

- [8] 曹云台, 郭立伟, 施栋磊, 等. 陶瓷膜应用于中药精制的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 314-317.
- [9] 董艳, 高瑞昶, 潘勤, 等. 超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 359-363.
- [10] 陈舜华. 应用超滤膜精制中药制剂的实验研究 [J]. 净水技术, 2004, 23(2): 16-18.
- [11] 李应东. 当归、红芪及其合剂超滤膜提取物促缺血心肌血管新生的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2005.
- [12] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cell [J]. *Circ Res*, 1982, 50: 101-116.
- [13] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 283-286.
- [14] 张红波, 万亚涛, 王莲哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(14): 228-229.
- [15] Latchman D S. Heat shock proteins and cardiac protection [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51: 637-646.
- [16] Jiang B, Xiao W, Shi Y, et al. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells [J]. *Cell Stress Chaper*, 2005, 10(3): 252-262.

龟板提取物上调维生素 D 受体表达促骨髓间充质干细胞向成骨分化

侯秋科¹, 吴静¹, 易香华¹, 陈东风^{1,2*}, 周健洪¹, 李伊为^{1*}

(1. 广州中医药大学 解剖学教研室, 广东 广州 510405; 2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要:目的 探讨龟板提取物诱导大鼠骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 向成骨分化和对维生素 D 受体 (VDR) 表达的影响。方法 从大鼠骨髓中分离 MSCs, 体外培养, 利用流式细胞术检测 MSCs 表面抗原 CD44 细胞标志, 体外培养 MSCs 分成不同的组观察其向成骨分化, 在培养基中不加任何处理的作为对照组, 培养基中加成骨诱导液诱导 MSCs 向成骨分化作为阳性对照组, 龟板提取物组在培养基中加龟板提取物, 诱导 7 d 后, 通过免疫化学染色、Western blotting、原位杂交、RT-PCR 等方法观察龟板提取物对原代培养的 MSCs 向成骨分化的成骨分化标记分子碱性磷酸酶 (ALP)、骨桥蛋白 (OPN) 及 VDR 阳性表达及 VDR mRNA 的表达情况。结果 免疫组化染色显示, 龟板提取物组成骨分化标记分子 ALP、OPN 和 VDR 的阳性百分比明显高于对照组, Western blotting 结果也显示龟板提取物组的 ALP、OPN 和 VDR 的蛋白表达水平高于对照组; 同时原位杂交、RT-PCR 结果表明, 龟板提取物诱导 MSCs 向成骨分化过程可明显促进 VDR mRNA 的表达。结论 龟板提取物可促 MSCs 向成骨分化, 其机制可能与 VDR 的上调有关。

关键词: 龟板提取物; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 维生素 D 受体

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0607-06

Induction of *Plastrum testudinis* extract to mesenchymal stem cells differentiation into osteoblast through up-regulating expression of vitamin D receptor

HOU Qiu-ke¹, WU Jing¹, YI Xiang-hua¹, CHEN Dong-feng^{1,2*}, ZHOU Jian-hong¹, LI Yi-wei¹

(1. Department of Anatomy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract : Objective To investigate vitamin D receptor (VDR) mechanism implicated in the osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by *Plastrum testudinis* extracts (PTE). **Methods** MSCs were dissociated from rat bone marrow and were marked using the expression of CD44 by the flow cytometry (FCM). MSCs Cultured *in vitro* were divided into different groups for the effects of MSCs differentiation into osteoblast, MSCs seeded in culture medium without treatment served as controls, MSCs seeded in culture medium with osteo-induction treatment served as positive controls, PTE was added and the cells were incubated for 7 d. Then immunohistochemistry, Western-blotting, *in situ* hybridization, and RT-PCR were applied to observing the expression of the osteoblast differentiation specific marker (ALP, OPN) as well as the VDR and VDR mRNA expression. **Results** Immunohistochemistry

收稿日期: 2009-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472272, 30772861)

作者简介: 侯秋科 (1983—), 女 (壮族), 广西柳州人, 研究生在读, 研究方向为中医药调控神经干细胞防治重大神经疾病。

Tel: (020) 36585448 E-mail: houqiuke@126.com

*通讯作者 陈东风 Tel: (020) 36588581 E-mail: cdf27212@21cn.com

results demonstrated that the percentages of ALP, OPN, and VDR positive cells in the PTE group were markedly higher than those in the control group. The Western-blotting also illustrated that the expressing of ALP, OPN, and VDR in the PTE group was higher than that in the control group. In parallel, *in situ* hybridization and RT-PCR results showed that the expression of VDR mRNA was significantly increased during the osteoblast differentiation of MSCs induced by PTE. **Conclusion** The PTE could promote MSCs differentiation into osteoblast, which might be associated with the up-regulation of VDR.

Key words: *Plastrum testudinis* extract (PTE); mesenchymal stem cells (MSCs); osteoblastic differentiation; vitamin D receptor (VDR)

骨组织缺损的修复中所采用的方法大都存在供骨区严重创伤及植骨区骨吸收等问题,而近年来骨组织工程为修复各类型骨组织缺损开拓了更广阔的前景。种子细胞是骨组织工程的三要素之一,选择合适的种子细胞是骨组织工程至关重要的环节。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是指存在于骨髓基质中的非造血干细胞,具有向多个方向分化的潜能^[1-4],已成为当前研究的热点,经适当的诱导可以分化为有成骨潜能的细胞。大量的研究表明多种中药对干细胞的定向分化有调控作用^[5,6],前期研究表明:龟板提取物及含药血清可促进体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞增殖^[7,8],这可能与龟板促 MSCs 增殖有关^[8,9],经长时间龟板含药血清诱导后也可以有效诱导 MSCs 向成骨分化^[10],龟板提取物还能够修复氧化损伤的骨髓间充质干细胞^[11]。但是龟板诱导 MSCs 向成骨分化的活性成分、物质基础不清楚。前期研究结果表明龟板提取物的化学成分含有脂肪酸类、脂肪酸酯类、甾体等 3 大类^[12]。本实验进一步探讨龟板提取物诱导 MSCs 向成骨分化的潜能及与维生素 D 受体 (VDR) 的关系,为阐明龟板的物质基础及药理效应提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物:清洁级 SD 大鼠 10 只,220~250 g,雄性,月龄 1~4 个月,由广州中医药大学实验动物中心提供 (粤检证字 2003A010 号)。

1.2 试剂与仪器:低糖 DMEM 培养基 (low glucose dulbecco's modified eagle's medium, L-DMEM)、Percoll 贮存液和胎牛血清 (FBS) 为 Gibco 公司产品;CO₂ 孵箱,德国 Heraeus 公司产品;倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司产品;碱性磷酸酶 (ALP)、骨桥蛋白 (OPN) 和 VDR 免疫组织化学 ABC 试剂盒由武汉博士德公司提供;一抗 ALP、OPN、VDR 由武汉博士德公司提供;二抗羊抗兔 IgG HRP 由武汉博士德公司提供;超敏发光液由北京普利莱公司提供;VDR mRNA 原位杂交试剂盒、

原位杂交专用盖玻片、DAB 染色试剂盒均购自武汉博士德公司;成骨诱导培养液:含地塞米松 0.1 μmol/L、维生素 C 50 μg/mL、10 mmol/L β-甘油磷酸钠。Trizol (Invitrogen 公司);德国 QIA GEN 公司 RT-PCR 试剂盒。CD44 细胞流式试剂盒:展晨公司产品。

1.3 龟板提取物的制备^[12]:将龟板 (购于广州市药材中心) 低温粉碎成粗粉,95% 乙醇渗漉法提取,回收溶剂得到乙醇提取物,应用石油醚、醋酸乙酯递增极性溶剂洗脱,得到龟板提取物。龟板提取物的化学成分含有十六酸甲酯 12.35%、十六酸 15.85%、十六酸乙酯 12.44%、十八酸甲酯 12.77%、十八酸 15.56%、十八酸乙酯 20.64%、甾醇 3.35%、十四酸甾醇脂 3.75%、甾酮 3.38%。龟板提取物不溶于水,二甲基亚砷溶解后配制成不同浓度的溶液。

1.4 MSCs 分离、体外扩增与鉴定^[13]:将大鼠股骨、胫骨骨髓用 DMEM 冲出,充分混匀,转入离心管,300 ×g 离心 10 min,去上清,L-DMEM 重悬,离心去上清后,加 4 mL L-DMEM 混匀。Percoll 贮存液按 0.56:0.44 混合,取 4 mL 放入 10 mL 离心管内,吸骨髓液在液面 2 cm 处贴管壁缓缓加入。水平离心机 900 ×g 离心 30 min,收集单核细胞层,用 DMEM 洗涤两次。然后计数细胞,调整密度,按 1 ×10²/cm² 密度接种,37℃、5% 饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养,培养液为含 10% FBS 的 L-DMEM,5 d 后更换培养液,弃去未贴壁细胞,3~4 d 换液 1 次,接近融合的 MSCs 用含 0.25% 胰酶室温消化 2~3 min,按 1 ×10⁴/cm² 传代。培养 3 代后,取出进行流式细胞技术检测。

1.5 MSCs 的诱导分化培养:传 3 代的 MSCs 以 1 ×10⁵/cm² 细胞密度接种于 24 孔培养板及 6 孔板,阳性对照组加成骨诱导培养液,龟板提取物高剂量组加入 30 μg/mL^[10] 提取物,龟板提取物低剂量组加入 3 μg/mL 提取物,对照组不加任何处理因素,每 3 天换液 1 次,诱导 7 d。

1.6 免疫组织化学检测:参照试剂盒操作方法,7 d 后,用免疫组化方法检测 MSCs 的 ALP、OPN 和 VDR 的阳性表达。将 24 孔板中的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min;用 0.01 mol/L PBS 液洗 3 次,每次 5 min;新鲜配制 3% H₂O₂,室温浸泡 5~10 min;用 0.01 mol/L PBS 液洗;滴加正常山羊血清,封闭 30 min;将血清洗净,分别滴加一抗 OPN、ALP 和 VDR,恒温下(37℃)孵育 2 h;用 0.01 mol/L PBS 液洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素化羊抗兔 IgG 室温下 30 min;用 PBS 液洗;滴加 SABC,室温 30 min;用 0.01 mol/L PBS 液洗;DAB 显色,室温下 20 min;用 0.01 mol/L PBS 液洗;脱水、透明,中性树脂封片。对照组分别用正常山羊血清和 PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同其他组。

1.7 原位杂交:24 孔板培养 7 d 后细胞爬片,4% 多聚甲醛(含 DEPC)固定 30 min,新鲜配制 3% 过氧化氢-甲醇溶液避光 10 min,3% 枸橼酸 1 mL + 胃蛋白酶 2 滴消化 10 min,预杂交液 38℃ 于 20% 的甘油湿盒内孵育 3 h,杂交液 38℃ 孵育过夜;生物素化羊抗地高辛 37℃ 孵育 1 h,SABC-POD 37℃ 孵育 30 min,生物素化过氧化物酶 37℃ 孵育 30 min。DAB 显色约 10 min,时间可根据显色情况掌握。水洗,脱水封片。阴性对照分别用不含探针的杂交缓冲液取代含探针的杂交液,及用正常羊血清取代羊抗地高辛抗体 IgG 进行孵育。每组随机取 5 张阳性细胞染色爬片,在显微镜下(×20)随机选 10 个视野对每张爬片 VDR 阳性细胞计数,取其平均值。

1.8 Western blotting 检测 ALP、OPN 和 VDR 蛋白表达:将诱导 7 d 后的细胞裂解,提取细胞总蛋白,分装后,取 50 μL,加入 6×蛋白质样品缓冲液(5:1)混匀,在 100℃ 水浴中煮沸 5 min,各组取 10 μL 在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳后,电转至 PVDF 膜,TTBS 洗 5 min,共 3 次,5% 脱脂牛奶封闭 30 min,分别加兔抗 ALP 和 VDR 多克隆抗体(1:1000)。4℃ 过夜,TTBS 洗 5 min,共 4 次,分别与 HRP 标记的二抗羊抗兔 IgG(1:10000)室温下振荡孵育 1 h,TTBS 洗 10 min,共 4 次,加超敏发光液反应 5 min,在暗室中曝光,后在显影液和定影液中冲洗胶片,显像后观察结果。

1.9 RT-PCR 检测 VDR mRNA 表达:提取对照组、成骨诱导组、龟板提取物组细胞基因组,总 RNA 按照 Trizol 试剂盒说明书进行;RT-PCR 参照 Genbank 的 cDNA 序列,采用 Primer Premier

5.0 软件设计引物,由上海英骏公司合成。VDR 上游引物:5'-GGAACGTGCCCCGAATCTGC-3',下游引物:3'-CACCCCACTCCACGAACTG-5'。GAPDH 上游引物:5'-TAAAGGGCATCTGGGCTACACT-3',下游引物:5'-TTACTCCTTGAGGCCATGTAGG-3'。反应条件为:93℃、2 min,然后 93℃、45 s,63℃、30 s,共 30 个循环。反应结束后,取 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳。VDR 和 GAPDH 反应条件相同。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以图像分析仪进行吸光度扫描。

1.10 统计学处理:每张切片随机选取 10 个 200 倍视野,计算其中阳性细胞数和总细胞数,求出百分比,所有数值应用 SPSS 10.0 统计软件采用方差分析检验。

2 结果

2.1 流式细胞技术检测结果:培养所得到的 MSCs 利用流式细胞术检测细胞表面抗原 CD44 细胞标志,结果发现 CD44 阳性细胞达到 98.14% (图 1)。

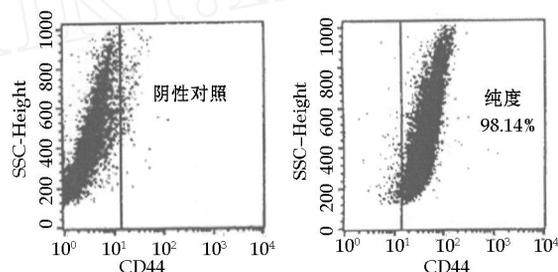


图 1 流式细胞术检测 MSCs 细胞表面抗原 CD44 细胞标志

Fig. 1 Detection of MSCs for cultured cell homogeneity CD44 by FCM

2.2 免疫组织化学结果

2.2.1 成骨标记物 OPN 和 ALP 的免疫组化染色结果:成骨诱导组和龟板提取物低剂量组、高剂量组的阳性细胞数明显多于对照组的阳性细胞数 ($P < 0.05$);而龟板提取物高剂量组的阳性细胞数多于低剂量组,低剂量组又稍多于成骨诱导组。结果显示成骨诱导组促 OPN 和 ALP 的表达,而龟板提取物高剂量组促 OPN 和 ALP 表达作用较强 (图 2)。

2.2.2 VDR 的免疫组化染色结果:成骨诱导组和龟板提取物低剂量组、高剂量组的阳性细胞数明显多于对照组的阳性细胞数 ($P < 0.05$);而龟板提取物高剂量组的阳性细胞数多于低剂量组,低剂量组又稍多于成骨诱导组。结果显示成骨诱导组促 VDR 的表达,而龟板提取物高剂量组促 VDR 表达较成骨诱导组强 (图 3)。

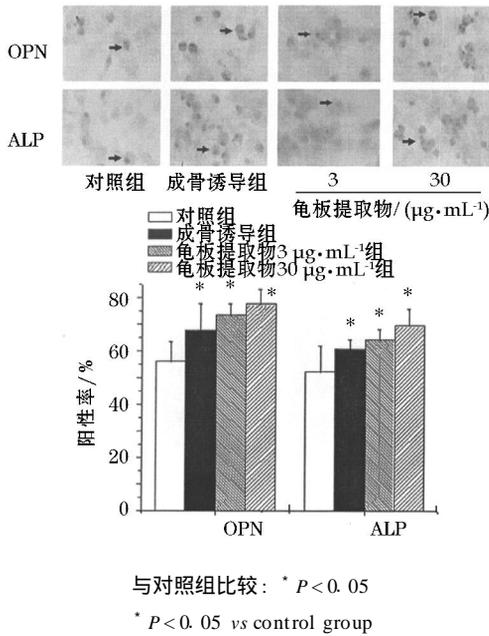


图 2 MSCs 成骨标记物 OPN 和 ALP 免疫组化染色结果

Fig. 2 Results of immunohistochemistry stain of OPN and ALP in MSCs

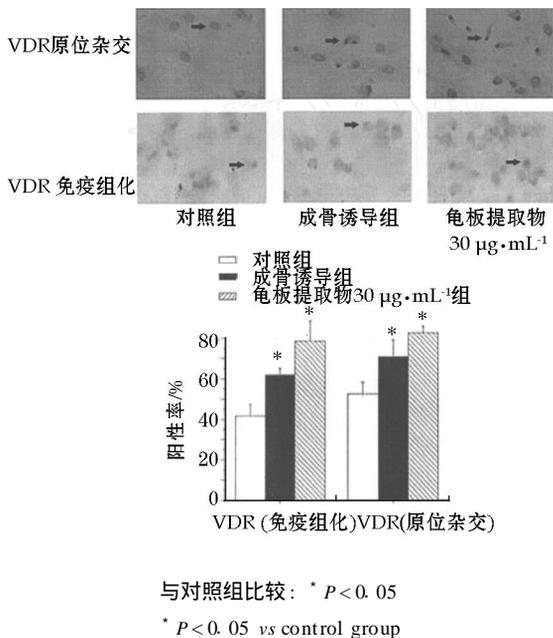


图 3 MSCs 中 VDR 阳性表达 (免疫组化染色) 和 VDR 原位杂交结果

Fig. 3 Results of VDR positive expression (immunohistochemistry stain) and VDR determined by in situ hybridization in MSCs

2.3 VDR 的原位杂交结果:与对照组相比,成骨诱导组和龟板提取物组的阳性细胞数明显增多 ($P < 0.05$);龟板提取物组呈明显强阳性且阳性细胞数又比成骨诱导组的多 (图 3)。

2.4 Western blotting 检测 ALP、OPN 和 VDR 蛋白的表达:成骨诱导组的 ALP、OPN (图 4) 和

VDR (图 5) 蛋白的表达水平均高于对照组,而龟板提取物组的 ALP、OPN、VDR 蛋白表达水平又高于成骨诱导组 (图 4)。

2.5 RT-PCR 结果:成骨诱导组的 VDR mRNA 表达升高,与对照组相比有显著差异;龟板提取物组的 VDR mRNA 的表达比成骨诱导组升高。半定量结果以 VDR 与 GAPDH 的比值表示 (图 5)。

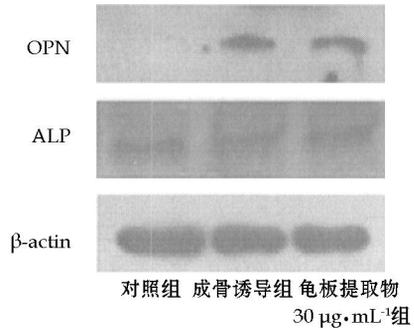


图 4 Western blotting 检测 MSCs 中 ALP 和 OPN mRNA 表达结果

Fig. 4 Results of ALP and OPN mRNA expression in MSCs determined by Western blotting

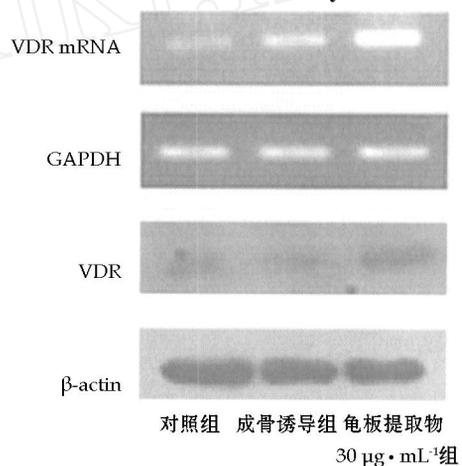


图 5 MSCs 中 VDR mRNA 和蛋白表达

Fig. 5 mRNA and protein expression of VDR in MSCs

3 讨论

骨髓间充质干细胞 (MSCs) 是一类来源于中胚层的未分化的间充质干细胞,它能分化为中胚层的多种成熟组织细胞,如脂肪、肌肉、骨和软骨等^[14]。MSCs 获取容易、创伤微小,具有无限扩增和多分化潜能,因自体移植不存在免疫排斥反应而受到医学研究者的青睐。同时, MSCs 作为骨组织工程最有希望和潜力的种子细胞,是目前研究最多的干细胞之一。开发促进 MSCs 向成骨细胞分化的新药已成为当前研究的热点。以中医“肾主骨髓”的理论为指导依据,前期实验已发现 MSCs 在

龟板含药血清诱导作用下,可向成骨细胞方向分化,表现为 ALP 活性升高^[10]。在成骨细胞系中 ALP 的表达作为成骨活动是否活跃的一种标志,MSCs 的 ALP 的活性越高,说明它向成骨细胞分化的程度越高;成骨细胞标记物 OPN 也是成骨分化的标志。本实验用流式细胞技术检测的 MSCs 的纯度,CD44 是 MSCs 的重要标记物,免疫组化结果显示龟板提取物能增加 MSCs 定向成骨分化标记物 ALP、OPN 阳性表达,Western blotting 结果显示龟板提取物组的 ALP、OPN 和 VDR 的蛋白表达水平明显高于对照组。中医补肾药龟板的化学成分复杂,其中发现龟板的醋酸乙酯部位分离出来的成分含有与成骨诱导剂地塞米松类似的甾类成分,甾类化合物主要是甾醇脂和甾酮类^[15]。当前,有机小分子具有促进干细胞增殖与分化的作用的研究引起人们的普遍关注。近期报道龟板提取物具有促进 MSCs 增殖的作用,进一步表明有机小分子对干细胞的增殖与分化的作用对发展细胞工程、组织构建以及基因治疗等方面具有重要意义^[16,17]。

核受体 (nuclear receptor, NR) 是一类在生物体内广泛分布的、配体依赖的转录因子,其成员众多,构成了一个大家族,可分为 3 大类:类固醇激素受体、非类固醇激素受体和孤儿核受体。VDR 作为亲核蛋白,属于类固醇激素/甲状腺激素受体超家族成员,是钙平衡和骨代谢的主要调节因子。VDR 是介导 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 发挥生物效应的核内生物大分子,具有抗增殖、促分化的作用。另外,VDR 可参与许多基因的转录调控,与影响成骨分化中有着密切的联系。MSCs 具有多向分化潜能,体外培养时只有一部分能自动分化成骨,其成骨分化很大程度上依赖诱导条件,其中基本的辅剂为地塞米松 (Dex)、-甘油磷酸钠 (-GP) 和维生素 C (Vit C)^[18]。Dex 可诱导 MSCs 分化表达骨钙素 (OCN),增强骨桥素 (OP) 和 I 型胶原 (Col I) mRNA,同时还可以调节成骨样细胞合成胰岛素生长因子 (IGFs) 和促进胶原合成的作用,刺激其 AKP 活性。-GP 提供磷离子作为 AKP 作用的底物,诱导和激活 AKP,促进有机磷向无机磷转化,并加速钙盐沉着。Vit C 可通过多种途径如基因转录、羟基化以及前胶原形成等刺激细胞外胶原基质的生物合成,含胶原的细胞外基质合成是诱导成骨的必须要求,研究证实^[19],Vit C 可诱导骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 的 AKP 活性,促进成骨标记蛋白 mRNA 的表达、钙的沉积、矿化结节的形

成。Vit C 诱导成骨是在 Col I 形成的基础上可能继发激活 BMPs 的信号转导途径,或通过整合素 $\alpha_2\beta_1$ (胶原特异性受体) 与胶原作用,激活局部黏合酶及丝裂原活化的蛋白激酶通道 (MAPK) 所致。在 Vit C 存在时,-GP (5 mmol/L) 对 AKP 的活性增加无明显作用,对于 Vit C 与 -GP 的协同作用还有待进一步研究。同时通过研究 VDR 基因敲除小鼠发现,Vit C 的大多数生物学作用是通过 VDR 介导的,VDR 缺陷可引起多种疾病的发生^[20]。免疫组化结果显示龟板提取物能增加 VDR 的阳性细胞数,Western blotting 结果显示龟板提取物组的 VDR 的蛋白表达水平明显高于对照组,原位杂交表明龟板醋酸乙酯部位能增加 VDR 的阳性细胞数,同时 RT-PCR 亦表明龟板提取物能上调 MSCs 定向成骨分化过程 VDR mRNA 的表达水平。

综上所述,龟板提取物促进 MSCs 向成骨分化可能与其内的小分子脂肪酸类、脂肪酸酯类、甾体直接进入细胞膜作用内部核受体有关。龟板提取物可上调 MSCs 定向成骨分化过程中 VDR 的表达,这在一定的程度上揭示龟板促进 MSCs 定向成骨分化的可能机制。

参考文献:

- [1] Chen D, Ji X, Harris M A, et al. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 295-305.
- [2] Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture human mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 295-312.
- [3] Coelho M J, Fernandes M H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(11): 1095-1102.
- [4] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [5] 胡俊,黄秀榕,祁明信,等. 中药诱导干细胞定向分化的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 147-149.
- [6] 胡军祥,申屠垠,殷舒,等. 中药对间质干细胞分化为神经细胞的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(15): 783-785.
- [7] Chen D F, Zeng H P, Du S H, et al. Extracts from *Plastrum testudinis* promote proliferation of rat bone-marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40: 196-212.
- [8] 周健洪,陈东风,黎辉,等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(1): 40-43.
- [9] 黎晖,李春,陈东风,等. 龟板含药血清促进骨髓间充质干细胞骨形态发生蛋白 4 的表达 [J]. 解剖学报, 2007, 38(3): 304-309.
- [10] 黎晖,周健洪,陈东风,等. 龟甲对大鼠骨髓间充质干细

- 胞向成骨分化的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16 (3): 1-4.
- [11] 李熙灿, 谢学明, 黄春花, 等. 龟板提取物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复及其抗脂质过氧化作用 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1043-1046.
- [12] 陈薇, 曾和平, 王春燕, 等. 中药龟板提取物化学成分及其调控鼠骨髓间充质干细胞 (rMSCs) 增殖活性的实验研究 [J]. 化学学报, 2007, 65(3): 265-270.
- [13] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cell [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
- [14] Service R F. Tissue engineers build new bone [J]. *Science*, 2000, 289: 1498-1450.
- [15] Zeng H P, Wang T T, Yang X H, et al. 8-Hydroxyquinoline derivatives induced the proliferation of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 5446-5450.
- [16] Carvey P M, Ling Z D, Sortwell C E, et al. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2001, 171(1): 98-108.
- [17] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cell [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
- [18] Bruder S P, Jaiswal N, Haynesworth S E, et al. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 278-294.
- [19] Ostuka E, Yamaguchi A, Hirose S, et al. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(46): C132-C138.
- [20] Holick M F. Vitamin D: A millennium perspective [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(2): 296.

委陵菜黄酮对正常小鼠及四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖与血脂的影响

乔卫, 赵川, 卢滨, 张彦文, 段宏泉*

(天津医科大学药学院 基础医学研究中心, 天津 300070)

摘要:目的 研究委陵菜黄酮对正常小鼠及四氧嘧啶糖尿病模型小鼠血糖、血脂的影响。方法 以四氧嘧啶制备糖尿病小鼠模型, 糖尿病小鼠分别给予反式和顺式委陵菜黄酮, 按照不同剂量连续给药 15 d, 采血测量空腹血糖, 测定血清甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC) 水平; 并观察各组小鼠胰腺组织病理学的改变。结果 委陵菜黄酮可显著降低实验性糖尿病小鼠的血糖、TG 和 TC 水平, 且胰腺组织病理学较模型组均有不同程度的改善。结论 委陵菜黄酮对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠具有降血糖和降血脂的作用, 但对正常小鼠的血糖、血脂没有影响。

关键词:委陵菜黄酮; 糖尿病; 血脂

中图分类号: R286.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0612-03

委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser., 别名翻白草、白头翁、痢疾草等, 属蔷薇科委陵菜属, 为多年生草本, 全草及根入药。有清热润燥, 凉血解毒, 止血消肿, 止痢之功效; 多用于治疗痢疾、疟疾、痈肿、各种出血^[1]。临床上多以其单方或复方治疗糖尿病, 此外委陵菜还有抗菌, 增强免疫的作用。

本课题组前期已经从委陵菜中分离筛选出具有抗糖尿病作用的活性成分: 椴树苷 (tiliroside^[2]), 委陵菜黄酮, 反式和顺式委陵菜黄酮, 即山柰酚-3-O-D-(6-O-trans-对羟基桂皮酰基) 葡萄糖苷和山柰酚-3-O-D-(6-O-cis-对羟基桂皮酰基) 葡萄糖苷^[3,4]。本实验拟研究这两种委陵菜黄酮对正常小鼠及四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖、血脂的影响, 并

探讨其作用机制, 以阐明委陵菜的物质基础。

1 材料

1.1 实验动物: 昆明种小鼠, 雌雄兼用, (24 ± 2) g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(军) 2002-001。实验前在实验室适应饲养 1 周, 室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 65% ~ 70%。日光照 12 h, 自由饮食、摄水。

1.2 药品、试剂与仪器: 顺式和反式委陵菜黄酮, 自制, 高效液相色谱法测定其质量分数分别为 94.7%、98.4% (峰面积归一化法), 四氧嘧啶 (Sigma 公司), 盐酸二甲双胍片 (天津太平洋制药公司, 批号 061104)。甘油三酯 (TG) 试剂盒、总胆固醇 (TC) 试剂盒 (中生北控生物科技有限公司)。血糖

收稿日期: 2009-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772635); 天津市自然科学基金资助项目 (07GCZDJ C05100)

作者简介: 乔卫 (1968—), 女, 天津人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药药理学研究。

Tel: (022) 23529181 E-mail: qiaowei@tjmu.edu.cn

*通讯作者 段宏泉 Tel: (022) 23542018 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn