·药物研究·

补肾方剂拮抗地塞米松促骨髓基质细胞向成脂细胞分化的实验研究

胡黎平 周金美 涂平生 黄自为 陈敏聪 李济田 谢富康

摘要：目的 观察补肾方剂对地塞米松促骨髓基质干细胞成脂作用的影响。**方法** 从成年 SD 大鼠分离出骨髓基质干细胞体外培养，取第三代细胞用于实验。分别在培养液其中加入 1×10^{-7} mol·L^{-1} 的地塞米松（A 组）、1×10^{-7} mol·L^{-1} 的地塞米松和 80 mg·L^{-1} 的补肾方剂（B 组），C 组为对照组。分别应用 MTT、碱性磷酸酶活性与三酰甘油含量法检测 MSCs 增殖与分别向成骨和成脂方向分化的能力。**结果** 实验组（A 组和 B 组）的 MSCs 增殖能力较对照组明显降低（$P<0.05$），但 A 组与 B 组之间差异无显著意义（$P>0.05$）；B 组 MSCs 碱性磷酸酶活性较 A 组增高（$P<0.05$），而三酰甘油含量低于 A 组（$P<0.05$）。**结论** 补肾方剂不能干预地塞米松对 MSCs 增殖的抑制作用，但具有抑制地塞米松促进 MSCs 向成脂方向分化的作用。

关键词：基质细胞；地塞米松；补肾方剂

Tonifying kidney recipes inhibits differentiation of MSCs into adipogenic cells induced by dexamethasone

HU Liping, ZHOU Jinmei, TU Pingsheng, et al. Sun Yat-sen Medical Collage, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To observe the effect of tonifying kidney recipes on differentiation of bone marrow stromal cells (MACs) induced with dexamethasone. **Methods** MSCc were isolated from adult rat were cultured *in vitro*, passaged three generations and used to do experiment. MSCs were divided into three groups: dexamethasone, dexamethasone plus tonifying kidney recipes and control. After respectively treated with medicine, exam the energy of MSCs differentiating into osteogenic or adipogenic cells through the MTT, ALP activity and triglyceride content methods. **Results** The proliferation of MSCs in Dexamethasone and tonifying kidney recipes group are lower than control group ($P<0.05$), but there is no significant difference between them. Dexamethasone plus tonifying kidney recipes can promote the activity of ALP more highly than Dexamethasone, but the content of triglyceride is lower ($P<0.05$). **Conclusion** Tonifying kidney recipes can not affect the low proliferation of MSCs induced by dexamethasone, but inhibit the differentiatiation of MSCs into adipogenic cells.

Key words: Marrow stromal cells; Dexamethasone; Tonifying kidney recipes

临床发现，长期大剂量使用皮质类固醇激素可导致骨质疏松。骨质疏松症患者骨量减少与髓腔内脂肪增多相伴出现，骨髓基质细胞（marrow stromal stem cells，MSCs）的成骨能力降低，且其成脂肪细胞能力加强[1,2]。因此，促进 MSCs 的成骨分化与钙化，并抑制其向脂肪细胞的分化可能是治疗和预防骨质疏松症的有效途径之一。“补肾方剂”为我院临床上用于治疗骨质疏松症较为有效的中药方之一，具有较好的临床疗效。为此，本实验选用补肾方中对成骨有作用的中药进行组合，观察其对地塞米松诱导后的骨髓基质干细胞增殖与分化的影响，为进一步阐明“补肾方剂”治疗骨质疏松症的作用机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

选用出生 2 周左右的 SD 大鼠 1 只，性别不限，由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂及仪器

基金项目：广东省自然科学基金资助项目（04012084）

作者单位：510080 广州，中山大学中山医学院（胡黎平、周金美、李济田、谢富康）；广州市番禺区中医院（涂平生、黄自为、陈敏聪）

通讯作者：涂平生，Email：tps59@sina.com

胎牛血清(杭州四季青公司产品),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司产品),胰酶及四甲基偶氮唑盐(MTT 试剂)(均为 Sigma 公司产品),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(基因公司),三酰甘油试剂盒(G-cell Biotechnologies)。倒置显微镜(Nikon 公司),CO_2 培养箱和细胞培养板(美国 Gibco 公司产品),723 型分光度计和 ELX 808 酶标仪(美国 BioTek 公司产品)。

1.3 药物

选用中草药淫羊藿、黄芪、杜仲、补骨脂和骨碎补(中国药品生物制品鉴定所产品),按 1∶15∶5∶5∶5 称重比例混合后,以 20 倍蒸馏水浸泡、煎煮 2 次,每次 2 ~ 3 h,过滤合并水提液,离心上清液浓缩;用 75% 乙醇沉淀 2 次,过滤回收乙醇;制成含生药 2 $g \cdot mL^{-1}$ 的药液,pH 调至 7.0;加活性碳脱色 2 次;精滤药液,用 DMEM 培养液稀释为 2 $g \cdot L^{-1}$ 的贮备液,过滤除菌。根据实验要求以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液分别配成浓度为 20 $mg \cdot L^{-1}$(低浓度组)、40 $mg \cdot L^{-1}$(中浓度组)、80 $mg \cdot L^{-1}$(高浓度组)的供试液及浓度为 0 的,以双蒸馏水对照液,4℃保存,备用。

1.4 方法

1.4.1 MSCs 的分离与培养:取出生 2W 左右的 SD 大鼠 1 只(性别不限,由中山大学北校区实验动物中心提供),引颈处死。无菌条件下取股骨,去股骨两端骨,冲出骨髓后,用 3 mL 无血清培养基,并以 2×10^4/mL 的密度接种于培养瓶中,加 10% DMEM 培养基,置 37℃、5% CO_2 培养,2 ~ 3 天换液 1 次。待细胞长满后进行传代,使用第 3 代细胞进行实验。A 组培养基中加入地塞米松(浓度为 $1 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$)、B 组培养基中加入地塞米松(浓度 1×10^{-7} $mol \cdot L^{-1}$)和补肾方剂(浓度 80 $mg \cdot L^{-1}$)、C 组为对照组(常规血清培养)。在倒置显微镜下观察细胞生长情况(见图 1)。

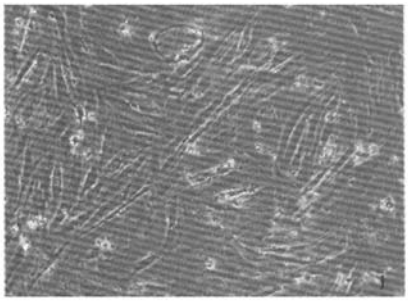

图 1 培养 5 d 骨髓基质细胞(×100)

1.4.2 细胞增殖功能测定:MSC 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 6 孔培养板中,每孔加入含 10% 胎牛血清的培养基,在 37℃ 5% CO_2 条件下培养。24 h 后分别加入条件培养液继续培养 1、2、3 d。采用 MTT 法[3],于 570 nm 波长测各组光吸收值(A 值),在酶标仪上进行测试。

1.4.3 细胞分化功能测定(ALP 活性测定):MSCs 接种密度条件同上,加不同浓度补肾方剂的 DMEM 培养基培养 1、2、3 d 后,部分细胞直接经对硝基酚磷酸盐(p-nitrophenylpicolinate,PNPP)作底物染色,观察阳性细胞情况(见图 2)。部分细胞经 0.1% Triton X 100 溶解液破碎制成细胞悬液,以 PNPP 为底物,用分光光度计测定各组细胞溶液中的 ALP 活性(条件为 pH 10.5,37℃条件下,波长为 405 nm),再用考马斯亮蓝法[4]测定蛋白质含量($mg \cdot L^{-1}$),ALP 活性以 kU/g.pro 表示。余下部分细胞直接行胶原蛋白-1 免疫组化染色,观察细胞分化过程中表达胶原蛋白-1 的阳性细胞(见图 3)。

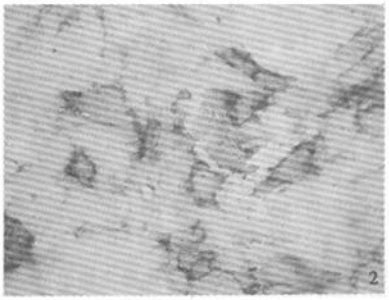

图 2 地塞米松作用 21 d 后碱性磷酸酶阳性细胞(×400)

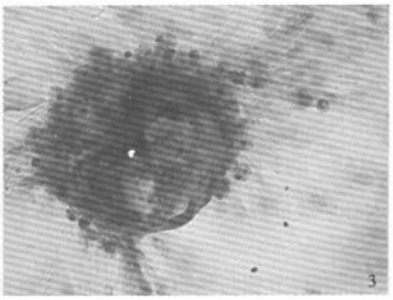

图 3 地塞米松诱导 21 d 后油红染色阳性细胞
(苏木素复染,×400)

1.4.4 细胞三酰甘油含量的测定:按 1×10^4/孔浓度将 MSCs 种植于培养板内,每组 3 孔,共 9 孔,分别 7、14、21 d 终止培养,吸出培养液,每孔加入无血清 DMEM 培养液 1 mL,用细胞刮器收集细胞,反复冻融裂解细胞,然后用氯仿:甲醇混合液抽提 5 min,将有机相 37℃水浴,使甲醇、氯仿挥发后,用三酰甘油试剂盒在全自动生化分析仪上测定三酰甘油含量,部分细胞固定后直接油红染色,观察阳性细胞形成

情况(见图 4)。

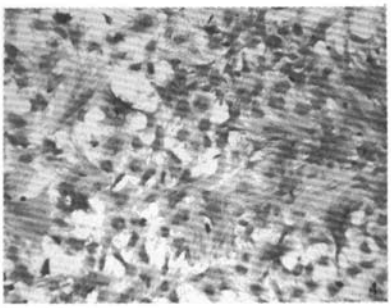

图 4 地塞米松诱导 21 d 后 Collagen Ⅰ 免疫组化阳性细胞
(DAB 显色,苏木素复染,×100)

1.4.5 统计学处理:用 SPSS 10.0 软件进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 增殖的影响(表 1)

表 1 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	光吸收值(1,2,3 d)		
		3 d	7 d	14 d
A	3	0.166 ± 0.011	0.201 ± 0.043*	0.223 ± 0.052*
B	3	0.145 ± 0.012	0.211 ± 0.021*	0.234 ± 0.023*
C	3	0.253 ± 0.012	0.644 ± 0.021	1.232 ± 0.023

注:与对照组比较* $P < 0.05$,A:地塞米松组,B:地塞米松加补肾方剂组,C:对照组

显微镜下观察发现,A 组 MSCs 增殖减慢,部分细胞由长梭型变成多边形。MTT 检测显示该组 MTT 值低于对照组(C 组),且差异有统计学意义($P < 0.05$),但 B 组与 A 组之间差异无显著性。提示地塞米松可抑制 MSCs 的增殖,而补肾方剂不能干预地塞米松对 MACs 的抑制作用。

2.2 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 碱性磷酸酶的影响(表 2)

表 2 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 碱性磷酸酶的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	ALP (mU/10^4 细胞)		
		3 d	7 d	14 d
A	3	0.134 ± 0.211	1.201 ± 1.043*	3.111 ± 1.223*
B	3	0.141 ± 0.235	1.223 ± 0.021*	6.234 ± 2.023*
C	3	0.141 ± 0.235	0.532 ± 0.051	3.234 ± 1.045

注:* $P < 0.05$,A:地塞米松组,B:地塞米松加补肾方剂组,C:对照组

于培养 7、14、21 d 分别测定 A、B 和 C 组培养细胞内碱性磷酸酶活性。结果显示,第 14 d,B 组 MSCs 细胞内的碱性磷酸酶活性明显高于 A 组和 C 组($P < 0.05$)。

2.3 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 三酰甘油含量的影响(表 3)

表 3 补肾方剂与地塞米松对 MSCs 三酰甘油含量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	三酰甘油 (μmol/10^4 细胞)(7,14,21 d)		
		3 d	7 d	14 d
A	3	0.134 ± 0.211	0.201 ± 1.043	1.111 ± 1.223*
B	3	0.141 ± 0.235	0.223 ± 0.021	0.014 ± 1.023
C	3	0.143 ± 0.123	0.153 ± 0.034	0.019 ± 1.032

注:* $P < 0.05$,A:地塞米松组,B:地塞米松加补肾方剂组,C:对照组

于培养 7、14、21 d 分别测定各组细胞内三酰甘油含量,结果显示,A 组 MSCsX 细胞内三酰甘油含量增加,而 B 组 MSCs 细胞内三酰甘油含量与 C 组差异无显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病,常并发骨折,甚至股骨头无菌性坏死。长期、大剂量使用皮质类固醇激素可导致骨质疏松症,其发病率仅次于绝经后及老年性骨质疏松症而居第 3 位[3]。

近年来有研究证实,在各种类型的骨质疏松症患者中,骨髓中的脂肪增多与松质骨骨量减少总是相伴出现,骨髓中的脂肪细胞与松质骨的骨量成反比[4],有一套复杂的机制调控骨髓基质细胞的分化方向,例如结合在糖皮质激素受体上的配体可调节骨髓基质细胞向成骨和成脂分化。有研究表明,糖皮质激素能够诱导骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞,同时减少其向成骨细胞的分化[5,6]。脂肪细胞的特点是能够合成并储存三酰甘油,因此本实验以检测三酰甘油含量作为鉴定脂肪细胞的方法;碱性磷酸酶是骨形成所必需的酶,在体外钙化中起关键性的作用,它的活性检测是鉴定成骨细胞的主要方法。

本实验选用的补肾方剂中淫羊藿、黄芪、杜仲、补骨脂和骨碎补均为补肾主药,根据"肾主骨"的理论,在治疗骨质疏松症中起重要作用。研究表明[7],淫羊藿可以促进成骨细胞增殖分化,与上调 BMP-2 基因的表达有关。淫羊藿主要成分可以逆转糖皮质激素的促成脂肪作用。且黄芪味甘,性温,可补气升阳。有文献报道[8],黄芪中的多糖在体外对成骨细胞的增殖与分化也可能发挥着双向调节作用。现代药理学研究证实[9],黄芪与当归有调节体液及细胞免疫作用。杜仲叶醇提取物可阻止 DM 合并去势大

鼠骨丢失,并具有类雌激素样作用[10]。补骨脂对新生大鼠成骨细胞的增殖有显著促进作用[11]。骨碎补促进骨髓基质细胞在体外向成骨细胞分化,说明该药含有诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化的成分[12]。本实验结果显示,由上述药组合而成的补肾方剂,具有促进 MSCs 向成骨分化和抑制其向脂肪细胞分化的作用,表明补肾方剂具有进一步的临床应用开发价值。

【参 考 文 献】

[1] 张维成.不同浓度地塞米松对骨髓基质细胞成脂、成骨分化的影响.中国临床康复,2006,10(29):98-100.

[2] 袁风红,邹耀红,高恺言,等.地塞米松对体外人骨髓基质细胞增殖及成骨分化的影响.中华风湿病学杂志,2006,10(8):482-484.

[3] Clowes JA, Peel N, Eastell R. Glucocorticoid-induced osteopotosis. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(4):326-332.

[4] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. J Cell Biochem, 2001, T81(1):23-38.

[5] Atmani H, Chappard D, Michel F. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. J Cell Biochem, 2003, 89:364-372.

[6] Walsb S, Jordan GR, Jefferiss C, et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. Rheumatology, 2001, 40:74-83.

[7] 刘尚全,杨颖,周丽斌,等.淫羊藿苷逆转地塞米松抑制成骨细胞分化及其机制.中华内分泌代谢杂志,2006,22(3):218-221.

[8] 金慰芳,朱文菁,王洪复,等.补肾中药 HUECS 对培养成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响.中国骨质疏松杂志,2001,7(8):9-11.

[9] 殷晓雪,陈仲强,党耕町,等.淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响.中国中药杂志,2005,30:289-291.

[10] 张立,葛焕琦,白立纬,等.杜仲叶醇防治糖尿病合并去势大鼠骨质疏松症的实验研究.中国老年学杂志,2003,23:370-372.

[11] 林举择,陈升恺,罗家栋.补骨脂注射液对体外培养大鼠成骨细胞增殖的影响.中医正骨,2004,16(6):6-9.

[12] 徐展望,张建新,谭国庆,等.中药骨碎补提取液对兔骨髓基质细胞体外成骨分化的影响.中医正骨,2006,18(6):15-17.

(收稿日期:2007-02-25)