

淫羊藿次苷 II 促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨性分化过程中 iNOS 活性和 NO 生成量的变化

翟远坤¹, 陈克明^{1*}, 葛宝丰¹, 马慧萍², 明磊国¹, 程国政¹

(兰州军区总医院 1. 骨科研究所, 2. 药材科, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 研究淫羊藿次苷 II (icariside II, ICS II) 对大鼠体外培养骨髓间充质干细胞 (rat bone marrow stromal cells, rBMSCs) 成骨性分化过程中诱导性一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) 表达及 NO 生成的影响。贴壁筛选法体外培养 rBMSCs, 待铺满 80% 皿底时, 进行成骨性诱导培养, 同时采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ICS II 进行药物干预, 比较 ICS II 组、L-NAME 组、ICS II + L-NAME 组和不加药的对照组之间的 iNOS 的活性、NO 生成量, 对比各组之间的成骨性指标, 包括碱性磷酸酶活性、碱性磷酸酶阳性克隆数 (CFU-F_{ALP}) 及钙化结节数量。提取总 RNA, 实时荧光定量 RCR (real-time PCR) 检测 Osterix (OSX)、Runx-2 及 iNOS mRNA 的表达情况; 同时提取总蛋白, Western blotting 法检测 I 型胶原蛋白和 iNOS 的分泌量。ICS II 可显著增强碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 增加钙化结节和 CFU-F_{ALP} 数量, 与成骨性分化相关的因子 OSX 和 Runx-2 的基因表达量也显著升高, 同时 I 型胶原的分泌量也明显增多, 但这些效应均可被 iNOS 的特异性抑制剂 L-NAME 所抑制。ICS II 可显著促进 rBMSCs 的成骨性分化, 但采用 L-NAME 进行阻断后, 随着 iNOS 和 NO 表达的降低, 成骨性分化的指标随之降低, 提示 ICS II 是通过提高 iNOS 活性, 促进 NO 的生成来刺激 rBMSCs 的成骨性分化的。

关键词: 淫羊藿次苷 II; 骨髓间充质干细胞; 成骨性分化; 诱导性一氧化氮合酶; 一氧化氮

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0383-07

The changes of iNOS and NO in the osteogenic differentiation process of rat bone marrow stromal cells promoted by icariside II

ZHAI Yuan-kun¹, CHEN Ke-ming^{1*}, GE Bao-feng¹, MA Hui-ping², MING Lei-guo¹, CHENG Guo-zheng¹

(1. Institute of Orthopaedics, 2. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Lanzhou 730050, China)

Abstract: This study is to investigate the effects on the expression of iNOS and production of NO in the osteogenic differentiation process of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) by icariside II. rBMSCs were cultured by adherence screening method. When the culture dishes were covered with 80% cells, the osteogenic induced cultures were adopted. Icariside II was supplemented into the culture at $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The activity of iNOS, content of NO and osteogenic differentiation markers including alkaline phosphatase (ALP) activity, CFU-F_{ALP} and mineralized bone nodules were compared among the icariside II-supplemented group, L-NAME group, icariside II + L-NAME group and the control. Total RNA was isolated and the gene expression of iNOS, Osterix and Runx-2 was investigated by real-time PCR. Total protein was also isolated and the secretion of iNOS and collagen I was examined by Western blotting. Icariside II can significantly improved ALP activity, CFU-F_{ALP} amount and mineralized nodules. Besides, the mRNA level of factors related to the osteogenic differentiation includes Osterix and Runx-2 also enhanced. The secretion of collagen I also promoted significantly.

收稿日期: 2010-09-28.

基金项目: 甘肃省科技重大专项计划资助项目 (092NKDA025).

*通讯作者 Tel: 86-931-8994327, Fax: 86-931-8994950, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

But all of these effects can be inhibited by *L*-NAME which can specifically inhibit the activity of iNOS. Icariside II enhances the osteogenic differentiation of rBMSCs significantly, but if the activity of iNOS was blocked by *L*-NAME, the osteogenic differentiation markers decrease accompanied with iNOS and NO decrease, suggesting that icaricidin II stimulates the osteogenic differentiation via enhancing the activity of iNOS and promoting the generation of NO.

Key words: icaricidin II; bone marrow stromal cell; osteogenic differentiation; iNOS; NO

淫羊藿是小檗科淫羊藿属多种植物的干燥地上部分,具有补肾壮阳、强筋健骨之功效,是中医治疗骨质疏松方剂中使用频率最高的中草药之一^[1, 2]。淫羊藿的主要化学成分是黄酮类化合物,尤以淫羊藿苷 (icariin, ICA) 的含量最高。陈克明等^[3-6]报道,ICA可抑制体外培养破骨细胞的骨吸收活性,促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化。ICA常通过口服方式给药,经肠道细菌分解会产生多种代谢产物,其中最主要的代谢产物为淫羊藿次苷 II (icaricidin II, ICS II)^[7, 8]。作者的前期研究表明,此代谢产物的促骨形成活性高于原药,应是 ICA 在其体内发挥生理活性的主要形式^[9],结构式见图 1。关于 ICA 的作用机制,许多人认为是植物雌激素样作用,作者采用 ICS II 的研究结果表明,在 rBMSCs 的成骨性分化过程中,ICA 的体内代谢产物 ICS II 可以提高 iNOS 的活性,促进 NO 的生成,从而激活 NO 信号途径,此应是其主要作用机制之一。

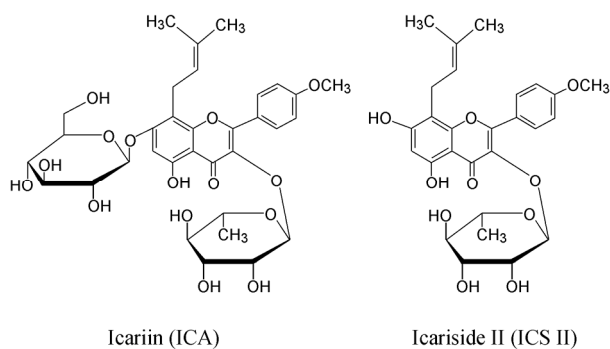


Figure 1 Chemical structures of ICA and ICS II

材料与方法

实验材料、试剂和仪器 体重 (150 ± 20) g 的雄性 Wistar 大鼠 4 只,购自甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心,动物质量合格证号 SCXK(甘)2004-0006-152。

DMEM/F12 培养基 (Gibco, USA); 甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸 (ASAP)、地塞米松、茜素红、*N*^w-硝基-*L*-精氨酸甲酯 (*N*^w-nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME) 及二甲基亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma 公

司; 类标准胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司); 淫羊藿次苷 II (ICS II, 上海融禾医药科技发展有限公司, 纯度 >98%)。碱性磷酸酶测定试剂盒与 NOS 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。硝酸盐测定试剂盒 (Molecular Probes, USA), RNAiso Reagent、反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶以及 Easy Dilution 稀释液均购自 TaKaRa 公司。引物由 TaKaRa 公司设计合成。I 型胶原和 β -actin 一抗购自 Abcam 公司。iNOS 一抗购自 CST 公司。辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥公司。

CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Revco, USA); 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本); 紫外分光光度计和台式高速冷冻离心机 (Heraeus, 德国); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, USA); 电泳仪、电转移仪和酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

大鼠骨髓间充质干细胞的培养 大鼠骨髓间充质干细胞培养方法基本依据文献^[3]报道。将大鼠颈椎脱臼处死,无菌条件下迅速剥离出股骨和胫骨,去两端骨髓,用 12 号针头抽取一定量的 DMEM/F12 培养液 (含肝素钠 500 u·mL⁻¹),注入骨髓腔内,完全冲出骨髓,合并冲出液,用滴管反复吹打,使细胞团块尽量打散。150 目滤网过滤 3 次,所得滤液基本上为单细胞悬液,进行细胞计数后,调整细胞数为 1.0 × 10⁷/mL,以每孔 2 mL 接种于 6 孔板或每孔 1 mL 接种于 12 孔板 (Nunc 公司),培养液中含 12% 胎牛血清。在 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的条件下培养 60 h,弃培养液,用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗涤 2 遍,换新鲜的 DMEM/F12 培养液 (含 12% 胎牛血清) 继续培养。此后每 3 天换液 1 次,待细胞铺满 80% 以上皿底时,进行成骨性诱导 (诱导条件为含 0.1 mol·L⁻¹ β -甘油磷酸钠、1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 地塞米松和 50 mg·L⁻¹ ASAP)。同时进行实验分组: ICS II 组 (培养液中含 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ ICS II), *L*-NAME 组 (含 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ *L*-NAME), ICS II + *L*-NAME 组 (含 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ ICS II 及 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ *L*-NAME), 对照组 (只含等体积溶剂,每毫升培养液含 DMSO 1 μ L)。每组平行做 4 份。

iNOS 活性测定 各组分别于成骨性诱导培养第 0.5、1、2、4 和 8 天, 测定细胞的 iNOS 活性。具体方法如下: 弃培养液, PBS 洗 2 次, 每孔加入抑制剂 50 μL , 底物缓冲液 100 μL , 促进剂 5 μL , 显色剂 50 μL , 混匀; 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 后, 加入透明剂 50 μL 和终止液 1 mL 进行显色; 显色后在紫外分光光度计上测定 530 nm 处的吸收度值, 根据公式换算出 iNOS 的活性。

NO 生成量检测 于成骨性诱导培养第 0.5、1、2、4 和 8 天, 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。具体方法如下: 将 *N*-1-萘基乙二胺 (组分 A) 和硫酸 (组分 B) 等体积混合, 96 孔板中每孔加入混合液 20 μL , 样本及稀释好的标准液 150 μL , 最后各孔加入三蒸水 130 μL , 混匀, 室温孵育 30 min; 紫外分光光度计上测定 548 nm 处的吸收度值, 依据所作标准曲线, 计算出样本的硝酸盐含量。

ALP 活性测定 各组于成骨性诱导培养第 4、8、12 天测定 ALP 活性, 具体方法如下: 弃培养液, PBS 洗 2 次, 每孔加入缓冲液和基质液各 0.3 mL 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 加入显色液 0.9 mL, 显色后在紫外分光光度计上测定 507 nm 处的吸收度值; 根据酚标准及样本的吸收度值, 计算酶活性, 结果以每孔 15 min 内产生的酚的摩尔量表示。

碱性磷酸酶阳性克隆 (CFU-F_{ALP}) 分析 于成骨性诱导培养第 8 天, 采用偶氮偶合法进行碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 组织化学染色。PBS 洗 2 遍, 10% 甲醛固定液处理 1 min, 转入基质溶液中 15 min 左右 (pH 8.9 的 Michaelis 氏巴比妥-HCl 缓冲液 20 mL 中含 α -萘基磷酸钠和固蓝 RR 盐各 20 mg)。当出现褐色斑点时即弃基质液, PBS 液冲洗后重新转入固定液中, 照相保存结果。

钙化结节分析 于成骨性诱导第 12 天, 采用茜素红染色法进行钙化结节的组织化学染色。PBS 洗 2

遍, 10% 甲醛固定 5 min。加入茜素红染色剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 肉眼或镜下观察矿化结节的形成情况。照相保存结果。

实时荧光定量 PCR 分析^[6,9] 总 RNA 的提取采用 Trizol 一步法进行, 紫外分光光度计检测浓度, 并用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。调整总 RNA 的质量浓度至 500 ng· μL^{-1} , 10 μL 逆转录体系取总 RNA 1 μL 。逆转录体系、PCR 扩增体系及反应条件均参照说明书设定。以标本中所提取的质量较好的 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为标准品, 经等比稀释后, 进行 PCR 反应制备标准曲线。反应结束后, 根据自动生成的标准曲线, 计算出待测样本中管家基因和目的基因的准确含量。以同一样本中, 目的基因与管家基因含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标。引物由 TaKaRa 公司根据 GenBank 所发布的序列设计并合成 (表 1)。

Western blotting 分析 于加药干预并诱导 8 天检测 iNOS 蛋白和 I 型胶原蛋白表达量。步骤如下: 将培养液吸出, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 漂洗 2 遍后, 加入 500 μL 的细胞裂解液 (50 mmol· L^{-1} Tris-HCl (pH 8.0)、150 mmol· L^{-1} NaCl、100 mg· L^{-1} PMSF、1 mg· L^{-1} 抑蛋白酶肽、1% Tween-20、0.5% 去氧胆酸钠、1% SDS) 于冰上静置 30 min, 使细胞充分裂解。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r·min $^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 用 BCA 法对总蛋白浓度进行定量; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 各组取含 50 μg 蛋白质样品, 经 15% SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 2% 脱脂奶粉室温下摇床振荡封闭 2 h, 然后加入 β -actin 和 iNOS (或 I 型胶原) 的一抗 (均为 1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:3 000 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 每进行下一步实验前, PVDF 膜均用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBST 摇床漂洗 3 次, 每次 10 min; 用增强化学发光法检测目的蛋白, X 光片的曝光时间依据实验效果而定, 灰度值使用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描测定, 重复 3 次。

Table 1 The primer sequence of real-time PCR

Gene	GenBank No.	Primer sequence		Product length/bp
iNOS	NM_012611.3	Forward	5'-CTCACTGTGGCTGTGGTCACCTA-3'	101
		Reverse	5'-GGGTCTTCGGGCTTCAGGTTA-3'	
OSX	NM_001037632.1	Forward	5'-GCCTACTTACCCGTCTGACTTT-3'	131
		Reverse	5'-GCCCCACTATTGCCAACTGC-3'	
Runx-2	NM_053470.1	Forward	5'-GCACCCAGCCCATAATAGA-3'	165
		Reverse	5'-TTGGAGCAAGGAGAACCC-3'	
GAPDH	NM_017008.3	Forward	5'-TATCGGACGCTGGTTAC-3'	140
		Reverse	5'-CTGTGCCGTTGAACTTGC-3'	

统计学分析 测定结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 进行单因素方差分析。

结果

1 iNOS 活性的变化

诱导培养 0.5 天后, iNOS 的活性达到较高值, ICS II 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。1 天后 iNOS 活性有所下降, 但仍显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。在此后设定的各时间点, 各组 iNOS 活性基本保持恒定, 但仍以 ICS II 组为最高。见图 2。

2 NO 分泌量的变化

诱导 0.5 天后 NO 生成量达到较高值, 且组间差异较大, ICS II 组显著高于其余各组。L-NAME 组与对照组无明显差异, 但除了 4 和 8 天, ICS II + L-NAME 组明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

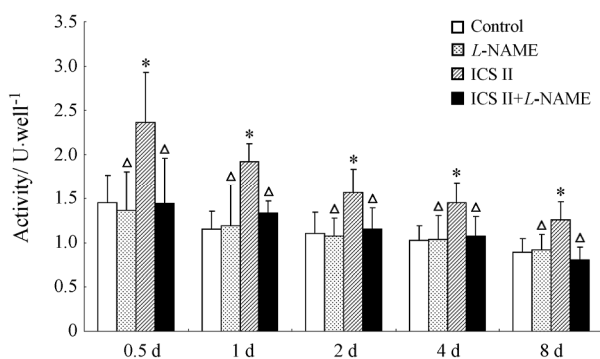


Figure 2 The iNOS activity after different durations of osteogenic induction culture ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). iNOS activity in ICS II group is higher than L-NAME and control group, but after being blocked by L-NAME, its activity decreased significantly. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs ICS II group

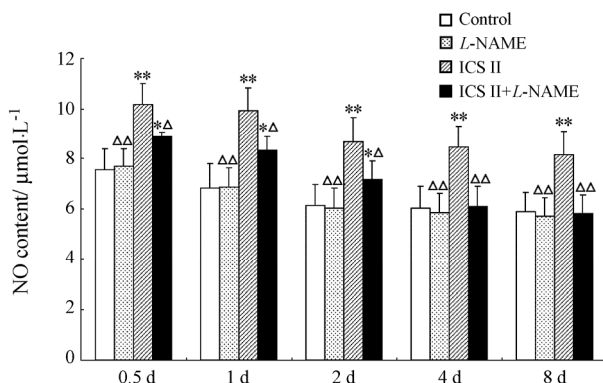


Figure 3 The NO content after different durations of osteogenic induction culture ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). This content is nitrate content indeed, but it can represent the NO generation. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

3 ALP 活性分析

ALP 活性于诱导培养第 8 天达到最高值, 12 天后趋于下降。在不同时间点, ICS II 组的 ALP 活性始终高于对照组、L-NAME 组和 ICS II + L-NAME 组, 而对照组、L-NAME 组与 ICS II + L-NAME 组无显著差异。见图 4。

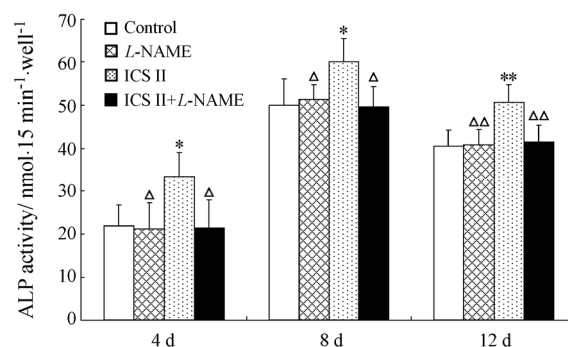


Figure 4 The ALP activity after different days of osteogenic induction culture ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). The activity in day 8 is the highest among different times. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

4 CFU-F_{ALP} 数量的变化

如图 5 所示, 成骨性诱导培养 8 天后 ICS II 组的碱性磷酸酶阳性克隆 (CFU-F_{ALP}) 数明显多于对照组和 L-NAME 组; 进行灰度扫描, ICS II 组 CFU-F_{ALP} 的面积、数量和相对灰度均显著高于其他各组。灰度越高表明染色越深, 说明酶活性越高。阻断 ICS II 组的 NO 生成, CFU-F_{ALP} 的面积、数量和相对灰度都明显下降, 差异具有统计学意义。灰度扫描结果见表 2。

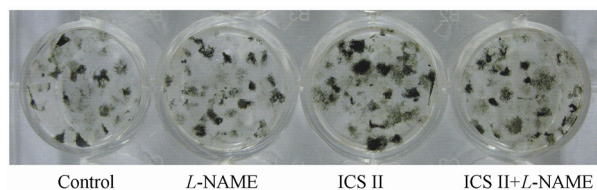


Figure 5 Results of CFU-F_{ALP} after 8 days of osteogenic induction culture. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

5 钙化结节形成情况

如图 6 所示, ICS II 组的钙化结节明显多于其他组, 阻断 NO 的产生, 会明显影响钙化结节的形成。灰度扫描显示类似结果 (表 3)。

6 成骨相关基因表达情况

6.1 iNOS mRNA 表达量的变化 iNOS mRNA 在成骨性诱导培养 12 h 后达到最高值, 此后趋于下降。

Table 2 Results of CFU-F_{ALP} after 8 days of osteogenic induction culture (intensity scanning). $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. One spot indicates one CFU-F_{ALP}. IOD indicates the intensity of calcified nodules' formation. L-NAME: 1×10^{-4} mol·L⁻¹; ICS II: 1×10^{-5} mol·L⁻¹. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

Group	Area (mm ² /well)	Number (CFU-F _{ALP} /well)	IOD
Control	45.925 ± 11.383	145.667 ± 9.609	27 177.837 ± 6 001.791
L-NAME	46.679 ± 9.829 $\Delta\Delta$	154.667 ± 8.145 $\Delta\Delta$	27 740.426 ± 4 978.376 $\Delta\Delta$
ICS II	106.599 ± 19.127**	193.667 ± 14.572**	70 823.477 ± 9 322.225**
ICS II + L-NAME	74.924 ± 17.849 $\Delta\Delta$	164.667 ± 8.021 $\Delta\Delta$	44 228.996 ± 8 427.451* $\Delta\Delta$

Table 3 Results of calcified nodules after 12 days of osteogenic induction culture (intensity scanning). $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. One red spot represents one calcified nodules. L-NAME: 1×10^{-4} mol·L⁻¹; ICS II: 1×10^{-5} mol·L⁻¹. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

Group	Area (mm ² /well)	Number (calcified nodules/well)	IOD
Control	22.227 ± 1.518	100.333 ± 5.859	12 029.901 ± 516.735
L-NAME	18.391 ± 3.149 $\Delta\Delta$	82.333 ± 9.292* $\Delta\Delta$	8 979.233 ± 1 002.738* $\Delta\Delta$
ICS II	51.313 ± 5.500**	113.333 ± 8.622	25 323.128 ± 1 743.818**
ICS II + L-NAME	29.199 ± 3.766 $\Delta\Delta$	93.000 ± 9.000 Δ	15 819.866 ± 1 325.050** $\Delta\Delta$

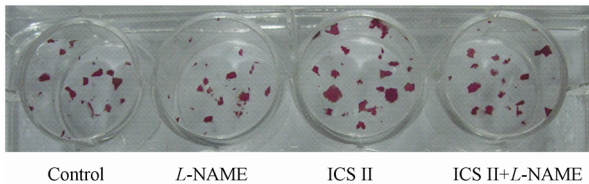


Figure 6 Results of calcified nodules after 12 days of osteogenic induction culture. L-NAME: 1×10^{-4} mol·L⁻¹; ICS II: 1×10^{-5} mol·L⁻¹

ICS II 组的 iNOS mRNA 水平始终高于其余各组, 在 12 和 24 h, 差异具有统计学意义。除 48 h 外, ICS II + L-NAME 组低于 ICS II 组, 但高于 L-NAME 组。见图 7。

6.2 Runx-2 mRNA 表达量分析 Runx-2 mRNA 在诱导培养 24 h 后达到最高值, 随后缓慢下降。在不同时间点, ICS II 组的 Runx-2 mRNA 水平均较高, 阻断 NO 的生成, Runx-2 mRNA 的表达下降比较明显。尤以 24 h 时的差异最为显著 ($P < 0.01$)。见图 8。

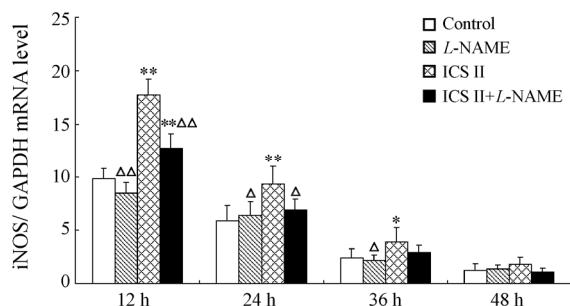


Figure 7 Expression of iNOS after different durations of osteogenic induction ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). L-NAME: 1×10^{-4} mol·L⁻¹; ICS II: 1×10^{-5} mol·L⁻¹. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

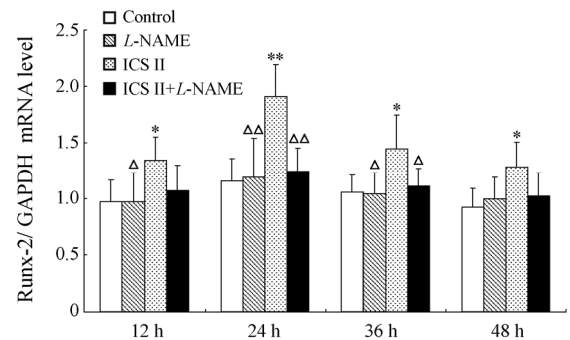


Figure 8 Expression of Runx-2 after different durations of osteogenic induction ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). L-NAME: 1×10^{-4} mol·L⁻¹; ICS II: 1×10^{-5} mol·L⁻¹. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

6.3 OSX mRNA 表达量分析 OSX mRNA 在诱导 12 h 后达到最高值, 此后显示快速下降趋势。与 ICS II 组相比, 除 48 h 外, 其他各时间点对照组和 L-NAME 组的 OSX mRNA 水平均明显较低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。阻断 ICS II 组 NO 的生成, 会明显抑制 OSX mRNA 的表达, 除 48 h 外, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 9。

7 Western blotting 分析

7.1 iNOS 蛋白表达量分析 如图 10 所示, 药物干预并成骨诱导 8 天后, ICS II 组的 iNOS 蛋白表达量显著高于其他各组, 对照组、L-NAME 组和 ICS II + L-NAME 组之间虽有差别, 但无统计学意义。

7.2 I 型胶原蛋白表达量分析 如图 11 所示, 成骨诱导 8 天后, I 型胶原蛋白的表达仍然以 ICS II 组为最高, 其余各组明显较低, 且 ICS II + L-NAME 组显著低于对照组和 L-NAME 组 ($P < 0.05$)。

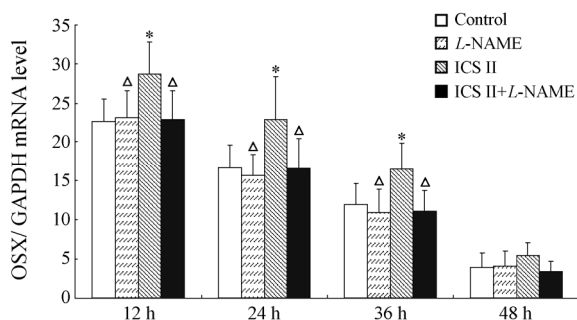


Figure 9 Expression of OSX after different durations of osteogenic induction ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$). L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs ICS II group

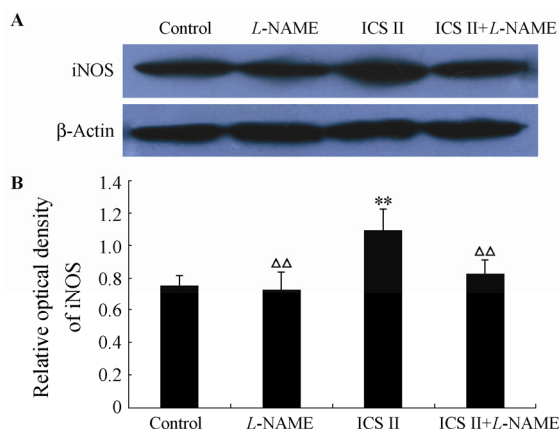


Figure 10 iNOS secretion after 8 days of osteogenic induction culture. In part A, the intensity of bands indicates the amount of protein secretion, part B is the scanning result of part A. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

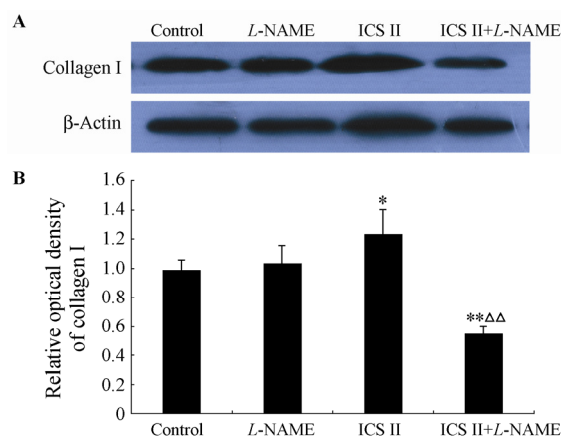


Figure 11 Collagen I secretion after 8 days of osteogenic induction culture. In part A, the intensity of bands indicates the amount of protein secretion, part B is the scanning result of part A. L-NAME: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ICS II: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs ICS II group

讨论

NO 信号分子是近年来的明星分子, 有着多种药理活性^[10], 且淫羊藿苷生物活性的发挥与其也有密切联系。刘武江等^[11]报道, 淫羊藿苷可增加 ED 模型大鼠阴茎海绵体中 iNOS 的 mRNA 和蛋白的表达, 对勃起功能障碍有一定的治疗效果。朱丹雁等^[12]报道, 淫羊藿苷可激活 NO 信号通路, 促进小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化。提示淫羊藿苷可能通过 NO 信号途径发挥其生理活性, 但有关淫羊藿次苷 II 是否是通过 iNOS/NO 信号通路促进 rBMSCs 的成骨性分化, 目前还未见报道。本研究考察了淫羊藿苷的主要代谢物——ICS II 对 rBMSCs 成骨性分化的影响, 并检测了在此过程中 iNOS 和 NO 的变化情况, 表明 ICS II 对 rBMSCs 成骨性分化的促进作用与 NO 信号通路密切相关。

骨髓间充质干细胞是骨髓中成骨细胞的祖细胞, 对其成骨性分化能力的研究一直是骨质疏松基础研究领域的一大热点。常用的检测指标包括碱性磷酸酶活性、钙化结节数量、OSX 及 Runx-2 等转录因子的表达量和 I 型胶原的分泌量等。其中碱性磷酸酶是最为常见的指标, 其活性的高低直接表征着成骨性分化的程度, 而钙化结节的数量可代表最终矿化的程度。OSX 是骨形成过程中必需的转录因子。骨髓基质干细胞分化为成骨细胞必须有 OSX 的参与, 其基因突变或缺失可导致骨发育延迟或停止^[13]。Runx-2 是促间充质干细胞向成骨细胞方向分化的早期调控基因, 如阻断成熟成骨细胞中 Runx-2 的表达, 可使成骨细胞标志物 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素等的表达下降, 并阻断成骨过程^[14]。Runx-2 与 OSX 也有一定的联系, OSX 的表达离不开 Runx-2 的存在, 是其表达所必需的因子^[15, 16]。I 型胶原的分泌则有利于矿化物质的沉积附着, 可以促进钙化结节的形成。NO 是生物体内非常重要的信号分子, 是 NO 信号通路激活与否的关键信使。通过对成骨性分化指标以及 NO 的检测, 可以明确 ICS II 和 NO 在 rBMSCs 成骨性分化过程中的关系, 为新药的设计和开发提供依据。

本实验证明了 ICS II 可明显促进 rBMSCs 的成骨性分化, 具体表现在明显增强碱性磷酸酶活性, 增加 CFU-F_{ALP} 及钙化结节数量, OSX、Runx-2 的基因表达和 I 型胶原的分泌也有显著提高, 这些指标均与 rBMSCs 的成骨性分化密切相关。在检测成骨指标的同时, 还发现 ICS II 可显著增强 iNOS 活性, 促进其

基因和蛋白的表达, 而且下游重要的信号分子 NO 的水平也有大幅度的提高。采用 iNOS 的特异性抑制剂 *L*-NAME^[17] 抑制 iNOS 活性, 从而降低 NO 的生成, 结果表明 ICS II 促进 rBMSCs 成骨性分化的过程会受到强烈影响, 碱性磷酸酶活性、钙化结节数量、OSX 及 Runx-2 等转录因子的表达量和 I 型胶原的分泌量等均有不同程度的下降, 对成骨性分化的促进作用可以大部分被阻断剂 *L*-NAME 所抑制, 表明 iNOS 活性及 NO 的分泌量对 rBMSCs 的成骨性分化有直接影响。另外发现, *L*-NAME 组虽然各项成骨性分化指标也有所下降, 但与对照组相比差别不大, 从而证明了 ICS II 通过提高 iNOS 的活性, 刺激 NO 的生成, 激活 NO 信号通路来发挥其促进骨形成的作用。

总之, 本研究首次发现, ICS II 通过激活 NO 信号途径发挥其促进骨形成的作用, 表明除研究较多的雌激素信号通路外, NO 信号途径也是其发挥药理活性的重要途径之一。

References

- [1] Liu M, Liu HP, Lu XM, et al. Simultaneous determination of icariin, icariside II and osthole in rat plasma after oral administration of the extract of Gushudan (a Chinese compound formulation) by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860: 113–120.
- [2] Qin LP, Han T, Zhang QY. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118: 271–279.
- [3] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icariin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. *Pharmazie*, 2005, 60: 939–941.
- [4] Chen KM, Ge BF, Liu XY, et al. Icariin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture [J]. *Pharmazie*, 2006, 62: 388–391.
- [5] Zhai YK, Li ZF, Cheng GZ, et al. Current status of the anti-osteoporosis mechanism of icariin [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2009, 15: 543–545.
- [6] Zhai YK, Ge BF, Ma HP, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 3219–3222.
- [7] Qiu F, Chen YJ, Kano YH, et al. Metabolism of orally administered icariin in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34: 222–226.
- [8] Xu W, Zhang YP, Yang M, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 667–672.
- [9] Zhai YK, Ge BF, Chen KM, et al. Comparative study on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by icariin and icariside II [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2010, 33: 1896–1900.
- [10] Zhang YH, Peng SX. Advances in the study of nitric oxide-donating drugs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, 44: 1200–1210.
- [11] Liu WJ, Xin ZC, Xin H, et al. Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats [J]. *Asian J Androl*, 2005, 7: 381–388.
- [12] Zhu DY, Lou YJ. Icariin-mediated expression of cardiac genes and modulation of nitric oxide signaling pathway during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 311–320.
- [13] Yu XQ, Zhang L. Current status of the effects on osteoblast differentiation by Osterix [J]. *J North China Coal Med Coll* (华北煤炭医学院学报), 2007, 9: 44–45.
- [14] Li YL, Xiao ZS. Runx-2 regulation and its isoforms [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2006, 22: 1153–1157.
- [15] Sun DM, Liu ZB, Zhao Y, et al. Runx-2 is involved promoter activity in regulating osterix and gene expression [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2006, 33: 957–964.
- [16] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, 108: 17–29.
- [17] Zhao HY, Shimokawa HA. Pharmacological actions and chronic vascular effects of *N*^ω-nitro-*L*-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthase [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34: 646–651.