

## · 基础研究 ·

## 肉苁蓉含药血清诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究

曾建春<sup>1</sup>, 樊粤光<sup>1</sup>, 刘建仁<sup>1</sup>, 曾意荣<sup>1</sup>, 易春智<sup>2</sup>, 阎亮<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学)

**【摘要】** 目的: 研究补肾中药肉苁蓉含药血清对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)定向分化的影响。方法: 全骨髓培养法获得原代骨髓间充质干细胞, 经胰酶消化传代培养至第 4 代, 将第 4 代 BMSCs 以  $5 \times 10^6$  接种于 2 块 6 孔板, 每板 3 组孔, 分为空白组、地塞米松组、肉苁蓉组, 2 d 后换液, 加入诱导液。空白组加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 L-DMEM 培养基继续培养, 地塞米松组在基础培养基中加入诱导剂(含  $\beta$ -甘油磷酸钠 10 mmol/L, 地塞米松 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 维生素 C 50 mg/L), 肉苁蓉组为含 10% 肉苁蓉含药血清的 L-DMEM 培养基。第 10 天取出 1 块 6 孔板做 ALKP 染色, 另一 6 孔板于第 20 天做 6 孔板茜素红染色。结果: 第 10 天肉苁蓉组及地塞米松组 ALKP 染色阳性, 第 12 天可见白色钙结节, 第 20 天茜素红染色阳性。结论: BMSCs 在肉苁蓉含药血清诱导下可向成骨细胞分化, 分别作为组织工程的种子细胞和诱导因子对治疗骨质疏松、骨折不愈合将有良好的前景。

**【关键词】** 肉苁蓉; 骨髓; 间质干细胞; 成骨细胞; 细胞分化

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.08.015

**Experimental study of directional differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) to osteoblasts guided by serum containing cistanche deserticola** ZENG Jian-chun, FAN Yue-guang\*, LIU Jian-ren, ZENG Yi-rong, YI Chun-zhi, YAN Liang. \*The first Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

**ABSTRACT Objective:** To study directional differentiation of BMSCs guided by Desertliving Cistanche (*Herba Cistanches*) which invigorates the kidney. **Methods:** Primary BMSCs were obtained by whole bone marrow culture and subcultured to the fourth generation by trypsin digestion, and then inoculated into two six-well plates at  $5 \times 10^6$  cells per milliliter, all the plates were divided into three groups as blank group, Dexamethasone (DXM) group and *Herba Cistanches* group, three wells in each group, medium were changed at day 2. The blank group were changed with L-DMEM containing 10% FBS. The DXM group were changed with medium containing 10 mmol/L  $\beta$ -sodium glycerophosphate, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  DXM and 50 mg/L vitamin C. The *Herba Cistanches* group were changed with medium containing 10% blood serum containing *Herba Cistanches* and L-DMEM. One of the six-well plates was stained by alkaline phosphatase (AKP) at the tenth day, the other one was stained by alizarin Bordeaux at the twentieth day. **Results:** At the tenth day DXM group and *Herba Cistanches* group were ALKP stained positive; from the 12th day, white calcium nodus could be seen at the surface of the wells; which alizarin stained positive by the twentieth day. **Conclusion:** The medium containing *Herba Cistanches* can guide BMSCs to differentiate into osteoblast, which promises a favorable prospect for the treatment of osteoporosis and bone fracture disunion.

**KEYWORDS** Cistanche deserticola; Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Osteoblasts; Cell differentiation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(8): 606-608 www.zggszz.com

间充质干细胞(MSCs)是一种多潜能成体干细胞, 主要存在于骨髓, 还存在于胚胎时期间充质来源的骨外组织, 如皮肤成纤维细胞、脂肪干细胞、骨骼肌的卫星细胞和血管内皮细胞等。骨髓 MSCs(BMSCs)是骨髓基质的组成成分, 体外分离培养后, 在一定的诱导条件下, 具有向成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、脂肪细胞、心肌细胞等多向分化的能力。在骨

组织工程的种子细胞来源主要有成骨细胞和 BMSCs 等。成骨细胞虽然具有良好成骨活性, 但来源有限, 大量分离获取困难, 体外大量扩增的潜力不足, 难以满足骨组织工程临床应用的需要; BMSCs 不仅具有良好的成骨细胞分化潜能和高成骨活性, 而且具有强大的增殖潜能, 来源方便, 可以满足自体组织工程, 成为研究的重点。

中医认为, 肾主骨、生髓。现代药理研究表明补肾药物均有不同程度的兴奋垂体-肾上腺-性腺系统作用, 与骨代谢密切相关, 雌激素有增强成骨作用,

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30572399)

通讯作者: 樊粤光 Tel: 020-36591348 E-mail: fanyurguang@21cn.com

雄激素有促进蛋白质合成, 促进骨基质增加及钙磷沉积的作用。肉苁蓉(*Herba Cistanches*)中苯乙醇总甙、麦角甾苷、甜菜碱均具有雄激素样作用, 本实验拟研究补肾中药肉苁蓉含药血清对 BMSCs 向成骨细胞分化的影响。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 无特定病原体动物(SPF)级 SD 大鼠 50 只, 体重 150~200 g, 雌雄不限, 由广州中医药大学实验中心提供。

**1.1.2 器材** 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 96 孔板, 6 孔板(Coning), 酶标仪(Thermo), CO<sub>2</sub> 培养箱(Heraeus), 注射器针头滤器, 0.22 μm 滤膜(MILLipore), SIGMA-3K15 离心机(sigma)。

**1.2 试剂** L-DMEM 培养基, 南美洲胎牛血清(FBS, 海克隆), β-甘油磷酸钠, 地塞米松, 维生素 C, 茜素红, MTT(广州威佳), DMSO(sigma), 肉苁蓉(产地云南), 碱性磷酸酶(ALKP)染液(南京建成生物有限公司), 0.25%胰酶(GIBCO 公司)。

### 1.3 肉苁蓉含药血清的制备与分组方法

**1.3.1 肉苁蓉含药血清的制备** 取肉苁蓉药材粗粉 150 g, 加入 70%乙醇 10 倍量, 加热回流 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 滤液减压浓缩至 300 ml, 室温冷却, 4 °C 冰箱保存备用。将中药药液稀释至每毫升 0.3 g 生药灌胃 SD 大鼠, 共 50 只, 每次 1 ml, 每日 2 次, 连续给药 4 d, 最后一次给药后 1 h 经腹主动脉采血, 室温静置 3 h 后置 4 °C 冰箱过夜, 2 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 针头滤器过滤除菌, 置于 -20 °C 保存备用。

**1.3.2 分组方法** 本实验分 3 组, 分别为空白组、地塞米松组和肉苁蓉含药血清组。空白组采用含 10%FBS 的 L-DMEM 培养基培养; 地塞米松组, 在空白组基础上加入诱导剂, 其最终浓度分别为 β-甘油磷酸钠 10 mmol/L, 地塞米松 0.1 μmol/L, 维生素

C 50 mg/L; 肉苁蓉组, 采用 10%肉苁蓉含药血清的 L-DMEM 培养基培养。

### 1.4 BMSCs 培养与观测方法

**1.4.1 原代 BMSCs 的分离培养与扩增** SD 大鼠经腹腔 10%水合氯醛 0.7 ml 麻醉后, 75%乙醇浸泡颈部以下躯体 5 min, 无菌条件下取出双下肢股骨和胫骨, 修洁软组织后, 咬骨钳修剪骨端, 暴露髓腔。10 ml 注射器吸取含 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养基反复冲洗髓腔, 至到骨质外观微微透亮。75 cm<sup>2</sup> 培养瓶收集骨髓冲洗液, 放 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 孵育箱培养。每 3 d 换液 1 次。当细胞长满瓶底 90%后, 0.25%胰酶消化后, 以 1:3 比例传代。

**1.4.2 BMSCs 诱导分化** 取 P4 细胞, 当细胞长满 90%后, 0.25%胰酶消化制备细胞悬液, 以细胞密度 5×10<sup>6</sup> 接种于 2 块 6 孔板, 每板 3 组孔, 每孔 2 ml。当细胞长满瓶底 80%以上后换液, 空白组原培养基继续培养, 地塞米松组与肉苁蓉组分别加入成骨诱导液。

**1.4.3 碱性磷酸酶染色** 诱导培养第 10 天时取出 1 块 6 孔板, 吸去培养基, PBS 清洗 2 遍, 加入固定液固定 10 min 后, 加入底物, 37 °C 水浴 15 min, 水洗。再加入苏木素复染 10 min, 水洗, 晾干, 镜下观察。

**1.4.4 茜素红染色** 诱导培养第 20 天取出 1 块 6 孔板, 吸去培养基, PBS 清洗 3 次, 95%乙醇固定 10 min, 加入 0.1%茜素红-Tris-HCl(pH 8.3)37 °C, 30 min, 镜下观察结果。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学观察** BMSCs 为成纤维样细胞, 贴壁后成梭形(见图 1)。加入诱导液后, 空白组细胞无明显变化; 地塞米松组第 5 天开始出现细胞成聚集生长, 细胞体积增大(见图 2); 肉苁蓉含药血清组从第 3 天开始出现细胞成聚集生长, 细胞体积增大(见图 3)。12 d 后地塞米松组(见图 4)和肉苁蓉组(见图 5)见明显结节形成。

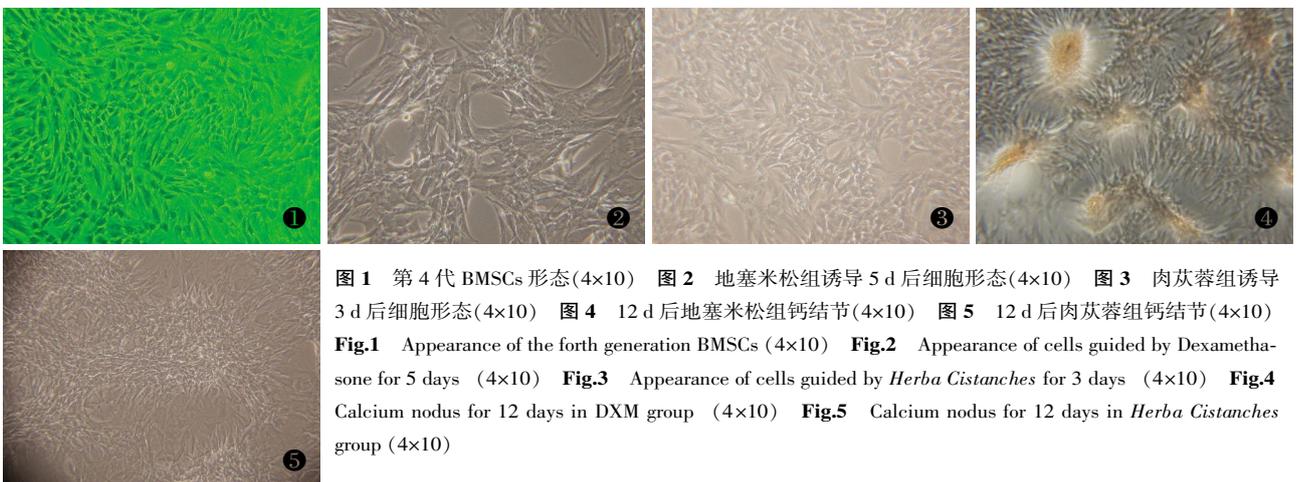


图 1 第 4 代 BMSCs 形态(4×10) 图 2 地塞米松组诱导 5 d 后细胞形态(4×10) 图 3 肉苁蓉组诱导 3 d 后细胞形态(4×10) 图 4 12 d 后地塞米松组钙结节(4×10) 图 5 12 d 后肉苁蓉组钙结节(4×10)  
Fig.1 Appearance of the forth generation BMSCs (4×10) Fig.2 Appearance of cells guided by Dexamethasone for 5 days (4×10) Fig.3 Appearance of cells guided by *Herba Cistanches* for 3 days (4×10) Fig.4 Calcium nodus for 12 days in DXM group (4×10) Fig.5 Calcium nodus for 12 days in *Herba Cistanches* group (4×10)

2.2 碱性磷酸酶染色 诱导第 10 天,经细胞碱性磷酸酶染色,空白组细胞内无色素沉着,地塞米松组及肉苁蓉组可见细胞内蓝色颗粒,细胞聚集区成紫黑色(见图 6、7)。

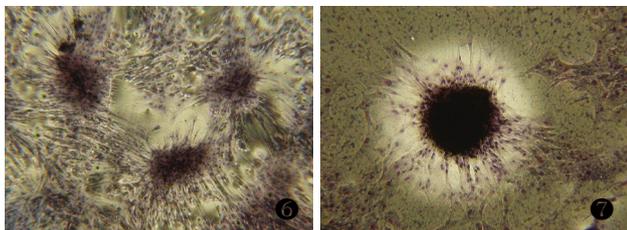


图 6 诱导第 10 天地塞米松组 ALKP 染色结果 (4×10) 图 7 诱导第 10 天肉苁蓉组 ALKP 染色结果(4×10)

Fig.6 Result of cells by ALKP staining for 10 days in DXM group (4×10) Fig.7 Result of cells by ALKP staining for 10 days in Herba Cistanches group (4×10)

2.3 茜素红染色 第 20 天,茜素红染色,空白组细胞间无色素沉积,地塞米松组及肉苁蓉组可见红色结节堆积(见图 8-9)。

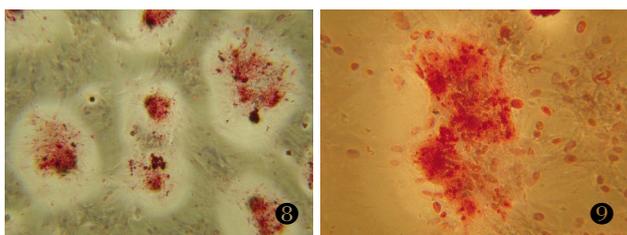


图 8 诱导第 20 天地塞米松组茜素红染色结果(4×10) 图 9 诱导第 20 天肉苁蓉组茜素红染色结果(4×10)

Fig.8 Result of cells by alizarin Bordeaux staining for 20 days in DXM group (4×10) Fig.9 Result of cells by alizarin Bordeaux staining for 20 days in Herba Cistanches group (4×10)

### 3 讨论

3.1 肉苁蓉含药血清对 BMSCs 诱导作用 肉苁蓉具有补中、入肝、滋肾、壮阳、润肠、通便之功效。现代药理研究表明补肾药物均有不同程度的兴奋垂体-肾上腺-性腺系统作用,与骨代谢密切相关,雌激素有增强成骨作用,雄激素有促进蛋白质合成,促进骨基质增加及钙磷沉积的作用<sup>[1]</sup>。肉苁蓉中苯乙醇总甙、麦角甾苷、甜菜碱均具有雄激素样作用。本实验发现,肉苁蓉含药血清可诱导 BMSCs 向成骨细胞分化。尽管目前以单味中药或复方中药诱导 BMSCs 向成骨细胞分化取得成功,但具体分子机制目前还未见相关报道。通过蛋白质组学研究可以分析此过程中相关蛋白质组差异,建立功能蛋白质组学,以期对肾主骨的理论进行新的诠释。

3.2 细胞密度在 BMSCs 向成骨细胞分化过程中起着重要作用 骨结节的形成除需要成骨诱导剂作用外,还有赖于接种细胞的密度,细胞密度必须达到一定的密度,细胞融合,才能向成骨细胞分化。本实验中当第 4 代细胞增殖至 90%以上融合时加入诱导剂进行培养,当细胞密度过低时细胞将增殖缓慢,无聚集生长之趋势。在细胞密度不均匀的同一培养孔内,细胞密集区出现了细胞界限不清、结构模糊现象,细胞聚集成团状,AKP 染色及茜素红染色阳性;而在细胞密度较低的区域并无细胞聚集成团状,AKP 染色及茜素红染色阴性。故骨组织工程中采用微载体结合更有效的体外培养方式,如三维培养(RCCS),以获得更多的细胞对细胞移植的成功具有重大影响。

3.3 肉苁蓉含药血清诱导 BMSCs 的临床意义 骨组织工程学具有广阔的临床应用前景,成为现代骨科学的研究热点。BMSCs 作为目前最为理想的骨组织工程种子细胞,对其作用研究的中心任务则是如何使之在尽可能简单的条件下定向分化为成骨细胞,进而转化为成熟的骨细胞。

目前对 BMSCs 定向分化常用的诱导剂由地塞米松、维生素 C、β-甘油磷酸钠组成。而在体外培养中,地塞米松对细胞增殖具有抑制作用<sup>[2]</sup>,与本实验所见相同,临床上地塞米松具有引起感染、骨坏死、骨质疏松等不良反应,将会限制 BMSCs 移植后在体内作为诱导剂的应用。肉苁蓉具有补肾、强筋骨的作用,本实验发现肉苁蓉具有促进 BMSCs 增殖和诱导 BMSCs 向成骨分化的作用。长期的临床应用中,未见肉苁蓉的不良反应,将其作为体内诱导剂具有广泛的临床应用前景。

总之,目前对于 BMSCs 作为骨组织工程种子细胞的研究,大多还处于实验阶段,如何能在较短时间内得到足够的 BMSCs,并运用简单的方法诱导其向成骨分化,是目前研究的重点。尽管具有补肾、强筋骨作用的肉苁蓉诱导 BMSCs 成骨分化的机制尚有待进一步研究,但将其作为 BMSCs 分化诱导剂,用于 MSCs 移植治疗骨折延迟愈合、不愈合、骨坏死等具有光明的前景。

#### 参考文献

[1] 杨收平. 肾主骨生髓学说的现代理解[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2002,3(8):489-490.  
[2] 袁风红,邹耀红,高恺言,等. 地塞米松对体外人骨髓基质细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 中华风湿病学杂志,2006,10(8):482-484.

(收稿日期:2009-10-29 本文编辑:连智华)