

## 酢浆草提取物对成骨细胞增殖及分化的影响

刘晓艳<sup>1</sup>, 董莉<sup>1</sup>, 刘亭<sup>1</sup>, 李靖<sup>2</sup>, 刘俊宏<sup>2</sup>, 席晓岚<sup>1</sup>, 王永林<sup>1\*</sup>

(1. 贵阳医学院药学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵阳医学院民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**探讨酢浆草水提物对体外培养的成骨细胞增殖、分化和矿化的影响。**方法:**不同质量浓度酢浆草水提物(10, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup>)作用人成骨肉瘤细胞株 SaOS-2 后, MTT 法测定细胞增殖情况、磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 法检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 法检测钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 和骨钙素 (OTC) 的分泌以及用茜素红染色法测定成骨细胞矿化结节数。**结果:**与空白组比较, 酢浆草水提物能明显促进 SaOS-2 细胞的生长 ( $P < 0.01$ ); ALP 活性呈时间依赖性增加 ( $P < 0.05$ ), 以 100 mg·L<sup>-1</sup> 剂量组最为显著 ( $P < 0.01$ ); 增强了细胞分泌 Ca<sup>2+</sup> ( $P < 0.05$ ) 和 OTC 的能力 ( $P < 0.01$ ); 并且酢浆草中、高剂量组可以明显促进矿化结节形成 ( $P < 0.05$ )。**结论:**酢浆草水提物在体外可以促进成骨细胞的增殖、分化和矿化, 提示酢浆草可能具有促进骨形成的能力。

**[关键词]** 酢浆草; 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0117-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010117

### Effect of *Oxalis corniculata* on Cell Proliferation and Differentiation in Human Osteoblast-like SaOS-2 Cells

LIU Xiao-yan<sup>1</sup>, DONG Li<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, LIU Jun-hong<sup>2</sup>, XI Xiao-lan<sup>1</sup>, WANG Yong-lin<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (Ministry of Education), Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate *in vitro* effects of water extract components of *Oxalis corniculata* on cell proliferation and differentiation in human osteoblast-like SaOS-2 cells. **Method:** SaOS-2 cells were treated with different concentrations (10, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup>) of water extract components, and then cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity were measured by MTT assay and *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) method respectively, secretions of Ca<sup>2+</sup>, osteocalcin (OTC) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and osteoblast mineralization nodules were measured by alizarin red staining method. **Result:** Compared with control group, water extract components of *O. corniculata* significantly promote proliferation of SaOS-2 cells ( $P < 0.01$ ), and it can also increase ALP activity in time-dependent manner ( $P < 0.05$ ), especially at the concentration of 100 mg·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ). Moreover, it can increase secretion of Ca<sup>2+</sup> ( $P < 0.05$ ) and OTC ( $P < 0.01$ ), and significantly promote formation of osteoblast mineralization nodules ( $P < 0.05$ ) at high and medium concentration. **Conclusion:** Water extract components of *O. corniculata* can promote proliferation, differentiation and mineralization of osteoblast. These results suggest that *O. corniculata* can promote bone formation.

**[Key words]** *Oxalis corniculata*; osteoblast; proliferation; differentiation; mineralization

**[收稿日期]** 20140809(001)

**[基金项目]** 贵州省中药现代化研究开发专项(黔科合中药字[2013]50191, 黔科合重 G 字[2013]4001); 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2011]2291 号; 贵州省高等学校创新能力提升计划(黔科合协同创新字[2013]04)

**[第一作者]** 刘晓艳, 在读硕士, Tel:18786706750, E-mail:liuxy\_25@163.com

**[通讯作者]** \*王永林, 教授, 博士生导师, Tel:0851-6908899, E-mail:gywyl@emc.edu.cn

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨量减少, 骨显微结构退变, 并伴骨脆性增加, 骨强度下降, 易于发生骨折的疾病。近年来, OP 已成为威胁中老年人健康的问题之一<sup>[1]</sup>。酢浆草是酢浆草科酢浆草属多年生宿根草本植物。全草均可入药, 其性寒、味酸, 归肝、小肠经。具有清热解毒、平肝定惊、消炎止痛、利湿消肿、凉血散瘀之功效<sup>[2]</sup>。酢浆草主要成分为黄酮、 $\beta$ -谷甾醇、胡萝卜苷、草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸等, 且其干燥草中的总黄酮含量高达 2.22%<sup>[3-4]</sup>, 具有较好的抗炎、抗病毒和抑菌作用。目前, 尚未见酢浆草抗骨质疏松作用的相关报道。而在前期研究中, 笔者发现酢浆草水提物可明显促进成骨细胞的增殖, 这意味着酢浆草可影响成骨细胞的骨形成过程, 可能具有抗骨质疏松的潜力。因此, 本实验用酢浆草水提物作用 SaOS-2 细胞, 研究其是否具有诱导成骨细胞分化成熟的功效, 为进一步研究其抗骨质疏松药效研究提供理论和实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞系** 人成骨肉瘤细胞 SaOS-2 (购于武汉博士德科技生物有限公司)。

**1.2 试剂** McCoy's 5a 培养基 (武汉博士德科技生物有限公司, 批号 PYG0026), 胎牛血清 (FBS, 批号 8199549)、胰蛋白酶 (批号 1268598)、青霉素-链霉素 (批号 15140-122) 均购自 Gibco 公司, 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (南京建成生物科技股份有限公司, 批号 A059-2), 维生素 D<sub>3</sub> (批号 318A034), MTT (批号 410C057), Triton X-100 (批号 T8200-100), (均购自 Solarbio 公司), 哺乳动物蛋白抽提试剂盒 (批号 CW0889), BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 CW0014), (均为中国康为世纪公司), 人钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) ELISA 试剂盒 (批号 E01C1177), 人骨钙素 ELISA 试剂盒 (批号 10100001), (均为上海蓝基公司), 茜素红 (Sigma 公司, 批号 WXBB2120V)。

**1.3 仪器** 数显立式压力蒸气灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗仪器厂), 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司), CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Thermo scientific 公司), Allegra 64R 冷冻高速离心机 (美国 Beckman), TS-100F 荧光倒置显微镜 (日本尼康公司), D680 酶标仪 (Bio-Rad, 中国)。

## 2 方法

**2.1 酢浆草水提物的制备** 取酢浆草 *Oxalis corniculata* 药材, 加 8 倍量的水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 药液过滤, 合并煎液后浓缩干燥, 即得酢浆草水提

物。用 DMSO 配置成每 1 mL 含 1 g 生药量的溶液, 于 -20 °C 保存备用, 实验时用培养基稀释至相应终浓度 (DMSO 含量 < 0.5%)。

**2.2 细胞培养** SaOS-2 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 McCoy's 5a 培养基于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 每隔 1 天换液 1 次, 当细胞汇合至 80% ~ 90% 时进行传代。

**2.3 细胞增殖检测** 以  $1 \times 10^4$  个/孔将 SaOS-2 细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后换液 (100  $\mu$ L/孔)。空白组加入不含药培养基, 给药组分别加入含有生药质量浓度为 1, 10, 100, 200, 400, 500 mg·L<sup>-1</sup> 酢浆草水提物的培养液。阳性药组为含 30 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 D<sub>3</sub> 的培养液。每个浓度设 5 个复孔。换液继续培养 48 h 或 72 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT (5 g·L<sup>-1</sup>), 继续培养 4 h 后弃去培养液。每孔再加入 DMSO 100  $\mu$ L, 用酶标仪在 490 nm 波长处检测各组吸光度值 A。

**2.4 ALP 活性测定** 以  $10 \times 10^4$  个/孔将 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 更换为含药的培养基, 各给药组终质量浓度分别为 10 mg·L<sup>-1</sup> (低浓度), 100 mg·L<sup>-1</sup> (中浓度), 200 mg·L<sup>-1</sup> (高浓度) 的酢浆草水提物。空白组为不含药培养基, 阳性药组为含 30 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 D<sub>3</sub> 的培养液。每组设 5 个复孔。继续培养 48 h 或 72 h 后, 吸去上清培养液, 用 PBS 液洗涤 2 次, 加入 200  $\mu$ L 0.1% Triton X-100, 冰浴 10 min。取上清液按 ALP 试剂盒中所述方法测定 ALP 活性, 同时采用 BCA 法测定细胞裂解液中的蛋白质含量, 以计算每克蛋白质中 ALP 的活性。

**2.5 钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 和骨钙素 (OTC) 的检测** 以  $10 \times 10^4$  个/孔将 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 更换为各组含药培养基。每组设 5 个复孔。分别在培养 48 h 或 72 h 后, 吸去培养液, 用 PBS 液洗涤 2 次, 加入 200  $\mu$ L 哺乳动物蛋白抽提试剂, 冰浴 10 min。取上清液用人钙离子 ELISA 试剂盒和人骨钙素 ELISA 试剂盒分别测定 Ca<sup>2+</sup> 及 OTC 含量。

**2.6 成骨细胞矿化结节数测定** 以  $30 \times 10^4$  个/孔将 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后, 更换为各组含药培养基, 隔天换液, 连续观察 14 d。待形成大量的矿化结节后, 吸去上清液, 用 PBS 洗涤 2 次, 95% 乙醇固定 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 0.1% 茜素红-Tris-HCl (pH 8.3) 于 37 °C 染色 30 min, 再用蒸馏水洗涤、干燥, 最后于显微镜 (400 倍) 下观察每个

孔矿化结节的数目。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件对本实验数据进行处理, 各组数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用单因素方差分析进行组间比较。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 细胞增殖情况及对 ALP 活性的影响** 与空白组比较,  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的酢浆草给药组细胞增殖活性无明显变化。  $10, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的酢浆草给药组细

胞增殖活性显著增高 ( $P < 0.01$ )。 酢浆草质量浓度至  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, SaOS-2 细胞的增殖被明显抑制 ( $P < 0.01$ ), 随着剂量增大产生一定毒性。 故以  $10, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为实验组酢浆草水提物的低、中、高浓度, 见表 1。 ALP 检测结果表明,  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  酢浆草作用 48 h 后, SaOS-2 细胞中的 ALP 水平明显上升 ( $P < 0.05$ )。 其余各给药组在 48 h 或 72 h 后的 ALP 水平均呈现非常显著的升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 酢浆草水提物对 SaOS-2 细胞增殖及 ALP 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖/%		ALP/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	
		48 h	72 h	48 h	72 h
空白	-	100.0 ± 0.5	100.0 ± 0.3	411.6 ± 15.5	647.5 ± 16.4
维生素 D <sub>3</sub>	30	119.0 ± 0.8 <sup>2)</sup>	122.9 ± 0.9 <sup>2)</sup>	945.2 ± 25.6 <sup>2)</sup>	1 495.4 ± 33.9 <sup>2)</sup>
酢浆草	1	99.9 ± 0.8	99.4 ± 0.7	-	-
	10	104.6 ± 0.4 <sup>2)</sup>	106.6 ± 0.4 <sup>2)</sup>	495.8 ± 11.4 <sup>1)</sup>	971.9 ± 22.6 <sup>2)</sup>
	100	112.9 ± 0.8 <sup>2)</sup>	118.7 ± 0.6 <sup>2)</sup>	831.7 ± 20.8 <sup>2)</sup>	1 453.6 ± 37.6 <sup>2)</sup>
	200	108.4 ± 0.4 <sup>2)</sup>	110.3 ± 0.5 <sup>2)</sup>	578.1 ± 16.2 <sup>2)</sup>	1 399.3 ± 29.4 <sup>2)</sup>
	400	94.5 ± 0.3 <sup>2)</sup>	92.9 ± 0.7 <sup>2)</sup>	-	-
	500	92.1 ± 0.6 <sup>2)</sup>	90.8 ± 0.5 <sup>2)</sup>	-	-

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.2 钙离子检测** 与空白组比较,低、中、高质量浓度的酢浆草水提物均对成骨细胞钙离子的分泌有非常明显的促进作用 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 酢浆草水提物对成骨细胞  $\text{Ca}^{2+}$  分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 The effects of water extraction of *O. corniculata* on the  $\text{Ca}^{2+}$  secretion in human osteoblast-like SaOS-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{Ca}^{2+}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
		48 h	72 h
空白	-	25.25 ± 1.47	36.78 ± 3.43
维生素 D <sub>3</sub>	30	181.37 ± 3.35 <sup>2)</sup>	243.05 ± 5.20 <sup>2)</sup>
酢浆草	10	82.22 ± 3.13 <sup>2)</sup>	120.61 ± 5.65 <sup>2)</sup>
	100	172.95 ± 5.45 <sup>2)</sup>	184.95 ± 4.52 <sup>2)</sup>
	200	131.27 ± 4.17 <sup>2)</sup>	154.61 ± 3.85 <sup>2)</sup>

**3.3 骨钙素检测及对成骨细胞矿化结节数目影响** 与空白组比较, 酢浆草低质量浓度组对骨钙素分泌无明显影响, 中、高质量浓度组可增加骨钙素的分泌 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 见表 3。 培养 14 d 后, 给药组矿化结节染色结果呈阳性, 与空白组比较, 低质量浓度的酢浆草具有增加成骨细胞矿化结节的趋

势。 中、高质量浓度组的矿化结节数目及其所占板底的表面积明显高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 见表 3, 图 1。

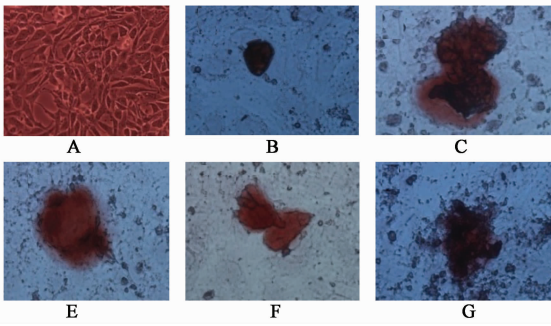
表 3 酢浆草水提物对成骨细胞 OTC 分泌及矿化结节数目的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 The effects of water extraction of *O. corniculata* on the OTC secretion and the mineralization nodules in human osteoblast-like SaOS-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	OTC/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		矿化结节/个 14 d
		48 h	72 h	
空白	-	11.4 ± 0.6	15.6 ± 0.6	4.2 ± 0.6
维生素 D <sub>3</sub>	30	16.5 ± 0.5 <sup>2)</sup>	21.5 ± 0.4 <sup>2)</sup>	9.6 ± 0.5 <sup>1)</sup>
酢浆草	10	13.6 ± 0.7	16.7 ± 0.3	-
	100	14.5 ± 0.8 <sup>1)</sup>	19.2 ± 0.5 <sup>1)</sup>	-
	200	15.1 ± 0.1 <sup>2)</sup>	18.5 ± 0.5 <sup>2)</sup>	8.9 ± 0.4 <sup>1)</sup>

### 4 讨论

骨质疏松是严重威胁中老年人健康的常见病和多发病, 给家庭和社会带来沉重的经济负担。 骨质疏松的发病原因主要是由于骨代谢过程中骨转换的失衡<sup>[5]</sup>。 成骨细胞和破骨细胞是骨形成与骨重建过程中两种功能相反却又互相依存的细胞, 成骨细



A. 体外培养 3 d 后的成骨细胞; 细胞成骨诱导培养 14 d 后, 钙结节茜素红染色后细胞中出现橘红色矿化结节; B. 空白组; C. 维生素 D<sub>3</sub> 30 mg·L<sup>-1</sup> 组; D. 酢浆草 10 mg·L<sup>-1</sup> 组; E. 酢浆草 100 mg·L<sup>-1</sup> 组; F. 酢浆草 200 mg·L<sup>-1</sup> 组

图 1 SaOS-2 细胞形态及成骨诱导 (×400)

Fig. 1 Morphology of SaOS-2 cell as well as osteogenic induction (×400)

胞数量不足或活力低下,不能有效地填充因破骨细胞骨吸收而形成的空腔,久之便造成骨质疏松<sup>[6]</sup>。因此防治骨质疏松症的关键之一是提高成骨细胞的增殖能力和分化水平。成骨细胞的发育过程分为细胞增殖、细胞外基质成熟及矿化 3 个阶段。在细胞增殖阶段,调控细胞周期和生长的基因表达旺盛,同时分泌细胞外基质;进入细胞外基质成熟阶段后,细胞中 ALP 活性升高。ALP 作为成骨细胞的功能标记物,其活性的升高是成骨细胞分化的早期标志<sup>[7-9]</sup>;在矿化发生阶段,骨钙素表达增加。本文研究发现:酢浆草质量浓度为 10, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 时可促进细胞增殖,1 mg·L<sup>-1</sup> 对细胞增殖无影响,而 400 mg·L<sup>-1</sup> 时抑制细胞增殖,且随着剂量增大产生一定细胞毒性。相较于空白组,酢浆草水提物可显著升高 ALP 活性水平,提示酢浆草水提物能够促进早、中期成骨细胞的分化,并加快其成熟速度。

有研究报道, Ca<sup>2+</sup> 浓度的增加会促进成骨细胞的生长,促进骨保护素的表达,表明成骨细胞的活性和成骨细胞内钙离子浓度呈正相关关系<sup>[10]</sup>。骨钙素是骨依赖维生素 K 蛋白,参与 Ca<sup>2+</sup> 与羟磷灰石的结合以及促进骨质矿化过程中不可缺少的必要成分<sup>[11]</sup>,其主要生理作用是维持正常骨的矿化速度,常被视为反映细胞功能活动的重要标志<sup>[12-13]</sup>。骨钙素可作为检测成骨细胞的可靠的重要标志之一,骨更新率越快,骨钙素值越高,反之则越低。矿化结节的形成是成骨细胞分化的最后阶段,也是成骨细胞体外成骨的早期标志。本文用酢浆草水提物处理 SaOS-2 细胞,并对其细胞钙含量、骨钙素分泌量和

钙化结节数进行了检测。实验结果发现,酢浆草水提物可呈一定时间依赖性的促进成骨细胞钙离子和骨钙素分泌;并且与空白组相比,中、高浓度酢浆草水提物能促进细胞钙化 (P < 0.05)。

综上所述,我们首次研究了酢浆草水提物对成骨细胞增殖与分化的作用,发现酢浆草水提物在体外可以促进成骨细胞的增殖、分化和矿化。这表明酢浆草水提物中含有促成骨细胞成熟分化的活性物质,提示酢浆草很可能具有抗骨质疏松的药效。

#### [参考文献]

- [1] Wang Q, Zhao B, Li C, et al. Decreased proliferation ability and differentiation potential of mesenchymal stem cells of osteoporosis rat [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(5):358.
- [2] 丁良,李静,杨慧. 酢浆草提取物体外抗氧化活性研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(10):2055-2056.
- [3] 杨红原,赵桂兰,王军宪. 红花酢浆草化学成分的研究[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(4):156-158.
- [4] 谭萍,赵云婵. 黔产酢浆草总黄酮含量的测定及提取方法研究[J]. 山西医药杂志, 2006, 35(5):462.
- [5] 许兵,金红婷,刘慧,等. 补肾活血颗粒对去势大鼠骨组织 Wnt/ $\beta$ -Catenin 通路的影响研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11):3400-3404.
- [5] 翟远坤,牛银波,潘亚磊,等. 柚皮苷对体外培养大鼠颅骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1):105-110.
- [6] 崔燎,邹丽宜,刘钰瑜,等. 丹参水提物和丹参素促进成骨细胞活性和防治泼尼松所致大鼠骨质疏松[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3):286-291.
- [7] 李大为,秦林林. 黄酮类药 Genistei 对原代培养大鼠成骨细胞增殖、分化、钙含量及矿化功能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4):307-310.
- [8] 郭世绂,罗先正,邱贵兴. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津:天津科技出版社, 2001:384-390.
- [9] 樊秦,赵文君,李应东. 华中五味子含药血清对成骨细胞增殖分化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2):33-35.
- [10] Ma S, Yang Y, Carnes D L, et al. Effects of dissolved calcium and phosphorous on osteoblast responses [J]. Oral Implantol, 2005, 31(2):61-67.
- [11] 卢建华,王维佳,何显,等. 红曲有效成分对体外培养成骨细胞增殖分化的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4):552-580.
- [12] Wagner E F. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61:40-22.
- [13] 张晓,张国庆,顾伯林,等. 丹参对成骨细胞骨钙素生成及钙离子浓度的影响[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2013, 15(2):274-277.

[责任编辑 聂淑琴]