·实验研究·

补肾健脾方干预大鼠成骨细胞增殖和凋亡的实验研究

鲍荣华[1△] 周虹[1] 李旭云[1] 孔令成[1]

［摘要］ **目的**：通过对补肾健脾方调控细胞凋亡途径干预大鼠成骨细胞增殖和凋亡的实验研究，探讨其治疗骨质疏松症的作用机制。**方法**：15 只 6 个月龄 SD 雌性大鼠，随机分为补肾健脾方组、阿伦膦酸钠组、空白对照组（等体积生理盐水），每组 5 只，连续给药 12 d，腹主动脉采血收集血清备用。细胞实验分为 3 组：空白对照组，补肾健脾方含药血清组和阿伦膦酸钠含药血清组。运用 MTS 测定成骨细胞增殖，实时荧光定量聚合酶链式反应法（qRT-PCR）测定 Caspase-3、ERO1、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达量。**结果**：MTS 测定结果显示 48 h 和 72 h 补肾健脾方含药血清均对大鼠成骨细胞的增殖无明显的影响，差异无统计学意义（$P>0.05$）。qRT-PCR 结果显示补肾健脾方含药血清相比于空白对照组能明显降低 Caspase-3（$P<0.01$）和 Bax（$P<0.05$）基因表达水平，提高 Bcl-2 mRNA 表达量，差异有统计学意义（$P<0.01$），但阿伦膦酸钠含药血清组 Caspase-3 和 Bax 基因下调更明显。**结论**：补肾健脾方含药血清能减少成骨细胞的凋亡，可能是通过 Caspase-3/Bcl-2 途径实现的。补肾健脾方对治疗骨质疏松症有一定的作用。

［关键词］ 补肾健脾方；成骨细胞；细胞凋亡；骨质疏松症

［中图分类号］ R-33 **［文献标志码］** A **［文章编号］**1005-0205(2021)10-0009-04

Efficacy of Tonifying Kidney and Spleen Compound on Proliferation and Apoptosis of Rat Osteoblasts

BAO Ronghua[1△] *ZHOU Hong*[1] *LI Xuyun*[1] *KONG Lingcheng*[1]

[1]Fuyang Traditional Chinese Medicine Orthopedics Hospital, Hangzhou 311400, China.

Abstract **Objective**: To observe the efficacy of Tonifying Kidney and Spleen compound on the proliferation and apoptosis of rat osteoblasts, and to explore its mechanism on treatment of osteoporosis. **Methods**: Fifteen 6-month-old female SD rats were randomly divided into three groups: the Tonifying Kidney and Spleen compound group, the Alendronate sodium group, and the blank control group (equal volume of normal saline), with 5 rats in each group. The rats were treated for 12 d continuously. Blood samples were collected from abdominal aorta and serum was collected for reserve. The cells were divided into three groups: blank control group, Tonifying Kidney and Spleen compound group and Alendronate sodium group. The proliferation of osteoblasts was measured by MTS, and the mRNA expression of Caspase-3, ERO1, Bcl2 associated x (Bax) and B-cell lymphama-2 (Bcl-2) were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results**: The MTS assay results showed that Tonifying Kidney and Spleen compound group had no significant efficacy on the proliferation of rat osteoblasts at 48 h and 72 h ($P>0.05$). Compared with the negative control group, the results of qRT-PCR displayed that Tonifying Kidney and Spleen compound significantly reduced the expression of Caspase-3 ($P<0.01$) and Bax ($P<0.05$), and increased the expression of Bcl-2 ($P<0.01$), but the expression of Caspase-3 and Bax in Alendronate sodium group were more obvious. **Conclusion**: The serum containing Tonifying Kidney and Spleen compound can reduce the apoptosis of osteoblasts, which may be achieved by Caspase-3/Bcl-2 pathway. It is suggested that Tonifying Kidney and Spleen compound may be a potential drug target for the treatment of osteoporosis.

Keywords: Tonifying Kidney and Spleen compound; osteoblasts; apoptosis; osteoporosis

细胞衰老的过程是内质网应激反应持续的过程。内质网通过激活非折叠蛋白反应以保护由应激所引起

基金项目：浙江省（杭州市）科技计划项目（20181228Y149）

[1] 杭州市富阳中医骨伤医院（杭州，311400）

△通信作者 E-mail：13647516@qq.com

的细胞损伤,减轻内质网负担,恢复细胞功能,但如果应激刺激过于强烈、持久,内环境紊乱无法纠正,则相应凋亡机制被激活并诱导细胞发生凋亡。成骨细胞作为骨质疏松症发生的关键细胞,它不仅参与骨形成,而且还参与破骨细胞性骨吸收的调节,因此笔者认为调控成骨细胞内质网的应激反应,对防治骨质疏松症有重要的意义。目前的研究[1-2]已证明补肾中药复方对骨代谢既可抑制骨吸收,又可促进骨形成,缩短再造周期,提高骨生物力学性能,改善骨质量。本院根据右归饮(《景岳全书》)加减化裁而来的补肾健脾方,在临床实践中具有较好的治疗骨质疏松症的作用。但其对成骨细胞的作用机制不明确,为了弄清该方对大鼠成骨细胞凋亡的影响及其作用机制,本研究采用实时荧光定量聚合酶链式反应法,检测 Caspase-3、Bax、ERO1 和 Bcl-2 的表达量,并分析三者的关系,为研究中药复方治疗骨质疏松症提供客观量化的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 月龄 SD 大鼠 15 只,雌性,由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号 44005800010719。

1.2 实验药物及试剂

补肾健脾方由肉苁蓉、菟丝子、淫羊藿等 10 味中草药组成,据临床用药剂量及新药研究中动物用药剂量要求,该方的提取药物,含生药量 1.65 g/mL。阿仑膦酸钠片,由默沙东公司提供(国药准字 J20080073,批号为 H20130241)。DMEM 培养基(Lot1896968)、胎牛血清(FBS;Lot1755919)、Ⅱ型胶原蛋白酶(Lot1934492)、胰蛋白酶溶液(Trypsin;Lot1851925)来自澳大利亚 Thermo Fisher 公司。青霉素和链霉素(P/S;Lot076M4762V)来自美国 Sigma-aldrich 公司。Trizol 裂解液(Lot180506)来自美国 Thermo Fisher 公司。RNA 提取试剂盒(Cat9767)来自美国 Takara 生物有限公司。Oligo-dT 等 RNA 逆转录试剂、PCR 反应试剂盒(Lot0000256582)、Tetrazolium salt (Lotab146310)来自澳大利亚Promega公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、干预及取样 15 只 SD 大鼠,随机分为补肾健脾方组、阿伦膦酸钠组、空白对照组(等体积生理盐水),每组 5 只。按照人-大鼠体表面积比值折算大鼠等效给药剂量,计算得出补肾健脾方组给药浓度为 5 mg/kg,阿伦膦酸钠组给药浓度为 1 mg/kg,空白对照组给予同等体积的生理盐水。1 次/d,连续 12 d,最后一次给药后 1 h 处死,各组动物在 1%水合氯醛 3 mL/kg 麻醉下,无菌条件下腹主动脉采血,4 ℃冰箱静置待全血凝固后(约 4 h),3 500 r/min离心 15 min,取上清。同组混合,56 ℃灭活 30 min,用 0.22 μm针头微孔滤器过滤除菌,-20 ℃冰箱保存备用。

1.3.2 大鼠成骨细胞的提取、培养及成骨分化 将 2 只新生 24 h 内的 SD 大鼠脱颈处死,在 70%酒精中浸泡 5~10 min,无菌环境下取大鼠颅骨,在 D-Hanks 平衡溶液中去除附着在骨表面的血管及结缔组织,将颅骨剪碎,并在无血清的 DMEM 中用 1 mg/mL 胶原胰酶消化在 37 ℃细胞培养箱中消化 5 次,分别持续 30 min(第 1 组分),25 min(第 2 组分),25 min(第 3 组分),20 min(第 4 组分)和 15 min(第 5 组分)。将第 1 组分和第 2 组分混合,第 3,4,5 组分混合,150 r/min 离心 10 min,用 D-Hanks 液洗涤两次,重悬细胞于 DMEM 完全培养基中(含 10% 胎牛血清,1%双抗),将细胞接种于细胞培养瓶,置于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱中培养。48 h 换液,弃去悬浮细胞,每隔 2 d 换液 1 次。待细胞融合率达到 90%以上时,加入成骨诱导培养基培养。成骨诱导培养基各成分比例为 100 nmol/L 的地塞米松,50 μg/mL 的维生素 C 膦酸酯,10 mmol/L 的 β-甘油膦酸钠。

1.3.3 MTS 检测补肾健脾方对大鼠成骨细胞毒性的影响 根据 MTS 试剂盒测定补肾健脾方对大鼠成骨细胞的影响。将成骨细胞以 3 000 个细胞/孔接种在 96 孔板上并过夜。后将(0.0,0.1,0.5,1.0,2.5,5.0 μmol/L)的大鼠补肾健脾方含药血清加入成骨细胞一起孵育 48 h 和 72 h,再将试剂 10 μL 加入 96 孔中,在酶标仪上于 490 nm 波长处测定各孔吸光度。

1.3.4 qRT-PCR 实验 将成骨细胞按每孔 5×10^4 个细胞的密度种入 6 孔板中,长至 80%时则更换成骨诱导培养基,加入大鼠补肾健脾方含药血清,大鼠阿伦膦酸钠含药血清,空白对照组加入相应体积的 PBS。每 2 d 更换 1 次培养基或分化液,至第 7 天使用 PBS 清洗各组细胞 1 次,随后进行 qRT-PCR 实验。每孔加入 1 mL Trizol 裂解液,冰上裂解 20 min,加入 200 μL氯仿,充分混匀,室温放置 10 min;4 ℃、12 000 r/min离心 15 min,吸取上清水相,转至新的 EP 管中,随后使用 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA,操作流程参照试剂盒使用说明。以 Oligo-dT 等试剂为反转录引物,以提取的总 RNA 为模版,在酶的催化下特异反转录为 cDNA。RT-PCR 采用 SYBR Green 和表 1 的特定引物。反应条件:预变性 95 ℃ 10 s,变性 95 ℃ 5 s,退火、延伸 60 ℃ 31 s,共 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔,并采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$法进行定量分析。RNA 相对表达量参照内参基因 Hprt。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件对所得数据进行统计处理,所有的实验至少重复 3 次。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表

表 1 qRT-PCR 实验引物序列

引物	上游	下游
Caspase-3	5′-TGGTTCATCCAGTCGCTTTG-3′	3′-CATTCTGTTGCCACCTTTCG-5′
Bax	5′-CAGGATGCGTCCACCAAGAA-3′	3′-CGTGTCCACGTCAGCAATCA-5
Bcl-2	5′-AGCGTCAAGAGGGAGATGTG-3′	3′-TTCCACAAAGGCATCCCAGC-5
ERO1	5′-AGCTTGACATGGACTAGTAG-3′	3′-ACTGCTGGCTGGCAAAGTAG-5
Hprt	5′-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3′	3′-TGGCCTCCCATCTCCTTCAT-5′

示。多组独立样本间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTS 细胞毒性检测

细胞毒性的检测结果表明，补肾健脾复方含药血清(0.0，0.1，0.5，1.0，2.5，5.0 μmol/L)在 48 h 和 72 h对成骨细胞未见明显毒性作用(见图 1)，差异不明显，无统计学意义。

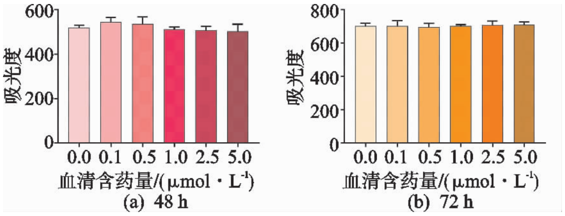

图 1 补肾健脾复方中药 MTS 毒性实验结果

2.2 补肾健脾方含药血清抑制成骨细胞凋亡的基因表达

通过 qRT-PCR 检测，发现相比于空白对照组，补肾健脾方含药血清组和阿仑膦酸钠含药血清组均能明显降低大鼠成骨细胞中 Caspase-3 和 Bax 基因表达的水平，提高 Bcl-2 基因表达的水平(见表 2)，其中阿仑膦酸钠含药血清组抑制大鼠成骨细胞凋亡基因表达比补肾健脾方含药血清组强。而 ERO1 在各组的变化不明显，差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

骨质疏松症可能导致严重的骨折和残疾，并与年龄密切相关，但任何原因所致的峰值骨量(BMD)下降、骨吸收增加和形成不足都可引起骨量降低和股脆性增加[3-4]。越来越多的证据表明，破骨细胞和成骨细胞在骨形成和骨吸收过程中的不平衡是导致骨质疏松症的重要原因[5-6]。值得注意的是，骨形成依赖于成骨细胞的增殖和分化，李淑梅等[7]研究表明淫羊藿甙能提高成骨细胞中 ALP 和 Col Ⅰ mRNA 的表达水平，从而促进成骨细胞增殖与分化，并通过提高 BMP-2 的表达水平来促进成骨细胞 Osterix 的基因表达，从而诱导骨形成，发挥抗骨质疏松作用。现代医学证实诱导成骨细胞的凋亡会进一步导致骨破坏[8]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键酶，该酶属于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族，是六大蛋白酶家族之一[9]。BCL-2 蛋白家族控制细胞凋亡的内在途径，BAX 的活性受到 BCL-2 家族内外复杂蛋白网络的精确控制。Bax 通过渗透线粒体外膜和随后启动 Caspase 级联，使细胞进入程序性死亡[10]。ERO1 主要参与维持 ERS 内氧化状态，ERO1 激活过多就会导致是细胞内活性氧簇(ROS)的增多，从而诱导细胞的凋亡加速。

表 2 补肾健脾方组和阿仑膦酸钠组对大鼠成骨细胞凋亡基因表达的影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-3 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	ERO1 mRNA
空白对照组	1.02±0.12	1.00±0.10	1.01±0.09	1.18±0.14
补肾健脾方组	0.63±0.07 2)	0.76±0.03 1)	1.38±0.03 2)	1.01±0.09
阿仑膦酸钠组	0.42±0.01 3)	0.66±0.02 2)	2.08±0.03 3)	0.99±0.11
F	28.65	17.81	172.4	21.29
P	0.000 9	0.003	<0.000 1	>0.05

注：相比于空白对照组，1)$P<0.01$，2)$P<0.001$，3)$P<0.000\ 1$。

中医认为“肾藏精，生髓，主骨”，是肾中精气促进机体生长发育功能的具体体现，骨的生长发育依赖肾中精气的滋养与推动，肾中精气充盈则骨髓生化有源，骨才能得到髓之滋养[11]。并认为骨质疏松性骨折愈合就是“瘀去、新生、骨合”的过程，且在“肾主骨”理论的指导下进行组方用药。因此，补肾中药已被用作治疗骨质疏松症的常用药物，有研究[12-13]证明以“补肾健脾法”拟定的补肾健脾方对骨代谢有双向作用，既可抑制骨吸收，又可促进骨形成，缩短再造周期，提高骨生物力学性能，改善骨的质量，是一个较理想的治疗骨质疏松症的药物。林巧璇等[14]观察补肾活血汤对骨质疏松性椎体压缩性骨折(OVCF)经皮椎体后凸成形术(PKP)后患者疼痛和血清骨代谢的改善作用，认为补肾活血汤能缓解 OVCF 术后患者疼痛，提高日常生活能力，促进骨形成，减少骨吸收，增加骨密度，可能降低 OVCF 术后患者再发骨折的风险。秦梦等[15]观察右归丸、淫羊藿、淫羊藿苷含药血清对成骨细胞增殖及 Wnt/β-catenin 信号通路的作用，发现右归丸、淫羊藿、

淫羊藿苷三者均能促进体外培养的大鼠成骨细胞的增殖，以右归丸作用最显著；右归丸可显著促进 wnt3a、wnt7b、β-catenin 蛋白的表达。而本研究中的中药复方是根据右归饮加减化裁而来，方中由肉苁蓉、菟丝子、淫羊藿等 10 味中草药组成，该方从骨质疏松症的肾虚、脾虚等病因病机立法，全方诸药共奏补肾壮骨、健脾益气、活血化瘀之功效。经过临床的实践应用，认为对骨质疏松症具有较好的治疗作用，然而，该方对成骨细胞的影响及其作为治疗骨质疏松症的新化合物的潜力还有待进一步研究。

在本研究中，数据显示补肾健脾方能显著下调 Bax 基因的表达，降低 Caspase-3 的活性，而 Bcl-2 的表达在大鼠成骨细胞中上调。但是 ERO1 的表达不显著，笔者分析有可能补肾健脾方没有通过由 ERO1 所介导的内质网途径，而对 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达显著，有可能是通过 Caspases 途径进行细胞凋亡的调控。基于上述结果，笔者认为补肾健脾方减少大鼠成骨细胞的凋亡，而且是通过 Caspase-3/Bcl-2 途径进行调控。而且本实验利用 MTS 法，通过观察补肾健脾方对大鼠成骨细胞活性的影响，证实补肾健脾方对大鼠成骨细胞无毒性作用。

综上所述，补肾健脾方可在一定程度上抑制大鼠成骨细胞的凋亡，而且是通过 Caspase-3/Bcl-2 途径进行调控，是治疗骨质疏松症的潜在靶向药物。

参考文献

[1] 余丽娟，罗毅文，熊云谱，等. 补肾活血汤含药血清对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 广州中医药大学学报，2021，38(2)：346-351.

[2] 王大伟，郑洪新. 补肾中药对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2019，25(2)：268-271.

[3] LIN X，XIONG D，PENG Y Q，et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China：current perspectives[J]. Clin Interv Aging，2015，10：1017-1033.

[4] 蔡东哲，惠礽华，孟祥奇. 骨质疏松症的病因病机研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志，2012，20(12)：76-78.

[5] KAUR M，NAGPAL M，SINGH M. Osteoblast-n-Osteoclast：making headway to osteoporosis treatment[J]. Curr Drug Targets，2020，21(16)：1640-1651.

[6] 施彦龙，李应福，谢兴文，等. BMP/Smads、OPG/RANK/RANKL 信号通路与骨质疏松关系的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志，2020，26(4)：600-604.

[7] 李淑梅，杨兴义，陆咏，等. 淫羊藿甙促进体外培养成骨细胞骨成形蛋白-2 及 Osterix mRNA 表达[J]. 中华内分泌代谢杂志，2013，29(11)：981-985.

[8] LI P F，WANG Y M，LIU X D，et al. A typical antipsychotics induce human osteoblasts apoptosis via Wnt/β-catenin signaling[J]. BMC Pharmacol Toxicol，2019，20(1)：10.

[9] 于丰铭，徐扬. Caspase-3 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报，2020，42(11)：2072-2078.

[10] 侯沁莲，董辉，杜利清. Bax 蛋白结构及相关共晶结构研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志，2018，41(2)：187-191.

[11] 翁绳健，吴立忠，李炜明，等. 肾虚与骨质疏松症关联性研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志，2018，26(12)：85-88.

[12] 李颖，黄宏兴，庄洪，等. 中药骨康对去势大鼠作用机制度实验研究[J]. 中华中医药杂志，2009，24(2)：160-163.

[13] 钟建春，谢兴文，李鼎鹏，等. 补肾方药治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志，2021，29(3)：85-88.

[14] 林巧璇，刘晶，卢莉铭，等. 补肾活血汤对骨质疏松性椎体压缩性骨折 PKP 术后患者疼痛和骨代谢的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志，2021，29(3)：21-26.

[15] 秦梦，陈元川，郭海玲，等. 补肾阳中药对成骨细胞 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志，2021，29(5)：9-11.

（收稿日期：2021-01-19）