

• 药理与临床 •

红芪中 5 种黄酮类成分对大鼠骨髓间充质干细胞和成骨细胞成骨分化的影响

方瑶瑶¹, 薛志远¹, 杨秀艳¹, 杨亚飞¹, 赵良功², 封士兰^{1*}

1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 研究红芪中毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素 5 种黄酮类成分对大鼠骨髓间充质干细胞 (rat bone marrow stromal cells, rBMSCs) 和颅骨成骨细胞 (rat calvarial osteoblasts, ROBs) 成骨性分化的影响。方法 贴壁分离法培养 rBMSCs; 酶消化法分离培养 ROBs; MTT 法检测 rBMSCs 和 ROBs 细胞的增殖情况; 试剂盒检测 rBMSCs 和 ROBs 的碱性磷酸酶 (ALP) 活性和 Ca²⁺ 含量; 茜素红染色法检测矿化结节形成。结果 5 种成分均能不同程度促进 rBMSCs 和 ROBs 的增殖, 提高 ALP 活性, 增加 Ca²⁺ 含量, 增加钙化结节面积和数量 ($P < 0.05$)。其中毛蕊异黄酮促进 rBMSCs 的成骨分化作用最佳, 美迪紫檀素促进 ROBs 的成骨分化作用最佳, 毛蕊异黄酮次之。结论 这 5 种黄酮类成分对 rBMSCs 和 ROBs 的成骨功能均有一定程度地改善作用, 而毛蕊异黄酮对 2 种细胞表现的成骨活性均较佳, 可发展作为良好的骨诱导活性因子。

关键词: 红芪; 美迪紫檀素; 芒柄花素; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 异甘草素; 成骨分化; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)03-0632-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.015

Effects of promoting osteogenic differentiation of rBMSCs and ROBs using five kinds of flavonoids from *Hedysari Radix*

FANG Yao-yao¹, XUE Zhi-yuan¹, YANG Xiu-yan¹, YANG Ya-fei¹, ZHAO Liang-gong², FENG Shi-lan¹

1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Second Hospital Affiliated to Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of five kinds of flavonoids (calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin) from *Hedysari Radix* on promoting osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) and rat calvarial osteoblasts (ROBs). **Methods** rBMSCs were isolated according to plastic adherence. ROBs were isolated by enzyme digestion method. The proliferation of rBMSCs and ROBs were detected by MTT assay. ALP activity and calcium content of rBMSCs and ROBs cells were detected by alkaline phosphatase kit and calcium kit. Mineralized nodule formation was detected by alizarin red staining. **Results** The five components could promote proliferation, increase ALP activity, increase calcium content, and increase the area and number of calcified nodules of rBMSCs and ROBs ($P < 0.05$). Among them, calycosin had the best effect on promoting the osteogenic differentiation of rBMSCs, and medicarpin promoted the osteogenic differentiation of ROBs with the best effect, followed by calycosin. **Conclusion** Five flavonoids promoted the improvement of osteogenic function, while calycosin has better osteogenic activity on rBMSCs and ROBs and can be used as an excellent osteoinductive factor.

Key words: *Hedysari Radix*; medicarpin; formononetin; ononin; calycosin; isoliquiritigenin; osteogenic differentiation; bone mesenchymal stem cells; osteoblasts

随着人口日趋老龄化, 骨质疏松症的发病率逐年上升, 对人类健康构成很大威胁^[1-2]。迄今, 利用中医药治疗骨质疏松症已受到越来越多研究者的关

注^[3]。红芪是豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根。基于课题组前期研究, 红芪已被证实具有抑制骨吸收, 刺激骨形成,

收稿日期: 2018-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703664)

作者简介: 方瑶瑶 (1994—), 女, 在读硕士, 从事中药、天然药物化学研究。E-mail: 1913169729@qq.com

*通信作者 封士兰 (1957—), 博士, 教授, 主要从事中草药及中药制剂中化学成分分离分析研究。E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

预防去卵巢所致骨质疏松症作用^[4-5]。但目前多数红芪抗骨质疏松的研究都集中在粗提取物上,难以描述发挥疗效的物质基础。大量研究表明黄酮类化合物具有显著的抗骨质疏松作用^[6-10]。柚皮苷剂量依赖性刺激体外培养骨髓间充质干细胞(BMSCs)和成骨细胞的增殖,提高碱性磷酸酶(ALP)活性,具有较强的骨保护活性^[11]。丁淑琴等^[12]发现山柰酚显著提高去卵巢大鼠骨密度,明显抑制大鼠尿液中骨钙和磷的流失。

本研究比较红芪中 5 种主要黄酮类化合物^[13](毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素)体外对大鼠 BMSCs (rBMSCs) 和成骨细胞的增殖、分化和矿化的影响,并将这几种化合物的成骨效力与其内在的分子结构差异进行比较,为 5 种黄酮类化合物构效关系的研究提供理论基础和依据。

1 材料

1.1 仪器

BS224S/BP211D 电子分析天平(Sartorius, 德国); 调速平板振荡器(姜堰市新康医疗器械有限公司); 倒置相差显微镜(Olympus, 日本); CO₂ 细胞培养箱(LabServ, 美国); Varioskan Flash 多功能酶标仪(美国赛默飞世尔公司); 移液枪(Eppendorf, 德国)。

1.2 药物与试剂

美迪紫檀素(质量分数>98%, 批号 CFS201501, Chem Faces 公司); 芒柄花苷(质量分数>98%, 批号 M-013-171216, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 芒柄花素(质量分数>98%, 批号 111703-200603, 中国食品药品检定研究院); 毛蕊异黄酮(质量分数>98%, 批号 20575-57-9, 宝鸡市辰光生物科技有限公司); 异甘草素(质量分数>98%, 批号 Y-008-161216, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 胎牛血清(CLARK 公司); II 型胶原酶(BIOSHARP 公司); 青霉素、链霉素、DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基均购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶、地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠均购自索莱宝公司; ALP 试剂盒(批号 20180614)、Ca 试剂盒(批号 20180704)均购自南京建成生物工程研究所; 二甲基亚砜(DMSO), Sigma 公司。

1.3 实验动物

1 月龄 SD 雄性大鼠, 体质量 120~170 g; 出生 48 h 以内 SD 大鼠乳鼠, 体质量 25~30 g; 均由

兰州大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(甘) 2013-0002。

2 方法

2.1 rBMSCs 的分离培养

参考郭晓宇等^[14]方法, 将 5 只约 150 g 的 1 月龄 SD 雄性大鼠脱颈椎处死, 75%乙醇浸泡消毒 10 min, 无菌剥离股骨和胫骨, 剪去两端骨髓后将 DMEM/F12 培养基(含 10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 1 000 U/mL 链霉素)注入骨髓腔并反复冲洗, 收集细胞悬液, 并通过 200 目细胞筛得到单细胞悬液, 吹打均匀。将收集的细胞调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 接种于 25 cm² 的培养瓶中。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 次日换液, 之后每 2~3 天更换 1 次培养基, 并用无菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗涤 3 遍。当细胞达到 80%以上融合时, 0.25%胰蛋白酶消化传代用于实验。

2.2 颅骨成骨细胞(rat calvarial osteoblasts, ROBs)的分离培养

大鼠颅骨成骨细胞的分离培养采用酶消化。参考方清清等^[15]方法, 取 10 只新生 SD 大鼠乳鼠, 75%乙醇消毒 10 min 后, 无菌条件下取颅骨, 剔除血管及结缔组织。用无菌 PBS 冲洗 2 遍, 将颅骨剪碎至 1~2 mm³。碎骨片装入无菌培养瓶中, 加入 0.5 mg/mL 胰蛋白酶于 37 °C 恒温震荡消化 2 次, 每次 10 min, 弃去消化液。再加入 1 mg/mL II 型胶原酶于 37 °C 恒温震荡消化 6 次, 每次 15 min。收集最后 4 次消化上清液并通过 200 目细胞筛滤过以除去骨碎片。将收集的单细胞悬液调整细胞密度为 3×10^4 个/mL, 接种于 25 cm² 的培养瓶中。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 次日换液, 之后每 2~3 天更换 1 次培养基, 并且用 PBS 洗涤 3 遍。当细胞达到 80%以上融合时, 用胰蛋白酶进行消化传代进行实验。

2.3 药物溶液配制及分组

精密称取 5 种黄酮类化合物(毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素), 溶解于 DMSO 中, 分别制成浓度为 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、0.01、0.1 mol/L 的保存液。给药组: 各保存液分别加入培养基中制备成单体成分溶液, 使终浓度分别为 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L; 对照组加入不含药物的培养液(DMSO 终体积分数小于 0.05%)。每组设 5 个复孔。

2.4 MTT 法检测细胞增殖

rBMSCs 或 ROBs 细胞以 1×10^4 个/孔铺板于 96

孔板, 细胞贴壁后, 加药, 每孔 100 μL, 培养 24、48 h 后, 每孔避光加入 10 μL MTT, 37 °C 避光孵育 4 h, 弃去培养基, 加入 100 μL DMSO, 振荡 20 min, 于酶标仪 490 nm 处测吸光度 (A) 值, 计算增殖率。

$$\text{增殖率} = A_{\text{加药}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 ALP 活性测定

将 P1 代细胞以 1×10^4 个/孔铺板于 12 孔板, 待细胞长满至 90% 以上, 更换成骨诱导培养基 (含有 1×10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠和 50 mg/L 抗坏血酸), 诱导培养 8 d, 每 3 天更换含药 (不同浓度的受试化合物) 培养基, 按照 ALP 试剂盒方法检测 ALP 活性, 结果以 nmol/(min·mg) 表示^[16]。

2.6 Ca²⁺的测定

5 种成分以增强 ALP 活性的最佳浓度, 分别给药 6 d 后, 收集分离的细胞上清液, 通过 Ca²⁺试剂盒测定上清液中 Ca²⁺的含量。

2.7 茜素红染色

将 P1 代细胞以 1×10^4 个/孔铺板于 12 孔板, 待细胞长满至 90% 以上, 更换成骨诱导培养基, 以增强 ALP 活性的最佳浓度的上述 5 种成分分别加入培养液中, 处理培养 12 d 后评估形成的钙化结节, 并通过选择性结合钙的茜素红染色来测定。染色后照相记录, 并使用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描, 统计钙化结节染色阳性区域的面积和数量。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件统计并分析, 各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每组处理平行重复 3 次, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 5 种黄酮类化合物对 rBMSCs 的作用

3.1.1 5 种黄酮类化合物对 rBMSCs 增殖的影响
从表 1 可以看出作用 24、48 h 后, 各化合物对 rBMSCs 均没有细胞毒性作用, 与对照组比较, $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L 的美迪紫檀素对细胞增殖有极显著的促进作用 ($P < 0.01$), $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L 的毛蕊异黄酮、芒柄花素和芒柄花苷显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组相比, 异甘草素作用 24 h 对 rBMSCs 的增殖没有显著性影响。 1×10^{-6} mol/L 的芒柄花苷作用 24 h 促进 rBMSCs 增殖能力最强, 增殖率为 $(124.70 \pm 3.89)\%$ 。

3.1.2 5 种黄酮类化合物对 rBMSCs ALP 活性的影响
ALP 活性的提高是 BMSCs 向成骨细胞分化的重要标志。给药 8 d 后, 5 种化合物作用后其细胞中的 ALP 活性均较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷和异甘草素提高 ALP 活性的最佳浓度均是 1×10^{-6} mol/L, 而美迪紫檀素的最佳浓度是 1×10^{-9} mol/L。并且在最佳浓度条件下, 增加 rBMSCs ALP 活性能力大小依次是毛蕊异

表 1 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 rBMSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on cell proliferation of rBMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	C/(mol·L ⁻¹)	增殖率/%		化合物	C/(mol·L ⁻¹)	增殖率/%		
		24 h	48 h			24 h	48 h	
毛蕊异黄酮	1×10^{-9}	96.47 ± 5.92	99.00 ± 8.44	芒柄花苷	1×10^{-6}	124.70 ± 3.89**	122.10 ± 5.41**	
	1×10^{-8}	100.80 ± 3.22	104.30 ± 4.87		1×10^{-5}	118.00 ± 9.02**	113.80 ± 2.38**	
	1×10^{-7}	109.50 ± 3.77*	118.40 ± 2.89**		异甘草素	1×10^{-9}	94.85 ± 9.79	97.76 ± 6.66
	1×10^{-6}	112.70 ± 5.31**	120.20 ± 4.76**			1×10^{-8}	97.59 ± 8.66	91.92 ± 6.07
	1×10^{-5}	111.30 ± 2.43**	118.20 ± 1.84**			1×10^{-7}	108.60 ± 4.67	115.00 ± 8.26**
芒柄花素	1×10^{-9}	94.71 ± 7.85	99.44 ± 1.53	1×10^{-6}	102.80 ± 8.69	117.60 ± 5.63**		
	1×10^{-8}	109.60 ± 9.32	106.00 ± 2.33*	1×10^{-5}	96.78 ± 6.35	100.40 ± 3.74		
	1×10^{-7}	117.30 ± 12.43*	117.00 ± 2.74**	美迪紫檀素	1×10^{-9}	118.40 ± 7.84**	119.50 ± 5.02**	
	1×10^{-6}	121.20 ± 7.04**	121.00 ± 3.17**		1×10^{-8}	121.90 ± 3.32**	125.10 ± 5.43**	
	1×10^{-5}	109.70 ± 2.58	108.30 ± 2.52**		1×10^{-7}	116.60 ± 2.07**	119.90 ± 3.12**	
芒柄花苷	1×10^{-9}	91.19 ± 8.58	94.72 ± 3.69	1×10^{-6}	114.00 ± 4.27*	118.00 ± 9.82**		
	1×10^{-8}	100.00 ± 3.13	105.80 ± 2.15	1×10^{-5}	110.40 ± 8.89*	105.70 ± 6.13		
	1×10^{-7}	116.80 ± 7.22**	110.80 ± 4.14**	对照	100.00 ± 4.70	100.00 ± 2.82		

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

黄酮>芒柄花苷>美迪紫檀素>芒柄花素>异甘草素。结果见表 2。

3.1.3 5 种黄酮类化合物对 rBMSCs 中 Ca²⁺水平的影响 图 1 结果显示, 各给药组 Ca²⁺水平均高于对

照组, 除芒柄花素和异甘草素差异不显著外, 其余差异均显著 ($P<0.05, 0.01$), 另外各给药组 Ca²⁺水平高低依次是毛蕊异黄酮>芒柄花苷>美迪紫檀素>芒柄花素>异甘草素。

表 2 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 rBMSCs 中 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on alkaline phosphatase (ALP) activity in rBMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
毛蕊异黄酮	1×10 ⁻⁹	12.05±0.11	芒柄花苷	1×10 ⁻⁹	12.14±0.24	美迪紫檀素	1×10 ⁻⁹	13.56±0.30**
	1×10 ⁻⁸	12.23±0.35		1×10 ⁻⁸	12.23±0.20		1×10 ⁻⁸	13.33±0.31**
	1×10 ⁻⁷	12.81±0.49*		1×10 ⁻⁷	12.59±0.02*		1×10 ⁻⁷	13.15±0.12**
	1×10 ⁻⁶	14.06±0.29**		1×10 ⁻⁶	13.83±0.18**		1×10 ⁻⁶	12.65±0.32**
	1×10 ⁻⁵	12.19±0.29		1×10 ⁻⁵	12.18±0.27		1×10 ⁻⁵	8.49±0.21**
芒柄花素	1×10 ⁻⁹	12.08±0.26	异甘草素	1×10 ⁻⁹	11.79±0.19	对照		11.98±0.20
	1×10 ⁻⁸	12.17±0.30		1×10 ⁻⁸	12.18±0.12			
	1×10 ⁻⁷	12.71±0.36*		1×10 ⁻⁷	11.94±0.11			
	1×10 ⁻⁶	13.71±0.22**		1×10 ⁻⁶	12.43±0.34**			
	1×10 ⁻⁵	12.61±0.68		1×10 ⁻⁵	9.56±0.12**			

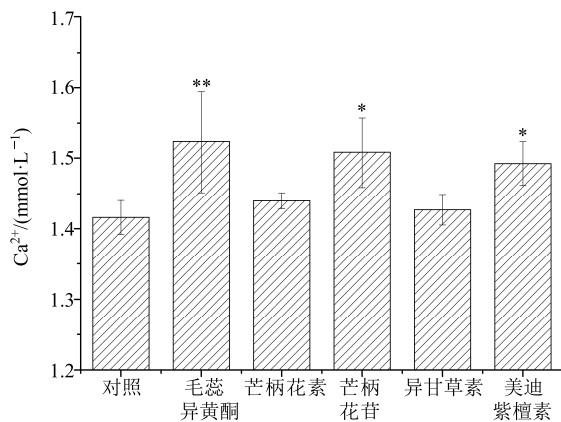


图 1 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 rBMSCs 中 Ca²⁺水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on Ca²⁺ levels in rBMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.1.4 5 种黄酮类化合物对 rBMSCs 钙化结节形成的影响 钙化结节的形成是成骨细胞成熟的标志之一。在茜素红染色后, 钙化的结节呈现鲜红色 (图 2)。第 12 天的钙化结节形成测定揭示了与 ALP 测定结果相似的趋势。5 种黄酮类成分作用的 rBMSCs 中钙化结节的形成增加, 不论钙化结节数量还是面积都极显著高于对照组 ($P<0.01$)。各给药组钙化结节数量大小依次是毛蕊异黄酮>芒柄花苷>美迪

紫檀素>芒柄花素>异甘草素; 各给药组钙化结节面积大小依次是毛蕊异黄酮>芒柄花苷>美迪紫檀素>异甘草素>芒柄花素。

3.2 5 种黄酮类化合物对 ROB 的影响

3.2.1 5 种黄酮类化合物对 ROB 增殖的影响 从表 3 可以看出, 给药 24、48 h 后, 各化合物对 ROB 均没有细胞毒性作用, 与对照组比较, 1×10⁻⁹~1×10⁻⁸ mol/L 美迪紫檀素及 1×10⁻⁷~1×10⁻⁶ mol/L 芒柄花素和芒柄花苷对 ROB 增殖有极显著的促进作用 ($P<0.01$), 1×10⁻⁸~1×10⁻⁷ mol/L 毛蕊异黄酮和 1×10⁻⁶~1×10⁻⁵ mol/L 异甘草素显著促进细胞增殖 ($P<0.05$), 1×10⁻⁹ mol/L 美迪紫檀素作用 24 h 促进 ROB 增殖能力最强, 增殖率为 (122.00±1.01) %。

3.2.2 5 种黄酮类化合物对 ROB ALP 活性的影响 ALP 活性是成骨细胞早期分化的表型标记。给药 8 d 后, 5 种化合物均提高 ROB ALP 活性, 并显著高于对照组 ($P<0.05, 0.01$)。毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷和异甘草素的最佳浓度均是 1×10⁻⁶ mol/L, 而美迪紫檀素的最佳浓度是 1×10⁻⁹ mol/L。在最佳浓度下, 增强 ALP 活性能力大小依次是美迪紫檀素>毛蕊异黄酮>芒柄花苷>芒柄花素>异甘草素。结果见表 4。

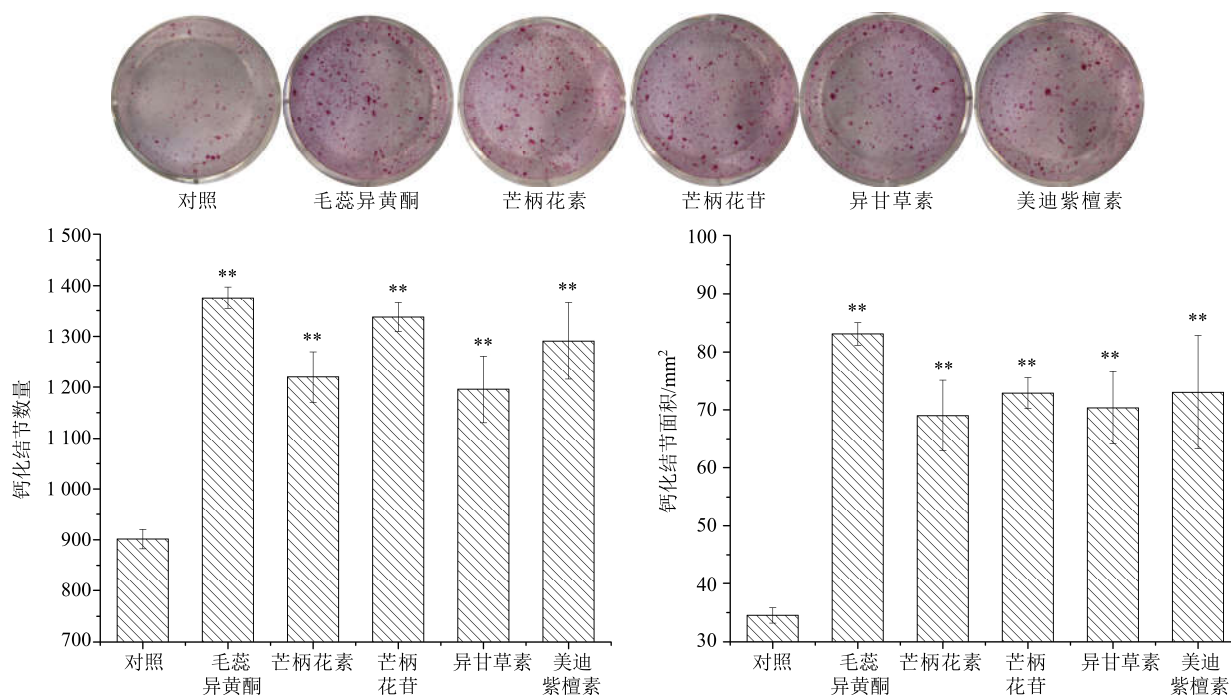


图 2 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 rBMSCs 钙化结节形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on calcified nodules of rBMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 ROB 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on cell proliferation of ROB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	C/(mol·L ⁻¹)	增殖率/%		化合物	C/(mol·L ⁻¹)	增殖率/%	
		24 h	48 h			24 h	48 h
毛蕊异黄酮	1 × 10 ⁻⁹	100.50 ± 2.20	99.06 ± 2.82	芒柄花苷	1 × 10 ⁻⁶	115.70 ± 2.28**	119.60 ± 2.26**
	1 × 10 ⁻⁸	109.60 ± 4.11**	107.20 ± 1.84*		1 × 10 ⁻⁵	111.60 ± 4.27**	114.40 ± 2.41**
	1 × 10 ⁻⁷	109.50 ± 3.77*	119.40 ± 2.05**	异甘草素	1 × 10 ⁻⁹	103.40 ± 3.34	100.30 ± 2.14
	1 × 10 ⁻⁶	103.00 ± 4.10	119.40 ± 2.05**		1 × 10 ⁻⁸	100.60 ± 0.29	105.00 ± 3.56
	1 × 10 ⁻⁵	111.40 ± 1.63**	117.10 ± 2.62**		1 × 10 ⁻⁷	98.10 ± 3.42	102.30 ± 3.17
芒柄花素	1 × 10 ⁻⁹	106.40 ± 3.34	104.50 ± 2.82	1 × 10 ⁻⁶	107.70 ± 6.31*	114.60 ± 3.29**	
	1 × 10 ⁻⁸	111.40 ± 2.80**	107.10 ± 4.41*	1 × 10 ⁻⁵	112.60 ± 2.40**	109.60 ± 1.88**	
	1 × 10 ⁻⁷	114.50 ± 2.12**	111.20 ± 2.56**	美迪紫檀素	1 × 10 ⁻⁹	122.00 ± 1.01**	119.60 ± 3.21**
	1 × 10 ⁻⁶	116.10 ± 2.69**	113.90 ± 2.86**		1 × 10 ⁻⁸	120.20 ± 3.38**	118.50 ± 3.14**
	1 × 10 ⁻⁵	101.70 ± 5.45	108.30 ± 2.52**		1 × 10 ⁻⁷	119.10 ± 2.80**	108.60 ± 1.41*
芒柄花苷	1 × 10 ⁻⁹	107.40 ± 4.77	106.10 ± 3.45	1 × 10 ⁻⁶	109.90 ± 2.37**	107.10 ± 5.60	
	1 × 10 ⁻⁸	112.20 ± 2.28**	108.50 ± 1.55*	1 × 10 ⁻⁵	107.00 ± 3.56*	105.40 ± 3.53	
	1 × 10 ⁻⁷	114.80 ± 2.16**	111.10 ± 2.82**	对照	100.00 ± 4.72	100.00 ± 4.24	

3.2.3 5 种黄酮类化合物对 ROB 的 Ca²⁺水平的影响
图 3 结果显示, 各给药组 Ca²⁺水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 另外各给药组 Ca²⁺水平高低依次是美迪紫檀素 > 毛蕊异黄酮 > 芒柄花苷 > 芒柄花素 > 异甘草素。

3.2.4 5 种黄酮类化合物对 ROB 钙化结节形成的影响
化合物均以提高 ALP 活性的最佳浓度给药 12 d 后, 茜素红染色结果见图 4, 与对照组相比, 5 种化合物显著促进了 ROB 钙化结节的数量和面积 ($P < 0.05$), 细胞成熟矿化程度明显增加。各组钙化

表 4 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 ROB 中 ALP 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on ALP activity in ROB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	化合物	C/(mol·L ⁻¹)	ALP/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
毛蕊异黄酮	1 × 10 ⁻⁹	37.69 ± 0.25	芒柄花苷	1 × 10 ⁻⁹	37.62 ± 0.33	美迪紫檀素	1 × 10 ⁻⁹	42.69 ± 0.11**
	1 × 10 ⁻⁸	37.81 ± 0.65		1 × 10 ⁻⁸	38.32 ± 0.25		1 × 10 ⁻⁸	42.21 ± 0.66**
	1 × 10 ⁻⁷	40.28 ± 0.30**		1 × 10 ⁻⁷	29.15 ± 0.32**		1 × 10 ⁻⁷	39.39 ± 0.38**
	1 × 10 ⁻⁶	41.39 ± 0.30**		1 × 10 ⁻⁶	40.07 ± 0.42**		1 × 10 ⁻⁶	38.58 ± 0.57*
	1 × 10 ⁻⁵	40.57 ± 0.10**		1 × 10 ⁻⁵	40.04 ± 0.20**		1 × 10 ⁻⁵	37.49 ± 0.15
芒柄花素	1 × 10 ⁻⁹	37.77 ± 0.08	异甘草素	1 × 10 ⁻⁹	37.64 ± 0.62	对照		37.72 ± 0.35
	1 × 10 ⁻⁸	38.09 ± 0.20		1 × 10 ⁻⁸	38.55 ± 0.60			
	1 × 10 ⁻⁷	38.32 ± 0.27*		1 × 10 ⁻⁷	38.93 ± 0.38*			
	1 × 10 ⁻⁶	39.71 ± 0.16**		1 × 10 ⁻⁶	39.68 ± 0.21**			
	1 × 10 ⁻⁵	38.88 ± 0.13**		1 × 10 ⁻⁵	37.78 ± 0.51			

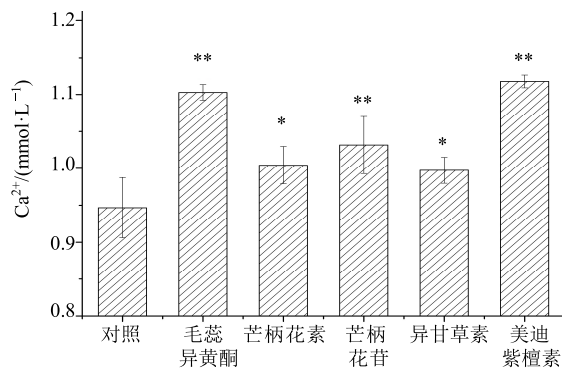


图 3 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 ROB 中 Ca²⁺ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on Ca²⁺ levels in ROB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

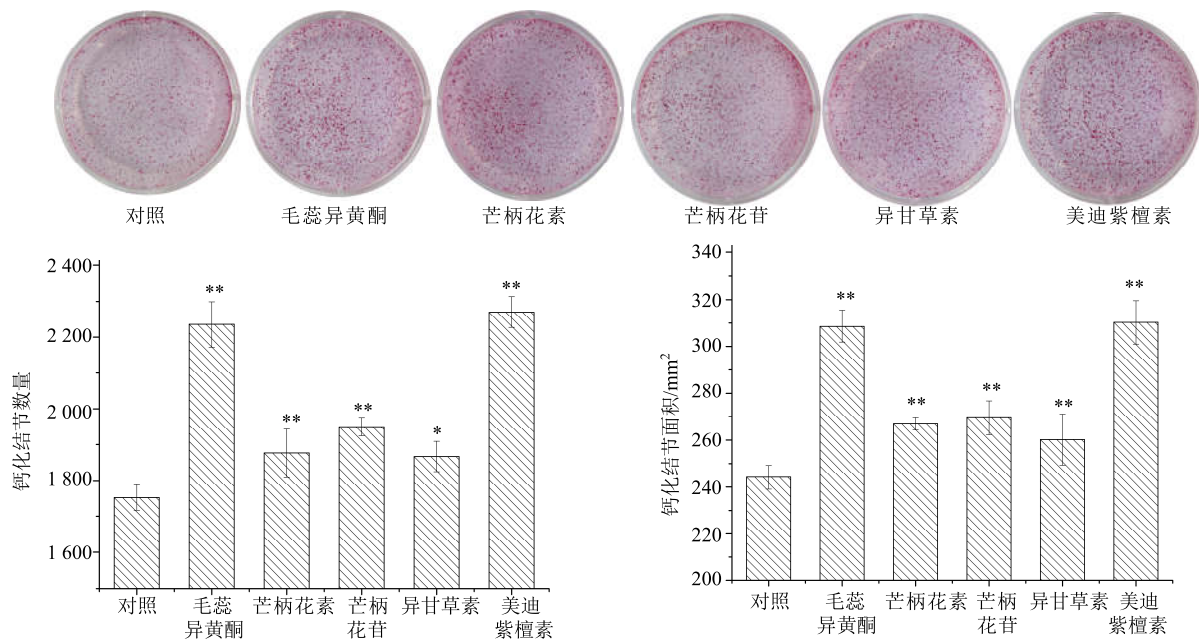


图 4 毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、异甘草素和美迪紫檀素对 ROB 钙化结节形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of calycosin, formononetin, ononin, isoliquiritigenin, and medicarpin on calcified nodules of ROB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结数量大小依次是美迪紫檀素 > 毛蕊异黄酮 > 芒柄花苷 > 芒柄花素 > 异甘草素；各组钙化结节面积大小依次是美迪紫檀素 > 毛蕊异黄酮 > 芒柄花苷 > 芒柄花素 > 异甘草素。

4 讨论

骨质疏松症是骨吸收大于骨形成的代谢失衡结果。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞，主要起源于具有自我复制和众多分化潜能的 BMSCs，增强成骨细胞的活性以及抑制破骨细胞增殖可以帮助恢复骨代谢平衡，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^[17-18]。现今，黄酮类物质治疗骨质疏松症和骨保护作用的研究已引起颇多研究者的关注。

本研究探讨了红芪中 5 种主要黄酮类成分对 BMSCs 和 ROBs 增殖、分化和矿化的影响。实验发现毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷和异甘草素这 4 种化合物在 1×10^{-6} mol/L 下可刺激 rBMSCs 和 ROBs 的成骨性分化, 而美迪紫檀素在 1×10^{-9} mol/L 下就可以显著促进 2 种细胞的增殖、分化和矿化。另外, 芒柄花苷较芒柄花素在促进 rBMSCs 和 ROBs 增殖、分化和矿化方面能力更强。与芒柄花素相比, 芒柄花苷在化学结构上更复杂, 它是 1 种在 C-7 位上带有葡萄糖基团的黄酮苷, 这表明可能葡萄糖基团有利于成骨活性。

本研究还发现毛蕊异黄酮较芒柄花素更加有效地促进 rBMSCs 和 ROBs 的分化和成熟。毛蕊异黄酮的化学结构与芒柄花素的化学结构类似, 仅在环 B 的 C-3 位取代基不同, 毛蕊异黄酮是羟基, 芒柄花素是氢基。黄酮类分子结构中羟基的数量和位置是产生雌激素活性的重要因素^[19], 一般情况下黄酮类分子母核上的羟基取代程度越大, 活性越强^[20], 毛蕊异黄酮比芒柄花素多一个羟基取代基, 这可能是毛蕊异黄酮在增强成骨活性方面比芒柄花素更有效的原因。实验中异甘草素促进 rBMSCs 和 ROBs 的增殖分化能力最弱, 其骨架是二氢黄酮的 C 环开环形成的查耳酮类, 其他 4 种化合物均是或类似于甲氧基异黄酮结构, 羰基、甲氧基和羟基的氧原子是异黄酮类化合物表现出抗骨质疏松症活性最活跃的部位^[21]。上述化合物促进骨形成的作用机制仍有待确定。

综上所述, 本研究为红芪防治骨质疏松症^[22]提供了科学依据和支持, 红芪中的主要黄酮类成分美迪紫檀素、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮和异甘草素, 具有增强 rBMSCs 和 ROBs 的成骨活性的能力, 具有潜在的增强骨骼强度和防治骨质疏松症的能力。

参考文献

- [1] 刘健彤. 骨质疏松症的药物治疗分析 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(12): 1379-1379.
- [2] 王迎彬, 王金花. 脂联素在骨质疏松性骨代谢疾病中的研究进展 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39(6): 746-748.
- [3] Liu Y, Liu J P, Xia Y. Chinese herbal medicines for treating osteoporosis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 3(3): CD005467.
- [4] 薛志远, 赵良功, 师志强, 等. 红芪和黄芪对去卵巢致大鼠骨质疏松防治作用的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(6): 21-24.
- [5] Zhao L, Zhao H, Sheng X, et al. Structural characterization and stimulating effect on osteoblast differentiation of a purified heteropolysaccharide isolated from *Hedysarum polybotrys* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 111(1): 714-721.
- [6] 蒋俊, 崔莉, 孙娥, 等. 基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 721-729.
- [7] Goel A, Raghuvanshi A, Kumar A, et al. 9-Demethoxy-medicarpin promotes peak bone mass achievement and has bone conserving effect in ovariectomized mice: Positively regulates osteoblast functions and suppresses osteoclastogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 411: 155-166.
- [8] 苏艳杰, 陈亚辉, 崔燎. 植物黄酮抗骨质疏松作用研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 562-568.
- [9] 丁小刚, 覃勇, 鄂建设, 等. 骨碎补总黄酮对老年性骨质疏松症患者血清骨钙素水平及骨密度影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(5): 519-521.
- [10] 王庆丰, 王孝辉, 张彩丽, 等. 骨碎补总黄酮促进大鼠诱导膜中 VEGF、BMP-2 表达的实验研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1220-1223.
- [11] 宋双红, 余倩, 王喆之, 等. 骨碎补防治骨质疏松研究概况 [J]. 生命的化学, 2015, 35(1): 73-80.
- [12] 丁淑琴, 杨风琴, 张玮, 等. 山柰酚治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(24): 2925-2929.
- [13] 柳小亚, 李继平, 陈心悦, 等. HPLC 同时测定红芪中 8 个活性成分的含量及聚类分析 [J]. 药学学报, 2016, 51(5): 786-791.
- [14] 郭晓宇, 李唯, 陈克明, 等. 淫羊藿苷通过 PI3K/AKT-eNOS 信号途径促进大鼠骨髓基质细胞的成骨性分化 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 966-970.
- [15] 方清清, 李志忠, 周建, 等. 低频脉冲电磁场通过 cAMP/PKA 信号通路促进成骨细胞分化的研究 [J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(11): 1508-1513.
- [16] Xie Y F, Shi W G, Zhou J, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation and maturation of osteoblasts by upregulating the expression of BMPRII localized at the base of primary cilium [J]. *Bone*, 2016, 93: 22-32.
- [17] 车晓明, 陈亮, 顾勇, 等. 茶多酚治疗骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 235-240.
- [18] 农梦妮, 曾高峰, 宗少晖, 等. 黄精多糖调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(15): 2133-2139.
- [19] Calliste C A, Le B J, Trouillas P, et al. Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(6A): 3949-3956.
- [20] 赵雪巍, 刘培玉, 刘丹, 等. 黄酮类化合物的构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3264-3271.
- [21] Srivastava A, Singh H, Mishra R, et al. Structural insights, protein-ligand interactions and spectroscopic characterization of isoformononetin [J]. *J Mol Struct*, 2017, 1133: 479-491.
- [22] 陈宇, 薛志远, 师志强, 等. 红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 160-166.