

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

盛华刚¹, 李娜², 朱立俏¹, 田景振^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 3. 山东泰邦生物制品有限公司, 山东 泰安 271000)

[摘要] 目的:探讨三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍对体外培养成骨细胞的增殖和钙化的影响。方法:取 3~5 代成骨细胞进行试验,成骨细胞密度为 1×10^5 个/mL,三七总皂苷和淫羊藿苷质量浓度为 1, 10, 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,采用 MTT 法观察单个药物及其配伍对成骨细胞的增殖的影响,采用茜素红钙化结节染色法观察钙化作用。结果:三七总皂苷和淫羊藿苷在质量浓度为 10, 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时皆能够明显促进成骨细胞增殖。三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍比例为 5:2 时,可明显促进成骨细胞增殖并有明显的钙化作用 ($P < 0.01$)。结论:从对成骨细胞增殖和钙化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; 成骨细胞; 增殖; 钙化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0183-04

Effect of Component Compatibility of Panax Notoginseng Saponins and Icaritin on Proliferation and Calcification of Osteoclasts

SHENG Hua-gang¹, LI Na², ZHU Li-qiao¹, TIAN Jing-zhen^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Shandong Taibang Biological Products Co., Ltd, Taian 271000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of the component compatibility of panax notoginseng saponins and icaritin on promoting the proliferation and calcification of osteoblasts. **Method:** The third-fifth generation cells were as experimental model, osteoblast density was 1×10^5 /mL, the concentration of Panax notoginseng saponins and icaritin was 1, 10, 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MTT was applied to determine proliferation of the cell and calcification. Alizarin red staining method was used to observe calcification. **Result:** Panax notoginseng saponins and icaritin in a dose of 10, 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were able to significantly promote the proliferation of osteoblasts. When the component compatibility of panax notoginseng saponins and icaritin was 5:2, compared with those of control group, the counts of calcified nodules in the group was significantly higher. The component group can promote proliferation of osteoblasts. **Conclusion:** The component compatibility of panax notoginseng saponins and icaritin is feasible from the proliferation and calcification of osteoblasts.

[Key words] panax notoginseng saponins; icaritin; component formula; osteoblast; proliferation; calcification

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基

质的合成、分泌和矿化。体外培养的成骨细胞具有与体内成骨细胞一样的生物活性,能很好的反映成骨细胞的功能活动特点。研究表明,三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)可促进大鼠成骨细胞的增殖、分化,促进成骨细胞 OPG 的表达^[1],还能促进大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞的增殖、分化^[2],淫羊藿苷(icaritin, ICA)对成骨细胞的生长增

[收稿日期] 20120216(006)

[第一作者] 盛华刚,讲师,博士,从事中药新制剂的研究, Tel: 0531-89628590

[通讯作者] * 田景振,教授,博士生导师,从事中药新制剂和新剂型的研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

殖有明显的促进作用等^[3-4],能够诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,可视为一种良好的骨诱导活性因子^[5]。本研究拟从药物组分配伍的角度出发,通过体外培养的成骨细胞,研究 PNS 和 ICA 不同配伍比例对成骨细胞增殖和钙化的影响。

1 材料

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

1.2 动物 Wistar 大鼠,山东大学动物中心,动物许可证号 SCXK(鲁)2009-0001。

1.3 试剂 *D*-Hank's 溶液低糖 DMEM, 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); 胶原酶 II, 青、链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司), MTT(济南朋远生物技术有限公司), 维生素 C(国药集团化学试剂有限公司), β -甘油磷酸钠(美国 Sigma 公司), 茜素红, DMSO(北京中生瑞泰科技有限公司)。

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), 酶标仪(TECAN, SUNRISE REMOTE)。

2 方法

2.1 成骨细胞的分离^[6] 将新生(<24 h)大鼠放入 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 °C 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 °C 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成骨细胞样细胞团。

2.2 成骨细胞(OB)的培养 细胞悬浮于含 10% FBS, 100 mg·L⁻¹ 链霉素, 100 U·mL⁻¹ 青霉素的 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 °C, 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。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。

2.3 PNS 和 ICA 有效浓度范围优选 OB 传至第 3~5 代, 以 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h, 吸弃培养液, 分别加入质量浓度为 1, 10, 20, 50 mg·L⁻¹ 的药物 100 μ L。对照组仅有等量细胞, 不加药物。加入受试药物后 48 h, 加入 10 μ L 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液, 培养 4 h, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪 490 nm 处测定吸光度(A)。

2.4 最佳配伍浓度的确定 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。

2.5 PNS 和 ICA 最佳配伍对成骨细胞钙化功能的调节^[7-8] 成骨细胞以 1×10⁵ 个/mL 细胞密度, 每孔 800 μ L, 接种于 24 孔板, 细胞贴壁后加入含 50 mg·L⁻¹ 维生素 C, 10⁻³ mol·L⁻¹ β -甘油磷酸钠的钙化结节培养液 800 μ L, 对照组仅加培养液不加药物, 药物组设定为对成骨细胞具有增殖作用的 PNS 最佳浓度组、ICA 最佳浓度组、最佳配伍组。每 3 d 换液 1 次, 18 d 后吸尽培养液, PBS 冲洗 2 次, 每次 500 μ L, 再用 500 μ L 95% 乙醇固定 10 min, 蒸馏水冲洗 2 次, 每次 500 μ L, 加入 0.1% 茜素红染色剂 400 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 蒸馏水冲洗 2 次, 每次 500 μ L, 显微镜下观察。每组随机选择 5 个视野, 低倍镜下钙化结节计数。

2.6 数据统计方法 数据用 SPSS 17.0 软件处理, 采用 *t* 检验。P<0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 PNS 和 ICA 有效浓度范围优选 PNS 和 ICA 皆在质量浓度为 10, 20, 50 mg·L⁻¹ 时能够明显促进成骨细胞增殖。见表 1。

3.2 最佳配伍浓度的确定 PNS 质量浓度分为 A1(10 mg·L⁻¹), A2(20 mg·L⁻¹), A3(50 mg·L⁻¹) 3 组, ICA 浓度分为 B1(10 mg·L⁻¹), B2(20 mg·L⁻¹), B3(50 mg·L⁻¹) 3 组, 交互配比试验, 结果见表 2。不同配伍组对 OB 增殖皆具有显著促进作用(P<0.01)。出现增殖效果, 并有显著性差异的最佳组合为 A3B2, 即 PNS: ICA = 5: 2, 药物组合要比 PNS 和 ICA 单独使用的效果好。

表 1 不同浓度 PNS 和 ICA 对成骨细胞的增殖影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{490}
对照	0	0.301 ± 0.012
PNS 1	1	0.330 ± 0.018
PNS 2	10	0.379 ± 0.030 ²⁾
PNS 3	20	0.417 ± 0.021 ²⁾
PNS 4	50	0.396 ± 0.017 ²⁾
ICA 1	1	0.306 ± 0.012
ICA 2	10	0.338 ± 0.016 ¹⁾
ICA 3	20	0.362 ± 0.017 ²⁾
ICA 4	50	0.408 ± 0.016 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 PNS 和 ICA 不同配伍对成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

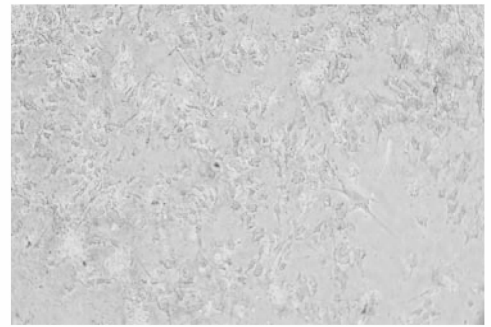
组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{490}
对照	0	0.315 ± 0.012
A1B1	PNS 10 + ICA 10	0.363 ± 0.020 ²⁾
A1B2	PNS 10 + ICA 20	0.402 ± 0.016 ²⁾
A1B3	PNS 10 + ICA 50	0.478 ± 0.013 ²⁾
A2B1	PNS 20 + ICA 10	0.445 ± 0.026 ²⁾
A2B2	PNS 20 + ICA 20	0.475 ± 0.019 ²⁾
A2B3	PNS 20 + ICA 50	0.486 ± 0.016 ²⁾
A3B1	PNS 50 + ICA 10	0.464 ± 0.015 ²⁾
A3B2	PNS 50 + ICA 20	0.513 ± 0.026 ²⁾
A3B3	PNS 50 + ICA 50	0.484 ± 0.017 ²⁾
A2	PNS 20	0.416 ± 0.027 ²⁾
B3	ICA 50	0.397 ± 0.022 ²⁾

3.3 PNS 和 ICA 最佳配伍对成骨细胞钙化功能的调节 显微镜下观察,药物组成骨细胞经茜素红染色后形成大量圆形的红色钙化结节,边界清晰,对照组较少,见图 1。低倍镜下钙化结节计数,结果见表 3。从表 3 可以看出,当 PNS 与 ICA 组分配伍比例为 5:2 时,对成骨细胞的钙化作用要明显高于对照组和 PNS 和 ICA 单剂量组 ($P < 0.01$)。

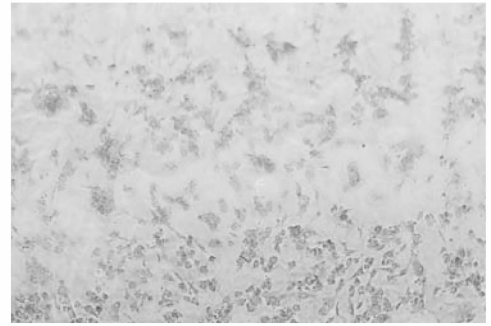
表 3 PNS 和 ICA 对成骨细胞钙化作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	矿化结节数/个
对照	0	44.0 ± 8.9
A2	PNS 20	60.0 ± 6.5 ²⁾
B3	ICA 50	54.8 ± 5.0
A3B2	PNS 50 + ICA 20	82.6 ± 7.8 ^{2,3)}

注:与 A2 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。



A



B

A. 对照组; B. 药物组 A3B2

图 1 成骨细胞钙化结节照片 ($\times 100$)

4 讨论

在骨折愈合过程中,成骨细胞首先要经历增殖阶段,成骨细胞数量的多少决定了骨形成的最初速度,因此促进成骨细胞增殖的药物才有可能促进骨的形成。本研究通过体外培养的大鼠成骨细胞研究了 PNS 和 ICA 组分配伍对成骨细胞增殖作用的最佳比例及钙化作用,结果显示,PNS 和 ICA 组分配伍能明显促进成骨细胞增殖,诱导细胞外基质钙化,有利于骨的形成,但其作用机制有待进一步研究。此外,因骨代谢与体内环境、激素的影响关系密切,细胞实验作为一种体外实验其结果仅能对药物的在体作用研究提供一个参考,体内组分配伍作用尚有待于动物实验来进一步确证。本研究可为推动 PNS 和 ICA 组分配伍对骨折的治疗研究奠定基础。

中药组分配伍的研究使中药配伍从饮片层次上升到组分层次,因为组分配伍研究的对象成分清楚,可以对作用环节及机制进一步深入研究。中药组分配伍的新模式有可能成为中药新药研发的新方向和中医方剂配伍理论的继承与延伸,但还需要更多的研究基础来支撑这一新模式。

[参考文献]

[1] 吴丽萍,陶天遵,石义刚,等.三七总甙对成骨细胞增殖、分化及 OPC 表达影响的研究[J].中国骨质疏松杂志,2004,10(2):239.

补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞形态和活力的影响

刘俊娥^{1,2}, 张继平^{2*}, 姚晖², 方永奇³, 梁毅³, 文凤妮¹

(1. 广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023;

2. 南方医科大学附属佛山医院, 广东 佛山 528000;

3. 广州中医药大学第一附属医院实验中心, 广州 510405)

[摘要] **目的:**探讨补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤 PC12 细胞形态和活力的影响。**方法:**采用中药血清药理学方法制备补阳还五汤含药血清,以 5%,10%,20% 的含药血清作用于 OGD 损伤 PC12 细胞,于倒置显微镜下观察细胞形态,用四甲基偶氮唑盐法检测细胞活力。**结果:**PC12 细胞 OGD 损伤后形态发生改变、细胞活力降低;5%,10% 补阳还五汤含药血清作用于 OGD 损伤 PC12 细胞 12,18,24 h,均可减轻细胞形态损伤、提高细胞活力($P < 0.01$);而 20% 补阳还五汤含药血清随作用时间的延长对 OGD 损伤 PC12 细胞的形态和活力具有双向调节作用。**结论:**一定浓度的补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞的形态和活力具有保护作用。

[关键词] 补阳还五汤; 含药血清; 缺氧缺糖; PC12 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0186-05

Effects of Buyang Huanwu Decoction Containing Serum on the Morphology and Viability of PC12 Cells During Oxygen-glucose Deprivation

LIU Jun-e^{1,2}, ZHANG Ji-ping^{2*}, YAO Hui², FANG Yong-qi³, LIANG Yi³, WEN Feng-ni¹

(1. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Foshan 528000, China;

3. Laboratory Center, The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[收稿日期] 20120410(013)

[基金项目] 广东省科技厅科技攻关项目(2004B36001009);广东省中药局中医药强省课题(2010008)

[第一作者] 刘俊娥,硕士研究生, Tel:18024190213, E-mail:ljune.2008@163.com

[通讯作者] *张继平,硕士生导师,研究员,主任中医师,从事中药药理研究, Tel:18665466131, E-mail:fszjping@163.com

- [2] 李学东,陈斌,郑创义,等.三七总皂甙通过 P38MAPK 信号通路促进大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞的增殖、分化[J].中国伤残医学,2009,17(4):167.
- [3] 蔡曼玲,季晖,李萍,等.5种淫羊藿黄酮类成分对体外培养成骨细胞的影响[J].中国天然药物,2004,2(4):235.
- [4] 于波,杨久山,刘岩,等.淫羊藿苷对人成骨细胞的作用[J].中医正骨,2006,18(6):17.
- [5] 蒋绍艳,宋丹妮,史玉朋,等.淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J].海南医学院学报,2009,15(10):1198.
- [6] 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
- [7] 钟代彬,孙立婷,吴培福,等.氟对山羊成骨细胞增殖分化及钙化功能的调节[J].中国兽医科技,2005,35(11):895.
- [8] 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.

[责任编辑 聂淑琴]