

# 补肾活血中药对体外培养成骨细胞增殖的影响

张宁<sup>1</sup>, 刘世巍<sup>1</sup>, 韩凤岳<sup>1</sup>, 宋军<sup>1</sup>, 罗燕楠<sup>1</sup>, 史颖红<sup>1</sup>, 任可<sup>2</sup>

(1. 中国中医研究院望京医院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学东方医院)

**摘要** 目的:探讨补肾活血中药对胎鼠颅盖骨来源成骨细胞增殖的影响,以进一步了解补肾活血中药改善骨代谢的作用机制。方法:取二次酶消化法培养的胎鼠颅骨第3代成骨细胞,随机分为5组:细胞对照组、空白血清组、含药血清组、原药组、阳性对照药(D3)组,分别加入普通细胞培养液、含空白血清及不同浓度补肾活血中药含药血清、补肾活血中药原药液、阳性对照药(D3)的条件培养液,在培养第3、6天用MTT比色法观察补肾活血中药含药血清及原药液对成骨细胞增殖率的影响。结果:补肾活血中药含药血清组成骨细胞增殖率较空白血清组、培养液组、D3组显著增强,且存在剂量依赖关系,随培养期延长,促进作用持续存在。补肾活血中药原药液在一般浓度对成骨细胞增殖无显著影响,而过高浓度对成骨细胞增殖有抑制作用。结论:补肾活血中药含药血清能够直接作用于体外培养的成骨细胞,促进其增殖。

**关键词** 中草药; 成骨细胞; 细胞,培养的

## Effects of tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine on proliferation of rat's osteoblasts in vitro

ZHANG Ning, LIU Shi-wei, HAN Feng-yue, SONG Jun, LUO Yan-nan, SHI Ying-hong, REN Ke. Wangjing Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine(Beijing, 100102, China).

**Abstract Objective:** To investigate the effects of tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine on rat osteoblasts in vitro, and to understand the mechanism how the Chinese medicine promotes bone formation.

**Methods:** The osteoblasts were isolated from newborn rat's calvaria by sequential enzyme digestion, and the cells of the third generation were divided into five groups randomly and treated with different culture medium.

After 3 and 6 days incubation the effects of tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine on proliferation of the osteoblasts were observed with MTT assay. **Results:** The tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine combined with the serum could stimulate the proliferation of the osteoblasts in dose-dependent manner.

With the time of the incubation, the stimulation persistently exists. High dose of the tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine inhibits the proliferation of the osteoblasts. **Conclusion:** The tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine can improve the proliferation of the osteoblasts.

**Conclusion:** The tonify-kidney and activate-blood Chinese medicine can improve the proliferation of the osteoblasts.

**Key words** Drugs, Chinese herbal; Osteoblasts; Cells, cultured

本研究拟通过胎鼠颅骨成骨细胞体外培养实验,观察补肾活血中药含药血清及原药液对成骨细胞增殖的影响,进一步探索补肾活血中药改善骨代谢的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 成骨细胞的分离和培养** 采用酶消化法和骨内成骨细胞培养法。拉颈处死1d龄SD大鼠(北京试验动物中心提供孕鼠),75%乙醇浸泡5min,无菌操作取出头盖骨,冰生理盐水液反复洗涤,除去脂肪组织及残留血,F12完全培养液再洗涤后剪成2~5

mm<sup>3</sup>碎片。将骨碎片用0.25%胰蛋白酶预消化15min,弃去上清,0.1%型胶原酶37℃消化20min,室温下磁力搅拌消化20min,收集消化液,室温下离心10min。去除上清液,用含20%胎牛血清(FBS)的Ham's F12培养液(青霉素和链霉素各100u/ml)少量悬浮细胞,接种于75ml培养瓶中。将获得的3瓶细胞置于二氧化碳培养箱,在5%CO<sub>2</sub>、95%空气,37℃下培养。24h可见细胞贴壁生长,胞浆开始伸展,换新鲜培养液,以后隔48h换培养液。于接种后第4天作第2继代培养。先以0.25%胰蛋白酶使贴

壁细胞消化松解、变圆,3~5 min 吸出消化液,加入新鲜培养液,轻摇吹打,细胞即脱壁。以  $5 \times 10^3/cm^3$  的密度移入新培养瓶中继续培养。

### 1.2 药物和分组

**1.2.1 补肾活血中药含药血清、原药液及 D3 培养液的制备** 补肾活血中药由川续断、丹参、当归、淫羊藿、仙灵脾等组成,水煎浓缩为含生药浓度 1 g/ml 的中药液。取 200 g 左右雄性 SD 大鼠 20 只(北京试验动物中心提供),单纯随机法分为空白组和给药组各 10 只,给药组大鼠以 40 g 生药/kg 体重灌入上述中药 3 d,每天 2 次;空白组同样饲养条件,不给药。两组大鼠分别于第 3 天第 2 次给药 2 h 后采血,离心,分离得含药血清和空白鼠血清,-20℃ 冰箱保存备用。取 1 g/ml 浓度的中药液 50 ml,4 000 r/min 离心 20 min 取上清液初滤、除渣滓,再到超净工作台用微孔滤膜器滤菌,得 4 ml 无菌生药液,调 pH 值至 7.0,56℃ 水浴灭活。取 1 ml 无菌中药液,用 F12 培养液配成浓度为 0.034 5、0.024 0、0.017 0、0.012 0、0.008 5、0.006 0 g/ml 原药培养液备用。D3 液:取 0.25 μg( $2.5 \times 10^5$  pg) D3,用 F12 培养液配成浓度为 2 000、1 000、500、250、125 pg/ml 的培养液备用。

**1.2.2 成骨细胞分组** 本实验取第 3 代成骨细胞,调节细胞液浓度至  $5 \times 10^4/ml$ ,以 100 μl/孔加入 96 孔培养板,随机分为 5 组:细胞对照组(药液浓度为 0);空白血清组(含药血清浓度为 0);含药血清组(含药血清浓度分别为 25%、17.5%、12.25%、8.5%、6%);原药组(中药浓缩液浓度分别为 0.034 5、0.024 0、0.017 0、0.012 0、0.008 5、0.006 0 g/ml);阳性对照药 D3 组(D3 浓度分别为 2 000、1 000、500、250、125 pg/ml)。使每孔培养液总量为 200 μl,空白血清组和含药血清组培养液血清总量均为 50 μl,原药组、D3 组及细胞对照组则含胎牛血清 25 μl。共接种 4 板,每组 2 板,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,分别培养 3、6 d,逐日检查细胞生长情况。

**1.3 培养细胞形态学观察** 在倒置相差显微镜下观察其活体形态和生长情况。细胞在接种 4 h 左右可见部分细胞贴壁、伸展,随培养时间延长,细胞伸出较多突起,有的突起相互连接;5~6 d 后细胞融合为单层,形态多为单核、多边形及梭形,局部有细胞密集的细胞团,符合成骨细胞特点。可见含药血清组细胞密度高于空白血清组。

### 1.4 成骨细胞增殖情况检测 四唑盐(MTT)比色

分析法测定各组成骨细胞增殖率:分别取培养第 3、6 天的成骨细胞培养板,将每孔中的培养液吸净,每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,于 37℃ 培养箱中孵育 4 h,将 MTT 甩净后加入二甲基亚砷(DMSO)100 μl/孔,振荡摇匀,用酶标仪 490 nm 波长测定其吸收值。计算各组每组 8 孔的平均吸收值。

**1.5 统计学方法** 所有参数均采用均数 ± 标准差表示,用单因素方差分析法对实验结果进行组间显著性比较。 $P < 0.05$  为有显著差异, $P < 0.01$  为有极显著差异。

## 2 结果

**2.1 补肾活血中药含药血清对成骨细胞的影响** 从表 1 可以看出,培养第 3 天,含药血清组各浓度组(6%~25%)MTT 吸收均值均高于空白血清组, $P < 0.01$ ,有极显著差异。培养第 6 天,12.25%~25%浓度组与空白血清组比较有极显著差异, $P < 0.01$ ;其余 2 组 MTT 吸收值高于空白血清组,但无显著差异。可见,含药血清可以显著促进成骨细胞增殖,且存在浓度依赖关系;随着培养天数增加,成骨细胞进一步增殖,这种浓度依赖关系更加显著。

表 1 培养第 3、6 天不同浓度含药血清组与空白血清组 MTT 值比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu l$ )

Tab. 1 Comparison of MTT values in the medicine contained serum groups and blank serum group after culture for 3 and 6 days ( $\bar{x} \pm s, \mu l$ )

含药血清浓度 (添加量 μl)	MTT 吸收值(μl)	
	第 3 天	第 6 天
25% (50)	0.219 ± 0.015 *	0.254 ± 0.011 *
17.5% (35)	0.209 ± 0.009 *	0.228 ± 0.007 *
12.25% (24.5)	0.194 ± 0.008 *	0.204 ± 0.014 *
8.5% (17)	0.178 ± 0.011 *	0.193 ± 0.007
6% (12)	0.181 ± 0.010 *	0.195 ± 0.010
0% (0)	0.151 ± 0.009	0.182 ± 0.000

注: \*含药血清各浓度组分别与空白血清组相比较, $P < 0.01$

**2.2 补肾活血中药原药液对成骨细胞的影响** 从表 2 可以看出,培养第 3、6 天,中药原药组和细胞对照组成骨细胞正常增殖,但两组 MTT 吸收值比较, $P > 0.05$ ,均无显著差异。此外,实验中发现,高浓度的中药原药液(浓度  $> 0.034 5$  g/ml)对成骨细胞增殖有明显抑制作用,在适宜浓度下则对细胞无明显影响。

**2.3 D3 对成骨细胞增殖的影响** 从表 3 可以看出,培养第 3、6 天,D3 组和细胞对照组成骨细胞正常增殖,但两组 MTT 吸收值比较, $P > 0.05$ ,均无显

著差异。同样,高浓度 D3 对细胞增殖有抑制作用,但差异不显著。

表 2 培养第 3、6 天不同浓度中药原药组与细胞对照组 MTT 吸收值比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{l}$ )

Tab. 2 Comparison of MTT values in active compound groups and control group after culture for 3 and 6 days

中药原药作用浓度 (g/ml)	MTT 吸收值 ( $\mu\text{l}$ )	
	第 3 天	第 6 天
0.034 5	0.138 $\pm$ 0.004	0.176 $\pm$ 0.003
0.024 0	0.138 $\pm$ 0.004	0.176 $\pm$ 0.008
0.017 0	0.136 $\pm$ 0.006	0.179 $\pm$ 0.008
0.012 0	0.143 $\pm$ 0.007	0.179 $\pm$ 0.008
0.008 5	0.138 $\pm$ 0.008	0.176 $\pm$ 0.008
0.006 0	0.143 $\pm$ 0.005	0.181 $\pm$ 0.008
0	0.141 $\pm$ 0.004	0.180 $\pm$ 0.009

表 3 培养第 3、6 天不同浓度 D3 组与细胞对照组 MTT 吸收值比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{l}$ )

Tab. 3 Comparison of MTT values in D3 groups and control group after culture for 3 and 6 days ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{l}$ )

各组 D3 组作用 浓度 (pg/ml)	MTT 吸收值 ( $\mu\text{l}$ )	
	第 3 天	第 6 天
2 000	0.158 $\pm$ 0.004	0.170 $\pm$ 0.012
1 000	0.158 $\pm$ 0.005	0.176 $\pm$ 0.011
500	0.153 $\pm$ 0.006	0.180 $\pm$ 0.010
250	0.155 $\pm$ 0.007	0.185 $\pm$ 0.008
125	0.158 $\pm$ 0.008	0.184 $\pm$ 0.009
0	0.141 $\pm$ 0.005	0.180 $\pm$ 0.009

本研究结果表明:与细胞对照组、空白血清组、D3 组相比,补肾活血中药含药血清能够显著促进体外培养的成骨细胞的增殖,且存在剂量依赖关系;随培养期延长,这种促进作用一直存在而未削弱。

### 3 讨论

本实验通过单独体外培养成骨细胞,以单细胞形态、增殖指标的变化<sup>[1]</sup>来观察补肾活血中药原药

液及含药血清对成骨细胞生长的直接效应,推论其对体内生长的成骨细胞的作用,探索补肾活血中药改善骨代谢的作用机制<sup>[2,3]</sup>。

结果发现,含药血清组成骨细胞的 MTT 值在培养第 3、6 天均显著高于空白血清组及其他各组,且有剂量依赖性。含药血清作为中药培养基,含有补肾活血中药经体内代谢后的活性成分,且无提纯、灭活、除菌不足等外界因素干扰,可较为真实的反映补肾活血中药的药效及药性,故含药血清的实验结果较为科学客观地提示了补肾活血中药能够显著促进成骨细胞的增殖。这种促进作用显著高于空白鼠血清和阳性对照药 D3。中药原药组增殖率 MTT 值与 D3 组、细胞对照组比较结果无显著差异。补肾活血中药中的川续断、淫羊藿、仙灵脾均有补肾壮骨的作用。现代药理学研究表明,川续断能够促进实验性大鼠骨损伤的愈合<sup>[4]</sup>,具有类雌激素、孕激素的作用<sup>[5]</sup>,有报道雌激素有促进成骨细胞增殖、分化的作用<sup>[6]</sup>。根据中医学理论,肝肾同源,精血同源,丹参、当归等补活血,补肝益肾,可促进骨生成。

### 参考文献

- 1 杨景山. 医学细胞化学细胞生物技术. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1940. 42.
- 2 廉凯,杜靖远,张银刚. 降钙素基因相关肽对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响. 中国骨伤,2002,15(1):20-22.
- 3 胡光亮,杜靖远,王洪,等. 补肾密骨液对骨代谢影响的体外实验研究. 中国骨伤,2000,13(2):83-85.
- 4 纪顺心,吴雪琴,李崇芳. 中药续断对大鼠实验性骨损伤愈合作用的观察. 中草药,1997,28(2):98.
- 5 王一涛,王家葵,杨奎,等. 续断的药理学研究. 中药药理与临床,1996,12(3):20-23.
- 6 Robert J, James TR, Thomas AE, et al. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. J Bone Joint Surg (Am), 1994, 76:713-721.

(收稿日期:2004-05-10 本文编辑:李为农)

## “好及施”“同息通”临床应用学术研讨会 有奖征文通知

“同息通”(曲安奈得注射液)为长效糖皮质激素,有强而持久的抗炎及抗过敏作用。适用于类风湿性关节炎、支气管哮喘、过敏性鼻炎、肩周炎、腱鞘炎、滑囊炎、慢性腰腿痛及多种皮肤病、眼病和脑外伤。“好及施”贴剂是日本进口复方制剂,其中水杨酸有良好的消炎作用,辣椒素和醋酸生育酚有促进人体血液循环之效,樟脑及薄荷醇能够缓解局部疼痛,适用于跌打扭伤、腰背酸痛、肩周炎、冻疮等。温感对慢性痛症的缓解和治疗效果显著,冷感对炎症初期尤为适宜。目前,在临床应用中得到广大医务工作者的认可。为了更好地评价“同息通”好及施”临床应用的经验,《中国骨伤》杂志编辑部和广东省医药进出口公司珠海公司联合举办“同息通”好及施”临床应用学术研讨会征文的评奖活动,以加强临床研究与交流。现将征文事宜通知如下:

1. 征文内容:应用“同息通”好及施”的临床经验总结及基础研究。
2. 征文要求:4 000 字以内全文及 500 字左右摘要各 1 份,抄清或打印,姓名、单位及地址、邮政编码请务必写清楚。写作规范参见《中国骨伤》稿约(见每年第 1 期)规定。
3. 征文评选方法: 评选标准:依据论文的设计水平、科学性、真实性等进行评审。 所有征文由《中国骨伤》杂志编辑部组织专家对论文进行评审。 凡入选论文编成论文集,并邀请作者参加“好及施”“同息通”临床应用学术研讨会,参会者将由中国中西医结合学会授予继续教育学分。会议时间、地点另行通知。
4. 征文请寄:北京东直门内南小街甲 16 号《中国骨伤》杂志编辑部(邮编:100700),并在信封左下角注明“征文”字样。