

微应变环境下柚皮苷对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

马信龙^{1,2}, 孙晓雷^{1*}, 杜育任¹, 赵斌^{1,2}, 李风波², 马剑雄², 张扬¹, 李爽¹

1. 天津市中西医结合骨科研究所, 天津 300211

2. 天津医科大学总医院, 天津 300052

摘要: **目的** 探讨在微应变环境下, 柚皮苷体外对培养的骨髓间充质干细胞(MSCs)向成骨细胞分化的影响及其机制。**方法** 将体外培养的兔MSCs接种于硅橡胶膜上, 利用EF3200力学试验仪搭载的BioDynamic生物反应舱系统, 对细胞进行周期性循环牵张微应变(微应变)加载。实验分成8组: 对照组(常规培养), 微应变组, 柚皮苷不同质量浓度(2、20、200 ng/mL)组, 微应变+柚皮苷(2、20、200 ng/mL)组。流式细胞仪检测各组MSCs的增殖指数; RT-PCR检测各组MSCs骨钙蛋白(OCN)、成骨特异性转录因子(Runx 2)与I型胶原(Col I)基因的表达。**结果** 在微应变环境下, 柚皮苷使MSCs呈现明显的极性排列趋向, 且细胞长轴平行力学刺激方向; 显著提高MSCs的增殖活性; 柚皮苷200 ng/mL显著上调OCN基因表达; 不同质量浓度的柚皮苷均显著上调Runx 2基因表达, 且与质量浓度呈正相关; 低质量浓度柚皮苷促进Col I基因表达, 而高质量浓度柚皮苷抑制了Col I基因的表达。**结论** 柚皮苷可增强在微应变环境下MSCs的增殖并能够促进其向成骨分化。

关键词: 柚皮苷; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 细胞增殖; 骨钙蛋白; 成骨特异性转录因子; I型胶原

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3200-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.019

Effect of naringin monomer on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells under microstrain environment

MA Xin-long^{1,2}, SUN Xiao-lei¹, DU Yu-ren¹, ZHAO Bin^{1,2}, LI Feng-bo¹, MA Jian-xiong², ZHANG Yang¹, LI Shuang¹

1. Tianjin Institute of Orthopedics in Traditional Chinese and Western Medicine, Tianjin 300211, China

2. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Objective Under the microstrain environment, to investigate the impact and mechanisms of osteoblast differentiation of the naringin monomer on marrow stem cells (MSCs) *in vitro*. **Methods** The cyclical stretch microstrain was loaded on silicone rubber membrane with cultured rabbit MSCs using EF3200 mechanical tester with the system of BioDynamic biological reaction tank. The experiment was divided into eight groups, A: the blank control group in conventional cultured environment; B: the group of alone microstrain loading; C: the group cultured in environment containing naringin and the naringin concentrations, respectively were 2, 20, and 200 ng/mL; D: under microstrain environment, the joint application with naringin at concentration of 2, 20, and 200 ng/mL. Flow cytometry was used to test the proliferation index (PI) of MSCs after microstrain loading. The gene expression of the cells in osteocalcin (OCN), osteoblast specific transcription factor (Runx2) and collagen type I (Col I) were assayed by RT-PCR. **Results** Under the microstrain environment combined with naringin, MSCs showed obvious polarity and the long axis of cells parallel to the direction of mechanical stimulus direction. The combination of naringin and microstrain stimulation can significantly improve the MSCs proliferation activity. Naringin (200 ng/mL) could improve the gene expression of OCN under the stimulation of 50 000 microstrain. Under 50 000 microstrain stimulation, naringin at different concentration could significantly enhance the Runx2 gene expression and the effect between the enhancement and the naringin concentration was positive. Under the microstrain stimulation, naringin at low concentration could promote the Col I gene expression, on the contrary, naringin at high concentration could inhibit the

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000432); 天津市卫生局科技基金项目(2011KZ57)

作者简介: 马信龙(1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为骨科和组织工程学。Tel: 13752132685 E-mail: agzhh@sina.com

*通信作者 孙晓雷 Tel: (022)28313173 E-mail: davidsun0812@gmail.com

Col I gene expression. **Conclusion** Under the microstrain environment, naringin monomer could enhance the proliferation of MSCs and promote the osteogenic differentiation of MSCs.

Key words: naringin; bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; cell proliferation; osteocalcin; osteoblast specific transcription factor; collagen type I

骨质疏松症是一种以骨量减少, 骨小梁微结构破坏, 从而导致脆性增加, 易发骨痛甚至骨折的全身性慢性骨骼疾病。随着社会老龄化的发展, 骨质疏松症已成为常见病、多发病。根据“肾藏精, 主骨生髓”的中医理论, 临床上采用“补肾健脾活血”的中药辨证治疗原发性及废用性骨质疏松症。从骨碎补中提取的柚皮苷能诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)向成骨细胞分化^[1-2]。有研究表明, 力学刺激对 MSCs 的分化有重要的影响^[3], 然而在生理力学环境中, 柚皮苷对 MSCs 的影响鲜见报道。本实验模拟生理状态下的周期性循环牵张微应变(简称微应变)环境, 观察在应力刺激条件下柚皮苷对 MSCs 向成骨细胞分化的影响及其机制, 探索中药与微应变环境在人体骨代谢中的协同作用及其机制, 为骨质疏松症的防治提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

柚皮苷, 质量分数为 98%, 西安冠宇生物技术有限公司; 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS), Gibco 公司; D-hank's 液, 自制; 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、碘化丙啶、Triton X-100, Sigma 公司; Percoll 淋巴细胞分离液, GE healthcare 公司; All-in-One™ qPCR Mix、All-in-One™ qPCR Primer, 美国 GeneCopoeia 公司。

1.2 动物

新西兰大耳白兔, 3月龄, 雌雄不限, 普通级, 体质量 2~3 kg, 天津医院动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(军)2007004。

1.3 仪器

细胞培养皿, Corning 公司; 倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; ElectroForce3200 力学试验仪、BioDynamic 生物反应舱系统, 美国 Bose 公司; CO₂ 细胞培养箱, Heraeus 公司; 流式细胞仪及相关分析软件, BD 公司; iQ5 Real Time PCR 检测洗脱, Bio-Rad。

2 方法

2.1 MSCs 原代培养

无菌条件下抽取兔胫骨骨髓 5 mL, 肝素抗凝, 加入等量 D-Hank's 液稀释。将稀释后的骨髓加至等

量淋巴细胞分离液液面上, 20 °C、3 000 r/min 离心 20 min。收集离心界面上乳白色云雾状单核细胞层, 加入等量培养基充分洗涤 2 次(2 000 r/min, 5 min), 弃上清, 10% FBS 培养基悬浮细胞, 细胞计数, 按 2×10^5 /mL 接种于培养瓶中, 加入含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 3 天半量换液。

2.2 微应变环境的建立、分组与给药

将第 2 代(P2) MSCs 以 2×10^5 /mL 密度接种于 4 cm×2 cm 硅橡胶膜上, 常规培养至细胞密度约达 80%, 以同步化各组细胞生长状态及密度, 然后置于 BioDynamic 力学生物反应舱系统中, 应用力学试验仪搭载的 BioDynamic 生物反应舱系统, 由 Bose PCI 系列数字控制器和 Win Testing 软件精确控制微应变的大小、加载时间, 频率为 0.25 Hz。对贴壁生长在硅橡胶膜表面的 MSCs 施加 $5 \times 10^4 \mu\text{e}$ 微应变的牵张应力, 循环加载 3 h。

实验分 8 组: 对照组(细胞常规培养), 微应变加载组(简称微应变组), 柚皮苷不同质量浓度(2、20、200 ng/mL)组, 微应变+柚皮苷不同质量浓度(2、20、200 ng/mL)组。对 P2 代 MSCs 持续给药。

2.3 流式细胞术检测细胞增殖

微应变 3 h 后, 将 MSCs 于培养箱继续培养 24 h, 胰酶消化法收集加载膜上的细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)离心清洗 2 次, 弃上清, 加入预冷的 70% 乙醇 1 mL, 吹打均匀, 4 °C 固定 8 h, PBS 清洗 2 次(1 000 r/min, 5 min)。以 1 mL 含有 0.2 mg RNase A 的碘化丙啶/Triton X-100 染色液重悬细胞, 37 °C 染色 15 min。流式细胞仪检测细胞中 DNA 含量和细胞周期, 计算 S 期细胞百分率与细胞增殖指数(PI)。

$$S \text{ 期细胞比例} = 1 - (G_0/G_1 \text{ 细胞比例} + G_2/M \text{ 细胞比例})$$

$$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)$$

2.4 荧光定量 PCR 法检测相关基因的表达

将各组细胞样本充分研磨, 加置 1 mL TRIzol 溶液中, 振荡混匀。采用相分离技术抽提 RNA, 琼脂糖电泳法检测骨钙蛋白(OCN)、成骨特异性转录因子(Runx 2)及 I 型胶原(Col I)基因浓度及完整性。各组检测基因反转录为 cDNA, 以 GAPDH

为内参基因,引物由广州复能基因有限公司设计。基因引物序列: GAPDH 正向引物 5'-ATGTTTGTGATGGGCGTGAA-3',反向引物 3'-GCCGAAGTGTCGTGGAT-5',扩增片段为 96 bp; OCN 正向引物 5'-TCACTCTTGTCGCCCTGCT-3',反向引物 3'-CTCTTGACACGAAGGCTGA5',扩增片段为 150 bp; Runx 2 正向引物 5'-CTTCATTCTCACCTCC-TCAGC-3',反向引物 3'-CAAGTTTCCTCATCC-CTCTC-5',扩增片段为 115 bp; Col I 正向引物 5'-GCAGGGCTCCAATGATGTT-3',反向引物 3'-CAAGGAAGGGCAAACGAGAT-5',扩增片段为 120 bp。逆转录反应体系、PCR 扩增体系以及反应条件按照试剂盒说明书设定。反应完成后进行扩增曲线

和熔解曲线分析。基因表达量以检测基因的初始模板量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 表示。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,以 LSD 法进行两两比较。

3 结果

3.1 MSCs 形态学观察

与对照组比较,微应变组 MSCs 的排列呈现与力学刺激方向相平行的趋势。与柚皮苷组比较,微应变+柚皮苷各剂量组 MSCs 呈现明显的极性排列趋向,且细胞长轴平行于力学刺激方向。结果见图 1。

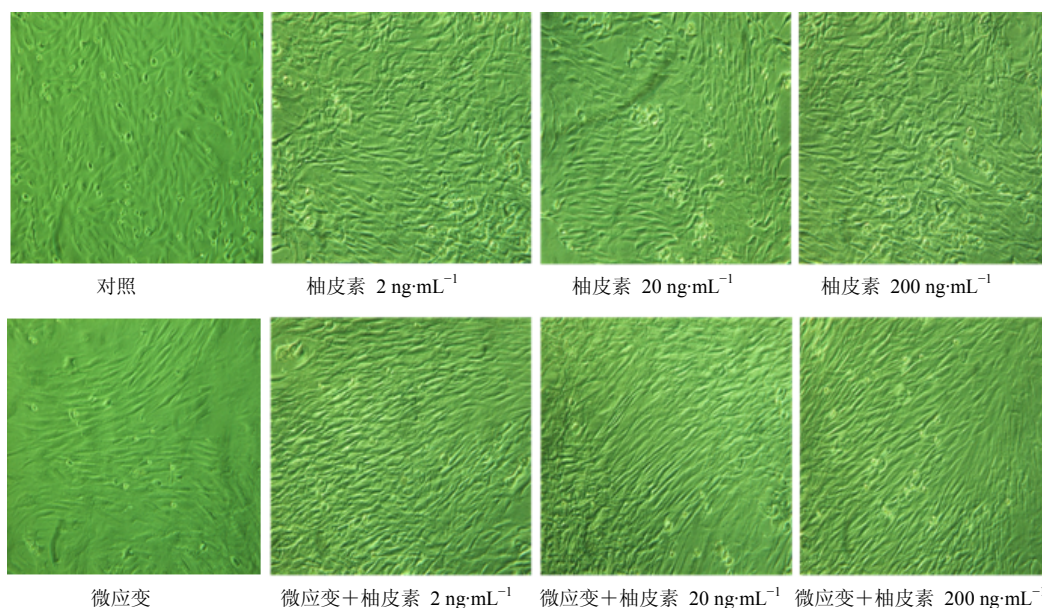


图 1 各组 MSCs 形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of MSCs in each group

3.2 对 MSCs 增殖的影响

与对照组相比,微应变组、柚皮苷不同质量浓度组 MSCs 的增殖未受到明显影响。微应变+柚皮苷组 MSCs 增殖的能力均强于相应质量浓度的柚皮苷组 ($P < 0.01$) 且均高于对照组及微应变组 ($P < 0.01$),其中柚皮苷 20、200 ng/mL 组的 MSCs 增殖无显著差异,但均高于 2 ng/mL 组 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.3 对 MSCs 成骨相关基因表达的影响

与对照组比较,各组 OCN 基因的表达无显著差异。但微应变+柚皮苷 2 ng/mL 组与微应变+柚皮苷 20 ng/mL 组 OCN 基因表达显著低于微应变组

($P < 0.05$); 微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组 OCN 基因表达显著低于柚皮苷 200 ng/mL 组 ($P < 0.05$); 柚皮苷 200 ng/mL 组的 OCN 基因表达明显高于柚皮苷 2、20 ng/mL 组 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

微应变组与柚皮苷各质量浓度组 Runx 2 基因的表达无显著差异。微应变+柚皮苷各组 Runx 2 基因的表达均显著高于对照组与微应变组 ($P < 0.05, 0.001$)。其中微应变+柚皮苷 2 ng/mL 组和微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组 Runx 2 基因的表达分别高于柚皮苷 2、200 ng/mL 组;而柚皮苷各质量浓度组间、微应变+柚皮苷各质量浓度组间 Runx 2 基因表达无显著差异。结果见图 4。

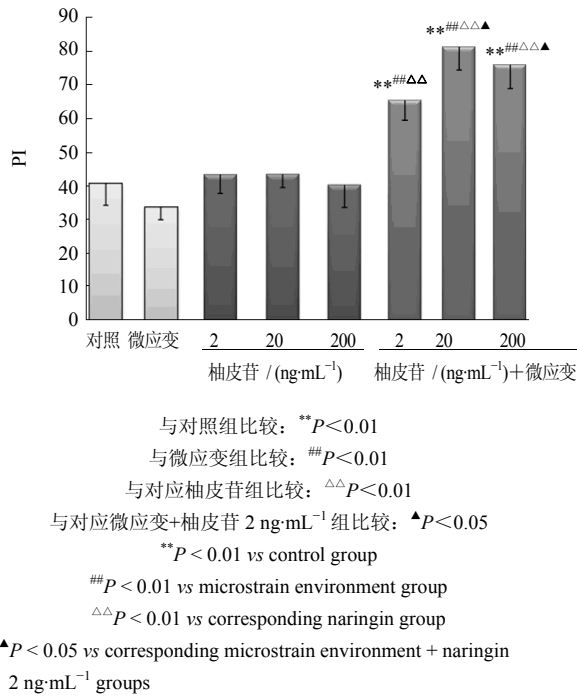


图2 柚皮苷对MSCs PI的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
 Fig. 2 Effects of naringin on PI of MSCs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

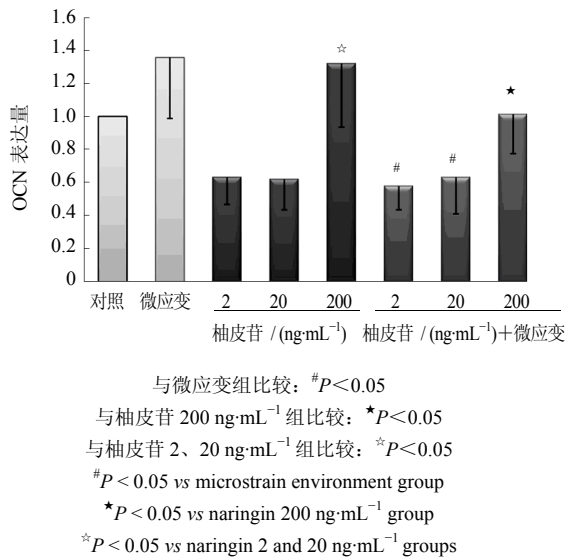


图3 柚皮苷对MSCs OCN基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 3 Effects of naringin on OCN gene expression of MSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

除微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组外, 其他各组 Col I 基因的表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。微应变+柚皮苷 2 ng/mL 组和微应变+柚皮苷 20 ng/mL 组 Col I 基因表达均高于微应变组 ($P < 0.01$); 而微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组 Col I 基因表达低于微应变组 ($P < 0.01$); 微应变+柚皮苷 2 ng/mL 组和微应变+柚皮苷 20 ng/mL 组 Col I 基因表达均高

于微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组 ($P < 0.05$); 柚皮苷 20 ng/mL 组 Col I 基因表达低于微应变+柚皮苷 20 ng/mL 组 ($P < 0.05$); 200 ng/mL 组 Col I 基因的表达却明显高于微应变+柚皮苷 200 ng/mL 组 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

4 讨论

应用补肾药物治疗骨质疏松症取得了良好的临

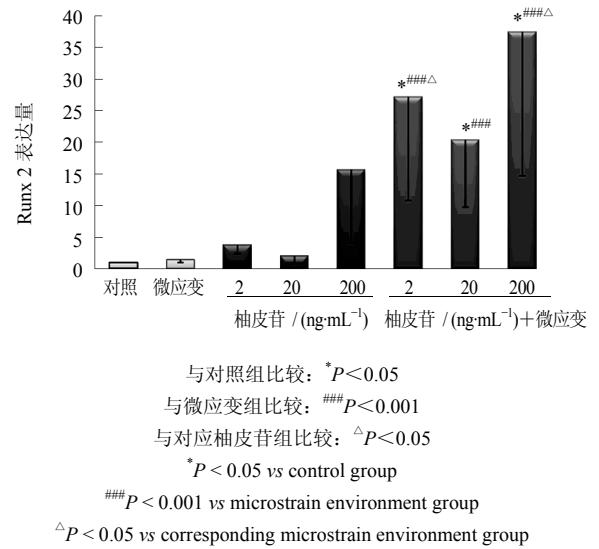


图4 柚皮苷对MSCs Runx 2基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of naringin on Runx2 gene expression of MSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

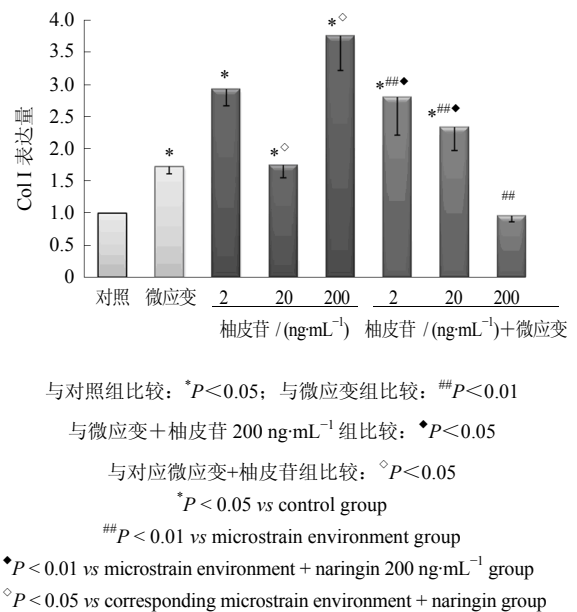


图5 柚皮苷对MSCs Col I基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
 Fig. 5 Effects of naringin on Col I gene expression of MSCs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

床效果^[4-5]。骨碎补是中医骨伤科方剂中常用中药，味苦、温，入肾经，具有促进骨折愈合，强骨补肾的功效^[6-8]。柚皮苷是骨碎补中的重要成分之一，具有活血解痉、改善局部微循环、加强氨基苷类药物排泄以及植物雌激素类等作用^[9]。有研究证实，柚皮苷在促进 MSCs 的增殖和分化中起重要作用，能显著提高体外培养的成骨细胞活性并促进成骨细胞增殖^[10]。

本实验模拟生理状态下的力学微应变环境，观察在微应力刺激下柚皮苷对 MSCs 向成骨细胞分化的影响及机制。结果发现，微应变应力刺激对细胞增殖未产生影响；在微应变环境下，柚皮苷显著促进细胞增殖，质量浓度为 20 ng/mL 时，细胞增殖活性最强。这与在中药治疗骨质疏松症的同时，给患者制定适当强度的功能锻炼的综合疗法相符。

OCN 是由分化期成骨细胞特异性分泌的一种非胶原蛋白，是成骨细胞分化、成熟的标志，也是骨形成或骨转换的重要标志^[11-12]。Garnero 等^[13]对成年大鼠进行的研究结果表明，长期的力量训练可刺激骨的形成。而本研究发现与已有报道有所不同，各组 MSCs 的 OCN 基因表达与对照组比较均无显著差异；但在微应变环境下，柚皮苷 2、20 ng/mL 组的 OCN 基因表达受到抑制，而 200 ng/mL 组的 OCN 基因的表达要高于柚皮苷 200 ng/mL 组；柚皮苷 200 ng/mL 的 OCN 基因表达显著高于 2、20 ng/mL 组。因此认为，单纯力学刺激最有利于 MSCs 向成骨细胞分化，而微应变条件下柚皮苷抑制 OCN 基因的表达，提示在骨质疏松症的临床治疗中，力学刺激是某些成骨功能的最主要影响因素。

Runx 是一类转录因子蛋白的统称^[14]，其中 Runx 2 又称核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$)，是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因^[15]，是成骨细胞开始分化的标志。Runx 2 基因转染后细胞增殖不受影响，而成骨细胞特异性基因如碱性磷酸酶、骨钙蛋白、骨桥素等均上调，提示相对高表达的 Runx 2 可促进新生成骨细胞的分泌和成熟，对 MSCs 具有明显的促成骨效应。本研究结果表明，微应变与柚皮苷各组对 MSCs 的 Runx 2 基因表达并无影响。但微应变刺激同时给予柚皮苷，可显著上调 Runx 2 基因的表达，且与柚皮苷的质量浓度呈正相关。单纯给予柚皮苷对 Runx 2 基因表达无明显影响。Runx 2 与多种骨代谢相关的细胞因子相互作用，协同调节成骨细胞与破骨细胞的分化及基因表达，这为骨质

疏松症的基因靶向治疗提供了新思路。

老年性骨质疏松症以成骨细胞成骨功能不全为特点，在治疗方法上以提高成骨细胞的数量，增强成骨细胞成骨功能为主^[16-17]。MSCs 是体内成骨细胞的主要来源，在各种生理因素的作用下，MSCs 均可向成骨分化，以调节骨代谢的平衡^[18]。本研究结果表明，微应变刺激、柚皮苷质量浓度与 MSCs Col I 基因表达间存在一定的效应关系，提示适度功能锻炼与适量药物干预对骨质疏松症的临床治疗均具有重要作用，因此应探寻一个平衡点，使中药与功能锻炼协同作用达到最佳的抗骨质疏松疗效。

综上所述，在微应变环境下柚皮苷可增强 MSCs 的增殖并促进其向成骨分化，提示在使用中药抗骨质疏松的同时，更要注重合理的功能锻炼。

参考文献

- [1] 张伟成. 补肾活血合剂促进骨折愈合观察 [J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(2): 70.
- [2] 王长海, 王文, 李军昌, 等. 中药骨松康治疗绝经后骨质疏松症临床疗效观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 1652-1671.
- [3] 刘伟, 赵劲民, 苏伟, 等. 柚皮苷对兔骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的影响 [J]. 江苏医药, 2011, 37(14): 1632-1636.
- [4] 李凤才, 谢海泉, 冷向阳. 复方鹿茸健骨胶囊质量原发性骨质疏松症的 III 期临床观察 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1856-1858.
- [5] 许旺. 中医药治疗性骨质疏松症的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 314-315.
- [6] 顾敏, 郭加南. 骨碎补治疗原发性骨质疏松症 [J]. 中国康复, 2004, 19(5): 297-297.
- [7] 李嫔, 蔡德培. 补肾中药对青春期大鼠下丘脑生长抑素基因表达与蛋白表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2003, 23(5): 502-521.
- [8] 陈丰连, 贾薇, 曾元儿. 影响骨碎补浸膏中柚皮苷含量的因素研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 210-211.
- [9] 谢雁鸣, 秦林林, 邓文龙, 等. 骨碎补总黄酮对成骨细胞体外培养作用的机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(3): 161-163.
- [10] Liu H C, Chen R M, Jian W C, et al. Cytotoxic and antioxidant effects of the water extract of the traditional Chinese herb gusuibu (*Drynaria fortunei*) on rat osteoblasts [J]. *J Formos Assoc*, 2001, 100(6): 383-388.
- [11] 武密山, 赵索芝, 任立中, 等. 柚皮苷对乳鼠成骨细胞增殖及表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5):

- 677-381.
- [12] Wang X L, Wang N L, Zhang Y, *et al.* Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line [J]. *Chin Pharm Bull*, 2008, 56(1): 46-51.
- [13] Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring [J]. *Mol Diagn Ther*, 2008, 12(3): 157-170.
- [14] 徐道志, 詹红生, 赵咏芳. 成骨细胞分化与骨骼发育的转录因子 Cbfa1/Runx2 [J]. *中医正骨*, 2006, 18(11): 61-63.
- [15] Bae S C, Lee Y H. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: The molecular basis of Runx2 regulation [J]. *Gene*, 2006, 366(3): 58-66.
- [16] Xu Y Z, Zhu M M, Wang K. Effects of traditional Chinese medicine *Drynaria fortunei* smith on alkaline phosphatase activity and ultra-structure of human gingival fibroblast cells [J]. *Chin J Pract Stomatol*, 2008, 1(3): 157-160.
- [17] 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.
- [18] 张海玲, 陈金锋, 陈东风. 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): 346-350.