

引用:郭柏铭,刘文松,孙丹,谢秋雯,洪莉,陈小香,程志安.健骨二仙丸对氧化应激致衰老骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及p16^{INK4}、p21^{CIP1}、p53表达的影响[J].中医导报,2025,31(11):14-19.

健骨二仙丸对氧化应激致衰老骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及p16^{INK4}、p21^{CIP1}、p53表达的影响*

郭柏铭¹,刘文松¹,孙丹¹,谢秋雯¹,洪莉¹,陈小香¹,程志安²

(1.广州白云山医院,广东 广州 510515;

2.广东省中医院,广东 广州 510120)

[摘要] 目的:研究健骨二仙丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)氧化应激损伤衰老后的细胞代谢活力、凋亡及衰老相关基因表达的影响。方法:采用全骨髓贴壁法培养BMSCs;流式细胞仪检测BMSCs表面标记物CD29、CD34、CD44、CD45、CD90。采用传统造模剂H₂O₂,以浓度500 μmol/L H₂O₂处理BMSCs 24 h诱导细胞氧化应激衰老模型建立;β-半乳糖苷酶染色确定BMSCs衰老模型的成功建立;健骨二仙丸含药血清干预氧化损伤衰老的BMSCs,采用MTT法分别检测健骨二仙丸含药血清对氧化衰老BMSCs 24、48、72 h后代谢活力的影响;运用流式细胞仪技术检测药物作用于衰老BMSCs 24 h后细胞凋亡情况;以反转录荧光定量技术(RT-q real-time PCR)观察衰老相关基因p16^{INK4}、p21^{CIP1}、p53表达水平的变化。结果:通过应用0.5 mmol/L浓度的H₂O₂作用24 h后可使BMSCs在形态学上有衰老的改变,β-半乳糖苷酶染色阳性率大于90%;以5%浓度健骨二仙丸含药血清作用衰老的BMSCs 24、48 h和10%药物浓度作用24 h后,可促进细胞增殖($P<0.05$),而20%药物浓度作用BMSCs 48 h有抑制其增殖的作用($P<0.05$);以10%含药血清浓度作用老化的BMSCs 24 h可抑制细胞凋亡($P<0.05$),下调衰老相关基因p21^{CIP1}与p53的表达($P<0.05$),而p16^{INK4}的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:健骨二仙丸对氧化衰老BMSCs有明显促进增殖,增强大鼠BMSCs的代谢,其凋亡率明显降低,在衰老相关基因p21^{CIP1}、p53表达方面也达到一定调节作用,发挥抗氧化衰老作用是通过多种途径完成的。

[关键词] 健骨二仙丸;氧化应激;衰老;骨髓间充质干细胞;增殖;凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)11-0014-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.11.003

Effects of Jiangu Erxian Pills (健骨二仙丸) on the Proliferation, Apoptosis, and Expression of p16^{INK4}, p21^{CIP1}, and p53 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Aging Induced by Oxidative Stress

GUO Boming¹, LIU Wensong¹, SUN Dan¹, XIE Qiwen¹, HONG Li¹, CHEN Xiaoxiang¹, CHENG Zhi'an²

(1.Baiyunshan Hospital, Guangzhou Guangdong 510515, China;

2.Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510120, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of serum containing Jiangu Erxian pills on metabolic activity, apoptosis, and the expression of senescence-associated genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after oxidative stress-induced senescence. Methods: BMSCs were cultured using the whole bone marrow wall method. Flow cytometry was used to detect surface markers CD29, CD34, CD44, CD45 and CD90 on BMSCs. An oxidative stress-induced senescence model was established by treating BMSCs with 500 μmol/L H₂O₂ for 24 hours. Successful establishment of the BMSCs senescence model was confirmed by β-galactosidase staining. BMSCs with oxidative damage and senescence were treated with Jiangu Erxian pills containing active ingredients,

*基金项目:国家自然科学基金项目(30772817);广东省自然科学基金项目(2015A030313343)

通信作者:程志安,男,主任医师,研究方向为中医药防治骨质疏松症

and the effects of the drug-supplemented serum on metabolic activity of oxidatively aged BMSCs were detected by MTT assays at 24, 48, and 72 h. Apoptosis in senescent BMSCs was assessed by flow cytometry after 24 hours of drug intervention. Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-q real-time PCR) was used to observe changes in p16^{INK4} and p21^{CIP1} and p53 expression levels related to senescence. Results: Treatment with 0.5 mmol/L H₂O₂ for 24 hours induced morphological changes of senescence in BMSCs, with a β -galactosidase positive staining rate exceeding 90%. Treatment with 5% concentration of Jiangu Erxian Pills containing active ingredients for 24 h and 48 h and 10% drug concentration for 24 h promoted cell proliferation ($P<0.05$). However, a 20% concentration inhibited proliferation after 48 hours ($P<0.05$). Treatment with 10% drug-containing serum for 24 hours significantly inhibited apoptosis ($P<0.05$) and downregulated the expression of p21^{CIP1} and p53 ($P<0.05$), while no statistically significant difference was observed in p16^{INK4} expression ($P>0.05$). Conclusion: Jiangu Erxian pills can promote the proliferation of oxidatively aged BMSCs, enhance the metabolism of rat BMSCs, markedly reduce their apoptosis rate, and achieve certain regulatory effects on the expression of aging-related genes p21^{CIP1} and p53. The antioxidant and anti-aging effects are achieved through multiple pathways.

[Keywords] Jiangu Erxian pill; oxidative stress; senescence; bone marrow mesenchymal stem cells; proliferation; apoptosis

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类主要来源于骨髓腔和脂肪组织的成体干细胞,是干细胞家族的重要成员^[1]。存在于骨髓中又称之为骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。当BMSCs老化后,其定向分化、增殖能力发生障碍时是引发骨质疏松症(osteoporosis, OP)的重要因素之一^[2]。随着人体年龄的增长,机体的衰老,全身相关机能逐渐衰退,人体抗氧化系统失去了原有的平衡,进而激化了人体内氧化应激状态^[3]。这种氧化应激状态可以使骨髓内微环境发生劣变,致使BMSCs成骨分化功能减退,更趋向于分化为脂肪细胞而不是成骨细胞,体内骨含量逐渐流失,从而引起骨质疏松症的发生^[4]。这个发病过程与骨髓内微环境的改变以及氧化应激状态密切相关^[5]。因此,调节骨髓微环境,抑制氧化应激状态,增强BMSCs代谢活力,使其更有利于向成骨细胞分化,对防治OP具有重要的临床意义。本研究拟建立BMSCs氧化损伤衰老模型,模拟骨髓微环境病理状态,从BMSCs的增殖、凋亡以及p16、p21、p53衰老基因表达的变化,观察健骨二仙丸对抗BMSCs氧化应激损伤发挥保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BMSCs细胞培养来源实验动物:SPF级雄性SD健康4周龄大鼠10只,质量(120 \pm 10)g;含药血清制备的实验动物:SPF级雄性SD健康8周龄大鼠20只,体质量(250 \pm 20)g。由广州中医药大学动物实验中心提供实验大鼠,动物质量合格证号:4405900586。大鼠饲养于广东省中医药科学院实验动物中心,饲养条件为温度24~26℃,湿度40%~60%。动物使用许可证号:SCXK(粤)2008-0094。本实验通过广州中医药大学实验动物伦理委员会审核批准,伦理审批号:20200423002。

1.2 药物与试剂 健骨二仙丸由龟甲(批号:YP20E01)、鹿角胶(批号:Z65020031)、党参(批号:B1311112)、枸杞子(批号:YPB4L0002)、续断(批号:B4920512)、山药(批号:YP24K02)组成,均来自广州采芝林药业有限公司,药物制作

方剂单位为广东省中医院药学部。

澳洲胎牛血清(批号:1069982)、2.5 g/L胰酶(批号:1297729)、L-DMEM培养基(批号:1237443)、2.5 g/L不含EDTA胰酶(批号:1227470)均购自美国Gibco公司;Anti-Rat CD45(批号:2277797)、Anti-Rat CD29(批号:2257636)、Anti-Rat CD44(批号:3235614)、Anti-Rat CD90(批号:3106690)均购自美国Pharmingen公司;Anti-Rat CD34(批号:CEPJ0112031)、二抗 Anti-sheep IgG(批号:ABSZ0212031)均购自美国R&D Systems公司;M-MLV第一链合成试剂盒(批号:8213019)、Trizol试剂(批号:28220)均购自美国Invitrogen公司;Fast Start Universal SYBR Green Master(实时荧光定量PCR预混液)(批号:049113914001)购自美国Roche公司;MTT(批号:MKBP6775V)购自日本Sigma公司;二甲基亚砜(批号:6349K)购自美国MP公司;链霉素(批号:J130014)购自美国Hyclone公司; β -半乳糖苷酶试剂盒(批号:C0602)购自江苏碧云天公司;AnnexinV/PI 双染凋亡试剂盒(批号:3300130)购自杭州联科生物公司;过氧化氢(批号:20130201)购自广州化学试剂厂。

1.3 主要仪器 TS300型倒置显微镜(日本Nikon公司);311型CO₂培养箱(美国Thermo公司);7500型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司);VictorX5型多标记微孔板检测仪(美国PE公司);FC500型流式细胞仪(美国Beckman公司);X-22R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);SVE-4A1型超净工作台(新加坡ESCO公司)。

1.4 造模与分组

1.4.1 BMSCs衰老模型建立 根据前期BMSCs衰老造模基础^[6],确定以H₂O₂浓度500 μ mol/L作用时间24 h为造模反应条件。将培育好的传代至第三代(P3)、P4 BMSCs种植在6孔板上,隔夜待BMSCs贴壁后,再使用500 μ mol/L浓度H₂O₂处理24 h后,收集衰老的细胞用于实验。

1.4.2 BMSCs培养及分组 SPF级雄性SD大鼠(4周龄)经脱

颈法处死,随后在无菌环境中分离股骨和胫骨,并注射培养基(L-DMEM)冲洗。获取骨髓后,依据全骨髓体壁培养技术进行BMSCs体外细胞培养。培养基含量为10 mL,其中配比包括胎牛血清(12%)、青霉素(100 IU/mL)、链霉素(100 IU/mL),以冲出骨髓,使之形成一种均匀单细胞悬液,并在培养瓶中完成接种。培养环境为37℃,注意培养液在48 h后更换,保持2 d更换1次;当发现细胞液融合达到70%以上后,使用胰酶消化传代并对其标记,以促使其达到P3、P4细胞状态,其间细胞活力最强,适合对其实验。将适合实验的BMSCs分为3组($n=3$)。健骨二仙丸组:BMSCs传至P4时,加入500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养24 h,去上清,分别加入5%、10%、20%健骨二仙丸含药血清培养;模型组:单纯加入500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养24 h,去上清,加入5%、10%、20%空白大鼠血清继续培养;空白血清组:未经过 H_2O_2 处理,直接用5%、10%、20%空白大鼠血清培养。

1.5 实验给药 健骨二仙丸由龟甲、鹿角胶、党参、枸杞子、续断、山药按照1:1:3:6:6:6比例组成,将所有中药饮片混合后用饮片量8倍水充分浸泡1 h后煎煮至沸腾后,继续小火煎煮45 min,再加入药量6倍水重复煎煮第2次,过滤后取上清液,将2次上清液混合并使用旋转蒸发仪浓缩,使每1 mL药液含有3.795 g生药,放置4℃冰箱保存以备用。

将20只8周龄SD大鼠根据随机数字法分为健骨二仙丸含药血清组和空白对照组,每组10只。给药剂量参照文献[7]计算,详细方法见表1~2。经计算后,健骨二仙丸汤含药血清组给药剂量为每天75.9 g/kg(按生药计),灌胃容积为10 mL/kg;空白组灌服等体积的生理盐水。两组均连续给药7 d。在第7天给药期间,灌胃后2 h再次给药(第2次)。且第2次给药1 h后,将SD大鼠用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉完成腹主动脉取血,所采集的血液在室温下静置2 h后以3 500 r/min离心15 min(离心半径10 cm),吸取上清,0.22 μm 一次性过滤器过滤除菌,56℃水浴锅灭活30 min,-80℃超低温冷冻冰箱储存备用。以前期的实验基础^[14-15]为依据,制备5%(5 mL含药血清配95 mL培养基)、10%(10 mL含药血清配90 mL培养基)、20%(20 mL含药血清配80 mL培养基)健骨二仙丸药血清用于本研究。

表2 健骨二仙丸组灌胃给药方法及剂量

动物数/只	放大倍数	处方总量/g	天数	药物总量/g	剂数
10	2	345	7	1 328.25	3.85

1.6 观察指标

1.6.1 鉴定BMSCs细胞 鉴定过程中使用干细胞鉴定试剂盒,各项操作均按照说明书完成。选择离心管(15 mL),基于胰蛋白酶消化后的P3 BMSCs置入其中,且分别将其分离在离心管(5 mL)中,每个控制为 $1\times 10^5\sim 10\times 10^5$,分别对其设定为A管、B管;随后按照离心、去上清等程度完成2次冲洗。A管中,分别增加CD29、CD44、CD45、CD90、CD34,剂量均为2 μL ;B管中与其相同。孵育大约0.5 h(避光);洗涤次数2(PBS);随后还需增加Anti-sheep IgG,孵育0.5 h(避光)再次洗涤次数2

(PBS),为其增加PBS重悬(500 μL),最后使用上流式细胞仪完成测定。

1.6.2 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)检测衰老 对经 H_2O_2 诱导的MSCs执行 β -半乳糖苷酶染色。具体流程遵循试剂盒操作指南:室温固定15 min后,用PBS清洗3遍,弃去洗液;加入染色工作液后,在37℃无 CO_2 环境下过夜温育。次日在倒置光学显微镜下评估染色结果,计数视野内的总细胞和SA- β -gal染色阳性细胞(特征为细胞质青绿色且细胞变圆)。据此计算髓核阳性细胞百分比。

1.6.3 MTT法检测BMSCs代谢活力 BMSCs体外培养至P3、P4时收集细胞,按照文献[6]将空白血清组、模型组及健骨二仙丸组以每孔 5×10^3 个细胞种植于96孔板中,每孔加入5 g/L的MTT 20 μL ,37℃孵育4~6 h,终止培养,轻轻吸取孔内上清液后加入150 μL DMSO,室温震荡5 min,待蓝紫色甲瓞颗粒充分溶解后,采用Victor X5多标记微孔板检测仪测定各孔在570 nm波长处的吸光度值(OD值)。

1.6.4 流式细胞仪检测BMSCs凋亡 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,将BMSCs种于6孔板中,按照Annexin V-FITC/PI试剂盒提供的方法检测细胞凋亡率。具体操作为:用不含EDTA的胰酶消化收集细胞,经两次PBS洗涤后,将细胞重悬于100 μL 结合缓冲液。加入5 μL AnnexinV-FITC和1 μL PI染色液,混匀后避光孵育10 min。再加入400 μL 结合缓冲液,上流式细胞仪立即进行数据采集和分析。该步骤重复进行3次,并计算平均凋亡率。

1.6.5 基因引物设计 实验所用引物由Invitrogen公司合成,其序列是利用Invitrogen的在线工具OligoPerfectDesigner设计并经BLAST比对验证特异性。引物信息具体如下:p16引物为上游5'-CTACTCTCTCCGCTGGGAA-3'和下游5'-GGCC-TAACTTAGCGCTGCTT-3'(157 bp);p21引物为上游5'-CAGGCTCAGGAGTTAGCAAGG-3'和下游5'-TCAACACC-CTGTCTTGTCTTCG-3'(74 bp);p53引物为上游5'-GTCCGGAAGTGACCACCAAT-3'和下游5'-ATGTCCCA-CACGGAGACAAC-3'(96 bp);GAPDH引物为上游5'-AT-GATTCATCCCACGGCAAG-3'和下游5'-CTGGAAGATGGT-GATGGGTT-3'(89 bp)。

1.6.6 RT-PCR检测衰老相关基因表达 利用RT-qPCR方法评估衰老相关基因的表达水平。总RNA的提取依照TRIzol法试剂盒说明进行,所得RNA通过超微量分光光度计检测浓度和纯度(A260/A280在1.6~2.0为合格)。随后,根据逆转录试剂盒方案,在冰上将总RNA逆转录为cDNA。实时PCR反应体系体积为20 μL ,使用Roche扩增试剂盒并在ABI 7500仪上进行。每个样本设复孔。PCR循环程序:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min(45个循环);熔解曲线(95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s)。每份样本的RT-qPCR检测均重复3次,结果取平均值。

1.7 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行数据统计分析,

表1 健骨二仙丸组灌胃给药方法及剂量

动物数/只	每日给药剂量/(g/kg)	每次灌胃体积/(mL/kg)	每日灌胃次数	药物最终质量浓度/(g/mL)	药物最终体积/mL
10	75.9	10	2	3.795	350

计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据符合正态分布和方差齐性,采用单因素方差分析,并进行多重比较。若不满足正态性检验及方差齐性,则采用非参数秩和检验比较总的差异及组间比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs培养及衰老细胞形态变化 如图1所示,传代至第三代的细胞(P3)生长旺盛,形态呈长纤维状并以旋涡状排列。而经过H₂O₂处理的BMSCs,在图2~3中可见其具有一系列衰老特征,包括细胞体积增大、外观变得扁平及细胞核体积增加等。

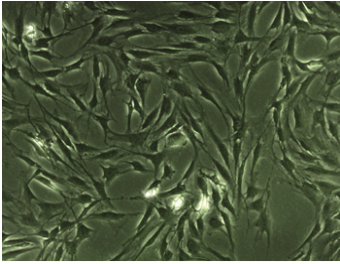


图 1 BMSCs 培养 (×200)

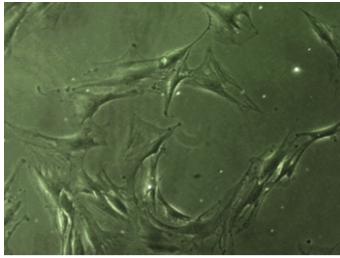


图 2 经过 H₂O₂ 处理的 BMSCs (×300)

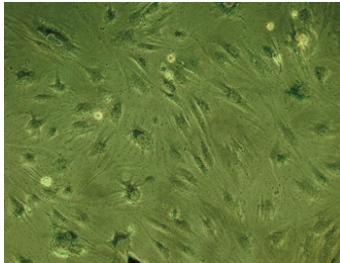


图 3 经过 H₂O₂ 处理的 BMSCs (×200)

2.2 BMSCs的鉴定 本研究成功建立了间充质干细胞的培养体系,通过流式细胞仪检测得到了证实(见图4)。检测结果显示,分离培养的细胞特异性表达间充质干细胞的阳性标志CD44、CD29、CD90,而不表达造血干细胞标志CD45、CD34。

2.3 健骨二仙丸对衰老的BMSCs代谢活力的影响 由表3~5可见,与模型组比较,5%健骨二仙丸含药血清作用24、48 h以及10%含药血清作用衰老的BMSCs 24 h后,有明显促进其增殖的作用($P<0.05$);而20%含药血清作用48 h对衰老的BMSCs

有抑制增殖的作用($P<0.05$)。

表 3 5%健骨二仙丸含药血清对衰老 BMSCs 代谢活力影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
空白血清组	3	0.814 ± 0.058	1.061 ± 0.091	0.797 ± 0.024
模型组	3	0.617 ± 0.034 ^a	0.765 ± 0.023 ^a	0.792 ± 0.020
健骨二仙丸组	3	0.703 ± 0.013 ^b	0.949 ± 0.098 ^b	0.810 ± 0.035

注:与空白血清组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

表 4 10%健骨二仙丸含药血清对衰老 BMSCs 代谢活力影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
空白血清组	3	0.758 ± 0.020	1.201 ± 0.056	0.604 ± 0.039
模型组	3	0.601 ± 0.045 ^a	0.906 ± 0.050 ^a	0.630 ± 0.026
健骨二仙丸组	3	0.710 ± 0.292 ^b	0.917 ± 0.031	0.603 ± 0.028

注:与空白血清组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

表 5 20%健骨二仙丸含药血清对衰老 BMSCs 代谢活力影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
空白血清组	3	0.788 ± 0.018	1.189 ± 0.036	0.666 ± 0.077
模型组	3	0.593 ± 0.060 ^a	0.861 ± 0.019 ^a	0.653 ± 0.063
健骨二仙丸组	3	0.589 ± 0.052	0.769 ± 0.052 ^b	0.635 ± 0.044

注:与空白血清组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 健骨二仙丸对衰老的BMSCs凋亡的影响 如表6所示,模型组BMSCs的细胞凋亡率明显高于空白血清组($P<0.05$)。健骨二仙丸组BMSCs的存活率高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图5)

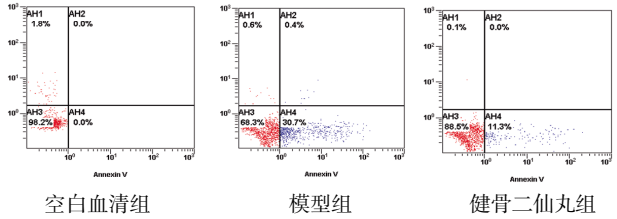


图 5 各组 BMSCs 凋亡情况比较

表 6 10%健骨二仙丸含药血清对衰老 BMSCs 凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间/h	存活率/%	凋亡率/%
空白血清组	3	24	95.0±3.9	3.9±3.8
模型组	3	24	69.5±2.7 ^a	30.0±2.4 ^a
健骨二仙丸组	3	24	82.6±5.5	17.1±5.4 ^b

注:与空白血清组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 健骨二仙丸对衰老相关基因表达的影响 如图6所示,模型组与空白血清组比较,p16^{INK4}、p21^{CIP1}、p53表达均显著上调($P<0.05$)。健骨二仙丸组与模型组比较,p21^{CIP1}、p53表达分

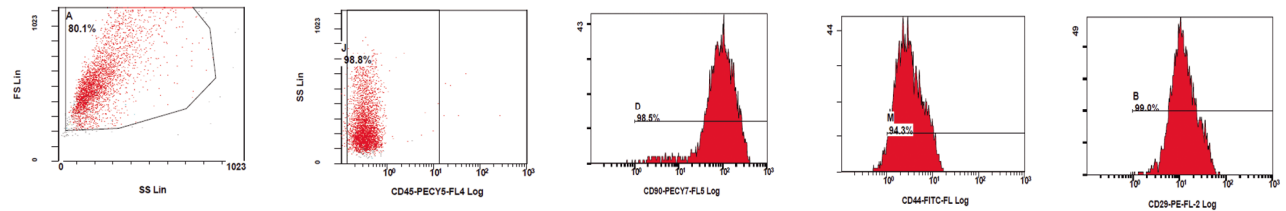
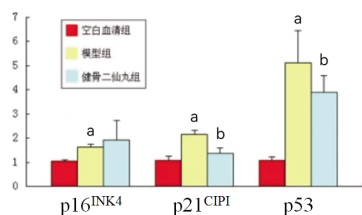


图 4 流式细胞术分析间充质干细胞表面标志

别下调36.7%、23.9% ($P<0.05$), 而p16^{INK4}表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注:与空白血清组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

图6 健骨二仙丸作用老化MSCs24后衰老相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

近年来,氧化应激作为人们健康的一个危险因素越来越受到医学界重视,且又与我们生活环境密切相关。如环境污染、酗酒吸烟、情志抑郁都加速了机体的氧化应激^[8-9],提高体内活性氧自由基(ROS)水平,使机体迅速衰老,促使疾病的发生。同时,氧化应激导致骨髓微环境发生劣变,致使BMSCs的成骨定向分化能力减弱,衰老的BMSCs更趋向于脂肪分化。脂肪细胞增多使骨髓腔内脂肪堆积,进而引起骨质疏松症。有研究^[10]表明:氧化应激能够抑制BMSCs的Runx2和I型胶原的表达,从而使BMSCs成骨分化发生障碍。SIES H等^[11]研究表明, H_2O_2 处理BMSCs,可以抑制细胞的成骨分化能力,且大量的ROS可阻碍BMSCs的定向分化能力。在机体面临的氧化应激反应十分严重情况下,抗氧化系统均衡性无法保证,且ROS的大量产生导致机体衰老情况更严重^[12]。

机体衰老多与细胞有关,其间的一些基因表达情况也会发生异常,如p16^{INK4}、p21^{CIP1}、p53等基因均为主要的影响因素^[13]。当机体处于氧化应激状态时,大量ROS作用于p53/21途径和p16/pRb途径,共同诱导MSCs出现早熟性衰老^[14]。ROS又能够通过p53/21途径来保证pRb/E2F轴逐渐降低,且自我更新功能、再生功能均受到明显障碍,以增加衰老进程^[15]。因此,保护BMSCs能够对抗氧化应激损伤,改善细胞衰老后的功能,提高其向成骨细胞分化能力是至关重要的,也是防治骨质疏松症有效途径之一^[16]。

健骨二仙丸在骨质疏松疾病的临床应用中作用显著,且能发挥一定疗效。如以上探究分析所示,健骨二仙丸可促使血清内的碱性磷酸酶、骨钙素和I型胶原逐渐增加,对成骨分化具有一定作用^[17]。健骨二仙丸含药血清还能够上调BMSCs的Runx2基因表达,且PPAR γ 基因也得到一定控制,从而防止成脂分化过度^[18]。本研究采用 H_2O_2 刺激BMSCs,建立氧化衰老模型,模拟骨髓微环境病理状态,观察健骨二仙丸含药血清对衰老BMSCs的影响。结果表明,健骨二仙丸含药血清可以促进衰老的BMSCs增殖,降低其凋亡率,并能够有效地抑制p21^{CIP1}、p53衰老相关基因的表达,可更好地保护BMSCs。PCR数据显示,健骨二仙丸并未下调p16^{INK4}的表达,而p21是p53下游靶点,受p53调控^[19]。健骨二仙丸可同时抑制p21^{CIP1}、p53的表达以延缓BMSCs衰老,说明此过程与p53/21途径相关。结合流式细胞术结果可知,健骨二仙丸可能是通过调控p53/21途

径和抑制细胞凋亡,进而保护BMSCs免疫氧化损伤来发挥作用机制。上述实验结果提示:健骨二仙丸抗BMSCs氧化衰老是通过多种途径完成的。

源于中医学理论“肾为先天之本,主骨生髓”,机体衰老与肾脏关系密切。健骨二仙丸由龟甲、鹿角胶、党参、枸杞子、续断、山药等补肾药物组成,这些药物结合能达到补肾益气填精的作用。目前,越来越多的研究表明,补肾单味中药具有抗氧化、延缓衰老和抗骨质疏松的疗效^[20-22]。因此,为进一步明确健骨二仙丸方药发挥抗氧化、衰老作用机制,可对方剂中单味中药有效成分进行实验研究,进一步明确方药抗衰老作用机制。此外,应对BMSCs进行成骨、成脂诱导分化,检测健骨二仙丸是否对衰老的BMSCs有促进成骨分化作用,进一步为其发挥抗骨质疏松症提供实验依据,也为后期实验方案设计奠定基础。

参考文献

- [1] MICELI V, BULATI M, IANNOLO G, et al. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: The need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 763-768.
- [2] CHENNA S, KOOPMAN W J H, PREHN J H M, et al. Mechanisms and mathematical modeling of ROS production by the mitochondrial electron transport chain [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(1): C69-C83.
- [3] CHANDRA A, RAJAWAT J. Skeletal aging and osteoporosis: Mechanisms and therapeutics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3553-3558.
- [4] ENSRUD K E, CRANDALL C J. Osteoporosis[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2017, 167(3): ITC17-ITC32.
- [5] KIMBALL J S, JOHNSON J P, CARLSON D A. Oxidative stress and osteoporosis[J]. *JBJS*, 2021, 103(15): 1451-1461.
- [6] 郭柏铭, 李聪, 程志安, 等. 过氧化氢诱导BMSCs氧化衰老模型的建立及相关基因p16、p21、p53表达的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2014, 31(4): 630-634.
- [7] 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 等. 血清药理学方法研究探索[J]. *中药药理与临床*, 1997, 13(3): 29-31.
- [8] KURO-O M. The Klotho proteins in health and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1): 27-44.
- [9] FAN Y, CUI C, ROSEN C J, et al. Klotho in Oss(+)-mesenchymal progenitors exerts pro-osteogenic and anti-inflammatory effects during mandibular alveolar bone formation and repair[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 155-160.
- [10] REN B C, ZHANG Y F, LIU S S, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12355-12367.

- [11] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species(ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.
- [12] WANG J, ZHANG Y, CAO J, et al. The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance[J]. *Autophagy*, 2023, 19(9): 2409–2427.
- [13] XIE X H, WANG F, GE W X, et al. Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 957: 175979.
- [14] LI J, KARIM M A, CHE H, et al. Deletion of p16 prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(2): 672–683.
- [15] COLAIANNI G, ERREDE M, SANESI L, et al. Irisin correlates positively with BMD in a cohort of older adult patients and downregulates the senescent marker p21 in osteoblasts[J]. *J Bone Miner Res*, 2021, 36(2): 305–314.
- [16] ZHAI Y K, WANG Q F, LI Y Y, et al. The higher osteoprotective activity of psoralidin in vivo than coumestrol is attributed by its presence of an isopentenyl group and through activated PI3K/Akt axis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 102: 1015–1024.
- [17] 程志安, 宋少云, 吴燕峰, 等. 健骨二仙丸介导间充质干细胞的成骨细胞定向诱导及其成骨活性[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2005, 13(1): 8–11.
- [18] 程志安, 危建安, 韩凌, 等. 六味地黄丸、金匱肾气丸、健骨二仙丸含药血清对BMSCs成脂、成骨细胞分化相关基因的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2): 261–265.
- [19] HAN D D, GU X L, GAO J, et al. Chlorogenic acid promotes the Nrf2/HO-1 anti-oxidative pathway by activating p21 (Waf1/Cip1) to resist dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic cells [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2019, 137: 1–12.
- [20] 周群, 曾弦, 黄丹, 等. 骨碎补化学成分和生物活性研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(8): 2727–2741.
- [21] 白如君, 邢晓磊, 张虎. 巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨质量、生物力学、 β_2 肾上腺素能受体及OX-LDL水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(13): 3251–3255.
- [22] 鲁林, 方虹. 骨碎补总黄酮抑制Notch1/Hes1/Prdx1通路对骨质疏松大鼠抗氧化能力的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(10): 1431–1436.

(收稿日期: 2025-04-30 编辑: 李海洋)

(上接第13页)

- [15] WANG X X, WANG P, DU H T, et al. Prediction of the active components and mechanism of Forsythia suspensa leaf against respiratory syncytial virus based on network pharmacology[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5643345.
- [16] ZHANG G X, ZHAO B B, LIU J N. The development of animal models for respiratory syncytial virus (RSV) infection and enhanced RSV disease[J]. *Viruses*, 2024, 16(11): 1701.
- [17] 黄家望, 马心悦, 朱梦晨, 等. 基于“扶正祛邪”治则的中医药抗病毒性肺炎作用机制的研究进展[J]. *中医药学报*, 2022, 50(12): 97–101.
- [18] 王秀丽, 陈美汐, 王艳玲, 等. 大黄通过NRV1调节miR-509-3p/Rab5c轴抑制呼吸道合胞病毒的效果[J]. *河北医药*, 2024, 46(19): 2949–2953.
- [19] 侯长周, 张建锋, 安海, 等. 栀子抗呼吸道合胞病毒作用及基于网络药理学和分子对接的机制研究[J]. *药物评价研究*, 2024, 47(9): 1985–1994.
- [20] 胡秋芳, 李凡敏. 连翘苷对呼吸道合胞病毒感染小鼠的治疗作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40 (15): 2202–2206.
- [21] 高加胜, 鲁建, 钱雅琴, 等. 紫正地黄汤联合孟鲁司特钠治疗儿童腺样体肥大疗效及对患儿血清变态反应指标、氧化应激的影响[J]. *陕西中医*, 2021, 42(9): 1247–1249.
- [22] 刘丹, 廖亮英, 张稳. 复方钩藤降压片对自发性高血压大鼠PI3K/Akt信号通路及其下游细胞炎性因子的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(2): 292–296.
- [23] ZHOU Q X, HE M, JIN Q, et al. Mechanism of action of Taohong Siwu decoction in the alleviation of primary dysmenorrhea[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1343179.
- [24] 许云姣, 吴文笛, 张志毕, 等. 基于PI3K/Akt及NF- κ B信号通路探讨大鼠应激性溃疡的关键保护因子[J]. *云南中医中药杂志*, 2021, 42(6): 79–83.
- [25] 钟华林, 李玲波, 覃焕桦, 等. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路探讨虎杖苷诱导鼻咽癌细胞凋亡的初步研究[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2019, 26(10): 536–540.
- [26] 孙微, 王一帆, 李贺, 等. 乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠海马PI3K/Akt/mTOR通路和神经递质的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(14): 47–51.
- [27] 刘芬之, 郭珈宜, 李峰, 等. 中药熏洗联合西药治疗骨关节炎疗效及对患者IL-6、TNF- α 的影响[J]. *陕西中医*, 2020, 41(4): 474–476.
- [28] 朱博超, 李彦杰, 秦宏伟, 等. 针刺通过TLR4/NF- κ B信号通路调控炎症反应治疗中枢神经系统疾病的作用机制研究进展[J]. *中医导报*, 2023, 29(2): 160–165.

(收稿日期: 2025-03-11 编辑: 时格格)