

# 阿胶强骨口服液含药血清对胎鼠成骨细胞护骨素及护骨素配体 mRNA 表达的影响

沈霖 武嘉林 李蕾 夏远军 高兰 谢晶 周丕琪 杨艳萍

**摘要:** 目的 研究阿胶强骨口服液含药血清对胎鼠成骨细胞中 OPG、RANKL 表达的影响, 探讨阿胶强骨口服液治疗骨质疏松的分子机制。方法 3月龄 Wistar 大鼠(雌雄各半) 30只, 随机分为阿胶强骨口服液, 雌激素, 及生理盐水对照组, 灌胃 7d 后, 制备实验组和对照组的含药血清。将新生 SD 大鼠分离的颅骨成骨细胞, 制成单细胞悬液, 消化传代, 取二代培养的成骨细胞, 制成细胞悬液。培养细胞被分为 5 组, 分别加同体积药液, 对照组仅加培养液, 继续培养。采用 MTT 比色分析、 $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷( $^3\text{H}$ -TdR) 渗入法测定成骨细胞增殖, 用放免法测定细胞内 BGP 含量, RT-PCR 测定胎鼠成骨细胞中 OPG、RANKL mRNA 的表达。结果 阿胶强骨口服液含药血清以剂量依赖方式促进成骨细胞的增殖, 与对照组相比, 差异显著( $P < 0.05$ )。成骨细胞 OPG 基因 mRNA 表达在阿胶强骨口服液含药血清 100ml/L 时最强, 与雌激素组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ), 且明显高于对照组( $P < 0.05$ )。成骨细胞 RANKL 基因 mRNA 表达在 1000ml/L 阿胶强骨口服液含药血清与雌激素组比较无显著性差异( $P < 0.05$ ), 且明显低于对照组( $P < 0.05$ )。结论 阿胶强骨口服液可在细胞水平上促进骨的合成代谢及前成骨细胞的有丝分裂, 分子水平上调节 OPG/RANKL 表达而治疗骨质疏松。

**关键词:** 骨质疏松; 骨保护素; 骨保护素配体; 骨钙素; 阿胶强骨口服液

**Effects of containing drugs blood serum of donkey - hide glue reinforcing bone oral solution on mRNA expressing of OPG and OPGL in osteoblast in rats** SHEN Lin, WU Jialin, LI Lei, et al. Union Hospital, Affiliated Tongji Medical College, Huazhoug University of Technology and Science, Wuhan430022, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of containing drugs blood serum of donkey - hide glue reinforcing bone oral solution (DGRBOS) on mRNA expression of OPG and OPGL in osteoblast in rats and explore the molecular mechanism of treating osteoporosis with DGRBOS. **Methods** 30 Wistar rats were randomly divided into DGRBOS group, estrogen group and normal control group. After intragastric administration for 7 days, containing drugs serum was prepared, Skull osteoblast was isolated from newborn SD rats and was made into single cell suspension. The cultured osteoblasts were divided into 5 groups. The experimental groups were given equal volumes of drugs serum and the control group was given cultured fluid. The osteoblast proliferation was measured by antigenic MTT colorimetric analysis and  $^3\text{H}$ -TdR penetration method. The intra-cellular BGP contents were evaluated by radioimmunity. The mRNA expression of OPG and PANKL in osteoblasts was analyzed by Rt-PCR. **Results** DGRBOS could enhance osteoblast proliferation in a dose-dependent manner, compared to the control group; a significant difference was present ( $P < 0.05$ ). As the concentration of contained drug serum of DGRBOS for 1000ml/L appeared as the peak of mRNA expression OPG and OPGL in osteoblasts, compared with control group, significant differences were absent ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The partial mechanism of preventing and treating osteoporosis with DGRBOS is that it might promote osseous anabolism and preosteoblast caryocinesia at cellular lever and regulate OPG/RANKL ratio at molecular lever.

**Key words:** Osteoporosis; OPG; RANKL; BGP; Donkey-hide glue reinforcing bone oral solution (DGRBOS)

骨质疏松的发生是骨重建过程紊乱的结果。正常的骨重建过程依赖骨吸收和骨形成过程的动态平衡,而这一过程又分别与破骨细胞(osteoclast OC)和成骨细胞(osteoblast OB)的功能密切相关。骨保护素(OPG)是新近发现的调节骨吸收的一种糖蛋白<sup>[1]</sup>,成骨细胞能表达OPG基因,并通过OPG配体(OPGL,也称receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)调节破骨细胞活性,已经证实,在M-CSF存在的前提下,RANKL能够诱导破骨细胞前体转化为破骨细胞,并且增强成熟破骨细胞的活性<sup>[2]</sup>。OPG是通过竞争性结合RANK而抑制破骨细胞分化的可溶性受体。OPG/RANKL系统是破骨细胞和成骨细胞相互调节的耦联因子之一<sup>[3]</sup>。因此,OPG/RANKL在骨质疏松发病以及防治中的作用成为近年来研究的热点。阿胶强骨口服液是治疗骨质疏松症的国家3类中药。为了探讨其疗效机理,我们于2003年6月至2004年10月研究观察了阿胶强骨口服液含药血清对胎鼠成骨细胞中OPG、OPGL表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 阿胶强骨口服液含药血清制备

3月龄Wistar大鼠(购自同济医学院实验动物中心,Ⅱ级动物,动物合格证号:19-050)30只,随机分为3组( $n$ 均=10)。阿胶强骨口服液组,按照人与动物间药物剂量的换算方法<sup>[4]</sup>,计算出每只大鼠灌胃给服阿胶强骨口服液(国药准字Z20000039,新疆华世丹药业股份有限公司生产,批号:20030118C6)1.5ml/次,1次/d;雌激素组将利维爱(荷兰欧加农公司产品,批号LE0901-10)药物研磨为细粉,用蒸馏水配制成0.0125mg/1.5ml浓度灌胃,1次/d;对照组灌服生理盐水1.5ml/次,1次/d,共7天。末次灌胃后右心室取血,将各组血液于低温条件下(4℃)下放置6h,3000r/min离心后取血清。再将血清过滤除菌后4℃冷藏备用<sup>[5]</sup>。

### 1.2 成骨细胞的分离和培养

按本实验室法<sup>[6]</sup>,将新生SD大鼠(同济医学院实验动物中心提供,Ⅱ级动物,动物合格证号:19-053)分离的颅骨成骨细胞种植在含10%小牛

血清的DMEM培养液(美国Gibco公司)中,制成单细胞悬液,置37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,待细胞融合后,消化传代。取二代培养的成骨细胞用含10%小牛血清培养液配制成 $2 \times 10^5$ ml的细胞悬液,然后根据实验要求接种于培养瓶或培养板中,放入CO<sub>2</sub>培养箱内孵育24h后用于实验。

### 1.3 干预试验

培养细胞被分为5组,分别加同体积药液。阿胶强骨口服液组分别加入用培养液稀释为100ml/L、500ml/L及1000ml/L不同浓度的阿胶强骨口服液含药血清;雌激素组分别加入100ml/L及1000ml/L利维爱含药血清;对照组仅加培养液。同时各组再加入含10%小牛血清的培养液,继续培养。

### 1.4 成骨细胞增殖及细胞内骨钙素(BGP)定量测定

#### 1.4.1 MTT比色分析法

接种在96孔培养板的细胞生长72h后,于1000r/min离心5min。吸去上清液,每孔加入1mg/ml MTT 100 $\mu$ l,于37℃孵育2h,细胞内出现深蓝色晶体后,终止培养,吸弃孔内上清液,每孔加入100 $\mu$ l DMSO,4℃冰箱内过夜,使细胞内结晶体完全溶解,直接于DG3022酶联免疫检测仪570nm波长处比色,测定OD值。并计算抑制率:抑制率=[(实验组OD值-对照组OD值)/对照组OD值]×100%。

#### 1.4.2 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)渗入法

96孔培养板细胞生长66h后,加入含1 $\mu$ Ci/ml<sup>3</sup>H-TdR的新鲜培养液,继续培养6h,终止反应,用ZT-Z型自动细胞收集仪将细胞收集至999型玻璃纤维滤纸上,以蒸馏水充分洗涤,5%三氯醋酸固定,干燥,入5ml闪烁瓶内闭光过夜,以液体闪烁计数器测量每孔每分钟计数(cpm)值。

#### 1.4.3 细胞内骨钙素(BGP)定量测定

接种于培养瓶中的细胞培养72h,消化悬浮后取10<sup>6</sup>个细胞,离心,加1ml PBS与0.2% triton-X(含4mmol/L EDTA)按1:1混合,静止10min后按BGP专用试剂药盒(北京放射医学研究所产品)说明书用放免法测定细胞内BGP含量。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

Trizol(美国Gibco公司)抽提成骨细胞总RNA。取2 $\mu$ g总RNA,用逆转录试剂盒(美国Promega公

司)合成 cDNA,再取 1 μl cDNA 行 PCR 扩增 OPG、RANKL 基因,以 β-actin 基因为内对照。引物由生物工程公司合成,OPG 上游引物:5' t g t c c g g a t g g g t t c t t c t c a g g t 3',下游引物:5' t t c c c a g g c a a g c t c t c c a t c a a g 3',扩增长度为 482 b p; O P G L 上游引物:5' t t c g a g g t t c t c a g t g g c a c a g 3',下游引物:5' g g c t g g t g a g g a a t t a g c g t c 3',扩增长度为 453 b p, β-actin 上游引物:5' g t t t g a g a c c t t c a a c a c c c c 3',下游引物:5' g t g g c c a t c t c t c t t g c t c g a a g t c 3',扩增长度为 320 b p。反应体系为 50 μl,双蒸水 35 μl, d N T P 1 μl, M g C l 2 3 μl, 10×Buffer 5 μl, T a q 酶 0.5 μl,上游引物各 1 μl,下游引物各 1 μl,模板 3 μl。OPG 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,53℃退火 30 s,72℃延伸 30 s 共 30 个循环,最后延伸 7 min。OPGL 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,53℃退火 30 s,72℃延伸 30 s 共 30 个循环,最后延伸 7 min。PCR 扩增产物于含 0.5 mmol/L 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并拍照,并用 Im-agemaster I VDS 成像分析系统行条带光密度检测,测

值与 β-actin 光密度值比较。

1.6 统计学方法

用 SPSS12.0 软件包统计分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 阿胶强骨口服液含药血清对成骨细胞增殖的影响

MMT 比色及 <sup>3</sup>H - TdR 测定结果显示,阿胶强骨口服液含药血清以剂量依赖方式促进成骨细胞的增殖,与对照组相比,100 ml/L 含药血清即可明显促进成骨细胞增殖 (P<0.05),并在 500 ml/L 浓度时达到最大效应 (P<0.01),当浓度大于 500 ml/L 时,其作用趋于饱和。见表 1。

2.2 阿胶强骨口服液含药血清对成骨细胞 BGP 的影响

各浓度阿胶强骨口服液及利维爱含药血清均可增加成骨细胞 BGP 含量 (P 均<0.05),见表 1。

表 1 各组 MTT, 3HTdR 及 BMG 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度	n	MTT (OD 值)	3H-TdR (CMR 值)	BGP (ng/10 <sup>6</sup> 细胞)
对照组	0	10	0.2047±0.0027	373.5±32.4	19.82±3.67
阿胶强骨	100 ml/L	10	0.2176±0.0032*	547.6±57.7*	27.22±5.32*
口服液组	500 ml/L	10	0.2268±0.0040*	791.4±89.7**	31.53±4.45*
	1000 ml/L	10	0.2231±0.0037*	754.8±83.4**	32.34±5.58*
利维爱	100 ml/L	10	0.2463±0.0026*	1051.8±89.4**	36.46±5.43*
	1000 ml/L	10	0.2607±0.0034**	1355.8±36.7**	39.83±4.28*

注:与对照组比较\*P<0.05,\*\*P<0.01

2.3 成骨细胞 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达

成骨细胞 OPG 基因 mRNA 表达在阿胶强骨口服液含药血清 1000 ml/L 时最强,与 100 ml/L,500 ml/L 比较差异有显著性 (P<0.05),且与 100 ml/L 利维

爱血清比较无显著性差异 (P>0.05)。成骨细胞 RANKL 基因 mRNA 表达在 1000 ml/L 阿胶强骨口服液含药血清与 100 ml/L 利维爱血清比较无显著性差异 (P>0.05)。且明显低于对照组,见表 2。

表 2 各组 OPG 及 RANKL 基因 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度	n	OPG/β-actin	RANKL/β-actin
对照组	0	10	0.564±0.21	0.036±0.004
阿胶强骨	100ml/L	10	0.581±0.32	0.032±0.007
口服液组	500ml/L	10	0.608±0.31	0.034±0.007
	1000ml/L	10	0.986±0.27*	0.018±0.005*
利维爱	100ml/L	10	1.043±0.39*	0.018±0.004*
	1000ml/L	10	1.246±0.34*	0.006±0.007**

注:与对照组比较,\*P<0.01,\*\*P<0.001

### 3 讨论

研究已表明,原发性骨质疏松症的骨代谢活动呈负平衡状态,即骨吸收增强,骨形成相对减弱,以至骨质不断丢失。因此抑制骨吸收,促进骨形成是防治骨质疏松症的有效方法。成骨细胞是骨发生和骨形成的物质基础。成骨细胞一定数量的增殖,才能产生丰富的骨胶原和分泌钙离子,并通过钙化形成骨细胞,以维持骨组织生理代谢。在体内,成骨细胞是不分裂的,其数量的增加完全依赖于其前身细胞。体外培养来源于前成骨细胞,具有分裂增殖能力。本研究应用 MMT 比色分析和<sup>3</sup>H-TdR 掺入法观察了阿胶强骨口服液含药血清对体外培养成骨细胞增殖的影响,并与抗骨质疏松药利维爱进行对照。结果发现,阿胶强骨口服液对成骨细胞的增殖有明显的促进作用,并且这种作用呈现剂量依赖性和可饱和性,与利维爱无显著性差异。

骨钙素亦称骨  $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白,它是由成骨细胞产生和分泌的一种非胶原蛋白,具有骨代谢调节激素样作用。羧基化后的骨钙素可与  $\text{Ca}^{2+}$  和羟基磷灰石结合,使骨矿化。骨钙素检测常可反映骨的合成代谢。本实验显示,各浓度的阿胶强骨口服液及利维爱含药血清均可增加成骨细胞内骨钙素的含量,组间无显著性差异。提示阿胶强骨口服液治疗骨质疏松症的机理之一是促进骨的合成代谢及前成骨细胞的有丝分裂。

RANKL 是 TNF 配体超家族的成员,主要通过和细胞信号转导受体 NF- $\kappa$ B 受体激动剂 (RANK) 结合而发挥作用<sup>[7]</sup>。RANKL 和破骨细胞表面的 RANK 结合后,可以促进破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,同时增强破骨细胞的活性并延长破骨细胞的存活时间<sup>[8]</sup>。OPG 属于 TNF 受体超家族,是一种分泌型受体,无转膜区。OPG 竞争性的结合破骨细胞表面 RANK,从而阻断 RANKL 与 RANK 结合,抑制破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,并抑制成熟破骨细胞的活性<sup>[9]</sup>。OPG 在转基因小鼠中过度表达可以导致骨质硬化。提示这种 OPG 转基因小鼠存在破骨细胞分化缺陷<sup>[10]</sup>。相反,OPG 基因敲除小鼠由于破骨细胞分化和活性明显增强,所以表现为严重的骨质疏松<sup>[11]</sup>。体外研究也表明,

OPG 能显著的抑制破骨细胞分化并抑制破骨细胞的骨吸收活性<sup>[12]</sup>。

RANKL 和 OPG 在局部表达的相对水平 (通常用 RANKL/OPG 表示),在调控破骨细胞介导的骨吸收效应中起主导作用<sup>[12]</sup>。局部或全身性的影响骨重建的因素或因子都与局部 RANKL/OPG 的改变有关。本试验结果表明阿胶强骨口服液含药血清能使 OPG mRNA 和蛋白的表达升高,部分降低成骨细胞 RANKL 基因 mRNA 表达,表明其治疗骨质疏松的机理之一是在细胞分子水平上调节 OPG/RANKL 表达而达到的。

### 【参 考 文 献】

- [1] Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999, 402: 304 - 309.
- [2] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*, 1999, 145: 527 - 538.
- [3] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin; a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309 - 319.
- [4] 施新首. 现代医学实验动物学. 北京: 人民军医出版社, 1999: 32.
- [5] 师少军, 陈汇, 曾繁典. 中药复方药物代谢动力学研究方法及展望. *中国临床药理学杂志*, 2001, 17 (3): 235 - 238.
- [6] 沈霖, 杜靖远, 胡光亮, 等. 密骨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.
- [7] Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*, 2000, 141: 4768 - 4776.
- [8] Lam J, Nelson CA, Ross FP, et al. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest*, 2001, 108: 971 - 997.
- [9] Grimaud E, Re' dini F, Heymann D. Osteoprotegerin; a new agent for the treatment of bone disease. *Drug Discov Today*, 2002, 6: 1241 - 1242.
- [10] Fazzalari NL, Kuliwaba JS, Atkins GJ, et al. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1015 - 1027.
- [11] Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK - L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 795 - 823.
- [12] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397: 315 - 323.