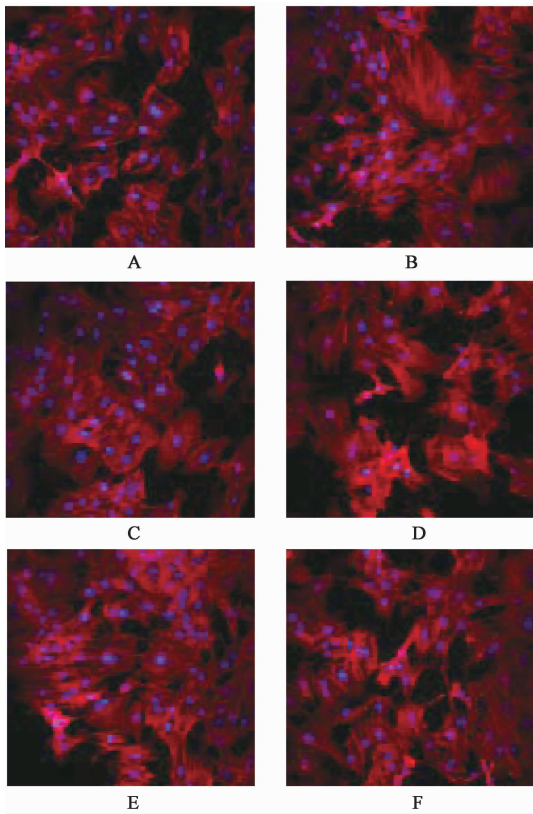


图 1 淫羊藿黄酮类主要成分对细胞骨架的影响(×400)  
A. 空白; B. 朝藿定 A; C. 朝藿定 B; D. 朝藿定 C; E. 淫羊藿苷; F. 淫羊藿次苷(图 2 同)

图 1 Effect of Epimedii Folium flavonoids active ingredients on BMSCs' cell morphology(×400)  
Fig.1 Effect of Epimedii Folium flavonoids active ingredients on BMSCs' cell morphology(×400)

表 2 淫羊藿黄酮类主要成分对 BMSCs 碱性磷酸酶活性的影响(̄x ± s, n = 3)

Table 2 Effect of Epimedii Folium flavonoids active ingredients on alkaline phosphatase assay in BMSCs(̄x ± s, n = 3)

组别	剂量/mol·L <sup>-1</sup>	碱性磷酸酶
空白	-	0.36 ± 0.05
朝藿定 A	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.40 ± 0.07
朝藿定 B	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.39 ± 0.04
朝藿定 C	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>1)</sup>
淫羊藿苷	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>1)</sup>
淫羊藿次苷	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>2)</sup>

及的靶点最多,同时碱性磷酸酶活性实验(表 2)表明这 2 种化合物促进 BMSCs 向成骨细胞增殖分化的能力最强,二者具有一致性;但是碱性磷酸酶活性实验显示朝藿定 C 干预作用具有显著性,而网络药理学没有预测到符合统计要求的、朝藿定 C 的相关靶点,这一点有待深入研究。

3.6 通路富集分析及“成分-靶点-通路”的网络可视化 根据表 2 预测出的靶点,进行通路富集分析,

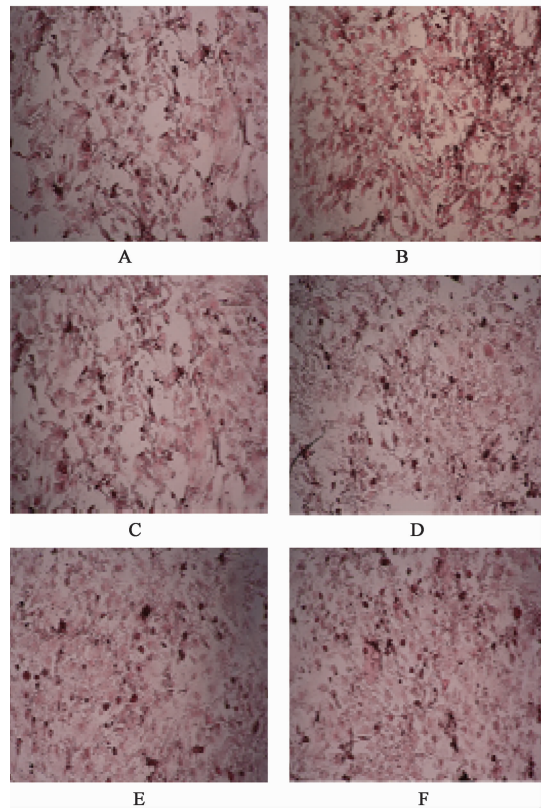


图 2 淫羊藿黄酮类主要成分对细胞矿化结节的影响(茜素红染色,×400)

Fig.2 Effect of Epimedii Folium flavonoids active ingredients on mineralized nodule in BMSCs(alizarin red staining,×400)

共得到 6 条与增殖分化相关的信号通路(见表 4),而图 3 清楚的展现了“成分-靶点-通路”之间的相互关系,从整体上展示了淫羊藿黄酮在促进细胞诱导分化方面的潜在机制。

从表 4 和图 3 可以看到 Regulation of cell proliferation 通路涉及到的化合物最多,与朝藿定 A,朝藿定 B,淫羊藿苷,淫羊藿次苷均具有相关性。细胞增殖是细胞的重要生命特征,Regulation of cell proliferation 作为细胞增殖调控通路,是参与细胞增殖最重要的信号通路之一,以上结果说明该通路可能是淫羊藿各成分的作用的基本途径。

其次, Cell differentiation, Osteoclast differentiation, Estrogen signaling pathway 和 Activation of MAPK activity 4 条通路均涉及到 3 个共同化合物,分别为朝藿定 B,淫羊藿苷,淫羊藿次苷,以上 4 条这些通路主要与细胞分化相关。此外, Procollagen-proline 3-dioxygenase activity, Procollagen-proline 4-dioxygenase activity 和 Regulation of growth plate cartilage chondrocyte proliferation 3 条通路均分别涉及到一个化合物。

表 3 淫羊藿黄酮类主要成分潜在作用靶点

Table 3 Potential targets of Epimedii Folium flavonoids active ingredients

No.	潜在靶点	化合物	得分	No.	潜在靶点	化合物	得分
1	KCNJ3	淫羊藿苷	114.143	18	ALK	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000
2	KCNJ5	淫羊藿苷	114.143	19	IKBKB	淫羊藿苷	36.688
3	KCNJ6	淫羊藿苷	114.143	20	CHUK	淫羊藿苷	36.688
4	KCNJ9	淫羊藿苷	114.143	21	CXCR4	淫羊藿苷	36.688
5	CHRNA7	淫羊藿苷	114.143	22	P3H1	淫羊藿苷	25.857
6	CHRNA10	淫羊藿苷	114.143	23	P3H2	淫羊藿苷	25.857
7	CHRFAM7A	淫羊藿苷	114.143	24	P3H3	淫羊藿苷	25.857
8	POR	淫羊藿次苷	80.882	25	SRPK2	淫羊藿苷	25.857
9	TNK2	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	26	P4HA1	淫羊藿苷	25.857
10	PRKAA1	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	27	P4HA2	淫羊藿苷	25.857
11	ABL2	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	28	PTGS1	朝藿定 A	23.000
12	ABL1	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	29	AGTR1	朝藿定 A	23.000
13	PTGER2	朝藿定 B	48.000	30	NOS2 *	淫羊藿次苷	22.373
14	AKT1	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	31	NOS3 *	淫羊藿次苷	22.373
15	CREB1	朝藿定 B	48.000	32	CARM1	淫羊藿次苷	22.373
16	APAF1	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000	33	CYLC1	淫羊藿次苷	22.373
17	ADCY1	朝藿定 B, 淫羊藿次苷	48.000				

注: \* 表示已有实验验证<sup>[24]</sup>。

表 4 淫羊藿黄酮类主要成分相关靶点的通路富集分析

Table 4 Pathway enrichment of potential targets of Epimedii Folium flavonoids active ingredients

No.	通路	化合物	P
1	procollagen-proline 3-dioxygenase activity	淫羊藿苷	$6.75 \times 10^{-4}$
2	regulation of cell proliferation	淫羊藿苷, 淫羊藿次苷, 朝藿定 A, 朝藿定 B	0.021
3	activation of MAPK activity *	淫羊藿苷, 淫羊藿次苷, 朝藿定 B	0.030
4	estrogen signaling pathway *	淫羊藿苷, 淫羊藿次苷, 朝藿定 B	0.032
5	cell differentiation	淫羊藿苷, 淫羊藿次苷, 朝藿定 B	0.032
6	procollagen-proline 4-dioxygenase activity	淫羊藿苷	0.033
7	osteoclast differentiation	淫羊藿苷, 淫羊藿次苷, 朝藿定 B	0.035
8	regulation of growth plate cartilage chondrocyte proliferatio	淫羊藿次苷	0.049

注: \* 表示已有实验验证<sup>[25-26]</sup>。

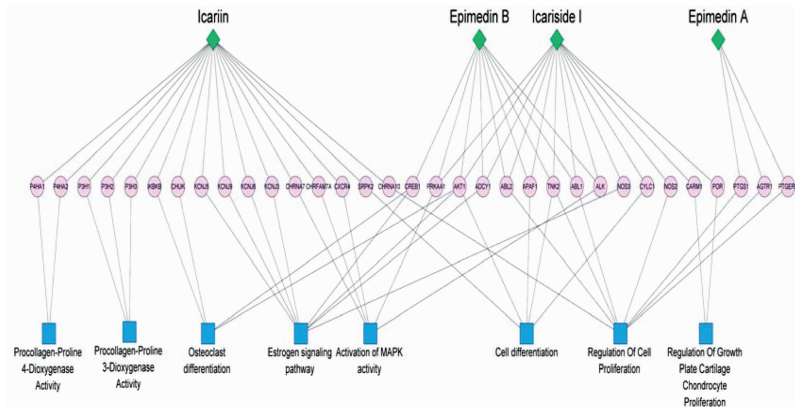


图 3 淫羊藿黄酮类主要成分-靶点-通路关系

Fig.3 Network map of compounds-targets-passway for Epimedii Folium flavonoids active ingredients



#### 4 讨论

淫羊藿作为我国经典的传统中药,在防治骨质疏松方面疗效确切。骨髓间充质干细胞作为一种来源于骨髓基质的细胞,具有多种分化功能,在一定条件下该细胞可诱导为成骨细胞。因此,研究淫羊藿主要成分促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化,对于阐释淫羊藿抗骨质疏松的作用机制以及从中筛选出具有潜在开发价值的单体药物,具有重要意义。

以上结果说明在药物浓度为  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下作用 14 d 后,以茜素红染色、细胞骨架染色和碱性磷酸酶活性检测为指标,5 种淫羊藿黄酮类成分均具有促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖分化的趋势,其中朝藿定 C,淫羊藿苷和淫羊藿次苷具有显著差异。在此基础上,网络药理学研究发现,5 种黄酮类化合物共与 33 种增殖分化相关的靶点直接相关,通过通路富集分析得到 8 种相关信号通路,并且部分靶点及通路已被实验证实,如 Hsieh 等<sup>[24]</sup> 人研究表明淫羊藿苷可通过上调 NOS,增强 Runx-2 的活性,来促进 BMSCs 向成骨方向分化。翟远坤等<sup>[25]</sup> 研究表明淫羊藿次苷 II 可通过激活 Estrogen signaling pathway,促进 BMSCs 向成骨方向分化,与此同时 OSX,Runx-2 基因的表达量也明显升高。毛项颖等<sup>[26]</sup> 研究表明淫羊藿苷可介导 MAPK 信号通路,通过激活 MAPK 信号通路上的 p38,进而抑制 ERK,起到促进间充质干细胞株 C3H10T1/2 向成骨细胞方向分化。此外,碱性磷酸酶活性实验表明朝藿定 C 的作用显著,但是网络药理学分析没有找到符合打分要求的相关靶点,提示我们朝藿定 C 可能通过未发现的靶点、通路或其他相关机制发挥作用,因此,朝藿定 C 的作用机制值得深入研究。

#### [参考文献]

[1] 杨玮,徐道华,周晨慧,等. 小檗碱对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(12):1560-1563.

[2] 胡资兵,曾荣,郭伟韬,等. 骨髓间充质干细胞诱导分化特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(43):8561-8566.

[3] 邱林,金先庆. 骨髓间充质干细胞的生物学特性及其临床治疗应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(12):2347-2350.

[4] XU S, XU Y. Recent progress of BMSCs acting as seeding cell for tissue engineered cartilage[J]. Chin J Repar Reconstr Surg, 2008,22(2):163-166.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M].

北京:中国医药科技出版社,2015:77.

[6] 陈彦,赵艳红,贾晓斌,等. RP-HPLC 法同时测定不同品种淫羊藿药材中 5 种主要黄酮类成分的含量[J]. 中国药房,2008,19(6):431-443.

[7] 郭青,吴晓燕,宁青,等. 淫羊藿茎叶中 5 种黄酮类成分分析及质量评价[J]. 中草药,2011,42(10):2028-2032.

[8] 郭宝林,肖培根. 5 种淫羊藿的不同部位的黄酮类成分分析[J]. 中国中药杂志,1996,21(9):523-525.

[9] 杲丽,胡成虎,金岩. 骨髓间充质干细胞在小鼠早衰性骨质疏松中的细胞生物学功能研究[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(4):707-712.

[10] 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.

[11] 翟远坤,葛宝丰,马慧萍,等. 淫羊藿苷促进体外培养大鼠骨髓间充质干细胞的成骨性分化[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3219-3222.

[12] 马慧萍,贾正平,葛欣,等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究[J]. 华西药理学杂志,2002,17(3):163-167.

[13] 蔡鹏,朱绍兴,苏一鸣,等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(36):7073-7077.

[14] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep,2016. doi:10.1038/srep21146.

[15] XU F, DING Y, GUO Y, et al. Anti-osteoporosis effect of Epimedii Folium via an estrogen-like mechanism based on a system-level approach [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 177:148-160.

[16] 吴磊宏,高秀梅,王林丽,等. 附子多成分作用靶点预测及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(21):2907-2910.

[17] 刘洪,范欣生. 甘遂与甘草反药相互作用的网络药理学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(9):186-192.

[18] HUANG D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nat Protocols, 2009, 4(1):44-57.

[19] JIAO X, Sherman B T, HUANG D W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis [J]. Bioinformatics, 2012, 28(13):1805-1806.

[20] Hsieh T P, Sheu S Y, SUN J S, et al. Icariin isolated from Epimedii Folium pubescens regulates osteoblasts

- anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression [ J ]. Phytomedicine, 2010, 17 ( 6 ): 414-423.
- [ 21 ] LIANG W, LIN M, LI X, et al. Icariin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line [ J ]. Int J Mol Med, 2012, 30(4): 889-895.
- [ 22 ] 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.
- [ 23 ] 廖乃顺,李钻芳,林如辉,等.比较 3 种形态学方法观察成骨细胞矿化结节的应用价值[ J ]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33): 5266-5270.
- [ 24 ] Hsieh T P, Sheu S Y, SUN J S, et al. Icariin isolated from Epimedii Folium pubescens regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression [ J ]. Phytomedicine, 2010, 17 ( 6 ): 414-423.
- [ 25 ] 翟远坤,陈克明,葛宝丰,等.淫羊藿次苷 II 通过激活雌激素信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化[ J ]. 中国药理学通报, 2011, 27(10): 1451-1457.
- [ 26 ] 毛项颖,卞琴,沈自尹.淫羊藿苷介导 MAPK 信号通路促进间充质干细胞株 C3H10T1/2 成骨分化的体外研究[ J ]. 中西医结合学报, 2012, 10(11): 1272-1278.
- [ 责任编辑 周冰冰 ]

## 《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)  
刘春生教授(北京中医药大学)  
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)  
王长虹教授(上海中医药大学)  
倪艳教授(山西省中医药研究院)  
倪健教授(北京中医药大学)  
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)  
李孝栋教授(福建中医药大学)  
康文艺教授(河南大学)  
张艳教授(辽宁中医药大学)  
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)  
蔡宇教授(暨南大学药学院)  
王冰副教授(上海中医药大学)  
袁子民副教授(辽宁中医药大学)  
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。