

· 基础研究 ·

补肾活血方对离体胎鼠颅骨成骨细胞增殖的影响

汤耿民¹ 沈霖² 肖明英¹

(1. 湖北省中医药研究院, 湖北 武汉 430074; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院)

【摘要】 目的 探讨补肾活血方对成骨细胞代谢的影响。方法 胎鼠颅骨成骨细胞培养于含有 0, 10, 100, 1 000, 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 5 种浓度的补肾活血方药液培养基中 72 h 后, 分别采用噻唑蓝比色法和胸腺嘧啶核苷渗入法检测成骨细胞增殖、分化情况, 并与具有促细胞增殖作用的成纤维细胞生长因子作对照。结果 补肾活血方药液以剂量依赖方式促进成骨细胞的增殖, 与对照组相比, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 药液即可促进成骨细胞增殖, 并在 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度时达到最大效应 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 补肾活血方具有促进骨形成作用。

【关键词】 成骨细胞; 动物, 实验; 中草药

Effects of Chinese medicine Bushenhuoxue on the proliferation of fetal rat calvarial osteoblast in vitro
TANG Gengmin, SHEN Lin, XIAO Mingying. Hubei Academy of Traditional Chinese Medicinal and Pharmacy, Hubei Wuhan, 430074, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Bushenhuoxue on osteoblastic cell metabolism **Methods** Fetal rat calvarial osteoblastic cell were cultured in the medium containing Bushenhuoxue with five different concentrations, 0, 10, 100, 1 000, and 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, and incubated for 72 hours. Calorimetric MMT, ^3H -thymidine incorporation were used to determine the condition of cell proliferation and differentiation in vitro. **Results** Bushenhuoxue with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ might promoted the proliferation of osteoblastic cells. Its effects was concentration-dependent. 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ may reach the highest effect. **Conclusion** Bushenhuoxue can promote the bone formation.

【Key words】 Osteoblasts; Animals, laboratory; Drugs, Chinese herbal

补肾活血方能刺激成骨细胞 $\text{TGF-}\beta_1$ 的分泌和合成, 有利于新骨生成^[1]。本研究以期在细胞水平探讨补肾活血方促进骨愈合的疗效机制。

1 材料与方法

1.1 实验药物和试剂 补肾活血方药液制备: 将补肾活血方药物^[1]加水煎 3 次, 过滤, 合并 3 次滤液, 加热浓缩至 2:1 (药材量: 药液量) 后, 加 95% 乙醇沉淀 3 次, 滤纸过滤并回收乙醇至尽, 配制成 2 g/ml 药液, 调 pH 至 7.0, 加 1% 活性炭脱色 3 次, 精滤, 分装, 灭菌, 密封备用。重组碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 为北京邦定公司产品; 噻唑蓝 (MTT) 为 Sigma 产品; $^3\text{HTdR}$ 购自中国原子能研究所; DMEM 培养液, 胎牛血清为

GIBCO 产品; OMSO 购自上海化学试剂厂; 其它均为市售分析纯。

1.2 成骨细胞的分离和培养 按同济医科大学协和医院骨科实验室法^[2], 将新生 SD 大鼠 (同济医科大学实验动物中心提供, 二级动物) 分离的颅骨成骨细胞种植在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 制成单细胞悬液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱内培养, 待细胞融合后, 消化传代。取二代培养的成骨细胞, 用含 10% 小牛血清培养液配制成 $2 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞悬液, 然后根据实验要求接种于 96 孔培养板之中, 放入 CO_2 培养箱内孵育 24 h 后, 培养细胞被分为 3 组, 分别加入同体积药液, 对照组仅加培养液, 补肾活血方组分别加入稀释为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 不同浓度的药液; 成纤维细胞生长因子组分别加入

基金项目: 1. 湖北省卫生科研基金资助项目 (W9721)

2. 湖北省自然科学基金资助项目 (99J136)

10 ng·ml⁻¹、50 ng·ml⁻¹、100 ng·ml⁻¹药液。同时各组再加入含 10% 小牛血清的培养液,继续培养。

1.3 成骨细胞增殖测定

1.3.1 MTT 比色分析法^[3] 接种在 96 孔培养板的细胞生长 72 h 后,于 1 000 r/min 离心 5 min。吸弃上清液,每孔加入 1 mg·ml⁻¹ MTT 100 μl,37 °C 孵育 2 h,细胞内出现深蓝色晶体后,终止培养,吸弃孔内上清液,每孔加入 100 μl DMSO,4 °C 冰箱内过夜,使细胞内结晶体完全溶解,直接于 DG3022 酶联免疫检测仪 570 nm 波长处比色,测定 OD 值。并计算抑制率:抑制率=[(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值]×100%。

1.3.2 ³H 胸腺嘧啶核苷(³H-TdR) 渗入法^[4] 96 孔培养板细胞生长 96 h 后,加入含水 1 μCi·ml⁻¹ ³H-TdR 的新鲜培养液,继续培养 6 h,终止反应,用 ZT-

Z 型自动细胞收集仪将细胞收集至 999 型玻璃纤维滤纸上,以蒸馏水充分洗涤,5% 三氯醋酸固定,干燥,放入 5 ml 闪烁瓶内闭光过夜,以液体闪烁计数器测量每孔每分钟计数(cpm)值。

本实验数据用均数±标准误($\bar{x} \pm S\bar{x}$)表示,显著性检验用 *t* 检验。

2 结果

MTT 比色及 ³H-TdR 测定结果显示,补肾活血方药液以剂量依赖方式促进成骨细胞的增殖,与对照组相比,100 μg·ml⁻¹ 药液即可促进成骨细胞增殖,并在 1 000 μg·ml⁻¹ 浓度时达到最大效应(*P*<0.05, *P*<0.01);当浓度大于 1 000 μg·ml⁻¹ 时,其作用趋于饱和。但补肾活血方对成骨细胞增殖的促进作用不及 bFGF,见表 1。

3 讨论

表 1 各组 MTT 和 ³HTdR 测定结果($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

组 别	药物浓度	n	MTT(OD)值	³ H-TdR(CPM)值
对照组(μg·ml ⁻¹)	0	6	0.2113±0.016	377.5 ± 31.4
补肾活血方组 (μg·ml ⁻¹)	10	6	0.2183±0.034	356.7 ± 4.6
	100	6	0.2214±0.043	490.5 ± 84.3*
	1 000	6	0.2367±0.034*	850.8 ± 96.4**
	5 000	6	0.2339±0.021*	834.5 ± 82.1**
bFGF 组(ng·ml ⁻¹)	10	6	0.2381±0.012*	984.1 ± 30.9**
	50	6	0.3482±0.016**	1063.8 ± 85.4***
	100	6	0.4021±0.014***	1181.3 ± 1075***

注:与对照组比较 **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.0001

成骨细胞是骨发生和形成的物质基础。本研究应用 MTT 比色分析和 ³H-TdR 渗入法观察了补肾活血方对体外培养成骨细胞增殖的影响。结果显示,外源性补肾活血方对成骨细胞的增殖有明显的促进作用,并且这种作用呈现剂量依赖性和可饱和性,这可能是该方能加快骨愈合过程的疗效机制之一。至于补肾活血方是通过何种途径影响成骨细胞的合成、分泌功能,达到促进成骨的目的,可能与补肾活血方可增加成骨细胞的表达有关。^[1]

本实验结果还提示,1 000 μg·ml⁻¹ 浓度补肾活血方药液对体外培养成骨细胞增殖的影响,与 10 ng·ml⁻¹ 浓度的阳性对照药 bFGF 无明显差异。bFGF 是一种内源性多肽生长因子,能够促进细胞有丝分裂。Jinggushi 等^[5]报道在骨折愈合初期的肉芽组织中即有 bFGF 表达,而且 bFGF 能够刺激骨折区毛细血管形成,骨痂增大和矿化。Wand 研究表明^[6]将一定剂量的 bFGF 与脱钙骨基质和 GA 等共同移

植,可明显地刺激植入体中新骨形成。由此提示,补肾活血方促进成骨增殖的机制可能与其可诱导成骨细胞 bFGF 的表达有关,有待进一步探讨。

参考文献

- 1 汤耿民,沈霖,涂意辉,等. 补肾活血方对成骨细胞生长因子 TGF-β₁mRNA 表达的影响. 中国中医骨伤科杂志,1999,7(5):11.
- 2 郭洪敏,杜靖远. 维生素 K₂ 对成骨细胞增殖和分化的影响. 中华老年医学杂志,1998,17(2):73.
- 3 Hansen M B. Re-examination and further development of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Method, 1989, 119:203.
- 4 李端玉. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京:人民卫生出版社,1988,31(4):251.
- 5 Jinggushi S, Scully SP, Tyce ME, et al. Transforming growth factor-beta I and fibroblast growth factors in rat growth plate. J Orthop Res, 1995, 13(5):761.
- 6 Wand JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. Acta Orthop Scand (Suppl), 1996, 269:1.

(收稿:2002-08-26 修回:2003-01-02 编辑:李为农)