

补肾中药 HU-ECS 对培养成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响

金慰芳 朱文菁 王洪复 骆宏丰 胡昌奇

【摘要】 目的 为了解补肾中药 HU-ECS 对体外培养成骨细胞的作用。方法 应用 MTT 法、对硝基苯磷酸盐法及茜素红染色方法观察 HU-ECS 对体外培养成骨细胞的增殖、ALP 表达及矿化结节形成的影响。结果 HU-ECS 具有刺激成骨细胞增殖作用(10^{-6} g/ml 组, $P < 0.01 \sim 0.001$), 提高 ALP 活性及矿化结节形成的数量。结论 HU-ECS 具有刺激体外培养成骨细胞增殖及分化成熟的功能。

【关键词】 补肾中药; 细胞培养; 成骨细胞

Effects of HU-ECS on proliferation, differentiation and mineralization of cultured osteoblasts in vitro
JIN Weifang, ZHU Wenjing, WANG Hongfu, et al. Research Center of Geriatric Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 **Objective** To study the effects of HU-ECS extracted from traditional Chinese medicine on cultured osteoblasts in vitro. **Methods** MTT, PNPP and ARS were used to observe the proliferation, activity of ALP and the number of mineral nodes of osteoblasts cultured in vitro. **Results** It was found that HU-ECS had the effects on stimulating the proliferation, ALP activity and the number of mineral nodes of cultured osteoblasts. In 10^{-6} g/ml concentration, the effect was stable and notable. **Conclusion** HU-ECS has the effects on stimulating the proliferation, differentiation and maturation of cultured osteoblasts in vitro.

【Key words】 Chinese drage; Cultured cell; Osteoblast

HU-ECS 是补肾中药提取成分, 具有雌激素相类似的化学结构。本实验室以增殖、分化及矿化功能为指标, 观察 HU-ECS 对体外培养成骨细胞的影响, 旨在为骨质疏松症防治药物研究提供一定的依据。

材料和方法

1. 细胞培养: 新生 1 日龄 SD 大鼠, 由上海放射医学研究所实验动物房提供, 沪医实验动物合格证: 34。用王洪复等^[1]的酶消化分离法分离培养大鼠头盖骨成骨细胞。取第二继代细胞实验。

2. 增殖测定: 培养成骨细胞以 $6 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于 6 孔塑料培养板($\phi 35$ mm Nunclon, Denmark), 24 h 后加入不同浓度 HU-ECS($10^{-10} \sim 10^{-4}$ g/ml), 于 7% NCS-MEM(GIBCO)培养液中培养 48 或 72 h, 然后用 MTT 法^[2]测定, 结果以 A_{570} 表示。

3. 碱性磷酸酶(ALP)测定^[3]: 加药后 48 h 吸去

培养液, 细胞经 0.1% Triton X-100 溶解液破碎制成细胞悬液, 取 0.1 ml 用对硝基苯磷酸盐法(PNPP)测各组 ALP 活性, 另取 0.1 ml 用考马氏亮蓝法测定蛋白含量, 以每毫克蛋白中国际单位(U/mg 蛋白)表示 ALP 活性。

4. 矿化结节形成测定: 细胞以 $2.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于 12 孔塑料培养板($\phi 24$ mm), 培养液为 10% NCS-MEM 中含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维生素 C 10 mmol/L Na β -glycerol-phosphate。2 d 换液 1 次, 于 14 d 用 95% 乙醇原位固定, 0.1% 茜素红染色(ARS) 30 min^[4], 用有格(0.2 mm $\times$ 0.2 mm)涤纶薄膜贴附于培养板底部, 低倍光镜下作矿化结节计数, 本实验采用双盲法。

结 果

1. 对成骨细胞增殖率的影响: 不同浓度 HU-ECS 对培养成骨细胞均显示增殖刺激作用(表 1), $P < 0.01 \sim 0.001$ 。其中 10^{-6} g/ml 的增殖刺激作用较为稳定。

2. 对 ALP 表达的影响: 不同浓度给药组培养 48 h 后, ALP 活性均呈不同程度提高(表 2), 以 10^{-6} g/

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570774); 上海市教委重点学科资助项目

作者单位: 200032 上海医科大学老年医学研究中心(金慰芳, 朱文菁, 王洪复); 上海医科大学药学院天然药化教研室(骆宏丰, 胡昌奇)

ml 浓度的作用为明显, $P < 0.05 \sim 0.01$ 。

3. 对矿化功能的影响: 成骨细胞于培养 14 d 可见矿化结节的形成, 茜素红染色后呈现大小、形态不一的红色阳性结节(见图 1)。 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ g/ml 浓度

组的结节形成数较不给药组分别提高 7.8% ~ 13.5%, 其中 10^{-6} g/ml 与对照组比较差异有显著性, $P < 0.05$ (表 3)。

表 1 HU-ECS 对体外培养成骨细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)($n = 4$)

组别	A_{570} (增殖率%)			
	1	2	3	4
对照	0.588 ± 0.066	0.527 ± 0.025	0.552 ± 0.008	0.670 ± 0.022
HU-ECS(g/ml)				
10^{-10}	$0.728 \pm 0.032^{**}$ (23.8)	0.577 ± 0.038 (9.5)	—	—
10^{-9}	—	—	$0.591 \pm 0.014^{**}$ (7.1)	0.678 ± 0.043 (1.2)
10^{-8}	$0.810 \pm 0.030^{***}$ (37.8)	$0.597 \pm 0.010^{**}$ (13.3)	$0.580 \pm 0.008^{**}$ (5.1)	0.685 ± 0.020 (2.2)
10^{-7}	—	—	$0.603 \pm 0.023^{**}$ (9.2)	$0.718 \pm 0.010^{**}$ (7.2)
10^{-6}	$0.806 \pm 0.037^{**}$ (37.1)	$0.672 \pm 0.034^{***}$ (27.5)	$0.613 \pm 0.033^{*}$ (11.0)	$0.766 \pm 0.038^{**}$ (14.3)
10^{-4}	$0.708 \pm 0.045^{*}$ (20.4)	$0.882 \pm 0.013^{***}$ (67.4)	—	—

注: 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 10^{-5} 组 A_{570} 均为“—”

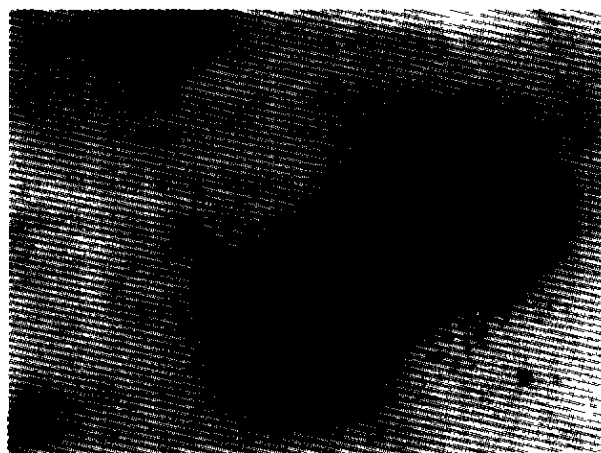


图 1 培养 14 d 茜素红染色阳性的矿化结节 $\times 100$

表 2 HU-ECS 对体外培养成骨细胞 ALP 表达的影响($\bar{x} \pm s$)($n = 4$)

组别	ALP 活性(U/mg 蛋白)		
	1	2	3
对照组	0.438 ± 0.042	0.737 ± 0.054	1.288 ± 0.135
HU-ECS(g/ml)			
10^{-10}	0.482 ± 0.042	—	—
10^{-8}	0.486 ± 0.019	0.803 ± 0.038	1.459 ± 0.084
10^{-6}	$0.609 \pm 0.103^{*}$	0.819 ± 0.114	$1.786 \pm 0.211^{**}$
10^{-4}	—	0.716 ± 0.048	—

注: 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 HU-ECS 对体外培养成骨细胞矿化功能的影响($\bar{x} \pm s$)($n = 4$)

组别	n	矿化结节数
对照 HU-ECS(g/ml)	6	299.67 ± 20.5
10^{-10}	4	330.75 ± 23.5
10^{-8}	6	323.00 ± 27.6
10^{-6}	6	$240.00 \pm 34.1^{*}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

骨质疏松症是绝经后妇女和老年人的常见病和多发病。破骨细胞骨吸收功能活跃和成骨细胞骨形成功能衰退是骨质疏松发生的主要病理机理。目前骨质疏松防治药物大多数为作用于破骨细胞而抑制骨吸收的药物^[3]。氟化物是较早作用于成骨细胞而刺激骨形成的药物, 但存在骨质疏松性增高而易发骨折的副作用, 临床较少应用。因而研究作用于成骨细胞促进骨形成功能而无明显副作用的药物是骨质疏松防治的目标。

本文作者应用补肾中药提取成分在细胞水平上以成骨细胞的增殖率、ALP 表达及矿化功能为指标观察对培养成骨细胞的影响。结果显示 HU-ECS 对成骨细胞具有明显的刺激作用, 表现为①细胞增殖率提高, 不同浓度药物可使成骨细胞增殖率较不用药组提高 11% ~ 37%, 以 10^{-6} g/ml 浓度的作用较为

稳定;②成骨细胞 ALP 活性提高,以 10^{-6} g/ml 的表达为明显;③促进矿化结节形成,用药组的矿化结节数均较不用药组增加,其中 10^{-6} g/ml 组增加明显。ALP 活性的高表达是成骨细胞分化的早期标志^[6,7],矿化则是细胞进一步分化成熟的功能表现。HU-ECS 对成骨细胞除刺激增殖外,对 ALP 活性和形成矿化结节的功能均有较好刺激作用,说明 HU-ECS 在促进细胞增殖的同时,也能促进细胞进一步分化成熟。因而可提高成骨细胞骨形成的功能,为骨质疏松症防治提供了一条途径。

本实验结果是 HU-ECS 对体外培养成骨细胞的直接作用,其作用机理尚待深入探讨。此外,人体是一个复杂的环境,骨代谢受多种激素和因子的影响, HU-ECS 对整体防治骨质疏松的作用有待对骨质疏

松动物模型的影响实验。

参 考 文 献

- 1 王洪复.由胎鼠头颅骨培养骨细胞的实验技术和细胞形态观察.上海医科大学学报,1991,18:475-477.
- 2 朱文菁.MTT 法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力.上海医科大学学报,1995,22:254-257.
- 3 Eans DB. The effect of rh IL-1 β on cellular proliferation and production of PGE2 plasminogen activator osteocalcin and ALP by osteoblastic cells derived from HU-ECSman bone. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 166:208-216.
- 4 Foresta C. Osteoporosis and decline of gonadal function in the elderly male. Horm Res, 1984, 19: 18-22.
- 5 Kasperk C. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. J Clin Endo Metab, 1990, 71: 1322-1329.