

复方仙贞汤抑制成骨细胞凋亡的实验研究

周丽珍 王淑丽 徐赫男 牛福玲 崔巍 秦腊梅 姜良铎

【摘要】 目的 观察不同浓度的复方仙贞汤对 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡的影响。方法 TNF- α 培养液诱导体外培养成骨细胞凋亡后,分别加入不同浓度的复方仙贞汤,用流式细胞仪检测其对成骨细胞的凋亡率。结果 复方仙贞汤 1 $\mu\text{g/ml}$ 组和 500 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞凋亡率明显降低,与模型组和空白对照组相比,差异非常显著,其中 1 $\mu\text{g/ml}$ 组作用更强。500 $\mu\text{g/ml}$ 可能是通过影响成骨细胞周期中的 G₀-G₁ 和 S 期而达到抑制凋亡作用的,而 1 $\mu\text{g/ml}$ 组还能增加 G₂-M 期成骨细胞。结论 复方仙贞汤能抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡,以低浓度(1 $\mu\text{g/ml}$)抑制作用较好。

【关键词】 复方仙贞汤; 成骨细胞; 凋亡

Inhibition of osteoblast apoptosis using Compound Xian Zhen Decoction ZHOU Lizhen, WANG Shuli, XU Henan, et al. Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China

【Abstract】 **Objective** To test the capability of the Compound Xian Zhen Decoction in different concentrations to inhibit osteoblast apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). **Methods** After induction of apoptosis of osteoblasts cultured *in vitro*, the Compound Xian Zhen Decoction in different concentrations was added to the culture medium, the rate of osteoblast apoptosis was tested by flow cytometry. **Results** Compared with the model group and the control group, the groups treated with the Compound Xian Zhen Decoction in concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$ manifested reduced rates of osteoblast apoptosis with significant difference; the drug in the concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ had higher effect. The drugs may affect G₀-G₁ stages and S stage of cell cycle to inhibit the osteoblast apoptosis, and the drug in the concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ increased the quantity of osteoblasts in G₂-M stages. **Conclusions** The Compound Xian Zhen Decoction can inhibit osteoblast apoptosis induced by TNF- α and has best effect in low concentration (1 $\mu\text{g/ml}$).

【Key words】 Compound Xian Zhen Decoction; Osteoblasts; Apoptosis

骨质疏松症属中医骨痹、骨痿范畴,我们根据“肾为先天之本,主骨生髓;脾胃为后天之本,气血生化之源,大肠、小肠皆属于胃”的中医理论,以及老年人生理病理特点,提出:人到老年,不但脾肾两虚,骨失濡养,而且肠胃功能也见衰退,经常发生壅滞现象,引起血络不和,表现因虚至实,虚实夹杂的骨痛、骨痿症,治疗宜补脏通腑,脏腑同治。复方仙贞汤是我们临床治疗骨质疏松症的经验方,既补益脾肾,又通降活血。前期体外培养的成骨细胞增殖实验显示:复方仙贞汤低浓度即有明显的促增殖作用,且增加细胞裂解液中 ALP 活性。为进一步探讨复方仙贞汤促成骨细胞增殖的机理,我们设计了对成骨细胞凋亡的实验。

材料和方法

1. 材料

(1)培养细胞:成骨细胞株 UMR106,北京大学医学部提供。

(2)复方仙贞汤的制备^[1]:将中药分别加 8 倍及 6 倍量水煎 2 次,第 1 次 2 h;第 2 次 1 h。将药液用纱布过滤,合并 2 次滤液,然后加热浓缩。用 95% 乙醇等体积沉淀 1 次,取上清,再水浴加热回收乙醇至尽。将药液调 pH 至 7.0~7.1,加 1% 活性炭脱色 3 次,滤膜过滤除菌,然后 4℃ 冰箱保存备用。

(3)主要试剂:MEM (Minimum Essential Medium) 培养液, Gibco 公司生产。胎牛血清 (Fetal Bovine Serum), Hyclone Laboratories 公司出产。胰蛋白酶 (Trypsin from beef pancreas), BDH Chemicals 公司出产。碘化丙啶(propidium iodide, PI)、Rnase 酶、TNF- α ,

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院(周丽珍、徐赫男、王淑丽);北京中医药大学东直门医院(牛福玲、崔巍、秦腊梅、姜良铎)

Sigma 公司出产。

2. 方法

成骨细胞系 UMR106, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液培养。细胞在培养瓶中长满至单层后, 用 0.02% EDTA 与 0.05% 胰酶先后消化, 制成单细胞悬液, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 液调浓度为 2.0×10^4 个/ml, 每孔加 3 ml 细胞悬液, 接种于六孔板, 在 5% CO₂、37℃ 培养箱中预培养 24 h 后, 吸弃原培养液, 换成无血清的 MEM 液每孔加 3 ml, 作同步培养 14 h, 吸弃培养液, 将所培养的细胞分为 3 组, ①空白对照组: 仅加含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液, ②TNF-α 诱导组: 加浓度为 30 ng/ml 的 TNF-α 培养液, ③治疗组: 加浓度为 30 ng/ml 的 TNF-α, 同时分 4 组分别加不同浓度的复方仙贞汤的培养液(浓度分别为 500 μg/ml、50 μg/ml、10 μg/ml、1 μg/ml), 以上每孔都分别加 3 ml 药液。然后置于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养 72 h。培养完成后, 用 0.02% EDTA 和 0.05% 胰蛋白酶消化细胞, 分别收集于离心管中, 以 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 用 4℃ PBS 液清洗细胞 3 次, 再用 70% 冷乙醇固定过夜。然后将固定好的细胞再用 4℃ PBS 液清洗 3 次, 每管中加含 20

μl RNase 酶(浓度为 10 μg/ml)的 PBS 液 250 μl, 制成细胞悬液, 置 37℃ 水浴箱中 30 min, 之后加浓度为 1 mg/ml 的碘化丙锭(PI)50 μl, 于 4℃ 避光染色 60 min。最后细胞悬液过 200 目尼龙网, 上流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

结 果

1. TNF-α 诱导成骨细胞凋亡的结果

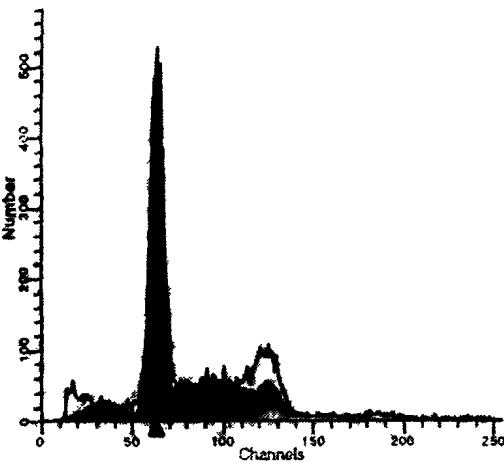
从表 1 可以看出, TNF-α 对成骨细胞有凋亡作用, 不同浓度的 TNF-α 与空白对照组比较均有显著性差异($P < 0.01$), 但不同浓度的 TNF-α 之间对成骨细胞致凋亡作用并无显著性不同, 本实验选用致凋亡率均值较高的 30 ng/ml 为模型组浓度。同时我们还可以看出, 加入 TNF-α 的各组成骨细胞处于 G0-G1 期的较多, 即在 TNF-α 作用下, 细胞多处于休止期和 DNA 合成前期。而与空白对照组比较, 在 G2-M 期无明显不同, 在 S 期却有显著性差异($P < 0.01$)。

图 1 为成骨细胞在不同浓度的 TNF-α 作用下处于细胞周期的不同阶段的组方图。从图中我们可以看出, 空白对照组的成骨细胞亚二倍体峰符合正常细胞情况, 其凋亡率明显低于加入 TNF-α 的各组。

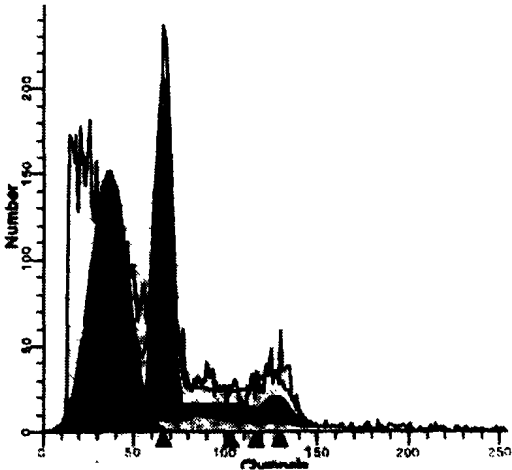
表 1 不同浓度 TNF-α 对成骨细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率 A 值	G0-G1 期 A 值	S 期 A 值	G2-M 期 A 值
空白对照组	6	10.620 ± 1.252	52.657 ± 0.746	34.502 ± 0.663	12.842 ± 0.510
40 ng/ml	6	38.447 ± 3.526 ^{▲▲}	58.273 ± 1.097 ^{▲▲}	30.065 ± 1.248 [▲]	11.662 ± 1.024
30ng/ml	6	40.335 ± 2.281 ^{▲▲}	60.122 ± 0.784 ^{▲▲}	27.028 ± 1.039 ^{▲▲}	12.853 ± 0.535
20ng/ml	5	36.030 ± 3.414 ^{▲▲}	59.668 ± 0.846 ^{▲▲}	25.710 ± 0.905 ^{▲▲}	14.618 ± 0.987

注: 与空白对照组比较[▲] $P < 0.05$; ^{▲▲} $P < 0.01$



(1)空白对照组



(2)TNF-α 40 ng/ml

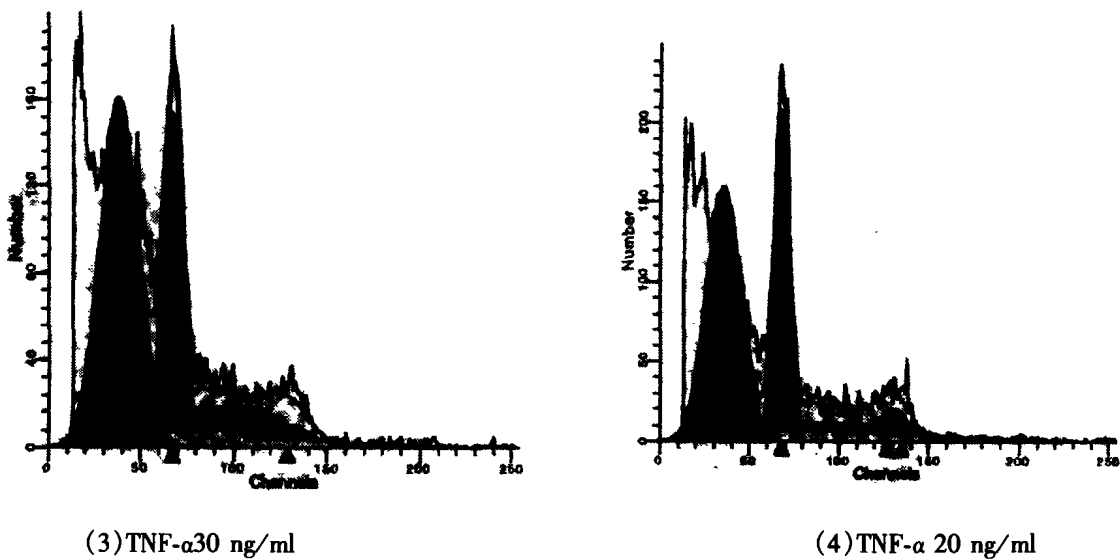


图 1 TNF-α 诱导成骨细胞凋亡

2. 复方仙贞汤抑制成骨细胞凋亡的结果

表 2 显示,加入复方仙贞汤后,①1 μg/ml 组和 500 μg/ml 组细胞凋亡率明显降低,与模型组和空白对照组相比,差异非常显著($P < 0.01$)。1 μg/ml 组与 500 μg/ml 组相比有显著性差异($P < 0.05$)。而 50 μg/ml 和 10 μg/ml 组对凋亡率无明显影响,与模型组比较无显著性差异。②模型组的成骨细胞大多处于 G₀-G₁ 期,与空白对照组相比,差异非常显著($P < 0.01$),而 500 μg/ml 和 1 μg/ml 组 G₀-G₁ 期的成骨细胞明显减少,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.01$),其中 500 μg/ml 组与空白对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。在 DNA 复制的 S 期,模型组的成

骨细胞与空白对照组相比,差异非常显著($P < 0.01$),而各加药组均较模型组有所提高,1 μg/ml 组和 500 μg/ml 组差异非常显著($P < 0.01$),其中 500 μg/ml 组与空白对照组相比,有非常显著的差异。③模型组 G₂-M 期成骨细胞与空白对照组相比,无显著性差异;而 1 μg/ml 组却能增加 G₂-M 期成骨细胞,与空白对照组和模型组相比,有显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 为模型组加入不同浓度复方仙贞汤培养 72 h 后测出细胞处于不同周期的直方图,图中(4)的凋亡峰明显低于其他组。

表 2 不同浓度复方仙贞汤对成骨细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	凋亡率	G ₀ -G ₁ 期	S 期	G ₂ -M 期
空白对照组	6	10.620 ± 1.252	52.657 ± 0.746	34.502 ± 0.663	12.842 ± 0.510
模型组 (30ng/mlTNF-α)	6	40.335 ± 2.281 ^{△△}	60.122 ± 0.784 ^{△△}	27.028 ± 1.039 ^{△△}	12.853 ± 0.535
模型 + 500 μg/ml	6	29.057 ± 1.401 ^{**}	49.750 ± 0.783 ^{△**}	39.785 ± 1.455 ^{**△△}	11.135 ± 0.511
模型 + 50 μg/ml	6	36.762 ± 1.701	58.558 ± 1.285	31.675 ± 0.849	9.767 ± 0.649
模型 + 10 μg/ml	6	39.102 ± 2.369	56.208 ± 0.696	31.770 ± 0.390	12.020 ± 0.632
模型 + 1 μg/ml	6	22.467 ± 1.086 ^{△△*}	51.643 ± 1.066 ^{**}	33.497 ± 1.285 ^{**}	14.91 ± 0.758 ^{△**}

注:与空白对照组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型 + 500 μg/ml 的中药组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

讨 论

1. 本实验所用的流式细胞仪测定法^[10] (Flow Cymetry, FCM)是“近代细胞生物学、分子生物学、分子免疫学、单克隆抗体技术、激光、电子计算机等学科高度发展、综合的结晶。它为从微观认识细胞性质及细胞横向比较提供了精密准确的方法和手段,

是对单细胞进行多参数定量分析的高技术。”流式细胞仪测定法避免了用光镜和荧光镜等观察细胞形态及染色质变化时,观察到的细胞数量有限的缺点,又避免了用凝胶电泳及 DNA 碎片定量观察法研究细胞凋亡情况时破坏了细胞的完整性,且不能测出凋亡细胞所占总细胞的百分含量的缺点。目前,流式细胞仪作为一种简捷的研究方法以得到广泛应用。

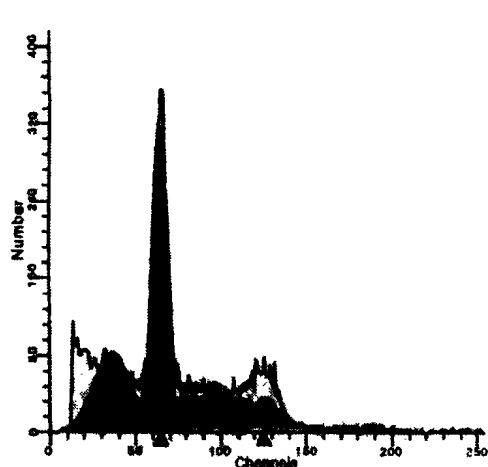
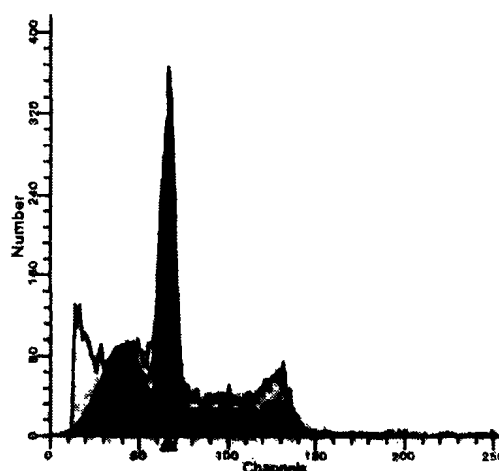
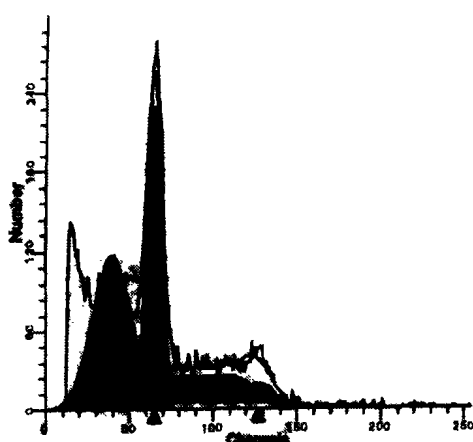
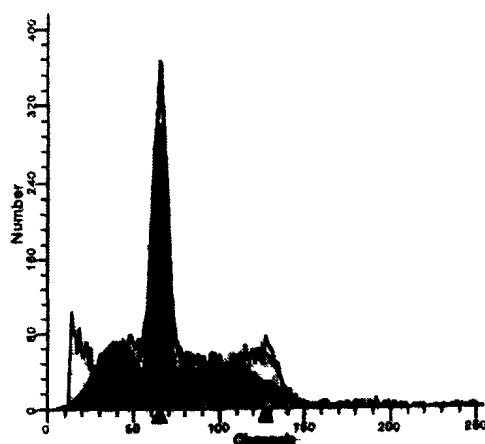
(1) TNF- α / 30 ng/ml + 复方中药 500 μ g/ml 组(2) TNF- α 30 ng/ml + 复方中药 50 μ g/ml 组(3) TNF- α / 30 ng/ml + 复方中药 10 μ g/ml 组(4) TNF- α 30 ng/ml + 复方中药 1 μ g/ml 组

图 2 复方仙贞汤抑制成骨细胞凋亡

2. 本实验中,我们在给药前均用无血清培养基培养,目的是使细胞回复到 G_0 期,保证大多数细胞在给药前处于同一细胞分裂期,以排除因为细胞分化状态不同引起的差异。

3. 骨代谢周期是骨吸收和骨形成维持在一种动态平衡状态,破骨细胞的骨吸收活动和成骨细胞的骨形成活动相互偶联,不断进行骨重建(bone remodeling),所以两者的活动相辅相成不可分割,保证了骨的生长发育和个体的生长发育^[2]。一旦偶联被打破,平衡失衡,破骨细胞的骨吸收活动相对增强或成骨细胞的骨形成活动相对减弱,骨吸收大于骨形成,发生骨质丢失,导致骨质疏松。所以减少破骨细胞的骨吸收活动或增加成骨细胞的骨形成活动两方或任何一方都有助于延缓和治疗骨质疏松。

细胞凋亡(apoptosis)又叫程序性死亡(programme cell death PCD),是由基因控制的自主性的有序死亡,在骨组织的发生、演变、骨修复、骨重建等方面有

重大意义^[2]。多种因素可参与诱导和抑制细胞凋亡。肿瘤坏死因子(TNF- α)即是其中因素之一。TNF- α 是17KDa的细胞因子,由破骨细胞样细胞及成骨细胞合成。现已证明TNF- α 可以直接作用于成骨细胞,对其增殖、分化产生影响^[2]。虽然TNF- α 对成骨细胞的作用较复杂,但现在,学者们在TNF- α 对成骨细胞分化作用的研究结果比较统一,均认为TNF- α 抑制胶原合成、AKP活性和骨钙素合成^[3-5]。Feter^[6]和Jilka^[7]体外实验发现仅TNF- α 可促进成骨细胞凋亡,我们的实验结果也证实了TNF- α 确有促成骨细胞凋亡作用。Pacifi^[8]等人“对绝经后骨质疏松患者末梢血的单核细胞进行培养,发现其还能产生TNF- α 和GM-CSF,切除卵巢的患者,体内的TNF- α 和GM-CSF水平升高,接受雌激素治疗的患者TNF- α 和GM-CSF恢复到正常水平,这也说明TNF- α 在人体内超量形成是促成骨细胞凋亡的因素之一”,Klein等^[2]发现“在老年低骨密度的病人中,骨

组织活检发现成骨细胞数目明显减少,并有凋亡小体出现。提示在绝经后妇女和老年人中,由凋亡引起的成骨细胞数量降低,成骨功能减退,也是引起骨重建失衡的重要原因”。我们的实验结果表明 TNF- α 可能使成骨细胞生长受到抑制,大量积聚并停滞在细胞分化周期的 G₀/G₁ 期阶段,而诱导成骨细胞凋亡。

4. 大量研究表明,“凋亡一旦启动,触发级联反应,刺激物的信息就在信号传递阶段通过细胞器传播,最后集中于效应阶段的一个至多个选择性通路。在培养基中加入细胞凋亡抑制剂,可在许多环节上阻止细胞凋亡的发生”^[9]。所以抑制成骨细胞凋亡的执行,也是防止骨质疏松发生的重要途径。我们把复方仙贞汤加入到 TNF- α 诱导的成骨细胞组,发现模型加 50 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度复方仙贞汤组其凋亡率与模型组比较无统计学意义,说明此浓度下不能发挥抑制凋亡的作用。而模型加 500 $\mu\text{g/ml}$ 和 1 $\mu\text{g/ml}$ 浓度复方仙贞汤组其凋亡率与模型组比较明显减少,有统计学意义,说明药物在此两浓度下抑制凋亡的作用好,且 1 $\mu\text{g/ml}$ 组比 500 $\mu\text{g/ml}$ 组的凋亡率也显著性减少,可见低浓度更能发挥抑制凋亡作用,其凋亡较少,亦骨损失少。同时,从加用中药后其细胞显示各周期的不同百分率及与模型组和空白组差异比较,我们还可以看出:复方仙贞汤抑制成骨细胞凋亡,因所用的浓度不同而影响的细胞周期不同。如高浓度主要影响 G₀-G₁ 期和 S 期,而低浓度对 G₀-G₁、G₂-M、S 期都有影响,且可使诱导细胞的周期变化接近未被诱导的细胞同期变化率。从 G₀-G₁ 期、G₂-M 期和 S 期的比较又可以推测,高浓度复方仙贞汤可使细胞突破 G₀-G₁ 期调控点而进入 DNA 合成的 S 期,而低浓度复方仙贞汤使细胞不但突破 G₀-G₁ 期,也突破 S 期而进入 G₂-M 期,从而更加有效的抑制凋亡。因此推测复方仙贞汤可能是减弱了 TNF- α 对成骨细胞周期某个调控点的作用而在凋亡过程起到抑制作用,影响了细胞的不同周期,也可能刺激释放或激活某些细胞因子,间接抑制破骨细胞作用,具体机制如何?有待于进一步研究^[11],而 50 $\mu\text{g/ml}$ 组比 10 $\mu\text{g/ml}$ 组在前期促增殖实验中均有良好的促增殖作用,此处加入 TNF- α 后却失去抑制凋亡作用,说明药物促增殖和抑凋亡作用并不同步,是否有在 TNF- α 刺激下,启动了某些因素所

致,也是需探讨之处。

5. 复方仙贞汤由淫羊藿、女贞子、酒军等几味中药组成,具有补益脾肾,通降和血之功效。前期临床研究证明,复方仙贞汤能升高雌二醇水平,抑制骨吸收,提高血清骨钙素水平,升高骨密度,改善临床症状,且无毒副反应。动物实验证明能增加骨组织的承载能力,提高骨骼抵抗外力冲击的能力;升高去卵巢大鼠血钙、血磷,降低尿钙、尿磷,促进骨矿化等。体外培养的成骨细胞增殖实验中,低浓度即显示出明显的促增殖作用,且能增加细胞裂解液中 ALP 活性,同时药物分析结果,复方仙贞汤中含有大量雌二醇和钙、镁等丰富的微量元素。本实验结果显示,复方仙贞汤能抑制 TNF 诱导的成骨细胞凋亡,说明复方仙贞汤增强成骨细胞功能的机制可能与抑制成骨细胞凋亡有关。总之,由于凋亡参与了骨质疏松症的发病及病理过程,所以调控成骨细胞凋亡,增强细胞对凋亡的耐受性,也为开发新型防治骨质疏松症的药物提示了新思路。

参 考 文 献

- 1 周丽珍,肖永华,秦腊梅,等.新复方对体外培养成骨细胞增殖和功能的影响.中国现代临床医学杂志,2003,2(6):39-41.
- 2 董玉峰,戴克戎.细胞凋亡与骨重建.中国矫形外科杂志,2000(7):9.
- 3 Zheng MH, Wnod DJ, Papadimitrion JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. Pathol Res Pract, 1992, 188: 1104.
- 4 Roodman GD. Advances in bonebiology: the osteoclast. Endocr Rev, 1996, 17: 308.
- 5 Frost A, Jonsson KB, Nission O, et al. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblast. Acta Orthop Scand, 1997, 68: 91.
- 6 Ferter A, Anthony T, Muruy CM. Endocrinology, 1997, 138:3849.
- 7 Jilka RL, Weinstein T, Bellido AM, et al. Osteoblast programmed cell death: modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res, 1998, 13:793-802.
- 8 Pacifici R, Brown C, Pus check E, et al. The effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood monocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:5134.
- 9 彭善发,王则胜,黎辉.临床实用细胞学.北京:科学技术文献出版社,2002. 10-23.
- 10 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学.北京:科学技术文献出版社,2002.497-504.
- 11 邓耀祖,屈伸.医学分子细胞生物学.北京:科学出版社,2002. 449-453.

(收稿日期:2004-07-25)