

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

叶亚平 李娜 向威 王锐 郭风劲 许涛

【摘要】 目的 探讨周期性张应力(CTS)联合淫羊藿苷促进脂肪干细胞(ASCs)成骨分化的作用。**方法** 分离 10 只 Sprague-Dawley (SD)大鼠的 ASCs,分别按不同的干预方法将收集的 ASCs 细胞分为对照组(仅用普通培养基干预)、淫羊藿苷组(仅用淫羊藿苷干预)、1000 μ 组(仅用 1000 μ 的 CTS 干预)、2000 μ 组(仅用 2000 μ 的 CTS 干预)、3000 μ 组(仅用 3000 μ 的 CTS 干预)和联合干预组(用 2000 μ 的 CTS 联合淫羊藿苷进行干预)。淫羊藿苷的作用浓度为 10^{-7} mol/L;CTS 的设置参数为频率 1.0 Hz,应力大小分别为 1000 μ strain(简称 1000 μ)、2000 μ 、3000 μ ,每刺激 5 s 之后休息 15 s,每日总刺激时间为 2 h。干预 7 d 后,收获细胞采用 Western Blot 法检测碱性磷酸酶(ALP)蛋白的表达;用淫羊藿苷联合 2000 μ 的 CTS 对 ASCs 进行干预 3 d 后,收获 ASCs 细胞用 Western Blot 法检测其 Runx 相关基因转录因子 2(Runx2)、YES 相关蛋白(YAP)和结缔组织生长因子(CTGF)蛋白的表达;分别于干预 3 d 和 7 d 后,采用 ALP 活性定量检测试剂盒对 ALP 活性进行检测;干预 3 d 后,利用 RT-PCR 检测 YAP 下游靶基因 CTGF 和锚蛋白重复结构域 1(Ankrd1)的表达;干预 7 d 后,利用 RT-PCR 检测成骨分化相关基因骨桥素(OPN)和 I 型胶原的表达,并对各组所得数据进行统计学分析比较。**结果** 淫羊藿苷和 CTS(1000 μ 、2000 μ 、3000 μ)均能显著促进 ALP 蛋白的表达。与 1000 μ 和 3000 μ 应力大小的 CTS 相比,2000 μ 的 CTS 具有最强的促 ALP 蛋白表达能力;且 2000 μ 的 CTS 联合淫羊藿苷能显著促进 ALP 的表达及 Runx2 和 CTGF 的表达,且其联合作用时效效应更明显;但淫羊藿苷和 2000 μ 的 CTS 单独作用并不能促进 YAP 蛋白的表达,只有联合作用时才具有促 YAP 表达作用。淫羊藿苷和 2000 μ 的 CTS 单独作用 3 d 和 7 d 后均能显著上调 ALP 的活性,且其联合作用时上调 ALP 活性的效应更加明显。淫羊藿苷和 2000 μ 的 CTS 单独作用 7 d 后,能显著促进成骨分化基因 OPN 和 I 型胶原蛋白的表达,且联合作用时效效应更明显。淫羊藿苷和 2000 μ 的 CTS 单独作用 3 d 后能显著促进 YAP 靶基因 CTGF 和 Ankrd1 的表达,联合作用时效效应更明显。**结论** CTS 和淫羊藿苷联合作用可以通过上调 YAP 活性来促进 ASCs 的成骨分化。

【关键词】 淫羊藿苷; 周期性张应力; 脂肪干细胞; 成骨分化

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371915)

Cyclic tensile strain combined with icariin promotes the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells

Ye Yaping*, Li Na, Xiang Wei, Wang Rui, Guo Fengjing, Xu Tao. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Xu Tao, Email: rehabcc@163.com

【Abstract】 Objective To study the roles of icariin and cyclic tensile strain (CTS) in promoting the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells (ASCs) and the molecular mechanisms involved. **Methods** ASCs were isolated from Sprague-Dawley rats and treated either with icariin (10^{-7} mol/L) or with 1000 μ , 2000 μ or 3000 μ of CTS for 7 days, or with icariin plus CTS at 2000 μ for three days. Alkaline phosphatase (ALP) activity was detected after 3 and 7 days of intervention. Western blotting was performed to detect the expression of Runx-related transcriptional factor 2 (Runx2), Yes-associated protein (YAP) and connective tissue growth factor (CTGF) after the third day of the intervention. A reverse transcription polymerase chain reaction was performed at 7 days to detect the expression of osteopontin (OPN) and collagen 1a and after 3 days to detect the expression of the YAP target gene, CTGF and ankyrin repeating domain 1 (Ankrd1). **Results** Icariin and CTS at 1000 μ , 2000 μ or 3000 μ could all significantly promote the expression of ALP protein. CTS at 2000 μ was the most effective. The co-treatment with icariin and CTS significantly promoted ALP protein expression compared with icariin or CTS treatment alone. It also significantly promoted the expression of Runx2 and CTGF protein. Icariin or CTS (2000 μ) alone could not pro-

mote the expression of YAP protein, but icariin combined with CTS (2000 μ) promoted it significantly. Either icariin or CTS (2000 μ) could significantly promote ALP activity after 3 and 7 days, but icariin combined with CTS had the most obvious effect. Both icariin and CTS (2000 μ) could also significantly promote the expression of the osteogenesis-related genes OPN and collagen 1a, as well as the YAP targeted genes CTGF and Ankrd1. However, the combination of icariin and CTS had the greatest effect in promoting the expression of OPN mRNA, collagen 1a mRNA, CTGF mRNA and ankrd1 mRNA. **Conclusion** Icariin and CTS co-treatment may promote osteogenic differentiation of ASCs via activating YAP expression.

【Key words】 Icariin; Cyclic tensile strain; Adipose-derived stem cells; Osteogenic differentiation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (grant 81371915)

随着我国人口老龄化和社会经济的逐步发展,因退行性疾病或创伤导致的骨质疏松症、骨折以及相应的骨质大量丢失、骨折术后不愈合等疾病的发病率也稳步上升^[1],给临床医师带来了巨大的挑战。促进骨再生和骨折早期康复的方法包括自体骨移植、同种异体骨移植及人工合成骨修复材料^[2],其中以细胞为基础的骨组织工程技术的发展为骨再生和骨折早期康复提供了新的治疗选择^[3]。骨组织工程领域中脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs)作为种子细胞已得到广泛应用^[4],而种子细胞如何感知细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中生物力学和生物化学环境的变化已经成为目前研究人员最为关心的问题之一^[5]。有研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)能感知不同强度的细胞外基质并作出不同反应^[6]。笔者前期研究工作也表明,生物力学,即周期性张应力(cyclic tensile strain, CTS)刺激可以显著促进 ASCs 和骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的成骨分化^[7]。除生物力学因素外,生物化学因素也能够调控 ASCs 的一系列生物学行为(如粘附、增殖和分化等)。笔者前期研究工作显示,双糖链蛋白多糖(biglycan, BGN)等生物化学因素可以显著促进骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)诱导的成骨分化^[8]。研究生物力学和生物化学联合干预对 ASCs 成骨分化的影响及其相关分子机制有助于加深对 ASCs 生物学行为的理解及骨组织工程相关生物材料设计原则与理念的改进,更有助于骨折等临床常见疾病的早期康复治疗。

淫羊藿是中国传统医学中治疗骨损伤最常用的中草药之一。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分,分子量为 676.67,分子式为 $C_{33}H_{40}O_{15}$,结构上是异戊烯基黄酮醇苷类化合物^[9]。有研究显示,淫羊藿苷能有效防治骨质疏松和骨质疏松相关性骨折^[10]。本研究旨在深入探讨 CTS 和淫羊藿苷联合作用促进脂肪干细胞成骨分化的作用及其机制,为促进骨缺损修复及骨折早期康复提供有意义的临床依据。

材料与方法

一、实验材料

DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco 公司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,美国),青霉素链霉素双抗(博士德公司,中国),I 型胶原酶、胰蛋白酶(博士德公司,中国),RIPA 蛋白裂解缓冲液(碧云天生物科技公司,中国),结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)一抗(Santa Cruz 公司,美国),YES 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)一抗(CST 公司,美国),Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcriptional factor 2, Runx2)一抗(Santa Cruz 公司,美国),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)一抗(Santa Cruz 公司,美国),辣根过氧化物酶偶联二抗(博士德公司,中国),电泳仪、半干转膜仪和凝胶成像仪(BioRad 公司,美国),ECL 化学发光试剂盒(Thermo Pierce 公司,美国),Trizol 抽提液(Invitrogen 公司,美国),聚乙二醇辛基苯基醚-100(Octyl Phenoxy Poly Ethoxy 100, Triton X-100)(Sigma 公司,美国),反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、Taq 聚合酶、dNTP(MBI 公司,美国),引物合成(北京擎科生物技术有限公司),RNA 酶(Sigma 公司,美国),IQ SYBR Green 混合物(Bio-Rad 公司,美国),蛋白定量检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),ALP 定量检测试剂盒(中国建成生物科技公司),淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所),二甲基亚砜(DMSO, Dimethyl sulfoxide, Sigma 公司,美国)。

二、实验方法

(一)大鼠 ASCs 的分离和培养

选取体重 200~250 g 的成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 10 只(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),所有实验动物操作都经华中科技大学同济医学院伦理委员会批准。将大鼠颈椎脱臼处死后,仔细解剖分离得到大鼠腹股沟脂肪组织,修剪并去除血管及浅筋膜等结缔组织,用眼科剪剪至糊状,加入 2 倍于组织体积的 0.1% I 型胶原酶,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,加入

等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 900×g 离心 10 min 后, 去掉上清, 沉淀物用 5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬, 并以 80 目尼龙筛网过滤, 倒置显微镜下观察并计数后, 将细胞种植于 25 cm² 培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养, 并标记为原代。以后每隔 2 天换液 1 次, 并于换液后在倒置显微镜下观察细胞生长状况和形态特征。待细胞接近融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1 : 2 比例传代。

(二) 不同干预方法及细胞分组

干预方法有普通培养基、淫羊藿苷、CTS 和 CTS 联合淫羊藿苷四种方式。其中, 淫羊藿苷的作用浓度为 10⁻⁷ mol/L; CTS 的设置参数为频率 1.0 Hz, 应力大小分别为 1000 μ strain (简称 1000 μ)、2000 μ、3000 μ, 每刺激 5 s 之后休息 15 s, 每日总刺激时间为 2 h。采用四点弯曲加力系统进行加力, 将细胞接种到特制的塑料培养板上, 细胞的初始接种密度为 1×10⁵/cm², 普通培养基进行培养, 每 2 天更换 1 次培养液。当应力作用于细胞培养皿时, 培养皿发生形变, 其下面发生弯曲形变而其上面发生牵张形变, 同时粘附于培养皿上表面的细胞也受到牵张应力的作用, 牵张应力大小由培养皿形变位移和厚度决定。

对 ALP 蛋白进行定量检测时共选取不同张应力大小 (1000 μ、2000 μ 和 3000 μ) 的 CTS 进行干预, 分别按不同的干预方法将收集的 ASCs 细胞分为对照组 (仅用普通培养基干预)、淫羊藿苷组 (仅用淫羊藿苷干预)、1000 μ 组 (仅用 1000 μ 的 CTS 干预)、2000 μ 组 (仅用 2000 μ 的 CTS 干预)、3000 μ 组 (仅用 3000 μ 的 CTS 干预)、联合干预组 (用 2000 μ 的 CTS 联合淫羊藿苷干预)。其余实验仅将 ASCs 细胞分为对照组 (仅用普通培养基干预)、淫羊藿苷组 (仅用淫羊藿苷干预)、CTS 组 (仅用 2000 μ 的 CTS 干预)、联合干预组 (用 2000 μ 的 CTS 联合淫羊藿苷进行干预)。

(三) 成骨分化相关蛋白检测

诱导 ASCs 成骨分化 7 d 后, 收获 ASCs 细胞提取对照组、淫羊藿苷组、1000 μ 组、2000 μ 组、3000 μ 组和联合干预组 ASCs 细胞的总蛋白, 用 Western Blot 法检测 ALP 蛋白的表达。诱导 ASCs 细胞成骨分化 3 d 后分别检测对照组、淫羊藿苷组、2000 μ 组、联合干预组 ASCs 细胞的 Runx2、YAP、CTGF 蛋白水平的表达。

具体方法如下: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗细胞 3 次, 之后加入 RIPA 裂解液于冰上进行裂解, 再加入 1 : 50 的蛋白酶抑制剂和 1 : 100 磷酸化酶抑制剂于冰上继续裂解, 之后细胞刮刀刮取细胞收集悬液, 离心取上清。利用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量检测试剂盒对总蛋白进行定量检测, 之后将蛋白质煮沸变性, 加入上样缓

冲液后置于 -20 °C 条件下保存待用。蛋白上样量为 25 μg, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 法分离蛋白质, 将蛋白质转移到硝化纤维膜上, 用 5% 脱脂牛奶进行封闭 1 h 以避免抗体非特异性结合。然后加入相应的一抗抗体进行孵育, 4 °C 过夜。漂洗后再加入以适当比例稀释的辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗, 室温下孵育 2 h, 继续漂洗 3 次。最后采用 ECL 化学发光法对蛋白表达定量进行检测, 选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参。条带强度以凝胶成像分析系统 BioRad 软件进行相对定量分析。

(四) ALP 定量检测

将 ASCs 细胞以 5×10⁴ 个/ml 的密度种植于六孔板中, 干预细胞 3 d 和 7 d 后, 分别收获对照组、淫羊藿苷组、2000 μ 组和联合干预组的 ASCs 细胞并检测其 ALP 活性。

步骤简述如下: PBS 漂洗后, 细胞刮刀刮下细胞以 Triton X-100 处理, 然后于 4 °C 条件下离心 10 min。取 30 μl 上清, 50 μl 缓冲液和 50 μl 基质溶液混合, 37 °C 孵育 15 min。最后加入 150 μl 体积的显色液, 分光光度计读取 520 nm 长度波长下的吸光度值, 同时 BCA 法测定蛋白质浓度, ALP 活性以光密度 (optical density, OD) 值/mg 蛋白为单位。

(五) 基因检测

诱导 ASCs 成骨分化 3 d 后, 分别收获对照组、淫羊藿苷组、2000 μ 组和联合干预组的 ASCs 细胞, 提取总 RNA, 用 PCR 法检测 CTGF 和锚蛋白重复结构域 1 (ankyrin repeating domain 1, Ankrd1) 的 mRNA 表达。

诱导 ASCs 成骨分化 7 d 后, 分别收获对照组、淫羊藿苷组、2000 μ 组和联合干预组的 ASCs 细胞, 提取总 RNA, 用 PCR 法检测骨桥素 (osteopontin, OPN) 和 I 型胶原的 mRNA 表达。

具体方法如下: 收获 ASCs 细胞, PBS 轻柔漂洗, 并使用 Trizol 分别提取各组细胞的总 RNA, 按逆转录试剂盒的操作步骤逆转录得到 cDNA, 并选取逆转录产物进行实时荧光定量 RT-PCR。引物标记采用荧光染料 SYBR Green I。扩增条件如下: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 45 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共进行 30 次循环。

CTGF 引物序列: 上游 CGTTAGCCTCGCCTTGGTG, 下游 GGGAGCCGAAGTCCGAGA (NM_022266.2); Ankrd1 引物序列: 上游 CGGCTCTTGATGACCTTCG, 下游 GCATTCTCCTTGAGGCTGTC (NM_013220.1); OPN 引物序列: 上游 CAGCAACGGGAAGACCAGC, 下游 GCTTTGGAAGCTGCCTGACTG (NM_012881); COL1a

引物序列:上游 GTGGATGGCTGCACGAGTC,下游 TGAGTTTGGGTTGTTGGTCTGT(NM_053304);GAPDH 引物序列:上游 GGCAAGTTCAACGGCACAG,下游 CGCCAGTAGACTCCACGACAT(NM_017008.4)。反应结束后在 PCR 仪上读取 Ct 值,并进行相应计算,以 GAPDH 为内参。

三、统计学方法

使用 SPSS 11.0 版统计软件对数据进行统计学分析处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析检测。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、淫羊藿苷和 CTS 对 ALP 蛋白表达的影响

干预 ASCs 细胞 7 d 后,收获 ASCs 细胞检测 ALP 蛋白的表达水平(图 1)。结果显示淫羊藿苷组 ALP 蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.05$);CTS 干预(1000 μ 、2000 μ 和 3000 μ 组)的 ALP 蛋白表达水平也显著高于对照组($P < 0.05$);与 1000 μ 组和 3000 μ 组相比,2000 μ 组的 ALP 蛋白表达水平最高($P < 0.05$);与 2000 μ 组或淫羊藿苷组相比,联合干预组的 ALP 蛋白表达水平最高($P < 0.05$)。详见图 2。

二、淫羊藿苷和 CTS 对 Runx2 和 YAP 及 CTGF 蛋白表达的影响

淫羊藿苷和 2000 μ 组 Runx2 的表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$),干预 3 d 后,联合干预组的 Runx2 表达水平不仅显著高于对照组(图 3),也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μ 组($P < 0.05$)。对 YAP 蛋白和其靶基因 CTGF 蛋白的表达水平分析的结果显示,与对照组相比,淫羊藿苷或者 2000 μ 组干预并不能显著促进 YAP 蛋白的表达,但联合干预组的 YAP 表达却显著高于对照组($P < 0.05$)。淫羊藿苷组及 2000 μ 组的 CTGF 表达均显著高于对照组($P < 0.05$),联合干预组 CTGF 表达不仅显著高于对照组,也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μ 组($P < 0.05$),详见图 4。

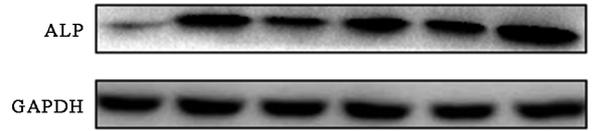


图 1 干预 7 d 后各组细胞中 ALP 蛋白表达水平的蛋白电泳图

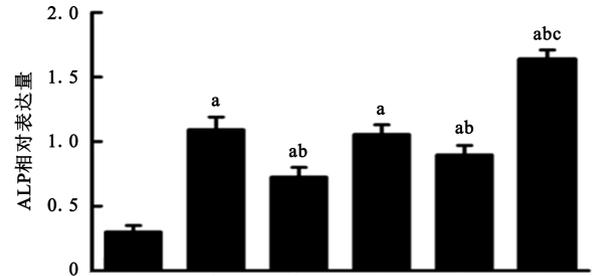


图 2 干预 7 d 后各组细胞中 ALP 蛋白表达水平的相对定量图
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 2000 μ 组比较,^b $P < 0.05$;与淫羊藿苷组比较,^c $P < 0.05$

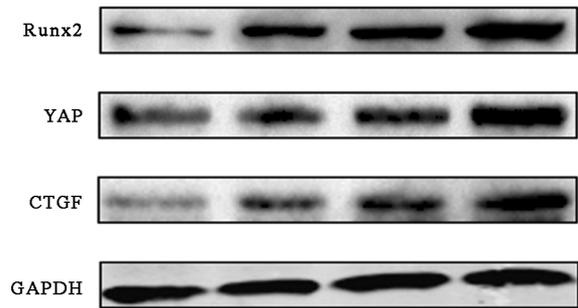


图 3 干预 3 d 后各组细胞中 Runx2 和 YAP 及 CTGF 蛋白表达水平的蛋白电泳图

三、淫羊藿苷和 CTS 对 ALP 活性的影响

干预 3 d 后,淫羊藿苷组和 2000 μ 组的 ALP 活性表达均显著高于对照组($P < 0.05$),联合干预组的 ALP 表达不仅显著高于对照组,也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μ 组($P < 0.05$);干预 7 d 后的 ALP 活性均高于干预 3 d 时的水平,淫羊藿苷组和 2000 μ 组 ALP 活性表达亦显著高于对照组($P < 0.05$),联合干预组的 ALP 表达不仅显著高于对照组,也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μ 组($P < 0.05$),详见图 5。

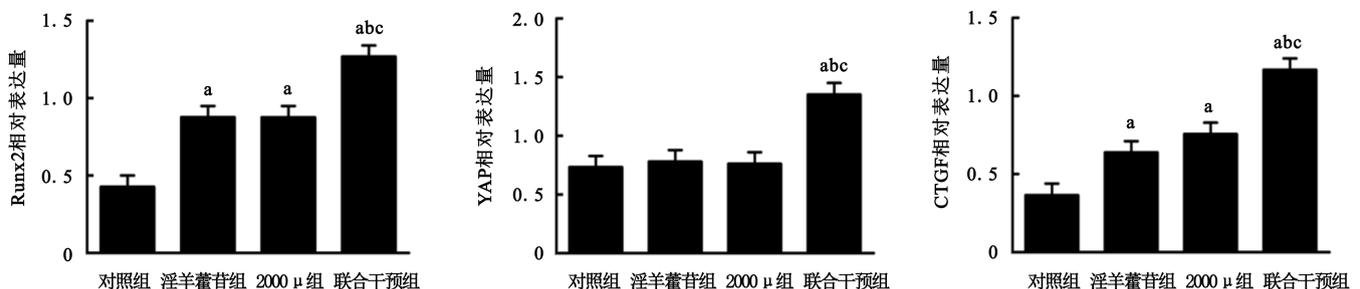
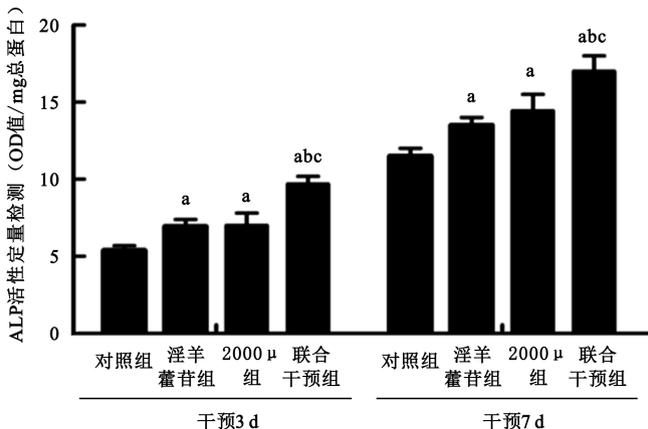


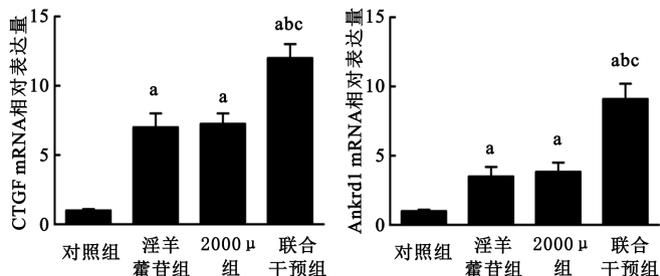
图 4 干预 3 d 后各组细胞中 Runx2 和 YAP 及 CTGF 蛋白表达水平的相对定量图
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与淫羊藿苷组比较,^b $P < 0.05$;与 2000 μ 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 干预 3 d 后各组细胞中 Runx2 和 YAP 及 CTGF 蛋白表达水平的相对定量图



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与淫羊藿苷组比较,^b $P < 0.05$;与 2000 μm 组比较,^c $P < 0.05$

图 5 干预 3 d 和 7 d 后 ALP 定量检测示意图

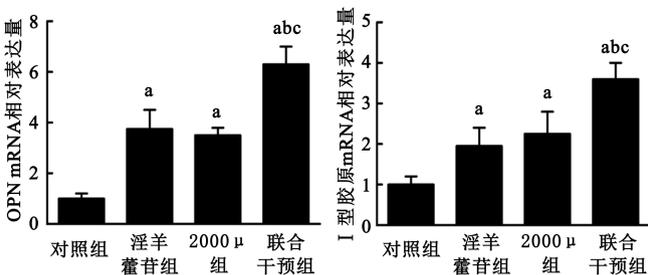


注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与淫羊藿苷组比较,^b $P < 0.05$;与 2000 μm 组比较,^c $P < 0.05$

图 7 干预 3 d 后各组细胞中 CTGF 基因和 Ankrd1 基因 mRNA 的相对表达量

四、淫羊藿苷和 CTS 对成骨分化基因骨桥素和 I 型胶原表达的影响

干预 7 d 后,淫羊藿苷组和 2000 μm 组的 OPN 及 I 型胶原 mRNA 的表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$),联合作用组的 OPN 及 I 型胶原 mRNA 的表达不仅高于对照组 ($P < 0.05$),也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μm 组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见图 6。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与淫羊藿苷组比较,^b $P < 0.05$;与 2000 μm 组比较,^c $P < 0.05$

图 6 干预 7 d 后各组细胞的骨桥素基因和 I 型胶原基因 mRNA 相对表达量

五、淫羊藿苷和 CTS 对 YAP 蛋白靶基因 CTGF 和 Ankrd1 表达的影响

干预 3 d 后,淫羊藿苷组和 2000 μm 组的 CTGF 及 Ankrd1 的 mRNA 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$),联合作用组的 CTGF 及 Ankrd1 的 mRNA 表达不仅高于对照组 ($P < 0.05$),也显著高于淫羊藿苷组和 2000 μm 组 ($P < 0.05$),详见图 7。

讨 论

骨组织工程在治疗骨缺损,促进骨折愈合等领域具有十分重要的意义^[11]。诸多研究表明,ASCs 在骨组织工程中已得到广泛应用^[12]。体内和体外研究显示,ASCs 能通过直接向成骨细胞方向分化或通过旁分泌细胞因子促进机体内源性干细胞增殖来达到促进骨

缺损修复和加速骨折愈合的目的^[13-15]。ASCs 成骨分化可受到不同生物化学因素的调控。最近的诸多研究显示,淫羊藿苷在抑制骨质疏松和促进干细胞成骨分化方面发挥着十分关键的作用。有研究表明,淫羊藿苷能通过类似雌激素机制来抑制骨质疏松发生^[16],淫羊藿苷能通过 ERα-Wnt/ β -catenin 信号通路来促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化^[17]。淫羊藿苷对大鼠 ASCs 成骨分化的作用尚缺乏深入研究。ALP 活性为最常见的测量成骨活性的指标之一,它是成骨分化最常见的蛋白质产物^[18]。本研究表明,淫羊藿苷可显著促进 ASCs 成骨分化相关基因 ALP 蛋白的表达和显著促进 ALP 活性的上调。Runx2 是成骨分化的核心调控基因,研究显示 Runx2 基因敲除能显著抑制小鼠的成骨细胞发育^[19]。本研究表明,淫羊藿苷可以显著促进大鼠 ASCs 内 Runx2 的表达。骨桥素为成骨细胞分泌的非胶原蛋白,I 型胶原为促进成骨发育的基质蛋白^[20]。本研究也表明,淫羊藿苷可促进 ASCs 内骨桥素和 I 型胶原的表达。

ASCs 成骨分化也受到生物力学因素的调控。研究显示力学干预可促进细胞成骨分化,但相关的生物力学研究大部分集中于骨细胞、成骨细胞和 BMSCs,研究生物力学因素对 ASCs 成骨分化影响的研究相对较少。有学者研究显示,CTS 能通过上调 BMP-2 表达来促进 ASCs 成骨分化^[21]。本研究结果亦进一步证实了 CTS 能够促进 ASCs 成骨分化基因 ALP 蛋白的表达,CTS 也能促进成骨分化相关基因 Runx2,骨桥素和 I 型胶原的表达。本研究也显示 2000 μm 大小的 CTS 相比于 1000 μm 和 3000 μm 而言,其促 ASCs 成骨分化能力更强。

骨组织工程中 ASCs 作为种子细胞,不仅受到生物化学因素调控,也受到生物力学因素调控,本研究对此联合作用进行了重点阐述。本研究结果表明,淫羊藿苷和 CTS 联合作用能进一步促进 ASCs 成骨分化,且能显著促进 YAP 蛋白及其靶基因 CTGF 和 Ankrd1 的表达。YAP 为最近研究发现的一个新的转录共激

活子,它与转录因子 TEAD 结合形成复合物后再与 DNA 结合并激活下游基因表达^[22]。研究显示,YAP 受到上游 Hippo 通路的调控,Hippo 通路的核心成员包括丝氨酸/苏氨酸激酶 MST1、MST2、LATS1 及 LATS2,支架蛋白 SAV1(与 MST1 和 MST2 结合)、MOB1(与 LATS1 和 LATS2 结合)。当 Hippo 通路激活的时候 YAP 蛋白发生磷酸化并被运出细胞核进入细胞质内,继而被 β -TRCP 依赖的蛋白酶体降解^[23]。本研究结果显示,虽然单独淫羊藿苷或单独 CTS 作用并不能直接促进 YAP 的表达,但其联合作用却能显著上调 YAP 表达,单独淫羊藿苷或单独 CTS 均能显著促进 YAP 靶基因 CTGF 和 Ankrd1 的表达,在淫羊藿苷和 CTS 联合作用时,其促 CTGF 和 Ankrd1 表达的效应得到进一步增强。

综上所述,淫羊藿苷和 CTS 联合作用可能通过上调 YAP 来促进 ASCs 的成骨分化,但该调控关系仍然需要采用基因敲除等方法进行进一步的深入验证。本实验对研究生物力学和生物化学因素协同作用下的 ASCs 成骨分化意义重大,有助于加深对 ASCs 生物学行为的理解及骨组织工程相关生物材料设计原则与理念的改进,也对促进骨缺损修复和加速骨折早期康复具有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(12): 685-697. DOI: 10.1038/nrrheum.2009.228.
- [2] Raisin S, Belamie E, Morille M. Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage[J]. *Biomaterials*, 2016, 104(2): 223-237. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.017.
- [3] Lu CH, Chang YH, Lin SY, et al. Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1695-1706. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.015.
- [4] Zhang X, Guo J, Zhou Y, et al. The roles of bone morphogenetic proteins and their signaling in the osteogenesis of adipose-derived stem cells[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(1): 84-92. DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0204.
- [5] Zouani OF, Kalisky J, Ibarboure E, et al. Effect of BMP-2 from matrices of different stiffnesses for the modulation of stem cell fate[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9): 2157-2166. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.007.
- [6] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [7] Ye Y, Du Y, Guo F, et al. Comparative study of the osteogenic differentiation capacity of human bone marrow- and human adipose-derived stem cells under cyclic tensile stretch using quantitative analysis[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(6): 1327-1334. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1123.
- [8] Ye Y, Hu W, Guo F, et al. Glycosaminoglycan chains of biglycan promote bone morphogenetic protein-4-induced osteoblast differentiation[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(5): 1075-1080. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1091.
- [9] Zhang D, Fong C, Jia Z, et al. Icarin stimulates differentiation and suppresses adipocytic transdifferentiation of primary osteoblasts through estrogen receptor-mediated pathway[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(2): 187-198. DOI: 10.1007/s00223-016-0138-2.
- [10] Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(7): 1072-1079. DOI: 10.1359/jbmr.070405.
- [11] El HAJ, Cartmell SH. Bioreactors for bone tissue engineering[J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224(12): 1523-1532.
- [12] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine[J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(2): 269-291. DOI: 10.1007/s12015-010-9193-7.
- [13] Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome[J]. *Biochimie*, 2013, 95(12): 2222-2228. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.06.001.
- [14] 黄敏红, 梁至洁, 梁一丹, 等. 人参皂苷 Rg1 促进脂肪干细胞体外增殖与成骨分化[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(11): 2463-2468. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.11.008.
- [15] 江淳, 郭风劲, 许涛, 等. 低强度脉冲超声波对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33(6): 408-412. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.06.004.
- [16] Xu F, Ding Y, Guo Y, et al. Anti-osteoporosis effect of Epimedium via an estrogen-like mechanism based on a system-level approach[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 177: 148-160. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.007.
- [17] Wei Q, Zhang J, Hong G, et al. Icarin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by activating the ER α -Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 931-939. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.107.
- [18] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation[J]. *FASEB J*, 1990, 4(13): 3111-3123.
- [19] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-754.
- [20] Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen[J]. *J Biochem*, 2001, 129(1): 133-138.
- [21] Yang X, Gong P, Lin Y, et al. Cyclic tensile stretch modulates osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells via the BMP-2 pathway[J]. *Arch Med Sci*, 2010, 6(2): 152-159. DOI: 10.5114/aoms.2010.13886.
- [22] Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(4): 1287-1312. DOI: 10.1152/physrev.00005.2014.
- [23] Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(1): 63-79. DOI: 10.1038/nrd4161.

(修回日期:2016-12-23)

(本文编辑:汪玲)