

含骨松宝的老龄大鼠血清对兔成骨细胞增殖作用的实验研究*

张贵林 王长松 唐俊杰 任光友

摘要 目的:观察骨松宝对体外培养成骨细胞增殖和代谢的影响。方法:给 18 月龄老年大鼠灌胃骨松宝 1.5g/kg 体重,每日 2 次,连续 3 天,末次灌胃后 1h 取血分离血清,用 D8900 培养基分别配成含药鼠血清 7.5% 和 15% 的培养基,并用于培养成骨细胞 24h,同时以加有 7.5% 和 15% 未用药老龄大鼠血清的 D8900 培养基、含 20 μ mol/L 氟化钠(NaF)的 D8900 无血清培养基及 D8900 无血清培养基作对照,用 MTT 法检测细胞增殖,并测定培养基上清液中 Ca^{2+} 浓度及碱性磷酸酶(ALP)的含量变化。结果:与加有相同浓度鼠血清的 D8900 培养基组、D8900 培养基加 NaF 组和 D8900 培养基组比较,含药鼠血清组的成骨细胞增殖明显,差异有显著性($P < 0.01$)。培养基中的 Ca^{2+} 消耗量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),ALP 浓度明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:骨松宝能促进成骨细胞 DNA 合成和提高对 Ca^{2+} 的利用,促进成骨细胞的生长增殖。

关键词 骨松宝 骨质疏松 成骨细胞培养 血清药理学

Experimental Study on Effect of Gusongbao Contained Serum of Old Rats on Osteoblast Proliferation of Rabbits ZHANG Gui-lin, WANG Chang-song, TANG Jun-jie, et al Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang (550004)

Objective: To observe the effect of Gusongbao (GSB) on proliferation and metabolism of osteoblast cultured in vitro. **Methods:** Old rats, aged 18 months, were given GSB 1.5 g/kg, twice a day for 3 days by intragastric perfusion. Blood of the rats was collected 1 hr after the final perfusion to isolate serum for preparing, with D8900 medium, the culture media containing 7.5% or 15% GSB, which was used to culture osteoblast for 24 hrs. Besides, D8900 media containing 7.5% or 15% old rats' serum without medication, containing 20 μ mol/L sodium fluoride, and simple D8900 medium were prepared for control. The cell proliferation was detected by MTT method, and the changes of Ca^{2+} concentration and ALP content in supernatant of culture were also observed. **Results:** The osteoblast proliferation cultured in GSB serum containing medium was significantly increased than those cultured in the other control media ($P < 0.01$), at the same time, the Ca^{2+} consumption increased and the ALP content elevated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** GSB could promote the DNA synthesis, increase the utilization of Ca^{2+} and accelerate the growth and proliferation of osteoblast.

Key words Gusongbao, osteoporosis, osteoblast culture, serum pharmacology

骨松宝临床用于防治骨质疏松症(osteoporosis, OP)及 OP 所引起的骨折,具有不良反应少、疗效显著的特点^[1,2]。笔者于 2002 年 2—3 月采用体外成骨细胞培养和血清药理学的方法,观察老龄大鼠灌胃骨松宝后的血清对成骨细胞生长增殖和代谢的影响。

材料与方法

1 动物 Wistar 大鼠,18 月龄,20 只,雌雄各半,体重(468.75 $\pm$ 57.12)g,日本大耳白兔,雌性 1 月龄,体重 535g,贵阳医学院实验动物中心提供,合格证:SCXK(黔)2002—0001。

2 药物 骨松宝胶囊(由淫羊藿、续断、川芎、赤芍、生地、牡蛎等中药制成,每克骨松宝含生药量为 10g,贵州富华药业有限责任公司生产,批号:980927)。

3 试剂及仪器 DMEM 培养基(Gibco 公司);新生小牛血清(成都哈里生物工程有限公司);胰蛋白酶

* 本课题为贵阳市科学技术计划项目(No. 2001—27)

贵阳医学院 贵阳 550004)

通讯作者:张贵林, Tel: 0851—6785813, E-mail: zhangguilinzgl@hotmail.com

(Gibco 公司);D8900 培养基(Sigma 公司);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司);氯化钠(分析纯,重庆化学试剂厂);Yamatol T-61 型 CO₂ 培养箱(日本);Olympus PM-10AD 型倒置显微镜(日本);96 孔培养板、24 孔培养板(Corning 公司);Biorad505 酶标仪(日本);ABBOTT-AEROSSET2000 大型全自动生化分析仪(美国)。

4 实验方法

4.1 含药血清制备 取 18 月龄 Wistar 老龄大鼠 20 只,雌雄各半,分层随机分为对照组和骨松宝组,骨松宝组动物每日早、晚各一次灌胃 15% 骨松宝 1ml/100g 体重[3.0g/(kg·d)],第 5 次给药后 1h 再灌胃一次(对照组同法灌胃等容积生理盐水)。末次灌胃后 1h 乙醚麻醉,无菌条件下股动脉取血,4℃ 2500r/min 离心 25min,吸取血清,同组混匀,56℃ 30min 灭活,以 0.22μm 微孔滤膜正压过滤除菌。用 D8900 无血清培养基将给药组大鼠血清和对照组大鼠血清分别配成含血清 7.5% 及 15% 的含药鼠血清培养基和对照鼠血清培养基, -40℃ 保存备用。

4.2 成骨细胞培养 在无菌条件下取 1 月龄健康日本大耳白兔肋骨,除去骨膜、肋软骨以及周围软组织,按文献^[3,4]所述方法进行组织块法原代培养。即将肋骨剪成 1mm×1mm×1mm 大小,置于无菌的培养瓶中,均匀铺开,骨块间隔 0.5cm,将培养瓶翻转,加入 2.5ml 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基(内含 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素),3h 后轻轻将培养瓶翻转。每 2~3 天全量换培养基一次,至细胞长成单层后用 0.125% 胰蛋白酶消化传代,用第 2 代细胞做实验。培养的细胞经碱性磷酸酶染色、Von-Kossa's 染色呈阳性反应,同时在形态学上符合成骨细胞生长特点。

4.3 成骨细胞增殖检测 参照文献^[5]方法,将第 2 代细胞消化后用台盼蓝染色,镜检活细胞≥95%。计数后分别加入 96 孔板中,每孔 200μl,细胞数为 1.76×10⁵/孔。培养 24h,观察细胞贴壁后,换成含不同浓度含药大鼠血清及对照大鼠血清的 D8900 培养基,另设 D8900 无血清培养基和含 20μmol/L 氟化钠

D8900 无血清培养基分别作正常对照和阳性对照,每组 10 个平行孔。培养 24h,培养结束前 4h 向每孔内加入 5mg/ml MTT20μl,培养结束后,弃去培养孔内培养基,每孔加入二甲基亚砷 150μl 振荡,待蓝色结晶完全溶解后,用酶标仪(波长 490nm)测定各孔吸光度(A)。

4.4 成骨细胞培养基中生化物质测定 将第 2 代细胞消化、计数后,分别加入 24 孔板中,每孔细胞数为 2.5×10⁵ 个。培养 24h,观察细胞贴壁后同上分组和处理,每组 8 个平行孔。分别培养 24h 后用全自动生化分析仪测定培养基中的碱性磷酸酶(ALP)和钙(Ca²⁺)浓度。每组的培养基各取 3 份测定 Ca²⁺ 浓度,取其均值作为原浓度,原浓度减培养成骨细胞 24h 后的浓度得消耗的 Ca²⁺ 量。

5 统计学方法 采用组间 t 检验。

结 果

1 成骨细胞增殖检测 见表 1。7.5% 和 15% 含药鼠血清组吸光度分别显著高于 7.5% 和 15% 鼠血清组,并显著高于 D8900 组和 D8900 加 NaF 组(P<0.01)。

表 1 成骨细胞增殖检测 (x±s)

组别	n	吸光度(A)
D8900	10	0.0052±0.0092
D8900 加 NaF(20μmol/L)	10	0.0219±0.0126**
D8900 加 7.5% 鼠血清	10	0.0405±0.0162**△
D8900 加 15% 鼠血清	10	0.2241±0.0265**△△
D8900 加 7.5% 含药血清	10	0.1350±0.0674**△△▲▲
D8900 加 15% 含药血清	10	0.3065±0.0307**△△▲▲

注:与 D8900 组比较,*P<0.05,**P<0.01;与 D8900 加 NaF 组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与 D8900 加相同浓度鼠血清组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01;下表同

2 成骨细胞培养基中生化物质的测定 见表 2。培养基中生化物质测定结果显示,含药鼠血清组与相同浓度不含药鼠血清组比较,Ca²⁺ 消耗量明显增加,差异有显著性(P<0.05);ALP 浓度明显升高,其中 7.5% 含药鼠血清组差异尤其显著(P<0.01),15% 含药鼠血清组与 15% 鼠血清组比较,ALP 浓度有升高趋

表 2 成骨细胞培养基中生化物质的测定 (x±s)

组别	n	Ca ²⁺ (mmol/L)			ALP(U/L)
		原浓度	培养 24h 后浓度	消耗量	
D8900	8	1.05±0.02	0.80±0.06	0.25±0.06	1.76±0.72
D8900 加 NaF(20μmol/L)	8	1.05±0.00	0.60±0.09	0.47±0.10**	2.64±0.47*
D8900 加 7.5% 鼠血清	8	1.35±0.01	0.81±0.14	0.54±0.14**	3.28±1.29*
D8900 加 15% 鼠血清	8	1.60±0.03	0.78±0.13	0.82±0.13**△△	12.49±1.23**△△
D8900 加 7.5% 含药血清	8	1.41±0.03	0.74±0.10	0.68±0.10**△△▲	14.91±6.43**△△▲▲
D8900 加 15% 含药血清	8	1.85±0.02	0.91±0.09	0.94±0.09**△△▲	15.18±3.50**△△

势,但差异无显著性($P>0.05$)。

讨 论

从细胞水平和分子水平验证并揭示中药及其复方制剂的作用及作用基础,是推动中药现代化的一种不可或缺的重要手段。离体细胞培养是从细胞水平研究药物作用机制较为理想的体外模型^[6]。但是,由于中药制剂本身的理化性质等不确定因素对实验结果的干扰,同时还由于中药制剂并不能完全代表其在体内真正产生药效的成分,如将中药制剂直接用于细胞培养极易产生假阴性或假阳性的结果。因此,血清药理学的提出与应用^[7,8]不仅克服了上述中药制剂用于体外实验的弊端,并且其结果与在体实验有较好的一致性。它不但反映中药可被机体吸收利用的成分及其代谢物的药理效应,而且还能表达可能由药物诱导机体内源性成分所产生的作用。采用给药老龄大鼠血清做试验,以求能更好地反映骨松宝的药效特征。

OP 的组织学机制主要是由于骨重建负平衡所致,其细胞学机制可能是成骨细胞增殖受抑制。成骨细胞的作用是促进骨的矿化,提高骨对钙的利用。MTT 比色试验是一种检测细胞存活和生长的方法,并能反映细胞 DNA 合成的状态^[5]。MTT 是一种能接受氢原子的染料,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原成为难溶性的紫色结晶物并能沉积在细胞中,而死细胞无此功能,二甲基亚砷能溶解细胞中的紫色结晶物,用酶联免疫检测仪在 490nm 处测定其吸光度,可间接反映细胞数量,在一定范围内,MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比,与细胞内 DNA 的合成呈正相关,其特点是灵敏度高,重复性好,与其他检测细胞活性的方法(如细胞计数法、软琼脂克隆形成试验和³H-TdR 掺入试验等)有良好的相关性。ALP 为成骨细胞所分泌,ALP 水平提高反映成骨细胞增殖活跃,成骨细胞可促进 Ca^{2+} 在基质中的沉积,这一功能与细胞的 ALP 活性密切相关。实验结果显示,含药大鼠血清组与各对照组相比,成骨细胞增殖、ALP 含量和 Ca^{2+} 消耗量均明显增加,可见骨松宝被大鼠吸收后,可促进成骨细胞增殖并增加对 Ca^{2+} 的利用,这对 OP 的骨重建和对 Ca^{2+} 的利用具有积极的意义,为骨松宝治疗 OP 症提供了细胞学方面的实验依据。

加有鼠血清的培养基其 Ca^{2+} 浓度高于无鼠血清的培养基,应为鼠血清所携之 Ca^{2+} 所致,含药鼠血清培养基的 Ca^{2+} 浓度又高于不含药鼠血清,表明老龄大鼠连续 3 天灌胃骨松宝的末次给药后 1h,其血清中的 Ca^{2+} 浓度有明显升高,应为骨松宝中的牡蛎补充了钙源,方

中其他中药则促进了钙的吸收所致。OP 患者对钙的吸收能力比同龄健康人群显著降低^[9],骨松宝增加了机体对钙的吸收,无疑有助于 OP 的防治。中医学认为淫羊藿、续断、川芎、生地、牡蛎均有坚(壮、强)筋骨之功^[10]。现有大量报道证实方中的主药淫羊藿具有明显的抗 OP、促进骨髓细胞 DNA 合成、促进骨骼生长等作用^[11-13]。实验结果表明,大鼠灌胃骨松宝后能促进消化道对钙的吸收,其血清能促进成骨细胞的 DNA 合成、增殖和对钙的利用,与现代诸多相关报道相一致。

实验结果还显示培养基中的 Ca^{2+} 浓度与成骨细胞的增殖及 Ca^{2+} 消耗均呈正相关,推测骨松宝增加机体对 Ca^{2+} 的吸收是其促进成骨细胞增殖和抗 OP 的一种机制。

参 考 文 献

- 1 上海中医药大学附属曙光医院,上海中医药大学附属龙华医院,上海第二医科大学附属瑞金医院,等.骨松宝治疗骨质疏松症临床总结.贵阳中医学院学报 2000;22(增刊):113—115.
- 2 天津医院骨病科.骨松宝治疗原发性骨质疏松 30 例疗效观察.贵阳中医学院学报 2000;22(增刊):115—117.
- 3 Drivdahl RH, Puzas JE, Howard GA, et al. Regulation of DNA synthesis in chick calvaria cell by factors from bone organ culture proc. Soc Exp Biol Med 1981;168:143.
- 4 栗向东,胡蕴玉.庆大霉素对兔成骨细胞增殖及超微结构的影响.中华骨科杂志 1999;19(3):177—179.
- 5 司徒镇强,吴军正.细胞培养.西安:世界图书出版公司,1996:186—187.
- 6 Peruche B, Kriegelstein J. Neuroblastoma cells for testing neuroprotective effects. J Pharmacol Meth 1991;23:63—65.
- 7 田代真一.“血清药理学”と“血清药化学”——汉方の药理学から始まった药物血中浓度测定の新しい世界. TDM 研究 1988(5):54.
- 8 Hiriko Iwama, Sakae Amagaya, Yukio Ogihara, et al. Effect of Shassaikoto, a Japanese and Chinese herbal medical mixture, on the mitogenic activating of lipopolysaccharide—a new pharmacological testing model. J Ethnopharmacol 1987;211:45.
- 9 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998:235.
- 10 江苏新医学院编.中药大辞典.上海:上海人民出版社,1977:2252,2268,211,2568,1125.
- 11 李青南.淫羊藿提取液对去睾丸大鼠骨代谢的影响.中草药 1993;24(12):637.
- 12 刘春福.淫羊藿多糖对羟基脲所致小鼠“阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率的影响.中国中药杂志 1991;16(10):620.
- 13 高子范.淫羊藿注射液对试管内鸡胚股骨生长的促进作用.中西医结合杂志 1985;5(3):172.

(收稿 2002-04-08 修回 2003-04-15)