

杜仲叶活性部位 I 调控骨代谢平衡作用研究

蔡险峰 徐贤柱 郁晖晖 王曼莹

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0498-04

摘要:目的 研究杜仲叶活性部位 I 对人体骨代谢平衡的多靶位双重调控作用。为补肾壮骨中药临床防治骨质疏松症(OP)提供理论依据。方法 从杜仲叶 5 个极性不同的提取部位(I、II、III、IV、V)中选取对骨代谢平衡调节最有效部位 I,建立体外大鼠成骨细胞培养、肾细胞培养以及两种细胞共培养实验模型,加入高、中、低剂量杜仲叶活性部位 I 培养,生物化学法测定成骨细胞早期特异性分泌的 ALP 活性,ABC-ELISA 法测定肾细胞 OPG 和成骨细胞 OPG 与 ODF 的分泌量;RT-PCR 技术检测 OPG 基因 mRNA 转录量。结果 杜仲叶活性部位 I 促成骨作用表现剂量依赖性。对成骨细胞作用明显的剂量是 $10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($P < 0.001$),对肾细胞作用明显的剂量是 $10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($P < 0.05$)。成骨细胞与肾细胞共培养的最佳比例是 2:1。结论 杜仲叶活性部位 I 在成骨细胞、肾细胞不同靶部位对人体骨代谢平衡具有双重调控作用。

关键词: 杜仲叶活性部位 I; 成骨细胞; 肾细胞; 共培养; 骨代谢平衡

Studying in adjusting metabolism balance of bone with active component I from Duzhongye CAI Xianfeng, XU Xianzhu, YU Huihui, et al. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtopic Plant Resources, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: Objective To study the dual and multitarget adjusting metabolism of bone with active component I from Duzhongye, provides the theoretical basis for preventing and treating osteoporosis with the Chinese medicine which can tonify the kidney and strengthen bone. **Methods** To select the most effective component I on adjusting metabolism balance of bone from five different polar component (I、II、III、IV、V) abstracted from Duzhongye. The experimental models were set up to culture the rat's osteoblast, kidney cells and osteoblast-kidney cells co-culture, then the active component I abstracted from Duzhongye with different concentrations were added to the culture medium. The ALP secreted specifically by osteoblast was tested by biochemical method, the OPG secreted by kidney cells and the OPG and ODF secreted by osteoblast were tested by ABC-ELISA, and the transcription of OPG mRNA was tested by RT-PCR. **Results** The cells grew especially significant with different concentrations of the component I, $10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ affected the osteoblast obviously ($P < 0.001$) and $10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ affected the kidney cells remarkably ($P < 0.05$). The best ratio of the osteoblast co-cultured with the kidney cells was in 2:1.

Conclusion The active component of Duzhongye can dual adjust metabolism balance of bone on the different targets position of osteoblast and the kidney cells.

Key words: Active component I from Duzhongye; Osteoblast; Kidney cell; Co-culture; Metabolism balance of bone

“骨为干”载于《灵枢·经脉篇》,“骨者髓之府”载于《素问·脉要精微论》。可见,骨骼是人体的支架、杠杆,是生长骨髓、贮藏骨髓之地。骨代谢保持精细

平衡,则骨组织健康;骨代谢失去平衡,则导致骨性疾病。骨质疏松症(Osteoporosis OP)是全人类骨峰值期后都将不同程度发生的多发病、难治之症,被称为无声的流行病(Silent epidemic)。目前用于治疗 OP 的药物大多数是骨吸收的抑制剂,少数药物能促进骨形成,具有双重功效的药物缺乏。世界各国都在积极寻找研制理想的防治 OP 新药^[1]。

中医所描述的“骨痹”、“痿症”与 OP 临床症状

基金项目:国家自然科学基金项目(30460160)

作者单位:330022 南昌,江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,江西师范大学生命科学学院

通讯作者:王曼莹,Email: wmy8888@sohu.com

和发病机理相似。中医治疗 OP 的大量临床资料证实,补肾中药具有明显的防治效果。近代实验研究也初步证明,这类中药能调节机体的骨代谢平衡^[2]。本研究是在体外分别进行成骨细胞培养与肾细胞培养的基础上,建立两种细胞共培养模型,进一步观察与证实杜仲叶活性部位 I 对骨代谢平衡的多靶位双重调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 杜仲叶:9 月采自江西省林科院,本室制备杜仲叶浸膏,分离提取杜仲叶活性部位 I。

1.1.2 动物:三月龄 SD 大鼠与新生 24 h 内 SD 大鼠,由江西省动物中心提供。

1.1.3 仪器:MCO-15A 二氧化碳培养箱,日本 SANYO 公司;倒置显微镜,日本 Olympus 公司;ELX808 酶联免疫检测仪,冷冻离心机,美国 Bio-Tek 公司。

1.1.4 试剂:ALP 试剂盒,北京中生北控生物科技股份有限公司;DMEM(低糖)、II 型胶原酶, Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青公司;胰蛋白酶,上海生化试剂公司;ODF 定量检测、OPG 定量检测 ABC-ELISA 试剂盒,上海西唐生物科技有限公司;TRNzol,天根试剂公司;DMSO、OPG 引物、RT-PCR、TaqDNA,上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 杜仲叶活性部位 I 分离提取流程^[3](图 1)

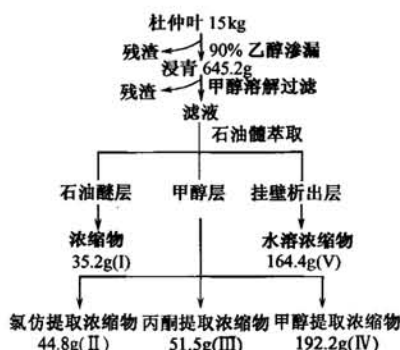


图 1 杜仲叶活性部位 I 分离简图

1.2.2 成骨细胞分离与培养:取新生(24 h 内)SD 乳鼠,无菌条件下取头盖骨,剔除黏附的结缔组织及血管,剪成 1 mm² 碎块,置于 10% 胎牛血清 DMEM 7 ml 培养基中作组织培养 3 天,去培养液加入 0.25% 胰蛋白酶 2 ml 在室温下消化 3 min,含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 1 ml 终止消化,离心收集细胞,备用。

1.2.3 肾细胞分离与培养:3 月龄 SD 大鼠,无菌条件下取双侧肾脏,除肾包膜后加入 0.5 ml 无血清培养液将肾脏剪成糊状,加入 0.25% 胰蛋白酶 2 ml 消化 15 min,含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 2 ml 终止消化。反复 3 次,离心收集细胞,备用。

1.2.4 成骨细胞与肾细胞共培养:参照相关文献预试验^[4]。按一定比例将上述两种备用细胞置于同一反应体系进行培养。分别观察成骨细胞:肾细胞为 1:1、1:2 与 2:1 的培养效果,建立共培养模型。设置杜仲叶活性部位 I 高、中、低剂量组(10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ g·ml⁻¹)与空白对照组培养观察,并同时与成骨细胞单培养结果进行对照。

1.2.5 ALP、OPG 与 ODF 的测定:均按试剂盒使用说明书操作。碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞早期分泌的特异性酶,是成骨细胞分化成熟的标志性产物。护骨素(OPG)、破骨细胞分化因子 ODF 是骨代谢平衡的终极调节因子。观察与测定杜仲叶活性部位 I 对成骨细胞分泌 OPG、ODF 与肾细胞分泌 OPG 的调控作用。

1.2.6 RT-PCR 检测肾细胞中 OPG 基因转录 mRNA 方法:参照相关文献进行预试验^[5]。按 Trizol 试剂盒操作说明抽提细胞总 RNA。提取总 RNA 的质量用琼脂糖凝胶电泳检测。取 4 μl 总 RNA 用 Promega 公司的逆转录试剂盒合成 cDNA 再进行扩增,分别扩增肾细胞 OPG 与 β-actin(内对照)。RT-PCR 中设计的引物序列见表 1。

OPG 扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,32 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。β-actin 扩增条件:94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,26 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物分别用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后在紫外透射仪下检测、拍照。

1.2.7 统计学处理:所有实验数据采用 SPSS 13.0 软件处理,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验(*P* < 0.05 为差异有显著性)。

2 结果

2.1 杜仲叶活性部位 I 的分离浓缩与分析鉴定

按杜仲叶活性部位分离提取流程,获得杜仲叶 5 个极性不同部位(I、II、III、IV、V),联合采用体外成骨细胞培养与 OP 动物模型整体试验分析表明,I、II 提取部位促进成骨细胞增殖作用最明显,*P* < 0.01。初步分析与雌激素作用效果相似^[3,6]。取杜仲叶石油醚分离活性部位 I 进行本实验研究,

表1 肾细胞 OPG mRNA RT-PCR 引物序列

扩增物	正向引物	反向引物	扩增长度	Genebank 编号
OPG	TGGAGCTCGAATTCTGCTTG	CATCAAGATGCGGAGCTGCT	603 bp	NM-012870
β -actin	GAAATCGTCGCTGACATTAAG	CTAGAAGCATTGCGGTGCA	490 bp	NM-008084

活性部位 I 毛细管柱气相色谱见图 2。

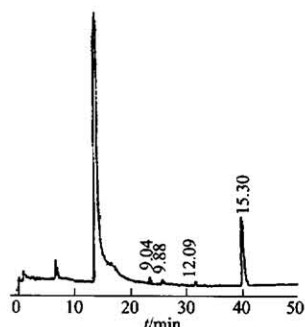


图2 杜仲叶石油醚分离部位气相色谱图

2.2 成骨细胞-肾细胞共培养模型与杜仲叶活性部位 I 的影响

共培养最佳比例为成骨细胞:肾细胞 = 2:1。在共培养体系中,同时对成骨细胞与肾细胞作用明显的杜仲叶活性部位 I 剂量为 $10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。第三天培养结果如图 3 所示。

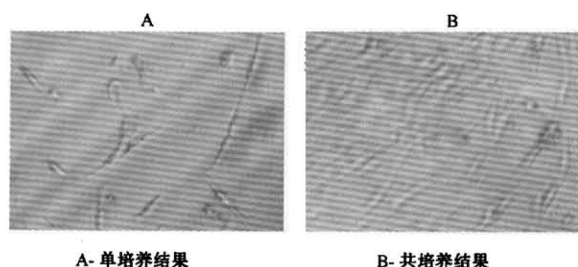


图3 成骨细胞单培养与成骨细胞、肾细胞共培养结果比较

图 3 显示在同一剂量作用下,成骨细胞-肾细胞共培养组的成骨作用优于成骨细胞单培养组。

2.3 ALP 活性检测结果

成骨细胞分化成熟过程中早期分泌的特异性碱性磷酸酶 ALP 经偶氮染料染成紫红色的成骨细胞见图 4。

图 4 显示,在同一剂量作用下培养 3 天,成骨细胞与肾细胞共培养体系中,ALP 分泌量明显增加,成骨作用优于单培养体系。证明杜仲叶活性部位 I 不仅直接作用于成骨细胞的分化成熟,而且可通过肾细胞协同促进成骨作用,有效地促进成骨细胞的形成。

2.4 杜仲叶活性部位 I 对成骨细胞分泌 OPG 与

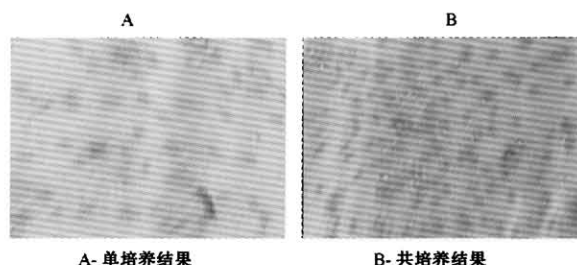


图4 单培养与共培养体系 ALP 染色结果比较

ODF 的调控作用

含杜仲叶活性部位 I 为 $10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 实验组促进成骨细胞 OPG 生成与抑制 ODF 生成的效果明显, $P < 0.001$ 。同时,发现含杜仲叶活性部位 I 过高,对成骨细胞生长有饱和和抑制现象(见表 2)。

表2 杜仲叶活性部位 I 对成骨细胞产生 OPG 与 ODF 的影响

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	OPG (492 nm OD)	ODF (492 nm OD)	OPG/ ODF
空白对照	0	0.392 ± 0.034	0.198 ± 0.105	1.9
低剂量组	10^{-6}	$0.421 \pm 0.115^*$	$0.186 \pm 0.035^*$	2.3
中剂量组	10^{-5}	$0.579 \pm 0.098^{**}$	$0.154 \pm 0.075^{**}$	3.7
高剂量组	10^{-4}	$0.578 \pm 0.183^{**}$	$0.151 \pm 0.103^{**}$	3.8

注: $n = 8, \bar{x} \pm s, ^* P < 0.05, ^{**} P < 0.001$

2.5 杜仲叶活性部位 I 对肾细胞分泌 OPG 的调控作用

高、中、低 3 剂量组试验结果表明差异均有显著性($P < 0.05$),以高剂量组最明显($P < 0.001$),见表 3。

表3 不同剂量杜仲叶活性部位 I 对肾细胞分泌 OPG 的影响

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	OPG($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	增加(%)
空白对照	0	3967.50 ± 221.92	—
低剂量组	10^{-6}	$4282.51 \pm 200.83^*$	7
中剂量组	10^{-5}	$4338.75 \pm 256.98^*$	9
高剂量组	10^{-4}	$4841.52 \pm 277.15^{**}$	22

注: $n = 8, \bar{x} \pm s, ^* P < 0.05, ^{**} P < 0.001$

2.6 RT-PCR 检测肾细胞 OPG 基因转录 mRNA

实验组肾细胞 OPG mRNA 转录量与空白对照组比较,96 h 后差异具有显著性(见图 5)。空白组、实验组培养 96 h 后,OPG 基因表达区带吸光强度 R 值分别为 0.2143、0.6574($P < 0.01$)。

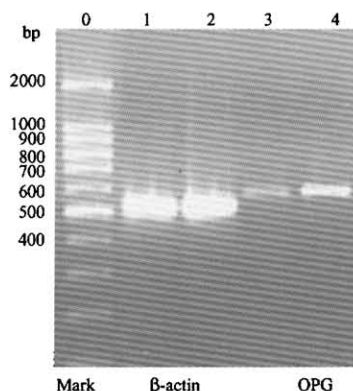


图 5 肾细胞 OPG mRNA 的 RT-PCR 结果
0 泳道:Marker;1 泳道:空白组培养 96 h;2 泳道:
实验组培养 96 h;3 泳道:空白组培养 96 h;4 泳
道:实验组培养 96 h

3 讨论

本实验室对杜仲叶防治 OP 的有效成分与作用机理进行了较系统的研究。前期的实验已观察到杜仲叶相关活性成分能在骨组织、肾组织、性腺组织等多靶位调节机体的骨代谢平衡。不仅能抑制破骨吸收,更重要的是可以促进成骨细胞的分化成熟,具有双重调控作用。

本研究在成骨细胞、肾细胞单培养基础上,建立了成骨细胞-肾细胞共培养模型,用于进一步观察分析杜仲叶活性部位 I 的多靶位、双重调节骨代谢作用。在建立两种以上细胞共培养模型的研究中,发现并解决了一个关键问题——两种待培养细胞最适比例的确定。这一关键问题的解决要点是对两种细胞生长速度的准确测定,以合适的比例混合使之协调生长获得有效共培养结果。在成骨细胞-肾细胞共培养体系中,杜仲叶活性部位 I 促进成骨作用明显优于单培养体系。

本实验以 OPG 的酶联免疫吸附测定法,证明杜仲叶活性部位 I 可明显地使肾细胞分泌 OPG 的量

明显升高,促进成骨作用。RT-PCR 结果也证明肾细胞在杜仲叶活性部位 I 的刺激下表达 OPG 的 mRNA 量明显升高。这就是在成骨细胞-肾细胞的共培养中,杜仲叶活性部位 I 对成骨作用的促进效果明显大于无肾细胞共存的单独培养效果的机理之一。证明了杜仲叶活性部位 I 也能作用于肾组织间接参与成骨作用,具有多靶位作用效果。

针对成骨细胞可同时产生护骨素 OPG 与破骨细胞分化因子 ODF 两种调控骨代谢平衡的重要物质^[7],本实验在分子水平上研究杜仲叶活性部位 I 对骨代谢平衡的双重调节作用。实验结果表明,杜仲叶活性部位 I 可以上调成骨细胞 OPG 与下调 ODF 的表达量,明显提高 OPG/ODF 比值,有效促进成骨作用。杜仲叶活性部位 I 对 OPG 与 ODF 基因表达的双重调控机理还需进一步探索。

【参 考 文 献】

- [1] Thor U. Dysregulated Osteoprotegerin/RANK Ligand/RANK Axis in Clinical and Experimental Heart Failure. *Circulation*, 2005 (17): 2461-2468.
- [2] Peng TP, WANG MY. Studying the clinical effects of GuMiBo in the treatment of primary osteoporosis. *Osteoporosis Update*, 1999, 285-289.
- [3] 胡金家,王曼莹. 杜仲叶提取物对体外培养的成骨细胞代谢功能调节研究. *中国中医基础医学杂志*, 2001, (7): 48-51.
- [4] 朱伟南,杨志明,李秀群. 成骨细胞与血管内皮细胞直接混合培养的体外实验研究. *山西医科大学学报*, 2004, 35(3): 219-221.
- [5] 詹红生,赵咏芳,石印玉. 补肾益精方对 ODF、OPG、RANK mRNA 表达水平的影响. *中国内分泌代谢杂志*, 2001, 17(5): 360-361.
- [6] 饶华,胡金家,书亮,等. 成骨样细胞体外培养法筛选杜仲叶防治骨质疏松症的药效成分. *解剖学研究*, 2004, 26: 115-117.
- [7] Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, (256): 449-455.

(收稿日期:2008-01-30)