

二磷酸盐和骨碎补总黄酮对诱导后成骨细胞影响的实验研究

田坤 尹文哲 刘伟 薛震 赵金东

摘要：目的 探索二磷酸盐和骨碎补总黄酮联合作用如何在分子水平发挥作用于成骨细胞，揭示其效果如何。方法 使用诱导方法作用于骨髓基质干细胞，使之转化为成骨细胞，用 RT-PCR 检验成骨细胞不同浓度的二磷酸盐或骨碎补总黄酮配制成条件培养基，作用于成骨细胞，并分析生长曲线，分析细胞基因碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase ALP) 和胶原酶 I (collagenase col I) 表达情况。结果 骨髓基质细胞经过 4 周诱导可转化为表达 col I 和 ALP 的成骨细胞，经过生长曲线分析，二磷酸盐和骨碎补总黄酮 $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，对诱导后的成骨细胞有抑制作用； $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有促进作用； $10^{-10} \sim 10^{-12} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不明显，其中 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最强。基因分析后，发现二磷酸盐和骨碎补总黄酮促进成骨细胞表达 col I 和 ALP，且两者合用效果大于单独用药。结论 二磷酸盐和骨碎补总黄酮合用均可促进成骨细胞基因表达，且两者合用效果大于单独用药。

关键词：骨髓基质干细胞；成骨诱导；二磷酸盐；骨碎补总黄酮

Experimental study on the effect of Diphosphonate and assemble flavone of drynaria rhizome on the induced osteoblast TIAN Kun, YIN Wenzhe, LIU Wei, et al. Harbin Medical University The 2nd Affiliated Hospital, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To study effects of diphosphonate and assemble flavone of drynaria rhizome on the osteoblast at the level of molecule. **Methods** We isolated and cultured the MSCs, then induced MSCs (bone marrow stem cell MSCs) into osteoblast and checked the osteoblast by RT-PCR; the conditioned medium in different concentration was prepared containing diphosphonate or assemble flavone of drynaria rhizome; with the conditioned medium the osteoblast was cultured; then the growth curve was analyzed and the cytogene (collagenase col I) col I and (alkaline phosphatase ALP) ALP expression was detected. **Results** We can induce MSCs into osteoblasts which can express gene col I and ALP. Through analysis growth curve, we demonstrated the diphosphonate or assemble flavone of drynaria rhizome with $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ had the inhibition on the osteoblast; it with $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ had a promotion on the osteoblast; it with $10^{-10} \sim 10^{-12} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ had a restraint on osteoblast. **Conclusion** Through gene analysis, we found the diphosphonate or assemble flavone of drynaria rhizome can have the promotion on the osteoblast. Especially, combined diphosphonate and assemble flavone of drynaria rhizome had more promotion on the osteoblast than diphosphonate or assemble flavone of drynaria rhizome lonely.

Key words: Bone marrow stem cell; Osteoblast induction; Diphosphonate; Assemble flavone of drynaria rhizome

二磷酸盐作为一类重要的防治骨质疏松症的药物，治疗骨质疏松症（特别是 2 型骨质疏松）的机理主要是作用于破骨细胞^[1]，抑制骨吸收，降低骨转换，并通过改变使破骨细胞活化的骨基质性质抑制新生破骨细胞形成。但是长期服用二磷酸盐又会引

起胃肠道等一些副作用。如何减少副作用，又提高治疗的效果，是目前用该药治疗与预防骨质疏松的关键。国内外目前应用二磷酸盐和骨碎补治疗骨质疏松已有大量报道，但是二磷酸盐或骨碎补总黄酮如何在分子水平发挥作用的机制报道不多见，特别是两者联合用药的效果如何，未见报道。本实验将二磷酸盐和骨碎补总黄酮联合用药，观察其对成骨细胞的分子生物学变化。

作者单位：哈尔滨医科大学附属第二医院骨二科（田坤、尹文哲、薛震、赵金东）哈尔滨医科大学附属第二医院实验中心（刘伟）

通讯作者：田坤，Email: tiank2088.student@sina.com

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 普通级大鼠由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供。胰蛋白酶、EDTA 均购自美国 sigma 公司;DMEM、新鲜牛血清、MTT 购自北京索莱宝科技有限公司;TRIZol 试剂盒、骨钙素免疫组化染色试剂盒、ALP 染色试剂盒和矿化结节茜红素染色试剂盒、Dntp、 $MgCl_2$ $1 \mu L$ 、 $10 \times$ Buffer、Tap 酶、引物合成均购自上海博亚生物技术有限公司;倒置显微镜 (OLYMPUS IMF2-21 日本);酶联免疫检测仪 (Multis Kan Mk3 美国);PCR 扩增仪 (AMPLY GeneStar 9625 中国);滑碎补总黄酮北京岐黄制药有限公司提供;二磷酸盐购自江苏正大天晴药业股份有限公司。

1.2 细胞分离与培养

取 14W 的 Wistar 普通级大鼠引颈处死,无菌条件下取管状骨骨髓。将骨髓标本移入梯度液中,离心,用吸管吸取单核细胞部分,接种密度为 $10^4 \sim 10^5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$,在 $37^\circ C$ 含 5% 的湿化空气中培养。培养 4~5 d 换液半量,以后每 3 d 换液用含 10% 的 DMEM 培养液。细胞长满时可用胰蛋白酶消化法收集细胞用于实验或进行传代培养。

1.3 诱导与培养

骨髓基质细胞传第 3 代后,及时加入诱导剂 (DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清 + $10^{-8} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 地塞米松 + $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 甘油酸钠 + $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 维生素 C) 继续培养。

1.4 细胞特征性鉴别

1.4.1 一般形态学观察 采用倒置显微镜能够观察细胞生长情况及形态特征,并照像。

1.4.2 骨钙素免疫组化染色、ALP 染色和矿化结节茜红素染色。

1.4.3 用逆转录检测是否表达碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase ALP) 和胶原酶 I (collagenase col I)。

1.5 成骨细胞增殖检测

采用四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazole tetrazolium, MTT) 法。取成骨细胞,酶消化后接种于 96 孔板,贴板后换为条件培养基含 $10^{-4} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $10^{-6} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $10^{-10} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $10^{-12} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 浓度的二磷酸盐 (依磷,生产批号 20050611) 或和骨碎补总黄酮 (强骨胶囊,生产批号 20051108) 和空白组进行刺激,并于 24、48、72、96 h 进行检测。检测前 4 h 于培养液中加入 $20 \mu L$ 的 MTT 共同培养,最后弃

上清液,加入 $150 \mu L$ 的 DMSO 充分混匀,静置 10 min 后,用酶标仪测定 492 波长的吸光度值。

1.6 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

细胞培养及处理同前。

1.6.1 总 RNA 提取及检测 采用 TRIZol 试剂盒,提取总 RNA,取少量做快速琼脂糖电泳,以分析 RNA 完整性。

1.6.2 cDNA 第一链合成 采用 Superscrip 2 第一链合成试剂盒,操作按产品说明进行。

1.6.3 多聚酶链反应 (PCR) 目的基因为 ALP 和 col I,参照基因为 β -actin。ALP 上游引物为 5'-CC-CGCATCCTTAAGGGCCAG-3',下游引物为 5'-TAGG-CGATGTCCTTGCAGC-3',其扩增产物长度为 408 bp; col I 上游引物为 5'-GGAGAGACTGCCAACTCCAG-3' 下游引物为 5'-CCACCCCAGGGATAAAAACT-3',扩增产物长度为 206 bp β -actin 上游引物为 5'-ACCA-CAGCTGAGAGGGAAATCG-3',下游引物为 5'-AG-AGGTCTTTACGGATGTCAACG-3',其扩增产物长度为 281 bp。反应体系为 $25 \mu L$,dNTP $0.5 \mu L$, $MgCl_2$ $1 \mu L$, $10 \times$ Buffer $2.5 \mu L$,上游引物各 $1.0 \mu L$,下游引物各 $1.0 \mu L$,Tap 酶 $0.5 \mu L$ 。

1.6.4 ALP 和 col I 的反应条件 $94^\circ C$ 预变性 5 min, $94^\circ C$ 变性 30 s, $55^\circ C$ 退火 30 s, $72^\circ C$ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 $72^\circ C$ 延伸 7 min。

1.6.5 PCR 产物分析 取 PCR 产物 5 和 DL 2000 Marker,在 1.5% 琼脂糖下电泳,于紫外线箱中观察并记录。

通过 GDS 8000 DNA 定量测定系统对目的基因和参照基因条带进行像素值测定,并计算出两者比值。

1.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 差表示,组间比较用方差分析,两两比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 成骨细胞鉴定

诱导 4 周后,ALP 染色可见细胞内有黑色颗粒,骨钙素免疫组化染色,成骨细胞浆可见棕黄色颗粒胞浆被染成空泡,矿化结节茜红素染色呈红色结节,且细胞能表达 ALP 和 col I,证明细胞为成骨细胞;形态为梭形,长满为近似方形,见图 1。

2.2 MTT 检测结果

MTT 检测结果如图 2 所示,二磷酸盐和骨碎补总黄酮 $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时,对诱导后的成骨细

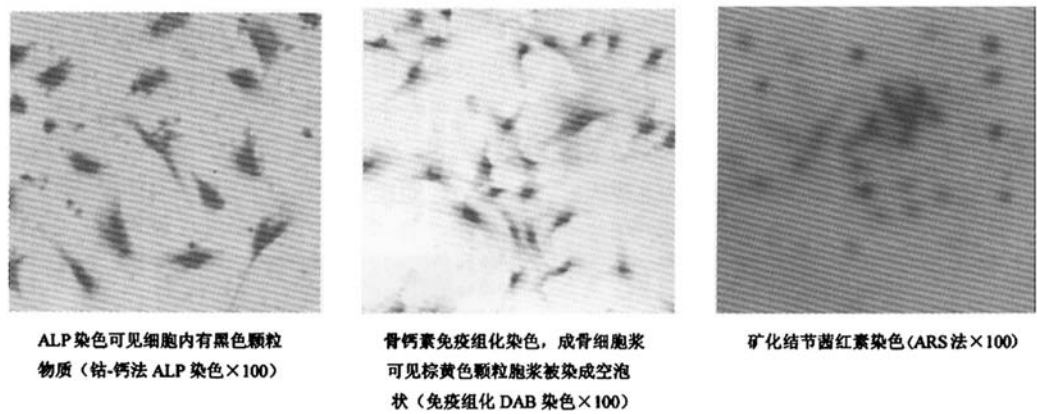


图 1 成骨细胞鉴定

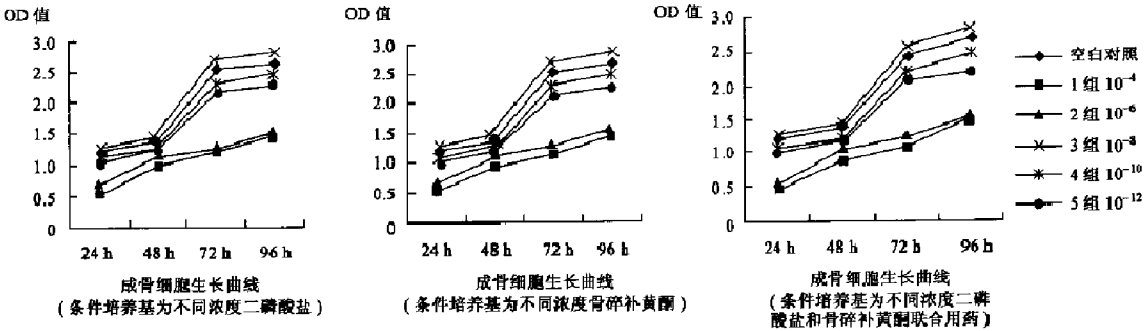


图 2 MTT 检测结果

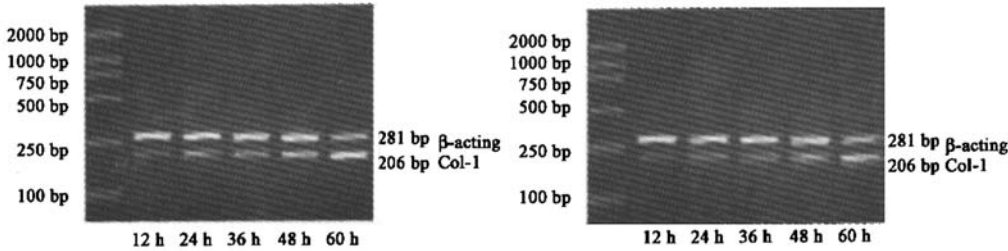
胞有抑制作用； $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有促进作用； $10^{-10} \sim 10^{-12} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不明显，其中 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最强。

2.3 ALP 和 col I 逆转录基因分析

以 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作为标准条件培养剂，将成骨细胞分别接种于 5 个培养瓶中，细胞接种密度为 $10^4 \sim 10^5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为益。并于 12、24、36、48、60 h 提取裂解物，进行 ALP 和 col I 逆转录基因分析，结果如图 3、图 4，表 1 ~ 4 所示，显示细胞都能表达

ALP 和 col I，并且，其基因表达随时间有增高趋势。

实验分 3 组，以加二磷酸盐 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为实验 1 组，培养基为骨碎补 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为实验 2 组，培养基含二磷酸盐 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和骨碎补 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为实验 3 组，共同培养 48 h 后，行 ALP 和 col I 逆转录基因分析，结果如图 5、图 6，3 组均表达 ALP 和 col I，且含二磷酸盐 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和骨碎补 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的联合用药组，基因表达的强度明显高于单独用药组，含 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二磷酸盐实验



条件培养基为含有浓度为 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二磷酸盐，作用细胞为诱导的成骨细胞

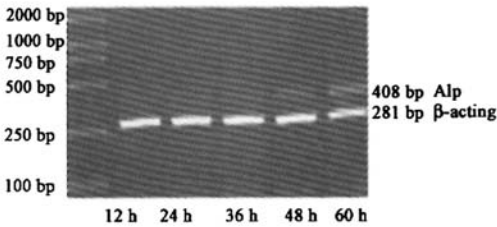
条件培养基为含有浓度为 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的骨碎补总黄酮，作用细胞为诱导的成骨细胞

图 3 不同时间逆转录 col I 基因表达

1 组与含 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补实验 2 组,基因表

表 1 培养基为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补
总黄酮时 col I 像素值(强度/面积)

项目	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
β-actin	184/1123	184/954	188/1307	195/1856	145/1171
col	117/1394	82/720	123/1175	153/982	291/971

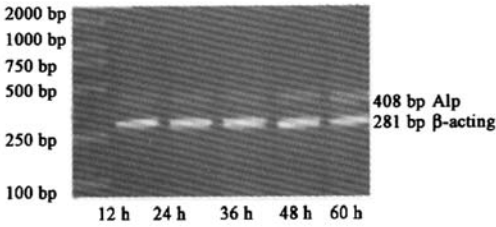


条件培养基为含有浓度为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的二磷酸盐, 作用细胞为诱导的成骨细胞

达的强度比较差异不大。

表 2 培养基为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的二磷酸盐时
col I 像素值(强度/面积)

项目	12 h	24h	36h	48h	60h
β-actin	179/940	183/1186	191/1321	195/1720	145/1112
col	82/826	117/1381	125/888	152/923	273/910



条件培养基为含有浓度为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补总黄酮, 作用细胞为诱导的成骨细胞

图 4 不同时间逆转录 ALP 基因表达

表 3 培养基为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补总黄酮时
ALP 像素值(强度/面积)

项目	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
β-actin	227/940	236/1347	233/1365	92/1115	107/1418
ALP	72/414	75/357	79/449	224/1370	184/1403

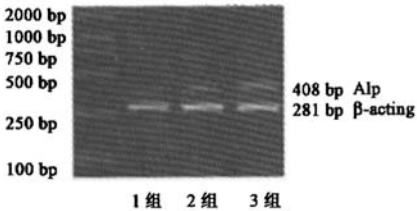


图 5 48 h 后逆转录 ALP 基因表达

注:1 组培养基为含 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的二磷酸盐;2 组培养基为含 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补总黄酮;3 组培养基为含 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的骨碎补总黄酮和二磷酸盐联合用药。

表 4 培养基为 10^{-8} mmol·L⁻¹ 的二磷酸盐时
ALP 像素值(强度/面积)

项目	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
actin	220/1490	232/1335	240/1311	224/1390	182/1324
ALP	51/684	86/714	79/448	193/1131	207/1122

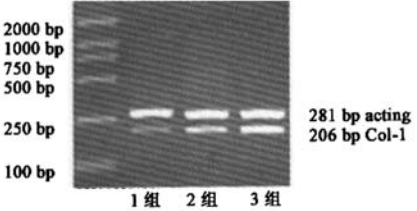


图 6 48 h 后逆转录 COL 基因表达

3 讨论

本实验采用密度为 1.077 的淋巴分离液来分离骨髓基质干细胞,经梯度离心后,可以获得均一性较好的骨髓基质细胞。本方法同 Ishigaki^[1],改善了贴壁分离筛选法红细胞占据骨髓基质细胞贴壁空间减少骨髓基质细胞贴壁的缺点,提高了贴壁率,缩短了首次换液的时间。

双磷酸盐类是一种治疗骨质疏松抗骨吸收药物^[2],二磷酸盐除作用于破骨细胞外,是否还作用于成骨细胞,报道不多。孟凡青^[3]报道,帕米磷酸钠能直接作用于大鼠成骨细胞,促进其增殖,但抑制分化。本实验发现二磷酸盐 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mmol·L⁻¹ 时,

对诱导后的成骨细胞有抑制作用; $10^{-10} \sim 10^{-12}$ mmol·L⁻¹ 时促进作用不明显,其中 10^{-8} mmol·L⁻¹ 时作用最强,说明二磷酸盐发挥作用与浓度有关 且在 10^{-8} mmol·L⁻¹ 促进成骨细胞生长的同时,促进成骨细胞的 ALP 和 col I 分子水平的表达,其表达程度在时间上有增高的趋势,说明存在时间依从性^[4],这点与 Im 等^[5]的研究结果,二磷酸盐可以促进成骨细胞 col I、BMP-2 基因表达大体近似。

现代研究表明,骨碎补提取物可以促进骨生成,增加骨密度^[6],并且通过调节组织蛋白酶 K,抑制骨量丢失^[7]。本研究发现骨碎补总黄酮 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mmol·L⁻¹ 时,对诱导后的成骨细胞有抑制作用; $10^{-10} \sim 10^{-12}$ mmol·L⁻¹ 时促进作用不明显,其中 10^{-8}

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最强,说明骨碎补总黄酮发挥作用与浓度有关;且在 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 促进成骨细胞生长的同时,也促进成骨细胞的 ALP 和 col I 分子水平的表达,其表达程度在时间上也有增高的趋势。这也与 Jeonq 等^[8,9]通过对 MC 3 T 3-E 1 成骨细胞的研究发现,骨碎补通过对骨形态发生蛋白 BMP-2、碱性磷酸酶和胶原酶调节,促进成骨细胞增殖与分化的结果基本吻合。

二磷酸盐和骨碎补对成骨细胞的影响机制如何,目前尚无定论。有研究提示^[10],二磷酸盐是通过激活成骨细胞核酸受体信号和表达热休克蛋白 Hsp 90,促使其增殖分化的,而骨碎补还没有这方面的报道。但可以推测骨碎补对成骨细胞的作用,也可能是通过细胞内外的信号调节激酶和特异性通道蛋白发挥作用的,这还有待于进一步试验研究。

骨碎补总黄酮和二磷酸盐两者合用效果如何,国内外文献报道较少,本实验结果发现,含二磷酸盐 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和骨碎补总黄酮 $10^{-8} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的联合用药组,也可以促进成骨细胞的 ALP 和 col I 基因表达,且基因表达的强度明显高于单独用二磷酸盐或单独用骨碎补,即二磷酸盐和骨碎补联合用药,效果大于两种药物单独应用,可见二磷酸盐和骨碎补总黄酮有协同作用。有研究表明,骨碎补黄酮对骨的作用(包括骨折愈合等)的同时,副作用很小^[11,12]。但是,作为临床上广泛使用的骨吸收抑制剂,二磷酸盐的副作用^[13,14]是不容忽视的。据此推测,如果两者合用可以减少两者药物用量,其二磷酸盐的副作用可能减小。此外,Jeonq 等^[15]还发现,骨碎补除可以促进成骨细胞生长外,还参与激活细胞免疫和体液免疫,特别是在长期应用骨碎补后,其可以改善白细胞的总量,并通过诱导环磷酰胺重塑免疫调节效应。因此,对于联合用药的协同作用是否还有免疫因素的参与,也是需要进一步研究的。

【参 考 文 献】

- [1] Ishigaki H, Yamamoto Y, Ishida H, et al. Preparation and functional analysis of tumor-infiltrating stroma cells using bone marrow chimera mice. *Microbiol Immunol*, 2006, 50(8): 655-662.
- [2] Kanakis I, Kousidou OCh, Karamanos NK. *In vitro* and *in vivo* antiresorptive effects of bisphosphonates in metastatic bone disease. *In Vivo*, 2005, 19(1): 311-318.
- [3] 孟凡青, 吕国良, 吴鸿, 等. 帕米磷酸钠对大鼠成骨细胞增殖、分化的影响. *中国康复理论与实践*, 2004, 10: 580-581.
- [4] von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 6941-6949.
- [5] Im GI, Qureshi SA, Kenney J, et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*, 2004, 25(18): 4105-4015.
- [6] Wonq RW, Rabie AB. Systemic effect of crude extract from rhizome of *Drynaria fortunei* on bone formation in mice. *Phytother Res*, 2006, 20(4): 313-315.
- [7] Jeonq JC, Lee JW, Yoon CH, et al. Inhibitory activity of *Drynariae* rhizoma extracts on cathepsin having bone resorption activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2004, 26(3): 373-385.
- [8] Jeonq JC, Lee JW, Yoon CH, et al. Stimulative effects of *Drynariae* Rhizoma extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(3): 489-495.
- [9] Jeonq JC, Lee JW, Yoon CH, et al. *Drynariae* Rhizoma promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells through regulation of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, type I collagen and collagenase-1. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(6): 829-834.
- [10] Romanello M, Bivi N, Pines A, et al. Bisphosphonates activate nucleotide receptors signaling and induce the expression of Hsp90 in osteoblast-like cell lines. *Bone*, 2006, 39(4): 739-753.
- [11] 赵晋宁, 谢雁鸣, 邓文龙, 等. 骨碎补总黄酮的大鼠长期毒性试验. *卫生毒理学杂志*, 2004, 18: 301-302.
- [12] 赵晋宁, 谢雁鸣, 张文军, 等. 骨碎补总黄酮急性毒性实验. *医药导报*, 2005, 24: 12-14.
- [13] Piesold JU, Al-Nawas B, Grotz KA. Osteonecrosis of the jaws by long term therapy with bisphosphonates. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006, 10(5): 287-300.
- [14] Eckert AW, Maurer P, Meyer L, et al. Bisphosphonate-related jaw necrosis—severe complication in maxillofacial surgery. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(1): 58-63.
- [15] Jeonq JC, Lee JW, Yoon CH, et al. Effects of *Drynariae* rhizoma on the proliferation of human bone cells and the immunomodulatory activity. *Pharmacol Res*, 2005, 51(2): 125-136.

(收稿日期: 2007-05-14)