

骨疏康对成骨细胞刺激作用的研究

唐海涛 唐海 罗先正 徐雍 唐淑珍

摘要 目的 通过体外成骨细胞培养,观察补肾中药骨疏康对成骨细胞的直接刺激作用。方法 采用第2代成骨细胞加入浓度为5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 的骨疏康药液,测定 AKP、BGP、PDY 的含量并进行细胞计数。结果 加药后细胞数随药物浓度增加而增加,AKP 和 BGP 水平也相应提高。20 $\mu\text{g/ml}$ 组的 LAP 和 BGP 水平较 5 $\mu\text{g/ml}$ 组和 10 $\mu\text{g/ml}$ 组增加明显,有显著差异 $P<0.05$ 。PYD 含量随药液浓度增加而减小,20 $\mu\text{g/ml}$ 组与 5 $\mu\text{g/ml}$ 组间有显著差异 $P<0.05$ 。结论 认为骨疏康有直接刺激成骨细胞增殖及加强其活性的作用,这种作用随浓度增加而增大,浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 时效果明显。骨疏康可能有抑制破骨的作用。

关键词 成骨细胞 体外培养 骨疏康

Effect of Gushukang on osteoblastic in vitro

Tang Haitao, Tang Hai, Luo Xianzheng, Xu Yong, Tang Shuzhen

Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China

Abstract The aim of this study was to evaluate the effect of Gushukang on osteoblasts (OB). Osteoblasts obtained from new born rat calvaria were cultured for serial passage. We used the second passage cells to determine the activity of AKP, BGP, PYD and quantity of the cells with solution of Gushukang. Depended on the concentration of solution of Gushukang, specimens were divided into 3 groups: 5 $\mu\text{g/ml}$ (group I), 10 $\mu\text{g/ml}$ (group II), 20 $\mu\text{g/ml}$ (group III). The results showed that quantity of OB, AKP, BGP were associated with the concentration of Gushukang solution. In comparison with Group I and II, AKP and BGP in Group III were increased predominantly ($P<0.05$). The quantity of PYD was decreased when the concentration of Gushukang was rising. There is predominant difference between Group III and I ($P<0.05$). Gushukang can stimulate proliferation of OB and improve its activity directly. Furthermore, Gushukang may inhibit absorption of bone.

Key words Osteoblast Culture in vitro Gushukang

骨质疏松是一种以骨量减少为特征的疾病。其发病原因很多,但各种原因所导致的最终结果都是使成骨过程低于破骨过程,导致骨量减少,骨结构破坏,骨强度下降。成骨细胞是骨

质生发、形成的物质基础,只有其不断的分裂增殖才可以产生丰富的胶原基质,通过矿化作用形成更多骨质。通过刺激成骨细胞增殖促进骨组织形成是治疗骨质疏松症的主要方法之一。目前认为氟化物是作用于成骨细胞达到治疗骨质疏松的最主要药物,多年的临床应用取得了较好的结果。近年来的一些研究也表明一些中药也具有刺激成骨细胞的作用。本研究的目的

是利用离体成骨细胞培养,观察中药骨疏康对成骨细胞增殖的影响,揭示其治疗骨质疏松的药理作用。

1 材料和方法

1.1 配液:D-Hank's液(无钙、镁离子),pH值为7.2~7.5,高压灭菌;RPMI 1640培养液,pH值为7.2~7.5,过滤除菌;0.1% Collagenase液(Type I Sigma),用D-Hank's液配制,过滤除菌;0.25%胰蛋白酶。

1.2 成骨细胞培养

采用新生SD大鼠,用70%酒精浸泡,无菌取出颅骨,用D-Hank's液冲洗。将颅骨上的所有结缔组织去除,再漂洗2次。将颅骨剪成1cm×1cm大小的小片,用D-Hank's液清洗,1000转/10min离心。在沉淀中加入0.1% Collagenase液(每只0.5ml),放入37℃培养箱中消化20min。吸出上清液,第一次消化液弃掉。再加入同样剂量的0.1% Collagenase液,37℃培养箱中放置20min,吸出上清液,加入1滴小牛血清终止酶反应。沉淀中再加入0.1% Collagenase液,37℃培养箱中放置20min,吸出上清,然后再重复第一次过程。将3次吸出的上清液混合,1000转/10min离心。沉淀中加入10%FCS 1640培养液,将溶液倒入平皿中,放入37℃培养箱中培养,3d后换液,10d左右传代。

1.3 培养细胞鉴定

1.3.1 形态学观察:进行倒置显微镜和电镜观察。

1.3.2 碱性磷酸酶染色:采用改良Gomon钙-钴法。取培养皿中生长的成骨细胞盖玻片,经95%酒精固定10min,蒸馏水冲洗3次。将盖玻片放入孵育液中37℃,5h,滴加20g/L硝酸钴5min,流水冲净。滴加1%硫化铵5min,流水冲净,复染。

1.4 中药对成骨细胞的刺激作用

1.4.1 药液配置:中药骨疏康用RPMI 1640培养液配成浓度为0.1g/ml的溶液。骨疏康1g加入1640培养液10ml中。将药液pH值调至7.0,然后用0.45μm滤器除菌。

1.4.2 成骨细胞分组:取处于生长旺盛的第2、3代的成骨细胞,用0.25%的胰蛋白酶消化。1640培养液漂洗2遍,然后配成 1×10^5 的细胞悬液。将细胞悬液加到24孔板上,每孔1ml。放入37℃培养箱中培养。待细胞贴壁后,第2天加入配好的药液。细胞分组如下:Ⅰ组:加入浓度为5μg/ml的药液;Ⅱ组:加入浓度为10μg/ml的药液;Ⅲ组:加入浓度为20μg/ml的药液。各组标本在37℃培养箱内继续培养5d,然后收集上清液,测定碱性磷酸酶(AKP)、骨钙素(BGP)和吡啶酚(PYD)的浓度,并进行细胞计数。

1.5 结果分析

采用SPSS统计软件包,用单因素方差分析和 q 检验对实验结果进行统计分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察:①倒置显微镜观察:细胞在接种4h左右可见部分细胞贴壁,伸展。随培养时间延长,细胞伸出较多突起,有的突起相互连接。培养5~6d后细胞融合为单层。细胞形态多为单核、多边形及梭形,呈“铺路石”样排列,局部有细胞密集的区域。符合成骨细胞特点。②电镜观察:透射电镜显示细胞呈类圆形,表面有微绒毛突起。细胞中富含较多线粒体、扩张的粗面内质网及大量的分泌空泡。细胞膜下可见丰富的颗粒状电子致密物。细胞核较大,可见核膜内陷,有大的核仁。符合成骨细胞特点。

2.2 细胞染色:碱性磷酸酶染色细胞胞浆内有棕黑色沉淀并掩盖细胞核上,染色呈强阳性。

2.3 药物刺激效果

表 1 不同浓度药物作用下各观察指标的水平($\bar{x}\pm s$)

实验组	AKP(IU/L)	BGP(ng/ml)	PYD(nM/mMCR)	细胞数
I 组(5 $\mu\text{g/ml}$)	10.12 $\pm$ 0.65	14.58 $\pm$ 1.27	88.47 $\pm$ 17.5	1.5 $\times$ 10 ⁵
II 组(10 $\mu\text{g/ml}$)	10.91 $\pm$ 1.95	15.25 $\pm$ 1.48	73.53 $\pm$ 8.41	2.0 $\times$ 10 ⁵
III 组(20 $\mu\text{g/ml}$)	14.37 $\pm$ 2.02	17.44 $\pm$ 0.76	69.02 $\pm$ 10.39	2.5 $\times$ 10 ⁵

注:组间比较 $P_{AKP\text{I-III}} > 0.05$; $P_{AKP\text{I-II}} < 0.05$; $P_{AKP\text{II-III}} < 0.05$; $P_{BGP\text{I-III}} > 0.05$; $P_{BGP\text{I-II}} < 0.05$; $P_{BGP\text{II-III}} < 0.05$; $P_{PYD\text{I-III}} > 0.05$; $P_{PYD\text{I-II}} < 0.05$; $P_{PYD\text{II-III}} > 0.05$

在不同药物浓度下各观察指标结果见表 1。从中我们发现骨疏康可以明显刺激成骨细胞的增殖,随药物浓度的增加,成骨细胞数明显增多。反应成骨细胞活性的 AKP 和 BGP 随药物浓度增加也相应增加,说明药物有刺激成骨细胞的作用,浓度增高刺激加强。统计分析表明从整体上讲不同药物浓度对 AKP 和 BGP 浓度的影响是有显著差异的 $P < 0.05$ 。q 检验表明对于 AKP 来说 III 组与其他两组间存在显著差异 $P < 0.05$, I, II 组间差异无统计意义;对于 BGP 来说 III 组与其他两组间都有明显差异 $P < 0.05$,而 I, II 组间差异不显著。这说明提高骨疏康的浓度有利于药效的发挥。从总体上看骨疏康可降低吡啶酚的含量 $P < 0.05$,组间比较发现 I 组 III 组间有统计差异,其他组间差异不显著。

3 讨论

胎鼠成骨细胞体外培养开始于 60 年代,目前这种方法已成为一种重要的实验方法。通过单独体外培养成骨细胞,我们可以简化实验影响因素,可以从单细胞形态、代谢指标的变化乃至从分子水平观察某一因素对成骨细胞的直接效应。成骨细胞是参与骨代谢的重要细胞,它与破骨细胞共同维持着骨代谢改建的平衡。骨质疏松症发生的机理是骨形成落后于骨溶解,在骨改建过程中无法完全修复破坏的骨质,使得骨量不断减少。因此治疗骨质疏松的关键是促进成骨细胞的成骨过程,缓解破骨细胞的破骨过程。

文献报道成骨细胞电镜下的超微结构具有如下特征:有凹陷的细胞核,胞浆中含有大量的

线粒体、扩张的粗面内质网和分泌空泡,并含有丰富的电子致密物。我们的电镜照片符合以上特点,可以证明培养的细胞为成骨细胞。成骨细胞的另一特点是具有较强的 AKP 活性,AKP 染色应为强阳性。AKP 染色阳性细胞计数可直接代表该细胞群中成骨细胞的纯度。我们培养的细胞 AKP 染色呈强阳性,这也说明我们的成骨细胞培养是成功的。

血清 AKP 约 40%~75%由成骨细胞产生,其活性可反映成骨细胞功能的强弱^[1]。血清 AKP 和骨碱性磷酸酶(BAKP)是最常用的评价骨形成的指标。骨钙素是一种非胶原蛋白,在骨组织中存在最丰富,特异性强。已证实它是由成骨细胞分泌并存在于细胞外骨基质中。骨钙素认为是一种反映骨转换过程中骨再生的很敏感的指标^[2,3]。我们认为采用这两个指标来观察在骨细胞在药物刺激下的反映是很有意义的。

祖国医学认为肾与骨的生理、病理有密切关系,即“肾主骨”理论。《素问·六节脏象篇》中有“肾者……其充在骨”的说法。肾藏精而主髓,髓居骨中,骨又赖髓养,故所合在骨。肾精充足则髓化生有源,骨得到髓的充分滋养而坚固有力。如果骨髓化源不足则不能养骨。对于骨病《内经》明确指出的有骨痿者补肾以治之。骨质疏松症其本在骨,从中医角度来说骨质疏松属骨痿,是因肾虚所致,因此要从肾着手治疗。

骨疏康是以淫羊藿、熟地黄、黄芪、丹参等补肾活血中药构成的复方制剂,其治疗骨质疏松的原理是通过补肾益气、活血达到壮骨的目的。蒋淑媛等曾对此药进行过 300 例临床观察,发现用药后骨密度值有显著增加,73.6%的患者骨密度增加 0.05 g/cm²^[4]。但他们没有指出

骨疏康增加骨密度值的根本原因。我们的研究表明骨疏康有直接刺激成骨细胞,促进其增殖及活性的功能。当刺激浓度在 $20\mu\text{g/ml}$ 时,反映成骨细胞功能的 AKP 和 BGP 有显著的增加。药物浓度小于 $10\mu\text{g/ml}$ 时对成骨细胞的刺激作用相对较弱,ALP 和 BGP 随药物浓度变化较小。李芳芳等的研究表明当补肾中药浓度在 $5\mu\text{g/ml}$ 时可抑制成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶活性^[5],这与我们的结果有所不同。我们认为这种差别可能是由于中药方剂组分不同以及实验方法不同所造成的。由于我们未设空白对照组,因此我们无法确定当药物浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 时 AKP、BGP 以及细胞数与未加药时有明显不同。但从三组不同药物浓度刺激的结果看是可以确定骨疏康具有对成骨细胞直接刺激的作用,而且这种刺激作用依赖于药物的浓度。骨疏康对成骨细胞直接刺激作用的机制目前还不清楚。近年来研究发现在破骨细胞质膜上存在一种质子泵,其主要功能是承担破骨细胞的酸分泌。一些物质可特异抑制这种质子泵达到抑制破骨细胞溶骨的作用。质子泵是一种广泛存在于真核细胞内质膜上的能量系统,成骨细胞表面或分泌空泡表面一定会有执行相应功能的结构。某些物质可能会直接刺激这些结构,加速成骨细胞分泌功能。这可能是骨疏康刺激成骨细胞的机理之一。

我们对标本的检测中发现有一定浓度的 PYD 存在,而且其水平与药物浓度间有一定关系。随药物浓度增大,PYD 水平有下降的趋势。药物浓度为 $20\mu\text{g/ml}$ 时,PYD 浓度较其他两组有明显下降,而浓度小于 $10\mu\text{g/ml}$ 时 PYD 浓度差别不大。PYD 是骨胶原纤维肽链末端的交联环,通过破骨细胞对胶原的降解而释放。PYD 是反映骨吸收的敏感指标。我们认为在标本中有一定量 PYD 水平的原因是成骨细胞在传代过程中可能有部分细胞破坏,破坏的细胞

可能释放某种物质降解胶原产生 PYD。我们的结果表明加大骨疏康药液浓度可使培养液中 PYD 的浓度下降。这暗示骨疏康可能有抑制破骨的作用。

与体外研究不同,药物在体内的作用形式更加复杂。我们的实验只是证明骨疏康的某些成分具有直接刺激成骨细胞的作用。许多研究表明,补肾中药抗骨质疏松的机理是复杂的。药物在体内代谢可产生许多药理作用。淫羊藿制剂既可直接刺激成骨细胞^[6],促进其活动和再生,又可以保护性腺组织而维持激素水平。补肾中药对下丘脑-垂体-性腺轴的各个层次都有改善作用,可提高卵巢对垂体促性腺激素的反应能力^[7]。补肾中药可以通过增加肠道 CaBP-D9K mRNA 水平,继而增加 CaBP-D9K 的含量,促进肠道对钙的吸收。通过补肾治疗可以提高肾脏 1α 羟化酶的活性,使 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 水平升高。

参 考 文 献

1. Arlot ME, Delmas PD, Chappard D, et al. Trabecular and endocortical bone remodeling in postmenopausal osteoporosis: Comparison with normal post menopausal women. *Osteoporosis Int*, 1990, 1: 41.
2. Malluche HH, Faugere MC, Fanti P, et al. Plasma levels of bone gla protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int*, 1984, 26: 569.
3. Defeo LJ, Parthomore JG, Price PA. Changes in plasma bone gla protein during treatment of bone disease. *Calcif Tissue Int*, 1982, 34: 121.
4. 蒋淑媛,等. 骨疏康颗粒治疗骨质疏松症的临床观察. *中国骨质疏松杂志*, 1995, 1: 167.
5. 李芳芳,等. 补肾方剂及不同分离组份对成骨细胞增殖分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(3): 71.
6. 李清尚,等. 淫羊藿提取液对去势大鼠骨代谢的影响. *中草药*, 1993, 24(12): 637.
7. 王文健,等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴的作用的研究. *中医杂志*, 1986, 4: 32.