

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.15.018

左归丸对骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因甲基化的影响

杨 锋^{1,2*}, 潘 乐², 马秋涛², 张 涛², 杨利学^{1,2}, 李彦民¹

(1. 陕西中医学院附属医院, 陕西省咸阳市渭阳西路副 2 号, 712000; 2. 陕西中医学院第一临床医学院)

摘要 目的 研究左归丸对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 向成骨分化的表观遗传学机制。方法 30 只 SD 大鼠给予左归丸溶液 (浓度为 472.5 g/L) 灌胃, 每次 1 ml, 每日 2 次, 连续灌胃 3 天后经腹主动脉采血, 制备左归丸含药血清。无菌条件下取出 SD 大鼠双侧股骨和胫骨, 收集骨髓冲洗液, 贴壁法培养传代所得 BMSCs。取 2 代 BMSCs 以 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 密度接种于培养皿, 分为 3 组, 对照组常规培养; 成骨诱导组用 10% 空白血清加成骨诱导剂培养; 左归丸组用 10% 左归丸含药血清加成骨诱导剂培养。干预 14 天后采用 RT-PCR 及甲基化特异性 PCR 检测法进行 Runx2、Osterix、OC 及 β -catenin 基因表达和甲基化状态检测。结果 左归丸组 Runx2、Osterix、OC、 β -catenin 的相对表达量较对照组、成骨诱导组均上调 ($P < 0.05$)。左归丸组 Runx2、Osterix、OC、 β -catenin 基因甲基化率均低于对照组、成骨诱导组 ($P < 0.05$)。结论 左归丸含药血清可通过去甲基化的表观遗传调控机制促进 BMSCs 向成骨细胞分化。

关键词 左归丸; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 基因甲基化

表观遗传学是研究基因表达可遗传的变化但核苷酸序列不发生改变, 最终导致可遗传的表型变化^[1]。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 中 DNA 序列没有改变, 但是可以分化成不同功能的细胞, 近年来表观遗传调控 BMSCs 分化已经成为科学研究的热点和前沿领域^[2-3]。DNA 甲基化是最早发现的表观遗传修饰途径之一, DNA 甲基化可造成基因的失活。左归丸是经典补肾名方, 有研究证实, 应用左归丸治疗骨质疏松症等骨骼相关疾病可取得较好的疗效, 但对其作用机制的研究还不够深入^[4-5]。本研究通过研究左归丸对 BMSCs 成骨分化相关基因甲基化的影响, 旨在从基因角度阐明左归丸促进 BMSCs 向成骨分化的表观遗传学机制。

1 材料与方法

1.1 动物

选 4 周龄 SD 大鼠 30 只, 清洁级, 体重 (180 ± 20) g, 雌雄各半, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (陕)

2012-003, 饲养于陕西中医学院实验中心饲养室。

1.2 药物及试剂

左归丸组成: 熟地黄 24 g, 山萸肉 12 g, 枸杞子 12 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 龟甲胶 12 g, 山药 12 g, 牛膝 9 g。分别加水煎制, 并根据“人与动物体表面积折算等效剂量比率表”计算临床等效剂量, 配制成浓度为 472.5 g/L 的溶液。基因组 DNA 抽提试剂盒 (Qiagen 公司, 货号: 937255), 甲基化修饰试剂盒 (Qiagen 公司, 货号: 59305), PCR 试剂盒 (上海捷兰生物技术有限公司, 货号: 201223)。氯胺酮 (连云港恒瑞制药, 批号: KH060601), L-DMEM (Sigma 公司, 货号: D6046), 胎牛血清 (Gibco 公司, 货号: 10099-141), 1% 青链霉素 (Gibco 公司, 货号: 15140-122), 地塞米松 (Sigma 公司, 货号: D4902), β -甘油磷酸钠 (Sigma 公司, 货号: G6251), L-抗坏血酸 (Sigma 公司, 货号: D5960)。

1.3 主要仪器

AE21 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 三气细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司), 7300 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 流式细胞仪 (Bechman

基金项目: 国家自然科学基金 (81102610, 81473711), 陕西省中医管理局 2013~2015 年度中医药科学技术研究课题 (13-JC014)

* 通讯作者: yangfengdudu@163.com, (029) 32086876

Epiex 公司), UV-2300 紫外分光光度仪 (上海天美科技有限公司), 台式高速离心机 (Eppendorf 公司), GIS1600 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.4 左归丸含药血清的制备

30 只 SD 大鼠给予左归丸溶液灌胃, 每次 1 ml, 每日 2 次, 连续灌胃 3 天, 第 3 天下午灌胃后 1 h, 给予大鼠腹腔注射氯胺酮 120 mg/kg 麻醉后, 经腹主动脉采血, 1500 r/min 离心 10 min 后抽滤、56℃ 灭活、-20℃ 冻存备用。

1.5 BMSCs 的分离、培养

取 18 只 SD 大鼠处死后, 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下取出双侧股骨和胫骨, 咬骨钳修剪骨端, 暴露髓腔, 5 ml 注射器吸取含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基反复冲洗髓腔, 直到骨质外观微微透亮。90 mm 培养皿收集骨髓冲洗液, 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。每 3 天换液 1 次。第 4 代培养细胞进行流式细胞仪检测, 结果显示, 细胞均一性较好, 其中 CD34、CD45 表达呈阴性, 而 CD90、CD105 表达呈阳性, 阳性率分别为 93.136% 和 93.182%, 提示培养所得细胞为 BMSCs, 非造血性细胞。用细胞计数板作有核细胞计数, 调整细胞浓度为 5×10^4 /ml, 以备实验之用。

1.6 实验分组及处理

取 2 代 BMSCs, 以 5×10^4 /cm² 密度接种于 60 mm 培养皿。分为 3 组, 每组 6 个培养皿。对照组以 L-DMEM、10% 胎牛血清、1% 青链霉素进行培养。成骨诱导组以 L-DMEM、10% 空白血清 (大鼠生理盐水灌胃后所采集的血清)、1% 青链霉素、成骨诱导剂 (10^{-8} M 地塞米松, 10 mM β-甘油磷酸钠, 0.05 mM L-抗坏血酸) 进行培养。左归丸组以成骨诱导培养液加 10% 左归丸含药血清培养。分别在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 14 天。

1.7 RT-PCR 检测成骨及成脂相关基因表达

诱导分化第 14 天, 按照试剂盒说明提取各组细胞总 RNA, 反转录及实时荧光定量 PCR 检测 Runx2、Osterix、OC、β-catenin 的 mRNA 表达。随机引物由华大基因合成, 各基因引物序列: GAPDH, 上游 5'-AATGATCCGTTGTGGATCTGA-3', 下游 5'-CCTGCTTACCACCTTCT-3', 长度 150bp; Runx2, 上游 5'-CATGGTGGAGATCATCGC-3', 下游 5'-ACTCTTGCCTCGTCCACTC-3', 长度 99bp; Osterix, 上游 5'-TGGCTTTTCTGTGGCAAGAG-3', 下游 5'-TTTGCTCAAGTGGTCTGCTTC-3', 长度

133 bp; OC, 上游 5'-AAAGCCTTCATGTCCAAGCA-3', 下游 5'-TCCGCTAGCTCGTCACAATT-3', 长度 119 bp; β-catenin, 上游 5'-CCATCACCACGCTG-CATAAT-3', 下游 5'-TTGCTTTCCTGATTGCCGTA-3', 长度 143 bp。按 PCR 试验说明书操作。

1.8 甲基化特异性 PCR 法检测相关基因甲基化状态

按照试剂盒说明提取各组细胞 DNA, 加入亚硫酸盐混合液修饰, 纯化, PCR 反应。甲基化引物由 Methyl Primer Express v1.0 设计, 由华大基因合成, Runx2-MF: CGAAGTAGTAGTTGTTTAGAAC; Runx2-MR: TAACTCGATTAATCTCGATA; Runx2-NMF: TGTGAAGTAGTAGTTGTTTAGAAT; Runx2-NMR: ACTAACTCAATTAATCTCAATA; β-catenin-MF: GGGCGTTTGTATATTAGTTGAC; β-catenin-MR: AAATCGTCACAATTCAAATCGT; β-catenin-NMF: TAGGGGTGTTTGTATATTAGTTGAT; β-catenin-NMR: AAATCATCACAATTCAAATCATCAC; Osterix-MF: TTGTTTTTTTTTTAGTAGCGC; Osterix-MR: CTA-AAATCCGACTCTTAACTCG; Osterix-NMF: TTTTT-GTTTTTTTTTTAGTAGTGT; Osterix-NMR: CCTA-AAATCCAACCTTAACTCAAA; OC-MF: TGTTTT-GAAATACGGTAATTC; OC-MR: CTACAACTAC-CGAAACGAA; OC-NMF: TTGTTTTGAAATATGCTA-ATTT; OC-NMR: ACTACAACTACCAAAACAAA。PCR 产物电泳, 电泳条件: TBE 缓冲液, 1.2% 的琼脂糖, 电压 180V, 电泳时间 50 min。用 GIS1600 凝胶成像系统分析净光密度, 甲基化率 = 甲基化的光密度 / (甲基化的光密度 + 非甲基化的光密度) × 100%。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行结果分析, 计量资料若服从正态分布及方差齐性, 以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析检验。若不能满足上述条件, 则采用非参数方法检验。两样本率的比较用卡方检验。

2 结果

2.1 各组细胞成骨相关基因表达比较

表 1 示, 左归丸组 Runx2、Osterix、OC、β-catenin 的相对表达量较对照组、成骨诱导组均上调 ($P < 0.05$)。

2.2 各组细胞基因甲基化率比较

表 2 示, 左归丸组 Runx2、Osterix、OC、β-catenin 基因甲基化率均低于对照组、成骨诱导组

表 1 各组细胞成骨相关基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Runx2	Osterix	OC	β -catenin
对照组	6	1.00 $\pm$ 0.45*	1.00 $\pm$ 0.75*	1.00 $\pm$ 0.52*	1.00 $\pm$ 0.48*
成骨诱导组	6	2.42 $\pm$ 0.47*	1.21 $\pm$ 0.31*	2.02 $\pm$ 0.68*	1.38 $\pm$ 0.30*
左归丸组	6	8.80 $\pm$ 0.33	16.22 $\pm$ 0.56	8.13 $\pm$ 0.55	6.39 $\pm$ 0.55

注: 与左归丸组比较, * $P < 0.05$

($P < 0.05$), 表明左归丸含药血清通过调节成骨基因甲基化的下调, 促进基因的高表达。

表 2 各组细胞基因甲基化率比较 (%)

分组	Runx2	Osterix	OC	β -catenin
对照组	18.50	25.49	60.14	46
成骨诱导组	17.09	28.57	71.11	39
左归丸组	12.66	21.23	55.13	41

3 讨论

中医学认为, “肾为先天之本, 藏精, 主骨生髓”。《素问·脉要精微论》曰 “骨者, 髓之府, 不能久立, 行则振掉, 骨将惫矣。”清代唐宗海《中西汇通医经精义》曰 “盖髓者, 肾精所生, 精足则髓足。”可见筋骨的强弱与肾气的充盈、肾精的封藏密切相关, 肾虚患者骨矿含量普遍低于正常人^[6-7]。同时许多研究已经证实, 补肾填精中药能延缓骨质疏松患者的骨量丢失, 可以促进 BMSCs 的增殖和骨向分化, 使 BMSCs 能够合理地向成骨分化或者使脂肪化逆转并骨化, 促进骨的形成^[8]。表观遗传机制在干细胞定向分化中起着重要的作用, 其中 DNA 甲基化是基因转录水平表观遗传学调控的主要方式, 其在干细胞分化过程中起着重要的作用。甲基化达到一定程度时会使 DNA 结构收缩, 螺旋加深, 而不利于转录的起始, 导致基因失活。相反去甲基化则可上调基因表达^[9]。如何降低 BMSCs 成骨分化过程中相关基因甲基化水平将为骨质疏松等代谢性骨疾病的治疗提供新思路。

左归丸出自张景岳的《景岳全书·新方八阵》, 为补肾填精的名方, 具有滋阴补肾功效。研究左归丸干预肾骨相关疾病的机制有助于阐明“肾主骨”理论的科学内涵, 从而进一步指导临床。目前对于左归丸与骨骼疾病的相关研究多集中在成骨细胞及相关转录因子等方面, 对于左归丸与 BMSCs 成骨分化的表观遗传学机制的研究尚未见报道, 故我们选择了在 BMSCs 成骨分化过程中的重要基因 Runx2、Osterix、OC、 β -catenin 等来研究补肾名方左归丸对 DNA 甲基化的影响。BMSCs 中

成骨细胞的分化与 Runx2 的活性增强有关, Runx2 决定着 BMSCs 向成骨细胞分化, 并在分化早期有促进作用, Runx2 缺失可以使成骨分化功能丧失^[10]。Osterix 是 BMSCs 中细胞向成骨分化及骨形成过程中不可或缺的转录因子中基因编码的蛋白, 存在于发育的骨组织中进行相关的特异性表达。OC 是成骨细胞功能的特异性标志物在骨的形成及生长过程中的一个重要角色, 可以结合钙维持正常的骨矿化率, 与骨的形成和骨密度的增加呈正相关, 作为成骨细胞的分化指标, 反映成骨细胞的活性^[11]。 β -catenin 基因可以表达 β -catenin 蛋白, 后者是正常成骨代谢的关键因子, 广泛存在于成骨细胞中, 其甲基化的水平直接影响着成骨化的发展变化^[12]。本研究结果表明, 左归丸含药血清可以上调成骨相关转录因子 Runx2、Osterix、OC 和 β -catenin 的表达, 而其 DNA 甲基化水平则明显下调。

综上所述, 左归丸可使 BMSCs 成骨过程中 Runx2、Osterix、OC、 β -catenin 基因表达明显上调, 且其 DNA 甲基化水平降低, 一定程度上说明补肾中药左归丸可以通过下调成骨基因甲基化率, 促进基因的高表达, 使 BMSCs 向成骨方向分化。

参考文献

- [1] Riddihough G, Zahn LM. Epigenetics. What is epigenetics? Introduction [J]. Science, 2010, 330(6004): 611.
- [2] Bibikova M, Laurent LC, Ren B, et al. Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 123-134.
- [3] Thomas D, Kansara M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation [J]. J Cell Biochem, 2006, 98(4): 757-769.
- [4] 鞠大宏, 张春英, 王安民, 等. 左归丸对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的治疗作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(3): 17-20.
- [5] 鞠大宏, 吕爱平, 张春英, 等. 左归丸对卵巢切除所致骨质疏松大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的影响 [J]. 中医杂志, 2002, 43(10): 777-779.
- [6] 王大健, 王爱坚, 黄李平, 等. 探讨老年肾虚证与骨密度的关系 [J]. 上海中医药杂志, 2002, 16(9): 35-36.

- [] 邓伟民, 崔伟历, 贺扬淑, 等. 补肾壮骨冲剂对男性骨质疏松患者骨矿含量和骨密度的影响 [] . 中国临床康复, 2005, 11(9): 150.
- [] 张荣华, 欧阳菁. 肾主骨生髓理论与骨髓间充质干细胞骨向分化 [] . 中医杂志, 2006, 47(10): 730-732.
- [] 李光雷, 喻树迅, 范术丽, 等. 表观遗传学研究进展 [] . 生物技术通报, 2011, 22(1): 41-49.
- []0] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of

Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [] . Cell, 1997, 89(5): 755-764.

- []1] 杨丹, 于燕妮. 成骨细胞特异性转录因子 Osterix 研究进展 [] . 中国公共卫生, 2013, 29(1): 142-145.
- []2] 许冰, 刘慧, 许应星, 等. 成骨细胞中经典 Wnt/ β -catenin 通路研究进展 [] . 生命科学, 2011, 23(5): 477-481.

Influence of *Zuogui Wan* (左归丸) on Methylation of Osteogenic Differentiation Related Gene in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell

YANG Feng^{1,2}, PAN Le², MA Qitao², ZHANG Tao², YANG Lixue^{1,2}, LI Yanmin¹

(1. Affiliated Hospital of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Province, 712000; 2. First Clinical Medical College, Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the epigenetic mechanism of *Zuogui Wan* (左归丸) in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Thirty SD rats were given 1 ml *Zuogui Wan* solution (472.5 g/L) by gavage twice a day for continuous 3 days. Afterwards, blood samples were collected and *Zuogui Wan* serum samples were obtained. Bilateral femur and tibia of SD rats were obtained in asepsis and irrigation fluid of bone marrow was collected. BMSCs were incubated and passaged by adherent method. Second generation of BMSCs were inoculated in the density of $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in culture dishes. They were divided into 3 groups. Control group was conventional cultured. Osteogenic induction group was cultured by 10% blank serum with osteogenic induce supplements. *Zuogui Wan* group was cultured by 10% *Zuogui Wan* serum with osteogenic induce supplements. After 14 days, gene expression and methylation of Runx2, Osterix and β -catenin were detected by RT-PCR and methylation specific PCR. **Results** Expressions of Runx2, Osterix, OC and β -catenin were higher in *Zuogui Wan* group than those in control and osteogenic induction groups ($P < 0.05$). Methylations of Runx2, Osterix, OC and β -catenin were lower in *Zuogui Wan* group than those in control and osteogenic induction groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *Zuogui Wan* serum can promote BMSCs differentiating to osteoblasts by epigenetic mechanism of demethylation.

Keywords *Zuogui Wan*; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; gene methylation

收稿日期: 2014-10-15; 修回日期: 2015-03-06

编辑: 邓 媛

读者·作者·编者

论文中表的应用

表格是学术论文中清晰、直观地表达结果的必要工具, 正确、合理、规范地使用表格, 有助于读者理解全文, 往往可以达到文字叙述难以达到的效果。图的运用应遵从如下规则。

1. 应具有自明性和可读性, 读者不必查找前后文内容即可理解表格中所表达的含义。
2. 应按正文中出现的顺序用阿拉伯数字依序编号, 表题连同表序置于表的上方。
3. 表中的内容不应与正文文字及插图内容重复。
4. 数据表宜采用国际通行的三线表格式, 力求结构简洁。
5. 表中的量、单位、符号、缩略语等应与正文中所写一致。出现缩略语宜在表注中注明中文名称。
6. 表内参数同一指标保留的小数位数应相同, 同一栏的数字应按位次上下对齐。
7. 统计表中应列出样本数, 表中的符号、标记、代码以及需要说明的事项以最简练的文字作为表注附于表的下方。
8. 中文期刊表题及表内其他文字说明可以只使用中文, 也可以中英文对照, 但不应仅使用英文。