

· 基础研究 ·

淫羊藿苷对人成骨细胞增殖及 OPG 蛋白表达的实验研究

郭海玲, 赵咏芳, 王翔, 徐宇, 詹红生

(上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科, 上海 201203)

【摘要】目的:建立体外培养人成骨细胞系, 观察淫羊藿苷对人成骨细胞增殖的影响, 以及对人成骨细胞内骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)蛋白表达的影响, 探讨淫羊藿苷促进人成骨细胞骨形成的可能作用机制。**方法:**将手术中取得的人股骨头松质骨骨片, 使用酶消化法进行培养, 取生长良好的第 3 代人成骨细胞进行实验。实验分为 4 组, 对照组给予 15%NCS-DMEM-F12(1:1)培养液培养; 淫羊藿苷组分别于正常培养液内添加终浓度为 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/L 淫羊藿苷。噻唑蓝比色法(MTT)分别在培养 1、3、5、7、9 d 后观察各组人成骨细胞的增殖情况, 用蛋白免疫印迹方法(in-cell western blot)测定各组培养 8、10、12 d 后人成骨细胞内 OPG 蛋白的表达情况。采用重复测量的方差分析方法, 比较各组间在不同时间点的作用差异。**结果:**MTT 结果, 淫羊藿苷组具有促进人成骨细胞增殖的作用, 并呈明显的量效关系, 即随着淫羊藿苷浓度的增高, 其促人成骨细胞增殖的能力增强, 以 10^{-6} mol/L 淫羊藿苷组(0.402 ± 0.033)促成骨细胞增殖的作用最显著, 与对照组(0.268 ± 0.031)比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在时效关系的研究中, 随着培养天数的延长, 人成骨细胞的量逐渐增加, 人成骨细胞于第 5 天时进入快速生长期, 第 7 天进入平台期; 淫羊藿苷组从第 5 天开始促进人成骨细胞的增殖, 第 7、9 天仍然具有明显的促成骨细胞增殖的作用, 以第 9 天促增殖作用最强。其中, 第 9 天 10^{-6} mol/L 淫羊藿苷组(0.402 ± 0.033)与对照组(0.268 ± 0.031)比较有统计学意义($P < 0.01$)。OPG 表达结果, 对照组人成骨细胞培养至第 8 天时检测到 OPG 蛋白的表达, 表达量为 1.01 ± 0.08 , 第 12 天达到表达高峰为 1.80 ± 0.10 , 两个值比较有统计学差异($P < 0.05$); 在观察的不同天数内, 不同浓度的淫羊藿苷组人成骨细胞内 OPG 蛋白表达低于对照组, 且随着淫羊藿苷浓度的降低, OPG 蛋白的表达量逐渐降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 干预 12 d, 10^{-6} mol/L 淫羊藿苷组 OPG 量(1.67 ± 0.13)和 10^{-8} mol/L 淫羊藿苷组 OPG 量(1.64 ± 0.05)比较, 无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:**淫羊藿苷促人成骨细胞骨形成能力的作用途径之一, 是通过提高人成骨细胞的增殖能力而实现。

【关键词】 淫羊藿苷; 成骨细胞; 骨保护素

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.07.015

Experimental study on the mechanism of icariin improving human osteoblasts proliferation and the expression of OPG protein GUO Hai-ling, ZHAO Yong-fang, WANG Xiang, XU Yu, ZHAN Hong-sheng. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Objective: To establish the human osteoblasts culture system in vitro, observe the effects of icariin on human osteoblasts proliferation and expression of OPG protein, and to explore the mechanism of promoting bone formation about human osteoblast in icariin. **Methods:** The femoral cancellous bone pieces were obtained from the operation. The enzyme digestion method was used for culturing. The third passage of human osteoblast was taken for experiments. The cells were divided into four groups, the control group was treated with 15%NCS-DMEM-F12 (1:1), the experimental groups were respectively treated with 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} mol/L icariin. The MTT method was used to observe the proliferation of human osteoblast on 1, 3, 5, 7, 9 d; in 8, 10, 12 d, western blot was used to determine the expression of OPG protein on human osteoblast. **Results:** ① Results of MTT; the icariin promoted the proliferation of human osteoblast. There was a concentration-response relation, while with the concentration of icariin increased, the ability was more obvious. There was statistically difference between 10^{-6} mol/L icariin group (0.402 ± 0.033) and the control group (0.268 ± 0.031) ($P < 0.05$). In the timely research, as the time prolong, the number of human osteoblast were more. At the fifth day, the human osteoblast entered rapid growth period, and access the growth platform stage; the icariin began to promote the proliferation of human osteoblast from the fifth day, which almost maintained to the 7th day and the 9th day, and most obvious in the 9th day. There was statistically difference between 10^{-6} mol/L i-

基金项目: 1. “中医骨伤科学”国家和上海市重点学科建设项目(编号: 100508, T0303); 2. 国家自然科学基金项目(编号:

30371793, 30500674, 81073114, 81001527); 3. 上海市科委项目(编号: 08ZR1419400, 08411950300)

Fund programs: The National Natural Science Foundation of China (No. 30371793, 30500674, 81073114, 81001527)

通讯作者: 赵咏芳 Tel: 021-20256519 E-mail: zhao_dingding@126.com

icariin group (0.402 ± 0.033) and the control group (0.268 ± 0.031) at the 9th day. ②The results of OPG protein expression; in the control group, the expression of OPG protein was detected at the 8th day (1.01 ± 0.08), and reached the expression peak (1.80 ± 0.10), there was statistically different ($P < 0.05$). In the different days and different concentration icariin groups, the expressions of OPG protein were all inferior to the control group. While the concentration decreasing, the expression was less. There were statistically difference ($P < 0.05$). At the day 12, there was no significant difference of OPG protein expression between the 10^{-6} mol/L icariin group and the 10^{-8} mol/L icariin group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The effect of icariin promoting the proliferation of human osteoblast maybe is one of the mechanisms of improving the bone formation on human osteoblast.

KEYWORDS Icariin; Osteoblasts; Osteoprotegerin(OPG)

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(7):585-588 www.zggszz.com

成骨细胞是承担骨重建的一类重要细胞,其功能的高低对维持正常的骨转换具有重要意义。老年性骨质疏松症的主要病理机制在于成骨细胞的骨形成能力低下,从而导致成骨细胞与破骨细胞之间的耦联失衡^[1]。选择以补肾壮骨为主要治则的中药来防治老年性骨质疏松症是当前中医药界普遍选择的方法,临床报道也证实这类中药具有不错的提高骨密度的疗效^[2-3]。在众多抗骨质疏松症的中药中,淫羊藿是目前使用频率最高的补肾中药之一,而淫羊藿苷是从淫羊藿内占主要成分的皂苷类物质中所提取的单体,因此我们选用淫羊藿苷为代表,采用细胞学的方法,来探讨淫羊藿促人成骨细胞骨形成能力的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品 DMEM 培养基(低糖)、F12 培养基、新生小牛血清均购自 Gibco 公司,胰蛋白酶,Ⅱ型胶原酶,MTT (sigma 公司),DMSO (Amresco 公司),Odyssey Goat anti mouse IRDye800C (批号: B70308-01)购自 LI-COR 公司,OPG 抗体(小鼠抗人)购自 Abcam 公司,Trion X-100 购自上海生工,淫羊藿苷购自中国药品生物制品检定所。

1.2 骨组织标本来源 收集骨组织标本(经患者同意,由主刀医师手术取材),病例为骨折后手术患者,均排除先天性疾病、内分泌代谢疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等疾病,取出的骨标本立即浸入 DMEM-F12 培养液中备用。

1.3 实验方法

1.3.1 人成骨细胞的分离与培养 清除骨表面附着的结缔组织,PBS 反复冲洗,用剪刀将骨组织剪碎至 1 mm^3 大小,PBS 冲洗至骨组织发白,将骨组织碎块转移至离心管中,加 0.25% 胰蛋白酶, 37°C , 消化 30 min; 弃胰蛋白酶,加入 0.1% Ⅱ型胶原酶, 37°C , 消化 1 h, 收集上清液,转移至另一离心管中, 1000 r/min 离心 10 min; 于含骨组织的离心管中再加入 0.1% Ⅱ型胶原酶, 37°C , 消化 1 h, 收集上清液,转移至离心管中,离心,收集细胞;加入 DMEM-F12 培养液(含 15%NCS),吸管反复吹打成细胞悬液,接

种于 25 cm^2 培养瓶中,第 2 天观察细胞贴壁及生长情况,换液,每 2~3 d 换液 1 次。

1.3.2 碱性磷酸酶染色鉴定人成骨细胞 取生长良好的第 3 代人成骨细胞, 2×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板中,每孔 1 ml,待细胞贴壁后(24 h)吸弃孔内培养液,按照碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行人成骨细胞染色鉴定(GENMED)。

1.4 实验分组与给药 实验分 4 组:对照组,用完全培养液(15%NCS-DMEM-F12)培养;淫羊藿苷组,完全培养液加淫羊藿苷标准品,按分子量计算,分别制备终浓度为 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 的淫羊藿苷。人成骨细胞的培养条件除淫羊藿苷浓度外,均为含体积分数为 15%小牛血清的 DMEM-F12 培养液。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 细胞增殖检测 噻唑蓝比色(MTT)法,按照实验分组检测对照组和淫羊藿苷组的细胞增殖。取生长良好的第 3 代人成骨细胞,以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl ,待细胞贴壁后吸弃培养液,按实验分组分别加入不同的培养基 200 μl ,各组培养基均为 2 d 换液 1 次。于第 1、3、5、7、9 天用 MTT 法检测各组细胞增殖情况。MTT 法具体步骤: PBS 清洗细胞,在所需检测的培养孔每孔加入 100 μl 无血清 DMEM-F12 培养液,再加入 20 μl /孔 MTT (5 mg/ml), 37°C , 5% CO_2 浓度及饱和湿度的培养箱内孵育 4 h,小心吸弃孔内 MTT 培养上清液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO),振荡 15 min,在酶标仪中 490 nm,读取各孔吸光度 A 值。

1.5.2 骨保护素(OPG)蛋白含量的测定 取生长良好的第 3 代人成骨细胞,以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl ,待细胞贴壁后吸弃培养液,按照实验分组给予药物干预,每孔 200 μl 。药物干预 12 d 后,运用蛋白免疫印迹法(in cell western blot)测定 OPG 蛋白含量,红外激光成像系统扫描,测定 OD 值。

1.6 统计学方法 SPSS13.0 统计分析软件,计算各组数据的均值和标准差,重复测量的方差分析比较各组间差异,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 人成骨细胞碱性磷酸酶染色 倒置相差显微镜下观察,人成骨细胞呈三角形、多角形或不规则形,有长短不等的突起,细胞核呈椭圆形,有 1~2 个核仁,胞浆内可见黑色颗粒;细胞内见深褐色细胞核即为碱性磷酸酶染色阳性(见图 1)。

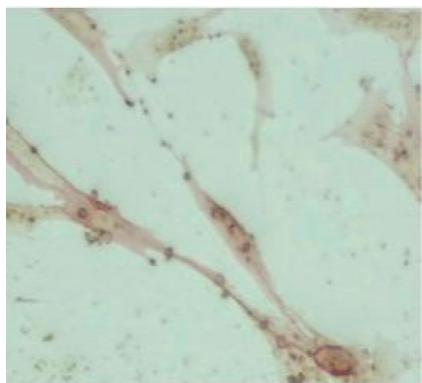


图 1 人成骨细胞 AKP 染色(光镜×200)

Fig.1 Alkaline phosphatase staining of human osteoblast ×200

2.2 人成骨细胞增殖检测结果 各组细胞干预后,分别于 1、3、5、7、9 d 检测人成骨细胞增殖情况,与正常对照组比较,淫羊藿苷对人成骨细胞的促增殖作用有浓度依赖性,随着淫羊藿苷浓度的降低,对人成骨细胞的促增殖作用逐渐减小(见表 1),采用重复测量的方差分析比较各组间差异,在 1、3、5 d 时各组之间比较无统计学意义($P>0.05$)。在 7 d 时,与对照组比较; 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.000$ 、 0.020 、 0.560 ; 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组与对照组比较无统计学差异。与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较; 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.007$ 、 0.015 。与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组进行比较; 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组 $P=0.150$, 两者无统计学差异。在 9 d 时与对照组比较; 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.000$ 、 0.077 、 0.340 ; 10^{-8} mol/ml 和 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组与对照组比较均无统计学差异。与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较; 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.000$ 、 $P=0.001$ 。

表 1 不同浓度的淫羊藿苷对人成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effects of different concentration of icariin on osteoblast proliferation ($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞增殖				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	0.092±0.005	0.142±0.011	0.166±0.008	0.263±0.019	0.268±0.031
10^{-6} mol/L 淫羊藿苷组	0.093±0.005	0.129±0.016	0.148±0.021	0.273±0.039*	0.402±0.033*
10^{-8} mol/L 淫羊藿苷组	0.100±0.006	0.143±0.020*	0.150±0.150	0.266±0.041	0.343±0.063**
10^{-10} mol/L 淫羊藿苷组	0.096±0.007	0.122±0.009*	0.148±0.011	0.248±0.021*	0.352±0.032**

注: *同一天与对照组比较, $P<0.05$; *同一天与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P<0.05$; *同一天与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P<0.05$

Note: * $P<0.05$, vs. the control group, at the same day; * $P<0.05$, vs. the 10^{-6} mol/L icariin group, at the same day; * $P<0.05$, vs. the 10^{-8} mol/L icariin group, at the same day

10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组比较,无统计学差异($P=0.725$)。

2.3 OPG 蛋白表达结果 各组细胞干预 8、10、12 d 后,淫羊藿苷组细胞内 OPG 蛋白表达较对照组明显下降,且随着淫羊藿苷浓度的减小 OPG 蛋白表达呈下降趋势(表 2)。采用重复测量方差分析方法比较各组间差异。在第 8 天时,与对照组比较; 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.008$ 、 0.001 、 0.000 ; 与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较; 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.141$ 、 $P=0.001$; 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较差异无统计学意义; 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P=0.000$ 。在第 10 天时,与对照组比较; 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.015$ 、 0.003 、 0.001 ; 与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较; 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.212$ 、 0.007 ; 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较,差异无统计学意义; 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P=0.013$ 。在第 12 天时,与对照组比较; 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组均为 $P=0.000$; 与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较; 10^{-8} 、 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组分别为 $P=0.034$ 、 0.000 ; 10^{-10} mol/ml 淫羊藿苷组与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P=0.000$ 。

表 2 淫羊藿苷对人成骨细胞内 OPG 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Effects of different concentration of icariin on expression of OPG protein in human osteoblast ($\bar{x}\pm s$)

组别	OPG 蛋白表达		
	8 d	10 d	12 d
对照组	1.01±0.08	1.37±0.19	1.80±0.10
10^{-6} mol/L 淫羊藿苷	0.83±0.08*	0.96±0.11*	1.67±0.13
10^{-8} mol/L 淫羊藿苷	0.78±0.05*	0.89±0.09*	1.64±0.05*
10^{-10} mol/L 淫羊藿苷	0.68±0.04**	0.80±0.12**	1.57±0.12**

注: *同一天与对照组比较, $P<0.05$; *同一天与 10^{-6} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P<0.05$; *同一天与 10^{-8} mol/ml 淫羊藿苷组比较, $P<0.05$

Note: * $P<0.05$, vs. the control group, at the same day; * $P<0.05$, vs. the 10^{-6} mol/L icariin group, at the same day; * $P<0.05$, vs. the 10^{-8} mol/L icariin group, at the same day

3 讨论

原发性骨质疏松症的主要发病机制在于骨吸收大于骨形成,成骨细胞在骨重建过程中起着主导作用。成骨细胞体外培养技术在骨代谢的研究中非常重要,不仅可为筛选骨代谢相关要药提供细胞模型,而且是研究骨代谢机制的重要手段之一。人成骨细胞体外培养技术起始于 20 世纪 80 年代初期^[4],随着培养技术的不断改进与成熟,对离体培养人成骨细胞的形态、功能与药物影响的研究也不断深入,近年来逐渐深入到蛋白分子水平的研究^[5]。人成骨细胞的主要来源为新生儿颅骨^[6]和成人松质骨^[7],由于新生儿颅骨标本的选取不符合伦理学的要求,因此我们选用骨折后的标本,且均经患者同意,签署知情同意书。同时,新生儿颅骨来源的成骨细胞具有较旺盛的增殖和分化能力,与骨质疏松症患者的骨形成能力差异较大,因此取材于成人松质骨的骨标本,用胰蛋白酶多次消化的方法所获取的人成骨细胞更接近骨质疏松症的成骨细胞功能状态,且数量较多,形态多样,生长稳定,有明显的成骨细胞特征,获得的研究结果可能更接近于临床。

淫羊藿的现代药学研究证明,其主要有效成分为淫羊藿皂苷类,占总成分的 65%~70%,同时还有淫羊藿总黄酮、及多糖。过去对淫羊藿的药理研究多集中在淫羊藿总黄酮上,而少见对淫羊藿皂苷成分的研究。因此,我们选用淫羊藿苷作为皂苷类成分的代表,观察其促人成骨细胞骨形成能力。细胞增殖能力中,我们观察到对照组人成骨细胞于第 5 天进入快速增殖期,随即很快就进入到生长平台期;而淫羊藿苷具有很强的促成骨细胞增殖的能力,并表现出明显的量效、时效关系曲线,在培养第 9 天时仍然处于快速增殖期。这一结果,与淫羊藿总黄酮的促成骨细胞增殖的报道一致。有文献报道^[7]淫羊藿总黄酮主要是通过增加 OPG mRNA 的表达来抑制破骨细胞的分化和成熟,从而达到其抑制骨吸收的目的。

OPG 是一类跨膜蛋白,主要是由成骨细胞系的各种细胞合成,并随细胞的分化而表达增加,它通过与相邻的破骨细胞内的 RANKL 结合,发挥抑制破骨细胞形成、分化、存活、活化并诱导破骨细胞凋亡的功能。因此,测定人成骨细胞内 OPG 蛋白的表达更接近体内的生理过程。我们的研究观察到,在培养 8, 10, 12 d 时,不同浓度淫羊藿苷组 OPG 蛋白的表达量均低于对照组,结合既往的报道,OPG 蛋白表达在分化期明显高于增殖期。人成骨细胞增殖率的实验中,已经发现对照组于培养 7 d 时就进入到分化期,而淫羊藿苷组在培养 9 d 时仍然处于快速增殖

期,这可能是对照组 OPG 蛋白表达高于淫羊藿苷组的原因。另外,高浓度淫羊藿苷组 OPG 的表达量仍然高于低浓度组,且随着培养天数的增加,OPG 蛋白表达量也逐渐增加,这也符合随着培养天数的延长,人成骨细胞逐渐进入分化期,细胞内 OPG 蛋白的表达量也逐渐增加,这可能是淫羊藿苷促人成骨细胞内 OPG 蛋白表达与促人成骨细胞增殖结果不一致性的关键原因。

总之,淫羊藿苷促人成骨细胞骨形成能力的作用途径之一,是通过提高人成骨细胞的增殖能力而实现。淫羊藿对人成骨细胞骨形成的促进作用研究,为临床骨质疏松症防治新药的开发提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 赵咏芳,詹红生,徐宇,等. 补肾益精中药调控体外培养成骨细胞 IGF-I 分泌与表达的研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40: 4-6. Zhao YF, Zhan HS, Xu Y, et al. Effects of kidney-nourishing and essence-enriching herbs on osteoblast IGF-1 secretion and expression in vitro[J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Za Zhi, 2006, 40: 4-6. Chinese.
- [2] 周敏,赵咏芳,郑昱新,等. 密骨胶囊对原发性骨质疏松症患者中医证候疗效的随机对照研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(9): 1210-1213. Zhou M, Zhao YF, Zheng YX, et al. Random controlled clinical trial on effects of Migu capsule in primary TCM syndrome of osteoporotic patients[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2009, 24(9): 1210-1213. Chinese.
- [3] Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture[J]. Calcif Tissue Int, 1985, 37(3): 228-235.
- [4] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, et al. Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shorting and replicative senescence in human osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(8): 1453-1464.
- [5] De Pollak C, Amaud E, Renler D, et al. Age-related changes in bone formation, osteoblastic cell proliferation and differentiation during postnatal osteogenesis in human calvaria[J]. J Cell Biochem, 1997, 64: 1282.
- [6] 张兴凯,杨庆铭,邓廉夫,等. 成人成骨细胞体外培养[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(1): 51-54. Zhang XK, Yang QM, Deng LF, et al. In vitro culture of human osteoblasts[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2000, 38(1): 51-54. Chinese.
- [7] 陈柏龄,谢登辉,王宗伟,等. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPG mRNA 表达的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 271-273. Chen BL, Xie DH, Wang ZW, et al. Effect of total flavone of epimedium on expression of bone OPG, OPGL mRNA in ovariectomized rats[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(4): 271-273. Chinese with English abstract.

(收稿日期: 2011-01-25 本文编辑: 王玉蔓)