

淫羊藿含药血清对成骨细胞增殖与分化影响的实验研究进展

罗晓 宋敏 刘艳

中图分类号: R681.1Q253 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)11-0818-05

摘要: 近年, 含药血清试验已成为研究中药淫羊藿对成骨细胞作用的热点。笔者回顾了淫羊藿含药血清对成骨细胞增殖与分化影响的相关实验研究的文献, 从淫羊藿含药血清试验、成骨细胞体外培养、淫羊藿含药血清对成骨细胞作用机理等方面进行分析, 进一步探讨淫羊藿对成骨细胞功能产生影响的有效部位、活性成分和作用机制, 为中药淫羊藿防治骨质疏松奠定基础。

关键词: 淫羊藿; 含药血清; 成骨细胞

Development of the experimental research of the effects of the drug serum in herba epimendii on osteoblast proliferation and differentiation LUO Xiao, SONG Min, LIU Yan. Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China

Abstract: In recent years, drug serum test has become a hot spot on studying the effect of osteoblast with epimedium. This paper reviews the relevant documents on the experimental studies about the effects of the drug serum in Herba epimendii on the proliferation and differentiation of osteoblast. By analyzing the experiments of drug serum in Herba epimendii, the cultivation of osteoblast outside of the body, and the effective mechanism of drug serum in Herba epimendii on osteoblast, the paper further explores the effective parts, the active ingredients and the mechanism, which is produced by drug serum in Herba epimendii. The exploration has laid a foundation for the prevention and treatment of osteoporosis with Herba epimendii.

Key words: Herba epimendii; Drug serum; Osteoblast

淫羊藿(herba epimendii)又名仙灵脾,《雷公炮炙论》认为具有“补肾壮阳,益精健骨”之功效,是传统的补肾壮阳药。现代研究表明淫羊藿作用广泛,在心血管系统、中枢神经系统、免疫系统、抗骨质疏松症(OP)、抗衰老等方面均有不同疗效。尤其在抗OP方面,由淫羊藿组成的复方制剂在抑制骨量丢失、改善OP症状方面有明显疗效^[1];单味淫羊藿对去势、维甲酸、羟基脲、激素等所致的骨质疏松动物模型亦表现出较好的防治作用^[2,3]。此外,体外实验也证实淫羊藿可以促进成骨细胞增殖与分化、抑制破骨细胞的分化和吸收功能^[4,5]。

近年来,运用体外成骨细胞培养和中药血清干预实验,研究和发现骨质疏松治疗药物的报道已屡见不鲜。该法与传统的将中药粗提物直接加入反应

体系中的方法相比具有明显的优势:在某种程度上克服了中药本身的理化性质不确定因素对实验结果的干扰,而且相对接近药物在体内的生物转化的真实过程,能在一定程度上揭示中药和复方在体内代谢过程中的转化和转变,有助于中药真正有效部位、活性成分地发现,能客观地阐明中药的药效和作用机理。目前,采用淫羊藿不同提取物的含药血清对体外培养的成骨细胞进行干预,初步确立了淫羊藿对成骨细胞功能产生影响的有效部位、活性成分和作用机制,为中药淫羊藿防治骨质疏松奠定了基础,现对近年的研究情况作一综述。

1 中药血清药理学

中药血清药理学(含药血清)是指给动物灌胃或人服用一定量的中药单方或复方制剂,一定时间采血,分离血清,用此含药成分血清进行体外试验的一种实验方法^[6]。这一概念于1984年由日本学者田代真一在第一届和汉医药学会会议上首次提出^[7,8]。

作者单位: 730000 兰州 定西东路 35 号甘肃中医学院 148# 信箱

通讯作者: 罗晓, Email 363979867@qq.com

该法排除了在体外实验过程中药物与细胞直接作用时某些因素的干扰,客观地模拟了药物与机体相互作用过程,较接近药物体内环境中产生的药理效应的真实过程,使实验结果的可信度大大提高^[9],是一种较为科学的中药药理学研究方法。

按照血清药理学的初衷,为了尽量准确地再现在体实验的整个过程,离体组织(细胞)的供体动物和含药血清的供体动物必须具有同质性^[10]。含药血清所含有的药物成分必定包括经过体内一系列生物转化后真正发挥作用的有效成分,同时也包括那些在药物作用下机体所产生的内生性有效成分,即各种生理活性物质。在此过程中值得引起注意的是血清中的上述有效成分是药物与机体相互作用之后产生的。当我们采用中药血清药理学实验方法时,我们的目的是要在体外尽量准确地再现在体实验时药物与机体相互作用的整个过程,此时,作用体系为离体组织(细胞)加含药血清。

这一方法具有简便、干扰因素少、体现中药的整体效应和适于观察辨证复方作用的优点,是一种较好的反应中药药效的体外试验技术,近年来被广泛用于淫羊藿的开发研究。

2 成骨细胞体外分离培养的实验研究

成骨细胞是骨形成细胞,对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量维持和损伤修复起关键作用。一旦成骨细胞生成不足或功能降低,不能及时补充由于破骨细胞活动所导致的骨吸收、骨量丢失,将直接导致骨形成减少。1964 年,Peck 等^[11]首先使用胶原酶消化骨片成功培养成骨细胞,至今经历了 40 余年的发展历史,其间随着细胞培养技术的发展,其方法得到了不断的更新和完善,培养标本来源涉及禽类、啮齿类、哺乳动物并逐渐过渡到了人类。国内外文献报道动物(大鼠、小鼠、鸡、兔)、人的胚胎颅骨或新生动物的颅骨为成骨细胞的常用来源。最近又建立了用成熟大鼠的颅骨及生长期的大鼠的长骨分离培养成骨细胞的方法。黄洁等^[12]选用成年雌性大鼠松质骨在较短的时间内得到较多数量的成骨细胞。王海彬等^[13]取人松质骨建立成骨细胞体外培养模型并得到了大量纯化的成骨细胞。

研究表明培养后的成骨细胞在体内仍具有良好的成骨能力,在不同环境下可以形成骨组织。林清泉等^[14]建立了胶原酶阶梯消化法进行鼠颅骨体外培养的生物模型。先用 1% 的 I 型胶原酶在 37℃ 水温中振荡消化 15min,再先后以 0.5%、0.1% I 型胶

原酶同上法处理 1.5h。最后将成骨细胞纯化、鉴定。结果显示所培养的细胞具有典型的成骨细胞特性,且成分单一。黄洁等^[12]采用组织块法和胰酶相结合的方法进行成骨细胞的培养,骨粒经反复冲洗后,其表面黏附的骨髓细胞已大多去除,然后在培养液中培养 5d,其表面的骨髓细胞和少量成骨细胞贴壁,取出骨粒后再给予胰蛋白酶消化,弃前 2 次(可能含有骨髓细胞)消化液,培养所得细胞即可获得纯度较高的成骨细胞,而骨粒反复胰酶消化可以获得较多的原代、一代细胞,避免长期培养、反复传代引起的细胞表型改变。自 1979 年 Mills 首次体外成功地培养人成骨细胞后,不少学者对成人成骨细胞的培养进行了改良。张兴凯等^[15]先用胰酶消化骨块以去除血细胞和成纤维细胞,骨片经短时培养后,再用胰酶消化,得到大量纯净成骨细胞。王海彬等^[13]以人松质骨为来源,采用反复冲洗、胶原酶预消化等预处理,再用胰酶消化,取得大量纯化的成骨细胞,比用单纯胶原酶消化后取得细胞纯化度高。将分离培养的成骨细胞大量增殖后回植于体内,具有取材方便、成骨能力好等优点,且不需考虑免疫反应和传播疾病的危险。此外细胞的体外培养可以排除体内多种因素的相互影响,为进一步研究骨代谢机理提供了有价值的实验依据。

3 淫羊藿对成骨细胞增殖与分化的影响

成骨细胞是蛋白分泌型细胞,能产生 I 型胶原,合成分泌骨基质,具有高碱性磷酸酶(ALP)活性,并能吸收和转运钙离子,是骨形成和骨重建的重要功能细胞。目前认为,ALP 活性是成骨细胞功能及分化程度的指标,其活性的高低可反映成骨细胞的成熟状态,ALP 活性越高,表明细胞越趋成熟,而 ALP 活性降低,则说明细胞趋于增殖状态。I 型胶原蛋白是成骨细胞分化的又一特征^[16],是骨有机基质的主要成份。许多研究均发现淫羊藿具有促进成骨细胞的增殖与分化功能,其机理目前认为有以下几方面。

3.1 淫羊藿本身的有效成份能促进成骨细胞的增殖与分化

李芳芳等^[17]研究发现淫羊藿煎液能促进体外培养的成骨细胞的增殖与分化。李勇等^[18]通过观察淫羊藿总黄酮对体外培养大鼠成骨细胞的作用,发现其能促进成骨细胞增殖及分化成熟,促进矿化结节形成。刘素彩等^[4]发现淫羊藿苷可明显促进体外培养大鼠成骨细胞碱性磷酸酶的活性及 I 型胶原

蛋白的表达 表明其可促进成骨细胞的分化,在同一实验中并未发现淫羊藿苷对成骨细胞增殖作用的影响。王俊勤等^[19]通过研究淫羊藿甙对体外培养大鼠成骨细胞的作用,发现淫羊藿甙能促进成骨细胞增殖,可明显抑制分化早期成骨细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性,而对分化晚期成骨细胞内 ALP 活性具有促进作用,表明淫羊藿甙对成骨细胞增殖和分化具有不同的调节作用。蔡曼玲等^[20]观察 5 种淫羊藿黄酮发现,淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、淫羊藿定 B、淫羊藿定 C 具有增加细胞基质钙及促进体外培养成骨细胞增殖和矿化的作用。刘福春等^[21]发现淫羊藿多糖能使体外培养的小鼠骨髓细胞的细胞增殖率和 DNA 合成率显著提高,说明淫羊藿多糖是通过调节 DNA 合成水平而促进细胞增殖的。此外,刘思金等^[22-23]研究淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷对体外培养的人成骨样细胞增殖和骨形成功能的影响,发现它们均具有促进成骨样细胞增殖和分化作用,并表现出浓度的依赖性。

3.2 淫羊藿可间接促进成骨细胞的增殖与分化

马涛等^[24]用老年雄性大鼠连续服用淫羊藿水提液 1 个月,取其血清,发现其血清对新生大鼠颅骨成骨细胞有促进增殖和分化的作用,提示血清中含有一些促进成骨细胞生长的因素,推测淫羊藿水提液可能促进大鼠生成大量的促骨增殖和分化的特异因子,如 BMF(骨形态发生蛋白)、Leptin(瘦素)等。刘铁汉等^[25]在离体条件下研究发现淫羊藿苷可被人肠内菌代谢,主要代谢产物为淫羊藿苷的苷元,大鼠灌服淫羊藿苷后,吸收入血的主要代谢物为宝藿苷 I,他们在研究淫羊藿对细胞因子的影响时发现,淫羊藿苷及其肠菌代谢产物(宝藿苷 I 和淫羊藿苷元)对 IL-8、TNF 的产生有一定抑制作用^[26]。殷晓雪等^[23]观察淫羊藿苷对人成骨细胞增殖和分化的影响,发现淫羊藿苷促进人成骨细胞增殖分化的作用与升高人成骨细胞 BMP-2 mRNA 表达有关,而 BMP-2 被认为是 TGF- β 家族活性最高且惟一能单独诱导成骨的因子^[27]。因此,我们认为淫羊藿可促进机体产生促成骨细胞生长的因子,进而促进成骨细胞的增殖与分化。

3.3 淫羊藿类雄激素样作用可促进成骨细胞的增殖与分化

淫羊藿具有补肾阳的作用,其类雄激素样作用可促进性腺的分泌,产生大量类雄激素样物质,促进成骨细胞的增殖与分化。马慧萍等^[28]采用维甲酸灌胃造成骨质疏松模型,检测灌服淫羊藿总黄酮后

大鼠血清生化指标,发现血中睾酮(T)和雌二醇(E_2)水平显著升高,其中睾酮含量升高更为明显。陈璐璐等^[29]研究睾酮(T)对体外培养成骨细胞的作用,发现睾酮对新生大鼠颅骨成骨细胞有促进增殖和分化的作用。

4 研究中存在的问题及展望

4.1 淫羊藿含药血清试验存在的问题

目前,含药血清试验方法已成为研究中药淫羊藿对成骨细胞作用的热点,研究层次已从器官培养到细胞培养、基因表达、DNA 合成等,以细胞药效学的研究最多,研究领域广,主要涉及:对细胞分裂增殖的影响,对细胞凋亡的作用,调节免疫等方面。但是血清药理学,作为一种新的实验方法,还刚刚起步,存在许多问题,需要不断的完善。如供体动物的选择以及是否需要造模,给药的剂量与次数,反应体系中淫羊藿含药血清的添加量以及含药血清的处理与保存等等。目前国内外大多数学者认为,为了保证中药血清药理学实验结果与在体实验的一致性,血清供体动物必须进行造模。对于含药血清的保存问题,周明眉等^[30]通过实验研究发现含药血清经长期低温保存($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 个月)后药效显著降低($P < 0.01$)。提示低温冰冻保存仍影响含药血清药效。崔晓兰等^[31]证实 3d 保存或不保存处理的比较对药效无任何影响。故在进行实验时宜使用新鲜或保存时间较短的含药血清。而对于体外实验中如何确立淫羊藿含药血清的添加量,使之既要避免高浓度血清对细胞的毒性作用,又要使含药血清的浓度接近于血药浓度,以便较客观地反映复方的整体药效是十分有必要的。关于血清对细胞的毒性作用,有学者报道含药血清在高浓度时可抑制细胞增殖。因而体外实验中含药血清的浓度选取 10%^[32]。也有学者研究了异种血清对细胞的毒性作用,发现亲缘关系较近或同种血清添加到较高浓度,甚至 100% 时仍能促进细胞增殖,亲缘较远的异种血清在低浓度(种属不同分别在 10% ~ 40%)才促进细胞增殖^[33]。还有学者认为,考虑实验体系中被培养细胞的血清耐受性,含药血清的添加量不超过 20% 为宜^[34]。

4.2 成骨细胞的体外培养存在的问题

近年来,成骨细胞的体外培养技术越来越受到研究学者们的重视,但由于它易受到诸多客观原因的干扰,而导致实验结果的不一致性。主要表现在以下 2 个方面:①种子细胞的来源:不同种属,或同一种属不同年龄段,以及取材部位的不同均可导致

实验结果的不一致。②实验方法 培养方法的不同,如是采用组织块法还是酶消化法。酶消化法可获得大量细胞,便于培养细胞浓度的调整,但操作方法较复杂,酶处理后对细胞膜表面受体和抗原成分有损坏,影响了培养细胞的贴壁和成活率,故需合适掌握消化时间。组织块培养法可靠、简便,且所得细胞较纯,但细胞产出率低,一定程度上限制了它的应用。另外还有培养基选择上的差异、细胞接种的密度大小不同等。此外由于机体的统一性、复杂性决定了该实验手段不能完全代替动物造模实验研究,更不能高于临床研究,具有一定局限性,因此不能过于夸大它的作用。

4.3 展望

中药淫羊藿含药血清干预体外培养的成骨细胞,观察其对成骨细胞增殖与分化的作用,为进一步探讨其对骨质疏松的作用机理,起到了积极进步的作用。体外成骨细胞分离培养技术是继用实验动物造模对骨科疾患做基础研究之后出现的又一种新的实验研究方法,培养的成骨细胞可作为生物学模型干预研究使用。血清药理学尽管作为一种年轻的研究方法还不够完善,仍存在着许多尚待解决的问题,其具体的实验操作也有待进一步规范。但它在中药和中药复方的研究中已越来越显示出光明的前景,相信随着这门技术的不断完善,它将配合免疫学、分子生物学的研究,发挥其在科学研究和临床应用中的作用。

【参 考 文 献】

- [1] CHEN Zhixin, XU Xiangjiu, HANG Gang, et al. Clinical study of the combined therapy with gushukang and calcium for the treatment of postmenopausal osteoporosis. Chinese Journal of Bone Tumor and Bone Disease, 2004, 3(1):18-20(in Chinese).
- [2] JI Hui, LIU Kang, GONG Xiaojian, et al. Effects of Epimedium koreanum flavoids on osteoporosis in ovariectomized rats. Chinese Journal of Osteoporosis 2001, 7(1):4-8(in Chinese).
- [3] JI Hui, LIU Kang, LI Shaoping, et al. Effect of HEF on osteoporosis induced by retinoic acid in male rats. Journal of China Pharmaceutical University 2000, 31(3):222-225(in Chinese).
- [4] LIU Sucui, KONG Dejuan, ZHAO Jingshan, et al. Effects of epimedium pubescens icariine on proliferation and differentiation of osteoblasts. Journal of Chinese Traditional Basical Medicine, 2001, 7(8):28-30(in Chinese).
- [5] LI Jingjing, YU Shifeng, LI Tiejun, et al. *In vitro* study of the effects of epimedium on osteoclastic bone resorption in various oral mineralized tissues. Chinese Journal of Stomatology, 2002, 37(5):391(in Chinese).
- [6] WANG Hongfu, JIN Weifang, GAO Jianjun. Osteoporosis prevention and treatment of drug Cell pharmacodynamics *in vitro* evaluation. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999, 5(2):58-63(in Chinese).
- [7] 田代真一. ヒト由来培養細胞を用いた漢方薬理学研究系の開発. 和漢医学学会志, 1985 (2):106.
- [8] 田代真一. 柴苓湯の培養繊維芽細胞に対する特異的増殖抑制. 和漢医学学会志, 1985 (2):108.
- [9] LI Yikui, WU Jianyu. Chinese medicine serum Pharmacological Research Methods//JIN Zhengjun Progress in pharmacology. Beijing: Science Press, 1998:257-259.
- [10] ZHANG Shengpeng, SHI Xuguang, GUI Shuhua, et al. The thinking of serum on the pharmacology of traditional Chinese medicine for the serum about the animal model. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2001, 21(5):388-389(in Chinese).
- [11] Peck WA, Birge ST. Bone cells:biochemical and biological studies after enzymatic isolation. Science, 1964, 146:1746-1750.
- [12] HUANG Jie, CHENG Yunying. Biologic features of rat osteoblast and its culture *in vitro*. Journal of Nanjing Railway Medical College, 2000, 19(2):88-90(in Chinese).
- [13] Wang Haibin, Zhang Xinkai, Shi Yinyu, et al. Human osteoblastic cells derived from trabecular bone culture *in vitro*. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthoedics, 1999, 7(2):1-2(in Chinese).
- [14] LIN Qingquan, LI Yi, TU Yihui, et al. Study on the *in vitro* culture of osteoblasts by collagen ase-ladder digest assay. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2001, 18(4):359-360(in Chinese).
- [15] ZHANG Xingkai, YANG Qingming, DENG Lianfu, et al. *In vitro* culture of human osteoblasts. Chinese Journal of Surgery, 2000, 38(1):51-53(in Chinese).
- [16] Scutt A, Bertram P, Brautigam M. The role of glucocorticoids and prostaglandin E2 in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage: positive and negative effects. Calcif Tissue Int, 1996, 59(3):54-62.
- [17] LI Fangfang, SONG Shiping, LI Jianping, et al. Osteoblast proliferation and differentiation of Epimedium. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999, 5(2):70-73(in Chinese).
- [18] LI Yong, JI Hui, LI Ping, et al. Effects of epimedium pubescens flavonoids on osteoblasts *in vitro*. Journal of China Pharmaceutical University 2002, 33(1):48-50(in Chinese).
- [19] WANG Junqin, HU Yougu, ZHENG Hongjun, et al. The effect of icariin on proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro*. Modern Rehabilitation, 2002, 6(9):1307-1308(in Chinese).
- [20] CAI Manling, JI Hui, LI Ping, et al. Effects of five flavonoids isolated from epimedium pubescens on osteoblasts *in vitro*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2003, 25(4):285(in Chinese).
- [21] LIU Fuchun, DING Guangxia, LI Juxian. Effects of epimedium sagittatum maxim polysaccharides on DNA synthesis of bone marrow cells of " Yang Deficiency " animal model caused by hydroxyurea. China Journal of Chinese Materia Medica, 1991, 16(10):620-623(in Chinese).
- [22] LIU Sijin, JIA Guiying, XUE Yan, et al. The proliferative and differentiative effect of total flavonoids of Herba epimedii(HEF) on

- osteoblast-like cell. Chinese New Drugs Journal, 2003 (216) :432-435(in Chinese).
- [23] YIN Xiaoxue, CHEN Zhongqiang, DANG Gengting, et al. Effects of epimedium pubescens icariin on proliferation and differentiation of human osteoblasts. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(4) :289-291(in Chinese).
- [24] MA Tao, CUI Liao, WU Tie, et al. Effects of serum of aged male rat treated with epimedium herb extract on proliferation and differentiation of rat calvarium osteoblast *in vitro*. Chinese Journal of Osteoporosis, 2002, 8(1) :55-60(in Chinese).
- [25] Liu Tiehan, Wu lijun. Studies on the metabolism of icariin by intestinal bacteria part I :The transformation of icariin by intestinal flora. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(11) :834-837 (in Chinese).
- [26] Liu Tiehan, Wang Benxiang. Effect of icariin and its metabolites on the production of cytokines by THP-1 cells. Acta Pharma Ceutica Sinica, 2000, 35(4) :245-248(in Chinese).
- [27] Mehler, Mark F, Mabie, et al. Bone morphogenetic proteins in the nervous system. Trends in Neurosciences, 1997, 20(7) :309.
- [28] MA Huiping, JIA Zhengping, BAI Menghai, et al. Influence of total flavonoids of herba epimedii on the biochemical index of osteoporosis in rats. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19(2) :187-190(in Chinese).
- [29] Chen Lulu, Cao Tianshu, Xia Wenfang, et al. Effects of testosterone on fetal rat calvarial osteoblastic cells *in vitro*. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999, 5 :5-7(in Chinese).
- [30] ZHOU Mingmei, YANG Kui, JIANG Yuanping, et al. Chinese medicine serum pharmacology study of the method-serum containing low-temperature preservation and the impact of inactivated serum. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 1999, 15(2) :46(in Chinese).
- [31] Cui Xiaolan, He Yuzhuo, Gao Yingjie, et al. Study on a Serum-pharmacology Method of a Chinese Medical Formula- I. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 1995, 4(2) :13(in Chinese).
- [32] ZHAN Hongsheng, ZHAO Yongfang, FENGWei, et al. Serum containing Chinese medicine methods in regulating bone and cartilage metabolism on the basis study. China Journal of Traumatology & Orthoedics, 2000, 13(11) :661(in Chinese).
- [33] WU Jianyu, MU Jing, LI Yikui, et al. The serums toxicity effect of different animal species to cultured cells and the toxicity effect decreased by deactivated. Chinese Pharmacological Bulletin, 2000, 16(1) :118-119(in Chinese).
- [34] Pan Weisong, Liu Meifeng, Shi Yue, et al. Plasma pharmacology and plasma chemistry and pharmacokinetics of traditional Chinese Medicines. Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2002, 4(3) :51-55(in Chinese).