· 药理与临床 ·

基于大麻素 2 型受体和雌激素受体 α 研究升麻和黑升麻含药血清对成骨细胞功能的影响

赵子慧[1]，胡思婧[1]，陈高策[1]，叶欣园[1]，刘 燕[1]，张泉龙[1]，徐金龙[2]，秦路平[1]，韩 婷[3*]，张巧艳[1,3*]

1. 浙江中医药大学药学院，浙江 杭州 310053
2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六九医院，内蒙古 呼和浩特 010051
3. 中国人民解放军海军军医大学药学院，上海 200433

摘 要：目的 研究升麻 *Cimicifuga foetida* 和黑升麻含药血清基于大麻素 2 型受体（cannabinoid receptor type 2，CB2R）与雌激素受体 α（estrogen receptor α，ERα）对成骨细胞骨形成的调控作用。**方法** 采用高分辨质谱法鉴定升麻和黑升麻中的化学成分；升麻与黑升麻含药血清或与 CB2R 反向激动剂 AM630 或 ERα 抑制剂 ICI 联合处理 MC3T3-E1 成骨细胞，CCK-8 法测定细胞增殖活性；试剂盒测定碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性；茜素红染色观察成骨细胞骨矿化结节的形成；Western blotting 检测骨形成相关蛋白及 CB2R 与 ERα 的表达。**结果** 升麻和黑升麻中分别鉴定了 12、14 个化学成分，其中有 3 个共有成分。升麻和黑升麻含药血清可显著增加成骨细胞的增殖、ALP 活性和骨矿化结节形成，增加 CB2R 和 ERα 及骨形成相关蛋白的表达。15%升麻含药血清对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、ALP 活性、骨矿化结节形成及骨形成相关蛋白表达的促进作用可被 AM630 和 ICI 所逆转，15%黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞骨形成的促进作用仅可被 ICI 所逆转。**结论** 升麻含药血清可通过 CB2R 与 ERα 双靶点促进成骨细胞的骨形成，黑升麻含药血清仅通过激活 ERα 增加成骨细胞的骨形成。

关键词：升麻；黑升麻；成骨细胞；大麻素 2 型受体；雌激素受体 α；升麻消旋体 A；7,8-二羟基升麻醇；2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2023)18 - 5941 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.012

Effects of *Cimicifuga foetida* and black cohosh medicated serum on osteoblasts functions based on CB2R and ERα

ZHAO Zi-hui[1], HU Si-jing[1], CHEN Gao-ce[1], YE Xin-yuan[1], LIU Yan[1], ZHANG Quan-long[1], XU Jin-long[2], QIN Lu-ping[1], HAN Ting[3], ZHANG Qiao-yan[1, 3]

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
2. 969 Hospital of PLA Joint Logistics Support Forces, Hohhot 010051, China
3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To study the regulatory effects of *Cimicifuga foetida* and black cohosh medicated serum on osteoblastic bone formation based on cannabinoid receptor type 2 (CB2R) and estrogen receptor α (ERα). **Methods** High-resolution mass spectrum was used to identify the chemical constituents in *C. foetida* and black cohosh. The osteoblastic MC3T3-E1 cells were treated with various concentrations *C. foetida* and black cohosh medicated serum or the combination with CB2R inverse agonist AM630 or ERα antagonist ICI. CCK-8 method was used to determine the proliferation of MC3T3-E1 cells. The assay kit was used to measure the alkaline phosphatase (ALP) activity. The alizarin red staining was used to detect the formation of bone mineralized nodules in MC3T3-E1 cells. Western blotting was applied to analyze the expressions of CB2R, ERα and related proteins with osteoblastic bone formation.

收稿日期：2023-05-05

基金项目：上海市科委科技支撑计划项目（22S21901600）；国家自然科学基金资助项目（81973534）

作者简介：赵子慧，女，硕士研究生，研究方向为中药活性成分及其作用。E-mail: zzh18684297873@163.com

***通信作者：**韩 婷，教授，主要从事中药活性成分及资源开发利用研究。E-mail: hanting@smmu.edu.cn

张巧艳，教授，主要从事中药活性成分及其作用机制研究。E-mail: zqy1965@163.com

Results A total of 12 chemical constituents were identified in *C. foetida*, and 14 constituents in black cohosh, with three common constituents. Both *C. foetida* and black cohosh medicated serum significantly increased the proliferation, ALP activity and the formation of bone mineralized nodules, and also enhanced the expression of CB2R, ERα and related proteins associated with osteoblastic bone formation. Moreover, the promoting effects 15% *C. foetida* medicated serum on osteoblastic MC3T3-E1 cells could be reversed by AM630 and ICI, while the improvement effects of 15% black cohosh medicated serum on osteoblast only could be reversed by ICI. **Conclusion** *C. foetida* medicated serum increased the osteoblastic bone formation via activation of CB2R and ERα and black cohosh medicated serum enhanced the osteoblastic bone formation only via activiation of ERα.

Key words: *Cimicifuga foetida* L.; black cohosh; osteoblast; cannabinoid receptor type 2; estrogen receptor α; cimicifugate racemimer A; 7,8-dihydroxy cohoshol; 2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1

骨质疏松症是危害老年人健康的重大疾病，其发生与骨形成的成骨细胞功能减退和骨吸收的破骨细胞活性增强有关[1-2]。成骨细胞和破骨细胞的形成分化和功能受多个靶点和信号通路的调控。大麻素 2 型受体（cannabinoid receptor type 2，CB2R）和雌激素受体 α（estrogen receptor α，ERα）为调控成骨细胞和破骨细胞功能的关键靶点。CB2R 主要存在于骨骼及外周免疫系统，其激动剂 HU308 可激活成骨细胞的 CB2R，缓解雌激素缺乏导致的骨质疏松症[3]。CB2R 激动剂因其无精神成瘾样的不良反应[4]，已成为调控骨代谢药物研究的新热点。ERα 在成骨细胞和破骨细胞中高度表达，ERα 激动剂对骨骼具有保护作用，如抗骨质疏松药物雷诺昔芬、他莫昔芬等。研究证明，以 ERα 为靶点的雷诺昔芬、他莫昔芬对 CB2R 也有一定的激动作用[5]。成骨细胞中 CB2R 和 ERα 的激活均可以调节 Wnt/β-catenin 通路，并增强成骨相关转录因子 2（runt-related transcription factor 2，Runx2）、骨形态发生蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）的表达，促进骨形成[6-7]。因此，同时激活 CB2R 和 ERα 靶点的药物，可显著增强成骨细胞的骨形成，有效防治骨质疏松症。

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.) Maxim.或升麻 *C. foetida* L.的干燥根茎，具有抗肿瘤、抗骨质疏松症、神经保护等多种生物活性[8-9]。在欧洲和北美，来源于同属植物黑升麻 *C. racemosa* L.的制剂常用于缓解更年期综合征及骨质疏松症的治疗[10-11]。研究表明升麻与黑升麻的抗骨质疏松症及缓解更年期症状的作用效果相似[12]，表明升麻也可作为替代和补充治疗剂，用于骨质疏松症、更年期综合征等疾病的防治。然而，升麻和黑升麻在细胞水平上对骨代谢的调控作用及机制尚不清楚。因此，本研究基于 CB2R 和 ERα 双靶点，比较升麻与黑升麻含药血清对成骨细胞功能的调控作用，为将升麻开发为抗骨质疏松症的临床补充药物提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只，体质量 200～250 g，购自浙江中医药大学实验动物中心，许可证号 SCXK（浙）2021-0361，动物饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心，室温（25±2）℃，相对湿度 45%～50%，自由进食饮水。本研究中所有实验动物的使用严格遵守浙江中医药大学伦理规定（批准号 20221207Aazz0619080878）。

1.2 细胞

小鼠成骨前体细胞系 MC3T3-E1（目录号 GNM15）来自中国科学院（上海）细胞库。

1.3 药材

升麻（批号 210901）购自浙江中医药大学中药饮片有限公司，经浙江中医药大学药学院秦路平教授鉴定为毛茛科植物升麻 *C. foetida* L.的干燥根茎。

1.4 药品与试剂

黑升麻制剂胶囊（批号 LG15353.A01）购自澳洲 Nature’s Way 公司；甲酸（批号 A800013）、甲醇（批号 M921074）购自上海麦克林生化科技有限公司；乙腈（批号 45983，色谱纯）购自默克有限公司；α-MEM 培养基（批号 TBD41061）购自天津灏洋生物制品科技有限公司；4%多聚甲醛（批号 R20497）购自上海源叶生物科技有限公司；磷酸酶蛋白酶抑制剂（批号 P1045）、Western 及 IP 裂解液（批号 P0013J）、上样缓冲液（批号 P0015）、脱脂奶粉（批号 P0216）、Western 一抗稀释液（批号 P0023A）、牛血清白蛋白（批号 ST023）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 P0010）、30%丙烯酰胺溶液（批号 ST003）、1.5 mol/L Tris-HCl（pH 8.8，批号 ST788）、1 mol/L Tris-HCl（pH 6.8，批号 ST768）、过硫酸铵（批号 ST005）、TEMED（批号 ST728）、DAPI 染色液（批号 061819191015）、碱

性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）试剂盒（批号 121820210416）购自上海碧云天生物技术有限公司；Tris（批号 A501492-0500）、甘氨酸（批号 A502065-0500）购自上海生工生物科技有限公司；胎牛血清（批号 10091-148）、CB2R 反向激动剂 AM630（批号 GC10147）、ERα 抑制剂 ICI（批号 A1428）购自 APExBIO 公司；青霉素-链霉素（批号 15140-122）购自美国 GLPBIO 公司；ECL 显色液（批号 1925901）购自美国 Millipore 公司；CCK-8 增殖检测试剂盒（批号 ab228554）、成骨细胞特异基因 Osterix 兔多克隆抗体（批号 ab22552）、I 型胶原蛋白（type I collagen，COL-1）兔单克隆抗体（批号 ab138492）、兔抗单克隆 CB2 抗体（批号 ab259323）、兔抗单克隆 BMP2 抗体（批号 ab14933）、兔抗单克隆 ER 抗体（批号 ab32063）购自英国 Abcam 公司；Runx2 兔多克隆抗体（批号 12556S）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）兔多克隆抗体（批号 AF7021）购自美国 Affinity 公司。

1.5 仪器

Vanquish 超高液相色谱仪、Q Exactive PLUS Mass Spectrometer 质谱仪、ST16R 型低温高速离心机、371 型 CO_2 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；LC-10N-50A 型冷冻干燥机（上海力辰邦西仪器科技有限公司）；XP105 型电子天平（瑞士梅特勒-托利多仪器公司）；PowerPac Basic 双垂直电泳仪、Synergy H1 型多功能酶标仪（美国伯腾公司）；Eclipse Ti-s 型荧光相差倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；RE-2000A 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）。

2 方法

2.1 样品制备

升麻饮片 100 g，用 60%乙醇以 1∶10 的固液比回流提取 2 次，每次 2 h，滤过浓缩后冻干，最终产率为 19.8%。依据《中国药典》2020 年版一部中升麻成人最高剂量为 10 g，按照体表面积换算得大鼠 ig 剂量为 180 mg/kg；黑升麻胶囊推荐用量为每日 0.667 g，换算得大鼠 ig 剂量为 60 mg/kg。

2.2 升麻和黑升麻化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

2.2.1 供试品溶液的制备　精密称取升麻提取物和黑升麻胶囊内容物各 40 mg，加入 80%甲醇溶液 500 μL，45 Hz、240 s 加钢珠匀浆，冰水浴超声处理 1 h，−20 ℃静置 1 h。4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 后，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜于进样瓶中备用。

2.2.2 高效液相色谱条件　Waters XSelect® HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.5 μm），流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱：0～15 min，5%～95% B；15.0～15.1 min，95%～5% B；15.1～20.0 min，5% B。体积流量为 0.4 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 1 μL。

2.2.3 质谱条件　鞘气体积流量 30 L/h；辅助气体积流量 10 L/h；离子透镜电压 55.0 V；喷雾电压 3.8、−3.2 kV；毛细管温度 320 ℃；辅助气加热器温度 300 ℃；ESI 离子源；雾化气压 379.22 kPa；辅助气压 379.22 kPa；气帘气压 241.32 kPa；温度 550 ℃；喷雾电压 5500 V（正离子模式）；轰击能量 40 eV；碰撞能差 20 eV。利用控制软件（Analyst TF 1.7，AB Sciex）基于信息依赖型扫描功能（information dependent acquisition，IDA）在每个数据采集循环中，筛选出强度最强且大于 100 的分子离子采集二级质谱数据。使用 Progenesis QI 软件导入原始数据，进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分和峰对齐等，利用自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法进行鉴定。

2.3 升麻及黑升麻含药血清的制备

60 只大鼠称定体质量（x）后分为 3 个区组，第 1 区组 18 只（200 g≤x＜210 g），第 2 区组 18 只（210 g≤x＜230 g），第 3 区组 24 只（230 g≤x≤250 g），依次对大鼠进行编号，按照完全随机法分为 3 个给药组，每组 20 只，分别 ig 生理盐水、180 mg/kg 升麻提取物、60 mg/kg 黑升麻胶囊内容物，1 次/d；各组连续给药 7 d 后，腹主动脉取血，4 ℃静置 2 h，3000 r/min 离心 15 min，分离上清液，为消除个体化差异将 3 个给药组血清分别合并后，56 ℃灭活 30 min，0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后分装，冻存于 −80 ℃保存备用。

2.4 细胞培养

将状态良好的 MC3T3-E1 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 α-MEM 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，待细胞生长至 70%～80%时传代，用于后续实验。）

2.5 成骨细胞的处理及指标测定

2.5.1 药物处理　MC3T3-E1 细胞培养 24 h，用 5%、10%、15%的升麻或黑升麻含药血清处理后，进行指标测定。为了观察 CB2R 和 ERα 抑制剂对升麻含药血清对成骨细胞作用的逆转作用，在细胞给药前 30 min，加入 1 μmol/L CB2R 反向激动剂 AM630，或者 1 μmol/L ERα 抑制剂 ICI，培养，进行指标测定。

2.5.2 成骨细胞增殖和 ALP 活性检测 将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^4/孔接种于 96 孔板，细胞贴壁后，分别加入升麻或黑升麻含药血清，继续培养 24、48、72 h，加入 10 μL CCK-8 溶液培养 30 min 后，测定 450 nm 处的吸光度（*A*）值。

MC3T3-E1 细胞以 5×10^3/孔接种于 96 孔板中，按“2.5.1”项下方法处理，加入成骨诱导液（5×10^{-3} mol/L β-甘油磷酸、100 mg/L 抗坏血酸和 1×10^{-8} mol/L 地塞米松）诱导成骨分化。给药 7 d，按照试剂盒说明书测定 ALP 活性。将培养的细胞用预冷的 PBS 冲洗 2 次，加入 ALP 染色液，37 ℃染色 30 min 后，PBS 洗涤细胞 3 次，显微镜下观察拍照。

2.5.3 骨矿化结节诱导及茜素红 ARS 染色 将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^4/孔接种 96 孔板中，按“2.5.1”项下方法处理，成骨诱导 14 d 后，用预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次，每孔加入 50 μL 4%多聚甲醛中固定 30 min，用含 40 mmol/L 茜素红的 ARS（pH 4.2）染色 30 min，光学显微镜下观察成骨细胞骨矿化结节的形态和数目。用 10%氯化十六烷吡啶磷酸钠溶解骨结节，并在 570 nm 处测定 *A* 值。

2.5.4 Western blotting 分析 将 MC3T3-E1 细胞以 2×10^5/孔接种于 6 孔板中，按“2.5.1”项下方法处理，成骨诱导 7 d 后，用预冷的 PBS 冲洗细胞 3 次，每孔加入 200 μL RIPA 裂解液，冰上裂解 30 min，离心，取上清，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后变性。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，用 5%胎牛血清蛋白封闭后，分别加入成骨相关蛋白抗体（1∶1000）、GAPDH 抗体（1∶1000）、CB2R 抗体（1∶500）、ERα 抗体（1∶1000），4 ℃孵育过夜，加入二抗（1∶3000），37 ℃孵育 1 h，用 MONAD QuickChemi 5100 化学发光成像系统显影并定量分析条带。

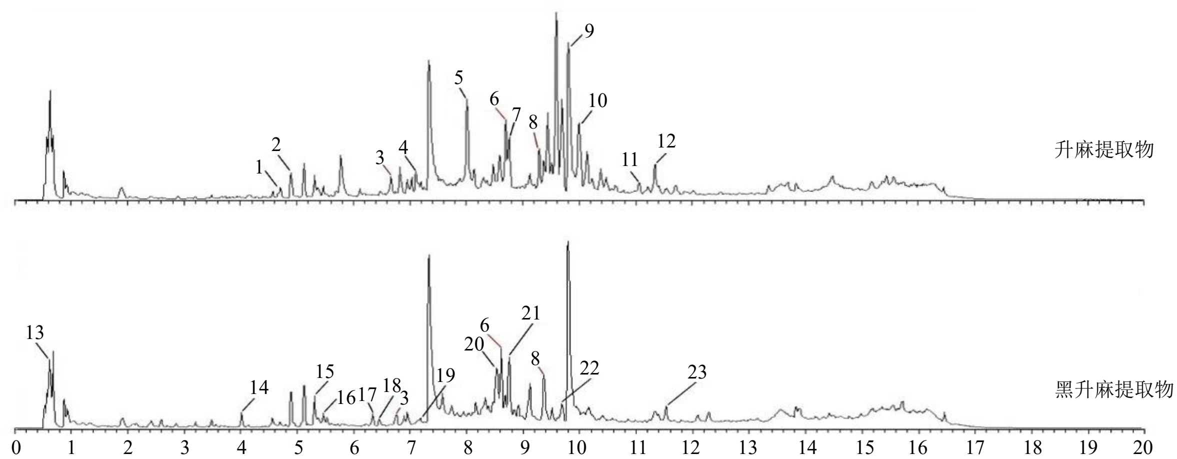
2.6 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据采用 Prism 9.0 软件进行统计学分析，采用 Dunnett-*t* 检验和单因素方差分析多重比较数据。

3 结果

3.1 基于 UPLC/Q-TOF/MS 的升麻和黑升麻化学成分的比较

收集整理国内外升麻属植物化学成分研究的相关文献，建立包括化合物英文名称、分子式、结构式、精确相对分子质量及特征碎片的化学成分文献信息数据库，比较化学成分的质谱信息，对检测到的化合物进行鉴定。如图 1 所示，在正离子模式



1-升麻酸 C 2-norkhelloside 3-升麻消旋体 A 4-cimiheracleins A 5-cimigenol-3-*O*-β-*D*-galactopyranoside 6-7,8-二羟基升麻醇 7-25-methoxy-24-*O*-acetylisohurinol 8-2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1 9-25-*O*-methylcimigenol-3-*O*-α-*L*-ara 10-cimiracemoside C 11-金龟草二醇 12-升麻醇-3-酮 13-去甲猪毛菜碱 14-cimicifugolide C 15-升麻酸 A 16-15,16-*seco*-14-carboxyl-16-oxo-hydro-shengmanol-3-*O*-β-*D*-xyl 17-3-*O*-α-*L*-ara-24-*O*-acetylhydroshengmanol-15-*O*-β-*D*-glucose 18-3,4-二甲氧基肉桂酸 19-阿克特素 20-15,16-*seco*-升麻新醇 C 21-cimiracemoside J 22-cimicinol 23-24-*O*-acetylhydroshengmanol

1-cimicifugc acid C 2-norkhelloside 3-cimicifugate racemimer A 4-cimiheracleins A 5-cimigenol-3-*O*-β-*D*-galactopyranoside 6-7,8-dihydroxy cohoshol 7-25-methoxy-24-*O*-acetylisohurinol 8-2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1 9-25-*O*-methylcimigenol-3-*O*-α-*L*-ara 10-cimiracemoside C 11-acerinol 12-cimigenol-3-one 13-desmodifylline 14-cimicifugolide C 15-cimicifugc acid A 16-15,16-*seco*-14-carboxyl-16-oxo-hydro-shengmanol-3-*O*-β-*D*-xyl 17-3-*O*-α-*L*-ara-24-*O*-acetylhydroshengmanol-15-*O*-β-*D*-glucose 18-3,4-dimethoxycinnamic acid 19-actetil 20-15,16-*seco* cohoshenol C 21-cimiracemoside J 22-cimicinol 23-24-*O*-acetylhydroshengmanol

图 1 UPLC/Q-TOF/MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of UPLC/Q-TOF/MS

下采集数据，通过对保留时间、精确相对分子质量及二级质谱碎片等的对比分析，从升麻提取物中共鉴定 12 个化学成分，包括升麻酸 C、norkhelloside、升麻消旋体 A、cimiheracleins A、cimigenol-3-*O*-β-*D*-galactopyranoside、7,8-二羟基升麻醇、25-methoxy-24-*O*-acetylisohurinol、2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1、25-*O*-methylcimigenol-3-*O*-α-*L*-ara、cimiracemoside C、金龟草二醇和升麻醇-3-酮；从黑升麻胶囊内容物中共鉴定 14 个化学成分，包括去甲猪毛菜碱、cimicifugolide C、升麻酸 A、15,16-*seco*-14-carboxyl-16-oxo-hydro-shengmanol-3-*O*-β-*D*-xyl、3-*O*-α-*L*-ara-24-*O*-acetylhydroshengmanol-15-*O*-β-*D*-glucose、3,4-二甲氧基肉桂酸、升麻消旋体 A、阿克特素、15,16-*seco*-升麻新醇 C、7,8-二羟基升麻醇、cimiracemoside J、2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1、cimicinol 和 24-*O*-acetylhydroshengmanol，其中升麻和黑升麻提取物中均检测到的成分为升麻消旋体 A、7,8-二羟基升麻醇及 2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1。

3.2 升麻与黑升麻含药血清基于 CB2R 及 ERα 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

如表 1 所示，5%、10%和 15%的升麻和黑升麻含药血清作用 24 h，对 MC3T3-E1 细胞的增殖均无显著影响。5%和 10%的升麻和黑升麻含药血清作用 24 h，对 MC3T3-E1 细胞的增殖均无显著影响。升麻和黑升麻含药血清分别作用 48 h 均可剂量相关性地显著促进 MC3T3-E1 细胞的增殖（$P<0.05$、0.01、0.001）。CB2R 反向激动剂 AM630 或 ERα 抑制剂 ICI 预处理后能逆转 15%升麻或黑升麻含药血清对成骨细胞增殖的促进作用（$P<0.01$、0.001）；AM630 和 ICI 共同处理后更加有效逆转升麻或黑升麻含药血清对成骨细胞增殖的促进作用（$P<0.001$），表明升麻或黑升麻含药血清可能通过激活 CB2R 和 ERα 增加成骨细胞的增殖。

3.3 升麻与黑升麻含药血清基于 CB2R 及 ERα 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

成骨细胞表达 ALP，参与其分化和骨基质的矿化。ALP 活性常用于表征成骨细胞的分化和骨基质矿化功能。如图 2 所示，5%、10%和 15%的升麻与黑升麻含药血清均可显著增加成骨细胞 ALP 活性，且呈剂量相关性（$P<0.01$、0.001）。AM630、ICI 及二者共同预处理均可逆转 15%升麻含药血清对成骨细胞 ALP 活性的促进作用（$P<0.001$），且 AM630 和 ICI 共同处理的逆转作用更为显著（$P<0.01$、0.001），表明升麻通过激活 CB2R 及 ERα 增加成骨细胞 ALP 的活性。AM630 预处理不能逆转 15%黑升麻含药血清对成骨细胞 ALP 的促进作用，而 ICI 预处理能够逆转 15%黑升麻含药血清对 ALP 活性的促进作用，表明黑升麻可能仅通过激活 ERα 增加成骨细胞 ALP 的活性。

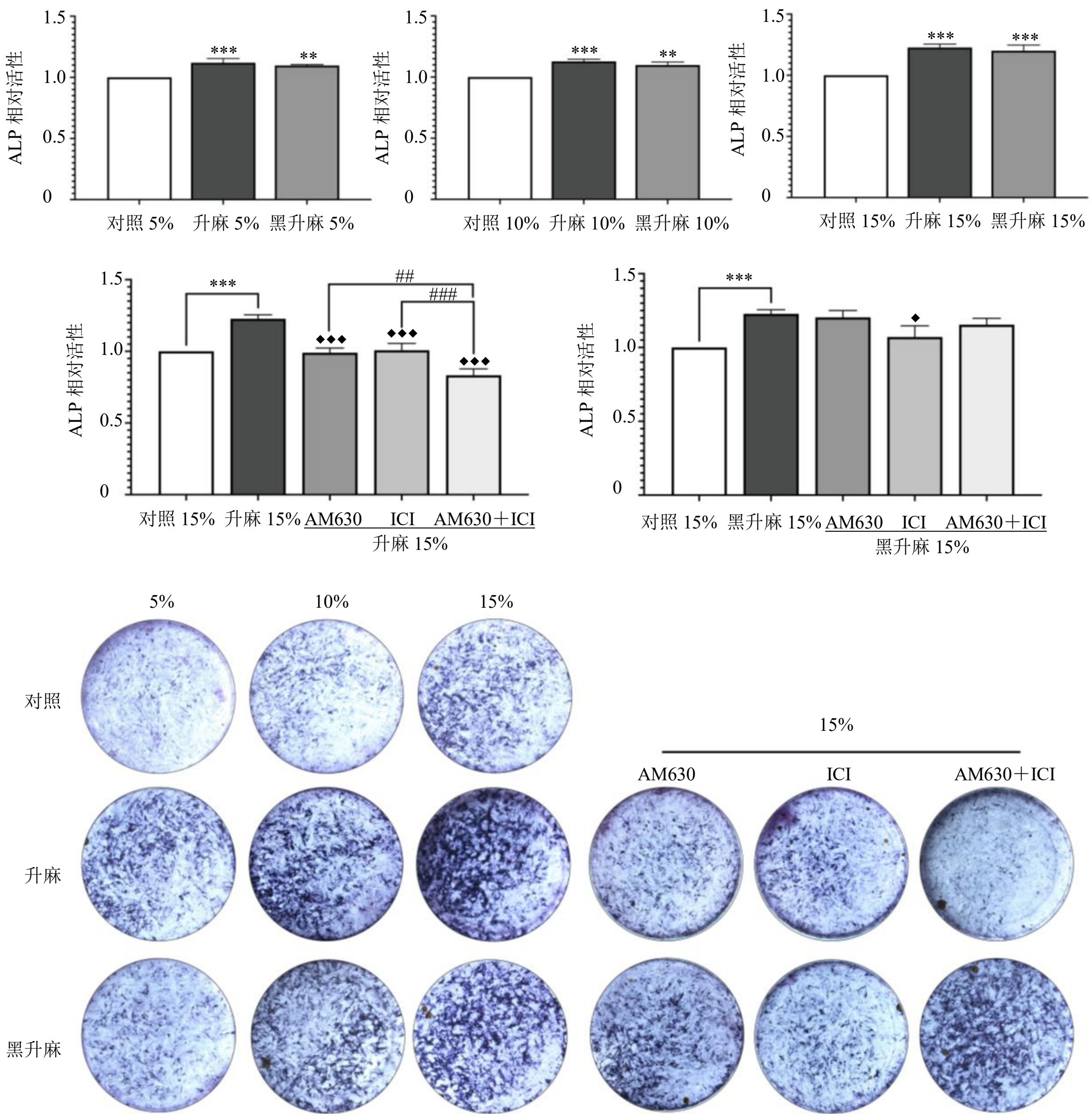
表 1 升麻与黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响及 AM630 和 ICI 的逆转作用 ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of *C. foetida* and black cohosh medicated serum on proliferation of MC3T3-E1 cells and reversal effects of AM630 and ICI ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

组别	剂量	*A* 24 h	*A* 48 h	*A* 72 h
对照	5%	0.54±0.02	0.54±0.01	0.63±0.01
	10%	0.60±0.01	0.62±0.01	0.73±0.03
	15%	0.60±0.02	0.78±0.03	0.72±0.04
升麻	5%	0.54±0.01	0.61±0.01*	0.63±0.01
	10%	0.58±0.02	0.76±0.03***	0.76±0.02
	15%	0.64±0.03	0.95±0.02***	0.83±0.03*
黑升麻	5%	0.53±0.01	0.59±0.01*	0.63±0.01
	10%	0.58±0.01	0.67±0.02**	0.72±0.01
	15%	0.62±0.01	0.95±0.01***	0.76±0.01*
升麻＋AM630	15%＋1 μmol·L^{-1}	0.64±0.03	0.83±0.02◆◆◆	0.77±0.01
升麻＋ICI	15%＋1 μmol·L^{-1}	0.67±0.06	0.82±0.02◆◆◆	0.81±0.03
升麻＋AM630＋ICI	15%＋1 μmol·L^{-1}＋1 μmol·L^{-1}	0.66±0.02	0.76±0.02◆◆◆	0.79±0.01
黑升麻＋AM630	15%＋1 μmol·L^{-1}	0.67±0.01◆	0.90±0.03	0.72±0.01
黑升麻＋ICI	15%＋1 μmol·L^{-1}	0.67±0.04◆	0.85±0.03◆◆	0.71±0.03◆
黑升麻＋AM630＋ICI	15%＋1 μmol·L^{-1}＋1 μmol·L^{-1}	0.63±0.01	0.82±0.03◆◆◆	0.69±0.02◆

与含相同浓度血清的对照组比较：$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与无 AM630 或 ICI 的 15%药物处理组比较：◆$P<0.05$ ◆◆$P<0.01$ ◆◆◆$P<0.001$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ *vs* control group containing the same concentration of serum; ◆$P < 0.05$ ◆◆$P < 0.01$ ◆◆◆$P < 0.001$ *vs* 15% drug treatment group without AM630 or ICI



与对照组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001；与无 AM630 或 ICI 的 15%药物处理组比较：$^{◆}P$＜0.05　$^{◆◆}P$＜0.01　$^{◆◆◆}P$＜0.001；与 AM630 及 ICI 联合给药组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001，图 3、5、6 同

$^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01　$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{◆}P$ < 0.05　$^{◆◆}P$ < 0.01　$^{◆◆◆}P$ < 0.001 *vs* 15% corresponding drug treatment group without AM630 or ICI; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01　$^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* AM630 and ICI combined administration group, same as figs. 3, 5 ,6

图 2　升麻与黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响及 AM630 和 ICI 的逆转作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2　Effects of *C. foetida* and black cohosh medicated serum on ALP activity of MC3T3-E1 cells and reversal effects of AM630 and ICI ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4　升麻与黑升麻含药血清基于 CB2R 及 ERα 对 MC3T3-E1 细胞骨矿化结节形成的影响

成骨细胞通过矿化产生骨基质，增加骨量。如图 3 所示，5%、10%和 15%的升麻与黑升麻含药血清均可显著促进成骨细胞矿化结节的形成（P＜0.01、0.001）。AM630 和 ICI 预处理均可逆转 15%升麻含药血清对成骨细胞矿化结节形成的促进作用（P＜0.001），且 AM630 和 ICI 共同处理后，逆转作用更加显著（P＜0.01、0.001），表明升麻含药血清通过激活 CB2R 及 ERα 增加成骨细胞的矿化。ICI 预处理可逆转 15%黑升麻含药血清对骨矿化结节的促进作用（P＜0.05），但 AM630 预处理对不能逆转 15%黑升麻含药血清对骨矿化结节的促进作用，表明黑升麻仅通过激活 ERα 增加成骨细胞的矿化。

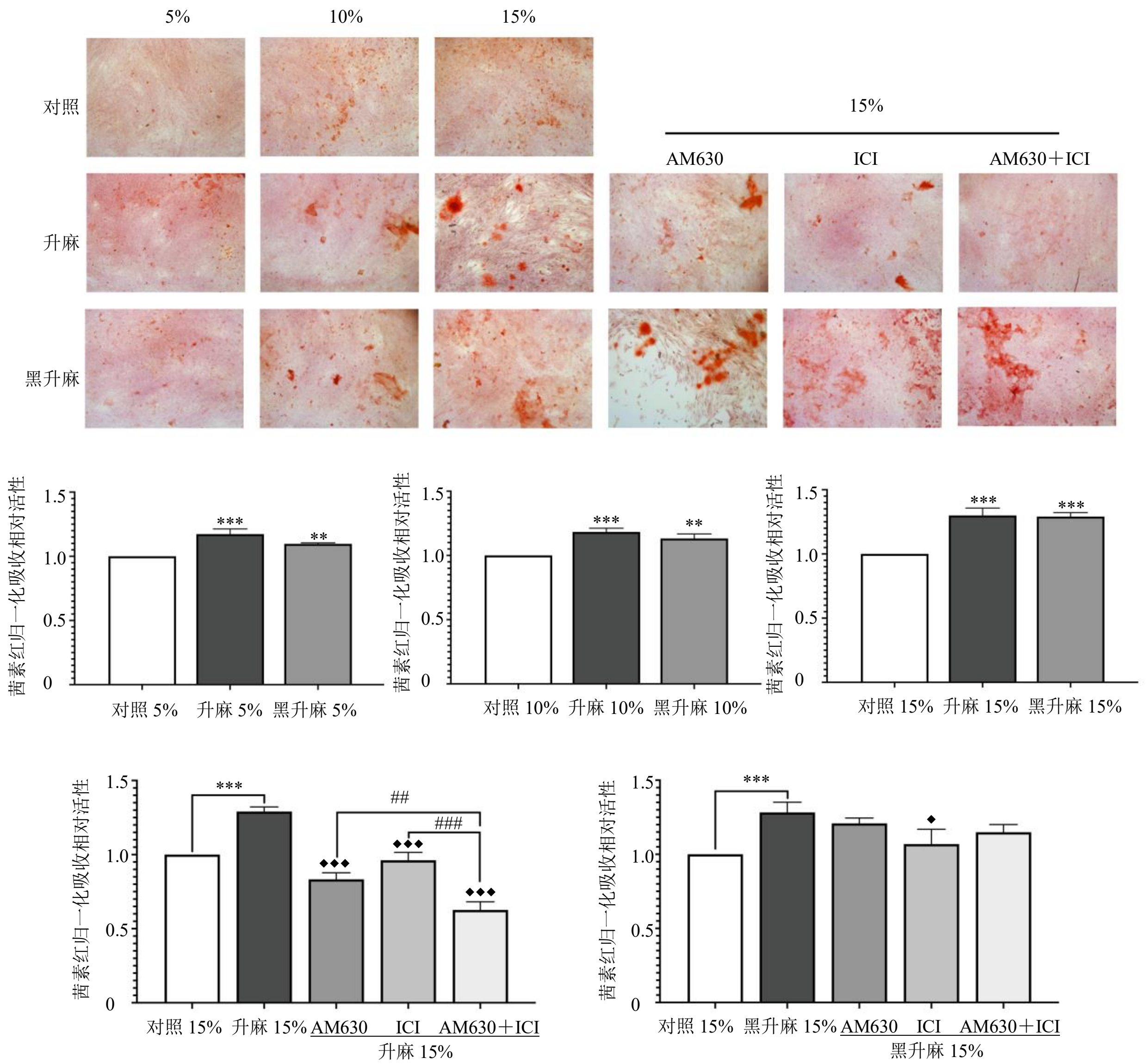


图 3　升麻与黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞骨矿化结节形成的影响及 AM630 和 ICI 的逆转作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

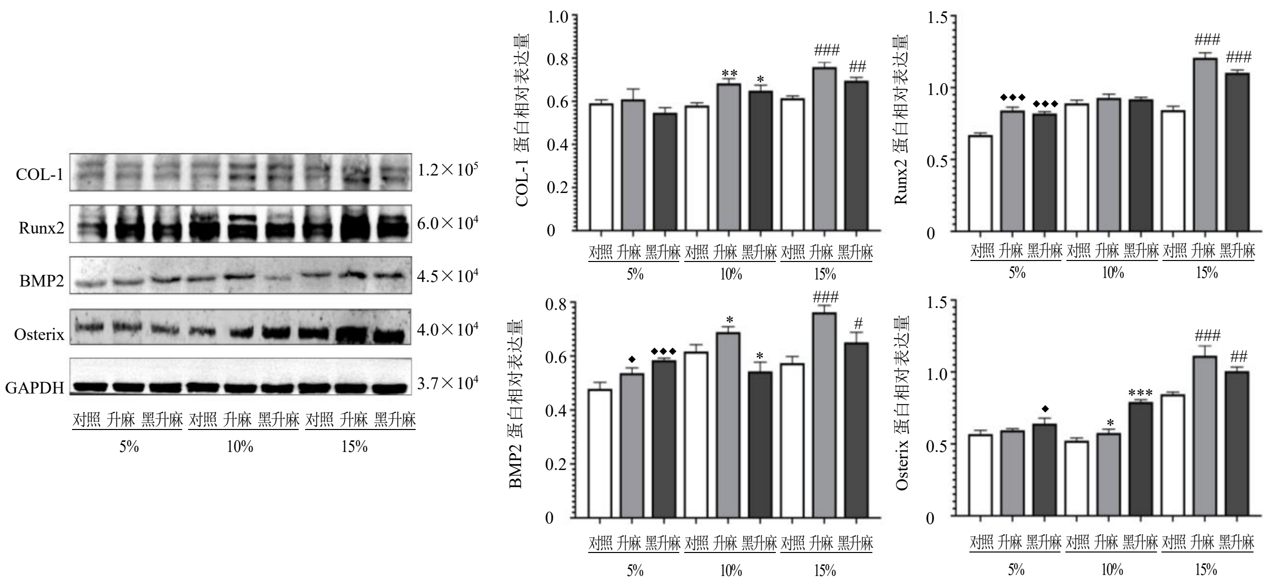
Fig. 3　Effects of *C. foetida* and black cohosh medicated serum on formation of bone mineralized nodules of MC3T3-E1 cells and reversal effects of AM630 and ICI ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5　升麻与黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞 CB2R 与 ER-α 及骨形成相关蛋白表达的影响

BMP2、Runx2 和 Osterix 是参与成骨细胞功能调控的关键蛋白，COL-1 是成骨细胞分泌的基质蛋白，这些蛋白表达水平的高低，反映了成骨细胞的骨形成能力。如图 4 所示，5%、10%和 15%的升麻与黑升麻含药血清均可显著上调成骨细胞 BMP2、Runx2、Osterix 及 COL-1 的表达（P＜0.05、0.01、0.001），且呈剂量相关性，表明升麻和黑升麻含药血清可促进成骨细胞的形成和分化。

如图 5 所示，15%的升麻含药血清可显著上调成骨细胞 CB2R 与 ERα，及骨形成相关蛋白 BMP2、Runx2、Osterix 及 COL-1 的表达（P＜0.001），AM630、ICI 或两者共同预处理可逆转 15%升麻含药血清对成骨细胞 CB2R、ERα 及骨形成蛋白 BMP2、Runx2、Osterix 及 COL-1 表达的促进作用（P＜0.05、0.01、0.001），进一步表明升麻含药血清通过激活 CB2R 与 ERα 促进成骨细胞的形成、分化和骨矿化作用。

如图 6 所示，15%的黑升麻含药血清可显著上调成骨细胞 CB2R 与 ERα，及骨形成相关蛋白 BMP2、Runx2、Osterix 及 COL-1 的表达，其对成骨细胞关键蛋白表达的增强作用可被 ICI 逆转，而不能被 AM630 逆转。



与对照 5%组比较：◆P＜0.05　◆◆◆P＜0.001；与对照 10%组比较：*P＜0.05　**P＜0.01　***P＜0.001；与对照 15%组比较：#P＜0.05　##P＜0.01　###P＜0.001

◆P < 0.05　◆◆◆P < 0.001 *vs* control 5% group; *P < 0.05　**P < 0.01　***P < 0.001 *vs* control 10% group; #P < 0.05　##P < 0.01　###P < 0.001 *vs* control 15% group

图 4　升麻与黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 细胞骨形成相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Fig. 4　Effects of *C. foetida* and black cohosh medicated serum on bone formation-related proteins of MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

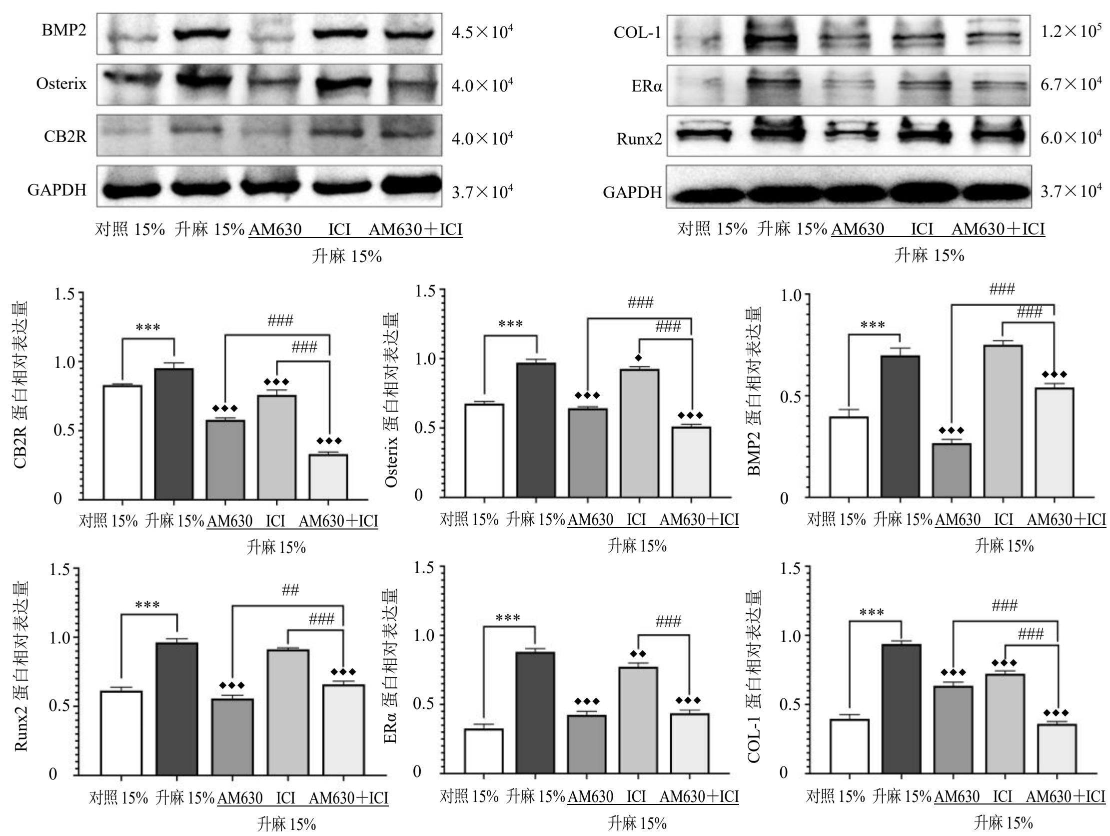


图 5　升麻含药血清对成骨细胞 CB2R 与 ERα 及骨形成相关蛋白表达影响及 AM630 和 ICI 的逆转作用（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Fig. 5　Effect of *C. foetida* medicated serum on expressions of CB2R, ERα and bone formation-related proteins in osteoblast and reversal effects of AM630 and ICI ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

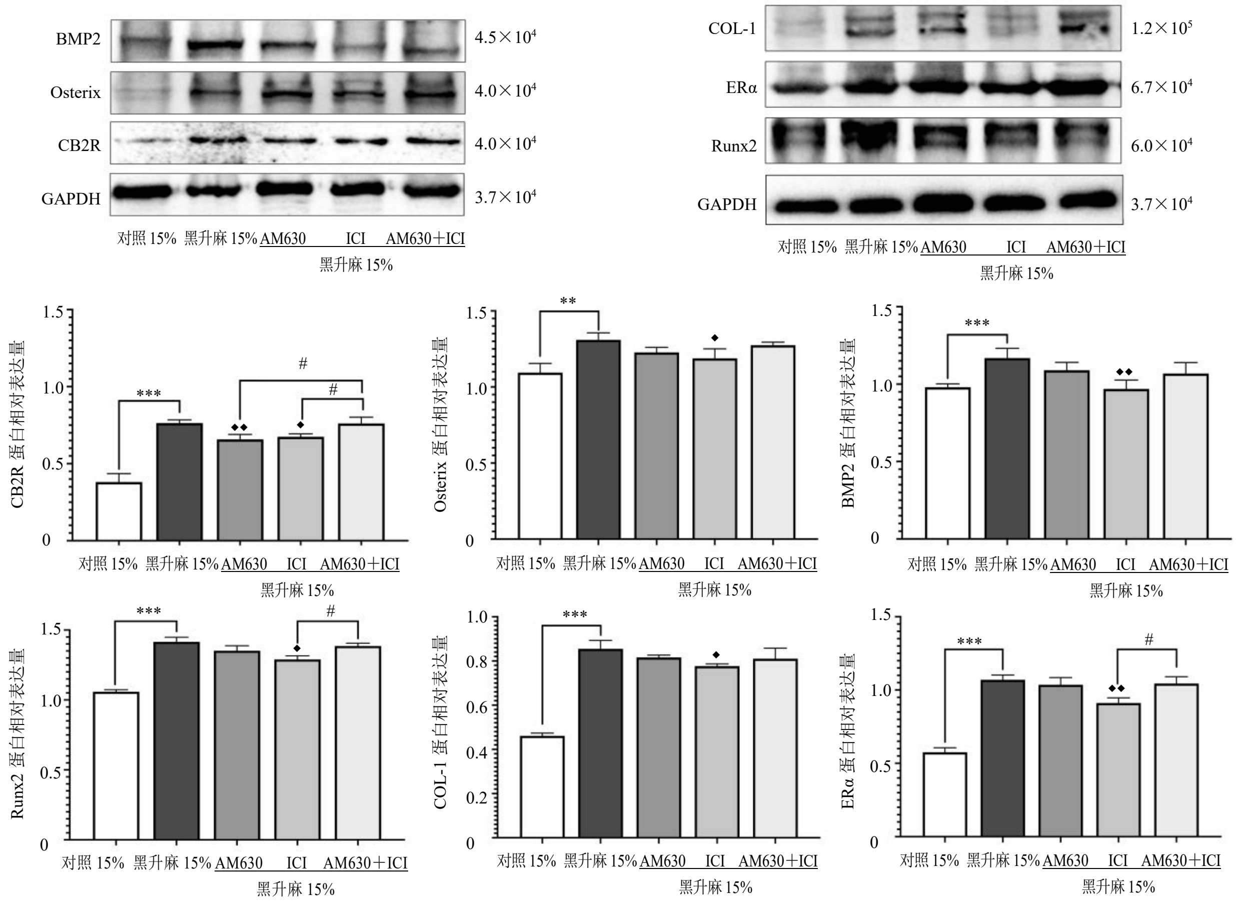


图 6 黑升麻含药血清对成骨细胞 CB2R 与 ERα 及骨形成相关蛋白表达影响及 AM630 和 ICI 的逆转作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of black cohosh medicated serum on expressions of CB2R, ER-α and bone formation-related proteins in osteoblast and reversal effects of AM630 和 ICI ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

目前，骨质疏松症的治疗药物如雌激素、双磷酸盐、甲状旁腺素等均存在一定程度的不良反应。中药和天然药物均有不良反应小、可长期服用等特点，在骨质疏松症的防治上具有明显的优势[13-14]。动物实验研究表明升麻和黑升麻提取物可显著减少去卵巢骨质疏松大鼠的骨丢失[15-16]。黑升麻在欧美长期用于防治更年期综合征和骨质疏松症。本研究发现升麻与黑升麻含药血清可显著增加成骨细胞的增殖活性、ALP 活性、骨矿化结节形成及成骨细胞 BMP2 和 Runx2 等关键蛋白的表达，显示出确切的促进成骨细胞骨形成的作用。升麻含药血清对成骨细胞功能的促进作用可被CB2R反向激动剂AM630或 ERα 抑制剂 ICI 所逆转，表明升麻含药血清可能通过激活 CB2R 与 ERα 双靶点发挥调控骨代谢的作用。黑升麻含药血清对成骨细胞功能的促进作用仅可被 ERα 抑制剂 ICI 逆转，CB2R 反向激动剂 AM630 对黑升麻含药血清促进成骨细胞功能的作用没有显著影响，表明黑升麻仅通过激活 ERα 促进成骨细胞的骨形成。这些结果可为升麻和黑升麻临床用于防治骨质疏松症提供科学的依据。

成骨细胞的分化和骨形成在维持骨重塑平衡和骨量方面起着关键作用。成骨细胞是参与骨形成的关键效应细胞，负责骨基质的合成、分泌和矿化，并完成骨重建。BMP 在未分化间充质细胞向成骨细胞的分化中起关键作用，Runx2 和 Osterix 是成骨细胞分化和骨形成所需的转录因子[17]。MC3T3-E1 细胞系是小鼠成骨前体细胞系，该细胞系在体外经诱导可分化为成骨模型，常用于研究药物对成骨细胞增殖和分化影响的研究。本实验观察升麻和黑升麻含药血清对 MC3T3-E1 的增殖、分化、矿化及关键蛋白表达的影响，发现升麻和黑升麻含药血清能显著促进成骨细胞的增殖、ALP 的活性、骨矿化结节的形成及骨形成关键蛋白的表达，具有抗骨质疏松症的作用。在成骨细胞增殖研究中，发现含药血清干预成骨细胞 24、48、72 h 中，仅在 48 h 有显著的

增殖作用，在24、72 h增殖效果不显著，可能是因为药物干预 24 h 后，药效作用于成骨细胞时间较短，未有显著增殖；药物干预72 h后增殖效果不显著，可能是因为成骨细胞在给药48 h后达到一定程度增殖，所以对照组与给药处理未显示出差别。

CB2R 可在成骨细胞上表达，激活成骨细胞 CB2R 的表达，可增加成骨细胞的骨形成作用[18]。成骨细胞 CB2R 的表达增加，可激活 BMP/Wnt/β-catenin 通路，增加 Runx2 和 BMP2 的表达，进而促进成骨细胞的增殖、ALP 活性和骨基质矿化。本研究发现升麻与黑升麻含药血清作用于成骨细胞后，可促进成骨细胞增殖、ALP 活性和骨矿化结节形成及 Osterix、BMP2、Runx2 及 COL-1 的表达，CB2R 反向激动剂 AM630 可以逆转升麻含药血清对成骨细胞的作用，而不能逆转黑升麻含药血清的作用，表明升麻含药血清通过激活 CB2R 促进骨形成相关蛋白的表达调控成骨细胞功能，而黑升麻则可能不是通过直接激活 CB2R 发挥促进成骨细胞骨形成作用的。

ERα 为成骨细胞上调控骨代谢的关键靶点，雌激素通过 ERα 在维持骨骼稳态和防治绝经后骨质疏松症中发挥着重要作用。临床上治疗骨质疏松症的药物如戊酸雌二醇、他莫昔芬和雷诺昔芬等选择性雌激素受体调节剂均以 ERα 为靶点发挥调控骨代谢作用[19]。本研究发现升麻与黑升麻含药血清对成骨细胞功能的促进作用可被雌激素受体拮抗剂 ICI 所逆转，显示升麻和黑升麻可通过 ERα 调控成骨细胞的功能。然而，对 ERα 具有激动活性的药物常可引起乳腺癌、子宫内膜癌及心血管疾病等不良反应[20-22]，因此，后期需要进一步评价升麻和黑升麻用于骨质疏松症防治可能产生的相关不良反应。

升麻和欧美常用的天然药物黑升麻均来源于毛茛科升麻属植物，均具有三萜及苷类、酚酸类、色酮类、生物碱、含氮类等化合物[23]。本研究鉴定了升麻提取物中三萜及苷类 8 个、酚酸类 1 个、色酮类 2 个；天然药物黑升麻中三萜及苷类 8 个、酚酸类 3 个、生物碱类 1 个。其中共有成分 3 种，分别为酚酸类成分升麻消旋体 A、三萜及苷类成分 7,8-二羟基升麻醇和 2′-*O*-acetyl cimicifugoside H-1。升麻中三萜及其苷类主要为升麻苷 H-1，其质量分数为 0.53%～1.09%[24]；酚酸类以咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸为主，质量分数分别为 0.57%～1.75%、0.22%～1.79%、12.18%[25]；色酮类以升麻素为主，质量分数为 0.73%～5.81%[24]。天然药物黑升麻胶囊内容物的主要成分为三萜及其苷类成分，其质量分数为 2.5%。本研究发现升麻可能通过激活 CB2R 与 ERα 发挥促进成骨细胞增殖、分化和骨基质矿化的作用，表明升麻含有 CB2R 和 ERα 激动剂类化学成分；但黑升麻可能仅通过激活 ERα 发挥促进成骨细胞增殖、分化和骨基质矿化的作用。因此，后续有必要深入挖掘升麻和黑升麻对 CB2R 和 ERα 有激动作用的化学成分，明确其结构特征，为进一步的升麻和黑升麻调控骨代谢的机制阐明及新型抗骨质疏松症先导化合物的发现奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Aspray T J, Hill T R. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476.

[2] Kim J M, Lin C J, Stavre Z, *et al*. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2073.

[3] Xu A H, Yang Y, Shao Y, *et al*. Activation of cannabinoid receptor type 2-induced osteogenic differentiation involves autophagy induction and p62-mediated Nrf2 deactivation [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 9.

[4] Apostu D, Lucaciu O, Mester A, *et al*. Cannabinoids and bone regeneration [J]. *Drug Metab Rev*, 2019, 51(1): 65-75.

[5] Franks L N, Ford B M, Fujiwara T, *et al*. The tamoxifen derivative ridaifen-B is a high affinity selective CB2 receptor inverse agonist exhibiting anti-inflammatory and anti-osteoclastogenic effects [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 353: 31-42.

[6] Sun Y X, Xu A H, Yang Y, *et al*. Activation of cannabinoid receptor 2 enhances osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 874982.

[7] Tian F, Yang H T, Huang T, *et al*. Involvement of CB2 signalling pathway in the development of osteoporosis by regulating the proliferation and differentiation of hBMSCs [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2426-2435.

[8] 陈李乙, 李佳欣, 张美晴, 等. 升麻药材化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1685-1704.

[9] 李玥锴, 李钦琳, 韩凌, 等. 基于网络药理学的升麻治疗乳腺癌作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 642-651.

[10] Castelo-Branco C, Gambacciani M, Cano A, *et al*. Review & meta-analysis: Isopropanolic black cohosh extract iCR for menopausal symptoms - an update on the evidence [J].

Climacteric, 2021, 24(2): 109-119.

[11] Qin Z Y, Dong Z Y, Liu J L, *et al*. A preliminary study on the effects of black cohosh preparations on bone metabolism of rat models with GnRH-a-induced peri-menopausal symptoms [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 854345.

[12] Miao L Y, Chu T T H, Li P, *et al*. *Cimicifuga heracleifolia* is therapeutically similar to black cohosh in relieving menopausal symptoms: Evidence from pharmacological and metabolomics studies [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(6): 435-445.

[13] Martiniakova M, Babikova M, Omelka R. Pharmacological agents and natural compounds: Available treatments for osteoporosis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2020, 71(3): 307-320.

[14] Zhuo Y, Li M, Jiang Q Y, *et al*. Evolving roles of natural terpenoids from traditional Chinese medicine in the treatment of osteoporosis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 901545.

[15] Ahn B S, Yang M, Jang H, *et al*. Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Cimicifuga heracleifolia* in female mice [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 663-668.

[16] Chen J M, Wang H H, Dong Z Y, *et al*. GnRH-a-induced perimenopausal rat modeling and black cohosh preparations' effect on rat’s reproductive endocrine [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 683552.

[17] Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast differentiation and signaling: Established concepts and emerging topics [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6651.

[18] Rossi F, Tortora C, Punzo F, *et al*. The endocannabinoid/endovanilloid system in bone: From osteoporosis to osteosarcoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1919.

[19] Lee Y S, Gupta R, Kwon J T, *et al*. Effect of a bisphosphonate and selective estrogen receptor modulator on bone remodeling in streptozotocin-induced diabetes and ovariectomized rat model [J]. *Spine J*, 2018, 18(10): 1877-1887.

[20] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in premenopausal women with oestrogen receptor-positive early-stage breast cancer treated with ovarian suppression: A patient-level meta-analysis of 7030 women from four randomised trials [J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(3): 382-392.

[21] Machek S B, Cardaci T D, Wilburn D T, *et al*. Considerations, possible contraindications, and potential mechanisms for deleterious effect in recreational and athletic use of selective androgen receptor modulators (SARMs) in lieu of anabolic androgenic steroids: A narrative review [J]. *Steroids*, 2020, 164: 108753.

[22] Liang B, Burley G, Lin S, *et al*. Osteoporosis pathogenesis and treatment: Existing and emerging avenues [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 72.

[23] Salari S, Amiri M S, Ramezani M, *et al*. Ethnobotany, phytochemistry, traditional and modern uses of *Actaea racemosa* L. (black cohosh): A review [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1308: 403-449.

[24] 姚梅芬, 王岳峰, 李展, 等. 反相高效液相色谱法测定升麻药材中升麻苷 H-1 的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 696-699.

[25] 姜柔齐, 常丽静, 李明月, 等. 不同基原升麻饮片 HPLC 指纹图谱研究及 4 个成分含量测定 [J]. 中药材, 2021, 44(5): 1161-1167.

[责任编辑　李亚楠]