

· 药效与毒理学研究 ·

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠外周血 Treg/Th17 平衡的干预作用

刘梓峰, 郭 珍, 李燕舞, 巫燕莉, 李富凤, 邹 娟, 杜 群(广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 从效应 T 细胞活化的源头 Treg/Th17 入手, 探讨溃结灵调节 Th17 和 Treg 的平衡转化机制, 揭示溃结灵治疗溃疡性结肠炎(UC)的深层次作用机理及作用靶点。方法 采用 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS) ($25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TNBS+50%的乙醇) 诱导复制 UC 大鼠模型, 并随机分为模型组, 溃结灵高、中、低剂量组, 阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组, 另取 12 只 SD 大鼠设为正常组。流式细胞术检测大鼠外周血中 Treg 细胞和 Th17 细胞占总 CD4⁺T 细胞百分比及计算 Treg/Th17 之比。结果 模型组 Treg/Th17 之比, 较正常组显著降低 ($P < 0.01$), 溃结灵高、中、低剂量组以及柳氮磺胺吡啶组 Treg/Th17 之比与模型组比较均有显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 溃结灵对 TNBS 诱导的实验性溃疡性结肠炎大鼠有明显的治疗作用, 其作用机制可能与提高外周血 CD4⁺ Foxp3⁺Treg 细胞比例和降低 CD4⁺IL-17A⁺ Th17 细胞比例, 进而恢复机体 Treg/Th17 平衡有关。

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; Treg/Th17 平衡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2015)01-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.001

Effects of *Kuijieling* on Balance of Peripheral Blood Treg/Th17 in Experimental Ulcerative Colitis Rats

LIU Zifeng, GUO Zhen, LI Yanwu, WU Yanli, LI Fufeng, ZOU Juan, DU Qun (Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effect of *Kuijieling* (KD) on regulating the balance of Treg/Th17, which reflect the activation of effector T cells, and to reveal the therapeutic mechanism of KD for ulcerative colitis(UC) and the action target. **Methods** Trinitro-benzene-sulfonic acid(TNBS) $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ together with 50% of ethanol was used for the establishment of UC rat model. The proportion of Treg and Th17 cells in peripheral blood CD4⁺T cells and the ratio of Treg/Th17 were detected by flow cytometry. **Results** The ratio of Treg/Th17 in the model group was lower than that of the blank control group ($P < 0.01$), while was higher in high-, medium- and low-dosage KD groups and salicylazosulfapyridine (SASP) group than that of the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** KD shows obvious effect for the treatment of rats with TNBS-induced UC, and the therapeutic mechanism may be related with the regulation of Treg/Th17 balance through increasing the proportion of CD4⁺Foxp3⁺Treg cells and lowering the proportion of CD4⁺IL-17A⁺ Th17 cells in peripheral blood of UC rats.

Keywords: *Kuijieling*; Ulcerative colitis; Balance of Treg/Th17

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚不明确的限于结肠黏膜和黏膜下层的慢性非特异性肠道炎症, 呈连续性弥漫性分布, 多累及直肠和远端

结肠。临床表现主要有腹痛、腹泻、黏液脓血便, 病情轻重不等, 病程迁延及反复发作^[1]。该病常见于西方国家, 但近年研究发现在我国的发病率逐年增加。

收稿日期: 2014-09-14

作者简介: 刘梓峰, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗炎症性肠病的机制研究。Email: windlau@126.com。通讯作者: 杜群, 研究员, 研究方向: 中医药治疗炎症性肠病的机制研究。Email: duqun@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(81373798); 广州中医药大学中医内科学国家重点学科专项; 中央财政支持地方高校发展专项资金项目“重大难治性脾胃病防治协同创新平台”(财教 2013-338 号)。

其病因和发病机制尚不十分清楚,引起医学界的重视,肠道黏膜免疫系统的异常反应成为该病发病机制研究的热点。近年研究发现,介导炎症反应的辅助性T细胞 17^{Th} (T helper 17 cells, Th17)和介导免疫耐受的调节性T细胞 Treg (regulatory T cell, Treg)调控关系的失衡在炎症性肠病(IBD)发病过程中具有重要作用^[4]。Th17和Treg细胞的分化过程相互抑制,并且在功能上负性调节,Th17和Treg细胞的动态平衡是维持免疫稳定的重要机制,因此,促进Treg细胞分化生成,介导免疫耐受,抑制Th17细胞分化,恢复Treg/Th17平衡,维持体内免疫稳态,可能是治疗UC等自身免疫性疾病的新思路。本实验以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导大鼠UC模型,检测大鼠外周血单个核细胞(PBMC)中Treg和Th17细胞占总CD4⁺T细胞百分比并计算Treg/Th17之比,初步探讨溃结灵在溃疡性结肠炎中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,体质量170~200 g,雄性,广东省医学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物 溃结灵组方药材均购自采芝林连锁药店,其中,救必应为冬青科(Aquifoliaceae)冬青属(Ilex L)植物铁冬青*Ulex rotunda* Thunb)的干燥树皮;白术为菊科(Asteraceae)苍术属(*Atractylodes*)植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz)的干燥根茎;白芍为毛茛科(Ranunculaceae)芍药属(*Paeonia*)植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的去皮干燥根;水蛭为水蛭科动物蚂蝗(*Mitimnia pigra* Whitman)的干燥全体;炙甘草为豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza* L)植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)的炮制加工品。上述药材经广州中医药大学中药鉴定教研室童家赧老师鉴定,皆符合《中华人民共和国药典》标准。按组方称取药材,救必应20 g、白术10 g、白芍10 g、水蛭10 g、炙甘草5 g。成人体质量以60 kg计,临床用药量为每天55 g,剂量为 $0.92\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,大鼠给药高、中、低剂量分别按临床用量的20,10,5倍计算,即含生药量分别为18.3,9.2,4.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。大鼠灌胃给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,按煎剂制备方法煎煮,水浴浓缩至含生药量 $1.83\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药液(即为溃结灵高剂量),给药时根据给药剂量依次对半稀释成中剂量和低剂量,4℃冰箱保存,备用。

柳氮磺胺吡啶片(SASP),上海中西三维制药有限公司,批号:20121001。成人体质量按60 kg计,

以成人每天3 g临床用药量算,剂量为 $0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,大鼠给药剂量按成人临床用量的10倍计算,即 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按大鼠灌胃给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,即0.5 g配至10 mL。

1.3 主要试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),美国Sigma公司,批号:SLBD681V;无水乙醇:分析纯,广州化学试剂厂,批号:20120607;生理盐水,紫光古汉集团衡阳制药有限公司,批号:1209176-03;水合氯醛,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20111114;1640培养基,invitrogen-GIBCO公司,批号:8112084;胎牛血清,天津市灏阳生物制品科技有限责任公司,批号:20111102;双抗,北京Solarbio,批号:20111122;大鼠淋巴细胞分离液,天津市灏阳生物制品科技有限责任公司,货号:LTS1083;4%多聚甲醛,联科生物技术有限公司,批号:2119841;IL-17刺激剂和IL-17阻断剂,联科生物技术有限公司,批号:3155320;ANTI-RatCD4 FITC(批号:E00074-1632),Foxp3/Transcription Factor staining kit(批号:E00029-1668),ANTI-Mouse/Rat Foxp3 PE(批号:E01764-1635),ANTI-Mouse/Rat IL-17A PE(批号:E02115-1631),Rat IgG2a K Isotype Control PE(批号:E11037-1635),均为eBioscience公司产品;台盼兰染色液,Sino-American Blotec,批号:BS112;DMSO,BIOSHARP公司,批号:D-5879;40%甲醛,天津市武清区福林化工工贸有限公司,批号:04018018;NaCl,分析纯,天津市大茂化学试剂厂,批号:20091214。

1.4 主要仪器 FACSCalibur型流式细胞仪,美国Becton Dickinson公司;3K30/V型温控水平离心机,美国Sigma公司;SW-CJ-1F型洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;WSI-2000型倒置显微镜,广州微域光学仪器有限公司;BDN-150CRH型二氧化碳培养箱,昆山一恒仪器有限公司;TDL-40B型离心机,上海安亭科学仪器厂;QL-901型振荡器,其林贝尔仪器制造有限公司。

1.5 分组、模型复制^[5]及给药 取12只SD大鼠作为正常组,其余大鼠均提前1 d禁食不禁水24 h,乙醚麻醉,用大鼠灌胃针头轻轻从肛门插入,深度大约为8 cm,推入TNBS溶液 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,捏紧肛门平放5 min,待动物清醒后,常规饲养。

模型复制第3天,将UC模型大鼠随机分为模型组,溃结灵高、中、低剂量组(18.3,9.2,4.6 $\text{g}\cdot$

kg⁻¹), 阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组(0.5 g·kg⁻¹)。模型组及正常组给予等量蒸馏水, 每天灌胃 1 次, 连续 10 d, 末次给药后, 24 h 禁食不禁水, 称质量, 大鼠腹腔注射 10 %水合氯醛麻醉, 腹主动脉采血 5 mL 于肝素抗凝管中。

1.6 大鼠外周血 PBMC 的分离 在超净工作台上操作, 从肝素抗凝管中取出 3 mL 血, 用 PBS 缓冲液按 1 : 1 比例稀释, 梯度离心, 分离淋巴细胞, 洗涤后, 调整细胞浓度为 1 × 10⁷ 个·mL⁻¹。

1.7 外周血 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例的检测 取浓度为 1 × 10⁷ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液 100 μL 于流式管中, 加 CD4 抗体 0.5 μL, 室温避光孵育 15 min, 加入 PBS 洗涤, 弃上清, 余 100 μL 加 PBS 至 100 μL, 重悬细胞, 测定管加 Foxp3 抗体 5 μL, 对照管加入等量同型对照抗体, 4 °C, 避光孵育 30 min, 重复洗涤 1 次, 弃上清, 加 500 μL, 4 %多聚甲醛重悬, 封口, 4 °C, 避光贮存, 24 h 内待上机检测。

1.8 外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例的检测 取 96 孔板, 每孔加入相应样本的浓度为 1 × 10⁷ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液 100 μL, 每组设同型对照, 除调零孔其余各孔皆加入 0.5 μL 刺激剂, 培养箱培养 1 h 后, 加入阻断剂 0.5 μL, 37 °C, 5 %CO₂ 孵育 12 h, 细胞悬液移入流式管中, 加 CD4⁺ 抗体 0.5 μL, 室温避光孵育 15 min, 2 mL PBS 洗涤 1 次, 1500 r·min⁻¹, 离心 5 min, 弃上清, 加 100 μL PBS 重悬; 加入固定破膜工作液, 涡旋 5 s 混匀, 4 °C, 避光孵育 30 min, 加入 2 mL 破膜缓冲液工作液 1000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 洗涤细胞并弃去上清液, 余 100 μL 加 PBS 至 100 μL, 重悬细胞。测定管 IL-17 抗体 0.7 μL, 对照管加入等量同型对照抗体, 4 °C, 避光孵育 30 min, 重复洗涤 1 次, 弃上清, 加 500 μL, 4 %多聚甲醛重悬, 封口, 4 °C, 避光贮存, 24 h 内待上机检测。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 软件, 所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两两比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 外周血 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞的流式鉴定见图 1。与正常组比较, 模型组大鼠外周血 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例显著降低($P < 0.01$)。溃结灵各剂量组和柳氮磺胺吡啶组大鼠外周血中相应的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例与模型组比较均有显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

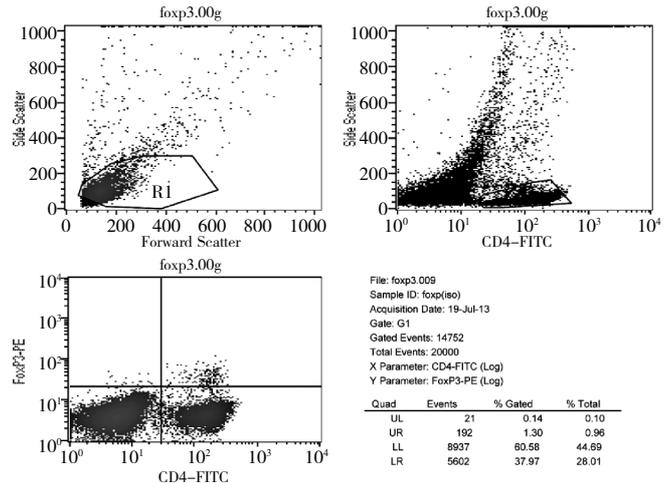


图 1 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞的流式鉴定

Figure 1 Detection of CD4⁺Foxp3⁺Treg cells by flow cytometry

2.2 外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞占 CD4⁺细胞的比例 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞的流式鉴定见图 2。与正常组比较, 模型组大鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例显著升高($P < 0.01$)。溃结灵高、中剂量组与柳氮磺胺吡啶组大鼠外周血中相应的 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例与模型组比较均显著降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

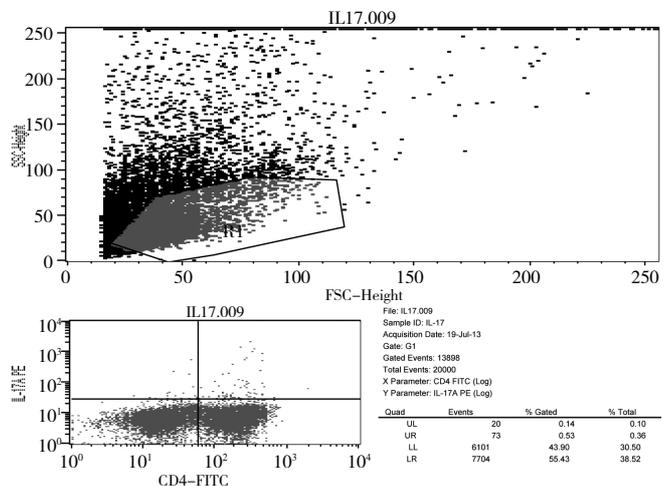


图 2 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞的流式鉴定

Figure 2 Detection of CD4⁺IL-17A⁺Th17 cells by flow cytometry

2.3 外周血中 Treg/Th17 细胞比值的变化 与正常组比较, 模型组 Treg/Th17 比值显著降低 ($P < 0.01$)。经溃结灵与柳氮磺胺吡啶治疗后, 大鼠外周血中相应的 Treg/Th17 比值皆有所升高, 与模型组比较均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

3 讨论

溃结灵是本所在多年临床实践基础上总结出的治

表 1 溃结灵对 UC 模型大鼠外周血 Treg/Th17 细胞比例的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The impact of *Kuijieling* on proportion of Treg/Th17 in peripheral blood of UC model rats

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	Treg/%	Th17/%	Treg/Th17
正常组	10	-	4.60 ± 0.48	1.46 ± 0.17	3.19 ± 0.56
模型组	9	-	3.75 ± 0.46 [#]	3.54 ± 1.08 [#]	1.14 ± 0.34 [#]
溃结灵高剂量组	10	18.3	5.04 ± 0.76 ^{**}	1.45 ± 0.45 ^{**}	3.69 ± 0.92 ^{**}
溃结灵中剂量组	9	9.2	4.57 ± 1.02 [*]	1.69 ± 0.35 ^{**}	2.77 ± 0.69 ^{**}
溃结灵低剂量组	10	4.6	4.47 ± 0.47 ^{**}	2.83 ± 1.01	1.75 ± 0.58 [*]
SASP 组	10	0.5	5.28 ± 0.56 ^{**}	1.67 ± 0.31 ^{**}	3.28 ± 0.79 ^{**}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

疗溃疡性结肠炎疗效确切的中药复方^[5]。前期研究^[7-8]表明, 溃结灵煎剂对多种溃疡性结肠炎大鼠模型有良好的治疗作用, 治疗后溃疡数量和溃疡面积均减小, 溃结灵能降低 TNBS 法 UC 模型大鼠体内促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 含量^[9], 降低细胞间粘附分子-1 的基因表达^[10], 还能抑制 UC 模型大鼠结肠组织 NF- κ B 的活化^[11]。在本次实验中对溃结灵的疗效进行观察, 给药后大鼠的腹泻和精神倦怠等症状好转, 溃疡数量与溃疡面积较模型组明显减少, 组织病理学观察也说明了溃结灵治疗 UC 疗效确切, 与前期的研究结果^[7]相一致。

Th17 细胞参与自身免疫性疾病, 在许多自身免疫组织损伤中具有重要作用^[12]。Treg 细胞介导免疫耐受。在多种自身免疫性疾病和炎症性疾病的患者和动物模型中, 均有发现 Treg 细胞数量下降或功能减弱^[13]。在正常的生理情况下, Treg 细胞和 Th17 细胞在分化和功能上相互拮抗, 从而维持机体的免疫平衡, 一旦它们之间的平衡关系被打破, 则可能导致多种疾病的发生。当机体存在炎症反应或者发生自身免疫性疾病时, 一些细胞因子过度表达影响了初始 T 细胞的分化格局, 引起 Th17 分化增加, 破坏了机体内的 Treg/Th17 平衡, 从而引起一系列的炎症反应^[14]。

新近研究发现^[15], Treg/Th17 分化平衡是维持肠道免疫稳定状态的重要因素, Treg/Th17 分化失衡可能参与 IBD 异常自身免疫反应。Treg 细胞数目的减少和功能的减弱会导致初始 T 细胞向 Th17 细胞的分化, Th17 细胞的比例增加和功能亢进, 进一步分泌炎症细胞因子 IL-17、IL-21、IL-22 和 TNF- α 等细胞因子, 介导炎症反应^[16]。研究发现, 在包括 UC^[17] 的 IBD^[18]患者中, 外周血 CD4+T 细胞中 Treg 细胞的比例下降, 而 Th17 细胞的比例升高, Treg/Th17 比例明显失衡, 并与疾病的活动度呈现出明显相关性^[19],

提示 Treg/Th17 分化失衡可能是人类发生 UC 的原因之一。

本实验表明, 模型组大鼠外周血中 Th17 细胞比例与正常大鼠比较明显升高, 而 Treg 细胞比例与正常组相比明显下降, 提示 UC 大鼠体内 Treg/Th17 分化失衡, 可能是由于 Treg 细胞数目下降, 致使其功能减弱或抑制, 而使 Th17 细胞分化占主导地位。给予药物干预后, 发现溃结灵能够上调外周血中 Treg 细胞在 CD4+ 细胞中的比例, 降低 Th17 细胞的比例, 进而调节 Treg/Th17 分化的平衡, 这可能是溃结灵治疗溃疡性结肠炎的免疫调节机制之一。

参考文献:

- [1] 中华医学会. 临床诊疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 131-136.
- [2] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17 producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [3] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+) foxp3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(12): 849-859.
- [4] 葛婷, 唐志鹏, 王亮, 等. Treg/Th17 失衡与炎症性肠病的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(7): 689-694.
- [5] 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(4): 370-372.
- [6] 柴玉娜, 郭珍, 杜群, 等. 溃结灵含药血清对 Caco-2 炎症细胞模型泛素系统 E1 UBC5 和 E3RSIB 蛋白表达的作用[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 137-139.
- [7] 胡旭光, 王汝俊, 杜群, 等. 溃结灵对实验性溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 35-37.
- [8] 宋宁, 李燕舞, 巫燕莉, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜超微结构的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 73-75.
- [9] 李红, 杜群, 王汝俊, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 IL-1 β 、TNF- α 的影响[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(5): 10-11.
- [10] 杜群, 李红, 王汝俊, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 ICAM-1 基因表达的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(3): 229-231.
- [11] 刘梓峰, 柴玉娜, 巫燕莉, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜泛素表达的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(6): 327-330.
- [12] Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 319-322.
- [13] Lahoute C, Herbin O, Mallat Z, et al. Adaptive immunity in atherosclerosis: Mechanisms and future therapeutic targets[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(6): 348-358.
- [14] Chen Z, Lin F, Gao Y, et al. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(5): 536-542.

- [15] Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(6): 733-741.
- [16] Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128: 1868-1878.
- [17] 晁康, 钟碧慧, 张盛洪, 等. CD4+T 细胞亚群失衡与溃疡性结肠炎发病的关系[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(23): 1605-1608.
- [18] Eastaff LN, Mabarrack N, Barbour A, et al. FOXP3+regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30: 80-89.
- [19] Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD[J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45(6): 571-583.

(编辑: 宋威)

左归丸对衰老大鼠骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化的影响

黄 进, 徐志伟, 詹 菲, 张 晨, 丁富平, 罗川晋, 李杰斌, 张 进(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 研究左归丸对衰老大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)成骨与成脂分化的影响。**方法** 通过腹腔注射 D-半乳糖建模, 制备衰老大鼠模型, 分离培养 MSCs, 并诱导 MSCs 成骨和成脂分化。通过碱性磷酸酶(ALP)活性检测、ALP 染色观察 MSCs 成骨分化能力, 通过甘油三酯(TG)表达量和油红 O 染色观察 MSCs 成脂分化能力。**结果** 模型组 MSCs ALP 染色阳性率明显低于正常组, 左归丸组 MSCs 染色阳性率明显高于模型组 ($P < 0.05$)。成骨诱导 14 d, 模型组 MSCs ALP 活性值明显低于正常组而左归丸组明显高于模型组 ($P < 0.05$)。油红 O 染色, 模型组 MSCs 染色阳性率明显高于正常组, 左归丸组 MSCs 染色阳性率明显低于模型组 ($P < 0.05$)。成脂诱导 7 d, 模型组 MSCs TG 表达量明显高于正常组而左归丸组 MSCs TG 表达量明显低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 左归丸可促进衰老大鼠 MSCs 向成骨细胞分化, 同时可抑制其向脂肪细胞分化。

关键词: 左归丸; 衰老; 骨髓间充质干细胞; 骨向分化; 脂向分化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.002

Effect of *Zuogui* Pills on Osteogenic Differentiation and Adipogenic Differentiation of Aging rat Mesenchymal Stem Cells

HUANG Jin, XU Zhiwei, ZHAN Fei, ZHANG Chen, DING Fuping, LUO Chuanjin, LI Jiebin, ZHANG Jin (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Zuogui* pills on osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of aging rat bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs). **Methods** Aging rat model was established by intraperitoneal injection of D-galactose, and then the MSCs of the model rat were isolated. Alkaline phosphatase (ALP) activity was detected and ALP stain was applied for the observation of osteogenic differentiation of MSCs, triglyceride (TG) content was detected and oil red O staining was used for evaluation of adipogenic differentiation of MSCs. **Results** ALP staining results showed the positive dying rate of model group was significantly lower than that of the normal group, while *Zuogui* pills group had obviously higher positive dying rate than the model group ($P < 0.05$). On osteogenic differentiation day 14, ALP activity of MSCs in the model group was lower than that of the normal group but was higher in *Zuogui* pills group than that of the model group ($P < 0.05$). The results of Oil red O staining showed that the positive dying rate of model group were significantly higher than that of the normal group, but was obviously lower in *Zuogui* pills group than that of the model group ($P < 0.05$). On adipogenic differentiation day 7, TG

收稿日期: 2014-10-14

作者简介: 黄进, 女, 主治医师, 研究方向: 肾藏精的基础与应用研究。Email: kitty_jinjin@163.com。通讯作者: 张进, 副教授, 研究方向: 肾藏精的基础与应用研究。Email: zhjin@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(81202732, 30500645); 广东省普通高校重点实验室开放基金资助项目(AAF433111A27)。