

# 活血补肾中药对培养成骨细胞 VEGF 活性的影响

沈冯君<sup>1</sup>, 刘日光<sup>1</sup>, 杨述华<sup>2</sup>, 沈骏<sup>1</sup>, 易诚青<sup>2</sup>, 李新春<sup>2</sup>, 刘建湘<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 华中科技大学同济医学院协和医院骨科)

**摘要** 目的: 研究活血补肾中药丹仙康骨胶囊对体外培养成骨细胞 VEGF 活性的影响, 进一步探讨丹仙康骨胶囊抗骨坏死的作用机制。方法: 应用 RT-PCR 及流式细胞仪检测观察不同剂量丹仙康骨胶囊对成骨细胞 VEGF mRNA 的表达与 VEGF 的生成的影响。结果: 丹仙康骨胶囊可以促进成骨细胞 VEGF mRNA 的表达与 VEGF 的生成, 并呈剂量依赖性。结论: 丹仙康骨胶囊促进成骨细胞 VEGF mRNA 的表达与 VEGF 的生成可能是其抗骨坏死的作用机制之一。

**关键词** 丹仙康骨胶囊; 成骨细胞; 血管内皮生长因子

**Effects of Danxian Kanggu capsule on the vascular endothelial growth factor expression and production in osteoblasts** SHEN Fengjun, LIU Riguang, YANG Shuhua, SHEN Jun, YI Chengqin, LI Xinchun, LIU Jianxiang. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (Guizhou Guiyang, 550002, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Danxian Kanggu capsules extracted from traditional Chinese medicine on the vascular endothelial growth factor expression and production by osteoblasts, and explore the mechanism of anti osteonecrosis of Danxian Kanggu capsules. **Methods:** Osteoblasts derived from fetal rats were used in this study. VEGF mRNA expression, intracellular production induced by Danxian Kanggu capsules were measured by RT-PCR and flow cytometry. **Results:** Danxian Kanggu capsules could significantly increase vascular endothelial growth factor expression and production in osteoblasts in a dose dependent manner. **Conclusion:** The anti osteonecrosis effect of Danxian Kanggu capsules may be through its increasable effect on vascular endothelial growth factor expression and production in osteoblasts.

**Key words** Danxian Kanggu capsule; Osteoblast; Endothelial growth factor

丹仙康骨胶囊是一种治疗股骨头缺血坏死的经验方苗药制剂, 具有“祛淤生新, 活血补肾”的功效。临床与实验研究已证实该制剂具有促进毛细血管再生, 加速骨坏死修复的作用<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)是目前已知的对血管生成具有调节作用的细胞生长因子中最为重要的一种, 在骨组织的生长、发育与修复过程中均起着重要作用。丹仙康骨胶囊的抗骨坏死作用是否通过影响 VEGF 来完成, 本研究以新生 SD 大鼠颅骨成骨细胞为研究对象, 观察了丹仙康骨胶囊对成骨细胞 VEGF 活性的影响。

## 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 内的新生 SD

大鼠 8 只(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。后将颅骨放入 10 ml 0.1% I 型胶原酶消化液(I 型胶原酶 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 °C 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 1000 r/min 下离心 10 r/min 弃上清。用 5 ml 含 20% 胎牛血清 DMEM(内含 5 mM 抗坏血酸、β-甘油磷酸钠, 均购自 Sigma 公司)。用培养液将沉淀的细胞团吹打混悬均匀, 接种于培养瓶。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 ℃ CPBS 液冲洗, 冷丙酮固定 10 min, 采用钙- 钴法<sup>[2]</sup>对培养的成骨细胞进行碱性磷酸酶(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, 取其内容物制成每毫升生药 3 g 水溶液, 灭菌分装封瓶。

**1.3 RNA 提取** 采用 TRIZOL (Gibco) 按产品说明书提取细胞总 RNA, 即 TRIZOL 裂解细胞, 加入氯仿, 均匀, 离心后取水相, 异苯醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 真空干燥。260 nm 波长测光密度。所提 RNA 的 A260/280 均在 1.8~2.0 之间。

**1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)** 5 μg RNA 经 AMV 逆转录酶及 Oligo dT 引物(Promega 公司)42 ℃ 60 min 逆转录成 cDNA。随后进行 PCR。目的基因 VEGF 引物序列为<sup>[3]</sup>: 正链引物 5'-CCTGTGGACATCTCCAGGAGTACG-3'; 负链引物 5'-GAAGCTCATCTCCTATGTGCTGGG-3', 抗增产产物大小为 196 bp, 该对引物可识别所有 VEGF 异构体, 并跨过内含子, 从而可排除基因组 DNA 的影响。PCR 反应体系为 25 μl, 酶和脱氧核苷三磷酸(dNTP) 为 Promega 产品, 变性、退火与延伸条件分别为 95 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环确保抗增产产物处于对数增长期(GeneAmp System, Biometra 公司)。以 β-actin 为内参照(产物大小为 250 bp)。用未经逆转录 RNA 及双蒸水作空白对照。抗增产产物 3% 琼脂糖溴化乙锭进行电泳分离, 紫外灯下观察, 利用计算机 DNA 定量系统对 VEGF 和 β-actin 条带进行像素值测定, 并算出二者比值。

**1.5 成骨细胞内 VEGF 测定** 利用流式细胞仪检测细胞内的 VEGF 的变化。细胞经胰蛋白酶消化, 吹打成单个细胞, 1% 的多聚甲醇固定, 皂素破膜, 兔抗鼠 VEGF 单克隆抗体(武汉博士德公司) 孵育, 洗 2 次, 羊抗兔单克隆抗体(武汉博士德公司) 避光孵育, 洗 3 次, 过网筛, 流式细胞仪检测其平均荧光强度的变化。

**1.6 统计学分析** 所有计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 软件包进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异非常显著。

## 2 结果

**2.1 成骨细胞鉴定** 钙- 钴法染色呈强阳性, 墨褐色表示酶含量多。

**2.2 丹仙康骨胶囊对成骨细胞 VEGF mRNA 表达的影响** 细胞在 10% FCS 的 DMEM 培养液中生长

至 80% 溶合, 去血清 24 h, 分别加入不同剂量的丹仙康骨胶囊液(10, 20, 40 mg/ml) 孵育 48 h。丹仙康骨胶囊能显著增加( $P < 0.01, n = 3$ ) 成骨细胞 VEGF mRNA 的表达, 其作用呈剂量依赖性(见图 1)。

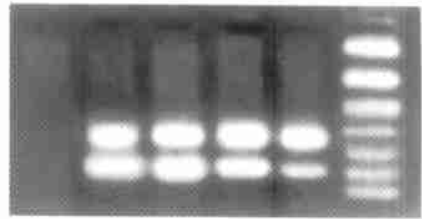


图 1 VEGF mRNA 表达电泳图: 泳道 1 为未加药细胞对照组, 像素值为  $0.483 \pm 0.004$ ; 泳道 2 为 10 mg 组, 像素值为  $0.870 \pm 0.005$ ; 泳道 3 为 20 mg 组, 像素值为  $1.120 \pm 0.134$ ; 泳道 4 为 40 mg 组, 像素值为  $1.097 \pm 0.138$ ; 泳道 5 为 RNA 生理盐水阴性对照组( $n = 3$ )

Fig 1 Electrophoretogram of VEGF mRNA: Pathway 1 was control group pixel value  $0.483 \pm 0.004$ . Pathway 2 was 10 mg group, pixel value  $0.870 \pm 0.005$ . Pathway 3 was 20 mg group, pixel value  $1.120 \pm 0.134$ . Pathway 4 was 40 mg group, pixel value  $1.097 \pm 0.138$ . Pathway 5 was RNA saline negative control group( $n = 3$ )

**2.3 丹仙康骨胶囊对成骨细胞内 VEGF 生成的影响** 细胞在 10% FCS 的 DMEM 培养液中生长至 80% 溶合, 去血清 24 h, 分别加入不同剂量的丹仙康骨胶囊液(10、20、40 mg/ml) 孵育 48 h 后, 收集细胞用流式细胞仪检测细胞内 VEGF 的含量, 以荧光强度(MFI) 表示含量的多少。结果丹仙康骨胶囊液刺激 48 h, 与对照组比较荧光曲线右移, 平均荧光强度(MFI) 增加, 表明丹仙康骨胶囊能显著增加( $P < 0.05 \sim 0.01, n = 3$ ) 成骨细胞内 VEGF 的生成, 其作用呈剂量依赖性(见图 2)。

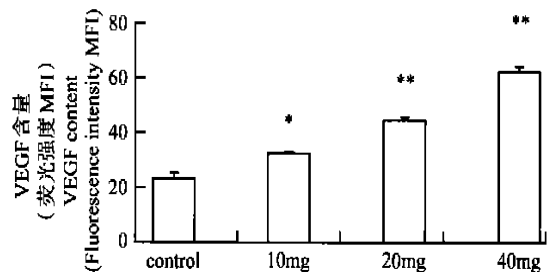


图 2 VEGF 生成比较(以荧光强度 MFI 表示,  $n = 3$ ): 对照组为  $23.46 \pm 1.91$ ; 10 mg 组为  $32.64 \pm 0.66$ ; 20 mg 组为  $62.32 \pm 1.98$

Fig 2 Comparison of VEGF production(fluorescence intensity MFI,  $n = 3$ ): Control group  $23.46 \pm 1.91$ , 10 mg group  $32.64 \pm 0.66$ , 20 group  $62.32 \pm 1.98$

## 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, 血管生成在骨坏死的修复中起着十分重要

的作用。丹仙康骨胶囊以活血补肾为主, 临床与实验均证明其具有明显的抗骨坏死作用<sup>[1]</sup>。

VEGF 又称血管通透因子, 是一种肝素结合型的同源二聚体蛋白, 由于剪接方式的不同, 人 VEGF 有多种形式存在, 即 VEGF165、121、189、206; 鼠 VEGF 比人的少一个氨基酸。众多资料<sup>[3, 4]</sup>表明 VEGF 对正常组织细胞的生长、发育及修复过程中血管的生成均起重要作用。VEGF 基因缺陷的鼠胚胎, 由于血管生成障碍而死亡。任何组织的修复都离不开血管的生成, 骨组织也一样。VEGF 在骨组织的新陈代谢中也起着十分重要的作用, 对成骨细胞与破骨细胞均能影响。在软骨化骨中, 肥大软骨细胞高表达 VEGF 时, 毛细血管也随着长入<sup>[3, 4]</sup>。Martine 等<sup>[5]</sup>发现, 鼠成骨细胞在分化过程中存在 VEGF 及其受体表达, 具有促进成骨细胞分化作用的 IGF-1 可刺激提高 VEGF 及其受体的表达水平。定向钙化性的 1-25 羟 V<sub>D3</sub> 与促进成骨的 TGF-β、FGF 等均能上调 VEGF 在成骨细胞上的表达<sup>[6]</sup>。VEGF 也能调节成骨细胞的分化, 把 VEGF 掺入培养的胎牛成骨细胞中, 能诱导其迁移、PTH 依赖性 cAMP 堆积与 ALP 的增多<sup>[7]</sup>。在基因缺陷的骨硬化症鼠注入 VEGF 可诱导破骨细胞的聚集<sup>[8]</sup>。Mari 等<sup>[9]</sup>报道 VEGF 能直接促进破骨细胞性骨吸取与成熟破骨细胞的生存。实验中发现 VEGF 能使胎兔破骨细胞在牙片上产生的骨陷窝面积增大, 破骨细胞存在 VEGF 受体表达, 同时在促进破骨细胞分化时还激活了 NF-κB (RANRL) 的受体。由此可见, VEGF 可能通过自分泌与旁分泌方式作用于成骨细胞与破骨细胞, 从而调节血管的生成, 在骨组织的再生、修复过程中发挥非常重要的作用。

本研究结果发现, 丹仙康骨胶囊具有明显促进成骨细胞 VEGF 的表达和生成, 并呈剂量依赖性。联系 VEGF 在调节成骨细胞、破骨细胞的活性及其血管生成方面的作用, 结合早期丹仙康骨胶囊抗股骨头坏死的临床与实验结果, 认为丹仙康骨胶囊促进成骨细胞 VEGF 的表达和生成可能是改善血管生成、促进骨坏死修复的作用机制之一。至于对破骨细胞有无作用还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 刘日光, 沈冯君. 丹仙康骨胶囊对培养成骨细胞影响的观察. 中国骨伤, 2004, 17(2): 77-79.
- 2 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.
- 3 Mariella FC, Silvia C, Ranieri C, et al. Vascular endothelial growth factor in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: A paracrine role during endochondral bone formation. J Cell Sciences, 2000, 113: 59.
- 4 Marta G, Garcia Ramirez, Nuria N, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. J Bone Mineral Res, 2000, 15(3): 534.
- 5 Martine ML, Deckers, Marcel K, et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. Endocrinology, 2000, 141(5): 1667.
- 6 Chu Changchua, Ronad C, Hamdy, et al. Mechanism of TGF-β1-induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblast Mc3T3-E1 cells. BBA, 2000, 1497: 69.
- 7 Midy V, Pbuat J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199: 380.
- 8 Shumpei N, Masato K, Hitoshi A, et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med, 1999, 190(2): 293.
- 9 Mari N, Toshio K, Toshiya A, et al. Vascular endothelial growth factor directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS, 2000, 473: 161.

(收稿日期: 2003-04-21 本文编辑: 李为农)

• 读者• 作者• 编者•

本刊关于参考文献著录和核对的要求

参考文献必须以作者亲自阅读过的近年主要文献为限, 并由作者对照原文核定。参考文献中的作者, 1~3 名全部列出, 3 名以上只列前 3 名, 后加“等”。外文期刊名称用缩写; 中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页, 只占 1 页的文献, 给出所在页即可。将参考文献按引用先后顺序采用顺序编码著录, 用阿拉伯数字排列于文末。[期刊]: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起页-止页. 例: 温建民, 桑志成, 钟红刚, 等. 正常足与 外翻足前足承重比例与距骨头下压力的研究. 中国骨伤, 2003, 17(11): 641-643. [专著]: 作者. 书名. 版次(第 1 版不标注). 出版地: 出版者, 出版年. 起页-止页. 例: 王亦璁. 骨与关节损伤. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 1031-1032. [专著中析出文献]: 析出责任者. 析出题名. 见: 原文献责任者 原文献题名. 版次. 出版地: 出版者, 出版年. 起页-止页. 例: 朱通伯. 脊柱及骨盆骨折. 见: 裘法祖, 孟承伟. 外科学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 792-806.