

黄精多糖对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中 PINP 和 BMP-2 表达的影响

曾高峰^{1*}, 宗少晖², 邹斌³, 李柯柯⁴

¹广西医科大学公共卫生学院; ²广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科;

³广西医科大学七年制临床医学 2007 级研究生; ⁴广西医科大学研究生学院, 南宁 530021

摘要: 探讨黄精多糖(PSP)对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化作用中 I 型前胶原 N 端前肽(Procollagen type I N-terminal Propeptide, PINP)和骨形态发生蛋白 2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)表达的影响。取 8 周龄雄性 BALB/C 小鼠 1 只, 无菌操作分离小鼠股骨和胫骨, 注射器冲出骨髓制成细胞悬液, 传代 3 次后分为 6 组用于实验。空白诱导组仅加入等量成骨诱导培养基; 阳性对照诱导组加入等量成骨诱导培养基及雌二醇(10^{-8} mol/L); 各 PSP 诱导组: 加成骨诱导培养基和各自浓度的 PSP(200、300、400、500 mg/mL)。每天在倒置显微镜下观察各组细胞的生长情况及形态变化。倒置相差显微镜镜下观察细胞形态变化。在培养第 7 d、第 14 d 采用 ELISA 酶联免疫吸附法分别测量细胞 PINP 和 BMP-2 的表达量。实验结果显示小鼠骨髓间充质干细胞原代培养呈长梭形, 有接触抑制现象, 诱导后细胞呈三角形、多角形、不规则形状, 细胞生长密集时可重叠生长。各不同浓度 PSP 诱导组均比非诱导组高表达 PINP 和 BMP-2($P < 0.01$)。表明 PSP 呈剂量相关性促进体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化, 高浓度 PSP 可显著促进骨髓间充质干细胞骨向分化过程中 BMP-2 和 PINP 的表达。

关键词: 黄精多糖; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞分化; I 型前胶原 N 端前肽; 骨形态发生蛋白 2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

The Expression of BMP-2 and PINP in the Osteoblast Differentiation of Mouse Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Induced by Polygonatum Polysaccharide

ZENG Gao-feng^{1*}, ZONG Shao-hui², ZOU Bin³, LI Ke-ke³

¹College of Public Hygiene of Guangxi Medical University; ²Department of Osteopathia, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; ³The seven-year combined Bachelor's and Master's Degree Program of clinical medicine of Guangxi Medical University; ⁴Graduate School of Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 530021, P. R. China

Abstract: The objective of this study was to observe the effects of polygonatum polysaccharide on the osteogenic differentiation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs). One BALB/C male mouse aged 8 weeks was used for femoral and tibial marrow by sterile working. The third generation of the cells was divided in 6 groups for this experiment. The blank induced group was cultured in osteogenic medium (OM). The positive control induced group was cultured in OM with 10^{-8} mol/L of 17β -E2. The PSP200-, PSP300-, PSP400- and PSP500-induced groups were cultured in OM with 200, 300, 400 and 500 mg/mL of PSP, respectively. Inverted microscope was used to observe the proliferation and morphologic change of these cells every day. The expression dose of PINP and BMP-2 were separately detected by ELISA kit at the 7th day and at the 14th day. After induced, BMSCs were proliferated effectively, presented triangle, astero-form, polygon or irregular shape. Clumps and multilayer of cells became evident. Compared to the non-induced group, the cells of PSP induced groups had a high expression dose of PINP and BMP-2 ($P < 0.01$). This demonstrated that PSP

can promote the proliferation of BMSCs and it can enhance the expression of PINP and BMP-2, especially in a high concentration of PSP.

Key words: Polygonatum polysaccharide; bone marrow derived mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; PINP; BMP-2

收稿日期: 2013-11-14 接受日期: 2014-07-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360279)

* 通讯作者 Tel: 86-015289669819; E-mail: fengfeng_388@126.com

黄精多糖 (Polygonatum polysaccharide, PSP) 是黄精的主要活性成分之一,近年对黄精多糖研究表明,黄精多糖具有降低血脂、延缓衰老、抗病毒以及增强免疫功能等作用^[1]。目前对于 PSP 对小鼠骨髓间充质干细胞的作用研究尚缺乏。在前期研究中,我们发现 PSP 对骨质疏松性骨折大鼠具有降低 IL-1、IL-6 的表达活性,降低成骨细胞的凋亡,抑制破骨细胞的活性,促进骨折愈合的作用^[2,3]。同时在实验中观察到 PSP 对骨髓间充质干细胞的骨向分化具有促进作用。本研究探讨 PSP 促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化作用过程中 PINP 和 BMP-2 的影响,为 PSP 应用于临床骨质疏松症的治疗做一些探索性的工作。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及成骨诱导培养基配制

实验动物:6~8 周龄的 BALB/C 小鼠(雌雄均可,广西医科大学实验中心);98% 黄精多糖(中国科学院成都生物研究所);10% 胎牛血清、胰酶、IMDM 培养基(Hyclone, USA);碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BPG)ELISA 试剂盒(武汉华美);1% 青霉素、链霉素、地塞米松、雌二醇(E2)、 β -甘油磷酸钠、Percoll 细胞分离液、维生素 C 以及 IBMX(购自 Sigma 公司);酶标仪(广西医科大学实验中心提供)。成骨诱导培养基:含 10% 胎牛血清,10 mmol/L β -甘油磷酸钠,1% 青霉素、链霉素,50 μ mol/L 维生素 C,0.1 μ mol/L 地塞米松的 IMDM 培养基。

1.2 小鼠骨髓间充质干细胞的体外分离及原代、传代培养

用 75% 酒精浸泡用脱臼法处死的小鼠 5 min,无菌操作分离小鼠股骨和胫骨。注射器冲出骨髓后制成单细胞悬液(用针头吹打均匀);将单细胞悬液注入试管中(加有密度为 1.082 的 Percoll 细胞分离液,低温下以 500 \times g 离心 30 min,取中间层,用 PBS 冲洗;在含有 1% 青、链霉素,10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中接种(1.5×10^5 pcu² 的密度),置于恒温细胞培养箱中;1 d 后更换培养基,弃非贴壁细胞,之后每 3~4 d 换液 1 次;细胞生长基本融合后,用胰酶消化;以 1:2 传代继续培养,选取生长良好的第 3 代细胞进行实验。

1.3 PSP 对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响

取第 3 代小鼠骨髓间充质干细胞以 2.5×10^5 /

mL 接种于 24 孔板,先用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素的 IMDM 培养基培养 24 h,24 h 后分为非诱导组、空白诱导组、阳性对照诱导组和 PSP 诱导组。空白诱导组仅加入等量成骨诱导培养基;阳性对照诱导组加入等量成骨诱导培养基及雌二醇(10^{-8} mol/L);各 PSP 诱导组:加成骨诱导培养基和各自浓度的 PSP(200、300、400、500 mg/mL)。每组设 5 个复孔,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养。每隔 2 d 换液。

1.4 倒置显微镜观察细胞形态学变化

镜下观察各组细胞在非诱导和诱导过程中不同时期细胞的生长、形态的变化及其特点。

1.5 各组 PINP、BMP-2 表达的检测

分别于第 14 d 获取各组细胞培养上清液,于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。参照 PINP ELISA 试剂盒操作方法手册进行检测。

分别于第 14 d 获取各组细胞培养上清液,于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。参照 BMP-2 ELISA 试剂盒操作方法手册进行检测。

1.6 统计学分析

利用 SPSS17.0 软件进行统计处理,实验结果以 $\bar{X} \pm s$ 表示,采用 ANOVA 法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 小鼠骨髓间充质干细胞培养形态特点

原代细胞约 24 h 已部分贴壁,呈透亮圆形,每 2~3 d 换液,不断弃除非贴壁细胞,3~5 d 可见集落

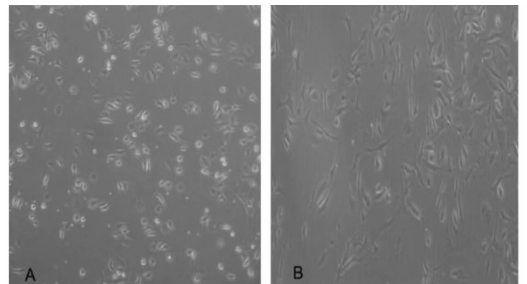


图 1 BMSCs 在 IMDM 中的形态学特征(200 \times)

Fig. 1 The morphological characteristics of BMSCs cultured in IMDM (200 \times)

(A) BMSCs 原代培养 2 d 后可见少许梭形细胞;(B) BMSCs 原代培养 10 d 后细胞呈不规则状且有细胞聚集

(A) Primary BMSCs after two days of culturing; few spindle shaped cells were observed;(B) Primary BMSCs after 10 days of culturing; cells were in irregular shape and cell colonies were observed.

形成,单核,核仁清晰,短梭形。约7~12 d贴壁的细胞继续伸展,逐渐形成形态较均一的长梭形细胞为主的集落并渐渐融合成片。传代细胞较原代细胞均一性好,呈均一的长梭形。小鼠骨髓间充质干细胞在原代及传代培养过程中,均以单层方式生长,均出现生长接触抑制。

2.2 PSP 干预小鼠骨髓间充质干细胞的形态学变化

非诱导组骨髓间充质干细胞仍保持均一的长梭形形态生长,当长满24板孔底时有生长抑制现象的产生,然后逐渐凋亡;各诱导组细胞开始时(1~2 d)生长稍减慢,后逐渐变为三角形、多角形、不规则形态,当生长近融合时,这部分细胞两端可以交叉重叠生长,其中以高浓度PSP组最为典型。

2.3 PSP 各组对 PINP 表达的影响

分别于第14 d获取各组细胞培养上清,比较PSP对小鼠BMSCs骨向分化中PINP表达的影响(表1)。比较各组的PINP表达量,方差齐性检验 $P=0.393$, $P>0.05$,总体方差齐相同。采用单因素方差分析,与空白诱导组相比,阳性对照诱导组、各PSP诱导组PINP值均明显升高,差异具有显著性($P<0.01$);与阳性对照诱导组相比,PSP 200诱导组、PSP 300诱导组、PSP 400诱导组下降,PSP 500诱导组PINP值升高,差异具有显著性($P<0.01$)。

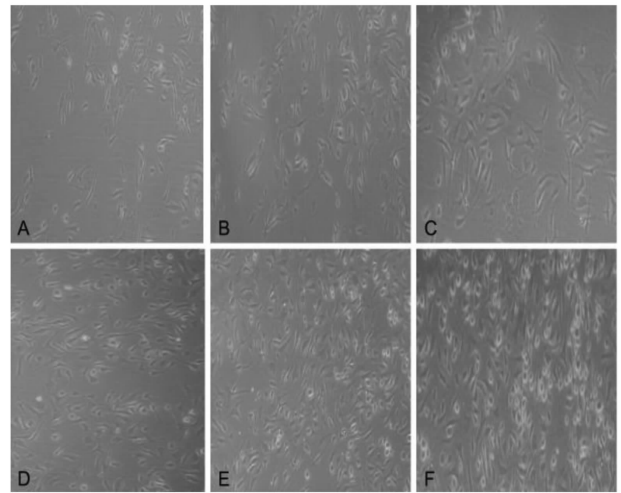


图2 空白诱导组(A)、阳性对照诱导组(B)、PSP200诱导组(C)、PSP300诱导组(D)、PSP400诱导组(E)、PSP500诱导组(F) BMSCs的形态学变化(细胞培养5 d后,200 \times)

Fig. 2 The morphological characteristics of BMSCs in blank induced group (A), positive control induced group (B), PSP 200 induced group (C), PSP 300 induced group (D), PSP 400 induced group (E), PSP 500 induced group (F) after five days of culturing (200 \times)

说明PSP可以促进PINP的分泌,且随着PSP浓度升高,PINP的表达呈上升趋势。

表1 PSP对小鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中PINP表达的影响

Table 1 Effects of PINP in the osteoblast differentiation of mouse BMSCs induced by PSP

组别 Group	时间 Time	n	PINP($\bar{X} \pm SD$, pg/mL)
空白诱导组 Blank induced group	14 d	7	20.73 \pm 0.18
阳性对照诱导组 Positive control induced group	14 d	8	33.56 \pm 0.06 ^a
PSP200组 PSP200 induced group	14 d	7	31.07 \pm 0.23 ^{ab}
PSP300组 PSP300 induced group	14 d	7	31.57 \pm 0.15 ^{ab}
PSP400组 PSP400 induced group	14 d	8	32.46 \pm 0.11 ^{ab}
PSP500组 PSP500 induced group	14 d	8	35.28 \pm 0.11 ^{ab}

注:a与空白诱导组比较, $P<0.01$;b与阳性对照诱导组比较, $P<0.01$ 。其中,n为各诱导组样本量。

Note:a. Compare with blank induced group, $P<0.01$;b. Compare with positive control induced group, $P<0.01$.

2.4 PSP 各组对小鼠 BMSCs BMP-2 表达的影响

分别于第14 d获取各组细胞培养上清,比较PSP对小鼠BMSCs骨向分化中BMP-2表达的影响(表2)。比较各组的BMP-2表达量,方差齐性检验 $P=0.067$, $P>0.05$,总体方差齐同。采用单因素方差分析,与空白对照诱导组比较,阳性对照诱导组、

PSP 200诱导组、PSP 300诱导组、PSP 400诱导组、PSP 500诱导组BMP-2值均升高,差异具有显著性($P<0.01$);与阳性对照组相比,PSP 200诱导组BMP-2下降,PSP 300诱导组、PSP 400诱导组、PSP 500诱导组BMP-2值均升高,差异具有显著性($P<0.01$)。说明PSP促进BMP-2的分泌,且随着PSP

浓度的升高,BMP-2 表达呈上升趋势。

表 2 PSP 对小鼠 BMSCs 骨向分化中 BMP-2 表达的影响

Table 2 Effects of BMP-2 in the osteoblast differentiation of mouse BMSCs induced by PSP

组别 Group	时间 Time	<i>n</i>	BMP-2 ($\bar{X} \pm SD$, pg/mL)
空白诱导组 Blank induced group	14d	7	30.64 ± 0.32
阳性对照诱导组 Positive control induced group	14d	8	34.56 ± 0.24 ^a
PSP200 组 PSP200 induced group	14d	7	33.51 ± 0.28 ^{ab}
PSP300 组 PSP300 induced group	14d	9	35.54 ± 0.88 ^{ab}
PSP400 组 PSP400 induced group	14d	8	40.49 ± 0.16 ^{ab}
PSP500 组 PSP500 induced group	14d	7	43.56 ± 0.20 ^{ab}

注: a 与空白诱导组比较, $P < 0.01$; b 与空白诱导组比较, $P < 0.01$ 。其中, *n* 为各诱导组样本量。

Note: a. Compare with blank induced group, $P < 0.01$; b. Compare with positive control induced group, $P < 0.01$.

3 讨论

黄精是我国传统名贵中药,味甘、性平,具有补气、润心肺、补肾益精、强劲骨、安五脏、止寒热、填精髓等功效^[4],而黄精多糖(PSP)则是黄精的提取物,是黄精的主要活性成分之一。据《本草纲目》记载:“黄精补诸虚,填精髓”,可“使五脏调和,肌肉充盈,骨髓坚强,其力倍增,多年不老,颜色鲜明,发白更黑,齿落更生”。《日子华本草》云黄精:“助筋骨”。《神仙芝草经》亦云黄精能使:“骨髓坚强,其力倍增”。说明黄精具有促进骨折愈合的作用。近年研究表明,黄精多糖具有降低血脂、延缓衰老、抗病毒以及增强免疫功能等作用^[1]。在前期对黄精多糖的研究中发现,黄精多糖具有促进小鼠骨髓基质细胞(BMSCs)生长及干预长春新碱对 BMSCs 增殖的抑制的作用^[5],表明黄精多糖具有促进骨髓间充质干细胞骨向分化的作用。本研究以骨髓间充质干细胞骨向诱导分化细胞模型为研究对象,采用不同浓度梯度的 PSP,探讨 PSP 对 BMSCs 骨向诱导分化效应的影响,结合实验结果发现 PINP、BMP-2 表达量的升高可能是 PSP 促进间充质干细胞骨向分化的作用的机制之一。

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种多能间充质干细胞,体外培养呈长梭形,单层贴壁生长,在一定条件下可以向成骨、成脂、成软骨分化,在含有 0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μmol/L 维生素 C 等诱导因子作用下可向成骨细胞分化^[6]。经骨向诱导后细胞逐渐变为三角形、多角形、不规则形态,当生长近融合时,细胞可以出现类似成骨细胞一样的重叠生长。BMSCs 向成骨分化

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,如早期出现的碱性磷酸酶、I 型胶原、成骨蛋白等及较晚出现的骨钙素、骨涎蛋白等^[7]。本实验可观察到诱导组中的细胞形态均有改变,在各诱导组中以 PSP500 组最为明显。

PINP 的水平是反映成骨细胞活性及 I 型胶原合成速率的特异指标,是 I 型胶原质沉积的特异性标志物,因此可定义为一个具有真正意义的骨形成标志物,临床用于骨质疏松的疗效观察和预后判断。PICP 或 PINP 在血清中的含量主要反映 I 型胶原合成速率及骨转换情况,升高提示 I 型胶原的合成速率加快,骨转换活跃。现已证实血清 PICP、PINP 水平与骨形成的组织计量学参数和钙动力学研究结果呈显著正相关^[8]。有研究显示,与 BGP 和 PICP 相比,PINP 是骨形成更为特异和敏感的指标,不受激素影响,对患者进行激素治疗不会影响血浆中 PINP 水平^[9,10]。

本实验显示,小鼠骨髓间充质干细胞经诱导后的中晚期,与空白诱导组相比,各 PSP 诱导组和阳性对照诱导组的 PINP 的表达均显著上升;与阳性对照诱导组相比,PSP500 组 PINP 的表达上升,其余 PSP 诱导组均低于阳性对照诱导组,但高于空白诱导组。说明 PSP 可以促进骨髓间充质干细胞骨向诱导分化过程中 PINP 的分泌,且随着剂量的增加,该促进作用增强。在成骨细胞基质成熟阶段,PINP 是沉集于基质之前所释放出的物质,也是成骨细胞在 I 型胶原合成增殖期从未成熟胶原释放的。当成骨细胞活性增强时,前胶原合成增多,PINP 浓度随即增高。说明 PSP 能促进骨髓间充质干细胞骨向诱导分化中成骨细胞的活性。

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs) BMPs 是一族独特的结构和功能相似的小分子量糖蛋白,属于转化生长因子超家族成员(BMP-1除外)^[11]。因此在骨组织中,BMPs的作用主要是诱导未分化的间质细胞向骨细胞和软骨细胞分化,诱导新骨加速形成,促进骨损伤的修复。

本实验中,骨髓间充质干细胞经 PSP 诱导后晚期,与空白诱导组相比,各 PSP 诱导组和阳性对照诱导组 PINP 的表达量均显著上升;与阳性对照组相比,PSP300 诱导组、PSP400 诱导组、PSP500 诱导组 BMP-2 的表达均上升,PSP200 诱导组低于阳性对照诱导组,但高于空白诱导组。说明随着 PSP 浓度的升高,其促进骨髓间充质干细胞骨向分化中 BMP-2 的表达的作用越显著。

本实验发现,高浓度 PSP 诱导组在骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化过程中对 PINP 和 BMP-2 的表达呈现类似同步的促进作用,说明 PSP 从多方面促进 BMSCs 骨向分化,高浓度 PSP 对两者的影响都较高。

综上所述:黄精多糖促进小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化过程中 I 型前胶原 N 端前肽和骨形态发生蛋白 2 的表达,高浓度黄精多糖促进作用显著。促进 PINP、BMP-2 的表达量可能是黄精多糖促进间充质干细胞骨向分化的作用机制之一,确切的机制尚需深入研究。

参考文献

- 1 Baber RJ, O Hara JL, Boyle FM. Hormone replacement therapy: to use or not to use? *Med J Australia*, 2003, 178: 630-633.
- 2 Zeng GF(曾高峰), Zhang ZY(张志勇), Lu L(鲁力), et al. Effects of polygonatum polysaccharide on the expression of interleukin-1 and 6 in rats with osteoporotic fracture. *Chin J Tiss Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16: 220-222.

- 3 Zeng GF(曾高峰), Zhang ZY(张志勇), Lu L(鲁力), et al. Effect and mechanism of polysaccharide intervention in a rat model of osteoporosis. *Chin J Tiss Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16: 9471-9478.
- 4 Fan QS(范青生). *Baojian Shipin Yuanli Yu Yiju* (保健食品配方原理与依据). Beijing: China Medical Science Press, 2007. 224-225.
- 5 Wen S(文珠), Hu GZ(胡国柱), Yu H(俞火), et al. Study the intervention of polygonatum sibiricum polysaccharides on proliferation of bone marrow stromal cells inhibited by VCR. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2011, 26: 1630-1632.
- 6 Xu CF(徐成峰), Hu DH(胡大海), Zhao ZT(赵周婷), et al. Isolation, culture and multiple differentiations of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Chin J Tiss Eng Res* (中国组织工程研究), 2010, 14: 1002-1005.
- 7 Yuan ZH(袁绍辉), Shang J(尚剑), Shao GJ(邵国军), et al. Construction of BMP_{4/7} fusion gene adeno-associated virus and biological effects of transfection on bone marrow stromal cells in rabbits. *Orthopedic J China* (中国矫形外科杂志), 2008, 20: 1568-1572.
- 8 Liu J(刘洁), Li W(李伟), Dong MG(董明纲). Progress of new biochemical markers of bone turnover. *Clin Med J China* (中国临床医学), 2006, 13: 102-104.
- 9 Hernandez MV, Goanabens N, Alvarez L, et al. Immunocytochemical evidence on the effects of glucocorticoids on type I collagensynthesis in human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74: 284-293.
- 10 Zhang J(张瑾), Deng JL(邓敬兰), Ouyang QH(欧阳巧洪), et al. A comparative study of bone mineral density and bone metabolic markers in primary osteoporosis. *Chin J Osteopor* (中国骨质疏松杂志), 2005, 11: 319-324.
- 11 Halleen JM. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res*, 2003, 23: 1027-1029.