

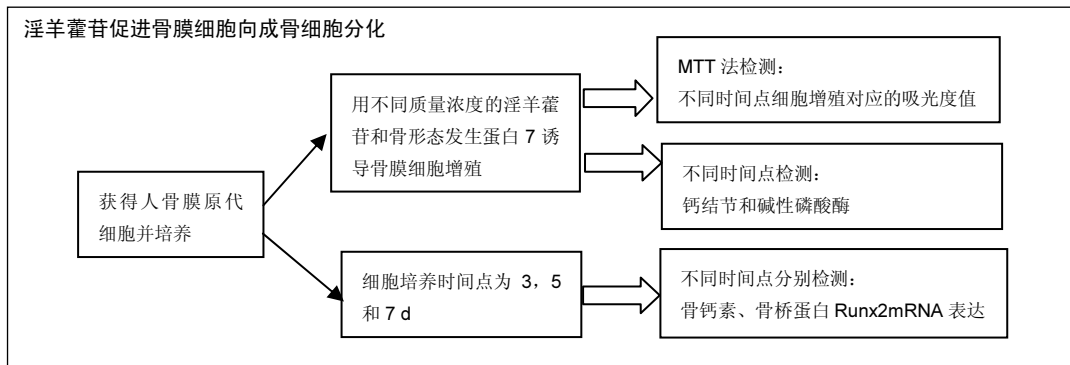
淫羊藿苷体外诱导骨膜细胞增殖及分化

钟秀霞, 罗美兰(深圳龙华人民医院, 广东省深圳市 518109)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0132

ORCID: 0000-0001-7928-1017(钟秀霞)

文章快速阅读:



钟秀霞, 女, 1986 年生, 广东省五华县人, 汉族, 2015 年广州中医药大学毕业, 药师, 主要从事药剂研究。

通讯作者: 罗美兰, 护师, 深圳龙华人民医院, 广东省深圳市 518109

中图分类号:R318
文献标识码:A
稿件接受: 2017-10-14

文题释义:

淫羊藿苷: 主要提取自淫羊藿属植物, 相对分子质量为 676.65, 属黄酮类化合物, 是植物类雌激素中的一种, 目前研究认为有减缓肾衰竭、活血化瘀、调节免疫代谢、抗肿瘤等作用。

MTT 法: 是目前被大量使用的检测细胞活性数量的方法, 主要用于检测活性的细胞数量, 其原理是活细胞内含有琥珀酸脱氢酶, 而坏死细胞则不含此类酶, MTT 可作用于琥珀酸脱氢酶并形成结晶, 结晶的数量可反映细胞的数量。MTT 法有经济、准确和快速的特点, 被广泛用于细胞实验中。

摘要

背景: 淫羊藿苷用于促进细胞增殖有广阔的运用前景。骨膜细胞有特定的分化方向不确定性, 同时也容易被诱导增殖, 常见的诱导物质包括超声、氧等物理方法或者骨形态发生蛋白 7 等诱导因子, 目前骨组织工程的研究已经有骨膜细胞运用的相关报道。但是淫羊藿苷诱导骨膜细胞增殖相关的报道少见, 淫羊藿苷诱导骨膜细胞后的分化方向目前尚未明确。

目的: 探讨淫羊藿苷对人骨膜细胞增殖及分化的影响, 为淫羊藿苷运用于骨组织工程提供理论依据。

方法: 手术获得人骨膜, 体外分离获得原代细胞, 培养扩增后, 种植培养骨膜细胞于 24 孔板中。分别用 0.001, 0.01 及 0.1 mg/L 的淫羊藿苷及 50 μg/L 的骨形态发生蛋白 7 诱导骨膜细胞增殖, MTT 法检测各组骨膜细胞的吸光度值。于 1, 3, 5 和 7 d 检测骨膜细胞碱性磷酸酶和钙结节的数量表达情况, RT-PCR 法检测骨钙素、骨桥蛋白和 Runx2 的 mRNA 含量。

结果与结论: ①骨膜细胞在加入淫羊藿苷后增殖良好, 不同质量浓度的淫羊藿苷组及阳性对照组均有促进骨膜细胞增殖的作用($P < 0.05$); ②加入了淫羊藿苷的骨膜细胞与对照组相比能产生更多的碱性磷酸酶和钙结节($P < 0.05$); ③0.1 mg/L 的淫羊藿苷显著上调骨钙素、骨桥蛋白和 Runx2 mRNA 的表达($P < 0.01$); ④结果表明, 淫羊藿苷有促进骨膜细胞增殖和分化为成骨细胞的作用, 可作为诱导剂用于骨组织工程中种子细胞的制备。

关键词:

淫羊藿苷; 骨形态发生蛋白 7; 骨膜细胞; 细胞增殖; 成骨分化; 碱性磷酸酶; 钙结节; 骨钙素; 骨桥蛋白; Runx2; MTT 法

主题词:

植物雌激素类; 骨生成; 碱性磷酸酶; 组织工程

基金资助:

江西省科技计划项目(20161BBG02315)

Proliferation and differentiation of periosteum cells induced by icariin

Zhong Xiu-xia, Luo Mei-lan (the People's Hospital of Longhua of Shenzhen, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Icariin has a broad prospect for promoting cell proliferation. Differentiation direction of periosteal cells is uncertain, but the cells are easy to be induced by ultrasound, oxygen or bone morphogenetic protein 7 (BMP7). Periosteal cells have been applied in bone tissue engineering; however, icariin effects on the proliferation and differentiation of periosteal cells is little reported.

Zhong Xiu-xia, Pharmacist, the People's Hospital of Longhua of Shenzhen, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China

Corresponding author: Luo Mei-lan, Nurse, the People's Hospital of Longhua of Shenzhen, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China



OBJECTIVE: To investigate the effect of icariin on the proliferation and differentiation of human periosteal cells, thus providing theoretical basis for icariin applied in bone tissue engineering.

METHODS: The human periosteum was obtained and the primary cells were isolated *in vitro*. After culture and expansion, periosteal cells were cultured in 24-well plates, and induced by 0.001, 0.01 and 0.1 mg/L icariin and 50 μ g/L BMP7, respectively. The corresponding absorbance values of different groups were detected. The levels of alkaline phosphatase and calcium nodules in periosteal cells were measured at 1, 3, 5 and 7 days, and the mRNA levels of osteocalcin, osteopontin and Runx2 were detected at 3, 5 and 7 days.

RESULTS AND CONCLUSION: The periosteal cells proliferated well after induction with icariin, and could proliferate well in different concentrations of icariin and the positive control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the periosteal cells induced by icariin were able to produce more alkaline phosphatase and calcium nodules ($P < 0.05$). The mRNA expression of osteocalcin, osteopontin and Runx2 in periosteal cells could be up-regulated by icariin ($P < 0.05$). These findings imply that icariin can promote proliferation and differentiate of periosteal cells into osteoblasts, and it can be used as an inducer for the preparation of seed cells in bone tissue engineering.

Subject headings: Phytoestrogens; Osteogenesis; Alkaline Phosphatase; Tissue Engineering

Funding: the Science and Technology Program of Jiangxi Province, No. 20161BBG02315

0 引言 Introduction

作为传统中药淫羊藿中的主要成分, 淫羊藿苷有增强调节机体免疫能力、抗肿瘤、调节内分泌、抗骨质疏松和护心活血等药效^[1-4]。有学者通过体外细胞培养, 发现淫羊藿苷能促进人脐静脉血管内皮细胞增殖并能进一步促进其血管的形成^[5]。也有研究通过鸡胚绒毛尿囊膜实验, 发现淫羊藿苷可抑制人脐静脉内皮细胞的增殖, 说明淫羊藿苷在不同的条件下, 对血管内皮细胞的增殖呈现双向作用^[6]; 有学者发现淫羊藿苷联合黄芩苷能抑制肝癌细胞表达血管内皮生长因子, 进而抑制内皮细胞的增殖^[7]。Wang等^[8]通过MTT, ELISA法发现淫羊藿苷可促进骨髓干细胞增殖, 其增殖过程会大量释放成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子。Chi等^[9]通过构建动物体外骨片模型, 发现淫羊藿苷能抑制破骨细胞对骨片的吸收、说明其有抑制破骨细胞分解吸收骨质的功能。有学者通过体外细胞实验、MTT法等实验证实淫羊藿苷具有促进骨髓基质细胞分化为成骨细胞的作用^[10], 但关于其在体外对细胞的诱导作用仅见少量报道。

当前研究拟探讨淫羊藿苷诱导骨膜细胞增殖和定向分化的作用, 并研究其最佳浓度和条件, 旨在探讨淫羊藿苷运用于体外细胞培养体系中的可能性, 为其作为诱导剂定向诱导骨膜细胞成骨分化奠定基础, 为组织工程诱导剂的选择开拓新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学对比观察实验。

1.2 时间及地点 于2017年1月至7月在广州中医药大学基础实验室完成。

1.3 材料 淫羊藿苷(上海纯优生物科技有限公司); DMEM-F12培养基(Gibco, 美国); 骨形态发生蛋白7(天津赛尔生物技术有限公司); 胰蛋白酶(Sigma, 美国); 倒置相差显微镜(Olympus, 日本); β -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸(Sigma, 美国); 胎牛血清(维森特生物技术(中国)有限公司); 二氧化碳恒温培养箱(Thermo, 美国); 超净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司); 碱性磷酸酶试剂盒(上海麦约尔生物技术有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma, 美国); 自动酶标分析仪(上海永创医疗器械

有限公司); Trizol、胶回收试剂盒、反转录试剂盒(上海钰森生物技术有限公司); RT-PCR试剂盒(上海钰森生物技术有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 人原代骨膜细胞培养^[11] 选取1名20岁健康男性志愿者, 术前签署知情同意书并已经通过伦理委员会批准。常规消毒、铺巾, 于手术中, 无菌操作下切取人锁骨表面约2 cm \times 2 cm的骨膜, 仔细剔除表面软组织, 切除表面结缔组织及附着的纤维组织, 之后即置于DMEM-F12的培养液中, 30 min内送入实验室, 先用Hanks液洗涤, 剪成3-5 mm的碎块, 骨膜碎块置入培养瓶后加入DMEM-F12培养液、0.125%胰蛋白酶、双抗(青霉素和链霉素)。在37 $^{\circ}$ C, 体积分数0.05%CO₂的细胞培养箱中培养, 隔天换液1次, 换液时把表面悬浮碎块丢弃。1周后骨膜细胞已经覆盖细胞培养瓶底, 用胰蛋白酶消化后并传代培养, 每次培养3 d, 取第3代细胞冻存, 复苏后用于以下实验。

1.4.2 淫羊藿苷对骨膜细胞增殖的影响(MTT法) 将第3代骨膜细胞接种于24孔板中, 1 \times 10⁴/孔。实验分为3组, 实验组分别加入不同质量浓度(0.1, 0.01和0.001 mg/L)的淫羊藿苷, 对照组加入等体积的生理盐水, 阳性对照组加入50 μ g/L骨形态发生蛋白7, 每组均设3个复孔。分别在细胞培养1, 3, 5和7 d检测细胞增殖情况, 检测前4 h在每孔加入20 μ L 5 g/L的MTT, 弃上清后加入150 μ L二甲亚砜, 微孔板振荡器上振荡10 min, 酶标仪检测各孔吸光度值($\lambda=490$ nm), 测3次, 取平均值。通过吸光度值反映细胞增殖情况, 得出淫羊藿苷最佳浓度。

1.4.3 淫羊藿苷诱导骨膜细胞碱性磷酸酶和钙结节的表达 将第3代骨膜细胞接种于24孔板中, 1 \times 10⁴/孔。实验分组同前, 但在淫羊藿苷组只加入质量浓度为0.1 mg/L淫羊藿苷。实验中用碱性磷酸酶试剂盒检测骨膜细胞在第1, 3, 5及7天的碱性磷酸酶的表达, 用Von Kossa染色法检查骨膜细胞钙结节的数量。每组均检测3次, 取平均值。

1.4.4 淫羊藿苷诱导骨膜细胞成骨相应基因的表达 取培养的第3代骨膜细胞, 按照1 \times 10⁷ L⁻¹的细胞浓度接种于12孔板中后, 随机分成实验组和对照组, 实验组各孔分别加入10⁻¹ mg/L的淫羊藿苷, 对照组加入等体积细胞培养液, 然后于第3, 5和7天收集细胞, 检测骨钙素、骨桥蛋白和

Runx2 mRNA的含量。每组均重复检测3次。吸去细胞培养板中的培养液后,用PBS洗涤2次,Trizol法分别裂解细胞并提取实验组和对照组细胞总RNA。Trizol溶解细胞后,加入300 μL氯仿于裂解液中,处理5 min后,调整离心机速度10 000 r/min离心15 min。离心后弃上清液并加异丙醇后再次离心,离心后再次弃上清液并用体积分数75%乙醇再次洗涤,后再次同转速离心5 min并弃上清液。加入40 μL ddH₂O溶解沉淀,低温保存备用。按照反转录试剂盒说明合成cDNA,低温保存备用。建立PCR反应体系后,扩增目的基因,采用Delta-delta Ct法计算目的基因表达情况,引物(苏州泓迅生物科技有限公司设计)如下。

PCR引物序列	
基因与引物名称	引物序列(5'to3')
β-actin F1	TTC TAC AAT GAG CTG CGT CTG GC
β-actin R1	CTC ATA GCT CTT CTG CAG GGA GGA
Runx2 F1	GTG GAA ACC TGA TCT ATG CTT G
Runx2 R1	ATG ACT TCT GCG TCT GCG TCT GGT GAT A
骨桥蛋白 F1	ACA CCG TGT GAG CAA AGC
骨桥蛋白 R1	TGC CTA TAG GAT CTG GGT GC
骨钙素 F1	TCA CAC AGG ACC TGA TGA CC
骨钙素 R1	CCA CAA TGA TCA AGT GGC TG

1.5 主要观察指标 ①淫羊藿苷和骨形态发生蛋白7诱导下骨膜细胞不同时间点的吸光度值;②淫羊藿苷和骨形态发生蛋白7诱导下细胞不同时间点钙结节和碱性磷酸酶的表达情况;③淫羊藿苷诱导下骨膜细胞骨钙素、骨桥蛋白和RUNX2的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件包进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同组之间的比较用方差分析,组和组间比较用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 MTT法检测淫羊藿苷对骨膜细胞的增殖作用 不同质量浓度的淫羊藿苷与对照组相比均有促进骨膜细胞增殖的作用,其促进细胞增殖的活性在第1, 3, 5和第7天均存在。与阳性对照组骨形态发生蛋白7相比,其促进细胞增殖作用无差别($P > 0.05$);不同时间点,淫羊藿苷组间对比,显示 10^{-1} mg/L有最大的促进作用($P < 0.05$)(表1, 图1)。

2.2 淫羊藿苷诱导骨膜细胞碱性磷酸酶和钙结节的表达 使用0.1 mg/L的淫羊藿苷在第1, 3, 5, 7天能有效诱导骨膜细胞碱性磷酸酶的表达和钙结节的形成。其碱性磷酸酶和钙结节的表达量与骨形态发生蛋白7组相比无明显差异,但各时间点相应表达量均比对照组高(图2-5)。

2.3 淫羊藿苷诱导骨膜细胞成骨特异基因的表达 淫羊藿苷诱导骨膜细胞增殖和分化相应基因表达情况如表2, 图6-8显示,淫羊藿苷组与对照组相比,其第3, 5和第7天骨

表1 淫羊藿苷促进骨膜细胞增殖的吸光度值 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 1 Absorbance values of the periosteal cells induced by icariin

时间	10^1 mg/L 组	10^2 mg/L 组	10^3 mg/L 组	对照组	骨形态发生蛋白7组
1 d	0.34±0.04 ^{abc}	0.22±0.06 ^{bc}	0.14±0.02 ^c	0.06±0.02	0.34±0.03 ^{abc}
3 d	0.45±0.02 ^{abc}	0.35±0.04 ^{bc}	0.18±0.05 ^c	0.16±0.06	0.46±0.05 ^{abc}
5 d	0.75±0.04 ^{abc}	0.55±0.06 ^{bc}	0.26±0.06 ^c	0.20±0.05	0.76±0.05 ^{abc}
7 d	0.95±0.02	0.65±0.05	0.33±0.06 ^c	0.31±0.04	0.98±0.10 ^{abc}

表注:与 10^2 mg/L组相比,^a $P < 0.05$;与 10^3 mg/L组相比,^b $P < 0.05$;与对照组相比,^c $P < 0.05$ 。

膜细胞中的Runx2、骨钙素、骨桥蛋白的mRNA的表达量均更高($P < 0.01$)。说明淫羊藿苷能促进骨膜细胞向成骨方向分化。

3 讨论 Discussion

骨组织工程基本的要素之一是种子细胞,目前常用的种子细胞有骨膜细胞、骨祖细胞、成骨细胞、骨髓基质细胞和干细胞^[12-13]。骨膜细胞是位于骨表面的细胞,内有成骨细胞和软骨细胞的前体细胞,在特定的诱导情况下,有潜在的分化增殖能力,且其潜在分化能力和年龄没有关系^[14-15]。鉴于其解剖特性,目前越来越多的学者选择骨膜细胞用于骨组织工程中。可以说,骨表面的骨膜细胞是成骨细胞和软骨细胞的前体库和源头,骨膜产生新骨的特性在哺乳动物不同阶段并不一致,早期伴随骨骼的快速生长而参与其中,晚期骨膜细胞并不活跃,仅仅参与骨骼损伤后的修复^[16-18]。骨膜细胞特定条件下诱导的分化方向不同,一般可向成骨及软骨方向分化,有学者证实其诱导骨髓基质干细胞定向分化的作用^[19-20]。当前实验通过构建体外细胞培养体系,MTT检测骨膜细胞增殖,系统研究淫羊藿苷诱导骨膜骨膜细胞分化。发现骨膜细胞表达的骨钙素、骨桥蛋白和Runx2的mRNA均比对照组高,说明淫羊藿苷能有效的诱导骨膜细胞增殖分化为成骨细胞。同时发现相应成骨特异mRNA的表达量和阳性对照组骨形态发生蛋白7组无明显差别,说明0.1 mg/L淫羊藿苷对骨膜细胞的诱导效应和骨形态发生蛋白7相当。骨形态发生蛋白7作为骨形态发生蛋白家族的重要成员,已经被证实有明显的诱导骨膜细胞成骨作用^[21]。选用骨形态发生蛋白7作为阳性对照组能进一步说明淫羊藿苷对骨膜细胞的诱导分化作用。

淫羊藿苷对细胞的刺激和诱导作用被广泛证实,有学者证实骨髓基质干细胞可被淫羊藿苷诱导增殖分化成骨细胞或脂肪细胞^[22-24];淫羊藿苷能促进脂肪干细胞向成骨方向分化,也具有抑制破骨细胞活力,减弱其分化扩增作用^[25]。目前淫羊藿苷诱导骨膜细胞分化尚无相关报道,课题组建立体外培养细胞体系,通过检测成骨特异因子论证淫羊藿苷对骨膜细胞的调控成骨作用,为骨组织工程提供了一种新的种子细胞和诱导剂的选择方向。

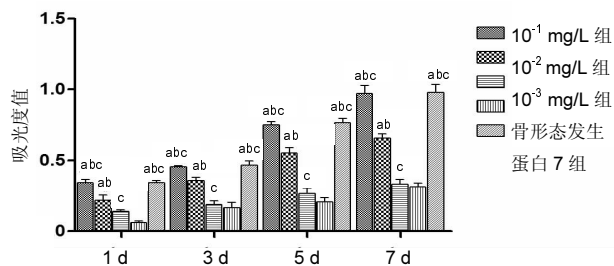


图 1 不同组骨膜细胞吸光度值

Figure 1 Absorbance values of the periosteal cells in different groups
 图注: 不同质量浓度的淫羊藿苷、骨形态发生蛋白 7 与对照组相比均有促进骨膜细胞增殖的作用, 不同质量浓度的淫羊藿苷之间对比, 10^{-1} mg/L 淫羊藿苷对骨膜细胞有最大的促增殖作用。与 10^{-2} mg/L 组比, $^aP < 0.05$; 与 10^{-3} mg/L 组比, $^bP < 0.05$; 与对照组比, $^cP < 0.05$ 。

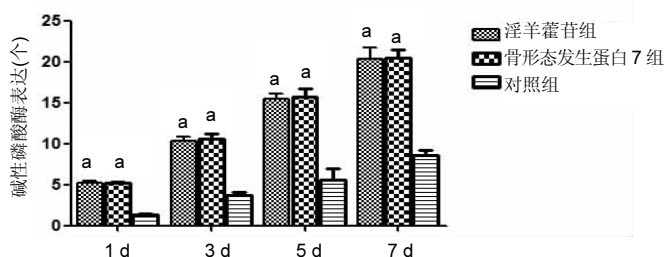


图 3 不同组碱性磷酸酶表达量

Figure 3 Expression levels of alkaline phosphatase in different groups

图注: 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 在不同时间点均有促进骨膜细胞碱性磷酸酶表达的作用, 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 对骨膜细胞碱性磷酸酶的表达无明显差别。与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

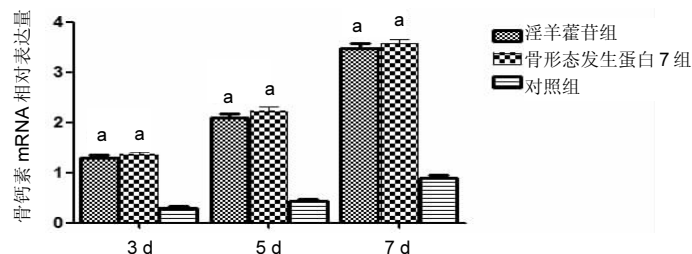


图 6 不同组骨钙素 mRNA 的相对表达情况

Figure 6 Relative mRNA expression level of osteocalcin in different groups

图注: 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 在不同时间均能上调骨膜细胞的骨钙素 mRNA 表达; 淫羊藿苷对膜细胞的骨钙素 mRNA 表达的上调作用和骨形态发生蛋白 7 相比无显著差异。与对照组比, $^aP < 0.01$ 。

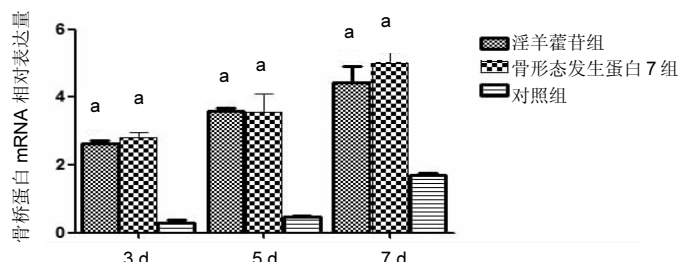


图 7 不同组骨桥蛋白 mRNA 相对表达情况

Figure 7 Relative mRNA expression level of osteopontin in different groups

图注: 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 在不同时间均能上调骨膜细胞的骨桥蛋白 mRNA 表达; 淫羊藿苷对膜细胞的骨桥蛋白 mRNA 表达的上调作用和骨形态发生蛋白 7 相比无显著差异。与对照组比, $^aP < 0.01$ 。

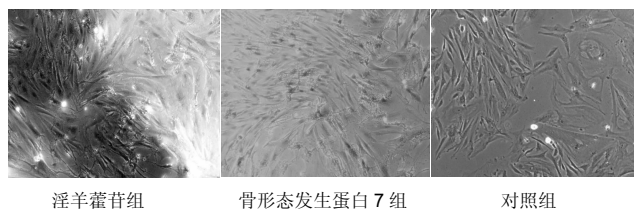


图 2 不同组第 7 天碱性磷酸酶染色的情况($\times 40$)

Figure 2 Staining of alkaline phosphatase in each group on day 7($\times 40$)

图注: 第 7 天淫羊藿苷组和骨形态发生蛋白 7 组和对照组相比碱性磷酸酶染色阳性数明显更多。

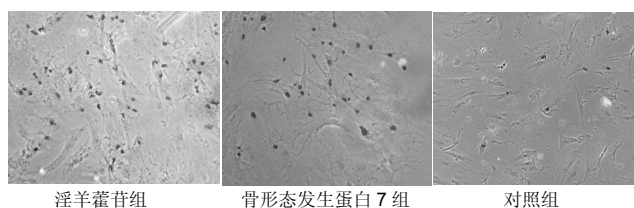


图 4 不同组第 7 天钙结节染色的情况($\times 40$)

Figure 4 Staining results of calcium nodules in each group on day 7 ($\times 40$)

图注: 第 7 天淫羊藿苷组和骨形态发生蛋白 7 组和对照组对比均可见较多的棕黑色钙结节染色颗粒。

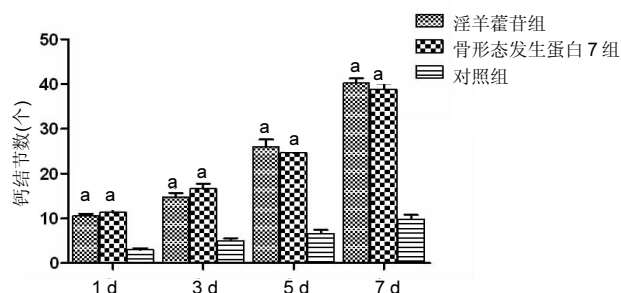


图 5 不同组钙结节的表达情况

Figure 5 Number of calcium nodules in different groups

图注: 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 在不同时间点均能增加骨膜细胞钙结节数量, 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 组的钙结节数量无明显差别。与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

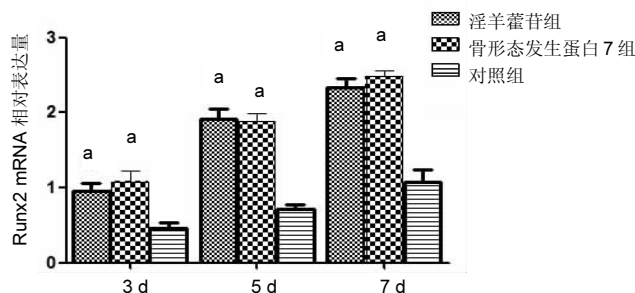


图 8 不同组 Runx2 mRNA 相对表达情况

Figure 8 Relative mRNA expression level of Runx2 in different groups

图注: 淫羊藿苷和骨形态发生蛋白 7 在不同时间均能上调骨膜细胞的 Runx2 mRNA 表达; 淫羊藿苷对膜细胞的 Runx2 mRNA 表达的上调作用和骨形态发生蛋白 7 相比无显著差异。与对照组比, $^aP < 0.01$ 。

表 2 不同组骨钙素、骨桥蛋白和 Runx2 的 mRNA 表达量

($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 2 mRNA expression levels of osteocalcin, osteopontin and Runx2 in different groups

组别	第 3 天			第 5 天			第 7 天		
	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2
淫羊藿苷组	1.29±0.12 ^a	1.29±0.12 ^a	0.96±0.21 ^a	2.09±0.17 ^a	2.09±0.17 ^a	1.92±0.27 ^a	3.48±1.86 ^a	3.48±0.19 ^a	2.33±0.25 ^a
骨形态发生蛋白 7 组	1.36±0.087 ^a	1.36±0.08 ^a	1.08±0.28 ^a	2.22±0.16 ^a	2.12±0.17 ^a	1.89±0.20 ^a	3.57±0.15 ^a	3.58±0.16 ^a	2.48±0.16 ^a
对照组	0.29±0.98	0.29±0.098	0.46±0.13	0.43±0.064	0.43±0.06	0.71±0.14	0.89±0.11	0.89±0.11	1.07±0.34
F 值	130.77	157.15	8.61	254.43	32.02	65.91	380.54	26.41	34.67
P 值	< 0.01	< 0.01	0.008	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

为验证淫羊藿苷对骨膜细胞的具体分化方向, 实验检测了不同时间点碱性磷酸酶和钙结节的表达, 二者均可作为成骨特异性检测标准^[26-27]。结果发现淫羊藿苷能促进骨膜细胞分泌和表达碱性磷酸酶和钙结节, 且其表达量和骨形态发生蛋白 7 对比无显著差异, 说明淫羊藿苷促进成骨标志物分泌的效应和阳性对照物骨形态发生蛋白 7 类似。实验还进一步检测了相应的成骨特异基因, 钙结节、碱性磷酸酶、骨钙素、Runx2 等。Runx2 是成骨细胞增殖分化的特异调控因子, 同时也对破骨细胞有重要作用, 是维持骨动态平衡和代谢重要的转录因子。Runx2 可通过调控细胞内外特异蛋白转录参与细胞增殖分化, 对骨的形成有正向促进作用^[28-30]。骨细胞增殖、矿化和代谢必须的酶是碱性磷酸酶, 是成骨细胞的标志性酶, 其含量的高低和细胞分化的成熟度密切相关, 同时其活性也反映成熟骨细胞的比例和数量, 并可代表细胞矿化的潜力, 碱性磷酸酶高说明成骨细胞数量多, 前体细胞数量相对少, 说明成骨分化更成熟^[31-32]。但是碱性磷酸酶在人体多个器官中均有表达, 也要注意其广泛性。有研究证实淫羊藿苷能促进碱性磷酸酶分泌, 并进一步促进成骨细胞增殖实验选用成骨检测的标志基因是 Runx2、骨钙素和骨桥蛋白, 均是直接参与到骨细胞矿化过程中的重要因子, 可综合多方面论证骨膜细胞被淫羊藿苷诱导成骨的特性^[33]。实验结果发现淫羊藿苷能在第 3, 5 和 7 天明显促进骨膜细胞分泌骨钙素、Runx2 和骨桥蛋白 mRNA, 说明淫羊藿苷明显促进了骨膜细胞成骨方向的分化。结合阳性对照物骨形态发生蛋白 7 的促进成骨分化作用, 进一步论证了淫羊藿苷有促进骨膜细胞成骨性分化的效果。

综上所述, 实验用植物雌激素淫羊藿苷作为组织工程的诱导剂并探讨其分化方向, 经过研究发现淫羊藿苷能促进骨膜细胞向成骨方向分化, 且其诱导分化能力和骨形态发生蛋白 7 无明显差异。因此淫羊藿苷可作为组织工程的待选诱导剂。MTT、荧光定量 PCR 等方法证实了淫羊藿苷的促细胞相关作用, 为骨组织工程选用良好有效的诱导剂奠定了理论基础。此外, 此次实验选用的骨膜细胞因其容易培养及取材等生物学特点, 可作为首选的骨组织工程种子细胞。

作者贡献: 课题设计, 实验操作, 实验结果分析和成文为第一作者, 通讯作者进行审校。

经费支持: 该文章接受了“江西省科技计划项目(20161BBG02315)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了淫羊藿苷药物, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究对象采用来自人体的组织, 符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 尤志强, 林松青, 王彬, 等. 淫羊藿苷抗骨质疏松症相关信号通路机制的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 190-193.
- [2] 马婷, 王丽娜, 李子坚, 等. 淫羊藿苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(9): 1505-1508.
- [3] Wang PZ, Zhang FJ, He QL, et al. Flavonoid Compound Icarin Activates Hypoxia Inducible Factor-1 α in Chondrocytes and Promotes Articular Cartilage Repair. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148372.
- [4] Wang QS, Zhang XC, Li RX, et al. A comparative study of mechanical strain, icariin and combination stimulations on improving osteoinductive potential via NF- κ B activation in osteoblast-like cells. *Biomed Eng Online*. 2015; 14: 46.
- [5] 赵曙炎, 马泽云. 淫羊藿苷及其代谢产物脱水淫羊藿素促血管内皮细胞增殖的初步机制研究[J]. 黑龙江医学, 2015, 3: 313-315.
- [6] 叶玉荷, 胡芳华, 邹佳萍, 等. 淫羊藿苷在体内对外对血管生成的抑制作用[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(3): 264-268.
- [7] 唐菁, 张玲, 李翠玲, 等. 淫羊藿苷与黄芩苷联合多柔比星对肝癌细胞 APRIL 表达和血管内皮细胞生长抑制的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(20): 1534-1537.

- [8] Wang JH, Tao YX, Ping ZC, et al. Icariin attenuates titanium-particle inhibition of bone formation by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in vivo and in vitro. *Sci Rep*. 2016; 6: 23827.
- [9] Chi LQ, Gao WY, Shu XR, et al. A Natural Flavonoid Glucoside, Icariin, Regulates Th17 and Alleviates Rheumatoid Arthritis in a Murine Model. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: 392062.
- [10] Mok SK, Chen WF, Lai WP, et al. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(4): 939-949.
- [11] Liu TL, Zhang X, Luo Y, et al. Slowly Delivered Icariin/Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Promote the Healing of Calvarial Critical-Size Bone Defects. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 1416047.
- [12] Liu M, Zeng X, Ma C, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*. 2017; 5: 17014.
- [13] Velasco MA, Narváez-Tovar CA, arzón-Alvarado DA. Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 729076.
- [14] Kim YK, Nakata H, Yamamoto M, et al. Osteogenic Potential of Mouse Periosteum-Derived Cells Sorted for CD90 In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5(2): 227-234.
- [15] Chung JE, Park JN, Yun JW, et al. Cultured Human Periosteum-Derived Cells Can Differentiate into Osteoblasts in a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-Mediated Fashion via Bone Morphogenetic Protein signaling. *Int J Med Sci*. 2016; 13(11): 806-818.
- [16] Sung IY, Park BC, Hah YC, et al. FOXO1 Is Involved in the Effects of Cigarette Smoke Extract on Osteoblastic Differentiation of Cultured Human Periosteum-derived Cells. *Int J Med Sci*. 2015; 12(11): 881-890.
- [17] Filion TM, Skelly JD, Huang M, et al. Impaired osteogenesis of T1DM bone marrow-derived stromal cells and periosteum-derived cells and their differential in-vitro responses to growth factor rescue. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8: 65.
- [18] Thitiset T, Damrongsakkul S, Bunaprasert T, et al. Development of Collagen/Demineralized Bone Powder Scaffolds and Periosteum-Derived Cells for Bone Tissue Engineering Application. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(1): 2056-2071.
- [19] 鲍远, 黄俊明, 靖兴志, 等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3501-3507.
- [20] 杨志烈, 王成龙, 赵东峰, 等. 淫羊藿苷对环磷酰胺化疗导致小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化障碍的保护作用[J]. 中国组织工程研
- 究, 2016, 20(6): 777-784.
- [21] Bei K, Du Z, Xiong Y. BMP7 can promote osteogenic differentiation of human periosteal cells in vitro. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(9): 8845-8851.
- [22] Wu YQ, Cao LY, Xia LG, et al. Evaluation of Osteogenesis and Angiogenesis of Icariin in Local Controlled Release and Systemic Delivery for Calvarial Defect in Ovariectomized Rats. *Sci Rep*. 2017; 7: 5077.
- [23] Li XF, Xu H, Zhao YJ, et al. Icariin Augments Bone Formation and Reverses the Phenotypes of Osteoprotegerin-Deficient Mice through the Activation of Wnt/ β -Catenin-BMP Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 652317.
- [24] 陶云霞. 淫羊藿苷活化 β -连环蛋白信号通路促进钛颗粒诱导的小鼠骨髓基质干细胞成骨分化[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(9): 2179-2182.
- [25] 叶亚平, 李娜, 向威, 等. 周期性张应力联合淫羊藿苷促进脂肪干细胞成骨分化的实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2017, 39(1): 10-15.
- [26] 李霞, 徐文滢, 简洪, 等. 成纤维细胞生长因子1型受体-显性负性作用对骨髓基质干细胞成骨诱导培养后碱性磷酸酶活性的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2016, 18(6): 526-531.
- [27] 汪琳, 谷辉杰, 陈晓, 等. 不同浓度SP600125对人脂肪干细胞体外增殖和成骨分化的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(2): 157-163.
- [28] Wei JW, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2015; 161(7): 1576-1591.
- [29] Kim HJ, Park JW, Lee KH, et al. Plant homeodomain finger protein 2 promotes bone formation by demethylating and activating Runx2 for osteoblast differentiation. *Cell Res*. 2014; 24(10): 1231-1249.
- [30] McGee-Lawrence ME, Carpio LR, Bradley EW, et al. Runx2 is required for early stages of endochondral bone formation but delays final stages of bone repair in Axin2-deficient mice. *Bone*. 2014; 66: 277-286.
- [31] Inglis S, Christensen D, Wilson D, et al. Human endothelial and foetal femur-derived stem cell co-cultures modulate osteogenesis and angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 13.
- [32] Watt J, Schlezinger JJ. Structurally-diverse, PPAR γ -activating environmental toxicants induce adipogenesis and suppress osteogenesis in bone marrow mesenchymal stromal cells. *Toxicology*. 2015; 331: 66-77.
- [33] 贾亮亮, 袁丁, 王洪武, 等. 淫羊藿苷药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3976-3979.