

引用:钟秋辉,周宇昊,马笃军,彭力平,毕玉杰,王立新,文胤翔.牛膝醇提取物含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的关键microRNAs研究[J].中医药导报,2025,31(8):58-65,85.

牛膝醇提取物含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的关键microRNAs研究*

钟秋辉^{1,2},周宇昊^{1,2},马笃军^{1,2},彭力平¹,毕玉杰^{1,2},王立新^{1,2},文胤翔²

(1.广州中医药大学第四临床医学院,广东 深圳 518033;

2.广州中医药大学,广东 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨含有牛膝(Achyranthes bidentata)醇提取物(AEAB)的兔血清影响骨髓间充质干细胞(BMMSC)增殖的关键微小RNA(miRNAs)。方法: BMMSC暴露于3种不同剂量的AEAB含药血清中(低剂量,每天1 g/kg;中剂量,每天3 g/kg;高剂量,每天6 g/kg),并检测其活力。对AEAB含药血清中剂量组和模拟组的BMMSC进行miRNA测序,以鉴定组间差异表达的miRNA(DEMs)。然后,探索miRNA-mRNA的关系,并进行功能富集分析和转录因子(TFs)-miRNA-mRNA相互作用网络分析。最后,通过实验验证关键DEMs在BMMSC中的表达和功能。结果:3种不同剂量的AEAB兔血清均可以显著提高BMMSC的活力。通过miRNA测序,在AEAB含药血清中剂量组和模拟组中共鉴定出40个DEMs。然后,149种miRNA-mRNA相互作用被鉴定出来,例如miR-6690-5p-Gnal。功能富集分析发现,包括miR-1946a在内的DEMs主要参与细胞-细胞黏附介导的活性。此外,33种miRNA-TF相互作用被鉴定出来,例如miR-23b-5p-Myc。最后,qPCR分析证实miR-1946a在AEAB含药血清处理后表达下调,miR-6690-5p和miR-23b-5p表达上调,与miRNA测序分析结果一致。抑制miR-6690-5p和miR-23b-5p后,含AEAB的血清对BMMSC活性的影响被抑制。结论:AEAB含药血清可能通过上调miR-23b-5p和miR-6690-5p促进BMMSC的增殖。此外,miR-1946a下调可能通过调控细胞-细胞黏附介导AEAB含药血清对BMMSC的促增殖作用。

[关键词] 骨质疏松症;牛膝醇提取物;骨髓间充质干细胞;差异表达miRNAs;功能富集分析

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)08-0058-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.010

Investigation of Key microRNAs by Which the Serum Containing Alcoholic Extract of Achyranthes Bidentata Promotes the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ZHONG Qiuhui^{1,2}, ZHOU Yuhao^{1,2}, MA Dujun^{1,2}, PENG Liping¹,
BI Yujie^{1,2}, WANG Lixin^{1,2}, WEN Yinxian²

(1.The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518033, China; 2.Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China)

[Abstract] Objective: To explore key microRNAs (miRNAs) by which rabbit serum containing alcoholic extract of Achyranthes bidentata (AEAB) affected proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). Methods: BMSCs were exposed to three doses of AEAB-containing serum (low dose, 1 g/kg; medium dose, 3 g/kg; and high dose, 6 g/kg), and their viability was detected. miRNA sequencing for the medium dose and mock (negative control) groups was performed to identify differentially expressed miRNAs (DEMs) between groups. miRNA-mRNA relationships were then explored, followed by functional enrichment analysis and analysis of the transcription factors (TFs)-miRNA-mRNA interaction network. Finally, the expression and function of key DEMs were experimentally verified in BMSCs. Results: BMSC viability was significantly increased after treatment with

*基金项目:国家自然科学基金项目(81804124);深圳市卫生健康菁英人才项目(2021XKG004)

通信作者:马笃军,男,副主任医师,研究方向为中医药联合干细胞治疗骨与关节疾患

three doses of AEAB-containing serum. Totally 40 DEMs were identified in the medium dose group and mock group through miRNA sequencing. Then, 149 miRNA-mRNA interactions were identified, such as miR-6690-5p-G Protein Subunit Alpha L (GnαL). Functional enrichment analysis showed that the DEMs including miR-1946a were primarily involved in cell-cell adhesion mediator activity. Furthermore, 33 miRNA-TF interactions, such as miR-23b-5p-Myc. Finally, qPCR analysis confirmed down-regulated expression of miR-1946a and up-regulated expression of miR-6690-5p and miR-23b-5p after treatment with AEAB-containing serum, which was consistent with the miRNA sequencing analysis results. The effect of AEAB-containing serum on BMSC activity was inhibited after inhibition of miR-6690-5p and miR-23b-5p. Conclusions: The AEAB-containing serum may promote BMSC proliferation via up-regulating miR-23b-5p and miR-6690-5p. Moreover, down-regulation of miR-1946a may mediate the effect of AEAB-containing serum on BMSC proliferation by mediating cell-cell adhesion mediator activity.

[Keywords] osteoporosis; alcoholic extract of Achyranthes bidentata; bone marrow mesenchymal stem cells; differentially expressed miRNAs; functional enrichment analysis

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种常见的全身性骨骼疾病,可导致骨质脆弱和骨折风险增加^[1]。在老年人群中,OP是最常见的骨折原因^[2]。全球每年约有890万例骨折与OP相关^[3]。雌激素、降钙素和特立帕肽等药物是临床治疗OP的推荐一线治疗方案^[4]。然而,由于药物副作用和长期疗效不佳等不利临床因素,至今尚未开发出完全有效的OP治疗方法^[5]。

牛膝(Achyranthes bidentata, AB)是治疗OP和骨折的知名传统补肝肾、强筋骨中药^[6]。牛膝的醇提取物(AEAB)是从AB中提取的主要成分,具有抗炎、抗风湿、抗OP等多种药理作用^[7]。AEAB中的果寡糖ABW50-1(1260 Da)已被发现可通过刺激骨形成来阻止OP的发生,因此具有开发新型抗OP治疗药物的潜力^[8]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMMSC)能够分化为软骨细胞或成骨细胞,近年来被广泛应用于骨相关疾病的治疗^[9]。前期研究发现,AEAB能够提高骨密度^[10],并促进骨髓来源干细胞增殖和软骨分化^[11]。此外,微小RNA(microRNAs, miRNA)在调节BMMSC成骨分化中发挥重要作用,对OP的临床治疗具有潜在价值^[12-13]。但是在OP进展过程中,AEAB影响BMMSC的关键miRNA及其相应机制尚未完全阐明。

因此,本研究采用AEAB含药血清处理BMMSC,并进行miRNA测序,旨在探讨含AEAB血清在OP进展过程中对BMMSC增殖的影响及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级健康新西兰大白兔12只,雌、雄各半,由广东省实验动物中心提供,体质量(1.27 ± 0.69)kg,兔龄2~3个月,动物生产许可证号:SCXK(粤)2019-0035,饲养于广州中医药大学第四临床医学院中心实验室,温度20°,湿度40%。动物实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审批号:2018023),实验操作符合2006年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药物与试剂 青霉素/链霉素(批号:2441911)、L-DMEM培养基(批号:2456019)、胎牛血清(批号:2531801P)、Power SYBR Green PCR Master(批号:2301186)、RevertAidTM First

Strand cDNA Synthesis Kit(批号:2595237)、Lipofectamine 2000(批号:2463638)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;1×磷酸缓冲液[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:B548117];bFGF(亚科因生物技术有限公司,批号:ATWG04161);Prime-ScriptTMRT Master Mix (Perfect Real Time)(批号:RR036A)、RNAiso Plus(Trizol)(批号:9109)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;牛膝醇提物(怀牛膝,广州中医药大学第四临床医学院药剂科制备,院内制剂批号:2019103)。

1.3 主要仪器 涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:QL-901);PCR仪器[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号T100];离心机[艾本德(上海)国际贸易有限公司,型号:5424];酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:Epoch];移液器[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];生物安全柜[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];二氧化碳培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:3111型];倒置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司,型号:IX73型];低速自动平衡离心机[湖南湘仪实验仪器开发有限公司,型号:TDZ4-WS型];分光光度计(FOSS NIR Systems,型号:6500);荧光定量PCR仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:7900HT FAST];Illumina Hiseq 4000基因测序平台[因美纳(中国)科学器材有限公司,型号:PE150]。

1.4 不同剂量AEAB含药血清的制备 根据之前的研究^[14],制备不同剂量的AEAB含药血清。制备方法如下:灌胃前,将不同浓度的AEAB(低剂量,每天1 g/kg;中剂量,每天3 g/kg;高剂量,每天6 g/kg)用蒸馏水配制成10 mL溶液。实验兔每天2次灌胃AEAB,连续7 d。收集含有不同剂量AEAB的兔血清。模拟组兔每天2次灌胃蒸馏水10 mL,连续7 d。

1.5 细胞培养与分组 兔来源的BMMSC(原实验室保存)用0.25%胰蛋白酶消化,以4 000个细胞/孔的密度接种到96孔板中。然后,将细胞孵育在含有10%胎牛血清、地塞米松(39.25 mg/L)、bFGF(10 μg/L)和维生素C(50 mg/L)的L-DMEM中,并在37 °C,5%CO₂的条件下培养1周。然后对BMMSC进行AEAB含药血清处理。处理前,血清在56 °C下热灭活30 min,使补体失活。然后

将细胞培养基中的血清浓度调整为5%。BMMSC被分为5组:空白对照组(不接受任何处理)、模拟组(接受5 μL生理盐水处理的兔血清处理)、低剂量组(接受5 μL低剂量AEAB含药血清处理)、中剂量组(接受5 μL中剂量AEAB含药血清处理)和高剂量组(接受5 μL高剂量AEAB含药血清处理)。

1.6 观察指标

1.6.1 CCK-8实验 在AEAB兔血清处理48 h和72 h后,各组样品进行CCK-8测定。细胞(4 000个/孔)接种于96孔板中,加入CCK-8溶液,在37 °C,5%CO₂的条件下孵育。然后,使用微标仪检测450 nm处的吸光度。

1.6.2 miRNA测序 对中剂量组($n=3$)和模拟组($n=3$)样品进行miRNA测序分析。采用RNAiso Plus Reagent提取总RNA。用分光光度计测定总RNA的质量。使用Illumina®(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)的NEBNext®Ultra™DNA文库准备试剂盒构建RNA-seq文库。最后,使用Illumina Hiseq 4000基因测序平台(配对端150 bp)对文库进行测序。

1.6.3 质量控制和miRNA分析 使用Fastx-Toolkit(version: 0.0.14)^[15]进行质量控制,方法如下。(1)去除reads中的3'序列和没有插入片段的reads;(2)去除N含量未知的reads;(3)删除低质量的(<20)reads;(4)排除长度<18 nt和>32 nt的reads。使用Bowtie(版本:1.1.2)将得到的reads与参考基因组(GRCm38)比对,获得用于转录组组装和表达分析的映射reads。然后,使用miRBase数据库(版本:22)^[16]将映射到参考基因组的reads与miRNA前体和成熟序列进行比较,以鉴定已知的miRNAs。对于尚未注释的已知miRNAs的reads,使用Rfam数据库(版本:12.3)^[17]进行注释。将无法与Rfam或miRbase数据库进行比较的sRNAs与参考基因组进行比较,并鉴定其周围序列。通过miRDeep2(版本:2.0.0.5)^[18]预测RNA二级结构。通过筛选Dicer消化位点和能量值,鉴定出新的miRNAs。使用miRDeep2对已知和新型miRNAs的表达水平进行定量分析。使用precomp函数进行主成分分析(PCA),使用ggfortify(版本:0.4.5)^[19]构建主成分图。

1.6.4 差异表达miRNA(DEM)分析 使用DESeq2(version: 1.10.1)^[20]鉴定中剂量组和模拟组之间的DEMs。采用Benjamini-Hochberg方法校正 P 值。DEMs的筛选阈值为调整后的 P 值<0.05和 \log_2 倍变化(FC)>1。使用热图和火山图对结果进行可视化。

1.6.5 miRNA-mRNA相互作用预测 使用miRanda(版本:3.3a)^[21]预测DEM的靶基因。选择评分>160和能量<-20,作为筛选miRNA-mRNA相互作用的默认参数。此外,还使用经过实验证的miRNA靶基因数据库miRTarBase(version: 7.0)^[22]进行预测。最后,进一步分析这两个数据库中发现的共同的miRNA-mRNA相互作用。使用Cytoscape(版本:3.4.0)^[23]将结果可视化。

1.6.6 功能富集分析 使用R中的clusterProfiler(版本:3.8.1)^[24]对参与miRNA-mRNA相互作用的miRNA进行基因本体-生物学过程(GO-BP)^[25]和京都基因与基因组百科全书(KEGG)^[26]通路富集分析。将 $P<0.05$ 和富集的miRNA数量 ≥ 2 作为富集分析的阈值。此外,使用Metscape^[27]对参与miRNA-mRNA相互作用

的miRNA的靶mRNA进行GO-BP和KEGG通路富集分析。显著富集结果的筛选阈值设定为 $P<0.05$,Min Overlap=3和Min Enrichment=1.5。根据各富集条目中富集基因的相似性(similarity>0.3),选取统计上最显著的条目(最小 P 值)构建聚类。根据 P 值,使用直方图将前20个聚类可视化。

1.6.7 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 基于检索相互作用基因/蛋白质的搜索工具(STRING)数据库(版本:11)^[28],筛选与DEMs相关的PPI关系对。筛选阈值为相互作用评分=0.4。然后,使用Cytoscape(版本:3.4.0)^[23]构建PPI网络。

1.6.8 转录因子(TF)-miRNA-mRNA相互作用网络 通过JASPAR数据库(<http://jaspar.binf.ku.dk>)^[29]确定与DEM相关的TFs,筛选阈值为 $P<0.00005$ 。结合TransmiR数据库^[30]中报道的现有TF-miRNA相互作用筛选TF-DEM相互作用。然后,结合鉴定出的miRNA-mRNA相互作用,构建TF-miRNA-mRNA相互作用网络。

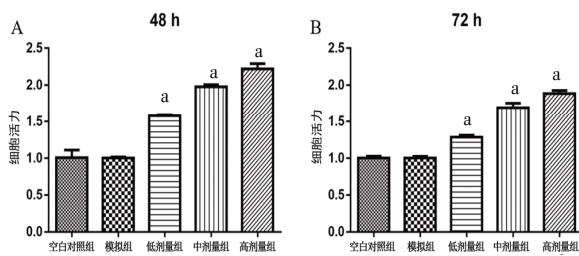
1.6.9 miRNA测序中关键DEMs的验证 使用定量PCR(qPCR)验证上述中剂量组和模拟组差异表达分析确定的关键DEMs。使用TRizol试剂从不同组的细胞中提取总RNA,并使用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。在ABI7900FAST(Thermo Fisher Scientific Inc.)上进行qPCR。SNORD68作为内源对照。PCR分析过程设定为:50 °C 3 min, 95 °C 3 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共40个循环;从60 °C加热到95 °C(以0.5 °C为增量,持续10 s),产生熔体曲线。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[31]计算miRNA的相对表达水平。

为了更好地了解关键DEMs的功能,使用Lipofectamine 2000将miR-23b-5p抑制剂、miR-6690-5p抑制剂和相应的阴性对照(miR-NC)转染到BMMSC中,分组为:空白组、miR-NC组、miR-23b-5p抑制剂组、miR-6690-5p抑制剂组,转染48 h后,使用qPCR检测转染效率。然后使用上述提到的CCK-8实验,进一步分析中剂量AEAB含药血清处理后,抑制miR-23b-5p或miR-6690-5p表达对细胞活力的影响,分组为:空白组(空白细胞组,不做任何处理)、模拟组(空白细胞组+5 μL空白组血清)、中剂量组(空白细胞组+5 μL中剂量组血清)、miR-NC+中剂量组(miR-NC组+5 μL中剂量组血清)、miR-23b-5p抑制剂+中剂量组(miR-23b-5p抑制剂组+5 μL中剂量组血清)、miR-6690-5p抑制剂+中剂量组(miR-6690-5p抑制剂组+5 μL中剂量组血清),分别在干预48 h、72 h后进行CCK-8检测。

1.7 统计学方法 计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。所有统计分析均采用GraphPad 7.0软件进行, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AEAB含药血清促进BMMSC的增殖 采用CCK-8实验检测AEAB含药血清处理48 h和72 h后BMMSC的活力。结果显示,与模拟组比较,3个AEAB含药血清处理组的BMMSC活力在48 h和72 h均显著增加($P<0.01$)。随着AEAB剂量的增加,AEAB含药血清对细胞活力的影响更加明显。(见图1)考虑到剂量越高,副作用可能越多,选择中剂量的AEAB含药血清进行进一步研究。



注:与模拟组比较, $P<0.001$ 。

图1 CCK-8法检测含牛膝醇提取物(AEAB)的免血清处理48 h和72 h后对BMSC活力的影响 (图1)

2.2 测序数据质量评估、预处理以及样本间DEMs的识别 miRNA测序共获得14 617万个原始reads,质量评分为Q30的碱基比例超过96%。测序数据的质量评价结果见表1。

对样本的数据比较显示,每个样本的reads数量在8 691 486和15 497 571之间。(见表2)

表2 数据比对结果

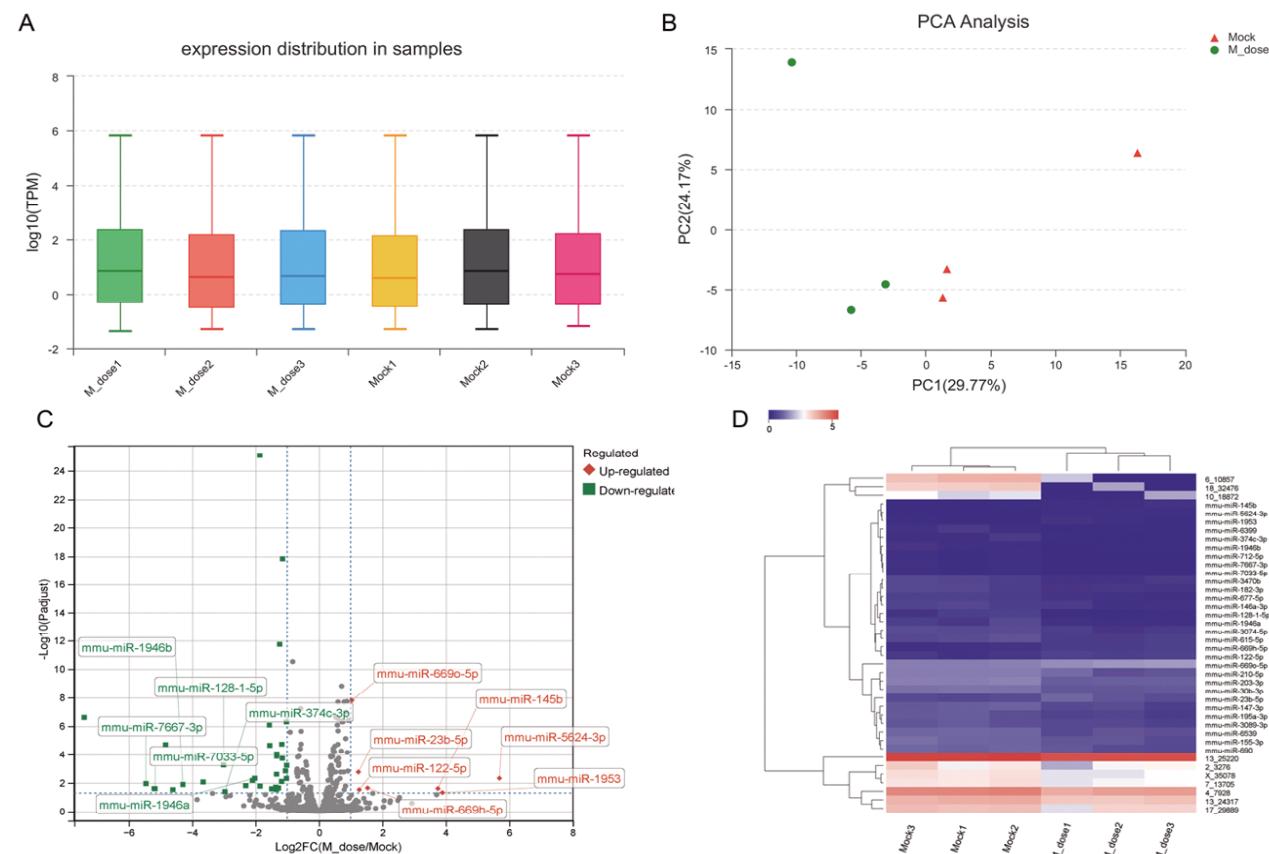
分组	样本	Total reads	Total mapped	Mapped reads(+)	Mapped reads(-)
模拟组	Mock1	23 173 216	21 999 496	5 986 228	18 126 758
	Mock2	24 713 022	23 427 457	6 404 401	19 301 701
	Mock3	19 772 778	18 910 689	5 058 885	15 666 757
中剂量组	M_dose1	24 754 810	23 808 668	6 086 253	19 815 064
	M_dose2	22 588 438	21 945 632	5 630 957	18 251 498
	M_dose3	23 687 516	22 904 710	6 007 366	18 990 015

注:总读取数(Total reads),经过过滤后的序列化序列的清洁读取数;映射读取数(Mapped reads),映射到基因组的读取数;映射读取数(+):位于基因组正链的读取数;映射读取数(-):位于基因组负链的读取数。

miRNA测序分析共鉴定出1 197个已知miRNA和293个新miRNA。样本的miRNA分布的箱形图(图2A)表明,通过标准归一化,消除了测序深度和基因长度带来的差异,数据可以

表1 测序数据质量控制结果

分组	样本	Raw reads	Raw bases	Clean reads	Clean bases	Error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC content/%	Useful reads(18nt-32nt)
中剂量组	M_dose1	26 191 698	1 964 377 350	25 787 926	590 922 275	0.023 0	98.75	96.36	41.86	24 754 810
	M_dose2	23 449 559	1 758 716 925	23 186 034	527 048 970	0.022 7	98.87	96.72	41.25	22 588 438
	M_dose3	24 467 805	1 835 085 375	24 281 029	553 552 895	0.022 5	98.98	96.91	41.51	23 687 516
模拟组	Mock1	24 755 347	1 856 651 025	24 397 493	559 215 519	0.022 4	99.08	96.94	42.33	23 173 216
	Mock2	26 381 056	1 978 579 200	26 038 211	599 144 905	0.022 5	99.01	96.85	42.39	24 713 022
	Mock3	20 933 221	1 569 991 575	20 653 430	470 312 986	0.022 9	98.75	96.49	42.07	19 772 778



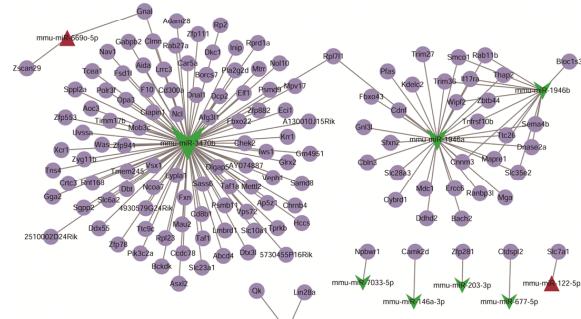
注:A.miRNA在6个样本中的表达分布。x轴表示样本,y轴表示 $\log_{10}(\text{TPM})$ 值。B.基于各样本中miRNA的TPM表达水平的PCA分析结果。C.DEMs的火山图。红色节点表示上调的miRNA,绿色节点表示下调的miRNA。D.DEMs的热图。

图2 miRNA测序数据预处理和差异表达microRNAs(DEMs)识别

用于后续分析。此外,基于每个样本中miRNA表达水平的PCA分析结果显示,不同组样本可以被显著区分(图2B)。

通过差异分析,在中剂量组和模拟组之间共鉴定出40个DEMs,其中7个miRNAs上调(如miR-6690-5p和miR-23b-5p),33个miRNAs下调(如miR-1946a、miR-1946b)。DEMs的火山图和热图分别如图2C、图2D所示。

2.3 miRNA-mRNA网络分析 基于miRanda和miRTarBase数据库,共识别了149个miRNA-mRNA相互作用,例如miR-6690-5p-Gnai。基于这些相互作用,构建了一个miRNA-mRNA相互作用网络,该网络包括10个DEMs(2个上调,8个下调)和135个mRNAs。(见图3)



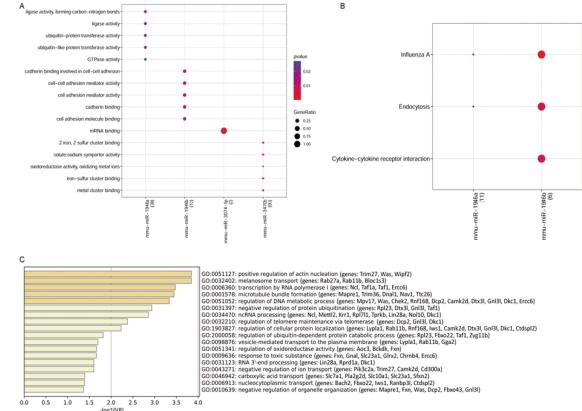
注:绿色倒三角表示下调的miRNAs,红色正三角表示上调的miRNAs,紫色节点代表mRNA;灰线表示相互作用。

图3 利用miRNA和靶mRNA构建的miRNA-靶基因相互作用网络

2.4 功能富集分析结果 为了阐明miRNAs的生物学功能,本研究对miRNA-mRNA相互作用中的miRNAs进行GO-BP和KEGG富集分析。结果显示,4种miRNAs(miR-1946a, miR-1946b, miR-3074-5p和miR-3470b)显著富集到多种GO-BP条目中,例如mRNA结合(GO:0003729, miR-3074-5p),细胞-细胞黏附介质活性(GO:0098632, miR-1946b)和细胞黏附介质活性(GO:0098631, miR-1946b)。(见图4A)其中miR-1946a和miR-1946b显著富集到甲型流感(GO:0098631),内吞作用

(mmu04144)和细胞因子-细胞因子受体相互作用(mmu04060)等功能或通路中。(见图4B)

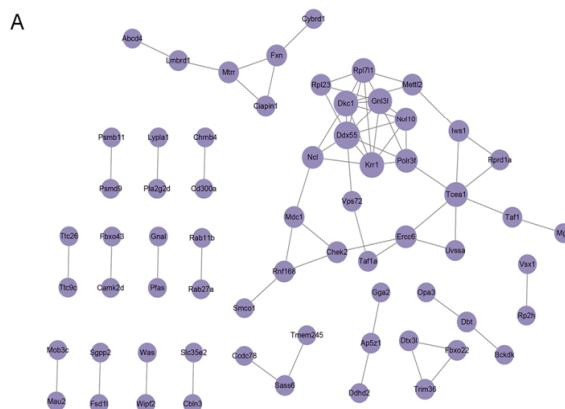
此外,本研究还对miRNA-mRNA相互作用中的mRNAs进行了GO-BP富集分析。结果显示,这些mRNAs主要富集在110种GO-BP功能中,包括正调控肌动蛋白成核(GO:0051127)、黑素小体转运(GO:0032402)和RNA聚合酶I转录(GO:0006360)。(见图4C)然而,这些mRNAs没有富集到任何一种KEGG通路中。



注:A.miRNAs的GO-BP富集结果。节点越大,基因比例越大;从蓝色到红色的颜色分布表示P值从小到大。B.miRNA的KEGG通路富集结果。节点越大,基因比例越大;从蓝色到红色的颜色分布表示P值从小到大。C.mRNAs的GO-BP富集结果。x轴代表-log10(P)值,y轴代表不同的GO-BP条目。

图4 miRNA-mRNA相互作用网络中miRNA和mRNA的功能富集分析结果

2.5 PPI和TF-miRNA-mRNA网络分析 针对miRNA-mRNA相互作用网络中的mRNAs,我们构建了一个PPI网络,该网络包括72个相互作用和65个节点。(见图5A)此外,共鉴定了33个miRNA-TF相互作用,如miR-23b-5p-Myc。然后,结合miRNA-mRNA相互作用信息,构建了TF-miRNA-mRNA相互作用网络,该网络包括182个相互作用、28个TF、17个miRNAs和135个mRNAs。(见图5B)



注:A.PPI网络。紫色节点代表mRNA,两个节点之间的线表示相互作用。B.TF-miRNA-mRNA相互作用网络。紫色节点代表mRNA,绿色倒三角表示下调的miRNAs,红色正三角表示上调的miRNAs,橙色六边形表示TF,两个节点之间的线表示相互作用。

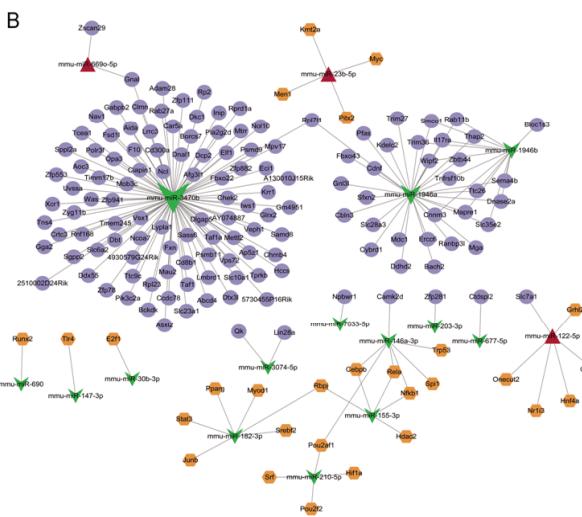


图5 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络和转录因子(TF)-miRNA-mRNA相互作用网络

2.6 关键DEMs的验证结果 采用qPCR分析验证miR-1946a、miR-6690-5p和miR-23b-5p的表达。结果显示,与模拟组比较,miR-1946a表达在AEAB含药血清中剂量组中显著降低,而miR-6690-5p、miR-23b-5p的表达显著升高($P<0.01$,图6A)。这些结果与miRNA测序结果一致。为进一步探索miR-6690-5p和miR-23b-5p在BMMSC中的功能,我们通过转染miR-6690-5p和miR-23b-5p抑制剂来抑制miR-6690-5p和miR-23b-5p在BMMSC中的表达。qPCR分析结果显示,转染miR-6690-5p和miR-23b-5p抑制剂后,miR-6690-5p和miR-23b-5p表达被明显抑制($P<0.001$,图6B)。CCK-8实验结果显示,与模拟组比较,AEAB含药血清中剂量组和miR-NC+AEAB含药血清中剂量组中的BMMSC活力显著升高($P<0.001$)。与miR-NC+AEAB含药血清中剂量组比较,AEAB含药血清中剂量联合miR-23b-5p/miR-6690-5p抑制剂处理后,BMMSC活力显著降低($P<0.05$,图6C),提示miR-23b-5p或miR-6690-5p抑制后显著逆反AEAB含药血清对BMMSC活力的影响。

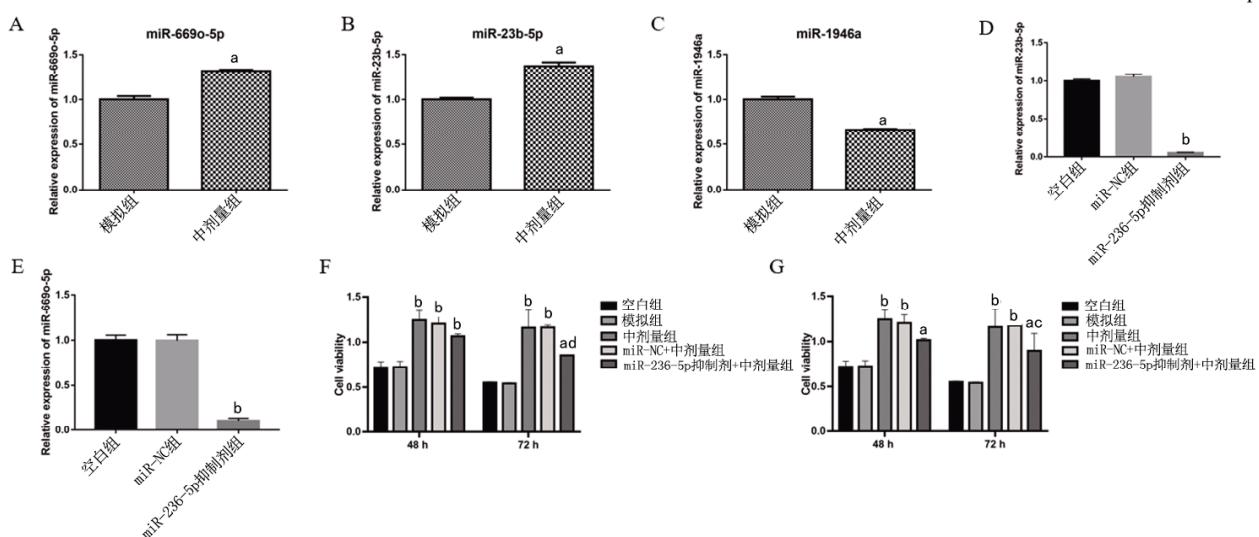
3 讨 论

大多数中药(TCMs)在给药后会在胃肠道经历一系列生物转化,其主要活性成分被吸收进入血清并分布到目标器官,产生生物效应^[32]。含药血清已被广泛用于研究血清药理学中特定细胞的药物效应,这考虑了生物体与中药之间的相互作用,并消除了中药复杂性偏差^[33]。牛膝具有补肝肾和强筋骨的作用,既往研究多在改善骨关节疾病及OP方面^[34],但具体作用机制不详。BMMSC是骨髓来源具有多向分化潜能的细胞,可调控机体成骨分化和骨量的平衡,是维持骨代谢正常的重要环节,其活力和成骨分化活性的下降是导致骨质疏松的重要原因^[35]。因此,为了研究AEAB对OP的可能作用机制,本研究使用AEAB含药血清来处理BMMSC,发现AEAB含药血清处理可以显著促进BMMSC增殖,表明AEAB有助于减缓或者逆转OP的骨量丢失。

虽然miRNAs可调节BMMSC的增殖和分化命运^[36],但在OP

进展过程中,AEAB促进BMMSC增殖的具体miRNA及其相应的分子机制尚不清楚。本研究基于miRNA测序数据共鉴定了40个DEMs和149个miRNA-mRNA相互作用(如miR-6690-5p-Gnal)。这些DEMs,如miR-1946a,主要富集于细胞-细胞黏附介质活性等功能中。而且,本研究鉴定了33个miRNA-TF相互作用,如miR-23b-5p-Myc。最后,qPCR分析证实miR-1946a表达在AEAB含药血清处理组中显著下调,而miR-6690-5p和miR-23b-5p表达上调,与miRNA测序分析结果一致。功能实验结果显示,抑制miR-6690-5p和miR-23b-5p后,AEAB含药血清对BMMSC活性的影响被减弱。

既往研究^[37]发现,miRNAs可调节骨稳态,并在OP的进展过程中发挥重要作用。MiR-23b是位于人类9号染色体上的miRNA,参与癌症和自身免疫性疾病的发展^[38]。先前的研究^[39]表明,血清miR-23b-3p水平是绝经后妇女OP和骨质疏松性骨折有价值的生物标志物。miR-23b表达上调可以引起BMMSC对树突状细胞成熟的抑制^[40]。miR-23b-5p作为典型的致癌miRNA,通过调控其靶基因的表达参与疾病进展^[41-42]。而且,miRNA-TF相互作用的异常调控参与许多疾病的发展。既往研究表明,c-Myc下调miR-23b可减轻缺血性脑损伤^[43]。鉴于c-Myc转录抑制miR-23b并能刺激多发性骨髓瘤细胞增殖,miR-23b-myc相互作用代表了一个前反馈回路,在骨髓瘤的生长和存活中起着关键作用^[44]。使用深度测序对脾T细胞中miRNA表达的分析表明,miR-6690-5p在BMMSC处理的小鼠脾病变中上调^[45]。本研究结果表明,miR-6690-5p与Gnal存在相互作用。据报道^[46],成骨细胞中缺乏G蛋白 α -亚基导致骨小梁和皮质骨的不同作用。miRNA-Gnal相互作用的生物学功能先前已在某些疾病的进展过程中得到证实^[47]。在本研究中,qPCR分析证实miR-23b-5p和miR-6690-5p的表达在AEAB含药血清中剂量组中显著升高。此外,相互作用分析表明,miR-23b-5p-Myc和miR-6690-5p-Gnal分别是两个明显的miRNA-TF和miRNA-mRNA相互作用。因此,我们推测,miR-23b-5p和



注: A、B、C.qPCR分析展示3个DEMs在组间的表达。与模拟组比较,^a $P<0.01$ 。D、E.qPCR分析证实转染效率。与miR-NC组比较,^b $P<0.001$ 。F、G. CCK-8法检测miR-23b-5p或miR-6690-5p抑制后对中剂量AEAB含药血清处理的BMMSC增殖的作用。与模拟组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.001$ 。与miR-NC+中剂量组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图6 关键DEMs验证

miR-6690-5p等关键DEMs可能是AEAB调控BMMSC生物学作用的关键靶点,进而影响AEAB在软骨分化和OP进展的作用。

细胞-细胞黏附是细胞信号转导的一个重要方面^[48]。由细胞黏附分子介导的细胞间相互作用,已被证明在骨骼形态发生、结构和分化中发挥重要作用^[49]。这些细胞黏附分子可以被BMMSC激活,参与骨髓形成^[50]。研究^[51]发现,AB提取物在非细胞毒性浓度范围内可有效抑制癌细胞的细胞-细胞黏附。AEAB能够促进胚胎大鼠海马神经元的神经细胞生长和黏附^[52]。生物信息学分析^[53]显示,OP的候选治疗基因主要富集于细胞-细胞黏附等功能。而且,一些miRNAs通过参与细胞黏附相关功能来促进疾病的发展^[54]。例如,在多发性骨髓瘤细胞中,miR-202影响BMMSC的黏附和生长^[55]。然而,到目前为止,miR-1946a对BMMSC软骨分化的影响尚不清楚。在本研究中,miRNA测序和qPCR实验证实,miR-1946a表达在AEAB含药血清处理组中显著下调。功能富集分析显示,miR-1946a主要富集于细胞-细胞黏附介导活性。因此,推测miR-1946a可能通过细胞-细胞黏附介导活性参与AEAB对BMMSC的生物学作用的调控。

本研究结果提示,AEAB含药血清可能通过上调miR-23b-5p和miR-6690-5p促进BMMSC的增殖。此外,miR-1946a下调可能通过调控细胞-细胞黏附介导活性参与AEAB含药血清对BMMSC增殖的作用。这些发现揭示了AEAB通过特定miRNAs调节BMMSC增殖的分子机制,对于理解补肝肾、强筋骨中药牛膝有效制剂AEAB在促进骨形成和治疗OP方面的潜在应用具有重要意义,为开发新的治疗策略提供了科学依据。

本研究具有一定的局限性。首先,本研究样本量小。其次,未使用动物在体研究和临床样本验证关键DEMs的表达。DEMs对OP的调控作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] ENSRUD K E, CRANDALL C J. Osteoporosis [J]. Ann Intern Med, 2024, 177(1): ITC1–ITC16.
- [2] LORENTZON M, JOHANSSON H, HARVEY N C, et al. Osteoporosis and fractures in women: The burden of disease[J]. Climacteric, 2022, 25(1): 4–10.
- [3] ODUWEGWU E. Male hypogonadism and osteoporosis: A systematic review[J]. J Endo Meta Res, 2022, 3(1): 1–40.
- [4] TU K N, LIE J D, WAN C K V, et al. Osteoporosis: A review of treatment options [J]. P T, 2018, 43 (2): 92–104.
- [5] DE VILLIERS T J. Bone health and menopause: Osteoporosis prevention and treatment[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2024, 38(1): 101782.
- [6] ZHANG S J, ZHANG Q, ZHANG D W, et al. Anti-osteoporosis activity of a novel Achyranthes bidentata polysaccharide via stimulating bone formation [J]. Carbohydr Polym, 2018, 184: 288–298.
- [7] HUA S, ZHANG X. Effects of Achyranthes bidentata alcohol on proliferation capacity of osteoblasts and miRNA in Runx2[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(3): 1545–1550.
- [8] YAN C Y, ZHANG S J, WANG C S, et al. A fructooligosaccharide from Achyranthes bidentata inhibits osteoporosis by stimulating bone formation[J]. Carbohydr Polym, 2019, 210: 110–118.
- [9] ARTHUR A, GRONTHOS S. Clinical application of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells to repair skeletal tissue[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9759.
- [10] 马笃军,彭力平,蒋顺琬,等.牛膝醇提物干预BMSC-Exos对OA模型兔局部骨组织超微结构及炎症小体的影响[J].中医药导报,2022,28(1):12–18.
- [11] 马笃军,彭力平,王立新,等.牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨定向分化的实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(2):6–11.
- [12] VULF M, KHLUSOV I, YUROVA K, et al. microRNA regulation of bone marrow mesenchymal stem cells in the development of osteoporosis in obesity[J]. Front Biosci, 2022, 14(3): 17.
- [13] LIN Y P, LIAO L M, LIU Q H, et al. MiRNA-128-3p induces osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via activating the Wnt3a signaling[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(3): 1225–1232.
- [14] 马笃军,赵静,彭力平,等.基于多组学整合分析牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨分化的生物网络机制研究[J].中医临床研究,2022,14(26):15–19.
- [15] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets[J]. Bioinformatics, 2011, 27(6): 863–864.
- [16] KOZOMARA A, BIRGAOANU M, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: From microRNA sequences to function [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): 155–162.
- [17] KALVARI I, ARGASINSKA J, QUINONES-OLVERA N, et al. Rfam 13.0: Shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(d1): D335–D342.
- [18] MACKOWIAK S D. Identification of novel and known miRNAs in deep sequencing data with miRDeep2 [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2011, (11): 1–15.
- [19] TANG Y, HORIKOSHI M, LI W X. Ggfortify: Unified interface to visualize statistical results of popular R packages[J]. R Journal, 2016, 8(2): 474.
- [20] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [21] ENRIGHT A J, JOHN B, GAUL U, et al. microRNA targets in Drosophila[J]. Genome Biol, 2003, 5(1): R1.
- [22] HSU S D, TSENG Y T, SHRESTHA S, et al. miRTarBase update 2014: An information resource for

- experimentally validated miRNA -target interactions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(1):D78–D85.
- [23] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498–2504.
- [24] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. Cluster profiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284–287.
- [25] HULSEGGE I, KOMMADATH A, SMITS M A. Globatest and GOEAST two different approaches for Gene Ontology analysis[J]. *BMC Proc*, 2009, 3(Suppl 4):S10.
- [26] KANEHISA M. The KEGG database [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 247:91–101.
- [27] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1523.
- [28] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: Protein –protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1):D447–D452.
- [29] BRYNE J C, VALEN E, TANG M E, et al. JASPAR, the open access database of transcription factor–binding profiles: New content and tools in the 2008 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(1):D102–D106.
- [30] WANG J, LU M, QIU C X, et al. TransmiR: A transcription factor–microRNA regulation database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1):D119–D122.
- [31] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402–408.
- [32] JIA D, CHEN X F, CAO Y, et al. On-line comprehensive two-dimensional HepG2 cell membrane chromatographic analysis system for characterizing anti-hepatoma components from rat serum after oral administration of Radix scutellariae: A strategy for rapid screening active compounds in vivo[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118: 27–33.
- [33] GAO Z W, DENG G H, LI Y J, et al. *Actinidia chinensis* planch prevents proliferation and migration of gastric cancer associated with apoptosis, ferroptosis activation and mesenchymal phenotype suppression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126:110092.
- [34] 赵宏建, 刘双晶, 李建朋, 等.牛膝改善骨质疏松模型大鼠内源性代谢物的作用机制[J].*中医学报*, 2024, 39(4):820–827.
- [35] 兰志杰, 郭浩然, 柯义兵, 等.长链非编码RNA在骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用机制[J].*山东医药*, 2024, 64(30):93–97.
- [36] ZHANG L X, ZHANG C, ZHENG J W, et al. miR-155-5p/Bmal1 modulates the senescence and osteogenic differentiation of mouse BMSCs through the hippo signaling pathway[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2024, 20(2):554–567.
- [37] TROJNIAK J, SENDER A, BANAS-ZABCZYK A, et al. The microRNAs in the pathophysiology of osteoporosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11):6240.
- [38] GUO Y X, WANG N, WU W C, et al. The role of miR-23b in cancer and autoimmune disease[J]. *J Oncol*, 2021, 2021:6473038.
- [39] RAMÍREZ-SALAZAR E G, CARRILLO-PATIÑO S, HIDALGO-BRAVO A, et al. Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women[J]. *Gene*, 2018, 679:19–27.
- [40] WU J G, JI C B, CAO F F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit dendritic cells differentiation and maturation by microRNA-23b[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(2):BSR20160436.
- [41] ZAMAN M S, THAMMINANA S, SHAHRYARI V, et al. Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e50203.
- [42] HU G D, WANG C X, WANG H Y, et al. Long noncoding RNA CCAT2 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXC1 expression by sponging miR-23b-5p in lung adenocarcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5):7998–8007.
- [43] XIN R, QU D H, SU S, et al. Downregulation of miR-23b by transcription factor c-Myc alleviates ischemic brain injury by upregulating Nrf2[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13):3659–3671.
- [44] FULCINITI M, AMODIO N, BANDI R L, et al. miR-23b/SP1/c-Myc forms a feed-forward loop supporting multiple myeloma cell growth[J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6(1):e380.
- [45] RUAN G F, ZHENG L, HUANG J S, et al. Effect of mesenchymal stem cells on Sjögren-like mice and the microRNA expression profiles of splenic CD4⁺ T cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6):2828–2838.
- [46] SAKAMOTO A, CHEN M, NAKAMURA T, et al. Deficiency of the G-protein α -subunit G α in osteoblasts leads to differential effects on trabecular and cortical bone[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22):21369–21375.
- [47] WANG K Z, WANG X M, LV H Z, et al. Identification of the miRNA –target gene regulatory network in intracranial aneurysm based on microarray expression data[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6):3239–3248.
- [48] HIDESHIMA T, ANDERSON K C. (下转第85页)

- 理的中药复方制剂药学研究技术指导原则(试行)》的通告[EB/OL].(2021-08-27)[2025-02-08].<https://ww.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0>.
- [14] 王祯,张俊令,焦宏基,等.黄芪有效成分的药理作用与质量控制研究进展[J].药物评价研究,2023,46(4):917-924.
- [15] 陈翔,丘余良.浅析黄芪在糖尿病肾脏病治疗中的作用[J].江西中医药,2024,55(11):77-80.
- [16] 王丹阳,冯毅晖,潘加豪,等.黄芪的主要化学成分及药理作用[J].新农民,2024(24):126-128.
- [17] 孙增红,张莎,王丽娃,等.黄蜀葵花提取物中总黄酮与总多酚含量测定及体外抑菌与抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2024,41(2):26-32.
- [18] 钟菲菲,李静,雷德卿,等.HPLC法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量[J].食品与机械,2023,39(9):57-64.
- [19] 余淑惠,费文婷,梁唯灿,等.高效液相色谱法测定臻源胶囊中金丝桃苷和五味子醇甲含量[J].吉林中医药,2023,43(8):957-960.
- [20] 关诗涵,刘畅,颜晓桐,等.黄蜀葵花化学成分、药理活性研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2025,50(4):908-921.
- [21] 王卓,钟凌云,解杨,等.基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(3):882-897.
- [22] 张鹏,许煜迪,周萍,等.基于血浆代谢组学研究制何首乌改善小鼠肾虚的作用机制[J].药学学报,2023,58(6):1464-1474.
- [23] 苑天彤,姜雪,李雪,等.何首乌提取物二苯乙烯苷对糖尿病肾病模型大鼠肾组织血管内皮生长因子干预研究[J].中华中医药学刊,2023,41(4):218-220,296-298.
- [24] 苑天彤,李雪,王宏杨.何首乌提取物二苯乙烯苷延缓糖尿病大鼠肾小球滤过率下降的实验研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2023,24(1):17-20+96-97.
- [25] 刘洋,王睿,陈淑静,等.莲须HPLC指纹图谱建立及12种黄酮类成分的含量测定[J].中药材,2024,47(12):3060-3064.
- [26] 刘燕,张清华,郭小藤,等.HPLC法测定黄蜀葵花中7种黄酮类成分的含量[J].中国药师,2021,24(7):373-376.

(收稿日期:2025-02-18 编辑:蒋凯彪)

- (上接第65页)Signaling pathway mediating myeloma cell growth and survival[J]. Cancers, 2021,13(2):216.
- [49] MARIE P J, HAŁĘ D, MODROWSKI D, et al. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton[J]. Calcif Tissue Int, 2014,94(1):46-54.
- [50] ARAI F, OHNEDA O, MIYAMOTO T, et al. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation[J]. J Exp Med, 2002,195(12):1549-1563.
- [51] JIANG Z, QIAN J, DONG H Y, et al. The traditional Chinese medicine Achyranthes bidentata and our de novo conception of its metastatic chemoprevention: From phytochemistry to pharmacology[J]. Sci Rep, 2017,7(1):3888.
- [52] TANG X, CHEN Y R, GU X S, et al. Achyranthes bidentata Blume extract promotes neuronal growth in

- cultured embryonic rat hippocampal neurons[J]. Prog Nat Sci, 2009,19(5):549-555.
- [53] LV M Y, CUI C L, CHEN P, et al. Identification of osteoporosis markers through bioinformatic functional analysis of serum proteome[J]. Medicine, 2020,99(39):e22172.
- [54] TENG Z W, XIE X G, ZHU Y, et al. miR-142-5p in bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes osteoporosis involving targeting adhesion molecule VCAM-1 and inhibiting cell migration[J]. BioMed Res Int, 2018,2018(1):3274641.
- [55] SHEN X J, GUO Y H, YU J J, et al. miRNA-202 in bone marrow stromal cells affects the growth and adhesion of multiple myeloma cells by regulating B cell-activating factor[J]. Clin Exp Med, 2016,16(3):307-316.

(收稿日期:2024-12-24 编辑:罗英姣)