

病治疗中常用的中药, PNS 是三七的主要有效成分。

增殖和分化是细胞发育过程中的两个不同方向, 本研究结果发现, PNS 在低、中剂量作用时, 脂肪细胞的数量略有增加, 但差异无统计学意义, 说明 PNS 在低、中剂量下不影响脂肪细胞的增殖, 不会促进脂肪组织体积的增大, 但在高剂量组时, 能明显促进脂肪细胞的增殖, 细胞数量增加; 在细胞分化方面, PNS 低浓度时, 对细胞分化影响不明显, 中、高浓度组可有效的抑制细胞内脂滴的聚积, 抑制细胞的分化, 且随着浓度的增大, 其抑制作用增强。由此提示, 三七的降脂最佳作用剂量并不是剂量越高, 效果越好, 中浓度作用, 可能更有利于降脂功能的发挥。进一步观察其对抑制调控脂肪细胞分化的主要转录因子 PPAR γ 2 和 C/EBP α 基因的表达^[8]发现, PNS 可能通过抑制调控脂肪细胞分化相关基因的表达而抑制前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化。

Leptin 和 PAI-1 是脂肪细胞分泌的两种重要激素, 其分泌异常将大大增加肥胖、2 型糖尿病和心血管事件发生, 本研究结果提示 PNS 一方面可以通过抑制成熟脂肪细胞的分化而减少 Leptin 和 PAI-1 的分泌, 另一方面可直接通过抑制脂肪细胞分泌 Leptin 和 PAI-1 而减少其在血浆中的水平。PNS 对脂肪细胞 Leptin 和 PAI-1 分泌的抑制作用将有利于降低导致心脑血管疾病发生的危险因素, 这在一定程度上也阐释了中药三七防治心脑血管疾病的部

分作用机制。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 (一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 吕萍, 陈海峰. 三七叶苷降脂作用的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 235.
- [3] Joshi Venugopal, Kazuhiko Hanashiro, Zhong-Zhou Yang, et al. Identification and modulation of a caveolae-dependent signal pathway that regulates plasminogen activator inhibitor-1 in insulin-resistant adipocytes[J]. PNAS, 2004, 101(12): 17120-17125.
- [4] Tang QQ, Zhang JW, Daniel LM. Sequential gene promoter interactions of C/EBP beta, C/EBP alpha, and PPAR gamma during adipogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(1): 235.
- [5] Hemati N, Ross SE, Erickson RL, et al. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 25913-25919.
- [6] 刘新迎, 周联, 梁瑞燕, 等. 柚皮苷对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖和诱导分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 176-179.
- [7] Ramirez-Zacarias JL, Castro-munozledo F, Kuri Haruch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J]. Histochemistry, 1992, 97(6): 493-497.
- [8] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway[J]. Genes & Dev, 2002, 16(1): 22-26.

(编辑: 邓响潮)

淫羊藿对骨质疏松 MSCs 成脂分化 PPAR γ mRNA 表达的影响

刘海全¹, 秦佳佳², 吴倩²(1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240; 2. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 探讨淫羊藿含药血清在骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 成脂分化过程中对过氧化物酶体增植物激活受体亚型 PPAR γ mRNA 表达的影响。**方法** 分离、培养骨质疏松大鼠 MSCs, 传至 3 代。将所获细胞随机分为模型组, 成脂诱导组, 西药组, 成脂诱导西药组, 中药组, 成脂诱导中药高、中、低剂量组。采用淫羊藿含药血清对 MSCs 进行干预, 并与尼尔雌醇含药血清进行对照, 观察各组 PPAR γ mRNA 表达的变化。**结果** 与模型组比较, 西药组、中药组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与成脂诱导组比较, 成脂诱导西药组、成脂诱导中药高、中、低剂量组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

收稿日期: 2013-03-11

作者简介: 刘海全, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中医药防治骨质疏松症。Email: liuhaiq1977@163.com。通讯作者, 秦佳佳, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药治疗和预防卵巢早衰发生机制研究。Email: acd0171@sina.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901915); 广东省普通高校“中医女性生殖调节与安全性研究”重点实验室开放基金资助项目(ZA201112); 广东省自然科学基金资助项目(S2011010004277)。

结论 淫羊藿含药血清可抑制绝经后骨质疏松症大鼠 MSCs 及其在成脂分化过程中 PPAR γ mRNA 的表达, 从而抑制 MSCs 成脂分化, 以防治骨质疏松症。

关键词: 淫羊藿; 骨髓间充质干细胞; 成脂分化; PPAR γ

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0382-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.015

Effect of Herb Epimedii on Expression of PPAR γ mRNA of MSCs During Adipogenesis in postmenopausal osteoporosis rats

LIU Haiquan¹, QIN Jiaia², WU Qian² (1. Affiliated Orthopedics Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240 Guangdong, China; 2. Jinan University, Guangzhou 510632 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Herb Epimedii on PPAR γ mRNA expression of MSCs during adipogenesis in postmenopausal osteoporosis rats. **Methods** The third generation of MSCs were divided into 8 groups at random, model group (MG), adipogenic induction group (AIG), western medicine group (WMG), adipogenic western medicine group (AWMG), herb group (HG), adipogenic low-dose herb group (ALDHG), adipogenic medium-dose herb group (AMDHG), adipogenic high-dose herb group (AHDHG). The PPAR γ mRNA expression of each group was observed. **Results** Compared with the MG, PPAR γ mRNA expression of WMG and HG were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the AIG, PPAR γ mRNA expression of AWMG, AWMG, ALDHG and AMDHG were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Herb Epimedii can reduce PPAR γ mRNA expression of MSCs in postmenopausal osteoporosis rats, inhibit the adipogenesis of MSCs, which contributes to the mechanism of the role of prevention and treatment of osteoporosis.

Keywords: Herb Epimedii; MSCs; Adipogenic differentiation; PPAR γ

随着人口老龄化的不断加剧, 骨质疏松的防治逐渐成为国内外医学研究的热点。Nuttal 等^[1]提出了通过抑制骨髓基质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 的脂肪分化, 达到预防和治疗骨质疏松症的观点为本病的防治提供了新的理念。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 成脂分化起关键性调控作用。本研究通过培养骨质疏松症大鼠 MSCs, 成脂诱导剂体外诱导其成脂分化, 应用淫羊藿含药血清对其进行体外干预, 并与尼尔雌醇含药血清作对比, 探讨淫羊藿在骨质疏松大鼠 MSCs 成脂分化过程中对 PPAR γ mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 15 只未生育的 3 月龄 SD 雌性大鼠, SPF 级, 广州中医药大学动物实验中心, 动物合格证号: 粤监证字 2008A002, 体质量 (220 ± 15)g, 其中 3 只用于 MSCs 体外培养供体, 12 只用于药物含药血清

供体。

1.2 试剂及药品 10% 胎牛血清 (FBS), Hyclone 公司, 批号: NRE0007; 低糖 DMEM 培养液, Gibco 公司, 批号: SV30082.01; L3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (IBMX), Sigma 公司, 批号: I-7018; 吡啶美辛、地塞米松, 广州威佳生物公司, 用于成脂诱导液制备; 丙酮酸钠溶液, Gibco 公司, 批号: SH30239.01; 淫羊藿购于广州中医药大学附属佛山市中医院, 72 g 加 10 倍量双蒸水浸泡、煎煮 30 min, 滤布过滤, 滤液于 70 ~ 80 °C 水浴中浓缩至 120 mg/mL, 冷藏保存备用; 尼尔雌醇片, 北京四环制药有限公司, 批号: 20080601; SYBR Green PCR Master Mix, Toyobo 公司。

1.3 绝经后骨质疏松症模型建立 大鼠腹腔 1% 戊巴比妥钠 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 沿后正中线下段作 1.0 ~ 1.5 cm 纵行切口, 逐层分离, 暴露卵巢, 于输卵管远端结扎并切除双侧卵巢, 闭合切口, 术后常规喂养 12 周。

1.4 原代 MSCs 的体外培养 颈椎脱臼法处死大鼠,

分离出股骨,剔除肌肉组织,将股骨中间剪断,用低糖 DMEM 培养液(含肝素 $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)反复冲洗髓腔,制成单细胞悬液。将单细胞悬液离心($1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),弃上清;加入含 10% FBS 的 DMEM,吹打散细胞,并以 10^7 个/mL 的密度接种在培养瓶中,置 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养。

1.5 MSCs 传代、纯化及分组 利用差异贴壁培养法纯化细胞,取 3 代细胞用于实验。实验细胞接种前均进行台盼蓝细胞活力计数,细胞活力要求在 98% 以上。实验细胞分为模型组,成脂诱导组,西药组,成脂诱导西药组,中药组,成脂诱导中药高、中、低剂量组。

1.6 含药血清及成脂诱导液的制备 成脂诱导剂的筛选、制备及含药血清的制备已于课题前期实验完成^[2]。成脂诱导剂配方: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 吡哆美辛, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松的 DMEM 培养基。大鼠按体表面积的方法,给予淫羊藿水提液($1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续 7 d;给予尼尔雌醇混悬液($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每周 1 次,连续 8 周。均灌胃给药,并于最后 1 次给药后 2 h 摘眼球采血。 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 20 min ,取上清, 56°C 水浴灭活 30 min ,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤除菌,分装, -20°C 保存备用。

1.7 干预方法 模型复制成功后,模型组仅加入 FBS,其余各组在加入 FBS 基础上分别加入不同药物干预 14 d。分别为成脂诱导组加入终浓度为 10% 的成脂诱导剂,成脂诱导中药高、中、低剂量组在加入成脂诱导剂的基础上加入终浓度为 20% 、 10% 、 5% 的淫羊藿含药血清,成脂诱导西药组加入终浓度为 10% 的尼尔雌醇含药血清和终浓度为 10% 的成脂诱导剂,中药组加入终浓度为 10% 的淫羊藿含药血清,西药组加入终浓度为 10% 的尼尔雌醇含药血清。

1.8 总 RNA 抽提 收集细胞,加入 1 mL Trizol 溶液,使细胞充分裂解,静置 5 min ; 4°C , 10000 g 离心 15 min ,可见分为 3 层, RNA 在上层水相,小心吸取上清液,转移到另一 EP 管中。加入 0.5 mL 异丙醇,轻柔地充分混匀,室温静置 10 min ; 4°C 下, 10000 g 离心 10 min ,去上清,收集 RNA 沉淀;加入 $60 \mu\text{L}$ DEPC 水溶解沉淀。去基因组使用 RNase-free 的 DNase I 配置反应液, 37°C 消化 30 min , 65°C 灭活 10 min ;完成总 RNA 纯度、完整性检测以及逆转录。

1.9 定量 PCR 测定 定量 PCR 用酶 SYBR Green PCR Master Mix,定量 PCR 仪 ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System;检测序列片段大小,内参片段: $18\text{SrRNA}-112\text{bp}$,目的片段: $\text{PPAR} \gamma -122\text{bp}$ 。设计的正式实验引物如下: qr-PPAR γ -F2: $5'$ gctgtgaagttcaatgcact, qr-PPAR γ -R2: $5'$ tcttgatgtcct-cgatgg。PPAR γ 表达 ΔCt 值检测: ΔCt =目的基因 Ct-内参 Ct; $\Delta\Delta\text{Ct}$ =待测样品中目的基因 ΔCt -参照样品中目的基因 ΔCt (若无参照样品则选择 ΔCt 最大的样品为参照进行计算);当 PCR 的扩增效率接近 100% ,相对样品模板量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验比较组间统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿含药血清干预 14 d 样品的 RNA 电泳图

应用凝胶成像系统观察,上述各组总 RNA 的 5srRNA 、 18srRNA 和 28srRNA 条带完整,且 28srRNA 的亮度接近 18srRNA 的 2 倍,说明各组总 RNA 提取比较完整,未见明显降解,见图 1。

2.2 淫羊藿对骨质疏松大鼠 MSCs 成脂分化 PPAR γ mRNA 表达的影响

与模型组比较,西药组、中药组

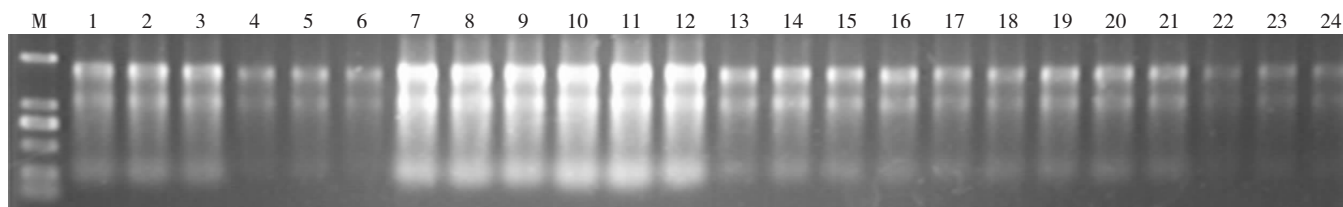


图 1 14 d 样品的 RNA 电泳图

Figure 1 RNA electrophoretogram of the samples on day 14

1~3. 模型组; 4~6. 成脂诱导组; 7~9. 为西药组; 10~12. 中药组; 13~15. 成脂诱导中药高剂量组; 16~18. 成脂诱导中药中剂量组; 19~21. 成脂诱导中药低剂量组; 22~24. 成脂诱导西药组, M 为 Marker。由下至上片段大小依次为 100, 250, 500, 750, 1000 bp。

PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 说明尼尔雌醇、淫羊藿能抑制骨质疏松大鼠 MSCs 的 PPAR γ mRNA 表达。与成脂诱导组比较, 成脂诱导西药组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.05$), 成脂诱导中药高、中、低剂量组 PPAR γ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 说明淫羊藿、尼尔雌醇在骨质疏松大鼠 MSCs 成脂分化过程中均可抑制 PPAR γ mRNA 的表达, 见表 1。

表 1 淫羊藿对骨质疏松 MSCs 成脂分化 PPAR γ mRNA 表达的影响($n=3$)

Table 1 Effect of Herb Epimedii on expression of PPAR γ mRNA of MSCs during adipogenesis

组别	PPAR γ mRNA
模型组	1.463 $\pm$ 0.123
成脂诱导组	1.467 $\pm$ 0.327
西药组	0.467 $\pm$ 0.231**
成脂诱导西药组	0.640 $\pm$ 0.075 Δ
中药组	0.863 $\pm$ 0.343*
成脂诱导中药高剂量组	0.083 $\pm$ 0.015 $\Delta\Delta$
成脂诱导中药中剂量组	0.630 $\pm$ 0.166 Δ
成脂诱导中药低剂量组	0.253 $\pm$ 0.123 $\Delta\Delta$

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与成脂诱导组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

研究发现^[3-4], 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 γ 最具有脂肪细胞特异性, 其基因在脂肪组织中有特异的表达, 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。Lecka-Czernik 等研究结果^[5]也同样证实, PPAR γ 活化能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。

淫羊藿是常用的补肾中药, 具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿之功效。叶纯等^[6]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^[7-8]进一步研究显示, 淫羊藿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。

前期实验研究已证实, 通过 7 d 的干预, 各组均有 PPAR γ mRNA 表达, 其中以模型组表达最为明显; 在抑制 PPAR γ mRNA 表达方面以中药低、高剂量组为最优^[9]。本研究为前期实验的延续研究, 与前期研究比较, 成脂诱导组 PPAR γ mRNA 表达呈现明显上升($P < 0.05$), 其余各组 PPAR γ mRNA 表达均呈下降趋势, 但统计学分析无显著性差异($P > 0.05$), 说明随着实验时间延长, 各组药物继续发挥抑制 MSCs 成脂分化的作用。

本实验结果表明, 应用中药淫羊藿含药血清干预, 可抑制绝经后骨质疏松症大鼠 MSCs PPAR γ mRNA 的表达, 同时, 可以抑制绝经后骨质疏松症大鼠 MSCs 在成脂过程中 PPAR γ mRNA 的表达, 从而抑制 MSCs 成脂分化。

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[J]. Bone, 2000, 27: 177-184.

[2] 刘海全, 秦佳佳, 杨海韵. 淫羊藿含药血清干预骨髓基质干细胞成脂分化过程的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2310-2312.

[3] 宋纯理, 党耕町. 髓腔内脂肪细胞与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 266-269.

[4] 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]. J Anim Sci, 2000, 78(8): 2127-2134.

[5] Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation [J]. Endocrinology, 2002, 143(6): 2376-2384.

[6] 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.

[7] Li SL, Zhang KH, Yu SF. The effect of Epimedium grandiflorum OIT on prevention and treatment of rat mandible and femur bone loss[J]. Chin J Dent Res, 2007, 10: 57-60.

[8] 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[J]. 北京大学学报(医学版), 2008, 1(40): 43-46.

[9] 刘海全, 秦佳佳. 淫羊藿含药血清对骨质疏松大鼠骨髓基质干细胞成脂分化 PPAR γ mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 611-614.

(编辑: 梁进权)