

左归丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶含量的影响

徐凌霄¹, 高俊², 张前德^{1*}

(1. 南京医科大学第一临床医学院, 南京 210029; 2. 常州中医院骨伤科, 江苏常州 213000)

[摘要] 目的: 研究左归丸含药血清对间充质干细胞骨向分化过程中碱性磷酸酶含量变化的影响。方法: 采用全骨髓贴壁法培养间充质干细胞, 连续进行 3 次差速贴壁法纯化间充质干细胞。常规诱导组以 β -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C 诱导间充质干细胞骨向分化, 实验组在常规诱导组基础上加以左归丸含药血清。使用茜素红染色钙结节、碱性磷酸酶染色鉴定诱导成功。分别在 0, 7, 14, 21 d 用比色法检测细胞中碱性磷酸酶含量。结果: 全骨髓贴壁法和差速贴壁法联合使用可得到较为均一间充质干细胞。用比色法测得碱性磷酸酶含量随着诱导时间延长而增加。结论: 大鼠间充质干细胞经药物诱导后可以分化为成骨细胞。左归丸含药血清能够促使诱导过程中碱性磷酸酶含量表达增加。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 左归丸含药血清; 成骨细胞; 碱性磷酸酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0149-04

Effect of Zuogui Pill Medicated Serum on Level of Alkaline Phosphatase During Differentiation from Rat Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblasts

XU Ling-xiao¹, GAO Jun², ZHANG Qian-de^{1*}

(1. The First Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

2. Department of Orthopedics, Changzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changzhou 213000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the change of ALPase during the differentiation from rat marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts induced by Zuogui Pill medicated serum. **Method:** The method of adherent culture was used to culture marrow mesenchymal stem cells and then consecutively to purify mesenchymal stem cells. In conventional induction group, β -glycerophosphate, dexamethasone and vitamin C was used to induce mesenchymal stem cell to differentiate into osteoblasts. In the experimental group, on the basis of conventional induction Zuogui Pill was applied to get the medicated serum. Alizarin red staining was used for showing calcium nodules and alkaline phosphatase staining was used to identify the successful induction. On the 0, 7th, 14th and 21st day a colorimetric assay of alkaline phosphatase was carried out respectively. **Result:** Whole bone marrow adherent method combined with differential adhesion method could get the purified mesenchymal stem cells. Alkaline phosphatase measured by colorimetry increased with the prolongation of induction, and the induction by the medicated serum was more significant. **Conclousin:** Rat mesenchymal stem cells could differentiate into osteoblasts when induced by drugs. Zuogui Pill medicated serum could promote the express of alkaline phosphatase.

[Key words] mesenchymal stem cells; Zuogui Pill medicated serum; osteoblasts; alkaline phosphatase

[收稿日期] 20100825(003)

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20093237110005); 国家自然科学基金青年基金(30701129); 国家中医药局青年科学基金(06-07JQ06)

[通讯作者] * 张前德, 博士生导师, Tel: 025-86862611, E-mail: zhangqiande@njmu.edu.cn

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是指具有一定自我更新能力,并能产生大量分化子代细胞的细胞^[1],具有高度自我更新能力和多向分化潜能,在一定诱导条件下能向软骨细胞、骨细胞等分化^[2]。MSCs 主要存在于骨髓中,这与中医学关于“精生髓,髓养骨”的含义有一定相似性,在中医学理论中,来源于先天肾精的充盈与否影响着骨的生长、发育、壮健及损伤修复,而 MSCs 因具有向骨分化的潜能已成为目前研究的热点^[3]。因此,“肾主骨”与“MSCs 分化成骨”的相似之处提示我们,两者之间存在着紧密的关系,有待进一步去探讨。根据祖国医学“肾藏精,主骨生髓”的理论,我们通过观察补肾益精代表方左归丸诱导 MSCs 骨向分化过程中重要标记碱性磷酸酶变化的影响,为今后进一步阐述“肾主骨”分子机制和从中药中寻找骨关节病保护剂奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,4 周龄,体重(100 ± 20)g,雌雄各半,分离间充质干细胞;SD 大鼠,SPF 级,8 周龄,体重(250 ± 20)g,制备大鼠血清,上述动物由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物许可证号 SCXK(军)2007-004,合格证号 0030626。

1.2 仪器设备 培养皿、培养板由美国 Corning 公司提供,3111 型 CO₂ 恒温培养箱由美国 Thermo 公司提供,CKX41 倒置相差显微镜由日本 Olympus 公司提供,EL-808 酶联免疫检测仪由美国 BIO-TEK Instruments 公司提供,Sterilgard advance 生物安全操作台,由美国 Baker 公司提供。

1.3 培养液及试剂 DMEM/F12 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司(批号分别为 715082, 619559, 753335);CCK-8 试剂盒为 Keyken 公司产品,碱性磷酸酶染液试剂盒,购自南京建成公司,批号 20091022;地塞米松、维生素 C 注射液购于南京金陵药业,批号 10041103,100804; β -甘油磷酸钠购于美国 Biosharp 公司,批号 2011/08。

2 方法

2.1 左归丸汤液的制备 熟地黄 24 g,山药 12 g,枸杞子 12 g,山萸肉 12 g,牛膝 9 g,菟丝子 12 g,龟板胶 12 g,鹿角胶 12 g,由江苏省中医院药剂科提供。以上中药加入 20 倍量的水煎煮两次,每次 1.5 h。过滤,蒸发浓缩成 1 g·mL⁻¹ 备用。

2.2 含药血清的制备及分组 选用成年 SD 大鼠 20 只,随机分为 2 组,分为常规剂量组和空白组,每组 10 只。根据大鼠与人体表面积换算,常规剂量组用中药 9.5 g·kg⁻¹ig。ig 方法采用李仪奎的通法^[4],具体为:分早晚 2 次 ig,连续 ig 3 d,于第 3 天末次 ig 1 h 后戊巴比妥钠麻醉、颈主动脉取血,离心,无菌分离血清,经 56 °C,30 min 水浴灭活补体后,用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,置 -20 °C 保存备用。空白组用 9.5 g·kg⁻¹生理盐水 ig,ig 及取血方法同中药组。

2.3 间充质干细胞分离、培养

2.3.1 MSCs 分离及传代培养 大鼠脱颈处死,75% 乙醇全鼠浸泡 10 min,无菌条件下取股骨及胫骨,显露骨髓腔。用 PBS 冲洗骨髓腔冲出骨髓,收集混悬液,离心弃上清液,然后用含有 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液吹打制成骨髓单细胞悬液。将骨髓单细胞直接接种于培养皿中,置 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。于 24 h 全量更换培养液,标记为原代(Passage, P₀),以后每 4 d 换液 1 次,换液后于显微镜下观察细胞生长情况和形态特征。约 10 d, MSCs 铺满培养瓶底面积达 80%,用含有 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化传代培养,直到贴壁细胞接近融合,再重复上述操作,反复传代扩增,并标记为 P₁ ~ P₃ 代等。取 P₃ 代细胞,消化传代后接种在 96 孔板中,接种密度 1 × 10⁴ 个细胞/cm²。

2.3.2 MSCs 的形态学观察 自原代培养开始用倒置显微镜动态观察 MSCs 的生长过程。

2.4 CCK-8 法测定 MSC 增殖 选用生长状态良好的第 3 代细胞,收集单细胞悬液,调整细胞密度以 1 × 10⁴ 个/mL 接种于 96 孔培养板上,每孔细胞数目约 1 000 个(即每孔约 0.1 mL),分别加入 100 μ L 基础培养液(无胎牛血清)饥饿培养,使细胞初步同步化,标记后置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育,分别在第 1 到 7 天每孔加入 10 μ L CCK8 试剂,37 °C 继续孵育 4 h 终止培养,选择 490 nm 波长,在酶标仪上测各孔吸光度(A),结果以 A₄₉₀ 表示细胞增殖水平,每组 6 复孔,试验重复 3 次。以未接种细胞的孔作为调零孔,记录结果。

2.5 成骨细胞诱导培养及鉴定

2.5.1 成骨细胞诱导培养 取第 3 代培养细胞,以 1 × 10⁴ /mL 接种于放有盖玻片的 6 孔培养板,共 12 个孔。培养细胞达 80% ~ 90% 融合时,改换成骨细

胞分化培养液,成骨细胞分化培养液含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸钠、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C 和 $100 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 双抗、 $100 \text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 胎牛血清。左归丸含药血清组添加含药血清,血清浓度为 10%,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育,每 3 天换液 1 次。

2.5.2 成骨细胞鉴定

2.5.2.1 碱性磷酸酶活性测定 取生长良好的第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞,加入成骨诱导液连续培养 21 d,取出长有细胞的盖玻片,用碱性磷酸酶试剂盒测定碱性磷酸酶表达情况。

2.5.2.2 矿化结节形成检测 取生长良好的第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞,加入成骨诱导液连续培养 21 d,取出长有细胞的盖玻片,加入 0.1% 茜素红染色,观察矿化结节形成情况。

2.6 比色法测定细胞分化中碱性磷酸酶的含量

取第 3 代培养细胞,以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 24 孔培养板,每孔接种细胞悬液 1 mL,共 48 孔。24 孔加经典成骨细胞分化诱导培养液,另 24 孔以左归丸含药血清联合经典诱导液。分别于 0,7,14,21 d,每次实验组和对照组各取 6 孔,用 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次。每孔细胞加 1 mL PBS,于 200 W 超声波破碎仪上处理 3 次,每次 60 s,间隔 5 min。离心后取上清液测碱性磷酸酶含量 (A_{405})。

2.7 统计学处理 用 SPSS 11.0 对结果进行统计和分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学观察 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。3 d 后,细胞发生明显变化,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。我们采取差速贴壁法,以 MSC 优势生长为主,细胞可逐渐纯化。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。

3.2 CCK-8 法测定大鼠间充质干细胞生长曲线 分别在 0 至 7 d 检测细胞的吸光度 (A),每天检测 6 孔细胞,其数值按 1 ~ 7 d A 依次为 0.204 ± 0.007 , 0.203 ± 0.010 , 0.242 ± 0.014 , 0.252 ± 0.007 , 0.288 ± 0.017 , 0.304 ± 0.012 , 0.301 ± 0.018 。其回归方程 $Y = 0.0192X + 0.1796$, $R^2 = 0.9371$ 。

3.3 MSCs 成骨诱导后钙结节及碱性磷酸酶染色鉴定 MSCs 经过常规诱导 21 d 后行茜素红钙结节染色以及碱性磷酸酶染色鉴定,分别可见圆形不透明的钙化结节(图 1A)和细胞呈多角形,胞浆见大量暗红色颗粒(图 1B),成典型的成骨细胞形态。

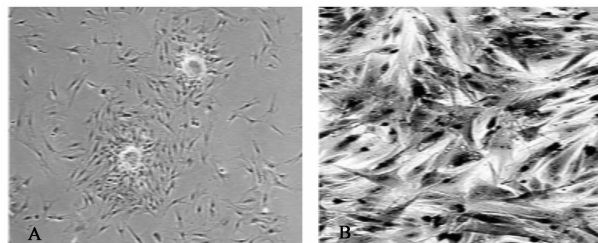


图 1 MSCs 成骨诱导后钙结节及碱性磷酸酶染色
A. 钙结节(茜素红染色,10 \times);B. 碱性磷酸酶染色(20 \times)

3.4 比色法测定分化中细胞碱性磷酸酶的含量 在 0,7,14,21 d 用比色法测得各组细胞碱性磷酸酶含量 (A_{405}),如表 1 所示。

表 1 比色法检测细胞碱性磷酸酶含量

组别	碱性磷酸酶含量 (A_{405})			
	0 d	7 d	14 d	21 d
空白	0.198 ± 0.008	0.201 ± 0.032	0.212 ± 0.021	0.223 ± 0.011
10% 含药血清	0.208 ± 0.013	$0.245 \pm 0.021^{1)}$	$0.308 \pm 0.014^{1,2)}$	$0.306 \pm 0.012^{1,2)}$
常规诱导	0.207 ± 0.038	$0.232 \pm 0.012^{1)}$	$0.248 \pm 0.014^{1)}$	$0.275 \pm 0.012^{1)}$

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$,与常规诱导组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

成骨髓来源的间充质干细胞具有高度可塑性而且来源广泛,易于在体外扩增,逐渐成为研究的重点。有实验表明^[5-6],在特定的诱导条件下,骨髓间

充质干细胞可以分化为间充质组织中的各类细胞,包括成骨、软骨、脂肪、肌腱和韧带等细胞。Maniatopoulos 等^[7]早在 1988 年就认为 MSCs 可分成确定性骨祖细胞,它能自发分化为成骨细胞,只占

很小部分;其余为诱导性骨祖细胞,鉴于骨髓间充质干细胞具有定向成骨细胞分化的潜能,间充质干细胞已成为人工骨材料的主要来源之一。但是 MSCs 不能自发形成骨组织,必须在诱导物的作用下才能成骨。目前已发现培养基中具有明确成骨作用的基本辅剂为地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C^[8];其中每种成分对 MSCs 的增殖分化都起到一定作用:①地塞米松可促进 MSCs 向成骨细胞分化,刺激其碱性磷酸酶的活性,使骨钙素、骨涎蛋白和骨胶蛋白的合成明显增加;② β -甘油磷酸钠可提供磷离子作为碱性磷酸酶的底物,促进有机磷向无机磷转化,加速生理性钙盐沉积,使钙结节增多;③维生素 C 促进体外培养细胞合成 I 型胶原,并调节碱性磷酸酶活性。碱性磷酸酶活性的提高是 MSCs 向成骨细胞分化的重要标志^[9],也是参与骨钙化的重要蛋白之一。成骨细胞可通过基质小泡释放钙离子和碱性磷酸酶等物质,钙离子在碱性磷酸酶作用下沉积在胶原上,完成基质矿化过程^[10]。从我们的实验中,我们发现在诱导后第 7 天开始两组的碱性磷酸酶含量均明显提高,其中含药血清组在第 14, 21 天升高均较常规诱导组明显,提示含药血清组对 MSCs 骨向转化有一定的刺激作用,能够促使这一过程发生。

左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,由熟地黄八两、山药炒四两、枸杞四两、山茱萸四两、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,方中配伍合理,君臣佐使搭配合理,共收滋阴补肾、填精益髓、强筋健骨之功,是中医补肾益精法经典代表方,在“肾主骨”理论指导下,也是治疗骨性关节炎主要方剂。我们实验利用田代真一教授提出“药物血清”的概念^[11]。以含药血清为平台,研究补肾益精代表方左归丸对骨髓 MSCs 骨向分化过程中碱性磷酸酶的变化,结果表明,左归丸含药血清能够促使 MSCs 骨向分化中碱性磷酸酶表达。碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞表面标志酶,随着成骨分化程度的增加,碱性磷酸酶表达增强。初步推断左归丸通过这样途径来促进骨形成以及骨代谢,不过需要指出的是,以补肾益精立法治疗骨性关节炎的机制是非常复杂的,本实验只是对其中的一个环节进行了探讨,有关其作用机制还有待于进一步深入研究。

干细胞的理论和技术是当今生命科学的前沿课题,“肾主骨”理论是中医学中藏象学说的核心理论之一,两者均是目前研究的热点,在两者的结合点上,我们的研究表明,左归丸含药血清对 MSCs 骨向分化有明显的促进作用,提示我们下一步的研究思路做进一步深入。这样,不仅为丰富中医藏象学说提供重要理论基础,而且可以更为科学的解释中医“肾主骨”理论依据。

[参考文献]

- [1] McKay R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309): 66.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143.
- [3] Modino S, Sharpe P T. Tissue engineering of teeth using adult stem cells[J]. Archives of Oral Biology, 2005, 50(2): 255.
- [4] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569.
- [5] Wagers A J, Weissman I L. Plasticity of adult stem cells[J]. Cell, 2004, 116(5): 639.
- [6] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5309): 71.
- [7] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. Cell Tissue Res, 1988, 254(2): 317.
- [8] Bruder S P, Jaiswal N, Haynesworth S E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation [J]. J Cellular Biochemistry, 1998, 64(2): 2784.
- [9] Abdallah B M, Jensen C H, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlx1/Pref-1[J]. J Bone Mineral Res, 2004, 19: 841.
- [10] White A, Lamb P W, Barrett J C. Frequent downregulation of the KAI1 (CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines [J]. Oncogene, 1998, 16(24): 3143.
- [11] 田代真一. 血清药理学. と“血清药化学”一汉方の药理学护がい始まつた药物血中浓度测定の新しい世界[J]. TDM 研究, 1988, 5: 54.

[责任编辑 聂淑琴]