

老年大鼠含淫羊藿血清对成骨细胞的增殖与分化的影响

马涛 崔燎 吴铁 艾春媚 李青南

【摘要】 目的 观察老年雄性大鼠含淫羊藿血清对新生大鼠颅骨成骨细胞增殖和分化的影响。方法 雄性, 19月龄SD大鼠24只, 随机分为3组, 分别为生理盐水组、淫羊藿低剂量组(1 g/ml)、淫羊藿高剂量组(2 g/ml), 按0.5 ml/100 g的量, 每日两次, 连续灌胃1个月, 处死前1 h, 再灌胃一次, 取血清(灭活, 过滤), 最终稀释成1:20、1:40、1:80加入新生大鼠颅骨成骨细胞体系, 用MTT法检测细胞增殖, 另外, 分别在第2天、第3天、第4天动态观察细胞生长过程, 做生长曲线和检测分化指标ALP。结果 老年大鼠含药血清在1:80稀释比, MTT测得的OD值给药组高于对照组($P < 0.05$)且以高剂量组高于低剂量组($P < 0.05$), 生长曲线表现为, 在第2天各组无明显差别, 从第3天开始, 含药血清增殖速度加快, 仍以高剂量组最快。ALP检测结果, 含药血清OD值高于对照组($P < 0.05$), 但不同剂量之间没有差异($P > 0.05$)。结论 老年雄性SD大鼠连续服用淫羊藿水提液1个月, 其血清对新生大鼠颅骨成骨细胞有促进增殖和分化的作用。

【关键词】 老年大鼠; 淫羊藿水提液; 含药血清; 成骨细胞; 增殖; 分化

Effects of serum of aged male rat treated with epimedium herb extract on proliferation and differentiation of rat calvarium osteoblast *in vitro* MA Tao, CUI Liao, WU Tie, et al. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of serum of aged rat treated with extract of epimedium herb on proliferation and differentiation of rat calvarium osteoblast *in vitro*. Methods Twenty-four SD rats at age of 19 months were randomly divided into 3 groups and treated with either saline or extract of epimedium herb (1 g/ml) and extract of epimedium herb (2 g/ml) respectively for 3 months. The animal serum was prepared for culture system in different dilution ratio (1:20, 1:40, 1:80). MTT, alkaline phosphatase (ALP) activity were detected to determine the status and activities of proliferation and differentiation. Results The serum from the treated rats at dilution ratio of 1:80 significantly induced cell proliferation and differentiation in a dose- and time-dependent manner, compared with the control ($P < 0.05$). Conclusion Serum of the aged rat treated with epimedium herb extract stimulates the proliferation and differentiation of neonatal rat osteoblast *in vitro*.

【Key words】 Aged male rat; Epimedium herb extract; Serum osteoblast; Proliferation Differentiation

中药淫羊藿有补肾阳, 强筋骨的功效, 近年来我们曾证明该药对SD去势大鼠的骨生长有促进作用^[1], 对肾上腺皮质激素所致大鼠骨质疏松的作用, 也有明显的防治作用^[2], 临床上用于治疗骨质疏松的复方中药也多含淫羊藿, 但淫羊藿对老年性男性的骨质疏松的作用未见报道, 并且淫羊藿的抗骨质疏松的作用机理还缺乏进一步的探讨; 为了观察淫羊藿对老年大鼠骨形成的影响, 特别是对成骨

细胞的影响。本实验采用血清药理学的方法来观察淫羊藿水提液治疗的老年大鼠血清对成骨细胞增殖和分化的影响。

材料和方法

1. 试剂: DMEM培养基购于Gibico公司, I型胶原酶, 透明质酸酶, MTT均购于Sigma公司, 碱性磷酸酶检测试剂盒购于北京中生物公司。

2. 实验药物: 浓度为1 g/ml淫羊藿水提液的配制, 市售淫羊藿1000 g全草洗净, 浸泡1.5 h, 加20倍体积水煮沸1 h, 过滤, 滤渣再加20倍体积水煮沸1 h, 过滤, 共重复3次, 收集3次的滤液, 合并煮沸

基金项目: 广东省教育厅自然科学基金资助项目

作者单位: 524023 湛江, 广东医学院药理教研室(马涛、崔燎、吴铁); 广东天然药物研究与开发实验室(艾春媚); 广东医学院骨生物学研究室(李青南)

浓缩至 1 000 ml 即为所需的药物; 2 g/ml 淫羊藿水提液的配制的工艺与浓度为 1 g/ml 淫羊藿水提液相同, 只是在最后一步合并浓缩至 500 ml。

3. 实验动物分组及给药: SD 老年大鼠, 雄性, 19 月龄, 共 24 只, 按体重随机分为 3 组, 即生理盐水组、淫羊藿低剂量组、淫羊藿高剂量组, 每日上午 9 时和下午 5 时按 0.5 ml/100 g 剂量给药两次, 连续给药 1 个月, 动物处死前 1 h, 再灌胃给药 1 次。

4. 灌胃含药血清的制备: 动物给予乙醚麻醉, 右心室抽血, 采集到的血液, 4℃ 静置 4 h, 3000 r/min 离心 30 min。收集血清, 56℃ 水浴灭活补体。-20℃ 保存, 本实验所用血清保存时间不超过 3 周。用前用培养基稀释, 过滤膜除菌。

5. 新生大鼠颅骨成骨细胞的制备及培养^[3]: 取新生大鼠(24 h 以内), 无菌取颅盖骨, 剔除粘附的结缔组织和血管, 剪碎约 1×1 mm³, 加含 0.2% 的 I 型胶原酶和 0.1% 的透明质酸酶的消化酶消化, 消化 5 个循环, 每次 20 min, 其间不时摇动, 取第 3、4、5 次消化的细胞悬液, 1000 r/min 离心 10 min 弃上清, 沉淀的细胞用 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液重悬, 吹打均匀后, 接种到培养瓶中, 培养瓶置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱孵育, 24 h 换液, 待细胞 60%~70% 贴壁后, 0.25% 胰酶消化, 本实验所用细胞均为原代培养。

6. 不同稀释比血清对成骨细胞增殖的影响 (MTT 法): 按朱文管等人的方法稍改进^[4] 细胞密度 1×10⁵ 个/ml 加入 96 孔板每孔 100 μl, 24 h 后换含 5% FCS 的 DMEM 培养基, 每孔 90 μl, 分别加入按 1:1, 1:3, 1:7 稀释比稀释的含药血清 10 μl, 使其最终稀释比为 1:20, 1:40, 1:80, 继续培养 72 h, 实验结束前 4 h 加 20 μl 的 MTT (5 mg/ml), 继续在 37℃, 5% CO₂ 条件下孵育, 实验结束后, 吸取培养液加甲臞溶解液 0.1 ml 振摇 15 min, 静置 0.5 h 后于酶标仪检测其吸光度, 测量波长 570 nm, 参考波长 630 nm。另细胞按 1×10⁴ 个/ml 加入 3 块 24 孔板, 每孔 1 ml, 24 h 后换含 5% FCS 的 DMEM 培养基, 用 1:80 稀释比血清, 动态观察各组细胞第 2、3、4 天的生长增殖情况, 并根据 MTT 法测得的吸光度做生长曲线。

7. 不同稀释比的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 的影响: 参照李德华等人的方法^[5] 主要是, 成骨细胞接种密度为 1×10⁵ 个/ml 加入 96 孔板, A₁-A₁₂ 行为空白调零, 每孔 100 μl。加药方法同前, 细胞加药后培养 3 d, 培养结束时去除培养液, 用 PBS 冲

洗 3 遍, 加 0.1% Triton X-100 200 μl 裂解 12 h, 吹打 1 min, 取 50 μl 细胞裂解液转移至另一 96 孔板, 用 PBS 液作空白调零。各孔均加碱性磷酸酶检测试剂盒中新鲜配制的底物 100 μl, 37℃ 孵箱孵育 30 min, 加 0.1 N 的 NaOH 终止反应。酶标仪检测, 波长为 405 nm。

8. 统计学方法: 各组均数的比较均用 ANOVA 方法检验, 所用统计软件为 SPSS10.0。

结 果

1. 不同稀释比血清对成骨细胞增殖的影响

不同稀释比血清对成骨细胞增殖的影响结果见表 1。

表 1 不同稀释比血清对细胞增殖情况比较 (A 值)

分组	不同稀释比		
	1:20	1:40	1:80
不含药血清对照组	0.285±0.008 ^{△△}	0.206±0.015 ^{△△}	0.132±0.014 ^{△△}
含药血清(低)组	0.277±0.021 ^{△△}	0.218±0.018 ^{△△}	0.171±0.013 [*]
含药血清(高)组	0.282±0.03 ^{△△}	0.217±0.012 [△]	0.195±0.019 ^{△*}

注: 与对照组比, * P<0.05, ** P<0.01; 与本组不同浓度比
△ P<0.05, △△ P<0.01

从表 1 可见, 不含药血清不同稀释比之间其促进细胞增殖的作用不同, 其趋势为 1:20>1:40>1:80, 含药血清也有相同趋势; 而含药组血清与生理盐水对照组相比, 在 1:20 和 1:40 稀释比血清各组未表现出差异, 而在 1:80 稀释比含药血清刺激增殖作用明显。

2. 淫羊藿含药血清对成骨细胞的生长曲线的影响

淫羊藿含药血清对成骨细胞的生长曲线的影响结果见图 1。

由图 1 可见, 在第 2 天各组细胞增殖未表现出明显差异, 从第 3 天起含药血清组细胞生长速率加快, 其中以淫羊藿高剂量组细胞生长速率最快。

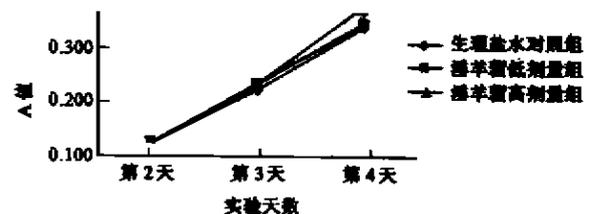


图 1 成骨细胞的生长曲线

3. 不同稀释比的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 的影响见表 2。

表2 各组不同稀释比血清对细胞碱性磷酸酶活性的比较

分组	不同稀释比		
	1:20	1:40	1:80
不含药血清对照组	1.847 ± 0.211 [△]	1.348 ± 0.04 ^{△△}	0.801 ± 0.117 ^{△△}
含药血清(低)组	1.779 ± 0.156 [△]	1.352 ± 0.051 [△]	0.974 ± 0.175 ^{△*}
含药血清(高)组	1.765 ± 0.084 [△]	1.448 ± 0.065 [△]	1.139 ± 0.172 ^{△*}

注:与对照组比,* $P < 0.05$;与本组不同浓度比

[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

由表2可见,不含药血清不同稀释比之间其促进细胞分化(ALP活性)的作用不同,其趋势为1:20 > 1:40 > 1:80;含药血清也有相同趋势;而含药组血清与生理盐水对照组相比,在1:20和1:40稀释比血清各组未表现出差异,而在1:80稀释比含药血清刺激细胞分化作用明显。

讨 论

1. 不含药血清不同稀释比血清对成骨细胞增殖和分化的影响

本次实验所培养的细胞经碱性磷酸酶染色呈阳性,培养18d,体系中长出骨节结,证实所培养的细胞为成骨细胞,已有文献报道,碱性磷酸酶可作为成骨细胞早期分化的指标^[6],我们通过观察ALP的改变,判断药物对细胞的分化活性影响。由表1和表2可见对照组不同稀释比不含药血清对成骨细胞作用效果不同,高浓度血清较低浓度血清有明显的促进作用。提示了大鼠血清中含有一些促进骨细胞生长的因素,一方面,在种属上,取材的细胞与给药血清同源,另一方面,血清中本身含有多种生长因子,而且随着浓度的降低各种生长因子也被大大的稀释了,因此其促进作用也随之减弱,这些因素的存在可影响我们对含药血清作用的判定,因此寻找一个较合适的稀释比对我们研究含药血清的作用有重要意义。

2. 含药血清对成骨细胞增殖和分化的影响

由表1和表2可见含药血清在不同稀释比的情况下,其作用趋势与生理盐水对照组相同,即高浓度血清刺激细胞增殖和分化作用大于低浓度血清。但是含药血清与对照组相比,其在稀释比为1:20和1:40时未表现出差异,而在稀释比为1:80时,含药血清较生理盐水对照血清有明显的刺激细胞生长的作用。出现这种情况,我们认为其一是,可能与细胞接种密度及细胞自身生长有关,因为,对照组血清中也含有各种生长因子有促进其增殖和分化的作用,由于我们是原代培养,当细胞增殖到一定程度,就会

抑制细胞的进一步增殖^[7],从而表现不出差异,在较低剂量(1:80)的情况下,血清中的生长因子被大大稀释了,含药血清的作用就能明显地表现出来;其二是,血清稀释后,血清中生长因子被稀释,对照组细胞增殖减少,唯独这时给药组血清可使细胞增殖高于对照组,说明给药组血清含有促进成骨细胞增殖的因素。实验方法上,在做生长曲线时,我们就采用1:80的稀释比,由图1可见,细胞在第2天含药血清组与生理盐水对照组无明显差别,可在随后的第3天、第4天含药血清则比对照组生长速率要快,且以含较高浓度淫羊藿灌胃的血清为最快。

3. 含药血清促进成骨细胞增长的作用机理探讨

含药血清的这种刺激成骨细胞增殖和分化的作用,作者认为其作用机理为多种因素的综合效应。首先,用来灌胃的淫羊藿水提液本身可能含有有效成分,淫羊藿煎液体外实验表明其可促进成骨细胞的增殖和分化^[8];第二,淫羊藿水提液可促进机体产生促成骨细胞的因子,考虑到灌胃的淫羊藿水提液要经过肠道细菌的代谢,其代谢产物有可能发挥药理活性。有报道淫羊藿水提液中淫羊藿苷及其肠菌代谢产物(宝藿苷I和淫羊藿苷元)对IL-6的产生有促进作用^[9],IL-6是骨质疏松发生发展过程中重要的细胞因子,有促成骨细胞增殖和分化的作用;第三,淫羊藿水提液可促进性腺的分泌,因为淫羊藿本身是补肾阳的作用,有类雄激素样的作用,产生的睾酮^[10]也具有促进新生大鼠颅骨成骨细胞增殖和分化的作用;第四,淫羊藿水提液还可能促进大鼠生成较大量的促骨增殖和分化的特异因子,如BMP, Leptin等;因此,淫羊藿含药血清可能是通过多环节来发挥其刺激成骨细胞增殖和分化的作用的,而不是单一因素在起作用。另外,在给药方法上实行了连续给药30d,比血清药理学中给药通法^[11]中的连续给药3d,明显延长了给药时间,从而不仅保证了一定的血药浓度,而且观察了药物对机体产生的长期效应,比如促进系统和局部激素或细胞因子的合成与分泌等。

本实验采用老年大鼠作为实验材料,与青年大鼠相比,其整体呈现衰老(性腺功能下降,骨质疏松)趋势,其血清中含有促进细胞生长分化的因素,特别是促进成骨细胞生长的因子可能较少,有报道老年

(下转第60页)

氧核苷酸转移酶介导的缺口平移法(TUNEL)、单链DNA免疫组化法和染色质荧光标记-吖啶橙法。TUNEL法在骨组织中应用不理想,与常规形态学检测方法相比,TUNEL法只标记出60%的具有经典凋亡形态表现的破骨细胞^[6]。免疫组化法需要多次洗破骨细胞,而凋亡的破骨细胞与培养基质的结合不牢固,反复冲洗很容易使之脱落,假阴性率不可避免。吖啶橙法首先由Fuller在1993年应用于破骨细胞凋亡研究^[3],因其操作简单、不损失细胞、细胞核染色清晰,而越来越多用于细胞凋亡研究。

3. 阿伦膦酸钠促进破骨细胞凋亡

本研究表明阿伦膦酸钠作用6h,体外培养的破骨细胞发生死亡是凋亡而不是坏死。其原因有:对正在死亡的破骨细胞连续观察发现破骨细胞呈现出典型的凋亡形态:板状伪足的折光率明显下降脱离培养皿,细胞浆迅速缩小变圆,核染色质浓缩,细胞核碎裂,大小不等,细胞膜发出大泡形如沸腾,细胞浆颗粒增多,这些形态学变化是不可逆的。坏死首先表现为细胞肿胀,之后细胞膜破裂,本研究没有发现在阿伦膦酸钠的作用下破骨细胞呈现肿胀形态。

阿伦膦酸钠诱导破骨细胞凋亡的机理还不清楚。有研究提示一氧化氮、ATP、TGF- β 、Fas配体能通过旁分泌的形式诱导细胞凋亡^[7],成骨细胞很可能在阿伦膦酸钠作用下释放这些因子促进破骨细胞的凋亡^[8]。阿伦膦酸钠降低组织中破骨细胞数量可能

与诱导破骨细胞凋亡相关。

本研究采用吖啶橙染色检测破骨细胞凋亡,方法简便、实用。阿伦膦酸钠明显促进破骨细胞凋亡,随阿伦膦酸钠浓度增加,破骨细胞凋亡的比例也增加。

参 考 文 献

- 1 Hughes DE, Mian M, Guiland DF, *et al.* The cellular mechanism of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res*, 1991, 17:109-114.
- 2 Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982, 136:27-36.
- 3 Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*, 1993, 178:1733-1744.
- 4 Wright KR, Hedges DE, Gaise TA, *et al.* Osteoclasts undergo apoptosis at the interface between resorption and formation in bone remodeling units. *J Bone Miner Res*, 1994, 9:5174.
- 5 Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 2000, 301:5-17.
- 6 Wright KR, Story B, Hedges DE, *et al.* Standard morphology is more sensitive than TUNEL for identification of apoptotic osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: S324.
- 7 Suda M, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med*, 1994, 199:873-879.
- 8 Hughes DE, Wright KR, Uy HL, *et al.* Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 1995, 14:1478-1487.