

# 不同炮制品入药的青娥丸含药血清 对人成骨细胞增殖、分化及矿化的影响

翁泽斌<sup>1</sup>, 颜翠萍<sup>2</sup>, 张志杰<sup>3</sup>, 高倩倩<sup>1</sup>, 赵根华<sup>1</sup>, 陈志鹏<sup>1</sup>, 蔡宝昌<sup>1</sup>, 李伟东<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 药学院, 南京 210046; 2. 江苏省泰州市药品检验所, 江苏泰州 225300;  
3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100070)

**[摘要]** **目的:**研究以不同炮制品入药的青娥丸含药血清对人成骨细胞增殖、分化和矿化的影响。观察盐炙品及生品青娥丸含药血清对人成骨细胞功能的影响,探讨青娥丸对骨质疏松症的治疗机制,阐述应用盐炙品配伍入药的必要性。**方法:**以绝经后妇女股骨松质骨分离得到的成骨细胞为研究对象,制备以补骨脂和杜仲生品及盐炙品配伍入药的青娥丸,给予大鼠生品及盐炙品青娥丸水提液  $ig(10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1})$ ,给药持续7 d,第7天采集大鼠血液制备含药血清。实验分为空白组、空白血清组、青娥丸含药血清组、盐青娥丸含药血清组。采用MTT法检测各组含药血清对人成骨细胞增殖的影响;同时测量成骨细胞碱性磷酸酶活性来评价各组含药血清对人成骨细胞分化的作用;采用细胞钙茜素红染色方法对给予含药血清处理的人成骨细胞进行染色,观察对人成骨细胞矿化的影响。**结果:**与同浓度空白血清比较,青娥丸的生品和盐炙品的含药血清均有促进成骨细胞增殖的作用 ( $P < 0.05$ ),且含药血清浓度相同时,青娥丸盐炙品含药血清促进成骨细胞增殖的作用优于生品含药血清 ( $P < 0.05$ );青娥丸生品及盐炙品含药血清具有促进成骨细胞分化的作用 ( $P < 0.05$ ),且盐炙品的作用要优于生品 ( $P < 0.01$ );空白血清对成骨细胞的矿化无显著的作用,而青娥丸生品及盐炙品含药血清具有促进成骨细胞矿化结节形成的作用,且盐炙品的作用要优于生品。**结论:**青娥丸能提高成骨细胞增殖、分化及矿化活性,其对于骨质疏松症的治疗作用与其能显著提高成骨细胞功能有关,且盐炙品入药的青娥丸效果较好。

**[关键词]** 青娥丸; 含药血清; 人成骨细胞; 骨质疏松症

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0165-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060165

**Serum Containing Drug of Different Processed Products of Qing'e Pill on Osteoblast Proliferation, Differentiation and Mineralization** WENG Ze-bin<sup>1</sup>, YAN Cui-ping<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-jie<sup>3</sup>, GAO Qian-qian<sup>1</sup>, ZHAO Gen-hua<sup>1</sup>, CHEN Zhi-peng<sup>1</sup>, CAI Bao-chang<sup>1</sup>, LI Wei-dong<sup>1\*</sup> (1. *Nanjing University of Chinese Medicine Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing; Pharmacy College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*; 2. *Taizhou Institute for Food and Drug Control, Tasizhou 225300, China*; 3. *Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study the serum containing drug of different processed products of Qing'e Pill on osteoblast proliferation, differentiation and mineralization. This study was designed to evaluate the promoting effect of serum containing drug of different processed products of Qing'e Pill on human osteoblast and investigate the possible mechanism in the treatment of osteoporosis. **Method:** Osteogenic cells were obtained from the femur in postmenopausal women. Different processed products of Qing'e Pill were performed by using crude and salt-roast *Eucommia ulmoides* and *Psoralea corylifolia*, respectively. Female Sprague Dawley rats were orally administrated with water extract of Qing'e Pill for 7 days. At the end of the administration, serum containing drug was collected. The experiment was divided into the blank group, the blank serum group, the different processed products of Qing'e Pill groups. Cell proliferation was determined by MTT assay. Cell (activity of alkaline phosphatase) ALP activity

**[收稿日期]** 20140919(008)

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学基金重点项目(11KJA360001);江苏省中药学优势学科开放课题(2001ZYX2-010)

**[第一作者]** 翁泽斌, 硕士, 从事中药炮制机制及饮片质量标准研究, E-mail: wengzebin@126.com

**[通讯作者]** \*李伟东, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药炮制机制及饮片质量标准研究, E-mail: liweidong0801@163.com

and mineralized nodule were tested using ELISA. **Result:** Compared to the blank serum group, the different processed products of Qing'e pill could significantly promote human osteoblast proliferation and ALP activity ( $P < 0.05$ ). Moreover, the formation of bone nodules increased in the osteoblasts after 14-day treatment in different processed products of Qing'e pill groups ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the ALP ( $P < 0.01$ ) and mineralization activity results of the salt-roast were better than the crude. **Conclusion:** Qing'e pill could increase proliferation, differentiation and mineralization activities in human osteoblast. Its therapeutic effect of osteoporosis might be involved in increasing the osteogenic function. Comparing to the crude drug, the salt-roast has a better effect in treating osteoporosis.

[**Key words**] Qing'e pill; serum containing drug; human osteoblast; osteoporosis

青娥丸为补肾健骨良方,其最早记载于《太平惠民和剂局方》,它由 4 味中药组成:杜仲(盐炙)、补骨脂(盐炙)、大蒜(蒸熟)、核桃仁(炒)。它具有补肾强腰的功效,常用于肾虚腰痛,起坐不利,膝软乏力<sup>[1]</sup>。因其有良好的补肾健骨的功效,常服之能有效预防和治疗骨质疏松症。近年来研究表明<sup>[2]</sup>,青娥丸能显著提高去卵巢大鼠成骨相关的血清生化指标和骨密度。临床研究发现<sup>[3]</sup>,口服青娥丸能有效治疗绝经后妇女骨质疏松症。目前,对于青娥丸抗骨质疏松症的研究多集中在整体动物药效学实验上,而在细胞水平上研究其对于成骨或破骨细胞功能和代谢的影响还鲜有报道。

青娥丸方中君药杜仲和臣药补骨脂均需盐炙后方能入药,在传统中药炮制理论中,盐炙能增强药物入“肾经”的作用<sup>[4]</sup>。而传统中医理论又认为,“肾主骨,生髓”<sup>[5]</sup>。因此,药物经盐炙后入“肾经”,能增强其补肾健骨的作用。本研究分别以杜仲、补骨脂盐炙后入药的青娥丸和未经盐炙入药的青娥丸为研究对象,观察了两种青娥丸的含药血清对人成骨细胞增殖、分化及矿化的影响,为具有补肾作用的中药临证用药以及在临床合理使用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,体重 250 ~ 300 g,由南京青龙山动物繁殖场提供,动物合格证号 SCXK(苏)2009-0002。

**1.2 药物及试剂** 杜仲(南京海昌中药集团,批号 111023),经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为 *Eucommia ulmoides* 的干燥树皮。补骨脂(上海雷允上饮片制药有限公司,批号 120521),经南京中医药大学陈建伟教授鉴定,为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* 干燥成熟果实。 $\alpha$ -MEM 培养基(美国 HyClone 公司,批号 SH30265),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1527494),青-链霉素溶液(美国 Gibco 公司,批号 15140-122),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批

号 25200-056), MTT(美国 Biosharp 公司,批号 BS030A),碱性磷酸酶试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号 P0321),细胞钙茜素红染色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司,批号 GMS80046.3)。

**1.3 仪器** Axion A1 型倒置显微镜(德国 Zesis 公司),INE600 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Memmert 公司),TDZ4-WS 型台式低速离心机(湘仪离心机仪器公司),Model 550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 绝经后妇女松质骨组织由江苏省中医院骨科提供,无菌条件取出绝经后妇女股骨松质骨组织,PBS 冲洗 3 遍。剪成 1 mm<sup>3</sup> 的骨片。放入培养皿(瓶)中,加入  $\alpha$ -MEM 培养基,37 °C 培养 24 h 后,弃去培养基,PBS 冲洗 3 遍,加入胰酶消化 1 h,血清终止消化。加入含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养液培养,每 48 h 更换培养液。7 ~ 14 d 后细胞开始贴壁。细胞汇合铺满细胞瓶后,使用胰蛋白酶消化,1:3 传代培养,实验采用第 3 代细胞。

**2.2 杜仲及补骨脂盐炙品的制备** 盐杜仲的制备:取杜仲块或丝,加盐水拌匀,闷透,置炒制容器内,以文火加热,炒至断丝,外表焦黑色时,取出,放凉。每 100 kg 杜仲用食盐 2 kg。盐补骨脂的制备:取补骨脂生品,加盐水拌匀,闷透,置炒制容器内,以文火加热,炒至有香气溢出,表面焦黄时,取出,放凉。每 100 kg 补骨脂用食盐 2 kg。

**2.3 青娥丸生品及盐炙品的制备** 青娥丸样品的制备:取杜仲和盐杜仲各 480 g,补骨脂和盐补骨脂各 240 g,核桃仁(炒)200 g,大蒜 240 g,等分为 2 份。将大蒜蒸熟,干燥后与杜仲和盐杜仲以及补骨脂和盐补骨脂粉碎成细粉,过筛,再将核桃仁捣烂,与以上粉末共研,过筛混匀,加炼蜜 50 g 制成大蜜丸。

**2.4 含药血清的制备** 30 只大鼠随机分为 3 组:空白组、青娥丸组、盐青娥丸组。每天按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 剂量分别 *ig* 给予青娥丸生品及盐炙品水提液,空白血

清组 *ig* 给药等量蒸馏水。连续给药 7 d, 第 7 天 *ig* 给药 1 h 后, 所有大鼠麻醉, 颈总动脉取血, 血液室温静置 1 h,  $3\ 600\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液。所收集的血清于  $56\ ^\circ\text{C}$  灭活 30 min, 保存于  $-80\ ^\circ\text{C}$ , 备用。

**2.5 成骨细胞增殖率测定** 选择对数生长期中生长旺盛的第 3 代细胞, 按细胞密度为  $0.8 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ , 培养 24 h, 弃去原培养液, 换无血清培养液, 饥饿细胞 24 h, 弃去无血清培养液, 向 96 孔板中加入各组不同质量分数含药血清培养液 (5%, 10%, 20%) 和空白血清培养液, 以含 10% 胎牛血清的培养液为空白对照, 每组重复 5 个孔, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ , 分别培养 24, 48 h 后, 弃去培养液, 加入  $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液  $50\ \mu\text{L}$ ,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养 4 h 后, 吸净上清液, 每孔加入  $150\ \mu\text{L}$  DMSO, 在摇床上振摇 10 min 使结晶充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 处, 测定吸光度 (*A*)。细胞增殖率的计算如下。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{空白血清}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

**2.6 成骨细胞碱性磷酸酶活性测定** 选择对数生长期中生长旺盛的第 3 代细胞, 按细胞密度为  $0.8 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ , 培养 24 h, 弃去原培养液, 换无血清培养液, 饥饿细胞 24 h, 弃去无血清培养液, 向 96 孔板中加入各组不同质量分数含药血清培养液 (5%, 10%, 20%) 和空白血清培养液, 以含 10% 胎牛血清的培养液为对照, 每药重复 5 个孔, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ , 培养 72 h 后, 取含药培养液  $30\ \mu\text{L}$ , 按照碱性磷酸酶试剂盒操作方法, 显色后在 405 nm 波长下测定各孔 *A*, 根据试剂盒说明计算碱性磷酸酶活性。

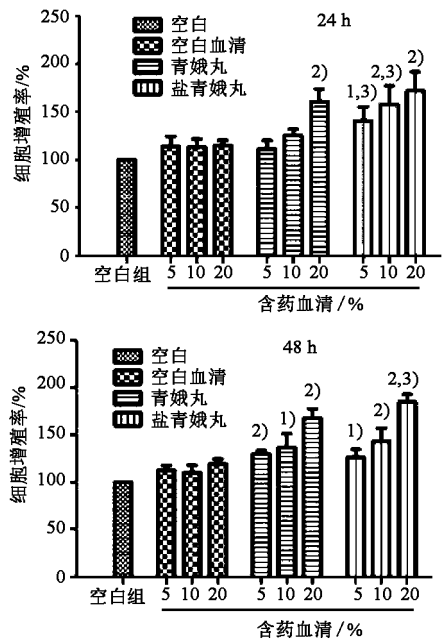
**2.7 成骨细胞钙茜素红染色** 选择对数生长期中生长旺盛的第 3 代细胞, 按细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2.0 mL, 培养 24 h, 弃去原培养液, 换无血清培养液, 饥饿细胞 24 h, 弃去无血清培养液, 向 6 孔板中加入各组不同质量分数含药血清培养液 (5%, 10%, 20%) 和空白血清培养液, 以含 10% 胎牛血清的培养液为对照, 每药重复 3 个孔, 每孔 2.0 mL, 培养 14 d 后, 按照细胞钙茜素红染色试剂盒操作方法, 显色后在倒置显微镜下观察、拍照。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件 One-way ANOVA 进行统计分析, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 盐炙对青娥丸方含药血清的成骨细胞增殖活性的影响** MTT 法分析不同炮制品的青娥丸方含药血清对成骨细胞增殖活性的影响, 青娥丸的生品

和盐炙品的含药血清均有促进成骨细胞增殖的作用 ( $P < 0.05$ ), 且含药血清浓度相同时, 青娥丸盐炙品含药血清促进成骨细胞增殖的作用优于生品含药血清 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



与空白血清比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与同质量分数生品青娥丸含药血清比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (图 3 同)

图 1 生品及盐炙品青娥丸含药血清对成人成骨细胞增殖活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects on proliferation ratio of human osteoblast treated with serum containing drug of different processed products of Qing'e Wan ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.2 盐炙对青娥丸方含药血清的成骨细胞分化活性的影响** 碱性磷酸酶活性测定法分析不同炮制品入药的青娥丸含药血清对成骨细胞分化活性的影响, 空白血清对成骨细胞的分化无显著的作用, 而青娥丸生品及盐炙品含药血清具有促进成骨细胞分化的作用 ( $P < 0.05$ ), 且盐炙品的作用要优于生品 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

**3.3 盐炙对青娥丸方含药血清的成骨细胞矿化活性的影响** 细胞钙茜素红染色法分析生品及盐炙品青娥丸含药血清对成骨细胞矿化活性的影响, 空白血清对成骨细胞的矿化无显著的作用, 而青娥丸生品及盐炙品含药血清具有促进成骨细胞矿化结节形成的作用, 且盐炙品的作用要优于生品。见图 3。

### 4 讨论

骨质疏松的发生主要是由于骨形成和骨吸收之间的动态平衡的紊乱所致。骨吸收和骨形成主要依赖于成骨细胞和破骨细胞的功能<sup>[6]</sup>。妇女绝经期

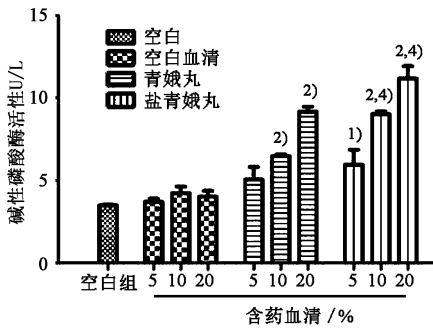


图 2 生品及盐炙品青娥丸含药血清对人成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effects on ALP activities of human osteoblast treated with serum containing drug of different processed products of Qing'e Pill ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

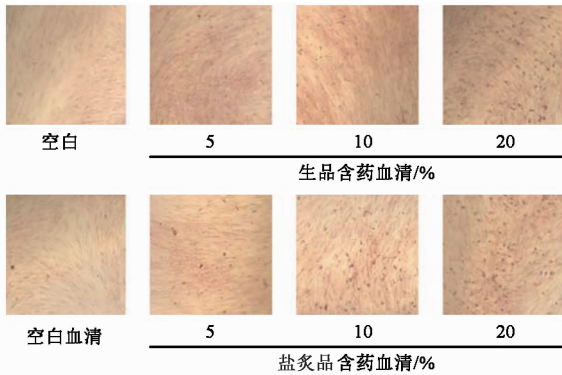


图 3 生品及盐炙品青娥丸含药血清对人成骨细胞矿化结节形成的影响 (细胞钙茜素红染色,  $\times 100$ )

Fig. 3 Effects on representative photograph of mineralization nodules staining in human osteoblast treated with serum containing drug of different processed products of Qing'e pill (cell calcium alizarin red staining,  $\times 100$ )

后,雌激素缺乏,骨转换率升高,骨吸收与骨形成之间脱节,破骨细胞吸收的骨量大于成骨细胞形成的骨量,导致净骨量丢失<sup>[7]</sup>。在骨重塑过程中,增加成骨细胞的数量和功能均能增强骨形成。因此,刺激成骨细胞增殖、分化和矿化能促进骨形成,从而防止骨量丢失,预防和治疗骨质疏松,降低骨折的发生率<sup>[8]</sup>。

成骨细胞在骨代谢中负责骨基质的合成、分泌和矿化<sup>[9]</sup>。成骨细胞在骨形成过程中要经历成骨细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡 4 个阶段。在细胞增殖阶段,成骨细胞数量显著增加,形成多层细胞。随后细胞合成并分泌 I 型胶原最终诱导形成矿化结节<sup>[10]</sup>。碱性磷酸酶为反映成骨细胞分化活性和骨形成的特异及敏感指标,成骨细胞活性增强,则碱性磷酸酶的分泌

增加<sup>[11]</sup>。

中药经过合理炮制并配伍组成方剂入药是中医临床用药的显著特点,青娥丸为临床补肾健骨常用方剂,其中君药杜仲、臣药补骨脂均需经过盐炙后入药。本研究以人成骨细胞为实验对象,探讨盐炙对青娥丸方体外药效的影响,根据中医“肾主骨”理论,笔者选用体外成骨细胞模型,采用 MTT 法,ALP 活性测定法、细胞钙茜素红染色法研究青娥丸不同炮制品含药血清对成骨细胞活性的影响。结果显示,青娥丸含药血清具有促进成骨细胞增殖、分化和矿化的作用。说明青娥丸治疗骨质疏松症的机制可能是通过提高成骨细胞活力,从而刺激骨形成。实验结果发现以杜仲、补骨脂盐炙品入药的青娥丸含药血清对于成骨细胞的刺激作用要优于以生品入药的青娥丸,说明了青娥丸中杜仲、补骨脂盐炙后入药的合理性和必要性。本文初步探讨了炮制与复方功效的相关性,为中药炮制机制研究开辟了新的思路。

【参考文献】

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:798.  
[ 2 ] 沈霖,杜清远. 青娥丸加味对大鼠卵巢切除诱导的实验性骨质疏松症的影响[J]. 中医研究,1994,7(2): 19-22.  
[ 3 ] 徐晓娟,沈霖,杨艳萍,等. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度和骨转换标志物的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2013,21(6): 8-10.  
[ 4 ] 刘蓬蓬,张凡,赵远,等. 中药盐制研究进展[J]. 中国药房,2013,43(24): 4101-4104.  
[ 5 ] 王拥军,卞琴,崔学军,等. “肾主骨”理论研究的思路与方法[J]. 上海中医药大学学报,2010,23(1): 8-12.  
[ 6 ] Weinstein R S, Manolagas S C. Apoptosis and osteoporosis[J]. Am J Med,2000,108(2): 153-164.  
[ 7 ] Yeap S S, Hew F L, Chan S P. Management of postmenopausal osteoporosis [ J ]. Malays Fam Physician,2013,8(2): 36-40.  
[ 8 ] Harada S, Rodan G A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass[J]. Nature,2003,423(6937): 349-355.  
[ 9 ] 刘宁,查振刚,王双利,等. 成骨细胞诱导骨髓基质细胞体外成骨的初步研究[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版,2009,30(4): 413-419.  
[ 10 ] 黄开,章庆国,蔡国锋. 成骨细胞与诱导剂对骨髓基质干细胞的增殖与成骨分化的影响[J]. 中国修复重建外科杂志,2006,20(2): 125-129.  
[ 11 ] 肖恩,孟萍. 骨质疏松骨代谢生化指标的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(3): 212-216.

【责任编辑 周冰冰】