

• 实验研究 •

牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞软骨定向分化的实验研究

马笃军¹ 彭力平^{1△} 王立新¹ 余阆¹ 裴军宇¹ 李明华² 徐宁达³ 肖伟¹

[摘要] 目的:观察牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)软骨定向分化的作用。方法:密度梯度离心联合骨髓贴壁法分离培养新西兰大白兔 BMSCs,取 P3 代细胞随机分成 5 组(空白组、完全诱导组、牛膝醇提物低剂量组、牛膝醇提物中剂量组、牛膝醇提物高剂量组),连续诱导培养 21 d,倒置相差显微镜观察细胞形态,免疫细胞学检测Ⅱ型胶原蛋白荧光表达,qRT-PCR 检测软骨分化标记基因 Sox9、蛋白聚糖、Ⅱ型胶原 mRNA 表达情况,Western Blot 检测 Sox9、蛋白聚糖、Ⅱ型胶原蛋白表达水平。结果:牛膝醇提物高、中、低剂量组与空白组相比Ⅱ型胶原蛋白荧光阳性表达明显;牛膝醇提物高、中剂量组与空白组相比软骨分化标记基因 Sox9、蛋白聚糖、Ⅱ型胶原明显增加($P<0.05$),Western Blot 验证 Sox9、蛋白聚糖、Ⅱ型胶原蛋白表达明显($P<0.05$),其中牛膝醇提物高剂量组效果最佳($P<0.01$),与完全诱导组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:牛膝醇提物能够诱导兔 BMSCs 成软骨分化,其具体作用机制有待进一步研究。

[关键词] 牛膝醇提物;怀牛膝;骨髓间充质干细胞;软骨分化

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)02-0006-06

Experimental Research on Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Rabbits Induced by Alcohol Extractive of *Achyranthis Bidentatae*

MA Dujun¹ PENG Liping^{1△} WANG Lixin¹ YU Tian¹ PEI Junyu¹
LI Minghua² XU Ningda³ XIAO Wei¹

¹ Shenzhen Clinical College, Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong China;

² Biomedical Research Institute, Medical Center, Shenzhen Peking University-The Hong Kong University of Science and Technology, Shenzhen 518000, Guangdong China;

³ Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518034, Guangdong China.

Abstract Objective: To observe the effect of chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of rabbits in vitro induced by alcohol extractive of *Achyranthis bidentatae* (AEAB). **Methods:** The BMSCs from New Zealand rabbits were isolated and cultivated by percoll density gradient centrifugation combined with bone marrow adherent. BMSCs at passage 3 were randomized divided into 5 groups: blank group, the complete induction group, low-dose treatment group by AEAB, middle-dose group therapy by AEAB, high-dose treatment group by AEAB. They were induced for 21 days. The morphology was observed by inverted microscope. The expression of type II collagen fluorescence was detected by immune cytology; the expression of cartilage differentiation marker genes of Sox9, aggrecan, and type II collagen mRNA were detected by QRT-PCR; the expression levels of Sox9, aggrecan, and type II collagen were also tested by Western blot. **Results:** Compared with the blank group, the type II collagen fluorescence was positive expressed in the treatment group (by AEAB treating of low dose, medium dose, and high dose). Compared with the blank group, the expression of the cartilage differentiation marker genes, such as Sox9, aggrecan, and type II collagen mRNA in the treatment group were increased significantly ($P<0.05$). The Western blotting confirmed expression of the Sox9, aggrecan, and type

II collagen ($P<0.05$), best effect was in the high-dose treatment group by AEAB ($P<0.01$), and there was no significant difference compared with the complete induction group ($P>0.05$). **Conclusion:** AEAB can induce BMSCs of rabbit into chondrogenic differentiation in vitro, but its specific mechanism needs further studied.

Keywords: alcohol extractive of *achyranthis bidentatae*; *achyranthis bidentatae*; bone marrow mesenchymal stem cells; chondrogenic differentiation

基金项目:深圳市科技计划(卫生系统)项目课题(201302124)

深圳市福田区卫生公益性科研项目(FTWS201318)

¹ 广州中医药大学深圳临床医学院(广东 深圳, 518033)

² 深圳北京大学-香港科技大学医学中心生物医学研究所

³ 广州中医药大学深圳医院

△通信作者 E-mail: plp001@sina.com

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)是一群具有多向分化潜能的均质性细胞,作为种子细胞能够根据微环境信号的指令分别分化为不同种类细胞,适合于伴随软骨下骨损伤的软骨缺损修复^[1],已成为细胞组织工程研究的热点。但干细胞对软骨病损的治疗方式研究较少,要将干细胞体外诱导技术最终应用到临床,还存在许多问题和风险,亟待研究解决。从骨代谢进行研究发现,BMSCs 的生物学特性与中医理论“肾主骨生髓”存在相关性,骨、软骨的生长、修复均依赖于肾中所提供的精气濡养和推动。通过对古方^[2]和专业杂志^[3]的统计,在治疗骨关节炎(Osteoarthritis, OA)的中药中,牛膝的使用频率最高。前期研究发现,牛膝具有能促进骨髓干细胞归巢^[4]、骨髓源成体干细胞软骨分化^[5]等作用。故本实验拟研究补肾强筋骨中药怀牛膝的有效制剂牛膝醇提物含药血清在体外共培养干预兔 BMSCs 向软骨细胞分化的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰大白兔 15 只,雌雄不限,2 月龄,质量 1.5~2.0 kg,由广东省医学动物实验中心提供[动物合格证号:SCXK(粤)2014-0035]。实验地址为深圳北京大学香港科技大学医学中心生物医学研究所实验动物中心[许可证号:SYXK(粤)2010-0106]。实验操作符合 2006 年科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 试剂与仪器

L-DMEM(Gibco,低糖,无丙酮酸钠);胎牛血清(FBS,Gibco);CO₂培养箱(Heraeus);倒置相差显微镜(Leica);Percoll 淋巴细胞分离液(Pharmacia);0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)(Gibco);低分子肝素钠注射液(0.4 mL/支,5 000 IU,齐鲁制药);CCK-8 试剂盒(C0037,碧云天);TRE-Trizol(Invitrogen);Primers(上海生工生物);PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa);SYBR Premix Ex Taq II(TaKaRa);BSA(牛血清蛋白,sigma);Collagen II 抗体[(ab3092),abcam];Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(广州易锦生物技术有限公司);DAPI 染液(碧云天生物研究所);抗荧光衰减封片剂(碧云天生物研究所);PVDF 膜(Merk emillipore);HRP 羊抗鼠(BOSTER 公司);HRP 羊抗兔(BOSTER 公司);全蛋白提取试剂盒(凯基生物);苯甲基磺酰(上海生工生物);Beyo-ECL Plus(碧云天);Sox9 Antibody(Sc-17341, Santa Cruz);COL2A1(Sc-52658, Santa Cruz);ADAMTS-5(Sc-83186, Santa Cruz);GAPDH(Cw0266,康为世纪);倒置荧光显微镜(DMI6000B,Leica);85-2 控温磁

力搅拌器(XMTD-701,金坛市医疗器械厂),牛膝醇提物(怀牛膝,深圳市中医院药剂科)等。

1.3 实验方法

1.3.1 牛膝醇提物含药血清制备 《中国药典》2010 年版牛膝常规用量 12 g,按照药理试验中动物与人体间的等效剂量进行换算,实验兔每日用量约 1 g/kg。按照常规用药量的 1,3,6 倍,予低剂量组 1 g/(kg·d)、中剂量组 3 g/(kg·d)、高剂量组 6 g/(kg·d),空白组 0 g/(kg·d),每天灌胃 2 次,每次灌胃时用蒸馏水配成 10 mL。12 只实验兔按照随机分组后根据以上用量连续用药 7 d 后制备牛膝醇提物含药血清。

1.3.2 BMSCs 分离、培养 实验兔静脉全麻后,予右侧髂嵴处备皮、消毒、铺巾;用 10 mL 注射器吸取预先稀释好的肝素 0.5 mL,将骨穿针垂直髂嵴穿刺点并顺髂骨中间层进入髓腔;拔出针芯,连接注射器,快速抽取骨髓液 2.0~3.0 mL;用 PBS 等比例混匀稀释骨髓液,然后将骨髓稀释液 1:1 加入密度为 1.073 g/mL Percoll 分离液的离心管中,20 min,2 500 r/min,巴氏吸管吸取离心后液体柱中乳白色界面层(单核细胞层)至另一试管,PBS 洗涤 3 次,再用含 10%胎牛血清 L-DMEM 培养基 5 mL 重悬细胞并计数。将上述细胞按 1×10^5 个细胞密度接种于塑料培养瓶(25 cm²)中,细胞培养箱培养条件 37℃,5% CO₂,用 L-DMEM 培养液培养。每天用倒置相差显微镜观察细胞生长情况。培养 48 h 后进行首次换液,以后间隔 48 h 换液,待细胞生长密度达 70%~80%时用 0.25%胰酶消化传代,镜下观察消化程度,取 3 mL PBS 吹打细胞,收集至 15 mL 离心管中离心,转速 1 000 r/min,5 min,按 1:3 比例进行传代培养,并记作 P1;P2,P3 等依次类推。

1.3.3 BMSCs 软骨分化 取第 4 代 BMSCs,胰酶消化,以 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 24 孔板中,在含 10%胎牛血清(FBS)的 L-DMEM 培养液中培养,并加入含地塞米松(39.25 mg/L),bFGF(10 μg/L),维生素 C(50 mg/L),在 37℃,5% CO₂ 孵箱内培养 1 周,换液 2 次。从第 2 周起随机用牛膝醇提物不同剂量组含药血清、含空白血清 L-DMEM 培养液和 TGF-β1(10 μg/L)替换 bFGF,继续培养 3 周,每日用倒置相差显微镜观察细胞形态变化并摄片。分别于诱导的第 3,6,9,12 天进行 CCK-8 检测,方法同上。具体分组如下:空白组为 10%胎牛血清+L-DMEM 培养液+空白血清;高剂量组为 10%胎牛血清+L-DMEM 培养液+高剂量含药血清;中剂量组为 10%胎牛血清+L-DMEM 培养液+中剂量含药血清;低剂量组为 10%胎牛血清+L-DMEM 培养液+低剂量含药血清;完全诱导组(经典成软骨诱导组)为 10%胎牛血清+

L-DMEM 培养液+空白血清+TGF-β1.

1.3.4 免疫细胞学检测Ⅱ型胶原蛋白荧光表达 制备空白组及实验组细胞爬片,取出爬片后,以4%多聚甲醛固定,并经氧化物酶阻断溶液浸泡。正常山羊血清封闭,依次加入:一抗(鼠抗兔Ⅱ型胶原单克隆抗体),4℃过夜;二抗(生物素化羊抗鼠 IgG)、链霉亲和素-过氧化物酶复合物室温孵育 30 min. 上述各步骤间均用 PBS 洗

涤,然后显色,脱水,透明,封片,计算阳性率。

1.4 qRT-PCR 引物设计

根据目的基因的种属及名称,在 NCBI 数据库查询参考核苷酸序列,采用 Primer 3.0 设计 Real Time PCR 引物,引物序列经 NCBI nBlast 比对无非特异性扩增,用于 qRT-PCR 实验。该实验目的基因引物序列(5' to 3')见表 1.

表 1 引物序列

Gene	Reference gene ID	Primer	Primer Sequence
Sox9	100008944	Forward	TGTGAACTGGTAGATCTGGT
		Reverse	AAGAAGTGAATAAGTGGGCT
Ⅱ型胶原	100009005	Forward	TGTGAACTGGTAGATCTGGT
		Reverse	AAGAAGTGAATAAGTGGGCT
蛋白聚糖	100009079	Forward	TGAAGAAGAAGAAGGGTTAGG
		Reverse	AGCAGTAGGAGCCAGAGTTAT
GAPDH	100009074	Forward	GGCGTGAACCACGAGAAGTA
		Reverse	ATGCCAGTGAGTTTCCCGTT

1.5 qRT-PCR 检测成软骨分化相关基因表达

分别收集对照组与实验组细胞,检测 Sox9、蛋白聚糖、Ⅱ型胶原 mRNA 表达。将 BMSCs 诱导培养 21d 后,用 Trizol 试剂分别提取实验组与对照组细胞的总 RNA,再用随机引物,逆转录酶转录为 cDNA,然后以此 cDNA 第 1 链为模板,进行 qRT-PCR 扩增。反应参数参考 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)试剂盒说明进行,Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线应用 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System 的操作方法进行。

1.6 Western Blot 检测软骨标记蛋白表达

取诱导培养 21 d 后的 6 孔板,按总蛋白提取试剂盒说明提取细胞蛋白。考马斯亮蓝 G250 测定蛋白质溶液的 OD 值,保持样品蛋白浓度在同一水平(4~8 μg/μL)。蛋白质样品与 5×的加样缓冲液(加入 β 巯基乙醇)按 4:1 混匀。每孔上样 40~60 μg 总蛋白,在 SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶中电泳,蛋白质分子量标准为普通 Marker,分子质量范围为 16~220 kD. 然后用湿转法将凝胶中的蛋白转至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 中,室温封闭 60 min. 根据蛋白 Marker 指示将 PVDF 膜剪开,参考一抗说明书,按 1:1 000(Sox9),1:1 000(COL2A1),1:1 000(ADAMTS-5)

比例稀释一抗。将 PVDF 膜分别放入含各自一抗溶液中,4℃孵育一抗过夜,1×TBST 漂洗 3 次,每次 5 min. 用含标记辣根过氧化物酶的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h. 使用 BeyoECLPlus 化学发光试剂,黑暗处显色,用 X 光片压片,显影液及定影液洗片,以 GAPDH 为内参,用 ImageJ 进行灰度分析。

1.7 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,完全随机设计多组比较用 LSD 和 Dunnett 法,不满足方差分析时用非参数检验,检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学观察

原代细胞刚接种时形态主要为梭形或圆形,大小不一(图 1),培养 48 h 后细胞开始贴壁生长,72 h 后基本全部贴壁生长,分布稀疏(图 2)。培养 3~4 d 后细胞呈多边形或梭形,增殖速度加快,细胞集落形成,集落之间互相靠近。7 d 可达 95%(图 3)。传代培养后 BMSCs 贴壁迅速,约 2 h 细胞大部分贴壁,细胞呈长梭形,分布均匀,平行排列呈螺旋状或漩涡状,细胞增殖迅速,细胞核明显、清晰,核浆比例大,传代至第 3 代时无明显变化(图 4)。

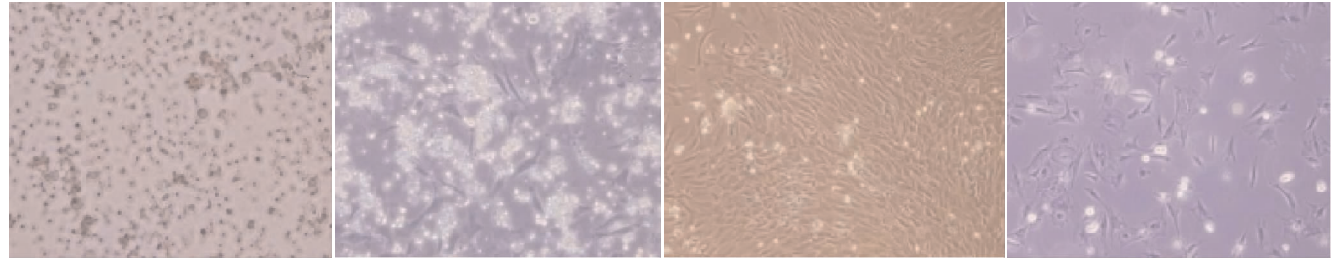


图 1 P0 代骨髓间充质干细胞 图 2 P0 代干细胞培养第 3 天 图 3 P0 代干细胞培养第 7 天 图 4 P3 代干细胞培养,倒置相差显微镜,×200
分离培养即刻

2.2 免疫细胞学检测 BMSCs 成软骨分化Ⅱ型胶原蛋白表达

连续诱导 21 d 后,空白组(图 5)并没有明显的Ⅱ型胶原荧光染色,牛膝醇提物含药血清干预组(图 6)和完全诱导组(图 7)Ⅱ型胶原荧光染色阳性明显,说

明完全诱导组和牛膝醇提物含药血清干预组诱导 BMSCs 分泌的Ⅱ型胶原蛋白表达明显。图 5~7 中蓝色代表 DAPI 核染色,红色代表 Collagen Ⅱ 免疫荧光表达,对比后见牛膝干预组 Collagen Ⅱ 显著阳性。倒置相差显微镜,×200。



图 5 空白对照组用牛膝醇提物含药血清干预培养 BMSCs 21 d 后Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)免疫荧光表达

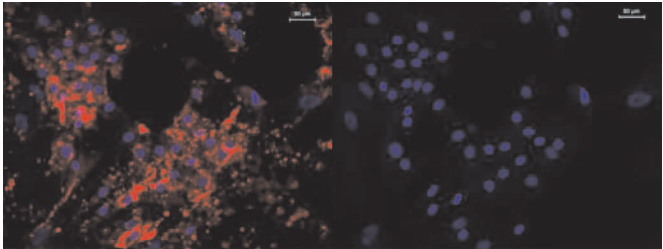


图 6 中剂量组用牛膝醇提物含药血清干预培养 BMSCs 21 d 后Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)免疫荧光表达

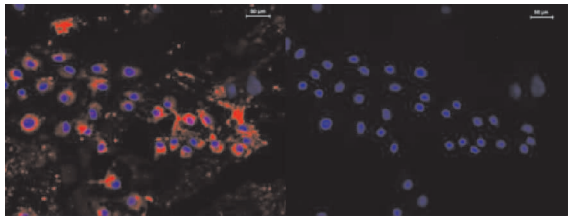


图 7 完全诱导剂组用牛膝醇提物含药血清干预培养 BMSCs 21 d 后Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)免疫荧光表达

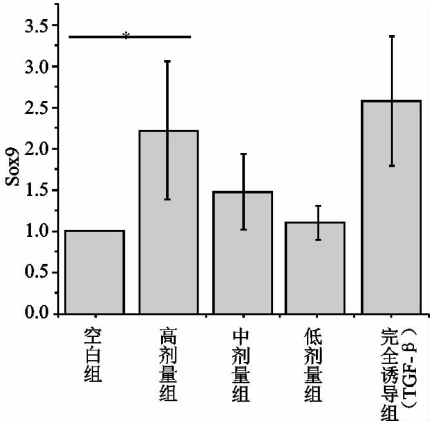
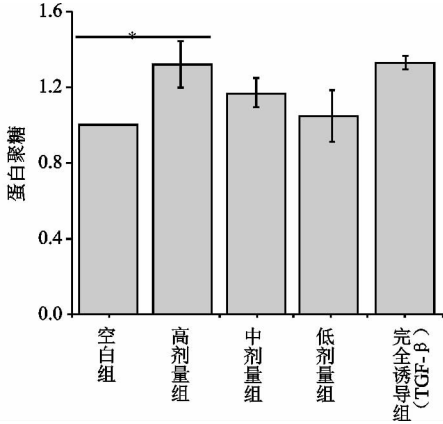
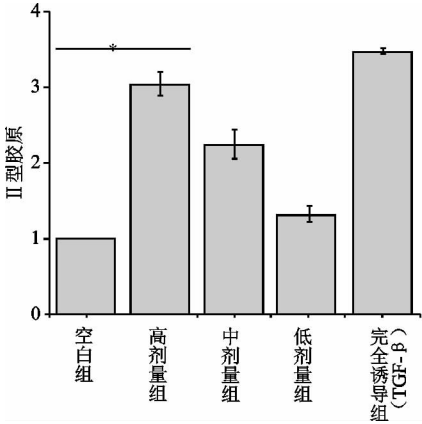


图 8 qRT-PCR 检测结果

2.4 Western Blot 检测结果

Western Blot 检测结果灰度分析表明,相比于空白组,各诱导组 Sox9、Ⅱ型胶原、蛋白聚糖表达量均增加,差异有统计学意义($P<0.05$);相对于空白对照

组,高剂量组 Sox9、Ⅱ型胶原、蛋白聚糖表达量明显增加($P<0.01$),与完全诱导组相比,高剂量组 Sox9、Ⅱ型胶原、蛋白聚糖表达量差异无统计学意义($P>0.05$)(图 9,10)。

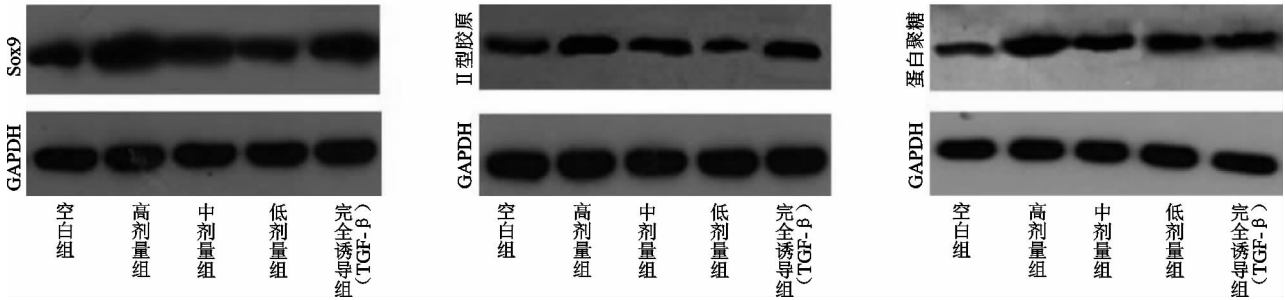


图 9 Western Blot 检测结果

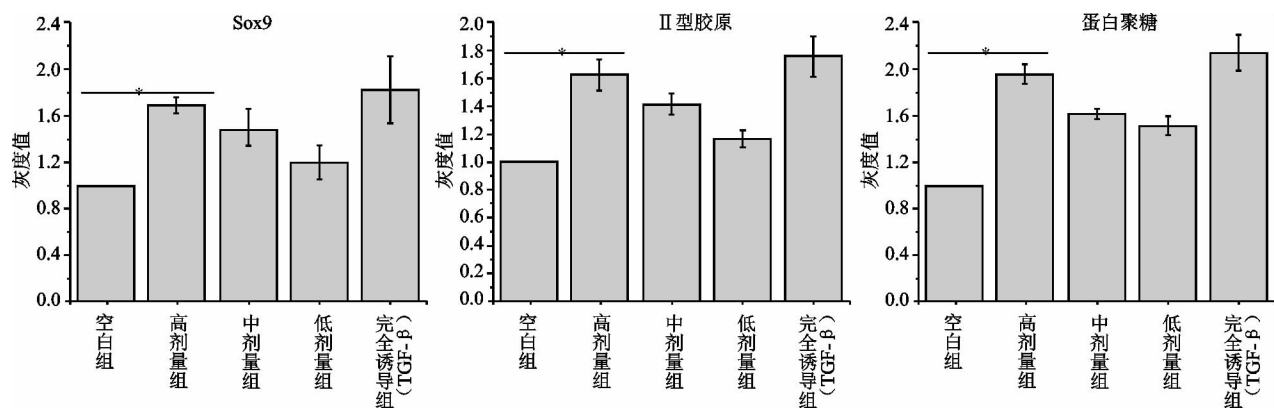


图 10 Western Blot 检测结果灰度分析

3 讨论

现代药理研究表明,骨碎补、鹿茸等单味中药能促进骨髓间充质干细胞向软骨分化,有助于软骨修复。骨碎补归肝肾经,性温,能补肾强骨、消肿止痛,适于虚寒体质患者;鹿茸归肝肾经,能强筋骨,单属补益药,消肿止痛作用不明显,其性温,偏补肾阳,有动风、动血之嫌,所含激素可致心悸,适用人群有限,药物价格较贵,长期服用较困难。牛膝与以上两味中药对比的优势在于:性味平和,适于各种体质患者,适于长期服用;有明显的引经作用,适于软骨损伤的高发部位——膝关节;能标本兼顾,适于 OA 的各种类型;能同时治疗多种中老年人常见病,适于 OA 的高发人群;药物来源广、价格低廉。

《神农本草经》记载,牛膝“主寒湿痿痹,四肢拘挛,膝痛不可屈伸……”。牛膝味苦、甘、酸、平,归肝、肾经,能活血通经,补肝肾,强筋骨,引血下行。目前牛膝有效成分提取方法很多^[6],但以醇类物质作溶剂提取有效成分的方式最成熟,提取物中主要有效成分包含多糖类、皂苷类、甾酮类、黄酮类等,并且具有显著促进成骨样细胞增殖的作用^[7]。与牛膝“补肝肾,强筋骨”功效相关的实验研究有:蜕皮甾酮具有促进蛋白质的合成、使受损细胞再生等作用,多糖类具抗氧化、免疫调节等作用,牛膝有促进人及动物 BMSCs 增殖的作用以及骨髓干细胞归巢,胡萝卜甾促进成骨样细胞增殖,甲醇提取物抗骨吸收,水煎液防治骨质疏松,乙醇提取物促进软骨细胞增殖、增加 II 型胶原表达^[8]和骨髓源成体干细胞(ASC)软骨分化^[5],以及抗炎镇痛等作用。

关节软骨受组织学和生物学特性的限制,骨组织中未分化的间充质细胞不能进入损伤部位^[9],软骨破坏后自然修复的组织为纤维软骨,缺乏原正常透明软骨的耐用性及力学功能^[10],如何修复病损的关节软骨是目前 OA 研究的重点和难点。

BMSCs 负责组织的修复和更新,具有多向分化潜能,在不同的诱导条件下分化为不同组织。生物医学

研究的热点集中在干细胞的生物活性研究方面^[11],干细胞工程对修复缺损具有极其重要的作用,其取材方便,对机体损伤小,体外扩增能力强。有关研究认为,相比其他来源,BMSCs 能更好地增殖分化为软骨细胞^[12],而且分化能力稳定,是终身可用的软骨前体细胞。自体 BMSCs 移植修复软骨损伤效果优于自体软骨细胞植入^[13]。BMSCs 具有 CD105(TGF-β 受体),细胞成软骨潜能似与其表达有关,另外,BMSCs 标志基因在平面培养时基因差别不明显,而在三维高密度培养时基因差别显著,所以,只有 BMSCs 是用于软骨组织工程学研究较为理想的种子细胞。

对干细胞软骨定向分化的诱导研究包括转基因、软骨诱导因子 A、胰岛素样生长因子-1 和转化生长因子 β1(Transforming Growth Factor-β1, TGF-β1)、低氧分压的单层细胞培养等^[14],其中 TGF-β1 是首选诱导剂,效果好,诱导率高。国外研究者还对软骨支架材料进行了许多研究,如地塞米松凝胶、三维纳米纤维^[15]、自体胶原基质^[16]、II 型胶原蛋白聚糖^[17]、种子细胞+支架+细胞因子复合物^[18]、可吸收明胶海绵等,并将其技术应用于临床。国内研究者也证实了兔 BMSCs 定向诱导后移植修复关节软骨的有效性。

BMSCs 定向分化为软骨细胞的机理复杂,亟待探讨。BMSCs 定向分化为软骨细胞时,多种细胞因子和信号转导通路参与其中,组成复杂多变的分子生物网络系统。研究发现,Wnt/β-catenin 通路在软骨细胞增殖、分化、迁移、凋亡及稳态维持方面起着重要作用,激活 Wnt/β-catenin 信号通路可阻止 BMSCs 向脂肪细胞、成骨细胞分化,进而促进其向软骨细胞转化。在早期软骨细胞分化形成阶段,RhoA/ROCK 信号通路调节肌动蛋白参与软骨细胞骨架结构形成,在维持细胞形态和调控软骨细胞基因表达中起着至关重要的作用。也有研究表明,Notch 信号通路过程中 JAG1 激活该通路的关键配体发挥对 BMSCs 软骨分化的具体调控,在调控软骨细胞增殖、分化,维持软骨细胞表型,以及软骨基质代谢平衡方面起着十分重要的作用。同

样 PI3K/Akt 信号途径的正常表达对软骨细胞的增殖、分化也具有不可替代的作用。最新研究发现,转录因子 Sox9 在 Sox5 和 Sox6 的协同作用下可诱导 BM-SCs 向软骨细胞方向分化,而且进一步研究表明,这三种基因联合作用可以修复软骨细胞,延长骨关节炎的发病时间。TGF- β /Smad 信号通路激活 TGF- β 可调节 BMSCs 的分化、增殖以及细胞凋亡等生理过程,共同在一定条件下上调 Sox9, II 型胶原和蛋白聚糖基因的表达。II 型胶原 Col2a1 基因是软骨细胞中 II 型胶原特异增殖基因,主要编码软骨基质 II 型胶原蛋白,也是软骨细胞特异性标志蛋白之一。Sox9 能与 Col2a1 内含子 1 上的特异位点结合,直接调控软骨细胞 Col2a1 的表达。另外,在软骨形成的初始阶段,未分化间充质干细胞向定向干细胞分化以及间充质细胞的聚集过程都需要 Sox9 的参与。Sox9 基因不仅是软骨特异性基因表达所必需的,同时也是调控间充质细胞聚集过程中所需的细胞膜蛋白的表达。在研究软骨形成中发现 Sox9 mRNA 表达量和 Col2a1 与甲状旁腺素相关肽(PTHrP)存在一定的依赖性,成正比关系趋势,认为促软骨形成的 Sox9 转录因子是 PTHrP 的信号靶点之一。由此可见,BMSCs 在向软骨分化的过程中,有多条信号通路参与其中,这些信号通路互相交织,在软骨细胞分化、增殖的进程担负着不同的作用,因此,进一步研究这种分子生物网络机制,明确 BM-SCs 向软骨细胞分化中不同分子对其作用的机制,将有助于找到治疗骨关节炎的靶点^[19]。

笔者为本项目进行的课题实验研究表明,牛膝醇提物含药血清体外培养兔 BMSCs 能提高软骨分化标记基因 Sox9、蛋白聚糖、II 型胶原蛋白表达,并进行了 WB 实验验证,提示牛膝醇提物能够诱导兔 BMSCs 向软骨细胞分化,为进一步的组织工程细胞移植研究提供了理论依据,为中医药治疗关节软骨损伤提供了新方法,但其具体作用机制和有效单体成分还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 毛建水,张慎启,何颖韬,等. 关节软骨损伤干细胞治疗研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2013,21(9):70-72.
- [2] 郭达,张斌山,刘金文. 骨关节炎的古代方药规律研究[J]. 南方医科大学学报,2010,30(9):2194-2195.
- [3] 姚共和,刘向前,李建斌,等. 中医期刊治疗膝关节骨关节炎方剂用药特点分析[J]. 湖南中医学院学报,2005,25(6):54-56.
- [4] 田能,孔祥英,王荣田,等. 不同引经药对股骨头坏死模型兔骨髓干细胞归巢的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):1624-1628.
- [5] 黄勇,黄秀深,胡一梅. “左归丸”配伍规律对骨髓源成体干细胞定向分化的调控作用[J]. 成都中医药大学学报,2010,33(1):48-52.
- [6] 赵佳,杨桂枝,田汉文. 牛膝醇提物对佐剂性关节炎模型大鼠滑膜病理的影响[J]. 西部医学,2008,20(3):485-487.
- [7] 孙奋勇,潘秋辉,洪岸. 牛膝促进成骨细胞增殖的作用与机理研究[J]. 中药材,2004,27(4):264-266.
- [8] 彭力平,马笃军,林栋栋,等. 牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察[J]. 湖南中医杂志,2013,29(2):126-129.
- [9] Poole AR. What type of cartilage repair are we attempting to attain[J]. Bone Joint Surg Am,2003,85 A(Suppl 2):40-44.
- [10] Messent EA, Ward RJ, Tonkin CJ, et al. Osteophytes, juxta-articular radiolucencies and cancellous bone changes in the proximal tibia of patients with knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage,2007,15(2):179-186.
- [11] Heckmann L, Fiedler J, Mattes T, et al. Mesenchymal Progenitor Cells Communicate via Alpha and Beta Integrins with a Three-dimensional Collagen type I Matrix[J]. Cells Tissues Organs,2006,182(3-4):143-154.
- [12] Bernardo ME, Emons JA, Karperien M, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Display a Better Chondrogenic Differentiation Compared with Other Sources[J]. Connect Tissue Res,2007,48(3):132-140.
- [13] Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, et al. Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation[J]. Am J Sports Med,2010,38(6):1110-1116.
- [14] Nuttelman C, Tripodi M C, Anseth KS. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs[J]. Biomed Mater Res A,2006,76(1):183-195.
- [15] Li WJ, Tuli RC, Okafor CK, et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials,2005,26(6):599-609.
- [16] Kramer J, Bohrsen F, Lindner U. In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells[J]. Cell Mol Life Sci,2006,63(5):616-626.
- [17] Vickers SM, Gotterbarm T, Spector M. Cross-linking affects cellular condensation and chondrogenesis in type II collagen-GAG scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res,2010,28(9):1184-1192.
- [18] Fan H, Hu Y, Qin L, et al. Porous gelatin chondroitin hyaluronate tri copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF- β 1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair[J]. J Biomed Mater Res A,2006,77(4):785-794.
- [19] 彭力平,朱春城,马笃军. 中药对干细胞移植治疗骨关节炎的干预效应[J]. 中国组织工程研究,2012,49(16):9289-9293.