

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.01.014

不同浓度麝香含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、分化的影响

谢兴文^{1,2}, 李应福^{*}, 李宁³, 李盛华¹, 宋敏³

(1. 甘肃省中医院, 甘肃省兰州市七里河区瓜州路 418 号, 730050; 2. 甘肃省中医药研究院; 3. 甘肃中医药大学)

摘要 目的 探讨不同浓度麝香对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 增殖和定向成骨、成脂诱导分化的影响。方法 60 只 SD 大鼠随机分为麝香高、中、低剂量组及空白对照组, 每组 15 只。麝香高、中、低剂量组分别给予麝香 16.8、8.4、4.2 $\mu\text{l}/100\text{g}$ 灌胃, 每日 1 次, 连续 8 天, 分别制备不同浓度麝香含药血清及空白血清。另取 15 只 SD 大鼠利用全骨髓贴壁筛选法分离 BMSCs, 培养至第 3 代, 通过细胞形态学观察、细胞表型鉴定、成骨及成脂诱导分化方法鉴定 BMSCs。利用不同浓度麝香含药血清和空白血清干预 BMSCs, 检测各组细胞不同时间细胞增殖率、碱性磷酸酶 (ALP) 活性、I 型胶原免疫荧光染色、钙化结节数及脂肪细胞转化率。结果 与空白血清组同时间比较, 麝香低剂量血清组在第 2、3、4、5、7 天, 麝香中剂量血清组在第 1、5 天细胞增殖率均升高; 麝香低剂量血清组在第 2、4、6、8 天, 麝香中剂量血清组在第 4、8 天, 麝香高剂量血清组在第 2、8 天 ALP 活性升高; 除麝香高剂量血清组钙化结节数外, 各组钙化结节数和脂肪细胞转化率亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与麝香低剂量血清组比较, 麝香高剂量血清组在第 1、3、5、7 天, 麝香中剂量血清组在第 1、5 天细胞增殖率降低, 在第 6、8 天 ALP 活性降低, 钙化结节数及脂肪细胞转化率亦降低 ($P < 0.05$)。麝香高、中、低剂量血清组 I 型胶原细胞阳性表达依次增强, 空白血清组细胞阳性表达很弱或几乎未见。结论 麝香可以促进 BMSCs 增殖并诱导其定向分化, 以 4.2 $\mu\text{l}/100\text{g}$ 浓度效果最好。

关键词 骨髓间充质干细胞; 麝香; 细胞增殖; 细胞分化; 碱性磷酸酶

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal-stem cells, BMSCs) 是存在于骨髓中的具有高度自我更新能力和诱导后有多向分化潜能的成体干细胞^[1]。近年来 BMSCs 移植在治疗骨及软骨疾病、心脏疾病、肝脏疾病、肾脏疾病等方面取得了满意成果^[2-3]。BMSCs 虽被认为是组织工程中用于骨缺损修复的理想种子细胞, 但体内数量有限, 能迁移至骨缺损处的 BMSCs 更加有限, 从而影响其修复效果^[4]。如何能在体外短时间内分离培养出大量纯化的干细胞, 如何促进其快速大量增殖, 并且成骨诱导后能够稳定表达成骨细胞是近年来干细胞研究的热点。本实验通过中药麝香 (Moschus) 干预 BMSCs, 观察麝香对 BMSCs 增殖、分化的影响, 为临床应用 BMSCs 治疗骨折、骨缺损等疾病提供

依据。

1 材料

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各 30 只, 体重 (200 ± 20) g; 4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 体重 (170 ± 20) g, 均购于甘肃中医药大学 SPF 实验中心。实验动物合格证号: SCXK (甘) 2015-0002。

1.2 实验药物、试剂

麝香 (兰州安泰堂天顺行药业有限公司, 批号: 20151001), 由甘肃中医药大学中药鉴定学教研室鉴定为天然麝香; 氯胺酮 (西安力邦制药有限公司, 国药准字 H20054749); DMEM/F12 培养基 (HyClone 公司, 批号: AAL208968); 胎牛血清 (FBS, 批号: 1402C)、胰蛋白酶 (批号: 1742078), Gibco 公司; 碱性磷酸酶 (ALP) 染色液 (批号: 20160623)、茜素红染色液 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81460735); 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDZX2015080)

* 通讯作者: 869472706@qq.com

20160703)、MTT 比色法试剂盒(批号: 20160531)、二甲基亚砷(DMSO, 批号: 20160507), 北京索莱宝科技有限公司; 成骨诱导分化培养基试剂盒(批号: T160608G001)、成脂诱导分化培养基试剂盒(批号: T160104G001), Cyagen 公司; 青霉素链霉素溶液(批号: C0222)、ALP 活性检测试剂盒(批号: 20160639), 上海碧云天生物技术有限公司; CD34(批号: GR201207-2)、CD45(批号: B168471)、CD44(批号: B195319)、CD90(批号: B206114)、一抗(批号: 20160825)、二抗(批号: 20160829), Abcam 公司; 油红 O 染色液(南京建成科技有限公司, 批号: 20160803)。

1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱(MCO-5AC 型, 日本三洋电机公司); 倒置相差显微镜(PW-30 型, 日本 Olympus 公司); 立式电热压力灭菌器(LMQ 型, 山东新华医疗器械有限公司); 流式细胞检测仪(COULTER EPICS XL 型, 美国 Beckman FAScan 公司); 酶标仪(ST-360 型, 上海科华有限责任公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备

将 60 只 6 周龄 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白对照组及麝香高剂量组(16.8 μ l/100 g)、麝香中剂量组(8.4 μ l/100 g)、麝香低剂量组(4.2 μ l/100 g), 每组 15 只。计算出给药量后将麝香充分研磨成细末并利用生理盐水稀释至 2.5 ml, 反复吹打制成麝香混悬液进行灌胃, 空白对照组灌服相同体积的生理盐水, 每日 1 次, 连续灌胃 8 天。第 8 天灌胃 2 h 后行腹主动脉采血, 4℃ 离心(3000 r/min) 10 min, 取上层血清, 将血清 56℃ 水浴 30 min 灭活补体, 置于 -20℃ 保存备用。

2.2 体外培养 BMSCs

采用全骨髓贴壁筛选法^[9]进行 BMSCs 的分离。15 只雄性 4 周龄 SD 大鼠脱颈处死, 无菌分离双侧股骨与胫骨, 利用无菌纱布块剥离附着于股骨与胫骨的肌肉并将其分离, 剪去股骨与胫骨干骺端, 显露骨髓腔, 用 5 ml 无菌注射器抽取含 10% FBS、100 U/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 DMEM/F12 培养液反复冲洗骨髓腔, 将骨髓制成单细胞悬液, 过滤并接种于直径 60 mm 无菌细胞培养皿中, 每皿 4 ml, 置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。每 3 天换液 1 次, 在倒置相差显微镜下观察, 待原代细胞

融合成单层后, 可用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 按 1:3 比例接种到新的无菌培养皿中, 此后每 3 天换液 1 次。当细胞融合成单层或接近单层时可继续传代, 第 3 代 BMSCs 用于后续实验。

2.3 BMSCs 细胞形态学观察及表型鉴定

接种后每 3 天在倒置相差显微镜下($\times 10$ 、 $\times 20$)拍照观察 BMSCs 形态与贴壁情况。细胞传至第 3 代达到 80%~90% 融合时, 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 将细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清, 加 PBS 后 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加 PBS 并制成单细胞悬液, 调整为 1×10^6 个/cm², 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 先加入 90 μ l PBS, 吹打为细胞悬液, 再加入一抗(CD34、CD45、CD90、CD44)及其同型对照各 10 μ l, 37℃ 避光 30 min 后加 400 μ l PBS, 上流式细胞仪检测。

2.4 BMSCs 细胞成骨、成脂诱导

用胰蛋白酶消化第 3 代细胞, 调整细胞为 2×10^4 个/cm² 接种在包被 0.1% 明胶的 6 孔板中, 每孔加入 2 ml 完全培养基, 置入 37℃、含 5% CO₂ 培养箱内培养, 当细胞融合度达 60%~70% 时, 加入成骨诱导完全培养基, 每孔 2 ml, 每 3 天换成骨诱导完全培养基 1 次, 诱导 17 天后, 用茜素红染色法对钙化结节染色。当细胞融合度达 90%~100% 时, 将孔内完全培养基吸走, 加入 2 ml 成脂诱导完全培养基 A 液, 诱导 3 天后, 吸弃 A 液, 加入 2 ml 成脂诱导完全培养基 B 液, 24 h 后吸弃 B 液, 换 A 液进行诱导, A 液和 B 液交替作用 18 天后, 继续用 B 液维持培养 7 天, 共诱导 25 天后进行油红 O 染色。

2.5 麝香含药血清对 BMSCs 成骨、成脂诱导的影响

2.5.1 细胞增殖率检测 第 3 代 BMSCs 加入含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清加入完全培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 按每孔 2×10^4 个接种至 96 孔板, 分为空白血清组和麝香低、中、高剂量血清组, 用浓度均为 5% 相应血清完全培养液培养, 各组培养液中均含有 5% FBS, 每组 10 个复孔。每 24 h 换液 1 次, 连续检测 7 天, 每次重复 3 次。酶标仪 490 nm 波长检测各孔 OD 值, 细胞增殖率 = OD 实验组 / OD 阴性对照组。

2.5.2 ALP 活性及染色测定 取第 3 代 BMSCs, 按 1:3 接种于 6 孔板中, 分为空白血清组和麝香

低、中、高剂量血清组, 每组 3 个复孔。待 BMSCs 接近 80% ~ 90% 融合时, 换含 5% 相应血清完全培养液, 各组培养液中均含 5% FBS 和成骨诱导剂。每 3 天换液 1 次, 分别在诱导第 2、4、6、8 天测定 ALP 活性, 第 9 天进行 ALP 染色。ALP 活性检测按照试剂盒步骤操作, ALP 染色按照 ALP 染色液步骤进行, 倒置相差显微镜下观察。

2.5.3 钙化结节检测 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化第 3 代 BMSCs, 按 2×10^4 个/ cm^2 的细胞密度接种在包被 0.1% 明胶的 6 孔板中, 分为麝香低、中、高剂量血清组和空白血清组, 每组 5 个复孔。置入培养箱内培养, 当细胞融合度达 60% ~ 70% 时, 换含 5% 的相应血清完全培养液, 各组培养液中均含成骨诱导剂及 5% FBS, 每孔 2 ml, 每隔 3 天换液 1 次。诱导 17 天后, 用茜素红染色法行钙化结节染色, 倒置相差显微镜下计数钙化结节, 每孔随机选 5 个视野计数并计算钙化结节数。

2.5.4 I 型胶原染色 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化第 3 代 BMSCs, 按照 2×10^4 个/ cm^2 的细胞密度接种于放有盖玻片的 6 孔板中, 分为麝香低、中、高剂量血清组和空白血清组, 每组 5 个复孔。待 BMSCs 接近融合时, 换含 5% 相应血清完全培养液, 各组培养液中均含 5% FBS 和成骨诱导剂。每 3 天换液 1 次, 诱导第 10 天行细胞免疫荧光法检测, 倒置相差显微镜下观察细胞变化。

2.5.5 脂肪细胞转化率检测 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化第 3 代 BMSCs, 按照 2×10^4 个/ cm^2 的细胞密度接种在 6 孔板中, 分为空白血清组和麝香低、中、高剂量血清组, 每组 3 个复孔。当细胞接近单层融合或过融合时, 换含 5% 的相应血清完全培养液, 各组培养液中均含 5% FBS、成脂诱导剂 A 液或 B 液。诱导 25 天后进行油红 O 染色, 倒置相差显微镜下观察, 每孔细胞随机选取 5 个视野计数显脂肪滴的细胞数 (a) 和总细胞数 (b), 脂肪细胞转化率 = $a/b \times 100\%$ 。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理, 计量

资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。不同时间段比较采用重复测量双因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BMSCs 细胞形态学观察及表型鉴定

倒置相差显微镜下观察, 刚接种的 BMSCs 与造血细胞或其他杂细胞混合漂浮在培养液中呈球形, 无法分辨, 首次换液后显微镜下观察可见少量细胞贴壁, 但很模糊。第 0 代 BMSCs 培养 10 天时, 贴壁细胞逐渐增殖融合, 呈三角形或纺锤形, 杂细胞明显减少; 第 3 代 BMSCs 生长速度快, 约 0.5 ~ 1h 细胞开始贴壁, 培养 3 天时细胞集落快速增殖, 细胞体积显著增大, 3 ~ 6 天细胞融合达 85% 以上, 排列比较规则, 细胞形态较一致, 呈漩涡状, 核浆比例增大。

CD45、CD34 在干细胞表面的表达阳性率分别为 1.5%、0, CD90、CD44 在干细胞表面的表达阳性率分别为 95.7%、94.6%, 说明 CD45 和 CD34 是阴性表达, CD44 和 CD90 是阳性表达。已有研究^[6]表明, BMSCs 体外扩增并不表达造血细胞的 CD45 和 CD34 等, 而表达 CD44 和 CD90 等, 这表明本实验培养扩增的细胞为 BMSCs。

3.2 BMSCs 成骨、成脂分化结果

经油红 O 染色后, 倒置相差显微镜下可见细胞浆内大小不等的圆形或椭圆形红色脂肪滴颗粒。经茜素红染色后, 倒置相差显微镜下可见多个圆形钙化不透明结节, 呈橘红色, 说明 BMSCs 定向成脂、成骨分化成功。

3.3 各组细胞不同时间细胞增殖率比较

表 1 示, 与空白血清组比较, 第 1、5 天麝香中剂量血清组细胞增殖率升高 ($P < 0.05$), 第 2、3、4、5 天麝香低剂量血清组细胞增殖率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 第 6 天麝香各剂量血清组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 第 7 天麝香低剂量血清组细胞增殖率高于空白血清组, 而麝香高剂量

表 1 各组细胞不同时间细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白血清组	10	0.20 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.37 ± 0.09	0.44 ± 0.09	0.60 ± 0.09	0.62 ± 0.09	0.61 ± 0.22
麝香低剂量血清组	10	0.25 ± 0.05	0.39 ± 0.07*	0.45 ± 0.13*	0.59 ± 0.13*	0.68 ± 0.21**	0.71 ± 0.19	0.72 ± 0.25**
麝香中剂量血清组	10	0.29 ± 0.01*	0.37 ± 0.12	0.42 ± 0.08 [△]	0.54 ± 0.08	0.66 ± 0.18*	0.66 ± 0.15	0.65 ± 0.16 [△]
麝香高剂量血清组	10	0.18 ± 0.03 [△]	0.24 ± 0.05	0.32 ± 0.15 [△]	0.46 ± 0.17	0.61 ± 0.16 [△]	0.58 ± 0.07	0.57 ± 0.23** [△]

注: 与空白血清组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与麝香低剂量血清组同时间比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组细胞不同时间 ALP 活性比较 (金氏单位, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天
空白血清组	3	2.07 $\pm$ 0.07	2.55 $\pm$ 0.06	3.73 $\pm$ 0.16	4.02 $\pm$ 0.17
麝香低剂量血清组	3	2.48 $\pm$ 0.15 ^{**}	3.27 $\pm$ 0.13 [*]	6.27 $\pm$ 0.12 ^{**}	9.00 $\pm$ 0.12 ^{**}
麝香中剂量血清组	3	2.22 $\pm$ 0.07 [△]	3.12 $\pm$ 0.04 ^{**}	4.17 $\pm$ 0.10	6.20 $\pm$ 0.03 [*]
麝香高剂量血清组	3	2.28 $\pm$ 0.04 [*]	2.87 $\pm$ 0.04	3.83 $\pm$ 0.08 [△]	5.66 $\pm$ 0.10 ^{*△}

注: ALP, 碱性磷酸酶; 与空白血清组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与麝香低剂量血清组同时间比较, $\Delta P < 0.05$

血清组低于空白血清组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与麝香低剂量血清组比较, 第 1 天麝香高剂量血清组细胞增殖率降低 ($P < 0.05$), 第 3 天麝香中、高剂量血清组降低 ($P < 0.05$), 第 5 天麝香高剂量血清组降低 ($P < 0.05$), 第 7 天麝香中、高剂量血清组降低 ($P < 0.05$)。

3.4 各组细胞不同时间 ALP 活性及染色结果比较

与空白血清组比较, 麝香高、中、低剂量血清组可见细胞的胞浆中出现黑色大小不一呈圆形、椭圆形或梭形的颗粒, 染色结果为阳性, 麝香低剂量血清组效果最佳。表 2 示, 与空白血清组同时间比较, 第 2 天麝香低、高剂量血清组 ALP 活性升高, 第 4 天麝香中、低剂量血清组 ALP 活性升高, 第 6 天麝香低剂量血清组 ALP 活性升高, 第 8 天麝香高、中、低剂量血清组 ALP 活性亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与麝香低剂量血清组比较, 第 2 天麝香中剂量血清组 ALP 活性降低, 第 6、8 天麝香高剂量血清组 ALP 活性降低 ($P < 0.05$)。各组组内不同时间段 ALP 活性比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.5 各组细胞钙化结节数及脂肪细胞转化率比较

表 3 示, 与空白血清组比较, 麝香低、中剂量血清组钙化结节数增多, 麝香低、中、高剂量血清组脂肪细胞转化率亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与麝香低剂量血清组比较, 麝香中、高剂量血清组钙化结节数均减少, 麝香高剂量血清组脂肪细胞转化率亦降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组细胞钙化结节数及脂肪细胞转化率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	钙化结节数 (个)	脂肪细胞转化率 (%)
空白血清组	5	10.94 $\pm$ 2.86	18.90 $\pm$ 6.75
麝香低剂量血清组	5	39.61 $\pm$ 4.67 ^{**}	50.37 $\pm$ 9.34 ^{**}
麝香中剂量血清组	5	23.75 $\pm$ 3.82 ^{*△}	38.09 $\pm$ 7.93 [*]
麝香高剂量血清组	5	18.23 $\pm$ 3.13 [△]	26.74 $\pm$ 5.76 ^{*△}

注: 与空白血清组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与麝香低剂量血清组比较, $\Delta P < 0.05$

3.6 各组细胞 I 型胶原染色结果

I 型胶原在细胞中的表达有大小不等、分布不

均、形状不一的绿色透亮光, 但大部分呈条索状, 这些均为阳性表达。麝香高、中、低剂量血清组细胞阳性表达依次增强, 空白血清组细胞阳性表达很弱或几乎看不到。

4 讨论

麝香具有开窍、辟秽、通络、散瘀、止痛之功, 《本草经疏》云其可“通窍开经络, 透肌骨之功耳”。本实验结果显示, 在麝香低浓度范围内, 麝香对细胞的增殖作用明显, 随着浓度的不断增加, 可能会影响 BMSCs 细胞周期, 导致对细胞的增殖产生抑制作用, 因此, 麝香对 BMSCs 增殖作用的最佳剂量约 4.2 μ l/100 g。

ALP 活性是成骨细胞功能及分化的早期标志物, 通过检测细胞内 ALP 活性程度可以反映各种细胞向成骨细胞分化功能的强弱, 随着成骨诱导时间的延长, ALP 表达量逐渐增加^[9]。本实验结果显示, 在不同时间点, 与空白血清相比较, 不同浓度麝香含药血清均明显提高了 BMSCs 中 ALP 活性, 培养第 8 天时达到高峰, 总体趋势说明随着时间推移各诱导组均可增加 ALP 活性, 但以低浓度更显著。同时 ALP 染色结果也证实了这一点。因此, 麝香具有促 BMSCs 早期向成骨细胞分化的功能。此外, 麝香各剂量血清组钙化结节数显著高于空白血清组, 进一步表明麝香低、中剂量具有诱导 BMSCs 定向分化的作用, 以低剂量效果显著。I 型胶原是骨形成过程中的关键因子, 主要通过成骨细胞分泌^[8]。本实验结果发现, 在不同剂量麝香干预下 I 型胶原在细胞胞浆内表达不同, 低剂量对 BMSCs 成骨诱导分化后 I 型胶原的表达影响最显著, 说明麝香具有促成骨细胞的生成。另外, 在对 BMSCs 成脂诱导分化后发现, 麝香不同剂量血清组脂肪细胞转化率显著高于空白血清组, 且麝香低剂量血清组高于麝香高剂量血清组, 表明麝香不同浓度具有诱导 BMSCs 成脂分化的作用, 并且以低剂量效果显著。

综上所述, 麝香含药血清体外干预 BMSCs, 具有促进 BMSCs 增殖、成骨分化、成脂分化的重

要作用,且小剂量效果最佳,说明麝香促进骨折、骨缺损等疾病愈合的机制之一与促 BMSCs 增殖分化有相关性。但相关作用中是否存在其他机制,仍有待今后的探索和研究。

参考文献

- [1] LIU L, YU Q, LIN J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(11): 1961-1971.
- [2] KAGAMI H, AGATA H, TOJO A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(3): 286-289.
- [3] 鲁先闯,张志峰,黄健. 骨髓间充质干细胞修复软骨缺损的应用前景 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(19): 3083-

3088.

- [4] 郭卫春,唐冰,熊敏,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗骨科疾病的研究进展 [J]. 骨科, 2014, 5(2): 121-124.
- [5] 谢兴文,许伟,李宁. 羌活鱼研粉物、水提及酸提物含药血清对骨髓间充质干细胞增殖及向成骨分化的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36): 6767-6771.
- [6] 白海,王存邦,马晓慧,等. 红景天苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 1072-1077.
- [7] CRUZ AC, SILVA ML, CAON T, et al. Addition of bone morphogenetic protein type 2 to ascorbate and β -glycerophosphate supplementation did not enhance osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. J Appl Oral Sci, 2012, 20(6): 628-635.
- [8] 汤小康,应航,李敏. 等. I 型与 II 型胶原酶在原代成骨细胞培养中消化效果的对比研究 [J]. 中医正骨, 2013, 25(6): 6-9.

Effects of Different Concentrations of *Moschus*-containing Serum on Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

XIE Xingwen^{1,2}, LI Yingfu¹, LI Ning³, LI Shenghua¹, SONG Min³

(1. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050; 2. Research Institute of Traditional Chinese Medicine in Gansu Province; 3. Guansu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of different concentrations of *Moschus* on the proliferation and osteogenesis and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into blank control group and *Moschus* high, medium, low dose groups, with 15 groups in each group. The *Moschus* high, medium, low dose groups were respectively given 16. 8, 8. 4, 4. 2 μ l/100 g *Moschus* once a day, for 8 consecutive days to prepare different concentrations of *Moschus*-containing serum and blank serum. BMSCs were isolated from other 15 SD rats by whole bone marrow adherence screening method, and cultured to the third generation. BMSCs were identified by cell morphology observation, cell phenotype identification, osteogenic and adipogenic differentiation methods. BMSCs were treated with different concentrations of *Moschus*-containing serum and blank serum. The cell proliferation rate, alkaline phosphatase (ALP) activity, type I collagen immunofluorescence staining, calcification nodules and adipocyte conversion rate were measured at different time points.

Results Compared with the blank serum group at the same time, the cell proliferation rate of the murine low-dose serum group was increased on the 2nd, 3rd, 4th, 5th, and 7th day, and it was also increased in the medium group on the 1st and 5th day. The ALP activity of the *Moschus* low-dose serum group was increased on the 2nd, 4th, 6th and 8th days, and that of the *Moschus* high-dose serum group was increase as well on the 2nd and 8th days, and it was increased on the 4th and 8th days in the *Moschus* medium-dose serum group. Except the number of calcified nodules in the high-dose serum group, the number of calcified nodules and adipocyte conversion rate in each group also were increased ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). Compared with the *Moschus* low-dose serum group, the cell proliferation rate of the *Moschus* high-dose serum group on the 1st, 3rd, 5th, and 7th days, and of the *Moschus* medium dose serum group on the 1st and 5th days was decreased, and the ALP activity on the 6th and 8th days was decreased. The number of calcified nodules and the conversion rate of adipocytes were also decreased ($P < 0. 05$). The positive expression of type I collagen cells in the high, medium and low doses of *Moschus* increased in turn, and the positive expression of blank serum group cells was weak or almost absent. **Conclusion** *Moschus* can promote the proliferation of BMSCs and induce their differentiation, the best effect occurred at the concentration of 4. 2 μ L/100 g.

Keywords Bone marrow mesenchymal stem cells; *Moschus*; cell proliferation; cell differentiation; alkaline phosphatase

(收稿日期: 2018 - 03 - 15; 修回日期: 2018 - 06 - 07)

编辑: 邓 媛