

· 基础研究 ·

# 镁黄长石浸提液促进人脂肪干细胞体外成骨分化的机制研究

朱旭贞<sup>1</sup>, 叶永玲<sup>1</sup>, 宋远江<sup>2</sup>, 肖治刚<sup>3</sup>, 戴建英<sup>4</sup>

(1. 浙江省杭州市中医院, 浙江 杭州 310007; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 4. 杭州市启迪生物有限公司, 浙江 杭州 311231)

**摘 要** 目的:探讨镁黄长石浸提液促进人脂肪干细胞成骨分化的机制。方法:分离培养人脂肪干细胞,制备镁黄长石浸提液母液及浓度为 1% 和 10% 的镁黄长石浸提液。采用体外培养的第 3 代人脂肪干细胞分别进行以下实验:①将接种于镁黄长石生物陶瓷材料上的第 3 代人脂肪干细胞分为 2 组, A 组以生长培养液培养、B 组以生长培养液 + 成骨诱导液培养。分别于培养开始前及培养开始后 1、4、7 d 和 10 d 提取培养液的上清液,采用电感耦合等离子体-原子发射光谱技术测定 Ca、Mg、Si 离子的浓度。②采用镁黄长石浸提液母液 + 成骨诱导液培养第 3 代人脂肪干细胞,分别在培养开始后 1、4、7、10、14、17、21 d 以 Western Blot 法检测细胞的细胞外调节蛋白激酶和磷酸化细胞外调节蛋白激酶的表达情况,同时在培养开始后 4、10、14、17 d 测定碱性磷酸酶含量。③将培养的第 3 代人脂肪干细胞分为 4 组, I 组以生长培养液 + 成骨诱导液培养、II 组以 1% 镁黄长石浸提液 + 成骨诱导液培养、III 组以 10% 镁黄长石浸提液 + 成骨诱导液培养、IV 组以镁黄长石浸提液母液 + 成骨诱导液培养。培养至第 10 天时,以 Western Blot 法检测 4 组细胞的细胞外调节蛋白激酶和磷酸化细胞外调节蛋白激酶的表达情况,并测定碱性磷酸酶定量含量。结果:①人脂肪干细胞体外培养过程中镁黄长石析出离子浓度。培养过程中不同时间点的 Ca 离子浓度不同( $P=0.001$ ); 2 组 Ca 离子浓度总体有差别( $P=0.001$ ),进一步比较, A 组各时间点 Ca 离子浓度均高于 B 组[0 d:  $(1.65 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.51 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 1 d:  $(4.78 \pm 0.18) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.56 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d:  $(3.27 \pm 0.11) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.90 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d:  $(3.24 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.03 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d:  $(3.14 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.13 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.000$ ]; 时间因素与分组因素存在交互效应( $P=0.001$ )。培养过程中不同时间点的 Mg 离子浓度不同( $P=0.001$ ); 2 组 Mg 离子浓度总体有差别( $P=0.001$ ),进一步比较显示,除 0 d 外,其余各时点 A 组 Mg 离子浓度均高于 B 组[0 d:  $(0.09 \pm 0.00) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.09 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.407$ ; 1 d:  $(0.46 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.27 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d:  $(0.27 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.13 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d:  $(0.26 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.18 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d:  $(0.24 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.17 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ]; 时间因素与分组因素存在交互效应( $P=0.001$ )。培养过程中不同时间点的 Si 离子浓度不同( $P=0.001$ ); 2 组 Si 离子浓度总体有差别( $P=0.001$ ),进一步比较,除 0 d 外,其余各时点 A 组 Si 离子浓度均高于 B 组[0 d:  $(0.01 \pm 0.00) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.01 \pm 0.00) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=1.000$ ; 1 d:  $(2.52 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.05 \pm 0.06) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d:  $(1.71 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(0.53 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d:  $(1.91 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.14 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d:  $(1.88 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.24 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ]; 时间因素与分组因素存在交互效应( $P=0.001$ )。②镁黄长石浸提液作用时间对人脂肪干细胞成骨分化的影响。磷酸化细胞外调节蛋白激酶在第 7 天开始表达,第 10 天和第 14 天时表达量最高,第 17 天时表达量又降至基础水平。第 4 天、第 10 天、第 14 天、第 17 天 ALP 含量比较,差异有统计学意义[ $(3.68 \pm 0.80) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(7.90 \pm 0.50) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(7.79 \pm 0.53) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(6.93 \pm 0.86) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $P=0.000$ ]。进一步两两比较,第 4 天时 ALP 含量低于其余 3 个时间点( $P=0.000$ ),其余各时点两两比较,差异均无统计学意义。③镁黄长石浸提液浓度对人脂肪干细胞成骨分化的影响。体外培养至第 10 天时,各组细胞的细胞外调节蛋白激酶表达量基本相同,而磷酸化细胞外调节蛋白激酶的表达量略有差异,其中 II 组表达量最高。各组细胞 ALP 含量比较,差异有统计学意义[ $(5.26 \pm 0.25) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.76 \pm 0.15) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.32 \pm 0.20) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.32 \pm 0.25) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $P=0.024$ ]。进一步两两比较, II 组含量高于其余 3 组( $P=0.010$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.007$ ),其余各组两两比较,差异均无统计学意义。结论:镁黄长石浸提液可以促进人脂肪干细胞成骨分化,且具有浓度依赖性,其机制可能与镁黄长石析出的 Ca、Mg、Si 离子激活细胞外调节蛋白激酶转导通路有关。

**关键词** 干细胞 人脂肪干细胞 细胞外调节蛋白激酶 镁黄长石

# Mechanistic studies on the extracts from akermanite promoting the human adipose derived stem cell osteogenic differentiation in vitro

ZHU Xu-zhen\*, YE Yong-ling, SONG Yuan-jiang, XIAO Zhi-gang, DAI Jian-ying.

\* Traditional Chinese Medical Hospital of Hangzhou City, Hangzhou 310007, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of extracts from akermanite promoting the human adipose derived stem cell (HADSC) osteogenic differentiation in vitro. **Methods:** Separation culture was carried on HADSC, original extracts from akermanite and the extracts with concentrations of 1% and 10% were respectively prepared. The following experiments were respectively carried on the third generation of HADSC. ① The cells inoculated on the akermanite bioceramics were divided into 2 groups, group A was cultured in growth media, group B was cultured in growth media combined with osteogenesis induced liquid. The supernatant of the culture solution was carried out before the culture and 1, 4, 7 and 10 days after the culture, then the concentrations of calcium ions, magnesium ions and silicium ions were detected through inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). ② The cells were cultured in original extracts from akermanite combined with osteogenesis induced liquid. The contents of extracellular regulated protein kinases (ERK) and phosphorylation ERK were detected through Western Blot technique on 1, 4, 7, 10, 14, 17 and 21 days after culture, and the contents of alkaline phosphatase (ALP) were detected on 4, 10, 14 and 17 days after culture. ③ The cells were divided into 4 groups, group I was cultured in growth media combined with osteogenesis induced liquid, group II was cultured in 1% extracts from akermanite combined with osteogenesis induced liquid, group III was cultured in 10% extracts from akermanite combined with osteogenesis induced liquid, group IV was cultured in original extracts from akermanite combined with osteogenesis induced liquid. After culturing for 10 days, the contents of ERK and phosphorylation ERK were detected through Western Blot method, and the contents of ALP were detected. **Results:** ① The concentrations of calcium ions were different at different time points in the process of culture ( $P=0.001$ ). There was total difference in the concentrations of calcium ions between the 2 groups ( $P=0.001$ ). Further multiple comparison indicated that the concentrations of calcium ions at different time points of group A were all higher than those of group B (0 d:  $1.65 \pm 0.03$  mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (1.51  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 1 d: (4.78  $\pm$  0.18) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (2.56  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d: (3.27  $\pm$  0.11) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (1.90  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d: (3.24  $\pm$  0.03) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (2.03  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d: (3.14  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (2.13  $\pm$  0.03) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.000$ ). There was interaction effect between time factor and group factor ( $P=0.001$ ). The concentrations of magnesium ions were different at different time points in the process of culture ( $P=0.001$ ). There was total difference in the concentrations of magnesium ions between the 2 groups ( $P=0.001$ ). Further multiple comparison indicated that the concentrations of magnesium ions at different time points of group A were all higher than those of group B except that on 0 d [0 d: (0.09  $\pm$  0.00) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.09  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.407$ ; 1 d: (0.46  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.27  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d: (0.27  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.13  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d: (0.26  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.18  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d: (0.24  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.17  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ]. There was interaction effect between time factor and group factor ( $P=0.001$ ). The concentrations of silicium ions were different at different time points in the process of culture ( $P=0.001$ ). There was total difference in the concentrations of silicium ions between the 2 groups ( $P=0.001$ ). Further multiple comparison indicated that the concentrations of silicium ions at different time points of group A were all higher than those of group B except that on 0 d [0 d: (0.01  $\pm$  0.00) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.01  $\pm$  0.00) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=1.000$ ; 1 d: (2.52  $\pm$  0.02) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (2.05  $\pm$  0.06) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 4 d: (1.71  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (0.53  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 7 d: (1.91  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (1.14  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ; 10 d: (1.88  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , (1.24  $\pm$  0.01) mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ,  $P=0.001$ ]. There was interaction effect between time factor and group factor ( $P=0.001$ ). ② Expression of phosphorylation ERK was started at the 7th day, and the contents of phosphorylation ERK reached the highest level at the 10th day and the 14th day, while the contents of phosphorylation ERK returned to the basic level at the 17th day. There was statistical difference in the contents of ALP among different time points (the 4th day: (3.68  $\pm$  0.80) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , the 10th day: (7.90  $\pm$  0.50) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , the 14th day: (7.79  $\pm$  0.53) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , the 17th day: (6.93  $\pm$  0.86) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ ;  $P=0.000$ ). Further multiple comparison indicated that the contents of ALP at the 4th day was lower than that of the rest 3 time points ( $P=0.000$ ), while there were no statistical differences between the other time points. ③ The contents of ERK for all the groups were the same basically at the 10th day, while the contents of phosphorylation ERK of group II was the highest among the 4 groups. There was statistical difference in the contents of ALP among the 4 groups ((5.26  $\pm$  0.25) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , (5.76  $\pm$  0.15) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , (5.32  $\pm$  0.20) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ , (5.32  $\pm$  0.25) nmol PNP  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ ;  $P=0.024$ ). Further multiple comparison indicated that the contents of ALP of group II was higher than that of the rest 3 groups ( $P=0.010$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.007$ ), while there were no statistical differences between the other

groups. Conclusion: The extracts from akermanite can improve osteogenetic differentiation of HADSC with the feature of concentration dependency, and its mechanism may have relationships with ERK signal transduction pathway activated by calcium ions, magnesium ions and silicium ions from extracts from akermanite.

**Key words** Stem cells; Human adipose derived stem cell; Extracellular regulated protein kinases; Akermanite

镁黄长石是一种新近发现的生物材料,具有力学性能和生物相容性好、降解速率容易控制的优点及促进种子细胞成骨分化的能力<sup>[1-3]</sup>。同时,镁黄长石浸提液中的 Ca、Mg、Si 离子可有效促进成骨细胞和人骨髓间充质干细胞的体外成骨分化<sup>[3-5]</sup>。体内和体外实验均已证实人脂肪干细胞(human adipose derived stem cell, HADSC)能分化形成骨组织,而且来源丰富、对供体损伤小,目前已成为骨组织工程的重要种子细胞来源<sup>[6]</sup>。笔者对镁黄长石浸提液促进 HADSC 体外成骨分化的机制进行了研究,现报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** 镁黄长石生物陶瓷(中国科学院上海硅酸盐研究所);脂肪组织(来自上海交通大学医学院附属第九人民医院整形外科接受腹部脂肪抽吸术的健康女性,所有操作均获得上海交通大学医学院伦理研究委员会认可)。

**1.2 实验试剂** I 型胶原酶(Washington Biochemical 公司);LG-DMEM(Gibco 公司);PBS、FBS(Hyclone 公司);红细胞裂解缓冲液、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)定量检测试剂盒、对硝基酚(p-Nitrophenol, PNP)、鼠抗人  $\beta$ -actin 单抗(Sigma 公司);鼠抗人细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)单抗、鼠抗人 p-ERK 单抗(Cell Signaling Technology 公司)。

**1.3 实验仪器** 超净工作台(上海医疗器械公司);恒温摇床(太仓市华美生化仪器厂);TE300 型倒置相差显微镜(Nikon 公司);Varioskan 全波段酶标仪(Thermo Electron 公司);电感耦合等离子体-原子发射光谱仪(inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES)(Varian 公司)。

## 2 方法

**2.1 分离培养 HADSC** 将所获得的脂肪组织以 PBS 清洗 3 遍,以 0.075% I 型胶原酶在 37℃ 条件下振荡消化 60 min。以含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养液终止消化,1 200 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心半径 15 cm),将获得的高密度间质组织细胞团以红细胞裂

解液处理 5 min 除去掺杂的红细胞,再用直径 100  $\mu$ m 的筛网除去未完全消化的组织。将所获得细胞以生长培养液(LG-DMEM、10% FBS、100 mg · mL<sup>-1</sup> 链霉素、100 单位 · mL<sup>-1</sup> 青霉素)重悬,按  $4 \times 10^4$  个 · cm<sup>-2</sup> 接种于直径 100 mm 的培养皿中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度条件下常规培养,每 3 d 换液 1 次。当细胞长至 70% ~ 80% 融合状态时按 1:3 的比例传代,选用第 3 代细胞进行实验。

**2.2 检测 HADSC 体外培养过程中镁黄长石析出离子** 以三蒸水将直径 10 mm、高 0.8 mm 的实心圆片状镁黄长石生物陶瓷材料清洗 3 遍,在 125℃、0.14 MPa 条件下消毒 30 min,待温度降至室温后放入培养板中,每孔 1 片。将培养的第 3 代 HADSC 以  $3 \times 10^3$  个 · cm<sup>-2</sup> 的浓度接种于镁黄长石陶瓷材料上,分为 2 组, A 组以生长培养液培养、B 组以生长培养液 + 成骨诱导液(0.01  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>, 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub>、50  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 维生素 C 磷酸酯、10 mmol · L<sup>-1</sup>  $\beta$ -磷酸甘油)培养,每孔 2 mL,24 h 后全部换液,以后每隔 3 天换液 1 次。分别于培养开始后 0 d(未浸泡镁黄长石的培养液)、1 d、4 d、7 d 和 10 d 提取培养液的上清液,于 -20℃ 保存。待样本全部收齐后采用 ICP-AES 技术测定 Ca、Mg、Si 离子的浓度。

**2.3 制备镁黄长石浸提液** 以三蒸水将直径 10 mm、高 0.8 mm 的实心圆片状镁黄长石生物陶瓷材料清洗 3 遍,在 125℃、0.14 MPa 条件下消毒 30 min,然后以生长培养液浸泡 3 d 得到镁黄长石浸提液母液,并以生长培养液将母液分别稀释成 1% 和 10% 两种浓度的镁黄长石浸提液保存备用。

**2.4 检测镁黄长石浸提液作用时间对 HADSC 成骨分化的影响** 将培养的第 3 代 HADSC 以  $3 \times 10^3$  个 · cm<sup>-2</sup> 的浓度接种于培养板上,采用镁黄长石浸提液母液 + 成骨诱导液培养,24 h 后全部换液,以后每隔 3 天换液 1 次。分别在培养开始后 1 d、4 d、7 d、10 d、14 d、17 d、21 d 以 Western Blot 法检测细胞表达 ERK 和 p-ERK 的情况;在培养开始后 4 d、10 d、14 d、17 d 采用文献[7]的方法进行 ALP 定量检测。

**2.5 检测镁黄长石浸提液浓度对 HADSC 成骨分化**

**的影响** 将培养的第 3 代 HADSC 以  $3 \times 10^3$  个  $\cdot \text{cm}^{-2}$  的浓度接种于培养板上,分为 4 组,Ⅰ组以生长培养液 + 成骨诱导液培养、Ⅱ组以 1% 镁黄长石浸提液 + 成骨诱导液培养、Ⅲ组以 10% 镁黄长石浸提液 + 成骨诱导液培养、Ⅳ组以镁黄长石浸提液母液 + 成骨诱导液培养。培养至第 10 天时,以 Western Blot 法检测 4 组细胞 ERK 和 p-ERK 的表达情况,并采用文献[7]的方法进行 ALP 定量检测。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计分析,各组HADSC体外培养过程中镁黄长石析出离子浓度的比较采用重复测量资料的方差分析,HADSC 体外培养过程中各时点 ALP 表达量的比较和 HADSC 体外培养第 10 天时各浸提液组 ALP 表达量的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

表 1 HADSC 体外培养过程中镁黄长石析出的 Ca 离子浓度  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	0 d	1 d	4 d	7 d	10 d	合计	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	1.65 ± 0.03	4.78 ± 0.18	3.27 ± 0.11	3.24 ± 0.03	3.14 ± 0.02	3.22 ± 1.03	211.820	0.001
B 组	1.51 ± 0.01	2.56 ± 0.02	1.90 ± 0.01	2.03 ± 0.02	2.13 ± 0.03	2.03 ± 0.35	133.810	0.001
合计	1.58 ± 0.08	3.668 ± 1.22	2.56 ± 0.75	2.64 ± 0.66	2.63 ± 0.55	2.62 ± 0.97	376.264 <sup>1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>
<i>t</i> 值	-7.803	-22.030	-21.286	-60.110	57.225	-32.131 <sup>1)</sup>	$(F=100.376, P=0.001)^{2)}$	
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001 <sup>1)</sup>		

注 1)主效应的 *F* 值(或 *t* 值)和 *P* 值;2)交互效应的 *F* 值和 *P* 值

表 2 HADSC 体外培养过程中镁黄长石析出的 Mg 离子浓度  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	0 d	1 d	4 d	7 d	10 d	合计	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	0.09 ± 0.00	0.46 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.12	439.890	0.001
B 组	0.09 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.06	248.510	0.001
合计	0.09 ± 0.01	0.36 ± 0.10	0.20 ± 0.07	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.22 ± 0.11	668.432 <sup>1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>
<i>t</i> 值	-0.926	-16.360	-18.273	-14.104	-10.063	-13.143 <sup>1)</sup>	$(F=81.538, P=0.001)^{2)}$	
<i>P</i> 值	0.407	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001 <sup>1)</sup>		

注 1)主效应的 *F* 值(或 *t* 值)和 *P* 值;2)交互效应的 *F* 值和 *P* 值

表 3 HADSC 体外培养过程中镁黄长石析出的 Si 离子浓度  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	0 d	1 d	4 d	7 d	10 d	合计	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	0.01 ± 0.00	2.52 ± 0.02	1.71 ± 0.01	1.91 ± 0.01	1.88 ± 0.01	1.61 ± 0.88	8 869.020	0.001
B 组	0.01 ± 0.00	2.05 ± 0.06	0.53 ± 0.01	1.14 ± 0.01	1.24 ± 0.01	0.99 ± 0.72	2 795.880	0.001
合计	0.01 ± 0.00	2.28 ± 0.26	1.12 ± 0.65	1.53 ± 0.42	1.56 ± 0.35	1.30 ± 0.85	10 600.000 <sup>1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>
<i>t</i> 值	0.001	-14.346	-139.742	-79.750	-76.230	-45.104 <sup>1)</sup>	$(F=709.740, P=0.001)^{2)}$	
<i>P</i> 值	1.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001 <sup>1)</sup>		

注 1)主效应的 *F* 值(或 *t* 值)和 *P* 值;2)交互效应的 *F* 值和 *P* 值。

**3.2 镁黄长石浸提液作用时间对 HADSC 成骨分化的影响** Western Blot 测定结果显示 p-ERK 在第 7 天开始表达,第 10 天和第 14 天 2 个时间点 p-ERK 表达量最高,第 17 天时 p-ERK 表达量又降至基础水

3 结 果

**3.1 HADSC 体外培养过程中镁黄长石析出离子浓度** ①Ca 离子浓度:培养过程中不同时间点的 Ca 离子浓度不同;2 组 Ca 离子浓度总体有差别,进一步比较,A 组各时间点 Ca 离子浓度均高于 B 组;时间因素与分组因素存在交互效应(表 1)。②Mg 离子浓度:培养过程中不同时间点的 Mg 离子浓度不同;2 组 Mg 离子浓度总体有差别,进一步比较,除 0 d 外,其余各时点 A 组 Mg 离子浓度均高于 B 组;时间因素与分组因素存在交互效应(表 2)。③Si 离子浓度:培养过程中不同时间点的 Si 离子浓度不同;2 组 Si 离子浓度总体有差别,进一步比较,除 0 d 外,其余各时点 A 组 Si 离子浓度均高于 B 组;时间因素与分组因素存在交互效应(表 3)。

平(图 1)。第 4 天、第 10 天、第 14 天、第 17 天 ALP 含量比较,差异有统计学意义[ $(3.68 \pm 0.80) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(7.90 \pm 0.50) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(7.79 \pm 0.53) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,

$(6.93 \pm 0.86) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $F = 25.556$ ,  $P = 0.000$ 。进一步两两比较,第 4 天时 ALP 含量低于其余 3 个时间点 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ),其余各时点两两比较,差异均无统计学意义。

**3.3 镁黄长石浸提液浓度对 HADSC 成骨分化的影响** Western Blot 检测结果显示,体外培养至第 10 天时,各组细胞 ERK 的表达基本相同,而 p-ERK 的表达略有差异,其中 II 组 p-ERK 表达最强(图 2)。各

组细胞 ALP 含量比较,差异有统计学意义 [ $(5.26 \pm 0.25) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.76 \pm 0.15) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.32 \pm 0.20) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $(5.32 \pm 0.25) \text{ nmol PNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $F = 5.498$ ,  $P = 0.024$ ]。进一步两两比较,II 组含量高于其余 3 组 ( $P = 0.010$ ,  $P = 0.020$ ,  $P = 0.007$ ),其余各组两两比较,差异均无统计学意义。

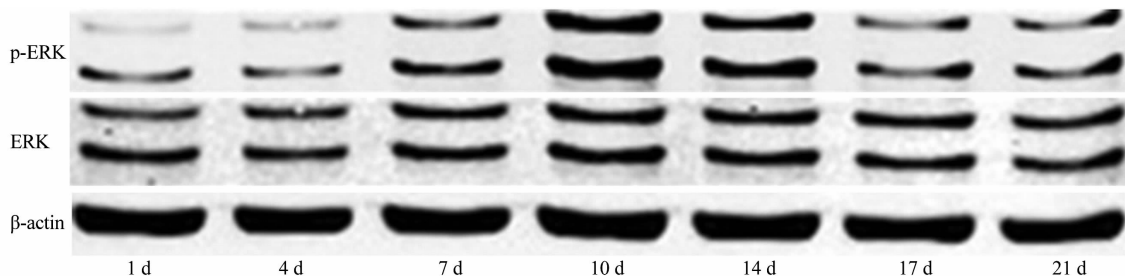


图 1 镁黄长石浸提液不同作用时间 HADSC 表达 ERK 和 p-ERK 的情况



图 2 镁黄长石浸提液不同浓度下 HADSC 表达 ERK 和 p-ERK 的情况

## 4 讨论

培养液中的各种离子通过作用于细胞膜离子受体,启动相应的信号转导通路以调控细胞移行、增殖和分化等生理活动。Zhang 等<sup>[8]</sup>有关 HADSC 体外成骨分化机制的研究结果显示,ERK 信号转导通路的启动对于调控 HADSC 的成骨分化起着至关重要的作用。本研究中镁黄长石浸提液作用时间对 HADSC 成骨分化影响的研究结果提示,ERK 信号转导通路的启动与 HADSC 成骨分化的进程在时间上是一致的。

吴成铁<sup>[9]</sup>有关镁黄长石粉体浸提液对 L929 成纤维细胞系和成骨细胞体外增殖影响的研究结果显示,含  $\text{Ca } 0.54 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg } 2.96 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Si } 4.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的镁黄长石粉体浸提液最能刺激 L929 成纤维细胞系的增殖,而含  $\text{Ca } 0.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg } 0.29 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Si } 1.41 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的镁黄长石粉体浸提液对成骨细胞的增殖促进作用最明显。这说明培养液中的活性离子对于特定细胞的增殖作用与其浓度相关,且不同细胞对同一种离子的反应也不尽相同。本实验中 Western Blot 的检测结果显示,

II 组 p-ERK 表达量最高,对应的 ALP 含量也最高。结合 HADSC 体外培养过程中各时点 B 组镁黄长石析出的离子浓度均较 A 组降低,说明镁黄长石浸提液中的 Ca、Mg、Si 离子参与了 HADSC 的成骨分化,而且这些离子对 HADSC 成骨分化的作用具有浓度依赖性。文献<sup>[2,10-13]</sup>的研究结果也表明,生物材料在培养过程中释放到培养液中的 Ca、Mg、Si 等离子能够显著增强成骨细胞的黏附、增殖及分化能力,其作用的发挥需要将离子浓度控制在一定范围内。

多种离子共同作用于细胞具有协同效应,细胞特定生理功能的变化可能是多种离子启动多条信号转导通路并彼此相互影响所引起的。信号转导通路彼此之间的“交谈”对于调控细胞的各项生理活动具有极其重要的作用<sup>[8,14]</sup>。因此,镁黄长石浸提液促进 HADSC 体外成骨分化,可能是镁黄长石析出的 Ca、Mg、Si 离子在原培养液的基础上共同作用的结果。

本研究的结果提示,镁黄长石浸提液可以促进 HADSC 成骨分化,且具有浓度依赖性,其机制可能与镁黄长石析出的 Ca、Mg、Si 离子激活 ERK 转导通路有关。

## 5 参考文献

- [1] Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications[J]. *Biomaterials*, 1991, 12(2): 155 - 163.
- [2] Wu C, Chang J. Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 83(1): 153 - 160.
- [3] Wu C, Chang J, Ni S, et al. In vitro bioactivity of akermanite ceramics[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(1): 73 - 80.
- [4] Wu C, Chang J, Zhai W, et al. Porous akermanite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 78(1): 47 - 55.
- [5] Sun H, Wu C, Dai K, et al. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow - derived stromal cells on akermanite - bioactive ceramics[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(33): 5651 - 5657.
- [6] 程海兵. 人脂肪干细胞在骨组织工程中应用的研究进展[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 07(4): 231 - 234.
- [7] 谷辉杰, 巩伦理, 张昀, 等. 镁黄长石浸提液影响人脂肪干细胞增殖和成骨分化的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2010, 6(6): 301 - 305.
- [8] Zhang LL, Wei W, Wang QT, et al. Cross - talk between MEK1/2 - ERK1/2 signaling and G protein - couple signaling in synoviocytes of collagen - induced arthritis rats[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(22): 2278 - 2283.
- [9] 吴成铁. Ca - Si - M 系列硅酸盐生物陶瓷的制备及性能研究[D]. 上海: 中国科学院上海硅酸盐研究所, 2006.
- [10] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 59(2): 312 - 317.
- [11] Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 68(4): 640 - 650.
- [12] Abed E, Moreau R. Importance of melastatin - like transient receptor potential 7 and cations (Magnesium, Calcium) in human osteoblast - like cell proliferation[J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(6): 849 - 865.
- [13] Valerio P, Pereira MM, Goes AM, et al. The effect of Ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 2941 - 2948.
- [14] Saxena NK, Taliaferro - Smith L, Knight BB, et al. Bidirectional crosstalk between leptin and insulin - like growth factor - I signaling promotes invasion and migration of breast Cancer cells via transactivation of epidermal growth factor receptor[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9712 - 9722.

(2013-02-16 收稿 2013-04-17 修回)

## · 通 知 ·

### 平乐郭氏筋伤手法诊疗软组织疼痛学术研讨会征文通知

筋伤手法是治疗筋伤疾病的常用外治法,平乐郭氏筋伤手法治疗软组织疼痛颇具特色,在同行业中具有领先水平。为了加强筋伤手法的学术交流,促进筋伤手法创新发展,由中华中医药学会主办、河南省中医药学会、河南省洛阳正骨医院、《世界中西医结合杂志》、《中医正骨》杂志、《风湿病与关节炎》杂志承办的“平乐郭氏筋伤手法诊疗软组织疼痛学术研讨会”拟于2013年8月在洛阳召开。

会议将邀请国内著名专家做专题讲座,介绍筋伤手法的最新研究成果和先进经验。敬请各位同道踊跃投稿并积极参会。论文经评审录用后,将收入“学术论文集”;参加会议者可获得国家级继续教育 I 类学分。现将会议征文有关事项通知如下。

#### 一、征文内容

①当前软组织疼痛领域的热点问题透析。②筋伤手法的技巧、适应证及并发症的处理。③平乐郭氏筋伤手法的特色及诊疗经验的应用与推广。④筋伤手法治疗的其他方面。

#### 二、征文要求

①应为未公开发表的论文,要求具有科学性、实用性,论据翔实、论证充分、文字精练、重点突出。②全文 5 000 字以内,并附 300 字以内的摘要及关键词。③稿件用标准 A4 纸排版,标题采用 3 号宋体字,摘要与关键词采用小 5 号宋体字;作者姓名及单位名称采用小 4 号楷体字,注明单位具体科室、通讯地址、邮编、电子邮箱及联系电话。④请将稿件发送至 fsbygy2012@163.com,并注明“平乐郭氏筋伤手法诊疗软组织疼痛学术研讨会”征文投稿。

#### 三、截稿日期

2013 年 7 月 20 日(以电子邮件发送时间为准)。

#### 四、联系方式

- 1.《世界中西医结合杂志》编辑部 联系人:李绍林、郭文芳 电话(传真):010-64822253 E-mail:sjzxyjh@126.com
- 2.《中医正骨》杂志编辑部 联系人:王智勇 电话:0379-63546705 E-mail:zyzg1989@126.com
- 3.《风湿病与关节炎》杂志编辑部 联系人:姜玉铃 电话:010-64822337 E-mail:fsbygy@163.com

中华中医药学会学术部