

专家论坛

肾主骨生髓理论与骨髓间充质干细胞骨向分化

张荣华* 欧阳菁*

张荣华,男(1964~),医学博士,中国中医研究院中西医结合博士后,教授、主任医师、博士生导师。历任暨南大学附属第一医院中医科主任,暨南大学医学院中医学教研室副主任、主任、中医学系副主任,擅长用中医药、中西医结合方法治疗老年病、慢性病、出血性疾病和身心疾病等。主要从事老年疾病防治的中药研究,中药药理学及现代中药研究和生物信号系统与药物干预研究。先后承担国家自然科学基金项目1项,省部级课题6项;发表学术论文70余篇,参与编写出版专著6部。

主题词 肾(中医)/生理学 骨髓细胞/病理学 @ 肾主骨

骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MSCs)具有向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、神经细胞、腱细胞等多个胚层细胞的分化潜能,同时具有增殖能力,是一种较为理想的种子细胞。故而MSCs在组织工程、细胞因子替代治疗、基因治疗以及再生医学等方面的应用越来越广泛。人们逐步认识到,体内骨髓的成骨能力可能来源于骨髓基质系统中的间充质干细胞。本文试对中医“肾主骨生髓”理论与MSCs增殖及骨向分化理论进行分析,以期为肾本质及补肾中药研究探讨一种思路,请同道斧正。

1 从基础理论分析肾主骨生髓与MSCs骨向分化

中医学认为,肾藏精,主骨生髓,髓藏于骨腔内,滋养骨骼,骨的生长发育依赖肾气的滋养与推动。如《素问·阴阳应象大论》曰:“肾主骨髓”,“在体为骨”。《素问·上古天真论》指出:“女子七岁,肾气盛,齿更发长;二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下;……四七,筋骨坚,发长极,身体盛壮;……七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”“丈夫八岁,肾气实,发长齿更;二八,肾气盛,天癸至……;四八,筋骨隆盛,肌肉满壮,……;七八,天癸竭,精少,肾藏衰,形体皆极。”意谓儿童时期,随着肾中精气的逐渐充盛,人体出现“齿更”等生长发育的现象。当精气充盈到一定程度,产生了名为“天癸”的精微物质,性器官成

熟,进而具备生殖能力,进入青春期。在青壮年阶段,肾中精气充盛,则骨坚且隆盛,肌肉壮满,身体盛壮。中年之后,随着肾中精气的逐渐衰少,性机能及生殖能力逐渐衰退,形体也衰弱而步入老年阶段。这段论述明确阐述了人的生殖能力和生长发育及衰老过程主要由肾中精气的盛衰来决定,故肾中精气的盛衰能够决定骨骼的强弱,影响骨的代谢。肾精充实,则骨髓化生有源,骨骼坚固,强健有力;肾精虚弱,则骨髓乏源,骨骼失养,脆弱无力。《素问·痿论》曰:“肾气热则腰不举,骨枯而髓减,发为骨痿。”中医认为,骨质疏松等骨病的病因病机主要是由于各种病因及年老而致的肾精不足,不能充骨养髓,骨骼失养所致。

MSCs是存在于骨髓中的一类多能干细胞,在一定诱导条件下具有向成骨细胞、成软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞、神经细胞、腱细胞等多个胚层细胞尤其是骨向分化的能力,其作为骨组织工程的种子细胞用于治疗骨相关疾病及作为载体用于基因治疗显示出广阔的前景。在适当的条件下体外培养, MSCs能贴附在塑料培养器皿壁上生长,迅速增殖,具有强大的体外扩增能力。1997年Bruder等^[1]报道,人骨髓MSCs的原代培养先有一个生长迟缓期,然后是对数生长期,最后达到最高生长速率,成人的MSCs可以在体外分裂(38 ± 4)次,并且维持纺锤形态不衰竭,并一直保持良好的成骨活性。进一步研究发现,经细胞周期检测约10%处于S期、G₂期和M期,其余90%处于G₀期、G₁期,说明了MSCs具有高分化潜能。Pittenger^[2]研究小组用从只有一个细胞来源的骨髓间充质干细胞进行了如下实验:将peccoll分离的人骨髓细胞定量接种到培养皿中,24小时后鉴定单个贴壁细胞,并将该细胞生成的30~50个左右的克隆,用0.25%的胰酶消化后大量扩增,进行骨、软骨及脂肪的定向分化,流式细胞仪鉴定表明,新生克隆与之前分离的骨髓间充质干细胞有共同的表面抗原分子。所选的6个克隆都可向骨分化,5个能向软骨分化,2个能向脂肪分化。这充分说明了骨髓间充质干细胞有多向分化的潜能。MSCs骨向分化路线可简示为, MSCs→骨祖细胞→前成骨细胞→成骨细胞→成熟骨细胞。在儿童时期,骨骼的发育正是处于生长活

基金项目:国家自然科学基金(30472274);广东省自然科学基金(04105837)

* 暨南大学药学院,广东省广州市黄埔大道西601号
(510632)

收稿日期:2006-03-10

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

跃期, MSCs 不断分化成骨促进骨骼的生长发育; 在成年机体内, 生理稳态的情况下大多数 MSCs 并不增殖。随着年龄的增加, MSCs 的细胞数量逐渐减少^[3], 其分化能力和生物学功能均降低, 尤其是骨向分化减少而脂肪细胞生成增多, 这可能是导致老年性骨质疏松症发生的重要机制之一。正如 Siggekow H^[4]所说, 随着年龄的增长, 骨组织不断丢失, 骨髓腔扩大, 局部成骨细胞减少, 而脂肪细胞大量增加。其原因可能是成骨细胞前体的分化受到干扰, 使成骨细胞和脂肪细胞的比例受到干扰而发生偏差, 分化为成骨细胞的数量减少, 脂肪细胞的数量增多。宋纯理^[5]也提出脂肪细胞过剩可能是骨质疏松发病的机理之一。即各种导致骨质疏松的原因通过一定的机理导致 MSCs 分化为成骨细胞减少, 而脂肪细胞的分化增加; 脂肪细胞刺激更多的造血干细胞分化为破骨细胞, 既而引起成骨细胞——破骨细胞的偶联失衡, 最终导致骨丢失、骨质疏松。这与《内经》阐述的肾主骨生髓理论描述颇多一致之处。

2 从临床研究分析肾主骨生髓与 MSCs 骨向分化

正如前文提到的骨质疏松症是以骨量减少、骨微观结构退化、骨脆性增加和易发生骨折的一种全身性疾病, 多发于绝经后妇女、老人和多种慢性疾病患者, 根据其临床表现属中医“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”、“骨极”等疾病范畴, 多因肾精亏虚导致的骨髓和气血生化不足, 骨失髓血的充养所致, 同时伴有脾虚及血瘀的病理基础。临床上根据肾主骨生髓而采用补肾为主的治法可取得较好疗效。

针对绝经后妇女和老年人“多虚多瘀”的生理病理特点, 我们对具有补肾壮骨生髓、活血通络止痛作用的纯中药复方制剂益骨胶囊进行了为期 6 个月的前瞻性、随机双盲、安慰剂对照和阳性药对照的临床研究^[6]。210 例确诊的绝经后骨质疏松 (PMO) 患者分为治疗组、骨化醇组和安慰剂组, 3 组患者均日服等量的元素钙, 同时分别服用益骨胶囊、骨化醇胶囊、安慰剂胶囊, 观察新发骨折及骨痛等临床症状、第 2~4 腰椎及股骨上段骨密度 (BMD)、(血、尿) 骨代谢指标、性激素水平以及不良反应情况等。研究结果显示, 治疗组总有效率为 95.5%, 未见新发骨折, 明显优于骨化醇组和安慰剂组 ($P < 0.05$); 治疗组骨密度增加在第 2~4 腰椎为 9.83%, 在股骨颈为 4.09%, 在 Wards 区为 4.60%, 在股骨大转子为 3.00%, 均高于安慰剂组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其骨代谢相关指标治疗组与安慰剂组比较: 尿羟脯氨酸/肌酐、尿钙/肌酐有明显下降 ($P < 0.01$), 血清碱性磷酸酶、骨碱性磷酸酶、骨钙素有明显升高, 雌二醇明显上升 ($P < 0.05$), 睾酮无变

化, 雌二醇/睾酮显著上升 ($P < 0.01$), 观察期间未见可能相关的毒副反应。说明补肾活血的益骨胶囊既可以促进骨形成, 又可以抑制骨吸收, 能够有效治疗 PMO。肖建德^[7]也认为, 绝经后妇女因卵巢功能低下、雌激素明显减少, 发生骨质疏松, 与中医肾虚有关, 应用具有补肾壮骨、养血滋阴作用的龟丝补骨片对绝经后早期妇女性激素和钙调节激素进行了观察, 发现龟丝补骨片具有类似雌激素样作用, 能够促进钙代谢、调整钙, 调节激素, 从而防治骨质疏松症。蒋淑媛^[8]观察了 55 例原发性骨质疏松症患者 (入选标准: 骨密度值低于同一性别 1 个标准差, 没有合并症, 未经过治疗的骨量减少及骨质疏松症患者)。治疗组 25 例, 选有补肾填精作用的卫骨胶囊; 对照组 30 例, 选用维生素 D 加钙片。6 个月后复查, 治疗组骨密度值上升变化差异非常显著 ($P < 0.01$), 总有效率为 96% ($P < 0.01$), 其中显效率为 88%。而对照组的总有效率为 20%, 两组对比差异非常显著。陈丽仪^[9]在治疗绝经后骨质疏松中发现, 运用补肾壮阳取穴的针灸与钙剂的联合治疗效果要优于单纯性钙剂治疗。治疗组患者的骨密度及血清雌二醇水平提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而对照组无明显变化, 提示补肾壮阳取穴和钙剂联合使用具有温补脾肾、提高激素水平、延缓骨丢失的作用。

查阅近 10 年来的有关中医药防治骨质疏松症的文献报道, 通过统计复方中的用药规律发现, 选择用药紧紧围绕中医肾主骨生髓理论, 尤以使用淫羊藿、熟地黄、骨碎补、黄芪、补骨脂、龟甲、牛膝、杜仲、鹿角胶居多。补肾中药治疗骨质疏松具有较好效果, 其机理可能与复方或单味药物影响骨代谢及 MSCs 骨向分化有关, 实际上近年来基础研究在这方面已做了大量的探讨工作。

3 从实验研究分析肾主骨生髓与 MSCs 骨向分化

体内实验显示, 自体骨髓 MSCs 移植, 可有效促进新骨形成, 具有体内成骨能力。戚孟春等^[10]对 SD 大鼠行右侧下颌骨牵张后随机分为实验和对照 2 组, 实验组在牵张间隙内注射自体 MSCs, 而对照组只注射等量生理盐水, 分别于固定期第 2、4、8 周分 3 批处死大鼠, 经放射学和组织学观察表明, 2 组牵张间隙内均形成了骨痂组织, 但实验组新生骨组织显著多于对照组; 计量学分析显示, 各时间点实验组新生骨量和新生骨小梁宽度均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

近年实验研究显示, 补肾中药能有效刺激 MSCs 增殖并诱导其骨向分化, 促进骨形成, 改善骨代谢。研究显示, 补肾活血中药复方^[11]可剂量依赖性地提高去睾大鼠骨密度, 提高股骨的机械性能, 减少骨折发生

率,并可以使骨形成相关指标如血清和骨碱性磷酸酶、骨钙素明显升高,骨吸收相关指标如尿羟脯氨酸/肌酐、尿钙/肌酐等下降;补肾补骨汤^[12]对去卵巢SD雌鼠骨密度、骨形态计量学参数及I型胶原等的维持具有明显效果,用半定量RT-PCR方法检测显示,中药处理可明显地抑制破骨细胞分化因子的表达和促进护骨因子的表达。谈志龙用MTT法观察,补肾复方中药^[13](主要成分:杜仲、何首乌、淫羊藿、丹参、熟地黄)含药血清对大鼠成骨细胞体外培养在对数生长期第3~9天有明显促进作用。

接着看一下单味补肾中药。黎晖等^[14]用龟甲诱导SD大鼠的MSCs向成骨细胞分化,将第3代的MSCs分为龟甲组和对照组。对照组培养液为含10%FBS的培养液;龟甲组为含10%FBS的培养液和龟甲含药血清。7天后碱性磷酸酶的表达较对照组明显升高,Von Kossa染色阳性,说明有钙结节的形成,同时在第7,14,21,28天,用放免法测定细胞培养液中的BGP含量,在各个时点龟甲组的BGP均高于对照组($P < 0.01$)。贾正平等^[15]研究淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化,MTT法显示该含药血清可强烈刺激细胞增殖,并显著提高碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌量和钙盐沉积量。具有补肾强筋骨作用的巴戟天在体外可以诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化^[16],通过RT-PCR方法进行半定量分析核心结合因子a1(Cbfa1)的表达发现,巴戟天的水提物、巴戟天醇提物均能使Cbfa1的表达加强,促使骨髓基质细胞向成骨细胞分化。

由此可见,补肾填精中药有利于MSCs的增殖和骨向分化,使MSCs能够合理地成骨分化或者使脂肪化逆转并骨化,成骨细胞数量增多,功能活跃,促进骨的形成。此类研究从以药证效的角度阐释了肾主骨生髓理论与MSCs骨向分化的一致性。

4 展望

中医学肾主骨生髓理论与MSCs增殖分化的相关性,为中医学肾本质及补肾中药研究提供了新思路;同时为中药防治如骨质疏松类疾病的疗效机制研究奠定一定的理论基础,并为今后骨质疏松症的细胞学机制以及中药防治研究提供新思路;由于补肾中药具有诱导分化作用,通过筛选补肾中药干预体外培养的MSCs,寻找可能有效地促进增殖和诱导分化的药物,为体外大量扩增MSCs及组织工程提供更多的细胞来源,将具有重大理论价值和实践意义。

参考文献

1 Bruder SP, Jaisw N, Haynesworth SE. Growth Kinetics, self-renewal

- and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem, 1997, 64(2): 278~294.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284(5411): 143~147.
- Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. J Biomed Mater Res, 1999, 48(6): 913~927.
- Siggelkow H, Hufner M. Modulation der Osteoblastogenese: implication for pathophysiology of osteoporosis. Dtsch Med wchenschr, 1999, 124(1~2): 1~2.
- 宋纯礼, 党耕町. 髓腔内脂肪细胞与骨质疏松. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 266~269.
- Zhang Ronghua, Chen Keji, Lu Daxiang. A clinical study of Yigu capsule in treating postmenopausal osteoporosis. Chin J of Integr Med, 2005, 11(2): 97~103.
- 肖建德. 中药龟丝补肾片对绝经后早期妇女性激素和钙调节激素的影响. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 258~262.
- 蒋淑媛. 中药卫骨胶囊治疗骨质疏松症的临床观察. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 346~348.
- 陈丽仪. 温针对绝经后骨质疏松症骨密度的影响及疗效研究. 中国针灸, 2004, 24(11): 744~746.
- 戚孟春, 胡静. 骨髓间充质干细胞移植促进大鼠下颌骨牵张成骨的研究. 中国口腔颌面外科杂志, 2005, 3(2): 151~154.
- 张荣华, 陈可冀, 陆大祥, 等. 补肾活血液延缓雌性大鼠增龄性骨质疏松的研究. 中国病理生理杂志, 2001, 17(12): 1205~1207.
- 滕晓英, 王连唐. 补肾补骨汤治疗绝经后骨质疏松症的疗效及分子机制. 中国病理生理杂志, 2004, 20(11): 2005~2010.
- 谈志龙. MTT法观察补肾健骨汤对大鼠成骨细胞增殖的影响. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(1): 94~95.
- 黎晖, 周健洪, 陈东风, 等. 龟板对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 159~161.
- 贾正平, 张汝学, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 420~422.
- 王和鸣. 巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程Cbfa1表达的影响. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12(6): 22~26.

欢迎邮购

《现代中医内科临床疗效评价与进展》

《现代中医内科临床疗效评价与进展》由杨仓良等编著, 陕西科技出版社出版。该书全面系统地反映了建国以来中医治疗内科100余种病症的客观疗效与进展状况, 内容包括论述(叙述不同时期古代医案的学术成就)、辨证论治(采用现代医学病名, 以中医四诊八纲为中心, 并列举病症的典型临床表现、治法方药)、现代中医临床客观疗效评价与进展(系统搜集、整理建国以来中医治疗内科疾病处方用药, 应用现代医学数据检测治疗效果及治疗新方法、多途径用药、剂型改革、新成果进展状况加以评述)、临床资料(检索了全国公开发行的医学期刊治疗内科每一病症的最佳有效方药, 其诊断标准均以现代医学检测数据为准, 反映其治疗方法独特新颖, 治疗例数多, 疗效高, 可以重复验证, 具可靠的医学数据, 经统计处理的疗效最佳的病例报道)、现代医学诊治(对中医诊治疗效欠佳的病例, 应用现代医学诊治, 结合中医治疗以促进中医发展)等项目。被称为“开卷可识40载中医内科之最佳效方”, 是中医、中西医结合内科临床、科研及教学的重要参考书。

本书由宁夏秦杨疑难病研究院中医医书店总经销, 每册38元, 免收邮挂费, 凡购5~10本者按9折, 11~20本者8折, 21本以上者按7折优惠。同时还有《毒药本草》78元, 《动物本草》120元, 《华佗神医秘方》7元等书, 优惠方式同上。

邮购地址: 宁夏银川市金凤区满城南街20号宁夏秦杨疑难病研究院曹艳玲收, 邮编: 750000, 电话: (0951) 3069258。