

# 补肾健骨汤对成骨细胞增殖与分化影响的实验研究

邢国胜, 谈志龙, 王淑云, 白人骁, 王毅

(天津市天津医院, 天津 300211)

**摘要:** 目的: 探讨补肾健骨汤体外对成骨细胞增殖与分化的影响。方法: 以酶消化法分离新生大鼠颅骨成骨细胞, 在含不同浓度的补肾健骨汤提取液的培养液中进行原代培养; 用常规计数法连续 7d 检测成骨细胞增殖情况; 以放免法测定培养第 5d 细胞内、外骨钙素的含量。结果: 补肾健骨汤提取液在  $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ~  $1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  浓度范围内剂量依赖性地增加成骨细胞数量及细胞内、外骨钙素含量。结论: 补肾健骨汤体外能促进成骨细胞的增殖及分化。

**关键词:** 补肾健骨; 成骨细胞; 增殖; 分化; 体外

**中图分类号:** R285.5    **文献标识码:** B    **文章编号:** 1005-9903(2002)01-0050-03

补肾健骨汤是我院依据“肾主骨”理论研制而成, 以治疗骨质疏松症为主的复方中药制剂, 经多年

临床应用已取得了一定的疗效。近年来临床研究证实本药能增加患者血中骨钙素水平, 改善患者骨密度。为探讨补肾健骨汤体外对成骨细胞的直接作用, 本实验采用原代培养的成骨细胞为模型, 通过测定细胞增殖率及骨钙素的含量来研究其对成骨细胞

---

收稿日期: 2001-05-14

基金项目: 天津市卫生局中医、中西医结合学科科研基金(93-28)

增殖与分化的影响,为其临床应用提供新的理论依据,并为进一步开发提取治疗骨质疏松症复方的有效成份奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 出生24h内清洁级纯种wistar大鼠,性别、体重不限,由军事医学科学院环境医学研究所提供,动物合格证号:医动字第005号。

**1.2 药物** 补肾健骨汤由杜仲、淫羊藿、丹参、甘草等中药组成,为天津医院药理室提供,批号990218,浓度按生药含量计算为 $33\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。经加热浓缩至2:1后,乙醇沉淀,过滤并回收乙醇至尽,继续加热浓缩成每毫升含2.64g生药的药液,脱色、精滤后以RPMI1640培养液配成浓度为 $13.2\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的贮备液,调节pH至7.2后灭菌。以含10%胎牛血清的1640培养液分别配成浓度为 $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (对照组)、 $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的供试液,密封,备用。

**1.3 主要试剂** RPMI1640培养液(Gibco);胎牛血清(中国医学科学院血液病研究所);II型胶原酶(Sigma);胰蛋白酶(Difco);骨钙素放免试剂盒(中国原子能科学研究院,批号:9901);

**1.4 新生大鼠颅骨成骨细胞的分离、培养** 参考文献方法<sup>[1]</sup>加以改进。将出生24h内的wistar大鼠脱臼处死后取其顶骨,去净软组织,用预冷的Hank's液漂洗骨组织,剪碎,再冲洗2次。收集洗净的骨组织,分别加入0.25%胰酶和0.1%II型胶原酶,37℃水浴消化4次,每次20min,弃去第一次消化的上清液,合并后三次的上清液过100目金属筛,将细胞悬液置于离心管中, $1000\text{转}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心10min,弃去上

清液,用1640培养液(含10%胎牛血清,pH=7.2)制成细胞悬液,吹打均匀,计数后接种于培养板中,37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度下孵育,隔日换液。

**1.5 成骨细胞增殖率的测定** 将分离出的成骨细胞培养24h后换成无血清1640培养液继续培养24h,吸净培养液,随机抽取6孔进行活细胞计数,分别换配好的供试液继续孵育,隔日换液,每d相同时间进行活细胞计数,连续7d,每天每组均设6个平行孔。计算细胞增殖率。

**1.6 细胞内、外骨钙素含量测定** 取换条件培养液后培养至第5d的成骨细胞,吸取培养液以放射免疫法测定细胞外骨钙素含量。同时用0.25%的胰蛋白酶消化细胞,吸出消化液后加入生理盐水吹打细胞使其游离,放置低温冰箱中反复冻溶法使细胞破碎,离心,上清液以放射免疫法测定细胞内骨钙素含量。每组均设6个平行孔。

**1.7 统计学处理** 实验数据均以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,计量资料均采用t检验。

### 2 结果

**2.1 补肾健骨汤对成骨细胞增殖的影响** 结果显示:补肾健骨汤提取液对成骨细胞增殖有促进作用,其中 $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组与对照组比较无统计学差异( $P>0.05$ ); $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组在培养前2d内与对照组比较无统计学差异( $P>0.05$ ),培养3d后细胞数量明显高于对照组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组和 $1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组在培养第1d与对照组比较均无统计学差异( $P>0.05$ ),而在培养第2~7d细胞数量明显高于对照组( $P<0.01$ )(见表1)。

表1 不同浓度的提取液对成骨细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

培养时间/d	成骨细胞数量( $\times 10^5$ )/细胞数 $\cdot\text{ml}^{-1}$					细胞增殖率/%			
	0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
1	1.52±0.44	1.60±0.30*	1.61±0.22*	1.62±0.22*	2.01±0.25*	5.26	5.92	6.58	32.24
2	1.59±0.28	1.68±0.34*	1.98±0.30*	2.90±0.29***	3.60±0.31***	5.66	24.53	82.39	126.42
3	2.10±0.66	2.88±0.49*	3.31±0.56**	4.53±0.52***	7.72±0.50***	37.14	57.62	115.71	267.62
4	2.94±0.38	3.33±0.29*	4.61±0.30***	5.79±0.39***	8.90±0.41***	13.26	56.80	96.94	202.38
5	3.61±0.79	3.90±0.44*	5.44±0.63***	6.92±0.59***	9.08±0.52***	8.03	50.69	91.69	151.52
6	4.09±0.68	4.60±0.78*	6.01±0.96**	8.01±0.89***	9.88±0.62***	12.47	46.94	95.84	141.56
7	4.84±0.99	5.79±0.90*	6.89±0.94**	8.93±0.92***	10.04±0.80***	19.63	42.36	84.50	107.44

注:与对照组( $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )比较,\* $P>0.05$ ;\*\* $P<0.05$ ;\*\*\* $P<0.01$

**2.2 补肾健骨汤对成骨细胞内、外骨钙素含量的影响**

结果显示: $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 补肾健骨汤组与对照组比较细胞内、外骨钙素的含量无统计学差异( $P>$

0.05); 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组和1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组细胞内、外骨钙素的含量均明显高于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ) (见表2)

表2 不同浓度提取液对成骨细胞内、外骨钙素含量影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

提取液浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	细胞内骨钙素含量 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	细胞外骨钙素含量 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
0	2.90 $\pm$ 0.74	2.42 $\pm$ 0.77
10	3.48 $\pm$ 0.75*	3.06 $\pm$ 0.84*
50	5.08 $\pm$ 0.59**	4.89 $\pm$ 0.72***
100	6.94 $\pm$ 0.92***	6.52 $\pm$ 0.89***
1000	7.69 $\pm$ 0.98***	7.88 $\pm$ 1.02***

注:与对照组( $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )比较,\*  $P > 0.05$ ; \*\*  $P < 0.05$ ;

\*\*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

骨质疏松症的组织学机制主要是由于重建负平衡所致。其细胞学机制则可能是成骨细胞增殖受抑制,分化程度降低<sup>[3]</sup>。成骨细胞是骨发生和骨形成的物质基础,只有成骨细胞数量的不断增加才能产生丰富的骨胶原蛋白和非胶原性蛋白质,从而进一步形成更多的骨组织。国内已有文献报道复方中药在体内能够使患者的骨量增加,骨小梁面积及密度、成骨细胞体密度、数密度增加<sup>[2]</sup>。但体内实验存在许多复杂因素的干扰,不便于直接观察复方药物的药理作用。为此,在临床研究的基础上我们采用了体外培养的方法来观察补肾健骨汤提取液是否具有直接促进成骨细胞增殖和分化的作用。成骨细胞在体外具有增殖能力已有文献报道<sup>[3]</sup>;骨钙素(osteocalcin)又称 $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白(bone Gla protein, BGP),是成骨细胞合成、分泌的主要非胶原蛋白,目

前认为是成骨细胞分化的主要指标之一<sup>[4]</sup>。从本实验结果可以看出,与对照组比较,补肾健骨汤提取液对成骨细胞的增殖和骨钙素的合成、分泌均有明显的促进作用,且具有明显的剂量依赖性,表明本复方提取液中含有促进成骨细胞增殖、分化的有效成份,在体外它能够直接刺激成骨细胞的增殖,促进其进一步分化。

目前促进成骨细胞增殖分化的研究是防治骨质疏松症研究的重要课题。如能将中药复方通过体外培养的方法进行筛选,找出对成骨细胞增殖分化有促进作用的药物,然后提取其有效成份联合用药,并根据中医药理论进行配方,有望找到更好的治疗骨质疏松症的药物,同时也可为临床上已取得一定疗效的复方制剂提供新的理论依据,从而为更好地开发、利用我国传统中药治疗骨质疏松症奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 徐荣辉,朱雅萍,柴本甫. 胚胎大鼠颅盖骨分离细胞早期体外培养的组织化学观察[J]. 解剖学报, 1988, 19(1): 53-58.
- [2] 邓伟民,沈有高,贺扬淑,等. 补肾壮骨中药对去势雌性大鼠股骨上段成骨、破骨细胞的影响[J]. 广州中医药大学报, 1998, 15(4): 281-283.
- [3] 郭昭庆,党耕町,王志国. 氟化钠及续断组分对成骨细胞增殖的影响[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(2): 84-87.
- [4] 高秀辉,薛延,袁润英,等.  $17\beta$ -雌二醇对人成骨样细胞OS-732增殖和分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(4): 6-8.
- [5] Lian JB, Gunderg CM. Osteocalcin. Biochemical consideration and clinical applications[J]. Clin Orthop Rel Res. 1987. 226: 267-270.