

淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化

马慧萍 贾正平 张汝学 陈克明 任俊 李茂星 王娟

【摘要】 目的 研究淫羊藿总黄酮(Total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum*, TFE)对大鼠骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)增殖和成骨性分化的影响。方法 将 TFE 和含淫羊藿总黄酮大鼠血清(Serum of rats administered TFE, SES)分别以不同浓度加入大鼠 MSCs 培养液中,进行细胞增殖和成骨性分化的分析。细胞增殖分析采用 MTT 法,成骨性分化则检测碱性磷酸酶、骨钙素、钙盐沉积量等分化指标。结果 TFE 直接加入培养液对 MSCs 增殖无明显影响,SES 则强烈刺激细胞增殖,成倍增加碱性磷酸酶染色阳性的克隆数。TFE 不影响 MSCs 的成骨性分化,但 SES 显著提高碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌量和钙盐沉积量。结论 淫羊藿总黄酮活性代谢产物强烈刺激 MSCs 的增殖和成骨性分化,是淫羊藿总黄酮抗骨质疏松症的重要机制。

【关键词】 淫羊藿;黄酮类化合物;骨髓间充质干细胞;分化;增殖

Rats serum containing total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* enhances proliferation and osteogenic differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells MA Huiping, JIA Zhengping, ZHANG Ruxue, et al. *Base of Clinical Pharmacology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China*

【Abstract】 Objective To investigate the effects of total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* (TFE) on the proliferation and differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** TFE and the serum of rats administered TFE (SES) were added into the culture medium of newborn rat MSC, Their effects on cell proliferation and osteogenic differentiation were studied by MTT and the analysis of differentiation indices. **Results** TFE had no appreciable effect on cell proliferation and differentiation at any concentration. while SES strongly stimulated cell proliferation, increased the number of colonies stained positive for alkaline phosphatase. SES also significantly improved osteogenic differentiation indices including alkaline phosphatase activity, osteocalcin secretion and calcium deposition level. **Conclusions** It is the metabolites of TFE but not the extract itself that enhance bone formation by increasing the number of MSCs and inducing their differentiation into osteoblasts. It partly explains the anti-osteoporosis mechanism of TFE.

【Key words】 Rat; Marrow mesenchymal stem cells; *Epimedium sagittatum*; Flavonoids; Osteoblasts; Differentiation; Proliferation

近年来,国内外学者十分注重从植物中提取和筛选抗骨质疏松症的天然有效成分,从大豆中提取的黄酮类化合物如 Diadzein 和 Genistein 等^[1]已被证明具有良好的抗骨质疏松作用。淫羊藿是中医防治骨质疏松复方制剂中应用频率很高的一味中草药,富含黄酮类化合物,我们已提取并证明淫羊藿总黄酮(Total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum*, TFE)

可预防大鼠实验性骨质疏松症^[2-4]。为进一步探明其抗病机理,本实验研究了 TFE 对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)增殖和成骨性分化的影响。

材料和方法

1. 大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)的培养

MSCs 的分离和培养按以前报道方法进行^[5]。取 2 月龄 SD 大鼠(雌雄不拘)1 只,锤击头部致死,于无菌条件下剥离股骨和胫骨,切除两端骨髓,用 12 号针头从一端向骨髓腔内注射含肝素钠(500 U/ml)的 DMEM 培养液,使骨髓被完全冲出,合并冲出液,

基金项目:全军十五规划重点课题, No 01Z008

作者单位:730050 兰州,兰州军区兰州总医院全军临床药理实验基地(马慧萍、贾正平、张汝学、任俊、李茂星、王娟);兰州军区兰州总医院骨科研究所(陈克明)

用滴管反复吹打,使团块尽量分散,依次用8号和4号针头抽吸过滤一次,所得滤液基本上为单细胞悬液。调整浓度至 1.0×10^7 cells/ml,以每皿5 ml接种于100 mm \times 20 mm的塑料培养皿中(Corning, USA)。培养液含15%胎牛血清、100 μ g/ml链霉素和100 U/ml青霉素。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂和饱和湿度条件下培养48 h,弃培养液,PBS(0.1 mol/L, pH7.4)洗涤两遍,加新鲜培养液继续培养。每4 d换液1次。待细胞长满皿底后,以0.25%胰蛋白酶消化悬浮,1:4传代。胎牛血清和胰蛋白酶购自Gibco公司。

2. 含 TFE 大鼠血清 (Serum of rats administered TFE, SES) 的制备

20只6月龄Wistar大鼠,雌雄各半,随机分为两组,一组为服药组,按1 g/kg灌服TFE(由本实验室提取^[2],含量为58.63%),每天1次,连续3 d。另一组为对照组,只灌服相同体积的载体溶液(即用于溶解TFE的溶剂,TFE的配制过程是:先以少量0.1 mol/L NaOH溶解,再以0.1 mol/L HCl调至pH7.6。对照组模仿此溶液的配制过程,但不加入TFE)。第3次灌胃1.5 h后,所有大鼠均在乙醚麻醉下自腹主动脉抽取血液,同组合并后离心获取血清,血清在56 $^{\circ}$ C灭活30 h,再用0.22 μ m滤膜过滤除菌后备用。

3. MSCs 增殖

取第3代以后的MSCs,按 3×10^3 cells/well接种于96孔板中,24 h后换新鲜培养液,并分别添加:TFE,共0.1、1、10和100 μ g/ml 4种浓度,每种浓度平行做6份,并设对照组。对照组只添加等体积的溶剂;SES,采用2.5%、5%和10% 3种浓度,培养液中胎牛血清浓度降至5%,对照组加相同浓度的对照血清。细胞增殖情况用MTT法进行分析。

4. CFU-F_{ALP} 分析

骨髓单细胞悬液 1.0×10^7 cells/well接种于6孔培养板中,每孔1 ml,48 h后吸除培养液,PBS振荡冲洗两遍,加新鲜培养液,并添加:0.1、1、10、100 μ g/ml的TFE;5% SES,胎牛血清浓度同时降至5%,加相同浓度对照血清做为对照。每4 d换一次新鲜培养液,至第12 d时,用偶氮偶合法进行碱性磷酸酶组化染色,方法是:PBS洗两遍,3.7%甲醛-70%乙醇固定液处理3~5 min,转入基质溶液中室温下15 min左右,当出现紫黑色斑点时,即弃培养液,流水冲洗,重新转入固定液中,记录斑点数目,并照相保存结果^[6]。

5. MSCs 成骨性分化

取第3代MSCs,按 1×10^5 cells/well接种于6孔

培养板中,次日换含10%胎牛血清、 10^{-8} mol/L地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油和50 μ g/ml Vc的新鲜培养液,同上浓度添加TFE和SES。每4 d更换1次培养液,进行下列各项指标的检测。

(1)碱性磷酸酶活性(alkaline phosphatase, ALP):根据Cheng等^[7]的方法改进。于培养至第4、8、12、16和20 d时,将待测各孔的培养细胞用胰蛋白酶消化悬浮后收集至0.5 ml Tris中(pH7.4,含0.1% Triton-X100和2 mmol/L MgCl₂),用超声细胞粉碎仪振荡处理,以使细胞膜破裂,离心,收集上清液,ALP活性用Sigma kit 104-LL测定。其原理是, ρ -nitrophenyl phosphate在ALP作用下生成 ρ -nitrophenol,生成的速率可在405 nm处测得。ALP活性表示为nmol ρ -nitrophenol/min/mg protein,蛋白质浓度用Bio-Rad DC kit(Bio Rad, Hercules, CA, USA)测定。

(2)骨钙素:每次更换新鲜培养液时,原培养液均收集冷冻于-30 $^{\circ}$ C,以待测定骨钙素浓度。骨钙素浓度最后一次性采用大鼠酶联免疫分析试剂盒测定(rat osteocalcin EIA kit, Biomedical Technologies, Inc, Stoughton, MA, USA)^[8]。

(3)钙含量:将待测各孔培养液吸出后,用PBS洗两遍,加入1 mol/L HCl 1 ml,振荡过夜,次日以1000 \times g离心10 min,上清液中Ca²⁺浓度用Sima kit 587-A测定^[9]。

(4)矿化结节:培养至第20 d时用von Kossa染色法显示矿化结节。培养细胞先用PBS洗两遍,然后用3.7%甲醛-90%乙醇固定5 min。加入新鲜配制的1%硝酸银后置紫外灯下照射15 min。镜下观察矿化结节^[6]。

6. 统计学处理。

结果表示为 $\bar{x} \pm s$,采用SPSS10.0统计软件进行t检验。

结 果

1. 对细胞增殖的影响

TFE各组与其相应对照组的A值无显著性差异。2.5%和5% SES组的A值则显著高于对照组(图1)。10% SES和对照血清有细胞毒作用,引起培养细胞悬浮和死亡。

2. 对 CFU-F_{ALP} 数目的影响

TFE各组与其相应对照的CFU-F_{ALP}数目接近,无统计学显著差异。但5% SES组的CFU-F_{ALP}数目几乎是其对照的2倍(SES组为 42.4 ± 6.9 ,对照组为 20.5 ± 5.2 , $P < 0.05$)。

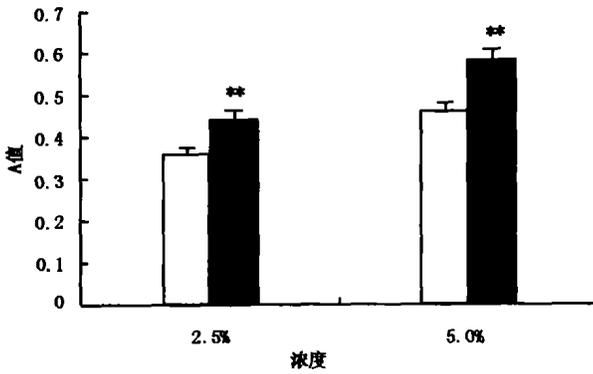


图1 不同浓度含淫羊藿总黄酮血清(SES)对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响

■为淫羊藿含药血清组, □为对照血清组。与对照组相比, ** $P < 0.01$

3. 对 MSCs 成骨性分化的影响

(1)对 ALP 活性的影响: TFE 各组与其相应对照的 ALP 活性始终无显著性差异。5% SES 对 ALP 活性的影响见图 2。可见第 4d 时 SES 组即显著高于对照组, 至第 12d 时达到对照组的两倍以上。从第 16d 起 ALP 活性降低, 但 SES 组仍显著高于对照组。

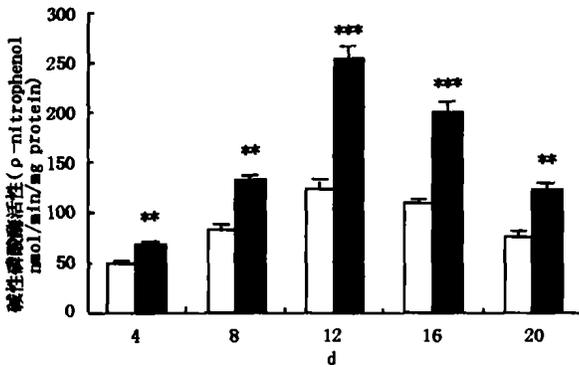


图2 5%淫羊藿总黄酮含药血清(SES)对大鼠骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性的影响

■为淫羊藿含药血清组, □为对照血清组。与对照组相比 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

(2)对骨钙素的影响: TFE 各组与其相应对照的骨钙素水平无显著性差异。SES 的影响情况见图 3。自第 8~12 d 起, SES 组培养液中的骨钙素含量显著高于对照组, 至第 16~20 d 时, 几乎达到对照组的两倍。

(3)对钙沉积量的影响: TFE 各组与其相应对照的钙沉积量未发现显著性差异。SES 的影响见图 4。至第 8 d 时, SES 组钙沉积量显著高于对照组, 至第 20 d 时, SES 组是对照组的 2 倍以上。钙沉积量的增加与矿化结节的形成和成熟相一致。

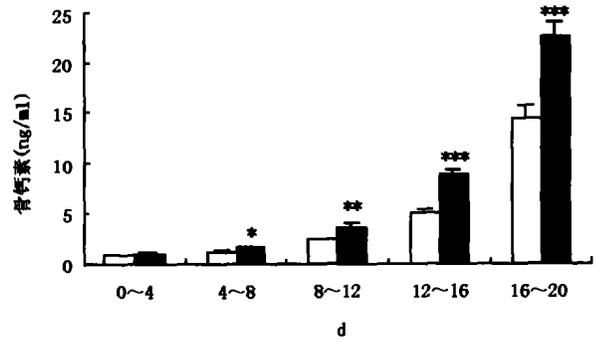


图3 5%淫羊藿总黄酮含药血清(SES)对大鼠骨髓间充质干细胞骨钙素分泌量的影响

■为淫羊藿含药血清组, □为对照血清组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

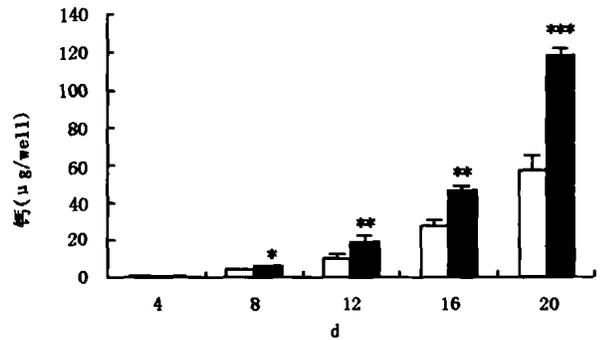


图4 5%淫羊藿总黄酮含药血清(SES)对大鼠骨髓间充质干细胞钙沉积量的影响

■为淫羊藿含药血清组, □为对照血清组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

讨 论

近年来, MSCs 多向分化潜能与骨质疏松症间关系的研究日益受到重视。人们发现 MSCs 成骨性分化能力的下降是发生骨质疏松症的重要原因^[10]。为此,设法保持甚至提高 MSCs 的成骨性分化能力被视为一条有效的防治途径。CFU-F 数量在原代培养情况下代表着骨髓细胞悬液中 MSCs 的数量, 而碱性磷酸酶染色阳性的 CFU-F 数量(即 CFU-F_{ALP})则代表着已定向分化为成骨细胞的 MSCs 数量^[11]。本实验中, TFE 对 MSCs 增殖和成骨性分化各项指标均无显著性影响, 而 SES 使 CFU-F_{ALP} 数量几乎增加一倍, 并显著提高碱性磷酸酶、骨钙素和钙盐沉积量等成骨性分化指标, 根据血清药理学原理^[12], 说明 TFE 经口服后产生的代谢产物中有未知的活性成分能够诱导未定向的 MSCs 向成骨细胞方向分化, 并提高成骨

(下转第 428 页)

骨强度除了与骨量有关外,还与骨内部结构有关。对松质骨而言,骨小梁构筑方式的改变,将更能说明骨强度的质变。Hahn^[2]认为,松质骨的稳定性不仅取决于其骨量的高低,还取决于其三维构筑以及骨小梁间的连接性,对骨小梁连接点和游离末端数测量更能说明骨小梁结构的稳定性。本实验结果亦表明,大鼠失神经支配后,血液钙磷浓度并无明显改变,而反映骨结构的骨小梁形态却有明显的改变,此结果与以上论述相符。

NGF作为一个经典的靶源性神经营养因子,其主要功能是维持交感与感觉神经元的存活与发育,同时对促进神经递质的合成也具有重要作用^[4]。NGF影响骨代谢的研究尚不足10年,有关这方面的研究较少。目前已被证实成骨细胞存在NGF的低亲和力受体(LNGFR),内源性和外源性NGF可与LNGFR结合,达到细胞间信息传递的作用,从而使成骨细胞发生磷酸化,成骨能力增强;另外,NGF在骨组织中对1,25(OH)₂D₃摄取起调节作用。体外研究表明,当成骨细胞培养基中加入1,25(OH)₂D₃可使骨细胞表达NGF^[5],反之NGF可能调节骨组织对1,25(OH)₂D₃的摄取,促进成骨,减轻骨质疏松。王子明等^[6]的实验表明,大鼠注射NGF后都可引起神经功能的改变,无论局部还是全身用药,只要能够达到损伤部位,就有一定的治疗作用。

本实验研究表明,大鼠失神经支配后体重增长慢,失神经肢肌肉严重萎缩,骨小梁连接点数显著下

降,游离末端数显著增加,说明失神经后肌肉营养不足,导致骨营养下降;骨小梁结构稳定性差,小梁排列不符合力学要求,其结果必然导致骨结构强度的明显下降。而局部给以NGF治疗后,肌肉萎缩程度明显减轻,大鼠的骨小梁平均宽度、体积密度、连接点数均较失神经支配组大鼠有明显增加,游离末端数也明显下降(见表1),说明NGF治疗能明显改善失神经支配所致的骨结构的改变,减少骨量的丢失。这可能与NGF的神经营养作用和神经调节作用有关,对神经性瘫痪病人预防骨质疏松的发生具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 徐建广,顾玉东. 缺血对失神经支配骨骼肌萎缩影响的研究. 中华手外科杂志, 1999, 15(3): 175-177.
- 2 Hahn M, Vogel M, Pompesius-kempa M. Trabecular bone pattern factor: a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. Bone, 1992, 13(4): 327-330.
- 3 Zeng QQ, Jee WS, Bigornia AE et al. Time responses of cancellus and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rats. Bone, 1996, 19(1): 13-21.
- 4 Sinson G, Voddi M, McIntosh TK et al. Combine fetal neural transplantation and nerve growth factor infusion effects on neurological outcome following fluid percussion brain injury in the rat. J Neurosurg, 1996, 84(4): 655-662.
- 5 姚建华. 神经生长因子对骨折愈合影响的研究进展. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(10): 996-998.
- 6 王子明, 杨恒文, 李芳, 等. 神经生长因子对大鼠坐骨神经半切损伤后的作用观察. 第三军医大学学报, 2000, 22(22): 42-48.

(收稿日期: 2004-01-08)

(上接第422页)

细胞的活性和功能,这应是淫羊藿总黄酮抗骨质疏松作用的一个重要机制。

参 考 文 献

- 1 Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. Am J Clin Nutr, 2000, 72(3): 679.
- 2 马慧萍, 贾正平, 谢景文, 等. 淫羊藿总黄酮的提取分离工艺研究. 华西药理学杂志, 2002, 17(1): 1-6.
- 3 马慧萍, 贾正平, 葛欣, 等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究. 华西药理学杂志, 2002, 17(3): 163-167.
- 4 马慧萍, 贾正平, 白孟海, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 187-189.
- 5 陈克明, 葛宝丰, 刘兴炎, 等. 大鼠骨髓基质细胞体外走向诱导成骨. 兰州大学学报, 2000, 39(1): 69-73.
- 6 席越, 王戈平, 黄啸原, 等主编. 骨组织病理解剖学技术. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 60.

- 7 Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. Endocrinology, 1994, 134: 277-285.
- 8 Yamamoto N, Furuya K, Handa K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for *in vitro* bone formation. Biol. Pharm. Bull, 2002, 25: 509-515.
- 9 Jaiswal N, Hayneworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cellular Biochem, 1998, 295-312.
- 10 宋纯理, 党更町. 髓腔内脂肪细胞与骨质疏松. 中国骨质疏松杂志, 2002; 8(3): 266-269.
- 11 Erben RG, Scutt AM, Miao D, et al. Short-term treatment of rats with high dose, 25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of Osteoblast precursor cells in bone marrow. Endocrinology, 1997, 138: 4629-4635.
- 12 马涛, 崔燎, 吴铁, 等. 老年大鼠含淫羊藿血清对成骨细胞的增殖与分化的影响. 中国骨质疏松杂志, 2002; 8(1): 55-60.

(收稿日期: 2004-01-10)