

淫羊藿水提取物对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化的影响及其机制

杨 丽¹, 朱晓峰², 王攀攀², 黄 丰¹, 张荣华^{1*}

1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

2. 暨南大学附属第一医院, 广东 广州 510630

摘 要: **目的** 观察淫羊藿水提取物对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 骨向分化能力及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 表达的影响, 阐释其防治骨质疏松症的作用机制。 **方法** 全骨髓贴壁法分离、纯化大鼠 MSCs; 以碱性磷酸酶 (ALP) 活性及 ALP 染色阳性率确定淫羊藿水提取物促 MSCs 骨向分化的最佳质量浓度, 并以该质量浓度进行 MSCs 骨向分化实验。按是否添加经典成骨诱导液将大鼠分为对照组、成骨诱导剂组、淫羊藿水提取物 (500 $\mu\text{g/mL}$) 组、淫羊藿水提取物 (500 $\mu\text{g/mL}$) + 成骨诱导剂组, 每 3~4 d 各组更换含相应物质培养液 1 次, 连续干预 14 d。通过检测各组 ALP、I 型胶原 (Col I)、骨钙素 (BGP) 和钙化结节等骨向分化指标的变化, 以评价淫羊藿水提取物对 MSCs 骨向分化能力的影响; 通过检测 TGF- β_1 、BMP-2 的表达, 研究淫羊藿水提取物促 MSCs 骨向分化的作用机制。 **结果** 淫羊藿水提取物最佳促 MSCs 骨向分化的质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$; 成骨诱导剂组、淫羊藿水提取物组及淫羊藿水提取物 + 成骨诱导剂组均能促进 MSCs 骨向分化及上调 TGF- β_1 和 BMP-2 的表达。 **结论** 淫羊藿促进 MSCs 骨向分化, 上调 TGF- β_1 、BMP-2 的表达可能是其作用机制之一。

关键词: 淫羊藿水提取物; 骨髓间充质干细胞; 骨向分化; 转化生长因子 β_1 ; 骨形态发生蛋白 2

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)22-3182-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.016

Effect of epimedium water extract on osteogenic differentiation in bone marrow derived mesenchymal stem cells of rats and its mechanism

YANG Li¹, ZHU Xiao-feng², WANG Pan-pan², HUANG Feng¹, ZHANG Rong-hua¹

1. Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. The first Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To investigate the effects of epimedium water extract (EWE) on the ability of osteogenic differentiation and the expression of TGF- β_1 and BMP-2 in inducing mesenchymal stem cells (MSCs) differentiating into osteoblast and to further explain its mechanism. **Methods** MSCs were isolated and purified by differential time adherent method; the most effective concentration of EWE on the osteogenic differentiation of MSCs was confirmed by the activity of alkaline phosphatase (ALP) and positive rates of ALP staining; according to the differently induced condition, MSCs were divided into four groups: control, classic (induced by the classic osteoblast-induced system), EWE (induced by the most effective concentration of EWE on the osteogenic differentiation), and EWE + classic (induced by the combination of classic osteoblast-induced system and the most effective concentration of EWE on osteogenic differentiation) groups. ALP, type I collagen (Col I), bone gla protein (BGP), and calcium nodes in each group were detected and compared to indicate the osteogenic differentiation of each group. TGF- β_1 and BMP-2 in each group were detected by ELISA. **Results** The most effective concentration of the EWE on the osteogenic differentiation of MSCs was 500 $\mu\text{g/mL}$. The classic, EWE, and EWE + classic groups could promote the osteogenic differentiation of MSCs and increase the expression of TGF- β_1 and BMP-2. **Conclusion** The EWE could promote the osteogenic differentiation of MSCs. The increase of the expression of TGF- β_1 and BMP-2 in the induced groups of EWE may be the mechanism of improving the differentiation of MSCs into osteoblast.

Key words: epimedium water extract; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; TGF- β_1 ; BMP-2

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173619); 广东省教育厅育苗工程项目 (LYM10025); 广东省自然科学基金博士启动 (S2012040007531)

作者简介: 杨 丽 (1979—), 女, 湖北荆门人, 博士研究生, 主要从事干细胞和临床中药学研究。E-mail: doctormoney@126.com

*通信作者 张荣华 Tel: (020)85220023 E-mail: tzh@jnu.edu.cn

骨髓间充质干细胞(MSCs)是在骨髓中发现的一种起源于中胚层、具有自我复制和多向分化潜能的非造血干细胞,在不同的诱导条件下,其能向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等中胚层组织分化。成骨细胞数量和功能的不足或相对不足,是骨质疏松症发生的重要因素之一,而作为成骨细胞起源的MSCs,其骨向分化能力又直接影响成骨细胞的数量和功能,故与骨质疏松症密切相关^[1]。

淫羊藿具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿之功效,药理和临床研究均证实其具有良好的防治骨质疏松症的作用,能促进成骨细胞增殖、矿化,抑制破骨细胞活性^[2-4]。本实验观察淫羊藿水提取物对MSCs骨向分化能力及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形态发生蛋白2(BMP-2)表达的影响,从干细胞角度阐释淫羊藿防治骨质疏松症的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

淫羊藿免煎颗粒,深圳三九医药股份有限公司,批号0605129s;DMEM培养基,美国Gibco公司;地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素C,美国Sigma公司;碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;大鼠I型胶原(Col I)ELISA试剂盒,美国ADL诊断实验室;骨钙素(BGP)放射免疫分析药盒,解放军总医院科技开发中心放免所;大鼠TGF- β_1 ELISA试剂盒,澳大利亚Bender MedSystems公司;大鼠BMP-2 ELISA试剂盒,美国R&D公司。

1.2 动物

清洁级SD雌性大鼠,3月龄,体质量(230±10 g),由中山大学实验动物中心提供,许可证号:粤监证字2005A010。

1.3 仪器

CO₂培养箱,美国Revco公司;CK40—F200型倒置相差显微镜,日本Olympus公司;紫外分光光度计,美国Perkin Elmer公司;Safire 2全波长多功能酶标仪,瑞士TECAN集团公司;FJ—2008PS型 γ 放射免疫计数器,西安核仪器厂。

2 方法

2.1 淫羊藿水提取物的制备

取1 g淫羊藿免煎颗粒(相当于饮片10 g)溶于10 mL双蒸水中,充分溶解,制备成质量浓度为1 g/mL的淫羊藿水提取物(淫羊藿苷质量分数为0.797%,符合《中国药典》规定),0.22 μ m微孔过

滤器滤过、除菌,4℃保存,以此质量浓度的提取物作为母液进行相应梯度的稀释。

2.2 经典成骨诱导液的配制

取 1×10^{-8} mol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ mol/L维生素C、10%胎牛血清(FBS),无菌条件下用高糖DMEM培养基定容至100 mL,充分混匀,4℃保存。

2.3 MSCs的分离、培养与传代

采用全骨髓贴壁法^[5]分离SD大鼠MSCs,以 1×10^6 /mL的密度将MSCs接种到25 cm²塑料培养瓶中,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,24 h后首次半量换液,之后每3 d换液1次。待细胞达到80%~90%融合后以1:2传代。

2.4 淫羊藿水提取物促MSCs骨向分化最佳浓度的确定

第3代MSCs以 1×10^5 /mL接种于24孔板。细胞分成对照组(有细胞但未加药物)、5个淫羊藿水提取物不同质量浓度组,共6组。待细胞接种24 h后,换入无血清培养基,24 h细胞周期同步化后加入药物及含10% FBS的L-DMEM完全培养液完全培养基,使药物终质量浓度分别为0、5、50、500、 5×10^3 、 5×10^4 μ g/mL,每孔终体积1 mL,每组6个复孔。培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养,每3~4 d各组更换含相应物质培养液1次,连续干预14 d。取细胞上清液,对硝基苯磷酸盐(pNPP)法检测ALP的量;钙钴法对细胞进行ALP染色,光镜下随机取10个非重叠视野,高倍镜下计数ALP阳性细胞和总细胞数,计算阳性染色率。综合上述2种方法检测的结果进行统计学分析,确定淫羊藿水提取物最佳促MSCs骨向分化质量浓度。

2.5 对MSCs骨向分化的影响

2.5.1 分组 实验分为4组:对照组(含10% FBS的L-DMEM完全培养液),成骨诱导剂组(含10% FBS的L-DMEM完全培养液+经典成骨诱导剂地塞米松 1×10^{-8} mol/L+ β -甘油磷酸钠10 mmol/L+维生素C 50 μ mol/L),淫羊藿水提取物组(含10% FBS的L-DMEM培养液+淫羊藿水提取物500 μ g/mL),淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组(含10% FBS的L-DMEM完全培养液+淫羊藿水提取物500 μ g/mL+地塞米松 1×10^{-8} mol/L)。

2.5.2 对MSCs ALP活性的影响 第3代MSCs以 5×10^4 /mL接种于24孔板,24 h后更换无血清的培养基,待细胞周期同步化24 h后各组加入相应药物,

每孔终体积为 1.0 mL, 每 3~4 d 换液 1 次, 持续处理 14 d, 每组 6 个复孔。分别取给药第 3、7、10、14 天细胞上清液, -20°C 保存, 按照 ALP 试剂盒说明检测 ALP 活性。

2.5.3 对 MSCs Col I、BGP 量的影响 取“2.5.2”项下各组给药第 7、14、21 天的细胞上清液, -20°C 保存, ELISA 法检测 Col I 的分泌量, 放射免疫法 (RIA) 法检测 BGP 的分泌量。

2.5.4 对 MSCs 矿化能力的影响 第 3 代 MSCs 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于预先置有小盖玻片的 6 孔板中, 共 4 组, 细胞处理同“2.5.2”项, 每孔终体积 2.5 mL, 每组 3 个复孔, 每 3 d 换液 1 次, 持续处理 21 d。第 21 天弃培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗, 95% 乙醇固定 30 min, 0.1% 茜素红染色 30 min, 清水冲洗, 低倍镜 ($\times 40$) 下进行矿化结节计数, 每孔细胞随机计数 10 个视野。

2.5.5 对 TGF- β_1 、BMP-2 量的影响 取“2.5.2”项下各组给药第 7、14、21 天细胞上清液, -20°C 保存, ELISA 法检测 TGF- β_1 和 BMP-2 的量。

2.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素及双因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准取双侧 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 淫羊藿水提取物促 MSCs 骨向分化最佳浓度的确定

3.1.1 对 ALP 活性的影响 与对照组相比, 淫羊藿水提取物 500 $\mu\text{g/mL}$ 组 ALP 的活性增强 ($P<0.01$), 而 50 mg/mL 组 ALP 的活性减弱 ($P<0.05$), 淫羊藿水提取物其他质量浓度组的 ALP 的活性与对照组比较均无显著差异, 表明淫羊藿水提取物 500 $\mu\text{g/mL}$ 促 MSCs 分泌 ALP 的能力最强。结果见图 1。

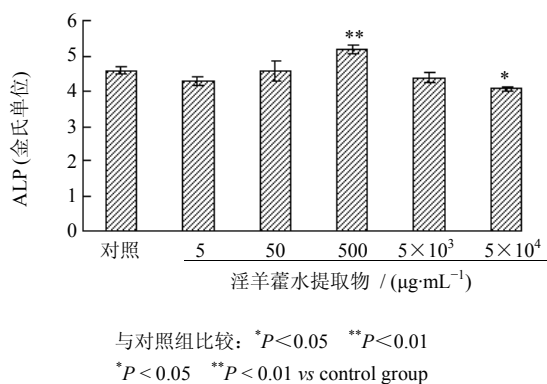


图1 淫羊藿水提取物对 ALP 活性的影响
Fig. 1 Effects of EWE on ALP activity

3.1.2 对 ALP 染色的影响 淫羊藿水提取物 5、50、500、 5×10^3 $\mu\text{g/mL}$ 组 ALP 阳性染色率均显著高于对照组 ($P<0.01$), 其中 500 $\mu\text{g/mL}$ 组的作用最显著 ($P<0.01$); 而 5×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 组 ALP 阳性染色率与对照组比较无显著差异。结果见图 2。结果表明淫羊藿水提取物 500 $\mu\text{g/mL}$ 具有最佳促 ALP 表达的作用, 采用该质量浓度进行后续实验。

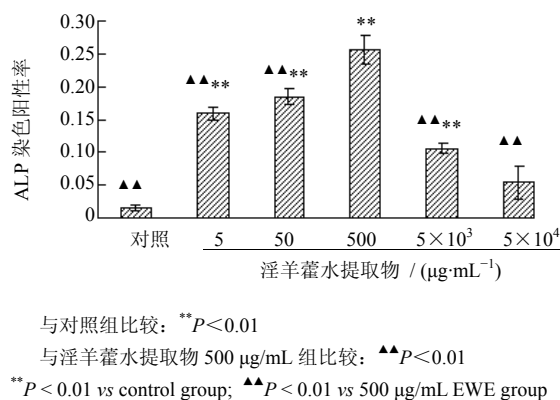


图2 淫羊藿水提取物对 ALP 染色阳性率的影响
Fig. 2 Effects of EWE on positive rates of ALP staining

3.2 对 MSCs 骨向分化的影响

3.2.1 对 ALP 活性的影响 给药第 3 天, 淫羊藿水提取物组、成骨诱导剂组的 ALP 活性显著强于对照组 ($P<0.05$); 淫羊藿水提取物组的 ALP 活性还显著强于淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.05$)。给药第 7 天, 仅淫羊藿水提取物组的 ALP 值明显强于对照组 ($P<0.05$)。给药第 10 天, 淫羊藿水提取物组 ALP 活性显著强于对照组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.05$ 、 0.01)。给药第 14 天, 淫羊藿水提取物组 ALP 活性显著强于对照组 ($P<0.05$)。给药第 3 天, 成骨诱导剂组 ALP 的活性明显强于对照组和淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.05$), 而与淫羊藿水提取物组无显著差异。上述结果提示淫羊藿水提取物和经典的成骨诱导剂均能促进 ALP 的表达, 且二者作用强度相当。结果见表 1。

3.2.2 对 Col I 和 BGP 量的影响 给药第 7 天, 淫羊藿水提取物的 Col I 的量显著高于成骨诱导剂组 ($P<0.01$), 而低于淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.01$)。给药第 14 天, 淫羊藿水提取物组 Col I 的量显著高于其他各组 ($P<0.01$)。给药第 21 天, 淫羊藿水提取物组 Col I 的量低于成骨诱导剂组和淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.05$ 、 0.01)。

结果表明,淫羊藿水提取物、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂、成骨诱导剂均能促进 Col I 的分泌,其中淫羊藿水提取物组及淫羊藿水提取物+成骨诱导剂的作用更为显著。结果见表 2。

给药第 7、14、21 天,淫羊藿水提取物组、成骨诱导剂组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 BGP 的量均高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01) 其中给药

第 7 天时,淫羊藿水提取物组 BGP 的量高于成骨诱导剂组 ($P<0.01$)。结果见表 2。

3.2.3 对 MSCs 矿化能力的影响 淫羊藿水提取物组、成骨诱导剂组 MSCs 矿化结节数均显著多于对照组和淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 ($P<0.05$),提示淫羊藿水提取物和成骨诱导剂均能显著增强 MSCs 的矿化能力。结果见表 3。

表 1 淫羊藿水提取物对 MSCs ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of EWE on ALP activity of MSCs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	ALP / ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)			
		给药第 3 天	给药第 7 天	给药第 10 天	给药第 14 天
对照	—	111.47 $\pm$ 7.15 [▲]	116.50 $\pm$ 6.96 [▲]	118.74 $\pm$ 3.47 [▲]	100.50 $\pm$ 5.20 [▲]
成骨诱导剂	—	130.67 $\pm$ 9.14 [*]	121.75 $\pm$ 9.00	124.18 $\pm$ 1.33	109.31 $\pm$ 7.34
淫羊藿水提取物	500	133.13 $\pm$ 4.95 [*]	137.52 $\pm$ 5.76 [*]	131.26 $\pm$ 6.34 [*]	100.01 $\pm$ 6.32 [*]
淫羊藿水提取物+成骨诱导剂	—	114.20 $\pm$ 3.07 [▲]	123.85 $\pm$ 3.96	110.37 $\pm$ 1.87 ^{▲▲}	107.68 $\pm$ 2.96

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与淫羊藿水提取物组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs EWE group

表 2 淫羊藿水提取物对 MSCs Col I 和 BGP 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of EWE on Col I and BGP amount of MSCs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Col I / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			BGP / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		给药第 7 天	给药第 14 天	给药第 21 天	给药第 7 天	给药第 14 天	给药第 21 天
对照	—	0.41 $\pm$ 0.06 ^{▲▲}	0.43 $\pm$ 0.05 ^{▲▲}	0.66 $\pm$ 0.06 ^{▲▲}	1.28 $\pm$ 0.03 ^{▲▲}	3.83 $\pm$ 0.77 ^{▲▲}	4.11 $\pm$ 0.49 ^{▲▲}
成骨诱导剂	—	1.62 $\pm$ 0.06 ^{***}	1.63 $\pm$ 0.04 ^{***}	1.54 $\pm$ 0.12 ^{**}	3.29 $\pm$ 0.77 ^{***}	7.11 $\pm$ 0.30 ^{**}	6.81 $\pm$ 0.75 ^{**}
淫羊藿水提取物	500	1.91 $\pm$ 0.11 ^{**}	2.68 $\pm$ 0.06 ^{**}	1.27 $\pm$ 0.08 ^{**}	6.44 $\pm$ 0.63 ^{**}	6.03 $\pm$ 0.92 [*]	7.88 $\pm$ 0.80 ^{**}
淫羊藿水提取物+成骨诱导剂	—	2.37 $\pm$ 0.11 ^{***}	1.94 $\pm$ 0.03 ^{***}	1.70 $\pm$ 0.10 ^{**}	6.17 $\pm$ 0.74 ^{**}	7.63 $\pm$ 0.65 ^{**}	7.36 $\pm$ 0.51 ^{**}

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与淫羊藿水提取物组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$, 表 3 同

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs EWE group, same as Table 3

表 3 淫羊藿水提取物对 MSCs 中矿化结节数的影响

($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 3 Effect of EWE on calcium nodes of MSCs

($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	矿化结节数 / 个
对照	—	5.30 $\pm$ 0.40 ^{▲▲}
成骨诱导剂	—	10.23 $\pm$ 1.91 [▲]
淫羊藿水提取物	500	14.63 $\pm$ 1.90 ^{**}
淫羊藿水提取物+成骨诱导剂	—	5.90 $\pm$ 2.01 ^{▲▲}

3.2.4 对 MSCs TGF- β_1 和 BMP-2 表达的影响 给药第 7 天,淫羊藿水提取物组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组、成骨诱导剂组 TGF- β_1 的值均显著高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01)。给药第 14 天,各组 TGF- β_1 的值均有所下降,但淫羊藿水提取物+成骨

诱导剂组的 TGF- β_1 值仍高于其他各组 ($P<0.05$ 、 0.01),而其他 3 组之间无显著差异。给药第 21 天,淫羊藿水提取物组 TGF- β_1 的值显著高于其他各组 ($P<0.01$)。淫羊藿水提取物和成骨诱导剂均能促进 TGF- β_1 的表达。结果见表 4。

给药第 7 天,淫羊藿水提取物组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组、成骨诱导剂组 BMP-2 的值均高于对照组 ($P<0.01$),其中成骨诱导剂组 BMP-2 的值最高 ($P<0.01$)。给药第 14 天,成骨诱导剂组 BMP-2 的值显著高于其他 3 组 ($P<0.01$)。给药第 21 天,淫羊藿水提取物组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组、成骨诱导剂组 BMP-2 的值均显著高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01),其中淫羊藿水提取物组、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组 BMP-2 值高于成

表4 淫羊藿水提取物对 MSCs 中 TGF- β_1 和 BMP-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Effect of EWE on expression of TGF- β_1 and BMP-2 of MSCs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TGF- β_1 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)			BMP-2 / ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		给药第7天	给药第14天	给药第21天	给药第7天	给药第14天	给药第21天
对照	—	0.48 $\pm$ 0.02 [▲]	0.36 $\pm$ 0.04 ^{△△}	0.32 $\pm$ 0.01	1 273.33 $\pm$ 25.17 ^{▲▲}	835.00 $\pm$ 265.00 [■]	1 795.00 $\pm$ 190.20 [*]
成骨诱导剂	—	2.50 $\pm$ 0.43 ^{**}	0.29 $\pm$ 0.06 ^{△△}	0.36 $\pm$ 0.06	2 866.67 $\pm$ 30.55 ^{**}	2 072.67 $\pm$ 76.43 ^{**}	2 198.33 $\pm$ 67.52 [*]
淫羊藿水提取物	500	1.96 $\pm$ 0.41 ^{**}	0.40 $\pm$ 0.05 [△]	0.95 $\pm$ 0.07 ^{**△△}	1 686.67 $\pm$ 15.28 ^{**▲▲}	1 216.67 $\pm$ 20.82 [■]	2 860.00 $\pm$ 40.00 ^{**■}
淫羊藿水提取物+成骨诱导剂	—	1.64 $\pm$ 0.12 [*]	0.58 $\pm$ 0.03 ^{**}	0.39 $\pm$ 0.07	1 668.33 $\pm$ 16.07 ^{**▲▲}	1 420.00 $\pm$ 20.00 ^{**■}	2 756.67 $\pm$ 58.59 ^{**■}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与淫羊藿水提取物组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$

与淫羊藿水提取物+成骨诱导剂组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$; 与成骨诱导剂组比较: [#] $P<0.05$ [■] $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs EWE group

[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs EWE + classic group; [#] $P<0.05$ [■] $P<0.01$ vs classic group

骨诱导剂组 ($P<0.01$)。结果表明淫羊藿水提取物、淫羊藿水提取物+成骨诱导剂、成骨诱导剂均能促进 BMP-2 的表达。

4 讨论

本实验选用的淫羊藿免煎颗粒是经现代工艺提取、浓缩、干燥而成,其功效与中药饮片一致,以制备的水提取物与原药材煎煮液中成分基本一致。实验结果显示,淫羊藿水提取物和经典成骨诱导剂均能显著增强 ALP,增加 Col I、BGP 的分泌量和矿化结节的数量,其在实验早中期增强 Col I 活性的作用优于经典成骨诱导剂,后期反下降,在实验早期增强 BGP 活性的作用优于经典成骨诱导剂。淫羊藿水提取物与经典成骨诱导剂联合给药不能显著增强 ALP 的活性和增加矿化结节的数量,但能明显促进 Col I、BGP 分泌,且在实验早期促 Col I 表达的作用最佳。各组给药第 3、7、10 天时 ALP 活性均显著高于第 14 天,表明 ALP 是反映 MSCs 骨向分化的一个早期指标;给药第 7、14 天的 Col I 值显著高于第 21 天,表明 Col I 是反映 MSCs 骨向分化的一个早中期指标;给药第 14、21 天 BGP 值高于第 7 天,表明 BGP 是反映 MSCs 骨向分化的一个中晚期指标。

在 TGF- β 超家族中,TGF- β_1 与骨代谢的关系最为密切。TGF- β_1 能调控多种间充质来源细胞的增殖和定向分化,尤其在成骨分化、骨基质合成和骨重建中起重要的作用,成为调控 MSCs 骨向分化的首选生长因子之一^[6-9]。BMPs 也属于 TGF- β 超家族成员,是目前公认的高效骨诱导因子,具有诱导成骨细胞分化和体外成骨的能力,而且能启动 MSCs 的成骨过程,其中以 BMP-2 的成骨能力最强^[10]。本实验结果显示,淫羊藿水提取物、经典成骨诱导剂、

淫羊藿水提取物+经典成骨诱导剂均能促进 TGF- β_1 和 BMP-2 的分泌,其中各组 TGF- β_1 表达量在给药第 7 天最高,随后迅速降低,在给药第 14~21 天维持低水平,提示 TGF- β_1 可能是一个在 MSCs 骨向分化过程中早期分泌的促分化因子。各组 BMP-2 在给药第 14 天下降,在给药第 21 天又有所回升,表明 BMP-2 在各组诱导 MSCs 骨向分化过程中均有分泌,且在给药第 14 天有所下降。在淫羊藿水提取物组和淫羊藿水提取物+经典成骨诱导剂组诱导过程晚期中,BMP-2 分泌量最高,提示 BMP-2 可能是淫羊藿促 MSCs 骨向分化过程后期非常重要的细胞因子。

综上所述,补肾中药可能以 MSCs 为作用靶点,通过促进其增殖和骨向分化,增加成骨细胞数量和活性,促进骨形成,从而达到治疗骨病的作用。而在促 MSCs 骨向分化过程中,上调 TGF- β_1 、BMP-2 的表达可能是其作用机制。

参考文献

- [1] 张海玲,陈金锋,陈东风,等. 龟板提取物对骨髓间充质干细胞中分化抑制蛋白 1 表达的影响 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 346-360.
- [2] 赵丽娜. 淫羊藿防治骨质疏松临床效果评价 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(9): 922-923.
- [3] 叶纯,苏进,王凡. 淫羊藿水提液对去势大鼠松质骨的影响 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2008, 26(1): 87-90.
- [4] 李盛林,高华,章魁华,等. 淫羊藿对小鼠成骨细胞增殖、功能及凋亡的影响 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2008, 40(1): 43-46.
- [5] Colter D C, Sekiya I, Prockop D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow

- stromal cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 7841-7845.
- [6] Lai C F, Cheng S L. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor β in normal human osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 15514-15522.
- [7] Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, *et al.* Transforming growth factor beta 1 to the bone [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(6): 743-774.
- [8] Takezawa T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2267-2275.
- [9] Jadlowiec J A, Celil A B, Hollinger J O. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(3): 409-423.
- [10] Schwartz Z, Simon B J, Duran M A. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(9): 1250-1255.