

· 基础研究 ·

# 强骨宝方载药血清灭活与否对成骨细胞增殖功能的影响

陈智能<sup>1</sup>, 苏友新<sup>2</sup>, 杨连梓<sup>2</sup>, 郑良朴<sup>3</sup>, 林久茂<sup>3</sup>, 王培清<sup>4</sup>

(1. 杭州市萧山骨伤医院, 浙江 杭州 311261; 2. 福建中医学院骨伤系; 3. 福建中医学院中心实验室; 4. 福建省中医研究院检验科)

**【摘要】** 目的: 探讨强骨宝方糖尿病鼠血清灭活与否对成骨细胞增殖的影响。方法: 采用胰蛋白酶-Ⅱ型胶原酶消化法从 1~2 日龄 SD 大鼠颅盖骨中分离出成骨细胞, 倒置显微镜下观察其形态, 碱性磷酸酶(ALPase)染色法、钙化结节染色、Van-Gieson 染色鉴定细胞后用灭活和不灭活的不同时效(灌胃 3、5 d, 末次灌胃 1、3 h)、不同浓度(5%、10%、20%)的强骨宝方糖尿病模型鼠血清加入成骨细胞培养体系, 作用一定的时间, 应用 MTT 比色法检测载药血清灭活对成骨细胞增殖能力的影响。结果: 强骨宝方灌胃 3、5 d, 末次灌胃 1、3 h 的 5%、10%、20% 糖尿病鼠不灭活血清与灭活组相比差异有统计学意义, 以不灭活载药血清对成骨细胞增殖功能的促进作用较强( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论: 强骨宝方糖尿病模型鼠血清灭活与否影响成骨细胞的增殖功能, 以不灭活载药血清的作用最佳。

**【关键词】** 成骨细胞; 细胞增殖; 血清学试验; 中药疗法

**Experimental study on the effects of inactivated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) on the proliferation of osteoblast cultured in vitro** CHEN Zhi-neng\*, SU You-xin, YANG Lian-zi, ZHENG Liang-pu, LIN Jiu-mao, WANG Pei-qing. \*The Traumatology and Orthopaedics Hospital of Xiaoshan, Hangzhou 311261, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of inactivated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) on the proliferation of osteoblast cells (OB) cultured in vitro. **Methods:** OB was isolated from the skull of newly born SD rats aged 1 to 2 days by means of Trypsin-collagenase digestion and identified by image analysis under inverted microscope, V-G collagen staining, ALP staining, calcification nod staining etc. After the OB was identified, in activated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with *Qianggubao* decoction (强骨宝方) of different phase (rats were fed with medicine 3 days or 5 days after last fed with medicine 1 hour or 3 hours) and concentration (5%, 10%, 20%) were added to the OB and incubated. After determined times, the effects of the proliferation of osteoblasts

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(编号: 2001J062)

通讯作者: 陈智能 Tel: 0571-82239093 E-mail: czneng@126.com

脊髓结构, 从而将损伤的神经传导通路重建。

本研究在形态学方面证实神经干细胞移植可促进轴浆运输的恢复, 具体治疗机制及肢体功能的恢复还有待深入研究。

### 参考文献

- 1 Park KI, Himes BT, Stieg PE, et al. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement; evidence from engraftment of neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol*, 2006, 199(1): 179-190.
- 2 王岩峰, 吕刚, 李雷, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子及生长相关蛋白 43 基因表达的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(6): 416-419.
- 3 王岩峰, 吕刚, 刁延娜, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后 PLP 基因表达的影响. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13(4): 605-607.

- 4 Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, et al. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 48(2): 211-219.
- 5 Nakamura M, Toyama Y, Okano H. Transplantation of neural stem cells for spinal cord injury. *Rinsho Shinkeigaku*, 2005, 45(11): 874-876.
- 6 Lu P, Jones LL, Snyder EY, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003, 181(2): 115-129.
- 7 Profyris C, Cheema SS, Zang D, et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 2004, 15: 415-436.

(收稿日期: 2007-11-14 本文编辑: 连智华)

were detected by MTT analysis. **Results:** There was significant difference between un-inactivated pharmaco-serum and inactivated pharmaco-serum on the proliferation of osteoblasts, and un-inactivated serum had stronger effects to improve the proliferation of osteoblasts ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Un-inactivated and inactivation pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) can influence the proliferation of, and the un-inactivated pharmaco-serum has stronger effects.

**Key words** Osteoblasts; Cell proliferation; Serologic tests; Treatment with Chinese herbs

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(6):429-431 www.zggszz.com

现已明确, 长期的高血糖状态是引发和形成糖尿病各种慢性并发症的主要危险因素<sup>[1]</sup>。我们先前的研究也发现, 高血糖状态抑制体外培养成骨细胞的增殖、分化与矿化功能<sup>[2]</sup>。强骨宝方防治糖尿病性骨质疏松 (diabetes osteoporosis, DOP) 疗效确切, 其作用机制之一与提高成骨和矿化能力有关<sup>[3]</sup>。然而在糖尿病机制下的强骨宝作用的细胞学机制尚未明了, 且疾病模型载药血清的制备和处理也较难控制。模型动物血清添加额外的施加因素比单纯动物血清对实验对象的干预具有更复杂的机制, 不但考虑一般血清药理学所遇到的问题, 还要对模型状态下的血清药理学作一考虑, 因此本实验拟从高血糖模型下制备载药血清和细胞培养的方法来探讨强骨宝方糖尿病模型鼠血清灭活与否对成骨细胞增殖功能的影响, 并且探讨处理模型血清的若干问题。

1 材料与方法

1.1 试剂 II 型胶原酶、胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐 (MTT 试剂) 购自 Sigma 公司, 葡萄糖氧化酶测定试剂由福建省中医药研究院生化检验科提供, 强骨宝组方药材购自福州市药材公司。

1.2 仪器 荧光倒置显微镜 (IX70, 日本 Olympus), CO<sub>2</sub> 培养箱 (GBB16, 德国 Hearas), FL200 半自动生化检测仪 (日本日

立), ELX808 酶联免疫检测仪 (美国 BIO-TEK)。

1.3 强骨宝载药血清的制备

1.3.1 强骨宝提取液的制备 将生药 (生黄芪、鹿角胶、煅牡蛎、怀山药、五味子、丹参、山茱萸、石斛、骨碎补、桑寄生等) 加水煎 3 次, 纱布过滤并 3 次合一, 继续加热浓缩制成每毫升含生药 1 g 的药液, 4℃保存备用。

1.3.2 载药血清的制备 取 SD 大鼠 75 只, 雌雄各半, 适应性饲养 1 周后, 给予四氧嘧啶 (Aollern) 120 mg/kg, 隔日 2 次腹腔注射, 第 5、7、9 天后剪尾采血, 应用葡萄糖氧化酶比色法测大鼠血糖  $\geq 13.9$  mmol/L 则认为糖尿病模型成功。成功模型随机按中药灌胃时间及血清制备时间分为 3 d 1 h 组、3d 3 h 组、5 d 1 h 组、5 d 3 h 组, 8 倍临床使用量予大鼠灌胃, 每日 2 次, 间隔 2 h。分别于灌胃 3、5 d, 末次灌胃后 1、3 h, 20% 乌拉坦 0.6 ml/100 g 腹腔注射, 腹主动脉取血, 取血后静置 1 h, 1 800 r/min 离心 20 min, 取上清液。

1.4 成骨细胞 (OB) 的分离、培养、鉴定与分组

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 (医动字第 23-010 (质) 号), SD 大鼠 75 只, 购自中国科学院上海实验动物中心 (沪 2002-0010)。

1.4.2 颅骨成骨细胞的分离、培养 取 1~2 日龄 SD 乳鼠颅

表 1 强骨宝方糖尿病大鼠血清灭活与否对成骨细胞增殖功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab.1 Effects of un-inactivated pharmaco-serum and inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) on the proliferation of osteoblastic cells (OB) cultured in vitro ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度	光密度值 (OD 值)							
		成骨细胞体外培养 48 h				成骨细胞体外培养 72 h			
		中药灌胃 3 d		中药灌胃 5 d		中药灌胃 3 d		中药灌胃 5 d	
	末次灌胃 1 h	末次灌胃 3 h	末次灌胃 1 h	末次灌胃 3 h	末次灌胃 1 h	末次灌胃 3 h	末次灌胃 1 h	末次灌胃 3 h	
非灭活组	20%	0.421 3±	0.326 7±	0.306 5±	0.289 7±	0.415 0±	0.359 2±	0.340 2±	0.316 7±
		0.090 8**	0.112 0*	0.015 2**	0.069 1**	0.014 2**	0.039 9**	0.033 3**	0.024 8**
	10%	0.281 0±	0.265 3±	0.201 2±	0.242 2±	0.304 8±	0.263 8±	0.277 0±	0.257 0±
		0.019 9**	0.023 7**	0.027 8**	0.024 7**	0.028 6**	0.004 9**	0.019 0**	0.013 1*
	5%	0.216 0±	0.217 3±	0.219 3±	0.238 3±	0.268 3±	0.253 2±	0.236 7±	0.231 2±
		0.040 0**	0.028 7**	0.052 0*	0.032 6**	0.045 6	0.013 0**	0.006 9**	0.013 6**
灭活组	20%	0.215 5±	0.209 8±	0.198 7±	0.158 3±	0.327 3±	0.264 2±	0.231 3±	0.273 2±
		0.079 7	0.031 0	0.026 3	0.030 3	0.022 5	0.020 1	0.009 4	0.016 0
	10%	0.181 0±	0.181 0±	0.130 0±	0.146 8±	0.243 8±	0.219 0±	0.200 5±	0.237 8±
		0.021 5	0.030 0	0.026 9	0.020 2	0.011 0	0.010 5	0.014 4	0.015 1
	5%	0.130 5±	0.139 3±	0.157 8±	0.160 0±	0.246 7±	0.192 5±	0.166 2±	0.186 3±
		0.018 7	0.026 6	0.026 4	0.037 9	0.024 4	0.012 8	0.011 4	0.015 6

注: 与灭活组相比, \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$

Note: Compared to inactivation group, \*\*  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$

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% CO<sub>2</sub> 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,组织化学对细胞爬片分别进行 V-G 胶原染色、ALPase 染色、矿化结节茜素红染色。

**1.4.5 分组** 取 2~8 代成骨细胞,2×10<sup>4</sup>/ml 的细胞密度接种于 96 孔培养板,经同步化后,分为不同时效(灌胃 3,5 d,末次灌胃 1,3 h)、不同浓度(5%、10%、20%)灭活与非灭活 2 大组,共 24 组。灭活组在 10% NCS α-MEM 培养体系中分别加入终浓度为 5 d 1 h 5%、5 d 1 h 10%、5 d 1 h 20%、5 d 3 h 5%、5 d 3 h 10%、5 d 3 h 20%、3 d 1 h 5%、3 d 1 h 10%、3 d 1 h 20%、3 d 3 h 5%、3 d 3 h 10%、3 d 3 h 20% 的灭活强骨宝方糖尿病模型鼠血清,非灭活组用不灭活上述分组强骨宝方糖尿病模型鼠血清的培养基培养,每孔 0.1 ml,培养 48、72 h。

**1.5 观测项目与方法** 观测成骨细胞体外不同培养时间在灭活与非灭活不同时效、不同浓度载药血清添加下的增殖功能。采用四唑盐(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,PBS 液洗 3 次,分别加入用 PBS 液配制的 5 g/ml MTT 液 20 μl/孔,结束后弃去培养上清液,加入二甲基亚砷(DMSO)每孔 100 μl 振荡 15 min,待紫色结晶完全溶解后,在酶标仪上、波长 490 nm,测定各孔的光密度值(optical density, OD 值)。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,采用成组设计定量资料两样本均数比较的 *t* 检验进行统计处理。

## 2 结果

**2.1 原代及传代 OB 形态学观察** 培养第 1 天细胞数量较多,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,有较多突起互相连接;细胞汇合时呈铺石状,并可重叠生长。符合 OB 的形态学特征。

**2.2 OB 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 ALPase 活性;矿化结节茜素红染色可见矿化结节形成。符合 OB 的功能学特征。

**2.3 强骨宝方不同时效与量相糖尿病大鼠血清灭活与否对成骨细胞增殖功能的影响** 见表 1。表 1 显示:成骨细胞培养 48 h 时,强骨宝方糖尿病大鼠血清各不灭活组与灭活组对成骨细胞增殖功能影响差异均有统计学意义( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。非灭活 3 d 1 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比,差异均有统计学意义( $t=5.771, P<0.01; t=8.360, P<0.01; t=4.739, P<0.01$ );非灭活 3 d 3 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组比,差异均有统计学意义( $t=2.463, P<0.05; t=4.830, P<0.01; t=4.877, P<0.01$ );非灭活 5 d 1 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比差异均有统计学意义( $t=2.748, P<0.01; t=4.506, P<0.01; t=2.584, P<0.05$ );非灭活 5 d 3 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比差异均有统计学意义

( $t=4.266, P<0.05; t=7.308, P<0.01; t=3.839, P<0.01$ )。

成骨细胞培养 72 h 时,强骨宝方糖尿病大鼠血清各不灭活组与灭活组对成骨细胞增殖功能影响差异有或无统计学意义( $P<0.01, P<0.05$  或  $P>0.05$ )。非灭活 3 d 1 h 20% 和 10% 组与灭活组相比差异有统计学意义( $t=8.069, P<0.01; t=4.872, P<0.01$ ),非灭活 5% 组与灭活组相比差异无统计学意义( $t=1.026, P>0.01$ );非灭活 3 d 3 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比差异均有统计学意义( $t=5.209, P<0.01; t=9.453, P<0.01; t=8.175, P<0.01$ );非灭活 5 d 1 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比差异均有统计学意义( $t=7.705, P<0.01; t=7.866, P<0.01; t=11.193, P<0.01$ );非灭活 5 d 3 h 20%、10% 和 5% 组与灭活组相比差异均有统计学意义( $t=3.608, P<0.01; t=2.345, P<0.05; t=5.298, P<0.01$ )。

## 3 讨论

MTT 比色法是由 Mosman 建立的一种快速测定细胞增殖的方法,与细胞内 DNA 的合成呈正相关,其特点是灵敏度高、重复性好,与其检测细胞活性的方法如细胞计数法、软琼脂克隆形成试验、3H-TdR 掺入试验等有良好的相关性<sup>[4]</sup>。所以应用 MTT 法进行载药血清疗效的筛选具有很高的实用价值。

机体不同疾病状态影响药物体内代谢,疾病模型血清本身以及其在探索药物的药理作用和机制中不容忽视,为了与临床患者用药的实际情况相符,宜采用病理状态下的动物制备载药血清<sup>[5]</sup>。对于疾病模型血清药理来说,不仅要看到即时血清,更要看到病理状态下的药物转化血清,或许更符合真实情况。然而疾病模型载药血清较单纯载药血清更复杂,在应用时不得不对血清处理方面的探索,以求更好地应用疾病模型载药血清反映中药复方在体外对细胞功能的影响。我们根据给药通法并综合中药半衰期方面的考虑(3 d 或 5 d),结合中药即时吸收的成分(1 h)、可能转化的成分(3 h)来进行设计和探讨<sup>[5]</sup>;在血清处理方面,采用灭活与不灭活血清。本实验结果显示,虽然血清中可能存在的补体和抗体成分对细胞产生免疫反应和细胞毒性,但是在疾病模型状态特别是糖尿病模型状态下对细胞的影响可能居于次要地位,灭活可能损耗药物血清的有效成分,破坏载药血清有效成分的结构和状态,从而对细胞的功能产生较大的影响,产生实验误差。特别在对于疾病状态下如糖尿病状态,细胞膜的稳定性与血糖水平以及病理机制下的反应需要探讨,实验条件的摸索必不可少,对于血清是否需要特殊的处理方法,不能完全参照文献方法。

## 参考文献

- 1 Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11(9): 1205-1223.
- 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 黄柏英,彭聪,祝和成. 应用 MTT 比色法评价新生小牛血清对培养细胞生长的影响. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(2): 236-237.
- 5 陈智能,苏友新,杨连梓. 疾病模型血清药理学及其在骨代谢研究中的若干问题. 中国骨伤, 2007, 20(1): 41-43.

(收稿日期:2007-11-23 本文编辑:连智华)