

· 实验研究 ·

补肾宁心方对小鼠成骨细胞的增殖和抗凋亡作用

王玉东 李大金 朱 影

摘要 目的 探讨补肾宁心方促进成骨细胞增殖和抗凋亡作用。方法 建立 BALB/c 小鼠绝经后骨质疏松模型,给予中药补肾宁心方浓缩液(简称中药组)灌服 12 周,灌服雌激素为阳性对照组(简称 E₂ 组),灌服生理盐水为阴性对照组(简称对照组)。12 周末处死各组动物取颅骨,以植块法培养成骨细胞,MTT 法测其增殖能力,取股骨,以透射电镜观察其细胞器的变化,取药物血清体外观察其抗成骨细胞凋亡作用。结果 中药组和 E₂ 组细胞器丰富,高尔基体发达,胶原纤维致密;中药组比对照组来源的成骨细胞具有更强的增殖能力($P < 0.05$);10%~20% 的中药药物血清在体外能有效抑制成骨细胞的凋亡。结论 中药补肾宁心方具有促成骨细胞增殖和抗凋亡作用。

关键词 补肾宁心方;成骨细胞;增殖;凋亡

Effect of Bushen Ningxin Decoction on Proliferation and Apoptosis of Murine Osteoblast WANG Yu-dong, LI Da-jin, ZHU Ying *Laboratory of Reproductive Immunology, Institute of Obstetrics & Gynecology, Fudan University, Shanghai (200011)*

Objective To investigate the effect of Bushen Ningxin decoction (BSNXXD) on postmenopausal osteoporosis. **Methods** Postmenopausal osteoporosis model of female BALB/c mice were founded and afforded with BSNXXD. The experiment was ceased, and the skeleton and blood of mice in each group were collected following 12 weeks of the treatment. Change of osteoblastic organelle in right femur was observed by transmission electron microscope (TEM). Osteoblasts from calvaria of different groups were isolated and cultured by the tissue fragment migrating growth method and the proliferation ratio of osteoblasts in the second passage was examined with thiazolyl blue reagents when cultured for 1 day and 5 days, respectively. **Results** TEM showed that the osteoblasts of the animal treated by BSNXXD had more cell organelles and developed Golgi complex, whose ability of proliferation ($P < 0.05$) and anti-apoptosis is stronger than that of OVX group. **Conclusion** BSNXXD can accelerate the proliferation and inhibit the apoptosis of osteoblasts, the effective concentration of pharmacological serum varies from 10% to 20%.

Key words Bushen Ningxin decoction; osteoblasts; proliferation; apoptosis

最近国际妇女健康协会(WHI)的研究项目得出令人吃惊的结果:大样本的流行病学研究证明激素替代治疗(hormone replacement therapy, HRT)增加了受试妇女心血管疾病、中风、子宫内膜癌及乳腺癌的发病率^[1]。目前应用的其他经典抗骨质疏松药物,如降钙素、二磷酸盐等多为抑制破骨细胞(osteoclast, OC)活性的药物,缺乏刺激成骨细胞(osteoblast, OB)活性或既刺激成骨又抑制破骨的药物。因此,在深入研究和

发掘化学合成药物的同时,更应注重天然植物化合物的开发研究^[2]。本研究通过观察中药复方补肾宁心方对 OB 增殖和抗凋亡作用,以探讨该方治疗绝经后骨质疏松的作用机制。

材料与方法

1 主要药品及试剂 补肾宁心方(由仙灵脾、补骨脂、菟丝子、枸杞子、生地、酸枣仁、知母、黄柏、泽泻、石菖蒲、甘草组成,制成浓缩液,每毫升含生药 2g,上海顺天堂国药店提供)。17 β -雌二醇(17 β -estradiol, Sigma 产品)配成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的液体。十二烷基硫酸钠(SDS, Serva 产品),新生胎牛血清(GIBCOL 产品),四甲基偶氮唑盐(MTT),胰蛋白酶、胶原

基金项目:上海市科技攻关项目(No. 004019061)

作者单位:复旦大学附属妇产科研究所生殖免疫室(上海 200011)

通讯作者:李大金, Tel: 021-63770161-386, E-mail: dali@shmu.

万方数据

酶、MEM 培养基、etoposide(鬼臼乙叉甙)均为 Sigma 产品。碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒、台盼蓝为 SABC 产品。

2 实验方法

2.1 动物实验及分组 8~9 月龄 BALB/c 小鼠 (中国科学院动物中心提供 ,合格证号 003)用 1mg/ml 氯胺酮腹腔注射麻醉 (100mg/kg) ,从背部切除双侧卵巢 ,随机分为 3 组 (每组 10 只) ,7 天后分别灌服 17β-雌二醇 E₂ 组) 补肾宁心方浓缩液 (中药组) 和生理盐水 (对照组) 。同时设假手术组 (手术过程相同 ,但不切除卵巢) 。灌药 8 周时 ,各组同时随机取 2 只小鼠的腰椎和股骨 ,以病理形态学确定骨质疏松模型的建立 ,排除手术的影响 ;3 个月后 ,颈椎脱臼法处死小鼠 ,心脏取血得血清 ,存于 -20℃ 待用 ;取头盖骨置 PBS 中作细胞培养用。

2.2 透射电镜观察 每组取 2 只动物的右股骨 , 2.5% 戊二醛 (V/V) 固定并脱钙后 ,送交复旦大学上海医学院电镜室 ,行常规超薄切片、电镜观察。

2.3 培养成骨细胞和增殖能力分析 采用植块法 ,参照文献^[3,4]方法分离和培养成骨细胞 :在 PBS 中 ,迅速将头盖骨去除骨膜、血管及结缔组织 ,PBS 洗涤 2~3 次。将骨组织剪碎为 1mm×1mm 大小 ,PBS 进一步冲洗至骨片发白后浸入 MEM (含 20% FBS , 100 IU/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素 ,pH 7.2) 中 ,均匀接种于 25cm² Costar 培养瓶 ,翻转培养瓶 ,在 5% CO₂ 37℃ 孵育箱培养 6h 后 ,正转培养瓶 ,静置培养 12 天后换液 ,每周 2 次 ,3 周后用 0.25% 胰蛋白酶消化 ,原瓶内接种 (此为传一代细胞) 。继续培养 1 周左右再用胰蛋白酶消化、计数 ,接种于玻片 ,ALP 法鉴定成骨细胞 ,接种于 96 孔板后 ,MTT 法分别测定培养 1、5 天的样本 ,在分光光度计 570nm 处测 OD 值 (OD 值在已描绘的线性范围内 ,排除细胞死亡或污染孔) 。

2.4 成骨细胞培养和抗凋亡测定 采用酶解法 ,取新生 3~5 天 BALB/c 小鼠的颅骨 ,按文献^[4]方法培养并鉴定。传一代成骨细胞用 MEM 培养液 (含 0.5% FBS) 培养 2h 后 ,先给予不同浓度的药物血清 (同浓度的空白血清做对照) 培养 1h ,再加 etoposide ,使其终浓度为 50μmol/L ,处理 6h ,0.25% 的胰蛋白酶消化 ,重悬于含血清的 MEM 中 ,800r/min 离心 6min ,弃上清 ,于细胞沉淀中加 0.04% 的台盼蓝 (PBS 稀释) ,5min 内用计数板计数细胞质、核均染色的凋亡细胞。随机选取 3 个视野 ,每视野至少计数 200~400 个细胞以计算百分比^[5]。etoposide 致凋亡的计算公式如下 (%DCe + 5%DCv) / (%DCe - %DCv) ,DC 为死

亡细胞 ;e :etoposide ;s :含激素/血清的培养液 ;v :含乙醚 (同浓度的空白血清) 的培养液。

3 统计学方法 将数据输入 SPSS11.0 进行 t 检验 (成骨细胞生长至汇合时的细胞数及其增殖能力) 和方差分析 (药物血清抗成骨细胞凋亡) 。

结 果

1 补肾宁心方抑制 OB 凋亡的作用 补肾宁心方的药物血清在 10%~20% (P<0.05 或 P<0.01) 浓度范围内有明显的抗 OB 凋亡作用 (见图 1) 。

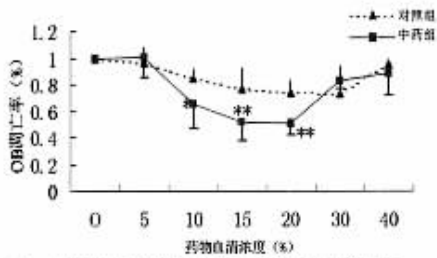


图 1 补肾宁心方药物血清抗 OB 凋亡的作用 (x±s, n=8)
注 :与对照组比较 , * P<0.05 , ** P<0.01

2 补肾宁心方对成骨细胞增殖能力的影响 颅骨来源的 OB 于培养第 2 天 (图 2A) 和第 5 天 (图 2B) 后 ,ALP 显色鉴定 (50×) ,纯度在 90% 以上。中药组细胞自骨片爬出的时间为 5~7 天 ,传一代成骨细胞生长至汇合时的细胞数增加 ,细胞的增殖能力较强 ;E₂ 组与对照组细胞自骨片爬出的时间均为 6~9 天 ,汇合时的细胞数目和增殖能力无明显差异 (见表 1 ,注 :同批处理的 3 个样本因污染放弃) 。

表 1 一代成骨细胞生长至汇合时的细胞数及增殖能力 (x±s)

组别	n	细胞数 (×10 ⁴ / 瓶)	OD 值
对照	7	52.43 ± 11.94	2.12 ± 0.14
中药	7	70.43 ± 17.47 *	2.35 ± 0.18 *
E ₂	7	60.00 ± 16.52	2.19 ± 0.13

注 :与对照组比较 , * P<0.05

3 补肾宁心方对细胞器的影响 透射电镜下 (800×) :中药组 (图 3B) 与 E₂ 组 (图 3C) 都显示 OB 的细胞质内含丰富的线粒体及大量分泌小泡 ,粗面内质网扩张 ,核膜清晰 ,核质均匀 ,无糖原颗粒堆积 ,未见残体 ,而对照组 (图 3A) 胶原纤维排列紊乱 ,线粒体、高尔基体等细胞器明显减少 ,可见残体。

讨 论

OB 能产生护骨素 (osteoprotegerin , OPG) ,通过结合 NF-κB 受体激动子的配体 (receptor activator of

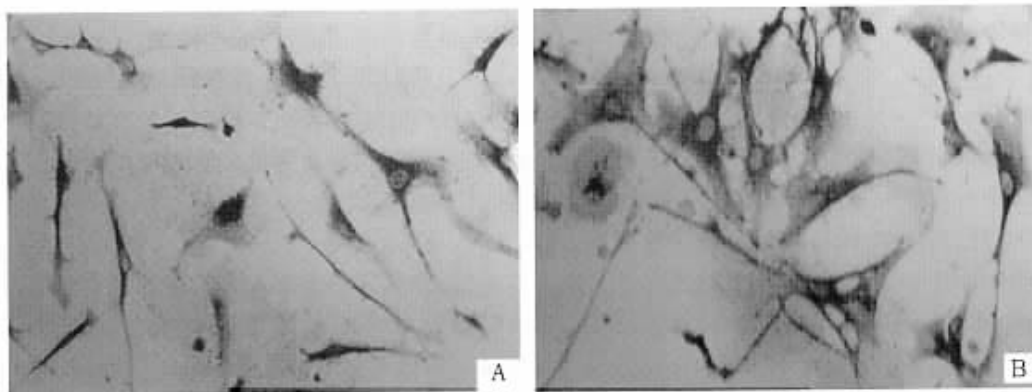


图 2 原代培养 OB 的 ALP 鉴定(50×)

注:A:颅骨来源的 OB 种植第 2 天;B:颅骨来源的 OB 种植第 5 天

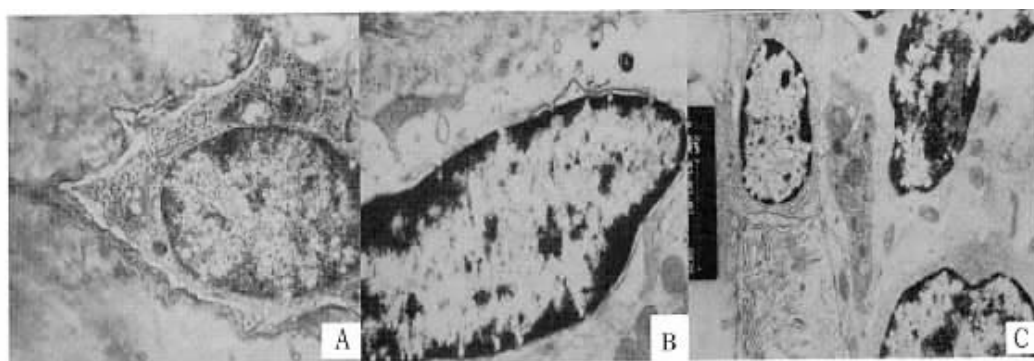


图 3 各组小鼠股骨透射电镜比较(800×)

注:A:对照组来源的 OB;B:中药组来源的 OB;C:E₂组来源的 OB

NF- κ B ligand, RANKL), 阻断后者与 NF- κ B 受体激动子(receptor activator of NF- κ B, RANK)的结合,从而有效地抑制 RANKL-RANK 介导的 OC 分化成熟,实现对 OC 功能的抑制,以及调控骨量的作用。许多调控 OC 分化的信号都是间接地控制成骨细胞 RANKL 或其 OPG 产物来实现的^[6]。因此,在 OB 与 OC 平衡失调致骨质疏松过程中,OB 起着更为重要的作用。原代培养的 OB 增殖较慢,细胞得率低,实验周期较长,使其应用受到限制。但由于原代培养的 OB 离体时间短,损伤少,形态与功能更接近正常生理情况,更能反映活体骨组织的生理状态,这是其他方法无法比拟的。本研究通过体内用药,体外观察药物对 OB 增殖及其细胞器的影响,以及药物血清体外抗 OB 凋亡作用,以了解补肾宁心方治疗绝经后骨质疏松的作用机制。

在相差倒置显微镜下,可见中药组比阴性对照组来源的 OB 较早爬出骨片,生长至融合所需要的时间较短。MTT 是线粒体脱氢酶的反应底物,接受呼吸链的电子还原为不溶于水的蓝紫色甲,其生成量与细胞数目呈线性正相关,一定条件下 MTT 检测能准确、灵敏地反映对数生长期细胞的增殖情况。提示补肾宁

心方可使 OB 保持较高的增殖能力。对照组细胞体积大,胞体较薄,胞浆内黑色颗粒增多,并见空泡,透射电镜显示中药组 OB 的线粒体、高尔基体和内质网等细胞器丰富,糖原堆积少,细胞周围可见胶原纤维排列。提示中药组 OB 代谢较快,有较高的合成纤维功能,并对糖原利用较多。etoposide 又名鬼臼乙叉甙,原用于抗肿瘤治疗,是促细胞凋亡药物。我们用灌服中药后的小鼠血清(药物血清),体外观察到有明显的抗 etoposide 诱导凋亡的作用,其有效的药物血清浓度是 10%~20%,而中药的浓缩液无体外抗凋亡的作用(结果略)。说明该复方的药物血清活性成分不是药物的原有有效成分,而是药物作用于机体后产生的内生性有效成分。另外,虽然雌激素能有效地抑制 OB 的凋亡,但未见促 OB 增殖的作用。

目前美国已经将雌激素列为致癌药物。我们的结果也证实,雌激素虽能有效地预防绝经后骨密度的降低,但同时也明显地促进子宫增生,补肾宁心方能改善骨密度和骨的形态变化,而对子宫无或仅有轻微的增生作用(未发表资料)。以往的结果证实,补肾中药对雌激素水平无影响,却能提高脾脏中雌激素受体(ER α)的表达^[7]。那么中药作用于机体后产生的内生

性有效成分是否通过 ER 作用于 OB, 以及对 ER 亚型 (α 和 β) 的表达有无优势调节作用, ER 又是如何通过 OB 胞内的调控机制发挥作用, 是绝经后骨质疏松研究中亟待解决的问题^[8]。

参 考 文 献

- 1 Martin Enserink. The vanishing promises of hormone replacement. *Sci* 2002; 297: 325—326.
- 2 廖二元. 骨质疏松研究的现状与展望. *中华内分泌代谢杂志* 2002; 18(2): 87—89.
Liao EY. The progress of research on osteoporosis. *Chin J Endocrinol Metab* 2002; 18(2): 87—89.
- 3 Siggekow H, Rebenstorff K, Kurre W, et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 75: 22—35.
- 4 王洪复主编. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 54.
Wang HF, editor. The photograph of osteocyte and the technology of osteocyte culture in vitro. Shanghai: Shanghai Sci-

ence and Technology Publishing House 2001: 54.

- 5 Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001; 104(5): 719—730.
- 6 Tamara Alliston, Rik Derynck. Interfering with bone remodeling. *Nature* 2002; 416(18): 686—687.
- 7 王文君, 俞瑾, 李大金. 中药复方“更年春”对老年雌性大鼠脾细胞 ER 及 IL-2、TNF 活性的影响. *生殖与避孕* 1996; 16(4): 263—267.
Wang WJ, Yu J, Li DJ. The effect of Chinese recipe “Gengnian chun” on spleen cells of old age female rat for estrogen receptor and the activity of IL-2, TNF. *Reprod Contracept* 1996; 16(4): 263—267.
- 8 王玉东, 李大金. 绝经后骨质疏松症发生的分子机制. *中华老年医学杂志* 2003; 23(3): 187—188.
Wang YD, Li DJ. The molecular mechanism for the genesis of postmenopausal osteoporosis. *Chin J Geriatr* 2003; 22(3): 187—188.

(收稿 2003-07-20 修回 2004-01-08)

第五次全国中西医结合中青年学术研讨会征文通知

培养和造就中医、中西医结合科技人才, 促进优秀青年科技人员成长是关系到我国中西医结合事业长远发展的重大战略任务。为此中国中西医结合学会青年工作委员会定于 2004 年 7 月中旬在贵阳举办第五次全国中西医结合中青年学术研讨会暨青年工作委员会工作会议, 会议将安排特邀报告、大会报告和专题讨论, 并进行优秀论文评奖。现将会议征文有关事宜通知如下:

1 征文内容 (1) 中西医结合理论研究 (2) 中西医结合临床研究及进展 (3) 中西医结合基础及实验研究; (4) 中西医结合临床、基础研究思路与方法 (5) 中药新药研究与开发 (6) 其他与中西医结合相关内容 (7) 全国中西医结合临床与药学研究学术研讨会征文仍然有效, 并继续征文。

2 征文要求 (1) 来稿请寄全文(3 000 字以内)和摘要(800~1 000 字)各 1 份。摘要应包括“目的、方法、结果、结论”4 部分, 如属于综述、总结报告、理论探讨等方面的文章, 其摘要应将主要内容表达清楚。无摘要的论文恕不受理。(2) 来稿请打印, 并附软盘。如手抄, 须字迹工整。稿件须加盖单位公章。并请自留底稿, 会议征文不退稿。(3) 来稿務必注明作者姓名、单位、邮政编码, 如属国家或省部级课题者请注明。(4) 来稿请寄 北京市海淀区西苑医院宋军收, 邮政编码: 100091, 信封请注明“中青年学术会议征文”; 也可发送电子邮件; E-mail: jun-song86@sohu.com

3 截稿日期 2004 年 5 月 30 日(以邮戳为准)。

本次会议可授予国家级继续教育学分, 会议具体时间及地点另行通知。