

淫羊藿苷对激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

季伟¹ 刘远航¹ 张倩¹ 欧宜林^{2△}

[摘要] **目的:**基于磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(PI3K/AKT)通路探讨淫羊藿苷对激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)成骨分化能力的影响。**方法:**体外培养人骨髓间充质干细胞,通过成骨、成脂诱导分化进一步鉴定人骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化能力。以地塞米松诱导人骨髓间充质干细胞模型,以 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 nmol/L 的淫羊藿苷干预 24 h 后, CCK-8 实验筛选出合适的淫羊藿苷浓度进行后续研究(CCK-8 法)。将人骨髓间充质干细胞分为对照组、模型组、PI3K 激活剂组(10 μmol/L 740YP 组)、淫羊藿苷组、淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组(淫羊藿苷+10 mmol/L LY294002 组)。CCK-8 法检测各组人骨髓间充质干细胞活力;染色法检测人骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化能力;RT-qPCR 法检测成骨分化相关基因表达水平;比色法检测碱性磷酸酶(ALP)活性;Western Blot 法检测各组人骨髓间充质干细胞中 PI3K/AKT 通路有关蛋白表达量。**结果:**第 3 代人骨髓间充质干细胞生长良好,成骨、成脂诱导分别显示有钙化结节、红色脂滴出现,说明人骨髓间充质干细胞具有成骨和成脂分化的能力。CCK-8 法筛选淫羊藿苷的浓度为 1 nmol/L 用于后续实验。与对照组相比,模型组钙化结节数量、ALP 活性、成骨因子(ALP、RUNX2、OPN、BMP2)的基因表达水平以及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,脂滴数量、成脂因子(PPAR γ 、C/EBP α)的基因表达水平以及 Bax 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组钙化结节数量、ALP 活性、成骨因子的基因表达水平以及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,脂滴数量、成脂因子的基因表达水平以及 Bax 蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与淫羊藿苷组相比,淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组钙化结节数量、ALP 活性、成骨因子的基因表达水平以及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,脂滴数量、成脂因子的基因表达水平以及 Bax 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**淫羊藿苷可能通过激活 PI3K/AKT 通路,进而增强地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞成骨分化能力和细胞活性。

[关键词] 淫羊藿苷;激素性股骨头坏死;人骨髓间充质干细胞;成骨、成脂分化;磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶通路

[中图分类号] R681.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)06-0014-07

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.250603

Effect of Icaritin on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Hormone-Induced Femur Head Necrosis

Ji Wei¹ LIU Yuanhang¹ ZHANG Qian¹ OU Yilin^{2△}

¹ Wuhan Third Hospital (Tongren Hospital of Wuhan University), Wuhan 430060, China;

² Zhongxiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhongxiang 431900, Hubei China.

Abstract Objective: To investigate the effect of icaritin on osteogenic differentiation ability of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) with femoral head based on the

phosphatidylinositol 3-kinase/serine threonine kinase (PI3K/AKT) pathway. **Methods:** hBMSCs were cultured in vitro and their differentiation ability was further identified by inducing osteogenic and adipogenic differentiation. Dexamethasone in-

基金项目:武汉市卫健委中医药科研项目(WZ22Q14)

¹ 武汉市第三医院(武汉大学同仁医院)(武汉,430060)

² 钟祥市中医院

△通信作者 E-mail: dtvlzf@163.com

duced hBMSCs model, and after 24 h of intervention with 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, and 100 nmol/L icariin, the appropriate icariin concentration was screened by CCK-8 experiment for subsequent research (CCK-8 method). hBMSCs were assigned into control group, model group, PI3K activator group (10 μ mol/L 740YP group), icariin group, and icariin+PI3K inhibitor group (icariin+10 mmol/L LY294002 group). CCK-8 was used to detect the viability of hBMSCs in each group. Alizarin red staining and oil red O staining were used to detect the differentiation abilities of hBMSCs. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of osteogenic differentiation related genes. Colorimetric method was used to detect alkaline phosphatase (ALP) activity. Western Blot method for detecting protein expression levels related to the PI3K/AKT pathway. **Results:** The 3rd generation hBMSCs grew well, with calcified nodules and red lipid droplets appearing during osteogenic and adipogenic induction, indicating that hBMSCs had osteogenic and adipogenic differentiation abilities. The concentration of icariin screened by CCK-8 was 1 nmol/L for subsequent experiments. Compared with the control group, the number of calcified nodules, ALP activity, gene expression levels of osteogenic factors (ALP, RUNX2, OPN, BMP2), protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and Bcl-2 were prominently lower in the model group, while the number of lipid droplets, gene expression levels of adipogenic factors (PPAR γ , C/EBP α), and protein expression level of Bax were obviously higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, the number of calcified nodules, ALP activity, gene expression levels of osteogenic factors, protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and Bcl-2 were obviously higher in the PI3K activator group and icariin group, while the number of lipid droplets, gene expression levels of adipogenic factors, and protein expression level of Bax were prominently lower ($P < 0.05$). Compared with the icariin group, the number of calcified nodules, ALP activity, gene expression levels of osteogenic factors, protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and Bcl-2 were prominently lower in the icariin+PI3K inhibitor group, while the number of lipid droplets, gene expression levels of adipogenic factors, and protein expression level of Bax were obviously higher ($P < 0.05$). **Conclusion:** Icariin can enhance dexamethasone induced osteogenic differentiation and cellular activity of hBMSCs by activating the PI3K/AKT pathway.

Keywords: icariin; steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; human bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic and adipogenic differentiation; phosphatidylinositol 3-kinase/serine threonine kinase pathway

激素性股骨头坏死(SANFH)^[1]是一种由糖皮质激素引起的骨代谢性疾病,骨髓间充质干细胞(BMSCs)基于其成骨分化能力在骨坏死修复中发挥重要作用。研究表明激素性股骨头坏死的发生与骨髓间充质干细胞的分化密切相关^[2]。淫羊藿苷(Icariin)能够通过调节骨髓间充质干细胞活性改善骨代谢疾病^[3-4],但其具体作用机制尚不清楚。PI3K/AKT通路在调节成骨分化中发挥重要作用^[5],通过调节PI3K/AKT通路可改善糖皮质激素诱导的骨质疏松症^[6]。本研究旨在探究淫羊藿苷调节PI3K/AKT通路对激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的影响,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

人骨髓间充质干细胞(hBMSCs, 货号为PC-045h)购自武汉赛奥斯生物科技有限公司;淫羊藿苷(CAS为489-32-7, HPLC \geq 98%)、PI3K抑制剂/激活剂(货号为01X7260/01X12364)均购自上海联祖生物科技有限公司;CCK-8试剂盒(货号为AS90075)购自浙江联硕生物科技有限公司;成骨/成脂诱导试剂盒(货号为FY200006/FY200007)购自上海觅拓生物科技有限公司;油红O染色试剂盒(货号为22096KB)、

茜素红S染色试剂盒(货号为20087CR)、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(货号为202977CA)购自上海博尔森生物科技有限公司;PI3K(MA1-74183)、p-PI3K(PA5-17387)、AKT(44-609G)、p-AKT(44-621G)、Bax(PA511378)、Bcl 2(PA130410)、Caspase 3(PA516327)抗体均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养

将冻存的人骨髓间充质干细胞复苏后置于含10% FBS的DMEM高糖培养基中培养。每隔2~3 d更换1次培养基,当细胞融合度达到90%左右时进行传代,取传代3次的对数生长期细胞观察其生长状况。

1.3 诱导分化能力检测

成脂分化检测:取第3代人骨髓间充质干细胞接种于12孔板内,培养至细胞融合度为80%左右时,加入成脂诱导分化液,经固定、染色后于显微镜下观察。

成骨分化检测:方法同成脂分化检测。在细胞高度融合后加入成骨诱导分化液,在观察到有较多钙化结节出现后,经固定、染色液染色后视野下拍照分析。

1.4 淫羊藿苷浓度筛选及分组处理

收集对数生长期的3代人骨髓间充质干细胞,先以地塞米松^[7]诱导细胞培养至24 h后,分别加入0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 nmol/L的淫羊藿苷干预

24 h后, CCK-8 法实验筛选出合适的淫羊藿苷浓度进行后续研究。

收集对数生长期的人骨髓间充质干细胞, 以 $10 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松诱导激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞模型, 将其分为对照组、模型组、PI3K 激活剂组 ($10 \mu\text{mol/L}$ 740YP 组)^[8]、淫羊藿苷组、淫羊藿苷 + PI3K 抑制剂组 (淫羊藿苷 + 10mmol/L LY294002 组)^[9]。另培养正常生长的人骨髓间充质干细胞作为对照组。

1.5 CCK-8 法检测细胞活力

分别收集各组细胞以 5×10^4 /孔接种至 96 孔板, 在 CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 分别向每个孔中加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂。孵育后在酶标仪中于 450 nm 波长下测量吸光度并计算细胞活力。

1.6 各组细胞 ALP 活性检测

各处理组细胞培养至第 7 天, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书检测 ALP 的活性。

1.7 各组细胞成骨分化检测

将各组细胞以 5×10^5 /孔接种到 6 孔板中, 加入成骨分化诱导液 (诱导液定期换新), 21 d 后经固定、茜素红染色液染色 (油红 O 染色) 后进行观察。

1.8 RT-qPCR 检测成骨、成脂因子 mRNA 的表达

收集各组人骨髓间充质干细胞, 用 Trizol 试剂分别提取总 RNA, 检测并调配成同一浓度; 然后反转录成 cDNA, 随后进行 PCR 扩增。变性、退火和延伸按试剂盒说明书进行设定。通过熔解曲线图确认引物是否有效, 引物序列 (见表 1) 由北京擎科生物公司合成, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达水平。

1.9 Western Blot 法检测 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达量

收集各组人骨髓间充质干细胞, 加入预冷的裂解

表 1 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
ALP	F: AGAATCTGGTGCAGGAATGG R: AGGCTCAAAGAGACCCATGA
RUNX2	F: GGACGAGGCAAGAGTTTCAC R: TTCCCGAGGTCCATCTACTG
OPN	F: TGAAACGAGTCAGCTGGATG R: TGAAATTCATGGCTGTGGAA
BMP-2	F: GCAAAGAAAAAGGAACGGACATT R: GGGAAGCAGCAACGCTAGAA
PPAR γ	F: ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA R: ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT
C/EBP α	F: TATAGGCTGGGCTTCCCTT R: AGCTTTCTGGTGTGACTCGG
β -actin	F: GAAACTACCTTCAACTCCATC R: CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC

液充分裂解后提取并定量分析总蛋白。蛋白经变性处理后通过电泳、转膜、封闭处理后分别加入一抗于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育过夜, 次日室温下加入二抗孵育, 可视化处理后, 凝胶成像仪采集图像并进行灰度分析。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行处理分析, 并以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人骨髓间充质干细胞的生长形态及分化能力鉴定

如图 1a 所示, 第 3 代细胞可见明显的细胞集群, 细胞呈长梭形、紧密有序排列。图 1b 为成脂分化后的人骨髓间充质干细胞, 染色后显示明显的红色脂滴。图 1c 为成骨诱导后人骨髓间充质干细胞, 染色显示为红色的钙化沉着物, 形态由纤维状逐渐形成钙结节, 茜素红染色呈阳性。

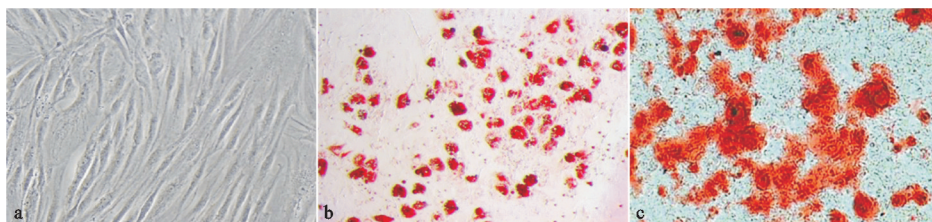


图 1 人骨髓间充质干细胞形态及分化能力 ($\times 100$)

2.2 淫羊藿苷对地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞活性影响

如图 2 所示, 随着淫羊藿苷浓度的增加, 人骨髓间充质干细胞的光密度 (OD) 值先升高后降低, 其中当浓度为 1 nmol/L 时, 人骨髓间充质干细胞的 OD 值最高, 因此选择 1 nmol/L 的淫羊藿苷用于后续实验。

2.3 各组人骨髓间充质干细胞活力比较

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力下

降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组细胞活力增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷 + PI3K 抑制剂组细胞活力减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组人骨髓间充质干细胞 ALP 活性比较

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组 ALP 活性显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比

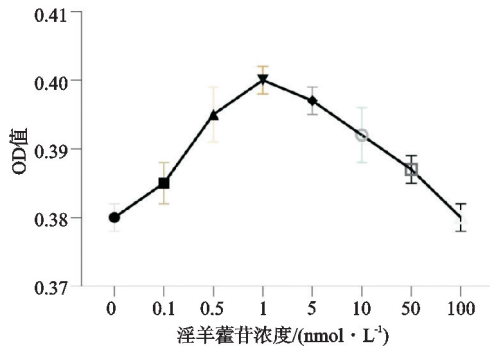


图 2 淫羊藿苷对地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞活性的影响

表 2 各组人骨髓间充质干细胞活力比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力/%
对照组	100.00 ± 8.00
模型组	69.40 ± 7.31 ¹⁾
PI3K 激活剂组	88.32 ± 6.08 ²⁾
淫羊藿苷组	90.64 ± 7.70 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	76.27 ± 8.36 ³⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与模型组比较, $P < 0.05$; 3)与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

较,PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组 ALP 活性显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组 ALP 活性明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 各组人骨髓间充质干细胞 ALP 活性比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	ALP 活性
对照组	75.01 ± 5.23
模型组	31.28 ± 2.86 ¹⁾
PI3K 激活剂组	68.67 ± 6.57 ²⁾
淫羊藿苷组	70.64 ± 6.40 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	47.35 ± 5.00 ³⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与模型组比较, $P < 0.05$; 3)与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组人骨髓间充质干细胞成骨分化比较

如图 3 所示,对照组染色均匀,可见红褐色矿化结节;模型组染色减弱,结节分布稀疏,矿化结节减少;PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组染色加深,结节分布广泛,矿化结节增多;淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组染色范围小、矿化结节数量减少。

Image J 软件分析显示:与对照组比较,模型组钙化结节数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组钙化结节数量明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与淫羊藿苷组比较,淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组钙化结节数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4。

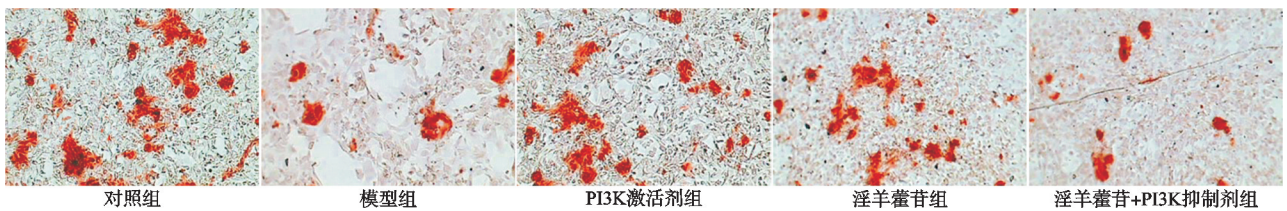


图 3 各组细胞茜素红染色图 (×100)

表 4 各组人骨髓间充质干细胞钙化结节数比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	结节数/个
对照组	12.67 ± 1.20
模型组	5.83 ± 0.45 ¹⁾
PI3K 激活剂组	9.17 ± 0.84 ²⁾
淫羊藿苷组	8.50 ± 0.70 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	6.33 ± 0.04 ³⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与模型组比较, $P < 0.05$; 3)与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 各组人骨髓间充质干细胞成脂分化比较

如图 4 所示,对照组脂质积累较少;模型组脂质积累增多、脂滴聚集;PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组脂质积累减少;淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组脂质积累增多。

Image J 软件分析显示:与对照组比较,模型组脂滴数量明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组脂滴数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与淫羊藿苷组比较,淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组脂滴数量明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 5。

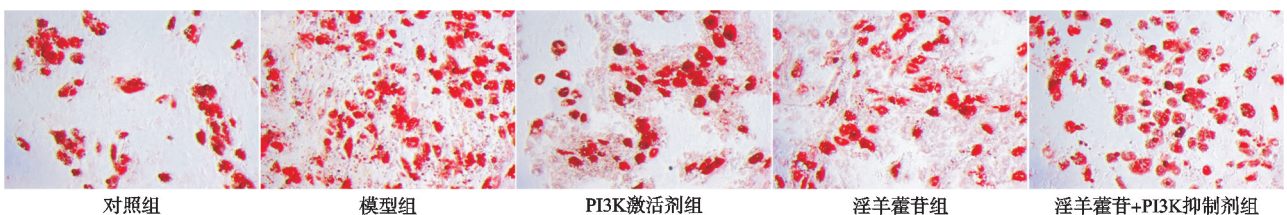


图 4 各组细胞油红 O 染色图 (×100)

表 5 各组人骨髓间充质干细胞脂滴数比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	脂滴数/个
对照组	35.83 ± 3.45
模型组	58.00 ± 5.22 ¹⁾
PI3K 激活剂组	40.33 ± 4.17 ²⁾
淫羊藿苷组	41.50 ± 3.80 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	51.17 ± 4.63 ³⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$; 3) 与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

表 6 各组成骨相关基因相对表达水平比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALP	RUNX2	OPN	BMP-2
对照组	0.89 ± 0.08	0.97 ± 0.04	0.92 ± 0.06	0.98 ± 0.01
模型组	0.31 ± 0.05 ¹⁾	0.46 ± 0.06 ¹⁾	0.26 ± 0.03 ¹⁾	0.53 ± 0.04 ¹⁾
PI3K 激活剂组	0.73 ± 0.06 ²⁾	0.81 ± 0.05 ²⁾	0.78 ± 0.06 ²⁾	0.88 ± 0.01 ²⁾
淫羊藿苷组	0.71 ± 0.08 ²⁾	0.84 ± 0.06 ²⁾	0.81 ± 0.07 ²⁾	0.86 ± 0.06 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	0.50 ± 0.06 ³⁾	0.62 ± 0.04 ³⁾	0.44 ± 0.05 ³⁾	0.59 ± 0.07 ³⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$; 3) 与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 各组人骨髓间充质干细胞中成脂相关基因表达检测

如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组 PPAR γ 和 C/EBP α 基因表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组 PPAR γ 和 C/EBP α 基因表达水平显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组 PPAR γ 和 C/EBP α 基因表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 7 各组成脂相关基因相对表达水平比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	PPAR γ	C/EBP α
对照组	0.95 ± 0.04	0.89 ± 0.09
模型组	1.54 ± 0.10 ¹⁾	1.26 ± 0.06 ¹⁾
PI3K 激活剂组	1.06 ± 0.07 ²⁾	0.97 ± 0.05 ²⁾
淫羊藿苷组	1.04 ± 0.08 ²⁾	0.99 ± 0.08 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	1.17 ± 0.06 ³⁾	1.08 ± 0.07 ³⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$; 3) 与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

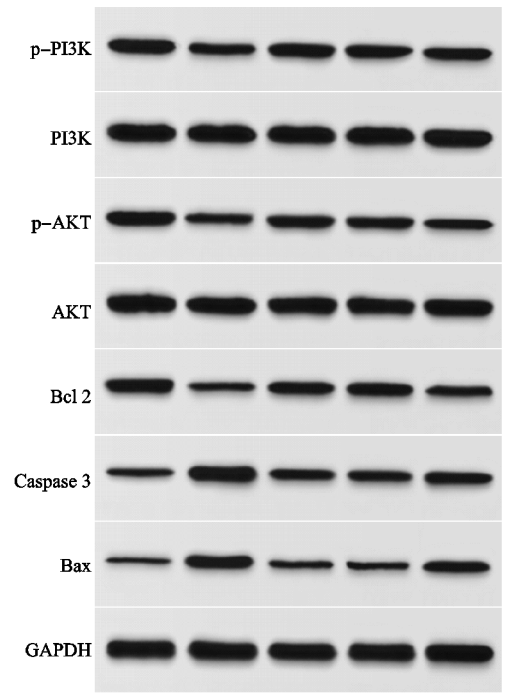
2.9 各组人骨髓间充质干细胞中与 PI3K/AKT 通路有关蛋白表达比较

如图 5 和表 8 所示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达明显降低, 促凋亡蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组各蛋白表达水平呈相反趋势显著变化, 差异有

2.7 各组人骨髓间充质干细胞中成骨相关基因表达检测

如表 6 所示, 与对照组比较, 模型组各成骨基因表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, PI3K 激活剂组和淫羊藿苷组各成骨基因表达水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组各成骨基因表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

统计学意义 ($P < 0.05$); 与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组 PI3K、AKT 磷酸化水平降低, 促凋亡蛋白表达量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A-对照组; B-模型组; C-PI3K 激活剂组; D-淫羊藿苷组; E-淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组

图 5 各组人骨髓间充质干细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白条带

表 8 各组人骨髓间充质干细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白表达量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	Bcl-2	Caspase 3	Bax
对照组	0.91 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.82 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.24 ± 0.01
模型组	0.58 ± 0.06 ¹⁾	0.46 ± 0.05 ¹⁾	0.31 ± 0.02 ¹⁾	0.98 ± 0.08 ¹⁾	0.79 ± 0.08 ¹⁾
PI3K 激活剂组	0.86 ± 0.07 ²⁾	0.79 ± 0.06 ²⁾	0.69 ± 0.08 ²⁾	0.49 ± 0.05 ²⁾	0.33 ± 0.05 ²⁾
淫羊藿苷组	0.88 ± 0.05 ²⁾	0.76 ± 0.08 ²⁾	0.70 ± 0.06 ²⁾	0.51 ± 0.06 ²⁾	0.35 ± 0.04 ²⁾
淫羊藿苷+PI3K 抑制剂组	0.67 ± 0.05 ³⁾	0.55 ± 0.06 ³⁾	0.45 ± 0.06 ³⁾	0.67 ± 0.08 ³⁾	0.60 ± 0.07 ³⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$; 3) 与淫羊藿苷组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

激素性股骨头坏死是许多病患使用类固醇后的常见并发症,导致激素性股骨头坏死的病理机制有很多,如成骨和成脂分化之间的失衡、凝血功能障碍、细胞凋亡障碍等。骨髓间充质干细胞是一种广泛的多功能细胞,是成骨细胞和脂肪细胞的常见祖细胞,通过其成骨分化能力在骨坏死修复中发挥重要的作用^[10]。既往研究表明^[11]骨髓间充质干细胞是激素性股骨头坏死的关键调控细胞,骨髓间充质干细胞成骨分化能力的变化与激素性股骨头坏死密切相关。因此,调节骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化对于预防和治疗激素性股骨头坏死至关重要。近年来淫羊藿苷因其广泛的药理活性被广泛应用于骨疾病(如骨质疏松、骨关节炎)的治疗。已有研究表明^[12-13]淫羊藿苷能够促进骨髓间充质干细胞增殖和分化、抑制骨髓间充质干细胞凋亡,改善衰老的骨髓间充质干细胞/骨质疏松症小鼠骨髓间充质干细胞损伤。但关于淫羊藿苷改善骨髓间充质干细胞的具体作用机制还不清楚。

骨髓间充质干细胞是一种能分化为多种细胞系的多能性细胞,其成骨和成脂分化在生理状态下保持动态平衡;但这种平衡会被类固醇破坏,使骨髓间充质干细胞向成骨分化减弱,从而加重骨质疏松、股骨头坏死等疾病^[14-15]。促进骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化的因子有很多,其中 Runx2 是成骨过程中的关键转录因子,受 BMP-2 调控;BMP-2 能够促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化^[16];PPAR γ 是脂肪形成的主调节因子,具有抗成骨作用;C/EBP α 是成脂分化过程中必不可少的调控因子^[17]。相关研究显示^[18]糖皮质激素诱导的骨髓间充质干细胞凋亡增加;激素性股骨头坏死患者骨髓间充质干细胞的成骨分化能力和增殖力降低,而成脂分化能力增强^[19]。本研究在地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞成骨因子基因表达水平及 Bcl 2 蛋白表达量降低,成脂因子基因表达水平及 Caspase 3 和 Bax 蛋白表达量升高,说明人骨髓间充质干细胞的成骨分化能力降低、成脂分化能力增强,可能存在细胞凋亡增多现象。经淫羊藿苷干预细胞后,成骨因子表达水平及 Bcl 2 蛋白表达量升高,成脂因子表达水平及 Caspase 3 和 Bax 蛋白表达量降低;此外茜素红染色和油红染色也显示钙化结节增多、脂滴减少,说明淫羊藿苷可促进人骨髓间充质干细胞的成骨分化,抑制成脂分化和细胞凋亡。

P13K/AKT 通路介导多种疾病的发生和发展,对细胞增殖分化发挥重要调节作用。网络药理学研究表明^[20]通过激活 P13K/AKT 通路可以促进骨形成。P13K/AKT 通路的激活可以改善成骨细胞损伤(如成骨细胞焦亡)、促进成骨细胞增殖分化^[21],还可促进骨

髓间充质干细胞成骨和抑制脂肪生成,调节骨代谢^[22]。本研究结果显示地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 磷酸化水平降低,提示 P13K/AKT 通路活性下降;而淫羊藿苷干预后 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 磷酸化水平升高,P13K/AKT 通路活性增强,同时人骨髓间充质干细胞成骨能力增强、成脂能力减弱,推测淫羊藿苷促进成骨、抑制成脂的作用与 P13K/AKT 通路活性有关。为了验证以上推测,本研究以 740YP(PI3K 激活剂)干预细胞后发现,人骨髓间充质干细胞的成骨能力增强、成脂能力减弱。而在淫羊藿苷干预细胞的基础上加入 LY294002(PI3K 抑制剂)发现,淫羊藿苷对 P13K/AKT 通路的激活作用被 LY294002 所抑制,人骨髓间充质干细胞的成骨能力减弱、成脂能力增强。以上回补实验进一步说明了淫羊藿苷促进人骨髓间充质干细胞成骨分化、抑制成脂分化的调节作用与 P13K/AKT 通路的激活有关。

综上所述,淫羊藿苷可能通过激活 P13K/AKT 通路提高人骨髓间充质干细胞的增殖能力,同时促进成骨分化、抑制成脂分化。但本研究仅从细胞层面说明淫羊藿苷的功效,并未在动物机体上进行实验,后续可通过动物实验进一步加深对淫羊藿苷的认识。

参考文献

- [1] NAN K, PEI J P, FAN L H, et al. Resveratrol prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head via miR-146a modulation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2021, 1503(1): 23-37.
- [2] XU P F, CHANG J, MA G W, et al. MiR-145 inhibits the differentiation and proliferation of bone marrow stromal mesenchymal stem cells by GABARAPL1 in steroid-induced femoral head necrosis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23(1): 1020-1028.
- [3] YUE J, YU H C, LIU P, et al. Preliminary study of icariin indicating prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head by regulating abnormal expression of miRNA-335 and protecting the functions of bone microvascular endothelial cells in rats[J]. *Gene*, 2021, 766(1): 1-12.
- [4] LIU W, XIANG S Y, WU Y C, et al. Icariin promotes bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via the mTOR/autophagy pathway to improve ketogenic diet-associated osteoporosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 127-136.
- [5] TONG W W, LI J, FENG X Z, et al. Kaiso regulates osteoblast differentiation and mineralization via the Itga10/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 41-51.
- [6] LI M, YANG N, HAO L, et al. Melatonin inhibits the ferroptosis pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling axis

- to attenuate steroid-induced osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022(1):1-22.
- [7] 王壮壮,周正新,朱磊,等. 骨痹通消颗粒对激素型股骨头坏死人骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的影响[J]. *中国医药导报*, 2024, 21(3):28-33.
- [8] 李燕伟,尚利晓,樊冬生. 姜黄素调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 LPS 诱导的角膜基质细胞自噬的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(10):2046-2051.
- [9] 师若迪,徐晨,李娟,等. LED 光源照射及 PI3K 抑制剂对人视网膜色素上皮细胞自噬和凋亡的影响[J]. *浙江医学*, 2024, 46(2):124-130.
- [10] 颜国标,宋浩民,林南星. 薯蓣皂苷通过信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(7):1-5.
- [11] WANG W, WU H Q, FENG S J, et al. Tanshinone II A promotes osteogenic differentiation potential and suppresses adipogenic differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(4):177-189.
- [12] 张锦明,田滢舟,赵玲,等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化缓解小鼠骨质疏松的机制[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(19):2991-2996.
- [13] 蔡叶,王明飞,张磊,等. 淫羊藿苷对衰老骨髓间充质干细胞成骨的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(2):162-167.
- [14] ZHANG J, CAO J, LIU Y, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(6):667-682.
- [15] FU L G, LIU H W, LEI W J. MiR-596 inhibits osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting Smad3 in steroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1):173-182.
- [16] 瞥慧,范颖,蒋宁,等. 淫羊藿次苷 I 及淫羊藿次苷 II 通过 BMP/Runx2/Osx 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(5):690-695.
- [17] 魏孔熙,刘永琦,李洋洋,等. 黄芪多糖对 X 线辐射骨髓间充质干细胞成脂分化的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2020, 41(2):304-308.
- [18] SHAN H J, LIN Y W, YIN F L, et al. Effects of astragaloside IV on glucocorticoid-induced avascular necrosis of the femoral head via regulating Akt-related pathways[J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(11):e13485-e13502.
- [19] 乔仁秋,李树山,殷力. 基于经典 Wnt/ β -连环蛋白信号通路探讨激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞成骨成脂分化机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(7):1206-1209.
- [20] ZHANG Z L, SHANG W, ZHAO X C, et al. Phenytoin regulates osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells by PI3K/Akt pathway[J]. *Regen Ther*, 2023, 24(1):201-210.
- [21] CHAI S, YANG Y B, WEI L W, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128(1):1-14.
- [22] XU K, FEI W C, GAO W X, et al. SOD3 regulates FLT1 to affect bone metabolism by promoting osteogenesis and inhibiting adipogenesis through PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 212(1):65-79.

(收稿日期:2025-01-11)

(上接第 13 页)

- [20] SONG W J, DONG Y, LUO C, et al. p38MAPK family isoform p38 α and activating transcription factor 2 are associated with the malignant phenotypes and poor prognosis of patients with ovarian adenocarcinoma[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2017, 213(10):1282-1288.
- [21] 杨萍. 中药影响膝骨性关节炎信号通路的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2022, 11(12):71-75.
- [22] CHEN Y L, YAN D Y, WU C Y, et al. Maslinic acid prevents IL-1 β -induced inflammatory response in osteoarthritis via PI3K/AKT/NF- κ B pathways[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(3):1939-1949.
- [23] 曹星星,苗喜云,曹玉举,等. 中医药调控 NF- κ B 信号通路治疗类风湿关节炎四肢关节破坏的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2024, 30(12):94-98.
- [24] 李名,谭则成,曹月龙. miRNAs 通过 MAPK 通路调控骨关节炎及中医药干预的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(22):4400-4405.
- [25] 龚姗,李弘,刘叶倩,等. 复方七芍降压片对高血压大鼠 LVH 及心肌 MMPs 和 p-P65 表达的影响[J]. *中药材*, 2020, 43(3):725-729.
- [26] 尤从新,骆文生,陈威,等. NF- κ B 信号通道在膝骨性关节炎中的作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2023, 31(15):1397-1400.
- [27] RIGOGLOU S, PAPA VASSILIOU A G. The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45(11):2580-2584.
- [28] 白春礼,马钢,苏日力格,等. NF- κ B/MAPKs 信号调节骨关节炎的研究进展[J]. *内蒙古医学杂志*, 2023, 55(10):1208-1212.
- [29] 陈水昌,邢振龙,丘青中. 膝三脏汤在膝关节骨性关节炎中的应用[J]. *河北中医*, 2016, 38(3):373-375.
- [30] 丘青中,邢振龙,戚子荣. 膝三脏汤对膝骨关节炎大鼠炎症因子及关节软骨含水率影响实验研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(12):25-27.

(收稿日期:2025-01-10)