

· 药物研究 ·

补肾中药血清对成骨细胞中 Smad1/5 信号转导蛋白活性的影响

张晓玮 郑洪新 林庶茹 金珉廷

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)01-0057-06

摘要: 目的 研究补肾中药血清对离体 SD 大鼠成骨细胞中 Smad1/5 活性的变化。方法 采用多次胶原酶消化法获取新生 SD 大鼠颅盖骨中的成骨细胞进行体外培养,并应用 Gomori 改良钙钴法对其进行碱性磷酸酶表达的鉴定;随机将实验用大鼠分为正常组、补肾中药组(补肾组)、骨质疏松颗粒对照组(骨质疏松组)、补中益气颗粒对照组(补脾组);对实验大鼠给药干预 8d 后,通过血清药理学的方法使用各组大鼠血清培养成骨细胞 48h;应用免疫组化 SABC 方法检测成骨细胞中 Smad1/5 的活性表达。结果 补肾中药血清作用于体外培养的成骨细胞 48h 后对于成骨细胞的增殖具有明显的促进作用,其效果优于正常组($P < 0.01$);成骨细胞中 Smad1/5 的活性表达,与正常组相比有所降低。结论 成骨细胞中存在 Smad1/5 的表达,表明 Smad1/5 可能有促进成骨细胞分化、增殖的功能,对成骨细胞保持自身功能、维持骨密度的作用上发挥重要的作用。②具有益肾填精壮骨的补肾中药可以影响 Smad1/5 在成骨细胞中的表达,对于促进和维持成骨细胞的特性及功能具有重要作用,这可能是防治骨质疏松症的机理之一。
关键词: 成骨细胞;Smad1/5;补肾中药;血清药理学

The effect of kidney-tonifying Chinese herb-conditioned serum on the activity of signal transduction protein Smad1/5 in osteoblasts ZHANG Xiaowei, ZHENG Hongxin, LIN Shuru, et al. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: Objective To study the effect of kidney-tonifying Chinese herb-conditioned serum on the activity of Smad1/5 in rat osteoblasts in vitro. **Method** The osteoblasts in the cranial bone of newborn SD rats were collected using repeated collagenase digestion method and cultured in vitro. The expression of alkaline phosphatase was measured using the modified Gomori cobalt calcium method. The experimental rats were randomly divided into normal group, kidney-tonifying Chinese herbs group (kidney-tonifying group), Gushukang particle control group (Gushukang group), and invigorating spleen-stomach and replenishing qi control group (tonifying spleen group). The osteoblasts were cultured in the conditioned serum from rats of different group after 8-day medicine intervention for 48 hours. The active expression of Smad1/5 in osteoblasts was measured using immunohistochemistry SABC method. **Results** The kidney-tonifying Chinese herb promoted the proliferation of osteoblasts in the 48-hour conditioned cultures in vitro. The efficacy of kidney-tonifying group is higher than that of the control group ($P < 0.01$). The active expression of Smad1/5 in osteoblasts of the kidney-tonifying group was lower than that of the control group. **Conclusion**

The existence of Smad1/5 in osteoblasts demonstrates that Smad1/5 can possibly promote the differentiation and proliferation of osteoblasts and play an important role to maintain the function of osteoblasts and bone mineral density. The Kidney-tonifying Chinese herb can influence Smad1/5 expression in osteoblasts and play an important role in promoting and maintaining the characterization and function of osteoblasts. This may be one of the mechanisms to prevent and treat osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Smad1/5; Kidney-tonifying Chinese herbs; Seropharmacology

基金项目: 国家 973 计划课题(2010CB530401)

作者单位: 110847 沈阳, 辽宁中医药大学

通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

骨质疏松症 (Osteoporosis) 是以骨量减少, 单位体积骨量降低, 骨组织微结构退行性变, 骨脆性增加而易于发生骨折的一种全身性骨骼疾患。骨质疏松症是目前世界上发病率、死亡率及医疗保健费用消耗较大的疾病之一, 是全球性的人类健康问题, 尤其危害老年人的健康和生活质量。目前估计, 采用世界卫生组织关于骨质疏松症骨密度低于成人骨峰值减 2.5 个标准差的诊断标准, 全世界约有 2 亿人患骨质疏松症。因此, 研究骨质疏松的发病机制, 并应用药物从根本上防治是非常必要的。

1 实验材料

实验动物: 雌性 SD 大鼠 18 只 (出生 < 24 h) 用于成骨细胞分离培养, 购于中国医科大学实验动物中心。清洁级雌性 SD 大鼠 28 只用于含药血清制备, 体质量 (370 ± 30) g, 10 月龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物质量合格证明号: SCXK (京) 2007-0001。

补肾益精壮骨中药: 为鹿茸冻干粉与牡蛎纳米钙微粉按照 1:1 的比例混合而成。

对照药物: ①补中益气颗粒剂: 北京汉典制药有限公司, 批准文号: 国药准字 Z20040120, 产品批号: 080610。②骨疏康颗粒剂: 辽宁康辰药业有限公司, 批准文号: 国药准字 Z20033255, 产品批号: 080519。

主要试剂: 胎牛血清、Hank's 液、0.25% 胰蛋白酶 (天津市灏洋生物制品科技有限公司); 兔抗大鼠 Smad1/5 一抗 BA0665、抗体稀释液 AR1016、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒 SA1028、DAB 显色试剂盒 AR1022 (武汉博士德生物工程有限公司等)。

主要仪器设备: 3111 型二氧化碳培养箱 (美国), 1287 型生物安全柜 (美国), MR1822 型低温高速离心机 (法国), CK40-F2 型倒置式生物显微镜 (Olympus, 日本), BX51 荧光观察显微镜 (Olympus, 日本)。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备

取健康雌性 SD 大鼠 28 只, 随机分为正常组、补肾中药组 (简称补肾组)、骨疏康颗粒对照组 (简称骨疏康组)、补中益气颗粒对照组 (简称补脾组), 每组 7 只。补肾组: 给药剂量为鹿茸 $1.575 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 牡蛎 $0.525 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; 骨疏康组: 给药剂量为 $2.1 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; 补脾组: 给药剂量为 $0.945 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。正常组不灌胃。动物每天上午灌胃 1 次, 连续

8 d。大鼠末次灌胃后, 禁食 24 h, 准备采血。大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 ($3 \text{ mL}/\text{kg}$), 行腹主动脉采血并制备血清, 灭活后冻存。使用前用 DMEM 液稀释成体积分数为 20% 的含药血清。

2.2 新生大鼠成骨细胞的分离培养

采用多次胶原酶消化法体外培养获取新生 SD 大鼠颅盖骨的成骨细胞样细胞团, 用 DMEM 培养液重悬细胞接种到 100 mL 培养瓶中, 置入含体积分数为 5%, 37°C 、饱和湿度的培养箱内进行培养, 每隔 2d 换液 1 次, 细胞约在 24h 开始贴壁。

2.3 成骨细胞的传代培养

采用胰蛋白酶消化法进行成骨细胞的传代。

成骨细胞的鉴定: 取传代后接种于已放入盖玻片的 6 孔培养板的成骨细胞, 用倒置显微镜观察细胞生长情况和形态特征, 待细胞爬满盖玻片后, 将盖玻片取出, 准备进行成骨细胞的鉴定。

成骨细胞的形态学鉴定: 经 $40\text{g}/\text{L}$ 多聚甲醛固定后, 常规苏木精-伊红染色。

成骨细胞的碱性磷酸酶染色: 采用 Gomori 改良钙钴法测定成骨细胞的碱性磷酸酶表达。

2.4 Smad1/5 在体外培养成骨细胞中的免疫组化检测

标本制备: 原代成骨细胞传代后, 换用不含血清的 DMEM 培养液培养 24h 使细胞同步化。加入等量的含体积分数为 20% 正常组血清、20% 补肾组血清、20% 补脾组血清、20% 骨疏康组血清的 DMEM 培养液, 继续培养 48h 后, 取出培养板中的盖玻片。

免疫组化检测步骤: 严格按照 SABC 免疫组化染色试剂盒标准流程操作。

各组免疫组化染色切片, 应用荧光观察显微镜取不同倍数拍照, BI-2000 医学图像分析系统进行灰度值分析, 并对每组测得的 15 个灰度值进行统计学分析。

3 统计学分析

计量数据采用 SPSS10.0 软件处理, 应用 ONE-Way ANOVA 进行方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

4 结果与分析

4.1 成骨细胞形态学观察

①倒置显微镜观察: 原代成骨细胞在贴壁前形态完整, 呈小圆球形, 细胞通体透亮, 折光性好, 胞内可见一黑色胞核。细胞在接种 24h 左右可见大部分

细胞贴壁,48h 左右细胞形态呈现多样化,多呈多角形、梭形、三角形和不规则形,胞浆丰富向外伸展。细胞为单核,胞核大而清晰,呈圆形或椭圆形,含有 1~2 个核仁。随培养时间的延长,细胞深处较多突起,有的突起相互连接。培养 3~5d 后,细胞变为长梭形、条索状,多融合成片,核变大,呈扁圆形,分界较为模糊。细胞传代后,形态与原代细胞无明显差异(见图 1)。



图 1 原代培养大鼠成骨细胞倒置

显微镜观察($\times 100$)

光镜下可见:细胞密度均匀,呈长梭形、条索状,多融合成片,细胞间连接紧密,核变大,呈扁圆形,分界较为模糊

②成骨细胞的 HE 染色:显示成骨细胞的大小比较均匀,形态呈多角形、梭形、三角形和不规则形,胞浆内可见嗜苏木精之蓝色颗粒,胞核大且清晰,呈圆形或椭圆形,含 1~2 个核仁(见图 2)。

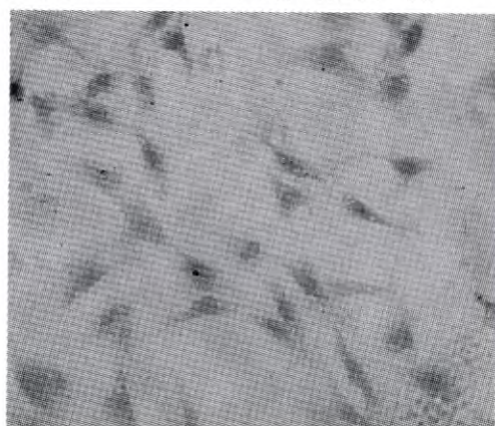


图 2 大鼠成骨细胞培养 HE 染色($\times 400$)

光镜下可见:细胞大小较均匀,形态呈多角形、梭形和不规则形。细胞有多个突起,部分细胞借突起相连接

4.2 成骨细胞碱性磷酸酶染色

成骨细胞经 Gomori 改良钙钴法染色和苏木精

复染后,可见棕黑色细微颗粒,多数分布于细胞膜上以及周围,胞浆中也可见到少量颗粒。阴性对照细胞内无棕黑色颗粒,细胞核内可见嗜苏木精之蓝色颗粒(见图 3、4)。



图 3 大鼠成骨细胞鉴定 阳性对照

改良钙钴法碱性磷酸酶染色($\times 400$)

光镜下可见:成骨细胞细胞膜以及胞浆存在棕黑色颗粒,细微颗粒

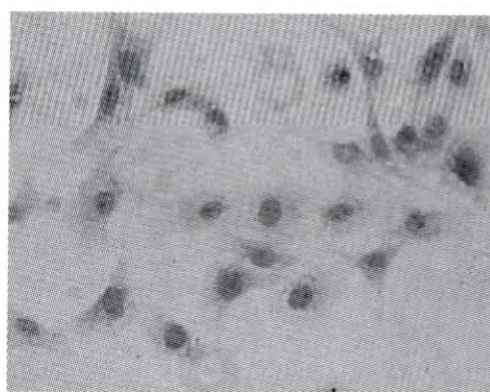


图 4 大鼠成骨细胞鉴定—阴性对照改良钙钴法

配合苏木精复染碱性磷酸酶染色($\times 400$)

光镜下可见:成骨细胞胞膜和胞浆中无棕黑色颗粒细胞核内可见嗜苏木精之蓝色颗粒

4.3 含药血清对成骨细胞增殖的影响

含药物的血清作用于成骨细胞 48 小时后,应用酶标仪以 540nm 为测定波长测定光密度(OD)值,结果显示:

1 与 20% 胎牛血清组比较,正常组、骨疏康组、补肾组和补脾组 OD 值均明显增大,存在显著性差异($P < 0.01$)。

2 与正常组比较,补肾组、补脾组 OD 值增大,存在显著性差异($P < 0.01$)。

3 与补肾组比较,各组 OD 值均相对较小,结果有统计学差异。其中补脾组($P < 0.05$),其余各组($P < 0.01$)。

组别	N	OD 值
0% 胎牛血清组	8	0.614100 ± 0.0250578 ▲▲◇◇◆◆☆☆★★
0% 胎牛血清组	8	0.638675 ± 0.0241305 △△◇◇◆◆☆☆★★
正常组	8	0.830394 ± 0.0264885 △△▲▲◆◆☆☆★★
疏康组	8	0.842880 ± 0.0359220 △△▲▲◇◇☆☆★★
补肾组	8	0.928723 ± 0.0157076 △△▲▲◇◇◆◆☆☆
健脾组	8	0.896084 ± 0.0245036 △△▲▲◇◇◆◆☆☆



万方数据

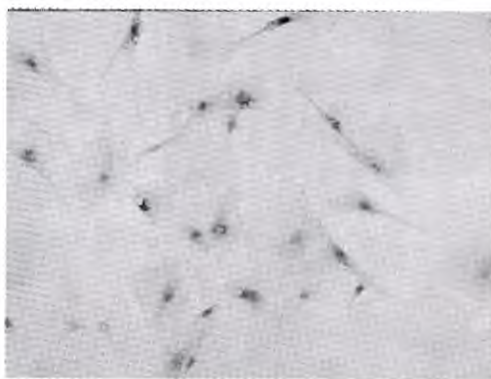


图 5-7 补脾组成骨细胞 Smad1/5
IHC 阳性 (×200)

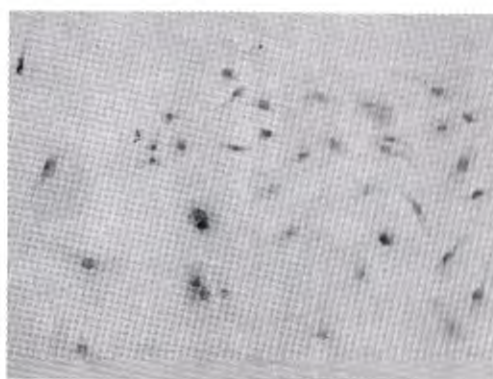


图 5-8 补脾组成骨细胞 Smad1/5
IHC 阴性 (×200)

4.4.2 免疫组化分析灰度值结果: Smad1/5 在成骨细胞中的灰度值表达结果显示:与正常组相比,补肾组、骨疏康组、补脾组表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与骨疏康组、补脾组比较,补肾组表达水平明显增加 ($P < 0.01$)。

表 2 Smad1/5 在成骨细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均灰度
正常组	15	139.2936 $\pm$ 0.5128 $\diamond\diamond\star\star\triangledown\triangledown$
骨疏康组	15	133.2672 $\pm$ 0.5220 $\blacktriangle\star\star\triangledown\triangledown$
补肾组	15	135.0297 $\pm$ 0.7904 $\blacktriangle\blacktriangle\diamond\diamond\triangledown\triangledown$
补脾组	15	123.6096 $\pm$ 2.2793 $\blacktriangle\blacktriangle\diamond\diamond\star\star$

注: $\blacktriangle\blacktriangle$ 表示与正常组比较 $P < 0.01$; $\diamond\diamond$ 表示与骨疏康组比较 $P < 0.01$; $\star\star$ 表示与补肾组比较 $P < 0.01$; $\triangledown\triangledown$ 表示与补脾组比较 $P < 0.01$

5 讨论

骨组织中负责更新骨重建与代谢的功能细胞为成骨细胞、破骨细胞和骨细胞,三者通过有序而紧密偶联的方式吸收骨基质、形成新骨质,进而维护骨骼的生物学性能和内环境的平衡。成骨细胞又称为骨

万方数据

母细胞,来源于间充质细胞分化的骨祖细胞 (osteoprogenitor cell),是前成骨细胞在骨塑建和骨重建过程中分化出来的。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,在骨外膜内层和骨内膜中都有分布,是形成骨组织的细胞。成骨细胞的形态多样,其形状与功能状态有关^[1]。成骨细胞具有旺盛的合成、分泌胶原蛋白和非胶原蛋白的功能,其合成分泌的胶原蛋白是有机骨基质的主要成分,合成的多种非胶原蛋白与成骨细胞和破骨细胞的功能调节有关,但是其功能和作用机制尚未完全清楚。成骨细胞体外培养技术是 1964 年由 Peck 首创,至今已有 40 余年的历史。目前,成骨细胞体外培养已经成为骨质疏松症病因病机及药物防治机理的离体研究的基础^[2]。Wong 等^[3]在 1975 年采用多次胶原酶消化法使体外培养的成骨细胞获得纯化。Robey^[4]在 1985 年发现,用低钙培养液培养的成骨细胞其纯度更高。在 Peck 首创体外培养成骨细胞技术的随后几十年间,培养技术不断地改进和完善,提高了成骨细胞的纯度和出产率。本实验采用出生 24h 之内的 SD 大鼠的颅盖骨,应用多次酶消化法在短时间内获得大量的原代成骨细胞以供实验之用。实验用的原代成骨细胞经过 HE 染色和 Gomori 改良钙钴法染色证实,其细胞生物学形态、特征稳定,证明此方法是体外培养大鼠成骨细胞实验模型中切实可行的方法。

Smad 蛋白是 I 型 BMP 受体的底物,其在 BMPs 信号从受体向细胞核内靶基因传递的过程中起着主要作用。BMP I 型受体被磷酸化而激活与 Smads 信号蛋白的相关反应,并激活了细胞内的信号传导通路^[5]。Smad1、Smad5 及 Smad8 均可以被 BMPs 受体磷酸化,这一过程是配体依赖性的。配体激活的受体复合物能与 Smad 蛋白结合并磷酸化羧基端的丝氨酸,此复合物转入细胞核内就可以参与基因转录。Smad1 和 5 均属于受体调节型 Smad,是细胞内重要的 TGF- β 信号转导和调节分子,可以将 TGF- β 信号直接由细胞膜转导入细胞核内。Smads 在从受体向细胞核内的靶基因传递 BMP 信号的过程中其主要作用^[6]。Smads 及其相关转录因子尤其是 Smad1、5、8 和 Cbfa1 在 BMPs 诱导成骨的信号转导过程中起着重要作用^[7]。Smad1 蛋白的表达可能与 BMPs 信号转导通路调控的软骨内化骨分子机制间存在相关性^[8]。

目前,中药防治骨质疏松症已经成为研究热点,众多实验表明鹿茸、牡蛎具有一定的防治骨质疏松症的作用。蔡明军等^[9]采用水溶液提取法从新鲜

梅花鹿鹿茸中提取出鹿茸多肽,应用流式细胞仪检测鹿茸多肽作用对人成骨肉瘤细胞(OS-732)后的细胞周期变化,结果表明鹿茸多肽对 OS-732 细胞有非常明显的增殖促进作用。蒙海燕等^[10]对鹿茸及鹿角胶对去卵巢大鼠骨质疏松症影响的实验表明:鹿茸及鹿角胶对去卵巢所致的大鼠骨质疏松症具有拮抗作用。李可强^[11]以鹿茸提取物复方作为研究因素,选择疗效比较确切的骨疏康颗粒作为阳性对照,结果表明,复方鹿茸提取物对因肌注地塞米松而引起的骨质疏松大鼠具有抑制模型大鼠骨吸收作用,能够防止骨量丢失,提高模型大鼠骨密度,对骨质疏松的防治具有良好效果。张婉虹等^[12]研究牡蛎肉水提液组对去卵巢组大鼠的影响时发现:牡蛎肉水提液能够增加大鼠股骨的最大载荷、最大应力和骨小梁数量、骨小梁宽度,从而证明牡蛎肉水提液能够预防去卵巢大鼠的骨质疏松。苏开鑫等^[13]研究牡蛎肉提取物对类固醇性骨质疏松大鼠骨代谢影响的实验中发现:牡蛎提取物可以提高大鼠骨钙、骨磷、骨锌、骨铁含量;使血钙降低恢复正常,碱性磷酸酶浓度升高。结果表明,牡蛎肉提取物可以有效防治泼尼松引起的骨代谢紊乱。胡静等^[14]研究发现:牡蛎钙补肾中药复方可明显上调 BMP-4 和 Smad5 蛋白表达,这可能是其防治骨质疏松症的重要机制之一。

近些年来,许多学者根据“肾主骨生髓”理论,运用中医药对骨质疏松症的病理机制和防治进行了大量的研究,共识肾精亏虚是骨质疏松症发生的主要病机,而以此理论为基础的中药复方对骨质疏松症的防治也取得了较为满意的效果。本实验结果表明:①成骨细胞中存在 Smad1/5 的表达,表明 Smad1/5 可能有促进成骨细胞分化、增殖的功能,对成骨细胞保持自身功能、维持骨密度的作用上发挥重要的作用。②具有益肾填精壮骨的补肾中药可以影响 Smad1/5 在成骨细胞中的表达,对于促进和维持成骨细胞的特性及功能具有重要作用,这可能是防治骨质疏松症的机理之一。③补肾中药血清作用于体外培养的成骨细胞 48h 后对于成骨细胞的增殖具有明显的促进作用,其效果优于正常组($P <$

0.01)。④成骨细胞中 Smad1/5 的活性表达,与正常组相比有所降低,这可能与本次实验末次给药 24h 后才采血,导致血药浓度偏低有关。

【参 考 文 献】

- [1] 李恩,等.骨质疏松鉴别诊断与治疗.第一版.北京:人民卫生出版社,2005:12.
- [2] 徐展望,许波,李军.成骨细胞体外培养研究进展.山东中医药大学学报,2004,28(4):313-315.
- [3] Wong MP, Stein JL, Stein GS, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblast: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. Exp Cell Res, 1995,21(4):35-45.
- [4] Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. Calcif Tissue Int, 1985,37: 453-460.
- [5] Franzen P, Ten Dijke P, Ichijo H, et al. Cloning of a TGF [beta] type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF [beta] type II receptor. Cell, 1993,75:681-692.
- [6] Kawabata M, Imamura T, Miyazono CH. Smad transduction by bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9:49-61.
- [7] 宋亚文,谢利民.骨发生和形成过程中 TGF- β /BMPs 的信号传导.中国中医骨伤科杂志,2004,12(2):41-44.
- [8] 孙强,邱勇,刘臻,等. Smad1 在青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间质干细胞中的表达及意义.中国脊柱脊髓杂志,2006, 16(11):847-850.
- [9] 蔡明军.鹿茸多肽的提取分离及其促进成骨细胞增殖的作用.吉林大学学报,2008.
- [10] 蒙海燕,曲晓波,李娜,等.鹿茸及鹿角胶对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响.中药材,2009,32(2):179-182.
- [11] 李可强,郑洪新,朱辉,等.鹿茸提取物复方对骨质疏松症干预作用.中国公共卫生,2011,27(8):1016-1017.
- [12] 张婉虹,谢华.牡蛎肉水提液对去卵巢大鼠骨质疏松影响的实验研究.中国自然医学杂志,2007,9(6):478-480.
- [13] 苏开鑫,谢华,王宏芬,等.牡蛎肉提取物对类固醇性骨质疏松大鼠骨代谢的影响.中国自然医学杂志,2009,11(2):97-99.
- [14] 胡静,郑洪新.牡蛎钙补肾中药复方对骨形成蛋白-4 诱导成骨信号转导机制的调控作用.中华中医药学刊,2009,27(9): 1891-1894.

(收稿日期:2011-08-25)

补肾中药血清对成骨细胞中Smad1/5信号转导蛋白活性的影响

作者: 张晓玮, 郑洪新, 林庶茹, 金珉廷
作者单位: 辽宁中医药大学, 沈阳, 110847
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2012, 18(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201201015.aspx