



喂饲补肾中药大鼠的血清对成骨细胞的生物学作用

骨质疏松症(Os)已成为老年人生活质量下降的主要原因之一,研究有效防治骨质疏松的药物一直受到人类的重视[1]。我们研究的骨灵丸在临床应用收到了较好的疗效[2],为了进一步阐明该药的作用机制,我们利用该药的中药血清对体外培养的成骨细胞进行干预,观察细胞的增殖、分化和矿化功能,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

无酚红DMEM培养基(Gibco BRL公司)和胎牛血清(杭州四季青公司),胰酶(美国Sigma公司),I型胶原酶(美国Sigma公司),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(Sigma公司)。

1.2 成骨细胞的分离与培养

取出生24 h的SD大鼠的头盖骨(南方医科大学实验动物中心提供),充分剥离骨膜,置盛有DMEM培养液的小瓶中修整并剪成1 mm×1 mm大小的碎块。加入0.1% I型胶原酶在37℃环境中震荡消化50 min,加入等体积的胎牛血清以终止消化。收集消化液,在4℃、1 000 r/min条件下离心10 min使细胞沉淀。弃上清液,沉淀细胞放置于含15%胎牛血清DMEM完全培养基和PEST(青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml)的培养皿内。并分别以约 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,加入适量培养液,置37℃、95%湿度、5.0% CO₂的孵育箱中培养。相差倒置显微镜下密切观察细胞生长状况,每2~3 d换新培养液1次。细胞长满后传代,使用第2代细胞进行实验。

1.3 中药血清的提取

补肾中药由鹿茸、骨碎补等组成,砂锅煎至300 ml,80℃水浴浓缩至160 ml。设立低(0.5 ml)、中(1.0 ml)、高(2.0 ml)3个剂量组及空白对照组(生理盐水),每组用SD大鼠4只,灌胃3 d,早晚各1次。末次灌胃后1 h采血,离心,56℃水浴30 min灭活,-20℃冰箱保存备用。

1.4 增殖测定

培养成骨细胞以 6×10^3 /孔密度接种于6孔塑料培养板,24 h后换入含15%中药血清的培养液中,72 h后用MTT方法在酶标仪上进行测试。测试条件参照文献[3],结果以D₅₇₀表示。

1.5 ALP测定

加药后48 h吸去培养液,细胞经0.1% Triton X-100溶解液破碎制成细胞悬液,取0.1 ml用对硝基苯磷酸盐法测各组ALP活性;另取0.1 ml用考马氏亮蓝法测定蛋白含量,以每mg蛋白中国际单位(U/mg·pro)表示ALP活性。

1.6 矿化结节形成测定

细胞以 2×10^4 密度接种于12孔塑料培养板(直径24 mm)中,2 d换液1次。10 d后换入含15%中药血清的培养液中,于14 d后加入β-磷酸甘油。用95%乙醇原位固定,0.1%茜素红染色30 min。用有格(0.2 mm×0.2 mm)涤纶薄膜贴附于培养板底部,低倍光镜下作矿化结节计数。本实验采用双盲法。

2 结果

2.1 对成骨细胞增殖率的影响

不同浓度的中药血清对培养的成骨细胞均显示增殖刺激作用，低、中、高剂量组的A570值分别为 0.592 ± 0.008 、 0.721 ± 0.022 、 0.627 ± 0.015 ，其中中剂量组的增殖刺激作用较为稳定(与空白对照组 0.527 ± 0.025 相比 $P < 0.01$)，观察成骨细胞呈梭形、三角形，形态欠规则，胞质丰富(图1)。各试验组间差异无显著性($P > 0.05$)。

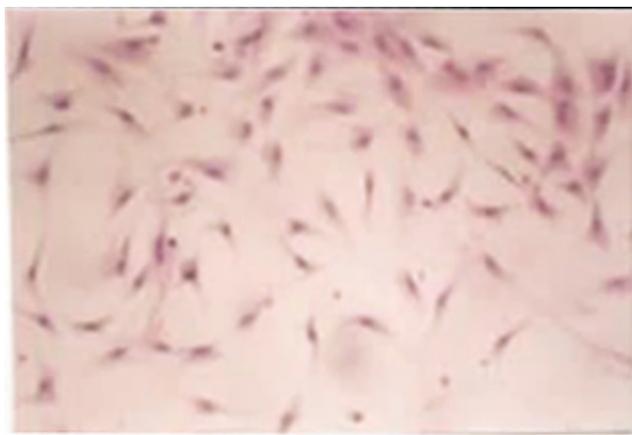


图1 加入补肾中药血清48 h的成骨细胞(ALP染色，原放大倍数： $\times 100$)

Fig.1 Osteoblasts cultured for 48 h in the presence of serum of kidney-tonifying traditional Chinese drug-treated rats (ALP staining, original magnification: $\times 100$)

2.2 对ALP表达的影响

不同浓度给药组培养48 h后，低、中、高剂量组的ALP活性分别为 0.780 ± 0.029 、 0.876 ± 0.025 、 0.769 ± 0.030 U/mg \cdot pro，与对照组(0.737 ± 0.054 U/mg \cdot pro)相比均呈不同程度提高，以中剂量组的作用为明显(与对照组相比 $P < 0.01$)，组间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 对矿化功能的影响

成骨细胞于培养14 d可见矿化结节的形成，茜素红染色后呈现大小、形态不一的红色阳性结节(图2)。低、中、高剂量组的矿化结节数分别为 308.1 ± 18.5 、 340.8 ± 23.4 、 320.3 ± 20.1 ，与对照组的 299.7 ± 20.5 相比分别提高3.3%~11.4%，其中中剂量组与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)，组间差异无显著性($P > 0.05$)。

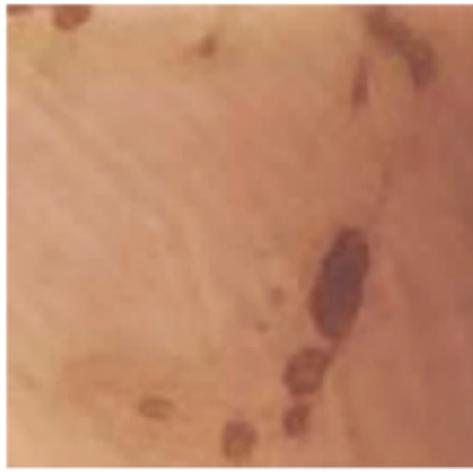


图2 加入补肾中药血清14 d的矿化结节(茜素红染色, 原放大倍数: $\times 40$)
Fig.2 Mineralized nodules among the osteoblasts treated with the serum for 14 d
(Alizarin red staining, original magnification: $\times 40$)

3 讨论

Os多见于绝经后妇女和老年人, 主要发病机制是骨形成与骨吸收失衡, 即破骨细胞骨吸收功能活跃, 而成骨细胞骨形成功能衰退。应用补肾中药可以改善Os患者的临床症状[4][5]。我们采用中药血清药理学研究方法, 收集达高峰时的血清。此时采集的血清, 应含有该药物的有效成分, 它不仅能反映该药物在体内的真实血药浓度, 而且以此血清进行体外试验, 可排除各种影响的干扰, 结果相对可靠。

加入中药血清后结果显示: (1)成骨细胞增殖率提高, 观察组的成骨细胞增殖率提高12.5%~36.8%, 以中浓度的作用较为明显; (2)成骨细胞ALP活性提高9.2%~18.8%, 以中浓度的表达为明显; (3)促进矿化结节形成, 观察组的矿化结节数均较对照组增加, 以中浓度组增加明显。ALP活性的高表达是成骨细胞分化的早期标志[6][7], 矿化则是细胞进一步分化成熟的功能表现。本实验表明补肾中药除对成骨细胞有刺激增殖作用外, 对ALP活性和矿化结节形成也有较好刺激作用。说明在促进细胞增殖的同时, 也能促进细胞进一步分化成熟, 因而可提高成骨细胞骨形成的功能。本实验提示各观察组之间对成骨细胞的作用无明显差异, 但存在一种最适浓度, 中药血清浓度太高, 不适宜细胞增殖、成熟, 太低则起不到作用。

我们已在临床上观察到补肾中药对患者的桡骨密度等方面有较显著的提高, 本实验在细胞水平观察了其成对成骨细胞的直接作用, 说明其防治Os的作用机制之一是促进骨形成。

(责任编辑: 杨金星)

参考文献:

[1] 朱建民, 方浩, 陈新刚, 等. 降钙素对体外培养成骨细胞的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(2): 147-9.

Zhu JM, Fang H, Chen XG, et al. Effects of calcitonin on osteoblasts in vitro[J]. Chin J Osteoporos, 2001, 7(2): 147-9.

[2] 李娟, 吴启富, 刘毅, 等. 骨灵丸治疗原发性骨质疏松症的临床疗效观察[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1999, 19(4 Suppl): 47-8.

[3] 朱文菁, 金慰芳, 张丽丽, 等. MTT法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力[J]. 上海医科大学学报, 1995, 22(4): 254-7.

Zhu WJ, Jin WF, Zhang LL, et al. Use of MTT assay for determination of osteoblasts viability and proliferation in vitro[J]. J Shanghai Med Univ, 1995, 22(4): 254-7.

[4] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸对抗维甲酸致骨质疏松作用的实验研究[J]. 第一军医大学

学报, 1999, 19(3): 242-4.

Li J, Chen XG, Wu QF, et al. Effects of GU LING WAN on osteoporosis by vitamin A acid: an experimental study [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(3): 242-4.

[5] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸防治原发性骨质疏松症的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志(Chin J Integr Med), 1997, 17(7): 163-4.

[6] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68(1): 43-52.

[7] Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels[J]. Biochem Bioshys Res Commun, 2003, 311(1): 179-86.

参考文献:

[1] 朱建民, 方浩, 陈新刚, 等. 降钙素对体外培养成骨细胞的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(2): 147-9.

Zhu JM, Fang H, Chen XG, et al. Effects of calcitonin on osteoblasts in vitro[J]. Chin J Osteoporos, 2001, 7(2): 147-9.

[2] 李娟, 吴启富, 刘毅, 等. 骨灵丸治疗原发性骨质疏松症的临床疗效观察[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1999, 19(4 Suppl): 47-8.

[3] 朱文菁, 金慰芳, 张丽丽, 等. MTT法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力[J]. 上海医科大学学报, 1995, 22(4): 254-7.

Zhu WJ, Jin WF, Zhang LL, et al. Use of MTT assay for determination of osteoblasts viability and proliferation in vitro[J]. J Shanghai Med Univ, 1995, 22(4): 254-7.

[4] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸对抗维甲酸致骨质疏松作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(3): 242-4.

Li J, Chen XG, Wu QF, et al. Effects of GU LING WAN on osteoporosis by vitamin A acid: an experimental study [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(3): 242-4.

[5] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸防治原发性骨质疏松症的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志(Chin J Integr Med), 1997, 17(7): 163-4.

[6] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68(1): 43-52.

[7] Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels[J]. Biochem Bioshys Res Commun, 2003, 311(1): 179-86.