

黔岭淫羊藿总黄酮类成分对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞活性的影响

刘婷, 曹春雨, 郝然*, 回连强

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察黔岭淫羊藿总黄酮类成分 (YYH-C) 对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞活性的影响。方法: 培养基连续培养 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞, 采用 MTT 法测定细胞增殖率, 全自动生化分析仪测定碱性磷酸酶 (ALP) 分泌水平, 观察 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 mg·L⁻¹ YYH-C 与细胞培养 72 h 及连续多次给药与细胞培养 1, 4, 7, 10 d 时对细胞活性的影响。结果: 0.78 ~ 50 mg·L⁻¹ 的 YYH-C 与细胞共培养 72 h, 能明显促进细胞增殖, 对细胞的最大增殖率达 132.32%, 0.78 mg·L⁻¹ 剂量组尚能明显促进 ALP 的分泌; YYH-C 连续给药 1~4 d 对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞未见明显的增殖作用和明显的促进细胞分泌 ALP 的作用; 自给药 7 d 开始, YYH-C 不同质量浓度组显示出不同程度的促进细胞增殖的作用, YYH-C 0.78 ~ 25.0 mg·L⁻¹ 呈现明显的量-效关系, 随着质量浓度进一步的增大, 对细胞的增殖作用不再增加, 药效至少持续至给药 10 d; 12.5, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ 在给药 7 d, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ 在给药 10 d 均能明显促进细胞分泌 ALP。结论: YYH-C 能明显促进 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的增殖, 且能明显促进细胞分泌 ALP, 提示 YYH-C 对成骨细胞活性的促进作用可能是其防治骨质疏松症的途径之一。

[关键词] 黔岭淫羊藿总黄酮类 (YYH-C); hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞; 骨质疏松症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0267-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1347.018.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:47

Influence of Total Flavones of *Epimedium leptorrhizum* Stearn on hFOB1.19 Osteoblast Activity

LIU Ting, CAO Chun-yu, HAO Ran*, HUI Lian-qiang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of total flavones of *Epimedium leptorrhizum* Stearn on hFOB1.19 osteoblast activity. **Method:** The hFOB1.19 osteoblast was treated with 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 mg·L⁻¹ total flavones of *E. leptorrhizum* Stearn, and then detected proliferation rate by MTT and alkaline phosphate (ALP) secretion by automatic biochemical analyzer after 72 h (single administration) and 1, 4, 7, 10 d (continuous administration). **Result:** 0.78-50 mg·L⁻¹ total flavones of *E. leptorrhizum* Stearn can promote proliferation of hFOB1.19 osteoblast by single administration after 72 h. The max proliferation rate is 132.32%. 0.78 mg·L⁻¹ total flavones can also promote the ALP secretion obviously. Total flavones of *E. leptorrhizum* Stearn has no influence on hFOB1.19 osteoblast by continuous administration at 1-4 d, but shows a different degree of promoting effect after 7 d. From 0.78 to 25.0 mg·L⁻¹, the effect presents an obvious dose relationship. With the further increase of drug concentration, the cell proliferation no longer increasing, and the effect lasted at least until 10 days. 12.5, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ total flavones of *E. leptorrhizum*

[收稿日期] 20120711(442)

[基金项目] 国家科技重大专项课题重大新药创制课题(2009ZX09103-426)

[第一作者] 刘婷, 副研究员, 硕士, 从事药理毒理学研究, Tel: 010-84252805-2231, E-mail: ltbit@163.com

[通讯作者] * 郝然, 助理研究员, 博士, 从事药理毒理学研究, Tel: 010-84252805-2236, E-mail: jessicahao2003@yahoo.com.cn

Stearn at the 7 d and 25.0, 50.0 mg · L⁻¹ total flavones at the 10 d can promote ALP secretion significantly. **Conclusion:** The total flavones of *E. leptorrhizum* Stearn can promote hFOB1.19 osteoblast proliferation and ALP secretion. It shows that the promotion of osteoblast activity by total flavones of *E. leptorrhizum* Stearn maybe a pathway of prevention and treatment of osteoporosis.

[**Key words**] total flavones of *Epimedium leptorrhizum* Stearn; hFOB1.19 osteoblast; osteoporosis

骨质疏松症中医学称为“骨痿”、“骨痹”、“腰背痛”、“虚损”等,是以骨量减少、骨组织显微结构受损、脆性增加、容易发生骨折为特征的代谢性骨病,属老年难治性疾病。随着人口的老齡化,骨质疏松目前在世界上已成为一个较大的社会问题,严重影响高龄人群的健康和寿命。淫羊藿作为一种传统中药,具有补肾阳、强筋肾、祛风湿之功效。在近 10 年防治骨质疏松症的 35 张经验方中,淫羊藿的使用频率高达 60%^[1]。目前的实验研究显示,淫羊藿中的黄酮类成分可防止骨质疏松的发生^[2-3],在进一步对淫羊藿总黄酮成分的研究中,以淫羊藿苷的药理作用最为明确^[4-5],药典中也以淫羊藿苷的含量作为质量控制的标准^[6],而对淫羊藿黄酮类成分中朝藿定 C 的研究较少。黔岭淫羊藿主要产于贵州地区,在当地分布广泛,但该品种入药较少,因其淫羊藿苷的含量较低,一般不能达到药典规定的标准。而该品种中朝藿定 C 的含量较高,我们的前期预试验提示,黔岭淫羊藿对骨质疏松的治疗同样具有一定的作用。为了进一步证实黔岭淫羊藿对骨质疏松症的治疗作用,我们观察了黔岭淫羊藿总黄酮对 hFOB1.19 人 SV40 转染的成骨细胞活性的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 试剂 DMEM:F12(1:1)培养基(Gibco 公司,批号 8111141),胎牛血清(Hyclone 公司,批号 ATM6155),0.25%胰蛋白酶(Solarbio 公司,批号 20111103),碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(北京万泰德瑞诊断技术有限公司,批号 GG1102AD03)。

1.2 药物 取黔岭淫羊藿药材,加 20 倍量 70%乙醇回流 3 次,每次 1 h,合并 3 次提取液,回收,得浓缩液。浓缩液加蒸馏水(1:1)放置,弃沉淀,取上清液,再浓缩得浸膏。80℃减压干燥,粉碎,即得黔岭淫羊藿总黄酮部分(YYH-C),其总黄酮含量 4.96 mg · g⁻¹、淫羊藿苷含量 1.17%、朝藿定 C 含量 8.87%。

1.3 细胞株 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞,购自中国科学院细胞库,用 DMEM 与 F12 1:1 混合培养基(含 10%胎牛血清)正常培养。

1.4 仪器 Thermo Variokanflash 型多功能酶标仪(美国),Kendro HERACell 型培养箱(德国),Toshiba TBA-40FR 全自动生化分析仪(日本)。

2 方法^[7]

2.1 YYH-C 单次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的影响 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液正常培养,0.25%胰蛋白酶消化细胞约 1 min 后,吹打细胞,调整细胞密度为 1.75 × 10⁴ 个/mL,200 μL/孔接种于 96 孔板中,细胞培养 24 h 后吸弃培养液,设正常对照组,YYH-C 终质量浓度分别为 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 mg · L⁻¹ 9 个组,每组 6 个复孔。37℃,5%CO₂ 培养箱中培育 72 h,取出,收集上清液 150 μL,全自动生化测定仪测定 ALP 活性。吸弃剩余培养液,加入 1 g · L⁻¹ MTT 100 μL/孔,37℃,5%CO₂ 培养箱中培育 4 h,吸弃上清,DMSO 200 μL/孔,微量振荡器充分混匀,570 nm 处测吸光度(A),并计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{正常对照组}}) / A_{\text{正常对照组}} \times 100\%$$

2.2 YYH-C 多次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的影响 细胞同 2.1 中所述方法铺板,培养 24 h 后吸弃培养液,分组同 2.1。每组 6 个复孔。37℃,5%CO₂ 培养箱中培育 1,4,7,10 d 取出,收集上清液 150 μL,测定 ALP 活性及后续的细胞增殖,测定均同 2.1。

2.3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件,资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 YYH-C 单次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的影响 YYH-C 对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞有明显的增殖作用,与正常对照组比较,YYH-C 0.78 ~ 50 mg · L⁻¹ 与细胞共培养 72 h,细胞最大增殖率达 132.32%,0.78 mg · L⁻¹ 剂量组对 ALP 的分泌有明显的促进作用,见表 1。

3.2 YYH-C 多次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的影响 YYH-C 给药 1,4 d 对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞未见明显的增殖作用,与正

表 1 YYH-C 单次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	细胞增殖		ALP /U·L ⁻¹
		A	增殖率/%	
正常对照	-	0.465 ± 0.094	-	17.34 ± 0.70
YYH-C	50.00	0.839 ± 0.267 ²⁾	80.19	17.13 ± 1.54
	25.00	1.081 ± 0.354 ²⁾	132.32	16.78 ± 1.59
	12.50	0.789 ± 0.173 ²⁾	69.60	15.93 ± 0.76
	6.25	0.819 ± 0.100 ³⁾	75.99	16.26 ± 0.73
	3.13	0.848 ± 0.116 ³⁾	82.28	16.27 ± 0.81
	1.56	0.767 ± 0.179 ²⁾	64.69	17.61 ± 0.60
	0.78	0.827 ± 0.217 ²⁾	77.76	19.01 ± 0.78 ³⁾
	0.39	0.614 ± 0.185	31.95	18.17 ± 0.92
	0.20	0.506 ± 0.176	8.70	18.01 ± 0.68

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

常对照组比较,细胞增殖率均 $< 10\%$;对细胞 ALP 的分泌亦无明显的促进作用;给药 7 d 开始,YYH-C 不同质量浓度组显示出不同程度的促进细胞增殖的作用,0.78 ~ 25.0 mg·L⁻¹ 呈现明显的量-效关系,随着剂量进一步增大,对细胞的增殖作用不再增加,药效至少持续至给药 10 d;YYH-C 12.5, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ 在给药 7 d, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ 在给药 10 d 均能明显促进细胞分泌 ALP, 见表 2。

4 讨论

成骨细胞具有合成、分泌组成骨基质胶原和糖蛋白的作用,在维持机体内环境稳定、生理机制调节和骨代谢疾病中发挥主要作用。促进成骨细胞生成是防治骨质疏松症的主要途径。目前,在细胞水平

上以成骨细胞的增殖率和 ALP 水平为指标观察药物对骨细胞功能的影响,已经成为筛选治疗骨质疏松有效药物以及探讨其药理作用机制的主要手段^[8]。成骨细胞增殖率能反映成骨细胞的数量变化,细胞数量不断增加才能产生丰富的胶原,从而通过钙化基质的形成产生更多的骨组织。ALP 是成骨细胞分泌的一种酶,特异性高,其在细胞中水平的高低,能合理地反映成骨细胞的分化程度和功能状态,当成骨细胞活动增强时,ALP 活性升高,因此 ALP 活性是成骨细胞分化成熟的早期标志^[9]。本研究所选用的 hFOB1.19 细胞是 Harris^[10] 等 1995 年建立的人胚永生化成骨细胞系,由自然流产的胎儿组织转染 SV40 LT 抗原基因使其获得永生化,与人成骨细胞有高度同源性,并表达多种成骨细胞特异性标志物,因而是评价药物促骨生成作用的最佳细胞模型。

2010 年版《中国药典》^[6] 中规定淫羊藿药材按干燥品计算,总黄酮以淫羊藿苷计,不得 $< 5.0\%$ 。从黔岭淫羊藿中提取的 YYH-C,其中淫羊藿苷含量为 1.17%,远没有达到药典的要求;朝藿定 C 含量为 8.87%,相对占主要成分。邓炜^[11] 等报道,黔岭淫羊藿对地塞米松所致的骨质疏松模型小鼠具有明显的改善作用。大量研究证实^[12-14],淫羊藿苷能够促进体外培养成骨细胞的增殖与分化,但有关黔岭淫羊藿尚未见相关报道。本研究结果表明,含有淫羊藿苷较少而朝藿定 C 成分较多的 YYH-C 能明显促进 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞的增殖,同时能显著促进细胞分泌 ALP,提示 YYH-C 具有促进成骨细胞生长、分化的作用,为黔岭淫羊藿用于防治骨

表 2 YYH-C 单次给药多次给药对 hFOB1.19 人 SV40 转染成骨细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	7 d			10 d		
		细胞增殖		ALP /U·L ⁻¹	细胞增殖		ALP/U·L ⁻¹
		A	增殖率/%		A	增殖率/%	
正常对照	-	0.570 ± 0.044	-	14.49 ± 0.77	0.302 ± 0.020	-	14.51 ± 0.24
YYH-C	50.00	0.699 ± 0.051 ³⁾	22.69	16.70 ± 1.20 ²⁾	0.450 ± 0.162 ¹⁾	48.81	16.23 ± 1.33 ¹⁾
	25.00	0.819 ± 0.037 ³⁾	43.74	15.97 ± 1.32 ¹⁾	0.692 ± 0.048 ³⁾	128.87	15.91 ± 1.30 ¹⁾
	12.50	0.802 ± 0.027 ³⁾	40.77	15.70 ± 1.04 ¹⁾	0.641 ± 0.037 ³⁾	111.89	14.32 ± 0.60
	6.25	0.789 ± 0.048 ³⁾	38.55	14.86 ± 0.43	0.576 ± 0.045 ³⁾	90.56	14.23 ± 0.79
	3.13	0.725 ± 0.037 ³⁾	27.25	15.12 ± 0.66	0.454 ± 0.043 ³⁾	50.06	13.69 ± 0.49
	1.56	0.668 ± 0.028 ³⁾	17.24	14.81 ± 0.27	0.404 ± 0.037 ³⁾	33.64	13.75 ± 0.39
	0.78	0.647 ± 0.021 ²⁾	13.61	15.20 ± 0.67	0.352 ± 0.015 ³⁾	16.48	13.73 ± 0.20
	0.39	0.530 ± 0.019	-6.93	15.01 ± 0.24	0.315 ± 0.036	4.28	13.82 ± 0.25
	0.20	0.515 ± 0.074	-9.63	14.79 ± 0.44	0.236 ± 0.033	-21.84	13.93 ± 0.32

钩藤属部分不同种植物药材对正常大鼠血压的影响

何飞¹, 苏华¹, 韦桂宁¹, 曾宪彪¹, 周军¹, 黄瑞松^{2*}

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2. 广西民族医药研究院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察钩藤属 6 个不同种药材乙醇提取物对正常大鼠血压的影响。方法: 急性降压试验: 将大鼠分为正常对照、硝苯地平 $0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以及钩藤、大叶钩藤、侯钩藤、攀茎钩藤、倒挂金钩、北越钩藤乙醇提取物含生药 $68.4, 34.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 14 组, 大鼠十二指肠给药 1 次, 记录给药前及给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h 大鼠颈总动脉血压; 慢性降压试验: 将大鼠分为正常对照、硝苯地平 $0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以及前述 6 种药材乙醇提取物 $34.2, 17.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 灌胃, 每天 1 次, 连续 11 d, 给药前和给药后第 7 天和第 11 天测定大鼠尾动脉血压。以给药后自身血压下降达 2.666 kPa 以上, 同时对对照组比较有显著性差异者为药物降血压有效。结果: 钩藤 $68.4, 34.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药后 0.5 h 颈总动脉血压下降达 2.666 kPa 以上, 且与对照组比较有显著性差异 (均 $P < 0.01$), 并维持 3 h 以上。钩藤 $34.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药后第 7, 11 天, $17.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药后第 11 天; 大叶钩藤、侯钩藤 $34.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药后第 11 天, 大鼠尾动脉血压下降值达 2.666 kPa 以上, 且与对照组比较有显著性差异 (均 $P < 0.01$); 而攀茎钩藤、倒挂金钩、北越钩藤给药后大鼠颈总动脉、尾动脉血压下降值均未达到 2.666 kPa 。结论: 钩藤、大叶钩藤、侯钩藤能够显著降低正常大鼠血压, 攀茎钩藤、倒挂金钩、北越钩藤对正常大鼠血压没有显著影响。

[关键词] 钩藤属; 品种; 低血压

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0270-06

[收稿日期] 20120706(008)

[基金项目] 广西科学基金项目应用基础研究专项(桂科基 0991007)

[第一作者] 何飞, 高级实验师, 从事中药药理、毒理学实验研究, Tel: 0771-5869102, E-mail: ygmfrs@126.com

[通讯作者] * 黄瑞松, 主任药师, 硕士生导师, 从事中草药化学分析和质量标准研究, Tel: 0771-3130064, E-mail: hrs.3130064@163.com

质疏松提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 郭杨, 马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 188.
- [2] 蒋淑军, 许芝兰. 淫羊藿总黄酮的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2004, 32(4): 60.
- [3] 马慧萍, 贾正平, 葛欣, 等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(3): 163.
- [4] 鲍加荣, 杨继文, 李树峰, 等. 淫羊藿苷对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(2): 191.
- [5] 王嘉琪, 李雪雁, 吴河龙, 等. 淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 196.
- [6] 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: 306.
- [7] 王洪复. 骨质疏松症药效研究方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 25.
- [8] 刘继平, 程玥. 中药促进成骨细胞功能和 ALP 活性影响研究的意义[J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(1): 7.
- [9] 姚新苗. 益骨汤含药血清对成骨细胞增殖和 ALP 影响的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(2): 1.
- [10] Harris S A, Enger R J, Riggs B L, et al. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line[J]. J Bone Miner Res, 1995, 10(2): 178.
- [11] 邓炜, 郑民强, 黄勇其. 黔产 2 种淫羊藿抗小鼠骨质疏松药效对比研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 939.
- [12] 刘尚全, 杨颖, 周丽斌. 淫羊藿甙逆转地塞米松抑制成骨细胞分化及其机制[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(3): 218.
- [13] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕町. 淫羊藿苷对成人成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 289.
- [14] Yin X X, Chen Z Q, Liu Z J, et al. Icariine stimulates proliferation and differentiation of human osteoblasts by increasing production of bone morphogenetic protein-2[J]. Chin Med J, 2007, 120: 204.

[责任编辑 何伟]