

中药续断含药血清对成骨细胞增殖和骨基质蛋白产生的影响

王威 史红 何永志 顾志敏 郑纺 刘友刚 王超 胡利民

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0103-04

摘要:目的 观察中药续断含药血清对体外培养的成骨细胞增殖和骨基质蛋白产生的影响。方法 ①制备大鼠含药血清 取雌性与雄性 Wistar 大鼠各 12 只,按性别随机分为 4 组,分别为 雄性给药组,雄性对照组,雌性给药组,雌性对照组,每组各 6 只,给药组按体重(4.5 g 生药/kg 体重)分别给予续断水提液灌胃,对照组按体重分别给予等量生理盐水,灌胃 1 w 后取血,离心提取血清。②分离、培养大鼠的原代成骨细胞。③将各组大鼠血清稀释为 2.5%、5% 和 10% 3 个浓度分别培养大鼠成骨样细胞,采用四氮唑蓝法(MTT)检测细胞增殖能力,同时采用生化和放免法进行了细胞碱性磷酸酶(AKP)检测和细胞培养液骨钙素(OC)检测。结果 当培养基中含药血清浓度为 2.5%、5% 时,雌性给药组成骨细胞增殖率、AKP 和 OC 的量均高于雄性给药组和雌性对照组($P < 0.01$);当血清浓度为 10% 时,雌性给药组与雌性对照组比较,存在显著性差异($P < 0.05$)。雌性给药组与雄性给药组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。在各浓度的血清中,雄性给药组与雄性对照组之间均无显著性差异。结论 中药续断的含药血清具有刺激骨基质蛋白(碱性磷酸酶和骨钙素)生成和分泌的作用,并具有刺激成骨细胞增殖的作用。这种作用在雌性大鼠的血清中表达强于雄性大鼠。

关键词: 成骨细胞; 含药血清; 续断; AKP 活性; OC 分泌

Effects on rats serum containing Radix Dipsaci on the proliferation ,AKP activity and OC secretion of osteoblasts *in vitro* WANG Wei , SHI Hong , HE Yongzhi , et al. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine , Tianjin 300193 , China

Abstract : **Objective** To observe the effect of rats serum containing Radix Dipsaci at different concentration and different sex on cell proliferation and AKP activity and OC secretion of osteoblasts *in vitro*. **Methods** ① Preparation of the rat serum containing drug : Wistar rats 24 , half in male and half in female , were randomly divided into four groups(male control group(I) , male drug-added group(II) , female control group(III) , female drug-added group(IV)). After being treated with Radix Dipsaci(4.5 g crude drug/kg weight) , and saline , respectively with gastric perfusion according to body mass for one week , blood was gained. After centrifuging operation , supernatant fluid was obtained. ② osteoblasts were isolated and cultured. ③ Quantitative analysis on proliferation of osteoblasts : The cells were disposed with different concentration of rat serum , and divided into 2.5% , 5% and 10% Radix Dipsaci group. The proliferation , AKP activity and OC secretion of cells was tested. **Results** ① Compared with the male drug-added group(0.3613 ± 0.0983) , female drug-added group(0.5690 ± 0.0295) could increase absorbance value and proliferation of osteoblasts , and there were significant difference($P < 0.05$) when the medium with 2.5% concentration of Radix Dipsaci rat serum. There were also significant difference($P < 0.01$) between female drug-added group and female antitheses group(0.3787 ± 0.0476). ② when the medium was 5% concentration of Radix Dipsaci rat serum , Compared with the male drug-added group(0.3560 ± 0.0482) , female drug-added group (0.8793 ± 0.1007) could increase absorbance value and proliferation of osteoblasts , and there were Significant difference($P < 0.01$). There were Significant difference($P < 0.01$) between female drug-added group and female antitheses group(0.3863 ± 0.0180) , too. ③ When the medium was

基金项目: 国家科技部支撑计划 名优中成药大品种二次开发关键技术的研究项目资助(2007BAI47B04)

作者单位: 300193 天津 天津中医药大学

通讯作者: 王威 ,Email : gene115@126.com

10% concentration of Radix Dipsaci rat serum, there was significant difference ($P < 0.05$) between female drug-added group (0.8560 ± 0.0175) and female antitheses group (0.3817 ± 0.1986). However, no matter what the concentration of Radix Dipsaci rat serum was, there are not significant differences between male drug-added group and male control group. **Conclusion** Radix Dipsaci can stimulate the proliferation, AKP activity and OC secretion of osteoblasts. Its function is on female drug-added more than male drug added.

Key words: Osteoblasts; Serum containing Radix Dipsaci; Radix Dipsaci; AKP activity; OC secretion

近年来,随着人类寿命的延长和老龄社会的到来,与衰老密切相关的骨质疏松症及并发症的发病率逐年增高,骨质疏松症已成为老年人生活质量下降和寿命缩短的主要原因之一。因而研究抗骨质疏松症的药物对提高老年人的生活质量具有重大意义。

当前西医疗疗骨质疏松症的药物主要有两大类:以抑制破骨细胞吸收作用为主的骨吸收抑制剂和以促进成骨细胞骨形成作用为主的骨形成促进剂^[1]。但均存在着不足之处。中医药防治骨质疏松症具有悠久的历史,且有很好的疗效。因此中药防治骨质疏松症的研究日益受到重视^[2,3],特别是在名优中药的二次开发中更具有意义。

中医理论认为“肾主骨”(《素问·宣明五气》),《素问·阴阳应象大论》指出“肾生骨髓”“肾充则髓实”,肾所藏之精,所主之液可化生骨髓,为“肾主骨”提供了物质基础。而续断为川续断科植物川续断(*Dipsacus asperoides* CY, Chenget TMAi)的干燥的根,性微温,味苦、辛,归肝、肾经。具有补肝肾、强筋骨、续折伤的作用^[4],而且在有些名优中药中也配有中药续断。为探讨续断防治骨质疏松症的作用,同时也为名优中药二次开发提供实验依据,我们进行了下述的实验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: Wistar 大鼠 24 只,雌雄各半,体重 200~220 g,清洁级,由北京维通利华实验动物中心提供。大鼠均在天津中医药大学实验动物中心清洁级实验动物室内饲养。新生 24 h 内 Wistar 乳鼠由天津中医药大学实验动物中心清洁级实验动物室提供。

1.1.2 实验药物: 中药续断,水煎后浓缩,生药含量为 7.6 g/mL 由天津中医药大学中药学院提供。

1.1.3 主要试剂: DMEM 培养基(Hyclone, USA); 新生牛血清(PAA, Austria); 胰蛋白酶(Sigma, USA); 胶原酶 II 型(Gibco, USA); HEPES(Sigma, USA); L-谷

氨酰胺(Amresco, USA); 多聚赖氨酸(sigma, USA); 青霉素(国产); 链霉素(国产); MTT(国产); SDS(国产); p-NPP(Sigma, USA); 骨钙素放免测定试剂盒(北京原子能物理所); Triton X-100(Sigma, USA)。

1.1.4 主要仪器: 超净工作台(JUJ I KAGAKU, 日本); RKI21002B 型 CO₂ 培养箱(RIKA2KOGYO, 日本); 倒置相差显微镜(OLYMPUS, 日本); KQ2100E 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司); LXJ26401 离心机(北京医疗离心机厂)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠含药血清的制备: 取大鼠 24 只,随机分为 4 组:①雄性给药组,按体重(4.5 g 生药/kg 体重)灌胃;②雄性对照组,灌等量生理盐水;③雌性给药组,按体重(4.5 g 生药/kg 体重)灌胃;④雌性对照组,灌等量生理盐水,以上各组均每日 1 次灌胃。连续给药 1 w,末次灌胃 1.5 h 后,乙醚麻醉,在严格无菌条件下由腹主动脉取血。将各组血液低温条件下放置 4 h,离心 3 000 r/min 5 min,提取血清,56℃ 灭活,过滤除菌后冷藏备用。

1.2.2 细胞的分离和培养: 成骨细胞的提取:取 24 h 内新生 Wistar 大鼠头盖骨,清除结缔组织, PBS 清洗, 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 预消化 20 min; 移入 0.1% II 型胶原酶内, 37℃ 振荡消化 60 min; 离心 1000 r/min 10 min, 去上清, 加 DMEM 培养液, 置 CO₂ 培养箱中培养。取第 2 代细胞, 调整浓度为 5×10^7 /L, 进行实验。

1.2.3 实验分组: 将成骨细胞用含有 3 个不同浓度的四组大鼠血清的培养基分别培养, 血清浓度分别为 2.5%、5% 和 10% (血清浓度是依据本实验室预实验的最佳浓度作为中浓度, 即 5%)。细胞分组为: 雄性给药血清 2.5%、5% 和 10% 3 个浓度组和雄性对照血清 2.5%、5% 和 10% 3 个浓度组, 雌性给药血清 2.5%、5% 和 10% 3 个浓度组和雌性对照血清 2.5%、5% 和 10% 3 个浓度组, 共 12 组。

1.2.4 MTT 法检测续断含药血清对成骨细胞增殖的影响: 第 2 代细胞调整浓度为 5×10^7 /L, 以 100 μ L/孔接种于 96 孔培养板, 24 h 后分别换含各组大

鼠血清的 DMEM 培养液血清浓度为 2.5%、5% 和 10%。放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后 ,弃培养液 ,加 0.1 mL PBS 和 10 μL 0.5% MTT ,37℃ 孵育 4~6 h ;加 0.1 mL 10% SDS ,37℃ 孵育过夜。振荡混匀 ,置酶联检测仪上测定吸光度值(波长 490 nm)。

1.2.5 细胞碱性磷酸酶(AKP)检测 :第 2 代细胞调整浓度为 5 × 10⁷ /L ,以 100 μL/孔接种于 96 孔培养板 ,24 h 后分别换含各组大鼠血清的 DMEM 培养液血清浓度为 2.5%、5% 和 10%。放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后 ,吸取培养液 ,在 - 20℃ 保存 ,用于骨钙素检测。同时换含 0.1% BSA 培养液孵育 24h ,PBS 冲洗 2 次 ,胰酶消化后混悬于 PBS 中 ,调整活性细胞密度为 4 × 10⁵ /mL 加入等量体积 1% TritonX-100 5 min ,制成细胞裂解液 ,加 1 mL 细胞裂解液于细胞碱性磷酸酶活性孵育液中 ,37℃ 水浴 15 min ,立即加入 2 mL 0.5mol/L NaOH 终止反应 ,测定吸光度 OD₄₀₅。碱性磷酸酶活性用 U/mL·孔表示。

1.2.6 细胞培养液骨钙素(OC)检测 :按照骨钙素放免试剂盒说明书操作。

1.2.7 统计学处理 :实验结果皆以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,采用 *t* 检验分析。应用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。

2 结果

续断对成骨细胞增殖的影响实验结果见表 1。当含药血清组浓度为 2.5% 时 ,雌性给药组(0.5690 ± 0.0295)与雄性给药组(0.3613 ± 0.0983)比较 ,有显著性差异(*P* < 0.05) ,雌性给药组与雌性对照组(0.3787 ± 0.0476)比较 ,也有显著性差异(*P* < 0.01)。当含药血清组浓度为 5% 时 ,雌性给药组(0.8793 ± 0.1007)与雄性给药组(0.3560 ± 0.0482)比较 ,有显著性差异(*P* < 0.01) ,雌性给药组与雌性对照组(0.3863 ± 0.0180)比较 ,也存在显著性差异(*P* < 0.01)。而当含药血清组浓度为 10% 时 ,雌性给药组(0.8560 ± 0.0175)与雌性对照组(0.3817 ± 0.0986)比较 ,存在显著性差异(*P* < 0.05) ,雌性给药组与雄性给药组(0.5610 ± 0.1964)比较 ,无显著性差异(*P* > 0.05)。而在各种血清浓度中 ,雄性给药组与雄性对照组之间均无显著性差异。

续断对成骨细胞 AKP 活性影响的实验结果见表 2。当含药血清组浓度为 2.5% 时 ,雌性给药组(2.016 ± 0.302)与雄性给药组(1.361 ± 0.298)比较 ,有显著性差异(*P* < 0.05) ,雌性给药组与雌性对照

表 1 续断对成骨细胞增殖的影响(U/mL·孔)

组别	2.5%	5%	10%
雌性给药组	0.5690 ± 0.0295 ^{bc}	0.8793 ± 0.1007 ^{bd}	0.8560 ± 0.0175 ^a
雌性对照组	0.3787 ± 0.0476	0.3863 ± 0.0180	0.3817 ± 0.0986
雄性给药组	0.3613 ± 0.0983	0.3560 ± 0.0482	0.5610 ± 0.1964
雄性对照组	0.3920 ± 0.0966	0.3497 ± 0.0943	0.4807 ± 0.1491

注 给药组与对照组比较 ,^a *P* < 0.05 ,^b *P* < 0.01 ;雄性给药组与雌性给药组比较 ,^c *P* < 0.05 ,^d *P* < 0.01

组(1.301 ± 0.305)比较 ,也有显著性差异(*P* < 0.01)。当含药血清组浓度为 5% 时 ,雌性给药组(3.009 ± 0.329)与雄性给药组(2.356 ± 0.348)比较 ,有显著性差异(*P* < 0.05) ,而当含药血清组浓度为 10% 时 ,雌性给药组(2.856 ± 0.317)与雌性对照组(1.981 ± 0.298)比较 ,存在显著性差异(*P* < 0.05) ,雌性给药组与雄性给药组(2.561 ± 0.296)比较 ,无显著性差异(*P* > 0.05)。而在各种血清浓度中 ,雄性给药组与雄性对照组之间均无显著性差异。

表 2 续断对成骨细胞 AKP 活性的影响(U/mL·孔)

组别	2.5%	5%	10%
雌性给药组	2.016 ± 0.302 ^{**}	3.009 ± 0.329 ^{**}	2.856 ± 0.317 ^{**}
雌性对照组	1.301 ± 0.305	2.013 ± 0.310	1.981 ± 0.298
雄性给药组	1.361 ± 0.298	2.356 ± 0.348	2.561 ± 0.296
雄性对照组	1.342 ± 0.306	2.149 ± 0.294	2.390 ± 0.249

注 给药组与对照组比较 ,^{*} *P* < 0.05 ,^{**} *P* < 0.01

续断对成骨细胞 OC 分泌影响的实验结果见表 3。当含药血清组浓度为 2.5% 时 ,雌性给药组(1.302 ± 0.210)与雄性给药组(0.961 ± 0.269)比较 ,有显著性差异(*P* < 0.05) ,雌性给药组与雌性对照组(0.945 ± 0.270)比较 ,也有显著性差异(*P* < 0.05)。当含药血清组浓度为 5% 时 ,雌性给药组(1.869 ± 0.190)与雄性给药组(1.689 ± 0.190)比较 ,无显著性差异(*P* > 0.05) ,雌性给药组与雌性对照组(1.293 ± 0.210)比较 ,也存在显著性差异(*P* < 0.05)。而当含药血清组浓度为 10% 时 ,雌性给药组(1.856 ± 0.170)与雌性对照组(1.381 ± 0.198)比较 ,存在显著性差异(*P* < 0.05)。雌性给药组与雄性给药组(1.461 ± 0.196)比较 ,无显著性差异(*P* > 0.05)。而在各种血清浓度中 ,雄性给药组与雄性对照组之间均无显著性差异。

表 3 续断对成骨细胞 OC 分泌的影响(mg/L)

组别	2.5%	5%	10%
雌性给药组	1.302 ± 0.210 [*]	1.869 ± 0.190 [*]	1.856 ± 0.170 [*]
雌性对照组	0.945 ± 0.270	1.293 ± 0.210	1.381 ± 0.198
雄性给药组	0.961 ± 0.269	1.689 ± 0.190	1.461 ± 0.196
雄性对照组	0.920 ± 0.276	1.349 ± 0.194	1.380 ± 0.149

注 给药组与对照组比较 ,^{*} *P* < 0.05 ,^{**} *P* < 0.01

3 讨论

动物实验研究表明,续断能有效增加骨密度,改善骨形态计量学,达到防治骨质疏松的目的^[5]。为进一步观察中药续断对不同性别动物成骨细胞增殖影响的差异,我们采用不同性别动物中药续断的含药血清体外培养成骨细胞对其增殖影响进行观察。

本实验采用 MTT 比色法,该方法能反映细胞内 DNA 的合成状态。MTT 能被活细胞线粒体中的琥珀酸还原酶还原为蓝紫色结晶,在一定范围内,MTT 结晶物形成数量与细胞数量成正比。与细胞内 DNA 的合成成正相关,采用酶标仪在 490 nm 处检测其吸光度,可间接反应细胞数量。其特点是灵敏度高、重复性好。

血清药理学研究方法可以较好地反映中药在体内代谢后产生的药物作用。其优点在于:可以观察中药在体内代谢后产生的药物作用对组织细胞形态和功能的影响,更准确地反映中药的治疗作用。

碱性磷酸酶作为成骨细胞表性特征之一,是一种普遍存在的胞内酶,主要分布于细胞质膜,在骨基质中可分离出含有碱性磷酸酶活性的钙结合蛋白。骨钙素是一种维生素 K 依赖酶修饰的骨基质蛋白,具有高度的特异性,对钙有亲和力,在骨结节形成时表达,基质矿化时其表达水平最高。在本实验中我们发现,雌性大鼠含药血清培养的成骨细胞其碱性磷酸酶和骨钙素表达均有上升,而雄性大鼠给药组与其对照组比较没有显著性差异($P > 0.05$),说明雌性大鼠的中药续断含药血清具有刺激骨基质蛋白

生成和分泌的作用。

我们还利用雄性大鼠和雌性大鼠分别制作含药血清,以观察不同性别动物中药续断含药血清对成骨细胞增殖影响的差异。结果发现雌性大鼠的含药血清与雄性大鼠的含药血清之间对促进成骨细胞增殖方面存在很大差异,利用雌性大鼠制备的含药血清能够很好的促进成骨细胞的增殖,而利用雄性大鼠制备的含药血清在短时间内未能观察到促进成骨细胞的增殖。本实验的研究结果提示我们,中药续断具有促进成骨细胞增殖的作用,这种作用在雌性大鼠含药血清中表达强于雄性大鼠,从而其有可能防治绝经后骨质疏松。这为名优中成药大品种二次开发提供了实验依据。至于为何不同性别动物中药续断含药血清对成骨细胞增殖和骨基质蛋白产生差异,有待我们进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 刘念,程泽能,李焕德.抗骨质疏松药物研究进展.中国新药杂志,2004,13(12):1243-1246.
- [2] 王义军.骨质疏松的中医药治疗进展.中国骨质疏松杂志,2000,3(3):59-63.
- [3] 朱飞鹏,王洪复.中医药防治骨质疏松症研究进展.中国自然医学杂志,2002,4(2):94-98.
- [4] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典. Vol. I. 北京:化学工业出版社,2005.
- [5] Wong RW, Rabie AB, Hägg EU. The effect of crude extract from *Radix Dipsaci* on bone in mice. *Phytother Res*, 2007, 21(6):596-598.

(收稿日期:2008-08-20)