

# 玛咖醇提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的作用

何琴<sup>1</sup>, 钟燕<sup>1</sup>, 范苏苏<sup>1</sup>, 朱振东<sup>2\*</sup>, 张旋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明

<sup>2</sup>云南省第三人民医院心血管内科/云南中医药大学综合实践教学基地, 云南 昆明

收稿日期: 2021年9月13日; 录用日期: 2021年10月6日; 发布日期: 2021年10月18日

## 摘要

目的: 初步探讨玛咖醇提取物(MAE)对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化的影响。方法: 黑玛咖用乙醇浸泡后旋转蒸发制备玛咖醇提取物浸膏。分离SD大鼠的股骨和胫骨利用全骨髓贴壁方法在体外培养BMSCs, 通过细胞表面标志鉴定细胞; 细胞传代培养至第3代, 将浸膏用成骨诱导培养基稀释为不同浓度(0、1.25、2.5、5、10 mg/ml)作用于BMSCs, 以不含药物的培养基作为空白对照, 采用CCK-8法检测MAE对BMSCs增殖与毒性, 利用茜素红染色观察钙化结节形成的数量, 评价MAE对BMSCs成骨分化的影响。结果: MAE浸膏1 g相当于原材料5 g; 大鼠BMSCs流式鉴定结果为CD45: 4.53%, CD44: 71.4%, CD90+: 85.6%, 细胞纯度较好; MAE对BMSCs的IC<sub>50</sub>是8.445 mg/ml, 且MAE呈剂量依赖性抑制细胞增殖, 药物浓度为2.5 mg/ml时细胞增殖最为明显, 此时茜素红染色强度最强。结论: MAE能够诱导大鼠BMSCs向成骨细胞分化, 且最佳作用浓度为2.5 mg/ml。

## 关键词

玛咖, 骨髓间充质干细胞, 成骨分化, 骨质疏松

# Effect of Maca Alcohol Extract Promotes Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Qin He<sup>1</sup>, Yan Zhong<sup>1</sup>, Susu Fan<sup>1</sup>, Zhendong Zhu<sup>2\*</sup>, Xuan Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming

\*通讯作者。

文章引用: 何琴, 钟燕, 范苏苏, 朱振东, 张旋. 玛咖醇提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的作用[J]. 临床医学进展, 2021, 11(10): 4529-4536. DOI: 10.12677/acm.2021.1110665

Medical University, Kunming Yunnan

<sup>2</sup>Department of Cardiovascular Diseases, The Third People's Hospital of Yunnan Province/Comprehensive Practical Teaching Base of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan

Received: Sep. 13<sup>th</sup>, 2021; accepted: Oct. 6<sup>th</sup>, 2021; published: Oct. 18<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of maca alcohol extract on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods:** Black maca was soaked in ethanol and then rotary evaporation was used to prepare maca alcohol extract (MAE). The bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated from femur and tibia of SD rats. BMSCs were cultured *in vitro* by whole bone marrow adherent method and identified by cell surface markers. The cells were subcultured to the third generation, and MAE was diluted into different concentrations (0, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL) in osteogenic induction medium to treat BMSCs. The drug-free medium was used as blank control, and the proliferation and toxicity of MAE on BMSCs were detected by CCK-8 method. Alizarin red staining was used to observe the number of calcified nodules and evaluate the effect of MAE on osteogenic differentiation of BMSCs. **Results:** 1 g MAE was equivalent to 5 g raw material; flow cytometric identification results were CD45: 4.53%, CD44: 71.4%, CD90+: 85.6%, the cell purity was good; the IC<sub>50</sub> of stem cells was 8.445 mg/ml, and the MAE inhibits cell proliferation in a dose-dependent manner. The cell proliferation was most obvious when the drug concentration was 2.5 mg/ml. At this time, the intensity of Alizarin Red staining was the strongest. **Conclusion:** MAE can promote BMSCs to differentiate into osteoblasts, and the optimal concentration is 2.5 mg/ml.

## Keywords

Maca, BMSCs, Osteogenic Differentiation, Osteoporosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种进行性全身性骨骼疾病,其主要特征为骨量降低、骨组织微结构恶化和骨孔隙增加,导致脆性增加[1]。前期无明显临床表现,随着骨量进一步的丢失,患病者会出现腰背酸软疼痛,脊柱变形,严重者可发生骨折而致残,易发群体主要包括绝经后妇女以及中老年人[2]。根据流行病学调查显示:在我国,50岁以上人群患有骨质疏松的总发病率为19.2%,而其中65岁以上女性发病率高达51.6%,因此骨质疏松症成为急需解决的影响中老年人健康的问题。对于此病的治疗目前临床首先药物治疗,但是抗骨质疏松的药物有许多不良反应,例如降钙素导致的恶心呕吐,双磷酸盐长期使用易发生反流性食管炎,停药后还会导致骨质溶解率升高和骨量减少[3]。于此开发安全有效用于预防和治疗骨质疏松症的新型药物十分必要。

玛咖属于十字花科植物,原产南美洲安第斯山脉,是传统的保健食品,除含有多种营养成分外,还含有玛咖酰胺、玛咖烯、芥子油苷及其衍生物、固醇等多种活性物质。研究表明,玛咖具有改善性功能、

提高生育能力、抗骨质疏松等多种功效,且毒性小、食用安全[4] [5]。目前关于玛咖醇提取物对骨髓间充质干细胞的研究较少,现以大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)为研究对象,初步观察玛咖醇提取物(Maca alcohol extract, MAE)对体外培养的BMSCs向成骨分化的影响。

## 2. 材料和方法

### 2.1. MAE 的制备

本研究采用丽江黑玛咖(标本编号 20200623),由昆明医科大学药学院陆露研究员鉴定为黑玛咖,将其制备成玛咖粉,称取适量的玛咖粉,按物料比 1:10(玛咖:乙醇)加入 95%乙醇搅拌浸泡 48 h,随后经过滤后收集上清液,剩余残渣用同等体积的 95%乙醇继续搅拌浸泡 48 h,过滤后混合两次收集的上清液。使用旋转蒸发仪制备 MAE 浸膏,待液体变粘稠鼓泡,停止旋蒸,加入少量甲醇除去水分,甲醇旋蒸完后收集浸膏,室温放置一夜后 4℃保存备用。

### 2.2. SD 大鼠 BMSCs 的原代提取培养与细胞表面标志物鉴定

选取昆明医科大学实验动物部提供的 SPF 级健康雄性大鼠,体重为 80~100 g。首先麻醉处死,于 75%乙醇中浸泡 10 min 后转移至超净台工作,在无菌的条件下取出大鼠两只后腿的股骨与胫骨,剔除附着在表面的多余组织并用 PBS 冲洗干净。将骨干两端的骨骺剪断随后暴露骨髓腔,用 5 ml 注射器吸取 DMEM 培养基轻轻冲洗骨髓腔,直至骨组织变得透明且里面无骨髓组织。将含有骨髓的培养基收集后吹匀,1000 r/min 离心 5 min。倒弃上清,加入 1 ml 含有 15%胎牛血清的 DMEM 培养基进行重悬,每只大鼠所提取的细胞接种在 1 个 T75 细胞培养瓶中并与环境控制在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。48 h 进行换液,以后每次 3 天进行后换液,细胞长满后进行传代,或者按照 9:1(血清:DMSO)进行冻存,后续实验选择第 3~4 代细胞。以上动物实验操作符合动物实验伦理规范,并经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准。

将培养至第 3 代细胞加入胰酶消化,离心后收集转移至流式管中加入标记抗体,孵箱孵育 30 min,再次离心收集细胞用 4℃预冷 PBS 充分吹打漂洗。按照流式说明书加入 PE 标记的 CD45、FITC 标记的 CD44、Cy5.5 标记的 CD90 抗体,同时设立 3 个空白对照(PBS 代替),于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 避光条件孵育 30 min,充分清洗后上机进行流式检测鉴定。

### 2.3. 实验分组及给药

将第 3 代大鼠 BMSCs 接种至 6 孔板,待细胞生长至 70%~80%时进行药物干预。实验分为①:完全培养基(10% FBS + DMEM 培养基 + 双抗);②:成骨诱导培养基(① + (10<sup>-8</sup> mol/L 地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸以及 10 mmol/L β-甘油磷酸钠);③:② + 1.25 mg/ml MAE;④:② + 2.5 mg/ml MAE;⑤:② + 5 mg/ml MAE;⑥:② + 10 mg/ml MAE。按照分组每 3 天更换培养基。

### 2.4. CCK-8 法检测 MAE 对大鼠 BMSCs 增殖与毒性

取生长状态良好的第 3 代 BMSCs 每孔 100 μl 按照 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔接种至 96 孔板中,每组设 6 个副孔,并在加液四周空白孔中补充生理盐水避免边缘效应,每 3 天依据分组换液 1 次。按照培养时间 1、3、5、7、9 天共接种 5 块板,在每次培养时间点后每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,37℃孵箱孵育 2 h 后使用酶标仪在波长 450 nm 检测吸光度观察药物对细胞的增殖影响。分析细胞毒性时以相同分组以及细胞浓度接种至 96 孔板中,培养 24 h 后更换不同培养基,继续培养 72 h 后加入 10 μl CCK-8,孵箱孵育 2 h 后酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度计算细胞毒性 IC<sub>50</sub>。

## 2.5. 茜素红染色

在 6 孔板中加入适量 0.1% 明胶覆盖培养皿，超净台放置 30 min 后弃去明胶。将第 3 代细胞按照  $2 \times 10^4$  个/ml 接种至附有明胶的培养皿中，每孔共 2 ml。当细胞融合度达到 60%~70% 时，根据不同分组更换不同培养基，以后每 3 天换液一次，诱导 2 周后吸走六孔板中的液体，用 PBS 清洗 2 次，每孔加入 2 ml 4% 中性甲醛溶液，固定 30 min 后 PBS 冲洗，每孔中加入 1 ml 茜素红染色 5 min，弃去液体，将培养板用 PBS 冲洗干净置于显微镜下观察。

## 2.6. 统计学方法

本次实验数据均采用 SPSS22.0 统计分析软件进行统计学分析，计量资料均以均数  $\pm$  标准差表示。

## 3. 结果

### 3.1. MEA 浸膏

将制备的 MAE 浸膏称重，用玛咖粉原重量/浸膏重量计算出 1 g 醇提取物相当于 5 g 原药材，浸膏如图 1 所示。



Figure 1. Black maca morphology and MAE

图 1. 黑玛咖形态及其玛咖醇提取物

### 3.2. 大鼠 BMSCs 形态学观察以及表型鉴定

如图 2 所示，利用全骨髓贴壁法提取分离培养结果：大鼠 BMSCs 原代培养 48 h 换液前观察到悬浮细胞数量多，成团率高。除去非贴壁的细胞，可见零散的贴壁细胞，细胞形态多为小圆形、扁平以及梭形。培养 2~3 天后可观察到部分集落形成，梭状细胞变多，随后每天观察到梭状集落细胞比例增多，8~10 天后集落增长快，细胞逐渐变大融合成片。传至第 2 代时，细胞主要以梭状细胞生长为主，但依然有少许不规则细胞存在。到第 3 代时细胞形态统一为梭状细胞，细胞核明显，大量细胞汇集时呈平行排列或漩涡样生长并紧密堆积在一起。

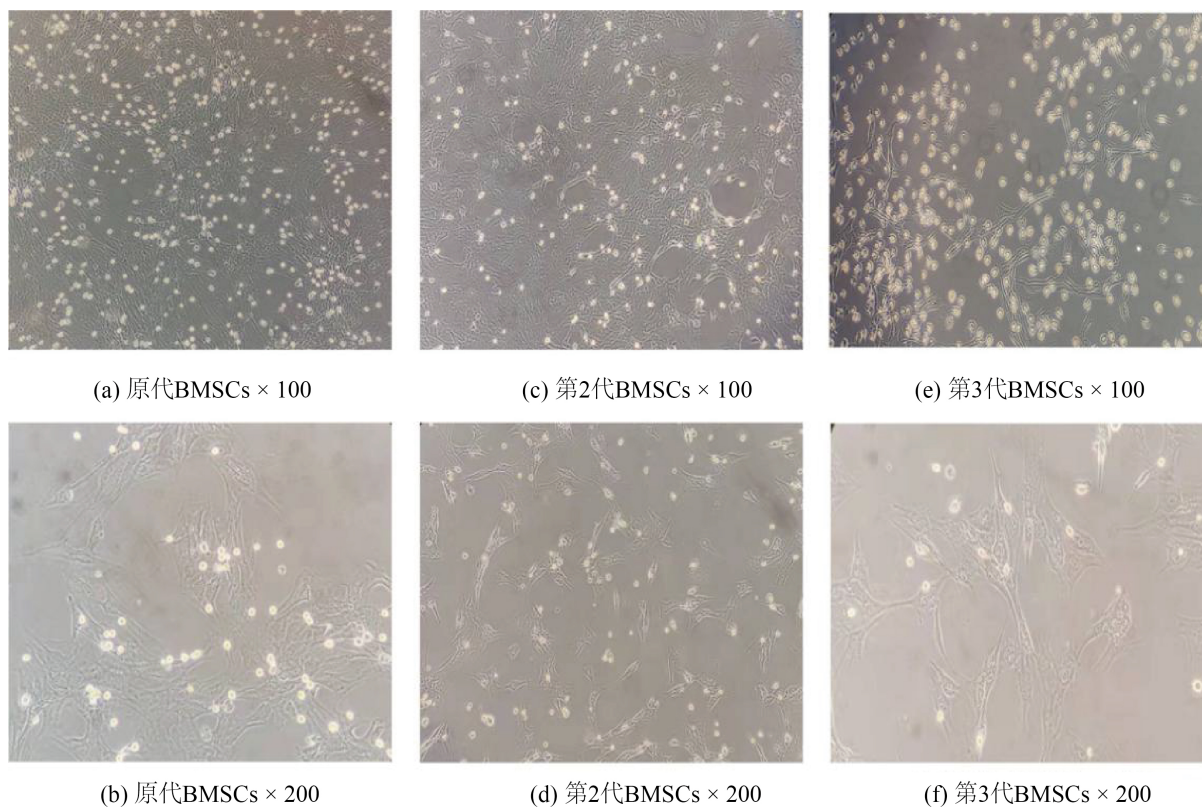
第 3 代大鼠 BMSCs 通过流式细胞仪检测 CD45、CD44 以及 CD90 的表达情况。结果如图 3 所示：CD45 的阳性率仅为 4.53%，而 CD44 和 CD90 阳性率分别为 71.4% 和 85.6%，这些抗体阳性率表达均符合 BMSCs 特性，表明本实验所用大鼠 BMSCs 符合规定。

### 3.3. CCK-8 法检测 MAE 对大鼠 BMSCs 增殖与毒性

不同浓度 MAE 与对照组进行比较均可促进大鼠 BMSCs 增殖，其中在第 5 天为增殖高峰，如图 4 所示：随着时间的变化，各个组均使 BMSCs 不同程度地增殖其中在第 5 天为增殖高峰，当药物浓度  $\leq 2.5$

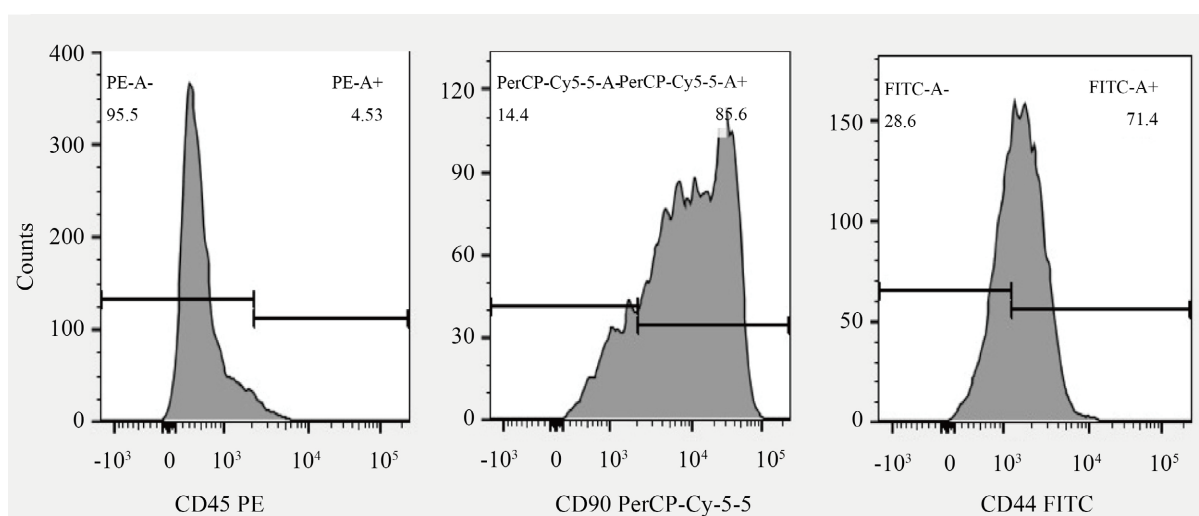


mg/ml 时, 随着 MAE 浓度的增加, 大鼠 BMSCs 增殖能力增强; 当药物浓度 > 2.5 mg/ml 时, 随 MAE 浓度增加, 细胞增殖作用降低。当 MAE 浓度为 2.5 mg/ml 时, 细胞增殖作用最强, 且根据吸光度计算出  $IC_{50} = 8.445$  mg/ml。因此, 当 MAE 浓度为 2.5 mg/ml 是该药物作用在大鼠 BMSCs 促进增殖的最佳浓度。



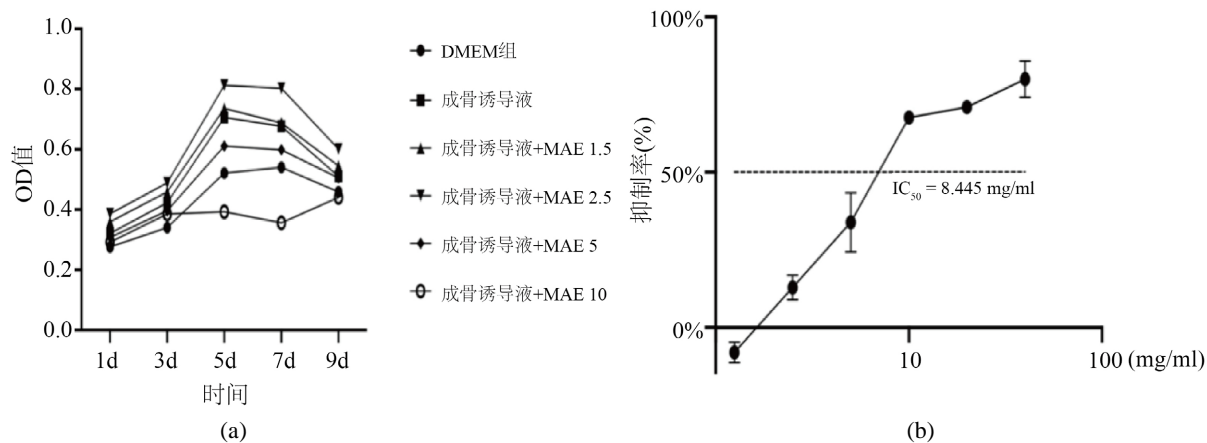
**Figure 2.** Morphological characteristics of BMSCs in SD rats

**图 2.** SD 大鼠 BMSCs 的形态特征



**Figure 3.** Flow cytometry identification

**图 3.** 流式细胞鉴定 BMSCs

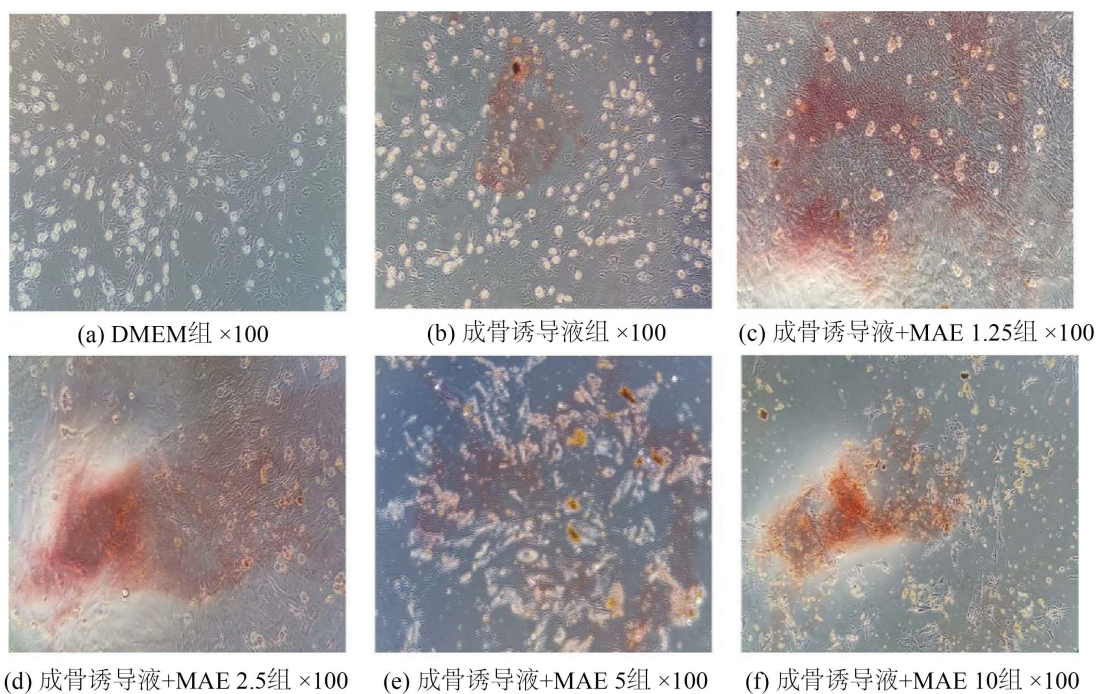


**Figure 4.** (a) Effects of MAE on BMSCs proliferation at different time points; (b) Effect of MAE on BMSCs proliferation in SD rats

**图 4.** (a) 不同浓度 MAE 对 BMSCs 不同时间点增殖影响; (b) MAE 对 SD 大鼠 BMSCs 增殖的影响

### 3.4. MEA 对大鼠 BMSCs 成骨分化的影响

将不同浓度的 MEA 作用于第 3 代大鼠 BMSCs 培养至 14 天后进行茜素红染色, 观察钙化结节形成情况评价 BMSCs 成骨分化情况。如图 5 所示经染色钙化结节主要呈橘红, 在 DMEM 完培组中无茜素红染色结节; 而随着成骨诱导液中 MEA 浓度增加, 当浓度  $\leq 2.5$  mg/ml, 橘红色钙化结节颜色逐渐加深变多且体积增大, 当浓度  $> 2.5$  mg/ml, 橘红色钙化结节减少且颜色变浅。结果发现, 当浓度为 2.5 mg/ml 时, 钙化结节颜色最深, 数量最多, 与细胞增殖结果一致, 表明 2.5 mg/ml MEA 能够明显促进 BMSCs 成骨分化。



**Figure 5.** Effect of MAE on BMSCs osteogenic differentiation (alizarin red staining)

**图 5.** 不同浓度 MAE 对 BMSCs 成骨分化的影响(茜素红染色)

## 4. 讨论

骨质疏松是以骨量减少以及损害性破坏骨组织微结构为特征的全身性系统性骨骼疾病,据 2015 年的统计该病居于我国常见疾病发病率中第五位,且骨质疏松的发病率具有逐年上升的趋势,与此同时在治疗骨质疏松时需要消耗巨大的公共保健资源[6]。目前临床治疗所使用的西药副作用明显,给患者的身心带来伤病以外更大的伤害。BMSCs 具有多向分化的特性,体外条件可经定向诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞以及软骨细胞等多种组织细胞,因此 BMSCs 已经成为组织工程中治疗骨折和骨损伤的种子细胞[7][8]。利用 BMSCs 的贴壁性,通过定期更换培养基除去血细胞、白细胞等悬浮细胞,该方法操作简单,为 BMSCs 原代提取的经典方法。

玛咖含有玛咖酰胺、玛咖烯、芥子油等多种活性物质[9]。经动物以及人体实验研究证实,玛咖具有改善性功能、抗疲劳、减少前列腺增生、抗骨质疏松等多种药理作用[10]。有研究表明,水提取物中玛咖烯和玛咖酰胺类物质与玛咖粉基本相当,且有效物质有所上升,其中醇提取物中玛咖烯和玛咖酰胺类物质略多于水提取物[11]。因此本实验将玛咖醇提取物作用于大鼠 BMSCs,初步探明 MAE 是否能促进大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化,考虑其抗骨质疏松活性以及是否可以作为抗骨质疏松药开发,同时为后续进一步实验提供 MAE 的最佳浓度。

在本次实验中,我们首先采用 95%乙醇作为溶剂,将玛咖粉浸泡后滤液浓缩成 MAE 浸膏备用。随后采用全骨髓贴壁法提取分离大鼠 BMSCs。通过定期换液以及传代不断纯化细胞,在第 3 代通过流式细胞表型鉴定发现本研究原代培养的大鼠骨髓间充质干细胞中 CD45 阳性率为 4.53%,CD44 阳性率为 71.4%,CD90 阳性率 85.6%,符合 BMSCs 特征且纯度较高。同时通过显微镜观察到通过间断性换液到第 3 代时,细胞集落成片且基本呈单一梭形状,说明采用全骨髓贴壁法可分离出纯度好、细胞生物学稳定性以及活性好的 BMSCs,证实本实验中所用大鼠骨髓间充质干细胞提取分离培养成功。

目前尚无文献报道 MAE 是否对大鼠骨髓间充质干细胞有增殖与毒性作用,故先进行 MAE 对细胞的增殖毒性试验,通过存活率计算出半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), $IC_{50}$  为细胞存活量为对照样本一半时的药物浓度,半数抑制浓度越高,说明药物的细胞毒性越低。CCK-8 检测法比 MTT 比色法检测线性范围更广,灵敏度更高,它的颜色深浅与细胞的增殖成正比,反之与毒性成反比。本实验通过设置不同浓度的 MAE 作用于大鼠 BMSCs,根据实验结果可知 MAE 对大鼠 BMSCs 增殖抑制  $IC_{50}$  为 8.445 mg/ml,所以实验所选药物浓度应在 8.445 mg/ml 以下。同时在不同浓度组别 MAE 对 BMSCs 不同时间点增殖影响中发现,成骨诱导液中 MAE 的浓度为 2.5 mg/ml 对 BMSCs 增殖促进最为明显。

钙化结节的形成是由于成骨细胞在细胞外基质分泌胶原和钙盐结合,此指标是鉴定成骨细胞分化的重要指标,茜素红溶液与成骨细胞中的钙离子螯合形成橘色复合物,复合物的数量以及颜色的深浅可以鉴定大鼠 BMSCs 是否向成骨细胞分化[12]。在本实验中,茜素红染色结果观察到与空白对照相比,当成骨诱导液中 MAE 浓度为 2.5 mg/ml 时,呈橘红色的钙化结节数量多且颜色深。基于以上结果,本研究初步发现体外细胞水平 MAE 能促进大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化,有一定的抗骨质疏松的潜力,但 MAE 促进 BMSCs 成骨分化的具体作用机制如何,尚需进一步深入研究。

## 基金项目

云南省科学技术厅 - 云南中医学院应用基础研究联合专项基金资助项目(2017FF117-064)云南省中青年学术和技术带头人培养项目(2015HB042)。

## 参考文献

- [1] Szekanecz, Z., Raterman, H.G., Petho, Z., *et al.* (2019) Common Mechanisms and Holistic Care in Atherosclerosis and



- Osteoporosis. *Arthritis Research & Therapy*, **21**, 15. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1805-7>
- [2] 葛继荣, 王和鸣, 郑洪新, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2020) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(12): 1717-1725.
- [3] 孟令仪, 周博宇, 张晶莹, 等. 骨质疏松发病机制及相关治疗药物研究进展[J]. 系统医学, 2019, 4(19): 193-195+198.
- [4] 周意, 栾洁, 储智勇. 玛咖化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 海军医学杂志, 2015, 36(2): 188-190.
- [5] Gonzales, G.F. (2012) Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **193**, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/193496>
- [6] Si, L., Winzenberg, T.M., Jiang, Q., et al. (2015) Projection of Osteoporosis-Related Fractures and Costs in China: 2010-2050. *Osteoporosis International*, **26**, 1929-1937. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3093-2>
- [7] Guo, L., Cai, T., Chen, K., et al. (2018) Kindlin-2 Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation through Control of YAP1/TAZ. *Journal of Cell Biology*, **217**, 1431-1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612177>
- [8] Munsell, E.V., Kurpad, D.S., Freeman, T.A., et al. (2018) Histone-Targeted Gene Transfer of Bone Morphogenetic Protein-2 Enhances Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation. *Acta Biomaterialia*, **71**, 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.021>
- [9] 王文琦. 玛咖的食品营养性与开发前景[J]. 食品安全导刊, 2017(Z2): 74.
- [10] Gonzales, C., Leiva Revilla, J., Rubio, J., et al. (2012) Effect of Red Maca on Prostate Zinc Levels in Rats with Testosterone-Induced Prostatic Hyperplasia. *Andrologia*, **44**, 362-369. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01190.x>
- [11] Wang, T., Teng, S., Zhang, Y., et al. (2017) Role of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation in Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **13**, 669-675. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3991>
- [12] 李丹青, 肖强兵. 巴戟天多糖通过 p38 MAPK 信号通路促间充质干细胞成骨分化的体外研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(5): 1-4+8.