



## 补肾中药对人成骨细胞钙离子摄取和钙化能力的影响

根据中医“肾主骨”理论,既往从整体和骨组织水平的研究认为补肾中药可以通过调节下丘脑-垂体-多个靶腺轴的功能,促进肠钙吸收,调节体内微量元素的平衡,改善骨的内部结构等机制防治骨质疏松[1][2],但其他对人成骨细胞钙离子摄取和钙化能力影响的机制尚不清楚。本实验选取补肾复方中药中常见的几种作为研究对象,从细胞学水平观察补肾中药对人成骨细胞钙代谢的影响,为“肾主骨”理论提供客观依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要设备、试剂及人成骨细胞的培养

Olympus倒置显微镜,CO<sub>2</sub>培养箱(奥地利,Nu3500E),流式细胞仪(美国Alibur Becton Dickinson公司)。补肾中药由鹿茸、骨碎补等药按君臣佐使配伍而成,所用药材购于南方医科大学南方医院中药房,并经中药鉴定。达尔伯克必需基本培养液(DMEM)、胎牛血清购于Gibco公司,胰蛋白酶、I型胶原酶、Fluo-3/AM、RNA酶购于Sigma公司。

无菌条件下取需要接受自体骨移植患者少量的髂骨松质骨,D-Hank液冲洗3次,剪成1 mm<sup>3</sup>大小碎片。多次冲洗,直至骨碎片变白。用0.25%胰蛋白酶消化45 min,去除首次消化所得的悬液,再加入2 mg/ml I型胶原酶消化30 min。弃消化液,冲洗。然后加入含有2 mg/ml I型胶原酶的DMEM培养液中消化4 h,滤网过滤后,1 000 r/min离心10 min,收集细胞,在含有10%胎牛血清的DMEM培养液中培养传代。

#### 1.2 补肾中药血清制备和实验分组

用前将药材按补肾中药配方混匀,煎煮,醇沉提取,高温消毒后,配制成高7.08 g(含生药,下同)/ml、中3.54 g/ml、低浓度1.77 g/ml中药入瓶封装待用。取SD雄性大鼠(200±20 g)每组各5只,以高、中、低不同浓度中药灌胃给药,灌服相应药液2次/d,共3 d。对照组灌服等量生理盐水,连续3 d。末次灌胃后第2天在无菌条件下抽取分离大鼠血清,标记,-20℃保存待用。

实验共分为4组:分别采用含高浓度补肾中药血清的DMEM完全培养液(高浓度补肾中药组)、含中浓度补肾中药血清的DMEM完全培养液(中浓度补肾中药组)、含低浓度补肾中药血清的DMEM完全培养液(低浓度补肾中药组)以及对照组血清的DMEM完全培养液进行成骨细胞培养,然后进行相应指标检测。

#### 1.3 检测指标

1.3.1 成骨细胞增殖的测定 第3代成骨细胞采用不同浓度补肾中药血清培养3 d后,0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,滤网过滤。用体积分数为70%冷乙醇固定30 min,PBS冲洗2次,加入RNA酶37℃消化30 min,PBS冲洗2次,再加入碘化丙啶4℃孵育30 min。用流式细胞仪进行细胞周期分析,打印DNA含量分布组方图,自动拟合出细胞周期各时相比比例,以增殖指数(proliferation index,PI)表示补肾中药血清对成骨细胞分裂增殖的影响。 $PI = (S \text{期细胞数} + G_2 \text{期细胞数} / M \text{期细胞数}) / (G_0 \text{期细胞数} / G_1 \text{期细胞数} + S \text{期细胞数} + G_2 \text{期细胞数} / M \text{期细胞数}) \times 100\%$ 。

1.3.2 成骨细胞钙离子摄取能力的测定 第3代成骨细胞0.25%胰蛋白酶消化，制成细胞悬液，计数细胞，在样本管内加入200 ml 8 mmol Fluo-3/AM 37 °C避光孵育30 min后，过滤至试管，然后加入不同浓度补肾中药血清培养10 min，以正常成骨细胞为对照。用流式细胞仪检测胞内Ca<sup>2+</sup>阳性百分比和荧光值的变化，以反映成骨细胞胞内游离Ca<sup>2+</sup>含量的变化。

1.3.3 成骨细胞钙化结节形成的测定 取第3代成骨细胞，以1×10<sup>6</sup>密度接种于12孔塑料培养板(f24 mm)内，培养4 h待细胞贴壁后，更换DMEM培养液(内含50 mg/ml抗坏血酸和10 mmol/L β-甘油磷酸钠)，每2天更换培养液1次，共培养14 d。培养完成后进行Von-Kossa染色。用有格涤纶薄膜(0.2 mm×0.2 mm)贴附于培养板底部，低倍显微镜下采用双盲法作钙化结节计数。

#### 1.4 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 8.0软件包进行统计学处理，GLM-General Factorial ANOVA作均数的显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞的培养及鉴定

72 h后成骨细胞逐渐贴壁生长，可见细胞呈梭形或鳞片状生长。1周后，细胞开始呈现成骨细胞形态，主要以长梭形细胞为主。约2~4周细胞融合成单层可作传代培养。经Gomori钙-钴法染色，中性红复染后，碱性磷酸酶染色阳性的成骨细胞基质呈棕黑色(图1)。培养液中加入VitC，β-甘油磷酸钠后细胞迅速呈复层生长，并有钙化结形成。培养28 d经Von-Kossa染色，显微镜下观察为黑色结节(图2)。

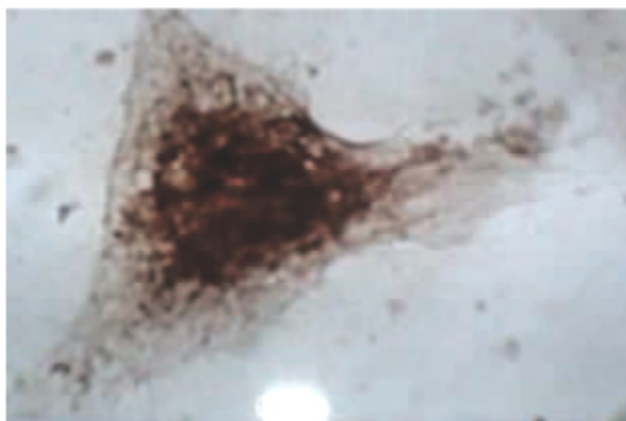


图1 Gomori钙-钴法染色可见成骨细胞胞质内大量分布的黑色颗粒状物质 (Gomori染色，原放大倍数：×200)

Fig.1 Dark granules in the cytoplasm of the osteoblast (Gomori staining, original magnification:×200)

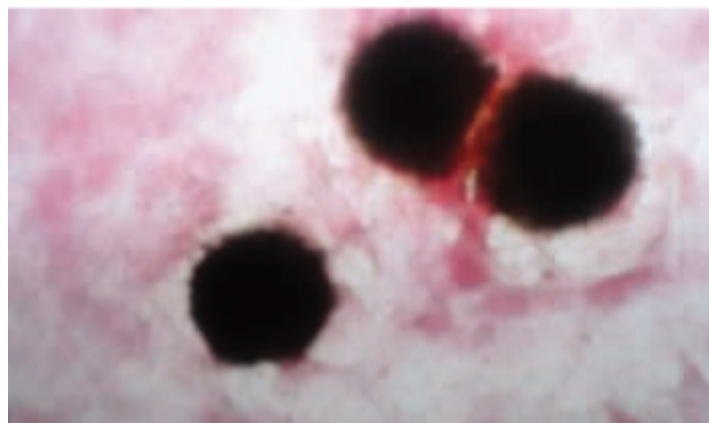


图2 Von-Kossa染色见成骨细胞基质旁多个形态不一的黑色结节(Gomori染色, 原放大倍数: ×250)

Fig.2 Black nodules adjacent to the cellular matrix of the osteoblast (von Kossa staining, original magnification:×250)

## 2.2 补肾中药血清对人成骨细胞增殖的影响

流式细胞仪检测结果(表1)显示: 经高、中、低浓度补肾中药血清培养72 h的成骨细胞, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞减少, S期细胞显著增加, 细胞增殖指数均有增高。提示高、中、低3种不同浓度的补肾中药血清可提高成骨细胞增殖、分化能力。

表1 不同浓度补肾中药血清对成骨细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.1 Effect of the serum of rats fed with different concentrations of the herbal drugs on osteoblast proliferation (*Mean*±*SD*)**

Group	S-phase cell ratio (%)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -phase cell ratio (%)	G <sub>2</sub> /M-phase cell ratio (%)	Proliferation index (%)
Control group	8.88±1.09	79.56±11.84	9.12±2.28	18.53±3.91
Low-dose group	13.56±2.54*	75.68±14.59	11.02±2.27	23.91±5.75*
Mid-dose group	19.42±1.65*	72.86±16.89	12.04±2.41	30.78±5.05*
High-dose group	14.12±1.80*	70.22±11.49	11.60±2.12	27.96±5.43*
<i>F</i>	27.29	0.41	1.58	5.83

\**P*<0.05 vs control group

## 2.3 补肾中药血清对人成骨细胞钙离子摄取能力的影响

流式细胞仪检测结果(表2)显示, 经高、中、低不同浓度补肾中药血清处理30 min的成骨细胞, 其胞内Ca<sup>2+</sup>含量均明显高于对照组, 其差异有显著性意义。

表2 补肾中药血清对成骨细胞钙离子摄取和矿化功能的影响

(*n*=5,  $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.2 Effect of the herbal drugs serum on calcium uptake and mineralization of the osteoblasts (*n*=5, *Mean*±*SD*)**

Group	Ca <sup>2+</sup> -positive cell ratio (%)	Fluorescence value of Ca <sup>2+</sup>	Number of calcium nodules
Control group	1.46±0.44	31.68±3.08	252.00±24.29
Low-dose group	54.01±4.03*	51.27±7.81*	297.00±18.45*
Mid-dose group	65.63±12.37*	60.02±12.51*	311.80±18.16*
High-dose group	82.13±12.69*	62.92±8.85*	321.60±15.57*
<i>F</i>	73.59	13.01	12.61

\**P*<0.05 vs control group

## 2.4 补肾中药血清对人成骨细胞矿化功能的影响

成骨细胞培养28 d后, 细胞基质中可见多个大小不等、形态不一的黑色结节。经高、中、低不同浓度补肾中药血清处理28d的成骨细胞, 其形成的黑色结节相对对照组多。其中, 高浓度补肾中药血清明显增加钙化结节的数量, 与对照组钙化结节数量相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ) (表2)。

## 3 讨论

随着社会老龄化的发展, 骨质疏松及其造成的合并症越来越普遍。促使对骨质疏松发病机制的阐明及防治药物的开发成为当务之急。由于目前药物治疗中尚存在诸如内分泌紊乱、癌变、疗效不确定、受生理因素限制、长期副作用等, 而中药具有副作用少, 疗效肯定等优点。因此, 近年来围绕补肾中药治疗骨质疏松的研究成为热点。

成骨细胞的钙转换功能是骨代谢的重要环节, 其机理比较复杂, 与成骨细胞的增殖、有机质形成和钙化能力密切相关。应用体外培养的成骨细胞可直接测定细胞对钙离子的摄取和释放情况。已知细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的增减、波动可导致胞内 $Ca^{2+}$ 信号的产生和终止。静息状态下成骨细胞内 $Ca^{2+}$ 相对稳定, 在某些外界因素刺激下, 细胞膜结构中的 $Ca^{2+}$ 通道可以开放, 使细胞内 $Ca^{2+}$ 内流而产生 $Ca^{2+}$ 信号。 $Ca^{2+}$ 作为胞内第二信使, 参与成骨细胞的信号传递, 调节细胞的反应, 调控转录、翻译等基因活动 [3][4][5]。研究证明, 各种激素、细胞因子等生物活性物质作用于靶细胞受体中的激酶活化及随后产生的生物学反应都是通过 $Ca^{2+}$ 实现 [6][7]。Fluo-3/AM是一种荧光染料, 可与细胞内 $Ca^{2+}$ 结合, 流式细胞仪可反映成骨细胞胞内 $Ca^{2+}$ 荧光强度的变化。经电脑自动分析系统可拟合出成骨细胞胞内的荧光强度, 从而得出 $Ca^{2+}$ 浓度的变化曲线。本实验结果显示, 在成骨细胞培养液中加入高、中、低不同浓度补肾中药血清后, 成骨细胞胞内 $Ca^{2+}$ 浓度均有明显瞬时升高。提示补肾中药可明显刺激成骨细胞膜上相应的受体, 导致 $Ca^{2+}$ 内流, 使细胞激活。成骨细胞膜上哪些受体对补肾中药起反应尚需进一步研究。

本实验还利用流式细胞技术能快速、定量检测和分选单细胞的特点, 来检测不同浓度补肾中药血清对成骨细胞增殖情况。检测结果显示, 对照组大部分细胞都休止在 $G_1$ 期, S期和 $G_2$ 期细胞所占比例减少, 表明DNA合成较少, 细胞增殖基本处于静止状态。加入补肾中药血清后成骨细胞S期和 $G_2$ 期比例增大, DNA合成增加, 细胞增殖活动旺盛, 说明补肾中药血清刺激处于静止状态的成骨细胞向增殖状态转化。成骨细胞在体外适宜环境下, 以膜内成骨的方式形成骨结节, 骨结节中间的成骨细胞钙化坏死后形成钙化灶, 由周围的成骨细胞爬行长入, 并被自身分泌的骨基质所包埋呈骨细胞样改变 [2]。本结果显示, 补肾中药刺激可以加快成骨细胞的分化增殖速度, 但低、中浓度血清并不能显著增加钙化结节形成的数目。只有高浓度血清可明显刺激钙化结节形成, 是否钙化结节的形成与补肾中药血清的浓度呈相关性, 有待实验进一步验证。

综上所述, 补肾药物作用成骨细胞, 可导致胞膜 $Ca^{2+}$ 通道反复快速而短暂地开放, 细胞在胞外 $Ca^{2+}$ 内流产生的 $Ca^{2+}$ 信号介导下激活, 通过细胞生物学调控系统, 迅速而灵敏地调节基因活动, 引起非特异性转录。同时促进成骨细胞增殖, 增加成骨细胞活性, 以发挥补肾药物的防治骨质疏松的作用。

### 参考文献:

[1] 马金, 郑洪新. 补肾中药防治骨质疏松的细胞分子生物学机理探要[J]. 中医药学刊, 2002, 20(2): 161-2.

Ma J, Zheng HX. Cellular and molecular biological mechanism of Bu-Shen Chinese Herbs on the treatment of osteoporosis[J]. J Tradit Chin Med, 2002, 20(2): 161-2.

[2] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸对抗维甲酸致骨质疏松作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(3): 242-4.

Li J, Chen XG, Wu QF, et al. Effects of GU LING WAN on osteoporosis by vitamin A acid: an experimental study [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(3): 242-4.

[3] 郭世跋, 罗先正, 邱贵兴. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津科学技术出版社, 2001. 25-7, 207-

[4] Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin[J]. J Clin Invest, 1999, 104(10): 1363-74.

[5] Wu XB, Li Y, Schneider A, et al. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice[J]. J Clin Invest, 2003, 112(6): 924-34.

[6] Senthil W. Signal transduction and ion channel activity[A]. In: Habicht, ed. Growth factors, differentiation factors, and cytokines[M]. Berlin: SpringerVerlag, 1990. 427.

[7] Chiusaroli R, Knobler H, Luxenburg C, et al. Tyrosine phosphatase epsilon is a positive regulator of osteoclast function in vitro and in vivo[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(1): 234-44.

#### 参考文献:

[1] 马金, 郑洪新. 补肾中药防治骨质疏松的细胞分子生物学机理探要[J]. 中医药学刊, 2002, 20(2): 161-2.

Ma J, Zheng HX. Cellular and molecular biological mechanism of Bu-Shen Chinese Herbs on the treatment of osteoporosis[J]. J Tradit Chin Med, 2002, 20(2): 161-2.

[2] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸对抗维甲酸致骨质疏松作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(3): 242-4.

Li J, Chen XG, Wu QF, et al. Effects of GU LING WAN on osteoporosis by vitamin A acid: an experimental study [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(3): 242-4.

[3] 郭世跋, 罗先正, 邱贵兴. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津科学技术出版社, 2001. 25-7, 207-11.

[4] Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin[J]. J Clin Invest, 1999, 104(10): 1363-74.

[5] Wu XB, Li Y, Schneider A, et al. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice[J]. J Clin Invest, 2003, 112(6): 924-34.

[6] Senthil W. Signal transduction and ion channel activity[A]. In: Habicht, ed. Growth factors, differentiation factors, and cytokines[M]. Berlin: SpringerVerlag, 1990. 427.

[7] Chiusaroli R, Knobler H, Luxenburg C, et al. Tyrosine phosphatase epsilon is a positive regulator of osteoclast function in vitro and in vivo[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(1): 234-44.