

含药血清对体外培养成骨细胞的影响

邵敏 庄洪

【摘要】 目的 研究中药骨康吸收后不同浓度血清对离体大鼠成骨细胞增殖的影响及其对成骨细胞分泌 IL-6 的影响。方法 采用胶原-胰蛋白酶消化法获得新生大鼠的成骨细胞,然后以中药骨康吸收后血清,加入体外培养成骨细胞中进行培养,MTT 法测成骨细胞增殖,ELISA 法测培养上清中 IL-6 含量。结果 发现中药吸收后血清能促进成骨细胞的增殖和分化,各种浓度中以正常剂量药物灌胃后 5 h 取血清含 10% 药物浓度最佳。同时,新生大鼠体外培养成骨细胞能够分泌 IL-6,体外培养成骨细胞在培养后 9 d 左右,IL-6 的分泌达到峰值,随后分泌 IL-6 的能力逐步下降,中药骨康含药血清可作用于成骨细胞,使其分泌 IL-6 的能力下降。结论 中药骨康含药血清能够促进成骨细胞的增殖与分化,从而促进骨形成同时可抑制成骨细胞分泌 IL-6,这可能是中药骨康抑制骨吸收的机制之一。

【关键词】 骨质疏松症;成骨细胞;增殖;白介素-6;中药

Effects of serum containing traditional Chinese medicine on proliferation and production of IL - 6 of osteoblasts in vitro SHAO Min, ZHUANG Hong. Traumatic and Orthopedic Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China

【Abstract】 Objective To observe and analyse the effects of traditional Chinese medicine Gukang oral liquid (GOL) on proliferation of osteoblasts (OB), production of IL - 6, and their roles in the metabolism of bone resorption. **Methods** Iliac bone specimens were obtained from the newborn rat calvaria. After the bone pieces were digested with collagenase -trypsin, osteoblasts were released and were fed with MEM, the cells of third passage were cultured for 24h, then the medium was changed for that containing serum with absorbed GOL, and the cells were cultured for another 24h. The proliferation of OB was observed using MTT reduction assay. After culture for 1, 5, 9, 14 days, the supernatant of cultured cell medium was collected. The IL -6 in the supernatant was detected by ELISA. **Results** The serum with absorbed GOL stimulated the proliferation of OB. The group of normal dosage administered 5h after gavage was best. Meanwhile osteoblasts produced the IL -6 spontaneously. The production of IL -6 peaked on days, then gradually diminished. The serum with absorbed GOL restrained osteoblasts from producing IL -6. **Conclusion** Serum with absorbed GOL can stimulate the proliferation of OB, thereby accelerating bone formation. The serum also restrains osteoblasts from producing IL -6, which may be one of the mechanisms of GOL in inhibiting the bone resorption.

【Key words】 Osteoporosis; Osteoblast; Proliferation; Interleukin-6; Traditional Chinese medicine

骨质疏松症是中、老年的常见病、多发病之一,由此引起的骨折不但给患者造成极大痛苦,而且给社会及家庭带来沉重的经济和生活负担。中药骨康是我院的中药制剂,临床和动物试验都显示对骨量丢失有较好的防治效果^[1-3]。本研究从体外培养成骨细胞,观察中药骨康含药血清对成骨细胞增殖和分泌白介素-6的影响,为中药骨康防治骨质疏松的机理研究提供依据。

材料和方法

1. 材料:1日龄 SD 乳鼠,雌雄兼用,分离原代成骨细胞;6月龄 SD 大鼠,体重(300 ± 20)g,雌雄各半,制备大鼠血清,上述动物由广州中医药大学实验动物部提供,实验动物合格证号:98A016。

2. 主要仪器设备:倒置显微镜(37 × B)上海光学仪器厂生产。CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司产品。6孔、24孔培养板,丹麦 Nunc 公司产品。超净

工作台,上海净化设备厂。分光光度计,冷冻高速离心机,Heracelus 产品。

3. 培养液:L-谷氨酰胺(华美生物工程公司), HEPES(Sigma),小牛血清(中国科学院上海细胞所),胰蛋白酶(SIGMA)、II型胶原酶(Sigma),链霉素(批号 960518-2,上海四药股份有限公司),乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)上海试剂一厂,分析纯。MEM 培养基干粉 9.4 g (GIBCO 产品),用 900 ml 三蒸水溶解,加青霉素(上海第二制药厂产品)100 U/ml,链霉素 100 U/ml,碳酸氢钠(上海虹光化工厂产品,AR 级)调 pH 值 7.2,4℃平衡,过滤除菌,冰冻保存。用时加 10%胎牛血清。

4. 新生大鼠颅盖骨成骨细胞分离、培养

原代成骨细胞的分离与培养:新生 1 日龄 SD 大鼠,75%酒精浸泡 15 min,揭去头皮,取出头盖骨,剔除附着的结缔组织,PBS 冲洗 3 次,用 0.25%胰蛋白酶预消化 25 min,再用 0.1% II 型胶原酶消化,37℃振荡,60 次/min,1 h × 2 次,离心,1 000 r/min,10 min。细胞经 PBS 洗后,加入含 10%的 FBS-MEM 培养液中培养,第 2 天换液,以后每 2~3 d 换液 1 次。细胞传代:约 4~7 d,细胞长成致密单层,铺满培养瓶底,进行传代,弃去原培养液,用 D-Hank's 液冲洗 2 遍,每瓶加入 0.25%的胰蛋白酶消化,相差显微镜下观察细胞,约 4 min 细胞成圆形,离心 1 000 r/min,10 min,弃去消化液,再用 D-Hank's 液冲洗 1 遍,加入培养液,制成细胞悬液,以 1×10^6 个/ml 计数,接种于新的 50 ml 培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中静置培养。

5. 含药血清的制备

按体表面积方法给予大鼠等效剂量中药骨康(由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供),首次灌胃后间隔 2 h 后再次给药,第 2 次给药后 1, 3, 5 h 后分别腹主动脉取血,对照组给予生理盐水灌胃,取血方法同前。离心 300 r/min,20 min,取上清,抽滤除菌后分装,-20℃保存备用(罗钙全含药血清的制备同上)。

6. 观察指标

(1)细胞增殖率

MTT 法测细胞增殖率,细胞经 0.25%的胰酶消化后,以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板,第 2 天更换为含药物 5%、10%、20%血清的培养液,培养 48 h 后,PBS 冲洗,更换无血清的 MEM 培养液,同时加入 MTT,孵育 4 h 后,加入 DMSO 终止反应,在波长 490 nm 处,于酶标仪上测定吸光度 A 值。

(2)IL-6 浓度测定

在培养后 1, 5, 9, 14 d 收集细胞培养上清液,ELISA 法测定细胞上清液内 IL-6 的浓度,IL-6 试剂盒由晶美公司提供。

8. 统计学分析

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 统计软件进行分析,组间比较用方差分析,显著性差异用 *q* 检验。

结 果

1. 细胞增殖率(相同剂量不同时效及不同剂量长效和短效的对比)

表 1 可见,10%药物大鼠血清 5 h 组、20%药物大鼠血清 1 h 组和 20%药物大鼠血清 5 h 组与空白组差异均有显著性,其中以 10%药物大鼠血清 5 h 组为佳。

表 1 各组成骨细胞增殖率测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	A 值(490nm)
空白大鼠血清 1 h 组	6	0.3483 ± 0.0012
5%药物大鼠血清 1 h 组	6	0.3400 ± 0.0020
10%药物大鼠血清 1 h 组	6	0.3633 ± 0.0026
20%药物大鼠血清 1 h 组	6	0.3817 ± 0.0015*
5%药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3600 ± 0.0018
10%药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3950 ± 0.0023**
20%药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3750 ± 0.0031*

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 可见,正常药物大鼠血清 5 h 组、5 倍药物大鼠血清 5 h 组、正常药物大鼠血清 7 d 组、5 倍药物大鼠血清 7 d 组与空白组均差异有显著性,其中以正常药物大鼠血清 5 h 组为佳。

表 2 各组成骨细胞增殖率测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	A 值(490nm)
半量药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3583 ± 0.00075
正常药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3950 ± 0.00235**
5 倍药物大鼠血清 5 h 组	6	0.3817 ± 0.00098*
半量药物大鼠血清 7 d 组	6	0.3517 ± 0.00041
正常药物大鼠血清 7 d 组	6	0.3817 ± 0.00147*
5 倍药物大鼠血清 7 d 组	6	0.3800 ± 0.00063*

注:与半量药物大鼠血清 5 h 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 3 3 组细胞上清液中 IL-6 含量测定结果($\bar{x} \pm s$)($n = 6$)

组别	1 d	5 d	9 d	14 d
空白组	7.54 ± 1.28	18.86 ± 2.99	21.85 ± 3.70	15.74 ± 3.05
罗钙全组	8.14 ± 1.21	16.05 ± 2.55	20.03 ± 2.49	14.23 ± 3.26
含药血清组	8.23 ± 1.69	13.87 ± 2.17*	16.93 ± 2.53*	13.99 ± 2.81

注:与空白组比较,* $P < 0.01$,含药血清组指的是含 10%正常剂量药物大鼠血清 5 h 组

表3可见,含药血清组5 d及9 d时,细胞上清中IL-6含量测定结果明显低于空白组及罗钙全组。

讨 论

体外成骨细胞的培养及其药物干预的研究是寻找有效防治骨质疏松药物的重要手段之一。本研究通过观察中药骨康吸收后血清对离体大鼠成骨细胞增殖率的变化,发现骨康吸收后血清能促进成骨细胞的增殖。上述结果可见,中药骨康含药血清在10%药物大鼠血清5 h组的效果最佳,而在最佳剂量中,是正常药大鼠血清5 h组效果最佳。提示正常剂量药物灌胃后5 h取血清药物浓度最佳。

1986年,日本学者田代真一首先提出了血清药理学或血清药化学的概念,它是指在动物经口服给药后一定时间采血、分离血清,用此含药物成分的血清进行体外实验的一种技术^[4-6]。由于制剂中杂质较多,电解质以酸碱度对体外培养体系的影响,故用吸收后含药血清来避免这些缺点,且此法更接近中药复方经口服吸收,肝脏代谢,进入血液循环而产生药理效应的真实过程,提高了研究结果的可靠性,因此对中药进行细胞学水平研究具有可行性。本研究选用含药血清来进行实验,结果分析符合药效学,说明本次实验是成功的,而且有明显的实际意义。但是在血清药理学应用过程中依然存在着诸如给药时间、采血时相、血清添加量等争论,有待进一步的研究。

IL-6具有破骨细胞激活因子的性质,其产生细胞也十分广泛。绝经后雌激素水平的下降引起IL-6升高。有资料表明成骨细胞膜上已发现有功能性雌激素受体^[7],而破骨细胞上存在IL-6受体^[8],本研究表明,新生大鼠成骨细胞能分泌IL-6,由此可见,雌激素对破骨细胞的影响部分可能是通过成骨细胞起作用。雌激素的下降诱发成骨细胞旁分泌

IL-6等细胞因子,使骨组织微环境内IL-6等细胞因子的含量上升,从而增强骨吸收,导致骨质疏松的出现。

骨质疏松相当于祖国医学中“骨痿”、“骨痹”的范畴,中医认为肾虚、脾虚、血瘀为本症病机。中药骨康以“肾主骨”理论为指导,针对其“多虚多瘀”之病机特点而组方的。全方以淫羊藿、肉苁蓉、补骨脂补肾壮骨为君,黄芪等健脾益气为臣,丹参等活血通络为使而组成。本研究发现,成骨细胞在培养后9 d左右,IL-6的分泌达到峰值,随后分泌IL-6的能力逐步下降,而中药骨康的含药血清能够抑制成骨细胞分泌IL-6,这可能是抑制骨吸收的原因之一。含药血清能否作用于成骨细胞,使其分泌IL-6的能力下降,血清IL-6及骨微环境中的IL-6含量下降,从而达到抑制骨吸收。

参 考 文 献

- 1 邵敏,杜莹,庄洪,等.骨康防治去势大鼠骨质疏松的实验研究.中国骨质疏松杂志,1999,5(2):67.
- 2 邵敏,刘庆思.补肾中药对骨质疏松大鼠性激素影响的实验研究.中国骨质疏松杂志,1999,5(4):23.
- 3 刘庆思,陈仲泽,李小依.骨康胶囊治疗绝经后骨质疏松症65例疗效观察.新中医,1995,10:31.
- 4 Iwama H, Amagaya S, Ogihain Y. Effects of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method. J Ethnopharma, 1987, 21: 45.
- 5 田代真一.ヒト由来培養細胞を用いた漢方薬理学研究系の開登.和漢医药学会志,1985(2):106.
- 6 田代真一.柴苓湯の培養纖維芽細胞に対する特異的増殖抑制.和漢医药学会志,1985(2):108.
- 7 Peck WA. Bone and mineral research/6: a regular survey of developments in the field of bone and mineral metabolism. Amsterdam: Elsevier, 1989. 317.
- 8 Kim CH, Cheng SL, Kim GS. Lack of autocrine effects of IL-6 on human bone marrow stromal osteoprogenitor cells. Endocr Res, 1997, 23: 181.