

• 基础研究 •

强骨宝方对体外培养成骨细胞影响的实验研究

苏友新¹, 郑良朴², 陈智能¹, 杨连梓³, 王和鸣¹

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350108; 2. 福建中西医结合研究院; 3. 福建省第二人民医院)

【摘要】 目的: 探讨不同浓度强骨宝方提取液直接添加对体外培养成骨细胞增殖、分化与矿化功能的影响。方法: 采用胰蛋白酶-Ⅱ型胶原酶消化法从2只1~2日龄SD乳鼠颅盖骨中分离出成骨细胞, 鉴定细胞并传代培养后, 分为对照组与4个实验组, 实验组分别用终浓度为100、50、10、5 μg/ml的强骨宝方提取液加入成骨细胞培养体系, 对照组用不含强骨宝方提取液的培养基培养, 应用MTT比色法、ALP含量测定、矿化结节形成等分别观察其对成骨细胞增殖、分化及矿化能力的影响。结果: 100、50及10 μg/ml浓度的强骨宝方提取液均具有促进体外成骨细胞增殖、分化与矿化的作用, 以100 μg/ml与50 μg/ml促进作用最强。结论: 每毫升含生药2g的强骨宝方提取液, pH=7.0, 50 μg/ml的添加浓度可能最适合于体外培养成骨细胞的增殖、分化及矿化成骨能力。

【关键词】 成骨细胞; 细胞培养; 细胞增殖; 细胞分化; 补肾药

Effect of *Qianggubao* decoction(强骨宝方) on osteoblast cultured in vitro SU Youxin^{*}, ZHENG Liangpu, CHEN Zhineng, YANG Lianzi, Wang Heming. ^{*} Department of Traumatology and Orthopaedics, the Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108 Fujian, China

ABSTRACT Objective To study the effect of *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract of different concentration on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblast(OB) cultured in vitro. **Methods** The OB was isolated from the skull of two SD rats which were 1 to 2 days after born by means of Trypsin-type II collagenase enzymatic digestion. After identified and subcultured, the OB was divided into control group and 4 experimental groups. Different concentration of 100, 50, 10 and 5 μg/ml *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract were added to the OB in 4 experimental groups. The OB in control group was cultured with normal nutrient medium without *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract. The effects of *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts was observed by MTT analysis, ALP analysis and mineralization formation respectively. **Results** The *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract of 100, 50 and 10 μg/ml promoted proliferation, differentiation and mineralization of osteoblast, in which the *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract of 100 μg/ml and 50 μg/ml had the better effects. **Conclusion** The *Qianggubao* decoction(强骨宝方) extract of pH=7.0, 50 μg/ml which contains 2 grams crude drug in 1ml is most suitable for proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts cultured in vitro.

Key words Osteoblasts; Cell culture; Cell proliferation; Cell differentiation; Kidney-reinforcing drugs

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(6): 394-396 www.zggszz.com

糖尿病性骨质疏松 (diabetic osteoporosis, DOP) 的发生与糖尿病时的高血糖及其继发的骨代谢紊乱密切相关^[1]。我们前期的研究也证实, 体外高糖培养液对成骨细胞的增殖、分化及矿化功能均有抑制作用^[2]。中药强骨宝方防治 DOP 的疗效确切^[3], 但对其具体作用环节尚不清楚。本研究拟通过观察强骨宝方水提取液直接添加对体外培养成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响, 从而从细胞生物学水平探讨该方防治 DOP 的机制。

1 材料与方

1.1 试剂 Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐 (MTT)

购自 Sigma 公司, 新生牛血清 (NCS)、Hepes 缓冲液、α-MEM 培养基、青-链霉素溶液均购自 Hyclone (USA) 公司, β-甘油磷酸钠、茜素红、二甲基亚砷 (DMSO) 购自上海生物工程有限公司, 分析纯葡萄糖购自上海化学试剂公司, ALP 试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.2 仪器 荧光倒置显微镜 (IX70 日本 Olympus), CO₂ 培养箱 (G-BB16 德国 Herais), 酶标仪 (ELX808 美国 Biotek), 紫外分光光度计 (DU650 德国 Beckman)。

1.3 强骨宝方提取液的制备 强骨宝方组方药材购自福建省福州市中药材采购供应站, 将组方生药 (生黄芪、鹿角胶、煅牡蛎、五味子、丹参、石斛、骨碎补等) 加水煎 3 次, 纱布过滤并 3 次合一, 药液经乙醇沉取 2 次, 滤纸过滤并且回收全部乙醇, 继续加热浓缩制成每毫升含生药 2 g 的药液, 调 pH=7.0

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目 (编号: 2001J62)

通讯作者: 苏友新 Tel 0591-83570513 Email suyouxin777@hotmail.com

并经活性碳脱色 3次,经 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,分装,4℃保存备用,使用时以培养基调制。

1.4 成骨细胞的分离、培养、鉴定及分组

1.4.1 实验动物 1~2日龄 SD 乳鼠 5只,购于福建医科大学实验动物中心。

1.4.2 颅骨成骨细胞的分离、培养 取 2只 1~2日龄 SD 乳鼠颅盖骨,先以 0.25% 胰酶溶液预消化,再用 0.1% II 型胶原酶溶液振荡消化,制成细胞悬液,接种于培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 换液 1次,以后每 2~3 d 换液 1次,细胞汇合后进行消化传代。

1.4.3 细胞爬片的制备 将消化下的细胞悬液接种于含有已消毒玻璃片的 6孔培养板,待细胞汇合后取出, PBS 液洗涤,固定液固定, -20℃ 储存备用。

1.4.4 成骨细胞的鉴定 倒置显微镜下及 HE 染色观察细胞的形态与生长情况,采用组织化学方法对细胞爬片分别进行 V-G 胶原染色、ALP 染色、矿化结节茜素红染色。

1.4.5 分组 取 5~8 代成骨细胞, 2 × 10⁴ /ml 的细胞密度接种于 96 孔培养板,经同步化后,分为对照组与 4 个实验组,共 5 组。实验组在 10% NCS α - MEM 培养体系中分别加入终浓度为 100、50、10、5 μg/ml 的强骨宝方提取液,对照组用不含强骨宝方提取液的培养基培养,每孔 0.1 ml 培养 48、72 h。

1.5 MTT 比色法测定成骨细胞增殖功能 培养结束前 4 h 弃去原培养液,用 PBS 液洗 3 次,分别加入用 PBS 液配制的 5 mg/ml MTT 液每孔 20 μl 结束后弃去培养上清液,加入 DMSO 每孔 100 μl 振荡 15 min 待紫色结晶完全溶解后,在酶标仪上以波长 490 nm 测定各孔的 OD 值。

1.6 成骨细胞分泌 ALP 的测定 分组同上,隔天换液 1 次,于 24 孔培养板培养 7 d 后取培养上清液 50 μl 采用磷酸苯二钠盐为底物,经 520 nm 波长比色,测 OD 值,换算成 ALP 活性(金氏单位 /100 ml)。

1.7 成骨细胞矿化功能的测定 成骨细胞培养同步化后,换入含 50 μg/ml 维生素 C、10 mmol/L β - 甘油磷酸钠的上述培养基,隔天换液。培养 18 d 后将培养基吸出,用 PBS 洗板 3 次,95% 乙醇固定 10 min,0.1% 茜素红溶液染色 30 min,蒸馏水洗,镜下计数每孔矿化结节数。

1.8 统计学处理 所得计量资料均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,多组之间比较先采用 F 检验而后进行 q 检验,以 P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 原代及传代成骨细胞形态学观察 培养第 1 天可见细胞数量较多,悬浮在培养液中,呈圆形,核大而圆,位于胞体的一端。24 h 后细胞全部贴壁,胞体展开呈三角形、多角形、梭形等,核呈卵圆形。对数生长期细胞分裂相多见,有较多的突起互相连接。细胞汇合时呈铺石状,并可重叠生长,符合成骨细胞的形态学特征。

2.2 成骨细胞染色鉴定 V-G 胶原染色可见红色的胶原、蓝色的胞核、黄色的胞质; ALP 染色可见胞内的 ALP 黑色团块, ALP 测定培养液有较高的 ALP 活性; 矿化结节茜素红染色可见矿化结节形成。符合成骨细胞的功能学特征。

2.3 添加不同浓度强骨宝方提取液对成骨细胞增殖功能的影响 见表 1。

表 1 不同浓度的强骨宝方提取液对成骨细胞增殖功能影响的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 The effects of different concentration of *Qianggubao* decoction (强骨宝方) extract on proliferation of osteoblastic cells cultured in vitro ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 Groups | 时间 Times | |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | 48 h | 72 h |
| 100 μg/ml 组 100 μg/ml group | 0.367 7 ± 0.012 9 ^a | 0.576 3 ± 0.032 7 ^{***Δ} |
| 50 μg/ml 组 50 μg/ml group | 0.399 3 ± 0.031 5 ^{***} | 0.625 0 ± 0.020 1 ^{***Δ} |
| 10 μg/ml 组 10 μg/ml group | 0.371 3 ± 0.018 3 | 0.562 0 ± 0.043 6 ^Δ |
| 5 μg/ml 组 5 μg/ml group | 0.349 5 ± 0.020 4 | 0.528 4 ± 0.029 3 |
| 对照组 Control group | 0.355 0 ± 0.019 8 | 0.513 7 ± 0.017 6 |

注: 与对照组比较, *P < 0.05 **P < 0.01 与 5 μg/ml 组比较, ^ΔP < 0.05, ^{ΔΔ}P < 0.01 与 50 μg/ml 组比较, ^{ΔΔΔ}P < 0.05

Note Compared with control group, *P < 0.05, **P < 0.01; compared with 5 μg/ml group, ^ΔP < 0.05 ^{ΔΔ}P < 0.01; compared with 50 μg/ml group ^{ΔΔΔ}P < 0.05

表 1 显示: 不同浓度的强骨宝方提取液在成骨细胞培养 48 h 和 72 h 时对其增殖功能影响具有统计学差异 (F = 6.36, P < 0.05 和 F = 9.91, P < 0.05)。其中在培养 48 h 时,与对照组比较, 50 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05); 与 5 μg/ml 组比较, 50 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01); 与 50 μg/ml 组比较, 100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05)。在培养 72 h 时,与对照组比较, 10 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05), 50、100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01); 与 5 μg/ml 组比较, 100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05), 50 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01); 与 50 μg/ml 组比较, 10、100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05)。

2.4 添加不同浓度强骨宝方提取液对成骨细胞分泌 ALP 及矿化功能的影响 见表 2。

表 2 显示: 不同浓度的强骨宝方提取液在成骨细胞培养 7 d 时对其分泌 ALP 与矿化功能的影响有统计学差异 (F = 9.36, P < 0.05 和 F = 8.25, P < 0.05)。与对照组 OD 值比较, 10 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05), 50、100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01); 与 5 μg/ml 组比较, 10、50 和 100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01)。与对照组矿化结节数比较, 10 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05), 50、100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.01); 与 5 μg/ml 组比较, 50、100 μg/ml 组差异有显著性意义 (P < 0.05)。

3 讨论

研究证实, 一些中药及复方具有明显促进成骨细胞增殖

表 2 不同浓度的强骨宝方提取液对成骨细胞分泌

ALP与矿化功能影响的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 The effects of different concentration of *Qinggubao* decoction(强骨宝方) extract on the ALP and mineralization of osteoblastic cells cultured in vitro ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 Groups | OD值 OD value (king unit/100ml) | 矿化结节数 Mineralization tubercle(n/hole) |
|----------------------|-----------------------------------|---|
| 100 μg/ml组 | 2.789 2 ± 0.168 9***▲▲ | 12.67 ± 2.61***▲▲ |
| 100 μg/ml group | | |
| 50 μg/ml组 | 2.802 0 ± 0.181 9***▲▲ | 12.50 ± 2.74***▲▲ |
| 50 μg/ml group | | |
| 10 μg/ml组 | 2.692 5 ± 0.221 6***▲▲ | 10.17 ± 2.56* |
| 10 μg/ml group | | |
| 5 μg/ml组 | 2.351 6 ± 0.192 6 | 7.83 ± 2.48 |
| 5 μg/ml group | | |
| 对照组 Control group | 2.308 5 ± 0.125 6 | 6.67 ± 2.73 |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5 μg/ml组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

Note Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with 5 μg/ml group ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

殖和分化的作用^[4,5]。强骨宝方是临床治疗糖尿病并发骨质疏松症而引起腰背痛的经验方,由生黄芪、鹿角胶、煅牡蛎、五味子、丹参、石斛、骨碎补等组成,能针对 DOP发病的中医证候特点进行治疗^[6]。临床研究和动物实验都表明:强骨宝方能通过降血糖、抑制骨吸收、促进骨形成而逆转骨代谢负平衡,调节血镁等微量元素水平,降低氧化应急与非酶糖基化反应等多种机制,而起到提高 BMD、防治 DOP的作用,但对于该方在细胞水平的作用及其机制尚不明确。成骨细胞是体内骨形成的主要细胞,成骨细胞功能的减退是骨质疏松发病的重要机制之一。采用新生大鼠颅盖骨分次酶消化法能获得较纯的颅骨成骨细胞,其生物学性状类似于体内成骨细胞的表型,能够保证实验用细胞的纯度均一和成骨细胞的生物学性质^[7],故本研究采用该细胞模型进行体外培养及强骨宝方提取液的干预观察。

培养成骨细胞先出现增殖,成骨细胞增殖率反应其生

长活跃与否的标志,是判断和筛选促进骨形成作用药物的一项指标。成骨细胞增殖到一定程度就会出现功能分化,ALP是一种较为肯定的成骨细胞分化的早期指标,它的表达和分泌是随着细胞分化的发展而增强,代表着骨形成的状况。在成骨细胞分泌 ALP后,会出现细胞的融合与矿化结节形成,矿化是细胞进一步分化成熟的功能表现。在本研究对成骨细胞增殖、分泌 ALP及矿化功能的研究中发现,100、50及 10 μg/ml浓度的强骨宝方提取液对成骨细胞早期增殖功能及随后分泌 ALP与矿化功能均有不同促进作用,这证实强骨宝方对骨形成具有促进作用,也提示强骨宝方提取液中可能含有直接作用于成骨细胞的物质,对骨代谢具有重要影响。

在本研究中也发现,虽然 100、50及 10 μg/ml浓度的强骨宝方提取液对成骨细胞的增殖、分化与矿化功能均有不同促进作用,但均显示 100 μg/ml及 50 μg/ml浓度的作用最强,促进作用均具有显著性意义($P < 0.01$)。而比较 100 μg/ml与 10 μg/ml 2种浓度在增殖、分化与矿化过程的作用,尚没有显著差异。说明合适剂量的强骨宝方提取液对成骨细胞功能作用较为重要,高浓度未必必要,太低浓度,如 5 μg/ml的作用不明显。对于强骨宝方而言,以每毫升含生药 2 g的提取液、pH = 7.0、50 μg/ml的添加浓度可能最合适。

参考文献

- 1 刘健民,许曼音.糖尿病性骨病.国外医学:内分泌分册,2003 23(2): 133-135
- 2 苏友新,陈智能,杨连梓,等.梯度糖溶液对体外培养成骨细胞影响的实验研究.中国骨伤,2005,18(7): 407-409.
- 3 苏友新,郑良朴,钱松涛.强骨宝对糖尿病性骨质疏松症患者骨密度及生化指标的影响.浙江中医学院学报,2002,26(4): 15-17.
- 4 汤耿民,沈霖,徐意辉.补肾活血方对 OB生长因子 TGF-β₁mRNA表达的影响.中国中医骨伤科杂志,1999,7(5): 56-58
- 5 徐荣辉,柴本甫,朱雅萍.丹参注射液对鸡胚颅骨分离细胞培养生长影响的组织化学观察.中华骨科杂志,1994,14 185-187
- 6 苏友新,郭进建,郑良朴,等.糖尿病性骨质疏松症的中医证候研究.福建中医学院学报,2002,12(1): 26-29
- 7 刘祖德,臧鸿声,欧阳跃平.新生大鼠颅骨成骨细胞体外生长过程研究.解剖学报,1995 26(2): 157-160

(收稿日期:2006-07-07 本文编辑:李为农)

本刊对来稿中照片图处理的有关要求

稿件中的图片要求有良好的清晰度和对比度,最好提供洗印好的照片。X线片图请一律寄照片,不可寄 X线胶片,图片不小于 8 cm × 12 cm,肢体照片需包括一端关节。图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要写在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、作者姓名及图的上下方向。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图片如有引自他刊者,应注明出处。图片均不可粘贴,另纸包好,以免污染或折损。大体标本照片在图内应有尺度标记。如提供电子版的图片,彩色图片应为 RGB 格式,建议作者使用数码相机拍摄照片时,图片分辨率最小为 300 ppi(像素/英寸),线条图最小 1 200 ppi 图像大小 5 in × 7 in(127 mm × 178 mm)。图片应按其在正文中出现的顺序命名,采用 JPEG 格式单独存储,请勿插入正文文档中(如 Word 文档)。若刊用人物像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。