

• 基础研究 •

蛇床子素对体外培养大鼠股骨组织吸收的抑制作用

周建¹,任雪梅²,马小妮¹,高玉海¹,闫丽娟¹,石文贵¹,陈克明¹

(1.中国人民解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所,甘肃 兰州 730050; 2.中国人民解放军兰州军区兰州总医院输血科,甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的:研究蛇床子素(Osthole, OS)对体外培养股骨组织(骨干和骨骺端)吸收活性的影响。方法:取(80±5)g 雄性 SD 大鼠 6 只,体外分离培养大鼠股骨组织的骨干和骨骺端,随机分为对照组、雌二醇组(estradiol, E)和蛇床子素处理组。同时在股骨组织分离培养 48 h 后采用终浓度为 1×10⁻⁵ mol/L 的蛇床子素和 1×10⁻⁸ mol/L 雌二醇对体外培养骨干和骨骺端进行处理;分别在药物处理后的第 3、6、9、12 天后测定抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, StrACP)活性、培养基中葡萄糖(Glucose, Glu)、乳酸(Lactic acid, La)的含量、Real-Time RT-PCR StrACP、集落刺激因子(Macrophage colony stimulating factor, MCSF)、组织激酶 K(Cathepsin K, CTSK)mRNA 的表达水平。**结果:**1×10⁻⁵ mol/L 蛇床子素组碱性磷酸酶(ALP)活性为 2226, 1×10⁻⁸ mol/L 雌二醇组 ALP 活性为 2498;与对照组比较 1×10⁻⁵ mol/L 蛇床子素和 1×10⁻⁸ mol/L 雌二醇组在加药处理后的第 6、9 和 12 天显著抑制 StrACP 酶活性 (P<0.05);1×10⁻⁵ mol/L 蛇床子素处理体外培养大鼠骨骺端和骨干组织的第 3、6、9 天后显著增加培养基中乳酸含量(P<0.05),并显著减少培养基中葡萄糖的含量(P<0.05)。与对照组比较,1×10⁻⁵ mol/L 的蛇床子素处理体外培养大鼠股骨组织后的第 6 和 9 天蛇床子素能显著抑制 StrACP, MCSF, CTSK mRNA 的表达水平(P<0.05)。**结论:**蛇床子素抑制体外培养大鼠股骨组织的骨骺端和骨干吸收活性同时可提高营养代谢水平。

【关键词】 蛇床子素; 股骨; 骨和骨组织; 抗酒石酸酸性磷酸酶

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.09.012

Inhibition of osthole for resorption of rats femur tissue in vitro ZHOU Jian, REN Xue-mei, MA Xiao-ni, GAO Yu-hai, YAN Li-juan, SHI Wen-gui, and CHEN Ke-ming*. *Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To investigate osthole effect on femoral tissue resorption activity of rat in vitro. **Methods:** Six SD rats weighted(80±5) g were used to isolate and culture femoral tissue (diaphyses and metaphysis) in vitro. The cultured tissue were divided into control group, estradiol group and osthole group. The femoral tissue was treated with final concentration of 1×10⁻⁵ mol/L osthole and 1×10⁻⁸ mol/L estradiol culture in vitro at 48 hours after cultured. Tartrate-resistant acid phosphatase (StrACP) activity, glucose and Lactic acid content, StrACP, MCSF (Macrophage colony stimulating factor) and CTSK (Cathepsin K) mRNA was detected by Real-Time RT-PCR were detected. **Results:** Concentration of Alkaline phosphatase activity were 2226 and 2498 in 1×10⁻⁵ mol/L osthole and 1×10⁻⁸ mol/L estradiol respectively. As compared with control group, the activity of StrACP of 1×10⁻⁵ mol/L osthole and 1×10⁻⁸ mol/L estradiol were inhibited at 6, 9, 12 days (P<0.05); under treatment of in 1×10⁻⁵ mol/L osthole, the content of Lactic acid were increased and the content of glucose were decreased at 3, 6, 9 days (P<0.05); StrACP, MCSF and CTSK mRNA expression level were inhibited at 6, 9 days (P<0.05). **Conclusion:** Osthole can inhibit bone resorption and raise the level of nutrition metabolism of femurs tissue.

KEYWORDS Osthole; Femur; Bone and bones; Tartrate-resistant acid phosphatase

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(9): 832-837 www.zggszz.com

骨质疏松是一种全身性系统性的骨骼疾病,发病机制是因为骨骼代谢失衡,正常骨代谢周期中,破

骨细胞(octoclast, OC)的骨吸收与成骨细胞(osteoblast, OB)的骨形成维持一种动态平衡^[1],当骨吸收大于骨形成时骨骼代谢减慢导致骨质疏松^[2]。随着我国人口老龄化的到来,骨质疏松预防和治疗的药物研究已经成为骨代谢调节研究的一个热点,有实验报道蛇床子素能促进体外培养骨髓间充质细胞成骨性分化和成骨细胞成熟钙化^[3-4],但是有关

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270963)

Fund program: National Nature Science Foundation of China (No. 81270963)

通讯作者:陈克明 E-mail:chkeming@yahoo.com.cn

Corresponding author: CHEN Ke-ming E-mail:chkeming@yahoo.com.cn

蛇床子素对股骨组织吸收尚未见报道,因此本实验建立体外股骨组织培养模型,观察了蛇床子素对体外培养的大鼠股骨组织代谢活性和骨吸收的影响,有望为蛇床子素治疗骨质疏松的药理学临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

SPF 级 SD 雄性大鼠 36 只,体重(80±5) g (甘肃省中医学院动物实验中心,合格证号 SCXK (甘) 2004-0006-152)。胎牛血清 (兰州民海生物公司); DMEM 培养基、II 型胶原酶 (Gibco 公司, 美国); RNAiso Reagent kit、Prime Script™ SYBR Premix Ex Taq™ II PCR 扩增试剂盒 (大连宝生物公司); 青霉素、链霉素、胰蛋白酶 (Sigma 公司, 美国); BCA 蛋白定量试剂盒 (武汉博士德); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (南京建成); 葡萄糖测定试剂盒 (南京建成); 蛇床子素和雌二醇为中国药品生物制品检定所提供的对照品 (纯度>99%); 其余试剂均为分析纯。

1.2 体外培养大鼠股骨组织

取雄性大鼠 6 只处死后放入 75% 乙醇浸泡 10 min, 取股骨, 去除肌肉、血管及结缔组织, 用无菌 PBS 冲洗骨髓腔后, 将骨骺端和骨干分开培养。将骨骺端和骨干剪成约 1 mm³ 大小的骨片, PBS 反复冲洗骨片, PBS 漂洗后, 随机取骨头片准确称量 0.3 g 骨头片后接种到 60 mm 的培养皿中, 用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM (含 4.5 g/L Glucose) 培养液 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 3 天换液 1 次^[5]。

1.3 ALP 酶活性法筛选最佳的蛇床子素和雌二醇浓度

在股骨组织培养的 48 h 后, 随机分为不同浓度 (1×10⁻⁴~1×10⁻⁸ mol/L) 的蛇床子素和雌二醇处理组, 每组 3 个重复, 处理后的第 9 天测定碱性磷酸酶活性, PBS 漂洗骨片, 匀浆股骨组织, 加入 1 ml 组织裂解液匀浆骨片, 匀浆后 1 000 r/min 离心 5 min 弃掉沉淀, Bradford 测定蛋白浓度, 操作按照说明书进行, 制作标准曲线, 计算样品中蛋白浓度, 然后分别测定各组 ALP 活性, ALP 活性测定按试剂盒说明书操作, 每组分别按缓冲液: 基质液=1:1 加入充分摇匀; 37 °C 水浴 15 min, 加入 3 倍于基质液显色液, 充分混匀显色, 测定 502 nm 处 A 值, 经过计算换算 ALP 活性。

1.4 实验分组

将接种有 0.3 g 骨组织的培养皿培养 48 h 后, 将含有 0.3 g 骨头片的培养皿随机 (培养皿编号后抓阄分组) 分为 3 组 (蛇床子素组、雌二醇组和对照组), 每组 3 个重复 (3 个培养皿), 分别用含浓度为

1×10⁻⁵ mol/L 蛇床子素^[3-4]、1×10⁻⁵ mol/L 雌二醇组阳性药物和加等体积的药物溶剂对体外培养大鼠股骨组织进行干预, 在干预后的 3、6、9、12 d 分别检测各项指标。

1.5 检测指标与项目

1.5.1 StrACP 酶活性测定 在蛇床子素和雌二醇处理培养后的第 3、6、9、12 天 PBS 漂洗骨片测定 StrACP 活性, 匀浆骨组织, 加入 1 ml 组织裂解液匀浆骨片, 匀浆后 1 000 r/min 离心 5 min 弃掉沉淀, Bradford 测定蛋白浓度, 操作按照说明书进行, 制作标准曲线, 计算样品中蛋白浓度, 然后分别测定各组 StrACP 活性, StrACP 活性测定按试剂盒说明书操作, 测定 490 nm 处 A 值, 经过计算换算 StrACP 活性 (U/gprot)^[6-7]。

1.5.2 标准曲线法测定培养中葡萄糖和乳酸含量 体外培养的骨片加蛇床子素后第 3、6、9、12 天换培养液时收集培养测定培养液中葡萄糖、乳酸的含量, 570 nm 测定 A 值。制作标准曲线, 依据标准曲线计算样本中葡萄糖、乳酸含量^[6-7]。

1.5.3 Real-time PCR 基因表达水平 Total RNA 提取: 骨组织在蛇床子素培养处理培养后的第 3、6、9、12 天后弃培养液, 无酶 PBS 漂洗 2 次, 加入 1 ml RNAiso Reagent Kit 裂解液匀浆骨组织, 收集匀浆液, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 200 μl 氯仿 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入等体积的异丙醇静置 15 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min 弃上清液, 75% 乙醇重悬浮沉淀 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后 -70 °C 保存, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 在 230、260、280、320 nm 测定 A 值, 调整 Total RNA 的浓度。

逆转录: 使用 Prime Script™ reagent Kit (TakaRa Code: DRR037A) 反转录试剂盒合成反转录出第 1 条 cDNA 链。反应体系: 5×Prime Script™ Buffer 4 μl, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.0 μl, Oligo dT Primer (50 μM) 1.0 μl, Random 6 Primer (100 μM) 1.0 μl, Total RNA 10 μl (1 000 ng) 补 RNase Free 水至 20 μl。37 °C 反应 15 min, 85 °C 5 s, -20 °C 保存。

引物设计: 根据实验要求, 在 genbank 查询所需要基因的目的序列 mRNA 序列, 引物均由宝生物 (大连) 公司根据序列设计并合成。StrACP: NM_019144.1 Forward 5' -GTGCATGACGCCAATGACCAAG-3' and Reverse 5' -TTTCCAGCCAG CACGTACCA-3' 产物长度 98 bp; MCSF: AF514357.1, Forward 5' -GCTGACTTGCTTGGGATG -3', Reverse 5' -CGTGATTTGGTTGCTCTGTTG -3' 产物长度 154 bp; CTSK NM_031560.2 Forward 5' -CGGC-

TATATGACCACTGCCTTC -3', Reverse 5' -TTTGC-CGT GCGTTATAC ATACA -3', 产物长度 114 bp; Gapdh: NM_017008.3 Forward 5' -GGCACAGTCAAG-GCTG AGAATG -3', Reverse 5' -ATG GTGGTGAA-GACGCCAGTA -3', 产物长度 143 bp。

PCR 反应体系为 20 μ l, 包括: SYBR Premix Ex Taq™ II (2 \times) 10 μ l; forward primer (10 μ mol/L) 0.8 μ l; Reverse primer (10 μ mol/L) 0.8 μ l; ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ l; cDNA Template 2 μ l; dH₂O 6 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 31 s, 进行 40 个循环, 每个循环收集荧光信号。随后缓慢升温, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 温度变化速度为 0.1 $^{\circ}$ C/s, 绘制 PCR 产物的溶解曲线, 了解扩增的特异性。

Real-Time RT-PCR 数据分析处理采用 $\Delta\Delta C_t$ 处理数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示数据的结果, 方法见文献^[8]。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。数据采用单因素方差分析, 组间的多重比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素和雌二醇的最佳浓度筛选结果

碱性磷酸酶为成骨活性的早期的标志性指标, 因此实验以碱性磷酸酶活性筛选指标筛选最佳的药物浓度活性, 表 1 为蛇床子素和雌二醇对体外培养

大鼠股骨组织 ALP 活性的影响, 以筛选出最佳的药物浓度为: 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素和 1×10^{-8} mol/L 雌二醇的 ALP 活性最高。

表 1 不同浓度蛇床子素和雌二醇对体外培养大鼠股骨组织 ALP 活性的影响 (nmol phenol/15 min/mg protein, $\bar{x}\pm s, n=3$)
Tab.1 Effect of different doses of osthole and estradiol on ALP activity of femoral tissue cultured in vitro (nmol phenol/15 min/mg protein, $\bar{x}\pm s, n=3$)

药物干预浓度	ALP 活性表达	
	蛇床子素	雌二醇
对照	1797 \pm 84	1799 \pm 69
1×10^{-4} mol/L	1606 \pm 91	1228 \pm 104
1×10^{-5} mol/L	2226 \pm 120	1569 \pm 101
1×10^{-6} mol/L	1913 \pm 68	1632 \pm 189
1×10^{-7} mol/L	1717 \pm 41	1984 \pm 159
1×10^{-8} mol/L	1422 \pm 82	2498 \pm 157

2.2 StrACP 活性检测结果

在 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素和 1×10^{-8} mol/L 雌二醇干预体外培养大鼠骨骺端第 9、12 天时, 蛇床子素组和雌二醇组 StrACP 活性低于对照组 ($P<0.05$); 而在干预第 6、9 天时, 蛇床子素组和雌二醇组骨干的 StrACP 活性低于对照组 ($P<0.05$), 见表 2。结果表明最佳浓度的蛇床子素和雌二醇能显著抑制 StrACP 活性水平。

表 2 蛇床子素和雌二醇对体外培养大鼠股骨组织 StrACP 活性的影响 (U/g prot, $\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.2 Effect of osthole and estradiol on StrACP activity of femoral tissue cultured in vitro (U/g prot, $\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	2.91 \pm 0.44	3.48 \pm 0.17	4.08 \pm 0.25	4.14 \pm 0.54	3.0235 \pm 0.371	3.437 \pm 0.21	5.256 \pm 0.331	4.8743 \pm 0.382
蛇床子素组	2.90 \pm 0.82*	2.98 \pm 0.26*	3.23 \pm 0.25*	3.48 \pm 0.39*	3.076 \pm 0.945*	2.986 \pm 0.673*	3.095 \pm 0.248*	3.6748 \pm 0.460#
雌二醇组	2.81 \pm 0.40#	2.78 \pm 0.27#	3.02 \pm 0.25#	3.378 \pm 0.12#	2.9176 \pm 0.270#	2.786 \pm 0.505#	2.961 \pm 0.483#	3.3748 \pm 0.426#
F 值	0.25	5.06	14.83	3.27	0.053	1.325	36.882	10.484
P 值	0.98	0.05	0.005	0.12	0.98	0.32	0.0006	0.01

注: * 与对照组相比, $P<0.05$; # 与对照组相比, $P<0.05$

Note: * compared with control group, $P<0.05$; # compared with control group, $P<0.05$

表 3 蛇床子素对大鼠股骨组织培养基中葡萄糖含量的影响 (mg glucose/g dry bone, $\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.3 Effect of osthole on Glucose content of femoral tissue cultured in vitro (mg glucose/g dry bone, $\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	1.91 \pm 0.38	2.70 \pm 0.12	2.72 \pm 0.14	3.08 \pm 0.67	2.74 \pm 0.184	1.80 \pm 0.14	2.23 \pm 0.38	2.78 \pm 0.20
蛇床子素组	1.36 \pm 0.18	1.19 \pm 0.14	1.73 \pm 0.21	2.88 \pm 0.43	1.17 \pm 0.09	1.18 \pm 0.17	1.65 \pm 0.17	2.68 \pm 0.35
<i>t</i> 值	1.754	12.304	5.648	0.335	10.049	26.109	4.978	0.780
P 值	0.221	0.007	0.03	0.77	0.01	0.001	0.38	0.32

表 4 蛇床子素对大鼠股骨组织培养基中乳酸含量的影响(mg lactic acid /g dry bone, $\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.4 Effect of osthole on lactic acid content of femoral tissue cultured in vitro(mg glucose /g dry bone, $\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	7.10±0.77	6.75±0.36	5.46±0.66	4.08±0.44	7.30±0.86	6.71±0.57	5.69±0.84	4.17±1.08
蛇床子素组	8.47±0.51	8.14±0.44	6.83±0.89	4.68±0.39	7.96±0.87	8.32±0.64	6.94±1.32	4.71±0.50
t 值	8.169	29.689	9.81	1.357	11.489	18.24	3.718	8.18
P 值	0.0146	0.001	0.01023	0.307	0.007	0.003	0.065	0.499

表 5 蛇床子素对大鼠股骨组织 StrACP mRNA 表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.5 Effect of osthole on StrACP mRNA expression of femoral tissue cultured in vitro($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	1.00±0.23	1.76±0.17	2.49±0.15	1.36±0.22	1.00±0.09	1.36±0.11	2.58±0.14	1.43±0.21
蛇床子素组	0.90±0.09	1.28±0.23	1.45±0.09	1.27±0.29	0.98±0.10	1.11±0.17	1.30±0.14	1.32±0.24
t 值	1.01	7.99	25.31	0.33	0.17	6.00	15.69	0.46
P 值	0.42	0.02	0.00	0.77	0.88	0.03	0.00	0.69

表 6 蛇床子素对大鼠股骨组织 MSCF mRNA 表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.6 Effect of osthole on MSCF mRNA expression of femoral tissue cultured in vitro($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	1.00±0.20	1.66±0.17	2.58±0.23	1.72±0.31	1.03±0.03	1.62±0.21	2.68±0.27	1.82±0.47
蛇床子素组	1.04±0.08	1.36±0.20	1.83±0.22	1.79±0.16	1.03±0.13	1.31±0.16	1.53±0.21	1.72±0.24
t 值	0.31	6.06	19.81	0.11	2.47	4.60	26.94	0.26
P 值	0.42	0.02	0.00	0.77	0.82	0.04	0.00	0.82

表 7 蛇床子素对大鼠股骨组织 CTSK mRNA 表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.7 Effect of osthole on CTSK mRNA expression of femoral tissue cultured in vitro($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨干				骨骺端			
	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d	培养 3 d	培养 6 d	培养 9 d	培养 12 d
对照组	1.00±0.12	1.62±0.19	2.40±0.32	1.71±0.19	1.04±0.14	2.39±0.24	2.58±0.14	1.77±0.15
蛇床子素组	1.02±0.14	1.33±0.17*	1.58±0.17*	1.72±0.23	1.03±0.16	1.36±0.16**	1.53±0.16**	1.78±0.19
t 值	0.33	5.67	9.83	0.06	0.62	24.37	28.22	1.64
P 值	0.78	0.03	0.01	0.96	0.96	0.00	0.00	0.24

2.3 葡萄糖、乳酸含量测定结果

结果见表 3-4。培养第 3 至 12 天,蛇床子素干预后培养液中葡萄糖含量呈升高趋势;蛇床子素处理体外培养大鼠骨骺端在蛇床子素处理第 3、6 天后培养基中葡萄糖含量低于对照组($P<0.01$);骨干在蛇床子素处理 6 d 后培养液中的葡萄糖含量低于对照组($P<0.01$),9 d 后葡萄糖含量仍低于对照组($P<0.05$)。股骨组织培养液中乳酸含量从第 3~12 天乳酸含量呈下降趋势;骨骺端在蛇床子素处理后的第 3、6 天后培养液中乳酸的含量低于对照组($P<0.01$);

骨干在蛇床子素处理后的第 3、6、9 天培养基中乳酸含量高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);蛇床子素能显著提高体外培养股骨组织营养代谢水平。

2.4 Real-time mRNA 检测

检测结果见表 5。药物处理后 StrACP mRNA 表达量得到明显调节,分别在蛇床子素分别在处理第 6、9 天,骨干和骨骺端 StrACP mRNA 的表达水平低于对照组($P<0.05$),表明蛇床子素对体外培养大鼠股骨组织具有一定抑制作用。

与对照组比较,在蛇床子素处理后第 6、9 天能

显著抑制骨干、骨骺端的 MSCF mRNA、CTSK mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。结果见表 6-7。

3 讨论

3.1 蛇床子素和雌二醇浓度筛选

蛇床子素是伞形科植物蛇床子的果实^[9]。研究^[3-4]发现蛇床子素对骨质疏松有明显的防治作用,能促进体外培养成骨细胞和骨髓间充质细胞成骨性分化,但是此前研究都是基于细胞水平的研究。本实验从组织水平研究蛇床子素对体外培养的大鼠股骨组织营养代谢水平和吸收活性的影响。雌二醇已经作为一种研究比较清楚的骨骼代谢的药物,因此实验应用雌二醇为阳性对照药物验证试验系统的可靠性,首先用不同浓度的雌二醇和蛇床子素,通过检测碱性磷酸酶活性确定药物作用于股骨组织的最佳药物浓度:蛇床子素 1×10^{-5} mol/L 和雌二醇 1×10^{-8} mol/L。使用最佳浓度的雌二醇处理股骨组织后测定抗酒石酸酸性磷酸酶活性,确保实验系统的准确性,再检测蛇床子素处理组 StrACP、MCSF、CTSK mRNA 表达水平以及培养液中葡萄糖和乳酸含量,检测蛇床子素对体外培养股骨组织营养代谢水平和骨吸收活性的影响。

3.2 StrACP 酶活性测定

抗酒石酸酸性磷酸酶被认为是破骨细胞活性的标志酶^[10],因此实验观察了雌二醇和蛇床子素对体外培养大鼠股骨组织中 StrACP 活性的影响,结果表明蛇床子素抑制 StrACP 活性,因此实验结果表明蛇床子素通过抑制破骨细胞的活性调节骨骼代谢,此实验是在组织水平检测了抗酒石酸酸性磷酸酶的活性,此结果更接近体内实验结果。

3.3 葡萄糖及乳酸含量的测定

葡萄糖为细胞或者组织代谢利用主要的能源物质,其代谢产物为乳酸,实验观测体外培养大鼠股骨组织培养液葡萄糖和乳酸含量,即可间接观测蛇床子素对体外培养大鼠股骨组织代谢水平的影响。实验结果显示蛇床子素能提高体外培养大鼠股骨组织的营养中的乳酸含量和减少葡萄糖含量,表明蛇床子素能提高体外培养大鼠股骨组织的葡萄糖利用速度和乳酸产量,可通过提高股骨组织的营养代谢水平来预防骨骼疾病的发生;实验结果还表明蛇床子素提高体外培养大鼠股骨组织葡萄糖利用速度和乳酸产量存在一定的时间效应。

3.4 骨吸收活性相关基因检测

实验进一步从基因水平研究了蛇床子素对 StrACP、MCSF 和 CTSK mRNA 表达水平影响,组织蛋白酶可使胶原降解变性导致骨骼结构发生变化^[11],MCSF 是细胞分泌的一种可溶性因子,可溶的

性细胞因子通过细胞与细胞的接触反应将信号传递至原始的破骨细胞,MCSF 增多促进破骨细胞分化成熟,增加骨吸收^[12],实验检测了 StrACP、MCSF 和 CTSK mRNA 的表达水平,以期从基因水平探究蛇床子素对体外培养股骨组织代谢的影响的基本作用机制,结果表明蛇床子素能抑制体外培养股骨组织 StrACP、MCSF 和 CTSK mRNA 表达水平,此实验结果为前期已有的报道结果蛇床子素能促进大鼠成骨细胞的矿化成熟结果^[13-14]在组织水平提供了一个可靠实验依据。基于前期的实验结果这可能是蛇床子素能有效抑制骨吸收,调节骨骼代谢机制之一,同时实验数据进一步证明蛇床子素调节体外培养大鼠股骨组织吸收活性存在一个时间效应。实验结果表明蛇床子素通过抑制破骨细胞活性相关的活性调节骨骼组织的代谢。

综上所述,实验建立了体外股骨组织培养模型,使用雌二醇作为阳性对照药物,确保实验模型的准确性,在组织水平研究了蛇床子素对体外培养大鼠股骨组织营养代谢水平和吸收活性的影响,结果表明蛇床子素能提高体外培养股骨组织营养代谢水平和抑制股骨组织的吸收活性,本实验数据结合已有的研究结果从骨吸收和骨营养代谢水平证明了蛇床子素具有调节骨骼代谢,同时在调节骨骼的过程中存在一定时间的依赖性,所以在后期的研究中应该准确把握时间依赖性的关键点,这可能是其治疗骨质疏松症的基础之一,因此本实验为骨质疏松治疗药物研究提供一个研究思路,此实验的机制和体内代谢活性有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张兵兵,潘君,邓小燕,等.破骨细胞骨吸收的分子机制[J].生物医学工程学杂志,2005,22(6):1283-1286.
Zhang BB, Pan J, Deng XY, et al. Osteoclastic bone resorption of the molecular mechanism[J]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2005, 22(6): 1283-1286. Chinese.
- [2] 余增丽,李文杰,张立实.金雀异黄酮对成人成骨细胞增殖及分化的影响[J].卫生研究,2004,33(5):569-571.
Yu ZL, Li WJ, Zhang LS. Genistein osteoblast proliferation and differentiation of human [J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2004, 33(5): 569-571. Chinese.
- [3] 明磊国,王鸣刚,陈克明,等.蛇床子素对体外培养成骨细胞成骨相关因子表达的影响[J].中药药理与临床,2011,27(2):53-57.
Ming LG, Wang MG, Chen KM, et al. Osthole on osteoblasts in vitro effects of expression of bone related factors[J]. Zhong Yao Yao Li Yu Lin Chuang, 2011, 27(2): 53-57. Chinese.
- [4] 明磊国,葛宝丰,陈克明,等.蛇床子素对体外培养骨髓基质干细胞增殖与成骨性分化的影响[J].中国药理学通报,2014,26(8):1098-1103.
Ming LG, Ge BF, Chen KM, et al. Effects of osthole culture proliferation of bone marrow stromal cells and osteogenic differentiation in

- vitro[J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao, 2014, 26(8): 1098-1103. Chinese.
- [5] Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, et al. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 303(1-2): 83-88.
- [6] Lai YL, Yamangwhi M. Phytocomponent p-hydroxycinnamic acid stimulates bone formation and inhibits bone resorption in rat femoral tissues in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 292: 45-52.
- [7] Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Stimulatory effect of zinc bone formation in tissue culture[J]. Biochem Pharmacol, 1987, 36: 4007-4012.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 DeltaC(T) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] 周则卫, 沈秀. 蛇床子素药理活性的研究概况[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(20): 1726-1730.
Zhou ZW, Shen X. Pharmacological activities of osthole[J]. Zhongguo Xin Yao Za Zhi, 2006, 15(20): 1726-1730. Chinese.
- [10] 万容, 李丽, 孔祥荣, 等. 不同治法方药对雌激素性股骨头坏死鸡股骨头 OPG, RANKL mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 149-152.
Wan R, Li L, Kong XR, et al. Different treatments on estrogen induced avascular necrosis of femoral head femoral head OPG, RANKL expression of chicken mRNA effect[J]. Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi, 2011, 17(8): 149-152. Chinese.
- [11] Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, et al. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteolytic activities[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(6): 504-513.
- [12] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts[J]. Science, 2000, 289(5484): 1504-1508.
- [13] Lyu X, Wang CY, Hou J, et al. Isolation and identification of metabolites of osthole in rats[J]. Xenobiotica, 2012, 42(11): 1120-1127.
- [14] Ming LG, Wang MG, Chen KM, et al. Effect of osthole on apoptosis and bone resorption of osteoclasts cultured in vitro[J]. Yao Xue Xue Bao, 2012, 47(2): 174-179.

(收稿日期: 2014-12-14 本文编辑: 李宜)

第 3 届奇正杯消痛贴膏临床应用论文征集

为促进民族医药发展, 弘扬藏医药文化, 探讨外用药治疗骨骼肌肉系统慢性疼痛相关疾病的临床疗效, 西藏奇正藏药营销有限公司继续举办第 3 届奇正杯奇正消痛贴膏临床应用论文有奖征文活动, 欢迎广大的临床医师踊跃投稿。

1 征文范围: 奇正消痛贴膏治疗腰肌劳损、落枕、肩周炎、风湿及类风湿性关节炎等骨骼肌肉系统慢性疼痛的临床疗效分析(单用/联合用药)、临床用药经验总结。

2 征文要求: (1) 论文未在公开出版的医学期刊上发表过; (2) 征文内容侧重于临床观察和研究, 必须设有对照组; (3) 征文格式要符合专业医学杂志约稿的要求; (4) 征文请注明第一作者姓名、单位、职称、地址、邮编、电子邮箱及联系电话。

3 征文截稿时间: 2015 年 11 月 30 日, 征文只接受电子邮箱投稿(Word 排版), 征文电子版发至邮箱: qzhxtt@163.com, 并注明“奇正消痛贴膏征文”字样。

4 征文评选: 本次征文活动由奇正藏药聘请专家评审委员会进行评审, 对论文进行严格、公正的评审。选取一等奖 1 名, 奖励 10 000 元研究基金; 二等奖 1 名, 奖励 8 000 元研究基金; 三等奖 1 名, 奖励 5 000 元研究基金; 优秀征文奖 20 名, 分别获得 2 000 元研究基金。未获奖论文第一作者均获赠精美礼品纪念品 1 份。论文通过审稿后将择优汇编成册并发表在骨科相关核心期刊上。