

淫羊藿在 MSCs 成脂分化过程中对 PPAR γ 基因表达影响的实验研究进展

刘海全 秦佳佳 杨海韵 刘庆思

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)11-0868-03

摘要: 骨髓基质干细胞具有多向分化的能力, 研究发现其成脂分化与骨质疏松症存在着不可忽视的关系。PPAR γ 是脂肪分化的主要调控因子, 已有研究发现其对 MSCs 分化方向起关键性调控作用。淫羊藿对 MSCs 成骨分化具有促进作用, 但其在 MSCs 成脂分化过程中对 PPAR γ 基因表达影响目前尚无研究报道。

关键词: 淫羊藿; 成脂分化; 骨质疏松; 研究进展

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.11.020

Experimental research on the effects of epimedium on expression of PPAR γ gene in the progress of the MSCs adipogenic differentiation LIU Haiquan, QIN Jiajia, YANG Haiyun, et al. Foshan of TCM, Foshan 528000, China

Abstract: MSCs has capacity of multi-directional differentiation. Some study found there was inevitable relationship between MSCs's adipogenic and Osteoporosis. PPAR γ is the main control factor of the adipose differentiation. It has been found playing a crucial role in the differentiation of MSCs. Epimedium can promote the osteogenic differentiation of MSCs. But there is not any report about its impact on the PPAR γ gene expression during MSCs adipogenic differentiation.

Key words: Epimedium; Adipogenic differentiation; Osteoporosis; Research progress

近年来随着骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)研究的深入, 骨髓腔内的脂肪细胞尤其是脂肪形成在骨质疏松发病及治疗中的作用逐渐引起人们的兴趣和关注。Nuttal 等^[1]提出了通过抑制骨髓基质干细胞的脂肪分化, 达到预防和治疗骨质疏松症的说法。宋纯理等^[2]提出骨质疏松发病机制的“脂肪细胞过剩”途径假说。因此抑制 MSCs 成脂分化是目前探讨骨质疏松症发病机制与防治的新途径。

1 骨髓基质干细胞成脂、成骨分化研究

MSCs 具有干细胞的共性, 即具有自我复制和多向分化能力, 体外不同诱导条件下, 能够向成骨细

胞、脂肪细胞及基质细胞等不同的细胞系分化。近年来的实验研究证实, MSCs 成脂分化与骨质疏松症存在着不可忽视的关系, 骨髓腔中成骨细胞与脂肪细胞具有同源性, 均来源于骨髓间充质干细胞, 两者存在此消彼长的关系^[3]。王华松等^[4]通过实验研究发现, 在 MSCs 与不同浓度的脂肪细胞的共培育体系中, 随着脂肪细胞浓度上升, MSCs 内碱性磷酸酶相对活性下降, 由此认为髓内脂肪细胞干扰了 MSCs 的成骨能力, 可能与骨质疏松症的发病有关。李湘辉等^[5]通过实验研究发现, 骨量不断丢失的同时, 骨髓腔内脂肪细胞的体积、数目均呈直线性增加, 提示骨质疏松症中的成骨细胞数量和功能降低可能与 MSCs 向成骨细胞分化的能力降低有关。李良等^[6]通过对不同月龄的正常大鼠与去势大鼠的 MSCs 体外培养观察证实, 去卵巢大鼠 MSCs 增殖能力明显下降, 向成骨细胞分化能力下降, 向脂肪细胞分化能力增强, 由此认为去卵巢骨质疏松大鼠 MSCs 向成骨细胞分化能力的降低和向脂肪细胞分化能力的增强, 可能与绝经后骨质疏松症的发生有关。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 30901915); 中国博士后科学基金面上资助项目(项目编号: 20080440744)

作者单位: 528000 佛山, 广东佛山市中医院(刘海全、杨海韵), 暨南大学(秦佳佳), 广州中医药大学(刘庆思)

通讯作者: 秦佳佳, Email: jopg0340@sina.com

2 PPAR γ 与成脂分化关系

近年来随着对脂肪细胞调控基因研究的不断深入,发现过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)的亚型 PPAR γ 是脂肪分化的主要调控因子,对 MSCs 分化方向起关键性调控作用。PPAR 是一组配体活化的转录因子,属于核受体超家族,广泛存在于人体内,它分为 α 、 β 、 γ 3 种亚型。

近年来临床试验、动物及体外实验研究发现,PPAR γ 有抗肿瘤、抗心肌缺血再灌注损伤、神经保护作用^[7];其是目前最具有脂肪细胞特异性的,其基因在脂肪组织中是特异表达的^[8],对脂肪细胞的分化起正向调节作用,在许多脂肪细胞基因转录前被诱导,对脂肪细胞的分化起关键性作用的调节因子^[9],可通过不同的调节通路促进成脂和抑制成骨,并与老年人成脂活性增强和成骨活性减弱有关。Rosen 等^[10]用 ES 细胞途径证明了 PPAR γ 对脂肪细胞的体内和体外分化都是必需的。PPAR γ 表达质粒可诱导多能干细胞及 3T3-L1 前脂肪细胞向终末期脂肪细胞转化^[11],还可促进非脂肪系细胞分化成脂肪细胞。PPAR 基因作为节俭基因(Thrifty genes)的主控基因,调控着与脂肪生成、糖尿病、肥胖相关基因的表达,该受体还参与多种细胞生理活动的转录调控,包括细胞周期调控、炎症、免疫调节、肿瘤细胞的活动等^[12,13]。其中,PPAR γ 2 亚型是脂肪细胞分化的关键调控因子,并对 MSCs 的分化方向起重要的调控作用。PPAR γ 2 表达高的 MSCs 向脂肪细胞转化,同时抑制成骨细胞分化转录因子即核心结合因子 a(Cbfa1)/Runx2 mRNA 的表达而减少成骨细胞生成,提示调控因子 PPAR γ 2 与 Cbfa1 之间存在交互作用,而这种作用影响着 MSCs 的分化结果——成骨或成脂,这可能是骨质疏松症时骨髓中脂肪细胞与成骨细胞比例失衡的一个原因^[14]。Lecka-Czemik 等^[15]发现,PPAR γ 2 活化促使脂肪细胞从前体细胞中分化出来,同时通过阻止 Cbfa1 的表达来抑制成骨细胞样的活性。

3 成脂分化能力的鉴定

MSCs 在含 10% 胎牛血清普通体外培养条件下可自发地分化成脂肪细胞,但一些成脂诱导剂可加速其分化。成脂诱导剂有糖皮质激素、吡哆米沙星、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)、生长激素等,它们可能共同作用启动了与脂肪细胞定向诱导

分化有关基因的表达,从而实现了向脂肪细胞的定向分化。Pereira 等^[16]证实糖皮质激素在抑制 MSCs 成骨分化的同时促进其成脂分化。糖皮质激素促进成脂分化的过程:当激素与受体结合后激活了一种促脂肪转录因子——增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding proteins, C/EBP δ),C/EBP δ 能特异性连接在 PPAR γ 启动子区和反式作用因子上激活 PPAR γ 基因表达,从而诱导 MSCs 分化为脂肪细胞,使骨髓中脂肪堆积^[17]。

光镜下 MSCs 成脂分化后细胞由梭形变为圆形、椭圆形或多边形,大小不等。细胞内含有脂滴,不同的生长时期脂滴的大小不同。用油红 O、苏丹 III 或钼酸等脂肪染料染色后胞浆内的脂滴被染成亮红色。另外脂肪细胞分化的鉴定不仅靠形态学指标进行检测,还可通过 RT-PCR、Western 印迹对特异基因的表达进行鉴别和测量。

4 淫羊藿防治骨质疏松症研究现状

中国历代医书中并无明确的病名与骨质疏松症相对应,但根据其所描述的临床症状及发病机理,如“骨痿”、“骨痹”、“骨枯”等与骨质疏松症颇为相似。其中定性定位较准确的当属“骨痿”。中医认为本病病机以肾虚为主,辨证论治骨质疏松症主要以补肾为主。肾藏精,主骨,所以肾虚必然会引起骨骼的异常。《素问·脉要精微论》有:“腰者肾之府,转摇不能,肾将惫矣。”《千金方》中有:“肾虚者,酸疼不安,好倦。”《丹溪心法·腰痛》中记有:“肾虚者,疼之不己者是也。”均说明肾虚精亏,不能主骨生髓,骨失濡养而致腰脊酸痛,因其为虚痛,故痛势隐隐,绵延不绝;精舍神,精衰则神弱而致神疲乏力;精虚则不能化气,鼓动血脉无力,气血不行,痹阻经络而致腰背疼痛。

淫羊藿(Epimedium)是常用的补肾中药,具有“补肾壮阳、强筋骨、祛风湿”之功效。近来研究发现,淫羊藿具有抑制衰老,促进骨髓基质干细胞增殖与成骨分化,预防骨质疏松的作用。刘小雨等^[18]通过实验研究发现,大鼠淋巴细胞凋亡率随增龄而逐渐升高,应用淫羊藿总黄酮干预可以明显降低这种趋势。马慧萍等^[19]通过研究发现,淫羊藿总黄酮可以显著提高碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌量和钙盐沉积量,其活性代谢产物强烈刺激 MSCs 的增殖和成骨性分化。李健等^[20]通过实验证实含淫羊藿血清对体外培养的骨器官有促进其成骨发育的作用。叶纯等^[21]通过实验研究发现淫羊藿水提液通过抑

制去势后大鼠松质骨基质中破骨细胞的生成,阻止了由于雌激素缺失引起的骨丢失,能有效预防骨质疏松症的发生。李盛琳等^[22, 23]通过研究也显示,淫羊藿提取液可以抑制去势雌性大鼠颌骨骨量下降,降低大鼠剩余牙槽嵴吸收速度,淫羊藿可显著增加成骨细胞碱性磷酸酶的活性,其防治骨质疏松症的重要机制之一可能是促进成骨细胞的成骨功能。目前,已有学者通过对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力研究发现,去卵巢骨质疏松大鼠的骨髓基质干细胞增殖和成骨分化能力都降低^[24]。

综上所述,去卵巢大鼠 MSCs 增殖能力明显下降,向成骨细胞分化能力下降,向脂肪细胞分化能力增强,淫羊藿提取物或含药血清可以促进 MSCs 成骨分化。但淫羊藿提取物或含药血清是否通过抑制 MSCs 成脂分化,从而促进其成骨分化,在 MSCs 成脂分化过程中淫羊藿提取物或含药血清对 PPAR γ mRNA 及其蛋白表达影响的机制尚未明了,有待于进一步研究证实。

【参 考 文 献】

- [1] Nuttall ME, Gimble JM. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone*, 2000, 27: 177-184.
- [2] 宋纯理, 党耕町. 髓腔内脂肪细胞与骨质疏松. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8(3): 266-269.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 2002, 284(5): 143-147.
- [4] 王华松, 陈庄洪, 罗永湘. 髓内脂肪细胞对骨髓基质细胞成骨能力的影响. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(22): 832-834.
- [5] 李湘辉, 陆志坚, 张金超, 等. 阿伦磷酸钠对小鼠骨髓基质细胞成骨和成脂分化的影响. *中国药理学报*, 2006, 27(6): 671-674.
- [6] 李良, 李东菊, 吴江, 等. 骨髓间充质干细胞在去卵巢大鼠骨质疏松发病机理中潜在的作用. *生物医学工程杂志*, 2006, 23(1): 129-135.
- [7] Ray DM, Akbiyik F, Phipps RP. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) ligands 15-deoxy-Delta2, 14-prostaglandin J2 and ciglitazone induce human B lymphocyte and B cell lymphoma apoptosis by PPAR gamma-independent mechanisms. *Journal of Immunology*, 2006, 177(8): 5068-5076.
- [8] Ding ST, Schinckel AP, Weber TE. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J Anim Sci*, 2000, 78(8): 2127-2134.
- [9] Khan E, Abu-Amer Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med*, 2003, 142: 29-34.
- [10] 陶新, 汪以真, 许梓荣. 分化转录因子与脂肪细胞分化调控. *畜牧与兽医*, 2002, 4: 34-36.
- [11] Decine JH, Eubank DW, Clouthier DE, et al. Adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter requires peroxisome proliferator activated receptor γ and 9-cis-retinoic receptor binding to adipocyte-specific enhancer in vivo. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 13604-13612.
- [12] Kersten S, Desvergne B, Wahl W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 2000, 405: 421-424.
- [13] Martens FM, Visseren FL, Lemay J, et al. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs*, 2002, 62: 1463-1480.
- [14] 林新富, 陈刚. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2 与骨质疏松症. *福建医药杂志*, 2007, 29(3): 109-110.
- [15] Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 2002, 143(6): 2376-2384.
- [16] Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effect of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAA-enhancer binding protein expression. *Bone*, 2002, 30(5): 685-691.
- [17] Pereira RM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis in culture. *Bone*, 2001, 28(5): 484-490.
- [18] 刘小雨, 沈自尹, 吴斌, 等. 衰老进程中大鼠淋巴细胞凋亡率的比较研究及淫羊藿总黄酮的干预作用. *中国免疫学杂志*, 2007, 23: 803-806.
- [19] 马慧萍, 贾正平, 张汝学, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(10): 420-423.
- [20] 李健, 叶纯, 刘道德, 等. 淫羊藿血清对 SD 大鼠骨体外生长发育的影响. *四川解剖学杂志*, 2004, 12(2): 106-109.
- [21] 叶纯, 苏进, 王凡. 淫羊藿水提液对去势大鼠松质骨的影响. *中国临床解剖学杂志*, 2008, 26(1): 87-90.
- [22] Li Shenglin, Zhangkuihua, Yu Shifeng. The effect of Epimedium grandiflorum OIT on prevention and treatment of rat mandible and femur bone loss. *Chin J Dent Res*, 2007, 10: 57-60.
- [23] 李盛林, 高华, 章魁华. 淫羊藿对小鼠成骨细胞增殖、功能及凋亡的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2008, 40(4): 43-46.
- [24] 李冬菊, 葛冬霞, 吴文超, 等. 去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力研究. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(3): 318-321.

(收稿日期: 2009-08-10)