

15 种中西药物含药血清对大鼠成骨细胞增殖成熟的影响

姜廷良 霍海如 李兰芳 郭淑英

【摘要】 目的 用含药血清体外观察 15 种中、西药物对大鼠新生鼠颅骨成骨细胞增殖成熟的影响,比较它们的作用。**方法** 将所试药物口服大鼠,每日 2 次,连续 5 次,于末次给药后 1 h 采血,分离获得含药血清,加入成骨细胞培养液中,培养 3 d,以 MTT 法和金氏法测定光密度值,探讨对成骨细胞增殖和细胞外液中碱性磷酸酶活性的影响。**结果** 所试 15 种药物的含药血清对成骨细胞增殖均无显著作用;3 种西药、4 种中成药能显著增强碱性磷酸酶活性,其作用强度分别依次为安雄、特乐定、福善美以及泰格、骨疏康、鹿茸健骨、仙灵骨葆。6 种中医古方对碱性磷酸酶活性无显著增强作用。**结论** 安雄胶囊(雄激素制剂)、特乐定片(氟制剂)、福善美片(双膦酸盐制剂)和中药泰格胶囊、骨疏康颗粒、鹿茸健骨胶囊、仙灵骨葆胶囊的含药血清在体外能促进成骨细胞分化成熟。

【关键词】 含药血清; 成骨细胞增殖; 碱性磷酸酶

Effect of serums containing fifteen traditional Chinese medicines and chemicals on multiplication and maturation of rat osteoblast JIANG Tingliang, HUO Hairu, LI Lanfang et al. Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of serums containing fifteen traditional Chinese medicines and chemicals on multiplication and maturation of osteoblast in newborn rats and compare their effective potency. **Methods** All tested medicines were orally administered to rats twice a day for consecutive five times. One hour after the last administration, rat blood was collected and serum was isolated and obtained. Then the drug-containing serums were added into culture medium of osteoblast, and they were cultured for three days. The multiplication of osteoblast and alkaline phosphatase (AKP) activity of extracellular fluid were assayed using MTT method and Jin's method, respectively. **Results** All fifteen drug-containing serums of the tested medicines had no significant effect on the multiplication of osteoblast. Three chemicals and four Chinese patent medicines could evidently increase AKP activity and their effective potency ranked in the following order: Andriol > Tridin > Fosamax for chemicals, and Taige > Gushukang > Lurong Jiangu > Xianling Gubao for traditional Chinese medicines. Six ancient prescriptions of traditional Chinese medicines had no obvious effect on AKP activity. **Conclusion** The drug-containing serums of Andriol capsule (preparation of anadrogenic hormones), Tridin tablet (fluorine preparation), Fosamax tablet (diphosphonate preparation) and traditional Chinese medicines such as Taige capsule, Gushukang granule, Lurong Jiangu capsule and Xianling Gubao capsule promote differentiation and maturation of osteoblast *in vitro*.

【Key words】 Drug-containing serum; Osteoblast multiplication; alkaline phosphatase

体外观察药物对成骨细胞增殖成熟的影响,是评价开发防治骨质疏松药物的一种有用方法。已有实验表明,用含药血清(将被试药物口服动物,于适当时间后,采取的受体动物血清)替代药物直接加入体外试验系统,更能反映药物在体内的作用^[1]。我们以此就防治骨质疏松的 5 种西药、4 种中药成方制剂和 6 种与骨代谢有关的中医古方,在体外对大鼠成骨细胞的作用进行了探讨。

材料和方法

1. 所试药物

(1)西药:特乐定片,意大利罗达药厂生产,批号 05-12-98,每片含氟 5 mg。倍美力片,美国惠氏-艾尔斯特制药公司生产,进口批号 9991417,每片含混合雌激素 0.625 mg。福善美片,美国默沙东药厂生产,批号 00055,每片含阿仑磷酸钠 10 mg。萌格旺片,日本帝人株式会社生产,每片含阿法骨化醇 0.5 μ g。安雄胶囊,荷兰欧加农公司生产,批号

A28122001,每粒含十一酸睾酮 40mg。以上药品均由上海中医药大学曙光医院石印玉教授惠赠。

(2)中药成方制剂:骨疏康颗粒,东港市康辰制药公司生产,批号 000206,每袋含 12 g 颗粒。仙灵骨葆胶囊,贵州仙灵药业公司生产,批号 20001107,每粒含 0.5 g 颗粒。鹿茸健骨胶囊,白求恩医科大学制药厂生产,批号 1999.ZL-36,每粒含 0.36 g 颗粒。泰格胶囊,某医院制剂,批号 9809001,每粒含 0.4 g 颗粒。

(3)中医古方:三辛散,源自《证治准绳》集九,由细辛、桂心、干姜组成,治小儿解颅。防风散,源自《太平圣惠方》卷八十二,由防风、白芨、柏子仁组成,治小儿囟开不合。夜合散,源自《疡科选粹》,由合欢皮、芥菜子组成,治打扑损伤、接骨。治脑缝不合方,源自《证治准绳》集九,由茵陈、车前子、百合组成,治小儿脑缝不合。折骨断筋方,源自《千金方》,由地黄、当归、羌活、苦参组成,治骨折伤筋。跌损方,源

自《跌损妙方》,由归尾、生地、槟榔、赤芍组成,治跌打损伤。

上述诸药饮片,均购自北京同仁堂平安大药房,按诸方配伍,分别加 10 倍水浸泡 1 h 后,混合煎煮,趁热过滤,减压浓缩至相当于 1 g 饮片/ml,4℃冰箱存储备用。

2 含药血清制备

每药各取健康雄性 Wistar 大鼠 3 只,口饲给药,1 日 2 次,连续 5 次,于末次给药后 1 h,乙醚麻醉,无菌条件下,经腹主动脉采血,冷置 1 h 后,离心,分离血清,是为含药血清,-20℃冰箱保存备用。另取雄性 Wistar 大鼠 3 只,按以上相同程序,口饲给予等体积水,所取血清是为正常血清,作对照用。大鼠口饲给药剂量均按人日用临床剂量,经人-大鼠体表面积比值折算成相当于人临床剂量,以 4 倍量给药(表 1)。

表 1 所试药物的用药剂量

药物名称	临床日用剂量(kg ⁻¹ ·人)	大鼠日饲剂量(kg ⁻¹ ·大鼠)	相当于人临床剂量的 含药血清浓度(kg ⁻¹ ·U) [*]
药药			
特乐定(以含氟量计)	0.25 mg	1.35 mg×4	1.62 mg
倍力美(以含雌激素量计)	10.4 μg	56.16 μg×4	70.0 μg
福善美(以含阿仑膦酸钠量计)	0.17 mg	0.92 mg×4	1.11 mg
萌格旺(以含阿法骨化醇量计)	0.017 μg	0.092 μg×4	0.11 μg
安雄(以含睾酮量计)	2.67 mg	14.42 mg×4	17.3 mg
中药成方			
骨疏康颗粒(以成药量计)	0.6 g	3.24 g×4	3.9 g
仙灵骨葆胶囊(以成药量计)	0.05 g	0.27 g×4	0.32 g
鹿茸健骨胶囊(以成药量计)	0.09 g	0.48 g×4	0.56 g
泰格胶囊(以成药量计)	0.06 g	0.32 g×4	0.39 g
中医古方			
三辛散(以饮片量计)	0.92 g	5.0 g×4	6.2 g
防风散(以饮片量计)	1.50 g	8.1 g×4	6.2 g
夜合散(以饮片量计)	2.50 g	13.5 g×4	16.1 g
治脑缝不合方(以饮片量计)	1.0 g	5.4 g×4	6.0 g
折骨断筋方(以饮片量计)	2.0 g	10.8 g×4	12.0 g
跌损方(以饮片量计)	2.0 g	10.8 g×4	12.0 g

注: * 含药血清浓度,指给血清供体的口饲剂量÷培养体系中血清的稀释倍数,以口饲剂量/U 表示

3. 成骨细胞培养

取新生 24 h 以内的 Wistar 大鼠,无菌条件下取出颅盖骨,剪碎,在 F12 培养液中,以 0.25% 胰酶和 0.1% I 型胶原酶依次消化,收集消化液,洗涤 5~7 次,重悬于含 15% 胎牛血清的 Ham's F12 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3~5d 传代 1 次。取第 2~3 代生长良好的细胞,经胰酶消化,镜检计数,用含 15% 胎牛血清的 F12 培养液调节至每毫升

有核细胞 5 万左右。在 96 孔培养板上,每孔加入细胞液 100 μl,并依次分别加入含药血清或正常对照血清 25 μl,培养液 75 μl,每孔共 200 μl,另置培养液对照,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,逐日检查,共培养 3 d。每种药物的含药血清各设 5 个剂量,剂量大小间距为 60%,第 3 个剂量相当于临床等效剂量。每个剂量设 5 个复孔,每种药物均经重复试验。

4. 药效作用评价

(1)对成骨细胞的增殖作用:将含药血清已培育 3d 的培养板,弃去上清,每孔加入 5 mg/ml 浓度的 MTT 溶液 20 μ l 和无血清 F12 培养液 100 μ l,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4h,弃去孵育液,每孔加入 DMSO 100 μ l,混匀,在伯乐 550 型酶标仪上,于 405 nm 波长处测光密度(OD)值,以[(含药血清孔的平均 OD 值 - 正常血清孔的平均 OD 值) ÷ (正常血清孔的平均 OD 值)] × 100%,计算增殖率(%)。

(2)对成骨细胞碱性磷酸酶活性的作用:吸取含药血清培育成骨细胞 3 d 的上清液 50 μ l,加入 pH10 的缓冲基质培养液 50 μ l,37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 15 min,再分别加入碱性溶液 50 μ l、4-氨基吡啶溶液 25 μ l、铁氰化钾溶液 25 μ l,混匀,放置 10 min,在酶标仪上于 490 nm 波长处,测定光密度值,在碱性磷酸酶标准曲线上换算成碱性磷酸酶活性单位,按[(含药血清孔的平均活性值 - 正常血清孔的平均活性值) ÷ (正常血清孔的平均活性值)] × 100%,计算碱性磷酸酶活性增加率(%)。

结 果

1. 特乐定片等 5 种西药的作用

图 1 所示,5 种药物 5 个剂量的含药血清对成骨细胞的增殖率在 9.9% ~ 5.8% 之间波动,均未见明显促进增殖的作用。对碱性磷酸酶活性,安雄胶囊、特乐定片、福善美片的含药血清均能提高其活性,增强率除个别剂量外,均 > 25%; 萌格旺片、倍美力片在最大剂量时也能提高其活性(图 2)。

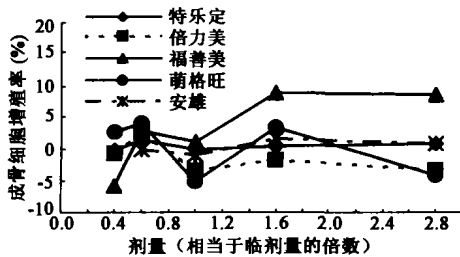


图 1 几种西药的含药血清对成骨细胞增殖的影响

2. 骨疏康颗粒等 4 种中药成方制剂的作用

从图 3 可以看出,所试药物各个剂量的含药血清对成骨细胞增殖率在 14% ~ 9.5% 之间波动,均未见明显促进增殖的作用。对碱性磷酸酶活性,泰格胶囊各剂量组的增殖率均在 34.8% 以上;骨疏康、鹿茸健骨和仙灵骨葆胶囊较高剂量的增殖率也在 30% 以上,提示它们对提高碱性磷酸酶活性有一定作用(图 4)。

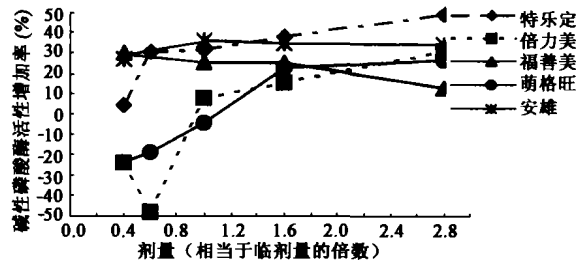


图 2 几种西药的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

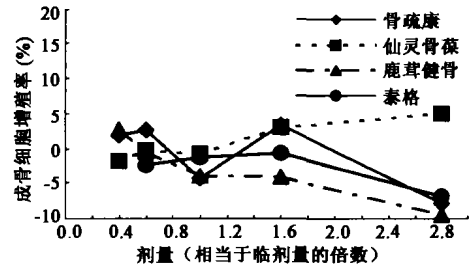


图 3 几种中药的含药血清对成骨细胞增殖的影响

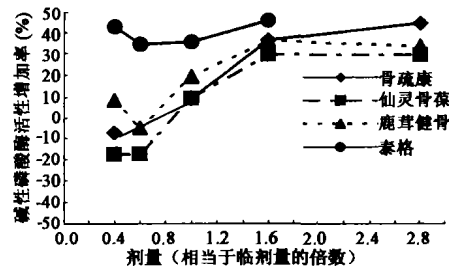


图 4 几种中药的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

3. 三辛散等 6 种古方制剂的作用

从图 5 所示,6 种古方制剂的含药血清对成骨细胞的增殖率在 5.0% ~ 5.1% 之间波动,均未见明显促进增殖的作用。对碱性磷酸酶活性,除治脑缝不合方和夜合散个别剂量的活性增加率在 4.9% ~ 0.5% 之间外,其余诸方均呈现抑制作用,其中,跌损方、折骨断筋方和防风散含药血清对碱性磷酸酶的抑制作用似呈量效相关(图 6)。

讨 论

用中西药物作用于新生鼠颅骨成骨细胞或成骨细胞株,以观察它们的药效或作用机理,已迭见报道^[2-6],其中,大部分是以药物在体外的直接接触。由于口服药物经胃肠道吸收入血、作用于靶器官,需经消化、肠道菌群作用、选择性吸收、肝脏代谢,原形药可能已经发生了变化;同时,在整体动物中,药物也可能通过间接途经影响靶组织。因此,以药物体

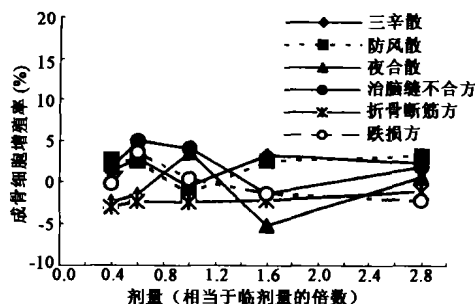


图 5 几种中医古方的含药血清对成骨细胞增殖的影响

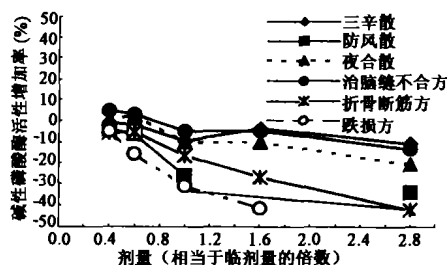


图 6 几种中医古方的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

外直接接触观察药效,会带来一定局限。我们试以药物口饲动物后一定时间获得的血清,即含药血清进行体外试验,可能在一定程度上更能真实地反映药效。

成骨细胞经历着增殖、分化、成熟、凋亡的过程。MTT 法 OD 值的上升,提示成骨细胞数量的增加;碱性磷酸酶活性的增加,反映了成骨细胞的分化成熟。我们所试的 15 种药物含药血清对成骨细胞增殖似均无明显作用;而所试的大部分西药和中成药能提高碱性磷酸酶活性,促进其分化成熟。在作用强度上,如将每个药物各剂量组的增强率相加,得出平均增强率的数值大小排序,西药依次为:安雄(平均增强率 33.1%,下同) > 特乐定(30.8%) > 福善美(23.6%) > 萌格旺(0.6%) > 倍美力(-3.4%);中

成药依次为:泰格(39.9%) > 骨疏康(20.9%) > 鹿茸健骨(18.8%) > 仙灵骨葆(7.0%)。6 种与骨代谢可能有关的中医古方,对碱性磷酸酶活性均无促进作用。

已知双磷酸盐(福善美)、萌格旺(阿法 D₃)主要作用于破骨细胞,抑制骨吸收,可能不直接影响成骨细胞增殖;氟制剂(如特乐定)是国内用于临床促骨形成的西药,虽未见能促进成骨细胞增殖,然促进分化成熟的作用较强。雌激素制剂(倍美力)既无促进成骨细胞增殖,也不显著促进其分化成熟,其防治骨质疏松作用主要在于破骨细胞。所试几种中成药有较强促进成骨细胞成熟的作用。有报道认为,骨疏康在体外能促进成骨细胞增殖^[5],但它是直接加入培养液中,正如有的实验报道的^[2],药物直接加入和用药血清的实验结果会有差异。究竟以何种实验方式所获结果更能反映实际药效,需进一步进行比较性研究的。至于所试的 6 种古方未能在我们的实验中呈现药效,是由于我们仅对成骨细胞的影响作了有限的探讨,不能排除它们对破骨细胞或骨代谢其他方面的作用。

参 考 文 献

- 1 阴赫宏,李兰芳,金亚宏,等.中药血清药理学研究现状.中国中医药信息杂志,1999,6(4):30-32.
- 2 李芳芳,李恩,宋士军,等.补肾方剂及不同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):71-73.
- 3 李芳芳,宋士军,李建平,等.淫羊藿对成骨细胞增殖分化的影响.中国骨质疏松杂志,1999,5(2):55-70.
- 4 沈霖,杜靖远,胡光亮,等.骨密片对离体胎鼠颅骨成骨细胞增殖及幼鼠颅骨块钙释放量的影响.中医研究,2000,13(1):22-25.
- 5 唐海涛,唐海,罗先正,等.骨疏康对成骨细胞刺激作用的研究.中国骨质疏松杂志,2000,6(2):60-63.
- 6 陈奕,赵咏芳,张月林,等.昆山接骨片对体外培养大鼠成骨细胞的影响.中医正骨,2001,13(1):5-6.