

## 淫羊藿素促进 BMSCs 成软骨分化的研究

汪建样<sup>1,2</sup>, 殷嫦嫦<sup>3</sup>, 王子瑶<sup>1,2</sup>, 耿书国<sup>1,2</sup>, 胡文龙<sup>1,2</sup>, 殷明<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南昌大学第二附属医院; <sup>2</sup>南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006; <sup>3</sup>九江学院, 九江 332000

**摘要:** 研究淫羊藿素在 GDF-5 诱导 BMSCs 成软骨分化过程中的作用。全骨髓贴壁法分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs), 取 P3 代细胞随机分成 4 组: 对照组, 淫羊藿素 (Icaritin) 组, Growth differentiation factor 5 (GDF-5) 组, Icaritin + GDF-5 联合组。连续诱导培养 14 d, 倒置相差显微镜观察细胞形态, Alcian Blue 染色检测细胞的蛋白聚糖改变, RT-PCR 检测软骨分化标记基因 Aggrecan、COL2、Sox9 及 COL1 的表达情况, Western Blot 检测 COL2 和 COL1 蛋白表达水平。结果提示, 与对照组及 GDF-5 组相比, Icaritin + GDF-5 联合组蛋白聚糖染色更深; 软骨分化标记基因 Aggrecan、COL2、Sox9 明显增加; II 型胶原蛋白表达量均明显增加。淫羊藿素能够促进 GDF-5 诱导 BMSCs 成软骨分化。

**关键词:** 淫羊藿素; GDF-5; BMSCs; 成软骨分化

中图分类号: R963

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.11.006

## Icaritin Promotes Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

WANG Jian-yang<sup>1,2</sup>, YIN Chang-chang<sup>3</sup>, WANG Zi-yao<sup>1,2</sup>, GENG Su-guo<sup>1,2</sup>, HU Wen-long<sup>1,2</sup>, YIN Ming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; <sup>2</sup>Medicine Graduate School, Nanchang University, Nanchang 330006, China; <sup>3</sup>Basic Medical College, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

**Abstract:** In this study, the effects of icaritin on chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by growth differentiation factor 5 were investigated. BMSCs were collected from Sprague Dawley rats. The morphology was observed by inverted microscope. rBMSCs at passage 3 were randomized divided into 4 groups: control group, Icaritin group, GDF-5 group, Icaritin + GDF-5 group and induced for 14 days. Alcian Blue stain showed the changes of proteoglycans; RT-PCR was used to detect the mRNA expression of Aggrecan, COL2, Sox9 and COL1; the protein expression levels of COL2 and COL1 were detected by Western Blot assay. The results indicated that, compared with the control group and GDF-5 group, Icaritin + GDF-5 group showed deeper proteoglycans staining; cartilage differentiation marker genes Aggrecan, COL2, Sox9 and the protein expression levels of COL2 significantly increased. Icaritin can promote chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by GDF-5.

**Key words:** icaritin; GDF-5; BMSCs; chondrogenic differentiation

关节软骨属于透明软骨, 营养供应和代谢产物的排泄需要通过关节液, 一旦发生损伤难以自我修复和再生<sup>[1]</sup>。软骨损伤很容易引起关节结构和功能的破坏, 导致剧烈的疼痛和功能障碍, 甚至致残<sup>[2]</sup>。传统的治疗方案只能缓解疼痛、维持关节的功能, 但不能恢复软骨的结构和生物力学特性。目前, 软骨组织工程技术被认为是治疗软骨损伤的最有前景的方法之一, 可能能够在更大程度上改善患

者生活质量、延缓关节退变及人工关节置换<sup>[3]</sup>。生长分化因子 (GDF) 5 是骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 超家族成员之一, 能够诱导 BMSCs 成软骨分化<sup>[4]</sup>。淫羊藿素 (Icaritin, ICT) 是淫羊藿主要活性成分淫羊藿苷的的衍生物。大量研究表明, ICT 具有类雌激素作用、抗氧化、防治骨质疏松、促进成骨分化、防治前列腺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌等作用<sup>[5]</sup>。但淫羊藿素体外对于 BMSCs 向软骨细胞分化作用的研究尚少。本次实验我们利用 GDF-5 联合 ICT 体外诱导大鼠 BMSCs 向软骨细胞分化, 探讨淫羊藿素体外是否能够促进 BMSCs 向软骨细胞分化, 为软骨损伤治疗提供实验参考。

收稿日期: 2015-06-26 接受日期: 2015-09-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81160226); 江西省教育厅基金 (GJJ13740)

\* 通讯作者 Tel: 86-791-8698917; E-mail: yinming0791@aliyun.com

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级 SD 大鼠(雌雄不限),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格号:43004700014337。试验单位使用许可证编号:SYXK(赣)2012-0002。

### 1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(FBS)、0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)(GIBCO 公司),Recombinant murine GDF-5(PEPROTECH 公司),淫羊藿素(上海原叶,HPLC  $\geq 98\%$ ),Alcian Blue 8GX(Solarbio 公司),GREENspin 细胞 RNA 快速提取试剂盒(北京庄盟),HiFiScript 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒,2  $\times$  Taq Master Mix、DNA Ladder 2000(SinoBio),引物合成(上海生工生物),总蛋白提取试剂盒(普利莱基因技术有限公司),Prestained Protein Ladder(Thermo Scientific 公司),GAPDH 多克隆抗体、COL1A2 多克隆抗体(Proteintech 公司),Anti-Collagen II antibody(abcam 公司),Goat Anti-Rabbit IgG,HRP(康为世纪),高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪)。

## 2 实验方法

### 2.1 BMSCs 分离、培养

本研究团队已建立了 rBMSCs 的分离、培养及纯度鉴定的研究实验条件<sup>[6]</sup>。取 3 周龄 SPF 级 SD 大鼠,颈椎脱臼法处死,75% 酒精浸泡 30 min,消毒后无菌分离出股骨和胫骨,采用全骨髓贴壁法分离 rBMSCs。用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞接种于塑料中,72 h 后换液,以后每 2 d 换液一次,待细胞生长至 90% 时按 1:2 传代。反复贴壁纯

化,取 P3 代细胞进行实验,并用倒置相差显微镜观察细胞形态。

### 2.2 BMSCs 向软骨细胞分化

取 P3 代细胞,常规消化后,调整细胞密度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ ,接种于 24 孔板中,同时将细胞密度调整为  $1 \times 10^6/\text{mL}$  接种于 6 孔板中,并按以下分组进行诱导:(1)对照组;(2)Icaritin 组;(3)GDF-5 组;(4)Icaritin + GDF-5 联合组。上述各组细胞均采用 10% FBS + DMEM/F12 培养基培养,其中 Icaritin 的终浓度为  $5 \mu\text{mol/L}$ ,GDF-5 的终浓度为  $100 \text{ ng/mL}$ ,每 2 d 换液一次,诱导培养 14 d,倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

### 2.3 蛋白聚糖的 Alcian Blue 染色

取诱导培养 14 d 后的 24 孔板进行 Alcian Blue 染色,PBS 漂洗 3 次  $\times 5 \text{ min}$ ,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 1 次, $0.1 \text{ mol/L}$  盐酸溶液漂洗 5 min 使 pH 降至 1.0,1% Alcian Blue 染色过夜,最后用  $0.1 \text{ mol/L}$  盐酸溶液洗脱非特异性染色。倒置相差显微镜下观察染色情况。

### 2.4 RT-PCR 检测成软骨分化相关基因表达

取诱导培养 14 d 后的 6 孔板,按 GREENspin 细胞 RNA 快速提取试剂盒说明提取细胞总 RNA。按 HiFiScript 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA,按 2  $\times$  Taq Master Mix 说明进行扩增。PCR 扩增反应体系:cDNA  $1 \mu\text{L}$ 、上游和下游引物各  $1 \mu\text{L}$ 、2  $\times$  Master Mix  $12.5 \mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$   $9.5 \mu\text{L}$ ,总反应体系  $25 \mu\text{L}$ 。扩增后产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳 25 min 左右。SIM 凝胶成像系统拍照并分析条带灰度值。内参为 GAPDH,目的基因为:Aggrecan、Col2a1、Col1a1、Sox9,引物序列和产物大小见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列  
Table 1 Sequences of primers

Gene	Primer nucleotide sequence(5'-3')	Product size (bp)
GAPDH	F - ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	440
	R - GGATGCACGGATGATGTTCT	
Aggrecan	F - TGGCATTGAGGACAGCGAAG	90
	R - TCCAGTGTGTAGCGTGTGGAATAG	
Col2a1	F - CGAGTGACAAAAGGAGAAGC	453
	R - CTGGTTGTTTCAGCGACTTGA	
Col1a1	F - GACGTCCTGCTGAAGTTGGT	588
	R - AGCCACGATGACCCCTTTATG	
Sox9	F - AGGAAGCTGGCAGACCAGTA	537
	R - CGGCAGCTATTGGTCAAAC	

## 2.5 Western Blot 检测软骨标记蛋白表达

取诱导培养 14 d 后的 6 孔板,按总蛋白提取试剂盒说明提取细胞蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。加入  $4 \times$  蛋白质上样缓冲液  $95^\circ\text{C}$  水浴 5 min 变性。每组蛋白上样量为  $30\ \mu\text{g}$ ,在 SDS-聚丙烯酰胺 (PAGE) 凝胶中电泳;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 2 h;分别加入 GAPDH (1:3000)、Col2 (1:5000)、Col1 (1:8000) 一抗工作液室温孵育 2 h,  $1 \times$  TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;用含标记辣根过氧化物酶的二抗 (1:6000) 室温孵育 2 h;漂洗后于暗室用 ECL 试剂盒进行曝光、显影、定影。晾干后,以 GAPDH 为内参,用 ImageJ 进行灰度分析。

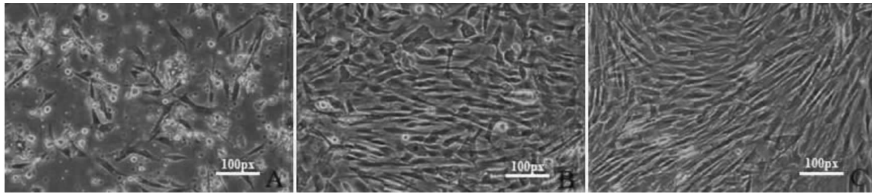


图 1 BMSCs 原代培养 3d(A)、BMSCs 原代培养 10d(B) 及 BMSCs 第三代培养 3d(C) 的细胞形态学观察 ( $\times 100$ )

Fig. 1 Cellular morphology observation of primary BMSCs cultured for 3 days (A), primary BMSCs cultured for 10 days and BMSCs at passage 3 cultured for 3 days (C) ( $\times 100$ )

## 3.2 rBMSCs 成软骨分化的形态改变及蛋白聚糖的 Alcian Blue 染色结果

各组细胞随着诱导时间的延长密度逐渐增加,淫羊藿素 (Icaritin) 组、GDF-5 组、Icaritin + GDF-5 联合组细胞形态都由长梭形逐渐向短梭形、三角形、类圆形转变,细胞体积逐渐缩小,胞浆丰富。且 Icaritin + GDF-5 联合组 (图 2D) 最为明显, GDF-5 组 (图

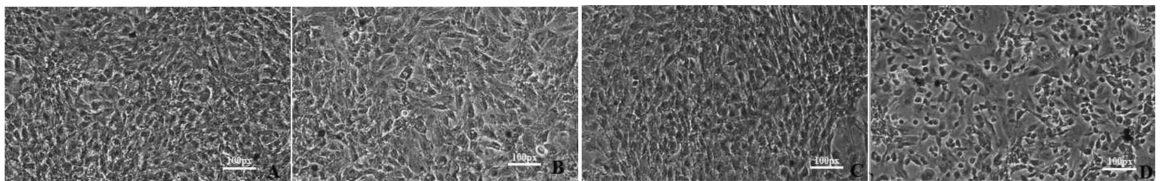


图 2 对照组 (A)、淫羊藿素 (B)、GDF-5 组 (C) 及 Icaritin + GDF-5 联合组 (D) 连续诱导 14 d 后细胞形态变化及分泌蛋白多糖量的变化 ( $\times 100$ )

Fig. 2 The morphological changes and content of cells secretory proteoglycan changes in control group (A), Icaritin group (B), GDF-5 group (C) and Icaritin + GDF-5 group (D) induced for 14 days ( $\times 100$ )

## 3.3 RT-PCR 结果

RT-PCR 检测结果分析表明,与对照组相比, Icaritin 组、GDF-5 组及 Icaritin + GDF-5 联合组软骨标记基因 Aggrecan、Col2、Sox9 表达量均明显增加

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行试验数据分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示。计数资料两样本间率的比较采用  $\chi^2$  检验,检验水平  $\alpha = 0.05$ ,组间比较采用单因素方差分析。

## 3 实验结果

### 3.1 rBMSCs 的形态学观察

大鼠骨髓间充质干细胞原代培养接种于培养瓶中,第 3 d 部分细胞贴壁生长,呈长梭形、多角形 (图 1A),第 10 d 细胞呈集落生长,漩涡状,近似鱼群样分布但有少量杂细胞,约 90% 融合 (图 1B)。传至 P3 代,细胞形态基本均一,长梭形或扁平状,呈典型密集漩涡状、鱼群样排列贴壁生长 (图 1C)。

2C) 和淫羊藿素组 (图 2B) 次之,而对照组 (图 2A) 变化最小。连续诱导 14 d 后,对照组 (图 2A) 并没有明显的蛋白聚糖染色,淫羊藿素组 (图 2B)、GDF-5 组 (图 2C)、Icaritin + GDF-5 联合组 (图 2D) Alcian Blue 染色后颜色由浅到深。说明诱导后四组细胞分泌蛋白聚糖的量逐渐增加。

( $P < 0.05$ ),相反成骨分化相关基因 Col1a1 表达量明显减少 ( $P < 0.05$ ),但是 Icaritin 组 Col1a1 表达量增加 ( $P < 0.05$ )。与 GDF-5 组比较, Icaritin + GDF-5 联合组 Aggrecan、Col2、Sox9 基因表达量也增加 ( $P$

<0.05),相应的 Col1a1 表达量下降( $P < 0.05$ ) (图 3)。

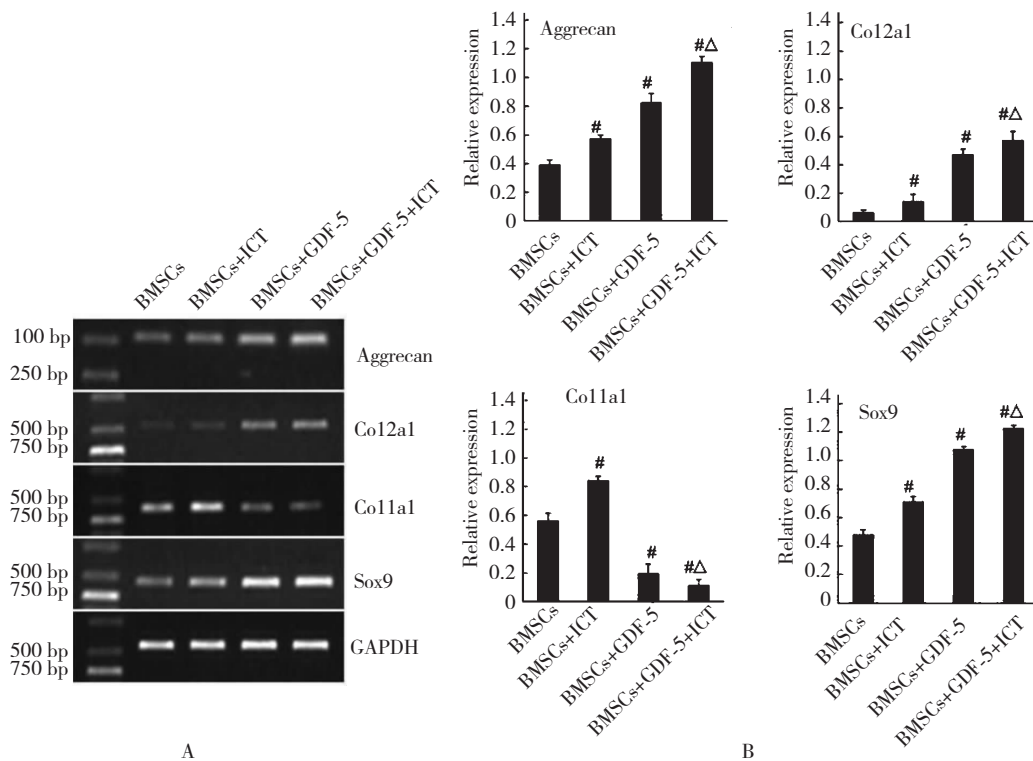


图3 BMSCs 诱导 14 d 后成软骨分化相关基因的表达水平

Fig. 3 Gene relative expression level detected at day 14 after induction

注:(A)电泳图;(B)RT-PCR 检测 Aggrecan,Col2a1,Col1a1,Sox9 基因表达水平分析结果。 $^{\#}P < 0.05$  与对照组相比; $^{\Delta}P < 0.05$  与 GDF-5 组相比。

Note:(A) electrophoresis;(B) Aggrecan,Col2a1,Col1a1,Sox9 gene relative expression level analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction.  $^{\#}P < 0.05$  VS. control group;  $^{\Delta}P < 0.05$  VS. GDF-5 group.

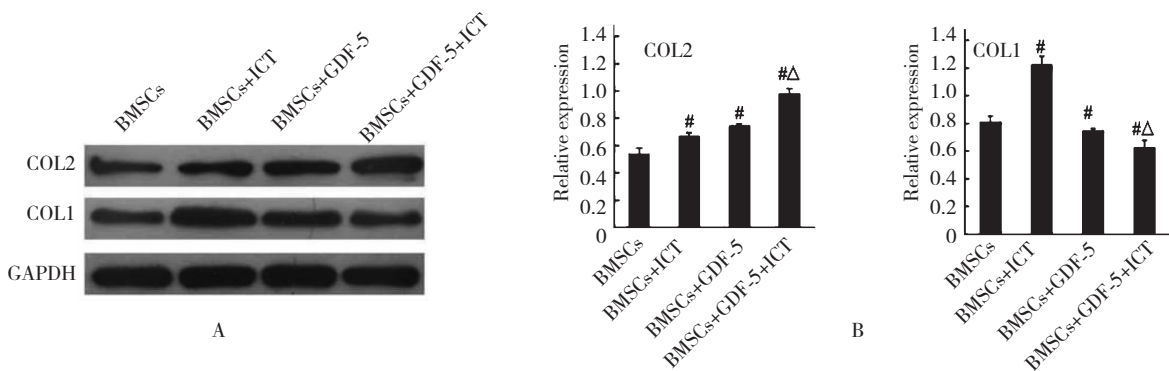


图4 BMSCs 诱导 14 天后相关蛋白的表达水平

Fig. 4 Protein relative expression of COL2 and COL1 after 14 days of induction

注:(A)电泳图;(B)Western Blot 检测 II、I 型胶原蛋白表达水平的灰度分析结果。 $^{\#}P < 0.05$ ,与对照组相比; $^{\Delta}P < 0.05$  与 GDF-5 组相比。

Note:(A) electrophoresis;(B) COL2 and COL1 Protein relative expression level analyzed by western Blot after 14 days of induction.  $^{\#}P < 0.05$  VS. control group;  $^{\Delta}P < 0.05$  VS. GDF-5 group.

### 3.4 Western Blot 检测结果

Western Blot 检测结果灰度分析表明,相比于 BMSCs 组,各诱导组 II 型胶原蛋白表达量均明显增

加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );相对于 BMSCs + GDF-5 组,BMSCs + GDF-5 + ICT 组 II 型胶原蛋白表达量增加( $P < 0.05$ )。与 BMSCs 组相比,BMSCs +

ICT 组 I 型胶原蛋白相对表达量增加 ( $P < 0.05$ ), 而 BMSCs + GDF-5 组及 BMSCs + GDF-5 + ICT 组表达减少 ( $P < 0.05$ ); 与 BMSCs + GDF-5 组相比 BMSCs + GDF-5 + ICT 组 I 型胶原蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

## 4 讨论与结论

BMSCs 是一种多能干细胞, 拥有强大的自我更新和良好的分化潜能, 在一定的条件下, 其可以向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞等分化<sup>[7]</sup>。由于它具有来源广、易得到、易于培养扩增、低免疫原性、能与软骨下骨很好的融合<sup>[8]</sup>等优点, 被广泛用于软骨组织工程。GDF-5 也被称为软骨衍生形态发生蛋白-1 (CDMP-1), 在胚胎发育阶段能够促进肢体发育, 参与肌腱、韧带、神经、皮肤、骨及软骨损伤修复<sup>[9]</sup>。在肢体发育的早期, GDF-5 表达于软骨基质的间充质干细胞凝集区; 随后它的表达仅局限于关节形成的中心区域, 是滑膜关节的正常形态和发育所必须的<sup>[10]</sup>。此外, GDF-5 还表达于成年人关节软骨组织中, 参与软骨表型和功能的维持<sup>[11]</sup>。有研究表明: GDF-5 能够诱导干细胞成软骨分化, 增加其蛋白聚糖和 II 型胶原的表达<sup>[4]</sup>。

淫羊藿是一味传统的中草药, 根据中国药典记录, 我国人民采用该药来壮骨强肾有几千年的历史, 利用现代的药物分析手段研究该药的成分发现: 其主要的药物成分为黄酮类化合物, 统称为淫羊藿总黄酮, 进一步的研究证明: 淫羊藿总黄酮中主要的活性单体为淫羊藿苷, 淫羊藿苷属于具有戊二烯结构的黄酮苷<sup>[12]</sup>。Zhang L 等<sup>[13]</sup>研究发现淫羊藿苷能够促进软骨细胞细胞外基质的合成和基因的表达, 有利于软骨细胞表型的维持。淫羊藿素 (Icaritin, ICT) 作为淫羊藿苷的衍生物, 是其体内代谢后的主要活性产物, 与其前体物质淫羊藿苷具有极其相似的分子结构, 具有抗氧化、防治骨质疏松、促进成骨细胞生长和增殖、治疗心血管疾病、保护神经变性损伤、防治乳腺癌等作用<sup>[14]</sup>。有研究表明: 低浓度 (4、8  $\mu\text{mol/L}$ ) 的淫羊藿素能够促进大鼠软骨细胞增殖抑制其凋亡<sup>[15]</sup>, 而高浓度则没有这个作用。本实验前期选用 1、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的 ICT 分别联合 100 ng/mL 的 GDF-5 诱导 rBMSCs 分化, Alcian Blue 染色结果提示 5  $\mu\text{mol/L}$  效果最好。因此, 本实验采用 5  $\mu\text{mol/L}$  的淫羊藿素联合 100 ng/mL 的 GDF-5 诱导 rBMSCs 成软骨分化, 实验结果表明 5  $\mu\text{mol/L}$  淫羊

藿素的淫羊藿素具有促进 GDF-5 诱导的细胞合成和分泌蛋白多糖, 促进 Aggrecan、Col2、Sox9 mRNA 表达, 促进 II 型胶原蛋白表达抑制 I 型胶原蛋白表达。其中蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白是透明软骨细胞分泌的特异性的软骨细胞外基质的主要成分, Sox9 是一种高迁移率族蛋白 (HMG-box) 转录因子, 是间质祖细胞成软骨分化早期阶段的标志<sup>[16]</sup>。成软骨分化标记基因 Aggrecan、Col2、Sox9 mRNA 及 II 型胶原蛋白表达量明显增加提示 GDF-5 联合 ICT 能够诱导 BMSCs 向软骨软骨细胞分化。与单独 GDF-5 组相比, 添加 ICT 组上述基因和蛋白表达水平明显增加 (差异有统计学意义), 说明淫羊藿素体外能够促进 rBMSCs 成软骨分化。此外, 淫羊藿素能够导入聚乙烯-磷酸三钙 (PLGA-TCP) 形成新的多孔复合支架, 它能持续释放 ICT, 并且有很好的生物相容性<sup>[17]</sup>, 有利于 ICT 用于软骨损伤的治疗的应用。

综上所述, GDF-5 联合淫羊藿素能够诱导 rBMSCs 成软骨分化, 其中 5  $\mu\text{mol/L}$  淫羊藿素能够促进 GDF-5 诱导的细胞成软骨分化, 为应用 ICT 治疗软骨损伤提供实验基础。

## 参考文献

- 1 Counsel PD, Bates D, Boyd R, *et al.* Cell therapy in joint disorders. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*, 2015, 7:27-37.
- 2 Chu CR, Millis MB, Olson SA. Osteoarthritis: From palliation to prevention. *J Bone Joint Surgery*, 2014, 9:130.
- 3 Mardones R, Jofré CM, Minguell JJ. Cell therapy and tissue engineering approaches for cartilage repair and/or regeneration. *Int J Stem Cells*, 2015, 8:48-53.
- 4 Feng G, Wan Y, Balian G, *et al.* Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. *Growth Factors*, 2008, 26: 132-142.
- 5 Zhang SQ. Ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the quantification of icaritin in mouse bone. *J Chromatogr B*, 2015, 978:24-28.
- 6 He DW (何丁文), Yin CC (殷嫦嫦), Gu YR (顾玉荣), *et al.* Differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neural-like cells induced by bFGF and EGF. *Basic Clin Med (基础医学与临床)*, 2013, 33:444-449.
- 7 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Sci*, 1999, 284:143-147.