

4 味中药对体外培养成骨样细胞增殖的影响 ——对通补强骨方中主要组成药物的研究

秦腊梅¹, 肖永华¹, 周丽珍², 郝瑞福², 牛福玲¹, 姜良铎¹

(1. 北京中医药大学东直门医院临床重点学科实验室, 北京 100700;

2. 北京中医药大学东方医院老年病科, 北京 100078)

摘要:应用 UMR-106 成骨细胞株, 观察通补强骨方中的四味主要药物-淫羊藿、女贞子、黄芪、大黄对成骨细胞株增殖情况的影响。结果发现: 四种药物在适当浓度均能促进成骨细胞增殖。其中黄芪在低浓度(5mg/L)即显示促增殖作用, 其作用强度与剂量无明显联系; 淫羊藿、女贞子高浓度组(500mg/L) 较低浓度组(5mg/L) 促增殖作用有上升趋势; 大黄中浓度(100mg/L) 有促增殖作用, 高浓度(1000mg/L) 有抑制成骨细胞增殖作用。

关键词: 成骨细胞; 骨质疏松症

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0018-04

The Influence of Four Single Herbs on Proliferation of Osteoblast-like Cells

in vitro: Study on the Components of Chinese Formula Tong Bu Qiang Gu Fang.

QIN La-mei¹, XIAO Yong-hua¹, ZOU Li-zhen², HAO Rui-fu², NIU Fu-ling¹, JIANG Liang-duo¹

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100700, China;

2. Dongfang Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100078, China)

Abstract: It has been shown that Tong Bu Qiang Gu Fang (TBQGF) has a good effect on the treatment of osteoporosis. Using the cell strain UMR 106, we observed the effects of several Chinese herbs, which were most important in the composition of TBQGF, on the proliferation of osteoblast-like cells *in vitro*. And we found that all of the Chinese herbs at appropriate concentrations could significantly promote the proliferation of osteoblasts. The high concentrations (500mg/L) of the Epimedii Hb and Ligustri Lucidi Fr had stronger effects on the proliferation of osteoblast-like cells than the low concentration (5mg/L). Astragali Membranace Rx showed a good effect at low concentration (5mg/L), but no dose dependence relationship. Radix et Rhizoma of low concentration had no effect at all, the medium concentration (100mg/L) of it showed a significant promoting-proliferation effect, while the high concentration (1000mg/L) inhibited the proliferation of the cells. The results suggested that the herbs could promote the proliferation of osteoblast-like cells.

Key words: Osteoblast; Osteoporosis

随着人口老龄化加剧, 骨质疏松症作为老年人的常见病、多发病, 引起了国内外学者的普遍关注。人们积极寻找疗效确切、副作用小、作用机理明确的抗骨质疏松症药物。根据成骨细胞在骨形成中的作用, 通过成骨细胞系判断药物是否具有促进骨形成作用, 是开发骨质疏松症治疗药物的重要手段之一。^[1]

我们用淫羊藿、女贞子、黄芪、大黄四味中药为主组成的通补强骨方, 在长期临床实践中表明对骨质疏松症的治疗有良好效果。为研究该中药方剂的

作用机制, 我们以氟化钠作为阳性对照药, 分别观察了以上四味中药对体外培养成骨细胞增殖的影响, 并初步探讨中药治疗骨质疏松症的作用机理。

1 材料与方法

1.1 培养细胞 成骨细胞株 UMR106, 北京大学医学部提供。

1.2 药品与主要试剂

1.2.1 中药的来源及炮制 大黄(*Rheum palmatum* L.), 产于青海。将其粉碎至小块状, 以 1:1 量加黄酒拌匀, 放入容器密闭, 置水锅中, 隔水炖 48h, 取出干燥。黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge), 产于山西西北部, 生用。女贞子(*Fructus Ligustri Lu-*

cidid), 产于广州, 5: 1 量加黄酒拌匀, 放入容器密闭, 置水锅中, 隔水炖至酒尽, 取出干燥。朝鲜淫羊藿 (*E. grandiflorum* Morr. et Decne), 产于吉林。以叶片入药。

1.2.2 实验药物的制备 将中药分别加 8 倍及 6 倍量水煎 2 次, 第一次 2h; 第二次 1.5h。药液纱布过滤, 合并 2 次滤液, 加热浓缩。95% 乙醇等体积沉淀 1 次, 取上清, 水浴加热回收乙醇至尽。配制成浓度约 1g 生药/ml 的药液, 调 pH 至 7.0~ 7.1, 加 1% 活性炭脱色 3 次, 滤膜过滤除菌。4℃ 冰箱保存备用。细胞培养时均用无血清培养液稀释到相应终浓度 (分别为 5mg/L、10mg/L、100mg/L、500mg/L、1000mg/L)。

1.2.3 主要试剂 氟化钠, 分析纯 (98.0%), 批号 8446117, 武汉中国长江化工厂。MEM (Minimum Essential Medium) 培养液, Gibco 公司生产。胎牛血清 (Fetal Bovine Serum), Hyclone Laboratories 公司出产。胰蛋白酶 (Trypsin from beef pancreas), BDH Chemicals 公司出产。二甲基亚砜 (Dimethyl Sulphoxide), 分析纯 (88.5%), 批号 20000629, 天津天河化学试剂厂。四氮唑蓝 (MTT), Sigma 公司生产, 用时以 PBS 配制, 5mg/ml, 过滤除菌, 4℃ 保存。

1.3 主要实验仪器 酶标仪 (Programmable MPT Reader), 型号 DV-990BV4。倒置显微镜, 重庆光学仪器厂, 型号 XSZ-D640X。96 孔细胞培养板, 美国 COSTAR 公司。

1.4 成骨细胞 (Osteoblast, 以下简称 OB) 培养和增殖检测 成骨细胞系 UMR106, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液培养。细胞在培养瓶中长满至单层后, 用 0.02% EDTA 与 0.05% 胰酶先后消化, 制成单细胞悬液, 调浓度为 1.0×10^4 /ml。每孔加 200 μ l 细胞悬液, 接种于 96 孔板。在 5% CO₂, 37℃ 培养箱中预培养 24h 后, 吸弃原培养液, 换成每孔 100 μ l 无血清培养液, 继续培养 24h。之后再换成含不同浓度 (分别为 5mg/L、10mg/L、100mg/L、500mg/L、1000mg/L) 中药的培养液, 培养 72h。72h 后, 加入浓度为 5mg/ml 的 MTT20 μ l 每孔, 常规孵育 4h。4h 后, 将各孔原有液体吸弃, 加入 100 μ l 二甲基亚砜 (DMSO), 微量搅拌器上混匀约 40sec, 用酶联免疫检测仪于 492nm 比色。结果以 A 值表示, 计算 OB 细胞增殖率 (proliferation rate, PR) 为 $A/A_0 \times 100\%$ 。实验结果重复 3 次。

1.5 资料统计分析 用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析, 分别进行 F 检验和 Q 检验。所有数据均

用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 氟化钠 1.25 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5 μ mol/L 3 个浓度均使 MTT 法检测的光吸收值较空白组升高 (见表 1)。与空白组相比, 2.5 μ mol/L 组有上升趋势, 无统计学意义; 1.25 μ mol/L、5 μ mol/L 组与空白组相比有显著性差异 (前者 $P < 0.01$, 后者 $P < 0.001$)。10 μ mol/L 组与空白组无明显差别。

表 1 不同浓度氟化钠 (μ mol/L) 对 OB 增殖的影响

组别	n	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	PR (%)
0	14	0.3539 \pm 0.0413	100.00
1.25	8	0.4247 \pm 0.0506 [▲]	120.01
2.5	8	0.3881 \pm 0.0577	109.67
5	8	0.4773 \pm 0.0274 ^{▲▲}	134.87
10	8	0.3675 \pm 0.0262	103.84

与空白相比 ▲▲ $P < 0.001$, ▲ $P < 0.01$ (以下同)

表 2 4 种中药不同浓度 (mg/L) 对 OB 增殖的影响

组别	浓度 (mg/L)	n	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	PR (%)
女贞子	0	7	0.4921 \pm 0.0804	100.00
	5	8	0.6506 \pm 0.0570 ^{▲▲}	132.21
	10	8	0.6631 \pm 0.0574 [▲]	134.74
	100	8	0.6526 \pm 0.0526 ^{▲▲}	132.61
	500	8	0.7450 \pm 0.0429 ^{▲▲}	151.39
	1000	8	0.7554 \pm 0.0106 ^{▲▲}	153.51
淫羊藿	0	7	0.4921 \pm 0.0865	100.00
	5	8	0.5984 \pm 0.0527 [▲]	121.60
	10	8	0.6165 \pm 0.0426 [▲]	125.28
	100	8	0.6517 \pm 0.0763 ^{▲▲}	132.43
	500	8	0.6738 \pm 0.0699 ^{▲▲}	136.92
	1000	8	0.6738 \pm 0.0413 ^{▲▲}	136.92
黄芪	0	7	0.4744 \pm 0.0865	100.00
	5	8	0.6376 \pm 0.0657 ^{▲▲}	134.40
	10	8	0.6223 \pm 0.0415 ^{▲▲}	131.17
	100	8	0.6269 \pm 0.0550 ^{▲▲}	132.15
	500	8	0.6625 \pm 0.0279 ^{▲▲}	139.65
	1000	8	0.6679 \pm 0.0376 ^{▲▲}	140.78
大黄	0	19	0.4995 \pm 0.0592	100.00
	5	16	0.5012 \pm 0.0428	100.34
	10	14	0.4988 \pm 0.0207	99.85
	100	14	0.5790 \pm 0.0497 ^{▲▲}	115.92
	500	15	0.4917 \pm 0.0307	98.44
	1000	13	0.3329 \pm 0.0456 ^{▲▲}	66.65

2.2 单味中药淫羊藿、女贞子、黄芪在 5mg/L、10mg/L

L、100mg/L、500mg/L、1000mg/L 5 个不同浓度均使 MTT 法检测的光吸收值升高, 各组与空白组间差异均有显著意义 ($P < 0.001$), 但不同浓度间差异无显著性; 大黄低浓度组 (5mg/L、10mg/L) 与空白组无差别, 中浓度组 (100mg/L) 显著增加光吸收值, 高浓度组 (1000mg/L) 显著降低光吸收值 (见表 2 3)。

3 讨论

3.1 成骨细胞是骨形成细胞, 对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡与骨量维持起关键作用。成骨细胞功能减退导致骨小梁变细、薄弱、穿孔, 皮质骨出现多孔性改变, 从而引起骨质疏松症的发生^[2]。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, 有望找到一种更好的治疗骨质疏松症的方法^[3]。

本研究采用成骨肉瘤细胞株 UMR-106 进行实验, 可避免成骨细胞原代培养中存在的种种问题, 如成骨细胞群体的不均一性, 成纤维细胞的污染等^[4]。同时, 在给药前用无血清培养基培养细胞 24h, 不仅能保证大多数细胞在给药前处于同一细胞分裂相, 排除因为细胞分化状态不同而可能引起的增殖差异, 而且能排除血清中含有多种物质的可能影响, 以显示纯粹的药物作用。

3.2 自 1961 年氟化钠开始用于 I 型骨质疏松症的治疗以来, 经过 30 多年的临床观察, 证明氟能增加骨小梁骨量^[5]。尽管其具体作用机制还有待进一步研究, 但可以肯定的是氟可以使成骨细胞数量增加, 活性提高, 骨形成加强^[6]。因此选用氟化钠作为对照药物, 同时也可以在一定程度上确证本实验所用成骨细胞株机能的正常。从总体上看, 在 1.25 μ mol/L-5 μ mol/L 的低浓度范围中, 氟化钠有较好的促增殖作用, 超过 10 μ mol/L 促增殖作用明显减弱, 与空白组无差别。提示氟化钠只在一定的低浓度范围内对成骨细胞有促增殖作用, 浓度过高并不能使其促进作用加强, 反而可能抑制细胞的增殖。国内和国外学者均有类似的研究报道^[3,7]。这对临床应用可能有一定的参考价值, 提示患者用药后应密切注意其血氟浓度的变化, 并根据浓度的高低随时调整用药剂量^[6]。

3.3 大量实验报道淫羊藿水提液能防治实验性骨质疏松症, 可抑制破骨细胞的活性, 同时又能促进成骨细胞的功能^[8], 对试管内鸡胚股骨的生长有明显的促进作用^[9], 并能促进骨髓细胞 DNA 的合成^[10]。本实验也表明淫羊藿有明显促进体外培养成骨样细

胞增殖的作用, 且高浓度作用较低浓度有所增强。

本研究发现, 在增加 MTT 光吸收值、促成骨细胞增殖方面, 女贞子各浓度组较淫羊藿各浓度组不仅毫不逊色, 反而显得作用更强。如从促增殖率看, 女贞子促增殖率最高达到 153.51%, 而淫羊藿最高为 136.92%。这一方面提示, 以女贞子为代表的补肾阴类药物对骨质疏松症的治疗同样具有良好作用, 其作用强度不仅与补肾阳药相近, 甚至可能更好。同时女贞子促增殖率在 5mg/L 为 132.21%, 在 500mg/L 时达到 151.39%, 高浓度较低浓度显示一定的作用上升趋势, 与淫羊藿类似。因而设想, 尽管有“补肾阳”与“补肾阴”的区别, 然而同为“补肾”“入肾”的中药, 则二者在治疗骨质疏松症的作用机制上, 很可能存在一定的共性。

本实验发现黄芪各浓度均有较强的促成骨细胞增殖的作用, 并与浓度变化无明显关系, 提示其作用机制可能不同于淫羊藿和女贞子, 值得进一步深入探讨。

实验中发现上述三味药物在最小实验浓度 5mg/L 即具有显著效果, 尤其以黄芪最为明显, 提示进一步研究可再降低实验药物浓度, 以便得出更为明确的量效关系。

本实验中通过酒蒸大黄药液对体外培养成骨细胞的直接作用, 显示其较小剂量比较大剂量更能促进成骨细胞增殖, 剂量过高反而有明显的抑制作用。这对发挥大黄对骨质疏松症的治疗作用可能进一步的参考价值。

淫羊藿、女贞子、黄芪分属补肾阳、补肾阴和补脾益气中药, 在骨质疏松症的临床治疗中发挥着重要作用, 在体外培养成骨细胞系中, 也有明显促成骨细胞增殖作用。大黄也有促骨细胞增殖作用, 但其作用方式明显与上述几种偏“补”的药物大相径庭。可以设想, 上述中药治疗骨质疏松症的可能机制之一是促进成骨细胞增殖。不同类别中药的具体作用机制到底有何不同, 以及具体某味中药与常用西药作用机制之间的区别, 均是值得进一步深入探讨的问题。

参考文献:

- [1] 邓力, 郑虎, 翁玲玲. 用培养成熟大鼠头盖骨的成骨细胞筛选药物[J]. 华西药理学杂志, 1998, 13(2): 85.
- [2] 王洪复, 金蔚芳, 高建军. 骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(2): 58-62.

- [3] 郭昭庆,党耕町,王志国. 氟化钠及续继组分对成骨细胞增殖的影响[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(2): 84.
- [4] 王卫华,于世凤. 成骨细胞体外培养方法研究进展[J]. 国外医学口腔学分册, 1996, 23(5): 287-290.
- [5] Murray TM. Fluoride treatment of postmenopausal osteoporosis: age, renal function and other clinical factors in the osteogenic response. J Bone Res, 1990, 5(suppl): 27-30.
- [6] 林华,韩祖斌. 氟化物治疗骨质疏松的新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(2): 74-76.
- [7] Wergedal JE, Lau KWH, Baylink DJ. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and pgsphatase activities in human bone cell culture[J]. Clin Orthop, 1988, 233: 274-282.
- [8] 李青南,廖进民,吴铁,等. 淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(8): 467.
- [9] 高子范,杨宗智,马克昌,等. 淫羊藿注射液对试管内鸡胚股骨生长的促进作用[J]. 中西医结合杂志, 1985, 5(3): 172.
- [10] 刘福春,丁光霞,李菊仙,等. 淫羊藿多糖对羟基脲所致“阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率的影响[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(10): 620.