

# 三七总甙对成骨细胞增殖、分化及 OPG 表达影响的研究

吴丽萍 陶天遵 石义刚 陶树清 吉光荣 王立春

**【摘要】** 目的 观察不同剂量的三七总甙对体外培养大鼠成骨细胞增殖、分化及 OPG 表达的影响,探索体外作用的机制和最佳剂量。方法 第 2 代培养的成骨细胞分别加入终浓度为 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的三七总甙,观察细胞生长、钙结节形成情况,碱性磷酸酶 (ALP) 染色、分泌量检测,骨钙素 (OCN) 检测,MTT 法观察成骨细胞增殖,免疫组化 SP 法结合阳性细胞计数法检测成骨细胞 OPG 表达。结果 成骨细胞在 7 d 可铺满瓶壁,30 d 可形成钙结节,三七总甙可促进成骨细胞的增殖 ALP、OCN 的分泌,以 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时作用明显。三七总甙可促进成骨细胞 OPG 的表达,在 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时作用明显。结论 三七总甙可促进大鼠成骨细胞的增殖、分化,促进成骨细胞 OPG 的表达,以 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时作用明显。

**【关键词】** 成骨细胞;三七总甙;增殖;分化;OPG

**Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on proliferation differentiation and osteoprotegerin expression of rat osteoblast** WU Liping, TAO Tianzun, SHI Yigang, et al. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University. Harbin 150086, China

**【Abstract】 Objective** To assess the effect of total saponins of *Panax notoginseng* (PNS) on the proliferation, differentiation and osteoprotegerin (OPG) expression of osteoblast and investigate the mechanism of OPG in osteoporosis. **Methods:** Osteoblasts obtained from the calvariae of newborn rats were cultured in medium with different concentrations of PNS. Cell proliferation was detected by microscopy and MTT method, Differentiation was determined by measuring alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin secretion. OPG expression was quantified by immunohistochemistry. **Results** PNS in 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  obviously increased osteoblast proliferation, differentiation and OPG expression. **Conclusion** PNS stimulates osteoblast proliferation and differentiation, and promote the expression of OPG

**【Key words】** Osteoblast; *Panax notoginseng*; Proliferation; Differentiation; Osteoprotegerin

成骨细胞 (osteoblast, OB) 是调节破骨细胞 (osteoclast, OC) 功能与分化的,最近发现了其调节的新的分子学机理。破骨细胞的分化依赖于成骨/基质细胞,最近在研究破骨细胞的过程中发现了一种由成骨/基质细胞产生的因子—骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 及骨保护素配体 (osteoprotegerin ligand, OPGL), 过去发现的调节成骨细胞、破骨细胞的众多因子被认为都是通过直接作用于成骨细胞,调节 OPG 和 OPGL 这两个因子之间的浓度的增加与减少,进而完成调节功能的。OPG 是一种分泌性糖蛋白<sup>[1]</sup>, 它由许多组织产生。OPG 在生理条件下具有抑制骨吸

收的活动。OPG 也能抑制高钙血症和由 IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、PTH、PTHrP、1,25(OH) $_2$ D $_3$  和切除卵巢引起的骨丢失<sup>[2]</sup>。OPG 对抑制绝经后妇女的骨吸收活动具有显著的作用。因此,研究细胞因子与 OPG 和 OPGL 的作用关系,可为骨质疏松的防治提供理论基础和方法。中药治疗骨质疏松症已取得较好的疗效并且从分子生物学方面已得到证实,但是否对 OPG、OPGL 有影响,国内外尚无报道,基于此,本实验试图在这些方面进行探索。

## 材料和方法

### 1. 大鼠成骨细胞体外分离与培养<sup>[3]</sup>

将新生 24 h 内 Wistar 大鼠 10 只无菌条件下取颅盖骨,剪碎至体积小于 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm,用

Hank 氏液充分冲洗。采用分离细胞培养法,置 II 型胶原酶(Sigma 公司)中于 37℃ 消化 15 min。弃上清,Hank 氏液充分冲洗后加入 1% II 型胶原酶,37℃ 消化 2 h。取消化后上清液反复冲洗离心 3 次后,弃上清,沉淀中加入培养液 DMEM(Gibco)混合液,加 15% 新生牛血清(Gibco)后,调整细胞计数后浓度为  $1.0 \times 10^5$ ,移入 50 ml 培养瓶中在 5%  $CO_2$ 、37℃ 饱和湿度条件下的恒温箱中孵化,培养液每 3 天更换 1 次。当细胞长满瓶底后,用 0.25% 的胰蛋白酶 0.02% EDTA 消化,按  $1.0 \times 10^5$  做传代至 25 ml 培养瓶中培养进行实验。三七总甙(昆明制药)处理前 2 d 用只含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 培养基培养细胞 48 h,加入终浓度为 0  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、50  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$  的三七总甙,培养细胞 72 h,然后进行检测。

2. 大鼠成骨细胞的特征性鉴定

一般形态学观察采用倒置相差显微镜每日观察细胞的生长情况及形态特征,并照相用。碱性磷酸酶(ALP)染色(改良 Gomori 氏钙-钴法)<sup>[4]</sup>计数阳性细胞百分率。

3. 成骨细胞上清液 ALP 检测

分别取 100  $\mu\text{l}$  加入三七总甙前后的成骨细胞各 8 瓶上清液,采用磷酸对硝基苯酯二钠盐比色法,日立 7000 全自动生化分析仪测定细胞上清碱性磷酸酶的活性。

4. 成骨细胞上清液骨钙素(OCN)检测

分别取 100  $\mu\text{l}$  加三七总甙前后的成骨细胞各 8 瓶上清液,采用北免东雅骨钙素放免试剂盒。根据放射免疫试剂盒说明书测定培养细胞上清中骨钙素(OCN)的含量, $\gamma$  计数器测定沉淀物 cpm 数,根据标准品曲线得到样品 OCN 含量。

5. 四唑盐比色(MTT)法测生长曲线

将对数生长期的细胞制成  $1 \times 10^4$  细胞悬液接种于 96 孔板,每孔滴加  $1 \times 10^4$  的细胞悬液 200  $\mu\text{l}$ ,0  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、50  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$  终浓度的三七总甙每组设 3 个孔,将培养板置于  $CO_2$  孵育箱中,分别于接种后第 1,2,3,4,5,6,7 天取出,每孔加 5  $\mu\text{g/l}$  的 MTT 20  $\mu\text{l}$  继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150  $\mu\text{l}$  二甲亚砜(DMSO)振荡溶解沉淀,用酶联免疫检测仪在 492 nm 波长下读取每孔的吸光度并绘制生长曲线。

6. OPG 免疫组化(SP 法)染色

传代培养的细胞按  $1.0 \times 10^5$  接种至铺有盖玻片的 6 孔培养板,随机分为 4 组,每组 6 孔,药物处理

细胞方法同上。加入药物 72 h 后,以 4% 多聚甲醛固定 10 min,应用 Histostain™-Plus Kits(北京中山生物技术有限公司),操作步骤按产品说明书进行。用 PBS 代替一抗作阴性对照。以细胞计数的方法判定 OPG 的表达程度。在  $20 \times 20$  视野下随机选择 5 个视野,对着色和未着色细胞进行计数。

7. 统计学处理 实验结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间进行 *t* 检验。

结 果

1. 成骨细胞的鉴定

成骨细胞贴壁后的形态及钙-钴染色:成骨细胞培养第 2 天开始贴壁,第 7 天铺满瓶壁。传代后细胞贴壁较快,约 12 h 贴壁,4 d 铺满瓶壁。细胞呈多角形,单核,从形态上无明显变化。培养第 30 d 时出现钙结节,呈棕黑色。钙-钴法染色成骨细胞胞质呈黑色,染色阳性的细胞数超过 75%。

2. 三七总甙对成骨细胞 ALP 与 OCN 的影响

细胞在 10  $\mu\text{g/ml}$ 、50  $\mu\text{g/ml}$  三七总甙的作用下碱性磷酸酶分泌量稍高,但与 0  $\mu\text{g/ml}$  比较无差异,在 50  $\mu\text{g/ml}$  下其生长较快。碱性磷酸酶的分泌量较多,与其他组比较差异较显著( $P < 0.05$ ),骨钙素含量提高明显,与其他组比较有较显著差异( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 成骨细胞上清碱性磷酸酶(U/L)及骨钙素(ng/ml)的含量( $\bar{x} \pm s$ )

三七总甙的剂量( $\mu\text{g/ml}$ )	ALP	OCN
0	$7.5 \pm 0.5$	$1.265 \pm 0.218$
10	$8.0 \pm 0.3$	$1.395 \pm 0.524^*$
50	$8.0 \pm 0.7$	$1.578 \pm 0.468^{**}$
100	$8.7 \pm 0.6^*$	$1.548 \pm 0.198^{**}$

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

3. MTT 测细胞生长曲线如图 1。

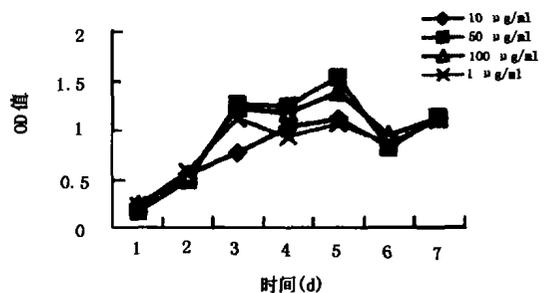


图 1 成骨细胞的生长曲线

4. 三七总甙对 OPG 表达的影响

免疫组化结果表明成骨细胞 OPG 阳性表达细

细胞,在三七总甙为 50  $\mu\text{g/ml}$  时阳性细胞数为  $80.26 \pm 4.60$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$  时阳性细胞数为  $84.84 \pm 3.43$ ; 50  $\mu\text{g/ml}$  时阳性细胞数为  $87.66 \pm 2.13$ ; 100  $\mu\text{g/ml}$  时阳性细胞数为  $90.36 \pm 2.21$ , 其中 100  $\mu\text{g/ml}$  组与 0  $\mu\text{g/ml}$  组比  $P < 0.05$ 。

## 讨 论

中医认为,三七具有活血、止痛、止血、散瘀消肿等功效。三七总甙是三七的主要成分,具有抗炎效应,其药理作用的研究已有许多报道。研究表明在治疗心脑血管疾病方面有很好的作用,有抗心律失常、舒张血管、抗血栓、增加冠状流量、改善血流变和微循环、降血脂及抗动脉粥样硬化等作用<sup>[5]</sup>。三七是骨伤科最为常用的药物之一。

有研究表明三七总甙可降低 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达<sup>[6]</sup>, 能降低烫伤小鼠产生的 NO、TNF<sup>[7]</sup>, 也能显著降低滑膜炎模型大鼠 TNF、NO 的含量<sup>[8]</sup>。TNF 可刺激破骨细胞形成和促进骨吸收,抑制成骨细胞 ALP 生成并减少细胞内钙含量,抑制骨形成和钙化。TNF- $\alpha$  是强有力的骨吸收诱导剂,且必须在成骨细胞存在时发挥作用。TNF- $\alpha$  刺激成骨细胞分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSM)、白介素-6(IL-6)等因子,诱使始祖细胞变为破骨细胞。同时,可以刺激 NO 的产生,而高浓度的 NO 对成骨细胞系的增殖有抑制作用。NO 对成骨细胞功能的影响很可能是双向性的。正常情况下,成骨细胞的增殖及骨基质分泌功能也依赖于少量 NO 的存在,较高浓度的 NO 主要抑制成骨细胞骨形成功能,包括抑制成骨细胞的增殖,还可能促进成骨细胞的凋亡。细胞因子对成骨细胞增殖的抑制作用部分依赖于 NO 对成骨细胞合成和分泌骨基质的抑制作用。有人报道高浓度 NO 不仅抑制成骨细胞 DNA 的复制及成骨细胞的增殖,还显著抑制成骨细胞的碱性磷酸酶活性和抑制成骨细胞合成骨钙素等<sup>[9]</sup>。

TNF- $\alpha$  可以在体外培养中像 OPGL 一样从无骨髓基质的巨噬细胞中诱导 OC 形成<sup>[10]</sup>。在佐剂性关节炎中,虽然在 TNF- $\alpha$  的作用下发生骨破坏,但 OPG 能阻止骨破坏,说明 TNF- $\alpha$  在体内是通过诱导破骨细胞中 OPGL 而发挥作用的。OPGL 是通过活化巨噬细胞而起作用,而不象 TNF- $\alpha$  一样是前炎性因子。

本实验中三七总甙剂量是参考文献[7,11]和经预实验而确定的。大剂量的三七总甙组碱性磷酸酶的分泌量少,与对照组及小剂量组有较显著差别,可能因为小剂量的情况下对成骨细胞的生长促进作用

更大。对成骨细胞的生长促进作用以 50  $\mu\text{g/ml}$  剂量组为显著,与上述报道相符<sup>[7]</sup>。三七总甙对成骨细胞生长、碱性磷酸酶的分泌、骨钙素分泌的影响是否是通过影响 TNF、NO 起作用,还是直接作用于成骨细胞本实验还不能解释,还需要进一步的实验证实。

OPG 是影响破骨细胞分化、成熟,调节骨代谢的关键因子。OPG 抑制破骨细胞形成是通过直接结合成骨/基质细胞上的 OPGL,最终干扰 OPGL 与 RANK 之间的信号传递。OPG 充当 RANK 的可溶性竞争者,OPGL 的假受体。OPGL 通过与其相应受体 RANK 的相互作用,激活转录核因子 NF- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ ),从而诱导破骨细胞前体细胞向成熟破骨细胞发育并可促进成熟破骨细胞的骨吸收功能。研究发现 IL-1、IL-6、IL-11、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 等刺激骨吸收的作用都是通过调节成骨/基质细胞 OPG 和/或 OPGL 的表达来实现的<sup>[12]</sup>。

免疫组化结果显示三七总甙能提高 OPG 的表达,一方面可能通过抑制 TNF 的分泌作用于成骨细胞;另一方面也可能直接作用于成骨细胞而起作用。有研究表明<sup>[6]</sup>:三七总甙能降低 NF- $\kappa\text{B}$  的活性,NF- $\kappa\text{B}$  是一类与多种基因启动子或增强子上的  $\kappa\text{B}$  位点发生特异性结合并促进基因转录的蛋白质总称,启动基因转录。本实验中三七总甙对 OPG 表达的影响可能也通过抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的活性,干预 NF- $\kappa\text{B}$  信号传递而起作用的。只观察到这种现象,根据报道做一些分析推测,但确切的机理还需要更深入的研究。

OPGL 是破骨细胞生成必须的因子,但 OPGL-RANK-OPG 环路则是最主要的调节破骨细胞分化和功能的系统,在骨微环境中其他细胞因子都是通过影响这一环路而起作用的。因此,研究中药对 OPGL-RANK-OPG 环路的影响和关系将为进一步明确骨质疏松的发生机理及治疗开拓新的领域。

## 参 考 文 献

- 1 Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblast that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 137-142.
- 2 Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PTH, PTHrP and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1478-1485.
- 3 薛庆善,主编. 体外培养的原理与技术. 北京:科学出版社, 2001. 485-486.
- 4 杨景山,主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990. 42-43.

氨酸测定法,尿钙和肌酐分别采用邻甲酚酞络合酮终点法和苦味酸法。

密钙息给药前后患者血清 E<sub>2</sub>、AKP 及空腹尿 Ca/Cr、OHPr/Cr 比值的变化,见表 1。

结 果

表 1 密钙息给药前后两组患者骨代谢指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	E <sub>2</sub> (pmol/L)	AKP(IU/L)	CT(pg/ml)	Ca/Cr(mg/mg)	OHPr/Cr(mg/mg)
原发闭经组	10					
给药前		36.236 ± 11.952	62.855 ± 15.340	40.102 ± 7.358	0.102 ± 0.077	0.031 ± 0.010
给药后		35.499 ± 12.704	69.107 ± 14.947	29.168 ± 14.005	0.062 ± 0.070*	0.021 ± 0.009
卵巢早衰组	10					
给药前		32.747 ± 9.987	49.178 ± 7.542	40.052 ± 7.794	0.170 ± 0.010	0.032 ± 0.020
给药后		34.801 ± 13.007	42.278 ± 15.399	36.135 ± 9.008	0.059 ± 0.180**	0.019 ± 0.014

注:与给药前比较 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

此表可见,密钙息给药前后两组患者反映骨吸收的指标空腹尿 Ca/Cr、OHPr/Cr 比值均见下降,前者用药前后对比差异有显著性(P < 0.05 及 P < 0.01),提示其骨吸收受到抑制。

(P < 0.05),说明密钙息给药可使该类患者骨质吸收到抑制,骨代谢的高转换失钙状态得以改善。故此,密钙息的应用对年轻的高促性腺激素低雌激素性闭经患者骨质疏松的早期防治具有重要临床意义。

讨 论

已知绝经后妇女因雌激素缺乏可导致骨矿物质的加速丢失<sup>[4,5]</sup>。众多研究表明雌激素替代疗法以及密钙息的应用不但可以维持绝经后妇女骨矿物质的相对稳定,而且还可以使其骨矿物质的含量有所增加<sup>[6,7]</sup>。已知年纪尚轻的原发闭经和卵巢早衰患者因已有显著的雌激素缺乏,其骨骼代谢已呈现明显的负钙平衡状态,故均有过早发生骨质疏松的倾向。为探讨减缓该类患者骨量丢失的有效途径,本研究将密钙息用于上述年轻的雌激素缺乏的患者,并详细观察了该类患者之骨代谢对密钙息的反应性。结果显示,密钙息给药后反映骨质吸收的指标空腹尿 Ca/Cr、OHPr/Cr 比值均较给药前显著下降(P < 0.05 及 P < 0.01),提示骨质吸收受到抑制。此外,患者血清 CT 的水平较给药前出现升高趋势,而空腹尿 Ca/Cr、OHPr/Cr 比值却较给药前显著下降

参 考 文 献

- Horsman A. The relation between bone loss and calcium balance in postmenopause. Clin Science, 2000, 59: 137.
- Milas L, Thornycroft A. Rate of bone loss in normal women: Evidence of accelerated trabecular bone loss after the menopause. Eur J Clin, 1999, 18: 529.
- Aloia JE, Steinberg KK, Felsen DT. Risk factor for postmenopausal osteoporosis. Am J Med, 1998, 78: 95-100.
- Steinberg KK. Sex steroid and bone density in premenopausal and perimenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 69: 533.
- Nielsen S. Magnitude and pattern of skeletal response to long-term continuous and cyclic sequential oestrogen progestin treatment. Am J Obstet Gynecol, 2002, 101: 319.
- Felsen DT, Netelenbos JC. The effect of postmenopausal estrogen on bone density in elderly women. N Engl J Med, 1998, 329L: 1141.
- Netelenbos JC. Short-term effects of Org OD14 and 17β-estradiol on bone and lipid metabolism in elder postmenopausal women. Maturitas, 2002, 13: 137. (收稿日期:2003-09-01)

(上接第 241 页)

- 王永发,杨福春,张艳,等.三七总甙治疗心脑血管疾病的研究进展.云南中医药杂志,1997,18(4):36-37.
- 王勇,黄文华,彭代智,等.三七总甙对烫伤后核因子-κB 及肿瘤坏死因子的影响.医药导报,2001,20:279-281.
- 罗中华,蔡绍丽,何保斌,等.三七总甙对烫伤小鼠巨噬细胞产生 NO 和 TNF 的作用.第三军医大学学报,2001,23:664-666.
- 李晓辉,李淑慧.三七总甙对 TNF、NO 含量的影响及其机制研究.中草药,1999,30:3014-3017.
- 郑少雄,单春艳,编写.骨质疏松-基础与临床.见:郭世斌,主

编.天津:天津科技出版社,2001.147-148.

- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. tumor necrosis factor stimulates osteoclastic differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med, 2000, 191: 275-285.
- 熊磊,刘成海,谭英姿,等.三七及三七总甙对 NIH/3T3 细胞增殖抑制作用比较.云南中医学院学报,1999,22(2):1-3.
- Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, et al. Osteotropic agent regulates the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cell. Endocrinology, 1998, 139: 4743-4746.

(收稿日期:2003-08-06)