·论著·

丹仙康骨胶囊对培养成骨细胞影响的观察

刘日光[1] ,沈冯君[2]
(1. 华中科技大学同济医学院协和医院骨科 ,湖北 武汉 430022 ; 2. 贵阳中医学院)

摘要 **目的**:为了解补肾活血中药丹仙康骨胶囊对体外培养成骨细胞的作用。**方法**:应用透射电镜、MTT、对硝基苯磷酸盐法(PNPP)及骨钙素(BGP)含量放免测定法 ,观察丹仙康骨胶囊对成骨细胞超微结构、增殖与分化作用的影响。**结果**:丹仙康骨胶囊刺激(20 mg/ ml)的成骨细胞 ,ALP 活性提高及骨钙素含量增多;透射电镜观察其细胞线粒体致密、游离核糖体增多、内质网丰富扩大增粗呈中等电子密度 ,而糖原溶解与脂肪空泡均较少。**结论**:丹仙康骨胶囊具有促进成骨细胞的代谢、增殖和分化的作用。

关键词 丹仙康骨胶囊; 成骨细胞; 细胞 ,培养的

Observation of the effects of Danxian Kanggu capsule on osteoblasts cultured in vitro *LIU Ri-guang , SHEN Feng-jun. Union Hospital , Tongji Medical College , Huazhong Science and Technology University (Hubei Wuhan* ,430022 , *China)*

Abstract **Objective** :To investigate the effects of *Danxian Kanggu (DXKG)* capsule extracted from traditional Chinese medicine on osteoblast cultured in vitro. **Methods** :Transmission electron microscope ,MTT , PNPP and BGP content radioimmunoassay were used to observe the effect of DXKG capsule on the ultrastracture proliferation differentiation of osteoblasts. The activity of ALPase and the BGP content of osteoblasts cultured in vitro. **Results** :*DXKG* capsule had the effects on stimulated osteoblasts that ALPase activity rised and BGP content increased in different concentration ,expecially in 20 mg/ ml concentration. Under transmission electron microscope observation ,changs could be seen in stimulated osteoblasts by *DXKG* such as the mitochondria were more fine and close and free ribosome were increased and the endoplasmic reticulum were more rich and large ,showed middle electron density than that of the control group ,but glycogen dissolution and liposome vacuoles obviously decreased. **Conclusion** :*DXKG* capsule possesses effects on stimulating proliferation and differentiation such as increasing the activity of ALPase and the BGP content of osteoblasts cultured in vitro.

Key words Danxian Kanggu capsule ; Osteoblasts ; Cells ,cultured

药物干预体外培养成骨细胞是研究治疗骨病药物的常用方法 ,本实验利用成骨细胞体外分离培养技术 ,以超微结构、增殖和分化功能为指标 ,观察具有补肾活血功效的纯中药制剂丹仙康骨胶囊对体外培养成骨细胞的影响。旨在进一步了解该制剂促进毛细血管再生 ,加速骨坏死修复作用[1,2]的机制 ,为研究防治坏死性骨病药物研究提供一些资料。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及鉴定 按照本实验室建立的二次胶原酶消化分离培养方法 ,取出生 24 h 内 SD 大鼠 8 只(由同济医学院动物中心提供) ,置入 75 %酒精中浸泡消毒 10 min ,无菌操作下完整取出颅盖骨。将颅骨置于盛有 PBS 缓冲液的培养皿中 ,搔刮骨面至粗糙 ,并用 PBS 液冲洗 3 次。然后将颅骨放入含 10 ml 0.1 % Ⅰ型胶原酶消化液(Sigma 产品 ,用 PBS 液释稀配成)的小瓶中室温静置 30 min ,以清除骨髓和少许残留纤维组织。用 PBS 液洗涤 3 次后 ,把颅骨移入另一盛有 10 ml 0.1 % Ⅰ型胶原酶消化液的小瓶中 ,再将颅骨剪成碎片 ,并于 37 ℃振荡消化 20 min。用吸管吹打数次后收集细胞悬液 ,并移入无菌离心管中 ,在 1 000 转/ min 下离心 10 min ,弃上清液。用 5 ml 含 20 %胎牛血清 DMEM 培养液将沉淀的细胞团吹打混悬均匀 ,接种于培养瓶。取第二代细胞进行实验 ,在二代细胞培养中 ,将无菌盖玻片置入培养瓶中 ,待细胞 80 %汇合时 ,取出生长细胞盖玻片 ,放入 4 ℃ PBS 液冲洗 ,冷丙酮固定 10 min ,采用钙 - 钴法[3]对培养的成骨细胞进行碱性磷酸酶

通讯作者:刘日光(现在贵阳医学院附属医学院骨科 ,贵州 贵阳 550004) E-mail:Liuriguang 5629519 @163. net

(ALP)染色鉴定。

1.2　药物　丹仙康骨胶囊由丹参,仙灵脾,骨碎补,红花等药组成。由贵阳中医学院药厂提供,取其内容物制成 3 g/ml 生药的水溶液,灭菌分装封瓶。

1.3　增殖测定　培养成骨细胞以 $2\times10^5/cm^2$ 密度接种于 96 孔塑料培养板,24 h 后加入不同浓度(80、40、20 mg/ml)丹仙康骨胶囊水溶液,于 10% FCS-DMEM 培养液中,使其终浓度为 40、20、10 mg/ml,继续培养 48 h,对照组只加 FCS-DMEM,然后用 MTT 法测定,结果以波长 570 nm 测定的 OD 值表示。

1.4　碱性磷酸酶(ALP)测定　按上述方法培养细胞,吸去培养液,细胞经 0.1% Trinton X-100 溶解液破膜制成细胞悬液。ALP 活性测定用对硝基苯磷酸盐法(PNPP)[5],通过吸光密度法换算得出 ALP 的含量。

1.5　骨钙素(BGP)含量放射免疫测定　收集上述培养液上清,采用放射免疫法测定各组的 BGP 含量。

1.6　透射电镜观察方法　培养成骨细胞以 $2\times10^5/cm^2$ 密度接种于 6 孔塑料培养板,24 h 后加入浓度 40 mg/ml 丹仙康骨胶囊水溶液,于 10% FCS-DMEM 培养液中,使其终浓度为 20 mg/ml,对照组只加 FCS-DMEM,加药后继续培养 48 h,吸去培养液,以 0.25%胰蛋白酶消化至细胞间隙疏松,弃去消化液,加 4 ℃ PBS 液离心成细胞团,用戊二醛锇酸固定,环氧树脂包埋,超薄切片,透射电镜观察。

1.7　数据处理　采用 SPSS 10.0 统计软件包进行独立样本组间 t 检验,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2　结果

2.1　成骨细胞鉴定　钙-钴法染色呈强阳性,与文献报道的成骨细胞特征相符[3]。

2.2　对成骨细胞增殖的影响(见表 1)　不同浓度的丹仙康骨胶囊对培养成骨细胞均显示增殖刺激作用,与对照组比较 $P<0.05\sim0.01$。其中以 20 mg/ml 的增殖作用较为明显。

2.3　对成骨细胞分化的影响(见表 1)　不同浓度给药组培养 48 h 后,ALP 活性均有不同程度增高,BGP 含量增加,与对照组比较 $P<0.05\sim0.01$,其中以 20 mg/ml浓度的作用尤为明显。

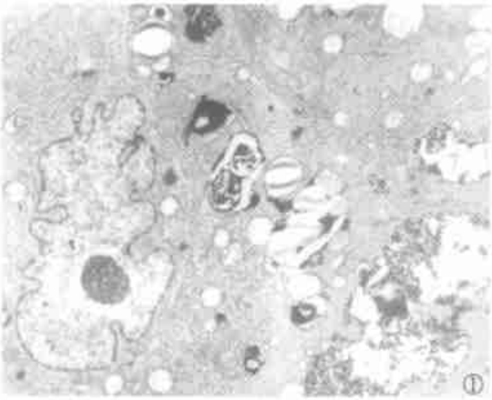
表 1　MTT, ALPase, BGP 测定值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Value of MTT, ALPase, BGP($\bar{x}\pm s$)

组别	药物浓度(mg/ml)	MTT(OD 值)	BGP(μg/l)	ALP(U/ml)
对照组	0	0.2565±0.0938	0.8442±0.1630	1.021±0.240
实验组	10	0.4051±0.0652*	1.1330±0.0663**	1.971±0.335*
	20	0.4201±0.0415**	1.1456±0.1765**	1.992±0.431**
	40	0.4032±0.0651*	1.1339±0.0662*	1.975±0.336*

注:*与对照组比较 $P<0.05$,**与对照组比较 $P<0.01$,$n=12$

2.4　透射电镜观察结果　与对照组比较,丹仙康骨胶囊治疗的成骨细胞线粒体致密、糖原无溶解、脂肪空泡较少、游离核糖体增多、内质网丰富扩大增粗呈中等电子密度(见图 1,2)。



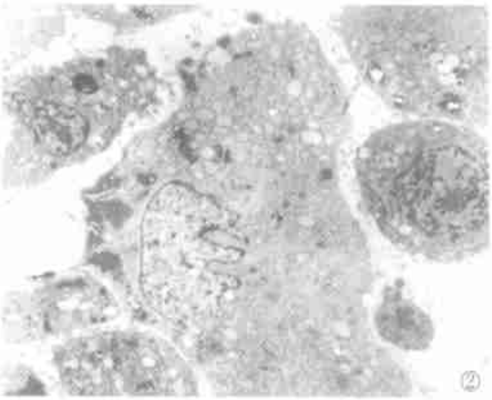


图 1　丹仙康骨胶囊组:成骨细胞线粒体致密、糖原无溶解、脂肪空泡较少、游离核糖体增多、内质网丰富扩大增粗呈中等电子密度(TEM×4 000)　图 2　对照组:成骨细胞线粒体肿胀、糖原溶解,脂肪空泡较多(TEM×3 150)

Fig 1　DXKG group: Mitochondrion of osteoblast were more fine and close, glycogen were not dissolved, liposome vacuoles decreased, free ribosome increased and endoplasmic reticulum is more rich and large showed middle electric density(TEM×4 000)　Fig 2　Control group: Mitochondrions of osteoblast are swelling, glycogen is dissolved and liposome vacuoles are more(TEM×3 150)

3　讨论

股骨头缺血坏死的修复是一个复杂的组织学变化过程,成骨细胞在骨坏死的修复中起着十分重要的作用。如何促进成骨细胞的分裂、增殖和分化,是

需要研究的问题。中医学认为"肾主骨生髓","瘀血不去,新骨不生"。丹仙康骨胶囊以活血补肾为主,具有明显的抗骨坏死作用[1,2]。丹仙康骨胶囊是本文作者治疗股骨头缺血坏死的中药经验方制剂,在细胞与亚细胞水平上以成骨细胞的增殖率、ALP 表达、BGP 含量及超微结构为指标,观察其对培养成骨细胞的影响。透射电镜观察发现:丹仙康骨胶囊治疗的成骨细胞,线粒体致密、游离核糖体增多、内质网丰富扩大增粗呈中等电子密度,而糖原溶解与脂肪空泡均较少,说明其蛋白质合成及转运功能旺盛。此与姚明忠等[6]的实验表明补肾中药可提高成骨样细胞 DNA 的合成,有助于成骨样细胞的增殖分化结果相一致。MTT 光密度表达,反映了细胞增殖活性,反映一定时间的细胞增殖速度[4]。结果显示丹仙康骨胶囊对成骨细胞有明显的刺激作用,能使细胞增殖率提高。ALP 的活性反映了成骨细胞的成骨活性,ALP 是成骨细胞分化的早期指标,其作用是水解有机磷酸释放出无机磷,用于羟基磷灰石的形成,因此,是骨形成的特异性酶。BGP 含有 A - 羟基麸酸残端,可作为阳离子螯合剂,维持骨的正常钙化,是成骨细胞分化的特征性指标之一,也是成骨细胞完成其成骨功能的重要物质。实验中不同浓度的丹仙康骨胶囊能促进成骨细胞 ALP 表达及 BGP 的含量,说明丹仙康骨胶囊在促进成骨细胞增殖的同时,也能促进其进一步分化成熟。因而可提高成骨细胞骨形成的功能,有助于骨坏死修复过程。但本实验结果是丹仙康骨胶囊对体外培养成骨细胞的直接作用,其作用机制有待深入探讨。

参考文献

1 刘日光,沈冯君. 化瘀活骨汤治疗股骨头坏死的体会. 贵阳中医学院学报,1998,20(1):14.

2 刘日光,沈冯君. 丹仙康骨胶囊治疗激素性股骨头缺血坏死的实验研究. 中国中医骨伤科杂志,2001,9(5):15.

3 席越,王戈平,黄啸原,等. 骨组织病理解剖学技术. 北京:人民卫生出版社,1997. 120.

4 朱文菁. MTT 法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力. 上海医科大学学报,1995,22:254-257.

5 Eans DB. The effect of rh IL-B on cellar proliferation and production PGE_2 Plasminogen activator osteocalcin and ALP by osteoblastic cells derived from HIL-ECS man bone. Biochem Biophys Res Commun,1990,166:208-216.

6 姚明忠,顾文聪,丁卫,等. 中药固真方对一些与细胞增殖有关基因表达的影响. 生物化学杂志,1996,12(1):116-117.

(收稿日期:2003 - 02 - 27 本文编辑:李为农)

2004 年全国时间生物医学学术会议征文通知

中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会筹委会将于 2004 年 11 月上旬在海南省海口市召开全国时间生物医学学术会议,会议将交流时间医学的临床、基础研究及教学方面学术论文,包括时间中医学、时间针灸治疗学(子午流注、灵龟八法等)及时间养生学等方面的文献、临床、基础研究或经验、医案等;并将正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会。征文要求:论文全文与 1 000 字以内摘要(研究性论文摘要请按目的、方法、结果、结论四部分撰写)各 1 份,A4 纸打印件和软盘或电子邮件附件方式(Word 或纯文本文件)一并寄会议联系人:山东省医学科学院抗衰老研究中心,赵子彦。地址:济南市经十路 89 号,邮编:250062,电话:0531-2919892,传真:0531-2601295,电子信箱:ziyanzhao @sina. com 或 ziyanzhao @163. com。截稿日期:2004 年 8 月 31 日。参见网址:www. chronobiology. net。

第八届全国与第四届国际足踝外科学术会议征文通知

由于 SARS 的影响,中华医学会骨科分会足踝外科学组决定将第八届全国与第四届国际足踝外科学术会议推迟到 2004 年八月在银川市召开,现将征文事宜通知如下:①征文内容:小腿与足、踝部的各种骨折、脱位临床治疗总结经验体会,基础研究,新技术新方法;显微外科在小腿与足踝区域内的应用、体会、经验总结;小腿与足踝部的各种骨病、肿瘤及畸形矫正的治疗体会、经验总结;足踝部各种疼痛性疾病的治疗体会,新技术新方法及科研成果等。②征文要求:论文在3 000字以内,附 800 字摘要,书写工整,最好打印,要求加盖公章。来稿请寄:北京安外小关 51 号北京足踝外科研究所,陈兆军,邮编:100029。③截稿日期:2004 年 6 月 10 日。请自留底稿,恕不退稿。