

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.15.015

二仙汤含药血清对过氧化氢诱导成骨细胞骨形成的影响

刘波^{*}, 吴琪, 刘志文, 徐彭, 杨硕, 谢慧慧, 王莹

(江西中医药大学药学院, 江西省南昌市湾里区梅岭大道 1688 号, 330004)

摘要 目的 探讨二仙汤治疗骨质疏松症的可能作用机制。方法 成骨细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 分为正常组、模型组、戊酸雌二醇组和二仙汤高、中、低剂量组, 每组 6 孔。除正常组外其余各组用含 $600 \mu\text{mol/L}$ 过氧化氢 (H_2O_2) 的完全培养基培养 3h 诱导成骨细胞骨形成模型。正常组用空白对照血清培养, 戊酸雌二醇组给予 8% 戊酸雌二醇含药血清培养, 二仙汤高、中、低剂量组分别给予 8%、4%、2% 二仙汤含药血清培养 48h, 检测成骨细胞增殖、碱性磷酸酶 (ALP) 活力、钙结节生成以及骨形成蛋白 2 (BMP-2) 和骨保护素 (OPG) 蛋白表达。另外以钙离子通道阻断剂 Nifedipine ($10 \mu\text{mol/L}$) 进行干预, 观察 Nifedipine 对 H_2O_2 刺激成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达以及 Nifedipine 干预下二仙汤含药血清对 H_2O_2 刺激成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达的影响。结果 与正常组比较, 模型组细胞增殖、ALP 活性、钙结节及 BMP-2 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。二仙汤各剂量组不同程度促进成骨细胞增殖, 提高 ALP 活力和钙结节生成, 促进 BMP-2、OPG 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Nifedipine 能提高 H_2O_2 刺激下成骨细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Nifedipine 组比较, 二仙汤含药血清和 Nifedipine 合用则显著提高 H_2O_2 刺激下的成骨细胞增殖, 降低 BMP-2、OPG 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 二仙汤含药血清能明显改善氧化刺激对成骨细胞骨形成的影响, 其机制可能与调节钙离子通道有关。

关键词 骨质疏松症; 二仙汤; 成骨细胞; 过氧化氢; 钙离子通道

骨质疏松症是一种临床上常见的代谢性疾病, 主要表现为骨痛、易骨折等, 病理特征表现为骨量减少、骨脆性增加、骨微细结构改变等^[1]。近年来研究发现, 氧化应激与骨质疏松症之间存在一定的关联性^[2], 并证实氧化应激是骨质疏松症的重要发病机制之一^[3]。成骨细胞在骨重建过程中起关键作用, 成骨细胞数量与功能的变化与骨质疏松症的发生、发展直接相关^[4]。钙离子作为第二信使, 是多种信号传导途径的枢纽, 能调节细胞生长、分化及功能活性等, 而钙离子通道是钙离子进出细胞的关键途径, 钙离子通道对成骨细胞增殖、分化、代谢、凋亡等生理功能起重要作用^[5]。活

性氧产生是骨质疏松症产生的主要因素之一^[6]。我们前期研究发现, 中药复方二仙汤具有补肾益精的功效, 能抗氧化, 提高骨密度, 改善骨质疏松症^[7-9]。本研究建立过氧化氢 (H_2O_2) 诱导成骨细胞骨形成变化模型, 探讨二仙汤对成骨细胞骨形成的影响及钙离子通道在二仙汤改善骨质疏松症中的作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 38 只, 8 周龄, 体质量 $180 \sim 220 \text{ g}$, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2016-0002。SPF 级新生乳鼠 24 只, 1 日龄, 雌雄不限, 购自江西中医药大学实验动物科技中心, 实验动物许可证号: SYXK (赣) 2014-0008。

基金项目: 国家自然科学基金 (81560723); 江西省自然科学基金计划 (20151BAB205072)

* 通讯作者: bozhrlu@163.com, (0791) 87118919

1.2 药品

二仙汤由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母等组成, 比例为 2: 2: 2: 2: 1: 1, 中药饮片均购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 统一煎煮, 用双蒸水漫过药液面 2 cm, 先浸泡 30 min, 后武火煮沸, 转换成文火煎煮 40 min, 反复煎煮 2 次, 收集 2 次药液合并, 浓缩成为二仙汤浓缩液 1.2 g/ml。戊酸雌二醇片购于拜耳医药保健有限公司, 批号: 306A。

1.3 主要试剂与仪器

钙离子阻断剂 Nifedipine 试剂 (批号: MKCB9232) 购自 Sigma 公司; H_2O_2 购于天津市飞船化学试剂科技有限公司 (分析纯, 批号: 20170401); 二甲基亚砜 (DMSO, 批号: 302A0323)、茜素红 (批号: 412A039)、噻唑蓝 (MTT, 批号: 6041053)、氯化十六烷基吡啶 (批号: 6004-24-6) 均购自 Solarbio 公司; 细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测试剂盒 (批号: 20170927) 购自南京建成生物工程中心; BCA 检测试剂盒 (批号: RD231234) 购自 Thermo 公司; 骨形成蛋白 2 (BMP-2, 批号: ab14933) 和骨保护素 (OPG, 批号: ab73400) 抗体购自 Abcam 公司; 0.25% Trypsin-EDTA (批号: 71160101100) 购于美国 Genview 公司; β -actin 抗体 (批号: AF7018) 购自 Affinity 公司; L-DMEM 培养液 (批号: AB10179384) 购自 Hyclone 公司。

ELX800 酶标仪 (美国 BioTek 仪器有限公司); Mini-PROTEAN 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); DMIL-LED 倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 二仙汤含药血清的制备

将 SD 大鼠体重分布相差 10 g 以内的大鼠归类, 然后从同类大鼠中简单随机抽取 3 只分别为 3 个组即: 空白对照组、戊酸雌二醇组、二仙汤组, 其余依上法进行。空白对照组 15 只, 其余两组每组 8 只。空白对照组灌服生理盐水 10 ml/kg, 戊酸雌二醇组则灌服戊酸雌二醇 0.8 mg/(kg · d), 二仙汤组则灌服二仙汤浓缩液 12 g/(kg · d)。各组连续给药 7 天, 最后 1 次给药后 1h 腹主动脉取血, 即获得空白对照血清、戊酸雌二醇含药血清、二仙汤含药血清。

2.2 原代成骨细胞的分离和培养^[1]

取新生小鼠乙醇浸泡消毒处死。无菌条件下剪

开头盖骨, PBS 液清洗, 剪成 1 mm², 均匀接种至底面积为 25 cm² 的培养瓶, 随后加入 5 ml 含有 20% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液。4 天后根据细胞贴壁程度半量换液, 细胞融合时 0.25% Trypsin-EDTA 消化并以 1: 2 传代。传至第 3 代 (P3), 经鉴定为成骨细胞则用于研究。

2.3 二仙汤含药血清对 H_2O_2 刺激成骨细胞功能的影响^[1]

实验分为 6 组, 即正常组 (无 H_2O_2 处理), 模型组 (H_2O_2 处理), 戊酸雌二醇组 (8% 戊酸雌二醇含药血清 + H_2O_2 处理), 二仙汤高剂量组 (8% 二仙汤含药血清 + H_2O_2 处理), 二仙汤中剂量组 (4% 二仙汤含药血清 + H_2O_2 处理), 二仙汤低剂量组 (2% 二仙汤含药血清 + H_2O_2 处理), 每组设 6 个复孔。

2.3.1 MTT 法检测细胞增殖 P3 代成骨细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 正常组更换空白对照血清的完全培养基, 其余各组则根据分组更换含不同含药血清的完全培养基, 连续培养 48 h。除正常组更换完全培养基外, 其余各组分别更换含 600 μ mol/L H_2O_2 的完全培养基, 继续培养 3 h, 去除孔内培养液更换新鲜培养液, 每孔加 20 μ l 5 g/L MTT, 继续培养 4 h, DMSO 溶解, 用酶标仪测定样本在 490 nm 波长处的吸光度值。

2.3.2 成骨细胞 ALP 活性检测 将 P3 代成骨细胞以 5×10^3 /孔接种于 24 孔板中, 培养 12h, 按上述方法每组细胞加入含药血清, 3 天换液 1 次, 第 5 天除正常组外, 各组更换含 600 μ mol/L H_2O_2 的完全培养基, 继续培养 3h, 根据试剂盒方法检测 ALP 活性。

2.3.3 茜素红法检测成骨细胞钙结节的形成 P3 代成骨细胞以 5×10^3 /孔接种于 24 孔板, 培养 12 h, 按上述方法细胞分组给药 12 h, 除正常组外, 各组更换含 600 μ mol/L H_2O_2 的完全培养基, 连续培养 3h 后按细胞分组给药更换培养基, 每 3 天以 H_2O_2 刺激 3 h 并换液 1 次, 第 21 天后以 95% 乙醇固定 30 min, 0.1% 茜素红于 37 $^{\circ}$ C 染色 30 min, 光镜下观察照相, 10% 氯化十六烷基吡啶定量钙结节。

2.3.4 Western blot 法检测成骨细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达 P3 代成骨细胞, 传代后接种于直径为 60 mm 的培养皿中。按上述方法每组细胞加入含药血清, 连续培养 48 h, 除空白组外, 更换含 600 μ mol/L H_2O_2 的完全培养基, 继续培养 3h, 弃

去培养基,用 4℃ 预冷的 PBS 冲洗一遍,加入 200 μ l RIPA 裂解液,冰上裂解细胞 40 min,将裂解后的样品离心 10 min,以 BCA 试剂盒测定 BMP-2、OPG 蛋白浓度。

2.4 Nifedipine 对 H_2O_2 刺激成骨细胞骨形成变化的影响

实验分为 4 组,即正常组(无 H_2O_2 处理),模型组(H_2O_2 处理),正常 + Nifedipine 组,模型 + Nifedipine 组。 H_2O_2 给药浓度为 600 μ mol/L, Nifedipine 给药浓度为 10 μ mol/L。依照 2.3 相同的方法、时间培养细胞,检测各组细胞增殖、ALP 活性及成骨细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达。

2.5 Nifedipine 作用下二仙汤含药血清对 H_2O_2 刺激成骨细胞骨形成的影响

实验分为 4 组,即模型组(H_2O_2 处理),模型 + 二仙汤组,模型 + Nifedipine 组,模型 + 二仙汤 + Nifedipine 组。二仙汤含药血清给药量选择 8% 的高剂量二仙汤含药血清, Nifedipine 给药剂量为 10 μ mol/L。依照 2.3 相同的方法、时间培养细胞,检测各组细胞增殖、ALP 活性及成骨细胞 BMP-2、OPG 蛋白表达。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料符合正态分布且方差齐性以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 二仙汤对 H_2O_2 刺激成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性、钙结节及 BMP-2、OPG 蛋白表达影响

表 1 示,与正常组比较,模型组细胞增殖、ALP 活性、钙结节及 BMP-2 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),OPG 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,戊酸雌二醇组 ALP 活性、钙结节及 BMP-2、OPG 蛋白表达升高($P < 0.01$);二仙汤高剂量组细胞增殖、钙结节及 BMP-2、OPG 蛋白表达升高,二仙汤中、低剂量组细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达亦升高($P < 0.01$)。与二仙汤高剂量组比较,二仙汤中剂量组钙结节及 BMP-2 蛋白表达降低,二仙汤低剂量组细胞增殖、钙结节及 BMP-2 蛋白表达亦降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。二仙汤低剂量组钙结节及 BMP-2、OPG 蛋白表达低于二仙汤中剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 Nifedipine 对 H_2O_2 刺激成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达影响

表 2 示,与正常组比较,模型组细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2 蛋白表达明显降低($P < 0.01$),正常 + Nifedipine 组各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,模型 + Nifedipine 组 ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常 + Nifedipine 组比较,模型 + Nifedipine

表 1 各组成骨细胞细胞增殖、ALP 活性、钙结节及 BMP-2、OPG 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞增殖 (OD 值)	ALP 活性 (1 金氏 U/100ml)	钙结节 (OD 值)	BMP-2 (灰度值)	OPG (灰度值)
正常组	6	0.560 $\pm$ 0.015	1.066 $\pm$ 0.064	0.259 $\pm$ 0.006	0.878 $\pm$ 0.04	0.605 $\pm$ 0.02
模型组	6	0.425 $\pm$ 0.034**	0.925 $\pm$ 0.028*	0.195 $\pm$ 0.015**	0.401 $\pm$ 0.01**	0.715 $\pm$ 0.04
戊酸雌二醇组	6	0.431 $\pm$ 0.038	1.911 $\pm$ 0.086 Δ	0.249 $\pm$ 0.017 Δ	0.483 $\pm$ 0.01 Δ	0.920 $\pm$ 0.06 Δ
二仙汤高剂量组	6	0.574 $\pm$ 0.038 Δ	0.986 $\pm$ 0.079	0.239 $\pm$ 0.005 Δ	1.249 $\pm$ 0.01 Δ	1.100 $\pm$ 0.13 Δ
二仙汤中剂量组	6	0.572 $\pm$ 0.032 Δ	1.079 $\pm$ 0.069 Δ	0.216 $\pm$ 0.020 Δ	1.042 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	1.166 $\pm$ 0.00 Δ
二仙汤低剂量组	6	0.535 $\pm$ 0.029 $\Delta\Delta$	1.204 $\pm$ 0.076 Δ	0.186 $\pm$ 0.010 $\Delta\Delta\Delta\#$	0.666 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta\#$	1.039 $\pm$ 0.07 $\Delta\#$

注: ALP, 碱性磷酸酶; BMP-2, 骨形成蛋白 2; OPG, 骨保护素; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与二仙汤高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与二仙汤中剂量组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

表 2 Nifedipine 对 H_2O_2 刺激各组成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞增殖 (OD 值)	ALP 活性 (1 金氏 U/100ml)	BMP-2 (灰度值)	OPG (灰度值)
正常组	6	0.239 $\pm$ 0.016	3.646 $\pm$ 0.087	1.528 $\pm$ 0.19	0.777 $\pm$ 0.04
模型组	6	0.123 $\pm$ 0.012*	3.269 $\pm$ 0.073*	0.726 $\pm$ 0.11*	0.753 $\pm$ 0.04
正常 + Nifedipine 组	6	0.239 $\pm$ 0.011	3.770 $\pm$ 0.217	1.074 $\pm$ 0.29	0.739 $\pm$ 0.05
模型 + Nifedipine 组	6	0.130 $\pm$ 0.009 $\Delta\Delta$	3.512 $\pm$ 0.172 $\Delta\Delta$	1.665 $\pm$ 0.47 $\Delta\Delta$	0.895 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: ALP, 碱性磷酸酶; BMP-2, 骨形成蛋白 2; OPG, 骨保护素; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常 + Nifedipine 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 Nifedipine 干预下二仙汤含药血清对 H_2O_2 刺激各组成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞增殖 (OD 值)	ALP 活性 (1 金氏 U/100ml)	BMP-2 (灰度值)	OPG (灰度值)
模型组	6	0.480 ± 0.047	5.071 ± 0.285	0.692 ± 0.02	0.931 ± 0.04
二仙汤高剂量组	6	0.551 ± 0.032*	5.312 ± 0.007	0.857 ± 0.01**	0.873 ± 0.03
Nifedipine 组	6	0.531 ± 0.061	4.899 ± 0.179	1.278 ± 0.01**△	1.392 ± 0.04**△
二仙汤高剂量 + Nifedipine 组	6	0.636 ± 0.051**△▲	4.810 ± 0.092△	0.724 ± 0.02*△▲	1.021 ± 0.04*△▲

注: ALP, 碱性磷酸酶; BMP-2, 骨形成蛋白 2; OPG, 骨保护素; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与二仙汤高剂量组比较, △ $P < 0.01$; 与 Nifedipine 组比较, ▲ $P < 0.01$

组细胞增殖、ALP 活性降低, OPG 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 Nifedipine 干预下二仙汤含药血清对 H_2O_2 刺激成骨细胞后细胞增殖、ALP 活性及 BMP-2、OPG 蛋白表达影响

表 3 示, 与模型组比较, 二仙汤高剂量组细胞增殖及 BMP-2 蛋白表达升高, Nifedipine 组 BMP-2、OPG 蛋白表达升高, 二仙汤高剂量 + Nifedipine 组细胞增殖及 BMP-2、OPG 蛋白表达亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与二仙汤高剂量组比较, Nifedipine 组 BMP-2、OPG 蛋白表达升高, 二仙汤高剂量 + Nifedipine 组细胞增殖、OPG 蛋白表达升高, 而 ALP 活性及 BMP-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与 Nifedipine 组比较, 二仙汤高剂量 + Nifedipine 组细胞增殖升高, BMP-2、OPG 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收间的动态平衡是维持骨质量的重要因素, 成骨细胞的骨形成减少是导致骨量丢失的主要原因。ALP 活性的增加是成骨细胞分化的主要表现, 而 BMP-2、OPG 是骨形成的重要标志^[2]。活性氧 (ROS) 是细胞代谢过程中产生的有较强氧化刺激活性的副产物, 包括超氧负离子、羟自由基和 H_2O_2 等, ROS 对成骨细胞有明显的损害作用^[3]。本研究证实, H_2O_2 能明显抑制成骨细胞的增殖和分化, 抑制骨形成相关蛋白 BMP-2 蛋白的表达。

中医学认为, 骨质疏松症多属“骨痿”“骨痹”“腰痛”等范畴, 表现为腰膝酸软、疼痛。从病机来看多伴有肾虚, 肾为先天之本, 藏精, 主骨生髓。肾精亏虚, 骨髓失充则出现骨骼脆弱、腰膝酸软等。二仙汤是已故名医张伯讷教授针对围绝经期综合征研制的方, 全方由仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、知母及黄柏组成, 具有滋阴泻火、调理冲任、平衡阴阳之功效, 使肾精充实, 化生有源, 骨坚固有力, 近年来临床上常用来改善骨质疏松

症^[8-9]。本研究发现, 二仙汤含药血清同样能提高 H_2O_2 抑制的成骨细胞增殖和分化, 提高成骨细胞的钙结节形成能力, 提高 BMP-2 和 OPG 蛋白的表达, 促进骨形成, 充分说明二仙汤能抵抗 H_2O_2 对成骨细胞骨形成的损害作用。

近年来, 已发现成骨细胞细胞膜上存在离子通道^[4], 钙离子通道功能变化直接影响成骨细胞的增殖等^[5]。本实验发现钙离子通道阻断剂 Nifedipine 并不直接影响成骨细胞增殖, 这与文献报道^[4]相同, 但 Nifedipine 能直接抑制 BMP-2 蛋白的表达, 也能使 H_2O_2 抑制的成骨细胞分化及 OPG、BMP-2 蛋白表达提高, 表明钙离子通道参与氧化应激状态下的成骨细胞骨形成。二仙汤和 Nifedipine 同时应用能显著提高成骨细胞增殖, 提高成骨细胞 ALP 活性, 二仙汤也能明显抑制 Nifedipine 对成骨细胞 OPG、BMP-2 蛋白表达的提高作用, 这充分说明二仙汤能促进成骨细胞增殖、分化, 促进骨形成, 还可能直接调节钙离子通道的功能。

总之, 不同剂量的二仙汤含药血清均能不同程度促进成骨细胞骨形成功能, 改善氧化刺激对成骨细胞骨形成的影响, 同时也能抑制钙离子通道阻断剂对氧化刺激对成骨细胞骨形成的作用, 提示二仙汤促进成骨细胞骨形成作用还可能与调节钙离子通道有关。

参考文献

- [1] 邢燕, 毕宏焱, 张倩楠, 等. 骨质疏松常用中成药介绍 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19 (1): 83-84.
- [2] 周年, 刘波, 徐彭. 氧化应激与骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20 (12): 1845-1849.
- [3] 孙振双, 耿元卿, 张丽君, 等. 氧化应激介导绝经后骨质疏松症发病机制的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22 (8): 1063-1066.
- [4] 程婉, 许兵, 应航, 等. 抗骨质疏松中药对成骨细胞作用的研究进展 [J]. 中医正骨, 2012, 24 (2): 65-68.
- [5] MCDONALD F. Ion channels in osteoblasts: a story of two intracellular organelles [J]. Surgeon, 2004, 2 (2): 63-69.
- [6] MANOLAGAS SC. From estrogen-centric to aging and oxi-

- dative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(3): 266-300.
- [7] 刘波, 陈明, 李姗姗, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(2): 129-132.
- [8] WONG KC, LEE KS, LUK HK, et al. Er-xian decoction exerts estrogen-like osteoprotective effects in vivo and in vitro [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(2): 409-426.
- [9] 年华, 徐玲玲, 马明华, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28(3): 277-280.
- [10] 唐孝明, 万伦, 刘仲前, 等. 改良组织块法大鼠成骨细胞培养的研究 [J]. *四川医学*, 2004, 25(5): 540-542.
- [11] LIU W, MAO L, JI F, et al. Targeted activation of AMPK by GSK621 ameliorates H₂O₂-induced damages in osteoblasts [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 10543-10552.
- [12] GUO S, FEI HD, JI F, et al. Activation of Nrf2 by MIND4-17 protects osteoblasts from hydrogen peroxide-induced oxidative stress [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105662-105672.
- [13] VESTER H, HOLZER N, NEUMAIER M, et al. Green Tea Extract (GTE) improves differentiation in human osteoblasts during oxidative stress [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2014, 11: 15. doi: 10.1186/1476-9255-11-15.
- [14] HU F, PAN L, ZHANG K, et al. Elevation of extracellular Ca²⁺ induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway contributes to the proliferation of osteoblasts [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107217. doi: 10.1371/journal.pone.0107217.
- [15] BLAIR HC, ROBINSON LJ, HUANG CL, et al. Calcium and bone disease [J]. *Biofactors*, 2011, 37(3): 159-167.

Effect of Serum Containing *Erxian Decoction* (二仙汤) on Bone Formation of Osteoblasts Induced by Hydrogen Peroxide

LIU Bo, WU Qi, LIU Zhiwen, XU Peng, YANG Shuo, XIE Huihui, WANG Ying

(College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of *Erxian Decoction* (二仙汤) in the treatment of osteoporosis. **Methods** Osteoblasts were inoculated into 96-well plates at 5×10^3 holes and divided into normal group, model group, estradiol valerate group and *Erxian Decoction* high, medium and low dose groups, with 6 holes in each group. All groups except the normal group, were cultured in complete medium containing 600 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide (H₂O₂) for 3 h to induce osteoblast formation model. The normal group was cultured with blank control serum. The estradiol valerate group was given serum containing 8% valerate estradiol, and the *Erxian Decoction* high, medium and low dose groups were given 8%, 4%, 2% *Erxian Decoction* respectively. The drug-containing serum was cultured for 48 h. The osteoblast proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, calcium nodule formation, and the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and osteoprotegerin (OPG) protein were detected. In addition, the intervention of Nifedipine (10 $\mu\text{mol/L}$) was used to observe the effects of Nifedipine on cell proliferation, ALP activity, BMP-2 and OPG protein expression after H₂O₂ induced osteoblasts and its effects under the intervention of Nifedipine. **Results** Compared with the normal group, cell proliferation, ALP activity, calcium nodules and BMP-2 expression were decreased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Groups with different doses of *Erxian Decoction* could promote osteoblast proliferation, increase ALP activity and calcium nodule formation, and promote BMP-2 and OPG protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Nifedipine could increase BMP-2 and OPG protein expression of osteoblasts induced by H₂O₂ ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The combination of serum containing *Erxian Decoction* and Nifedipine could significantly increase the proliferation of osteoblasts induced by H₂O₂ and decrease the expression of BMP-2 and OPG protein as compared with simple use of Nifedipine ($P < 0.01$). **Conclusion** The serum containing *Erxian Decoction* can significantly improve the effect of oxidative stimulation on the formation of osteoblasts, the mechanism may be related to the regulation of calcium channels.

Keywords osteoporosis; *Erxian Decoction*; osteoblasts; hydrogen peroxide; calcium channel

(收稿日期: 2018-01-02; 修回日期: 2018-03-16)

编辑: 邓 媛