

· 博士之窗 ·

# 健骨二仙丸含药血清对人成骨细胞增殖及细胞周期的影响\*

程志安<sup>1△</sup> 吴燕峰<sup>1</sup> 曾志勇<sup>1</sup> 魏青<sup>1</sup> 萧劲夫<sup>2△△</sup>

**内容提要** 目的:在临床研究和动物实验的基础上,进一步探讨健骨二仙丸对成骨细胞增殖和细胞周期的影响。方法:分离、培养人的原代成骨细胞,采用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶掺入法和四氮唑蓝法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期。结果:健骨二仙丸中、高剂量组细胞增殖率、S期细胞比率和细胞增殖指数等均显著高于空白对照组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),与雌激素组比较差异无显著性。细胞凋亡率和G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期细胞比率显著低于空白对照组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结论:健骨二仙丸能有效促进成骨细胞的增殖、分化,防止成骨细胞的凋亡。

**关键词** 成骨细胞 增殖 细胞周期 健骨二仙丸

**Effect of Jiangu Erxian Pill on Proliferation and Cell Cycle of Human Osteoblast** CHENG Zhi-an, WU Yan-feng, ZENG Zhi-yong, et al Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou (510120)

**Objective:** To further explore the effect of Jiangu Erxian Pill (JGEXP) on proliferation and cell cycle of human osteoblast on the basis of previous clinical and experimental studies. **Methods:** Human primary osteoblast were isolated and cultured. The cell proliferation was tested by <sup>3</sup>H-thymine incorporation and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and the cell cycle was determined by flow cytometry technique. **Results:** In the medium and high dosage JGEXP groups, the cell proliferation rate and index, and percentage of diploid synthesis phase (S phase) cells were significantly higher than those in the blank control group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and similar to those in the estrogen group; and the cell apoptosis rate and percentage of G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> stage cells were lower than those in the blank control group ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** JGEXP could effectively promote the cell proliferation and differentiation, and prevent the cell apoptosis of osteoblast in vitro.

**Key words** osteoblast, proliferation, cell cycle, Jiangu Erxian Pill

在既往临床工作和动物实验研究的基础上,为了探讨健骨二仙丸的作用机制,我们研究了该方对人成骨细胞增殖和细胞周期的影响,现将部分结果报道如下。

## 材料和方法

### 1 材料

1.1 试剂 DMEM/F12,美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清(FCS),美国 Hyclone 公司产品;<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶掺入法(<sup>3</sup>H-TdR)试剂盒,北京中国原子能研究所产品(中山医科大学放射免疫检测中心提供);四氮唑

蓝(MTT)、二甲基亚砷、胰酶等,均为美国 Sigma 公司产品;碱性磷酸酶染色试剂盒,由上海虹桥医用试剂研究所提供。

1.2 仪器 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱,美国 Forma Scientific Inc. 产品;LS3801 液体闪烁计数仪,美国 Beckman 公司生产;F-820 细胞计数器,美国 Sysmex 公司产品;HYS-4 多头细胞收集器,上海跃进医疗器械厂产品;Facscabibur 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司生产;CK40 和 1×70 型倒置显微镜,日本 Olympus 产品。

1.3 实验动物 普通级 SD 大鼠,体重 220~250g,由中山医科大学动物实验中心提供。合格证号:2000 年粤检证字 00A005。

1.4 实验药物 倍美力注射液 25mg/5ml,惠氏-立达(Wyeth-Lederle)中国有限公司(苏州)惠赠。健骨二仙丸由龟版胶、鹿角胶、续断、山药和人参等组成,

\* 国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 97C042)

1. 中山大学孙逸仙纪念医院(广州 510120);2. 深圳市中医药研

每克含生药 1g,深圳市中医院中药制剂室制剂,深圳市中医药研究所监制。

## 2 方法

2.1 健骨二仙丸含药血清的制备 取健康 SD 雌性大鼠 24 只,随机分为 3 组 (1)健骨二仙丸组 6 只,按 16.0g 生药/kg 体重灌胃,每天 1 次 (2)空白对照组 12 只,按 10ml/kg 体重灌胃生理盐水,每天 1 次; (3)雌激素组 6 只,按倍美力 0.125mg/kg 体重灌胃,每天 1 次,均连续给药 3 天。末次灌药 1.5h 后,乙醚麻醉,在严格无菌条件下由腹主动脉取血。将各组血液于低温条件(4℃)下放置 4h,离心(3 000r/min)5min 后取上清液,再将上清液过滤除菌后 4℃ 冷藏备用。

2.2 细胞的分离和培养 人成骨样细胞的分离和培养按文献<sup>(1,2)</sup>方法进行。松质骨来源于骨科手术中髂骨取骨。

### 2.3 成骨细胞的鉴定

2.3.1 形态学观察 在倒置显微镜下观察,成骨细胞呈三角形、多角形、纺锤形和菱形,胞浆丰富向外伸展,伸出几个突起与邻近细胞伸出的突起相连。胞核大而清晰,呈圆形或卵圆形,含 1~2 个核仁。

2.3.2 碱性磷酸酶(ALP)染色 成骨细胞含丰富的 ALP,ALP 是成骨细胞的标志性酶。染色过程如下:将贴壁细胞放置 4℃ 固定液中 30s,流水冲洗,空气晾干,把固定后的玻璃片放入工作液中,置 37℃ 水温箱中 45min,流水冲洗,苏木精复染,流水冲洗,晾干,直接油镜观片,酶活动处呈亮红颗粒。

2.3.3 矿化结节的形成 成骨细胞合成并分泌骨的有机成分后,在一定条件下无机盐有序地沉积于其内,是钙和磷形成羟基磷灰石。成骨细胞培养经  $\beta$ -磷酸甘油钠诱导,可在培养瓶(或皿)的底部形成矿化结节,也是成骨细胞的标志性产物。

2.4 含药血清细胞毒性的观察 用 DMEM/F12 培养液将大鼠血清倍比稀释,分别观察 100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3% 条件下健骨二仙丸含药血清的细胞毒性。成骨细胞按  $1.0 \times 10^5$ /ml 密度接种于 24 孔板,在 DMEM/F12 及 10%(V/V)FCS 中培养 24h 至细胞贴壁,用 Hank's 液冲洗 2 次。换成无血清培养液 24h 后,用不同血药浓度(100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3%)的大鼠血清处理细胞,每个药物浓度 4 孔。继续培养 48h,观察细胞生长情况,然后用 0.25% 胰酶消化细胞,离心,将细胞配成 1ml 的细胞悬液,在细胞计数器上计数。结果显示 50%、100% 浓度组细胞生长明显受到抑制,细胞数显著减少,3% 和 6.25% 组细胞生长缓慢,细胞数显著少于 12.5% 和

25% 组。12.5% 和 25% 组间比较差异无显著性。

2.5 细胞培养实验分组 根据细胞毒性观察结果,将培养成骨细胞分为健骨二仙丸 5%、10% 和 20% (大鼠血清)组(J5%、J10%、J20%),雌激素对照 1 组(E5%、E10%、E20%)和空白对照组(K5%、K10%、K20%)大鼠血清和健骨二仙丸一样等浓度稀释,雌激素对照 2 组(e5%、e10%、e20%)根据文献实验条件<sup>(3,4)</sup>,在 5%、10% 和 20% 的大鼠空白血清中加入相当于  $10^{-5}$  mol/L 马烯雌酮的倍美力溶液(以下简称  $10^{-5}$  mol/L 倍美力溶液),共 12 组。培养液量各组相同。

### 2.6 细胞增殖的定量分析

2.6.1 <sup>3</sup>H-TdR 法 传 5 代成骨细胞按  $2.0 \times 10^4$ /ml 密度接种于 24 孔板,在 DMEM/F12 及 10%(V/V)FCS 中培养 24h 至细胞贴壁,用 PBS 冲洗 2 次。换成含 0.5% FCS 的 DMEM/F12 培养液培养 24h 后,用不同血药浓度(5%、10%、20%)的大鼠血清处理细胞,每个药物浓度 4 孔。空白对照组加等量等浓度的大鼠血清,雌激素对照 1 组加入含雌激素的等量大鼠血清,雌激素对照 2 组于等量等浓度大鼠血清中加入  $10^{-5}$  mol/L 倍美力溶液。培养 48h 后,加入 <sup>3</sup>H-TdR 1  $\mu$ Ci/孔,继续培养 24h。用 2% EDTA 25  $\mu$ l 消化细胞,用多头细胞收集器将细胞抽吸到玻璃纤维滤纸上,用 3% 醋酸水溶液洗涤滤纸 3 次,洗去游离的 <sup>3</sup>H-TdR,烘干,加闪烁液测 cpm 值,结果以 4 次重复的 cpm 均值表示。

2.6.2 MTT 法 取 96 孔细胞培养板,每孔中加 0.1ml 含  $0.25 \times 10^5$  ml 的传 5 代成骨细胞于不含酚红的 DMEM/F12 及 10%(V/V)FCS 中,培养 24h 使细胞贴壁,用 Hank's 液冲洗 2 次。换成含 0.5% FCS 的 DMEM/F12 培养液培养 24h 后,加入不同浓度(5%、10%、20%)的大鼠血清及药物处理细胞,每个药物浓度 4 孔,培养 48h。每孔加 0.01ml 的 5%(mg/ml) MTT 溶液(5mg/ml 溶于 PBS 中,滤过除菌,4℃ 避光保存),在同样条件下培养 4h。取出,每孔加入 100  $\mu$ l 的二甲基亚砜,振荡混匀。在 96 孔酶标仪上检测光密度(OD)值,检测波长 595nm(参考波长为 485nm)。重复上述实验过程 3 次,观察结果的重复性如何,并以 4 次实验结果的均数做统计学处理。

2.7 细胞周期的测定 传 5 代成骨细胞按  $1.0 \times 10^4$ /ml 密度接种于 6 孔板,在 DMEM/F12 及 10% FCS 中培养 24h 至细胞贴壁,改用 DMEM/F12 及 5% FCS 继续培养 12 天,用 Hank's 液细胞冲洗 2 次。换成无血清培养液培养 24h,再以 20% 的大鼠血清和药

物处理细胞,每个药物浓度 2 孔。48h 后,吸取培养液 0.25%胰酶消化,反复冲洗后用 Hank's 液将细胞配成  $2 \times 10^6/\text{ml}$  的细胞悬液,离心,加入 70% 的冻酒精 2ml 固定 30min。1 200r/min 离心,弃上清,加入 0.5% 的 R Nase  $50\mu\text{l}$ ,再加入  $450\mu\text{l}$  碘化丙啶(propidium iodide, PI),置于  $2\sim 8^\circ\text{C}$  避光处 30min,上机检测。

2.8 统计学分析 实验数据用 SPSS 9.0 软件行方差分析,并用 Newman-Keuls 和 Dunnett's T3 进行组间比较。各项参数均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计检验的显著性水平取 0.05。

### 结 果

#### 1 健骨二仙丸对成骨细胞增殖的影响

1.1  $^3\text{H-TdR}$  掺入法测定增殖 空白对照各组间差异无显著性,表明单纯大鼠血清浓度变化对成骨细胞的增殖无明显影响。空白对照各组与 E5%组、E10%组、J5%组间比较差异无显著性,E20%、e5%、e10%、e20%、J10%和 J20%组细胞增殖显著高于空白对照组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见图 1。

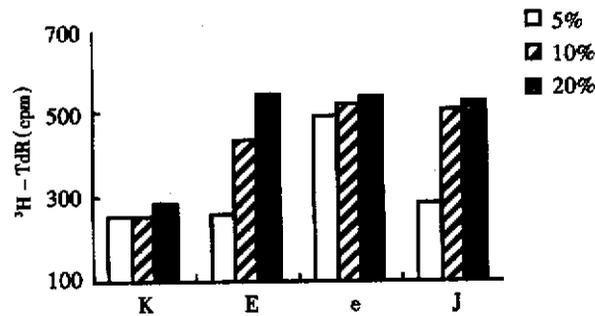


图 1 健骨二仙丸对成骨细胞增殖的影响

注 K 为空白对照组, E 为雌激素对照 1 组, e 为雌激素对照 2 组, J 为健骨二仙丸组;下同

1.2 MTT 法测定细胞增殖 空白对照组各组间差异无显著性,空白对照各组与 E5%组和 J5%组间差异无显著性。E10%、E20%、e5%、e10%、e20%、J10%和 J20%组间差异无显著性,但均显著高于 K5%、K10%、K20%、E5%、J5%组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见图 2。

#### 2 健骨二仙丸对成骨细胞周期和凋亡的影响

$G_0-G_1$  期细胞比率:健骨二仙丸组和雌激素对照组均显著低于空白对照组( $P < 0.05$ );S 期细胞比率:健骨二仙丸组和雌激素组均显著高于空白对照组( $P < 0.01$ );细胞增殖指数:健骨二仙丸组和雌激素组均显著高于空白对照组( $P < 0.01, P < 0.05$ ),见图 3。细胞凋亡比率:健骨二仙丸组和雌激素组均显著低于空

白对照组( $P < 0.01$ ),见图 4。

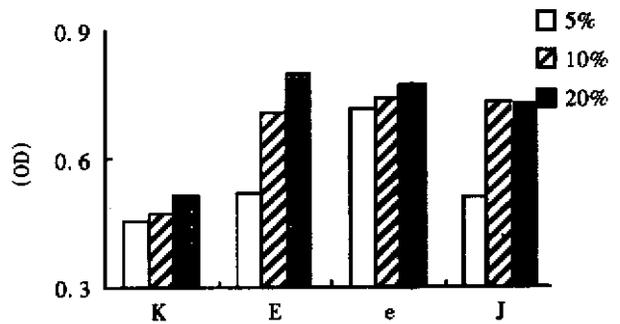


图 2 健骨二仙丸对成骨细胞增殖的影响

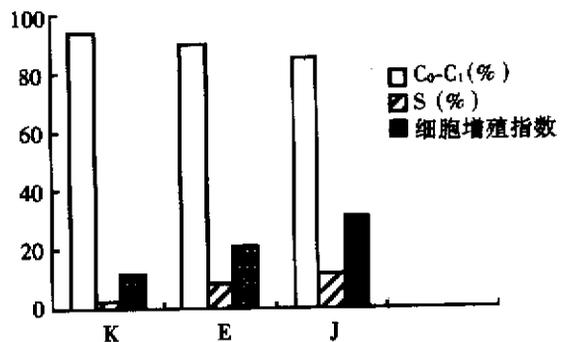


图 3 健骨二仙丸对成骨细胞周期的影响

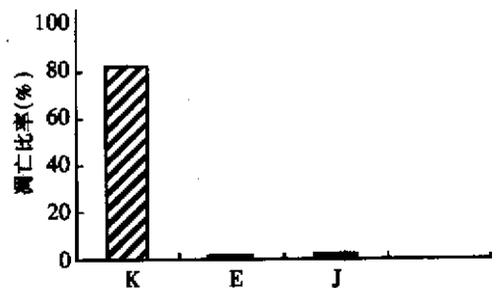


图 4 健骨二仙丸对成骨细胞凋亡的影响

### 讨 论

前期动物实验研究表明,健骨二仙丸能有效防止卵巢切除大鼠骨丢失,维持大鼠的骨结构,提高血清胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-I, IGF-I)水平<sup>(5,6)</sup>,进一步探讨其作用机制是本研究工作的目的。

成骨细胞是骨形成、骨骼发育与生长的重要细胞,可合成和分泌 20 余种胶原与非胶原蛋白和一些骨代谢的局部调节因子,在骨重建中生成类骨质和促进类骨质的矿化,形成的新骨质修补破骨细胞骨吸收形成的陷窝。成骨细胞成骨功能减退导致新骨形成减少,对骨吸收陷窝的修补能力减弱,造成骨小梁变细、薄弱、穿孔,皮质骨出现多空性变。因此探讨健骨二仙

丸对成骨细胞增殖及细胞周期的作用,对于进一步证明该方疗效的确切性并阐明其作用途径和机制具有重要意义。

成骨细胞一旦完成它们骨形成的功能,或者陷入骨基质中形成骨细胞,或者仍保留在骨的表面作为衬细胞。虽然如此,除骨细胞和衬细胞外,最初呈现在骨重建位置的 50%~70% 的成骨细胞的去向不能得到明确的解释。细胞凋亡导致这部分丢失细胞的死亡,在骨组织微环境中产生的生长因子和细胞因子影响这一过程<sup>(7)</sup>。健骨二仙丸对成骨细胞凋亡的抑制作用,可能是其防止骨丢失的作用机制之一。

生长激素具有促进成骨细胞增殖、分化的作用。但到目前为止,雌激素对成骨细胞增殖、分化的作用报道结果不一。有报道雌激素可有效刺激成骨细胞的增殖、分化,促进成骨细胞 I 型胶原 mRNA 的表达<sup>(8)</sup>,也有报道雌激素抑制成骨细胞的生长、增殖、分化和骨的形成<sup>(3)</sup>,另有一些报道却表明雌激素对成骨细胞的生长无明显影响<sup>(9)</sup>。成骨细胞对雌激素的反应不同,在一定程度上可能是由于在不同的细胞系和原代细胞培养过程中,细胞种类的不同,物种来源各异,未完全分化,和/或细胞内雌激素受体的含量少或受体变化<sup>(10)</sup>。孕激素能防治绝经后女性骨的丢失,维持骨结构的完整性,刺激成骨细胞的增殖、分化<sup>(9)</sup>。本研究结果表明,健骨二仙丸能显著促进成骨细胞增殖、分化。健骨二仙丸不仅能防止成骨细胞的凋亡,而且能刺激饥饿造成的细胞凋亡的增殖,说明健骨二仙丸能有效促进成骨细胞的成骨功能。

健骨二仙丸由《医方考》中龟鹿二仙胶加续断等组成。该方具有补肾填精,滋阴补阳,强壮筋骨,补先天为主,健脾益气,补后天为辅,先天和后天相辅相成的作用特点。现代药理学研究表明,该方中续断具有类雌激素和孕激素的作用<sup>(11)</sup>,龟版胶和鹿角胶主要成分为动物胶、骨胶原、角蛋白、脂肪、钙、磷、镁以及多种氨基酸等<sup>(12)</sup>,人参具有抗衰老,改善心肌功能和血液循环,提高免疫力,刺激垂体-肾上腺皮质系统功能,促进核酸和蛋白的合成等作用<sup>(13)</sup>。因此,健骨二仙丸促进成骨细胞增殖、分化,防止成骨细胞的凋亡的机制可能与调节生长激素、雌激素、孕激素和 IGF-I 的作用有关。

参 考 文 献

1. MacDonald BR, Gallagher JA, Ahnfelt-Ronne L, et al. Effects of bovine parathyroid hormone and 1,25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> on the production of prostaglandins by cell derived from human bone. *FEBS Lett* 1984 ;169:49—52.
2. Crisp AJ, McGuire-Goldring MB, Goldring SR, et al. A system for culture of human trabecular bone and hormone response profiles of derived cells. *Br J Exp Pathol* 1984 ;65:645—654.
3. Robinson JA, Harris SA, Riggs BL, et al. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 1997 ;138:2919—2927.
4. Brinton RD, Tran J, Proffitt P, et al. 17 beta-estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochem Res* 1997 22( 11 ):1339—1351.
5. 程志安, 萧劲夫, 谢文峰, 等. 健骨二仙丸对去势大鼠骨量和血脂的影响. *中国中医骨伤科杂志* 2001 ;( 5 ):10—13.
6. 程志安, 萧劲夫, 曾志勇, 等. 健骨二仙丸对去势大鼠结构和血清 IGF- I 的影响. *中国中医骨伤科杂志* 2001 ;( 6 ):5—8.
7. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death( apoptosis ): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998 ;13:793—802.
8. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-1, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 1989 ;125:825—833.
9. Harris SA, Tau KR, Turner RT, et al. Estrogens and progestins. In: Bilezikian JP( ed ) *Principles Bone Biology*. San Diego : Academic Press ,1996: 507—520.
10. Davis VL, Douse JF, Gray TK, et al. Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblastlike lines. *J Bone Miner Res* 1994 ;9:983—991.
11. 龚小健, 吴知行, 陈 真, 等. 川续断对离体子宫的作用. *中国药科大学学报* 1995 2( 2 ):115—119.
12. 郑虎占, 董泽宏, 余 靖主编. *中药现代研究与应用*. 北京 : 学苑出版社 ,1998:4278—4282, 563—573.
13. 王本祥主编. *现代中药药理学*. 天津 :天津科学技术出版社 , 1997:1233—1236, 1147—1161.

( 收稿 2001-07-30 修回 2001-10-25 )