

- fate chitosan micelles for superior cancer therapeutic efficacy and overcoming drug resistance [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11 (1): 145-157.
- [20] Mo R, Jin X, Li N, *et al.* The mechanism of enhancement on oral absorption of paclitaxel by *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micelles[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4609-4620.
- [21] 梅梅, 张翼, 任金红, 等. 新型紫杉烷化合物 NPB304 及其协同维拉帕米逆转耐药的研究[J]. *药学报*, 2014, 49(9): 1279-1288.
- [22] Chen J J, Liu S P, Zhao J, *et al.* Effects of a novel photoactiva-
- ted photosensitizer on MDR1 over-expressing human breast cancer cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 171: 67-74.
- [23] Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.
- [24] Wang F, Huang N, Yang Q, *et al.* Reversal of doxorubicin-resistance by *Salvia miltiorrhiza* ligustrazine in the SHG44/doxorubicin glioma drug-resistant cell line[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14 (4): 4708-4714.

牛膝提取物对大鼠骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化的影响

岳宗进, 于露, 刘汝银, 冯仲锴, 王新立, 王西彬, 鲁花
(河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002)

摘要: 目的 研究牛膝提取物对大鼠骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化的影响。方法 分离培养原代大鼠骨髓间充质干细胞后, 流式细胞仪检测细胞表面标记物, 分成对照组和牛膝提取物组 (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。培养14 d后, MTT法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 阿利新蓝法检测葡糖胺聚糖含有量, 实时定量聚合酶链反应 (Real-time PCR)、免疫印迹 (Western blot) 检测细胞中 Sox-9、II型胶原 (Col II)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) 水平。SIRT1 抑制剂 (尼克酰胺) 处理细胞, MTT法检测细胞增殖, RT-PCR 和免疫蛋白印迹检测 SIRT1、Sox-9 水平。结果 骨髓间充质干细胞表面 CD90 和 CD44 呈阳性表达, 而 CD45 和 CD34 呈阴性表达。与对照组比较, 牛膝提取物可显著促进骨髓间充质干细胞细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 上调细胞葡糖胺聚糖含有量及 Sox-9、Col II、Aggrecan 水平, 以上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖效应。另外, 尼克酰胺可抑制牛膝提取物诱导的骨髓间充质干细胞细胞增殖和 Sox-9 表达升高。结论 牛膝提取物可通过上调 SIRT1 水平来促进骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化。

关键词: 牛膝提取物; 骨髓间充质干细胞; 髓核样细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)12-2635-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.005

Effects of *Achyranthis bidentatae Radix* extract on the proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells

YUE Zong-jin, YU Lu, LIU Ru-yin, FENG Zhong-kai, WANG Xin-li, WANG Xi-bin, LU Hua
(The Second Hospital Affiliated to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

KEY WORDS: *Achyranthis bidentatae Radix* extract; bone marrow mesenchymal stem cells; nucleus pulposus-like cells; proliferation; differentiation

腰椎间盘突出是由椎间盘退变引起的一种骨科常见病^[1], 椎间盘退变源于髓核组织退变, 主

要特点为髓核细胞凋亡、细胞数量减少、髓核含水量、蛋白多糖含有量减少等^[2]。骨髓间充质干细

胞具有多向分化潜能以及自我更新能力,是细胞移植治疗椎间盘退变中最有前景的种子细胞^[3],但如何诱导其向髓核样细胞分化并发挥其修复作用还鲜有报道。牛膝为苋科多年生草本植物,又称怀牛膝,具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经的功效^[4],由其根部提取的有效成分皂苷具有诱导骨髓基质干细胞成骨分化的功能^[5],故本实验旨在检测牛膝提取物诱导骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的生物活性及相关分子机制,为探索椎间盘退变的生物学治疗奠定基础。

1 材料

牛膝提取物(牛膝饮片购于国大药房,批号20151001,经河南中医药大学第二附属医院专家鉴定为正品,参照文献[6]方法提取)。健康4周龄SD大鼠20只,SPF级,批号SYXK(豫)2016-0002,由河南省实验动物中心提供。DMEM培养基(批号600-441P)、双抗(含100 U/mL青霉素、100 μg/mL双链素)、胎牛血清(批号100-500)(美国Gemini公司);MTT、二甲基亚砷(DMSO)、尼克酰胺(NAM)(美国Sigma公司);FITC标记的鼠抗CD34、CD44、CD45、CD90单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);鼠抗II型胶原(批号ab185430)、Aggrecan(批号ab3778)、Sox-9多克隆抗体(批号ab76997)、β-actin(批号ab6276)鼠抗单克隆抗体(英国Abcam公司);羊抗鼠二抗(HRP)(批号112438,北京中杉金桥生物技术有限公司);BCA试剂盒(批号P0010)、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒(批号C1062,上海碧云天生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 干细胞分离培养 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠后,置于75%乙醇中消毒10 min,取股骨和胫骨,PBS清洗,露出骨髓腔吸取骨髓后,用添加双抗的DMEM培养液反复吹打,制成单细胞悬液,离心后弃上清,重悬后接种于培养瓶中(细胞密度 1×10^4 /孔),置于37℃、5% CO₂孵箱中培养,隔天观察细胞状态,48 h后更换培养基。待细胞铺满培养瓶底、密度长至80%融合时,按1:2比例进行传代培养,取第3代干细胞用于后续实验。所有步骤均在无菌条件下操作。

2.2 干细胞鉴定 取生长良好的干细胞,0.25%胰酶消化,4℃、1 000 r/min离心5 min,PBS清洗细胞3次,各管依次加入FITC标记的单克隆抗体CD34、CD44、CD45、CD90,同时每管样品设

立同型阴性对照。避光冰上孵育45 min,PBS洗涤细胞3次,500 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪进行检测分析。

2.3 干细胞诱导分化 取生长良好的干细胞,0.25%胰酶消化,以 5×10^7 /孔细胞密度接种于6孔板中,待细胞至70%融合,分4组进行诱导。分别用加入不同质量浓度牛膝提取物(0、10、30、50 μg/mL)的DMEM培养液诱导3、7、10、14 d,每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

2.4 干细胞活性检测 收集经不同质量浓度牛膝提取物诱导14 d的干细胞,以 5×10^3 /孔细胞密度接种于96孔板内培养24 h,待细胞达70%融合后每孔加入20 μL MTT溶液,孵育4 h,弃上清液,加入100 μL DMSO,振荡后,酶标仪检测490 nm波长下吸光度(A_{490})。然后,将生长良好的干细胞接种于96孔板中,分为对照组、牛膝提取物(50 μg/mL)组、牛膝提取物+尼克酰胺(20 mmol/L)组,处理14 d后,按照上述步骤检测细胞活性。

2.5 干细胞凋亡检测 收集经不同质量浓度牛膝提取物诱导14 d的干细胞,PBS洗涤2次,结合缓冲液将细胞重悬,参照凋亡试剂盒说明书加入Annexin V-FITC和PI进行标记,检测细胞凋亡率。

2.6 干细胞中葡糖胺聚糖含量检测 收集经牛膝提取物诱导3、7、10、14 d后的干细胞,超速离心提取葡糖胺聚糖,以蒸馏水为空白对照,硫酸软骨素为对照品,阿利新蓝法^[7]测定各组细胞上清液中葡糖胺聚糖含量。

2.7 mRNA表达检测 收集经不同质量浓度牛膝提取物诱导14 d的干细胞,Trizol法提取RNA,检测其纯度和完整性。参照逆转录试剂盒说明书合成cDNA,并进行PCR检测,引物由上海生工生物工程公司合成,序列为Sox-9,正向5'-GACTTC-CGCCACGTGGAC-3',反向5'-CAGTACCTGCCGCCAAC-3');Col II,正向5'-GGCAATAGCAGGT-TCACGTACA-3',反向5'-CGATAACAGTCTTGC-CCCATT-3');Aggrecan,正向5'-TCTACCGCT-GCGAGGTGAT-3',反向5'-TGTAATGGAACACGAT-GCCTT-3');SIRT1,正向5'-TGGCAAAGGAG-CAGATTAGTAGG-3',反向5'-CTGCCACAAGAAC-TAGAGGATAAGA-3';β-actin,正向5'-TGTTAC-CAACTGGGACGACA-3',反向5'-GGGCTGTT-GAAGGTCTCAAA-3'。

2.8 蛋白含量检测 收集经牛膝提取物诱导

14 d的骨髓间充质干细胞,提取细胞总蛋白后,BCA测定蛋白浓度,经SDS-PAGE电泳、转膜、脱脂奶粉封闭后,4℃下SIRT1、Col II、Aggrecan、Sox-9、 β -actin(均为1:300)一抗孵育过夜,PBST洗膜,二抗(均为1:300)室温孵育1h,PBST洗膜,ECL发光,压片,显影,检测蛋白含量。取生长良好的干细胞接种于6孔板中,分为对照组、牛膝提取物(50 μ g/mL)组、牛膝提取物+尼克酰胺(20 mmol/L)组,处理14 d后提取细胞总蛋白,按照上述方法检测Sox-9蛋白表达。

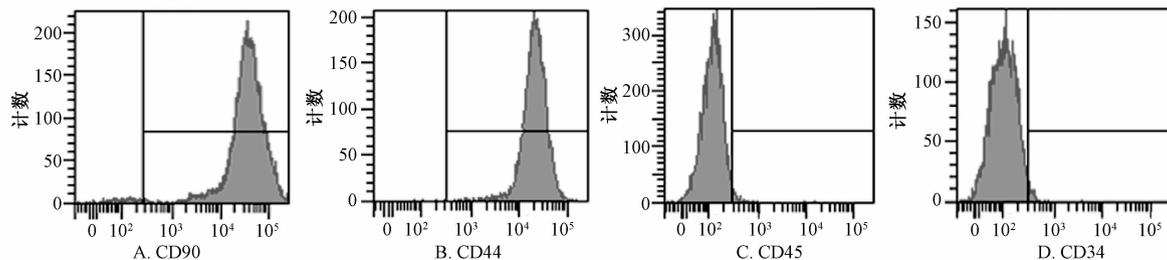
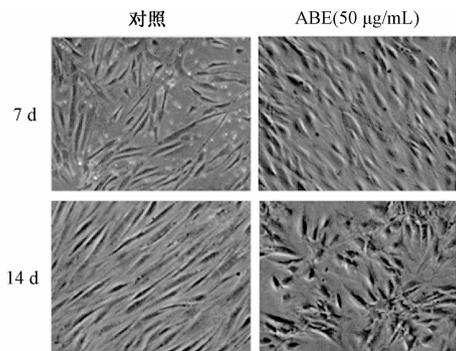


图1 干细胞表面标志物表达

Fig.1 Surface marker expressions of stem cells

3.2 干细胞形态观察 图2显示,传代干细胞贴壁后逐渐显现出梭形、纺锤形,进而形成呈集落生长区;牛膝提取物诱导7 d时,细胞形态由梭形向多角形转变,带有多个凸起,核周可见黑色颗粒;诱导14 d时,多数细胞变成多边形,核周颗粒明显,细胞表型十分接近髓核样细胞。



注: ABE为牛膝提取物

图2 干细胞形态观察

Fig.2 Morphology observation of stem cells

3.3 对干细胞增殖与凋亡的影响 图3显示,与对照组比较,牛膝提取物组干细胞活性显著上升($P < 0.05$),凋亡率显著降低($P < 0.05$),并呈剂量依赖效应。

3.4 对干细胞分化的诱导作用 图4显示,随着牛膝提取物诱导干细胞时间延长,细胞上清液中葡

2.9 统计学分析 通过SPSS 15.0软件进行处理,组间差异采用 t 检验、单因素方差分析,多重比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 干细胞鉴定 图1显示,分离培养的第3代干细胞均一表达CD90、CD44,阳性率分别达到98.34%、99.21%;CD45、CD34呈阴性,阳性率分别仅为2.47%、3.56%,证实所分离的细胞为骨髓间充质干细胞。

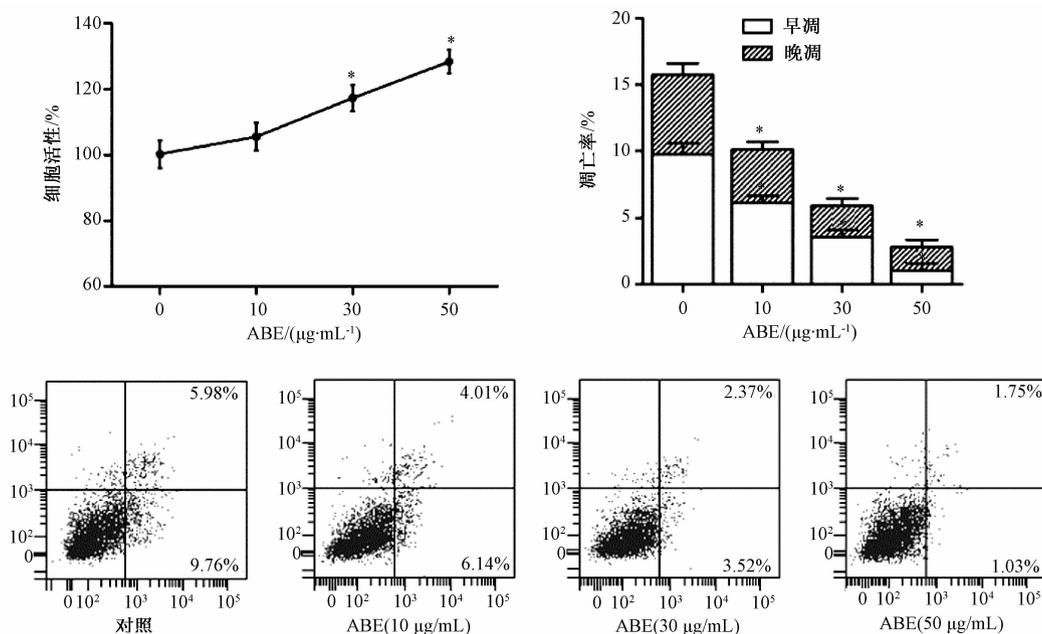
糖胺聚糖含量逐渐增加,并呈剂量依赖效应;与对照组比较,诱导14 d后牛膝提取物组Col II、Aggrecan、Sox-9蛋白及mRNA表达均显著上调($P < 0.05$)。

3.5 对干细胞增殖与分化的促进作用 图5显示,与对照组比较,牛膝提取物组SIRT1、Sox-9 mRNA及蛋白表达显著上调($P < 0.05$),干细胞活性显著提高($P < 0.05$),而加入尼克酰胺(SIRT1抑制剂)后均显著降低($P < 0.05$)。

4 讨论

腰椎间盘突出症是指椎间盘退变的基础上纤维环破裂髓核突出,进而压迫和刺激神经根所引起的一系列症状和体征^[2],椎间盘退变首先表现为髓核细胞的病变,表现为细胞数量减少,进而减少细胞外基质蛋白聚糖和II型胶原等物质,进一步造成含水量降低、椎间盘功能的损伤^[8]。中药对该类疾病治疗已有丰富的临床经验,而且安全性较高,适合长期使用,值得进一步探究和推广。

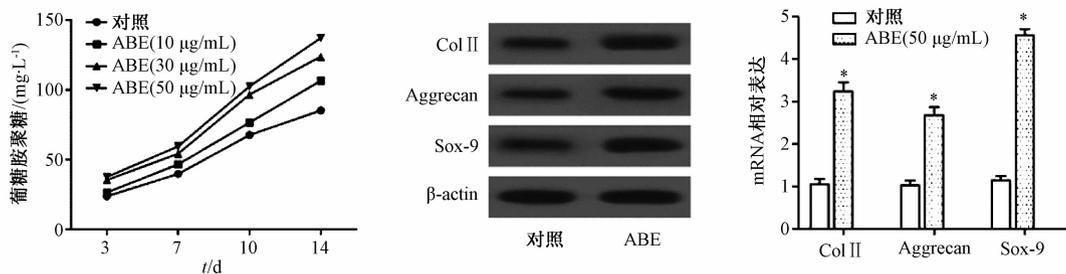
目前,骨髓间充质干细胞已经作为种子细胞用于组织工程,其优点在于取材方便,在体外能维持分化潜能,无任何排斥反应,髓核细胞为类软骨细胞,而软骨细胞表型的改变有赖于机械性刺激、加入生长因子等细胞外环境的变化^[9],但采用骨髓间充质干细胞治疗椎间盘退变的关键问题是如何将



注：ABE为牛膝提取物。与对照组（0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）比较，* $P < 0.05$

图3 提取物对干细胞增殖与凋亡的影响

Fig. 3 Effects of extract on the proliferation and apoptosis of stem cells



注：ABE为牛膝提取物。与对照组比较，* $P < 0.05$

图4 提取物对干细胞分化的诱导作用

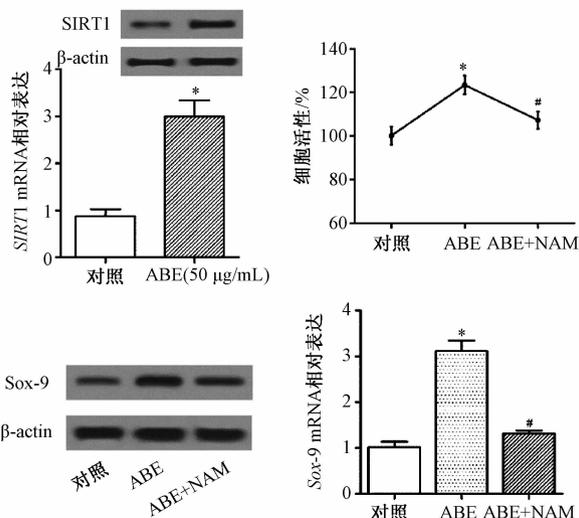
Fig. 4 Induction effect of extract on stem cell differentiation

其诱导分化为髓核样细胞而发挥其修复作用。研究证实，在 TGF- β 1 诱导下骨髓间充质干细胞可分化成髓核样细胞，并且对椎间盘损伤动物模型使用诱导后的干细胞后，退变组织恢复了再生^[10]；李淑洁等^[11]报道，牛膝提取物能促进软骨细胞增殖，上调软骨 II 型胶原（Col II）表达，修复软骨损伤；本实验发现，牛膝提取物作用于骨髓间充质干细胞 14 d 后，其细胞形态发生明显改变，随着培养天数延长，其外形逐渐接近髓核细胞，同时可通过促进骨髓间充质干细胞增殖，并抑制其凋亡。

Sox-9 已被证实为软骨细胞表型的主要调控者^[12]，Col II 与 Aggrecan 是软骨细胞的特征性表面标志，细胞外基质中葡糖胺聚糖含量可作为判断体外培养扩增软骨细胞分泌基质功能的可靠依据，

故本实验选择四者作为骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的特征指标。研究表明，牛膝多糖可上调软骨细胞 Col II 表达，从而促进软骨细胞增殖^[13]；本实验发现，牛膝提取物可显著提高骨髓间充质干细胞中葡糖胺聚糖含量及 Col II、Aggrecan、Sox-9 水平。

沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1（SIRT1）为细胞核去乙酰化酶，能调节细胞增殖与分化、衰老、能量代谢等决定细胞命运的功能^[14]，可通过脱乙酰化 β -catenin 来调控骨髓间充质干细胞分化^[15]。大量研究证明，中药有效成分可通过调节 SIRT1 来发挥对疾病的治疗作用^[16-17]；本实验发现，牛膝提取物可显著提高骨髓间充质干细胞 SIRT1 水平，而尼克酰胺（SIRT1 抑制剂）抑制了



注: ABE 为牛膝提取物, NAM 为尼克酰胺。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与牛膝提取物组比较, # $P < 0.05$

图5 提取物对细胞增殖与分化的促进作用

Fig. 5 Promotion effects of extract on cell proliferation and differentiation

细胞增殖与分化, 表明在该过程中 SIRT1 发挥了重要作用。

综上所述, 牛膝提取物可通过上调 SIRT1 来促进骨髓间充质干细胞增殖并抑制其凋亡, 上调髓核样细胞表征蛋白 Col II、Aggrecan、Sox-9 水平, 但其相关分子机制还需进一步研究。本实验通过研究牛膝提取物对骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响, 为中药治疗腰椎间盘突出提供了实验依据。

参考文献:

[1] 曾佳兴, 梁 斌. 腰椎间盘突出发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(11): 1723-1726.
 [2] Tsuji T, Watanabe K, Hosogane N, et al. Risk factors of radiological adjacent disc degeneration with lumbar interbody fusion for degenerative spondylolisthesis[J]. *J Orthop Sci*, 2016, 21(2): 133-137.
 [3] Tian Y, Yuan W, Li J, et al. TGFβ regulates Galectin-3 expression through canonical Smad3 signaling pathway in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration[J]. *Matrix Biol*, 2016, 50: 39-52.
 [4] 沈 舒, 王 琼, 李友宾. 牛膝的化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2011, 23(11): 1-6.

[5] He G, Guo W, Lou Z, et al. *Achyranthes bidentata* saponins promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the ERK MAPK signaling pathway[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 467-473.
 [6] 张小鸿, 吴杨峥, 徐先祥. 不同显色剂对牛膝总皂苷含量测定的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 113-116.
 [7] Yamashita A, Liu S Y, Woltjen K, et al. Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1978.
 [8] Colombini A, Lombardi G, Corsi M M, et al. Pathophysiology of the human intervertebral disc[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(5): 837-842.
 [9] Bridgen D T, Gilchrist C L, Richardson W J, et al. Integrin-mediated interactions with extracellular matrix proteins for nucleus pulposus cells of the human intervertebral disc[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(10): 1661-1667.
 [10] Wang W Z, Yao X D, Huang X J, et al. Effects of TGF-β1 and alginate on the differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells into a chondrocyte cell lineage[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(3): 995-1002.
 [11] 李淑洁, 陈秀娟, 任艳红, 等. 牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 132-135.
 [12] Hdud I M, Loughna P T. Influence of 1α, 25-dihydroxyvitamin D₃ [1, 25 (OH)₂D₃] on the expression of Sox 9 and the transient receptor potential vanilloid 5/6 ion channels in equine articular chondrocytes [J]. *J Anim Sci Technol*, 2014, 56: 33.
 [13] Weng X, Lin P, Liu F, et al. *Achyranthes bidentata* polysaccharides activate the Wnt/β-catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(4): 1045-1050.
 [14] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function[J]. *Biochem J*, 2007, 404(1): 1-13.
 [15] Simic P, Zainabadi K, Bell E, et al. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating β-catenin [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(3): 430-440.
 [16] Hu A, Huang J J, Li R L, et al. Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13429.
 [17] Gu C, Zeng Y, Tang Z, et al. *Astragalus* polysaccharides affect insulin resistance by regulating the hepatic SIRT1-PGC-1α/PPARα-FGF21 signaling pathway in male Sprague Dawley rats undergoing catch-up growth[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 6451-6460.