

## · 基础研究 ·

## 土鳖虫对激素诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

李树强<sup>1</sup>, 于涛<sup>2</sup>, 齐振熙<sup>3</sup>

(1.内江市中医院骨五科,四川 内江 461000;2.福建中医学院骨伤系;3.福建中西医结合研究院骨病研究所,福建福州 350003)

**【摘要】**目的:探讨激素性股骨头缺血坏死的发病机制及土鳖虫防治该病的作用机制。方法:体外培养骨髓间充质干细胞,传3代 BMSCs 随机分为空白组,模型组及中药低、中、高剂量组。模型组应用大剂量地塞米松诱导体外培养的骨髓间充质干细胞成脂分化,抑制其成骨分化。中药低、中、高剂量组在诱导成脂的同时给予土鳖虫含药血清干预。检测干预6d后各组细胞内成骨标志物骨钙素、碱性磷酸酶及I型胶原 mRNA 的表达。结果:土鳖虫含药血清可逆转激素诱导下的 BMSCs 内碱性磷酸酶含量,骨钙素及I型胶原 mRNA 表达均降低。结论:土鳖虫防治激素性股骨头缺血坏死的机制不仅是改善股骨头的微循环,同时还与其抑制激素诱导下的 BMSCs 成骨分化减少有关。

**【关键词】** 股骨头坏死; 活血化瘀剂; 骨髓; 间质干细胞

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2010.12.012

**Influence of Ground Beetle (土鳖虫) on steroid-induced BMSCs osteogenic differentiation** LI Shu-qiang, YU Tao, QI Zhen-xi\*. \*Osteopaedics Institute of Fujian Academy of Integrated Traditional and Western Medicine, Fuzhou 350003, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the pathogenesis of steroid-induced avascular necrosis of femoral head and the control mechanisms of Ground Beetle (土鳖虫). **Methods:** The bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured in vitro. The BMSCs in the 3rd generation were randomly divided into blank group, model group and Chinese medicine low, medium and high dose group. BMSCs of model group using high-dose steroid-induced in vitro were adipogenic differentiation to inhibit osteogenesis. Chinese medicine low, medium and high-dose groups at the same time were given the Ground Beetle (土鳖虫) intervention serum containing insects. The expression of osteocalcin, Alkaline phosphatase and Type I Collagen mRNA were detected and interfered 6 days later. **Results:** Serum containing Ground Beetle (土鳖虫) could reverse content of steroid-induced alkaline phosphatase of BMSCs, the expression of osteocalcin and Type I Collagen mRNA decreased. **Conclusion:** The control mechanism of Ground Beetle (土鳖虫) on steroid-induced avascular necrosis is not only to improve the microcirculation, but also to inhibit steroid-induced osteogenic differentiation of BMSCs reduced.

**KEYWORDS** Femur head necrosis; Blood act stasis remov agents; Bone marrow; Mesenchymal stem cells

Zhongguo Gushang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(12):921-924 www.zggszz.com

研究表明大剂量激素可抑制骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 成骨分化, 促进其成脂分化<sup>[1]</sup>, 目前已被许多学者用来解释激素性股骨头缺血性坏死的发病机制<sup>[2]</sup>。土鳖虫是临床中医家治疗股骨头缺血性坏死的常用药物。本研究通过观察土鳖虫含药血清对 BMSCs 成骨的促进作用, 探讨土鳖虫临床防治激素性股骨头缺血坏死的理论基础, 为其对该病的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及仪器 低糖 DMEM 培养基

(DMEM-LG)、胎牛血清及胰蛋白酶等细胞培养试剂 (美国 Hyclone 公司); 地塞米松磷酸钠注射液, 1 ml: 5 mg (浙江仙璐制药股份有限公司, 国药准字: H3362 0824); 碱性磷酸酶测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20071107); 骨钙素放射免疫试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20071107); 考马斯亮蓝试剂盒 (批号: 20080108, 南京建成生物工程研究所); 逆转录试剂盒 (批号: 253082, 美国 Promega 公司); 紫外分光光度计 (美国 Beckman); 半自动生化分析仪、酶标仪 (意大利 Biotecnica instruments); 倒置显微照相机 (日本 OLYMPUS 公司); 超纯水系统 (美国密理伯公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 SHEL-LAB 公司)。基因扩增仪 (美国 GE 生物系统公司)。

基金项目: 福建省科技计划项目 (编号: 2007F5060)

通讯作者: 齐振熙 Tel: 0591-87249005 E-mail: zxqi@fjtem.edu.cn

**1.2 土鳖虫含药血清制备** 选用中药土鳖虫 1 kg, 由福建中医学院第二附属医院中药房提供并由福建中医学院第二附属医院制剂中心一次性加工完成, 制成含生药 0.5 g/ml 浓缩液, 4 °C 保存备用。选用成年 SD 大鼠 46 只(由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号 SYXK (沪) 2007-0005), 用随机数字表法随机分为 4 组, 分别为中药低、中、高剂量组和空白组, 根据人鼠用药量及体表面积换算得出灌胃量。每组数量及灌胃方法如下: 空白组 16 只, 3.6 g/kg 生理盐水灌胃; 中药低剂量组 10 只, 1.8 g/kg 土鳖虫药液灌胃; 中药中剂量组 10 只, 3.6 g/kg 土鳖虫药液灌胃; 中药高剂量组 10 只, 7.2 g/kg 土鳖虫药液灌胃。各组灌胃每日 2 次, 早晚各半量, 连续灌胃 10 d。于第 10 天一次给予 1 d 的量, 灌胃 1 h 腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 20 min。吸取上层血清, 每组放入统一的无菌血清瓶内。经 56 °C, 水浴 30 min 灭活。用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 置 -20 °C 保存备用。

**1.3 BMSCs 体外培养与传代** 取 30 d 龄 SD 大鼠 4 只, 剖取双侧股骨和胫骨, 用 DMEM 液冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞, 按 Bereford 培养骨髓细胞的方法, 通过细胞贴壁分离, 获取 BMSCs。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 空气的二氧化碳培养箱中培养。每隔 3 d 换液 1 次。

原代细胞培养 12~16 d 融合传代, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 吹打成单细胞悬液, 以 5×10<sup>4</sup>/ml 的密度, 传 3 代细胞进行以下实验。

**1.4 BMSCs 鉴定** 形态学鉴定: 光镜观察细胞的形态。参照文献[3]的鉴定方法, 检测 BMSCs 细胞表面标志抗原 CD45 和 CD90 表达阳性率, 取长满瓶底的第 3 代 BMSCs, 用流式细胞仪检测抗原 CD45 和 CD90 阳性表达率。

**1.5 BMSCs 药物干预** 传 3 代 BMSCs 用随机数字表法随机分为中药低剂量、中药中剂量、中药高剂量以及模型组和空白组。中药各组分别加入含不同浓度含药血清的培养液(1 L 培养基中含 100 g 含药血清), 同时加地塞米松至终浓度 10<sup>-6</sup> mol/L; 模型组加入含生理盐水血清的培养液, 同时加地塞米松至终浓度 10<sup>-6</sup> mol/L; 空白组加入含生理盐水血清的培养液, 不加地塞米松。干预 6 d 后检测成骨标志物。

## 1.6 成骨标志物检测

**1.6.1 细胞内碱性磷酸酶(ALP)测定** 5 组细胞干预 6 d 后, 每组取 8 个样本, 用 0.02 % EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶联合消化, 离心, 1 000 r/min, 10 min。收集细胞, 反复冻融 3 次裂解, 离心, 3 000 r/min, 10 min。收集上清液, 用碱性磷酸酶试剂盒在酶标仪上检测。

**1.6.2 骨钙素(BGP)测定** 5 组细胞干预 6 d 后, 每组取 8 个样本, 取培养瓶中上清液, 用骨钙素检测试剂盒按说明采用放射免疫法来测定 5 组干预培养上清液中骨钙素含量(ng)。用考马斯亮兰试剂盒按说明书操作检测各样本细胞内总蛋白量(μg)。以骨钙素(ng)/细胞内总蛋白量(μg)做为最终结果。

## 1.6.3 I 型胶原 mRNA 表达的测定

(1)总 RNA 提取。5 组细胞干预 6 d 后, 每组取 8 个样本。一步法提取总 RNA, 按 Trizol Reagent 说明书操作。逆转录: 按照 Promega A3500 试剂盒换算得如下反应体系: 10×buffer 2 μl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 μl, 10 mM dNTP 2 μl, 500 U/ml Random Primer 1 μl, 40 U/ml RNA inhibitor 0.5 μl, 25 U/ml AMV 0.6 μl, 总 RNA 1 μg, DEPC 处理水补至 20 μl。加样后放入 PCR 扩增仪反转录, 程序设定: 25 °C×10 min, 42 °C×60 min, 99 °C×5 min, 4 °C 保存。反应完即得到逆转录产物 cDNA。

(2)PCR(引物设计均有 Oligo 6 软件设计, 上海生工合成)序列。I 型胶原: 上游引物 5'-GGTTTG-GAGAGAGCATGACC-3', 下游引物 5'-TTTGGGAAATTGAGTTTGG-3', 产物长度 514 bp; GAPDH: 上游引物 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAG-3', 下游引物 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3', 产物长度 288 bp。

(3)应用一步法进行 RT-PCR 反应。20 μl PCR 体系的组成: 10×buffer 2 μl(含镁离子), 10 mM dNTP 0.4 μl, 上、下游引物各 0.51 μl, Taq 酶 0.2 μl, cDNA 1 μl, DEPC 处理水补至 20 μl。反应条件: ①94 °C 灭活逆转录酶 5 min。②94 °C 变性 30 s, X °C 退火 30 s(注: 退火温度 X 因基因不同而异, I 型胶原 58 °C, GAPDH 55 °C), 72 °C 延伸 30 s, 第②步共循环 35 次。③4 °C 保存产物。

(4)电泳与成像分析。RT-PCR 产物的半定量分析: 各组 RT-PCR 产物应用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果采用紫外-凝胶成像分析系统记录, Quality One 软件半定量分析电泳结果, 以目的扩增条带 I 型胶原/GAPDH 对光吸收度比值的表达分析目的基因 mRNA 的相对表达水平。

**1.7 统计学分析** 定量资料进行单因素方差分析, 由统计软件包(SPSS 14.0)完成。

## 2 结果

**2.1 细胞形态观察和标志抗原 CD45 和 CD90 表达阳性率** 细胞接种后随即在倒置显微镜下观察, 培养液中存在很多大小不等的圆形细胞, 其中, 造血细胞为主要成分。随着培养时间延长, 造血细胞逐渐死亡, 其余细胞 24 h 后开始贴壁。3 d 后细胞发生明

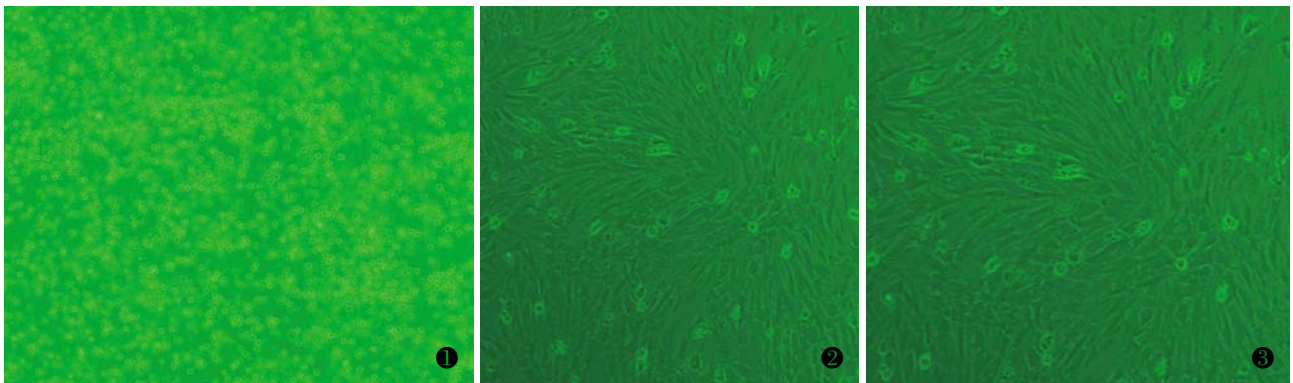


图 1 取材 2 h 后 BMSCs 细胞形态( $\times 100$ ) 图 2 空白组 BMSCs 干预 6 d 时的细胞形态( $\times 100$ ) 图 3 中药中剂量组 BMSCs 干预 6 d 时的细胞形态( $\times 100$ )

Fig.1 Cells morphology cultured for 2 hours Fig.2 In blank control group cells interfered for 6 days Fig.3 In middle-dose Chinese Medicine group cells interfered for 6 days

显变化,贴壁的基质细胞伸出突起变为梭形,体积增大,并开始增殖以后细胞突起相互连接。10~12 d 后细胞长满瓶底。传代细胞为圆形,接种 5~6 h 即迅速贴壁,伸展,重新恢复梭形。24 h 基本完成贴壁,5~6 d 细胞即可长满瓶底。干预 5~6 d 后,细胞体积增大,突触变长,形状极不规则(见图 1-3)。生长良好的贴壁细胞在第 3 代时行表面标记物检测。第 3 代细胞 CD45 阳性率约 1.9%,CD90 阳性率达 99.1%

**2.2 细胞内 ALP 检测结果** 各组细胞干预 6 d 后,模型组细胞内的碱性磷酸酶含量较空白组明显下降,而中药各组较模型组均有明显升高,且随着药量的加大碱性磷酸酶含量呈上升趋势(见表 1)。各组数据均符合正态性,符合方差齐性,用单因素方差分析,结果为( $F=205.597, P=0.000$ )。与模型组比较:空白组和中药低、中、高剂量组差异均有统计学意义( $P=0.000, 0<0.01$ )。与空白组比较中药低剂量组  $P=0.000$ , 中药中剂量组  $P=0.000$ , 中药高剂量组  $P=0.099$ 。

**2.3 BGP 检测结果** 各组细胞干预处理 6 d 后,上清培养液中骨钙素量 (ng) 除以细胞内总蛋白量 ( $\mu\text{g}$ ),以此比值为最终数据。模型组骨钙素含量较空白组明显下降,而中药各组较模型组均有不同程度的升高,且随着药量的加大骨钙素含量呈上升趋势(见表 1)。各组数据均符合正态性,符合方差齐性,用单因素方差分析,结果为 ( $F=23.623, P=0.000 < 0.01$ )。与模型组比较:空白组  $P=0.001$ , 中药低、中、高剂量组分别为  $P=0.969, 0.000, 0.000$ 。与空白组比较,中药低剂量组  $P=0.003$ , 中药中剂量组  $P=0.079$ , 中药高剂量组  $P=0.002$ 。

**2.4 I 型胶原 mRNA 的表达结果** 各组细胞干预处理 6 d 后,以 GAPDH 为对照,PCR 扩增产物经电泳分离后在紫外灯下观察,可见在 288 bp 和 514 bp 处各出现一条带(见图 4),通过凝胶成像扫描系统

做半定量分析,以 COL-I mRNA 与 GAPDH 的吸光度比值作为该产物的相对值。结果显示:细胞内的 COL-I mRNA 含量模型组明显低于空白组,而中药各组较模型组均有明显升高,且随着药量的增加细胞内 COL-I mRNA 含量呈上升趋势(见表 1)。各组数据均符合正态性,符合方差齐性,用单因素方差分析结果为  $F=23.232, P=0.000$ 。与对照组比较:空白组和中药低、中、高剂量组均为  $P=0.000$ ,与空白组比较,中药低剂量组  $P=0.989$ , 中药中剂量组  $P=0.873$ , 中药高剂量组  $P=0.902$ , 均无统计学差异。

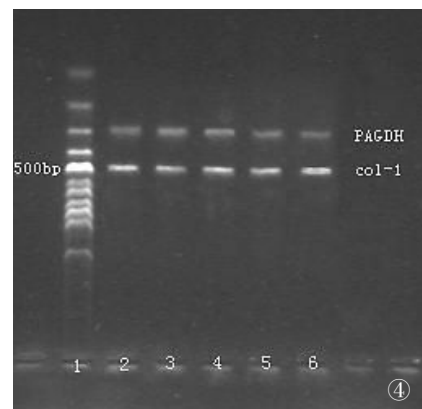


图 4 各组细胞 I 型胶原 mRNA 琼脂糖凝胶电泳结果 注:1 为 marker;2:空白组;3:模型组;4:中药低剂量组;5:中药中剂量组;6:中药高剂量组

Fig.4 Type I Collagen mRNA agarose gel electrophoresis in each group 1:for the marker;2:for the blank group;3:for model group;4:for low-dose Chinese medicine group;5:for medium-dose;6:for high-dose

### 3 讨论

临床组织学及病理学研究证明:激素性股骨头缺血性坏死的早期病理变化是股骨头骨髓内造血组织减少,脂肪组织增多,骨小梁内骨细胞数减少<sup>[4]</sup>。中医药治疗激素性股骨头缺血坏死的疗效已经得到肯定,认为其病机关键是血瘀。既往的研究表明,运用活血化瘀法、渗湿化痰法和补肾壮骨法 3 种不同

表 1 各组细胞干预处理 6 d 后碱性磷酸酶、骨钙素及 I 型胶原 mRNA 含量(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab.1 Expression of Alkaline phosphatase, osteocalcin and Type I Collagen mRNA in each group intervened for 6 days (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	碱性磷酸酶 (ALP)(U/L)	骨钙素(BGP) (ng/ $\mu$ g)	I 型胶原 mRNA
空白组	73.49 $\pm$ 5.97	1.98 $\pm$ 0.49	1.70 $\pm$ 0.16
模型组	25.51 $\pm$ 2.49	1.26 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.18
中药低剂量组	40.15 $\pm$ 3.53	1.27 $\pm$ 0.24	1.67 $\pm$ 0.05
中药中剂量组	61.28 $\pm$ 3.52	2.44 $\pm$ 0.50	1.74 $\pm$ 0.14
中药高剂量组	70.05 $\pm$ 3.97	2.71 $\pm$ 0.34	1.74 $\pm$ 0.14

注: ALP: 组间总体比较,  $F=205.597, P=0.000$ ; 与对照组比较, 中药低、中、高剂量组分别为  $P=0.969, 0.000, 0.000$ ; 与空白组比较, 中药低剂量组  $P=0.003$ , 中药中剂量组  $P=0.079$ , 中药高剂量组  $P=0.002$ 。BGP: 组间总体比较,  $F=23.623, P=0.000$ ; 与对照组比较, 空白组  $P=0.001$ , 中药低、中、高剂量组分别为  $P=0.969, 0.000, 0.000$ ; 与空白组比较, 中药低剂量组  $P=0.003$ , 中药中剂量组  $P=0.079$ , 中药高剂量组  $P=0.002$ 。I 型胶原 mRNA: 组间总体比较,  $F=23.232, P=0.000$ ; 与对照组比较, 空白组和中药低、中、高剂量组均为  $F=23.232, P=0.000$ ; 与空白组比较, 中药低剂量组  $P=0.989$ , 中药中剂量组  $P=0.873$ , 中药高剂量组  $P=0.902$

Note: ALP: compared among these groups,  $F=205.597, P=0.000$ ; compared with the control group,  $P=0.969, 0.000, 0.000$  in low, medium, high dose group respectively; compared with blank group,  $P=0.003, 0.079, 0.002$  in low, medium and high dose group respectively. BGP: compared among these groups,  $F=23.623, P=0.000$ ; compared with the control group,  $P=0.001, 0.969, 0.000, 0.000$  in blank, low, medium, high dose group respectively; compared with blank group,  $P=0.003, 0.079, 0.002$  in low, medium and high dose group respectively. Type I Collagen mRNA: compared among these groups,  $F=23.232, P=0.000$ ; compared with the control group,  $F=23.232, P=0.000$  in blank, low, medium, high dose group; compared with blank group,  $P=0.989, 0.873, 0.902$  in low, medium and high dose group respectively

的治则防治该病, 活血化痰法作用最为显著。

土鳖虫又名地鳖虫、土元、蟪虫, 是传统的活血化瘀中药, 具有逐瘀、破积、通络、理伤等功效, 是临床上常用的防治激素性股骨头缺血坏死中药。现代药理学研究证明, 土鳖虫具有调节血液流变学特性, 降低血脂、改善微循环的作用; 还有增强细胞对缺氧的耐受能力、提高超氧化物歧化酶的活性、减轻组织对缺血再灌注的损伤作用<sup>[5]</sup>。

BMSCs 是骨髓中的一类与造血干细胞不同的, 具有向骨、软骨、脂肪、肌肉等多种组织细胞分化能力的成体干细胞, 它在体外可以大量增殖并具有克

隆形成的能力。BMSCs 在自然条件下大多分化为成骨细胞, 很少分化为脂肪细胞。研究表明脂肪细胞和成骨细胞具相同的细胞表型, 在一定条件下可在不同的分化方向之间转化, 而且成骨与成脂肪之间似乎存在一种相互牵制、此消彼长的关系<sup>[6]</sup>。很多学者应用实验证明大剂量激素能使 BMSCs 向脂肪细胞转化, 从而使其向成骨细胞转化受阻<sup>[7]</sup>, 并由此认为这可能是激素导致股骨头缺血性坏死的机制之一。

本实验应用大剂量激素 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 干预 BMSCs 后, 细胞内成骨标志物: ALP、BGP 的表达及 I 型胶原 mRNA 的表达均有显著降低。说明激素在某个环节阻止 BMSCs 的成骨分化。而中药各组在激素诱导的同时加入土鳖虫含药血清, 结果显示 ALP、BGP 的表达及 I 型胶原 mRNA 的表达较模型组均有明显升高, 说明土鳖虫可阻止激素诱导下的 BMSCs 成骨分化减少。这种阻止作用可能是土鳖虫含药血清在 BMSCs 向脂肪细胞分化的某个或某些过程起作用, 其具体作用机制还有待进一步探讨。但可以明确土鳖虫可对抗激素对 BMSCs 成骨分化的抑制, 促进其成骨分化。这也许是土鳖虫防治激素性股骨头缺血坏死的机制。

参考文献

- [1] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med, 2001, 226 (6): 507-520.
- [2] 殷力, 李月白, 许建中, 等. 地塞米松调节 BMSCs 成脂及成骨分化的组织化学研究[J]. 河南医学研究, 2000, 9(4): 311-312.
- [3] 何志义, 原丽英, 陈晏, 等. 大鼠骨髓基质细胞的体外分离、培养和鉴定的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33 (5): 395-396.
- [4] 童培建, 肖鲁伟, 季卫锋, 等. 脂质代谢及破骨细胞活性在激素性股骨头坏死塌陷发生过程中的作用研究[J]. 中国骨伤, 2009, 22(2): 110-113.
- [5] 于燕, 刘继兰, 王菊英, 等. 土鳖虫水提物对实验性高脂血症大鼠血管内皮和内皮素的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24 (1): 15-17.
- [6] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells[J]. J Cell Biochem, 2001, 81: 23-38.
- [7] Schecroun N, Delloye C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells; comparative study and characterization [J]. Bone, 2003, 32(3): 252-260.

(收稿日期: 2010-03-25 本文编辑: 王玉蔓)