

丹参对成骨细胞株MC 3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性及DNA 合成的实验研究

丁 寅 相马俊一 山本照子 松本进 作田守

摘要 选择克隆化成骨细胞株——MC 3T3-E1 细胞,采用细胞培养方法,观察细胞内DNA 合成与碱性磷酸酶(ALPase)活性,了解丹参对体外培养的成骨细胞生长、分化与代谢的影响。研究结果显示,丹参明显增强MC 3T3-E1 细胞内ALPase 活性,5.0 mg/ml 浓度时,丹参对MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性影响最大,比对照组增强约 135%。丹参这种促进作用只限于分化晚期的MC 3T3-E1 细胞,而对分化早期细胞内碱性磷酸酶活性产生抑制作用。其次,这种作用还与药物作用时间有关。但是,丹参对各生长分化期的MC 3T3-E1 细胞内DNA 合成均无影响。本研究结果表明,丹参有明显增强体外培养分化晚期的MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性的作用,这种作用不是通过促进细胞增殖,而是改善细胞功能实现的,并且受丹参药物浓度与作用时间的影响,说明丹参可能在促进正畸牙齿移动中新生牙槽骨形成方面发挥作用。

关键词 丹参 细胞培养 MC 3T3-E1 细胞 骨改建 碱性磷酸酶 DNA

骨组织改建受多种因素的影响,如活性型维生素 D₃ 1,25(OH)₂D₃、甲状旁腺素(PTH)、降钙素、性激素、前列腺素 E (PGEs)、转化生长因子(TGF-β)、骨形成蛋白(BMP)及胰岛素样生长因子(IGFs)等¹的影响。关于这些激素影响骨组织改建的作用机理已有很多研究。近年来已发现中药丹参具有加速正畸牙齿移动的作用,组织学研究表明,注射丹参可以促进张力侧牙槽骨生长,图像分析结果显示,注射丹参可以增加移动牙牙周膜内毛细血管数目与血管面积²。但关于丹参促进骨改建作用的细胞生物学基础尚不清楚。本研究选择克隆化成骨细胞-MC 3T3-E1 为对象,采用细胞培养方法,通过观察细胞内DNA 合成与碱性磷酸酶活性,了解丹参对体外培养的成骨细胞生长、分化与代谢的影响。从细胞生物学基础上进一步认识中药丹参影响骨组织改建的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

纯化丹参注射液由上海新港制药厂提供。αMEM 培养液由美国西格玛化学公司提供,日本 ICN 生物制品公司提供胎牛血清(FBS)。

1.2 细胞培养

选用克隆化的小鼠成骨细胞-MC 3T3-E1 进行实验。将细胞种入 24 孔培养板中(每孔 3×10^4 个细胞),在含 10% FBS 的 αMEM 培养液中进行预培养数天,将细胞放入 CO₂ 孵箱进行培养(37℃, 5% CO₂, 95% 空气)。预培养结束后,将细胞换入含 0.3% FBS 并含不同浓度的纯化丹参的 αMEM 培养液中继续培养,观察丹参对培养细胞的作用。

1.3 碱性磷酸酶(ALPase)活性检测

培养结束时,倒弃原培养液,用 0.2% NonidetP-40 2ml 固定细胞,细胞经超声破碎后,加 160 μl 1 mol/L Tris-HCl 液于 200 μl 样品液中,采用 Lowry 法(1954)³ 检测 ALPase 活性。

1.4 细胞内DNA 及蛋白质合成检测

本研究通过检测细胞内游离的³H-胸腺嘧啶含量了解DNA 合成量。培养结束后,用 1.0 μCi/ml 的³H-

作者单位: 710032 第四军医大学口腔医学院正畸学教研室(丁 寅),日本大阪大学齿学部矫正科(相马俊一,山本照子 松本进 作田守)

胸腺嘧啶的标记细胞,然后细胞经 PBS 洗涤和 5% 三氯醋酸(TCA)及乙醚-乙醇混合液(1:3)固定,最后加入 1 mol/L NaOH 溶解。用液体闪烁计数器检测细胞内游离的³H-胸腺嘧啶的放射活性。细胞内蛋白质合成的测定,采用 Bradford (1976)⁴ 方法,细胞经(CBB)液染色后,用显微分光光度计在 595 nm 波长下检测。

1.5 统计学分析

全部数据经 Wilcoxon's 秩和分析法进行统计处理,统计图或表中,以每组(4孔)均值与标准差表示。

2 结 果

研究结果表明,纯化丹参明显增强 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性,不同浓度丹参对碱性磷酸酶活性的影响不尽一致,5.0 mg/ml 丹参对碱性磷酸酶活性影响最大,比对照组强约 135%,见图 1。其次,细胞的生长分化阶段不同,其丹参的作用也完全不同。丹参可以明显增强晚期 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性,但抑制分化早期细胞碱性磷酸酶活性,见图 2。丹参对各生长分化期 MC 3T3-E1 细胞内 DNA 合成均无影响,见附表。此外,丹参对成骨细胞内碱性磷酸酶活性的影响还存在时间依赖性,作用 96 h 后实验组碱性磷酸酶活性比对照组高 200%,见图 3。

附表 丹参对 MC 3T3-E1 细胞 DNA 合成的影响

预培养时间(d)	对照组	实验组
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
2	357.58 ± 10.98	345.31 ± 16.83*
4	233.94 ± 11.13	221.25 ± 9.94*
6	197.70 ± 12.58	198.42 ± 10.10*
8	133.93 ± 7.27	129.72 ± 9.11*
16	20.20 ± 1.39	21.81 ± 1.44*

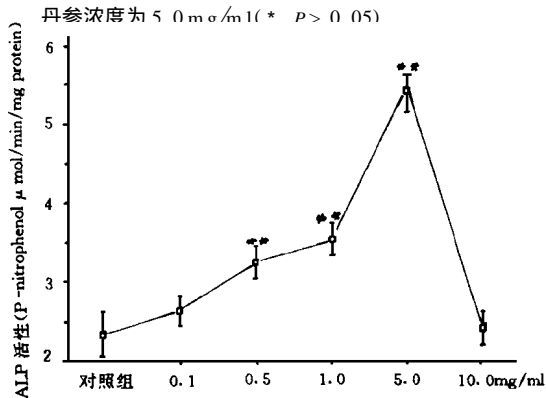


图 1 不同浓度丹参对 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性的影响
丹参作用时间为 72 h (** P < 0.01)

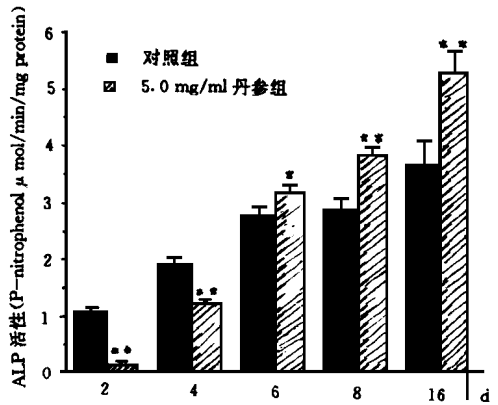


图 2 丹参对不同分化时期 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性的影响

丹参浓度为 5.0 mg/ml,作用时间为 72 h

(* P < 0.05, ** P < 0.01)

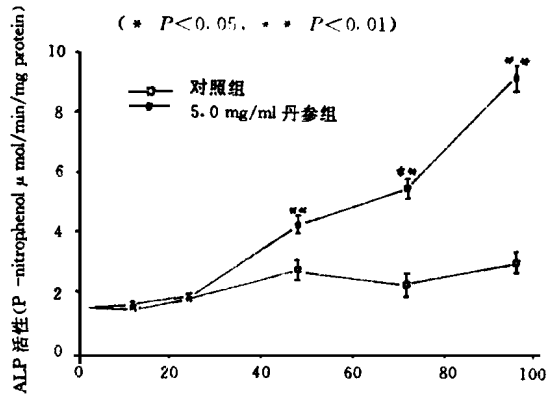


图 3 不同作用时间下,丹参对 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性的影响

丹参浓度为 5.0 mg/ml (** P < 0.01)

3 讨 论

3.1 关于 MC 3T3-E1 细胞株的生物学特性

该细胞株是 1981 年日本学者 Kadam a 等由新生 C57 BL/6 小鼠颅顶骨中分离培养所建立的一株成骨细胞株⁵,该细胞株具备体外培养成骨细胞的各种生物学特性,包括碱性磷酸酶活性、I 型胶原合成和基质矿化等,是一株良好的体外培养成骨细胞株⁶⁻¹⁰。

3.2 不同分化阶段细胞对丹参的反应

本研究结果表明,丹参明显增强分化晚期成骨细胞内碱性磷酸酶活性,但对分化早期成骨细胞内碱性磷酸酶活性则有明显抑制作用,说明成骨细胞的不同分化阶段对丹参存在不

同反应。Kurihara 等¹¹ 报道, 1, 25 (OH)₂D₃ 对分化早期的 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性有增强作用, 但对分化晚期的细胞内碱性磷酸酶活性无影响。Majeska 和 Rodan¹² 曾报道, 1, 25(OH)₂D₃ 对体外培养成骨细胞内碱性磷酸酶活性的影响依赖于细胞的分化阶段, 对分化早期细胞, 可以增强细胞内碱性磷酸酶活性, 而对分化晚期细胞, 则降低碱性磷酸酶活性。Ozawa¹ 研究表明, 持续的压力具有抑制分化早期成骨细胞内碱性磷酸酶活性的作用, 但对分化晚期成骨细胞内碱性磷酸酶活性无影响。以上研究表明分化阶段不同的成骨细胞具有不同的生物学特性。这可能是导致丹参对不同分化阶段的 MC 3T3-E1 细胞产生相反作用的主要原因, 但仍需进一步研究证实。

3.3 丹参对 MC 3T3-E1 细胞影响的机理

本研究结果表明, 丹参对分化早期和晚期的 MC 3T3-E1 细胞的 DNA 与蛋白质合成均无影响, 说明丹参增强碱性磷酸酶活性, 不是通过促进细胞增殖, 而是通过增强细胞的功能, 可以预测丹参促进新骨生成的作用机理, 可能是增强了成骨细胞本身的功能与活性。研究表明, 前列腺素 (PGs)¹³, 甲状旁腺素¹⁴ 等增强成骨细胞内碱性磷酸酶活性是通过细胞内环一磷酸腺苷调节的, 丹参如何增强成骨细胞内碱性磷酸酶活性, 还有待进一步研究。

3.4 丹参生物效应的影响因素

浓度的影响: 实验结果表明, 丹参对体外培养的 MC 3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶活性的影响与丹参浓度有密切关系, 0.5 mg/ml 浓度时, 已出现促进作用, 随浓度增加, 作用增强, 到 5.0 mg/ml 浓度时, 作用最强, 说明丹参的有效浓度为 0.5~5.0 mg/ml。

作用时间的影响: 丹参对 MC 3T3-E1 细胞的作用在加入 48 h 后才显示出来, 96 h 时达到较高水平, 这种时间依赖性可能与细胞代谢过程有关。

4 参考文献

- Ozawa H, Imamura K, Abe E, et al. Effect of continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC 3T3-E1) in vitro. *J Cell Physiol*, 1990; 142: 177
- Ding Y, Chen H, Xu RS. Effects of Salvia Miltiorrhiza Bunge (SMB) on vascularized reaction of periodontium during orthodontic tooth movement. Abstracts of 52th Annual Meeting of Japanese Orthodontic Society. 1993: 109
- Lowry OH, Robert NR, Wu ML, et al. The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurement. *J Biol Chem*, 1954; 207: 19
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- Kodama H, Amagai Y, Sudo H, et al. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *J Oral Biol*, 1981; 23: 899
- Suda H, Kodama H, Yamagai Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clone osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*, 1983; 96: 191
- Hata R, Hori H, Nagai Y, et al. Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinology*, 1984; 115: 867
- Nakatani Y, Tsunoi M, Hakeda Y, et al. Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC 3T3-E1 cells. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 123: 894
- Moss DW. In principles and practice of diagnostic enzymology. In: Wilkinson JH ed. New York: Yearbook Medical Publishers Inc, 399~422
- Posen S, Cornish C, Kleerekoper M. In metabolic bone disease (Avoli LV, Krane SM. eds). New York: Academic Press Inc, Vol 1: 141~181
- Kurihara N, Ishizuka S, Kiyoki M, et al. Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ on osteoblastic MC 3T3-E1 cells. *Endocrinology*, 1986; 118(3): 940
- Majeska RJ, Rodan GA. The effect of 1, 25-(OH)₂D₃ on alkaline phosphatase activity in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1982; 257: 3362
- Hakeda Y, Hiramatsu M, Kurihara N, et al. Inductive effects of prostaglandins on alkaline phosphatase in osteoblastic cell-clone MC 3T3-E1. *J Biochem*, 1985; 97: 97

14 Nakatani Y, Tsunoi M, Hakeda Y, et al Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC

3T3-E1 cells Biochem Biophys Communication, 1984; 123(3) 894

(1995- 08- 15 收稿)

Effects of *Salvia Miltiorrhiza Bunge* (SMB) on ALPase Activity and DNA Synthesis of Osteoblast Like Cells-MC3T3-E1

Ding Yin

Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, the Fourth Military Medical University

S. Soma, T. Takanoyama, S. Matsumoto, et al

Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Osaka University, Japan

Abstract

The authors previously found that SMB could increase the rate of remodel of periodontium and accelerate the orthodontic tooth movement in rabbits. To understand the role of SMB on the metabolism of cells in remodeling of periodontium, authors studied the effects of SMB on DNA synthesis and alkaline phosphatase (ALPase) activity of the cloned osteoblast like cells-MC 3T3-E1. The cells were cultured in a MEM with 0.3% of fetal bovine serum and treated with SMB at the concentration of 0.1 mg/ml- 10.0 mg/ml. There was no difference in DNA synthesis between the groups in different dosage of SMB and the group of control. On the other hand, SMB increased ALPase activity in a dose-dependent fashion in multilayer stage of cells, and up to maximum at the level of 5.0 mg/ml, in which concentration ALPase activity was about 135% greater than that of control. However, ALPase activity was inhibited in monolayer stage of cells by the addition of SMB. These results suggest that SMB has the stimulating effect on the phenotype of osteoblast-like cells in vitro, and may play an important role on accelerating the remodel of bone in vivo as well.

Key words: salvia miltiorrhiza bunge cell culture MC3T3_E1 alkaline phosphatase DNA

先天性上下牙槽粘连分离术一例报告

李翠平 刘志良 刘淑兰

患儿女性, 足月顺产, 24 h, 河北省曲阳县东流乡人。患儿出生后被发现上下牙槽粘连, 不能开口吮乳, 不能开口啼哭, 于 1995 年 10 月 8 日收入院。检查未见其它先天性畸形, 一般状况尚可。其母智力低下, 妊娠期间未用任何药物。父母非近亲婚配, 家族中无同病患者。

全身检查未见异常。口腔颌面外科检查见新生儿貌, 面部对称无畸形。口内上下牙槽粘连, 有吮乳反射, 啼哭时不能开口。左侧磨牙区有 0.8 cm 水平裂隙, 用

外科探针可经此裂隙探入口腔内, 其余上下牙龈均粘连, 口腔粘膜色泽正常。

入院后立即在无痛下上下牙槽分离术, 术中仅见软组织粘连, 以钝性分离为主, 必要时轻度锐剥离。分离顺利, 无出血。患儿哭闹时开口度 1.5 cm, 观察 24 h, 牙龈无出血, 能吮乳, 出院。

(1995- 05- 24 收稿)

作者单位: 071000 河北省职工医学院附属医院口腔科