

• 实验研究 •

左归丸、右归丸含药血清对大鼠脂肪干细胞
成骨分化的影响李玲慧^{1,2} 詹红生^{1*} 丁道芳^{1,2} 杜国庆^{1,2} 宋 奕^{1,2}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市浦东新区张衡路 528 号, 201203;

2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073114); 上海市科学技术委员会科研计划项目(11XD1404600)

* 通讯作者: zhanhongsheng2010@163.com, (021)20256519

[摘要] 目的 比较左归丸、右归丸对大鼠脂肪干细胞成骨性分化的影响并探讨相关机制。方法 将 30 只 SD 大鼠随机分为左归丸组、右归丸组和对照组各 10 只。左归丸组、右归丸组灌胃相应药物的浓度均为 7.55 g/(kg·d), 对照组灌胃等量生理盐水, 连续灌胃 3 天后制备左归丸、右归丸和对照含药血清。分离大鼠脂肪间充质干细胞, 分为左归丸组、右归丸组和对照组, 加入相应的体积分数 10% 的含药血清诱导培养 7 天后进行碱性磷酸酶(ALP)染色, 诱导 28 天后进行茜素红染色, 诱导培养 10 天检测各组细胞 Wnt3a、Lef-1、 β -catenin 蛋白表达。结果 各组细胞 ALP 染色均为阳性, 右归丸组细胞大面积深染, 明显强于左归丸组及对照组。各组细胞茜素红染色均为阳性, 右归丸组的矿化结节在数量和大小上优于左归丸组及对照组。左归丸组及右归丸组 β -catenin、Lef-1 蛋白表达均较对照组升高($P < 0.05$), 右归丸组 Wnt3a 蛋白表达亦较对照组升高($P < 0.05$); 并且右归丸组 β -catenin、Lef-1、Wnt3a 蛋白表达均高于左归丸组($P < 0.05$)。结论 右归丸及左归丸均促进大鼠脂肪干细胞成骨性分化, 且右归丸作用更为显著, 其机制可能与上调 β -catenin、Lef-1 及 Wnt3a 蛋白, 激活经典 Wnt 通路有关。

[关键词] 左归丸; 右归丸; Wnt 信号通路; 脂肪干细胞; 成骨分化

Effects of Zuogui Pill and Yougui Pill Containing Serum on Osteogenic Differentiation of Rat Adipose Stem Cells

LI Linghui^{1,2}, ZHAN Hongsheng¹, DING Daofang^{1,2}, DU Guoqing^{1,2}, SONG Yi^{1,2}

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203;

2. Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To compare the effects of Zuogui Pill [Left-Restoring (Kidney Yin) Pill] and Yougui Pill [Right-Restoring (Life Gate) Pill] on osteogenic differentiation of rat adipose stem cells and study the related mechanisms. **Methods** Thirty SD rats were randomized into the Zuogui Pill group, Yougui Pill group and control group, with 10 in each. The Zuogui Pill group and Yougui Pill group were gavaged with 7.55 g/(kg·d) corresponding drugs. The control group was gavaged with same amount of normal saline. The containing serum was prepared after 3-day intragastric administration. The adipose mesenchymal stem cells were separated from the rats in the control group and divided into the Zuogui Pill group, Yougui Pill group and control group, with corresponding Zuogui Pill serum, Yougui Pill serum, or normal saline serum added in respectively. The alkaline phosphatase (ALP) staining was conducted after 7 days of containing serum induced culture. The alizarin red staining was conducted after 28 days of containing serum induced culture. The protein expression of Wnt3a, Lef-1 and β -catenin was detected after 10 days of containing serum induced culture. **Results** The ALP staining of cells in each group were positive. A large area of deep-dyed cells could be seen in the Yougui Pill group as compared with the Zuogui Pill group and control group. The alizarin red staining of cells in each group were positive. The number and size of mineralized nodules in the Yougui Pill group was superior to that in the Zuogui Pill group and control group. Comparing with the control group, the protein expressions of Lef-1 and β -catenin were significantly increased in the Zuogui Pill group and Yougui Pill group ($P < 0.05$). Comparing with the control group, the protein expression of Wnt3a was significantly increased in the Yougui Pill group ($P < 0.05$). The protein expressions of Lef-1, β -catenin and Wnt3a in the Yougui Pill group were significantly higher than those in the Zuogui Pill group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both Yougui Pill and Zuogui Pill can promote the osteogenic differentiation of rat adipose stem cells, but Yougui Pill shows a greater effect. Its mechanisms may be relevant to up-regulating proteins of Lef-1, β -catenin and Wnt3a and activating Wnt signaling pathway.

Keywords Zuogui Pill; Yougui Pill; Wnt signaling pathway; adipose stem cells; osteogenic differentiation; warm and supplement kidney yang

骨质疏松症是指以骨强度下降、骨折风险增高为特征的骨骼系统疾病^[1]。中医学认为,肾虚是骨质疏松症发病的核心病理基础,干细胞学说与中医学“肾藏精”理论存在很大相似性,二者分别从不同层面参与了人体的生长、发育以及衰老的整个过程^[2]。本研究在中医学理论指导下,选取滋补肾阴和温补肾阳的代表方剂左归丸及右归丸制备含药血清,观察两种药物对体外培养的脂肪干细胞(ASCs)成骨性分化功能的影响,旨在揭示中医药治疗骨质疏松症的深层次机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠30只,体重(200±10)g,雌雄不限,购自上海中医药大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016。

1.2 主要试剂与仪器

L-DMEM培养基、胎牛血清、胰酶(Gibco);双抗(Biowest);I型胶原酶(Sigma);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号:ES781);Wnt3a、淋巴增强因子-1(Lef-1)、 β -连环蛋白(β -catenin)兔抗大鼠多克隆抗体(CST);NBT/BCIP染色液、BCA蛋白测定试剂盒(Pierce,批号:NI177946);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、Tris-base(Applicam)。CO₂恒温培养箱(HERA);细胞超净台(Labconco);倒置荧光显微镜(Olympus)。

1.3 含药血清的制备、动物分组与给药

左归丸组成:山药12g,熟地黄24g,枸杞子12g,山萸肉12g,川牛膝9g,鹿角胶12g,龟甲胶12g,菟丝子12g;右归丸组成:山药12g,熟地黄24g,山萸肉9g,枸杞子12g,菟丝子12g,鹿角胶12g,杜仲12g,肉桂6g,当归9g,炮附片6g,以上药物剂量均为成人的临床日用量。将大鼠按照随机数字表法分为左归丸组、右归丸组及对照组,每组10只,大鼠灌胃药物浓度为7.55g/(kg·d),连续给药3天,对照组灌胃等量生理盐水。末次给药1h后采集腹主动脉全血,室温放置2h后离心(2000r/min,20min),上层血清56℃、30min灭活,0.22 μ m滤膜抽滤除菌,制备左归丸、右归丸和对照含药血清,分装后置于-80℃保存备用,各组含药血清干预细胞的体积分数为10%。

1.4 ASCs的体外分离培养

对照组大鼠处死后以75%乙醇擦拭皮毛进行消毒,沿腹股沟方向切开体表皮皮肤,取出白色脂肪组织,置入含双抗的PBS反复冲洗3次,清除肉眼可

见的血管及杂质。0.1%I型胶原酶中37℃消化脂肪组织30min,1000r/min离心10min,以L-DMEM(含体积分数10%FBS)将细胞重悬,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。24h后首次进行换液,以后每2天换液1次。细胞生长至80%汇合时传代,光镜下观察细胞形态学变化。ASCs成骨诱导方案:L-DMEM,0.01 μ M 1,25-(OH)₂D₃,10mM β -甘油磷酸钠,50mg/L抗坏血酸。

1.5 碱性磷酸酶(ALP)染色

第三代细胞以2×10⁴/ml密度接种于6孔板中,分为左归丸组、右归丸组和对照组,每组3个复孔。将体积分数10%的含药血清相应的加入成骨诱导培养基中,干预诱导细胞7天,弃掉细胞培养液,PBS清洗1次,4%中性多聚甲醛固定3min,NBT/BCIP染色液于室温下避光孵育30min,PBS清洗2遍,倒置相差显微镜下观察。

1.6 茜素红染色

第三代细胞以2×10⁴/ml密度接种于6孔板,分为左归丸组、右归丸组和对照组,每组3个复孔。将体积分数10%的含药血清相应的加入成骨诱导培养基中,干预诱导细胞28天,弃掉细胞培养液,PBS清洗1次,95%乙醇固定5min,PBS清洗2次,每孔加入1ml 0.2%茜素红-Tris-HCl避光孵育30min,PBS清洗1次,于倒置显微镜下观察。

1.7 蛋白免疫印迹法测定细胞 β -catenin、Lef-1、Wnt3a蛋白表达情况

第三代细胞以2×10⁴/ml密度接种于6孔板,分为左归丸组、右归丸组和对照组,每组3个复孔。用相应的含药血清干预诱导培养10天,RIPA裂解细胞,提取细胞总蛋白,以BCA蛋白测定试剂盒测定样本蛋白浓度,加入上样缓冲液定量分装,煮沸10min,经SDS-PAGE胶电泳后转膜,封闭1h,加入相应一抗(Wnt3a/Lef-1/ β -catenin)抗体孵育过夜;TBST洗膜3次。加入兔抗鼠二抗孵育1h,TBST洗膜3次,化学发光法检测不同样品 β -catenin、Lef-1、Wnt3a蛋白表达情况;经计算机图像分析仪扫描并行灰度值测定及分析。

1.8 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察结果

倒置显微镜下观察,接种初期培养液表面漂浮大量脂滴,大多数细胞约接种1h左右开始贴壁,折

光性良好,呈圆球状或短梭形。24 h 后首次更换培养液,PBS 清洗细胞培养皿以去除未贴壁细胞、脂滴及其他杂质。接种 48 h 后,多数细胞呈长梭形生长,增殖旺盛,形态一致。原代培养 72 h 后,细胞生长至汇合,呈漩涡状排列紧密。经多次传代后,细胞仍维持长梭状形态,增殖力旺盛,约 3 至 5 天即可生长至汇合,第 10 代以内的细胞未见明显衰老、凋亡或大量脂滴生成。

2.2 ALP 染色结果

ALP 染色结果显示,阳性细胞呈蓝黑色,细胞核呈圆形或卵圆形,位于细胞中央,胞质内亦可见蓝黑色深染颗粒,各组细胞成骨诱导后均有 ALP 阳性表达。右归丸组细胞大面积深染,明显强于左归丸组及对照组;而左归丸组与对照组比较则无明显差异。提示右归丸可显著提高 ASCs 成骨性诱导后的 ALP 表达,效果优于左归丸。

2.3 茜素红染色结果

第三代 ASCs 进行成骨性诱导后,细胞形态由长梭形逐渐变得宽大,继续诱导后,细胞形态逐渐不规则,堆积如铺路石状。连续加药诱导 28 天,可见细胞呈现重叠生长,局部细胞堆积成密集的团块状,逐渐形成钙结节,茜素红染色后可见橘红色的矿化结节,证实该细胞具备成骨细胞特性,符合干细胞可定向分化的基本特征。各组染色后比较,左归丸组及右归丸组的钙结节无论在数量或大小上,均高于对照组;右归丸组与左归丸组相比,矿化结节数量无明显差异,而右归丸组的结节普遍大于左归丸组。提示左归丸和右归丸均可提高 ASCs 成骨性诱导后的矿化结节形成率,而右归丸略强于左归丸。

2.4 各组细胞 β -catenin、Lef-1、Wnt3a 蛋白表达比较

表 1 示,左归丸组及右归丸组 β -catenin、Lef-1 蛋白表达均较对照组升高 ($P < 0.05$);右归丸组 Wnt3a 蛋白表达亦较对照组升高 ($P < 0.05$),而左归丸组 Wnt3a 蛋白表达与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。右归丸组 β -catenin、Lef-1、Wnt3a 蛋白表达亦高于左归丸组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组细胞 β -catenin、Lef-1、Wnt3a 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	β -catenin/ GAPDH	Lef-1/ GAPDH	Wnt3a/ GAPDH
对照组	3	0.920 $\pm$ 0.060	0.335 $\pm$ 0.050	1.075 $\pm$ 0.117
左归丸组	3	1.283 $\pm$ 0.112*	0.846 $\pm$ 0.043*	1.048 $\pm$ 0.069
右归丸组	3	5.802 $\pm$ 0.031* Δ	1.470 $\pm$ 0.090* Δ	1.622 $\pm$ 0.060* Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与左归丸组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

原发性骨质疏松症又称为退行性骨质疏松症,步入老年后患者多表现为低转换型骨质疏松,骨形成和骨吸收均不活跃。目前临床治疗骨质疏松症的药物大多是基础钙制剂、维生素 D 及抗骨吸收类药物,然而老年人的骨重建能力已经很低,对于本身并不活跃的骨吸收,单纯给予钙剂和抑制溶骨很难从根本上改善已经疏松的骨质状况,因此治疗上应着重于促进骨形成,同时兼顾抑制骨吸收,从而使骨重建达到新的平衡。

中医学认为,肾为先天之本,主骨藏精生髓;肾虚则精亏髓空、骨骼失养,导致“骨痿”的发病。左归丸、右归丸均源自《景岳全书》。左归丸可滋肾补阴,临床上多用于真阴不足之肾虚证;右归丸可温补肾阳、填精止遗,临床上常用于肾阳不足之证;二者共用多味中药,而右归丸实则为左归丸去掉其中部分滋阴药物后再增加若干温阳药物而成。现代医学理论认为,成骨细胞和破骨细胞是骨组织中非常重要的两类骨细胞。成骨细胞的功能为合成和分泌细胞外基质、促进骨基质的矿化、参与破骨细胞性骨吸收的调控及维持骨代谢平衡^[3];而破骨细胞是一类高度分化的多核细胞,其主要功能为吸收骨。随着基础研究的不断深入,研究者们已经逐渐认识到,成骨细胞和破骨细胞之间的信号联系形成了最小的功能单元^[4]。综上,我们认为成骨细胞与破骨细胞的联系可以在中医阴阳学说中得到阐述,根据二者的功能特点可将成骨细胞划分为阳,破骨细胞则归属于阴,二者之间的信号传递类似于阴阳之间的互根、消长与转化,此推论已在前期的基础研究中得到证实^[5]。成骨细胞主要由间充质干细胞分化而来,先后经历细胞增殖、基质分泌、基质成熟和矿化形成四个阶段来完成成熟分化的过程^[6]。故在本研究中,我们选取易于取材、增殖旺盛的脂肪间充质干细胞作为研究对象,探讨左归丸和右归丸对脂肪干细胞向成骨性分化过程调控的差异及相关机理。

Wnt 信号通路在整个成骨分化过程中扮演重要角色。当 Wnt 蛋白与低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 或 6(LRP5/6)、跨膜受体 Frizzled 结合后,受体复合物使胞质内的 Dishevelled(Dsh)高度磷酸化,从而切断 β -catenin 的降解途径,抑制 β -catenin 蛋白降解,使其大量聚集后进入核内,与核内转录因子(TCF/LEF)相互作用,最终启动下游靶基因的转录和表达,调节成骨细胞的增殖分化,影响骨形成^[7]。

现有的 Wnt 信号通路相关研究很多,然而大量关于经典 Wnt 信号通路对于间充质干细胞成骨分化调控作用的研究结果却是相互矛盾的。Cho 等^[8]研究表明,Wnt3a 过表达后可抑制间充质干细胞的成骨分化;但也有研究表明^[9],经典 Wnt 通路的激活可以促进骨髓间充质干细胞(hMSC)的成骨分化。目前较为公认的观点是经典 Wnt 信号通路对骨形成的作用因靶细胞分化程度的不同而有所差别,当间充质干细胞已启动成骨方向的定向分化后,经典 Wnt 信号通路的作用是正向的,而在分化的终末阶段又对成骨细胞的最终分化成熟产生抑制^[10-11]。本研究中蛋白检测的时间点为 10 天,脂肪干细胞已处于定向成骨分化阶段,Wnt 通路对其有正向调节作用。实验结果表明,左归丸和右归丸均可上调成骨诱导后 ASCs 中 β -catenin、Lef-1 及 Wnt3a 蛋白,但右归丸的作用效果更为显著。ALP 染色结果也提示,右归丸可显著提高 ASCs 成骨分化早期的 ALP 表达量。从理论上讲,经典 Wnt 通路对成骨细胞的最终分化成熟有负调节的作用,然而本研究中茜素红染色结果显示,右归丸组的矿化结节在数量及大小上均优于其他两组,这表明右归丸可明显促进成骨细胞的成熟及矿化,因此我们推测温肾阳中药可能是通过其他途径来完成对成骨细胞最终矿化成熟的促进作用。

参考文献

- [1]侯建明,蓝旭华,吴晖南,等.近 5 年国内外骨质疏松症诊疗指南比较[J].中华关节外科杂志,2012,6(3):472-478.
- [2]沈自尹,黄建华.从淫羊藿激活内源性干细胞探讨“肾藏精”的科学涵义[J].中医杂志,2010,51(1):8-10.
- [3]Graham JM, Ayati BP, Holstein SA, et al. The role of osteocytes in targeted bone remodeling: a mathematical model[J]. PLoS One, 2013, 8(5): 63884.
- [4]Roux S. New treatment targets in osteoporosis[J]. Joint Bone Spine, 2010, 77(3): 222-228.
- [5]石印玉,詹红生,赵咏芳,等.补肾中药防治原发性骨质疏松症的细胞学研究[J].中医杂志,2001,42(10):621-623.
- [6]Sharma AR, Choi BS, Park JM, et al. Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway[J]. Indian J Biochem Biophys, 2013, 50(1): 19-25.
- [7]Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(4): 634-664.
- [8]Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, et al. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells[J]. Tissue Eng, 2006, 12(1): 111-121.
- [9]Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, et al. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(11): 1720-1731.
- [10]Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, et al. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2): 568-579.
- [11]Kahler RA, Yingst SM, Hoepfner LH, et al. Collagen 11a1 is indirectly activated by lymphocyte enhancer-binding factor1 (Lef1) and negatively regulates osteoblast maturation[J]. Matrix Biol, 2008, 27(4): 330-338.

(收稿日期:2013-03-15;修回日期:2013-06-05)

[编辑:邓媛]

读者·作者·编者

稿件中数字的用法

用于表示数量的数字一般应使用阿拉伯数字。在表示数值的范围时,可采用浪纹式连接号“~”或一字线连接号“—”。前后两个数值的附加符号或计量单位相同时,在不造成歧义的情况下,前一个数值的附加符号或计量单位可省略。如果省略数值的附加符号或计量单位会造成歧义,则不应省略。如:—36~—8℃、100~150 kg、2 亿~3 亿(不写为 2~3 亿)、15%~30% (不应写作 15~30%)、 $4.5 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^4$ (不应写作 $4.5 \sim 5.5 \times 10^4$)。

年月日的表达顺序应按照年月日的自然顺序书写,如 2008 年 8 月 8 日,2008—08—08。8 月 8 日不宜应写作“8—8”,2008 年 8 月不应写作“2008—8”,1990 年不应写作“90 年”。时间的表示既可采用 12 小时制,也可采用 24 小时制。时分秒的表达顺序应按照口语中时、分、秒的自然顺序书写,如 15 时 40 分,下午 2 时 12 分 36 秒,或写作 14:12:36。

在某些特定情况下应使用汉字数字。干支纪年、农历月日、历史朝代纪年及其他传统上采用汉字形式的非公历年等,应采用汉字数字,如丙寅年三月十五日,正月初八,清咸丰十年九月二十日,日本庆应三年。数字连用表示的概数、含“几”的概数应采用汉字数字,如三四个、四十五六岁、二十几、几分之一。数字作为词素构成定型词、词组、惯用语、缩略语或具有修辞色彩的词句,应使用汉字,如一氧化碳,“十一五”规划,十二指肠等。