

淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞骨向诱导的实验研究

吴昊¹ 查振刚¹ 姚平² 熊高鑫¹ 邝松玮¹ 束志勇¹

摘要 **目的** 通过研究淫羊藿苷(icariin, ICA)对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖和骨向分化能力的影响,并观察其促 BMSCs 骨向分化过程中对细胞因子转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形成蛋白-2(BMP-2)表达的影响,分析可能的作用途径,为阐释其防治骨质疏松(osteoporosis, OP)的作用机理提供实验依据,并为以 TGF- β_1 、BMP-2 作为筛选防治 OP 药物进行实验研究。**方法** 以碱性磷酸酶(ALP)等指标确定干预药物不同浓度梯度中最佳促 BMSCs 骨向分化剂量;分组实验,通过检测诱导分化过程中 ALP 和钙化结节等指标的表达,来观察其对 BMSCs 骨向分化能力的影响;采用 ELISA 法检测骨向分化过程中 TGF- β_1 、BMP-2 的表达。**结果** (1) ICA 最佳促 BMSCs 骨向分化浓度为 1×10^{-9} mol/L。ICA 10^{-9} 组能促进成骨指标的表达和 TGF- β_1 和 BMP-2 分泌增加;(2) 能促 BMSCs 骨向分化能力的 ICA 各诱导组均伴随 TGF- β_1 和 BMP-2 分泌增加。**结论** ICA 能促进 BMSCs 骨向分化;在 BMSCs 骨向分化过程中,上调 TGF- β_1 、BMP-2 的表达量可能是各干预药物促进 BMSCs 骨向分化的作用机制之一。

关键词 淫羊藿苷;骨髓间充质干细胞;骨质疏松症;骨向分化

Experimental Study of Icarin in Inducing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation WU Hao, ZHA Zhen-gang, YAO Ping, et al *Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Guangzhou (510630)*

ABSTRACT **Objective** To research the effect of icariin (ICA) on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and to study its influence on the expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in the progress of BMSCs differentiating into osteoblast, for providing an experimental evidence to explain the mechanism of ICA, also for exploring the feasibility of establishing a platform upon TGF- β_1 and BMP-2 to screen out the medicine in preventing and treating osteoporosis. **Methods** After the most effective concentration of ICA for promoting the differentiation of BMSCs into osteoblast was judged with the indices like alkaline phosphatase (ALP), etc., a grouped experiment was conducted for the sake of studying the effect and mechanism of ICA in its process of inducing BMSCs differentiation into osteoblast through detecting expression of ALP and calcium nodes, as well as the expressions of TGF- β_1 and BMP-2 with ELISA. **Results** The most effective concentration of the ICA on the BMSCs differentiation was judged as 1×10^{-9} mol/L, ICA of that concentration showed effects in enhancing the expressions of osteoblast-indices and increasing the secretion of TGF- β_1 and BMP-2. Besides, the increase of TGF- β_1 and BMP-2 was revealed in all the groups, in which ICA showed its influence visibly. **Conclusion** ICA could promote the differentiation of BMSCs into osteoblast; the up-regulation of TGF- β_1 and BMP-2 expressions is possibly one of the action mechanisms of various interventional drugs in their differentiation promoting progress.

KEYWORDS icariin; bone marrow mesenchymal stem cell; osteoporosis; osteogenic differentiation

淫羊藿苷(icariin, ICA)是传统补益中药淫羊藿的主要活性成分之一,具有温阳补肾、强筋健骨、祛风除湿等功效。研究发现,淫羊藿苷具有雌激素样结构,可抑制骨吸收,诱导骨髓间充质干细胞(bone mesen-

chymal stem cells, BMSCs)骨化,近年来已被视为一种植物雌激素广泛用于抗骨质疏松(OP)治疗和成骨、破骨细胞研究。本实验拟通过研究 ICA 促 BMSCs 骨向分化过程中对转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形成蛋白-2(BMP-2)表达的影响,探讨 ICA 促 BMSCs 增殖和骨向分化的作用机制,为阐释其防治骨质疏松的作用机理提供实验依据。

基金项目:广东省中医药管理局资助课题(No. 2007126)

作者单位:1. 暨南大学附属第一医院骨科(广州 510630);2. 暨南大学医学院

通讯作者:查振刚, Tel: 020-38688004, E-mail: zhzg@tom.com

材料与方 法

1 动物 健康新西兰大白兔,雌雄不限,4 周龄,体重 2.0~3.0 kg,由广东省医学动物实验中心提供(合格证号:2008A001)。

2 主要药物及试剂 ICA 粉末由中国药品生物制品鉴定所提供,纯度 98.3%,批号 120756-200812。DMEM/F12 为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清(FBS)为天津 TBD 公司产品;胰蛋白酶为美国 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)为美国 Sigma 公司产品;Rabbit TGF- β_1 、BMP-2、ELISA 试剂盒为美国 ADL 公司产品;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;经典骨向分化诱导剂(地塞米松磷酸钠- β -甘油磷酸钠-Vit C)为美国 Sigma 公司产品;茜素红为美国 Sigma 公司产品;无水乙醇为广州化学试剂厂产品。

3 主要仪器 REVCO-CO₂ 培养箱(RCOOOTVBB,上海生物科技公司);Olympus 倒置相差显微镜(CK40-F200,北京化学仪器公司);BIO-RAD 酶标仪(680,上海市跃进医疗器械厂);MILLIPORE 纯水仪(QCARDOR1 型,苏州净化);低速水平离心机(520,上海市跃进医疗器械厂);高速水平离心机(CK-150,美国 Sigma 公司);血球计数板(L-110,上海市求精生化试剂仪器有限公司);恒温磁力搅拌器(LK-M,江苏国华仪器厂);一次性针孔过滤器(0.22 μ L,德国 Sartorius)。

4 方法

4.1 BMSCs 的分离培养和鉴定 采用全骨髓贴壁法^[1],取 4 周龄新西兰大白兔空气注射耳缘静脉处死,75%酒精浸泡 10 min,再用 75%酒精、3%碘酒消毒兔双侧上下肢,铺无菌洞巾,无菌条件下取兔双侧肱骨、尺桡骨、股骨和胫腓骨,剔除骨表面附着的肌肉组织及骨干骺端,分离完毕将其置入小烧杯中。在超净台内用无菌 5 mL 注射器抽取不含 FBS 的 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔 3~4 次,充分吹打均匀,将冲洗液收集到离心管中,低速离心 1 000 r/min,离心 5 min,弃去上清液,加入含有 10% FBS 的细胞培养液重悬细胞。用无菌 1 mL 皮试针吸取溶液制成单细胞悬液,在光学显微镜下用血球计数板计数,以 5×10^6 个/mL 密度接种于 25 cm² 塑料培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的恒温培养箱中,24~48 h 后在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况,多数细胞贴壁生长且轻微摇晃瓶身见细胞不易脱落后,在超净台内首次全量换液(每次全量换液都加入含有 10% FBS 的培养液),弃去未贴壁细胞,以后每 3 天全量换液 1 次。原代培养 10~12 天左

右,贴壁细胞已贴满培养瓶,呈成纤维细胞样生长。用 37 $^{\circ}$ C 预热的 0.25% 胰酶室温下消化原代细胞,光学显微镜下见贴壁细胞基本挛缩后,加入新鲜完全培养液终止消化,用吸管吹打成单细胞悬液,按 1:2 比例传代,接种于两个 25 cm² 培养瓶中,以后每约 8~10 天细胞贴满培养瓶,按 1:3 比例传代。纯化细胞。定期观察,换液。

4.2 ICA 母液的制备 ICA 6.76 mg 溶于 10 mL PBS 液中,充分溶解后,制备成 1×10^{-3} mol/L 的母液,0.22 μ m 微孔过滤器过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。并以此浓度作为浓度梯度的母液进行相应的稀释。处理 ICA 时注意需先加 DMSO 10~20 μ L,在振荡的情况下使其充分溶解,再加入 PBS 液定容至 10 mL。

4.3 ICA 诱导 BMSCs 骨向分化的研究实验

4.3.1 ICA 促 BMSCs 骨向分化最佳浓度 P3 代 BMSCs 以 1×10^5 cells/mL 的密度接种于 24 孔板,设置空白组(有细胞但未加药物), 1×10^{-4} mol/L, 1×10^{-5} mol/L, 1×10^{-6} mol/L, 1×10^{-7} mol/L, 1×10^{-8} mol/L, 1×10^{-9} mol/L, 1×10^{-10} mol/L, 1×10^{-11} mol/L 的 ICA 各浓度组,共 9 组,每组 6 个复孔。待细胞接种 24 h 后,换入无血清培养基,24 h 细胞周期同步化后,再加入药物及完全培养基,使每孔终体积 1 mL。培养板置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中继续培养。每 3~4 天换液 1 次,连续干预 14 天。第 14 天收集细胞上清液,按照 ALP 试剂盒说明检测 ALP 活性;并将其结果进行统计学分析,以确定 ICA 最佳的促 BMSCs 骨向分化浓度。

4.3.2 ICA 对兔 BMSCs 骨向分化能力的影响 将实验分为 3 组,空白组:含 10% FBS 的 L-DMEM 完全培养液;经典组:含 10% FBS 的 L-DMEM 完全培养液加经典骨向分化诱导剂;ICA 10^{-9} 组:含 10% FBS 的 L-DMEM 培养液加 1×10^{-9} mol/L ICA。(1)检测 ALP 活性:P3 代 BMSCs 以 1×10^5 cells/mL 接种于 24 孔板,共 6 组,每组 6 个复孔。待细胞接种 24 h 后,换入无血清培养基,待细胞周期同步化 24 h 后加药,每孔终体积 1.0 mL。每 3~4 天换液 1 次,连续干预 14 天。干预期间分别取 3、7、14 天细胞上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存,收集齐后运用 ALP 试剂盒检测 ALP 活性。(2)检测体外矿化能力:P3 代 BMSCs 以 1×10^5 cells/mL 接种于预先置有小盖玻片的 6 孔板中,共 6 组,每组 3 个复孔。处理同上,每孔终体积 2.5 mL。每 3 天换液 1 次,连续干预 21 天。第 21 天将每组细胞弃培养液,PBS 清洗后,95%乙醇固定 30 min,再用 0.1% 茜素红染色 30 min,清水冲洗。低倍镜(40 \times)下进行矿化结节计数,每孔细胞随机计数 10 个视野的矿化结节数。

4.4 ICA 对 TGF-β₁ 及 BMP-2 表达的影响 分组同上;收集各组诱导 7、14、21 天细胞上清液, -20 ℃ 保存,收集齐后按照 Rabbit TGF-β₁ 及 BMP-2 ELISA 试剂盒说明进行检测。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值,以 OD 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,绘制曲线图,根据样品的 OD 值查找对应的浓度范围。

4.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,所得数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,定量指标运用方差分析,检验水准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1 BMSCs 的分离培养结果 分离培养后 36 h 首次换液见大量贴壁细胞(图 1A)。初期呈短棒状,3 ~ 4 天贴壁细胞数量增多,细胞伪足增长呈短梭形,贴壁分裂细胞形成不同大小、分散的细胞集落(图 1B);6 ~ 7 天集落迅速增加、长大,集落中心周围有放射状生长的贴壁细胞,胞体略大,形态均一,多呈梭形,排列紧密;之后细胞迅速增殖,集落相互融合,9 ~ 10 天细胞逐渐融合成片,细胞间相互紧密贴附生长,沿胞体长轴有序排列,呈漩涡状(图 1C、D)。细胞消化后,呈圆形,1 ~ 2 h 后开始迅速贴壁,伸展,逐渐恢复成梭形。传代后的细胞增殖速度较快,不再以成集落的方式生长,而是呈均匀分布的纺锤形细胞平均生长。5 ~ 7 天即可传代一次,且细胞形态单一均匀,融合后呈典型的

极性,漩涡状生长(图 1E、F)。取第 3 代细胞行流式细胞仪检测,CD44、CD29 阳性细胞比率分别为 94.57% 和 98.23%,CD45、CD34 阳性细胞比率分别为 0.61% 和 0.53%。符合 BMSCs 的生物学特性。

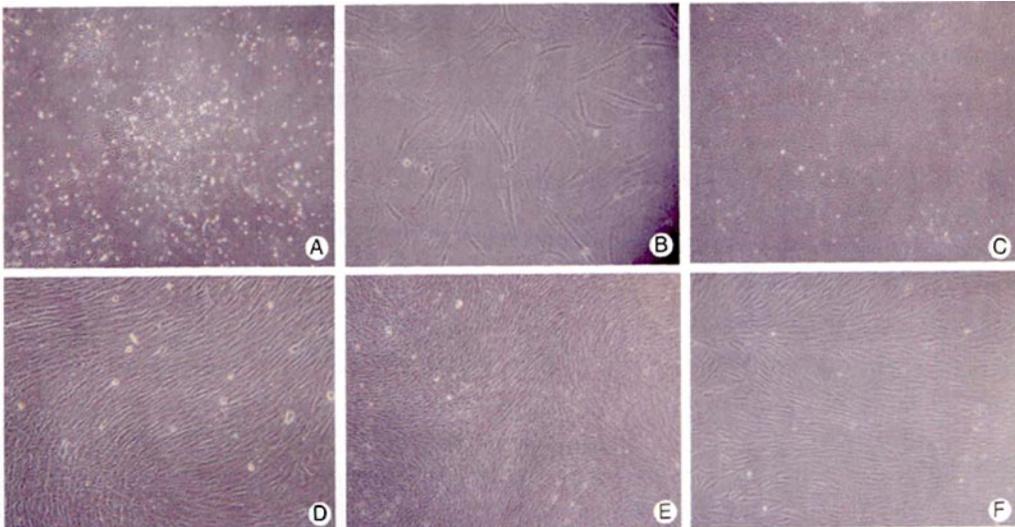
2 不同浓度 ICA 对 ALP 活性的影响(图 2) 观察 0、 1×10^{-4} mol/L、 1×10^{-5} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-10} mol/L、 1×10^{-11} mol/L ICA 组 9 个浓度梯度组对 BMSCs 骨向分化指标 ALP 的影响,结果表明 1×10^{-9} mol/L ICA 组的 ALP 值明显高于其他组($P < 0.05$),从而以筛选出其最佳促骨向分化 ICA 浓度为 1×10^{-9} mol/L。

3 各诱导组 ALP 活性比较(表 1) ICA 对 ALP 的影响具有时间依赖性。接种 3 天时,经典组、ICA 10^{-9} 组 ALP 值高于空白组($P < 0.05$),而 ICA 10^{-9} 组与经典组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);7 天及 14 天时 ICA 10^{-9} 组 ALP 值高于经典组及空白组($P < 0.05$)。表明 ICA 具有诱导 BMSCs 骨向分化的作用,且中后期诱导能力要高于经典骨向分化诱导剂。

表 1 各诱导组 ALP 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

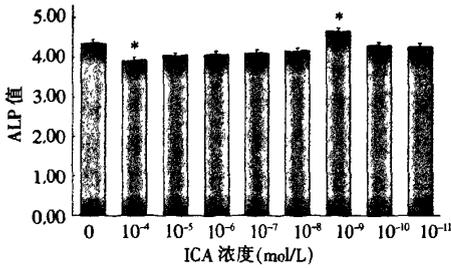
组别	n	ALP(金氏单位)		
		3 天	7 天	14 天
空白	6	6.3046 ± 0.1255	6.7851 ± 0.3001	5.7959 ± 0.2011
经典	6	7.4795 ± 0.3642*	6.9450 ± 0.2818	6.1491 ± 0.3133
ICA 10^{-9}	6	7.5740 ± 0.2161*	7.9389 ± 0.3504* [△]	6.8177 ± 0.2508* [△]

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与经典组比较, [△] $P < 0.05$;下表同



注:A 为 P0 代 BMSCs 首次换液 (40x);B 为 P0 代 BMSCs 培养 4 天 (100x);C 为 P0 代 BMSCs 培养 9 天 (40x);D 为 P0 代 BMSCs 培养 9 天 (100x);E 为 P3 代的 BMSCs(40x);F 为 P3 代的 BMSCs(100x)

图 1 BMSCs 的分离培养结果



注:与空白组比较,*P<0.05

图 2 不同浓度 ICA 对 ALP 活性的影响

4 各诱导组矿化结节数目比较(表 2) 茜素红染色结果显示,药物干预培养 BMSCs 21 天后,3 组光镜(40×)下均可见细胞聚集生长、细胞外钙盐沉积,并形成点状的钙化结节,经典组和 ICA 10⁻⁹组钙化结节的数量明显高于空白组(P<0.05),其中以 ICA10⁻⁹组最高。进一步表明 ICA 具有诱导 BMSCs 骨向分化的作用,且诱导能力要高于经典骨向分化诱导剂。

表 2 各诱导组矿化结节数目比较 (x̄ ± s)

组别	n	镜下视野数(40×)	矿化结节数目(个)
空白	10	10	4.9 ± 1.4
经典	10	10	10.4 ± 1.1*
ICA10 ⁻⁹	10	10	15.2 ± 1.5* ^Δ

5 各诱导组 TGF-β₁ 及 BMP-2 表达量比较(表 3) 与空白组比较,BMSCs 经诱导培养后,TGF-β₁ 和 BMP-2 的表达均有所增加,且两者的表达量均表现出先增多,后减少,再增多的趋势。培养 7 天时经典组和 ICA10⁻⁹组 TGF-β₁、BMP-2 值均高于空白组(P<0.05),BMP-2 值以 ICA10⁻⁹组表达最多(P<0.05);14 天时各组的 TGF-β₁、BMP-2 值均下降,TGF-β₁ 值各组差异无统计学意义(P>0.05),BMP-2 值以 ICA10⁻⁹组表达最多(P<0.05);21 天时各组 TGF-β₁、BMP-2 值有所回升,且两指标均以其中 ICA10⁻⁹组表达最多(P<0.05)。表明 ICA 可促进 TGF-β₁、BMP-2 的表达,其在后期的促表达能力高于经典骨向分化诱导剂。上调 TGF-β₁、BMP-2 的表达,可能是 ICA 促进 BMSCs 骨向分化的作用途径之一。

讨 论

ICA,别名淫羊藿甙,淫羊藿素。为小檗科植

物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿、或朝鲜淫羊藿的干燥茎叶提取物。是一种植物黄酮苷类化合物,为中药淫羊藿的有效药理成分,具有补肾壮阳、免疫调节、抗肿瘤、延缓衰老、抗疲劳和耐缺氧、影响内分泌和心血管系统等多种重要的生物活性,是一类具有药用价值和较高保健作用的中药单体,因而日益得到重视。

中医学认为,“肾藏精,主骨,生髓”。ICA 正是通过“补肾阳”而达到“强筋骨”的功效^[2],其作用机制目前尚不明确,但大体可归纳如下:(1)以神经-内分泌-免疫网络为介导的整体调节功能;(2)调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能及类激素样作用;(3)具有促进蛋白质合成和增强下丘脑-垂体-性腺轴及肾上腺皮质轴、胸腺轴等内分泌系统的功能;(4)调节机体内环境微量元素的平衡,促使矿物质在骨中沉积并调节骨代谢的平衡。另有研究表明,ICA 可促进成骨细胞形态发生蛋白和 Cbfa1 基因的表达,抑制间充质细胞成脂分化,并可通过发挥雌激素样作用,调节 OPG/RANK/RANKL 系统,从而活化成骨细胞、抑制破骨细胞活性^[2]。ICA 还可通过 MAPK 信号途径逆转地塞米松对成骨细胞增殖分化的抑制^[3],另外还可促进 MC3T3-E1 细胞 Smad4 mRNA 的表达^[4],这两者均是成骨细胞重要的信号传导递质,与其功能状态有着直接的关系。这些研究成果均肯定了 ICA 补肾益骨的功效,展现了其应用于骨组织工程领域的良好潜质。

BMSCs 与机体内的骨形成和损伤后的修复密切相关^[1]。实验以免 BMSCs 为靶细胞,对 ICA 作为一种骨诱导活性因子的可行性作了初步探讨。ALP 是 BMSCs 的早期成骨分化指标,因此,本实验选用 ALP 作为评价 ICA 促 BMSCs 骨向分化最佳浓度的筛选依据,并作为检验 ICA 促进 BMSCs 骨向分化能力的衡量指标。通过比较不同浓度组 ICA 促 ALP 分泌量的不同,可以找出 ICA 最佳促 BMSCs 骨向分化的浓度(1 × 10⁻⁹ mol/L)。同时将 ICA 与经典骨化诱导剂及空白组对比,衡量不同组 ALP 的活性,可以证明 ICA 具有促 BMSCs 成骨分化活性,且成骨活性存在最适剂量(1 × 10⁻⁹ mol/L)。钙化结节是成骨细胞功能活动的表

表 3 各诱导组 TGF-β₁ 及 BMP-2 的表达量比较 (μg/L, x̄ ± s)

组别	n	TGF-β ₁ 的表达量			BMP-2 的表达量		
		7 天	14 天	21 天	7 天	14 天	21 天
空白	6	118.81 ± 17.99	86.83 ± 12.48	91.77 ± 15.07	211.30 ± 11.79	188.99 ± 13.72	228.57 ± 9.36
经典	6	212.74 ± 10.38*	95.73 ± 13.93	103.75 ± 11.91*	257.08 ± 9.06*	201.39 ± 15.31	262.04 ± 10.06*
ICA10 ⁻⁹	6	197.27 ± 13.60*	99.81 ± 9.37	136.96 ± 16.22* ^Δ	299.22 ± 9.84* ^Δ	219.98 ± 11.03* ^Δ	341.37 ± 14.85* ^Δ

现形式,是 BMSCs 向成骨细胞分化成熟的标志之一^[1]。在诱导 21 天进行茜素红染色表明,ICA 可诱导成骨分化的 BMSCs 呈现聚集样生长,同时还可促进细胞外钙盐的沉积,形成钙化结节的数量明显高于经典组及空白组,这与成骨分化早期的 ALP 检测结果相一致。说明 ICA 在 BMSCs 成骨分化的全程均发挥了良好的成骨诱导活性。

TGF- β s 是 TGF- β 超家族的一员,其中 TGF- β_1 与骨代谢的关系最为密切,具有广泛的生物学活性,在骨诱导过程中被认为是极具潜力的因子^[5]。TGF- β_1 能调控多种间充质来源细胞增殖和定向分化,尤其是在成骨分化、骨基质合成和骨重建中起着重要的作用,成为调控 BMSCs 骨向分化的首选生长因子之一^[6,7]。石义刚等^[8]发现 TGF- β_1 能促进 OB 形成、活性增加,且在低剂量下增殖较快,亦能促进骨保护素(OPG) mRNA 的表达。此外,自分泌 TGF- β_1 还通过参与调节 OC 的活性,抑制单个 OC 对骨的吸收活性,诱导 OC 凋亡等抑制骨吸收。由此可见 OP 患者骨小梁内 TGF- β_1 含量下降,若给予外源性 TGF- β_1 ,不但增强骨形成,还可减轻 OC 的破骨作用,有益于 OP 的防治。TGF- β_1 能调控多种间充质来源细胞增殖和定向分化,尤其是在成骨分化、骨基质合成和骨重建中起着重要的作用,成为调控 BMSCs 骨向分化的首选生长因子之一^[7,8]。实验证实,外源性 TGF- β_1 加入或 TGF- β_1 基因转染入 BMSCs,均能提高其增殖能力,而且能促进成骨表型 ALP、BGP 和 OPN 的表达^[9]。此外,TGF- β_1 能抑制 BMSCs 脂向分化,而且对由糖皮质激素所诱导的 BMSCs 脂向分化也有抑制作用^[9,10]。

BMP 是体内一种多肽生长因子,属于 TGF- β 超家族成员,是目前公认的高效骨诱导因子,它具有诱导 OB 分化和体外成骨的能力,而且能启动 BMSCs 的成骨过程,其中以 BMP-2 的成骨能力最强^[11]。BMP-2 是一种分泌性、疏水性、酸性糖蛋白,它可在体内通过旁分泌和自分泌的形式诱导骨、软骨及与骨有关的结缔组织的形成,还能在体内非骨组织诱导骨源和非骨源性细胞的异位成骨^[12]。研究发现,老年 OP 患者的 BMP-2 mRNA 表达明显降低^[13],说明 BMP-2 的减少与 OP 的产生有着直接的联系。实验证实,外源性 TGF- β_1 或 BMP-2 加入 BMSCs,或将 TGF- β_1 基因或 BMP-2 基因转染入 BMSCs,均能提高其增殖能力,而且能促进成骨表型 ALP、BGP 和 OPN 的表达^[14,15],促进其向 OB 分化。

本实验中,不同诱导时间 TGF- β_1 和 BMP-2 的检测结果显示,BMSCs 经 ICA 诱导培养后,TGF- β_1 和

BMP-2 的表达均有所增加,说明 TGF- β_1 、BMP-2 与 BMSCs 骨向分化密切相关,上调 TGF- β_1 和 BMP-2 的表达可能是 ICA 诱导 BMSCs 骨向分化的作用机制之一。另外,各组中二者的表达量均表现出先增多,后减少,再增多的趋势,且各组 TGF- β_1 21 天时虽有回升,但表达浓度均低于 7 天时。而 BMP-2 则与之相反,诱导 21 天时各组回升浓度均大于 7 天时。提示 TGF- β_1 和 BMP-2 可能分别在 BMSCs 骨向分化过程的早期和晚期发挥重要作用,而这也与上述 ICA 对 BMSCs 的成骨分化全程发挥诱导活性的结论相吻合。

综合以上分析,淫羊藿苷可有效促进 BMSCs 的成骨分化,并且存在最适诱导浓度(1×10^{-9} mol/L),可视为一种良好的骨诱导活性因子,上调 TGF- β_1 和 BMP-2 的表达可能是 ICA 诱导 BMSCs 骨向分化的作用机制之一。另外,淫羊藿苷来源广泛、价格低廉、提取工艺相对简单、性质稳定、易于储存,这些特性亦为其将来应用于骨组织工程领域提供了便利。但其具体作用机制及其在分子水平对 BMSCs 的影响,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] FriedenstainAJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers [J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3): 263-272.
- [2] 黄建华,沈自尹,吴斌,等. 从基因表达谱和代谢组学角度探讨淫羊藿总黄酮延缓衰老的效应及机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(1): 47-50.
Huang JH, Shen ZY, Wu B, et al. Effect and mechanism of Eepimedium flavanoids for aging retardation from viewpoint of transcriptomics and metabonomics [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28(1): 47-50.
- [3] 杜娟,凌昌全,陈永安. 淫羊藿和熟地煎剂对糖皮质激素受体下调模型大鼠糖皮质激素受体的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(1): 64-67.
Du J, Ling CQ, Chen YA. Effect of herba epimedii brevicornus and prepared Radix Rehmannia on glucocorticoid receptor in glucocorticoid receptor down-regulated rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28(1): 64-67.
- [4] 雪原,王沛,齐清会,等. 淫羊藿甙对成骨细胞 Smad4 mRNA 作用的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(2): 119-123.
Xue Y, Wang P, Qi QH, et al. The experimental study of the effects of icariin on increasing Smad4 mRNA level in MC3T3-E1 cell *in vitro* [J]. Chin J Orthop, 2005, 25(2): 119-123.

- [5] Alliston T. TGF-beta regulation of osteoblast differentiation and bone matrix properties [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6(4):349-50.
- [6] Kten Dijke, P Janssens, S Van Hul W. Transforming growth factor beta 1 to the bone [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(6): 743-774.
- [7] Jadowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents [J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2003, 3(3): 409-423.
- [8] 石义刚,陶天遵,徐强,等. TGF- β 对成骨细胞增殖、分化及 OPG 基因 mRNA 表达的影响 [J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2003, 2(3):170-172.
Shi YG, Tao TZ, Xu Q, et al. Effect of TGF- β on the proliferation and differentiation and gene expression in rat osteoblast [J]. *Chin J Bone Tumor Bone Dis*, 2003, 2(3): 170-172.
- [9] 潘海涛,郑启新,郭晓东,等. 含 RGD 肽基因导入系统介导 TGF- β_1 基因转染对兔骨髓基质干细胞增殖和体外诱导成骨的影响 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2006, 25(5):596-601.
Pan HT, Zheng QX, Guo XD, et al. Effects on proliferation and osteoblastic phenotype of rabbit bone marrow stromal cells transfected with transforming growth factor-beta 1 gene mediated with RGD-containing peptide gene delivery system *in vitro* [J]. *Chin J Biomed Engine*, 2006, 25(5): 596-601.
- [10] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Holy X, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(17): 668-677.
- [11] Nakayama T, Cui Y, Christian JL. Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(6): 943-956.
- [12] 王茸影,易静. 骨形成蛋白调控成骨分化的信号机制 [J]. *生命科学*, 2005, 17(1):34-36.
Wang RY, Yi J. Signaling mechanism of osteoblastic differentiation of bone morphogenetic proteins [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2005, 17(1):34-36.
- [13] 张勇,吴兴裕,陈苏民. 老年性骨质疏松患者骨中骨形成蛋白-2 及骨形成蛋白-7 基因表达 [J]. *中国临床康复*, 2002, 6(7):989.
Zhang Y, Wu XY, Chen SM. Study of the gene expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2, -7 in the cancellous bone of senior primary osteoporosis [J]. *Mod Rehabil*, 2002, 6(7):989.
- [14] Delannoy P, Lemonnier J, Hay E, et al. Protein kinase C-dependent upregulation of N-cadherin expression by phorbol ester in human calvaria osteoblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 269(1): 154-161.
- [15] Kim HK, Kim JH, Abbas AA, et al. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(12):3121-3128.

(收稿:2009-08-17 修回:2010-01-12)

全国中西医结合基础理论研究学术研讨会征文通知

为了系统总结近年来中西医结合基础理论研究及临床实践应用的最新成果,深入研讨中西医结合基础理论的思路与方法,集中展示我国近期在该领域的研究成果与进展,定于2010年10月15—17日在湖南省长沙市(会议地点:留芳宾馆,14日全天报到)召开“第六届全国中西医结合基础理论研究学术研讨会”。会议由中国中西医结合学会基础理论研究专业委员会主办,中南大学湘雅医学院承办。现将征文事项通知如下。

征文内容 (1)中西医结合基础理论研究及临床应用进展、思路与方法;(2)中西医结合各科实验研究和临床应用研究;(3)中西医结合基础理论研究人才培养;(4)其他。

征文要求 (1)来稿免收审稿费,所投稿件须为尚未公开发表的论文;(2)论文要求主题明确,资料充分,数据可靠,论点鲜明。来稿请寄全文,要求4000字以内,并附400字以内的中英文结构式摘要及关键词。稿件一律用Word文档格式排版;(3)稿件须加盖单位公章,注明作者姓名、工作单位、邮编,如属省部级以上课题者请注明。

投稿方法 论文发至 E-mail:huangx59@163.com 或 xw3134@sina.com。邮件主题栏请注明“基础理论研究学术会议征文”字样;截止日期:2010年7月30日(以发送时间为准);经审评录用的论文将收入大会学术论文集,组委会将给论文作者邮寄会议通知,并在会议期间颁发论文证书。

联系方式 (1)湖南省长沙市湘雅路87号(邮编410008)中南大学湘雅医院,黄熙(13974976416);(2)广州中医药大学,富文俊(15918464103)、史亚飞(13798046294)。