

## • 实验研究 •

## 积雪草苷对脂多糖诱导的成骨细胞增殖和分化的影响

赵强<sup>1</sup> 肖波<sup>1</sup> 陈天逸<sup>1</sup> 赵明<sup>1</sup> 杨国奇<sup>1</sup> 徐银之<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨积雪草苷(AS)对脂多糖(LPS)诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化的影响。方法:先用 2 mg/L 脂多糖处理 MC3T3-E1 成骨细胞,再用 5,10,20,40,80  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷处理脂多糖诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞,检测细胞活性,筛选最佳药物浓度;将 MC3T3-E1 成骨细胞分为对照组(Control 组)、脂多糖组(LPS 组)、积雪草苷低、中、高浓度组(AS-L、AS-M、AS-H 组)、积雪草苷高浓度+CXCR4 抑制剂 AMD3100 组(AS-H+AMD3100 组);Hoechst 33258 染色观察细胞核形态;碱性磷酸酶(ALP)染色及碱性磷酸酶活性检测细胞成骨能力;茜素红染色法检测钙结节形成情况;免疫印迹检测分化相关标志物 I 型胶原(COL-I)、骨桥蛋白(OPN)、骨钙素(OCN)及 SDF-1、CXCR4 表达情况。结果:筛选出 10,20,40  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷为 AS-L、AS-M、AS-H 组药物浓度进行后续实验;与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染,呈明显细胞凋亡形态,碱性磷酸酶活性、钙结节形成、COL-I、OPN、OCN、SDF-1、CXCR4 蛋白表达显著下降( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染逐渐减轻,凋亡形态细胞逐渐减少,碱性磷酸酶活性、钙结节形成、COL-I、OPN、OCN、SDF-1、CXCR4 蛋白表达依次显著上升( $P<0.05$ );与 AS-H 组比较,AS-H+AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染加重,凋亡形态细胞明显增多,碱性磷酸酶活性、钙结节形成、COL-I、OPN、OCN、SDF-1、CXCR4 蛋白表达显著下降( $P<0.05$ )。结论:积雪草苷可通过激活 SDF-1/CXCR4 信号通路促进 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖与分化。

**[关键词]** 积雪草苷;脂多糖;成骨细胞;增殖;分化

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)07-0024-05

**DOI:** 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240704

## Efficacy of Asiaticoside on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts Induced by Lipopolysaccharide

ZHAO Qiang<sup>1</sup> XIAO Bo<sup>1</sup> CHEN Tianyi<sup>1</sup> ZHAO Ming<sup>1</sup> YANG Guoqi<sup>1</sup> XU Yinshi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pidun District People's Hospital in Chengdu, Chengdu 611730, China.

**Abstract** **Objective:** To investigate the efficacy of asiaticoside (AS) on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** MC3T3-E1 osteoblasts were first treated with 2 mg/L LPS, and then LPS induced MC3T3-E1 osteoblasts were treated with 5,10,20,40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  asiaticoside. Cell activity was measured and the optimal drug concentration was selected. MC3T3-E1 osteoblasts were separated into control group, lipopolysaccharide group (LPS group), low, medium, and high concentration asiaticoside groups (AS-L, AS-M, AS-H group), and high concentration asiaticoside + CXCR4 inhibitor AMD3100 group (AS-H + AMD3100 group). Hoechst 33258 staining was applied to observe the morphology of the nucleus; alkaline phosphatase (ALP) staining and ALP activity were applied to detect the osteogenic ability of cells; alizarin red staining method was applied to detect the formation of calcium nodules; immunoblotting was applied to detect the expression of differentiation related biomarkers such as collagen type I (COL-I), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), and SDF-1 and CXCR4. **Results:** 10, 20, and 40  $\mu\text{mol/L}$  AS were selected as drug concentrations for AS-L, AS-M, and AS-H groups in subsequent experiments; compared with the control group, the nucleus of MC3T3-E1 osteoblasts in the LPS group showed pyknosis and deep staining, showing an obvious apoptotic morphology, the ALP activity, calcium nodule formation, the expression of COL-I, OPN, OCN, SDF-1, CXCR4 proteins were greatly decreased ( $P<0.05$ ). The nuclear pyknosis and deep staining of MC3T3-E1 osteoblasts in

<sup>1</sup> 成都市郫都区人民医院(成都, 611730)

AS-L, AS-M, and AS-H groups gradually decreased compared with the LPS group, the number of apoptotic cells gradually decreased, the ALP activity, calcium nodule formation, the expression of COL- I , OPN, OCN, SDF-1, CXCR4 proteins were obviously increased in sequence ( $P < 0.05$ ). The nuclei of MC3T3-E1 osteoblasts in the AS-H + AMD3100 group showed increased pyknosis and deep staining compared with the AS-H group, the apoptotic morphological cells obviously increased, the ALP activity, calcium nodule formation, the expression of COL-I, OPN, OCN, SDF-1, and CXCR4 proteins were greatly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Asiaticoside can promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts by activating SDF-1/CXCR4 signaling pathway.

**Keywords:** asiaticoside; lipopolysaccharides; osteoblasts; proliferation; differentiation

骨缺损可能对机体的形态及功能产生影响,严重影响患者的心理和身体健康,而骨质疏松对于骨缺损修复的影响是一大难题<sup>[1]</sup>。目前骨缺损修复方式均存在自体骨来源有限、免疫排斥、传播疾病的风险及生物活性低等问题<sup>[2]</sup>。积雪草苷(AS)提取自中药积雪草,可促进骨髓间充质干细胞成骨分化<sup>[3]</sup>。SDF-1 广泛表达于各种细胞,其与 CXCR4 受体结合可以促进骨髓间充质干细胞的增殖、分化<sup>[4]</sup>。本研究主要探索积雪草苷对脂多糖(LPS)诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化及 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细胞

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞购于上海赛百慷生物公司。

### 1.2 主要药物

积雪草苷标准品( $\geq 98\%$ , SA8540)和脂多糖( $\geq 98\%$ , L8880)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 主要试剂与仪器

Hoechst 33258 染色液(C1017)购于上海碧云天公司;碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(LG-TE0003)购于上海羽哂生物公司;茜素红染色试剂盒(CTCC-JD001)购于无锡菩禾生物医药公司;COL-I(ab270993)、骨桥蛋白(OPN, ab218237)、骨钙素(OCN, ab309521)及 SDF-1(ab25117)、CXCR4(ab181020)一抗均购于英国 abcam 公司;SpectraMax iD3 型多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

### 1.4 细胞培养

MC3T3-E1 成骨细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,并置于 37℃ 下 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,将细胞培养至对数生长期用于后续实验。

### 1.5 细胞活性实验

将 MC3T3-E1 成骨细胞接种于 96 孔板,成骨分化诱导培养基培养 24 h,用 2 mg/L 脂多糖<sup>[5]</sup>处理 MC3T3-E1 成骨细胞 24 h,再用 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷处理脂多糖诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞 24 h,加入 CCK-8 试剂,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,检测细胞活性。

### 1.6 细胞处理及分组

将 MC3T3-E1 成骨细胞分为对照组(Control 组)、脂多糖组(LPS 组)、积雪草苷低、中、高浓度组(AS-L、AS-M、AS-H 组)、积雪草苷高浓度 + CXCR4 抑制剂 AMD3100 组(AS-H + AMD3100 组)<sup>[6]</sup>。对照组不做任何处理;脂多糖组用 2 mg/L 脂多糖处理 24 h; AS-L、AS-M、AS-H 组用 2 mg/L 脂多糖处理 24 h 后分别用 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷处理 24 h; AS-H + AMD3100 组用 2 mg/L 脂多糖、40  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷及 60  $\mu\text{mol/L}$  AMD3100 依次分别处理 24 h。

### 1.7 指标检测

**1.7.1 Hoechst 33258 染色** 将各组 MC3T3-E1 成骨细胞接种于 96 孔板,37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下在成骨分化诱导培养基培养 12 h,弃去培养基,PBS 冲洗后加入 4% 多聚甲醛固定,加入 Hoechst 33258 染色,PBS 漂洗后荧光显微镜观察细胞核形态。

**1.7.2 碱性磷酸酶活性检测** 将各组细胞接种于 96 孔板成骨分化诱导培养基培养 7 d,弃培养液,并用 PBS 洗涤,一部分加入碱性磷酸酶显色剂避光染色 30 min,光学显微镜观察并拍照。另一部分加入 0.1% Triton X-100 裂解细胞 30 min,反复吹打至细胞完全裂解,收集裂解液,4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。按照碱性磷酸酶活性检测试剂盒说明书进行操作,检测碱性磷酸酶活性。

**1.7.3 茜素红染色** 将各组细胞接种于 96 孔板成骨分化诱导培养基培养 21 d,PBS 漂洗,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,弃固定液,PBS 洗涤,加入茜素红染色液染色 30 min,弃茜素红染液,PBS 洗涤至液体颜色不变红,显微镜下观察钙结节形成并拍照。

**1.7.4 免疫印迹** 将各组细胞接种于 96 孔板中,成骨分化诱导培养基培养 7 d,加入 RIPA 细胞裂解液裂解蛋白,4℃ 下 6 000 r/min 离心 10 min,取上清,检测蛋白浓度。对各组蛋白分别进行凝胶电泳分离、转膜封闭 2 h,分别加入兔抗 COL- I 、OPN、OCN、SDF-1、CXCR4 一抗 4℃ 孵育过夜,随后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育,最后加入 ECL 化学发光液显色,检测 COL- I 、OPN、OCN、SDF-1、CXCR4 蛋白

表达情况。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行统计分析,计量资料符合正态分布以  $\bar{x}\pm s$  形式描述,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- $q$  检验,  $P<0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MC3T3-E1 成骨细胞活性比较

与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞存活率显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,10,20,40,80  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷组 MC3T3-E1 成骨细胞存活率显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );40  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷组与 80  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷组 MC3T3-E1 成骨细胞存活率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),因此选择 10,20,40  $\mu\text{mol/L}$  积雪草苷进行后续实验,见表 1。

2.2 各组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核形态比较

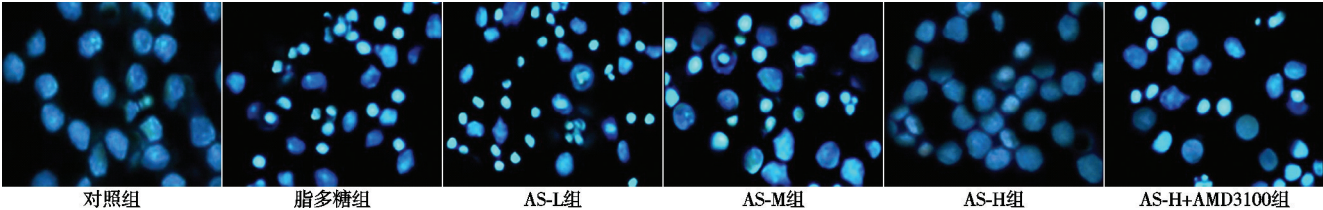


图 1 Hoechst 33258 染色观察各组 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡情况( $\times 200$ )

2.3 各组 MC3T3-E1 成骨细胞碱性磷酸酶活性比较

与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞碱性磷酸酶活性显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨

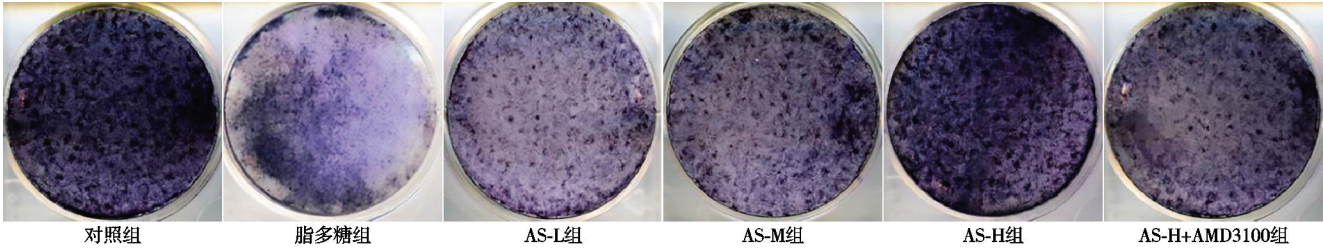


图 2 碱性磷酸酶活性检测各组 MC3T3-E1 成骨细胞分化情况( $\times 10$ )

表 2 各组 MC3T3-E1 成骨细胞碱性磷酸酶活性比较( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

组别	碱性磷酸酶/( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ )
对照组	$7.96\pm0.91$
脂多糖组	$2.03\pm0.26^{1)}$
AS-L 组	$3.52\pm0.42^{2)}$
AS-M 组	$5.27\pm0.59^{2)3)}$
AS-H 组	$7.39\pm0.84^{2)3)4)}$
AS-H+AMD3100 组	$5.44\pm0.63^{5)}$

注:1)与对照组比较,  $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比较,  $P<0.05$ ;3)与 AS-L 组比较,  $P<0.05$ ;4)与 AS-M 组比较,  $P<0.05$ ;5)与 AS-H 组比较,  $P<0.05$ 。

表 1 各组 MC3T3-E1 成骨细胞活性比较( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

组别	细胞存活率/%
对照组	$98.26\pm4.81$
脂多糖组	$46.37\pm2.31^{1)}$
5 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷组	$48.55\pm2.43$
10 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷组	$61.83\pm3.09^{2)}$
20 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷组	$75.69\pm3.78^{2)}$
40 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷组	$91.42\pm4.57^{2)}$
80 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷组	$94.88\pm4.76^{2)}$

注:1)与对照组比较,  $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比较,  $P<0.05$ 。

对照组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核形态完整,染色均匀,呈圆形或卵圆形;与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染,呈明显细胞凋亡形态;与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染逐渐减轻,凋亡形态细胞逐渐减少;与 AS-H 组比较,AS-H + AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞细胞核固缩深染加重,呈细胞凋亡形态细胞明显增多(见图 1)。

细胞碱性磷酸酶活性依次显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 AS-H 组比较,AS-H + AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞碱性磷酸酶活性显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2 和表 2。

2.4 各组 MC3T3-E1 成骨细胞成骨分化比较

与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成依次显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 AS-H 组比较,AS-H + AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3 和表 3。

2.5 免疫印迹检测 MC3T3-E1 成骨细胞 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达

与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达显著下降,差异有统计



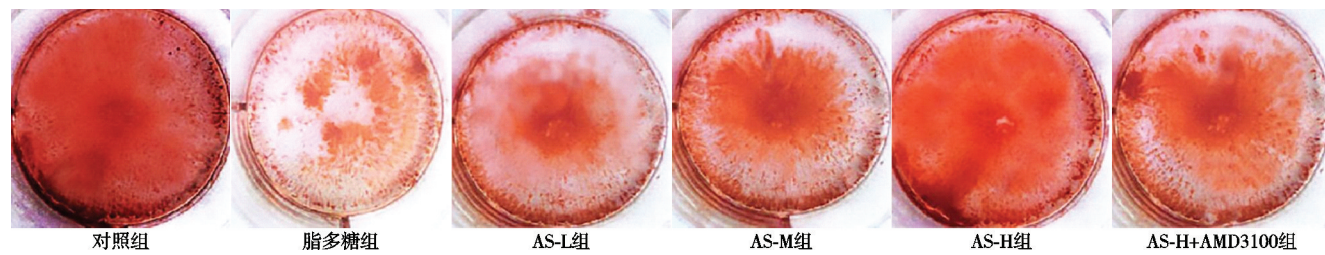


图 3 茜素红染色检测各组 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成情况(×10)

表 3 各组 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成比较(±s)	
组别	钙结节(光密度值)
对照组	0.72±0.07
脂多糖组	0.15±0.02 <sup>1)</sup>
AS-L 组	0.31±0.03 <sup>2)</sup>
AS-M 组	0.48±0.05 <sup>2)3)</sup>
AS-H 组	0.66±0.07 <sup>2)3)4)</sup>
AS-H+AMD3100 组	0.50±0.05 <sup>5)</sup>

注:1)与对照组比较, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比较, $P<0.05$ ;3)与 AS-L 组比较, $P<0.05$ ;4)与 AS-M 组比较, $P<0.05$ ;5)与 AS-H 组比较, $P<0.05$ 。

学意义( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨细胞 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达依次显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );

表 4 各组 MC3T3-E1 成骨细胞 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达比较( $n=6,\bar{x}\pm s$ )

组别	COL-I	OPN	OCN
对照组	0.71±0.07	0.68±0.07	0.82±0.08
脂多糖组	0.21±0.02 <sup>1)</sup>	0.12±0.01 <sup>1)</sup>	0.31±0.03 <sup>1)</sup>
AS-L 组	0.35±0.04 <sup>2)</sup>	0.27±0.03 <sup>2)</sup>	0.45±0.05 <sup>2)</sup>
AS-M 组	0.50±0.05 <sup>2)3)</sup>	0.43±0.04 <sup>2)3)</sup>	0.60±0.06 <sup>2)3)</sup>
AS-H 组	0.66±0.07 <sup>2)3)4)</sup>	0.61±0.06 <sup>2)3)4)</sup>	0.77±0.08 <sup>2)3)4)</sup>
AS-H+AMD3100 组	0.52±0.05 <sup>5)</sup>	0.46±0.05 <sup>5)</sup>	0.62±0.06 <sup>5)</sup>

注:1)与对照组比较, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比较, $P<0.05$ ;3)与 AS-L 组比较, $P<0.05$ ;4)与 AS-M 组比较, $P<0.05$ ;5)与 AS-H 组比较, $P<0.05$ 。

2.6 免疫印迹检测 SDF-1/CXCR4 信号通路相关蛋白表达

与对照组比较,脂多糖组 MC3T3-E1 成骨细胞 SDF-1、CXCR4 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与脂多糖组比较,AS-L、AS-M、AS-H 组 MC3T3-E1 成骨细胞 SDF-1、CXCR4 蛋白表达依次显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 AS-H 组比较,AS-H+AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞 SDF-1、CXCR4 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 5 和表 5。

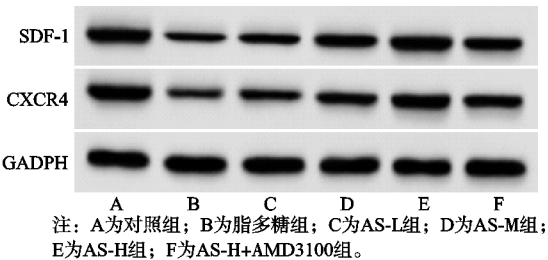
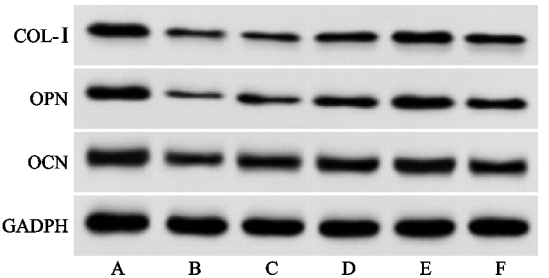


图 5 Western Blot 检测 SDF-1 和 CXCR4 蛋白表达

与 AS-H 组比较,AS-H+AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 4 和表 4。



注: A 为对照组; B 为脂多糖组; C 为 AS-L 组; D 为 AS-M 组; E 为 AS-H 组; F 为 AS-H+AMD3100 组。

图 4 Western Blot 检测 COL-I、OPN、OCN 蛋白表达

表 5 各组 MC3T3-E1 成骨细胞 SDF-1 和 CXCR4 蛋白表达比较( $n=6,\bar{x}\pm s$ )

组别	SDF-1	CXCR4
对照组	0.97±0.10	0.88±0.09
脂多糖组	0.44±0.04 <sup>1)</sup>	0.32±0.03 <sup>1)</sup>
AS-L 组	0.59±0.06 <sup>2)</sup>	0.48±0.05 <sup>2)</sup>
AS-M 组	0.75±0.08 <sup>2)3)</sup>	0.65±0.07 <sup>2)3)</sup>
AS-H 组	0.93±0.09 <sup>2)3)4)</sup>	0.84±0.08 <sup>2)3)4)</sup>
AS-H+AMD3100 组	0.78±0.08 <sup>5)</sup>	0.69±0.07 <sup>5)</sup>

注:1)与对照组比较, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比较, $P<0.05$ ;3)与 AS-L 组比较, $P<0.05$ ;4)与 AS-M 组比较, $P<0.05$ ;5)与 AS-H 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

骨质疏松可能导致骨量减少和骨骼结构改变,影响骨整合,而骨质疏松患者骨缺损修复仍是一大难题,目前主要通过材料填充进行缺损修复,其中包括自体骨、同种异体骨、脱钙骨基质、生物陶瓷、金属材料等,然而自体骨骨量有限,其他材料又有感染、传播疾病、免疫排斥和生物活性低等缺点<sup>[7]</sup>。因此,寻找新的药

物促进骨再生成为研究重点,随着国家医药科技的发展,中医中药也不断受到重视,从不同的草本植物中提取活性化合物治疗骨缺损越来越广泛。积雪草苷是从中药积雪草中提取的一种三萜类皂苷化合物,具有抗炎、抗纤维化、抗肿瘤、促进伤口愈合、抑制瘢痕形成、免疫调节、成骨分化等作用<sup>[8]</sup>。研究显示积雪草苷可以减少促炎细胞因子的释放,抑制软骨细胞凋亡和炎症反应,抑制关节软骨退变,保护膝关节炎大鼠软骨避免损伤<sup>[9-10]</sup>。另外积雪草苷可以抑制破骨细胞的形成和骨吸收,对细胞成骨分化产生积极影响<sup>[11]</sup>。本研究显示积雪草苷可以促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖及钙结节形成,同样积雪草苷可以促进成骨细胞的成骨分化。

碱性磷酸酶能在成骨的过程中促进矿化,其活性被广泛认为是成骨细胞活性的生化标记物,碱性磷酸酶高表达是成骨细胞分化的早期标志,而钙结节形成标志成骨细胞进一步分化成熟,是成骨晚期的一种标志物<sup>[12]</sup>。研究显示碱性磷酸酶的活性升高及钙结节形成增多,可以促进骨髓间充质干细胞(MSCs)成骨分化<sup>[13]</sup>。传统中药淫羊藿可以促进 MC3T3-E1 细胞的碱性磷酸酶活性,促进 MC3T3-E1 细胞的成骨分化<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,积雪草苷升高了碱性磷酸酶的活性,促进钙结节形成,说明积雪草苷可以促进 MC3T3-E1 成骨细胞的成骨分化。

COL-I、OPN、OCN 均是参与骨形成及矿化的重要骨基质蛋白。COL-I 不仅能刺激细胞的黏附和成骨分化,还可以在骨形成过程中为骨细胞钙盐沉积提供场所<sup>[15]</sup>。骨桥蛋白可以促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,是早期成骨的标志之一。骨钙素是成骨细胞晚期分化的标志物,常用于检验成骨细胞活性。研究显示 COL-I、OPN、OCN 表达升高,可以促进人牙龈成纤维细胞的增殖及成骨分化<sup>[16]</sup>。三七总皂苷能促进 COL-I、OPN、OCN 等成骨相关蛋白表达,促进 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,积雪草苷可以升高 COL-I、OPN、OCN 表达水平,说明积雪草苷参与 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖分化进程。

SDF-1/CXCR4 信号通路参与成骨细胞成骨相关蛋白的表达及骨形成过程,其中 SDF-1 即趋化因子 CXCL12,其可以通过自身反馈促进自身的增殖及成骨分化等。CXCR4 是一个由 7 个跨膜受体组成的家族成员,SDF-1 与其结合可以引起一系列的信号转导,促进细胞的成骨分化。研究显示促进 SDF-1 和 CXCR4 蛋白表达,可以促进骨髓间充质干细胞黏附、迁移及成骨分化,促进骨缺损区域的骨愈合<sup>[18]</sup>。SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 信号轴参与骨髓间充质干细胞早期成骨分化,其 SDF-1 和 CXCR4 表达升高可以提高细胞碱性

磷酸酶活性<sup>[4]</sup>。本研究显示,积雪草苷可以升高 SDF-1 和 CXCR4 表达水平,推测积雪草苷可能通过调控 SDF-1/CXCR4 信号通路参与 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖分化。为验证这一猜想,在积雪草苷高浓度处理 MC3T3-E1 成骨细胞的基础上进行 AMD3100 处理,结果显示 AS-H+AMD3100 组 MC3T3-E1 成骨细胞的碱性磷酸酶活性降低,钙结节形成减少,COL-I、OPN、OCN 蛋白表达降低,证实积雪草苷可通过调控 SDF-1/CXCR4 信号通路参与 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖分化。

## 参考文献

- [1] 谢梦生,龙燕鸣,李晓捷.慢病毒下调酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1 表达的骨髓间充质干细胞修复骨质疏松大鼠牙槽骨缺损[J].中国组织工程研究,2023,27(10):1528-1533.
- [2] BALDWIN P,LI D J,AUSTON D A,et al. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery[J]. J Orthop Trauma, 2019, 33(4): 203-213.
- [3] 曹振宇,沈晓钟,马建武,等.积雪草苷通过 TGF- $\beta$ /Smads 通路对 BMSCs 成骨分化的影响[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(5):695-700.
- [4] 白书林,王奕佩,金珂,等. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 信号轴介导柚皮素对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].上海口腔医学,2021,30(6):579-584.
- [5] HUANG Y, JIA Z, XU Y, et al. Selenium protects against LPS-induced MC3T3-E1 cells apoptosis through modulation of microRNA-155 and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Genet Mol Biol, 2020, 43(3): e20190153.
- [6] 王辉,徐亮亮,孙大明,等. 极度低氧条件下基质细胞衍生因子-1 $\alpha$  过表达对间充质干细胞迁移的影响[J]. 中国医药导报, 2022, 19(16): 5-10.
- [7] TANG G, LIU Z, LIU Y, et al. Recent trends in the development of bone regenerative biomaterials [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9(1): 665813-665830.
- [8] LV J, SHARMA A, ZHANG T, et al. Pharmacological review on asiatic acid and its derivatives: a potential compound [J]. SLAS Technol, 2018, 23(2): 111-127.
- [9] 丁平,张岱阳,李贺伟,等. 积雪草苷对膝关节炎大鼠软骨损伤的影响及机制研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(9): 7-13.
- [10] 付连桥,郭焱雄,李坚,等. 积雪草苷调控 miR-342-5p/AQP3 轴保护 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞损伤 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(3): 10-18.
- [11] HE L, HONG G, ZHOU L, et al. Asiaticoside, a component of Centella asiatica attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via NFATc1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4267-4276.

- [5] REN Z, WANG Y, AO G, et al. Overall adjustment acupuncture for postmenopausal osteoporosis (PMOP): a study protocol for a randomized sham-controlled trial[J]. *Trials*, 2020, 21(1):465.
- [6] CHENG C H, CHEN L R, CHEN K H. Osteoporosis due to hormone imbalance; an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1376.
- [7] 麻永胜, 蒋宜伟, 宋重东, 等. 从“滋水涵木”论治肝肾阴虚型绝经后骨质疏松症[J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(7):983-986.
- [8] 张宝荣, 谭颖颖. 左归丸加味对绝经后骨质疏松妇女血清 E<sub>2</sub>、IL-6 和 IGF-1 水平的影响[J]. *陕西中医学院学报*, 2015, 38(4):55-57.
- [9] 江南, 李春梅, 张艺, 等. 肝肾同补治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34(5):52-54.
- [10] BROWN J P, DON-WAUCHOPE A, DOUVILLE P, et al. Current use of bone turnover markers in the management of osteoporosis[J]. *Clin Biochem*, 2022, 109/110:1-10.
- [11] SHIEH A, ISHII S, GREENDALE G, et al. Urinary n-telopeptide and rate of bone loss over the menopause transition and early postmenopause[J]. *Journal of Bone and Mineral Research; The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2016, 31(11):2057-2064.
- [12] KELLY J. Bone turnover markers in osteoporosis[J]. *JAMA*, 2019, 322(23):2344.
- [13] WEN H, HUANG T, LI T, et al. Effects of short-term step aerobics exercise on bone metabolism and functional fitness in postmenopausal women with low bone mass[J]. *Randomized Controlled Trial*, 2017, 28(2):539-547.
- [14] SEELY K D, KOTELKO C A, DOUGLAS H, et al. The human gut microbiota: a key mediator of osteoporosis and osteogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17):9452.
- [15] CHEN X, XU J, ZHANG H, et al. A nomogram for predicting osteoarthritis based on serum biomarkers of bone turnover in middle age: a cross-sectional study of PTH and  $\beta$ -CTX[J]. *Medicine*, 2023, 102(20):e33833.
- [16] HU Q, WANG Q, LIU F, et al. Combination of calcitriol and zoledronic acid on PINP and  $\beta$ -CTX in postoperative patients with diabetic osteoporosis: a randomized controlled trial[J]. *Dis Markers*, 2022:6053410.
- [17] EASTELL R, SZULC P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis[J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2017, 5(11):908-923.
- [18] JIANG X, YAN N, ZHENG Y, et al. Risk of primary osteoporosis score (RPOPs): an algorithm model for primary osteoporosis risk assessment in grass-roots hospital[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23(1):1041.
- [19] 张鹏, 罗伟, 张冬梅, 等. 老年骨质疏松症不同中医证型中 BMD、25(OH)D<sub>3</sub> 及 PTH 的比较和相关性分析[J]. *四川中医*, 2020, 38(4):81-83.
- [20] SILVA B C, BILEZIKIAN J P. Skeletal abnormalities in hypoparathyroidism and in primary hyperparathyroidism[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2021, 22(4):789-802.
- [21] EJLSMARK-SVENSSON H, ROLIGHED L, HARSLOF T, et al. Risk of fractures in primary hyperparathyroidism: a systematic review and meta-analysis[J]. *Osteoporos Int*, 2021, 32(6):1053-1060.
- [22] KUŽMA M, JACKULIAK P, KILLINGER Z, et al. Parathyroid hormone-related changes of bone structure[J]. *Physiol Res*, 2021, 70(Suppl 1):S3-S11.
- [23] 罗颂平, 张玉珍. 罗元恺妇科述要[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1993.
- [24] 陈灏珠. 实用内科学: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:1265-1270.
- [25] BILEZIKIAN J P, BANDEIRA L, KHAN A, et al. Hyperparathyroidism[J]. *Lancet*, 2018, 391(10116):168-178.
- [26] SILVA B C, CUSANO N E, BILEZIKIAN J P. Primary hyperparathyroidism[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2018, 32(5):593-607.
- [27] 张雅冬, 许昕. 许昕教授运用“治肝六法”治疗妇科疾病探赜[J]. *河北中医*, 2022, 44(8):1249-1253.

(收稿日期: 2023-12-12)

(上接第 28 页)

- [12] 赵有顺, 林平, 涂迎春, 等. RUNX2 基因过表达载体修饰 BMSC 来源外泌体联合碳酸钙支架系统在骨缺损中的应用[J]. *中国骨伤*, 2022, 35(4):379-386.
- [13] 张好, 王翠竹, 皇甫慧敏, 等. 20(S)-原人参二醇对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(4):867-874.
- [14] 钱虹静, 刘钰莲, 张云鹏, 等. 淫羊藿苷对 MC3T3-E1 增殖及成骨分化的影响研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2023, 33(4):219-223.
- [15] AI Y, SHE W, WU S, et al. AM1241-loaded poly(ethylene glycol)-dithiothreitol hydrogel repairs cranial bone defects by promoting vascular endothelial growth factor and COL-1 expression[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10(1):888598-888606.
- [16] 张昕, 李长顺, 刘浩, 等. 人参皂苷 Rg1 促进人牙龈成纤维细胞增殖、迁移及成骨分化的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5):812-819.
- [17] 罗劲涛, 王仕迎, 韦标方. 三七总皂苷对 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨分化的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(7):2353-2358.
- [18] 黄钟炼, 罗绍伟, 林海明, 等. SDF-1/CXCR4 介导体外冲击波促进大鼠骨髓间充质干细胞的黏附、迁移作用[J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(6):721-726.

(收稿日期: 2024-01-12)