

羊胎素对体外成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响

艾春媚 崔燎 魏泉德 刘钰瑜 吴怡

【摘要】 目的 观察羊胎素在体外对新生大鼠颅骨成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响。方法 将提取之羊胎素稀释加入体外培养的SD新生大鼠颅骨成骨细胞体系中,终浓度分别为0.625%、1.25%、2.5%、5%和10%;加药后24、48和96 h用MTT法检测细胞的增殖并绘制生长曲线;培养5 d时用PNPP法测定细胞碱性磷酸酶(ALP)活性;培养31 d时用茜素红染色2.5%羊胎素组形成之矿化骨结节,用图像分析仪计算骨结节的面积。结果 所有含羊胎素浓度组,其MTT法测得的A值都显著高于空白对照组($P < 0.01$),生长曲线表现为含羊胎素组的细胞增殖加快,以2.5%浓度组最为显著;ALP结果显示,羊胎素各浓度组的碱性磷酸酶活性都显著高于空白对照组($P < 0.01$);茜素红染色后显示,2.5%羊胎素组所形成的骨结节面积显著高于空白对照组($P < 0.01$)。结论 羊胎素对体外培养的SD新生大鼠颅骨成骨细胞有显著的促进增殖、分化和矿化的作用。

【关键词】 羊胎素;成骨细胞;增殖;分化;矿化

Effects of placentin on osteoblast proliferation and differentiation in vitro Ai Chunmei, CUI Liao, WEI Quande, et al. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of placentin extracted from lamb placenta on rat calvarium osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. **Methods** Different dilutions of placentin were added to the cultured osteoblasts from calvarium of newborn SD rats. The final concentrations of placentin were 0.625%, 1.25%, 2.5%, 5%, and 10%. The MTT method was employed to detect the osteoblast proliferation after culture with placentin for 24 h, 48 h, and 96 h separately. The osteoblast differentiation was evaluated by detecting activities of alkaline phosphatase (ALP) using PNPP method after culture with placentin for 5 days. Mineralized nodules were stained with alizarin after culture with placentin for 31 days, and the areas of nodules were measured and computed by digitized image analyses. **Results** The OD values by MTT method in all placentin groups were much higher than that in control vehicle group ($P < 0.01$) and were in dose-dependent manner; placentin in concentrations of 2.5% and 5% showed better effects. ALP activities in all placentin groups were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The summed areas of mineralized nodules in 2.5% placentin group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). **Conclusions** Placentin extracted from lamb placenta stimulates the proliferation, differentiation and mineralization of cultured osteoblasts from SD rat calvarium *in vitro*.

【Key words】 Placentin; Lamb placenta; Osteoblasts; Proliferation; Differentiation; Mineralization

羊胎素是采用现代生物技术从羊胎中提取的可超滤的活性物质,其主要成分为小分子多肽,含有17种氨基酸,相对分子质量为3800~5000,是一种纯

天然的提取物,已报道其有提高机体免疫力,抗衰老及抗癌的作用^[1],本研究应用体外培养的新生大鼠颅骨成骨细胞观察羊胎素对成骨细胞增殖、分化和矿化的影响,为羊胎素作为预防和治疗骨质疏松症提供依据。

材料和方法

1. 试剂和仪器:DMEM培养基,Gibco公司产品;

基金项目:广东自然科学基金资助项目(020554)

作者单位:524023 湛江,广东医学院广东天然药物研究与开发实验室(艾春媚、崔燎、刘钰瑜);中山大学基础医学院病原生物学教研室(魏泉德);广东医学院医药科技开发中心(吴怡)

胎牛血清,杭州四季清公司产品;噻唑蓝、胰蛋白酶、透明质酸酶、I型胶原酶、对硝基苯磷酸二钠、维生素C和 β -甘油磷酸钠均为Sigma公司产品;DMSO,江苏如皋富康试剂厂产品;茜素红,上海化学试剂厂产品;CO₂培养箱(美国NAPCO);酶标仪(美国ELX800);图像分析仪(LEICA);恒温振荡仪(哈尔滨东联仪器厂);离心机(上海安亭仪器厂)。

2. 药物:羊胎素(即羊胎水解液)由本院医药科技开发中心提供,取来自内蒙的健康羊胎,用现代工艺低温冷冻干燥制成;实验时取羊胎粉300 mg,在10倍量水中用蛋白酶水解8 h,除去杂质,灭菌,得澄清透明的羊胎水解液(总氮含量N% = 0.69, pH值6.5);实验时以原液为100%含量,用三蒸水稀释,实验终浓度为含原液的0.625%、1.25%、2.5%、5%和10% 5个浓度组。

3. 实验动物:SD(24 h内)新生大鼠,由本院动物中心提供(动物合格证:粤检证字2003A025号)。

4. 细胞培养:取新生大鼠,无菌取颅骨,PBS(含100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)液冲洗数次,剔去结缔组织,剪碎,0.25%胰蛋白酶消化10 min,弃胰蛋白酶液,加入含0.1%透明质酸酶和0.2% I型胶原酶的消化液,在37℃恒温振荡消化20 min,取上清,2000 r/min,离心10 min,沉淀的细胞用不含血清的DMEM培养液洗涤离心一次,再沉淀的细胞用含10%胎牛血清DMEM培养基(含100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)重悬;如此重复消化颅骨碎片5次,将收集细胞混合,以 1×10^5 个/ml接种到培养瓶中,置37℃,5% CO₂培养箱培养,24 h换液,以后每2~3天换液1次,细胞融合后,用0.25%胰蛋白酶消化、传代。本实验所用细胞为传1~2代细胞。每项实验重复2~3次。

5. 成骨细胞增殖率测定:0.25%胰蛋白酶消化已融合成片的成骨细胞,并吹打成单细胞悬液,以 5×10^4 个/ml接种于96孔塑料培养板,100 μ l/孔,24 h后将培养液换成含1%胎牛血清的DMEM培养基,90 μ l/孔,同时加入各浓度的羊胎素10 μ l,使其终浓度为含原液的0.625%、1.25%、2.5%、5%和10%,对照组加入等量的三蒸水,在加药后的24、48和96 h加入MTT(用PBS溶解,5 mg/ml)20 μ l,37℃孵育4 h,将培养液吸出,加入150 μ l DMSO,待结晶完全溶解后,酶标仪测A值,检测波长为570 nm,参考波长630 nm。

6. 成骨细胞碱性磷酸酶活性测定:细胞培养、加入羊胎素的量及浓度以及对照组设置同成骨细胞

增殖率测定,置37℃、5% CO₂培养箱培养5 d,然后,将培养液吸出,用PBS 200 μ l/孔洗2遍,加入PNPP孵育液(25 nmol/L二乙醇胺7.5 ml + 1 nmol/L氯化镁0.75 ml + 6.7 nmol/L PNPP 5 ml + 三蒸水1.75 ml)150 μ l,置37℃恒温箱避光孵育30 min,0.4 mol/L NaOH 50 μ l终止反应,酶标仪于405 nm波长测A值。

7. 矿化骨结节及面积测量:将细胞消化并吹打成单细胞悬液,以 1×10^5 个/ml接种于6孔塑料培养板,每孔2 ml,24 h后,吸出培养液,换含50 μ g/ml维生素C,1 mmol/L β -甘油磷酸钠的培养液,同时加入羊胎素,使其终浓度为含原液的2.5%,对照组加入等量的三蒸水,每组设三个平行孔,连续加药15 d,停药后继续用上述培养液培养,每2~3天换液1次,至31 d,将培养液吸出,PBS液洗3次,95%酒精固定10 min,1%茜素红(2%酒精溶解,pH 8.3)染色5 min,自来水冲洗5次。结果用图像分析仪测量并计算矿化骨结节面积^[2](放大倍数25 \times)。

8. 统计学处理:用SPSS 10.0软件对实验数据进行分析,实验结果以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用t检验。

结 果

1. 对成骨细胞增殖率的影响

含羊胎素0.625%、1.25%、2.5%、5%和10%的各浓度组对成骨细胞培养24、48和96 h后,A值均较对照组显著增加($P < 0.01$,表1)。

表1 成骨细胞增殖率A值测定结果($\bar{x} \pm s$)

羊胎素组别样本数		24h A值	48h A值	96h A值
(%)	(n)			
0.0	8	0.285 \pm 0.014	0.379 \pm 0.025	0.374 \pm 0.037
0.625	8	0.294 \pm 0.018	0.477 \pm 0.034**	0.712 \pm 0.026**
1.25	8	0.336 \pm 0.025**	0.552 \pm 0.038**	0.851 \pm 0.083**
2.5	8	0.339 \pm 0.032**	0.650 \pm 0.066**	1.233 \pm 0.134**
5.0	8	0.339 \pm 0.042**	0.682 \pm 0.065**	1.170 \pm 0.352**
10.0	8	0.332 \pm 0.027**	0.498 \pm 0.057**	0.734 \pm 0.046**

注:与对照组比较** $P < 0.01$

2. 对成骨细胞生长的影响

由图1中可见,成骨细胞加入羊胎素24 h时即对细胞的增殖呈现显著的促进作用,随着时间的延长,这种作用愈明显。以2.5%及5%浓度组培养后对细胞生长的促进作用最为明显。

3. 对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

羊胎素各浓度组成骨细胞培养5 d后,使碱性磷酸酶的活性均明显增加($P < 0.01$,表2),尤以

2.5%及5%浓度组最为明显。

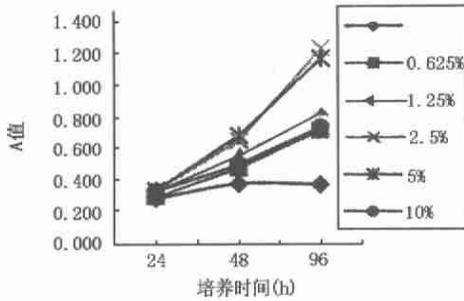


图1 羊胎素对细胞生长的影响

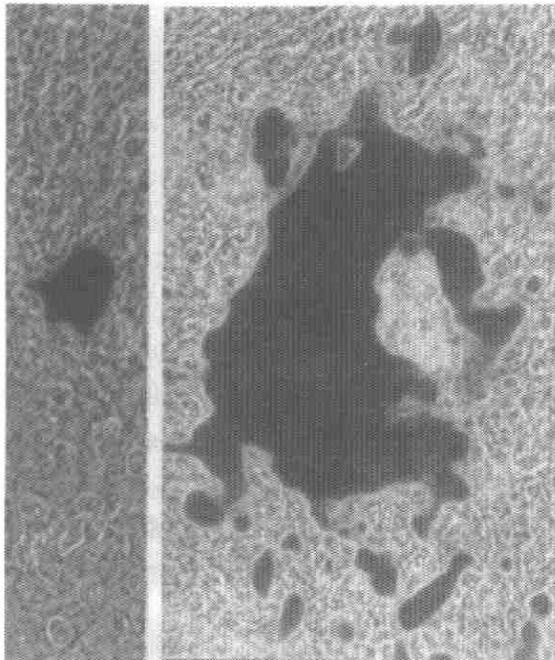
表2 培养5d碱性磷酸酶活性测定($\bar{x} \pm s$)

羊胎素组别(%)	样本数(n)	A组
0.0	8	0.416 ± 0.042
0.625	8	0.588 ± 0.050**
1.25	8	0.659 ± 0.027**
2.5	8	0.692 ± 0.052**
5.0	8	0.730 ± 0.035**
10.0	8	0.604 ± 0.101**

注:与对照组比较** P < 0.01

4. 对成骨细胞矿化骨结节的影响

成骨细胞在含2.5%羊胎素的培养系统中培养31d,骨结节数量明显多于对照组,骨结节呈圆形、椭圆形或不规则形,大小不一,边界清晰(图2),经图像分析仪测量骨结节面积,与对照组比较,含2.5%羊胎素组形成的骨结节面积明显大于对照组,差异有显著性(P < 0.01,表3)。



A. 空白对照组 B. 2.5%羊胎素组

图2 成骨细胞培养形成的骨结节(100x)

表3 成骨细胞矿化骨结节面积($\bar{x} \pm s$)

羊胎素浓度(%)	样本数(n)	面积(mm ²)
0.0	3	14.68 ± 3.701
2.5	3	37.318 ± 3.788**

注:与对照组比较** P < 0.01

讨论

骨质疏松和骨质疏松性骨折作为老年性疾病之一,已成为世界关注的严重社会问题。目前,用于预防和治疗骨质疏松的药物,包括各种钙剂、雌激素和双磷酸盐类都存在不同程度的缺陷,补钙剂虽能补钙,但不能促进骨胶原的合成,而雌激素和双磷酸盐类均有较大的副作用。因此,寻找既能促进钙等矿物质的沉积,又能促进胶原的合成,且无或很少有副作用的防治骨质疏松的天然药物成为研究热点。

羊胎素是利用现代生物技术从羊胎中提取的一种纯天然的生物活性物质,含有丰富的蛋白质,具有明显的抗辐射、抗衰老、抗肿瘤及提高人体免疫能力的作用^[1,3,4]。本实验利用蛋白酶水解提取之羊胎素作用于体外培养的大鼠颅骨成骨细胞,在含羊胎素原液的0.625%、1.25%、2.5%、5%和10%时培养24、48及96h,均可显著提高成骨细胞的增殖率(与空白对照组比较, P < 0.01),且以2.5%~5%浓度促增殖最为显著。碱性磷酸酶(ALP)的表达是成骨细胞分化的主要特征之一,在成骨细胞增殖早期就已经出现该基因的转录,增殖后期,ALP的活性可增加2~3倍^[5]。本实验ALP检测显示,羊胎素可显著增加成骨细胞ALP的含量(与空白对照组比较, P < 0.01),说明羊胎素具有促进成骨细胞分化的作用。

矿化结节的形成能力是反映成骨细胞晚期分化的指标。促进骨钙化的主要细胞是成骨细胞,矿化结节的形成代表了成骨细胞分化成熟、行使成骨功能的阶段,是成骨功能的形态表现。本实验茜素红染色结果显示,在含羊胎素原液2.5%的浓度时,生成的骨结节数量明显多于对照组,且单个骨结节面积明显大于对照组(见图2),图像分析仪总和之骨结节面积亦明显大于对照组(P < 0.01),说明羊胎素具有明显促进成骨细胞基质矿化的作用。

刺激成骨细胞增殖的信息传递通路较复杂,不同药物作用于不同细胞信息通路,对成骨细胞增殖作用较强的雌激素可作用于这些信号通道的一个分支旁路而防止骨质疏松^[6]。从3个月的人胎盘分离

- 4065-4073.
- 7 Svensson J, Lall S, Dickson SL, et al. Effects of growth hormone and its secretagogues on bone. *Endocrinology*, 2001, 14:63-66.
 - 8 Sugimoto T, Kaji H, Nakaoka D. Effect of low-dose of recombinant human growth hormone on bone metabolism in elderly women with osteoporosis. *Eur J Endocrinol*, 2002, 147:339-348.
 - 9 Baroncelli GI, Bertelloni S, Sodini F, et al. Lumbar bone mineral density at final height and prevalence of fractures in treated children with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:3624-3631.
 - 10 Semman E. Reduced bone density in women with fracture: contribution of low peak bone density and rapid bone loss. *Osteoporos Int*, 1994, 1 (Suppl 1): 5-25.
 - 11 Fitts JM, Klein RM, Powers C. Estrogen and tamoxifen interplay with T3 in male rats: Pharmacologically distinct classes of estrogen responses affecting growth, bone, and lipid metabolism, and their relation to serum GH and IGF-1. *Endocrinology*, 2001, 142: 4223-4235.
 - 12 Bravenboer N, Engelbregt MJT, Visser NA, et al. The effect of exercise on systemic and bone concentrations of growth factors in rats. *J Orthop Res*, 2001, 19:945-949.
 - 13 Genazzani AD, Stomati M, Strucchi C, et al. Oral dehydroepiandrosterone supplementation modulates spontaneous and growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone and insulin-like growth factor-1 secretion in early and late postmenopausal women. *Fertility & Sterility*, 2001, 76:241-248.
 - 14 Camacho-Hubner C, Savage M. Insulin-like growth factor-1 deficiency. *Hormone Research (Basel)*, 2001, 55(Suppl 1): 17-20.
 - 15 Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu LRJ, et al. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in vitro and OPG in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:4273-4279.
 - 16 Yakar S, Rosen CJ, Beamer Wesley G, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*, 2002, 110: 771-781.
 - 17 Stabnov L, Kasukawa Y, Guo R, et al. Effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) plus alendronate on bone density during puberty in IGF-1-deficient MIDI mice. *Bone*, 2002, 30:909-916.
 - 18 Garnero P, Elisabeth SR, Delmas PD. Low serum IGF-1 and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Lancet(North American Edition)*, 2000, 355:898-899.
 - 19 Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, et al. Endogenous prostaglandin E₂ and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 713-721.
 - 20 Kassem M, Okazaki R, Harris SA, et al. Estrogen effects in insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *Journal Calcif Issue Int*, 1998, 62:60-66.
 - 21 Koedam JA, Hoogerbrugge CM, Van SC. Differential regulation of IGF binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-1 and dexamethasone. *J Endocrinol*, 2000, 165:557-567.
 - 22 廖二元. 骨质疏松研究的现状与展望. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18(2):87-89.

(收稿日期:2004-05-25)

(上接第 497 页)

的胎盘素已证实属于胰岛素及胰岛素样生长因子家族,其基因重组产物用 Furin 水解后含 4kD 和 13kD 2 条多肽,有促进细胞增殖和分化的作用^[7]。本研究所用羊胎素为羊胎盘蛋白酶水解提取物,为胎盘水解片段,可能也属于胰岛素样生长因子家族,可刺激成骨细胞的某一信息通路发挥其生物活性。因羊胎素 2.5% 的浓度时促进成骨细胞增殖作用最佳,增加浓度并不能增强刺激作用,因此,其作用可能是通过受体作用机制,羊胎素对骨细胞的这种作用机理有待进一步研究。

本实验采用体外细胞培养的方法,初步证实了羊胎素具有促进成骨细胞增殖、分化和基质矿化的作用,但其作用有待体内实验进一步证实。羊胎素用于人体美容、保健已有数 10 年,尚未见有毒副作用的报道,相信随着今后研究工作的深入,羊胎素将

为骨质疏松症的防治提供新的选择。

参 考 文 献

- 1 杨秀芳,许牡丹,吴明鑫. 活化羊胎素的提取与应用开发. *宝鸡文理学院学报(自然科学版)*, 1999, 19:40-41.
- 2 Weinreb M, Suponitzky I, Keila S. Systemic administration of anabolic dose of PGE₂ in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone*, 1997, 20:521-526.
- 3 刘少娟,陈冠敏,何聆. 羊胎素延缓衰老作用的研究. *环境与职业医学*, 2002, 19:196-197.
- 4 岸本进. 从免疫观点看衰老. *最新医学*, 1989, 44:954-958.
- 5 王洪复,主编. *骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术*. 上海:上海科学技术出版社, 2001. 60-63.
- 6 Lorenzo J. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J Clin Invest*, 2003, 111:1641-1643.
- 7 Koman A, Cazaubon S, Couraud PO, et al. Molecular characterization and *in vitro* biological activity of placentin, a new member of the insulin gene family. *J Biol Chem*, 1996, 271:20238-20241.

(收稿日期:2004-06-28)