

菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响

刘芳*

(白城医学高等专科学校, 吉林 白城 137000)

[摘要] 目的:探讨菟丝子总黄酮(TFCC)对体外培养大鼠成骨细胞骨代谢的影响。方法:取新生 SD 大鼠的颅盖骨,采用改良的组织块法培养成骨细胞。应用 MTT 法、对硝基苯二钠基质动力学法(PNPP),放射免疫法及 ELISA 法分别测定 TFCC 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对成骨细胞增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素(BGP)含量及 I 型胶原(COL-I)分泌的影响。结果:TFCC 在 48 h 和 72 h 能显著促进成骨细胞增殖并提高 ALP 活性;48 h 时 TFCC 可促进细胞上清液中 BGP 和 COL-I 的分泌。结论:TFCC 能够明显促进大鼠成骨细胞的增殖与分化,并通过提高 COL-I 的分泌影响骨代谢。

[关键词] 菟丝子总黄酮;成骨细胞;增殖;分化;骨钙素; I 型胶原

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0232-03

Effect of Dodder Medicated Serum on the Osteoblasts Metabolism *in vitro*

LIU Fang*

(Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of total flavones from *Cuscuta chinensis* (TFCC) on the rat osteoblasts metabolism *in vitro*. **Method:** Improved tissue block culture was used. Osteoblast from newly born SD rats was used. MTT, PNPP, RIA and ELISA were used separately to observe the proliferation, the activity of alkaline phosphatase (ALP), secretion of osteocalcin (BGP) and Collagen Type I (COL-I) of osteoblasts cultured *in vitro* with TFCC of different concentration (0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in it for different incubation periods. **Result:** After 48 h and 72 h, 5% TFCC had the effect on stimulating cell proliferation and activity of ALP; and TFCC promoted secretion of BGP and COL-I after 48 h of cultured osteoblast. **Conclusion:** TFCC can significantly promote the proliferation and the differentiation, and may influence the bone metabolism by promoting the secretion of COL-I.

[Key words] TFCC osteoblasts; proliferation; differentiation; osteocalcin; COL-I

菟丝子是旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam 的干燥成熟种子,是温补肾阳的要药。其主要成分为多糖类,黄酮类,挥发油成分和生物碱类化合物等。其中黄酮类化合物主要包含山奈酚、槲皮素及糖苷类^[1]。现代研究显示,多种黄酮类化合物对大鼠成骨细胞增殖分化有促进作用^[2-4],但关于菟丝子总黄酮(TFCC)对成骨细胞骨代谢的影响研究较少,故本实验通过体外培养成骨细胞,观察 TFCC

对成骨细胞骨代谢相关指标的影响。

1 材料

1.1 试剂及药物 DMEM 培养基(Gibco,批号 20101016),胎牛血清(北京燕生生物技术有限公司,批号 20110122),II 型胶原酶、胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、(Sigma 公司),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(保定长城试剂有限公司,批号 20110115),骨钙素(BGP)放免试剂盒(天津协和医药科技有限公司,批号 201105),I 型胶原(COL-I)ELISA 试剂盒(美国 Bio Tech 公司,批号 20110412)。菟丝子总黄酮(TFCC)药液的配制:河北医科大学药学院生药室提取的 TFCC,其含量 > 59.9%,用低糖

[收稿日期] 2011-06-15

[通讯作者] *刘芳,讲师,从事儿科传染病研究, Tel: 13894664023, E-mail: 736343713@qq.com

DMEM 培养基配成实验所需浓度。

1.2 仪器 二氧化碳培养箱(美国 Nature 公司), XDS-1B 型倒置相差显微镜(Olympus), YJ1450 型净化工作台(苏州净化设备公司),TECAN 酶标仪(奥地利)。

1.3 动物 出生 24 h 内 SD 系乳大鼠,5 只,性别体质量不限,用于成骨细胞体外培养。由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号 612079。

2 方法

2.1 分组 共分为 6 组:空白对照组,TFCC 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。

2.2 新生大鼠成骨细胞的培养及鉴定 无菌条件下,取 24 h 以内新生 SD 大鼠颅盖骨,用 PBS 冲洗 3 次,用 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min,彻底清除骨表面被膜及软组织,将骨片剪成 1~3 mm^3 的骨粒,弃去胰蛋白酶溶液。在 0.1% II 型胶原酶中 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 45 min,将消化液弃去,用 PBS 冲洗 3 次。将骨粒分散于 100 mL 培养瓶中,加入含 20% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。3 d 后,细胞换液 1 次,待细胞融合铺满瓶底时,用胰蛋白酶消化,进行传代培养,传代时用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打。以后每 3 天传代 1 次。细胞传至第 3 代,通过细胞形态学观察及 ALP 化学染色鉴定为成骨细胞^[5]。细胞密度超过 85% 以上。

2.3 对成骨细胞增殖的影响 取对数生长期成骨细胞,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基将细胞悬液稀释,按 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,待细胞 70% 融合后吸弃培养基,分别加入含 TFCC 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基,继续培养 24, 48, 72 h 后,采用 MTT 法检测细胞增殖情况。即于培养结束前 4 h,每孔加入 MTT ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 μL ,吸弃培养基,加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 后用酶标仪测定 490 nm 吸光度(A)。

2.4 对成骨细胞分化的影响 取对数生长期成骨细胞,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基将细胞悬液稀释,按 5×10^3 个/孔接种于 24 孔板,每孔 500 μL ,待细胞 70% 融合后吸弃培养基,分别加入含 TFCC 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基,继续培养 24, 48, 72 h 后,分别将两块 24 孔板取出,吸取培养基上清液,用于 BGP 的测定;细胞用 PBS 冲洗 2 次后,每孔加入 250 μL 0.1% TritonX100 溶液,吹打细胞,10 min 后,收集每孔的溶液,用于 ALP

的测定。ALP 测定采用对硝基苯磷酸二钠基质动力学(PNPP)法,并进行蛋白质测定,结果用蛋白含量校正,以 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。BGP 测定采用放射免疫法(RIA),按试剂盒说明进行操作,含量以 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示。

2.5 对成骨细胞 COL-1 含量的影响 在加入含 TFCC 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基基础上继续培养 48 h,收集细胞培养基上清液,用于 COL-1 含量的测定。采用 ELISA 法测定,按照试剂盒说明,用酶标仪测定 492 nm 处 A,含量以 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对成骨细胞增殖的影响 大鼠成骨细胞在含 TFCC 培养液中培养 24 h 后,与空白组相比只有 TFCC 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 有促增殖作用($P < 0.05$);培养 48, 72 h 后,TFCC 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 有促增殖作用,明显高于对照组($P < 0.05$),其中 0.1, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组作用较为显著($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 TFCC 对成骨细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A		
		24 h	48 h	72 h
对照	0	0.270 \pm 0.026	0.379 \pm 0.016	0.421 \pm 0.034
TFCC	0.01	0.279 \pm 0.017	0.386 \pm 0.023	0.437 \pm 0.036
	0.1	0.272 \pm 0.025	0.429 \pm 0.032 ²⁾	0.497 \pm 0.044 ²⁾
	1	0.280 \pm 0.031	0.447 \pm 0.041 ²⁾	0.513 \pm 0.054 ²⁾
	10	0.288 \pm 0.030 ¹⁾	0.401 \pm 0.039 ¹⁾	0.467 \pm 0.041 ¹⁾
	100	0.293 \pm 0.029 ¹⁾	0.379 \pm 0.033	0.433 \pm 0.053

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对成骨细胞 ALP 活性的影响 与空白对照组相比,TFCC 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 在 24, 48, 72 h 均能够提高 ALP 活性,有显著统计学差异($P < 0.01$)。TFCC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 仅在 24 h 时 ALP 活性水平高于对照组($P < 0.05$)。TFCC 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 在 72 h 时 ALP 活性水平与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对成骨细胞 BGP 含量的影响 大鼠成骨细胞在含 TFCC 中培养 24 h, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可提高成骨细胞 BGP 的表达水平($P < 0.05$),培养 48 h 后,浓度为 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组继续保持高表达水平,促

表 2 TFCC 对成骨细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
对照	0	3.36 ± 0.96	5.77 ± 0.98	7.32 ± 1.43
TFCC	0.01	3.37 ± 0.71	5.86 ± 1.01	7.97 ± 1.66 ¹⁾
	0.1	3.49 ± 0.59	6.85 ± 1.21 ²⁾	8.64 ± 1.67 ²⁾
	1	3.42 ± 0.66	6.99 ± 1.33 ²⁾	9.41 ± 2.03 ²⁾
	10	3.39 ± 0.64	6.63 ± 1.24 ²⁾	8.46 ± 1.98 ²⁾
	100	3.68 ± 0.77 ¹⁾	5.79 ± 1.27	7.29 ± 1.53

进成骨细胞 BGP 的分泌 ($P < 0.05$); 培养 72 h 后, 仅 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能促进大鼠成骨细胞 BGP 的分泌 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 TFCC 对成骨细胞骨钙素的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	BGP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
对照	0	0.351 ± 0.065	0.792 ± 0.116	1.221 ± 0.134
TFCC	0.01	0.402 ± 0.172	0.786 ± 0.123	1.028 ± 0.076
	0.1	0.572 ± 0.051 ²⁾	0.809 ± 0.320	1.317 ± 0.144
	1	0.680 ± 0.084 ²⁾	1.107 ± 0.092 ¹⁾	2.153 ± 0.564 ¹⁾
	10	0.608 ± 0.069 ²⁾	1.221 ± 0.078 ¹⁾	1.467 ± 0.241
	100	0.393 ± 0.091	0.797 ± 0.093	1.433 ± 0.353

3.4 对成骨细胞 COL-I 含量的影响 培养 48 h 时, 与空白对照组相比, TFCC $0.1, 1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能够提高 COL-I 含量 ($P < 0.01$), TFCC 0.01 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组对 COL-I 含量无明显影响。见表 4。

表 4 TFCC 对成骨细胞 COL-I 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	COL-I/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	0	124.58 ± 2.34
TFCC	0.01	125.43 ± 4.71
	0.1	146.37 ± 5.93 ²⁾
	1	179.16 ± 3.66 ²⁾
	10	155.92 ± 5.87 ²⁾
	100	123.97 ± 4.88

4 讨论

成骨细胞是参与骨代谢的重要细胞, 它与破骨细胞共同维持着骨代谢的平衡。成骨细胞可合成分泌 ALP 和 BGP 等非胶原蛋白, 并诱导基质矿化, 直接参与骨形成。ALP 是成骨细胞分化成熟标记酶,

是成骨细胞分化早期的主要特征之一^[5]; BGP 又称 γ -羧基谷氨酸蛋白, 是成骨细胞特异性合成和分泌的一种非胶原蛋白, 是成骨细胞分化中晚期的一个标志性产物^[6], 因此绝大多数学者认为 ALP 和 BGP 是反映体外培养成骨细胞功能的两个特异性指标。

菟丝子味辛甘, 性平, 归肝、肾、脾经, 是温补肾阳的要药。本实验观察了 TFCC 对体外培养的成骨细胞增殖与分化作用以及对成骨细胞分泌的 COL-I 含量的影响。结果表明: 培养 24 h 后, 与空白组比, TFCC $10, 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能促进成骨细胞增殖 ($P < 0.05$); 培养 48, 72 h 后, TFCC $0.1, 1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有促增殖作用 ($P < 0.05$), 其中 $0.1, 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作用较为显著 ($P < 0.01$); TFCC $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 24, 48, 72 h 均能提高 ALP 活性、促进 BGP 的分泌; COL-I 是成骨细胞增殖和分化时分泌合成的蛋白, 培养 48 h 时, 与空白对照组相比, TFCC $0.1, 1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 能提高 COL-I 含量。由此可见, TFCC 能促进大鼠成骨细胞增殖, 提高 ALP 活性, 促进 BGP 的分泌, 并能促进增殖分化过程中 COL-I 的合成分泌。

综上所述, 本实验在细胞水平观察了菟丝子总黄酮对体外培养成骨细胞骨代谢的影响, 其分子生物学机制尚待深入研究。

[参考文献]

- [1] 郭澄, 王雅君, 张剑萍. 菟丝子的化学成分和药理活性研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(10): 1035.
- [2] 宋敏, 罗晓, 李宁, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清对成骨细胞增殖、分化的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(2): 3.
- [3] 王建华, 魏艳青, 李恩. 大豆甙元对大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 152.
- [4] Christopher Morris, Julian Thorpe, Luigi Ambrosio, et al. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human[J]. Biochem J Nutr, 2006, 136:1166.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 2004: 111.
- [6] 金慰芳, 朱文菁, 王洪复, 等. 补肾中药 HU-ECS 对培养成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(1): 9.

[责任编辑 何伟]