

· 博士之窗 ·

补肾活血方对大鼠成骨细胞增殖、分化及矿化的影响

臧洪敏¹ 陈君长¹ 刘亦恒¹ 刘润侠² 王坤正¹

摘要 目的 观察中药补肾活血方对体外培养 SD 大鼠成骨细胞增殖、分化及矿化的影响。方法 取新生的 SD 大鼠的颅骨,胶原酶法培养成骨细胞。应用 MTT 法,对硝基苯磷酸盐法(PNPP)及茜素红染色方法观察不同浓度补肾活血方对体外培养成骨细胞在 24、48、72h 不同时段增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性及矿化结节形成的影响。结果 不同浓度的补肾活血方均可促进成骨细胞增殖率提高,以中、高浓度组的作用较为明显($P < 0.01$);不同浓度补肾活血方可使 ALP 活性增强($P < 0.01$);中、高浓度组补肾活血方矿化结节数量,显著多于对照组($P < 0.01$)。结论 补肾活血方具有促进成骨细胞的增殖、分化及矿化的作用。

关键词 补肾活血方;细胞培养;成骨细胞

Effects of Bushen Huoxue Recipe on Proliferation, Differentiation and Mineralization of Osteoblasts in Rats

ZANG Hong-min, CHEN Jun-chang, LIU Yi-heng, et al Department of Orthopedics, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710004)

Abstract Objective To observe the effects of Bushen Huoxue Recipe (BHR) on cell proliferation, differentiation, maturation and mineralization in osteoblasts of rats cultured *in vitro*. **Methods** Osteoblasts from cranium of newborn SD rats were cultured by collagenase method. MTT, PNPP and ARS were used to observe the proliferation, activity of alkaline phosphatase (ALP) and the formation of mineral node of cultured osteoblasts effected by different concentrations of BHR at different time points (24, 48, 72 hrs after medication). **Results** Different concentrations of BHR could enhance the cell proliferation rate and ALP activity, the effects of BHR in high and moderate concentration were more significant in enhancing the cell proliferation rate ($P < 0.01$). And the number of mineral node of cultured osteoblasts treated by high and moderate concentration BHR was much more than that of the untreated osteoblasts ($P < 0.01$). **Conclusion** BHR could promote the proliferation, differentiation, and mineralization of the osteoblasts.

Key words Bushen Huoxue Recipe; cell culture; osteoblasts

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是绝经后女性和老年人的常见病。补肾活血方作为较为有效治疗该病的中药方之一在临床应用收到了良好的效果,为了进一步阐明此药的作用机制,对体外培养的新生 SD 大鼠成骨细胞进行干预,从细胞水平观察补肾活血方对成骨细胞增殖、分化和矿化的影响,现报告如下。

材料和方法

1 动物 选用出生 24 h 内的 SD 雄性大鼠 2 只,体重不限,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

2 试剂及仪器 胎牛血清(杭州四季青公司产品),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司产品),RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司产品),胰酶及四甲基偶氮唑盐(MTT 试剂)和 I 型胶原酶(均为 Sigma 公司产品),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(北京中生公司提供)。

倒置显微镜(Olympus 公司),CO₂ 培养箱、细胞培养板(美国 Gibco 公司产品),723 型分光光度计、ELX808 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司产品)。

3 药物 补肾活血方由熟地 12 g 生黄芪 30 g 白芍 9 g 苍术 9 g 黄柏 15 g 肉苁蓉 12 g 薏苡仁 30 g 当归 12 g 秦艽 9 g 牛膝 15 g 甘草 6 g 三七 6 g 等组成(由西安交通大学第二医院中医科刘润侠主任医师提供并鉴定,中药房煎制)。各组方药物充分混合后,以 20 倍蒸馏水浸泡、煎煮 2 次,每次 2 h,过滤合并水提液,离心上清液浓缩;用 75% 乙醇沉淀 3

作者单位:1. 西安交通大学第二医院骨科(西安 710004);2. 西安交通大学第二医院中医科

通讯作者:臧洪敏, Tel: 13119130749, E-mail: zhm197@163.com

次,过滤回收乙醇;制成含生药 2g/ml 的药液,调 pH 至 7.0;加活性炭脱色 3 次;精滤药液,用 RPMI 1640 培养液稀释为 2 g/L 的贮备液,高压灭菌。根据实验要求以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液分别配成浓度为 20 mg/L (低浓度组)、40 mg/L (中浓度组)、80 mg/L (高浓度组) 的供试液及浓度为 0 (双蒸馏水对照组),4℃ 保存,备用。

4 方法

4.1 成骨细胞的分离与培养 参照文献^[1]的方法,取出生 24 h 内的 SD 大鼠 2 只(性别、体重不限,由西安交通大学医学院实验动物中心提供)的颅骨,彻底剥离骨膜等软组织,置入含 DMEM 培养液的培养皿中修剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的骨片。加入 0.1% I 型胶原酶在 37℃ 环境下振荡消化 50 min,再加入等体积的胎牛血清终止消化。收集消化液,在 4℃, 1 000 r/min 条件下离心 10 min 使细胞沉淀。沉淀细胞放置于含 15% 胎牛血清 DMEM 培养基和 PEST(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)的培养皿内。并以约(2~5)×10⁴/cm² 的密度接种于培养瓶中,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养。每 2~3 天换液一次。待细胞长满后进行传代,使用第 3 代细胞进行实验。倒置显微镜下观察细胞生长情况并行 ALP 染色(见图 1、2)。

4.2 细胞增殖功能测定 成骨细胞以每孔 6×10³ 个细胞的密度接种于 6 孔培养板中,每孔加入含 15% 胎牛血清的培养基,在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。24h 后分别换入不同浓度补肾活血方的 DMEM 培养基继续培养 24、48、72 h。采用 MTT 法^[2],于 570 nm 波长测光吸收值(A 值),在酶标仪上进行测试。

4.3 细胞分化功能测定(ALP 活性测定) 成骨细胞接种密度条件同上,加不同浓度补肾活血方的 DMEM 培养基培养 48、72、96h 后,细胞经 0.1% Triton X-100 溶解液破碎制成细胞悬液,以对硝基酚磷酸盐(p-nitrophenylpicolinate,PNPP)作底物,用分光光度计测定各组细胞溶液中的 ALP 活性(条件为 pH 10.5,37℃ 条件下,波长为 405 nm),再用考马斯亮蓝法^[2]测定蛋白质含量(mg/L),ALP 活性以 kU/g·pro 表示。

4.4 细胞矿化功能测定 以每孔 1×10⁴ 个将细胞加入 24 孔培养板,加入含 15% 胎牛血清的培养基培养。24 h 后换入含 50 μg/ml 维生素 C,1 mmol 的 L-β 甘油磷酸钠的不同浓度补肾活血方培养基。2 天换液 1 次。培养 14 天后用 95% 乙醇固定 10 min, 0.1% 茜素红溶液染色 30min。以橘红色结节边界清
万方数据

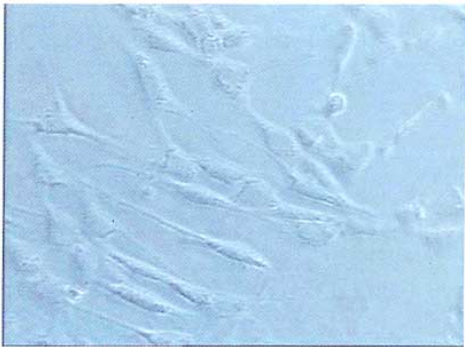


图 1 倒置显微镜下成骨细胞

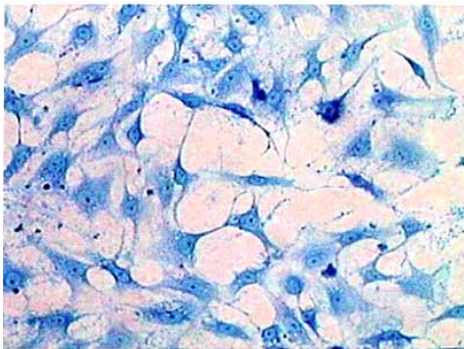


图 2 成骨细胞(ALP 染色, ×400)

晰,直径>200 μm 为矿化结节的计数标准^[3]。在低倍镜下对各孔作矿化结节计数(矿化结节结数/视野)。本实验采用双盲法。

4.5 统计学方法 用 SPSS 10.0 软件进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 不同浓度补肾活血方对成骨细胞增殖的影响 见表 1。在 24 h、48 h、72 h 时中浓度组、高浓度组的 A 值明显高于对照组(*P*<0.01)。低浓度组的 A 值在 72h 时明显高于对照组(*P*<0.05),在 24h、48h 时与对照组比较差异无显著性(*P*>0.05)。

表 1 不同浓度补肾活血方对成骨细胞增殖的影响 (A, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	光 吸 收 值		
		24h	48h	72h
对照	6	0.285±0.014	0.387±0.041	0.472±0.062
低浓度	6	0.317±0.016	0.412±0.027	0.547±0.021*
中浓度	6	0.476±0.048**	0.676±0.042**	0.828±0.067**
高浓度	6	0.629±0.037**	0.807±0.039**	0.919±0.086**

注:与对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01

2 不同浓度补肾活血方对 ALP 活性的影响 见表 2。中、高浓度组在 48 h、72 h、96 h 时及低浓度组在 72 h、96 h 时 ALP 活性水平高于对照组(*P*<0.01)。低浓度组在 48 h 时 ALP 活性水平与对照组

差异无显著性($P>0.05$)。

表 2 不同浓度补肾活血方对 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALP 活性(kU/g. pro)		
		48h	72h	96h
对照	6	0.235 $\pm$ 0.037	0.351 $\pm$ 0.072	0.421 $\pm$ 0.063
低浓度	6	0.279 $\pm$ 0.049	0.559 $\pm$ 0.064**	0.602 $\pm$ 0.068**
中浓度	6	0.647 $\pm$ 0.058**	0.746 $\pm$ 0.053**	0.782 $\pm$ 0.047**
高浓度	6	0.791 $\pm$ 0.072**	0.829 $\pm$ 0.071**	0.846 $\pm$ 0.091**

注:与对照组比较,** $P<0.01$

3 不同浓度补肾活血方对矿化结节数的影响
见表 3。中、高浓度组矿化结节数量(矿化结节数/视野)明显高于对照组($P<0.01$)。而低浓度组矿化结节数与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。

表 3 不同浓度补肾活血方对矿化结节数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	矿化结节数
对照	6	1.47 $\pm$ 0.41
低浓度	6	1.98 $\pm$ 0.73
中浓度	6	4.61 $\pm$ 0.57**
高浓度	6	6.25 $\pm$ 0.79**

注:与对照组比较,** $P<0.01$

讨 论

骨质疏松症是指单位体积骨量减少伴有骨强度的降低,主要与骨吸收和骨形成的动态平衡破坏有关。而骨形成和吸收主要由成骨细胞和破骨细胞来完成。骨细胞分泌骨基质(胶原和蛋白),并参与骨基质及钙的代谢,是骨形成、生长和发育主要的功能细胞。所以,促进成骨细胞的增殖在骨质疏松症防治中有重要意义。

实验结果显示,不同浓度的补肾活血方均可促进成骨细胞增殖率提高,而且使 ALP 活性增强,提示补肾活血方能促进成骨细胞分化。补肾活血方中、高浓度组矿化结节数量显著增高,提示其具有促进成骨细胞矿化结节形成的作用。碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,ALP 活性的高表达是成骨细胞分化的特异性标志^[4,5],是最常见评价骨形成的指标。成骨细胞是促进骨矿化的主要细胞,矿化是细胞进一步分化成熟的功能表现^[6],为骨形成的敏感标志。矿化结节形成代表了成骨细胞分化成熟,是成骨功能的形态表现。实验结果表明补肾活血方不仅有刺激成骨细胞增殖作用,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。

实验根据“肾主骨”、“肝肾同源”选用补肾活血方。方中熟地为补血要药,可补血活血。黄芪味甘,性温,万方数据

可补气升阳。王拥军^[7]等还发现黄芪中的多糖在体外对成骨细胞的增殖与分化也可能发挥着双向调节作用。现代药理学研究证实^[8],黄芪与当归有调节体液及细胞免疫作用。当归有行气活血,改善微循环作用,增强细胞对缺氧的耐受能力。牛膝可补血行血。肉苁蓉可补肾阳,益精血。薏苡仁、牛膝、黄柏、苍术可祛湿除痹。全方以活血祛瘀为主,又兼补益肝肾,是临床上有效治疗骨质疏松症的一种传统中药方。

实验在细胞水平观察了补肾活血方对成骨细胞的直接作用,说明其治疗骨质疏松的作用机制与其促进成骨细胞的增殖、分化及矿化的作用有关,为补肾活血方临床应用提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

- 王 前,钟世镇,龚文汇,等.鼠颅盖骨成骨细胞体外培养及 ALP 免疫组化法鉴别纯化.中华骨科杂志 1995;15(6):364—366.
Wang Q, Zhong SZ, Gong WH, et al. Culture and purification of osteoblastic cell derived from rat calvarial bone by ALP immunohistochemical technique. Chin J Orthop 1995;15(6):364—366.
- 张荣华,舒晓春.中药复方补肾活血液对成骨细胞影响的实验研究.中国病理生理杂志 2003;19(6):769—772.
Zhang RH, Shu XC. Effect of Chinese herbal recipe extract for replenishing kidney and activating blood circulation (CR KRABC) on osteoblast. Chin J Pathophysiol 2003;19(6):769—772.
- 金慰芳,朱文晋,王洪复,等.补肾中药 HU-ECS 对培养成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响.中国骨质疏松杂志 2001;7(8):9—11.
Jing WF, Zhu WQ, Wang HF, et al. Effect of HU-ECS on proliferation, differentiation and mineralization of cultured osteoblasts *in vitro*. Chin J Osteopor 2001;7(8):9—11.
- Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cell. Calcif Tissue Int 2001;68(1):43—52.
- Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. Biochem Biophys Res Commun 2003;311(1):179—186.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, et al. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 1986;38(3):143—154.
- 王拥军,宋莉君,孙爱贞,等.黄芪多糖的提取及对体外培养成骨细胞成骨能力的影响.中国中医骨伤科杂志 1999;7(6):1—4.
Wang YJ, Song LJ, Sun AZ, et al. The refine of APS and its effect on the osteogenic capacity of osteoblasts *in vitro*. Chin J Tradit Med Traum Orthop 1999;7(6):1—4.
- 王本祥主编.现代中药药理学.天津:天津科学技术出版社,1999:880—887.
Wang BX, editor. Modern pharmacology of traditional Chinese medicine. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1999:880—887.

(收稿:2005-04-20 修回:2005-08-25)