

三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍 对高糖培养成骨细胞增殖功能的影响

盛华刚*

(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:观察三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍对高糖条件下成骨细胞增殖功能的影响。方法:取 3~5 代成骨细胞进行试验,成骨细胞(OB)密度为 1×10^5 个/mL,观察葡萄糖(Glu)浓度分别为 20,40,60 mmol·L⁻¹ 时成骨细胞的生长情况。三七总皂苷和淫羊藿苷质量浓度为 10,20,50,100 mg·L⁻¹,采用 MTT 法观察单剂量药物及其配伍对高糖条件下成骨细胞的增殖抑制的改善情况。结果:与对照组相比,60 mmol·L⁻¹ Glu 的高糖环境对于 OB 的增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$);三七总皂苷和淫羊藿苷在质量浓度为 10,20,50 mg·L⁻¹ 时对高糖引起的 OB 增殖抑制具有显著改善作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),组分配伍比例三七总皂苷:淫羊藿苷为 50 mg·L⁻¹:20 mg·L⁻¹ 时,对高糖条件下成骨细胞增殖抑制具有明显的改善作用($P < 0.01$)。结论:从对高糖条件下成骨细胞增殖抑制改善作用的角度证实了三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍的合理性。

[关键词] 三七总皂苷;淫羊藿苷;组分配伍;高糖;成骨细胞;增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0180-04

[doi] 10.11653/syjf2013110180

Effect of the Compatibility of *Panax notoginseng* Saponins and Icaritin on Proliferation of Osteoblasts Cultured by High Glucose

SHENG Hua-gang*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of the compatibility of *Panax notoginseng* saponins and icaritin on high glucose-induced proliferation inhibition of osteoblasts. **Method:** The third-fifth generation cells were taken as experimental model, osteoblast density was 1×10^5 /mL, the growth of the osteoblasts was observed when glucose (Glu) concentrations were 20, 40, 60 mmol·L⁻¹. The concentration of *P. notoginseng* saponins and icaritin were 10, 20, 50, 100 mg·L⁻¹, MTT was applied to determine the protective effect of high glucose-induced proliferation inhibition of osteoblasts. **Result:** Compared with control group, the growth of the osteoblasts was significantly inhibited when Glu concentrations was 60 mmol·L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *P. notoginseng* saponins and icaritin in a dose of 10, 20, 50 mg·L⁻¹ had significantly protective effect of high glucose-induced proliferation inhibition of osteoblasts ($P < 0.05$, $P < 0.01$). When the component formula of *P. notoginseng* saponins and icaritin was 50 mg·L⁻¹:20 mg·L⁻¹, compared with control group, the component group can promote proliferation of osteoblasts ($P < 0.01$). **Conclusion:** The compatibility of *P. notoginseng* saponins and icaritin was feasible in the protective effect of high glucose-induced proliferation inhibition of osteoclasts.

[Key words] *Panax notoginseng* saponins; icaritin; component formula; high glucose; osteoblast; proliferation

[收稿日期] 20121123(017)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-013)

[通讯作者] *盛华刚,博士,讲师,从事中药新制剂的研究,Tel:0531-89628590,E-mail: shenghuagang@sina.com

糖尿病患者骨质疏松的发病率和骨质疏松性骨折的危险性要明显高于普通人群^[1]。对糖尿病及其并发症对骨折风险影响评估表明,无论是1型糖尿病还是2型糖尿病,骨折风险均是增加的,这可能与会削弱骨骼强度的高血糖水平有关^[2]。成骨细胞(osteoblast,OB)的数量减少或功能受损都会导致骨代谢的异常,从而引起机体多种疾病的发生,如骨质疏松症。前期研究表明,三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍可明显促进OB增殖并有明显的钙化作用^[3]。本研究拟进一步从药物组分配伍的角度出发,通过体外培养的OB,研究三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins,PNS)和淫羊藿苷(icariin,ICA)不同配伍比例对高糖条件下OB增殖功能的影响。

1 材料

1.1 药物 淫羊藿苷提取物(纯度98%,南京泽朗医药有限公司,批号20100704),三七总皂苷提取物(纯度92%,云南云科药业有限公司,批号20100522)。

1.2 动物 Wistar大鼠,山东大学动物中心,动物合格证号SCXK(鲁)20090001。

1.3 试剂 *D*-Hank's溶液,低糖DMEM培养基,FBS[均为赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],PBS(美国,Thermo公司);0.25%胰蛋白酶(美国,Gibco公司);MTT,*D*-葡萄糖(济南朋远生物技术有限公司);胶原酶II,青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司)。

1.4 仪器 XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电),BCM-1000A型生物洁净工作台(苏静集团安泰公司),BB5060UV型CO₂培养箱(上海立新有限公司),Tecan酶标仪(Sunrise Remote)。

2 方法

2.1 OB的分离^[4] 新生大鼠(<24 h)放入75%乙醇中浸泡消毒15 min,无菌操作取下颅盖骨,除去附着的血管及结缔组织,用*D*-Hank's溶液清洗3次,剪成1 mm³大小的碎块,再用*D*-Hank's溶液清洗3次,加入8倍于骨碎块体积的0.25%胰蛋白酶溶液,于37℃水浴中预消化30 min,其间不时摇动,然后以1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去消化液,用*D*-Hank's溶液清洗干净后,弃去上清液,再加入8倍于骨块体积的0.02% II型胶原酶溶液,于37℃水浴中消化5次,其间反复振摇,每次20 min,弃去前两次消化液,取最后3次消化液,1 000 r·min⁻¹离心10 min,弃去上清液,所得白色沉淀物即为OB样细胞团。

2.2 OB的培养 细胞悬浮于含10% FBS,100 U·mL⁻¹青霉素、100 mg·L⁻¹链霉素的DMEM培养液中,将细胞悬液通过120目不锈钢筛网,滤液吹打均匀,接种到培养瓶,于37℃,5% CO₂饱和湿度的培养箱中进行培养,每隔48 h换液,当细胞铺满培养瓶底的80%~90%时用0.25%胰蛋白酶消化,并传代培养,48 h后换液,以后每隔48 h换液1次,7 d后进行细胞鉴定。用倒置显微镜观察培养瓶底部细胞生长状态及分布情况。

2.3 不同浓度高糖条件对OB的增殖影响 OB传至第3~5代,以1×10⁴个/孔接种于96孔培养板,培养24 h后,观察完全贴壁,吸弃培养液,换不含FBS的DMEM培养基,加入葡萄糖(Glu),使Glu终浓度分别为20,40,60 mmol·L⁻¹。对照组仅有等量细胞,不加Glu。在加入Glu后24,48,72,96 h,加入10 μL 5 g·L⁻¹的MTT溶液,培养4 h,吸弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,酶标仪490 nm处测定吸光度(A)。

2.4 改善高糖引起OB增殖抑制的最佳配伍研究

2.4.1 不同浓度PNS和ICA对高糖引起的OB增殖抑制的影响 OB以1×10⁴个/孔接种于96孔培养板,培养24 h,吸弃培养液,换不含FBS的含有Glu的DMEM培养基,培养基中药物终质量浓度为10,20,50,100 mg·L⁻¹。对照组仅有等量细胞,不加药物。在加入受试药物后48 h,按2.3项下操作测定A。

2.4.2 配伍比例试验 将PNS和ICA有效浓度采用交互配比试验法,按2.3项下方法测定A。

2.5 数据统计与处理 数据用SPSS 17.0软件处理,组间比较采用*t*检验。*P*<0.05具有显著性差异。

3 结果

3.1 OB的培养 在倒置显微镜下可以观察到刚接种后的OB呈圆形,散布于培养瓶底,细胞之间无联系;第3天OB呈舒展状态,呈纤维束状、三角形等,数量增多,部分OB存在联系;第7天OB形状基本稳定,呈纤维束状、三角形,数量明显增多,细胞相互之间联系密切。

3.2 不同浓度高糖条件对OB增殖的影响 高糖对OB增殖作用影响与Glu浓度呈负相关。在20,40,60 mmol·L⁻¹的高糖环境培养下,OB仍然存在增殖趋势,20 mmol·L⁻¹组生长趋势与对照组相似,且对OB的增殖效果要优于对照组。而40,60 mmol·L⁻¹的高糖环境对于OB的生长则有着明显的抑制作用,

与对照组相比较有显著差异。72 h 后对照组和高糖组的 OB 生长减缓。所以 PNS 和 ICA 对高糖引起

的 OB 增殖抑制的改善作用中 Glu 浓度选择为 60 mmol·L⁻¹。见表 1。

表 1 不同浓度高糖培养液对 OB 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A₄₉₀

组别	浓度/mmol·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h	96 h
对照	-	0.235 ± 0.014	0.304 ± 0.022	0.366 ± 0.023	0.397 ± 0.016
Glu	20	0.256 ± 0.018 ¹⁾	0.344 ± 0.013 ¹⁾	0.394 ± 0.017	0.435 ± 0.017 ²⁾
	40	0.221 ± 0.015 ³⁾	0.271 ± 0.022 ³⁾	0.319 ± 0.012 ^{1,3)}	0.348 ± 0.020 ^{1,3)}
	60	0.210 ± 0.014 ^{1,3)}	0.246 ± 0.033 ^{1,3)}	0.277 ± 0.015 ^{2,3)}	0.292 ± 0.012 ^{2,3)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 20 mmol·L⁻¹ Glu 组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 改善高糖引起 OB 增殖抑制的最佳配伍研究

3.3.1 不同浓度 PNS 和 ICA 对高糖引起的 OB 增殖抑制的影响

PNS 和 ICA 在浓度为 10, 20, 50, 100 mg·L⁻¹ 时皆能够对高糖引起的 OB 增殖抑制具有显著改善作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 浓度在 10, 20, 50 mg·L⁻¹ 范围内其作用随浓度增加而增强, 因此 PNS 和 ICA 浓度范围确定为 10, 20, 50 mg·L⁻¹。见表 2。

表 2 不同质量浓度 PNS 和 ICA 对高糖引起的 OB 增殖抑制的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	A ₄₉₀
对照	-	0.263 ± 0.013
PNS 1	10	0.295 ± 0.018 ¹⁾
PNS 2	20	0.312 ± 0.016 ²⁾
PNS 3	50	0.345 ± 0.017 ²⁾
PNS 4	100	0.323 ± 0.020 ²⁾
ICA 1	10	0.315 ± 0.017 ²⁾
ICA 2	20	0.332 ± 0.020 ²⁾
ICA 3	50	0.341 ± 0.016 ²⁾
ICA 4	100	0.328 ± 0.014 ²⁾

3.3.2 配伍比例试验

将 PNS 分为 A1 (10 mg·L⁻¹), A2 (20 mg·L⁻¹), A3 (50 mg·L⁻¹) 3 组, ICA 分为 B1 (10 mg·L⁻¹), B2 (20 mg·L⁻¹), B3 (50 mg·L⁻¹) 3 组, 交互配比试验。不同配伍组对高糖引起的 OB 增殖抑制皆具有改善作用($P < 0.01$), 最佳组合为 A3B2, 即组分配伍比例为 50:20 mg·L⁻¹。结合表 2 中不同浓度 PNS 和 ICA 对高糖引起的 OB 增殖抑制的影响结果可以看出, 组间作用强度的差异不是由总浓度差异引起的, 而是配比不同造成的, 药物组合要比单个药物的作用显著。见表 3。

4 讨论

糖尿病大鼠骨折愈合过程中较正常大鼠骨钙素

表 3 PNS 和 ICA 不同配伍对高糖引起的 OB 增殖抑制的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	A ₄₉₀
对照	-	0.246 ± 0.017
A1B1	PNS 10 + ICA 10	0.324 ± 0.016 ²⁾
A1B2	PNS 10 + ICA 20	0.340 ± 0.018 ²⁾
A1B3	PNS 10 + ICA 50	0.360 ± 0.022 ²⁾
A2B1	PNS 20 + ICA 10	0.336 ± 0.014 ²⁾
A2B2	PNS 20 + ICA 20	0.352 ± 0.017 ²⁾
A2B3	PNS 20 + ICA 50	0.366 ± 0.014 ²⁾
A3B1	PNS 50 + ICA 10	0.384 ± 0.018 ²⁾
A3B2	PNS 50 + ICA 20	0.397 ± 0.015 ²⁾
A3B3	PNS 50 + ICA 50	0.378 ± 0.013 ²⁾

水平降低, OB 增殖下降^[5], 愈合过程中, 骨痂中的 OB 增殖能力下降^[6] 是导致糖尿病骨折大鼠愈合差的原因之一。OB 数量减少或功能受损都会导致骨代谢的异常, 从而引起机体多种疾病如骨质疏松症或者骨折不愈的发生。在骨折愈合过程中, OB 首先要经历增殖阶段, OB 数量的多少决定了骨形成的最初速度, 因此促进 OB 增殖的药物才有可能促进骨的形成。

糖尿病能够导致骨质疏松并会延迟骨折愈合, 这主要与血液中的高浓度的糖含量有关。细胞实验证实 OB 在高浓度 Glu 的培养条件下, 会产生增殖抑制。本研究表明 PNS 和 ICA 组分配伍对高糖引起的 OB 增殖抑制具有明显的改善作用, 与前期研究中 PNS 和 ICA 组分配伍对成骨细胞的增殖和钙化作用的研究结果具有一致性^[3], 这一研究可为 PNS 和 ICA 治疗糖尿病伴有骨质疏松或骨折延迟愈合的治疗的后续研究奠定基础。

本文仅是在细胞实验中对高糖环境下 OB 的增殖功能进行了先期研究, 因骨代谢与体内环境、激素的影响关系密切, OB 实验作为一种体外实验, 其结

丹参注射液对老龄大鼠红细胞膜组分的影响

牛雯颖, 袁良杰, 张禹, 武爽, 冯月男, 卞敬琦, 张瑶, 肖洪彬*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:从血液流变学和红细胞膜组分的变化探讨丹参注射液改善老龄大鼠血瘀证的作用机制。方法:70~72 周龄 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,随机分为丹参注射液(按生药量计)高剂量组(4.4 g·kg⁻¹)、低剂量组(1.1 g·kg⁻¹)和模型组。另外 10 只青龄大鼠作为青龄对照组,ip 给药 14 d 后,取血测定全血黏度、血浆黏度、红细胞变形指数以及红细胞膜各组分等指标。结果:与青龄对照组比较,模型组全血黏度显著升高($P < 0.05$),血浆黏度升高极显著($P < 0.01$);在 200 s⁻¹,500 s⁻¹切变率下红细胞变形指数均降低极显著($P < 0.01$),1 000 s⁻¹切变率下红细胞变形指数显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比丹参注射液组能够显著降低老龄大鼠的全血黏度($P < 0.01$)和血浆黏度($P < 0.05$),明显提高红细胞变形能力($P < 0.01$);并且能显著增加老龄大鼠红细胞膜唾液酸含量和巯基含量($P < 0.05$),显著提高红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 SOD(超氧化物歧化酶)活性($P < 0.01$, $P < 0.01$),降低 MDA(丙二醛)水平($P < 0.01$)。结论:丹参注射液可能是通过增加红细胞膜表面唾液酸含量、影响膜上脂质代谢、提高机体抗氧化能力,以及改变膜上负电荷荷电量等方面来改善老龄大鼠的血液流变学特性。

[关键词] 老龄大鼠;丹参注射液;血液流变学;红细胞膜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0183-04

[doi] 10.11653/syfy2013110183

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1404.006.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:04

Effect of Danshen Injection on the Components of Erythrocyte Membrane in the Aged Rats

NIU Wen-ying, YUAN Liang-jie, ZHANG Yu, WU Shuang, FENG Yue-nan,
BIAN Jing-qi, ZHANG Yao, XIAO Hong-bin*

[收稿日期] 20121227(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173186);黑龙江省博士后项目;黑龙江中医药大学优秀创新人才项目

[第一作者] 牛雯颖,助理研究员,博士后,E-mail:nwy012603001@126.com

[通讯作者] *肖洪彬,Tel:0451-82193409,E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

果仅是对药物的在体作用提供了参考,组分配伍的具体作用和体内配伍比例尚有待于动物实验来进一步确证。

[参考文献]

- [1] Hofbauer L C, Brueck C C, Singh S K, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9):1317.
- [2] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(1):45.
- [3] 盛华刚,李娜,朱立俏,等.三七总皂苷和淫羊藿苷组

分配伍对成骨细胞的增殖和钙化作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):183.

- [4] 刘芳.菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):232.
- [5] 李溪,向盈盈,龚跃昆,等.糖尿病骨折大鼠骨痂组织中成骨细胞增殖和骨钙素表达与骨形态发生蛋白-2干预的关系[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(20):3857.
- [6] 宫明智,唐立群,刘中浩,等.糖尿病模型大鼠增殖情况的观察骨折后骨痂细胞[J].中华老年医学杂志,2006,25(10):772.

[责任编辑 聂淑琴]