

补肾方剂及不同分离组份对成骨细胞增殖分化的影响

李芳芳 李 恩 宋士军 吕占军

摘要 从新生SD大鼠头盖骨获成骨细胞,传代培养。取第3代细胞,培养24小时,换含药培养液,继续培养72小时。细胞增殖检测用MTT法。并检测细胞碱性磷酸酶活性。结果补肾全方提取液直接加入细胞培养可抑制成骨细胞增殖但提高碱性磷酸酶活性($P<0.01$),将其吸收成分(鼠血清)加入细胞培养对细胞增殖无作用。将全方不同分离组份直接加入细胞培养,B组份对细胞增殖有抑制作用($P<0.05$),A、C、D组份无作用($P>0.05$);用不同分离组份吸收成分(鼠血清)加入细胞培养,则A组份有促细胞增殖的作用($P<0.05$),B、D组份抑制细胞增殖($P<0.05\sim0.01$),C组份无作用($P>0.05$)。综合两种加药方式对成骨细胞增殖的作用,推测补肾全方的A、B、D组份可能为直接作用于成骨细胞的药理活性成分。

关键词 补肾方剂 成骨细胞 药物吸收成分

Effect of kidney-tonifying recipe and its different components on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro

Li Fangfang, Li En, Song Shijun and Lu Zhanjun

Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract Osteoblasts (OB) obtained from newborn rat calvaria were cultured for serial passage. The cells of third passage were cultured for 24h, then the medium was changed for one containing kidney-tonifying recipe (KTR), and the cells were cultured for another 72h. We observed the proliferation of OB using MTT assay, and meanwhile determined the activity of AKP. The results showed that KTR 5mg/L depressed the proliferation of OB ($P<0.01$), increased AKP activity ($P<0.01$), but the absorptive component of KTR in rat serum had no effect on the proliferation of OB ($P>0.05$). From KTR components A, B, C and D were separated. The results showed that component B depressed the proliferation of OB ($P<0.05$), while components A, C, and D had no effect on the proliferation of OB. The absorptive fraction of component A promoted the proliferation of OB ($P<0.05$) while that of component B and D depressed the proliferation of OB ($P<0.05\sim0.01$), that of component C had no effect on the prolifera-

本文为国家自然科学基金资助课题(No. 39422001)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学中西医结合基础理论研究室(李芳芳 李恩);生理教研室(宋士军),实验中心(吕占军)

tion of OB ($P > 0.05$). The results indicated that components A, B and C may be the pharmacologically active constituents.

Key words Kidney-tonifying recipe Osteoblasts Absorptive fraction

成骨细胞是参与骨代谢的主要细胞,与破骨细胞共同维持骨重建平衡。通过刺激成骨细胞增殖而促进骨形成的最强的药物是氟化物,其余大多数用于治疗骨质疏松的药物均抑制破骨细胞,称为骨吸收抑制剂。治疗骨质疏松症的理想药物应该是既抑制骨吸收又刺激骨形成。在前一阶段研究中,我们观察到补肾方剂抗骨松对去卵巢大鼠有良好的抗骨量丢失作用,本研究利用离体成骨细胞培养,进一步观察补肾方剂抗骨松及不同分离组份对成骨细胞增殖分化的影响。

1 材料与方法

1.1 药物 补肾方剂抗骨松液由11味中药组成,所用中药均购自河北省药材公司,经生药教研室鉴定。以15~20倍蒸馏水浸泡、煎煮两次,2h/次,合并水提液,离心弃去沉淀,上清液浓缩,再经75%乙醇沉淀,去除沉淀,回收乙醇、减压浓缩成39g/ml。用DMEM培养液稀释为39mg/ml,过滤除菌,置冰箱备用。中国医学科学院药物研究所将总成分用一定方式分离为A、B、C、D四个组份。每种成分按原生药量计算,加入细胞培养体系的终浓度均为5mg/L。A、B为水溶性成分,用蒸馏水做对照, C溶于35.5%乙醇液、D溶于43%乙醇液, C组份在细胞培养体系乙醇终浓度为2.3%, D组份在细胞培养体系乙醇终浓度为1.29%, C和D分别做平行溶剂对照。均用滤膜过滤除菌,放置冰箱备用。

1.2 药物吸收成分血清制备 将雌性SD大鼠分为空白组(3只)、单次给药组(3只)、连续给药组(3只),单次给药组灌服中药11.6g/kg, 1.5小时后股动脉放血,连续给药组灌服7天中药,于第7天灌服后1.5小时股动脉放血,分离血清56℃灭活30分钟,经滤膜过滤除菌,

-20℃保存备用。空白组灌服自来水,其余一切处理同上。另将雌性SD大鼠9只麻醉,去除双侧卵巢(OVX),第20天起按上述分组方式、例数、给药方式和血清处理方式进行。A、B、C、D组所给药物为15.6g/kg,单次灌服后3小时取血。细胞培养时所含药鼠血清浓度为16%。

1.3 成骨细胞培养和增殖检测^[1,2]取新生(24小时以内)大鼠,无菌取头颅,剔除粘附的结缔组织,切碎,经0.25%胰蛋白酶消化15分钟,每3分钟振荡一次,弃去消化液,以0.1% I型胶原酶在37℃消化60分钟,每5分钟振荡一次,离心消化液1000转/min, 8分钟,收集细胞,接种于含15%小牛血清DMEM培养液的培养瓶中,培养瓶置于37℃培养箱,24小时换液,2~3天待细胞铺满培养瓶时,传代培养,所用实验细胞均为第3代细胞。按 1×10^4 细胞/ml接种于96孔培养板,每孔0.2ml。培养24小时,换含药培养液,继续培养72小时。换无血清DMEM液每孔0.1ml,加入10 μ l MTT溶液,继续培养4小时。加入0.1ml SDS溶液。放置于室温一定时间后于波长570nm测光吸收度值。

1.4 细胞碱性磷酸酶活性检测 细胞以 1.6×10^4 细胞/cm²接种于50ml培养瓶中,24小时后换含有全方中药(5mg/L)的培养液,继续培养72小时。用生理盐水洗涤数次后,每瓶加2ml生理盐水,冻融细胞。AKP活性测定用氨基萘替比林测酚法,蛋白质测定采用U-V吸收法。

1.5 统计学处理 组间均值比较的t检验。

2 结果

2.1 补肾方剂对成骨细胞增殖分化的影响 补肾方剂抗骨松液5mg/L时可抑制成骨细胞增殖($P < 0.01$),提高碱性磷酸酶活性($P <$

0.01),见表1。另一方面,不论是正常大鼠还是去势大鼠,含药血清与空白血清之间无差异($P > 0.05$),但去势大鼠各组与正常大鼠各对应组相比,均显示抑制成骨细胞增殖作用($P < 0.01$),见表2。

表1 补肾方剂对成骨细胞增殖分化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	培养孔数	A570	培养瓶数	AKP活性(u/g蛋白质)
空白组	46	0.39±0.05	4	10.92±2.19
中药组	48	0.28±0.08 [*]	4	19.69±1.44 [*]

注:^{*}与空白组比 $P < 0.01$

表2 药物吸收成分对成骨细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	培养孔数	A570	统计学比较
正常大鼠: 空白组	15	0.70±0.17	
单次给药组	16	0.72±0.12	$P > 0.05$
连续给药组	31	0.66±0.16	$P > 0.05$
OVX大鼠: 空白组	16	0.51±0.13 ^{***}	
单次给药组	24	0.56±0.13 ^{***}	$P > 0.05$
连续给药组	17	0.52±0.18 ^{***}	$P > 0.05$

注:OVX大鼠各组与正常大鼠对应组相比^{***} $P < 0.01$

2.2 补肾方剂的不同分离组份对成骨细胞增殖的影响 将药物直接加入细胞培养体系,B组份对成骨细胞增殖有抑制作用($P < 0.05$),其余各组均无影响($P > 0.05$),见表3。但A吸收成分有促进成骨细胞增殖作用($P < 0.05$),B、D吸收成分有抑制成骨细胞增殖作用($P < 0.05 \sim 0.01$),而C吸收成分对成骨细胞增殖无影响($P > 0.05$),见表4。

表3 各组份对成骨细胞增殖影响($\bar{x} \pm s$)

组别	培养孔数	A570
空白对照	8	0.60±0.07
A	12	0.62±0.05
B	12	0.53±0.07
C对照	12	0.55±0.08
C	12	0.61±0.10
D对照	12	0.59±0.08
D	12	0.57±0.08

注: $P_{空白-C对照} > 0.05$; $P_{空白-D对照} > 0.05$; $P_{空白-B} < 0.05$; $P_{B-C} < 0.05$; $P_{B-A} < 0.01$; $P_{B-D} < 0.05$

表4 各分离部位药物吸收成分对成骨细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	培养孔数	A570
空白对照	20	0.29±0.07
A	16	0.38±0.04
B	42	0.19±0.05
C对照	55	0.28±0.06
C	49	0.26±0.06
D对照	44	0.36±0.09
D	14	0.21±0.08

$P_{空白-C对照} > 0.05$; $P_{空白-D对照} < 0.05$; $P_{空白-A} < 0.05$; $P_{空白-B} < 0.05$; $P_{A-B} < 0.01$; $P_{D对照-D} < 0.01$; $P_{A-D} < 0.05$; $P_{D-C} < 0.05$

3 讨论

碱性磷酸酶是成骨细胞分化的特异性标志之一。补肾方剂抗骨松在5mg/L时抑制成骨细胞增殖,但促进成骨细胞分化成熟,这表明其在体内有可能直接作用于成骨细胞。但用中药提取液直接加入细胞培养体系,在方法学上存在许多问题,粗提液中所含电解质成分及一些普通的植物化学成分都会对实验结果产生影响,从而影响实验结果的可靠性。我国学者在中药复方的研究中采用给动物灌服中药一定时间后,取其血清进行实验的药理学新方法^[3,4],中药粗制剂经口服吸收后,用含药血清进行细胞培养实验,比较接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程。在本实验中,无论是正常大鼠还是去势大鼠,无论是一次性口服还是连续性口服,含药血清均对成骨细胞增殖无影响,产生这一现象有多种原因,例如血清标本采集时间不适、中药提取液灌服量较小等,尚不能肯定中药提取液在体内不作用于成骨细胞。另外在实验中观察到这一现象,即:去势大鼠的血清对成骨细胞增殖有抑制作用。在我们前期工作中观察到去势大鼠成骨细胞和破骨细胞活性均增强(整体实验、骨组织形态计量学检测),我们认为:在去势大鼠体内出现了抑制成骨细胞增殖

(下转75页)

老年男性骨质疏松症为Ⅰ型骨质疏松症,一般认为与PTH、CT分泌异常,增龄等因素有关,PTH及CT为钙调节激素,两者分泌与年龄密切相关。PTH促进骨吸收,CT可降低骨转换抑制骨吸收,促进骨形成。随年龄增长,CT分泌减少,PTH分泌增多。另外随年龄增长,肾功能逐渐减退,导致血磷升高,引起PTH继发性分泌升高,骨钙下降,终致骨质疏松^[1]。本文骨质疏松组PTH较正常组高,CT值有明显下降趋势与上述报道结果相一致。

雄性激素参与骨代谢对骨生成、骨量维持起重要作用,主要是促进骨内胶原形成,另一方面睾丸酮在骨内转化为二氧睾丸酮,对成骨细胞有直接增强作用。随增龄,男性睾丸机能减退,睾丸酮分泌减少。有人发现50岁以上男性约48%有不同程度的睾丸酮水平下降,本组结果显示两组之间无明显差异,56例中睾丸酮水平低于正常者占5.39%,远低于国外报道,说明本组骨质疏松症的发生受雄激素影响的因素较少。

骨钙素为反映骨形成指标,有人认为完整的骨钙素反映骨形成,骨钙素片段反映骨吸收,血清骨钙素增高见于高转换率的骨质疏松患者,但这些看法有待进一步探讨。本文骨质疏松组BGP高于老年正常组,BMD与BGP呈明显负相关表现为高转换型骨质疏松。一般认为Ⅰ型骨质疏松症为低转换型,本文致高转换型原因考虑可能与增龄有关,骨质疏松组大于70岁的老人占56.7%,有关文献报道^[2]男性松质骨丢失在30岁以后出现,但在70岁以前各部位骨丢失速率相对稳定,70岁以后出现暂短的快速丢失,这种暂短的松质骨快速丢失是否可引起高转换型骨质疏松,还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 何郁泉、潘子昂、刘京萍,等. 男性骨质疏松. 中国骨质疏松杂志,1995,1(1):63.
- 2 段云波、马海波、吴元沧,等. 成年男性人群皮质骨和松质骨骨量变化的研究. 解放军医学杂志,1994,3:199.

(上接73页)

的成分,在整体情况下由于代偿而表现不出来,而在离体情况下这种抑制则表达出来。

中药复方一般含有多种有效成分,共同发挥作用。我们将全方分离为不同组份,期望找到有效部分,实验分为整体实验和离体实验,整体实验正在进行,将在以后报道,离体实验呈现较复杂的结果。当将药物直接加入培养细胞中,仅有B组份表现抑制细胞增殖作用。而将药物吸收成分加入培养细胞中,则A部份出现促进成骨细胞增殖作用,D部份出现抑制成骨细胞增

殖作用,B组份仍保持抑制成骨细胞增殖作用,C组份仍对成骨细胞增殖无影响。由此推测:A、B、D组份均可能是作用于成骨细胞的药理活性成分,在整体情况下可表现为对成骨细胞作用的叠加,以某一作用占优势。

绝经后骨质疏松是由雌激素缺乏引起的多方面改变的综合结果,中药复方以其含有多种成分可能作用于多个环节多个位点而发挥作用,药物作用于成骨细胞,促进其增殖或促进其分化只是一个方面;离体实验也告诉我们:某些中药成分经体内转变后方产生药理活性。