

淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨和成脂分化的影响

宋鹏¹, 王鸣刚^{1*}, 姚娟², 马慧萍², 葛宝丰³, 陈克明³, 成魁³

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050; 2. 兰州军区兰州总医院药材科, 兰州 730050;
3. 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**研究淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)成骨和成脂方向分化的影响。**方法:**在 37 ℃ 5% CO₂ 和饱和湿度的条件下贴壁筛选体外培养 rBMSCs。采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成骨性分化, 第 3, 6, 9, 12 天进行碱性磷酸酶(ALP)活性测定, 第 15 天进行钙化结节染色, 第 12, 24, 48, 72 h 提取总 RNA, 采用实时聚合酶链反应(Real time PCR)方法分析检测骨成型蛋白 2(BMP-2)和骨特异性转录因子(Runx-2)mRNA 表达水平。采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成脂性分化, 第 5, 10, 15, 20 天进行甘油三酯含量的测定, 第 21 天进行油红 O 染色, 于 12, 24, 48, 72 h 提取总 RNA, 采用 Real Time PCR 方法分析检测 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 表达水平。**结果:**淫羊藿苷显著提高了细胞中 ALP 的活性, 增加了钙化结节数, 并且升高了成骨性相关因子 BMP-2 和 Runx-2 的基因表达量。淫羊藿苷降低了细胞中甘油三酯的含量, 减少了脂滴的形成, 并且减弱了成脂转录因子过氧化物酶体增生物激活受体 γ (PPAR γ) 和增强子结合蛋白(C/EBP α)的基因表达量。**结论:**淫羊藿苷对 rBMSCs 分化的调节有双向性, 即它在促进 rBMSCs 成骨性分化的同时又抑制 rBMSCs 成脂分化。

[关键词] 淫羊藿苷; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 成脂分化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0200-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1128.048.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 11:28

Effect of Icariin on Osteogenic Differentiation and Adipogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Stem Cells

SONG Peng¹, WANG Ming-gang^{1*}, YAO Juan², MA Hui-ping², GE Bao-feng³, CHEN Ke-ming³, CHENG Kui³

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
2. Institute of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China;
3. Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of icariin on osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells (rBMSCs). **Method:** rBMSCs were incubated with final concentrations of $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ icariin under the conditions of osteogenic induction culture. The alkaline phosphatase (ALP) activity was determined at day of 3, 6, 9, 12 days and mineralized nodules were stained at the 15th days; Total RNA was isolated and the gene expressions of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and Runx-2 were investigated by Real time PCR. rBMSCs adipogenic differentiation were treatment by icariin with the concentration $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, triglycerides content was determined at day of 5, 10, 15 and 20, rathonom red staining was made at day of 21. Total RNA was isolated at 12, 24, 48 and 72 h to investigate the gene expression of PPAR γ and C/EBP α mRNA by Real Time PCR. **Result:** Icariin significantly enhanced the ALP activity of the rBMSCs and the number of calcified nodules, and increased the gene expression of osteogenic factor BMP-2 and

[收稿日期] 20120216(011)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(1107RJZA125);甘肃省科技重大专项计划资助项目(09ZKDA025)

[第一作者] 宋鹏, 硕士生, 从事抗骨质疏松分子药理学研究, E-mail: beyondsp@foxmail.com

[通讯作者] * 王鸣刚, 博士, 教授, 从事分子生物学研究, Tel: 0931-8994327, E-mail: mgwang@163.com

Runx-2. Icariin significantly reduced triglyceride levels and the formation of lipid droplets, and decreased gene expression levels of the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . **Conclusion:** Icariin can regulate rBMSCs differentiation, and promote rBMSCs osteogenic differentiation and at the same time icariin can exert suppression of rBMSCs adipogenic differentiation.

[**Key words**] icariin; bone marrow stromal stem cells; osteogenic differentiation; adipogenic differentiation

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种成体多能干细胞,可在不同条件下分化为成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等^[1]。研究表明骨髓间充质干细胞作为成骨细胞前体的主要来源,其成骨和成脂双向分化的特性在骨质疏松发生时的骨量减少和骨髓中的脂肪组织伴行增多的现象中发挥重要作用^[2-3]。具有雌激素样作用的天然化合物淫羊藿苷在抗骨质疏松方面有巨大的潜力,不仅可以促进成骨细胞成熟分化,而且可以抑制破骨细胞的骨吸收活性^[4-5]。本文就淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 成骨和成脂方向分化的影响进行研究,明确淫羊藿苷促进 rBMSCs 成骨性分化,抑制 rBMSCs 成脂性分化的作用。

1 材料

1.1 动物 体重 120 g 左右的 Wistar 雄性大鼠[购自甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心,动物质量合格证号 SCXK(甘)2004-0006-152]。

1.2 药品与试剂 淫羊藿苷[上海融禾医药科技发展有限公司,提取自淫羊藿 (*Epimedium*),纯度 > 98%,批号 HIC110721],DMEM/F12 培养基 (Gibco, USA,批号 6721953),甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸 (ASAP)、地塞米松、茜素红、油红 O、胰岛素、吡啶美辛和二甲基亚砷 (DMSO) 均购自 Sigma 公司,类标准胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司,批号 20110905)。碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒 (批号 20110408) 和甘油三酯 (TG 酶法) 测试盒 (批号 20110408) 购自南京建成生物工程研究所。RNA iso Reagent, 反转录试剂盒, Taq DNA 聚合酶, Easy Dilution 稀释液 (均购自 TaKaRa 公司), 引物由 TaKaRa 公司设计合成。

1.3 仪器 RTG50005-9-VBC 二氧化碳培养箱 (Thermo Electron 公司, 美国), 550 型酶标仪 (BioRad 公司, 美国), IX-71 倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本), ABI7300 Real Time PCR 仪 (ABI 公司, 美国)。

2 方法

2.1 BMSCs 的分离、培养及鉴定 Wistar 雄性大鼠

脱颈处死, 无菌条件下迅速剥离出股骨和胫骨, 去两端骨髓, 用针管抽取一定量的 DMEM/F12 培养液 (含肝素钠 500 单位/mL), 注入骨髓腔内, 完全冲出骨髓, 滴管反复吹打, 150 目滤网过滤, 所得滤液基本上为单细胞悬液, 调整细胞密度为 1.0×10^7 个/mL, 以每孔 1 mL 接种于 12 孔板或每皿 4 mL 接种于中皿, 培养液中含 10% 的胎牛血清。在 37 °C 5% CO₂ 和饱和湿度的条件下培养 3 d, 弃培养液, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤两遍, 换新鲜的 DMEM/F12 培养液 (含 10% 的胎牛血清) 继续培养, 此后每 3 d 换液 1 次。鉴定采用原代细胞进行成骨和成脂诱导培养, 分别以茜素红和油红 O 对钙化结节和脂滴染色。

2.2 成骨性分化分析 经查阅文献^[4-5], 采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成骨性分化, 观察淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨性分化的影响。将原代细胞分为 2 组, 淫羊藿苷组和对照组。待细胞接近融合时更换诱导性培养基 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 β -甘油磷酸钠, $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ASAP), 同时淫羊藿苷组加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷进行干预, 对照组加入不含药物的载体溶液 (DMSO) $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组 12 个样本, 常规 3 d 换液 1 次。进行成骨性分化指标比较分析。

2.2.1 ALP 活性测定 在 24 孔板中, 分别于 rBMSCs 成骨性诱导培养及药物干预第 3, 6, 9, 12 天进行 ALP 活性测定。具体步骤按照碱性磷酸酶活性测试试剂盒说明书的操作方法进行, 即弃培养液, PBS 洗 2 遍, 每孔加入缓冲液和基质液各 0.2 mL, 混匀后 37 °C 水浴 15 min, 最后加入 0.6 mL 显色液, 显色后在紫外分光光度计上测定 507 nm 处吸光度 (A), 用酚标准做标准曲线并将其检测值换算为金氏单位。

2.2.2 矿化结节染色 于成骨性诱导培养及药物干预第 15 天, 采用茜素红染色法进行钙化结节的组织化学染色。弃培养液, PBS 洗 2 遍, 10% 甲醛固定 20 min。加入 0.1% 的茜素红-Tris-HCl 染色剂 (pH 8.9), 37 °C 孵育 1 h, 肉眼或镜下观察矿化结节

的形成情况。照相保存结果。

2.2.3 成骨性相关基因的表达 分别在成骨性诱导培养及药物干预 12, 24, 48, 72 h, 提取总 RNA, 采用 Real time PCR 方法分析检测 BMP-2 和 Runx-2 的 mRNA 表达水平。总 RNA 的提取采用 TRIzol 一步法, 紫外分光光度计检测浓度, 并用 1% 甲醛变性琼脂糖电泳检测其完整性, 调整总 RNA 的浓度至 500 ng·μL⁻¹, 取 2 μL 将其逆转录为 cDNA。逆转录体系、PCR 扩增体系及反应条件均参照试剂盒中的说明书设定, 以标本中所提取的高浓度 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为对照品, 经 10 倍梯度比例稀释后, 进行 PCR 反应制备标准曲线。反应结束后, 根据自动生成的标准曲线, 计算出待测样本中管家基因和目的基因的准确含量。以同一样本中, 目的基因与管家基因含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标。所用引物均委托大连宝生物公司根据 GenBank 所发布的序列设计并合成(表 1)。

表 1 引物设计序列

基因	引物序列	产物长度 /bp
BMP-2	Forward 5'-ACCGTGCTCAGCTTCCATCAC-3'	156
	Reverse 5'-TTCTCGCATTGTGCCGAAA-3'	
Runx-2	Forward 5'-GCACCCAGCCATAATAGA-3'	165
	Reverse 5'-TTGAGCAAGGAGAACCC-3'	
PPARγ	Reverse 5'-TGAAGGCTCATATCTGTCTCCG-3'	176
	Reverse 5'-CATCGAGGACATCCAAGACAAC-3'	
C/EBPα	Forward 5'-GATAAGAACAGCAACGACTACC-3'	135
	Reverse 5'-GCGGTCATTGTCACTGGTC-3'	
GAPDH	Forward 5'-TATCGGACGCTGGTTAC-3'	140
	Reverse 5'-CTGTGCCGTTGAACCTGC-3'	

2.3 成脂性分化分析 采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成脂性分化, 观察淫羊藿苷对 rBMSCs 成脂性分化的影响。将原代细胞分为 2 组, 淫羊藿苷组和对照组。待细胞接近融合时更换诱导性培养基(地塞米松 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胰岛素 $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、吡啶美辛 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时淫羊藿苷组加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷进行干预, 对照组加入不含药物的载体溶液(DMSO) $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 常规 3 d 换液 1 次。进行成脂性分化指标比较分析。

2.3.1 甘油三酯含量的测定 以 1×10^4 个/mL 的密度接种细胞于 6 孔板内, 每孔加培养液 2.5 mL, 于 rBMSCs 成脂性诱导培养及药物干预第 5, 10, 15, 20 天进行甘油三酯含量的测定。具体步骤按照甘

油三酯试剂盒说明书的操作方法进行, 即弃培养液, PBS 洗 2 遍后加入 1 mL PBS, 用细胞刮器收集各孔贴壁的细胞, 置入 EP 管中, 采用反复冻融法裂解细胞, 以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 10 μL, 然后加入试剂 I 和试剂 II (4:1) 混匀, 37 °C 水浴 10 min, 在紫外分光光度计上测定 505 nm 处 A。

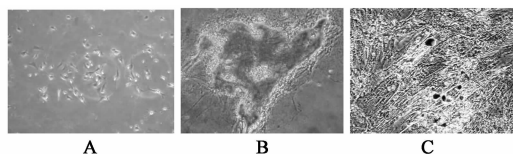
2.3.2 油红 O 染色 于成脂性诱导培养及药物干预第 21 天, 采用油红 O 染色法进行脂滴的组织化学染色。弃培养液, PBS 洗两遍, 10 % 甲醛固定 20 min。加入稀释的油红储存液(油红: 去离子水 3:2, 滤纸过滤, 室温放置 10 min), 37 °C 孵育 1 h。用 75 % 乙醇漂洗两遍, 除去多余的染料, 苏木染色 5 min, PBS 漂洗。镜下观察脂滴的形成情况, 照相保存结果。

2.3.3 成脂性相关基因的表达 分别在成脂性诱导培养及药物干预后 12, 24, 48, 72 h, 提取总 RNA, 采用 2.2.3 所述方法分析检测 PPARγ 和 C/EBPα 的 mRNA 表达水平。所用引物均委托大连宝生物公司根据 GenBank 所发布的序列设计并合成(表 1)。

2.4 统计学方法 测定结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 rBMSCs 细胞形态及鉴定 rBMSCs 培养 10 ~ 12 h 出现贴壁细胞, 48 h 后呈长梭状成纤维细胞样形态; 原代培养第 4 天, 贴壁细胞开始增殖, 形成细胞克隆单位(colony forming unit-fibroblast, CFU); 成骨性诱导培养第 15 天, 茜素红染色镜下观察钙化结节形成; 成脂性诱导培养第 20 天, 油红 O 染色镜下观察脂滴形成。综上观察鉴定, 表明分离培养的细胞具有成骨和成脂多向分化潜能, 可以认为实验中分离培养的细胞为 rBMSCs。



A. rBMSCs 形成的细胞克隆单位; B. 钙化结节的茜素红染色;
C. 脂滴的油红 O 染色

图 1 rBMSCs 细胞形态的鉴定(100 ×)

3.2 ALP 活性的测定 如表 2 所示, rBMSCs 成骨性诱导培养后, 对照组和淫羊藿苷组在第 3 天至第 12 天中随时间的递增 ALP 活性逐渐增强, 尤其第 6 天至第 9 天增强最明显。从成骨性诱导第 3 天开

表 2 两组各时间点 ALP 活性比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)nmol·(15min)⁻¹·mg⁻¹

组别	浓度/mol·L ⁻¹	ALP			
		3 d	6 d	9 d	12 d
对照	-	1.643 ± 0.117	2.284 ± 0.184	3.524 ± 0.221	4.877 ± 0.371
淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	2.296 ± 0.139 ¹⁾	3.877 ± 0.207 ²⁾	7.453 ± 0.598 ²⁾	8.336 ± 0.933 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

始,淫羊藿苷组在各时间点的 ALP 活性均高于对照组 ($P < 0.05$),其中第 9 天差距最显著 ($P < 0.01$)。

3.3 矿化结节染色 rBMSCs 成骨性诱导培养 15 d 后,茜素红组化染色结果表明,钙化结节染色结果呈阳性,淫羊藿苷组的钙化结节数目及其所占皿底的表面积明显高于对照组。将采集的矿化结节染色图片采用图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行扫描分析,淫羊藿苷组矿化结节的面积和数量为 (13.77 ± 1.67) mm²/皿和 (118.53 ± 11.59) CFU-F_M/皿,而对照组分别为 (6.74 ± 1.33) mm²/皿和 (67.44 ± 8.29) CFU-F_M/皿,淫羊藿苷组矿化结节的面积和数量均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

3.4 甘油三酯含量的测定 如表 3 所示,rBMSCs 成脂性诱导培养后,对照组和淫羊藿苷组在第 5 天至第 20 天中随时间的递增甘油三酯含量逐渐增强,尤其第 10 天至第 15 天增强最明显。从成脂性诱导第 5 天开始,淫羊藿苷组在各时间点的甘油三酯含量均低于对照组 ($P < 0.05$),其中第 15 天和第 20 天差距最显著 ($P < 0.01$)。

3.5 油红 O 染色 rBMSCs 成脂性诱导培养 21 d 后,油红 O 组化染色结果表明,脂滴染色结果呈阳性,淫羊藿苷组的脂滴数目及其所占视野的表面积

百分比明显低于对照组。将采集的脂滴染色图片采用图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行扫描分析,淫羊藿苷组脂滴的面积百分比和数量为 (18.8 ± 3.9)% 和 (147.6 ± 12.9) CFU-F_{LD},而对照组分别为 (35.8 ± 5.6)% 和 (265.9 ± 29.5) CFU-F_{LD},淫羊藿苷组脂滴的面积百分比和数量均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

3.6 相关基因表达 如表 4 所示,成骨性分化因子 BMP-2 mRNA 的表达在诱导后 12~72 h 持续上升,并且在各时间点淫羊藿苷组的 BMP-2 mRNA 的表达量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。成骨性转录因子 Runx-2 mRNA 在诱导培养 24 h 后达到最高值,随后迅速下降;除 72 h 外淫羊藿苷组的 Runx-2 mRNA 表达水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。成脂转录因子 PPAR γ mRNA 在诱导培养 12~72 h 持续上升,并且在各时间点淫羊藿苷组的 PPAR γ mRNA 的表达量明显低于对照组 ($P < 0.05$),其中 48,72 h 差异最为显著 ($P < 0.01$)。成脂转录因子 C/EBP α mRNA 在诱导培养 12~72 h 持续上升,除 12 h 外淫羊藿苷组的 C/EBP α mRNA 的表达量明显低于对照组 ($P < 0.05$),其中 48,72 h 差异最为显著 ($P < 0.01$)。

表 3 两组各时间点甘油三酯含量比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

A

组别	浓度/mol·L ⁻¹	TG			
		5 d	10 d	15 d	20 d
对照	-	0.121 ± 0.011	0.185 ± 0.012	0.383 ± 0.027	0.449 ± 0.031
淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	0.102 ± 0.009 ¹⁾	0.154 ± 0.015 ¹⁾	0.217 ± 0.019 ²⁾	0.279 ± 0.022 ²⁾

表 4 两组中相关基因 mRNA 在各时间点的相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 12$)

mRNA 名称	组别	浓度 /mol·L ⁻¹	各时间点 mRNA 的相对表达量			
			12 h	24 h	48 h	72 h
BMP-2	对照	-	1.042 ± 0.112	1.329 ± 0.104	1.671 ± 0.128	1.886 ± 0.149
	淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	1.565 ± 0.129 ²⁾	2.164 ± 0.162 ²⁾	2.942 ± 0.201 ²⁾	3.432 ± 0.237 ²⁾
Runx-2	对照	-	0.637 ± 0.043	1.099 ± 0.083	0.611 ± 0.037	0.297 ± 0.014
	淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	1.452 ± 0.129 ²⁾	2.575 ± 0.174 ²⁾	1.194 ± 0.081 ²⁾	0.391 ± 0.029
PPAR γ	对照	-	1.032 ± 0.074	1.438 ± 0.104	2.029 ± 0.182	3.384 ± 0.281
	淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	0.827 ± 0.043 ¹⁾	1.130 ± 0.079 ¹⁾	1.436 ± 0.119 ²⁾	1.839 ± 0.145 ²⁾
C/EBP α	对照	-	0.692 ± 0.054	1.112 ± 0.087	1.336 ± 0.102	1.716 ± 0.139
	淫羊藿苷	1 × 10 ⁻⁵	0.642 ± 0.043	0.871 ± 0.056 ¹⁾	1.004 ± 0.078 ²⁾	1.212 ± 0.091 ²⁾

4 讨论

随着人口的不断增长和老年化社会的到来,骨质疏松症及其所引起的骨折已成为严重危害人类健康的世界性公共卫生问题。近年来,随着对 BMSCs 研究的逐渐深入, BMSCs 在骨质疏松症的发生中发挥的作用日益引起高度的重视^[6-7]。BMSCs 作为成骨细胞前体的主要来源,其向成骨细胞分化能力的减弱或向脂肪细胞分化能力的增强是导致骨质疏松症的原因之一^[8]。因此,在研究骨质疏松症的发病机制或进行抗骨质疏松新药研究时,我们就必须考虑对 BMSCs 成骨和成脂方向分化的作用研究。

淫羊藿苷(icariin, ICA)是中草药淫羊藿的主要化学成分,属黄酮类化合物。我们前期已经研究发现 ICA 可抑制体外培养破骨细胞的骨吸收活性,促进成骨细胞的成熟分化,具有抗骨质疏松症的生理活性^[9]。本实验以 ICA 和 rBMSCs 为研究对象,从 rBMSCs 的成骨性分化和成脂性分化两个方面分别来研究 ICA 抗骨质疏松症的药物机理。首先采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成骨性分化,观察淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨性分化的影响。结果发现淫羊藿苷显著提高了成骨细胞标志酶碱性磷酸酶(ALP)的活性,增加了钙化结节数,并且升高了成骨性相关因子 BMP-2 和成骨性转录因子 Runx-2 的基因表达量。其次采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷干预 rBMSCs 的成脂性分化,观察淫羊藿苷对 rBMSCs 成脂性分化的影响。结果发现淫羊藿苷降低了脂肪细胞中的主要成分甘油三酯的含量,减少了脂肪细胞中脂滴的形成,并且减弱了成脂转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的基因表达量。最后通过淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨和成脂的影响研究,判断淫羊藿苷对 rBMSCs 分化的调节有双向性,即它在促进 rBMSCs 成骨性分化的同时又在抑制 rBMSCs 成脂分化。

近年来有研究报道 BMSCs 作为一种具有多向分化潜力的干细胞,其 Wnt 信号通路的激活可以促进成骨细胞分化转录因子 Runx-2, Dlx5 和 osterix 的表达,抑制脂肪分化转录因子 C/EBP α 和 PPAR γ 的表达^[10-11]。淫羊藿苷对 BMSCs 分化的双向性调节是否与 Wnt 信号通路有关是下一步实验的研究重

点,更深入的药物分子机制研究有助于为临床开发绝经后骨质疏松症防治的新药提供了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Backesjo C M, Li Y, Lindgren U, et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(7): 993.
- [2] 李湘辉, 陆志坚, 张金超, 等. 阿伦磷酸钠对小鼠骨髓基质细胞成骨和成脂分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(6): 671.
- [3] 庞婷婷, 崔燎. 骨髓基质干细胞成脂分化的调控及其对骨质疏松的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 9(13): 675.
- [4] Hui-Ping Ma, Lei-Guo Ming, Bao-Feng Ge, et al. Icariin is more potent than Genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization *in vitro* [J]. J Cell Biochem, 2011(112): 916.
- [5] Chen K M, Ge B F, Liu X Y, et al. Icariin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture [J]. Pharmazie, 2006, 62(5): 388.
- [6] 李良, 李冬菊, 吴江, 等. 骨髓间充质干细胞在去卵巢大鼠骨质疏松发病机理中潜在的作用[J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(1): 129.
- [7] 王洪复. 骨质疏松症药效研究方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 171.
- [8] Xu D H, Yang W, Zhou C H, et al. Inhibitory effect of berberine on differentiation of rat bonemarrow mesenchymal stem cells to adipocytes [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2011, 25(1): 1.
- [9] 明磊国, 陈克明, 葛宝丰, 等. 淫羊藿苷与染料木黄酮对体外培养成骨细胞增殖及矿化成熟影响的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16): 2240.
- [9] 章艳, 肖楚瑶, 丁月, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在治疗骨质疏松中的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(12): 917.
- [10] Bennett C N, Longo K A, Wright W S, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b [J]. Proc Natl Acad, 2005, 102(9): 3324.

[责任编辑 聂淑琴]