

# 加味左归丸诱导骨髓间充质干细胞骨向分化的实验研究

颜春鲁<sup>1,2</sup> 李盛华<sup>2\*</sup> 周明旺<sup>2</sup> 姚贞宇<sup>3</sup>

1. 甘肃中医学院敦煌医学与转化教育部重点实验室,兰州 730000

2. 甘肃省中医院,兰州 730050

3. 兰州市第一人民医院,兰州 730030

中图分类号: R274 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014)10-1154-05

**摘要:** **目的** 观察加味左归丸对体外培养的骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨细胞分化的影响。**方法** 采用全骨髓法(贴壁筛选法)培养大鼠 MSCs,用加味左归丸含药血清诱导大鼠 MSCs 向成骨细胞分化,并进行形态学观察和免疫细胞化学技术检测。**结果** 与空白对照组相比,加味左归丸组与经典诱导组均可以明显促进成骨表型化 MSCs 的矿化结节形成及 I 型胶原表达( $P < 0.05$ )。**结论** 加味左归丸可明显促进大鼠 MSCs 向成骨细胞转化,优化骨组织工程的种子细胞体系,改善骨组织的质量,促进骨组织的再生。

**关键词:** 加味左归丸;中医中药;含药血清;骨髓间充质干细胞;成骨细胞

## An experimental study of the osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells by Zuogui pill induction

YAN Chunlu<sup>1,2</sup>, LI Shenghua<sup>2</sup>, ZHOU Mingwang<sup>2</sup>, YAO Zhenyu<sup>3</sup>

1. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation of Ministry of Education, Gansu College of Chinese Medicine, Lanzhou 730000

2. Traditional Chinese Medical Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050

3. The First Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730030

Corresponding author: LI Shenghua, Email: lishenghua0619@126.com

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of Zuogui pill on the osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. **Methods** MSCs from SD rats were cultivated by using whole marrow method. MSCs were induced to differentiate into osteoblasts by addition of conditioned serum of Zuogui pill. Morphology was observed and Immunocytochemistry was performed. **Results** Compared with the blank control group, mineralized nodule formation and type I collagen expression were promoted in both Zuogui pill group and classical induction group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Zuogui pill induces the differentiation of osteoblasts from MSCs. It can optimize the seed cell system, improve the quality of the bone tissue, and promote the regeneration of the bone tissue.

**Key words:** Zuogui Pill; Traditional Chinese medicine; Conditioned serum; Mesenchymal stem cells; Osteoblast

骨髓间充质干细胞(MSCs)是干细胞领域的研究热点之一,体外培养为贴壁生长,表达多种细胞表面标记物,经不同条件诱导后,可向骨、软骨、脂肪、成肌、神经等多种细胞定向分化,具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。1988年 Mamiatopoulos 等<sup>[2]</sup>首次报道 MSCs

在体外培养能形成钙化的骨样组织,经 X 射线衍射分析确定形成的钙化物具有羟基磷灰石结构,证明体外培养 MSCs 具有成骨能力。加味左归丸具有滋阴补肾、填精益髓、强筋健骨的作用。研究显示,左归丸对去卵巢所致大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用<sup>[3]</sup>,并能促进成骨细胞增殖,是其能够治疗骨质疏松症的机理之一<sup>[4]</sup>。本实验采用加味左归丸含药血清作用于体外培养的大鼠 MSCs,观察其对大鼠 MSCs 向成骨细胞分化的影响,进一步探讨加味

基金项目: 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放基金项目(DHYX1213-004)

\* 通讯作者: 李盛华, Email: lishenghua0619@126.com

左归丸治疗骨质疏松症的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物:**3月龄 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重 200 ~ 220 g,由甘肃中医学院科研实验动物中心提供(合格证号:scxk(甘)字 2004-0006 号)。

**1.1.2 实验药物:**加味左归丸水煎液(甘肃中医学院附属医院药剂科制备)由熟地 24 g、山药 12 g、山萸肉 12 g、菟丝子 12 g、枸杞 12 g、牛膝 9 g、龟板胶 12 g、鹿角胶 12 g、骨碎补 12 g、陈皮 10 g 组成。按 11 g 生药/kg 大鼠的剂量购买药材,加入 20 倍量的水煎煮两次,每次 1.5 h,过滤,蒸发浓缩成 1 g/mL,于 4 °C 冰箱保存备用。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**DMEM 培养基(GIBCO)、胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程有限公司)、地塞米松(GIBCO)、 $\beta$ -甘油磷酸钠(SIGMA)、胰蛋白酶(GIBCO)、SW-CJ-LF 超净工作台(苏州安泰公司)、二氧化碳培养箱(SANYO)、离心机(湘仪公司)、普通光学显微镜等。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 加味左归丸含药血清制备:**3月龄 SD 大鼠,用加味左归丸水煎液(根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表)灌胃,剂量为 1.1 mL/100 g 大鼠,每日 2 次,连续灌胃 3 d。末次给药 1 h 后从股动脉取血,2 500 r/min 离心 10 min,分离血清,将所得上清液以 2 500 r/min 再离心 10 min,此次吸取的上清液即是所需含药血清。将此含药血清 56 °C 灭活 30 min,0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌,分装, -20 °C 冻存备用。

**1.2.2 骨髓 MSCs 体外分离和培养:**选用 6 周龄 SPF 级 SD 大鼠(约 150 g,雌雄不限),颈椎脱臼法处死。用 75% 的酒精浸泡后,无菌条件下取出胫骨和股骨,剪去骨骺端,用 5 mL 注射器抽取含有 10% FBS 的 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,冲洗液用尖吸管反复吹打均匀,以  $1.5 \times 10^5$  /mL 密度接种细胞于培养瓶中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育。第三天初次换液,以后每 2 ~ 3 d 换液 1 次。待细胞融合达 70% ~ 80% 时,用含 0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养。

**1.2.3 诱导 MSCs 向成骨细胞分化:**将第三代 MSCs 按  $2 \times 10^4$  /mL 密度接种于预先置有小盖玻片的 6 孔板中,将其分为空白对照组、经典诱导组和加

味左归丸组。待细胞融合达 70% ~ 80% 后,空白对照组添加原培养液,经典诱导组添加经典诱导液(最终浓度为  $10^{-5}$  mmol/L 地塞米松、50  $\mu$ g/L 维生素 C、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠),加味左归丸组添加加味左归丸含药血清。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,每 3 d 换液。

### 1.3 检测项目与方法

**1.3.1 成骨表型化 MSCs 的 Von-Kossa 染色:**取诱导 21 d 的贴壁细胞的盖玻片,PBS 漂洗数次,10% 福尔马林固定 10 min,2% AgNO<sub>3</sub> 水溶液浸染,紫外线下照射 1 h,蒸馏水洗 1 min,5% 硫代硫酸钠水溶液处理 5 min 后,水洗 5 min,脱水透明,树胶封片,置普通光镜下观察。

**1.3.2 免疫细胞化学法检测成骨表型化 MSCs 的 I 型胶原表达:**分别取诱导 7 d 和 14 d 贴壁细胞的盖玻片,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2 ~ 7.4)漂洗 3 次,5 min/次;4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 浸洗 2 次,5 min/次;30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和纯甲醇(1:50)处理 10 min;5% BSA 封闭 20 min,加入一抗(I 型胶原)4 °C 过夜;PBS 适当洗涤后加入二抗(生物素标记的抗小鼠 IgG)37 °C,20 min;PBS 适当冲洗后加 ABC 复合剂,37 °C,20 min;DAB 溶液显色 2 ~ 20 min;苏木素复染 2 ~ 10 min;脱水;树胶封片。采用 DI-2000 图像分析系统进行图像分析。

阳性结果判断:染色阳性表达为棕黄色,主要存在于细胞浆内。核膜、胞浆同时着色亦为阳性,单纯核膜着色而无胞浆着色或胞核、胞浆均无着色为阴性。灰度值表示阳性细胞表达强度,灰度值越小表达信号越强。

### 1.4 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 软件包统计分析,进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 骨髓 MSCs 的形态学特征

骨髓 MSCs 原代细胞生长第 4 d 时,可见多数细胞已贴壁,均匀分散生长,细胞以小角形、梭形多见,胞核位于中央,其间夹杂少量有核的淋巴细胞,红细胞极少见。第一次换液后,细胞为典型的长梭形,并呈集落生长,平行状或旋涡状排列,有一定的极性。一般 10 ~ 14 d 便可达 70% ~ 80% 融合(图 1),再次进行传代。传代以后以长梭形、多角形细胞为主。

### 2.2 骨向分化诱导后细胞形态学观察

加味左归丸组诱导后第 6 d 细胞形态开始发生

变化,由梭形逐渐转化为方形、鳞片形、三角形或多角形等,第8 d时,细胞外基质分泌增多,胞浆中及胞质外均可见较多细小黑色颗粒,胞核颜色较淡,胞浆色变深。第21 d时,细胞聚集成多个散在的细胞结节,结节中间的细胞由梭形变为矮立方形或锥体形,排列紧密,逐渐形成多层结构,并产生大量分泌颗粒,将结节包埋,结节中心部逐渐变浓,直至不透光而形成黑色的致密团状结构(图2)。经典诱导组诱导后细胞的形态变化跟加味左归丸组的变化相差不大。

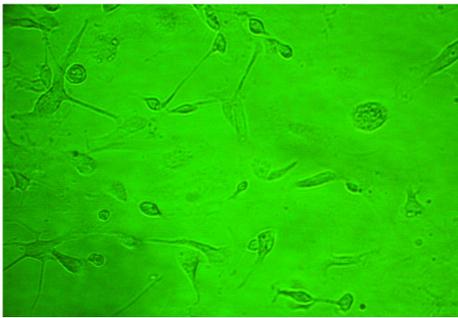


图1 培养第14天的MSCs( $\times 40$ )

Fig. 1 The culture of MSCs on the 14th day ( $\times 40$ )

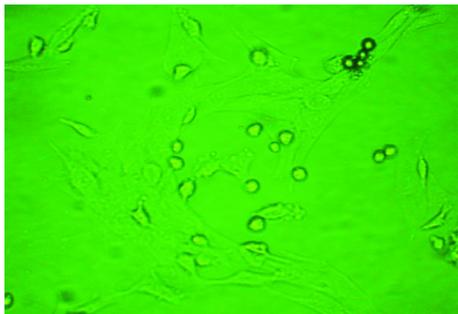


图2 MSCs经骨向诱导7天( $\times 40$ )

Fig. 2 The 7th day of induction from MSCs to bone( $\times 40$ )

### 2.3 Von-Kossa 染色结果

骨髓MSCs经骨向诱导7 d后,可见少量细胞呈簇状生长,未见明显的细颗粒状结构(图3)。经骨向诱导21 d,可见细胞呈明显的簇状生长,其中心部位成细颗粒状,无细胞结构,折光性强,经 $\text{AgNO}_3$ 染色呈黑色,证实为矿化结节,矿化结节以圆形或不规则形态多见,大小不一,周围细胞也可轻微红染,细胞核红色(图4)。而未经诱导的对照组细胞则表现为阴性。

### 2.4 免疫细胞化学染色结果及分析

在诱导第7d,经免疫细胞化学方法检测到细胞

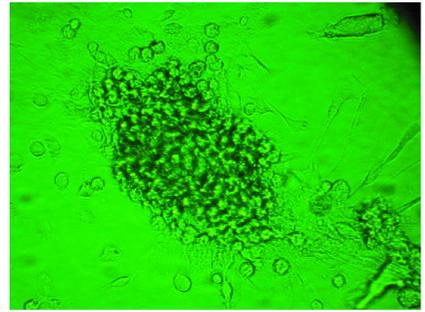


图3 MSCs经骨向诱导14天( $\times 40$ )

Fig. 3 The 14th day of induction from MSCs to bone( $\times 40$ )

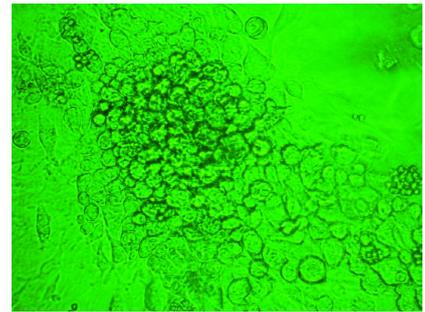


图4 MSCs诱导21d后形成的矿化结节( $\times 40$ )

Fig. 4 The formation of mineralized nodules after 21d induction( $\times 40$ )

呈现梭形或多角形,在细胞浆内可检测到I型胶原,表达为:经典诱导组染色为阳性(图5),加味左归丸组染色为弱阳性(图6),空白对照组染色为阴性;在诱导第14d,经免疫细胞化学方法检测到细胞呈现方形或多角形,在细胞浆内可检测到I型胶原,表达为:经典诱导组染色为强阳性(图7),药物组染色为阳性(图8),空白对照组染色为阴性。I型胶原灰度分析结果见表1。

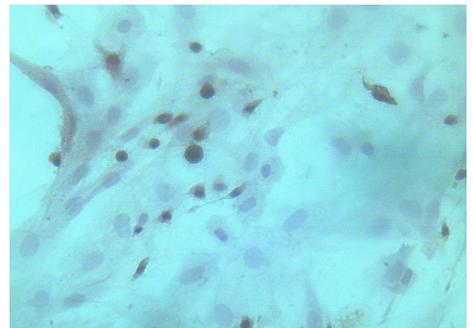


图5 经典诱导组骨向诱导7天I型胶原表达阳性( $\times 40$ )

Fig. 5 Positive expression of type I collagen in 7d-induction in classic induction group( $\times 40$ )

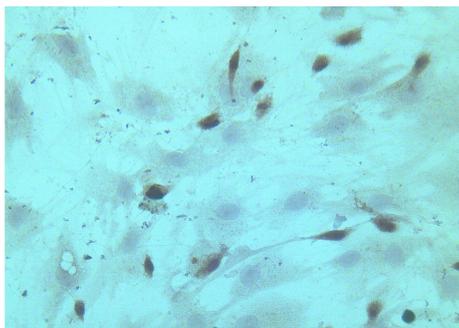


图 6 加味左归丸组骨向诱导 7 天 I 型胶原表达弱阳性(×40)

Fig. 6 Weak positive expression of type I collagen in 7d-induction in Zuogui pill group(×40)

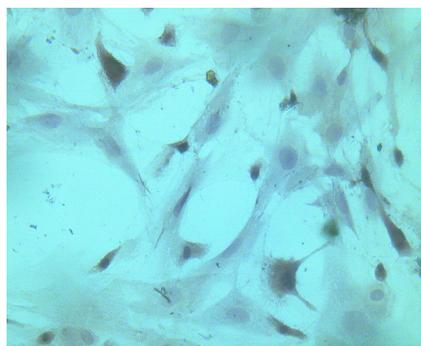


图 7 经典诱导组骨向诱导 14 天 I 型胶原表达强阳性(×40)

Fig. 7 Strong positive expression of type I collagen in 14d-induction in classic induction group(×40)

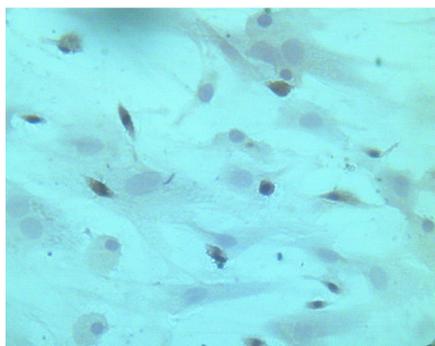


图 8 加味左归丸组骨向诱导 14 天 I 型胶原阳性(×40)

Fig. 8 Strong positive expression of type I collagen in 14d-induction in Zuogui pill group(×40)

表 1 不同处理因素内各时间点 I 型胶原灰度分析( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Analysis of the collagen type I gray in different treatment of each time point

组别	诱导后 7 天	诱导后 14 天
空白对照组	102.7187 ± 0.8760	102.4567 ± 2.4899
经典诱导组	97.7934 ± 1.9953 **	92.4785 ± 1.7562 **
加味左归丸组	99.9579 ± 3.0525 *	94.4599 ± 2.4026 **

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: Compared with the blank control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

离培养扩增,在体外可长时间保持未分化状态,加上骨髓来源丰富,采集方便安全、损伤小,将其作为理想的种子细胞用于创伤、感染、肿瘤及其他原因造成的骨组织缺损的研究已成为当前研究的热点<sup>[5]</sup>。

骨髓 MSCs 作为骨组织工程的种子细胞,具备向成骨细胞分化的能力,而 I 型胶原表达和矿化结节形成是检测成骨细胞活性的特异性方法。Owe 等<sup>[6]</sup>的研究表明: I 型胶原是成骨细胞表型和形成钙结节的基本保障。而矿化结节则能直接反映成骨细胞体外矿化的能力。

成骨细胞是骨形成过程中最重要的功能细胞<sup>[7,8]</sup>,并且近年来以治疗骨质疏松症为目的来讨论各种药物对 MSCs 骨向分化作用的研究极为丰富。左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,由熟地八两、山药炒四两、枸杞四两、山茱萸四两、川牛膝三两、菟丝子四两、鹿角胶四两、龟板胶四两,共 8 味药组成,方中重用熟地滋肾以补真阴,山茱萸涩精补髓,枸杞滋补肾阴。龟鹿二药,为血肉有情之品,鹿胶补阳,龟板滋阴,两药合用,沟通任督二脉,益精填髓,有补肾阴中包涵“阳中求阴”之义。菟丝子配牛膝,强腰膝,健筋骨。山药滋益脾肾。在此方基础上加骨碎补以强筋骨,加陈皮理气健脾、补而不腻。以上药物合用,共收滋阴补肾、填精益髓、强筋健骨之功。李瀚旻等<sup>[9]</sup>研究表明左归丸药物血清可以促进骨髓间充质干细胞转化为肝细胞。刘梅洁等<sup>[10]</sup>研究结果显示,与正常血清相比,左归丸含药血清能使 OB 分泌 OC 的量显著增多,说明左归丸对成骨细胞的骨形成有促进作用,这可能是其防治骨质疏松症的机制之一,亦为中医“肾主骨”理论提供了实验依据。本实验应用加味左归丸含药血清诱导 MSCs 向成骨细胞分化,并采用免疫细胞化学染色、Von-Kossa 染色法分别检测 I 型胶原的表达和矿化结节的形成。与空白对照组相比,加味左归丸含药血清能明显促进矿化结节形成

### 3 讨论

骨髓 MSCs 具有向成骨细胞分化的潜能,自体获取回输后不会发生免疫排斥反应,且易于体外分

和I型胶原表达,表明其能促进MSCs向成骨细胞分化。这一结果说明,加味左归丸能促进MSCs骨向分化是其能够治疗骨质疏松症的机理之一,本实验结果同时也为加味左归丸治疗骨质疏松症提供实验依据。需要指出的是,加味左归丸治疗骨质疏松症的机理是非常复杂的,本实验只是对其中的一个环节进行了探讨,有关其作用机理还有待于进一步深入研究。

### 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Friedenstien AJ, Corskaja JF, Kulagina, et al. Fibroblast precursor in normal and irradiated mouse hematopoietic organ [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5):267-274.
- [ 2 ] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH, et al. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. *Cell Tissue Res* 1988, 254(2):317-330.
- [ 3 ] Ju Dahong, Zhang Chunying, Wang Anmin, et al. Effect of treatment of Zuogui Pill on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Chines J Bas Med TCM*, 2001, 7(3):17-20.
- [ 4 ] Zhao Hongyan, Liu Hong, Liu Meijie, et al. Effect of Zuoguiwan containing serum on proliferation of osteoblasts function. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2005, 11(11):835-836.
- [ 5 ] Yao Tianhua, Li Xiaohong, Xiong Xizhou, et al. An experimental study of osteogenic differentiation and induced in vitro SD rat bone marrow stem cell. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2006, 27(3):234-257.
- [ 6 ] Owe TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of bone ECM [J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143(3):420-425.
- [ 7 ] Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence [J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12(2):134-147.
- [ 8 ] Tian Sande, Zhang Hong, Yang Hui. Study and application and development of osteoblast in CHINA. *Journal of Shanxi University of Science & Technology*, 2005, 23(1):91-94.
- [ 9 ] Li HM, Yan XS, Luo JJ, et al. Effect of Zuogui Wan drug serum on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11(28):5465-5468.
- [ 10 ] Liu Meijie, Lv Guohong, Zou Jun, et al. Effect of Zuoguiwan containing serum on osteoblasts secrete osteocalcin. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2007, 13(8):581-582.
- (收稿日期:2013-10-10;修回日期:2013-11-14)
- 
- (上接第1147页)
- [ 6 ] Deng WM, Hang P, Huang H, et al. Five-year follow-up study of a kidney-tonifying herbal Fufang for prevention of postmenopausal osteoporosis and fragility fractures [J]. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30(5):517-524.
- [ 7 ] Li XH, Lin N, Deng WM, et al. Effects of Bushen Zhuanggu Granules on body weight and bone histomorphometry of female rats with emasculation induced osteoporosis [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2011, 32(18):2357-2359.
- [ 8 ] Wang Y, Li LZ, Zhang YL, et al. LC, a novel estrone-rhein hybrid compound, promotes proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 344(1-2):59-68.
- [ 9 ] Nervina JM, Magyar CE, Pirih FQ, et al. PGC-1 $\alpha$  is induced by parathyroid hormone and coactivates Nurr1-mediated promoter activity in osteoblasts [J]. *Bone*, 2006, 39(5):1018-1025.
- [ 10 ] Mu CZ, Zhou J, Liu ZK. Preliminary demonstration of postmenopausal osteoporosis objective stasis Pathogenesis [J]. *Traditional Chinese Medicinal Research*, 2005, 18(1):30.
- [ 11 ] Xie L, Guo ZQ, Yao GH. TCM Syndrome Differentiation analysis for Postmenopausal osteoporosis [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 1999, 14(3):35-39.
- [ 12 ] Erdogan MO, Yıldız H, Artan S, et al. Association of estrogen receptor alpha and collagen type I alpha 1 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22(4):1219-1225.
- [ 13 ] Bonnelye E, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor alpha: a mediator of estrogen response in bone [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(5):3115-3121.
- [ 14 ] Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ ) [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(11):9013-9018.
- [ 15 ] Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(6):2635-2643.
- [ 16 ] Auld KL, Berasi SP, Liu Y, et al. Estrogen-related receptor  $\alpha$  regulates osteoblast differentiation via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(2):177-191.
- [ 17 ] Teyssier C, Gallet M, Rabier B, et al. Absence of ERR $\alpha$  in female mice confers resistance to bone loss induced by age or estrogen-deficiency [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11):e7942.
- (收稿日期:2013-11-16;修回日期:2013-12-21)

# 加味左归丸诱导骨髓间充质干细胞骨向分化的实验研究

作者: [颜春鲁](#), [李盛华](#), [周明旺](#), [姚贞宇](#), [YAN Chunlu](#), [LI Shenghua](#), [ZHOU Mingwang](#),  
[YAO Zhenyu](#)

作者单位: [颜春鲁, YAN Chunlu\(甘肃中医学院敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000; 甘肃省中医院, 兰州 730050\)](#), [李盛华, 周明旺, LI Shenghua, ZHOU Mingwang\(甘肃省中医院, 兰州, 730050\)](#), [姚贞宇, YAO Zhenyu\(兰州市第一人民医院, 兰州, 730030\)](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(10)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201410003.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201410003.aspx)