

淫羊藿苷含药血清对体外培养大鼠颅骨成骨细胞增殖与分化的影响

程国政 李志锋 翟远坤 陈克明

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)08-0576-04

摘要:目的 研究淫羊藿苷含药血清(Serum of rats administered icariin, SI)对体外培养大鼠颅骨成骨细胞(Rat calvarial osteoblasts, ROB)增殖和分化成熟的影响。方法 以每 1 kg 体重 0.25 g 淫羊藿苷的剂量灌服成年大鼠制得淫羊藿苷含药血清,以灌服等体积生理盐水制得对照血清。分别以 2.5%、5% 和 10% 3 种浓度加入 ROB 培养基,检测对成骨细胞增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性和钙化结节数等的影响。结果 2.5% 和 5% SI 均促进细胞的增殖,尤以 5% 浓度更为明显,该浓度含药血清提高 ROB 的 ALP 活性,增加 I 型胶原表达,并显著提高钙化结节形成数量。结论 淫羊藿经口服后的代谢产物可刺激成骨细胞增殖,促进其分化成熟,是淫羊藿抗骨质疏松的有效成分。

关键词:淫羊藿苷;血清;增殖;分化;成骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.08.006

Effects of the serum of rats administered icariin on the proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts in vitro CHENG Guozheng, LI Zhifeng, ZHAI Yuankun, et al. Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the serum of rats administered icariin on the proliferation, differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts. **Methods** 12 adult Wistar rats were given icariin intragastrically at 25 mg/100 g body weight and their serum was obtained after 1 hour. The control serum was obtained by giving equal volume of physiological saline. The serums were supplemented into the culture media of rat calvarial osteoblasts by 2.5%, 5% and 10% respectively. The proliferation of ROB was analyzed by MTT reduction assay. The osteogenic differentiation and maturation were assayed by measuring alkaline phosphatase activity (ALP) and numbering the mineralized bone nodules. **Results** The value of A570 in 2.5% and 5% SI group were significantly higher than those of the control. 10% SI was toxic to ROB. 5% SI was stronger than 2.5% SI in increasing ALP activity and the number of mineralized bone nodules which were significantly higher in SI group than in the control. **Conclusion** The metabolites of icariin after oral administration stimulate the proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts, indicating that they are effective in anti-osteoporosis.

Key words: Serum; Icariin; Proliferation; Differentiation; Osteoblast

淫羊藿是传统的补肾壮阳中草药,其主要有效成分是总黄酮和多糖。笔者的前期研究表明,淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松症具有抑制作用^[1,2],而单体成分淫羊藿苷不仅能促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化^[3,4],而且抑制骨髓细胞分化为破骨细胞^[5,6],并抑制其骨吸收活性,但对成骨细胞无明显影响^[7]。本实验研究了淫羊藿苷含药血清对

来源于新生大鼠颅盖骨成骨细胞的影响,以探讨淫羊藿苷经口服后产生的代谢产物是否具有促进骨形成活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 24 h 以内的 SPF 级 Wistar 大鼠 10 只。

1.1.2 主要试剂和仪器 α -MEM 培养基、胰酶、II 型胶原酶为 Gibco 公司产品;甘油磷酸钠、抗坏血酸、

地塞米松、二甲基亚砷均购自 Sigma 公司;胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 由兰州民海生物工程有限公司生产;淫羊藿苷由本实验室提取,浓度 > 98%;碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;I 型胶原抗体由博士德公司提供;主要仪器有 CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Revco, USA)、倒置相差显微镜 (OLYMPUS) 和酶标仪 (Bio-Rad550) 等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠颅骨成骨细胞的培养 (Rat calvarial osteoblast-like cells, ROB): 大鼠颅骨成骨细胞采用酶解法分离获得,方法同以前报道^[8]。细胞培养于含 10% FBS 的 α -MEM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养, 每 3 天换液 1 次, 待细胞长至 80% 融合时传代。

1.2.2 淫羊藿苷含药血清的制备: 6 月龄 Wistar 大鼠 12 只, 按 100 g 体重 25 mg 淫羊藿苷给药, 首次灌胃后间隔 20 h 第 2 次给药, 4 h 后第 3 次给药, 第 3 次给药 1 h 采用心脏穿刺取血。对照组用等体积生理盐水灌胃。血液静置凝固后 3000 rpm 离心 10 min, 上清即为淫羊藿苷含药血清 (Serum rats administered Icaritin, SI) 或对照血清 (Control), 抽滤除菌, 分装, -20℃ 保存备用。

1.2.3 含药血清对 ROB 增殖能力的影响: 原代细胞按 3×10^3 /ml 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 24 h 后换含不同浓度淫羊藿苷含药血清 (2.5%, 5%, 10%) 和对照血清 (2.5%, 5%, 10%) 的培养基培养 48 h, 弃培养液, 每孔加入无血清的 α -MEM 培养液 100 μ l 和 0.5% MTT 10 μ l, 继续孵育 4 h 后, 弃培养液, PBS 洗一遍, 每孔加入 100 μ l 的 DMSO, 摇床振荡

充分溶解后, 测 570 nm 处吸光度值 (A_{570})。

1.2.4 含药血清对 ROB 碱性磷酸酶活性的影响: 原代细胞按 2×10^4 /ml 的浓度接种于 12 只中皿中, 2 天后将其中一半的中皿换成含 5% 淫羊藿苷含药血清的培养液, 另一半换含 5% 对照血清的培养液, 所有培养液均含成骨性诱导剂 (10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠、 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、50 μ g/ml 抗坏血酸) 和 5% FBS, 每 3 天换液 1 次, 分别在诱导后的第 3、6、9、12、15 和 18 天用 ALP 试剂盒测定碱性磷酸酶。

1.2.5 对 I 型胶原的影响: 原代 ROB 传代培养于预先放置有盖玻片的 6 孔板中, 其中 3 孔含 5% 淫羊藿苷含药血清, 另 3 孔含对照血清, 成骨性诱导培养 1 周后取出盖玻片, 采用 SABC 法进行 I 型胶原免疫组织化学染色。

1.2.6 对钙化结节形成的影响: 原代细胞传代接种于 24 孔板, 培养至接近融合后换含 5% 淫羊藿苷含药血清和对照血清的培养液, 成骨性诱导培养 14 天后进行茜素红染色, 肉眼观察, 比较阳性克隆的多少。

1.3 统计学处理

所有检测结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS11.5 进行 t 检验。

2 结果

2.1 成骨细胞形态学观察

倒置相差显微镜下可见, 培养初期 ROB 以梭形为主。随着培养时间延长, 细胞体积增大, 形态以多角形为主, 7 d 左右逐渐融合成铺路石状, 12 d 左右出现细胞结节, 15 d 左右形成钙化结节, 经 von Kossa 法染色后呈黑色颗粒 (Fig. 1)。

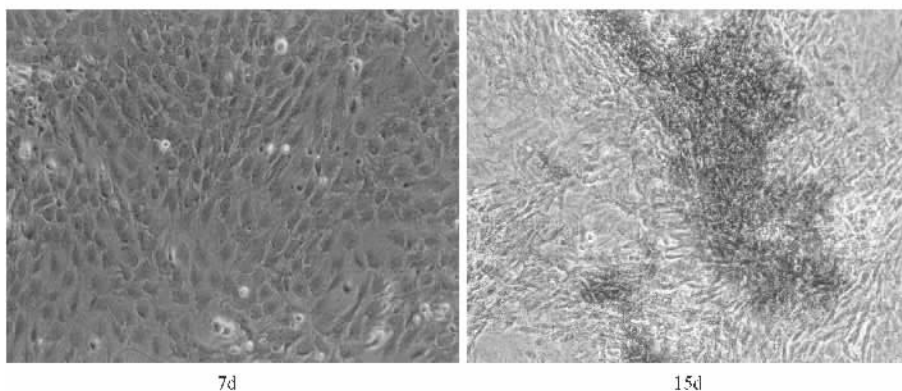


Fig. 1 The rat calvarial osteoblasts were cultured after 7 days (200 \times) and 15 days (100 \times). The mineralized nodules were stained by von Kossa

2.2 对 ROB 增殖的影响

2.5%和 5%淫羊藿苷含药血清组的 A_{570} 值均高于各自的对照组,差异具有统计学意义。10%淫羊藿苷含药血清组有大量细胞悬浮死亡,说明此浓度对 ROB 有毒性。

Table 1 The value of A_{570} at different groups ($n = 8$)

group	SI	Control
2.5%	$0.678 \pm 0.242^*$	0.334 ± 0.098
5.0%	$0.796 \pm 0.155^*$	0.419 ± 0.109

注: $P < 0.05$ vs Control

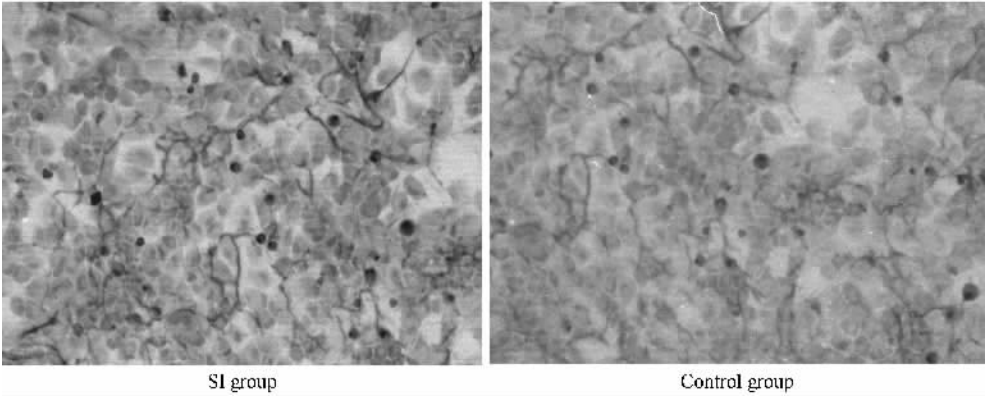


Fig.2 Comparison of histochemical staining results of type I collagen in ROB between SI group and the control (400 ×)

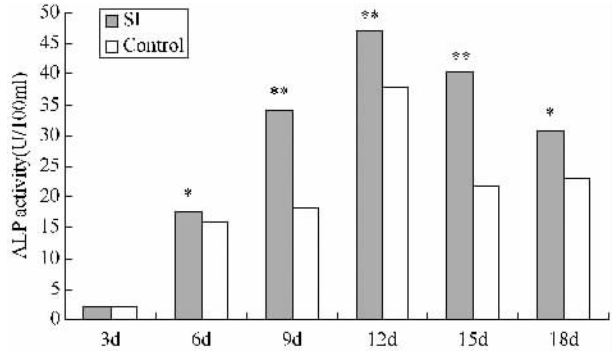


Fig.3 The intracellular alkaline phosphatase activity of ROB after different days of osteogenic induction culture. Alkaline phosphatase is a sign of enzyme of osteoblast. The higher activity indicates the more active osteogenic differentiation of osteoblasts. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

中药治疗骨质疏松的历史悠久,疗效确切。但中药成分极其复杂,原药成分与其经口服后产生的代谢产物往往生理活性不尽相同。邱峰等^[9]的研究

2.3 对 I 型胶原的影响

成骨性诱导培养 1 周后,SI 组细胞周围布满棕黄色丝状的 I 型胶原;对照组细胞周围明显较少 (Fig.2)。

2.4 对 ROB 碱性磷酸酶活性的影响

5%淫羊藿苷含药血清组在第 6、9、12、15 和 18 天的 ALP 活性均显著高于对照组,第 12 天 ALP 活性达到最高,此后逐渐下降 (Fig.3)。

2.6 淫羊藿苷含药血清对成骨细胞矿化的影响

成骨性诱导培养 15 天后,5% SI 组形成的钙化结节 (CFU-Ca) 数目明显比对照组多 (Fig.4)。

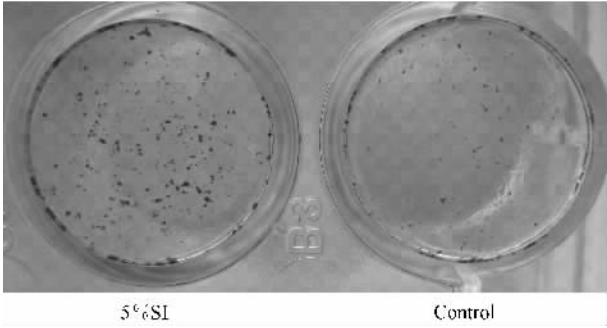


Fig.4 Mineralized nodules stained by alizarin. They were compared between 5% SI group and the control. A red dot represents a calcified nodule unit. The more red dot indicates the more active osteogenic differentiation

表明,淫羊藿苷经口服后至少产生 4 种代谢产物,对这些产物的活性逐一进行研究显然不易,而血清药理学研究方法不失为一种理想的选择。

成骨细胞在体内能合成和分泌胶原、糖蛋白等形成类骨质的成分,参与类骨质的钙化过程,是体内参与骨形成过程的主要细胞^[10],所以用含药血清干

预体外培养的成骨细胞,观察其对细胞增殖与分化的影响,为进一步阐释中药抗骨质疏松的作用机理,具有重要意义。

笔者采用 MTT 法比较了 2.5%、5% 和 10% 3 种浓度的淫羊藿苷含药血清对 ROB 细胞增殖的影响,发现 5% 浓度具有最大的促进增殖活性,10% 浓度导致部分细胞悬浮死亡,说明此浓度过高,不宜使用。成骨性诱导培养发现,5% 淫羊藿苷含药血清显著提高 ROB 细胞碱性磷酸酶活性,增加 I 型胶原蛋白表达量,并使其形成钙化结节的数量明显增多,表明该血清含有刺激 ROB 细胞增殖和促进其分化的活性物质。根据血清药理学原理,这些活性物质应是淫羊藿苷的代谢产物。

笔者在前期研究中已发现淫羊藿苷强烈刺激大鼠骨髓基质干细胞的成骨性分化,并抑制破骨细胞的形成和骨吸收活性,但对大鼠颅骨成骨细胞无明显影响。

本实验结果表明,淫羊藿苷经口服后产生的代谢产物不仅刺激成骨细胞的增殖,而且促进其分化。由于目前为止,绝大多数含淫羊藿苷的中草药制剂均为口服,所以淫羊藿苷代谢产物很可能是淫羊藿抗骨质疏松的有效成分,但其具体形式和作用方式还需通过动物实验检测具体生化指标进行深入研究。

【参 考 文 献】

[1] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Inhibitory effect of total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* on rat osteoporosis induced by

ovariectomy. Chinese journal of clinical rehabilitation, 2004, 8 (26) 5681-5683.

[2] Ma HP, Jia ZP, Bai MH, 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.

[3] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhance the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. Pharmazie, 2005, 60 939-942.

[4] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Effects of icariin on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. Chin J Osteoporos, 2008, 14(9) 642-645.

[5] Chen KM, Ge BF, Liu XY, et al. Icariin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture. Pharmazie, 2007, 62(5) 388-391.

[6] Lv MB, Liu XY, Ge BF, et al. Effects of Icariin on osteoclastic bone resorption and apoptosis *in vitro*, Chinese Journal of orthopaedics and traumatology 200720(8) 529-531.

[7] Chen KM, Ma HP, Ge BF, et al. Icariin enhances the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells but has no effects on the differentiation of newborn calvarial osteoblasts of rats. Pharmazie, 2007, 62(10) 785-789.

[8] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. The serum of rats administered flavonoid extract from *Epimedium sagittatum* but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro*. Pharmazie, 2004, 59(1) 61-64.

[9] Qiu F, Chen YJ, Kano Y, et al. Metabolites of icariin in urine following oral administration. Chinese Chemical Letters, 1998, 9 (4) 393-395.

[10] Ding HW, He XH, Su GZ, et al. Neonatal mouse osteoblasts *in vitro* and changes in morphological structure. People's Liberation Army medical journal, 1998, 23(6) 449-451.

(收稿日期:2009-04-01)