

葛根素通过NO信号通路促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成骨性分化

宋明甲^a, 文益民^a, 柴晓亮^a, 周建^b, 吴晓燕^{a*} (中国人民解放军联勤保障部队九四〇医院, a.脊柱外科, b.骨科研究所, 兰州 730050)

摘要: 目的 观察葛根素促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成骨性分化过程中是否激活NO信号通路。方法 一氧化氮合成酶抑制剂(nitric oxide synthase inhibitors, LNMA)预处理大鼠骨髓间充质细胞12 h后, 使用葛根素处理骨髓间充质细胞不同时间, 观察其对骨钙素(osteocalcin, OC)含量, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性和钙化结节染色, Runx-2、OSX、BMP-2和Collagen-1 mRNA表达水平的影响, 以及NO和3'-5'-环鸟苷一磷酸(cGMP)含量的影响。结果 葛根素对骨髓间充质细胞增殖活性存在浓度的依赖性, 其中 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 促进其增殖活性最高, 并显著提高了该细胞中ALP活性。预先使用LNMA处理大鼠骨髓间充质细胞后, 葛根素提高该细胞中ALP活性、OC含量、钙化能力和Runx-2、OSX、BMP-2和Collagen-1 mRNA的表达水平作用均受到抑制, 以及葛根素提高NO和cGMP含量能力受到抑制。结论 葛根素能有效促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成熟与矿化, 并需要NO信号通路的参与。

关键词: 葛根素; 骨髓间充质细胞; NO/cGMP信号通路

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)17-2124-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.17.003

引用本文: 宋明甲, 文益民, 柴晓亮, 等. 葛根素通过NO信号通路促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成骨性分化[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2124-2130.

Puerarin Promoted Bone Marrow Mesenchymal Cells Osteogenesis Differentiation of Rats Through NO Signaling Pathway

SONG Mingjia^a, WEN Yimin^a, CHAI Xiaoliang^a, ZHOU Jian^b, WU Xiaoyan^{a*} (Joint Logistics Support Force 940 Hospital, CPLA, a.Spinal Surgery, b.Institute of Orthopaedics, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe whether puerarin promotes rat bone marrow mesenchymal cells osteogenesis differentiation through NO signaling pathway *in vitro*. **METHODS** The rat bone marrow mesenchymal cells were pretreated with nitric oxide synthase inhibitors(LNMA) 12 h, to observe the presence of puerarin on osteocalcin(OC), alkaline phosphatase(ALP) and calcification nodules staining, PCR detected the expression levels of osteogenic genes Runx-2, OSX, BMP-2, and Collagen-1 mRNA and determined NO and 3'-5'-Cycloguanosine monophosphoric acid(3'-5'-cyclic-GMP, cGMP) after different processing times. **RESULTS** After treatment of rat bone marrow mesenchymal cells with different concentrations of puerarin, the group of $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly increased the activity of ALP in rat bone marrow mesenchymal cells and pre-treated with LNMA. After the rat bone marrow mesenchymal cells. The enhancement of ALP activity, OC content, calcification ability, and expression levels of Runx-2, OSX, BMP-2, and Collagen-1 mRNA in rat bone marrow mesenchymal cells were inhibited. It was further verified that puerarin could significantly increase NO and cGMP content, but the pretreatment with LNMA was inhibited. **CONCLUSION** Puerarin can effectively promote the maturation and mineralization of rat bone marrow mesenchymal cells *in vitro*, and NO signaling pathway is required to participate.

KEYWORDS: puerarin; bone marrow mesenchymal cells; NO/cGMP signaling pathway

葛根素是传统中药葛根中提取的主要单体化合物之一, 其化学名为4,7-二羟基-8-β-D吡喃葡萄糖醛基异黄酮。前期的研究报道葛根素具有抗炎、祛痰、解热、提高机体免疫力, 提高绝经后骨质疏松症患者骨密度等药理活性^[1-2]。动物模型研究发现葛根素具有抑制切除卵巢大鼠的骨流失作

用^[3-4], 还可促进体外培养成骨细胞的成熟与矿化^[5]。已经证明葛根素具有促进骨形成的作用^[3], 但是葛根素是否通过促进骨髓间充质细胞成骨性分化促进骨形成, 目前尚未见研究报道。前期的研究报道骨髓间充质细胞可以定向分化为成骨细胞^[6], 本研究以体外培养大鼠骨髓间充质细胞为研究模型

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(1506RJZA306)

作者简介: 宋明甲, 男, 主治医师 Tel: 13893656996
E-mail: landawuxiaoyan@163.com

E-mail: 122525050@qq.com

*通信作者: 吴晓燕, 女, 主管护师 Tel:

细胞,旨在研究葛根素促进骨髓间充质细胞成骨性分化过程及其具体机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

葛根素(中国药品检定所,批号:110752-201615);胎牛血清(荣晔生物生物公司兰州,批号:RF-32-01);DMEM/F12培养基(批号:11054020)、 β -磷酸甘油钠(批号:819-83-0)、抗坏血酸(批号:A4403)、地塞米松(批号:D4902)、青霉素(批号:M7292)、链霉素(批号:V900929)均购自美国Sigma公司;一氧化氮合成酶阻断剂(nitric oxide synthase inhibitors, LNMA,批号:475886)、RNAiso Plus Reagent(批号:9108)、Prime ScriptTM reagent Kit(批号:R037A)、PCR扩增试剂盒(批号:639505)均购自大连宝生物公司;BCA蛋白定量试剂盒(索莱宝公司,批号:F8060);骨钙素(osteocalcin, OC)EIA Kit试剂盒(IDS公司,批号:H152);一氧化氮(NO)测定试剂盒(批号:A012-1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)测定试剂盒(批号:A059-2)、环磷酸鸟苷(cGMP)ELISA试剂盒(批号:A163)均购自南京建成生物工程公司;鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cy-clase, sGC)一抗(美国abcam公司,批号:ab155651);蛋白激酶G(PKG)一抗(Cell Signaling公司,批号:#3248)。

1.2 原代大鼠骨髓间充质细胞培养

大鼠骨髓间充质细胞培养依据文献方法进行操作^[6]。实验SD大鼠购于甘肃中医药大学动物实验中心,动物质量合格证号:SCXK(甘)2016-0006-152,一月龄SPF级SD大鼠,♀,2只,脱臼处死后,75%乙醇浸泡10 min,无菌条件下迅速剥离出股骨和胫骨,去除两端骨帽后用注射器抽取含肝素钠 $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DMEM/F12培养液反复冲洗骨髓腔,合并冲洗液反复吹打,使细胞团块尽量打散,收集细胞悬浮液150目细胞筛过滤,所得滤液基本上为单细胞悬液,调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的条件下培养,每3 d更换培养液1次,每次无菌PBS洗涤2次,待细胞生长融合至80%以上时,进行传代培养,传代3次进行后续药理活性实验。

1.3 MTT法测定药物浓度

大鼠骨髓间充质传代培养3次后调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种至96孔板中,接种培养

12 h后,依次加入不同浓度(1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的葛根素对其进行处理,药物处理48 h后加入0.5% MTT继续培养4 h,加入DMSO避光孵育10 min,490 nm处测定吸光值(OD)。

1.4 药物浓度筛选

传代培养至第3代的骨髓间充质细胞融合生长至80%以上时对其进行成骨性诱导培养(诱导条件为含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油钠、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸,同时加入不同浓度(1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的葛根素对其进行处理后的4 d和6 d测定ALP活性。

1.5 葛根素通过NO信号通路促进骨髓间充质细胞成骨性分化分组处理

传代培养至第3代的骨髓间充质细胞融合生长至80%以上时对其进行成骨性诱导培养,培养液含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油钠、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸,依据实验设计分为:对照组(只含等体积溶剂),葛根素组($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葛根素),LNMA组(含 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LNMA,浓度参考文献[7]),联合组(含 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葛根素及 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LNMA),每组重复3次。

1.5.1 ALP活性的测定 骨髓间充质细胞在葛根素处理后的第4,6天测定ALP活性。所有具体操作参见说明书,首先取出培养的骨髓间充质细胞PBS漂洗2次,按照1:1的比例分别加入基质液和缓冲液然后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴15 min后加入显色液,避光混匀后507 nm测定OD值,然后依据说明书换算成金氏单位。

1.5.2 OC含量测定 骨髓间充质细胞在葛根素处理后的第4,6天分别测定培养液中OC含量,收集细胞培养液后 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,检测OC含量。严格按照试剂盒测定,测定结束后,严格按照测定的OD值和标准品制作标准曲线。

1.5.3 钙化结节染色分析 葛根素处理大鼠骨髓间充质细胞第14天后,应用茜素红进行钙化结节染色。取出培养细胞PBS洗2遍,10%甲醛固定10 min。加入预先配制好茜素红染液进行染色,方法参考[6],加入茜素红染液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育1 h,流水漂洗,照相记录结果。

1.5.4 成骨相关基因检测分析 葛根素处理培养细胞 24 h 和 48 h 后, 提取总 RNA, 检测 Runx-2、OSX、BMP-2 和 Collagen-1 mRNA 表达水平。所用引物根据 Genbank 所发布的序列设计引物合成, 见表 1。总 RNA 的提取, 采用 Trizol 提取总 RNA, 取出培养细胞 PBS 漂洗 2 次, 加入 1 mL Trizol 冰上放置 15 min, 收集裂解液, 加入 200 μL 三氯甲烷前后颠倒混匀静置 5 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清液, 弃沉淀, 向上清液中加入等体积的异丙醇, 室温静置 15 min 后 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 弃上清, 获得 RNA 沉淀, 75%乙醇漂洗 2 次。无酶水溶解 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 紫外分光光度计检测纯度并计算浓度。调整总 RNA 的质量浓度至 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 严格按照试剂盒操作说明将其逆转录为 cDNA。将逆转录获得 cDNA 进行 PCR 扩增反应, 反应体系及其 PCR 的反应条件严格按照 TaKaRa 公司的试剂盒说明操作。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 PCR Primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Runx-2	上游 GCACCCAGCCATAATAGA	140
	下游 TTGGAGCAAGGAGAACCC	
OSX	上游 GCCTACTTACCCGTCTGACTTT	131
	下游 GCCCACTATTGCCAACTGC	
Collagen-I	上游 TTCCCGGTGAATTCGGTCTC	129
	下游 ACCTCGGATTCCAATAGGACCAG	
BMP-2	上游 ACCGTGCTCAGCTTCCAT-CAC	130
	下游 TTCCTGCATTTGTTCCCGAAA	
GAPDH	上游 TATCGGACGCCTGTTAC	140
	下游 CTGTGCCGTTGAACCTTGC	

1.5.5 NO 含量检测 葛根素处理体外的骨髓间充质细胞 24 h 后测定 NO 含量, 每次取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液, 测定培养液中硝酸盐的含量, 以硝酸盐含量来衡量 NO 的生成量。具体的操作按照 NO 试剂盒说明书, 将各样品加至 96 孔板中, 紫外分光光度计上测定 550 nm 处的 OD 值, 利用 NO 含量计公式计算出样本的 NO 含量。

1.5.6 cGMP 含量检测 葛根素处理培养细胞 24 h 后, 用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 漂洗培养细胞 3 次, 每 60 mm 细胞皿中加入 1.5 mL 0.25%胰蛋白酶消化收集细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 加 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS 涡旋震荡混匀, 沸水浴

10 min 冷却后, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 按照 cGMP ELISA 试剂盒操作详见说明进行。紫外分光光度 450 nm 处测定, 根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出浓度。

1.6 统计学方法

所有统计分析均采用 SPSS 16.0 统计软件完成, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 其中组间差异采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 Tukey 方法统计分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $P<0.01$ 表示差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葛根素骨髓间充质细胞增殖活性影响

葛根素处理骨髓间充质细胞 48 h 后, 从 $1\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐提高骨髓间充质细胞增殖, 然而 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增殖活性逐渐减弱。与对照组比较, $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组促进骨髓间充质细胞增殖能力最强($P<0.01$), 因此 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葛根素为最适药物浓度, 结果见图 1。

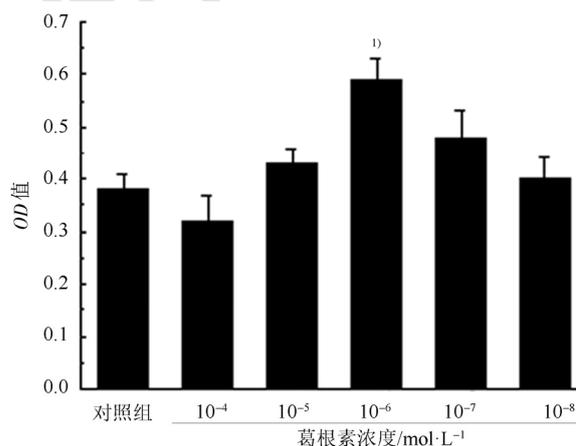


图 1 不同浓度葛根素对骨髓间充质细胞增殖活性的影响分析($n=6$)

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Different concentrations of puerarin effect on proliferation of bone marrow mesenchymal cells($n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

2.2 葛根素浓度筛选

葛根素处理骨髓间充质细胞第 6 天, 测定 ALP 活性, 实验结果显示, 葛根素对 ALP 活性影响存在浓度的依赖性。与对照组比较, $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 ALP 活性最高($P<0.01$), $1\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 其次($P<0.05$)。 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为葛根素促进骨髓间充质细胞成骨性分化最佳研究浓度, 后期实验均采

用 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为实验药物浓度, 见图 2。

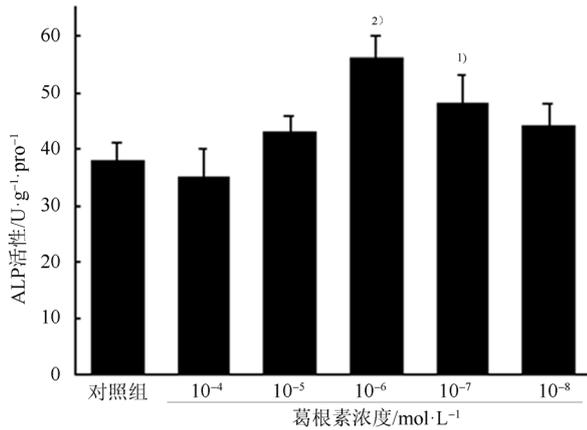


图 2 不同浓度葛根素对骨髓间充质细胞 ALP 活性的影响分析($n=3$)
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Different concentrations of puerarin effect on ALP activity of bone marrow mesenchymal cells($n=3$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.3 LNMA 对葛根素提高骨髓间充质细胞 ALP 活性的影响分析

葛根素干预骨髓间充质细胞第 4 天后, 与对照组、LNMA 和联合组比较, 葛根素组显著提高了骨髓间充质细胞中 ALP 活性($P<0.01$)。干预第 6 天, 葛根素组 ALP 活性显著高于对照组和联合组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 联合组 ALP 活性显著高于对照组和 LNMA 组($P<0.05$), 见图 3。

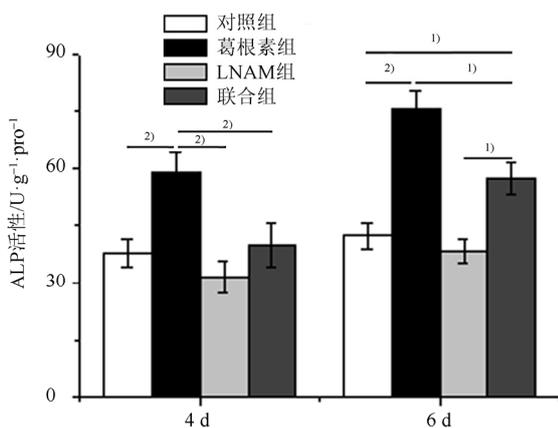


图 3 LNMA 对葛根素提高骨髓间充质细胞 ALP 活性的影响
¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 LNMA effect on puerarin improvement of ALP activity of bone marrow mesenchymal cells
¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.4 OC 含量分析结果

葛根素处理 LNMA 预骨髓间充质细胞第 4, 6

天后测定 OC 含量, 与对照组、联合组比较, 第 4 天葛根素处理组 OC 含量明显提高($P<0.05$), 第 6 天 OC 含量显著提高($P<0.01$), 见图 4。

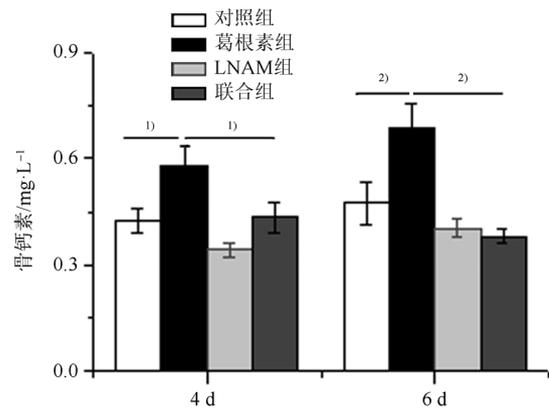


图 4 LNMA 对葛根素提高骨髓间充质细胞骨钙素含量的影响
¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 LNMA effect on puerarin improvement of osteocalcin content of bone marrow mesenchymal cells
¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.5 钙化结节染色分析结果

葛根素处理成骨性诱导培养的骨髓间充质细胞 14 d 后钙化结节茜素红染色结果见图 5, 葛根素组显著提高骨髓间充质细胞钙化能力, 而联合组钙化能力受到了显著抑制, 见图 5。

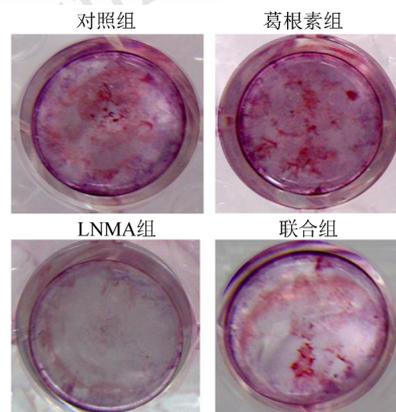


图 5 钙化结节茜素红染色影响分析结果

Fig. 5 Results effect of alizarin red staining on calcified nodules

2.6 成骨性相关因子 mRNA 表达分析

Runx-2、OSX、BMP-2 和 Collagen-I 均为成骨性分化重要的因子, 因此在葛根素处理后 24 h 和 48 h 提取总 mRNA 检测其表达水平。结果显示, 葛根素组 Runx-2 mRNA 的表达水平显著高于对照组和联合组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 以及联合组显著

高于对照组($P<0.05$); 葛根素组 OSX 的 mRNA 表达水平显著高于对照组和联合组($P<0.01$); 葛根素处理骨髓间充质细胞 24 h 后, 葛根素组 BMP-2 mRNA 表达水平显著高于对照组($P<0.01$), 而处理 48 h 后, 葛根素组显著高于对照组和联合组($P<0.01$); 葛根素处理骨髓间充质细胞 48 h, 葛根素组 Collagen-I mRNA 表达水平显著高于对照

($P<0.01$)。结果见图 6。

2.7 葛根素对 NO 信号通路的影响

葛根素组 NO 和 cGMP 含量高于对照组和联合组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见图 7, 然而使用 NO 信号通路阻断剂 LNAM 预处理骨髓间充质细胞后葛根素提高骨髓间充质干细胞成骨性分化能力显著受到抑制($P<0.05$)。

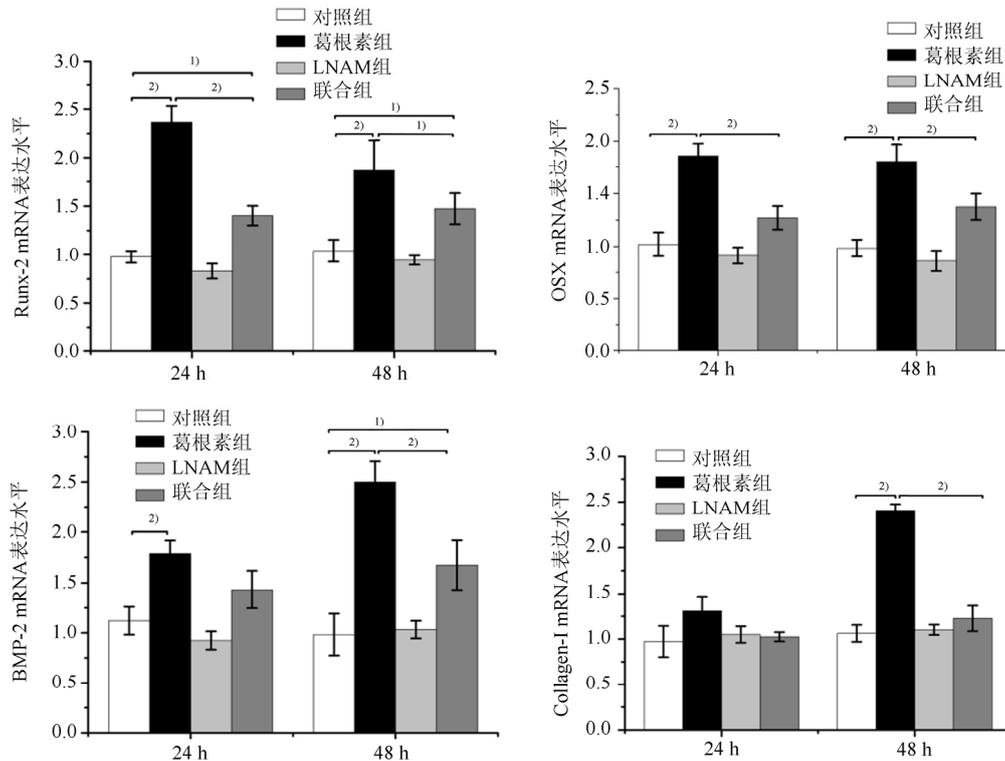


图 6 骨形成相关因子 mRNA 表达的影响($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Results bone formation related factor mRNA expression($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

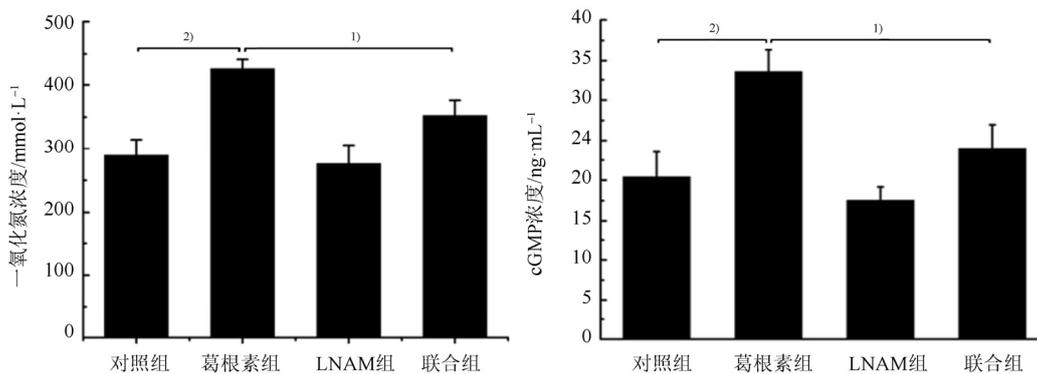


图 7 葛根素对 NO 和 cGMP 含量的影响($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 7 Results of puerarin effect on NO and cGMP contents($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.8 葛根素对 sGC 和 PKG 蛋白表达的影响

通过 Western blot 检测了葛根素对 sGC 和 PKG 蛋白表达的影响, 葛根素组 sGC 和 PKG 蛋白表达水平显著提高, 而联合组 sGC 和 PKG 蛋白的表达水平受到抑制。sGC 蛋白扫描分析结果显示, 与对照组和联合组比较, 葛根素组显著提高 sGC 蛋白的表达水平($P<0.01$); PKG 蛋白扫描分析结果显示, 与对照组和联合组比较, 葛根素组显著提高 PKG 蛋白的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 8。

3 讨论

骨质疏松症作为一种全身性系统性骨骼疾病严重威胁中老年人的健康, 因此骨质疏松症的预防和治疗成为一种研究热点, 尤其是抗骨质疏松症药物研发成为关注焦点。中草药葛根中提取的葛根素具有促进骨形成的作用, 但是其促进骨形成作用机制尚不完全清楚^[11-21]。前期的研究表明骨骼重建过程中骨形成作用主要是由成骨细胞完成, 成骨细胞主要是由骨髓间充质细胞分化而来, 那么葛根素是否具有促进骨髓间充质细胞分化为成骨细胞? 本文首先研究了不同浓度的葛根素对骨髓间充质细胞的增殖和成骨性分化的影响, $1\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葛根素能显著提高骨髓间充质细胞增殖以及 ALP 活性、OC 含量, 以及其增加钙

化能力, 提高成骨相关因子 mRNA 的表达水平, 然而 NOS 阻断却抑制了这一过程, 以及葛根素促进体外培养骨髓间充质细胞成骨性分化依赖于 NO 信号通路。

骨髓间充质细胞在骨代谢过程中扮演着骨形成的角色, 如果能有效地促进骨髓间充质细胞分化为成骨细胞, 那么就能促进骨形成。ALP 活性为骨形成标志性指标^[8], 因此本研究实验通过观察 ALP 活性获得促进骨髓间充质细胞成骨性分化的葛根素最适浓度为 $1\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

NO 参与调控多种生理过程包括骨重建过程^[9-10], 通常 NO 由分子氧和精氨酸单位末端氮在 NOS 的作用下产生。NO 可结合到可溶性 sGC 的血红素基团上, 增加该酶活性^[8], 由此引起 cGMP 水平升高, 从而导致 cGMP 依赖性蛋白激酶级联激活。NO 体外研究表明, 由成骨细胞自身产生的少量 NO 可能是成骨细胞内生长因子产生的调节剂^[11-12]。NO 的缓慢释放诱导体外成骨细胞的生长和分化^[12]。本研究观察了葛根素在促进体外培养骨髓间充质细胞分化过程中是否激活 NO 信号途径。本文首先使用 NO 合成酶阻断剂 LNMA 预处理骨髓间充质细胞后发现葛根素提高骨髓间充质细胞中 ALP 活性和 OC 含量的能力受到抑制, 以及其提高骨髓间

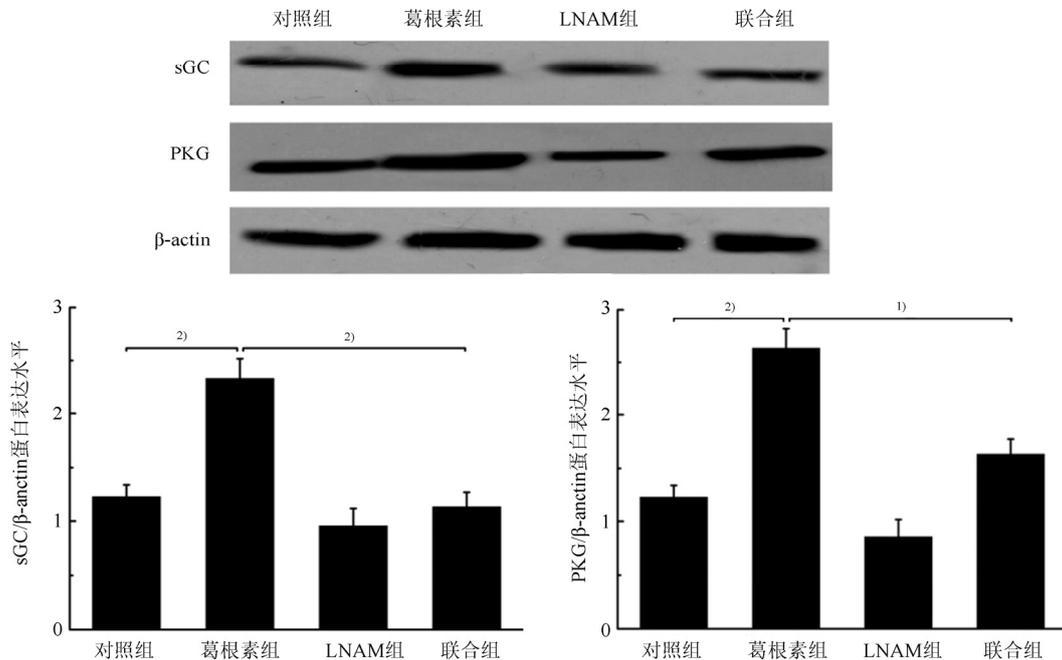


图 8 葛根素对 sGC 和 PKG 表达的影响的分析($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 8 Results sGC and PKG protein expression($n=3$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

充质细胞钙化能力和提高成骨相关因子 Runx-2、OSX、BMP-2 和 Collagen-I mRNA 表达水平受到抑制,但是试验结果提示 LNMA 并不能完全抑制葛根素促进体外培养骨髓间充质细胞成骨性分化,因此推断葛根素促进骨髓间充质细胞成骨分化通过 NO 信号通路并非其唯一作用途径。本实验进一步观察发现 NOS 活性被抑制后,葛根素提高骨髓间充质细胞 NO 和 cGMP 含量均受到抑制,因此进一步证明了葛根素在促进骨髓间充质细胞成骨性分化过程中需要 NO/cGMP/PKG/sGC 信号过程发挥作用。

骨髓间充质细胞在骨形成过程中扮演着重要的角色,因此实验应用骨髓间充质细胞作为研究的模式细胞,研究了葛根素对体外培养骨髓间充质细胞作用的药理活性,以及其促进成骨性分化分子机制,结果表明葛根素在促进体外培养骨髓间充质细胞成骨性分化过程中激活了 NO 信号通路,因此推测该机制为葛根素调节骨代谢可能机制之一,本研究为葛根及其有效成分促进骨形成药理活性机制和抗骨质疏松症药物研究奠定一定的基础。

REFERENCES

[1] 夏立武,金羊平,樊如强,等.药食同源之葛根的研究现状与进展[J].名医,2018,65(10):236-236.

- [2] ZHONG H B, GUO X, HUANG L H. Puerarin stimulates osteogenesis and bone formation through ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2019, 29(2): 78-83.
- [3] ZENG S L, SHI X B. Effects of puerarin on osteoporosis and PI₃K/AKT signaling pathway in ovariectomized female rats [J]. Hebei Med J(河北医药), 2018, 40(23): 3566-3569.
- [4] 张明. 葛根素对骨质疏松症治疗作用及机制的实验研究 [D]. 大理: 大理大学, 2016.
- [5] 洪禹利. 葛根对骨成长的关系与骨质疏松病患背痛临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2004.
- [6] 郑高利. 葛根异黄酮对骨质疏松症的防治作用及其机制研究 [D]. 杭州, 浙江大学博士论文, 2002.
- [7] ZHAI Y K, GUO X Y, GE B F, et al. Icariin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activating the PI₃K-AKT-eNOS-NO-cGMP-PKG [J]. Bone, 2014(66): 189-198.
- [8] 吴江群. 骨髓基质干细胞体内成骨分化研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [9] KALYANARAMAN H, SCHALL N, PILZ R B. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone [J]. Nitric Oxide, 2018(76): 62-70.
- [10] LI Q L, SUN H M, ZHANG M L. Nitric oxide, exercise and skeletal muscles [J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床康复), 2004, 8(290): 6456-6457.
- [11] GAO C Y, ZHAO J, HAN D M, et al. The relationship between nitric oxide and the clinical pathogenesis of osteoarthritis [J]. J Mudanjiang Med Univ(牡丹江医学院学报), 2011, 32(2): 36-38.
- [12] HOLLAS M A, AISSA M B, LEE S H, et al. Thatcher. Pharmacological manipulation of cGMP and NO/cGMP in CNS drug discovery [J]. Nitric Oxide, 2018, 2019(82): 59-74.

收稿日期: 2018-11-16

(本文责编: 曹粤锋)