

- [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)。

expression level of MSCs in the model group was higher than that of the normal group but was lower in *Zuogui* pills group than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** To some extent, *Zuogui* pills can promote osteogenic differentiation of aging rat MSCs and inhibit their adipogenic differentiation.

Keywords: *Zuogui* pills; Aging; Mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Adipogenic differentiation

中医学认为肾为先天之本、肾主藏精,影响机体的生长、发育与衰老。本课题组将肾虚衰老理论与干细胞衰老相结合,观察补肾填精的处理因素对细胞衰老进程、增殖分化活动的影响。本研究通过观察大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)经诱导后成骨、成脂分化能力的不同表现,探索补肾益精代表方左归丸对衰老大鼠 MSCs 成骨、成脂分化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,3 月龄,体质量 150 ~ 180 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2013-0020。

1.2 试剂 左归丸中药材,购于广州中医药大学第一附属医院中药房;D-半乳糖,上海生工有限公司,批号:LY1205B3012;ALP 染色试剂盒,碧云天生物技术有限公司;油红 O 染色液,美国 Sigma 公司,批号:1320065;甘油三酯检测试剂盒,浙江东瓯诊断试剂有限公司,批号:2013100024;碱性磷酸酶检测试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20140319。

1.3 分组、模型复制及给药 取 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组,即正常组,模型组,左归丸高、中、低剂量组(35.96, 17.96, 8.98 g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常组外,其余各组大鼠每天腹腔注射 D-半乳糖,连续 2 个月复制大鼠衰老模型。正常组注射等量的生理盐水,常规饲养。同时,正常组和模型组灌胃给予等量的生理盐水。

1.4 药物制备 左归丸水提液组成:熟地黄、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、鹿角胶、龟板胶、菟丝子。以上中药加入纯净水煎煮,过滤,浓缩至所需浓度。左归丸高、中、低剂量组用药剂量分别相当于临床等效剂量的 4, 2, 1 倍。

1.5 MSCs 的分离、培养与传代 颈椎脱臼处死大鼠,无菌条件下,分层剥离双后肢胫骨,用 10 %胎牛血清的完全培养液反复冲洗骨髓腔。无菌针吸取溶液制成单细胞悬液,接种后置于培养箱中培养;原代 MSCs 培养 48 h 后进行首次换液,以后每 3 d 换液 1 次。培养 7 ~ 10 d 后,细胞铺满瓶底约 80 % ~ 90 %。

此时,加入 PBS 缓冲液冲洗,再用 0.25 %的胰蛋白酶消化,接种于新培养瓶中进行扩增培养。按 1 : 3 比例传代。

1.6 骨向分化能力观察

1.6.1 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测 各组大鼠 P3 代 MSCs 接种于 6 孔板中培养。24 h 后,移去旧的培养液,每孔加入 2 mL 的成骨诱导液。每 3 d 换液,连续干预 21 d。分别取第 7, 14, 21 天细胞上清液, -20 °C 保存,标本收集齐后,按照试剂盒说明检测 ALP 活性。

1.6.2 ALP 染色 分别于第 7, 14, 21 天取出相应 6 孔板进行 ALP 染色,光镜下随机取 10 个非重叠视野,高倍镜下记数 ALP 阳性细胞和总细胞数,计算阳性染色率。

1.7 脂向分化能力观察

1.7.1 甘油三酯 (TG) 的检测 各组大鼠 P3 代 MSCs 接种于 6 孔板中培养。每 3 d 进行换液,直至细胞达到 100 %融合,每孔加入 2 mL 成脂诱导液开始诱导。3 d 后更换为成脂维持液进行维持,24 h 后再更换成成脂诱导液诱导,如此进行 3 个循环。分别取各组第 7、14、21 天细胞上清液, -20 °C 保存,样本收集齐后,按 TG 测定试剂盒说明书操作。

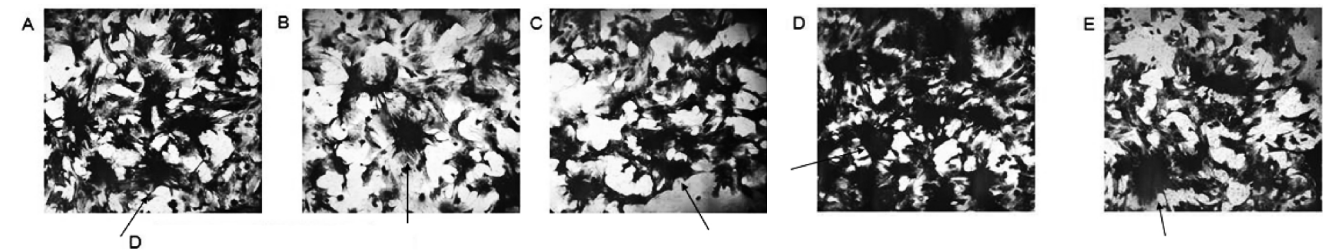
1.7.2 油红 O 染色 分别于第 7, 14, 21 天取出相应 6 孔板进行油红 O 染色;光镜下随机取 10 个非重叠视野,高倍镜下记数阳性细胞和总细胞数,计数每个视野中脂滴阳性率数值。

1.8 统计学处理方法 实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,运用方差分析。

2 结果

2.1 骨向分化能力比较

2.1.1 ALP 染色 成骨细胞诱导分化:诱导 7 d 左右可见细胞表面有较多棕褐色细小颗粒出现,随着诱导时间延长棕褐色颗粒明显增加。第 21 天时 ALP 染色可见大量蓝黑色矿化结节,见图 1(箭头所指为代表性阳性细胞)。其中,模型组大鼠 MSCs 染色阳性率明显低于正常组($P < 0.05$),左归丸各剂量组大鼠 MSCs 染色阳性率明显高于模型组($P < 0.05$),见表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 左归丸低剂量组; D. 左归丸中剂量组; E. 左归丸高剂量组

图 1 各组大鼠 MSCs ALP 染色

Figure 1 ALP staining result of MSCs in each group

表 1 各组大鼠 MSCs ALP 染色阳性率比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	ALP 染色阳性率 /%		
		7 d	14 d	21 d
正常组	-	0.1980±0.0169	0.3630±0.0258	0.4710±0.0524
模型组	-	0.1450±0.0207*	0.3270±0.0200*	0.4070±0.0283*
左归丸低剂量组	8.98	0.1910±0.0292▲	0.3710±0.0300▲	0.4570±0.0800▲
左归丸中剂量组	17.96	0.1860±0.0189▲	0.3660±0.0403▲	0.4550±0.0682▲
左归丸高剂量组	35.93	0.1800±0.0284▲	0.3460±0.0347▲	0.4540±0.0690▲

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ▲ $P<0.05$ 。

2.1.2 ALP 活性检测 从第 14 天开始, 模型组大鼠 MSCs ALP 活性较正常组明显降低($P<0.05$), 左归丸中、高剂量组 ALP 活性明显高于模型组 ($P<0.05$)。成骨诱导至 21 d, 各组大鼠 MSCs ALP 活性有所下降, 但模型组大鼠 MSCs ALP 活性仍明显低于正常组($P<0.05$), 左归丸各组 ALP 活性明显高于模型组($P<0.05$)。提示模型组大鼠 MSCs 成骨分化能力较正常大鼠降低, 左归丸可促进衰老大鼠 MSCs 向成骨细胞分化, 见表 2。

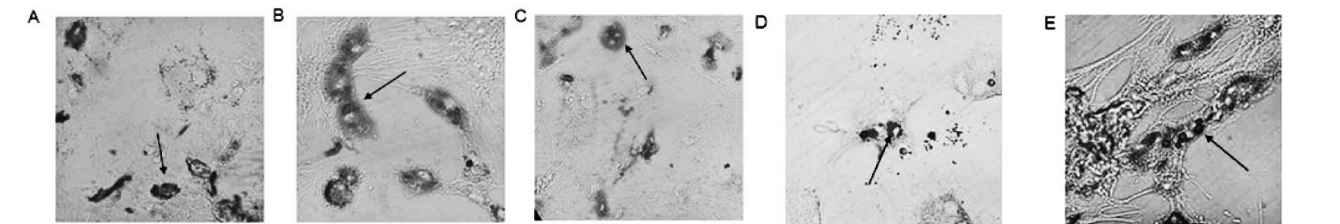
表 2 各组大鼠 MSCs ALP 活性检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	ALP/ 金氏单位		
		7 d	14 d	21 d
正常组	-	17.02±3.612	29.99±3.116	26.97±3.046
模型组	-	21.51±5.651	15.31±0.932*	13.79±1.388*
左归丸低剂量组	8.98	16.39±3.878	21.00±6.898	21.43±5.342▲
左归丸中剂量组	17.96	23.19±3.668	26.67±3.869▲	25.65±3.257▲
左归丸高剂量组	35.93	20.89±6.173	23.16±6.350▲	23.39±3.978▲

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ▲ $P<0.05$ 。

2.2 脂向分化能力比较

2.2.1 油红 O 染色 脂肪细胞诱导分化: 诱导分化 14 d 后细胞形态逐渐向类圆形转变, 体积变大, 细胞质内出现少量圆形透亮小滴。油红 O 染色呈现胞浆中的红色颗粒, 见图 2(箭头所指为代表性阳性细胞)。其中, 模型组大鼠 MSCs 染色阳性率明显高于正常组($P<0.05$), 左归丸各剂量组大鼠 MSCs 染色阳性率明显低于模型组($P<0.05$), 见表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 左归丸低剂量组; D. 左归丸中剂量组; E. 左归丸高剂量组

图 2 各组大鼠 MSCs 油红 O 染色

Figure 2 Oil red O staining of MSCs in each group

2.2.2 TG 的检测 第 7 天, 模型组大鼠 MSCs TG 表达量较正常组明显升高 ($P<0.05$), 左归丸中、高剂量组 TG 表达量明显低于模型组($P<0.05$)。至 21 d, 模型组大鼠 MSCs TG 表达量仍明显高于正常组($P<0.05$), 左归丸低、中剂量组 TG 表达量明显低于模型组($P<0.05$)。提示模型组大鼠 MSCs 成脂分化能力较正常大鼠升高, 左归丸在一定剂量时可抑制衰老大

鼠 MSCs 向成脂细胞分化, 见表 4。

3 讨论

本课题组前期研究将干细胞的特性和中医理论中的“肾精”学说进行分析后提出: 干细胞具先天之精属性, 是先天之精在细胞层次的存在形式^[1-3]。肾藏精主骨, 衰老时肾精亏虚, 会出现骨质疏松。MSCs

表3 各组大鼠 MSCs 油红 O 染色阳性率比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Oil red O staining positive rate of MSCs in each group

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	油红染色阳性率/%		
		7 d	14 d	21 d
正常组	-	0.1390 ± 0.0223	0.3370 ± 0.0347	0.4480 ± 0.0507
模型组	-	0.2160 ± 0.0237*	0.4070 ± 0.283*	0.5120 ± 0.0290*
左归丸低剂量组	8.98	0.1780 ± 0.0319 [▲]	0.3490 ± 0.0428 [▲]	0.4680 ± 0.0602 [▲]
左归丸中剂量组	17.96	0.1800 ± 0.0320 [▲]	0.3580 ± 0.0429 [▲]	0.4410 ± 0.0433 [▲]
左归丸高剂量组	35.93	0.1796 ± 0.0375 [▲]	0.3470 ± 0.0399 [▲]	0.4700 ± 0.0501 [▲]

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠骨髓 MSCs TG 表达量比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 TG expression of MSCs in each group

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹		
		7 d	14 d	21 d
正常组	-	0.788 ± 0.608	0.731 ± 0.155	0.961 ± 0.614
模型组	-	1.060 ± 0.435*	1.186 ± 0.082*	1.321 ± 0.149*
左归丸低剂量组	8.98	0.974 ± 0.112	1.057 ± 0.228	1.021 ± 0.181 [▲]
左归丸中剂量组	17.96	0.855 ± 0.064 [▲]	0.948 ± 0.062	0.948 ± 0.085 [▲]
左归丸高剂量组	35.93	0.902 ± 0.113 [▲]	1.027 ± 0.113	1.155 ± 0.180

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，[▲] $P<0.05$ 。

的成骨分化能力减弱、成脂分化能力增强是衰老骨质疏松的重要机制^[4-5]。基于干细胞与中医“肾精亏虚”的衰老理论，本研究选择补肾填精之代表方左归丸，研究补肾精治法对衰老大鼠 MSCs 分化能力的影响。左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书》，具有滋阴补肾、填精益髓、强筋健骨的疗效。

MSCs 成骨分化的重要表现是细胞能够合成、分泌表达成骨特异性的蛋白和细胞外基质成分，其中，ALP 和骨钙素是诱导成骨后的两个关键性标志^[6-7]。ALP 为一种较为肯定的参与促进钙化活动的酶类。在骨代谢的研究中被广泛应用。学者研究^[7]发现，MSCs 在成骨诱导后，ALP 是最早出现的成骨性标志，并且有时间依赖性，随着诱导时间延长表达量增加。ALP 可以衡量 MSCs 向成骨细胞方向分化的程度。本研究发现，正常组 ALP 的表达量明显高于模型组，说明我们的成骨诱导是成功的；左归丸各组的 ALP 表达量明显高于模型组，可以初步说明衰老大鼠骨质疏松后，MSCs 的成骨能力降低，而左归丸能够增强衰老大鼠 MSCs 的成骨分化能力。近年来，随着干细胞研究的深入，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。有学者^[8]提出骨质疏松发病机制的“脂肪细胞过剩”途径假说。TG 可以衡量 MSCs 向脂肪细胞方向分化的程度。模型组 TG 的表达量明显高于正常组，说明我们的成脂诱导是成功的；左归丸各组的 TG 表达量明显低于模型组，可以初步说明衰老大鼠骨质疏松

松后，MSCs 的成脂能力增强，而左归丸能够抑制衰老大鼠 MSCs 的成脂分化能力。

研究^[9-10]发现，MSCs 成骨分化的减弱是细胞衰老的重要改变。随着年龄的增长，成骨细胞数量和活性的下降与脂肪细胞的数量增加相伴行^[11]。本研究结果表明，D-半乳糖亚急性衰老模型大鼠 MSCs 骨向分化能力降低，脂向分化能力增强，一定浓度左归丸水提液能明显促进衰老大鼠 MSCs 向成骨细胞分化，抑制其向成脂细胞分化，从而达到延缓干细胞衰老的目的。左归丸可以通过提高 MSCs 成骨分化能力，抑制其向脂肪细胞分化能力来改善老年骨质疏松，这诠释了中医学补肾精壮骨的治疗方法，并在一定程度上佐证了干细胞与先天之精相关的理论假说，及在此基础上提出的衰老假说“肾精亏虚即为干细胞及其调控系统的衰老的过程^[12]，是人类衰老的根本所在”这一理论的正确性。

参考文献：

- [1] 张进, 徐志伟, 杜少辉, 等. “精”学说与干细胞辨识[J]. 中医药学刊, 2004, 22(7): 1198-1200.
- [2] 张进, 徐志伟. 补肾法诱导间充质干细胞向神经方向分化研究[J]. 现代医院, 2004, 4(9): 15-17.
- [3] 张进, 徐志伟, 陈群, 等. 干细胞与中医基础理论中的先天之精学说[J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 189-192.
- [4] 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[J]. 四川大学学报, 2005, 36(3): 318-321.
- [5] 秦佳佳, 刘海全, 杨海韵, 等. 淫羊藿含药血清对绝经后骨质疏松症大鼠 MSCs 成脂分化干预作用研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1096-1099.
- [6] Morimichi M, Yoshinori. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cell during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen[J]. J Biochem, 2001, 129(1): 133.
- [7] Sammons J, Ahmed N. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3)[J]. Stem Cells, 2004, 13(3): 273.
- [8] 宋纯理, 党耕町. Intramedullary fat cells and osteoporosis[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 266.
- [9] Frhrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging[J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(12): 926-930.
- [10] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro[J]. BMC CellBiology, 2006, 5(10): 7-14.
- [11] Kha HT, Basseri B, Shouhed D, et al. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(5): 830-840.
- [12] 张进, 徐志伟, 丁富平, 等. “肾藏精”的现代实质新理论[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2010, 4(12): 550-553.

(编辑：宋威)