

· 基础研究 ·

龟鹿二仙胶诱导大鼠骨髓基质干细胞成骨分化作用及对 Wnt 通路的影响

牛素生¹ 李楠¹ 张燕¹ 刘俊宁¹ 林建华²

摘要 **目的** 观察龟鹿二仙胶含药血清对 SD 大鼠骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)成骨分化的作用及其对 Wnt 信号通路相关因子的影响。**方法** 100 只 3 月龄雌性 SD 大鼠经腹腔入路切除双侧卵巢,按随机数字表法分为低剂量组、中剂量组、高剂量组和空白组,每组 25 只。按体表面积换算龟鹿二仙胶剂量并灌胃给药,连续 7 天后腹主动脉采血制备含药血清。1 月龄 SD 大鼠全骨髓贴壁法分离 BMMSCs,流式细胞法(flow cytometry, FCM)法检测 F₃ 代细胞 CD45 和 CD90 表达;不同浓度龟鹿二仙胶含药血清干预 F₃ 代 BMMSCs 72 h 后,FCM 法检测细胞周期的影响并计算增殖指数,确定最佳干预浓度。F₃ 代细胞分为 FBS 组、空白组、龟鹿二仙胶组和经典诱导组,诱导培养 21 天后,茜素红(alizarin red staining, ARS)染色法观察 BMMSCs 成骨分化,RT-PCR 检测成骨分化相关基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和骨钙素(osteocalcin, OC) mRNA 的表达;RT-PCR 和 Western blot 检测 Wnt5a、 β -连环蛋白(β -catenin)、淋巴样增强因子-1(lymphoid enhancer factor-1, Lef-1) mRNA 和蛋白的表达。**结果** F₃ 代细胞 CD45 阳性表达率为 1.46% $\pm$ 0.23%, CD90 阳性表达率为 96.97% $\pm$ 3.21%;浓度为 10% 的龟鹿二仙胶中剂量组含药血清能显著促进 BMMSCs 增殖;龟鹿二仙胶组和经典诱导组 ARS 染色可见橘红色钙结节。与空白组及 FBS 组比较,龟鹿二仙胶组和经典诱导组 OC 和 ALP mRNA 表达上调($P < 0.05$), Wnt5a、 β -catenin mRNA 和蛋白表达上调($P < 0.05$);与空白组、FBS 组和经典诱导组比较,龟鹿二仙胶组 Lef-1 mRNA 和蛋白表达均升高($P < 0.05$);与 FBS 组和空白组比较,经典诱导组 Lef-1 蛋白表达上调($P < 0.05$)。**结论** 龟鹿二仙胶含药血清具有促进 BMMSCs 增殖,诱导 BMMSCs 向成骨细胞分化的作用,其机制可能与调控 Wnt 信号通路相关因子的表达有关。

关键词 龟鹿二仙胶;含药血清;骨髓基质干细胞;成骨分化;Wnt 信号通路

Guilu Erxian Glue Induced Osteogenic Differentiation of BMMSCs and Its Effects on Wnt Signal Pathway NIU Su-sheng¹, LI Nan¹, ZHANG Yan¹, LIU Jun-ning¹, and LIN Jian-hua² 1 College of Orthopedics and Traumatology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 2 Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou (350005)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Guilu Erxian Glue (GEG) containing serum on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and Wnt signal pathway related factors. **Methods** Totally 100 three months old female SD rats had their bilateral ovaries excised peritoneally. They were divided into the low, middle, high GEG groups, and the blank control group by random digit table, 25 in each group. The dose of GEG was calculated according to body surface area, and GEG containing serum was administered by gastrogavage for 7 successive days. Blood was collected by abdominal aorta to prepare drug containing serum. F3 passage BMMSCs of 1-month SD rats were isolated by whole bone marrow adherent method, and cultured *in vitro* for 3 passages. The cell surface markers (CD45 and CD90) of F3 passage were detected by flow cytometry (FCM). BMMSCs were treated

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No. 2012J01382)

作者单位:1. 福建中医药大学骨伤学院(福州 350122); 2. 福建医科大学第一附属医院骨科(福州 350005)

通讯作者:林建华, Tel: 0591-87983333, E-mail: jianhua@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.01.0072

ted with different concentrations GEG containing serum for 72 h. Then the cell cycle was determined by FCM, and the proliferation index calculated. The optimal intervention concentration was determined. Then F3 passage BMMSCs were divided into four groups, i.e., the fetal bovine serum (FBS) group, the blank control group, the GEG group, the classical induction group. After they were treated with corresponding medium for 21 days, BMMSCs were dyed with alizarin red staining (ARS) to observe their osteogenic differentiation. mRNA expressions of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) of BMMSCs were detected by RT-PCR. mRNA and protein expressions of Wnt5a, β -catenin, and lymphoid enhancer factor-1 (Lef-1) were detected by RT-PCR and Western blot. Results The ratio of CD45 positive expression was $1.46\% \pm 0.23\%$, and the ratio of CD90 positive expression was $96.97\% \pm 3.21\%$. Middle EGE containing serum (10%) could significantly stimulate the proliferation of BMMSCs. In ARS citrus red calcium nodules could be seen in the GEG group and the classical induction group. Compared with the FBS group and the blank control group, mRNA expressions of OC and ALP were up-regulated, mRNA and protein expressions of Wnt5a and β -catenin were up-regulated in the GEG group and the classical induction group ($P < 0.05$). Compared with the FBS group, the blank control group, and the classical induction group, mRNA and protein expressions of Lef-1 were up-regulated in the EGE group ($P < 0.05$). Compared with the FBS group and the blank control group, protein expressions of Lef-1 increased in the classical induction group ($P < 0.05$). Conclusions GEG containing serum had the functions of stimulating the proliferation of BMMSCs, and inducing the osteogenic differentiation of BMMSCs. Its mechanism might be possibly related with regulating Wnt signal pathway related factors.

KEYWORDS Guilu Erxian Glue; drug containing serum; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; Wnt signal pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征一种全身性骨代谢性疾病,以绝经后骨质疏松症最为多见,其特点是骨的脆性增加和易于引起脆性骨折^[1,2],严重威胁人类健康。研究表明,骨髓基质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 在体内多种因素的调控下可向成骨细胞分化,参与和维持骨的构建过程^[3,4],与 OP 的发病关系密切。在其向成骨细胞分化过程中受多条信号通路的调控,其中 Wnt 信号通路逐渐成为研究的热点。近年来,研究发现中药可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMMSCs 向成骨细胞分化^[5,6]。前期研究发现中药经典复方龟鹿二仙胶能增加去卵巢骨质疏松大鼠骨密度和骨强度^[7],但作用机制尚不清楚。因此,本研究以体外细胞培养的方式观察龟鹿二仙胶对 BMMSCs 增殖和成骨分化的作用,并检测其对 Wnt 信号通路相关因子的影响以探求其防治绝经后 OP 的作用机制。

材料与方法

1 动物 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 100 只,体质量 250 ~ 280 g,用于龟鹿二仙胶含药血清制备。1 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 10 只,体质量 90 ~ 100 g,用于

BMMSCs 分离。购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号:SCXK(沪):2007-0005;动物合格证号:2007000532861],饲养于福建中医药大学医学实验动物中心清洁级实验室[许可证号:SYXK(闽)2009-0001]。除给药时间外,所有大鼠均 24 h 自由进食、饮水。

2 药物 鹿角胶(批号:A110611)6 g 龟甲胶(批号:A110372)9 g 枸杞子(批号:A110362)9 g 人参(批号:A110648)6 g,选用培力药业有限公司“农本方”浓缩中药配方颗粒。

3 试剂及仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶(美国 Hyclone),细胞周期测试试剂盒、CD90 和 CD45 表面标记物抗体(美国 BD 公司),SD 大鼠 BMMSCs 成骨诱导分化完全培养基(广州赛业生物科技有限公司)、茜素红-S 粉(美国 Sigma 公司),Wnt5a、 β -catenin、淋巴样增强因子-1(lymphoid enhancer factor-1,LEF-1)和 β -actin 兔抗大鼠单克隆蛋白抗体(美国 CST 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Pierce 公司),RevertAid™ cDNA 第一链合成、RIPA 裂解液(美国 Thermo 公司)。ND-2000C 型超微量蛋白核酸酶分析仪(美国 Thermo 公司)、Olympus IX70 倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社),DYY-12 型多用电泳仪、GEL

DOC2000 凝胶成像系统、S1000 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),FAC Salibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

4 含药血清制备 100 只 3 月龄雌性 SD 大鼠经腹腔入路^[7]切除双侧卵巢,随机数字表法分为低剂量组、中剂量组、高剂量组和空白组,每组 25 只。大鼠给药量按人与大鼠体表面积换算等效剂量^[8],计算后大鼠每天药量分别为鹿角胶 540 mg/kg,龟甲胶 162 mg/kg,枸杞子 270 mg/kg,人参 108 mg/kg,高、中、低组剂量之比为 4:2:1。术后第 2 天开始分 2 次(8:00am 和 2:00 pm)灌胃给药,连续 7 天。最后 1 次灌胃 2 h 后腹主动脉采取全部动脉血,室温静置 2 h 后 1 000 r/min 离心 15 min,分离含药血清,同组混匀,56 ℃水浴 30 min 灭活,0.22 μm 超微滤器过滤、分装,-20 ℃保存。

5 BMMSCs 分离培养和鉴定

5.1 BMMSCs 分离 1 月龄 SD 大鼠,采用全骨髓贴壁法分离 BMMSCs。具体操作如下:大鼠断颈处死后浸泡于 75% 酒精 5 min,游离双侧股骨和胫骨,剔除其上软组织,PBS 液冲洗 2 遍,自髌板处暴露干骺端骨面并显露骨髓腔,含 10% FBS 的培养基反复轻柔冲洗骨髓腔,收集冲洗液,5 mL 移液器轻轻吹打成单细胞悬液,200 目滤网过滤后转移至 10 mL 培养皿,37 ℃、5% CO₂、100% 湿度条件培养,记为 F₁代。48 h 后进行首次半量换液,此后每 2 天全量换液 1 次,直至培养皿底细胞融合呈片(约占皿底 80%~90%),0.25% 胰蛋白酶消化并计数细胞,按 2 × 10⁵ 个/瓶将细胞接入 25 mL 细胞培养瓶传代培养,此后每 2 天全量换液,至细胞融合 80%~90% 时按 1:4 比例传代至 F₃。

5.2 BMMSCs 鉴定

5.2.1 细胞形态观察 自 F₁代开始,倒置显微镜下观察 BMMSCs 生长并记录形态变化。

5.2.2 流式细胞仪(FCM)检测 BMMSCs 表面标记物 CD45 和 CD90 取 F₃代状态良好的细胞,0.25% 胰酶消化后计数,取 1 × 10⁶ 个细胞加入流式管中,依次加入兔抗大鼠 CD45 和 CD90 单克隆抗体,室温避光孵育 45 min,PBS 洗涤 3 遍去除未结合抗体,1 mL PBS 重悬细胞,流式细胞仪上检测 CD45 和 CD90 的表达^[9]。实验重复 3 次。

6 龟鹿二仙胶含药血清对 BMMSCs 增殖的影响 取 F₃代细胞,计数后以 1 × 10⁴ 个/孔密度接种于 6 孔板,按表 1 将细胞分组。血清饥饿 24 h,更换相应的条件培养基,继续培养 72 h 后 FCM 检测各组细胞

表 1 细胞增殖检测的分组及干预条件

组别	基础培养基	血清浓度
FBS	LG-DMEM + 双抗	10%
10% 空白血清	LG-DMEM + 双抗	10%
20% 空白血清	LG-DMEM + 双抗	20%
10% 低剂量血清	LG-DMEM + 双抗	10%
20% 低剂量血清	LG-DMEM + 双抗	20%
10% 中剂量血清	LG-DMEM + 双抗	10%
20% 中剂量血清	LG-DMEM + 双抗	20%
10% 高剂量血清	LG-DMEM + 双抗	10%
20% 高剂量血清	LG-DMEM + 双抗	20%

G₀/G₁、S、G₂/M 期细胞数,并计算细胞增殖指数(proliferation Index, PI)。PI 计算公式为:PI = (S + G₂/M) / (G₀/G₁ + S + G₂/M)^[10],以确定促进 BMMSCs 增殖的最佳含药血清浓度。

7 龟鹿二仙胶含药血清对各组 BMMSCs 成骨分化的影响 F₃代细胞以 1 × 10⁴ 个/每孔接种于 6 孔板,将细胞分为:FBS 组(LG-DMEM + 10% FBS)、空白组(LG-DMEM + 10% 大鼠空白血清)、龟鹿二仙胶组(LG-DMEM + 10% 龟鹿二仙胶中剂量组含药血清)和经典诱导组[LG-DMEM + 10% FBS + 地塞米松(10⁻⁸ mol/L) + β-甘油磷酸钠(10 mmol/L) + 维生素 C(50 mg/L)],血清饥饿 24 h 后按照分组,予以相应干预,分别干预 21 天后进行相关检测。

7.1 ARS 染色 条件培养后第 21 天,吸除原培养基,将细胞用 PBS 冲洗 3 遍,尽量吸尽 PBS,10% 福尔马林固定 45 min,吸除福尔马林并用蒸馏水缓慢冲洗 2 遍,稍晾干后每孔加入新鲜配置的 2% 茜素红-S 染液(pH:4.2) 1 mL,37 ℃ 遮光孵育 30 min,蒸馏水反复轻柔冲洗,干燥,显微镜下观察并拍照记录。

7.2 RT-PCR 检测 各组细胞 ALP 和 OC mRNA 表达 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,按 RevertAidTM cDNA 第一链合成试剂盒操作说明,20 μL 反应体系下将 RNA 逆转录为 cDNA。ALP、OC 和内参基因 GAPDH 引物序列及反应条件见表 2。94 ℃ 预变性 3 min、变性 30 s,退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,结束循环后,72 ℃ 再延伸 10 min。取终产物 5 μL,在电压 90 V、电流 50 mA 条件下行琼脂糖凝胶电泳 20 min,Image Lab 3.0 软件分析,以目的条带和内参 GAPDH 的灰度值比值进行分析。

8 龟鹿二仙胶含药血清对各组细胞 Wnt5a、β-catenin 和 Lef-1 mRNA 表达的影响 按照分组诱导培养 21 天后,RT-PCR 检测 Wnt5a、β-catenin 和 Lef-1 mRNA 表达,方法同 7.2。Wnt5a、β-catenin、Lef-1 以及内参基因 GAPDH 引物序列及反应条件等

见表 3。Image Lab 3.0 软件分析图像,以目的条带和内参 GAPDH 的灰度值比值进行分析。

表 2 ALP 和 OC 引物及反应条件

引物	序列	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)	循环数
ALP	F:5'-CCCAAAGGCTTCTTG-3'	357	50	33
	R:5'-CTGGTAGTTGTTGTGAGC-3'			
OC	F:5'-AGGGCAATAAGGTAGTA-3'	286	53	35
	R:5'-GAGGCTCTGAGAAGCATAAA-3'			
GAPDH	F:5'-AGAAGGETGGGGCTCATTTG-3'	258	55	30
	R:5'-AGGGGCCATCACAGTCTTC-3'			

表 3 Wnt5a、β-catenin 和 Lef-1 引物及反应条件

引物	序列	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)	循环数
Wnt5a	F:5'-GATGCCCTCAAGGAGAGTATG-3'	259	55	33
	R:5'-CCGTCTTAAACTGGTCATAGCC-3'			
β-catenin	F:5'-TGCA GCGACTAA GCAG GA-3'	425	54	38
	R:5'-TCAC CAGCACGA AGGA CA-3'			
Lef-1	F:5'-CCTACCCATCTTCACTTTCAGG-3'	201	55	35
	R:5'-TAGCTCCTGTTCCTTT CTCT G-3'			
GAPDH	F:5'-AGAAGGETGGGGCTCATTTG-3'	258	55	30
	R:5'-AGGGGCCATCACAGTCTTC-3'			

9 龟鹿二仙胶含药血清对各组细胞 Wnt5a、β-catenin 和 Lef-1 蛋白表达的影响 按分组诱导培养 21 天后,4℃ PBS 液冲洗 3 遍,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,5×蛋白上样缓冲液混合后沸水(100℃)浴 5 min 将蛋白变性。每孔取 20 μg 蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转到 PDVF 膜上,室温封闭 2 h,加入稀释后的一抗,一抗稀释浓度分别为兔抗大鼠 Wnt5a (1:1 000)、兔抗大鼠 β-catenin(1:1 000)、兔抗大鼠 Lef-1(1:1 000)、羊抗大鼠 β-actin(1:1 000),4℃ 摇床过夜后,TBST 洗涤去除残余一抗,加入二抗后室温孵育 1 h,再次 TBST 洗涤,加入 ECL 发光液,用凝胶成像系统扫描,以 Image Lab 3.0 软件分析,蛋白表达值以目标蛋白灰度值与 β-actin 灰度值之比计算。

10 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,成组数据比较采用 *t* 检验,方差齐性则用 LSD 法两两比较,方差不齐则采用 Dunnett's *T*3 法两两比较,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 细胞形态观察(图 1) 接种 24 h 后,皿底可见少许细胞贴壁,形状不规则。3~4 天后,贴壁细胞明显增多,呈细长外形,和成纤维细胞外形相似。6~

8 天后可见贴壁细胞呈簇状生长,至第 10 天时细胞形态较为均一,外形细长且按一定方向紧密排列呈旋涡状。细胞传代后 24 h 即基本全部贴壁且增殖速度快,每 5~6 天即可铺满瓶底。

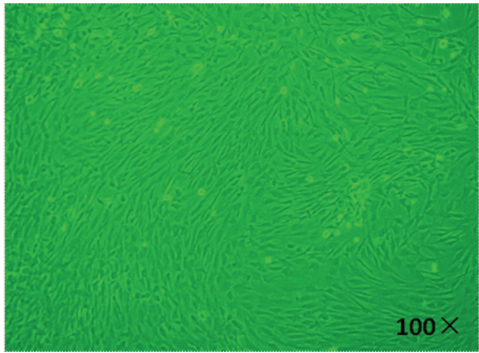
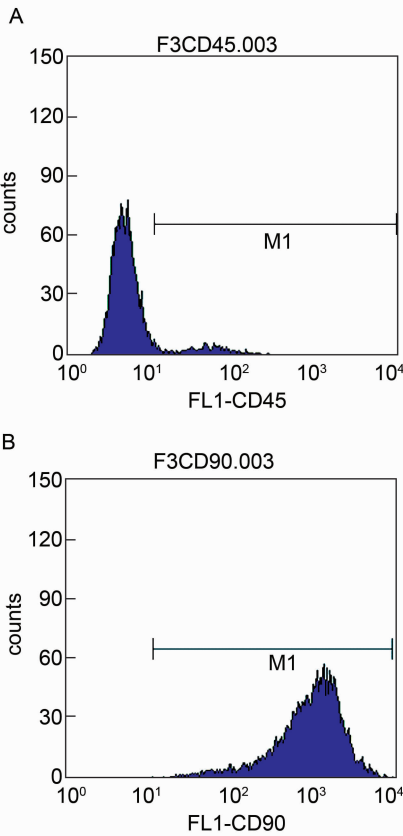


图 1 F1 代培养 8 天 (×100)

2 CD45 和 CD90 的表达情况(图 2) CD45 阳性表达率为 1.46% ± 0.23%,呈低表达(图 2-A),CD90 阳性表达率为 96.97% ± 3.21%,呈高表达(图 2-B),符合 BMMSCs 细胞表面抗原特点,说明全骨髓贴壁法分离的细胞为 BMMSCs,经传代培养至 F₃代后符合实验要求。



注: A 为 CD45 阳性表达率;B 为 CD90 阳性表达率;*n* = 3
图 2 FCM 法鉴定 BMMSCs 细胞表型 CD45 和 CD90 表达

3 BMMSCs 细胞周期的变化(表 4) 浓度为 10% 龟鹿二仙胶中剂量组含药血清 S 期细胞比率显著高于 FBS 组、10% 低剂量血清组、10% 高剂量血清组、20% 空白血清组、20% 低剂量血清组和 20% 高剂量血清组, G₂/M 期细胞比率高于 FBS 组、10% 空白血清组、10% 低剂量血清组、20% 空白血清组、20% 低剂量血清组和 20% 中剂量血清组, G₀/G₁ 期细胞比率低于其他各组, 增殖指数为 22.89 ± 1.37, 显著高于其他组, 差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。说明含 10% 龟鹿二仙胶中剂量组含药血清具有促进 BMMSCs 细胞增殖作用, 且较其他组作用明显, 在后续实验中以此浓度的含药血清作为最佳干预浓度。

4 ARS 染色结果比较(图 3) FBS 组和空白组染色未见橘红色结节(图 3 A、B)。龟鹿二仙胶组和经典诱导组细胞光镜下观察呈多角形, 互相重叠, 呈团簇状生长并可见结节样结构(图 3 C、D), 茜素红染色可见明显的橘红色钙结节(图 4E、F)。

5 各组 OC、ALP mRNA 表达比较(图 4) 与 FBS 组和空白组比较, 龟鹿二仙胶组及经典诱导组 OC、

ALP mRNA 相对表达量升高, 差异有统计学意义(P < 0.05)。

6 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 mRNA 的表达(图 5) 与 FBS 组和空白组比较, 龟鹿二仙胶组及经典诱导组 Wnt5a、β-catenin mRNA 相对表达量升高, 差异有统计学意义(P < 0.05); 与 FBS 组、空白组和经典诱导组比较, 龟鹿二仙胶组 Lef-1 mRNA 相对表达量升高, 差异有统计学意义(P < 0.05)。

7 各组 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 蛋白表达(图 6) 与 FBS 组和空白组比较, 龟鹿二仙胶组和经典诱导组 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义(P < 0.05); 与经典诱导组比较, 龟鹿二仙胶组 Lef-1 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义(P < 0.05)。

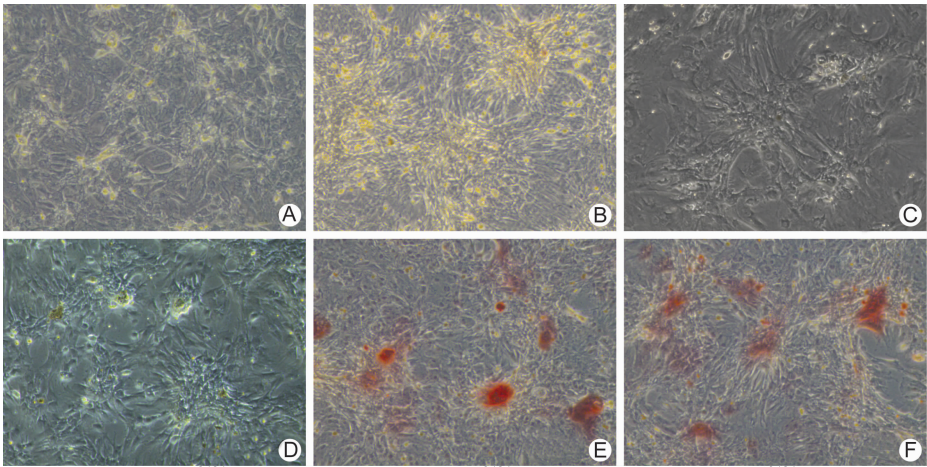
讨 论

OP 属中医学“骨痿、骨痹”的范畴^[11]。中医学认为骨骼的强壮有赖于“肾精”的充足, “肾精”随着年龄的增长发生动态的变化, OP 的发病与“肾精”关系密切。BMMSCs 具有较强的增殖能力, 在一定条件下可

表 4 龟鹿二仙胶含药血清对 BMMSCs 细胞周期的影响 (x̄ ± s)

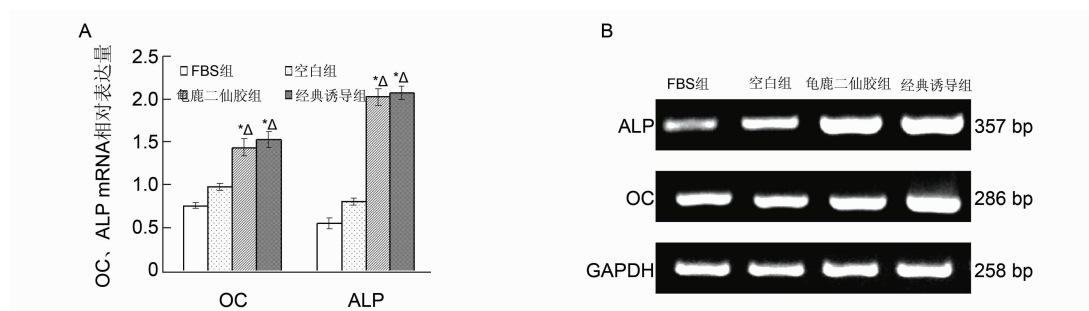
组别	BMMSCs 细胞周期(%)			增殖指数(PI)
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
FBS	87.79 ± 3.61 *	5.82 ± 0.81 **	6.38 ± 4.42 **	12.20 ± 2.86 *
10%空白血清	87.52 ± 1.32 *	7.28 ± 2.25 *	5.19 ± 3.52 **	12.47 ± 3.43 *
10%低剂量血清	86.90 ± 1.63 *	6.07 ± 0.65 **	7.01 ± 2.26 **	13.07 ± 1.96 *
10%中剂量血清	77.10 ± 1.67	10.67 ± 0.50	12.22 ± 1.29	22.89 ± 1.37
10%高剂量血清	85.36 ± 1.41 *	7.32 ± 1.01 *	9.17 ± 1.24 *	16.49 ± 2.39 *
20%空白血清	88.40 ± 1.18 *	5.23 ± 0.81 **	6.35 ± 1.40 **	11.59 ± 1.09 *
20%低剂量血清	86.34 ± 2.87 *	6.17 ± 2.75 **	5.83 ± 2.41 **	12.00 ± 3.19 *
20%中剂量血清	87.13 ± 0.45 *	8.81 ± 3.02 *	4.05 ± 2.95 **	12.86 ± 3.73 *
20%高剂量血清	84.90 ± 1.58 *	5.82 ± 1.04 **	9.27 ± 1.37 *	15.10 ± 1.58 *

注: 与 10% 中剂量血清组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 每组样本数为 3



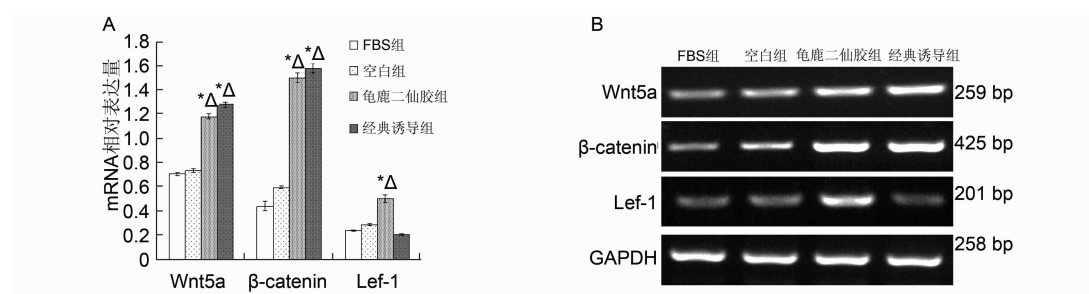
注: A、B 分别为 FBS 组和空白组 ARS 染色图; C、D 分别为龟鹿二仙胶组和经典诱导组光镜观察; E、F 分别为龟鹿二仙胶组和经典诱导组 ARS 染色图

图 3 BMMSCs 诱导后成骨分化情况观察(×100)



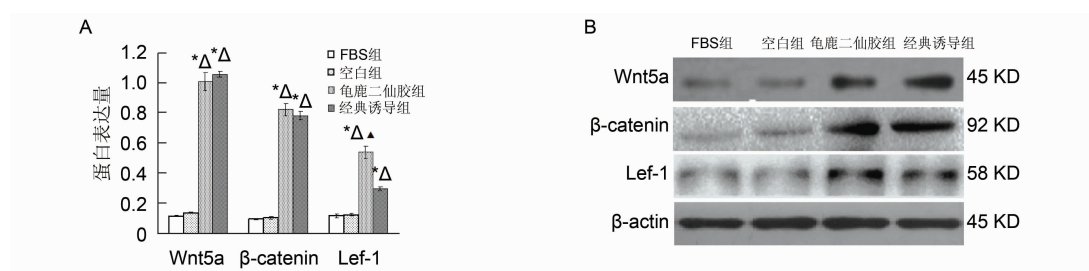
注: A 为 OC 和 ALP mRNA 表达与 GAPDH 相对表达量 (GAPDH = 1; $n = 3$); 与 FBS 组比较, $*P < 0.05$; 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; B 为 OC、ALP 琼脂糖凝胶电泳图

图 4 各组细胞 ALP、OC mRNA 表达比较



注: A 为 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 mRNA 相对表达量 (GAPDH = 1; $n = 3$); 与 FBS 组比较, $*P < 0.05$; 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; 与经典诱导组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; B 为各组细胞 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 琼脂糖凝胶电泳图

图 5 各组细胞 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 mRNA 表达比较



注: A 为 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 蛋白相对表达量 (β-actin = 1; $n = 3$); 与 FBS 组比较, $*P < 0.05$; 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; 与经典诱导组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; B 为各组细胞 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

图 6 各组细胞 Wnt5a、β-catenin、Lef-1 蛋白表达比较

向成骨细胞分化^[12],但其增殖能力和向成骨细胞分化能力与年龄有密切关系,所以 BMMSCs 和“肾精”在内涵与功能上具有很大的相关性^[13]。研究发现骨髓中 BMMSCs 含量极少,而具有补肾壮骨功效的中药以及以补肾为主的中药复方能促进 BMMSCs 增殖和成骨分化^[14-16],因此促进 BMMSCs 增殖和诱导其向成骨细胞分化可能是“补肾”中药具有“壮骨”功能作用途径之一。龟鹿二仙胶中鹿角胶和龟板胶皆为血肉有情之品配伍人参和枸杞子益气养阴,具有补肾、充精髓的作用。本实验结果表明龟鹿二仙胶含药血清能显著增加 S、G₂/M 期细胞数,具有促进 BMMSCs 增殖的作用。

BMMSCs 向成骨细胞分化过程伴有特异性成骨标

志物表达水平的上调^[17]及钙结节出现等。ALP 为成骨前体细胞和成骨细胞分化的标记,是 BMMSCs 向成骨细胞分化的早期标志物之一^[18],OC 也是成骨细胞分化最早、最具有特异性的指标^[19],且表达稳定。本实验中,各组 BMMSCs 细胞干预培养 21 天后,龟鹿二仙胶组 ALP、OC mRNA 的表达显著高于 FBS 组和空白组,说明龟鹿二仙胶含药血清具有早期诱导 BMMSCs 成骨分化的作用。茜素红染色是观察 BMMSCs 成骨分化形成的钙结节常用的染色方法。本实验中茜素红染色后显示龟鹿二仙胶组和经典诱导组中均可见数个大小不等、形态不规则的橘红色矿化结节,而空白组和 FBS 组细胞未见明显矿化结节染色,说明龟鹿二仙胶含药血清能促进

BMMSCs 向成骨细胞分化并形成成熟的钙结节。

BMMSCs 向成骨细胞分化过程中受多条信号通路的调控^[20], Wnt 信号通路是近些年来研究的热点^[21], 其中 Wnt/ β -catenin 通路又称为 Wnt 经典通路, 是目前研究最为充分, 与骨组织代谢关系最为密切的通路, 可通过诱导成骨细胞分化^[22]的方式促进骨形成, 对骨骼生物学非常重要^[23,24]。有研究表明中药通过对 Wnt 信号通路相关因子基因和蛋白表达的影响, 参与 BMMSCs 成骨分化的过程^[25]。本研究结果也表明龟鹿二仙胶含药血清则能通过上调 Wnt5a、 β -catenin 和 Lef-1 基因和蛋白的表达, 促进 BMMSCs 向成骨细胞分化。

本研究以血清药理学的方法观察龟鹿二仙胶含药血清对 BMMSCs 增殖及诱导成骨分化的作用, 认为龟鹿二仙胶能促进 BMMSCs 增殖且通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMMSCs 向成骨细胞分化, 但该通路其它因子及非经典通路是否参与这一过程还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hadji P, Klein S, Haussler B, et al. The bone evaluation study (BEST): patient care and persistence to treatment of osteoporosis in Germany [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 51(11): 868–872.
- [2] Park C, Ha YC, Jang S, et al. The incidence and residual lifetime risk of osteoporosis-related fractures in Korea[J]. *J Bone Miner Metab*, 2011, 29(6): 744–751.
- [3] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy[J]. *Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301–316.
- [4] 裴雪涛主编. 干细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 84.
- [5] 曾建春, 曾意荣, 樊粤光, 等. 淫羊藿甙诱导 MSCs 向成骨细胞分化过程中对 Wnt 信号通路的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 607–611.
- [6] 张贤, 朱丽华, 钱晓伟, 等. 杜仲醇提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的 Wnt 信号途径[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45): 8520.
- [7] 牛素生, 林建华, 李楠, 等. 龟鹿二仙胶对去卵巢骨质疏松大鼠腰椎骨强度的影响及机制[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(3): 5–7.
- [8] 黄继汗, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [9] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular

Therapy Position Statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315–317.

- [10] 贾宇臣, 赵凯, 马秀梅, 等. 改良组织块贴壁法制备人脐带间充质干细胞[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(3): 415–418.
- [11] 宋长恒, 付小卫, 张方珍, 等. 略谈骨质疏松症的中医病因病机[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(8): 854–856.
- [12] Derubeis SR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances [J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1): 160–165.
- [13] 张进, 徐志伟, 杜少辉, 等. 精学说与干细胞辨识[J]. 中医药学刊, 2004, 22(7): 1198.
- [14] 董群伟, 孙奋勇, 王华. 牛膝含药血清对体外培养人间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(2): 185–187.
- [15] 曾意荣, 樊粤光, 刘红, 等. 补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(8): 1581–1585.
- [16] 黎晖, 周健洪, 陈东风, 等. 龟板对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 159–161.
- [17] 张磊, 张柳, 田发明, 等. 辛伐他汀对大鼠 BMMSCs 成骨诱导 WNT 信号传导通路相关因子 mRNA 表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(11): 1371–1375.
- [18] 宋会平, 王志强, 赵亚平, 等. 血小板裂解液对大鼠 BMSC 成骨分化的干预效应[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(6): 737–741.
- [19] 金小岚, 郎红梅, 万勇, 等. 不同氧浓度对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 982–986.
- [20] Wang Q, Cai J, Cai XH, et al. miR-346 regulates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72266.
- [21] 岳二丽, 杨晓晴, 赵红宇. Wnt 信号通道组成及其在成骨细胞分化增殖中的效应[J]. 中国口腔种植学杂志, 2008, 13(4): 195–199.
- [22] Kato M, Patel MS, Levasseur R, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor[J]. *Cell Biol*, 2002, 157(2): 303–314.
- [23] Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases [J]. *Gene*, 2004, 341(1): 19–39.
- [24] Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signaling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9(5): 1063–1077.
- [25] 秦梦, 陈元川, 郭海玲, 等. 补肾阳中药对成骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(5): 9–14.

(收稿: 2015-12-03 修回: 2016-10-10)