

菟丝子含药血清对成骨细胞代谢调控的影响

杜波^{1*} 王婧²

(1. 白城医学高等专科学校, 吉林省白城市棉纺路 27 号, 137000; 2. 首都医科大学附属复兴医院)

* 通讯作者: zgyyznb@163.com, 13522942184

[摘要] 目的 探讨菟丝子含药血清对体外培养大鼠成骨细胞代谢调控的影响。方法 采用血清药理学方法制备菟丝子含药血清; 采用改良的组织块法体外培养大鼠成骨细胞; 分别用 5%、10%、15%、20% 菟丝子含药血清诱导培养成骨细胞 24h、48h、72h 后, MTT 法检测大鼠成骨细胞的增殖情况; 用对硝基苯二钠基质动力学法(PNPP)测定细胞内碱性磷酸酶(ALP)的活性; 培养 48h 后用 RT-PCR 方法检测 I 型胶原(COL-I) mRNA 的表达。结果 5% 和 10% 菟丝子含药血清在 48h 和 72h 能显著促进成骨细胞增殖并提高 ALP 活性; 在 48h 时 10% 菟丝子含药血清可促进 COL-I mRNA 的表达。结论 10% 菟丝子含药血清能够明显促进大鼠成骨细胞的增殖与分化, 表明其具有促进成骨作用。

[关键词] 菟丝子; 含药血清; 成骨细胞; 增殖; 分化

Effect of Dodder-Containing Serum on the Metabolism of Osteoblasts In Vitro

DU Bo¹, WANG Jing²

(1. Baicheng Medical College, Jilin Province, 137000; 2. Beijing Fuxing Hospital Affiliated to Capital Medical University)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Dodder-containing serum on the metabolism of rat osteoblasts (OB) cultured in vitro. **Methods** The Dodder-containing serum was prepared by serological pharmacological method, and the improved tissue block culture was adopted to culture the osteoblasts in vitro of newly born SD rats. After the culture of OB ($n=8$) for 24, 48, and 72 hours with 5%, 10%, 15%, and 20% Dodder-containing serum respectively, the MTT method was used to observe the proliferation, the PNPP matricial dynamic method was applied for observing the activity of intracellular alkaline phosphatase (ALP), and after 48h culture, the RT-PCR technique was employed to detect the COL-I mRNA expression. **Results** After 48h and 72h culture, the 5% and 10% Dodder-containing serum functioned significantly in improving the proliferation of OB and enhancing the activity of ALP. After 48h culture, the 10% Dodder-containing serum functioned in promoting the COL-I mRNA expression. **Conclusion** The 10% Dodder-containing serum can significantly promote the proliferation and differentiation of OB, indicating that it benefits osteogenesis.

Key Words Dodder seed (*Semen Cuscutae*); medicine-containing; osteoblasts; proliferation; differentiation

菟丝子是旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis-Lam*)的干燥成熟种子, 味辛甘, 性平, 归肝、肾、脾经, 具有补肾益精、养肝明目、安胎的功效^[1]。其主要成分为黄酮类化合物、多糖类化合物、生物碱类化合物和挥发油成分等。研究表明, 传统单味中药及其有效成分、复方中药及含药血清对成骨细胞增殖分化有促进作用^[2-4], 本实验通过体外细胞培养, 观察菟丝子含药血清对成骨细胞的增殖与分化作用的影响, 及其对成骨细胞分泌的 I 型胶原(COL-I) mRNA 表达的影响, 为临床治疗骨质疏松症新药开发提供依据。

1 材料

1.1 试剂及药物

胎牛血清(北京燕生生物技术有限公司, 批号: 20110126); 胰蛋白酶、II 型胶原酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均为 Sigma 公司; DMEM 培养

基(Gibco, 批号: 20101016); 碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(保定长城试剂有限公司, 批号: 20110115); Redzol 总 RNA 提取试剂(北京赛百盛基因技术公司, 批号: 042811); M-MLV 反转录酶(Tiagen 公司产品, 批号: J8302); Taq PCR MasterMix(Tiagen 公司产品, 批号: J8322); 菟丝子, 河北省中医院购入。

1.2 仪器

XDS-1B 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 二氧化碳培养箱(美国 Nature 公司); 酶标仪(奥地利 TECAN 公司); 7230G 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器公司); DYY-12 型三恒多用电泳仪(北京市六一仪器厂); PCR 仪(英国 Techne 公司)。

1.3 动物

SD 大鼠, 20 只, 雌雄不限, 体重(200±15)g, 动物合格证号: 810024; 出生 24h 内 SD 系乳大鼠, 5

只,性别体重不限,动物合格证号:612079,均由河北医科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 引物设计

所有 PCR 引物均由上海生工生物技术有限公司合成(见表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列

转录物	正向引物	反向引物	引物长度
β -actin	GAGACCTTCAAG- ACCCAGCC	TGGGGGCATCGG- AACCGCTCA	443bp
I 型胶原	AGCAGACGGGAG- TTTCACCTC	TGTCTTCTTGGC- CATGCGTCA	193bp

2.2 菟丝子含药血清制备

将 20 只大鼠按随机数字表法分为给药组、对照组,每组 10 只。常法制备成含生药 2g/ml 的浓煎液,剂量相当于临床等效剂量的 10 倍,对照组灌胃相同体积的生理盐水。2 次/天,连续 10 天,末次给药后股动脉放血,离心得含药血清和空白血清,过滤除菌,−20℃ 冰箱保存待用。

2.3 成骨细胞的培养及鉴定

无菌条件下,取出生后 24h 以内的大鼠颅盖骨,用 PBS 冲洗 3 次,放入 0.25% 的胰蛋白酶溶液中消化 15min,彻底清除骨表面被膜及软组织,将骨片剪成 1~3mm³ 的骨粒,弃去胰蛋白酶溶液。在 0.1% 胶原酶 II 中室温消化 45min,将消化液弃去,用 PBS 洗 3 次。将骨粒分散于 100ml 培养瓶中,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。3 天后细胞换液 1 次,7 天后用胰蛋白酶消化,细胞进行传代培养,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打传代,置于培养瓶中放入培养箱中继续培养。以后每 3 天传代 1 次。细胞传至第 5 代,通过细胞形态学观察及碱性磷酸酶(ALP)细胞化学染色鉴定所用细胞为成骨细胞^[5]。细胞纯度超过 85% 以上。

2.4 菟丝子含药血清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 培养液将细胞悬液稀释至 3×10^4 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 200 μ l,待细胞 70% 融合后吸弃培养基,加入含 5%、10%、15%、20% 菟丝子含药血清和空白血清的培养基,继续培养 24、48、72h 后,每孔加入 MTT(5g/L)20 μ l,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4h,吸弃培养基后加入 150 μ l 二甲

490nm 吸光度 A。

2.5 菟丝子含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响

取对数生长期成骨细胞,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液将细胞悬液稀释至 3×10^4 个/ml,接种于 24 孔板,待细胞 70% 融合后吸弃培养基,加入含 5%、10%、15%、20% 菟丝子含药血清和空白血清的培养基,继续培养 24、48、72h 后,分别将 2 块 24 孔板取出,用 PBS 冲洗 3 次后,每孔加入 250 μ l 0.1% TritonX100 溶液,吹打细胞,10min 后,收集每孔的溶液,用于 ALP 及蛋白质的测定。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 U/g 表示。

2.6 RT-PCR 检测 COL- I mRNA 的表达

取第五代细胞,以 5×10^4 个/ml 接种于 100ml 培养瓶中,培养 1 天后更换成无血清 DMEM 培养液,使细胞生长同步化。24h 后每组分别加入含 10% 菟丝子含药血清和 10% 空白血清的培养液。培养 48h 后收集细胞,用 Redzol 提取总 RNA。按照试剂盒说明进行逆转录与扩增。以 β -actin 为内参,扩增 35 个循环。PCR 产物分别用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,至凝胶成像仪中照相,图像分析系统测定各条带灰度值,以每组细胞目的基因电泳带面积灰度值与内参电泳带面积灰度值之比作为该标本目的基因表达的相对数值。

2.7 统计学方法

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。

3 结果

3.1 菟丝子含药血清对成骨细胞增殖的影响

表 2 示,大鼠成骨细胞在含菟丝子含药血清培养液中培养 24h 后,各组与空白血清组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);培养 48、72h 后,5% 和 10% 菟丝子含药血清有促增殖作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 菟丝子含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响

表 2 示,与空白血清组比较,培养 24h 时菟丝子含药血清对大鼠成骨细胞 ALP 活性差异无统计学意义($P > 0.05$);培养 48、72h 后,5% 和 10% 菟丝子含药血清培养液中成骨细胞的 ALP 活性明显高于空白血清组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 菟丝子含药血清对成骨细胞 COL- I mRNA 表达的影响

表 3 示,含药血清组能促进 COL- I mRNA 的

表 2 菟丝子含药血清对成骨细胞增殖及 ALP 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	浓度	样本数	24h		48h		72h	
			吸光度 A	ALP(U/g)	吸光度 A	ALP(U/g)	吸光度 A	ALP(U/g)
空白血清组		8	0.269±0.026	4.23±0.99	0.377±0.016	6.89±1.64	0.431±0.052	7.94±1.86
含药血清组	5%	8	0.279±0.017	4.37±1.07	0.416±0.023*	8.36±1.72**	0.487±0.066*	9.13±2.24*
	10%	8	0.282±0.025	4.47±0.82	0.449±0.032**	8.53±2.58**	0.503±0.068**	9.34±2.01*
	15%	8	0.270±0.031	4.23±0.92	0.387±0.041	7.05±1.99	0.443±0.076	8.25±2.38
	20%	8	0.263±0.029	4.35±1.23	0.379±0.033	6.99±1.53	0.433±0.053	8.17±1.72

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 3 菟丝子含药血清对成骨细胞 COL-Ⅰ mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	COL-Ⅰ mRNA	β-actin mRNA	COL-Ⅰ / β-actin
空白血清组	4	7.15±0.94	9.35±0.67	0.69±0.09
含药血清组	4	8.15±0.44	10.35±0.86	0.88±0.07*

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$

表达,高于空白血清组($P<0.05$)。

4 讨论

成骨细胞是参与骨代谢的重要细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化,直接参与骨形成。成骨细胞增殖受抑制及分化程度降低,将直接导致骨形成减少,引起骨质疏松的发生。因此,促进成骨细胞的数量增加和提高其分化功能将有利于骨的形成。

菟丝子始载于《神农本草经》,是温补肾阳的要药。现代研究表明,许多补肾中药具有促进大鼠成骨细胞增殖分化作用^[4,6-7]。本实验观察了菟丝子含药血清对体外培养的成骨细胞增殖与分化作用以及对 COL-Ⅰ mRNA 的表达的影响。实验结果表明,培养 48h 和 72h 后,与空白血清组比较,5%和 10%菟丝子含药血清有促增殖作用。ALP 为成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,是成骨细胞分化的早期标志,它可以从一个侧面反映药物对成骨细胞的作用^[5],与细胞增殖情况联合可有效反映成骨细胞的代谢功能。培养 48h 和 72h 后,5%和 10%浓度的菟丝子含药血清可以提高 ALP 活性,提示菟丝子含药血清可以促进成骨细胞分化。COL-Ⅰ 是成骨细胞增殖和分化时分泌合成的蛋白,10%浓度的菟丝子含药血清可以增强 COL-Ⅰ mRNA 的表达,与空白血清组比较差异有统计学意义。由此可见,菟丝子含药血清能促进大鼠成骨细胞增殖,提高 ALP 活性,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含药血清对成骨细胞代谢调控的影响,发现其治疗骨质疏松的作用机制与其促进成骨细胞的增殖与分化,促进成骨细胞中 COL-Ⅰ 的合成分泌作用有关。

可为菟丝子含药血清临床治疗骨质疏松症提供实验依据。

参考文献

[1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:291.

[2]张军芳,郭敏,王建华. 异补骨脂素加锌对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(3):409.

[3]宋芹,董小萍,郁小兵. 补骨脂提取物对体外培养小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞分化的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(10):1264.

[4]Hu YM, Liu C, Cheng KW, et al. Sesquiterpenoids from Homalomena occulta affect osteoblast proliferation, differentiation and mineralization in vitro [J]. Phytochemistry, 2008, 69(12): 2367-2373.

[5]司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2004:111.

[6]Huang J, Yuan L, Wang X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro [J]. Life Sci, 2007, 81(10): 832-840.

[7]宋敏,罗晓,李宁,等. 淫羊藿总黄酮含药血清对大鼠成骨细胞增殖、分化的影响[J]. 中国中药杂志,2010,18(2):3.

(收稿日期:2011-03-31;修回日期:2011-07-04)

[编辑:行之]

欢迎邮购《中医杂志》

1997 年 2、4、6 期、8—12 期,每册 3.50 元;1998 年 3—8 期,10—12 期,每册 4 元;1999 年 4—12 期,每册 4 元。合订本 65 元;2000 年 2—12 期,每册 5.80 元,合订本 85 元;2001 年 2—12 期,每册 6.50 元,合订本 95 元;2002 年 1—12 期,每册 6.80 元;2003 年 1—12 期,每册 6.80 元,合订本 105 元;2004 年 1、2 期、4—12 期,每册 6.80 元,合订本 115 元;2005 年 1—7、9、11、12 期,每册 6.80 元,合订本 125 元;2006 年 1—12 期,每册 7.30 元,合订本 135 元;2007 年 2—12 期,每册 8.80 元;2008 年 2—12 期,每册 9.80 元;2009、2010 年每册 9.80 元。2007—2010 年合订本每年 140 元。2011 年(半月刊),每册 9.80 元(缺 5、6 期),上半年合订本(1—12 期)140 元。《中医杂志》2006—2009 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄,如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部。邮编:100700,电话:(010)64018164。