

骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响

宋渊^{1,2} 李盛华^{1*} 何志军¹

1. 甘肃省中医院, 兰州 730050
2. 天津中医药大学, 天津 300193

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 02-0125-05

摘要: **目的** 研究骨碎补含药血清对成骨细胞的增殖、成骨的影响。**方法** 取乳鼠颅骨, 利用二型胶原酶反复消化, 离心, 提取成骨细胞。利用骨碎补含药血清干预, 分别测定细胞增殖率、ALP 活性、钙盐沉积量、骨钙素分泌量等, 研究骨碎补含药血清对成骨细胞的增殖、成骨分化及其抗氧化性的影响;**结果** 用含药血清干预, 测定增殖率、ALP 活性、钙盐沉积量、骨钙素分泌量、钙化结节量均高于空白对照组。**结论** 骨碎补含药血清可以促进成骨细胞的增殖、成骨分化及其增强其抗氧化性。

关键词: 成骨细胞; 增殖 分化; 骨碎补; 含药血清

Effect of drynaria-containing serum on the proliferation and osteogenesis of osteoblasts

SONG Yuan^{1, 2}, LI Shenghua¹, HE Zhijun¹

1. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: LI Shenghua, Email: lishenghua0619@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of drynaria-containing serum on the proliferation and osteogenesis of osteoblasts. **Methods** The cranium of the suckling mice were collected, then digested with type II collagenase repeatedly, and then centrifuged, in order to extract osteoblasts. The intervention of drynaria-containing serum was applied. Then, the proliferation rate of cells, the ALP activity, the amount of calcium deposition, and the secretion of osteocalcin were determined respectively, in order to investigate the effect of drynaria-containing serum on the proliferation, the osteogenic differentiation, and the antioxidant activity of osteoblasts. **Results** After the intervention of drynaria-containing serum, the proliferation rate, the ALP activity, the amount of calcium deposition, the secretion of osteocalcin, and the calcified nodules were higher than that in blank control group. **Conclusion** The drynaria-containing serum can promote the proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts, and enhance its antioxidant activity.

Key words: Osteoblast; Proliferation and differentiation; Drynaria-containing serum

种子细胞、支架材料和细胞因子是组织工程骨构建的 3 个重要组成部分^[1]。在骨微结构中成骨细胞是骨重建激活或中止的控制者, 局部细胞因子通过自分泌或旁分泌方式, 在局部组织直接促进成骨细胞的分化功能, 增加骨胶原的形成, 也可作用于骨原细胞, 增加有功能的成骨细胞数目, 并最终促进骨基质形成^[2-4]。本实验通过药理学含药血清手段干预成骨细胞, 来观察骨碎补对于成骨细胞增殖、成骨分化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物和细胞培养试剂: 细胞培养基 D-MEM/F-12 (GIBCO 公司), 胰蛋白酶 (SIGMA 公司), 乙二胺四乙酸 (EDTA) (分析纯, 莱阳市双双化工厂), 生药骨碎补 (由甘肃省中医院提供)、四季青胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)。

1.1.2 主要仪器: 倒置相差显微镜 (日本, CX-47), 二氧化碳培养箱 (日本, MCO-45AC), 高压灭菌器 (日本, LDZX-30KBS)。

1.1.3 动物来源: 采用 SPF 级 SD 4 月龄大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 200 ~ 220g, 乳鼠 5 只 (由甘肃中

*通讯作者: 李盛华, Email: lishenghua0619@126.com

医学院动物实验中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:在无菌条件下取出 SPF 级乳鼠颅骨,去除周围组织,反复剪碎,利用二型胶原酶反复消化,离心,弃掉上清,加入培养液,吹打均匀后移入培养皿内,在 37℃,5% CO₂ 孵育箱内培养,每 3 天换液 1 次。在相差显微镜见细胞汇合成单层,即可用胰蛋白酶消化法以 1:2 的比例进行传代培养。

1.2.2 药物制备:将生药骨碎补利用水煎浓缩后分别含生药 0.5、1、2 g/mL。

1.2.3 含药血清制备:将 40 只大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,低剂量组、中剂量组、高剂量组及生理盐水组,各组每天均以 10 mL/kg 的剂量灌服。每日 2 次,连续给药 7 d,第 8 天一次服用全天剂量,1 h 内腹主动脉采集血液并 3000 r/min 离心 15 min,取血清,过滤除菌后,−20℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 动物饲养:在甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心动物房饲养,SPF 级动物专用饲料饲养,饮食、饮水无限制。

1.3 指标检测

1.3.1 细胞增殖率测定:分别与干预后的 24、48、72 h 测定细胞的增殖率。P3 代细胞按 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h。PBS 漂洗 2 次后换入新鲜的培养液(含 5% FBS),并加入骨碎补含药血清和生理盐水血清继续培养。分别于 24、48、72 h 后弃培养液,PBS 漂洗 2 次,换含 0.5% MTT 的无血清的 DMEM/F12 培养液,继续孵育 4 h,弃培养液,每孔加入 100 μ L 的 DMSO,摇床振荡 10 min,测 490 nm 处吸光度值。

1.3.2 碱性磷酸酶活性测定:分别在含药血清处理干预后的第 6、9、12 d,将培养液吸出,PBS 洗两遍,按碱性磷酸酶(ALP)试剂盒操作步骤加入 500 μ L 基质液,37℃水浴 15 min 后加入 750 μ L 显色液,紫外分光光度计 A490 测定吸光度值,最后换算成金氏单位。

1.3.3 钙盐沉积量检测:分别于 12、16 d 取待测样品,弃去培养液,将细胞用 PBS 洗两遍,每皿加入 1 mL 2N HCl,在震荡混合仪上震荡过夜,第二天用移液枪反复吹打后吸入标记的离心管,10000 r/min 离心 10 min,收集上清液 −80℃ 冰箱保存。待各时间点样品收集全后按照 Calcium Colorimetric Assay Kit 试剂盒说明操作,酶标仪 570 nm 处测吸光值。

计算各孔的 Ca²⁺ 含量,以 μ g/孔表示。

1.3.4 骨钙素分泌量检测:收集成骨诱导后第 12 天和 16 天各组培养液 1 mL,冻存于 −80℃,待各时间点样品收集全后,采用大鼠骨钙素放射免疫分析试剂盒进行骨钙素含量测定。酶标仪 450 nm 处测定吸光度值,计算各孔骨钙素含量,以 ng/mL 表示。

1.3.5 钙化结节 Von kossa 染色:于含药血清干预后的第 12 d 将培养液吸出,PBS 洗两遍,4% 多聚甲醛甲醛固定 10 min,蒸馏水漂洗 3 次。5% 硫代硫酸钠孵育 30 min,蒸馏水冲洗,加入 1% 硝酸银溶液,紫外灯下染色 30 min,蒸馏水冲洗掉浮于表面的黑色物质,继续用 5% 硫代硫酸钠染色 20 min,蒸馏水漂洗后观察,拍片照相记录。

1.4 统计学处理

所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析(ANOVA),用 SPSS16.0 统计软件包进行统计处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时期细胞显微镜下形态

倒置显微镜下观察,刚接种的成骨细胞由于培养液中存在造血细胞而无法分辨,漂浮在培养液中的细胞多呈球形。首次换液后,即可见少量贴壁细胞,多呈短棒状,也可见圆形或椭圆形的杂细胞;细胞培养 3d 的增长成骨细胞逐渐变成梭形,体积变大,具有细胞突起,可形成大小不等的细胞集落,细胞间排列较紧密;细胞传至第三代时细胞全部成梭形排列生长(图 1)。

2.2 MTT 检测结果

含药血清组细胞增殖率明显高于空白组,其中以骨碎补含药血清的高浓度促增殖效果较好(图 2)。

2.3 ALP 活性检测结果

含药血清组细胞 ALP 活性明显高于空白组,其中以杜仲含药血清高浓度组 ALP 活性较高;各组 ALP 活性在第 9 d 上升达到顶峰,第 12 d 时 ALP 活性开始下降(表 1)。

2.4 钙盐沉积量检测

含药血清组钙盐沉积量明显高于空白组,其中以骨碎补含药血清高浓度组钙盐沉积量较高,随着时间的延长钙盐沉积量逐渐升高(表 2)。

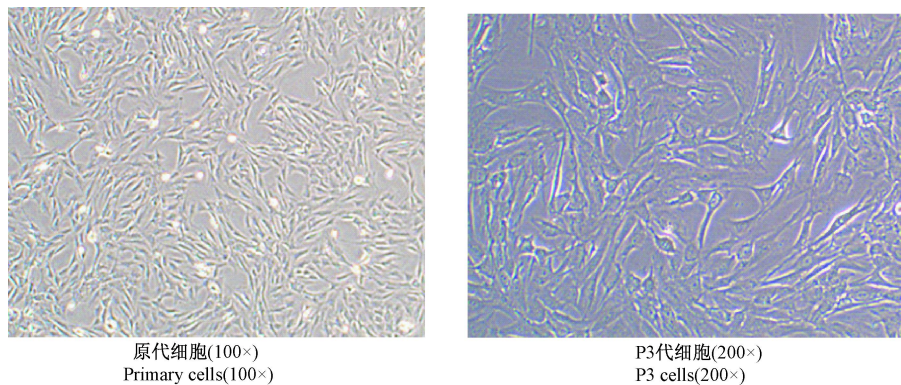


图1 不同时期细胞显微镜下形态

Fig.1 The morphology of cells at different time points under the microscope

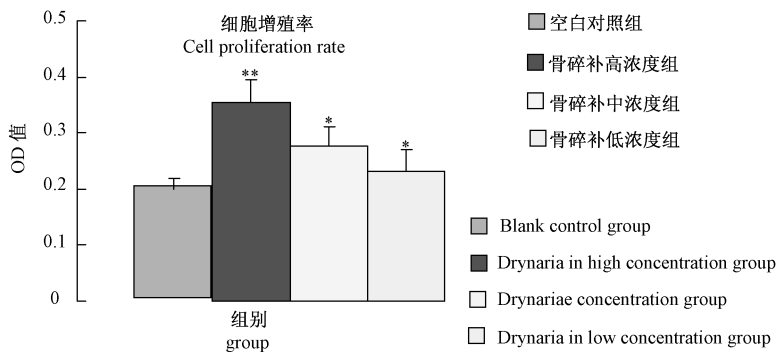


图2 细胞增殖率检测,与空白组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Fig.2 Cell proliferation rate detection , compared with that in blank control group , ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

表1 不同时期各组细胞 ALP 活性

Table 1 The ALP activity of cells at different time points

组 别	3d	6d	9d	12d
空白对照组 (Blank control group)	130. 27 ± 13. 64	150. 92 ± 12. 15	209. 38 ± 11. 06	115. 62 ± 10. 93
骨碎补低浓度组 (Drynaria in low concentration group)	147. 25 ± 11. 52	159. 34 ± 11. 47	219. 37 ± 13. 62	124. 38 ± 21. 50
骨碎补中浓度组 (Drynariae concentration group)	153. 24 ± 11. 42	190. 35 * ± 10. 08	241. 09 ± 11. 38	151. 36 ± 11. 25
骨碎补高浓度组 (Drynaria in high concentration group)	189. 23 ± 10. 34 *	245. 21 ± 19. 56	284. 23 ± 11. 58 **	161 ± 19. 34

注:含药血清组与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with blank group, serum * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 骨钙素分泌量检测

含药血清组骨钙素分泌量高于空白组,其中以骨碎补含药血清高浓度组分泌量较高,随着时间的延长骨钙素分泌量增加(表3)。

2.6 成骨诱导后钙化结节

钙化结节的数量明显高于空白组对照组,其中以杜仲含药血清高浓度组效果较好(图3)。

3 讨论

随着老龄化进程,骨质疏松的发病率逐年升高,防治骨质疏松是目前医学界的研究的热点和难点,成骨细胞在整个骨质疏松发病过程中起着中心环节的作用^[5,6],不仅仅体现在骨形成方面,而且还可通过直接联系和分泌细胞因子对破骨细胞的生长和分

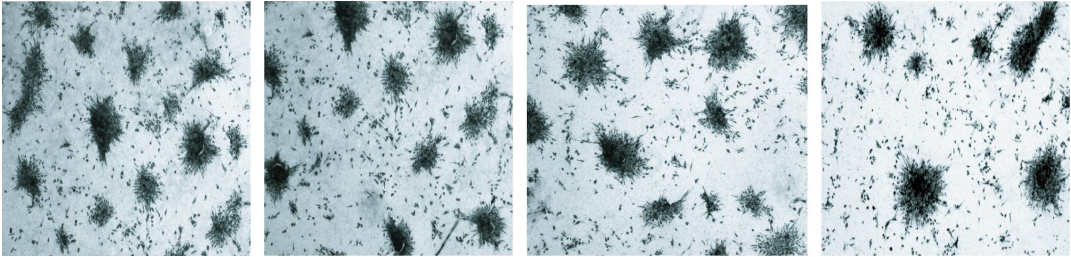


图3 钙化结节硝酸银染色

注:左至右分别为骨碎补高浓度组、骨碎补中浓度组、骨碎补低浓度组、空白组

Fig. 3 The silver nitrate staining of calcified nodules

Note: left to right respectively high concentration group, Rhizoma Drynariae Rhizoma Drynariae concentration group, low concentration group, blank group

表2 不同时期各组细胞钙盐沉积量

Table 2 The amount of calcium deposition of cells at different time points

组别	12 d	16 d
空白对照组 (Blank control group)	59.52 ± 2.02	105.21 ± 2.56
骨碎补低浓度组 (Drynaria in low concentration group)	75.37 ± 2.29 *	110.79 ± 3.27
骨碎补中浓度组 (Drynariae concentration group)	81.92 ± 3.03 *	113.09 ± 2.95 *
骨碎补高浓度组 (Drynaria in high concentration group)	100.25 ± 3.26 **	141.23 ± 6.54 **

注:含药血清组与空白组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

Note: compared with blank group, serum * P < 0.05, ** P < 0.01

表3 不同时期各组细胞骨钙素分泌量

Table 3 The secretion of osteocalcin of cells at different time points

组别	12 d	16 d
空白对照组 (Blank control group)	361 ± 5.12	430.15 ± 10.69
骨碎补低浓度组 (Drynaria in low concentration group)	390.21 ± 10.12	439.52 ± 11.31
骨碎补中浓度组 (Drynariae concentration group)	410.89 ± 6.31	465.31 ± 10.24
骨碎补高浓度组 (Drynaria in high concentration group)	431.27 ± 11.75 **	498.27 ± 11.06 **

注:含药血清组与空白组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

Note: compared with blank group, serum * P < 0.05, ** P < 0.01

化起决定性作用,从而对骨吸收发挥重要的调节作用,成骨细胞作为具有成骨潜能的主要功能细胞,促进其增殖、成骨分化具有重要意义^[7-9]。

中药促进成骨细胞的成骨、增殖是目前研究的热点。祖国医学认为杜仲“主治腰膝痛,补中,益精气,坚筋骨”。而骨碎补是中国特有药材,其药用历史悠久,在临床有着广泛的应用。本实验发现高浓度骨碎补含药血清可促进成骨细胞的增殖。碱性磷酸酶是参与骨代谢的重要蛋白质,特异性高,被认为是细胞外基质成熟的早期标志,在骨代谢研究中被广泛应用,其活性高低程度可以反映出细胞的成骨能力。骨钙素则被认为是成骨细胞分化最具特征性的标志物当成骨细胞活动增强时 ALP 活性升高,本实验发现骨碎补含药血清能促进成骨细胞 ALP 的分泌,提高 ALP 活性,从细胞因子水平上阐明了其治疗骨质疏松的可能的机理,同时还发现骨碎补含药血清可以促进钙盐沉积量、骨钙素分泌量、钙化结节的形成。由此证明中药骨碎补可以促进成骨细胞的成骨分化。

通过本实验研究表明,说明骨碎补含药血清对大鼠成骨细胞 ALP 活性的表达以及其矿化等具有很重要的促进作用。通过综合检测,说明骨碎补可以促进成骨细胞的增殖、矿化。而在骨折的愈合过程中,成骨细胞的数量、ALP 活性、矿化程度是决定骨折愈合的关键。而骨碎补可以促进成骨细胞的增殖、矿化,在临床上具有很好的应用前景,对于缩短骨折愈合时间,减轻患者痛苦,具有很好的临床意义。本实验还存在不足之处,骨碎补可以促进成骨细胞的增殖、矿化,但是其有效成分,最佳剂量等还没有解决,因此,还有待于后续的不断努力。

随着骨质疏松患者和骨折病人数量的增加,如何降低骨质疏松发病率,降低骨折风险,引起广泛关注^[10-12]。中医药具有促进骨折愈合及预防骨质疏松的作用,应进一步开发利用。

[2] Gulati S, Godbole M, Singh U, et al. Are children with idiopathic nephrotic syndrome at risk for metabolic bone disease? *Am J Kidney Dis*, 2003, 41: 1163-1169.

[3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(3): 2-17.

Society of Osteoporosis and Bone Mineral Diseases of Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of primary osteoporosis (2011) [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Disease*, 2011, 4(3): 2-17.

[4] Kumedu Y, Lnaba M, Nishizawa Y. Secondary osteopoposis and its treatment diabetes mellitus. *Japan J Clin Med*, 1998, 56: 1579-1586.

[5] 李刚强, 宋玉明, 陈斌. 骨质疏松 120 例临床研究. *陕西医学*, 2009, 6(12): 801-803.

Li GQ, Song YM, Chen Bin. Clinical study of 120 cases about osteoporosis. *Shanxi Medical Journal*, 2009, 6(12): 801-803.

[6] Yamamoto T. The role of AGEs for the pathogenesis Of osteopenia in diabetes mellitus [J]. *Clin Calcium*, 2006, 16(8): 62-66.

[7] Deb DK, Chen YZ, Li YC, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- κ B pathway [J]. *American Journal of Physiology-Renal physiology*, 2009, 296(5): 1212-1218.

[8] Li YC. Vitamin D and Diabetic Nephropathy [J]. *Current Diabetes Repots*, 2008, 8(12): 464-469.

[9] 陈家伦. 临床内分泌学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2011. 1429-1431.

Chen JL. *Clinical Endocrinology* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2011. 1429-1431.

[10] Dominguez CC, Sosa HM, Traba ML et al. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int*, 1998, 8(2): 147-151.

[11] Garnero P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998, 27(2): 303-322.

[12] Garnero P. Biomarkers for asteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mot Diagn Ther*, 2008, 12: 157-170.

[13] Liebon L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and metabolism: a complex crosstalk. *Harm Res*, 2009, 71 Suppl I: 134-138.

[14] Gamero P, Ferreras M, Karsdal MA, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 859-867.

[15] Hamrick MW. Perspectives: leptin and bone: a consensus emerging [J]. *Bone Key Osteovision*, 2007, 4(2007): 99-107.

[16] Avbersek Luznik I, Gmeiner ST, Marc J, et al. Activity or mass concentration of bone-specific alkaline phosphatase as a marker of bone formation [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45: 1014-1018.

(收稿日期: 2013-02-13; 修回日期: 2013-05-15)

(上接第 128 页)

【 参 考 文 献 】

[1] Wu JJ, Wang J, Wu YG. Experimental study of xianlu jiangsu decoction serum on osteoblasts proliferation and ALP [J]. *Zhe Jiang Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*, 2009, 33(1): 36-37. (in Chinese)

[2] Liu Qi, He JN, Wang CX. The research progress of bone marrow stromal stem cells to the osteoblast induced [J]. *Zhong Guo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2010, 18(6): 68-70. (in Chinese)

[3] Dai YG, Wu SH. Marrow stromal stem cells differentiation into osteoblast The research progress of impact factor [J]. *Lu Zhou Yi Xue Yuan Xue Bao*, 2010, 33(4): 459-461. (in Chinese)

[4] Ai GP, Su YP, Yan G, et al. The experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of skin wound combined with local radiation injury [J]. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2002, 82(23): 1632-1636. (in Chinese)

[5] Shao M, Zhuang H, Zhao J, et al. A Clinical study on the treatment of fracture delayed union by taking and grafting and grafting bone through percutaneous catheter [J]. *Zhong Yi Zheng Gu*, 2003, 15(4): 3-4. (in Chinese)

[6] Shao M, Zhuang H. The influence of medicated serum on in vitro culture of osteoblasts [J]. *Zhong Guo Gu Zhi Shu Song Za Zhi*, 2003, 9(2): 117-119. (in Chinese)

[7] Chen Z, Li Q, Qin MS, et al. Effect of Jiangsu Erxian Pill Extract on PKC and Bag1 in Rat Osteoblast in Vitro [J]. *Zhong Guo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2010, 18(2): 6-8. (in Chinese)

[8] Sheng XC, Yang RH, Peng J, et al. Experimental study on effect of Jiangsu Guben Capsule medicated serum on osteoblast of rats in vitro [J]. *Zhong Hua Zhong Yi Yao Za Zhi*, 2010, 25(2): 278-281. (in Chinese)

[9] Xu YJ, Zhao JN. Progressing study in osteoblasts cultured in vitro [J]. *Zhong Guo Gu Shang*, 2010, 23(7): 562-564. (in Chinese)

[10] Wei HW, Li Z, Zhang ZH, et al. The Effect of Gukang Drug Serum on the Activity of Alkaline Phosphates of Newborn Rats Osteoblasts [J]. *Zhong Yi Yao Xue Kan*, 2005, 23(1): 76-78. (in Chinese)

[11] Chen XJ, Wang Y, Wang L, et al. Induction of bone mesenchymal stem cells to form osteoblast [J]. *Chong Qing Yi Xue*, 2009, 28(10): 1185-1187. (in Chinese)

[12] Wei HW, Lin YF, Qu CZ, et al. Effect of Gukang medicated serum on platelet-derived growth factor expression in the healing process of osteoporotic fracture [J]. *Zhong Guo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2008, 12(37): 7290-7292. (in Chinese)

(收稿日期: 2013-01-02; 修回日期: 2013-04-24)

骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响

作者:

宋渊, 李盛华, 何志军, SONG Yuan, LI Shenghua, HE Zhi jun

作者单位:

宋渊, SONG Yuan(甘肃省中医院, 兰州 730050; 天津中医药大学, 天津 300193), 李盛华, 何志军, LI Shenghua, HE Zhi jun(甘肃省中医院, 兰州, 730050)

刊名:

中国骨质疏松杂志 

英文刊名:

Chinese Journal of Osteoporosis

年, 卷(期):

2014(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201402003.aspx