

• 论著 •

林蛙油含药血清对成骨细胞和破骨细胞增殖和活性的影响

王丹辉 王照辉 吴巍 顾淑珠 朱国英

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)05-0318-04

摘要: 目的 探讨林蛙油含药血清对成骨细胞(Osteoblast, OB)增殖、分化和矿化能力的影响,及其对破骨细胞(Osteoclast, OC)分化的影响。方法 源于大鼠颅盖骨的原代 OB 中加入不同浓度的林蛙油含药血清进行干预。MTT 法观察林蛙油含药血清对 OB 增殖的影响,用硝基苯磷酸盐(*p*-nitrophenyl phosphate, PNPP)偶氮法观察林蛙油含药血清对 OB 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性的影响,茜素红(alizarin red S, ARS)进行矿化结节染色并计算面积以观察林蛙油含药血清对 OB 矿化能力的影响。RANKL 诱导前破骨细胞株 RAW264.7 细胞 6 d 后,加入林蛙油含药血清,用抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP)染色法观察 TRAP 阳性多核细胞。结果 林蛙油含药血清可使体外培养 OB 的增殖率明显提高($P < 0.01$),并可明显促进 OB 的矿化能力($P < 0.05$),但其对 OB 的 ALP 活性影响作用不明显($P > 0.05$)。此外,林蛙油含药血清对 RANKL 诱导体外培养的破骨前体细胞 RAW264.7 形成的成熟多核破骨细胞有抑制作用,表现为 TRAP(+)成熟多核破骨细胞数明显减少($P < 0.01$)。结论 林蛙油含药血清可促进 OB 的增殖能力和矿化能力,并可抑制破骨细胞的形成。

关键词: 林蛙油; 含药血清; 成骨细胞; 破骨细胞

Effects of serum from oviductus ranae on the proliferation and differentiation of osteoblasts and osteoclast WANG Danhui, WANG Zhaohui, WU Wei, et al. Academy of Chinese Medical Sciences, Jilin 130021, China

Corresponding author: WANG Danhui, Email: wang_danhui@yahoo.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effects of serum from Oviductus Ranae on the proliferation, differentiation and mineralization in osteoblast, and its function on osteoclast differentiation. **Methods** Serum from Oviductus Ranae with different density were fed to calvaria bone specimens obtained from rat. The proliferation of osteoblasts were analyzed using MTT assay and the ALP activity of OB was observed via PNPP. After being dyed by ARS, the area of calcium nodule was calculated to see the effect of serum from Oviductus Ranae on OB mineralization. 6 days after the pre-OC strain (RAW-264.7) was induced by RANKL, serum from Oviductus Ranae was added, to observe the TRAP activity. **Results** Serum from Oviductus Ranae has notable effects on the proliferation of in vitro cultured OB ($P < 0.01$) and remarkably stimulated the mineralization of OB ($P < 0.05$), while its effect on the ALP activity of OB was not obvious ($P > 0.05$). Meanwhile, serum from Oviductus Ranae has some inhibitory function on the transformation of pre-OC strain (RAW-264.7) induced by RANKL into mature multinucleated OC which was shown in significant reduction of the number of TRAP(+) ($P < 0.01$). **Conclusion** Serum from Oviductus Ranae can promote the proliferation and mineralization ability of OB, and significantly inhibit the formation of OC.

Key words: Oviductus ranae; Serum; Osteoblasts; Osteoclast

基金项目: 中国博士后科学基金(20090451502)

作者单位: 130021 长春, 吉林省中医药科学院(王丹辉、王照辉); 北京同仁堂生物制品开发有限公司(吴巍); 复旦大学放射医学研究所(顾淑珠、朱国英)

通讯作者: 王丹辉, Email: wang_danhui@yahoo.cn

骨质疏松 (osteoporosis OP) 是中老年人中常见的一种代谢性骨病, 主要发生在绝经后妇女和老年人中, 绝经后妇女由于雌激素缺乏更易发生骨质疏松, 由于易诱发骨折, 可致畸、致残, 给中老年人带来莫大的痛苦, 并严重影响生活质量^[1]。OP 属中医痿症范畴, 中医认为本病病机为肾精亏损, 治以补肾壮骨为主。林蛙油是我国传统名贵中药, 是北药道地药材中的道地产品, 临床用来治疗肾虚、骨质疏松等广泛应用, 疗效确切。与骨代谢密切相关的细胞主要有成骨细胞 (Osteoblast, OB) 和破骨细胞 (Osteoclast, OC), 本实验研究了林蛙油含药血清对体外培养成骨细胞和破骨细胞增殖和活性的影响, 以探讨林蛙油治疗骨质疏松的可能机制, 从而为其防治 OP 特别是绝经后骨质疏松症 (Postmenopausal osteoporosis PMOP) 的临床应用提供了科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 h 内新生 SD 大鼠, 用于分离原代成骨细胞; 10 月龄 SD 大鼠 (雌雄各半) 50 只, 用于制备大鼠含药血清, 由复旦大学实验动物科学部提供。合格证号为 SCXK (沪) 2002-0002。

1.2 实验药物及主要试剂

同仁堂牌长白山中国林蛙油颗粒 [卫食健字 (2002) 第 0060 号], 2 g/袋。倍美力 (爱尔兰惠氏药厂), 国药准字: J2005120, 0.625 mg/粒。II 型胶原酶购自 Sigma 公司, MEM、DMEM 和胎牛血清 (FBS) 均购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶、噻唑蓝 (MTT) 和茜素红 S (alizarin red S, ARS) 购自美国 Amresco 公司; 对硝基苯磷酸二钠盐 (PNPP) 购自 Fluka 公司; NBT/BCIP 染色试剂盒购自华美生物工程公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱 (Heraeus, 德国), CJ-2F 医用超净工作台, 酶标仪 (Sunrise, 澳大利亚), 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本), 荧光显微镜 (Nikon 80i, 日本), Pixera 150CL 荧光显微数码成像系统 (Pixera 公司, 美国) 和 Simple PCI 专业图象分析系统 (Compix 公司, 美国)。

1.4 含药血清制备

10 月龄 SD 大鼠 50 只, 雌雄各半, 分为 5 组: 对照组; 林蛙油高、中、低 3 个剂量组; 倍美力组; 分别按照体型系数公式计算大鼠相当于人的用量, 溶于

色拉油中灌胃。分两次给药, 期间间隔 6 h, 连续 7 d; 对照组给予相同体积色拉油。末次给药 1 h 后采血, 2000 r/min 离心 10 min, 吸清上清, 56℃ 30 min 灭活, 微孔滤膜过滤除菌, 分装后 -20℃ 保存备用。

1.5 原代成骨细胞分离与培养

取 24 h 内新生 SD 大鼠头盖骨分离培养, 方法见文献 [2-3]。将头盖骨剪成 1 mm × 1 mm 小块后用 0.25% 胰酶 37℃ 消化 15 min, 再用 0.1% II 型胶原酶 37℃ 振荡消化 60 min, 将含细胞的消化液以 1000 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞用含 10% NBS 的 MEM 培养液混悬, 将细胞悬液接种于培养瓶, 置 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养, 24 h 后换含 10% NBS 的 MEM 培养液, 以后每 3 天换液 1 次。细胞汇合后传代培养, 所用实验细胞均为第 2 代细胞。OB 的鉴定: 用倒置相差显微镜观察成骨细胞形态, NBT/BCIP 染色试剂盒进行细胞 ALP 染色, 显微镜下观察拍照。

1.6 林蛙油含药血清对 OB 增殖的影响 (MTT 法)

将第 2 代对数生长期细胞以 2.5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 每组 8 复孔。培养 24 h 后, 各组分别加入含 2.5% 大鼠含药血清 + 7.5% FBS 的 MEM 培养基, 继续在 5% CO₂、37℃ 的恒温培养箱中培养 1、3、5 和 7 d 后终止培养。测定前 4 h, 用 PBS 冲洗后更换无血清 MEM 培养液 100 μl, 同时加入 10 μl 0.5% MTT, 培养箱中孵育 4 h, 加入 150 μl 10% SDS, 37℃ 水浴振荡 2 h, 冷却至室温后在酶标仪上 570 nm 处测定每孔的吸光度 (A_{570}) 值。

1.7 林蛙油含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响 (PNPP 偶氮法)

细胞接种同增殖率测定。培养 24 h 后, 各组分别加入含 2.5% 大鼠含药血清 + 7.5% FBS 的 MEM 培养基, 继续在 5% CO₂、37℃ 的恒温培养箱中培养 72 h 后终止培养。弃去培养液, PBS 淋洗 3 次, 每孔加入 100 μl 0.05% Triton-x, 超声裂解。取细胞裂解液 50 μl 于 4℃ 预冷的 96 孔板, 再加入 50 μl 的 ALP 底物反应液 (PNPP-DEA 溶液), 然后于 37℃ 恒温振荡箱中放置 30 min, 以 0.2 mol/L NaOH 终止反应, 在酶标仪上 405 nm 处测定每孔的吸光度值 (A_{405})。另取 4 μl 细胞裂解液, 按照 BCA 法蛋白定量检测试剂盒说明进行蛋白定量检测。ALP 活性最终以 U/mg 蛋白表示。

1.8 林蛙油含药血清对 OB 矿化能力的影响

将第 2 代对数生长期细胞以 5×10^4 /孔密度接种于 48 孔培养板, 每组 6 复孔。培养 24 h 后, 各组

分别加入含 2.5% 大鼠含药血清 + 7.5% FBS 的 MEM 培养基,以后隔天换液,1 周后加入矿化诱导液(含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbic Acid 和 10 mmol/L Na- β -glycerol-phosphate),第 20 天用 95% 乙醇原位固定 30 min,0.2% 茜素红(ARS)进行矿化结节染色并计算面积,以 $\text{mm}^2/\text{孔}$ 表示。

1.9 林蛙油含药血清对 TRAP 阳性多核 OC 形成的影响

小鼠的单核细胞系 RAW 264.7 细胞(ATCC 号:TIB-71)以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 48 孔板,培养过夜后分别用 50 ng/ml RANKL 和含 2.5% 大鼠含药血清 + 7.5% FBS 的 DMED 培养基干预,细胞每 3 天换液 1 次。第 7 天抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,光镜观察。显微镜下计数 TRAP 阳性多核破骨细胞。计数标准为:①TRAP 染色阳性;②核仁 ≥ 3 个;③无空泡、细胞肿胀等凋亡表现。

1.10 统计学处理

统计描述结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK 法。使用 SPSS 12.0 for Windows 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 培养成骨细胞的鉴定

培养 7 d 后汇合的原代成骨细胞呈立方体状、铺路石状。成骨细胞 ALP 染色后活性部位呈紫色细颗粒状,分布于胞浆,细胞核染色阴性。

2.2 林蛙油含药血清对 OB 增殖的影响

与实验对照组比较,林蛙油中剂量组对成骨细胞增殖能力增强($P < 0.01$),见表 1。林蛙油小剂量、高剂量组对成骨细胞增殖无影响。

表 1 不同剂量组林蛙油含药血清对 OB 增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	$A_{570 \text{ nm}}$	范围
实验对照	8	1.1074 ± 0.1308	0.9350 ~ 1.3550
倍美力	8	$1.6021 \pm 0.2046^*$	1.3560 ~ 1.9030
林蛙油小剂量	8	1.1443 ± 0.1373	0.9630 ~ 1.3930
林蛙油中剂量	8	$1.3936 \pm 0.1125^*$	1.2340 ~ 1.5270
林蛙油大剂量	8	1.0826 ± 0.2421	0.9840 ~ 1.1610

注:与实验对照组比较,* $P < 0.01$

2.3 林蛙油含药血清对 OB 分化的影响

进一步分析了林蛙油含药血清对原代培养成骨细胞 ALP 活性的影响作用。结果表明,加入含药血清后,ALP 染色阳性反应细胞数增加不明显($P > 0.05$),见表 2。

表 2 不同剂量组林蛙油含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响(U/mg , $\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	ALP	范围
实验对照	8	15.47 ± 3.50	10.97 ~ 23.08
倍美力	8	$22.63 \pm 2.53^*$	18.77 ~ 25.70
林蛙油小剂量	8	11.78 ± 2.62	7.77 ~ 15.57
林蛙油中剂量	8	11.60 ± 1.87	8.31 ~ 14.37
林蛙油大剂量	8	12.72 ± 1.75	9.50 ~ 14.82

注:与实验对照组比较,* $P < 0.01$

2.4 林蛙油含药血清对 OB 矿化能力的影响

探讨林蛙油含药血清对成骨细胞分化影响作用的最后一步,分析了林蛙油含药血清对基质矿化能力的影响。原代成骨细胞培养 20 d 后,用茜素红染色进行分析。结果表明:对照组和倍美力组培养细胞中可见到矿化形成(大小不一、形态各异的红色结节),林蛙油含药血清的细胞中矿化作用明显,与对照组比较, $P < 0.05$,见表 3。

表 3 不同剂量林蛙油含药血清对成骨细胞 OB 矿化能力的影响作用($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	矿化结节数	矿化面积
实验对照	4	10.0 ± 5.7	0.178 ± 0.159
倍美力	5	16.8 ± 5.3	0.227 ± 0.077
林蛙油小剂量	4	$22.3 \pm 5.6^*$	0.362 ± 0.181
林蛙油中剂量	5	$23.2 \pm 7.3^*$	0.283 ± 0.175
林蛙油大剂量	4	$22.5 \pm 7.6^*$	0.329 ± 0.170

注:与实验对照组比较,* $P < 0.05$

2.5 林蛙油含药血清对破骨前体细胞分化能力的影响(TRAP + 多核细胞计数)

OC 增殖和分化能力是影响其骨吸收的重要方面,利用 TRAP 染色观察药物对破骨前体细胞增殖和分化能力的影响。结果见表 4。与实验对照组比较,不同剂量林蛙油干预组的 TRAP(+)多核破骨细胞数均明显减少($P < 0.01$)。

表 4 不同剂量林蛙油含药血清对 TRAP(+)细胞计数影响($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	TRAP(+)细胞计数	范围
实验对照	6	106 ± 29	69 ~ 133
倍美力	6	$13 \pm 7^*$	5 ~ 21
林蛙油小剂量	6	$25 \pm 9^*$	13 ~ 35
林蛙油中剂量	6	$13 \pm 6^*$	5 ~ 21
林蛙油大剂量	6	$15 \pm 9^*$	7 ~ 31

注:与实验对照组比较,* $P < 0.01$

3 讨论

林蛙油 (*Oviductus rancae*) 为中国林蛙雌蛙的输卵管经采制干燥而成。林蛙油主要成分是蛋白质, 脂肪, 糖类和灰分, 并含 A、B、C、D 等多种维生素。脂肪成分中睾酮 (15.3 ± 1.4) pg/100 mg、(孕酮 187.9 ± 19.4) pg/100 mg, 雌二醇 (52.31 ± 5.89) pg/100 mg。从定量分析来看林蛙油含有雌二醇, 睾酮, 孕酮 3 种性激素。其中雌二醇和睾酮分别是雌激素和雄激素中生理作用最强的^[4]。OP 在祖国医学属“虚劳”、“骨萎”等范围, 主要病因是肾虚, 林蛙油具有补肾益精、强筋壮骨的作用, 是治疗 OP 特别是治疗 PMOP 的有效药物^[5]。目前治疗 OP 的西药主要有降钙素、二磷酸盐、激素等, 尽管疗效肯定, 但存在副作用大、依从性较差等特点, 而林蛙油具有历史悠久、副作用小、便于患者长期服用的优势。

含药血清方法是中药体外药理实验的一种新方法, 近年来, 由日本学者田代真一提出的中药含药血清方法开始受到研究者的重视, 研究表明, 该方法能够较为客观地反映中药的药效^[6]。我们将林蛙油“含药血清”添加于细胞的培养环境不仅可以避免直接添加中药可能导致中药杂质成分的干扰, 而且可以体现中药体内代谢的外援成分及其内生成分的整体效应^[7]。

OP 发生的根本原因是骨代谢失衡, 骨代谢主要 OB 和 OC 来完成, 处在骨吸收 (OC 清除旧骨) 和骨形成 (OB 填补新骨) 的动态平衡中, OB 和 OC 间相互的调控可保持骨的整体性^[8]。而在发生骨质疏松症时, OB 和 OC 间的这种整体平衡被破坏。因此, 防治 OP 要从抑制 OC 的破骨过程和促进 OB 成骨过程两方面入手^[9]。

OB 具有增值、合成及分泌 AKP 的功能及体外矿化功能。成骨细胞增长率、成骨细胞碱性磷酸酶活性、矿化结节的形成能力等检测方法能够反映 OB 的功能和骨形成状况^[10]。OC 在骨吸收和改建过程中起重要的作用, 旧骨被吸收的速度和持续时间取决于 OC 的骨吸收活性和 OC 的数量。TRAP 在 OC 中含量丰富, TRAP 的表达与 OC 的分化程度有关, 是骨组织中 OC 重要的酶组化识别标志, 影响 OC 的贴附活性, 因此, 检测 TRAP 的活性能够反映 OC 的状况^[11]。

本实验采用中药血清药理学方法, 探讨了林蛙油对 OB 功能包括增值、分化和矿化的影响作用, 以及其对破骨前体细胞增值和分化能力的影响。研究结果表明: 林蛙油含药血清不仅可以明显促进 OB 的增值和矿化能力, 同时, 可抑制破骨前体细胞增值和分化, OC 可能是林蛙油防治 OP 的重要靶细胞之一, 从而达到抑制骨吸收的作用。林蛙油抑制骨吸收的作用强于促进骨形成的作用, 这与雌激素通过抑制骨吸收实现抗骨质疏松的作用特点相符^[12], 这可能是林蛙油治疗 OP 的作用机理所在。本研究结果对林蛙油进一步开发具有重要价值, 为林蛙油防治 OP 特别是 PMOP 的临床应用提供了科学的实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] 《指导原则》编写委员会编写. 中药防治骨质疏松症及其骨折的临床前和临床评价指导原则. 北京: 人民卫生出版社, 2006:1.
- [2] Ramnaraine M, Pan W, Clohisy DR. Osteoclasts direct bystander killing of cancer cells *in vitro*. Bone, 2006, 38:4-12.
- [3] Yi J, Williams PJ, Niewolna M, et al. Tumor-derived PDGF plays a critical role in osteosclerotic bone metastases in an animal model of human breast cancer. Cancer Res, 2002, 62:917-923.
- [4] 王春霖. 蛤士蟆油甾体激素定量分析及药理作用. 中药通报, 1985, 10 (2): 44.
- [5] 梁磊, 邓虹珠. 益妇宁软胶囊对去势大鼠骨质疏松症的影响. 中国中药杂志, 2005, 30 (12): 919-922.
- [6] 田代真一. 血清药理学と血清药化学. 现代东洋医学, 1992, 13 (1): 113-117.
- [7] 刘烨, 沈慧凤. 关于中药血清药理学实验方法的讨论. 贵阳中医学院学报, 2004, 26: 53-56.
- [8] Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. Phytomedicine, 2008, 15: 55-61.
- [9] 刘忠厚. 骨矿与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 250.
- [10] 姚新苗, 冷涛, 张云鹏. 益骨口服液含药血清对成骨细胞增值、分化及矿化功能的影响. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18 (1): 6-8.
- [11] 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 533.
- [12] Cheleuitte D, Mizuno S, Glowacki J. *In vitro* secretion of cytokines by human bone marrow: effect of age and estrogen status. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83: 2043-2051.

(收稿日期: 2010-02-15)