

右归饮含药血清对人骨髓基质干细胞诱导为成骨细胞的影响

★ 吴云刚 (浙江省温州医学院一附院骨伤科 温州 325000)

★ 张志平 (江西省南昌市第一医院骨科 南昌 330008)

摘要:目的:观察右归饮对体外人骨髓分化成骨细胞的影响。方法:将右归饮含药血清加入人骨髓基质干细胞诱导分化成骨细胞的培养体系,采用细胞形态学观察、MTT 法及细胞内 ALP 含量检测反映其促进成骨的功能。结果:形态学观察及 MTT 法表明,右归饮对成骨细胞的增殖起促进作用,钙结节染色及细胞内 ALP 含量测定表明右归饮对成骨细胞的活性有促进作用 ($P < 0.05$)。结论:右归饮对人骨髓基质干细胞诱导分化的成骨细胞的成骨起促进作用。

关键词:右归饮;骨髓基质干细胞;成骨细胞;碱性磷酸酶

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

骨髓分化成骨细胞减少,使骨修复过程缓慢;同时,股骨头内骨微循环障碍,大量骨细胞缺血缺氧而死亡,最终发生股骨头缺血性坏死。因此探讨右归饮对骨髓分化成骨细胞影响,进一步证明该方对股骨头缺血性坏死疗效的确切性并阐明其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

二氧化碳培养箱、超净工作台、Stat Fax-2100 型酶标仪、Olympus 倒置显微镜 + Image-Pro-Plus 图像分析系统;DMEM、胰蛋白酶、MTT、DMSO、胎牛血清、碱性磷酸酶试剂盒、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C。

1.2 实验药物

右归饮制剂:熟地 15 g、枸杞子 15 g、山茱萸 10 g、淮山药 15 g、杜仲 15 g、制附子 10 g、肉桂 5 g、炙甘草 5 g,加蒸馏水 500 mL 低温浸泡 12 小时,取出放置室温,煮沸后文火煎 30 分钟,纱布过滤,药渣加水 300 mL,煮沸后再文火煎 30 分钟,滤液合并,90 ℃ 水浴浓缩至 1:1(相当于生药 1 g/mL),4 ℃ 冰箱冷藏备用。

1.3 实验方法

1.3.1 右归饮含药血清的制备 含药血清制备:以 SD 大鼠 10 只,每日给予右归饮 9 g/(kg·d)灌胃^[1],另设 5 只对照组,以生理盐水灌胃,连续 7 天,于最后一次灌药后 1 小时(灌药前禁食、不禁水 12 小时),麻醉后腹主动脉取血并分离血清(取血 5~10 mL,静置 0.5 小时后,1 000 r/min 离心 15 分钟),经 56 ℃、30 分钟灭活,无菌过滤后,置 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 MSC 的分离和培养 实验用骨髓取自 12 例健康成人,取材前均向其说明并经本人同意志愿捐献,其中男 9 例,

女 3 例;年龄 15~55 岁,平均 34.7 岁。

注射器肝素化后抽取 4~5 mL 骨髓,置入装有 DMEM 培养液的 20 mL 无菌离心管中带至实验室。以 Percoll (1.073 g/mL)为分离介质,用梯度离心法^[2]分离单个核细胞。多次洗涤后重新悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中,3~5 天后换液,去除未贴壁的细胞,每 3 天换液 1 次,每天观察细胞形态、贴壁及生长情况。待细胞融合达 80%~90%,用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

1.3.3 体外成骨的诱导 根据实验设计,当第 3 代的 MSCs 细胞贴壁生长达到 70%~80% 融合时,加入含地塞米松 (5 nmol/L)、 β -磷酸甘油钠 (10 mmol/L) 和维生素 C (50 $\mu\text{mol/L}$) 的 DMEM 成骨条件培养液,制成细胞悬液,按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种 75 cm^2 的培养皿,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱培养。右归饮组,加入右归饮含药血清培养液;对照组只加含血清培养液。收集第 15 天细胞培养上清,用于 ALP 的检测。每次每组设 8 孔,重复上述实验 4 次。

1.4 成骨细胞的鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶 (ALP) 染色 取诱导培养 2 周后的细胞, PBS 冲洗后,丙酮固定 10 分钟后,蒸馏水冲洗。入孵育液中,37 ℃ 孵育 5 小时,自来水冲洗后,用 2% 硝酸钴中浸透 5 分钟,蒸馏水洗数次,再用 1% 的硫化铵 (现配) 中浸 2~3 分钟,自来水冲洗,自然干燥后封固。对照组用未诱导的同组细胞。

1.4.2 钙结节染色 (Von Kossa 法) 细胞爬片用 PBS 冲 2 次,经冷丙酮固定 10 分钟后,蒸馏水冲洗,放入 2% 硝酸银内置暗处 1 小时,蒸馏水洗 3 次,5% 硫代硫酸钠还原 1 小时 (硫代硫酸钠 5 g, 0.1 mol/L, 氢氧化钠 0.2 mL, 蒸馏水 100

mL);干燥,封片。

1.5 含药血清对成骨细胞作用的定量分析

1.5.1 细胞内 ALP 含量检测 取生长状态良好的第 3 代细胞,按 2×10^4 /mL 密度接种于 2 个 24 孔板内,分别采用普通培养基培养、条件培养基诱导培养以及条件培养基诱导后加入含右归饮血清培养,分别于第 2、4、6、8 天各取 6 孔细胞用 0.1% TritonX-100 裂解后,收集裂解液按 ALP 检测试剂盒的说明进行加样操作,用分光光度计检测各管 OD,然后按公式计算出 ALP 的含量:ALP(金氏单位/100mL) = 测定管吸光度/标准管吸光度 $\times$ 标准管含酶量 $\times 100 \text{ ml}/0.05 \text{ ml}$

1.5.2 MTT 法 将细胞以 5×10^3 /mL 细胞数接种于 96 孔板中,选择 6 孔细胞,每孔加入 MTT 溶液 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 小时后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 15 分钟裂解细胞,使沉淀物充分溶解。在酶联免疫检测仪上测定每孔的 OD₄₉₀ 值。

1.6 统计学处理

各数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 10.0 进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 含药血清对成骨细胞增殖的影响

2.1.1 细胞形态学观察 (1)原代培养:细胞接种 5~7 天后,可见贴壁的细胞中有大量圆形细胞,其中有少量呈成纤维细胞样外形的贴壁细胞;(2)传代培养:传代培养细胞。

2.1.2 MTT 法测定细胞增殖 右归饮对成骨细胞增殖的影响。由表 1 可知,右归饮组 MTT 值与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$),表明右归饮对成骨细胞的增殖有促进作用,与上述形态学观察结果一致。

表 1 右归饮含药血清对成骨细胞增殖及成骨省活力的影响

组别	MTT(OD 值)	细胞内 ALP/U·g ⁻¹
空白对照组	0.101 $\pm$ 0.018	1.62 $\pm$ 0.22
右归饮组	0.276 $\pm$ 0.037*	3.67 $\pm$ 0.82 [▲] *

与正常相比,右归饮组 $P < 0.05$,[▲]与正常相比,右归饮组 $P < 0.05$ 。

2.2 含药血清对成骨细胞生物活性的影响

2.2.1 钙结节染色 条件培养基培养组细胞呈集落生长后开始形成钙结节,细胞间出现的致密的圆形不透光团块呈现片状的棕染,着色区域范围广、面积大。条件培养基诱导加含右归饮血清培养组细胞,上述表现更为明显。普通培养基组细胞未见典型钙结节形成。

2.2.2 细胞内 ALP 含量测定 右归饮对成骨细胞内 ALP 含量影响由表 1 可知,右归饮组细胞内 ALP 值与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$),表明右归饮对成骨细胞的活性有促进作用,与上述形态学观察结果一致。

3 讨论

3.1 骨髓基质干细胞成骨

正常骨髓组织分为造血系统和基质细胞系统,基质细胞系统是指骨髓腔内为造血系统提供结构和功能支持的结缔组织,造血细胞可以释放某些因子,刺激基质细胞生长^[1]。基质细胞具有多方向分化的潜能,在不同条件下分化为成骨细胞、肌细胞、脂肪细胞等多种细胞系统^[2]。Long 等推测骨髓基质干细胞分化为成骨细胞的顺序为:克隆形成细胞——簇状形成细胞——成骨前细胞——成骨细胞^[2]。

ALP 是鉴定成骨细胞的生化和组织学标志,并可用来评价骨发生。我们观察到,体外培养的细胞集落中央最早出现阳性表达,染色也较深。此处细胞密集,细胞分裂受到接触抑制,细胞最早开始向成骨细胞分化,然后周边细胞 ALP 染色出现阳性,进入细胞分化阶段^[3]。

钙钴法是利用碱性磷酸酶在 pH9.4 的环境下,以镁离子为激活剂,能使 β -甘油磷酸钠水解出磷酸,再与高浓度钙盐结合形成无色磷酸钙。磷酸钙与硝酸钴结合形成磷酸钴,经过硫化胺处理后形成棕黑色沉淀于酶活性处,并随酶活性增加而颜色加深。改良的 Gomori 钙钴法可较好的显示碱性磷酸酶在细胞中的存在。碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞表面标志酶。随着成骨分化程度的增加,碱性磷酸酶表达增强^[4]。

3.2 右归饮对成骨细胞的影响

根据中医“肾主骨”理论,右归饮是温补肾阳的经典名方,本研究通过右归饮对体外培养的成骨细胞的作用,观察到右归饮对成骨的作用,为临床治疗提供了新思路。

在本实验中,通过确定碱性磷酸酶的活性来判定右归饮的成骨作用,笔者认为右归饮可以通过增加碱性磷酸酶的活性促进钙沉积,从而引起成骨,这与激素降低碱性磷酸酶的活性,刺激破骨细胞活动,引起钙流失的作用相抵消。同时右归饮含药血清可以促进成骨细胞增殖,从而进一步引起成骨作用。

参考文献

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.33~34
- [2] Long MW, Robison JA, Ashcraft EA, et al. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factor[J]. J Clin Investigation, 1995, 95: 881~887
- [3] 王敏, 翁雨来, 胡晓洁, 等. 犬骨髓基质干细胞诱导为成骨细胞的实验研究[J]. 上海口腔医学, 2002, 11(4): 327~331
- [4] 康新勤, 臧伟进, 胥晓丽, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞定向成骨细胞分化中碱性磷酸酶的变化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2004, 25(4): 366~368

(收稿日期:2006-09-06)

欢迎投稿! 欢迎订阅!