

中药增骨 I、III号调节 rhBMP-2 对成纤维细胞的影响

魏玉玲 邹庆 傅刚 梁克玉

【摘要】 目的 观察中药增骨 I、III号调节体外重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)对体外成纤维细胞的影响。方法 体外分离培养人成纤维细胞。然后用中药增骨 I、III号及增骨 I、III号复合 rhBMP-2 分别作用于成纤维细胞,使用倒置相差显微镜观察其形态,噻唑蓝(MTT)比色分析其增殖、放免测定骨钙素(BGP)含量。结果 增骨 I、III号 MTT 比色结果与对照组差异有显著性($P < 0.05$),中药复合 rhBMP-2 组与对照组比色结果差异非常显著($P < 0.01$)。增骨 I、III号及中药复合 rhBMP-2 都可促进成纤维细胞 BGP 的表达,与对照组相比结果差异分别为有显著性($P < 0.05$)和非常显著性($P < 0.01$)。结论 增骨 I、III号能激活成纤维细胞向成骨细胞分化,能增强 rhBMP-2 诱导成骨,促进成纤维细胞成骨表型的表达。

【关键词】 增骨 I、III号; 成纤维细胞; 骨形态发生蛋白-2

Effects of rhBMP-2 on fibroblasts *in vitro* regulated by Zenggu I, III. WEI Yuling, ZOU Qing, FU Gang, LIANG Keyu. The Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medicine College, Wuhan 430061, China.

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Chinese herbal medicine Zenggu I, III alone or combined with rhBMP-2 on fibroblasts *in vitro*. **Methods** Fibroblasts were isolated from human foreskin by collagenase digestion. The cell morphology was examined with an inverted phase contrast microscope. Chinese herbal medicine Zenggu I, III and Zenggu I, III combined with rhBMP-2 were added into the fibroblasts and incubated together. Fibroblast proliferation and osteocalcin expression were determined in both groups. **Results** The cell proliferation in the Zenggu I, III group and the Chinese herbal medicine combined with rhBMP-2 group was higher than that in the control group ($P < 0.05$, and $P < 0.01$, respectively). The BGP contents of the cultured cells were higher in all the groups than in the control ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). **Conclusion** Chinese herbal medicine Zenggu I, III can activate the differentiation and increase the inducible bone formation by rhBMP-2, and promote the osteoblastic phenotype expression of fibroblasts.

【Key words】 Zenggu I, III; Fibroblasts; rhBMP-2

作者利用体外培养方法,观察在中药增骨 I、III号及体外重组骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)作用下,成纤维细胞增殖及成骨表型的变化,以进一步明确增骨 I、III号治疗骨质疏松症的机理。

材料和方法

1. 人成纤维细胞的分离及培养:按文献[1],将人包皮剪碎,胰蛋白酶消化,体外分离培养,制成成纤维细胞悬液(2×10^5 /ml)备用。

2. 主要药物成分:中药增骨 I、III号由湖北中医学院附属医院制剂中心制备,批号 950417, 950406, 5 mg/只,浓度为 10%, pH7.0, 组方见文献

[2],使用前用 DMEM 培养液配成 80 mg/ml 备用。rhBMP-2 由美国 Genetic Institute 惠赠,使用前用 DMEM 培养液配成 200 ng/ml 备用。

3. 实验分组:取第 2 代成纤维细胞悬液,以每 5 孔为一平行样本,按 200 μ l/孔、 4×10^4 ml 的浓度接种于 96 孔培养板上,每孔加入不同条件培养液 100 μ l,根据不同干预条件设置以下 4 组:A 组,DMEM 培养组(对照组);B 组,rhBMP-2 组;C 组:增骨 I、III号模拟序贯疗法组,分别于第 1、3 天加入增骨 I 号,第 6、9、12 天加入增骨 III 号;D 组:增骨 I、III号及 rhBMP-2 组。

4. 细胞形态学观察、绘制生长曲线与噻唑蓝(MTT)比色分析:倒置相差显微镜动态观察成纤维细胞形态变化,并参照文献[1]进行细胞计数,绘制生长曲线,选择处于对数生长期的细胞进行 MTT 比

色分析,研究各组细胞增殖情况。

5. 骨钙素(BGP)含量测定:收集不同时期(培养3、6、9、12、15 d)细胞上清,放射免疫测定各组的骨钙素含量。

6. 线形回归统计分析,求出细胞增殖率(K),其余进行Q检验。

结 果

1. 倒置相差显微镜观察:可见原代培养的成纤维细胞30 min开始贴壁,10 h全部贴壁并伸出突起及伪足,胞体较大,呈扁平梭形、不规则长方形或三角形,形成单层后呈放射状,交叉排列,胞核呈卵圆形,有核仁1~2枚(图1)。A组细胞形态学变化不明显;B组多突形细胞增加;C组细胞增殖活跃(核分裂相较多);D组增殖迅速,胞内可见大量的分泌颗粒和囊泡,培养12 d后细胞交织成多层重叠结构,分泌物聚集成结节状(图2)。

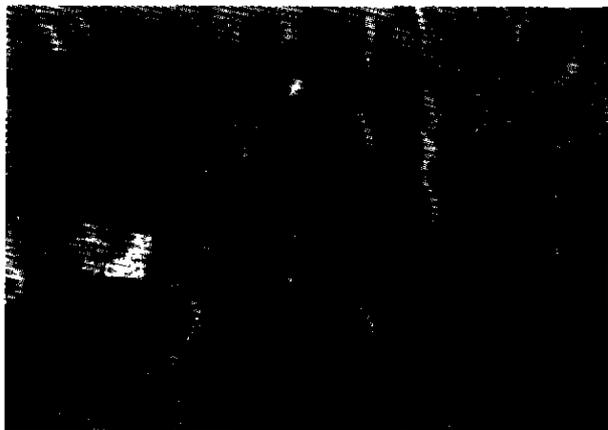


图1 原代培养48 h的成纤维细胞×100



图2 联合条件组培养12 d的成纤维细胞×400

2. 各组成纤维细胞生长率:按线形回归分析,代入 $\delta = KT + C$ 公式,求出各组相关系数及生长率(K值),然后比较。K(A) = 0.7428, K(B) = 0.9013, K(C) = 0.9198, K(D) = 0.9588, K比值如下:K(D)/K(A) = 4.106(即联合条件组比对照组高3.106倍), K(C)/K(A) = 2.055(即增骨I、III号比对照组高1.055倍), K(B)/K(A) = 1.962(即rhBMP-2组比对照组高0.962倍)。

3. 成纤维细胞增殖变化。MTT比色分析结果见表1。

4. BGP含量测定结果见表2。

表1 不同条件下成纤维细胞增殖变化

组别	MTT(A值)
对照组	0.04066 ± 0.002659
rhBMP-2组	0.07852 ± 0.003802*
中药组	0.08593 ± 0.003479**
中药复合组	0.12800 ± 0.001397***

注:与对照组比较,*P < 0.05, **P < 0.01;与rhBMP-2组比较,^P < 0.05, ^^P < 0.01;与中药组比较,**P < 0.01; n = 5

表2 各组BGP含量(ng/ml)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
A	0.3598 ± 0.0332	1.1520 ± 0.0806	3.6328 ± 0.2546	5.5328 ± 0.1234	3.5438 ± 0.2406
B	1.4468 ± 0.1747*	4.4220 ± 0.1726**	9.8156 ± 0.3653**	7.2720 ± 0.2180*	7.0540 ± 0.0833**
C	0.4100 ± 0.0158	1.9610 ± 0.1162	4.0906 ± 0.1623	6.3626 ± 0.1069	4.0844 ± 0.0249*
D	5.3174 ± 0.1352***	10.9608 ± 0.9270***	22.3162 ± 1.0716***	17.4814 ± 0.7504***	14.8202 ± 1.1884***

注:与对照组比较,*P < 0.05, **P < 0.01;与rhBMP-2组比较,^P < 0.05, ^^P < 0.01;与中药组比较,^^P < 0.01

讨 论

1. 成纤维细胞的生物学特性

最近 Patricia^[3]提出“成骨细胞是分化精确(sophisticated)的成纤维细胞”。成纤维细胞是由中胚叶的间充质细胞分化而来,间充质细胞是胚胎早期的

原始结缔组织,具有多分化潜能,在不同的条件及物质诱导下,其分化呈多样性。BGP,含有A-羟基羧酸残端,可作为阳离子的螯合剂,维持骨的正常钙化,是成骨细胞分化的特征性指标之一,也是成骨细胞完成其成骨功能的重要物质。本实验MTT结果证实增骨I号能使成纤维细胞增殖,增骨I、III号能

使反映成骨表型水平的 BGP 含量显著增加,提示增骨 I、III号有促进骨形成的作用。

2. 增骨 I、II、III号在序贯疗法中的作用机理。

在骨重建活动周期中,每个骨重建基本单位(BMU)要经历激活-吸收-逆转-形成4个时相。ADFR序贯疗法治疗骨质疏松症是分别针对其4个时相而应用不同的药物治疗,从而使骨形成大于骨吸收,达到增加骨量的目的^[4]。

增骨 I、II、III号是根据现代骨重建理论和 ADFR 序贯疗法设计而成,在临床应用中已证实能有效防止骨质疏松症。增骨 I、II、III号以补肾中药为主,补肾中药可增强下丘脑-垂体-性腺功能,提高成骨样细胞 DNA 合成。在前期增骨 I、II、III号的骨计量学^[5]、体外成骨细胞及破骨细胞的药效观察和对 I、II型胶原基因的表达影响^[6]的实验研究中已证实:增骨 I号激活骨重建基本单位(BMU)、增骨 II号为骨吸收抑制剂,增骨 III号可促进骨形成。增骨 I、II、III号按 ADFR 程序进行序贯疗法,可使骨重建始终处于正性平衡之中,有效防治骨丢失、增加骨形成,治疗骨质疏松症。

本实验是在不同的条件下观察成纤维细胞的增殖及成骨表型的表达,并观察其对 rhBMP-2 诱导成纤维细胞成骨的影响。实验结果表明增骨 I、III号可明显增强 rhBMP-2 诱导成纤维细胞成骨,表明增骨 I、III号对骨形成的影响有可能是通过介导 rh-BMP-2 而发挥作用。

参 考 文 献

- 1 范保荣,方家椿,高捷.我国小儿包皮成纤维细胞原代及传代培养的研究.细胞生物学杂志,1984,6:77-81.
- 2 梁克玉,魏玉玲,郭帮富,等.中药增骨 I、II、III号序贯疗法治疗绝经后骨质疏松症-附 120 例临床观察.中医正骨,1999,11(1):9-11.
- 3 Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, 2000, 289: 1501-1504.
- 4 Frost HM. Coherence treatment of osteoporosis. Orthop Clin North Am, 1981, 12: 649-651.
- 5 魏玉玲,郭帮富,梁克玉,等.增骨 I、II、III号序贯疗法防治骨质疏松症组织形态计量学分析.中医正骨,1999,11(9):8-11.
- 6 魏玉玲,王炳南,梁克玉,等.增骨 III号对 I、II型胶原基因表达的实验研究.中国骨伤,2000,13:459-460.