

[文章编号] 1000- 4718(2006)06- 1171- 03

# 益骨胶囊含药血清在共育体系中对大鼠成骨细胞增殖 ALP 活性及 IL- 11 mRNA 表达的影响\*

傅淑平, 张荣华<sup>△</sup>, 徐立群

(暨南大学药学院中药学教研室, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 观察益骨胶囊含药血清在成骨- 破骨细胞共育体系中对 SD 大鼠成骨细胞(OB)增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性及白细胞介素- 11(IL- 11)mRNA 表达的影响。方法: (1)取 1d 龄 SD 大鼠颅骨分离培养 OB, 取 5 d 龄 SD 大鼠四肢股骨、胫骨分离培养破骨细胞(OC), 建立细胞上清相通但细胞间不相互混杂的平面式成骨- 破骨细胞共育体系, 实验分为两组(含药血清组和对照组)。(2)MTT 法检测 OB 增殖, 氨基安替吡啉测酚法测定 ALP 活性, FQ- PCR 法测定 IL- 11 mRNA 相对表达量。结果: 含药血清组中 OB 的 A 值、ALP 活性、IL- 11/ $\beta$ - actin 比值均高于对照组( $P < 0.05$ )。结论: 益骨胶囊含药血清在共育体系中可促进 OB 增殖, 增强 OB ALP 活性, 提高 IL- 11 mRNA 的表达。

**[关键词]** 益骨胶囊; 成骨细胞; 白细胞介素 11; 碱性磷酸酶; mRNA 表达

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effect of yigu capsule drug- containing serum on proliferation, ALP activity and expression of interleukin- 11 mRNA in rat osteoblasts in the co- culture

FU Shu- ping, ZHANG Rong- hua, XU Li- qun

(Department of Traditional Chinese Medicine, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of yigu capsule drug- containing serum on proliferation, ALP activity and expression of interleukin- 11 mRNA in Sprague- Dawley rat osteoblasts in the co- culture system. **METHODS:** (1) Osteoblasts and osteoclasts were isolated from 1 and 5- day- old Sprague- Dawley rats, respectively. The osteoblasts- osteoclasts co- culture system was built to prevent the two kinds of cells from contact and allow the media to exchange. The experiment included two groups, drug- containing sera group and control group. (2) The osteoblasts proliferation, ALP activity and expression of interleukin- 11 mRNA were detected by the MTT, 4- aminoantipyrine spectrometric methods and FQ- PCR, respectively. **RESULTS:** In drug- containing sera group, the osteoblasts proliferation, ALP activity, expression of IL- 11 mRNA were higher than those of control group ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Rat sera containing yigu capsule can obviously enhance the osteoblast proliferation, ALP activity and expression of IL- 11 mRNA.

**[KEY WORDS]** Yigu capsule; Osteoblasts; Interleukin- 11; Alkaline phosphatase; mRNA expression

既往研究表明, 益骨胶囊含药血清可调节体外单独培养的 OB 分泌细胞因子, 抑制 OC 的抗酒石酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)活性, 促进 OC 的凋亡。考虑到骨代谢中 OB 与 OC 两者之间存在密切的信息交流, 本研究拟观察益骨胶囊含药血清在成骨- 破骨细胞共育体系中对 OB 增殖 ALP 活性及 IL- 11 mRNA 表达的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 实验动物** 清洁级 10 月龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体重(384.75  $\pm$  4.86)g, 由广东省动物实验中心提供, 合格证号: 2003A013。普通级 1 d 龄 Sprague- Dawley(SD)新生大鼠和 5 d 龄 SD 新生大鼠, 由南方

[收稿日期] 2006- 03- 16 [修回日期] 2006- 03- 27

\* [基金项目] 国家自然科学基金项目资助(No. 30472274); 广东省自然科学基金重点项目资助(No. 04105837); 广东省社会发展计划资助重点引导项目(No. 2004B33001004)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 020- 85220936; E- mail: tzh@jnu.edu.cn

医科大学实验动物中心提供,合格证号:2003B029。

**1.2 药物** 参照益骨胶囊制备工艺,取淫羊藿、当归等7味中药免煎颗粒(由深圳三九医药股份有限公司提供),水提乙醇沉淀并进一步浓缩至每毫升含相当于8g原生药的药液(浓稠度接近流浸膏)。

**1.3 主要试剂** DMEM培养基(Gibco),胎牛血清(杭州四季青),0.25%胰酶(Hyclone),II型胶原酶(Invitogen),MTT(Bebco),DMSO(Sigma),PCR检测试剂盒(ABI公司),Trizol(Invitrogen),ALP检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

**1.4 主要仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(SHELLAB),倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂),可调式移液器(Eppendorf),721分光光度计(上海第三分析仪器厂),酶标仪(Thermo Labsystems),培养板(Costar),DNA/RNA纯度测定仪(Pharmacia公司),PE9600基因扩增仪(PE公司),PE7000全自动荧光定量PCR仪(Perkin Elmer公司)。

**2 方法**

**2.1 OB的分离与培养** 参照文献<sup>[2]</sup>。

**2.2 OC的分离与培养** 参照文献<sup>[3]</sup>。

**2.3 成骨-破骨细胞共育体系的建立** 将6或12孔细胞培养板改造成左右平行,上清液可自由交流而细胞不相互混杂的OB-OC共育培养板<sup>[1]</sup>,取OB以一定密度接种于共育培养板的OB培养室,3h后,待OB已贴壁,将新分离的OC以一定密度接种于OC培养室;待细胞周期同步化后,按实验要求进行培养。

**2.4 大鼠血清的制备** 参照文献<sup>[2]</sup>制备益骨胶囊含药血清和生理盐水对照血清,并以25%浓度的含药血清为敏感浓度含药血清,作为正式实验的体外添加剂量。

**2.5 实验分组** 取第3代OB与OC在共育板中接种培养并待细胞周期同步化后,将细胞分为含药血清组、对照组2组;含药血清组细胞加入敏感浓度含药血清培养;对照组细胞加入同浓度对照血清予以培养,按实验要求培养后,取细胞或上清用各项指标的测定。

**2.6 OB增殖情况测定** 按2.5方法分组,以2×10<sup>4</sup>cells/well的密度接种培养OB与OC,5d后弃去培养液,D-Hanks液冲洗3次,更换无血清的DMEM培养基400μL,同时OB培养室内加入5g/L的MTT80μL/well,置37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4h后弃去上清液,在加DMSO400μL/well,微孔板振荡器振荡10min,在酶标仪上测A值,波长为570nm。

**2.7 OB ALP活性测定** 按2.5方法分组以2×10<sup>4</sup>cells/well的密度接种培养OB与OC,5d后弃去培养液,D-Hanks液冲洗3次,在OB培养室内加入500μL0.1%Triton X-100/well作用30min,收集细胞裂解液,用氨基安替吡啉测酚法检测ALP活性,以100mL细胞裂解液在37℃与基质作用15min产生1mg酚为1单位。

**2.8 OB中IL-11 mRNA相对表达量的测定** 按2.5实验分组方法以2×10<sup>5</sup>cells/well的密度接种培养OB与OC,逐日倒置显微镜下观察,当细胞铺满孔底时,弃去培养液,D-Hanks液冲洗3次,0.25%胰酶消化OB,Trizol提取RNA,FQ-PCR法检测OB中目的基因IL-11的表达量(上游引物序列F:5'-CGTAGCCATCCAGGCTGTGT-3';下游引物序列R:5'-CCAGTGGTACGACCAGAGGC-3');由电脑自动分并计算结果;并用目的基因的拷贝数除以内参照(β-actin)基因的拷贝数,得到一个相对数的结果用于最终比较。

**3 统计学处理**

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 11.0软件处理,采用两独立样本t检验。

**结 果**

**1 OB的增殖**

表1 两组中MTT法测定的A值

Tab 1 A value of two groups by MTT method( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| Group                | A value          |
|----------------------|------------------|
| Control              | 0.2512 ± 0.0303  |
| Drug-containing sera | 0.4877 ± 0.0438* |

\* P < 0.05 vs control group.

**2 ALP的活性**

表2 两组中碱性磷酸酶活性测定结果

Tab 2 ALP activity in two groups(U/100 mL,  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| Group                | ALP activity     |
|----------------------|------------------|
| Control              | 2.3622 ± 0.1152  |
| Drug-containing sera | 3.1140 ± 0.1665* |

\* P < 0.05 vs control group.

**3 IL-11 mRNA的表达**

表3 两组中IL-11 mRNA表达量的比较

Tab 3 Expression of IL-11 mRNA in two groups( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| Group                | IL-11/β-actin     |
|----------------------|-------------------|
| Control              | 3.0733 ± 0.0306   |
| Drug-containing sera | 10.2333 ± 0.2055* |

\* P < 0.05 vs control group.

## 讨 论

本研究通过借鉴以往实验研究成果<sup>[2]</sup>选择 25% 浓度的含药血清为敏感浓度含药血清,并以此敏感浓度含药血清作为含药血清组的体外添加剂量。分别以 ALP 活性与 OB 增殖率作为 OB 功能的指标,采用 FQ-PCR 检测 IL-11 mRNA 的相对表达水平,以期从 IL-11 探讨益骨胶囊含药血清防治骨质疏松症的可能机制。

从实验结果中可以看到:含药血清组中 IL-11 mRNA 的相对表达水平明显高于对照组,该组中 OB ALP 活性、OB 增殖率均明显高于对照组。由此说明益骨胶囊含药血清可以提高 OB IL-11 mRNA 的相对表达量,增强 OB ALP 活性,刺激 OB 增殖,从而促进骨的形成,这一结果与 Suga 等<sup>[4]</sup>的研究结果相一致。

IL-11 作为 gp130 细胞因子家族成员之一,在骨局部主要由骨基质-OB 分泌(包括成骨前体细胞);其介导的生物学功能是通过 gp130 信号转导链传递,从而使细胞获得增殖和活化的信号;OB 和 OC 及其前体都是 IL-11 的靶器官。在转基因鼠中源性 IL-11 的过量表达可刺激骨形成,增加长骨皮质的厚度和强度,防止增龄性皮质骨的丢失;IL-11 亦可通过 STAT3 途径刺激骨形成蛋白靶基因的转录,抑制脂肪细胞的形成,促使骨髓间质细胞向 OB 转化<sup>[5]</sup>。另外,IL-11 还可以协同 BMP-2 共同促进骨的形成<sup>[6]</sup>。Inoue 等<sup>[7]</sup>认为由 AP-1 调节的 IL-11 表达的下降可能是老年性 OP 的发病机制之一;IL-11 对 OB 与骨形成具有促进作用,是骨形成的生理性刺激

因子。因此,我们认为:益骨胶囊含药血清在共育体系中提高 OB ALP 活性、刺激 OB 增殖的作用可能与其上调 OB IL-11 mRNA 的表达水平、增强 OB 增殖活化信号相关,而这也可能是该方防治骨质疏松症的作用机制之一。

### [参 考 文 献]

- [1] 杨德鸿,金大地,陈建庭,等. 共育体系中成骨细胞和破骨细胞生物学特性观察[J]. 中华骨科杂志, 2001, 21(11): 676-680.
- [2] 舒晓春,张荣华,彭柯萍,等. 益骨胶囊对成骨细胞增殖影响的时效及量效关系研究[J]. 中药材, 2003, 26(9): 644-647.
- [3] 舒晓春,张荣华,朱晓峰,等. 益骨胶囊含药血清对大鼠破骨细胞凋亡和分泌抗酒石酸性磷酸酶的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 1234-1237.
- [4] Suga K, Saitoh M, Fukushima S, et al. Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(9): 695-707.
- [5] Takeuchi Y, Watanabe S, Ishii G, et al. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice[J]. J Biol Chem, 2002, 277(50): 49011-49018.
- [6] Suga K, Saitoh M, Kokubo S, et al. Interleukin-11 acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 to accelerate bone formation in a rat ectopic model[J]. J Interferon Cytokine Res, 2003, 23(4): 203-207.
- [7] Inoue D, Matsumoto T. Reduced AP-1-mediated transcription of interleukin-11 gene in marrow stromal cells as a mechanism of senile osteoporosis: lessons from SAMP6[J]. International Congress Series, 2004, 1260(5): 61-65.