

表 2 各组药物对红细胞膜流动性差异

Tab 2 Effect of each group on the membrane fluidity of erythrocyte membrane

组 别	剂量/ mg·mL ⁻¹	P	η
葛根素注射液组	22	0.349±0.007	6.276±0.008
空白对照组	—	0.227±0.004 ¹⁾	2.015±0.005 ²⁾
PEG 化葛根素组	552	0.251±0.006 ¹⁾	2.402±0.003 ²⁾

注：与葛根素注射液组比较，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01

Note: Compared with puerarin injection group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

抗溶血作用。这些实验结果表明 PEG 修饰技术减少了葛根素的溶血不良反应，PEG 化葛根素具有较好的安全性。

REFERENCES

[1] YU J Q, GAO E. Research progress in pharmacological activities of puerarin on cardio-cerebral-vascular system [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2008, 17(24): 3880-3882.

[2] ZHANG H Y, LI D W, SHI C H. Advances in studies on clinical practice of puerarin [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2012, 27(1): 75-78.

[3] HUANG P, GONG Y S, FAN X W, et al. Effect of puerarin on Apelin/APJ system in right ventricle of pulmonary

hypertensive rats induced by hypoxia-hypercapnia [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(4): 565-569.

[4] LI G. Research on biological assessment of anti-hemolysis compound puerarin injection [D]. Yangcheng: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2009.

[5] YUE P F, YUAN H L, CONG L B, et al. Study on preparation and anti-hemolysis activity of puerarin submicron emulsion [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(2): 119-123.

[6] LIU X Y, LI J R, WANG N J, et al. Alleviation of PEGylated puerarin on erythrocyte hemolysis induced by puerarin in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient rats [J]. Chin Herb Med, 2013, 5(1): 47-52.

[7] LIU X Y, YU B Y, WANG N J, et al. A validated stability-indicating HPLC method for the determination of PEGylated puerarin in aqueous solutions [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(23): 2061-2066.

[8] LIU X Y, ZHI H Y, DU F, et al. A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(31): 3297-3302.

[9] YANG Y, YE X L, LI X G. Effect of berberine on membrane fluidity and membrane protein fluorescence of rabbit red-blood cells [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2009, 30(17): 1627-1629.

[10] ZHANG L Q, GUI X, et al. Clinical significance of changes of membrane fluidity of akaryocyte in hypoxic ischemic(HIE) of newborn [J]. Chin Rem Clin(中国药物与临床), 2010, 10(10): 1154-1155.

收稿日期: 2013-06-05

牡荆苷对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

周晨慧, 张雪, 徐道华* (广东医学院, 广东 东莞 523808)

摘要: 目的 探讨牡荆苷对体外培养大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。方法 采用 MTT 法检测牡荆苷对骨髓间充质干细胞生存率的影响, 以对硝基苯磷酸盐法检测碱性磷酸酶活性, 茜素红法染色评价钙化结节形成。实时荧光定量 PCR 检测 runt-related transcription factor 2(Runx2)和 osterix(Osx)表达。结果 牡荆苷在 0.1~50 μmol·L⁻¹ 浓度内对骨髓间充质干细胞生存率无显著影响。牡荆苷能明显提高骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶活性, 并能促进钙化结节形成。牡荆苷也上调 Runx2 和 Osx 基因表达。结论 牡荆苷可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化, 其作用可能与上调 Runx2 和 Osx 基因表达有关。

关键词: 牡荆苷; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)04-0405-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.005

Effect of Vitexin on the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ZHOU Chenhui, ZHANG Xue, XU Daohua* (Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

基金项目: 东莞市科技计划资助项目(2011108102019)

作者简介: 周晨慧, 女, 博士, 讲师 Tel: (0769)22896506

E-mail: chenhuizh@126.com

*通信作者: 徐道华, 男, 博士, 教授,

硕士 Tel: (0769)22896551 E-mail: daohuax108@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of vitexin on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs). **METHODS** Methylthiazolyl tetrazolium(MTT) assay was applied to determine the viability of MSCs. Alkaline phosphatase(ALP) activity was detected using p-nitrophenyl phosphate assay. Nodule formation of calcium was observed with alizarin red stain. The genes expression of runt-related transcription factor 2 (Runx2) and osterix (Osx) was detected by real time PCR. **RESULTS** Vitexin at concentration from 0.1 to 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ had no effect on viability of MSCs. Vitexin effectively stimulated the activity of ALP in MSCs and increased the nodule formation of calcium. Vitexin also up-regulated the expression of Runx2 and Osx mRNA. **CONCLUSION** Vitexin improves the osteogenic differentiation of MSCs, which may be related with the up-regulation of the expression of Runx2 and Osx.

KEY WORDS: vitexin; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种易于扩增、具有多种分化潜能的细胞,在特定诱导条件下,可分化为骨、软骨、肌肉、脂肪及肌腱等多种组织细胞。近年来发现, MSCs 与骨质疏松症的发生发展密切相关, MSCs 向成骨细胞分化能力的减弱是导致骨质疏松症的原因之一^[1-2]。因此,通过促进 MSCs 向成骨方向分化,已成为骨质疏松症防治的研究热点之一。

牡荆苷(vitexin)是自然界中最常见的黄酮碳苷,具有抗炎、抗氧化、抗病毒和降血糖等作用^[3-4]。通络生骨胶囊对股骨头坏死具有极好的疗效,该方由单味药木豆叶组成,牡荆苷为其主要成分^[5-6]。但牡荆苷对 MSCs 成骨分化作用未见报道。本研究采用细胞培养技术,观察牡荆苷对大鼠 MSCs 成骨分化作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

牡荆苷由本实验室制备(纯度>98%),制备方法参照文献[7]进行,用二甲基亚砜(DMSO)溶解为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,临用时用培养基稀释至所需浓度;噻唑蓝(MTT,批号: M5178)、DMSO(批号: RNBC6511)、氯化十六烷基吡啶(批号: BCCL1675)、维生素 C(批号: SLBB4446V)、地塞米松(批号: SLBF8128V)、 β -磷酸甘油(批号: 120M54281V)均购于美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(批号: 1300105),胎牛血清(批号: 1105311)均购自 Gibco 公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(批号: H1200618)购于 BioSystems 公司;所有引物由 invitrogen 公司合成。

1.2 MSCs 分离培养

采用全骨髓法,取 1 月龄 SPF 级 SD 大鼠,脱颈处死后无菌条件下取出双侧股骨,除去肌肉、剪去两端骨髓,冲出骨髓并悬浮于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养,首次 24 h 换液,以后每 3 d 换液 1 次,

细胞达 80%融合时,0.25%胰蛋白酶消化传代培养。

1.3 细胞生存率检测^[8]

MSCs 细胞接种于 96 孔培养板,接种密度为 $5\times 10^3\cdot\text{孔}^{-1}$,细胞生存率检测采用 MTT 法。各实验组处理后,加入 MTT 使其终浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 4 h,弃培养液,加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 的 DMSO 使甲瓚颗粒完全溶解,酶标仪波长 570 nm 测定吸光度值。

1.4 ALP 活性的测定

24 孔板中每孔接种 1×10^4 MSCs 细胞,细胞完全融合后,每孔分别加入成骨诱导液(由内含 $0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 维生素 C 和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油 DMEM 完全培养基组成)或含不同浓度牡荆苷的成骨诱导液,隔天换液,7 d 后吸出各孔培养液,各孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞裂解液。采用试剂盒检测 ALP 活性, Bio-Rad 法测定蛋白浓度。

1.5 钙化结节染色^[9]

12 孔板中每孔接种 2×10^4 MSCs 细胞,细胞完全融合后,每孔分别加入成骨诱导液或含不同浓度牡荆苷的成骨诱导液,隔天换液,18 d 后吸出各孔培养液, PBS 洗 2 遍,茜素红法染色并拍照。10%氯化十六烷基吡啶洗脱茜素红,酶标仪波长 562 nm 测定吸光度值。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 Runt-related transcription factor 2(Runx2)和 osterix(Osx)表达

收集各组细胞,提取细胞总 RNA,取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录合成 cDNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ cDNA 产物,加入荧光混合物和各基因上、下游引物(引物序列 Runx2: 5'-CCGATGGGACCGTGGTT-3' 和 5'-CAGCAGAGGCATTTTCGTAGCT-3'; Osx: 5'-CAGCC TGCAGCAAGTTTGG-3'和 5'-TTTTCACAGGGCT GTTGAGT-3'; β -actin: 5'-CGTAAAGACCTCTAT GCCAACA-3'和 5'-CGGACTCATCGTACTCCTG CT-3',总体积 $15\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min,以后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s 循环 40 次。以 β -actin

作为内参，目的基因的表达用相对表达量表示。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。数据分析采用单因素方差检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牡荆苷对细胞生存率的影响

牡荆苷在 $0.1 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 MSCs 生存率无显著影响，说明在此浓度下牡荆苷对 MSCs 无显著毒性，结果见表 1。

表 1 牡荆苷对 MSCs 生存率的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of vitexin on the vability of MSCs($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	OD 值
空白对照组	—	1.35 ± 0.39
牡荆苷	0.1	1.26 ± 0.17
	1	1.25 ± 0.22
	5	1.34 ± 0.17
	10	1.31 ± 0.19
	50	1.41 ± 0.18

2.2 牡荆苷对 ALP 活性的影响

与空白对照组比较，牡荆苷可浓度依赖性地增强 MSCs ALP 活性，结果见表 2。

表 2 牡荆苷对 MSCs 碱性磷酸酶的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of vitexin on ALP activity in MSCs($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$
空白对照组	—	1.40 ± 0.35
牡荆苷	10	$2.66 \pm 0.36^{1)}$
	50	$2.94 \pm 0.25^{1)}$

注：与空白对照组比较， $^{1)}P < 0.01$

Note: Compared with control group, $^{1)}P < 0.01$

2.3 牡荆苷对 MSCs 钙化结节的影响

与空白对照组比较，牡荆苷在浓度为 10， $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中培养 18 d 时可显著增加 MSCs 钙化结节的形成($P < 0.01$)，结果见图 1。

2.4 牡荆苷对 Runx2 基因表达的影响

Runx2 为 MSCs 成骨分化的重要转录因子，本实验采用荧光定量 PCR 法检测 Runx2 mRNA 变化。结果表明，牡荆苷呈剂量依赖性增加 Runx2 基因表达，结果见图 2。

2.5 牡荆苷对 Osx 基因表达的影响

Osx 为 MSCs 成骨分化另一重要转录因子，本实验采用荧光定量 PCR 法检测 Osx mRNA 变化。结果表明，牡荆苷呈剂量依赖性增加 Osx 基因表

达，结果见图 3。

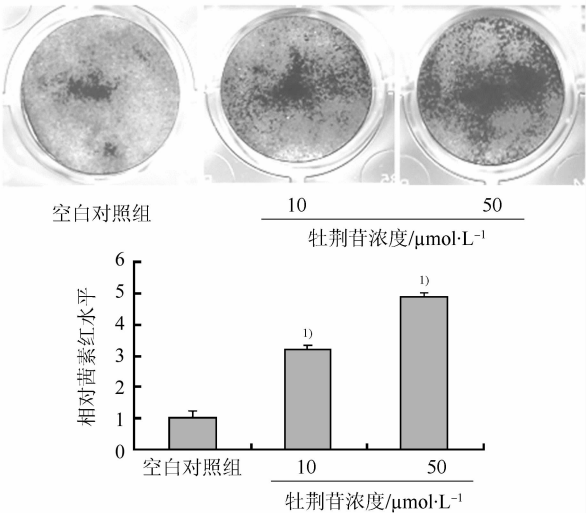


图 1 牡荆苷对 MSCs 钙化结节的影响($n=4$, $\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较， $^{1)}P < 0.01$

Fig 1 Effect of vitexin on the nodule formation of calcium in MSCs($n=4$, $\bar{x} \pm s$)
Compared with control group, $^{1)}P < 0.01$

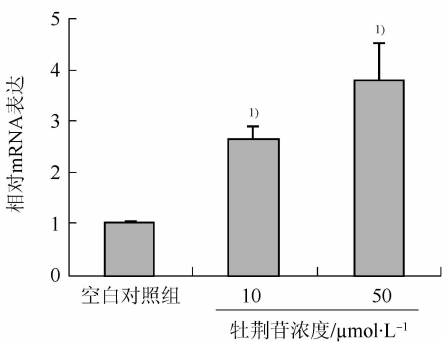


图 2 牡荆苷对 Runx2 基因表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较， $^{1)}P < 0.01$

Fig 2 Effect of vitexin on the the expression of Runx2 mRNA in MSCs($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
Compared with control group, $^{1)}P < 0.01$

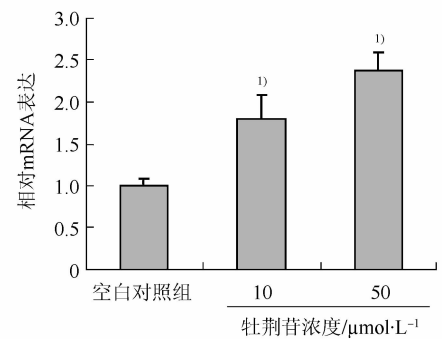


图 3 牡荆苷对 Osx 基因表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较， $^{1)}P < 0.01$

Fig 3 Effect of vitexin on the expression of Osx mRNA in MSCs($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
Compared with control group, $^{1)}P < 0.01$

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨的微观结构退化为特征^[10],致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的全身性骨骼疾病。随着人口的不断增长和老年化社会的到来,骨质疏松症及其所引起的骨折已成为严重危害人类健康的世界性公共卫生问题。

近年来发现, MSCs 与骨质疏松症的发生发展密切相关, MSCs 向成骨细胞分化能力的下降是导致骨质疏松症的主要原因之一^[1-2]。本实验观察了牡荆苷对 MSCs 毒性的影响, 研究显示牡荆苷在 $0.1\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内对 MSCs 细胞无显著毒性。在 MSCs 成骨过程中, 其首先分化为前成骨细胞, 再分化为成骨细胞, 最后发生矿化。ALP 为 MSCs 成骨分化的早期标志物, 可分解焦磷酸为磷酸, 后者为羟基磷灰石形成所必须的原料^[11]。因此, ALP 在骨形成中起重要作用。此外, 骨基质钙化产生的矿化结节是成骨分化末期的重要标志。本研究结果表明牡荆苷可剂量依赖性地增加 MSCs 中 ALP 活性, 并显著促进了 MSCs 钙化结节的形成。这些结果说明牡荆苷对 MSCs 的成骨分化具有明显的促进作用。

Runx2 又称核心结合因子 $\alpha 1$, 属于 runt 结构域基因家族的转录因子, 为成骨特异性转录因子。研究显示, 在 Runx2 完全缺失的小鼠中, 膜内成骨和软骨内成骨均被完全抑制; 过表达 Runx2 可显著促进成骨细胞分化^[12-13]。Osx 是含有锌指结构的转录因子, 在骨形成中起重要作用。在 Osx 完全缺失的小鼠中, 膜内成骨和软骨内成骨也被完全抑制。研究还发现, 在 Runx2 完全缺失的小鼠中, 没有观察到 Osx 表达; 而在 Osx 完全缺失小鼠仍能正常表达 Runx2。说明 Osx 为 Runx2 下游靶基因^[14-15]。本研究结果发现牡荆苷可上调 Runx2 和 Osx 基因表达。推测牡荆苷促进 MSCs 成骨分化可能与通过上调 Runx2 基因表达进而促进 Osx 基因表达有关。

REFERENCES

- [1] PINO A M, ROSEN C J, RODRIGUEZ J P. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells(MSCs) improves

- bone marrow adipogenesis [J]. Biol Res, 2012, 45(3): 279-287.
- [2] CARBONARE D L, VALENTI M T, ZANATTA M, et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(11): 3356-3365.
- [3] TANUS-RANGEL E, SANTOS S R, LIMA J C, et al. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus*(Kunth) Micheli(Alismataceae) [J]. J Med Food, 2010, 13(5): 1161-1166.
- [4] DONG L Y, CHEN Z W, GUO Y, et al. Mechanisms of vitexin preconditioning effects on cultured neonatal rat cardiomyocytes with anoxia and reoxygenation [J]. Am J Chin Med, 2008, 36(2): 385-397.
- [5] YANG J, LI J, XU C Y, et al. Experimental research on prevention of glucocorticoid-induced avascular necrosis of the femoral head with Tongluo Shenggu capsules [J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2005, 16(3): 185-188.
- [6] ZHANG J Q, LI H L, TAN Y F, et al. Study on quality evaluation of Pigeonpea Leaves [J]. Chin Trad Herb Drugs(中草药), 2010, 41(10): 1723-1725.
- [7] YAN C, LIN L, LIU H, et al. Study of flavonoids from leaves of *Santalum album* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(22): 3130-3133.
- [8] XU W, CHEN Q Y. Role of Rho GTPase in inhibiting metastasis and proliferation ability of human lung cancer cell lines by curcumin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(5): 475-480.
- [9] YAO D, XIE X H, WANG X L, et al. Icaritin, an exogenous phytomolecule, enhances osteogenesis but not angiogenesis-an *in vitro* efficacy study [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41264.
- [10] ZHOU P, LI J, WO L Q, et al. Clinical study on treatment of spleen deficiency type postmenopausal osteoporosis with Guiluyanggu [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(5): 529-534.
- [11] ORIMO H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease [J]. J Nippon Med Sch, 2010, 77(1): 4-12.
- [12] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. Cell, 1997, 89(5): 755-764.
- [13] ZHAO Z, ZHAO M, XIAO G, et al. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Ther, 2005, 12(2): 247-253.
- [14] KIM Y J, KIM H N, PARK E K, et al. The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells [J]. Gene, 2006, 366(1): 145-151.
- [15] NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. Cell, 2002, 108(1): 17-29.

收稿日期: 2013-12-08