

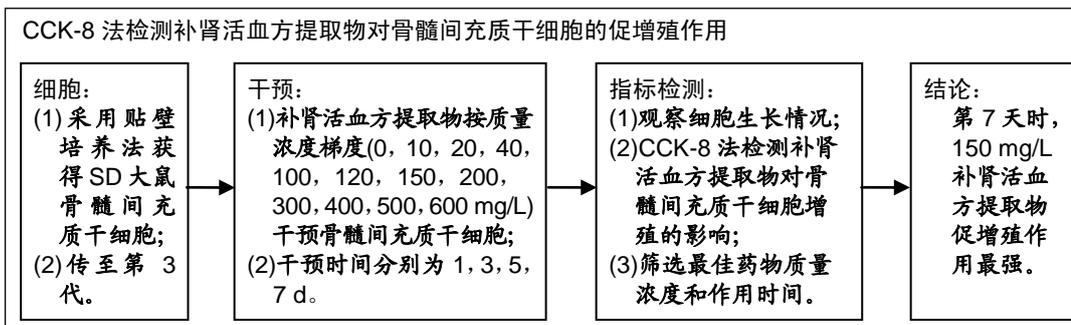
# 中药补肾活血方提取物促进SD大鼠骨髓间充质干细胞增殖作用的最佳浓度

卫荣<sup>1,2</sup>, 温欣<sup>1</sup>, 王莉<sup>2</sup>, 魏志勇<sup>3</sup> (新疆维吾尔自治区中医药研究院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; <sup>2</sup>苏州高新区人民医院, 江苏省苏州市 215000; <sup>3</sup>新疆生产建设兵团奎屯中医院, 新疆维吾尔自治区奎屯市 833200)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1585

ORCID: 0000-0002-7642-7911(卫荣); 0000-0002-9786-4328(魏志勇)

文章快速阅读:



卫荣, 女, 1968年生, 陕西省韩城市人, 汉族, 2009年新疆医科大学毕业, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事中西医结合治疗风湿病的临床与基础研究。

通讯作者: 魏志勇, 副主任医师, 新疆生产建设兵团奎屯中医院, 新疆维吾尔自治区奎屯市 833200

文献标识码:A

稿件接受: 2018-11-30



文题释义:

**补肾活血方:** 课题组前期研究发现, 新疆地区维、汉妇女绝经后骨质疏松症中医证型分布规律以肾虚血瘀型为最多见, 根据“肾藏精, 血瘀论”拟定补肾活血方, 用于治疗骨质疏松症取得良好疗效, 但其作用机制尚不清楚。该方由鹿角胶、补骨脂、淫羊藿、丹参、黄芪、熟地黄、白芍等中药组成, 作者采用水提的方法获得补肾活血方, 其提纯的药物所含生药量为 1.43 g/mL。

**细胞毒性:** 是由细胞或化学物质引起的单纯细胞杀伤事件, 不依赖于凋亡或坏死的细胞死亡机制。细胞毒性检测主要是根据细胞膜通透性发生改变来进行, 常用以下 2 种方法: MTT 法及 CCK-8 法。CCK-8 法对细胞毒性小, 可以多次测定选取最佳测定时间, 与 MTT 方法相比线性范围更广。

摘要

**背景:** 目前补肾活血方干预骨髓间充质干细胞增殖分化的实验中, 其最佳影响质量浓度是多少, 尚不明确。

**目的:** 探讨补肾活血方提取物诱导骨髓间充质干细胞增殖分化的最佳质量浓度和最佳时间。

**方法:** 采用贴壁筛选培养法分离纯化 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 取第 3 代细胞用于实验。将补肾活血方提取物按质量浓度梯度(0, 10, 20, 40, 100, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L)干预第 3 代骨髓间充质干细胞, 诱导时间分别为 1, 3, 5, 7 d。荧光倒置显微镜观察补肾活血方提取物干预后骨髓间充质干细胞的生长情况。用 CCK-8 法检测不同质量浓度补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞的毒性, 筛选最佳药物质量浓度和作用时间。

**结果与结论:** 与 0 mg/L 组比较, 第 5, 7 天时, 100, 120, 150 mg/L 补肾活血方提取物可促进骨髓间充质干细胞增殖( $P < 0.05$ ); 在第 7 天时, 150 mg/L 补肾活血方提取物促增殖作用最强( $P < 0.01$ ); 药物质量浓度在 150-200 mg/L 时, 增殖率下降明显; 随着实验时间的延长, 大于 200 mg/L 时, 骨髓间充质干细胞增殖不明显。

**关键词:**

骨髓间充质干细胞; 补肾活血方; 细胞毒性; 细胞增殖; 干细胞; 国家自然科学基金

**主题词:**

骨髓; 间质干细胞; 中草药; 细胞增殖; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

**基金资助:**

国家自然科学基金项目(81460676), 项目负责人: 卫荣; 国家第 55 批博士后基金项目, 项目负责人: 卫荣

## Bushen Huoxue Recipe extract at the optimal concentration promotes the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats

Wei Rong<sup>1,2</sup>, Wen Xin<sup>1</sup>, Wang Li<sup>2</sup>, Wei Zhiyong<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Xinjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>the People's Hospital of Suzhou New District, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Kuitun Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Kuitun 833200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Wei Rong, MD, Chief physician, Professor, Xinjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; the People's Hospital of Suzhou New District, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Wei Zhiyong, Associate chief physician, Kuitun Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Kuitun 833200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

## Abstract

**BACKGROUND:** It is unclear what is the optimal concentration of *Bushen Huoxue* Recipe to promote the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the optimal concentration and induction time of *Bushen Huoxue* Recipe extract to induce the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats were isolated and purified by adherent screening culture. Then, the bone marrow mesenchymal stem cells of 3<sup>rd</sup> generation were cultured with the extracts of *Bushen Huoxue* Recipe at different concentration (0, 10, 20, 40, 100, 120, 150, 200, 300, 400, 500 and 600 mg/L). The induction time was 1, 3, 5 and 7 days, respectively. The growth of bone marrow mesenchymal stem cells induced by *Bushen Huoxue* Recipe extracts was observed by fluorescent inverted microscope. The toxicity of different concentration solutions to bone marrow mesenchymal stem cells was detected by cell counting kit-8 for screening the optimal drug concentration and induction time.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the 0 mg/L group, 100, 120 and 150 mg/L extracts from *Bushen Huoxue* Recipe significantly promoted the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells at the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days ( $P < 0.05$ ). The 150 mg/L *Bushen Huoxue* Recipe extract showed the strongest proliferative effect ( $P < 0.01$ ), while the proliferation rate decreased significantly, when the mass concentration of *Bushen Huoxue* Recipe extract was 150–200 mg/L. With the extension of the induction time, the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells showed no obvious changes after intervention with *Bushen Huoxue* Recipe at a concentration of more than 200 mg/L.

**Subject headings:** Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Drugs, Chinese Herbal; Cell Proliferation; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81460676 (to WR); the 55<sup>th</sup>-Batch National Post-Doctoral Fund of China (to WR)

## 0 引言 Introduction

作为存在于骨髓中的非造血多能干细胞, 骨髓间充质干细胞具有自我更新、多向分化的特点, 其在骨髓中含量最多, 体外培养可大量繁殖, 免疫排斥反应弱; 骨髓间充质干细胞可向成骨细胞、成软骨细胞等多种细胞分化, 因而被广泛用于骨组织缺损的治疗<sup>[1-4]</sup>。因此, 骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化用于治疗骨质疏松症研究已成为热点。在中医“肾主骨生髓”、“在体为骨”、“肝肾同源”的理论指导下制定中药补肾活血方治疗骨质疏松症, 临床上应用多年, 取得了良好的效果。补肾活血方对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响成为作者研究的新命题, 但是目前在补肾活血方干预骨髓间充质干细胞增殖分化的实验中, 其最佳影响浓度是多少, 尚不明确。因此, 实验选取不同质量浓度补肾活血方提取物对大鼠骨髓间充质干细胞进行干预, 应用CCK-8法检测, 旨在得出补肾活血方提取物诱导骨髓间充质干细胞增殖分化的最佳浓度<sup>[5]</sup>, 为下一步研究补肾活血方干预SD大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 重复测量实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年3月至2016年12月在新疆医科大学第一附属医院实验动物科学研究部完成, 该部门具有国际AAALAC资质认证, 按照国际标准化操作流程执行。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级健康雌性SD大鼠2只, 6周龄, 体质量(150±20) g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SYXK(新)2013-0001。所有SD大鼠均在实验室统一标准饲养。该实验经过实验动物使用和管理委员会审核通过, 伦理审批号: IACUC20150210-07。

1.3.2 实验试剂及仪器 南美洲胎牛血清、 $\alpha$ -MEM培养基(Gibco公司); 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA、1%双抗、PBS(Hyclone公司); CCK-8(日本同仁化学研究所); CD34-PE(Abcam公司); CD29-FITC、CD44H-PE、CD45-Percp/cy5.5(eBioscience公司); CO<sub>2</sub>恒温培养箱(Thermo公司, 型号311); 酶标仪(Thermo公司, 型号1510); 流式细胞仪(BD公司); 低速台式离心机(法国Jouan公司); 荧光倒置显微镜(Zeiss公司); 96孔板(Corning公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 补肾活血方提取物制备 中药补肾活血方主要由鹿角胶、淫羊藿、补骨脂、丹参、黄芪、熟地黄、白芍等中药组成, 其提取的药物含生药量1.43 g/mL(由新疆医科大学附属中医医院制剂室提供), 分别加蒸馏水15  $\mu$ L, 室温震荡1 h, 静置过夜, 15 000 r/min离心10 min, 弃去沉淀。水浸上清不经处理即得水提取物。水提取物经0.22  $\mu$ m膜过滤, -20  $^{\circ}$ C保存, 用完全培养液(含体积分数为10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养液)稀释到所需要的质量浓度(10, 20, 40, 100, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L)。

1.4.2 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养<sup>[6]</sup> 6周龄SD雌性大鼠, 颈椎脱臼处死, 在无菌条件下取股骨、胫骨, 剔除附着于骨上的其他组织, 放置含有PBS及500 U/mL青链霉素的无菌平皿中, 用PBS冲洗2次, 再用1%双抗液体(100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)冲洗3遍, 剪开骨骺端, 露出骨髓腔, 用5 mL注射器吸取含体积分数为10%胎牛血清和1%双抗的 $\alpha$ -MEM完全培养液冲出股骨、胫骨的骨髓, 在培养皿中用小号针头(棕色头)20 mL注射器反复吹吸细胞悬液3遍, 将骨髓小粒尽可能冲散, 制成单细胞悬液, 混匀, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, 加入完全培养液重悬细胞沉淀, 反复吹打将液体混匀, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, 加入含1%双抗, 1% L-谷氨酰胺, 体积分数为10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM完全培养液重悬细胞沉

淀, 接种到培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中, 每隔3 d换液1次。

待原代细胞贴壁生长90%左右时, 进行细胞传代。室温下, 用一次性吸管吸弃培养液, 用温育的PBS轻轻冲洗细胞2次, 用温育的0.25%胰酶以1:3消化传代。显微镜下观察细胞消化情况, 当细胞变圆并有少部分脱落时, 加入完全培养基终止细胞消化, 用一次性吸管轻轻吹打贴壁细胞, 直到贴壁细胞悬浮, 按1:3进行传代培养, 接种于无菌培养瓶中, 并标记第1代。接种后每3 d或4 d换液1次, 用荧光倒置显微镜每日观察细胞形态及生长情况, 当细胞融合至90%左右时继续传代操作, 余类推。前3代细胞放于倒置显微镜下观察, 并拍照保存。

**1.4.3 骨髓间充质干细胞的流式鉴定** 取第3代细胞, 融合至80%–90%时, 采用0.25%胰蛋白酶消化约2 min, 加完全培养基终止消化, PBS清洗3遍, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加1 mL PBS制成细胞悬液, 用200目筛网过滤, 计数约 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 上机用CD29、CD44、CD34、CD45检测相应的抗原表达量。

**1.4.4 CCK-8法筛选补肾活血方提取物的最佳质量浓度及时间** 选取第3代对数生长期的骨髓间充质干细胞, 离心稀释吹打配制成细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的均匀单细胞悬液, 将其接种于96孔板中, 每孔细胞悬液100  $\mu\text{L}$ , 每组设6个复孔, 孔板周围加PBS 100  $\mu\text{L}$ 保持湿度, 放入CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 24 h后细胞贴壁进行换液, 弃去96孔板中的培养基, 实验各孔加入 $\alpha$ -MEM完全培养液配制的不同质量浓度的补肾活血方提取物溶液, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 质量浓度分别为10, 20, 40, 100, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L; 对照各孔继续加完全培养液100  $\mu\text{L}$ , 以只加培养液的孔为空白组, 继续放至CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 分别于1, 3, 5, 7 d取出, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂, 于CO<sub>2</sub>孵箱中避光孵育3 h, 用酶标仪在450 nm波长处检测各组细胞的吸光度值, 取6个孔平均值。以吸光度值的平均值为纵坐标, 补肾活血方提取物溶液质量浓度为横坐标, 绘制细胞吸光度值趋势图, 即骨髓间充质干细胞的吸光度值在不同补肾活血方提取物溶液质量浓度条件下的差异图。细胞存活率 $=[(A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100\%$ , 其中A<sub>s</sub>为实验孔吸光度值, A<sub>c</sub>为对照孔吸光度值, A<sub>b</sub>为空白孔吸光度值。

**1.5 主要观察指标** ①SD大鼠骨髓间充质干细胞形态学变化; ②SD大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定结果; ③补肾活血方提取物干预后的细胞形态变化; ④CCK-8法检测不同质量浓度补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞的毒性, 筛选最佳药物质量浓度。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计学分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。采用重复测量的方差分析进行效果评价, 重复测量方差分析需要进行协方差矩阵“球对称”结构假设, 如果满足“球对称”假设则采用未校正的F界值, 如果不满足“球对称”假设, 采用

Greenhouse-Geisser方法对F界值进行校正, 组间比较采用LSD法, 设定检验水准 $\alpha=0.05$ ,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 SD大鼠骨髓间充质干细胞形态学变化** 培养第3天, 细胞有触角伸出, 细胞形态多数呈多角形、棱形, 少部分呈现条索状, 细胞为成簇状生长, 胞浆内分布呈颗粒状。细胞培养至第7天, 原代细胞长满瓶底, 见图1A–C。传代培养, 细胞进入快速生长期, 第3代细胞形态均一, 呈网状、纤维状、漩涡状生长, 排列有一定方向性, 见图1D–F。

**2.2 SD大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定结果** 第3代骨髓间充质干细胞CD44、CD29为阳性表达, 分别为96.3%, 77.1%, 而CD34、CD45为弱表达, 分别为1.2%, 2.5%, 见图2。

**2.3 补肾活血方提取物干预后细胞形态改变** 骨髓间充质干细胞经不同质量浓度补肾活血方提取物干预后第1天, 低质量浓度干预组形态未见明显改变, >300 mg/L时细胞开始凋亡, 可见死亡细胞。第3天, 低质量浓度干预组细胞呈现缓慢增殖, 并且发现质量浓度为150 mg/L干预组细胞生长旺盛, 见图3A; 质量浓度为200 mg/L干预组细胞出现死亡, 但数量不多, 见图3B; >400 mg/L时细胞全部死亡。第7天, 低质量浓度干预组细胞缓慢增殖, 质量浓度为150 mg/L干预组细胞生长旺盛, 见图3C; 质量浓度为200 mg/L干预组细胞仍然有增殖, 但死亡细胞数量也较多, 见图3D。

**2.4 不同质量浓度补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞增殖的影响** 以各组所测得的吸光度值的平均值为纵坐标, 补肾活血方提取物溶液质量浓度为横坐标, 绘制细胞吸光度值趋势图, 骨髓间充质干细胞的吸光度值在不同补肾活血方提取物溶液质量浓度条件下的趋势, 见图4。

从图4可见, 骨髓间充质干细胞加入不同质量浓度补肾活血方提取物进行干预, 培养至1, 3, 5, 7 d时加入CCK-8, 所测得的吸光度值不同, 随着补肾活血方提取物质量浓度的增加, 测得的吸光度值逐渐增加, 在药物质量浓度为150 mg/L时, 测得吸光度值接近峰值, 当药物质量浓度>200 mg/L时, 吸光度值出现下降趋势。补肾活血方提取物干预骨髓间充质干细胞第7天时的吸光度值普遍较高, 干预第1天时的吸光度值普遍较低, 吸光度值随着补肾活血方提取物溶液干预时间的增加出现上升趋势。

由表1可见, 与对照组(0 mg/L)比较, 第5, 7天时, 100, 120, 150 mg/L补肾活血方提取物可促进骨髓间充质干细胞增殖( $P < 0.05$ ); 在第7天时, 150 mg/L补肾活血方提取物促增殖作用最强( $P < 0.01$ ); 药物质量浓度在150–200 mg/L时, 增殖率下降明显; 随着实验时间的延长, >200 mg/L时, 补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞增殖作用不明显。

表 1 不同质量浓度补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Effects of *Bushen Huoxue* Recipe extracts with different mass concentrations on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells

补肾活血方提取物 质量浓度	1 d	3 d	5 d	7 d
0 mg/L	1.00±0.35	0.80±0.32	1.00±0.34	2.72±0.90 <sup>d</sup>
10 mg/L	1.32±1.07	0.86±0.05	0.35±0.21	2.92±0.30
20 mg/L	1.52±0.67	0.89±0.06	0.69±0.17 <sup>c</sup>	3.23±0.23 <sup>c</sup>
40 mg/L	2.23±0.91 <sup>a</sup>	1.23±0.10 <sup>a</sup>	1.05±0.41	5.54±0.87 <sup>ac</sup>
100 mg/L	2.31±0.97 <sup>a</sup>	1.07±0.42	2.13±0.22 <sup>b</sup>	9.85±2.75 <sup>bd</sup>
120 mg/L	1.97±0.78	1.35±0.41 <sup>a</sup>	2.11±1.21 <sup>b</sup>	10.73±1.71 <sup>bd</sup>
150 mg/L	2.84±0.35 <sup>b</sup>	1.96±0.29 <sup>bd</sup>	2.53±1.20 <sup>b</sup>	12.89±0.21 <sup>bd</sup>
200 mg/L	1.51±0.42	1.03±0.04 <sup>c</sup>	1.70±0.14 <sup>c</sup>	3.83±0.14 <sup>d</sup>
300 mg/L	0.97±0.42	1.05±0.01	0.97±0.15	1.97±0.11 <sup>c</sup>
400 mg/L	1.42±0.98	1.14±0.01	1.27±0.04	1.43±0.17
500 mg/L	1.53±0.52	1.36±0.04	1.47±0.10	1.08±0.19
600 mg/L	1.22±0.04	1.55±0.03	1.40±0.22	1.03±0.06
F 值	36.254			
P 值	< 0.001			

表注: ①在相同时间下, 与对照组(0 mg/L)相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; ②在相同浓度下, 与第 1 天相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; ③浓度之间差异有显著性意义( $F=361.254$ ,  $P < 0.001$ ), 时间和浓度存在交互作用( $F=16.568$ ,  $P < 0.001$ )。

### 3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞被认为是组织工程中首选的种子细胞, 其获取容易, 具有低免疫原性、强大的自我更新能力以及多向分化潜能<sup>[6-7]</sup>, 近年来被广泛应用于骨质疏松症研究<sup>[8]</sup>。

骨质疏松症是指单位体积骨量减少伴有骨强度的降低, 主要与骨吸收和骨形成的动态平衡破坏有关。骨形成和吸收主要由成骨细胞和破骨细胞来完成。骨细胞分泌骨基质(胶原和蛋白), 并参与骨基质及骨钙的代谢, 是骨形成、生长和发育的主要功能细胞, 其中成骨细胞起着主要作用, 促进成骨细胞的增殖在骨质疏松症防治中有重要意义<sup>[9-11]</sup>。研究发现骨髓间充质干细胞向成骨分化减少、成脂分化增多是骨质疏松症发病的重要机制<sup>[12-14]</sup>。因此, 抑制骨髓间充质干细胞成脂分化、促进其成骨分化从而纠正骨代谢失衡是治疗骨质疏松症的方向之一<sup>[15-17]</sup>。

中医学尚无骨质疏松症的病名, 根据其临床表现及对中医临床资料的挖掘及整理, 将其归为“骨萎”、“骨枯”范畴<sup>[18]</sup>。《医精经义》曰:“肾藏精, 精生髓, 髓生骨, 故骨者肾之所合也, 髓者, 肾精所生, 精足则髓足, 髓在骨内, 髓足则骨强”。《素问·痿论》云:“肾气热, 则腰脊不举, 骨枯而髓减, 发为骨痿。”, 由此可见, 骨质疏松症病机关键在于肾虚<sup>[19]</sup>。现代临床与实验研究发现补肾活血中药既能促进成骨细胞的分化增殖, 又能够促进骨形成<sup>[20-21]</sup>, 达到协同作用。作者根据“肾藏精, 血瘀论”拟定补肾活血方用于治疗骨质疏松症。该方用血肉有情之鹿角胶以温补肝肾、养血益精, 补骨脂补肾壮骨助阳共为君药; 臣药配以熟地黄、白

芍、淫羊藿补肾滋阴益精, 此乃取其“善补阳者, 必于阴中求阳”和“壮水之主, 以制阳光”之意; 同时佐以丹参通络止痛活血, 黄芪益气补中, 全方共奏补肾活血之功, 既培补后天以填补肾中精气, 又兼活血养血的作用。

从国内中药对骨髓间充质干细胞骨向分化研究看, 探讨单味中药及其单体或复方对骨髓间充质干细胞骨向分化的影响<sup>[22-30]</sup>, 多采用含药血清作用于骨髓间充质干细胞的方法, 虽然有分子量小的优势, 但不能直接反映中药的药效, 而且由于成分复杂, 并不能明确其诱导骨髓间充质干细胞骨向分化的机制。该研究用水提法, 将补肾活血方的提取物直接应用于骨髓间充质干细胞培养, 取得满意效果。

骨髓间充质干细胞具有贴壁的特点, 传至第3代后细胞纯化, CD29、CD44等多种细胞均属于非造血类细胞, 是骨髓间充质干细胞的重要表面标志物, 经流式细胞术检测 CD29和CD44表达阳性, CD34和CD45表达阴性, 故骨髓间充质干细胞得以鉴定<sup>[31-34]</sup>。

CCK-8法是应用于细胞增殖或细胞毒性实验的一种快速、无放射性、高灵敏度检测的试验方法。利用酶标仪通过测定细胞培养液吸光度值, 可以间接反映出活细胞数量<sup>[35]</sup>。通过CCK-8法检测得到的吸光度值与活细胞数的线性相关度要明显优于MTT法<sup>[36]</sup>。实验采用CCK-8法, 证实补肾活血方提取物在不同质量浓度、不同时间对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖作用不同, 补肾活血方提取物对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖效应与干预时间呈正效应关系, 随着作用时间的延长, 细胞增殖明显。100, 120, 150 mg/L 补肾活血方提取物对骨髓间充质干细胞增殖有显著促进作用, 其增殖效应随药物质量浓度呈递增关系, 其中150 mg/L 补肾活血方提取物干预第7天时, 对骨髓间充质干细胞的增殖效果最显著。当药物质量浓度在150-200 mg/L之间时, 对骨髓间充质干细胞产生了抑制作用, 药物质量浓度 > 200 mg/L时, 骨髓间充质干细胞的增殖效应不明显。

综上所述, 补肾活血方能有效促进骨髓间充质干细胞体外增殖, 150 mg/L 补肾活血方提取物在干预第7天时, 增殖作用最强, 效果最佳。中药复方治疗骨质疏松症应选择适当的药物质量浓度和时间以及合适的提取方法, 进而有效促进骨髓间充质干细胞增殖, 低质量浓度可能无法为骨髓间充质干细胞增殖提供充足营养, 而超过一定的质量浓度范围可能又会起到抑制骨髓间充质干细胞增殖的作用。

**致谢:** 感谢新疆医学动物模型重点实验室老师们的帮助。

**作者贡献:** 实验设计为第一作者, 实施为通讯作者和第二作者。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81460676)”、“国家第 55 批博士后基金项目”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:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该实验经过实验动物使用和管理委员会审核通过, 伦理审批号: IACUC20150210-07。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 本研究遵守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:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

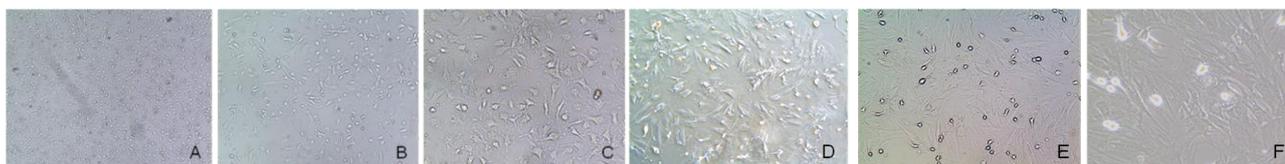
**生物统计学声明:** 文章统计学方法通过了新疆中医药研究院统计学专家审核。

**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4.0”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

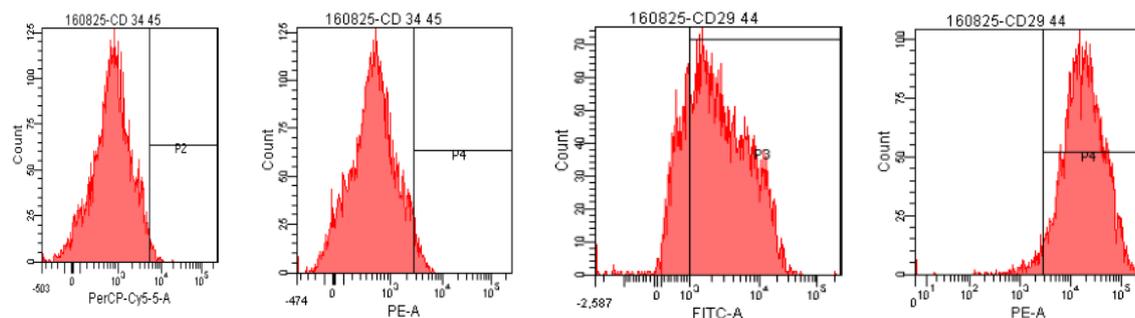
- [1] Gopal K, Amirhamed HA, Kamarul T. Advances of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of cartilage defects: a systematic review. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(6):663-669.
- [2] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2008; 26(1):1-21.
- [3] 刘宽,吴兴. Hedgehog信号调控骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化: 调控方式及其串话机制尚待研究[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(37):6040-6045.
- [4] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷VI诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(2):222-226.
- [5] 熊建文,肖化,张镇西. MTT法和cck-8法检测细胞活性之条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5):559-562.
- [6] Obeid M, Saber Sel D, Ismael Ael D, et al. Mesenchymal stem cells promote hard-tissue repair after direct pulp capping. *J Endod*. 2013;39(5):626-631.
- [7] Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, et al. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(12):1663-1679.
- [8] Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-177.
- [9] 许兵,金红婷,王萧枫,等. 补肾活血含药血清对成骨细胞经典 Wnt/ $\beta$ -catenin通路的影响研究[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(6): 553-558.
- [10] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊治指南(2011年)[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2011, 4(1):2-17.
- [11] 黄永铨,罗毅文,王斌,等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(1):86-91.
- [12] Kim J, Ko J. A novel PPAR $\gamma$ 2 modulator sLZIP controls the balance between adipogenesis and osteogenesis during mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Death Differ*. 2014;21(10):1642-1655.
- [13] Huang J, Zhao L, Xing L, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010;28(2):357-364.
- [14] Liao L, Yang X, Su X, et al. Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow. *Cell Death Dis*. 2013;4:e600.
- [15] Kim M, Lee YJ, Jee SC, et al. Anti-adipogenic effects of sesamol on human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(1):49-54.
- [16] An Q, Wu D, Ma Y, et al. Suppression of Evi1 promotes the osteogenic differentiation and inhibits the adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Mol Med*. 2015;36(6):1615-1622.
- [17] Wang C, Meng H, Wang X, et al. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med Sci Monit*. 2016;22:226-233.
- [18] 肖建德.实用骨质疏松症学[M].北京:科学出版社,2004:134-137.
- [19] 赵红霞,于智敏,鞠大宏.骨质疏松症中医病因病机现代研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(9):717-720.
- [20] 张睿昕,王大伟,贾永龙,等. 补肾活血壮骨方治疗早期创伤性股骨头坏死66例[J]. *河南中医*, 2014, 34 (5):863.
- [21] 郑光明. 补肾活血方治疗骨质疏松性股骨粗隆间骨折术后的疗效观察[D]. 广州:广州中医药大学, 2011.
- [22] 朱丽华,张贤,张艳红,等. 杜仲诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的有效部位[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(36):6758-6761.
- [23] 李会珍,李蒙,李瑞玉,等. 淫羊藿对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6):979-984.
- [24] 傅淑平,杨丽,洪浩,等. 淫羊藿苷促SD大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(7): 839-846.
- [25] 杨锋,潘乐,马秋涛,等. 左归丸对骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因甲基化的影响[J]. *中医杂志*, 2015, 56(15):1326-1329.
- [26] 张甲第,时舒曼,张海洋,等. 银杏叶提取物对骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(6):575-579.
- [27] 李晨睿,孟志远,牛银波,等. 黄芩苷通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(7):919-924.
- [28] 田原,邸阳,包翠芬,等. 松果菊苷含药血清促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及ZHX3表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(20):4052-4057.
- [29] 郭杨,马勇,成吉华,等. 益肾通络复方含药血清对兔骨髓间充质干细胞体外增殖和成骨分化的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(5):508-510.
- [30] 高璐,郑洪新,陈谊敬,等. 补肾中药成分配伍调控RUNX2、OSX对大鼠BMSCs成骨分化的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(4):425-429.
- [31] Hu Y, Lou B, Wu X, et al. Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2018;2018:6704583.
- [32] Guo Z, Yang J, Liu X, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)*. 2001;114(9):950-953.
- [33] Sun S, Guo Z, Xiao X, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*. 2003;21(5):527-535.
- [34] Li G, Yu F, Lei T, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies. *Neural Regen Res*. 2016; 11(6):1015-1024.
- [35] 万文婷,李宁,刘静,等. CCK-8法与MTT法检测人前列腺癌细胞活性的比较研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 12(12):3046-3048.
- [36] 刘素贞,曹晓敏,许丽娟,等. 应用CCK8法检测鸡淋巴细胞活性的检测最佳条件研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(13):212-214.



图注: 图中 A-C 为培养第 7 天, 放大倍数分别为  $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ , 细胞呈多角形、棱形, 少部分呈现条索状; D-F 为第 3 代骨髓间充质干细胞, 放大倍数分别为  $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ , 细胞形态均一, 呈网状、纤维状、漩涡状生长。

图 1 大鼠骨髓间充质干细胞形态学变化

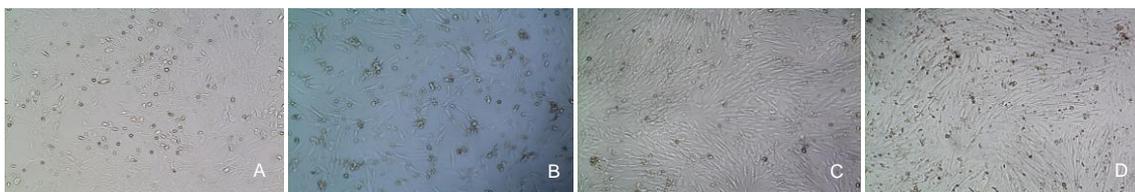
Figure 1 Morphological changes of rat bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 第 3 代骨髓间充质干细胞 CD44、CD29 为阳性表达, 而 CD34、CD45 为弱表达。

图 2 流式细胞仪检测 SD 大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原的表达

Figure 2 Flow cytometry detection of surface antigens of bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats



图注: 图中 A 为第 3 天时, 质量浓度为 150 mg/L 干预组细胞生长旺盛; B 为第 3 天时, 质量浓度为 200 mg/L 干预组细胞出现死亡, 但数量不多; C 为第 7 天时, 质量浓度为 150 mg/L 干预组细胞生长旺盛; D 为第 7 天时, 质量浓度为 200 mg/L 干预组细胞仍然有增殖, 但死亡细胞数量也较多。

图 3 补肾活血方提取物干预后骨髓间充质干细胞形态改变( $\times 50$ )

Figure 3 Morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells after intervention of *Bushen Huoxue* Recipe extract ( $\times 50$ )

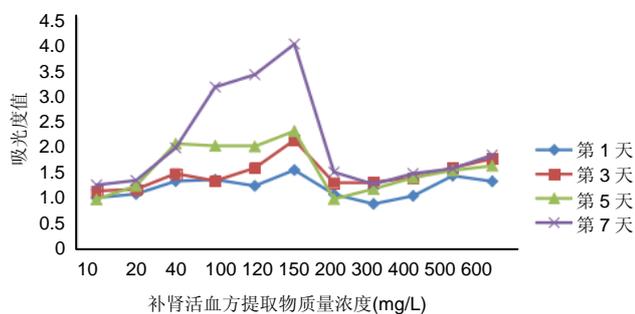


图 4 骨髓间充质干细胞吸光度值与补肾活血方提取物质量浓度及干预时间的关系

Figure 4 Relationship of the absorbance of bone marrow mesenchymal stem cells to mass concentration and intervention time of *Bushen Huoxue* Recipe