

狗脊生、制品不同提取部位对成骨细胞的影响

于海涛¹,鞠成国^{1,2},章琦¹,贾天柱^{1,2,3*}

(1. 辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600; 2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心,辽宁大连 116600; 3. 国家中医药管理局中药炮制工艺原理重点实验室,辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:探索狗脊不同提取部位对体外培养成骨细胞的增殖作用;比较狗脊生、制品对细胞增长的影响。方法:用狗脊生制品的石油醚层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层及粗多糖与成骨细胞共同培养;并且将各提取部位给大鼠灌胃,取大鼠含药血清与成骨细胞共同培养,以 MTT 法检测细胞的增殖。结果:各提取部位与细胞共同培养试验和含药血清与细胞共同培养试验中,均以狗脊正丁醇提取部位对细胞增殖作用最明显,且制品强于生品。结论:狗脊炮制品正丁醇提取物能够显著促进成骨细胞增殖。

[关键词] 狗脊;成骨细胞;骨质疏松;噻唑蓝

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0036-04

Effect of Different Extracts From *Cibotium barometz* on Cultureing Osteoblasts

YU Hai-tao¹, JU Cheng-guo^{1,2}, ZHANG Qi¹, JIA Tian-zhu^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China;

2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China;

3. The Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of different extracts from *Cibotium barometz* on proliferation of Osteoblasts. To compare the effects on proliferation of osteoblasts between crude and processed products, to explore the mechanism of anti-osteoporosis for *C. barometz*. **Method:** Osteoblasts with petroleum ether layer extract, chloroform layer extract, ethylacetate layer extract, butanol layer extract and polysaccharide from crude and processed products of *C. barometz* were cultured respectively. Meanwhile, after the rats were fed with each layer extract, the rat serum together with osteolastes was cultured. The proliferation was tested by MTT method. **Result:** In the different extract with osteoblasts test and the rat serum with osteoblasts test, the butanol layer extract had the most significant effect on cell proliferation of osteoblasts. And the effect of the processed product was more significant than that of crude product. **Conclusion:** The butanol layer extract from processed products of *C. barometz* had the most significant effect on cell proliferation of Osteoblasts.

[Key words] *Cibotium barometz*; osteoblasts; osteoporosis; MTT

[收稿日期] 20110618(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973938)

[第一作者] 于海涛, 研究生, 从事中药炮制学, Tel: 0411-87586115

[通讯作者] *贾天柱, 教授, 从事中药炮制原理研究工作, Tel: 0411-87586499, E-mail: jiatz @ lnutcm. edu. cn

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊的干燥根茎。味苦、甘,性温,归肝、肾经。具有补肝肾,强腰膝,祛风湿之功效,常用于腰膝酸软、下肢无力、风湿痹痛等症,临床常用于治疗骨质疏松症。祖国传统医学认为肾与骨的关系非常密切,《素问·宣明五气论》说“五脏所主,肾主骨”。《素问·应象大论》说“肾生骨髓”,肾精充足,则骨髓生化有源,骨得髓的充分滋养

而坚固有力。狗脊即能补肝肾又强筋壮骨,可谓治疗骨质疏松症之要药,已有研究^[1-2]表明狗脊对摘除卵巢所致的大鼠骨质疏松模型有良好的治疗作用,并且以正丁醇提取部位最强。本文着眼于狗脊对成骨细胞的增殖作用,从促进骨形成角度探索狗脊治疗骨质疏松症的机制,探索抗骨质疏松的有效成分。

1 材料

1.1 药材 狗脊药材采自四川成都,根据2010年版《中国药典》由辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz.* (L.) J. Sm. 的干燥根茎。

1.2 试剂 DMEM 干粉培养基(Gibco 公司)、新生牛血清(Gibco 公司)、胰酶(Gibco 公司)、I 型胶原酶(Sigma 公司)、MTT(Gibco 公司)、DMSO(ACS 级)、水为哇哈哈纯净水、细胞培养用具等。

1.3 动物 SD 雌性大鼠购自大连医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

2 试验方法

2.1 样品制备

2.1.1 狗脊的炮制 取净河砂(约为饮片8倍量)置锅中加热至滑利状态(180~190℃),保持砂温,下药,边炒边埋,炒6~7 min,出锅筛去砂,晾凉备用。

2.1.2 狗脊饮片的提取 分别取生、制品粉末(过60目筛)各100 g,8倍量80%乙醇回流提取3次,每次40 min,合并提取液,浓缩至200 mL置分液漏斗中,分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇各150 mL萃取,收集各萃取液蒸干溶剂备用。分别记为生品的石油醚层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层;制品的石油醚层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层(简称 $S_{石}, S_{氯}, S_{乙}, S_{正}, Z_{石}, Z_{氯}, Z_{乙}, Z_{正}$)。

2.1.3 粗多糖的提取 分别取生、制品粉末(过60目筛)各100 g,8倍量水煎煮3次,每次40 min,浓缩至200 mL,加乙醇使终浓度为80%净置过夜沉淀多糖,抽滤收集多糖备用。将多糖用水溶解,用氯仿-正丁醇(4:1)的混合液与多糖1:4混合除蛋白,抽滤收集多糖水溶液,浓缩至50 mL,加乙醇使终浓度为80%净置过夜沉淀多糖,抽滤收集粗多糖,记为生多糖、制多糖(以下简称 $S_{糖}, Z_{糖}$)。

2.1.4 含药血清的制备^[3] 取SD雌性大鼠随机分成10组,每组4只,分别记为: $S_{石}, S_{氯}, S_{乙}, S_{正}, S_{糖}; Z_{石}, Z_{氯}, Z_{乙}, Z_{正}, Z_{糖}$ 。另取4只灌胃生理盐水做

空白对照组。各组药物按2.1.2和2.1.3项下提取,用纯净水溶解配成相当于生饮片含量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,以 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 给药量灌胃给药,每日1次,连续7 d,待最后一次给药后2 h,用 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),麻醉后剪开腹部,腹主动脉取血,离心($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)分离血清, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 成骨细胞的原代培养^[4-5] 取24 h以内新生大鼠用75%乙醇消毒后置于培养皿中,在超净台下揭去头顶皮肤,剪下颅骨,置PBS液内,清除骨膜、血管及结缔组织,再用PBS清洗3次,在PBS液内将颅骨剪成约 1 mm^2 的小块;将骨片移入5 mL 0.25%胰酶内, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预消化20 min以清除纤维细胞;弃去消化液,将骨片移入5 mL 0.1% I型胶原酶中 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化分离细胞50 min;用100目筛网过滤消化液,将消化液移入离心管中,加培养液终止消化, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min;小心倾出上清液,加入适量含15%小牛血清的DMEM培养液(以下简称培养液),将细胞混悬;用计数板调整细胞密度 $5 \times 10^5/\text{mL}$,将调整好密度的细胞悬液分装到培养瓶中,再加入培养液共5 mL,放入 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。

与书中^[4,6]及文献^[7-8]中成骨细胞的特征和图片比较,本细胞呈梭形、三角形和多边形,胞核大而清楚,呈圆形或卵圆形,含1~2个核仁。

2.3 试药与成骨细胞的共同培养和增殖检测

2.3.1 培养用试药的制备 ①含药培养液:将2.1.2和2.1.3项下提取的各狗脊提取部位称重,溶于DMSO中,配成相当于生饮片含量为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。在超净工作台下用移液器吸取各提取部位 $10 \mu\text{L}$ 于 10 mL 量瓶中,用无血清培养液稀释至刻度,配成 $2.0 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药培养液, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤除菌, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

②含药血清培养液:将2.1.4项下得到的血清室温融化,在超净工作台下用无血清培养液配成含该血清15%的含药血清培养液, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤除菌, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3.2 细胞加药培养和增殖检测^[9-11] 选择密度适宜的原代培养细胞,用0.25%胰酶和0.1% I型胶原酶的混合酶进行传代,选择对数生长期中生长旺盛的第3代细胞,用含药培养液和含药血清培养液分别将细胞密度调整为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,铺入96孔板中,每孔 $200 \mu\text{L}$,培养24 h后,弃去原培养液,换无

血清培养液,饥饿细胞 24 h,以使细胞周期同步化。弃去无血清培养液,第一组 96 孔板加入含药培养液,以无血清培养液和培养液为对照,每药重复 5 个孔,每孔 200 μL ;第二组 96 孔板加入含药血清培养液,以生理盐水组大鼠血清培养液和培养液为对照,每药重复 5 个孔,每孔 200 μL ,继续培养 48 h 后,弃去培养液,加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 50 μL 培养 4 h 后,吸去上清液,加入 150 μL DMSO,在摇床上振摇 10 min 使结晶充分溶解,用酶标仪在 405 nm 处,测定吸光度。用 Spss 15.0 统计学软件进行加药组与对照组之间的比较(图 1~4)。细胞增殖率的计算如下:

$$\text{增殖率} = (A_{\text{加药组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

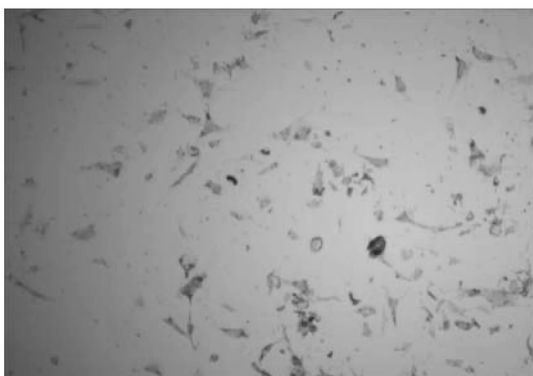


图 1 无血清培养液对照组 (MTT 染色,100 \times)

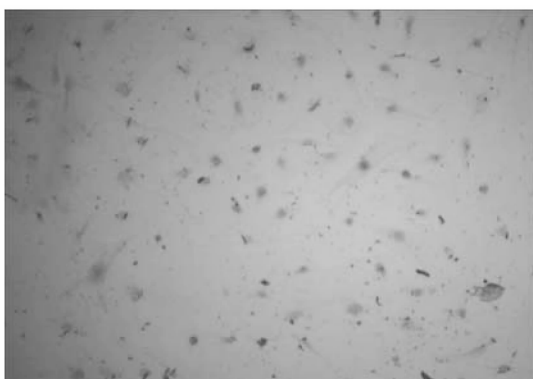


图 2 空白血清组 (MTT 染色,100 \times)

3 结果

MTT 测定结果如表 1,2 所示。含药培养液试验中,各组试药对细胞增殖均有一定作用,且除 $S_{\text{乙}}$ 和 $Z_{\text{糖}}$ 组外,均有特别显著的作用,尤其是生、制品正丁醇组增殖率达到了 116.2% ,184.3% ,说明狗脊正丁醇提取部位直接与成骨细胞共同培养时,促进细胞生长的作用最强,且制品作用大于生品。含药血清培养液试验中, $S_{\text{氯}}$ 、 $S_{\text{乙}}$ 、 $Z_{\text{乙}}$ 、 $Z_{\text{正}}$ 和 $Z_{\text{糖}}$ 组对细胞增殖



图 3 含药培养液试验 $Z_{\text{正}}$ 组 (MTT 染色,100 \times)



图 4 含药血清培养液试验 $Z_{\text{正}}$ 组 (MTT 染色,100 \times)

有一定作用,且呈显著作用,制品正丁醇组增殖率最大,为 59.2% ,说明狗脊炮制品正丁醇提取部位的含药血清与成骨细胞共同培养时,促进细胞生长的作用最强。

表 1 含药培养液对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

药物	$A(\bar{x} \pm s)$	增殖率/%
$S_{\text{石}}$	$0.530 \pm 0.050^{3)}$	92.4
$S_{\text{氯}}$	$0.447 \pm 0.073^{3)}$	62.2
$S_{\text{乙}}$	$0.380 \pm 0.043^{1)}$	37.7
$S_{\text{正}}$	$0.596 \pm 0.064^{3)}$	116.2
$S_{\text{糖}}$	$0.499 \pm 0.080^{3)}$	80.9
$Z_{\text{石}}$	$0.494 \pm 0.078^{3)}$	79.4
$Z_{\text{氯}}$	$0.526 \pm 0.056^{3)}$	90.9
$Z_{\text{乙}}$	$0.693 \pm 0.099^{3)}$	151.5
$Z_{\text{正}}$	$0.783 \pm 0.050^{3)}$	184.3
$Z_{\text{糖}}$	$0.367 \pm 0.042^{1)}$	33.2
无血清培养液对照组	0.276 ± 0.043	
小牛血清培养液对照	$0.805 \pm 0.082^{3)}$	191.9

注:与无血清培养液对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$,表 2 同。

表2 含药血清培养液对细胞增殖的影响

药物	A($\bar{x} \pm s$)	增殖率/%
S _石	0.364 ± 0.042	
S _氯	0.713 ± 0.048 ³⁾	23.9
S _乙	0.687 ± 0.036 ³⁾	19.4
S _正	0.606 ± 0.050	5.2
S _糖	0.593 ± 0.033	3.1
Z _石	0.293 ± 0.035	
Z _氯	0.357 ± 0.048	
Z _乙	0.805 ± 0.045 ³⁾	39.8
Z _正	0.917 ± 0.052 ³⁾	59.2
Z _糖	0.757 ± 0.051 ³⁾	31.6
空白血清组	0.576 ± 0.041	
小牛血清培养液对照	0.800 ± 0.052 ³⁾	39.0

由2种试验方法可以看出,狗脊炮制品正丁醇提取部位对成骨细胞的增殖作用最强,可作为进一步分析狗脊有效成分的基础。

4 讨论

狗脊制品正丁醇提取部位对成骨细胞增殖作用最强,这与前期研究^[1-2]狗脊制品正丁醇提取部位抗大鼠卵巢切除骨质疏松模型作用最强的试验结果相吻合。大鼠卵巢切除骨质疏松模型虽然是国内外公认的骨质疏松经典动物模型,但其周期长,在药物的筛选中应用较少,更多的是用在药效学评价中。本试验结果与大鼠卵巢切除骨质疏松模型的试验结果相吻合,因其均以制品正丁醇提取部位作用最强,故认为可以用成骨细胞试验作为高通量的筛选,能够筛选出抗骨质疏松的具体有效成分,且方法周期较短,试验方法简便快捷,可用来筛选有效成分。

由前期研究及本研究可以看出,狗脊能够促进成骨细胞生长,并且能够抗大鼠卵巢切除型骨质疏松,这提示狗脊抗骨质疏松作用可能是通过促进骨

细胞生长,增加骨量,以增加骨密度的机制来实现的。

[参考文献]

- [1] 索天娇. 狗脊生、制品不同提取部位药效学研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2010;6.
- [2] 步显坤. 烫狗脊的炮制机理研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2010;5.
- [3] 刑国胜,谈志龙,王淑云,等. 补肾健骨汤对成骨细胞增殖及硷性磷酸酶、骨钙素合成的影响[J]. 中草药,2001,32(11):1020.
- [4] 冯坤. 洛阳正骨临床丛书实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2008;520.
- [5] 刘玉琴. 细胞培养实验手册[M]. 北京:人民军医出版社,2009.
- [6] 杨吉成. 细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [7] 林一峰,魏合伟,黄宏兴,等. 骨康含药血清对新生大鼠成骨细胞增殖影响的研究[J]. 中医药学刊,2003,21(7):1116.
- [8] 镐英杰,王珍,李秀群,等. 大鼠成骨细胞增殖及护骨素蛋白含量与甲状旁腺激素的调节效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(47):8234.
- [9] Zhang D W, Cheng Y, Zhang J C, et al. Cytotoxic effects of flavonol glycosides and monflavonoid constituents of *Epimedium koreanum* on primary osteoblasts [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2008, 46(3):185.
- [10] Harada S I, Rodan G A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass [J]. *Nature*, 2003, 423(6937):349.
- [11] 高晓燕,杜晓鹃,赵春颖. 补肾中药对成骨样细胞UMR106增殖的影响[J]. 承德医学院学报,2001,18(4):283.

[责任编辑 蔡仲德]