

• 药理与临床 •

补肾通络方通过抑制 chemerin 及炎症因子干预骨质疏松症的机制研究

谭 登¹, 方彭华², 孙 旭³, 张 玉², 张农山², 华永庆², 韩 龙², 万仕炜², 闵 文^{2*}

1. 仪征市中医院, 江苏 仪征 211400

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

3. 泰州市人民医院, 江苏 泰州 225300

摘 要: **目的** 评价补肾通络方对骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨、成脂分化以及小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 破骨分化模型的干预作用, 并探究其调节骨形成及骨吸收的相关机制。**方法** 分别给予补肾方、通络方和补肾通络方进行干预, 采用茜素红染色法鉴定 BMSCs 成骨分化后各组钙结节形成情况; 采用油红 O 染色鉴定 BMSCs 成脂分化后各组脂滴形成情况; 采用 qRT-PCR 法检测 BMSCs 成骨、成脂分化后各组成骨、成脂分化标志基因 mRNA 表达, 成骨、成脂分化过程和炎症模型中 chemerin mRNA 表达; 采用 ELISA 法检测 BMSCs 成骨、成脂分化过程和炎症模型中各组 chemerin 分泌量。采用抗酒石酸性磷酸酶 (tartrate-resistant alkaline phosphatase, TRAP) 染色鉴定各组 RAW264.7 细胞破骨分化程度, 并测定各组 TRAP 活性; 采用 Western blotting 法检测 RAW264.7 细胞破骨分化中各组 TRAP 蛋白表达情况; 采用 qRT-PCR 法及 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞破骨分化后各组 chemerin、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 表达及分泌。**结果** 与对照组比较, 补肾通络方组钙结节显著增多 ($P < 0.01$), 脂滴显著减少 ($P < 0.01$), 成骨分化标志基因表达显著升高 ($P < 0.01$), 成脂分化标志基因表达显著下降 ($P < 0.05$), chemerin 分泌及基因表达在成骨分化第 3 天及成脂分化第 3、7 天显著下降 ($P < 0.05$, 0.01)。与对照组比较, BMSCs 炎症模型 chemerin 分泌及基因表达显著升高 ($P < 0.01$); 与 BMSCs 炎症模型比较, 补肾通络方组 chemerin 分泌及基因表达显著下降 ($P < 0.01$)。与对照组比较, RAW264.7 细胞破骨分化中 TRAP 阳性细胞、活力、蛋白表达以及 IL-6、TNF- α 分泌与基因表达均显著升高 ($P < 0.05$, 0.01); 与模型组比较, 补肾通络方组 TRAP 阳性细胞、活力、蛋白表达以及 IL-6、TNF- α 分泌与基因表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 补肾通络方可通过抑制 chemerin 及炎症因子来调节成骨、成脂分化及破骨细胞分化, 从而促进骨形成、抑制骨吸收、改善骨质疏松症。

关键词: 骨质疏松症; chemerin; 炎症因子; 补肾通络方; 骨髓间充质干细胞; RAW264.7 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)19-5899-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.013

Mechanism of Bushen Tongluo Formula on intervention for osteoporosis by inhibiting chemerin and inflammatory factors

TAN Deng¹, FANG Peng-hua², SUN Xu³, ZHANG Yu², ZHANG Nong-shan², HUA Yong-qing², HAN Long², WAN Shi-wei², MIN Wen²

1. Yizheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yizheng 211400, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of Bushen Tongluo Formula (补肾通络方) on osteogenesis, adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and RAW264.7 cells osteoclast differentiation model, to explore its related mechanisms for regulating bone formation and bone resorption. **Methods** Bushen Formula, Tongluo Formula and Bushen Tongluo

收稿日期: 2021-04-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774335); 国家自然科学基金资助项目 (81473390); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX19_1212); 国家重点研发计划项目 (2019YFC1709905)

作者简介: 谭 登, 硕士, 住院医师, 从事中医药防治骨质疏松症研究。Tel: 17766102753 E-mail: tandeng1993@126.com

***通信作者:** 闵 文, 博士, 教授, 从事中医药防治骨质疏松症研究。Tel: (025)85811644 E-mail: wenge1977@126.com

Formula were given for intervention. Alizarin red staining method was used to identify the formation of calcium nodules in each group after osteogenic differentiation of BMSCs; Oil red O staining was used to identify lipid droplet formation in each group after adipogenic differentiation of BMSCs; qRT-PCR was used to detect mRNA expressions of bone formation and adipogenic differentiation marker genes after osteogenesis and adipogenic differentiation of BMSCs, *chemerin* mRNA expression during osteogenesis and adipogenic differentiation and inflammation models; ELISA was used to detect chemerin secretion in each group of BMSCs osteogenic, adipogenic differentiation and inflammation models. Tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP) staining was used to identify the degree of osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in each group, and TRAP activity in each group was determined; Western blotting was used to detect TRAP protein expression in osteoclast differentiation of RAW264.7 cells; qRT-PCR and ELISA methods were used to detect *chemerin*, interleukin-6 (*IL-6*) and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) mRNA expressions and secretion after osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in each group. **Results** Compared with control group, calcium nodules in Bushen Tongluo Formula group were significantly increased ($P < 0.01$), lipid droplets were reduced ($P < 0.01$), osteogenic differentiation markers gene expressions were increased ($P < 0.01$), adipogenic differentiation markers gene expressions were decreased ($P < 0.05$), chemerin secretion and gene expression were decreased on 3rd day of osteogenic differentiation and 3rd, 7th day of adipogenic differentiation ($P < 0.05, 0.01$). Compared with control group, chemerin secretion and gene expression in BMSCs inflammation model were increased ($P < 0.01$); Compared with BMSCs inflammation model, chemerin secretion and gene expression in Bushen Tongluo Formula group were decreased ($P < 0.01$). Compared with control group, TRAP positive cells, activity and protein expression, *IL-6*, *TNF- α* secretions and gene expressions were increased in osteoclast differentiation of RAW264.7 cells ($P < 0.05, 0.01$); Compared with model group, TRAP positive cells, activity and protein expression, *IL-6*, *TNF- α* secretions and gene expressions in Bushen Tongluo Formula group were reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** Bushen Tongluo Formula can regulate osteogenesis, adipogenic differentiation and osteoclast differentiation by inhibiting chemerin and inflammatory factors, thereby promoting bone formation, inhibiting bone resorption and improving osteoporosis.

Key words: osteoporosis; chemerin; inflammatory factors; Bushen Tongluo Formula; BMSCs; RAW264.7 cells

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨密度下降、骨组织微结构退化为特征的代谢性疾病。据报道, 全球的 OP 患者已达 2 亿, 其发病率仅次于冠心病及脑血管病, 严重威胁中老年人生命健康^[1]。OP 的发病机制复杂多样, 其主要机制为骨形成及骨吸收失衡^[2], 而骨骼的长期制动、雌激素水平下降及慢性炎症等均为 OP 发生的重要因素^[3], 尤其是 OP 引起的长期慢性疼痛与慢性炎症密不可分^[4]。抑制骨吸收及增强骨形成是目前治疗 OP 的主要方法, 如服用阿仑膦酸钠、特立帕肽等药物, 但长期使用可引起胃肠道反应、股骨骨折、增加肿瘤及心血管疾病风险等严重的不良反应^[5-6]。传统中医药因其疗效优异、不良反应小等独特优势备受关注。

OP 在中医内属于“骨痿”“骨枯”的范畴, 其基本病机包括“肾虚”“脾虚”“络阻”“血瘀”等。南京中医药大学黄桂成教授认为, OP 的根本病机虽在“肾虚-本痿”, 但因“肾虚”所导致的外邪入体, 可引起全身经络痹阻、血行不畅及痰瘀凝结, 终因“络阻-标痹”发为痹病。而由此所拟定的补肾通络方经多年临床应用已被证明对 OP 引起的骨量下降及长期骨痛等症状具有良好且稳定的疗效^[7]。补肾通络方由淫羊藿、续断、骨碎补、茯苓、白芍、

甘草、全蝎、蜈蚣等组成, 兼备补肾壮骨与通络止痛功效。本课题组前期研究发现, 处方中补肾类中药、通络类中药及补肾通络方对去卵巢模型大鼠及斑马鱼 OP 模型骨量及骨微结构均有改善作用, 但补肾通络方效果最佳^[8-9]。补肾通络方可促进骨形成标志基因表达, 抑制骨吸收标志基因表达, 但其具体机制尚不明确^[10-11]。为进一步探讨补肾通络方对 OP 的体外干预效应及其调节机制, 本研究拟通过骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化模型、成脂分化模型、炎症模型及小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 破骨分化模型系统评价补肾方、通络方及补肾通络方对骨形成及骨吸收的干预作用, 并明确其相关调节机制。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠, 1 周龄, 购自江苏省南京市青龙山动物繁殖场, 动物许可证号 SCXK (SU) 2017-0001。当日将大鼠脱颈椎处死并用于骨髓提取 BMSCs, 动物实验遵循南京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.2 细胞

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.3 药材

补肾方由淫羊藿 12 g、骨碎补 12 g、白芍 9 g、茯苓 9 g、续断 12 g、甘草 6 g 组成；通络方由全蝎 5 g、蜈蚣 5 g 组成；补肾通络方由淫羊藿 12 g、骨碎补 12 g、续断 12 g、全蝎 5 g、蜈蚣 5 g、白芍 9 g、茯苓 9 g、甘草 6 g 组成。淫羊藿、骨碎补、白芍、续断、茯苓、全蝎、蜈蚣、甘草购自亳州市胜元堂有限公司，经南京中医药大学刘圣金副教授鉴定分别为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim 的干燥叶、水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortune* (Kunze) J. Sm 的干燥根茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根、川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体、蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch 的干燥体、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根和根茎。

1.4 药品与试剂

成骨分化培养基、 α -MEM 培养基（批号 1867733）购自美国 Gibco 公司； β -甘油磷酸钠（批号 SLBN8622V）、地塞米松（批号 WXBC3944V）、L-抗坏血酸（批号 SLBN3833V）、维生素 D（批号 740284）、抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant alkaline phosphatase, TRAP）染色试剂盒（批号 387A-1KT）、白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β , 批号 96-400-018-10）、脂多糖（lipopolysaccharide, LPS, 批号 L-2630）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；成脂分化培养基（批号 RASMX-90031）、油红 O 染料（批号 RASMX-90031）购自赛业（南京）生物医药技术有限公司；茜素红 S 染料（批号 172833）Servicebio；TRAP 抗体（批号 ab191406）、 β -tubulin 抗体、HRP 标记的 IgG 抗体购自英国 Abcam 公司；大鼠 chemerin ELISA 试剂盒（批号 11/2018）、小鼠 chemerin ELISA 试剂盒（批号 12/2018）、小鼠肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）ELISA 试剂盒（批号 01/2019）、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒（批号 04/2019）购自上海酶联生物科技有限公司；引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计并合成。

1.5 仪器

MCO-20AIC 型 CO₂ 细胞培养箱（日本三洋公司）；stemiF2000-C 型体式显微镜、Axio Examiner 型倒置显微镜（德国 Zeiss 公司）；7500 型 qRT-PCR 仪（美国

Thermo Fisher Scientific 公司）；ChemiDocTMRS+数字化凝胶成像工作站（美国 Bio-Rad 公司）；SyneRgy2 型酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；Mantra 型定量病理成像分析系统（美国 PerkinElmer 公司）。

2 方法

2.1 补肾方、通络方和补肾通络方的制备

称取 10 倍各处方量药材，粉碎过 40 目筛，加入 10 倍量水回流提取 2 h，再加入 8 倍量水回流提取 1.5 h，合并 2 次提取液，减压回收溶剂浓缩至 1 g/mL（以生药量计），于 4 ℃ 保存。高效液相色谱法（HPLC）、色谱-质谱联用技术一级和二级碎片信息表明没食子酸、绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、淫羊藿苷、川续断皂苷和甘草酸 7 种成分可以较好地作为补肾通络方的质量控制指标^[12]。

2.2 BMSCs 的分离与培养

取 4 只 1 周龄 SD 大鼠脱颈椎处死，使用无菌器械完整分离大鼠股骨及胫骨，使用无菌 PBS 溶液冲洗，并剪去骨骼一端，随后置于无菌骨髓分离提取装置^[13]，12 000 r/min 离心 30 s，重复 3 次，随后在每个无菌装置各加入 200 μ L α -MEM 培养基，收集各无菌装置骨髓混悬液，经一次性细胞过滤器（100 μ m）滤过，1500 r/min 离心 3 min，弃上清；加入 2 mL 红细胞裂解液混匀并于冰上裂解 15 min，1500 r/min 离心 3 min，弃上清；加入 2 mL PBS 溶液混匀，1500 r/min 离心 3 min，重复 3 次，最后加入 2 mL 含血清的 α -MEM 培养基混匀后接种至培养皿中。6 h 后换液，24 h 后再次换液，之后每 2~3 天换液 1 次，直至细胞融合度达到 80%~90%进行传代培养。取第 3 代 BMSCs 用于后续实验。

2.3 流式细胞仪鉴定 BMSCs 纯度

取第 3 代 BMSCs 经消化、离心后，PBS 溶液洗涤 2 次，调整至细胞密度为 1×10^6 /mL 的细胞悬液，分别滴加 2 μ L CD29、CD90、CD34 及 CD45 抗体，室温避光孵育 15 min，以 PBS 溶液洗涤 2 次，采用流式细胞仪检测。

2.4 分组

2.4.1 BMSCs 成骨分化 取第 3 代 BMSCs 细胞，分为空白组（ α -MEM 培养基）、对照组（成骨分化培养基）、补肾方组（含 180 μ g/mL 补肾方的成骨分化培养基）、通络方组（含 30 μ g/mL 通络方的成骨分化培养基）、补肾通络方组（含 210 μ g/mL 补肾通络方的成骨分化培养基），分化 14 d 后进行实验。

2.4.2 BMSCs 成脂分化 取第 3 代 BMSCs 细胞，

分为空白组 (α -MEM 培养基)、对照组 (成脂分化培养基)、补肾方组 (含 180 μ g/mL 补肾方的成脂分化培养基)、通络方组 (含 30 μ g/mL 通络方的成脂分化培养基)、补肾通络方组 (含 210 μ g/mL 补肾通络方的成脂分化培养基), 分化 14 d 后进行实验。

2.4.3 BMSCs 炎症诱导 取第 3 代 BMSCs 细胞, 分为对照组 (α -MEM 培养基)、模型组 (含 10 ng/mL IL-1 β 的 α -MEM 培养基)、补肾方组 (含 10 ng/mL IL-1 β 及 180 μ g/mL 补肾方的 α -MEM 培养基)、通络方组 (含 10 ng/mL IL-1 β 及 30 μ g/mL 通络方的 α -MEM 培养基)、补肾通络方组 (含 10 ng/mL IL-1 β 及 210 μ g/mL 补肾通络方的 α -MEM 培养基), 培养 3 d 后进行实验。

2.4.4 RAW264.7 细胞破骨分化 取形态正常的 RAW264.7 细胞, 分为对照组 (DMEM 培养基)、模型组 (含 10 ng/mL LPS 的 DMEM 培养基)、补肾方组 (含 10 ng/mL LPS 及 180 μ g/mL 补肾方的 DMEM 培养基)、通络方组 (含 10 ng/mL LPS 及 30 μ g/mL 通络方的 DMEM 培养基)、补肾通络方组 (含 10 ng/mL LPS 及 210 μ g/mL 补肾通络方的 DMEM 培养基), 分化 4 d 后进行实验。

2.5 MTT 法筛选药物最适浓度

分别取第 3 代 BMSCs 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, RAW264.7 细胞以 2.5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 培养 24 h。BMSCs 设置对照组, 补肾方 (0.1、1.0、5.0、10.0、15.0、30.0、60.0、180.0、360.0 μ g/mL) 组, 通络方 (0.1、1.0、5.0、10.0、150.0、

30.0、60.0、120.0、240.0 μ g/mL) 组及补肾通络方 (0.1、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、105.0、210.0、420.0 μ g/mL) 组; RAW264.7 细胞设置对照组, 补肾方 (0.6、3.0、30.0、60.0、180.0、360.0、720.0、1 480.0 μ g/mL) 组, 通络方 (0.1、0.5、1.0、10.0、30.0、60.0、120.0、240.0 μ g/mL) 组及补肾通络方 (0.7、3.5、35.0、70.0、210.0、420.0、840.0、1 680.0 μ g/mL) 组; 药物以 α -MEM 培养基配制为相应质量浓度的含药培养基, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 48 h, 加入 MTT 溶液 (5 mg/mL), 孵育 4 h 后检测各组吸光度 (*A*) 值。

2.6 茜素红染色检测 BMSCs 成骨分化

BMSCs 细胞成骨分化 14 d 后, 弃掉培养基, 以 PBS 溶液洗涤 3 次; 加入 1 mL 4% 中性甲醛溶液, 室温静置 10 min, 弃去甲醛, 双蒸水洗涤 3 次; 加入 1 mL 茜素红染料, 室温静置 20 min, 弃掉染料, 双蒸水清洗残留染料, 烘干后于显微镜下观察并拍照。采集并保存照片后, 每孔加入 1 mL 10% 醋酸振荡孵育 30 min, 离心; 加入矿物油, 加热 10 min, 冷却后于冰上孵育 5 min, 离心; 取 500 μ L 溶液, 加入 200 μ L 10% 氢氧化铵中和, 取 150 μ L 中和液, 采用酶标仪检测各组 *A* 值。

2.7 qRT-PCR 检测 BMSCs 和 RAW264.7 细胞成骨和成脂标志相关因子及炎症因子 mRNA 表达

细胞分化结束后, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 对细胞中相关因子进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	种属	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>chemerin</i>	大鼠	F: GTGGACAGTGCTGATGACCTGTTCTT R: AGGCATTTCCGCTTCCTCCCAT	765
<i>Runx2</i>	大鼠	F: CATCCTTCCCTCCGAGACCCTAA R: CCCAACATGGCTGCTCCCTTC	5641
<i>Osx</i>	大鼠	F: CTCACCTCTGCTGGCCCTGAC R: CACCTTACTGCCCTCCTGCTTG	1505
<i>ALP</i>	大鼠	F: AGGGTGGGTTTCTCTCTTGG R: CATGATGGTTGCAGGGTCTG	2415
<i>PPARγ</i>	大鼠	F: CTCCAGCATTTCTGCTCCAC R: CGCAGGCTCTACTTTGATCG	1830
<i>C/EBPα</i>	大鼠	F: GTCAGACCAGAAGGCTGAGT R: TGGTCCCAGTGCTTTCATCC	2673
<i>GAPDH</i>	大鼠	F: TGAACGGGAAGCTCACTGG R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	1306
<i>chemerin</i>	小鼠	F: AGGGTGAGAGGGAACAACCTG R: TAGGGCTAGGGAGATCAGCA	845
<i>TNF-α</i>	小鼠	F: CTCATGCACCACCATCAAGG R: ACCTGACCACTCTCCCTTTG	1687
<i>IL-6</i>	小鼠	F: GACTGATGCTGGTGACAACC R: AGACAGGTCTGTTGGGAGTG	1083
<i>GAPDH</i>	小鼠	F: GGTTGTCTCCTGCGACTTCA R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	1296

2.8 油红 O 染色检测 BMSCs 成脂分化

BMSCs 成脂分化 14 d 后, 弃掉培养基, 以 PBS 溶液洗涤 3 次; 加入 1 mL 4% 中性甲醛溶液, 室温静置 10 min, 弃掉甲醛, 双蒸水清洗 3 次; 加入 1 mL 60% 异丙醇溶液, 室温孵育 10 min, 弃掉异丙醇, 双蒸水清洗 3 次; 加入 1 mL 油红 O 染料, 室温孵育 20 min, 弃掉染料, 双蒸水清洗 3 次, 烘干后于显微镜下观察并拍照, 统计各组脂滴数量。

2.9 ELISA 法检测 BMSCs 和 RAW264.7 细胞各因子分泌

细胞培养、分化结束后收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 BMSCs 和 RAW264.7 细胞各因子分泌水平。

2.10 TRAP 染色检测 RAW264.7 细胞破骨分化

取形态正常的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板, 并放置细胞爬片, 破骨分化 4 d 后, 取出培养板, 以 PBS 溶液洗涤 3 次; 加入 500 μ L 固定液, 室温固定 5 min, 弃去固定液, 三蒸水洗涤 3 次; 加入 500 μ L TRAP 染液, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 弃去染料, 三蒸水洗涤 3 次, 室温晾干细胞爬片, 于载玻片上使用树脂封片, 于 Mantra 镜下观察并拍照。

2.11 TRAP 酶活力检测 RAW264.7 细胞破骨分化

取形态正常的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板, 每 2 天换液 1 次, 4 d 后取出细胞, 按照 TRAP 酶活力检测试剂盒说明书检测各组细胞 TRAP 活力。

2.12 Western blotting 检测 RAW264.7 细胞 TRAP 蛋白表达

取形态正常的 RAW264.7 细胞接种于 12 孔板, 每 2 天换液 1 次, 分化 4 d 后提取细胞蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 分别加入 TRAP 和 β -tublin 抗体孵育, 加

入 HRP 标记的 IgG 抗体孵育, 加入 ECL 发光液显影。

2.13 数据分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 Graphpad Prism 5.0 软件中 one-way ANOVA 分析法进行组间比较。

3 结果

3.1 BMSCs 培养及纯化

如图 1 所示, 使用全骨髓贴壁培养法纯化 BMSCs, 在 6 h 换液后观察到贴壁细胞数量较多, 此时 BMSCs 呈圆形或类圆形, 特征不明显。在 24 h 换液后可明显观察到 BMSCs 形态改变为菱形及短梭型, 同时贴壁细胞大量减少, 表明换液对去除其他杂质细胞有明显作用。在第 3 天换液后发现, BMSCs 增殖速度加快, 细胞集落逐渐呈放射状排列。在第 6 天换液后, 细胞间隙基本消失, 融合度达到 60%~70%, 细胞多呈梭型, 排列呈放射状。传代后 BMSCs 增殖速度明显加快, 3~4 d 可在 100 mm 细胞培养皿中生长至 80%~90%, 但在传至第 4 代及以后, 原代 BMSCs 增殖能力逐渐下降。

3.2 流式细胞术鉴定 BMSCs 纯度

如图 2 所示, BMSCs 表面标记物 CD90、CD29 阳性表达率分别为 85.9%、87.5%, 造血干细胞 HSC 表面标记物 CD11、CD45 阳性表达率分别为 9.0%、14.3%, 表明提取的 BMSCs 可以用于后续实验。

3.3 MTT 筛选药物对 BMSCs 的最适浓度

如图 3 所示, 与对照组比较, 补肾方各剂量组 BMSCs 细胞活力无显著变化; 通络方 (10、15 μ g/mL) 组细胞活力明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 通络方 (120 μ g/mL) 组细胞活力明显升高 ($P < 0.01$); 补肾通络方 (0.1 μ g/mL) 组细胞活力显著升高 ($P < 0.01$), 补肾通络方 (10、25 μ g/mL) 组细胞活力明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01)。根据药物配比 (补肾方:

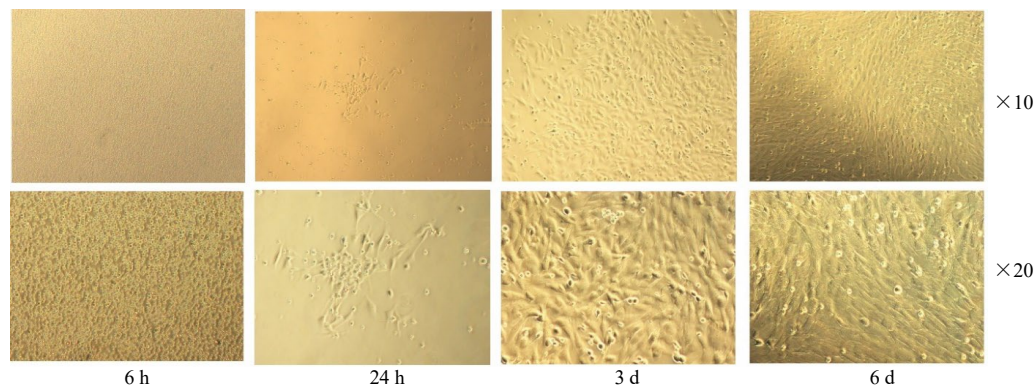


图 1 BMSCs 细胞形态学

Fig. 1 Cell morphology of BMSCs

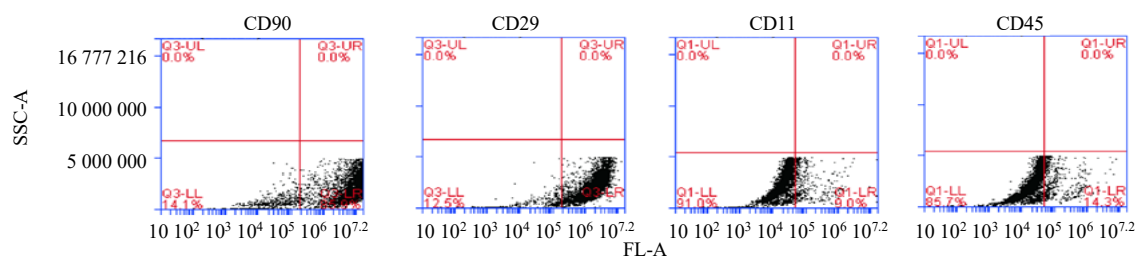
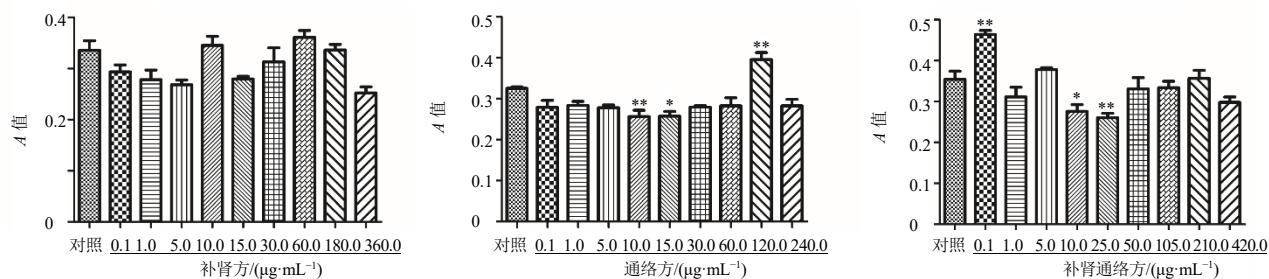


图 2 流式细胞术鉴定 BMSCs 纯度

Fig. 2 Flow cytometry identified purity of BMSCs

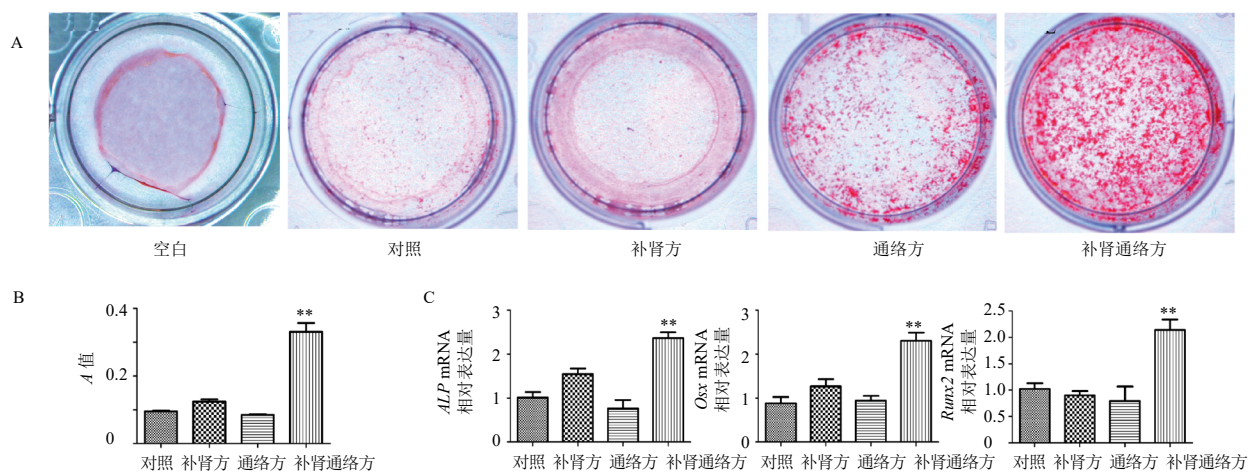
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 4~6 同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as fig. 4—6图 3 MTT 筛选药物对 BMSCs 的最适浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 MTT screening optimal concentration of medicine for BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

通络方: 补肾通络方=6:1:7), 选择补肾方 180 $\mu\text{g/mL}$ 、通络方 30 $\mu\text{g/mL}$ 及补肾通络方 210 $\mu\text{g/mL}$ 为对 BMSCs 无细胞毒作用的适宜质量浓度。

3.4 补肾通络方促进 BMSCs 成骨分化

如图 4-A、B 所示, 与对照组比较, 补肾方组、

通络方组 BMSCs 无明显钙化结节出现, 而补肾通络方组 BMSCs 矿化结节面积明显增加, A 值显著升高 ($P < 0.01$)。如图 4-C 所示, 与对照组比较, 补肾通络方组 BMSCs 成骨分化标志基因 *ALP*、*Ox* 及 *Runx2* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。



A-茜素红染色法检测各组矿化结节 B-定量各组矿化程度 C-qRT-PCR 检测各组成骨分化标志基因表达

A-alizarin red staining to detect mineralized nodules in each group B-quantify the degree of mineralization in each group C-detect the marker genes expression of osteogenic differentiation in each group by qRT-PCR

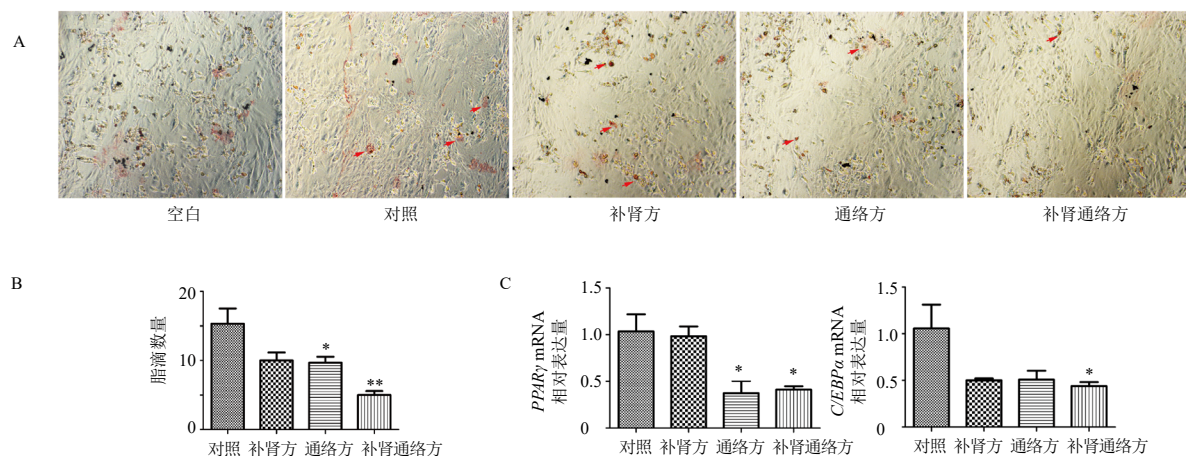
图 4 补肾通络方对 BMSCs 成骨分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of Bushen Tongluo Formula on osteogenic differentiation of BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 补肾通络方抑制 BMSCs 成脂分化

如图 5-A、B 所示,与对照组比较,通络方组和补肾通络方组 BMSCs 脂滴数量明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 5-C 所示,与对照组比较,补肾方组 BMSCs 中 *C/EBPα* mRNA 表达水平呈下降趋势,通络方组 *PPARγ* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$);补肾通络方组 *PPARγ* 及 *C/EBPα* mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$)。

3.6 补肾通络方抑制 BMSCs 成骨及成脂分化中 *chemerin* mRNA 表达及分泌

如图 6-A、B 所示,在 BMSCs 成骨分化中,随着时间增加,*chemerin* mRNA 表达及分泌逐渐降低。与对照组比较,补肾通络方组 *chemerin* 分泌在分化第 3 天显著降低 ($P < 0.01$),补肾方组、通络方组及补肾通络方组 *chemerin* mRNA 表达水平在分化第 3 天显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 6-C、D 所



A-油红 O 染色法检测各组脂滴形成 B-各组脂滴数量统计 C-qRT-PCR 检测各组成脂分化标志基因表达

A-oil red O staining to detect the formation of lipid droplets in each group B-counting the number of lipid droplets in each group C-detect the marker genes expression of adipogenic differentiation in each group by qRT-PCR

图 5 补肾通络方对 BMSCs 成脂分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Bushen Tongluo Formula on adipogenic differentiation of BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

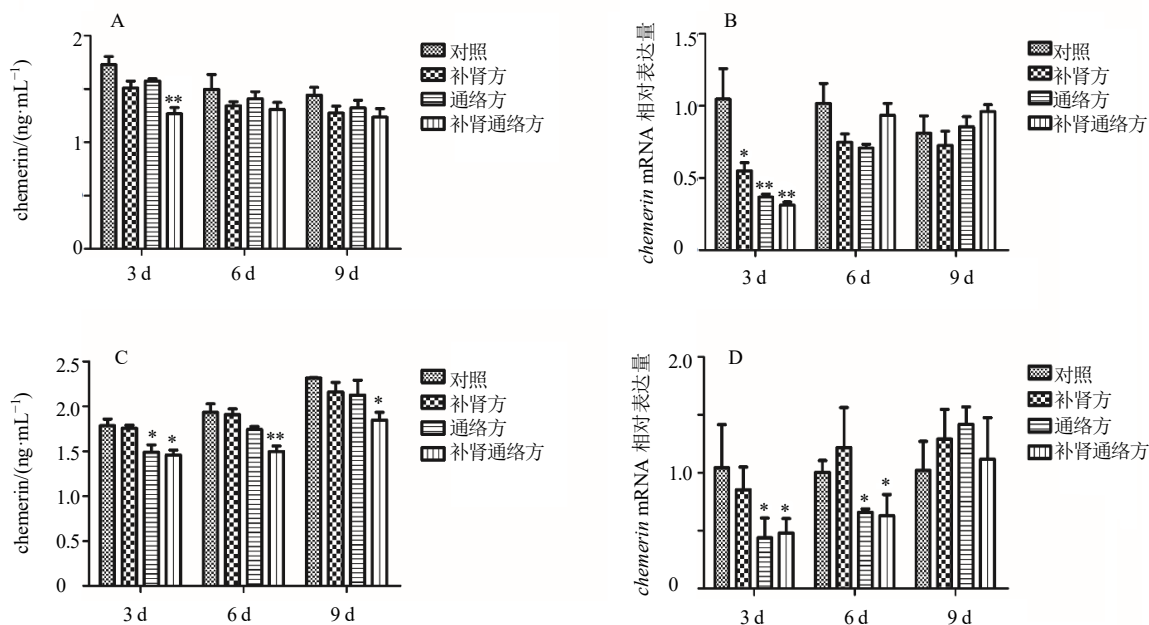


图 6 BMSCs 成骨分化 (A、B) 及成脂分化 (C、D) 中 *chemerin* 分泌及 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

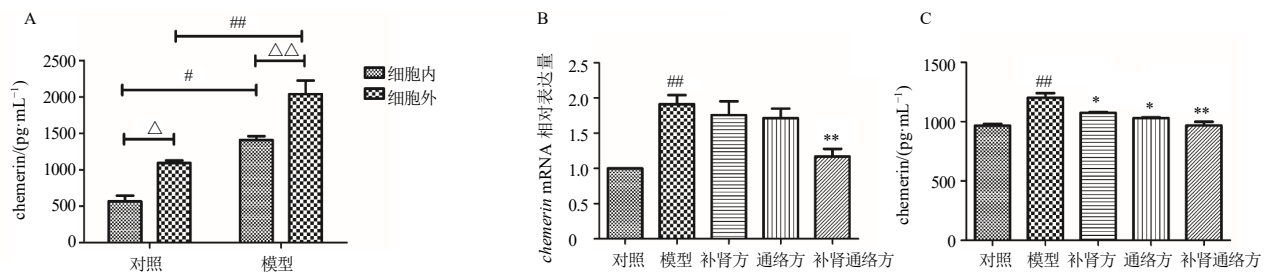
Fig. 6 *Chemerin* secretion and mRNA expression in BMSCs osteogenic differentiation (A, B) and adipogenic differentiation (C, D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

示,在 BMSCs 成脂分化中,随着时间增加,chemerin mRNA 表达及分泌逐渐升高。与对照组比较,补肾通络方组 chemerin mRNA 表达及分泌在分化第 3、6 天均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.7 补肾通络方对 BMSCs 炎症模型 chemerin mRNA 表达及分泌的影响

如图 7-A 所示,对照组 BMSCs 细胞外 chemerin 水平显著高于细胞内 ($P<0.05$),模型组 BMSCs 细胞外 chemerin 水平显著也高于细胞内 ($P<0.01$),

表明 BMSCs 主要通过将 chemerin 分泌到细胞外发挥相应生理及病理作用。与对照组比较,模型组细胞内外 chemerin 水平均明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01),表明炎症因子可促进 chemerin 分泌。如图 7-B、C 所示,与对照组比较,模型组 chemerin mRNA 表达及分泌显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,补肾通络方组 chemerin mRNA 表达及分泌均显著降低 ($P<0.01$),补肾方组和通络方组 chemerin 分泌明显下降 ($P<0.05$)。



A-细胞内外 chemerin 量 B-各组 chemerin mRNA 相对表达量 C-各组 chemerin 含量 与对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与细胞内比较: Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$

A-intracellular and extracellular chemerin content B-relative expression of chemerin mRNA in each group C-chemerin content in each group # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$ vs intracellular

图 7 BMSCs 炎症模型中 chemerin mRNA 表达及分泌 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Chemerin mRNA expression and secretion in BMSCs inflammation model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.8 MTT 筛选药物对 RAW264.7 细胞的最适浓度

如图 8 所示,与对照组比较,补肾方 (360、720、1480 $\mu\text{g/mL}$) 组 RAW264.7 细胞活力显著降低 ($P<0.001$),通络方 (60、120、240 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞活力明显升高 ($P<0.001$),补肾通络方 (840、1680

$\mu\text{g/mL}$) 组细胞活力显著升高 ($P<0.001$)。根据药物配比 (补肾方:通络方:补肾通络方 6:1:7),故选择补肾方 180 $\mu\text{g/mL}$ 、通络方 30 $\mu\text{g/mL}$ 及补肾通络方 210 $\mu\text{g/mL}$ 为对 RAW264.7 细胞活力无明显影响的适宜质量浓度。

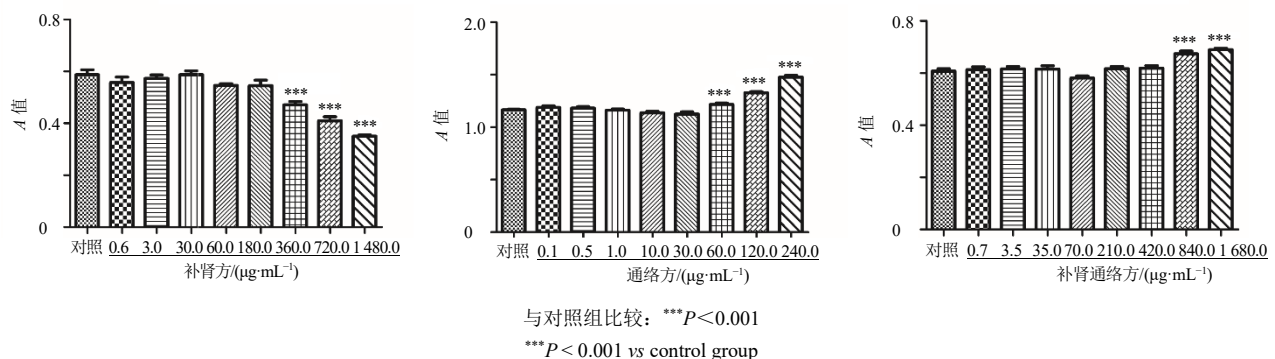


图 8 MTT 筛选药物对 RAW264.7 细胞的最适质量浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 MTT screening optimal concentration of medicine for RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.9 补肾通络方抑制 RAW264.7 细胞破骨分化

如图 9-A、B 所示,与对照组比较,模型组 RAW264.7 细胞 TRAP 阳性细胞数量和 TRAP 活力均显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,补肾方组、

通络方组及补肾通络方组 TRAP 阳性细胞数量和 TRAP 活力均明显降低 ($P<0.01$),其中补肾通络方组最为显著。如图 9-C 所示,与对照组比较,模型组 TRAP 蛋白表达水平升高;与模型组比较,各

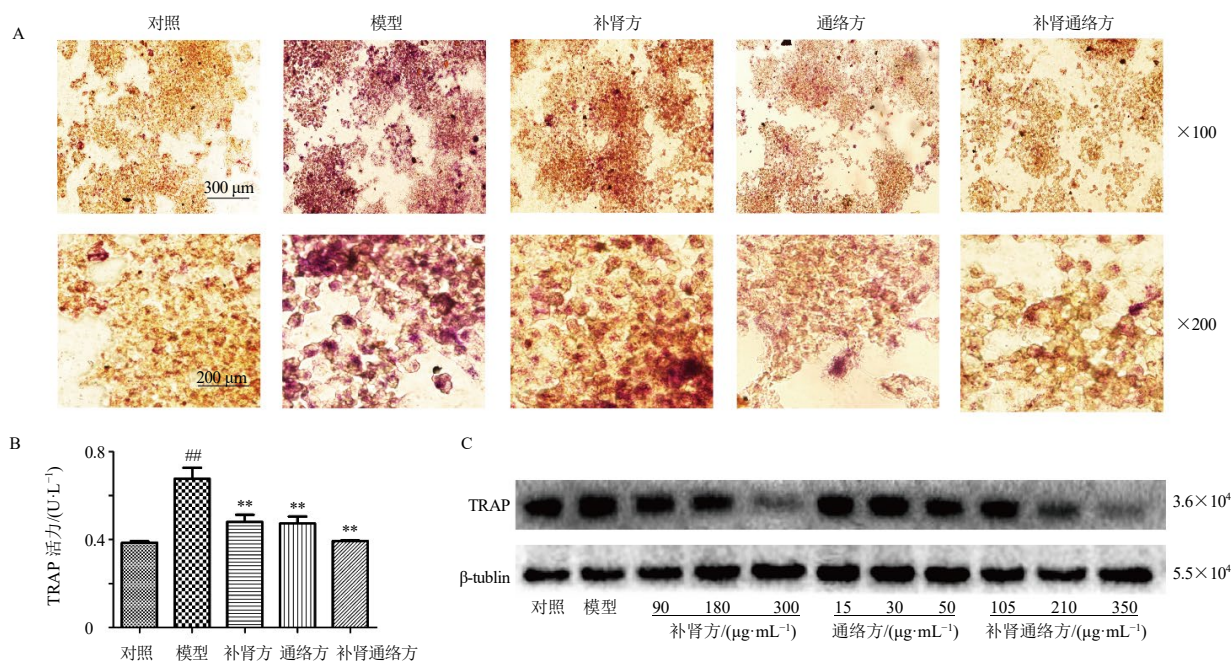


图 9 补肾通络方对 RAW264.7 细胞破骨分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 9 Effect of Bushen Tongluo Formula on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

给药组 TRAP 蛋白表达水平降低,且呈剂量相关性,其中补肾通络方组抑制作用更强。

3.10 补肾通络方抑制 RAW264.7 细胞破骨分化中炎症因子表达及分泌

如图 10 所示,与对照组比较,模型组 RAW264.7

细胞破骨分化中 chemerin、IL-6 及 TNF- α 分泌明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), IL-6 及 TNF- α mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,通络方组及补肾通络方组 IL-6 及 TNF- α 分泌明显降低 ($P < 0.01$), IL-6 及 TNF- α mRNA 表达水平显

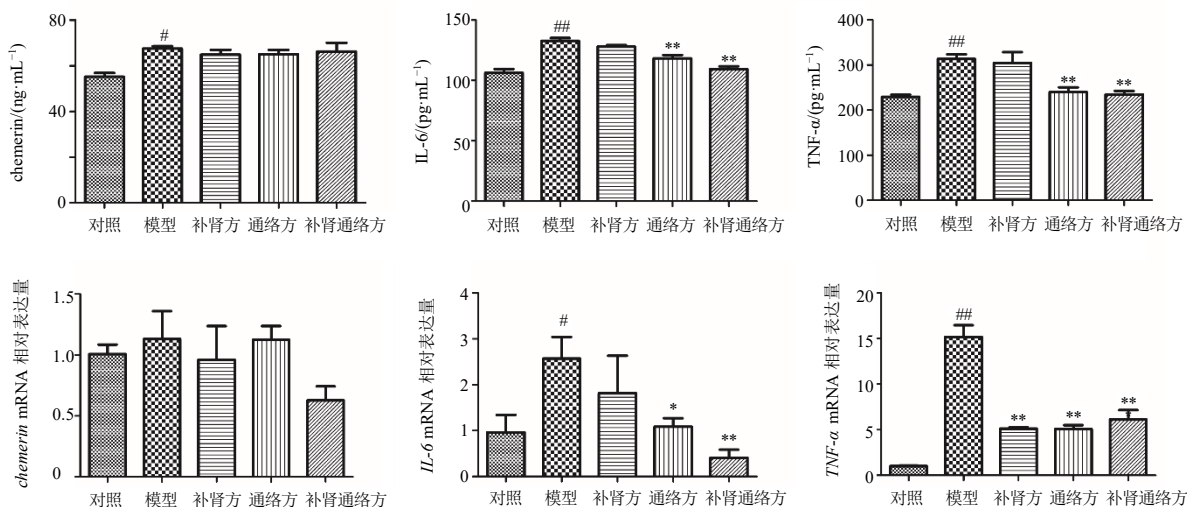


图 10 RAW264.7 细胞破骨分化中 chemerin、IL-6、TNF- α 分泌及 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Chemerin, IL-6, TNF- α secretion and mRNA expressions in osteoclast differentiation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；补肾方组 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

Chemerin 是一种分泌型蛋白，通过与其受体结合发挥相应生理作用，其主要分泌组织包括脂肪组织、肝脏及骨组织等。Chemerin 可通过与其受体牛卵泡趋化因子样受体 1 (chemokine-like receptor 1, CMKLR1) 结合抑制 BMSCs 中 β -catenin 表达，从而影响 BMSCs 成骨分化^[14]。Muruganandan 等^[15]通过分析 chemerin 基因序列发现其中含有与 PPAR γ 同样的反应原件，而 PPAR γ 又是脂肪细胞生长的关键调节因子；BMSCs 成脂分化中 chemerin 分泌显著升高，表明 chemerin 对改变 BMSCs 分化方向从而影响骨形成具有关键作用。本研究通过诱导 BMSCs 成骨及成脂分化发现，随着 BMSCs 成骨分化，chemerin 表达及分泌逐渐减少；而随着 BMSCs 成脂分化，chemerin 表达及分泌逐渐升高；补肾通络方可显著抑制 BMSCs 成骨及成脂分化早期 chemerin 表达及分泌，表明补肾通络方可能通过抑制 chemerin 表达及分泌促进 BMSCs 成骨分化，并抑制其成脂分化，从而逆转其分化方向，促进骨形成。

Chemerin 还是一种趋化素，可趋化巨噬细胞及树突细胞，升高炎症水平^[16]。研究显示，风湿性心脏病患者外周血 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 chemerin 水平均明显升高，表明 chemerin 与炎症水平呈正相关^[17]。本研究通过 BMSCs 炎症模型同样观察到 chemerin 表达及分泌随炎症水平增加而升高，而补肾通络方可显著抑制炎症环境下 chemerin 表达及分泌，表明补肾通络方对炎症环境下 BMSCs 中 chemerin 的高度表达及大量分泌具有显著的抑制作用。破骨细胞在分化成熟过程中会分泌大量炎症因子，升高骨髓微环境中炎症水平，而这些炎症因子以及 chemerin 又可进一步促进破骨分化，表明炎症因子与破骨分化存在密切联系^[18-19]。本研究通过 RAW264.7 细胞破骨分化模型发现，模型组成熟破骨细胞数量、活性及标志蛋白表达显著增加，炎症因子 IL-6、TNF- α 表达及分泌明显升高。经补肾通络方干预后，成熟破骨细胞数量、活性及标志蛋白表达显著降低，IL-6、TNF- α 表达及分泌明显降低，表明补肾通络方可显著抑制破骨细胞分化成熟，并且抑制相关炎症因子的产生。

综上，本研究通过成骨、成脂、破骨分化及炎

症模型证实了补肾通络方不仅对 OP 模型大鼠及斑马鱼骨量与骨微结构具有显著改善作用，还可通过抑制炎症因子及 chemerin 的产生来调节 BMSCs 成骨、成脂分化及破骨分化，从而促进骨形成，抑制骨吸收，改善 OP 症状，为中医药治疗 OP 提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, et al. The great beauty of the osteoclast [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 558: 70-78.
- [2] Zhu M P, Liu H, Sun K, et al. Vinpocetine inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates ovariectomy-induced bone loss [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109769.
- [3] 孟令仪, 周博宇, 张晶莹, 等. 骨质疏松发病机制及相关治疗药物研究进展 [J]. *系统医学*, 2019, 4(19): 193-195.
- [4] Intemann J, De Gorter D J J, Naylor A J, et al. Importance of osteocyte-mediated regulation of bone remodelling in inflammatory bone disease [J]. *Swiss Med Wkly*, 2020, 150: w20187.
- [5] Kishimoto H, Noguchi K, Takaoka K. Novel insight into the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) [J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2019, 55(1): 95-102.
- [6] 宋庆明, 盛正妍, 刘皋林. 特立帕肽治疗骨质疏松症的应用进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(6): 415-418.
- [7] 闵文, 黄桂成, 马勇, 等. 补肾通络对原发性骨质疏松症中医证候影响的临床研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2010, 26(5): 344-346.
- [8] 谭登, 张玉, 张农山, 等. 补肾通络方对骨质疏松斑马鱼效应评价及破骨细胞自噬机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 79-85.
- [9] 闵文, 黄桂成, 华永庆, 等. 补肾通络方治疗去势大鼠骨质疏松的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 189-192.
- [10] 韩龙, 闵文, 吴铭杰, 等. 补肾通络方促进骨质疏松症大鼠骨形成机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1): 97-102.
- [11] 闵文, 韩龙, 韩诗雨, 等. 补肾通络方对骨质疏松大鼠骨吸收的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(19): 4743-4746.
- [12] 袁翰. 补肾通络方激活 HIF/VEGF 信号通路促进骨质疏松大鼠模型的血管生成与抑制骨量流失 [D]. 南京:

- 南京中医药大学, 2017.
- [13] 王礼宁, 马勇, 郑苏阳, 等. 大鼠骨髓单核细胞的快速分离方法及向破骨细胞的诱导分化 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(18): 1-6.
- [14] Muruganandan S, Govindarajan R, McMullen N M, *et al.* Chemokine-like receptor 1 is a novel wnt target gene that regulates mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(3): 711-724.
- [15] Muruganandan S, Parlee S D, Rourke J L, *et al.* Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23982-23995.
- [16] Er L K, Wu S, Hsu L A, *et al.* Pleiotropic associations of *RARRES2* gene variants and circulating chemerin levels: Potential roles of chemerin involved in the metabolic and inflammation-related diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 4670521.
- [17] 许锋成, 曾洪燕, 杜曦, 等. 风湿性心脏病患者外周血脂肪因子 Chemerin 与 IL β 、IL-6 及 TNF- α 表达的相关性 [J]. 西部医学, 2019, 31(9): 1411-1414.
- [18] 郭世明, 郑亚明, 陈盛, 等. 青娥方含药血清对破骨细胞前体 RAW264.7 细胞 FAK/Src/p130Cas 通路及上清液炎症因子的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(1): 85-90.
- [19] Muruganandan S, Dranse H J, Rourke J L, *et al.* Chemerin neutralization blocks hematopoietic stem cell osteoclastogenesis [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2172-2182.
- [责任编辑 李亚楠]