



# 何首乌和菟丝子对破骨细胞和成骨细胞增殖及分化的影响

程孟春<sup>1</sup>, 刘艳秋<sup>1</sup>, 王莉<sup>1</sup>, 肖红斌<sup>1\*</sup>, 李晓燕<sup>2</sup>, 杨蕾<sup>2</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连 116023;

2. 河北以岭医药研究院, 河北石家庄 050035)

**[摘要]** 目的: 研究中药何首乌和菟丝子醇提物和主要单体成分对破骨细胞和成骨细胞增殖及分化的影响。方法: MTT法检测小鼠前破骨细胞株 RAW264.7 和小鼠颅顶前成骨细胞 MC3T3-E1 subclone 14 的存活率。RANKL 诱导 RAW264.7 分化后, 试剂盒检测 TRAP 酶活力。结果: 500 mg · L<sup>-1</sup> 何首乌醇提物作用 36 h, RAW264.7 细胞存活率降至 76.45%。100 mg · L<sup>-1</sup> 菟丝子醇提物作用 36 h, 存活率为 38.47%, 并呈时间依赖性。何首乌中的大黄素、大黄酸、大黄素甲醚对 RAW264.7 的生长有较强的抑制活性; 二苯乙烯苷和菟丝子中的金丝桃苷则无此活性。在 0.1 ~ 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 何首乌和菟丝子醇提物不同程度抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 的 TRAP 酶活力。何首乌和菟丝子醇提物对成骨细胞 MC3T3-E1 生长抑制作用较弱, 并在一定剂量和作用时间, 表现出一定的促增殖作用。结论: 何首乌和菟丝子在高剂量下可直接抑制前破骨细胞增殖, 但对成骨细胞毒性较小; 在低剂量下可抑制前破骨细胞分化, 并对成骨细胞生长略有促增殖作用。

**[关键词]** 何首乌; 菟丝子; 骨质疏松; MC3T3-E1; RAW264.7

何首乌和菟丝子均为临床比较常用抗骨质疏松中药<sup>[1]</sup>。何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 具有补肝肾, 益精血, 乌须发, 强筋骨之功效, 是滋补肝肾的常用中药。何首乌含有多种化学成分, 如蒽醌类(主要成分为大黄素, 大黄酸, 大黄素甲醚等), 二苯乙烯类(主要成分为 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, 简称二苯乙烯苷)和磷脂类化合物等<sup>[2]</sup>。菟丝子为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子, 具有补肝肾, 益精明目, 安胎的功效, 是中药补肾壮阳固精的要药。菟丝子主要含有黄酮类化合物(如金丝桃苷), 甾类化合物(如 β-谷甾醇)等<sup>[3]</sup>。目前对这 2 味补肾中药的抗骨质疏松作用研究多采用动物造模方式, 而它们对骨代谢的重要细胞(即成骨细胞和破骨细胞)是否有直接作用研究很少。基于此, 本实验在细胞水平考察这 2 味中药对成骨细胞和破骨细胞的活性影响。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆 14, 即 MC3T3-E1 subclone 14 和小鼠前破骨细胞 RAW264.7 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海), 前者以含 10% 胎牛血清(杭州四季青)的 α-MEM (Hyclone) 培养, 后者以含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco) 培养, 0.05% 胰蛋白酶(Solarbio)消化传代。细胞置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱内培养。

**1.2 试剂** MTT, RANK Ligand from mouse (RANKL), 抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒 (TRAP kit) 均为 Sigma 产品。

**1.3 样品** 何首乌 70% 乙醇提取物(以下简称何首乌醇提物)和菟丝子 95% 乙醇提取物(以下简称菟丝子醇提物)为石家庄以岭医药研究院提供, 何首乌分别用 10, 8, 8 倍体积的 70% 乙醇回流提取 3 次, 时间分别为 2, 2, 1 h, 提取液合并, 60 °C 减压浓缩至干; 菟丝子分别用 12, 10, 10 倍体积的 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次提取 1 h, 提取液合并, 60 °C 减压浓缩至干。何首乌, 菟丝子所含单体化合物二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside), 大黄素(emodin), 大黄酸(rhein), 大黄素甲醚(phycion), 金丝桃苷(hyperoside)均购自中国药品生物制品检定所, 雌二醇(E<sub>2</sub>)购自 Alfa Aesar。

**[稿件编号]** 20100712003

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-140, 2009ZX09313-003); 中国科学院重要方向性项目(KSCX2-YW-R-078)

**[通信作者]** \* 肖红斌, Tel: (0411) 84379667, Fax: (0411) 84379756, E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn



**1.4 仪器** 二氧化碳培养箱(HEAL FORCE),超净工作台(HEAL FORCE),酶标仪(sunrise,TECAN),倒置显微镜(Olympus)。

## 2 方法

**2.1 MTT法检测何首乌醇提物和菟丝子醇提物对RAW264.7细胞存活率的影响**<sup>[4]</sup>

RAW264.7细胞以每孔5 000个的浓度接种到96孔板,每孔100 μL,培养过夜。提取物以培养基配制成所需浓度,每孔加入100 μL,阴性对照孔加入等量培养基。培养36,84 h后,每孔加入MTT(5 g · L<sup>-1</sup>)20 μL,反应4 h后,小心甩去培养液,每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min充分溶解,酶标仪在492 nm波长检测吸光度值,计算细胞存活率,生存率(PR%) = (A<sub>实验组</sub> - A<sub>空白对照组</sub>) / (A<sub>阴性对照组</sub> - A<sub>空白对照组</sub>) × 100%。

**2.2 TRAP试剂盒检测RANKL诱导的RAW264.7细胞TRAP酶活力**<sup>[5]</sup> RAW264.7细胞以每孔2 000个接种到96孔板,每孔50 μL,培养过夜。阴性对照组每孔加入150 μL无血清培养基,RANKL组每孔加入50 μL无血清培养基配制的RANKL和

100 μL无血清培养基,实验组每孔加入以无血清培养基配制的RANKL 50 μL和何首乌菟丝子醇提物各100 μL,RANKL的终浓度为10 μg · L<sup>-1</sup>,培养6 d后,TRAP试剂盒染色,镜下计数染色阳性细胞数,以RANKL诱导组阳性细胞数为100%,计算阴性对照组和实验组的染色阳性细胞百分率。

**2.3 MTT法检测何首乌醇提物和菟丝子醇提物对MC3T3-E1细胞的影响** MC3T3-E1细胞以每孔4 000个接种到96孔板,方法同**2.1**。

**2.4 MTT法检测何首乌菟丝子所含单体化合物对RAW264.7细胞存活率的影响** 通过对RAW264.7细胞生长抑制作用的研究,初步检测何首乌菟丝子中的活性化合物,方法同**2.1**,计算细胞抑制率 = (A<sub>阴性对照组</sub> - A<sub>实验组</sub>) / (A<sub>阴性对照组</sub> - A<sub>空白对照组</sub>) × 100%。

## 3 结果

500 mg · L<sup>-1</sup>何首乌醇提物作用36,84 h后,RAW264.7细胞的存活率分别下降至76.45%,32.62%。菟丝子醇提物在100 mg · L<sup>-1</sup>剂量下,作用36 h后,RAW264.7细胞的存活率下降至38.47%,并呈剂量时间依赖性,结果见表1。

表1 何首乌菟丝子醇提物对RAW264.7细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /mg · L <sup>-1</sup>	36 h		84 h	
		A	PR/%	A	PR/%
何首乌醇提物	0	0.803 ± 0.019	100	2.156 ± 0.036	100
	0.1	0.701 ± 0.127	84.98	2.104 ± 0.252	97.39
	1	0.792 ± 0.018	98.28	1.942 ± 0.332	89.23
	10	0.911 ± 0.973	115.8	1.859 ± 0.458	85.01
	100	0.780 ± 0.052	96.52	1.732 ± 0.296	78.62
	500	0.643 ± 0.026 <sup>1)</sup>	76.45 <sup>1)</sup>	0.820 ± 0.152 <sup>1)</sup>	32.62 <sup>1)</sup>
菟丝子醇提物	0	0.803 ± 0.019	100	1.556 ± 0.088	100
	0.1	0.879 ± 0.035	111.09	1.418 ± 0.056	90.04
	1	0.841 ± 0.054	105.50	1.557 ± 0.166	100.05
	10	0.907 ± 0.011	115.21	1.502 ± 0.109	96.12
	100	0.385 ± 0.016	38.47 <sup>1)</sup>	0.405 ± 0.013	16.71 <sup>1)</sup>
	500	0.202 ± 0.014	11.48 <sup>1)</sup>	0.241 ± 0.017	4.87 <sup>1)</sup>

注:与阴性对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.05(表3同)。

前破骨细胞RAW264.7经TRAP染色阴性,用RANKL诱导后,前破骨细胞向成熟破骨细胞分化,TRAP染色阳性。0.2,2.0 mg · L<sup>-1</sup>的何首乌醇提物能抑制RANKL诱导的TRAP酶活力,使其染色阳性细胞百分率分别下降至26.98%,40.48%。菟丝子醇提物则在0.1,1.0 mg · L<sup>-1</sup>均使RANKL诱导的TRAP酶活力下降,染色阳性细胞数下降至

59%,结果见表2。

何首乌菟丝子醇提物对MC3T3-E1细胞的生长毒性较弱,何首乌醇提物在100,200 mg · L<sup>-1</sup>的剂量下,作用48 h,对MC3T3-E1细胞的生长略有促进作用。菟丝子醇提物在1,10 mg · L<sup>-1</sup>剂量下,作用120 h后对MC3T3-E1细胞也有一定促进生长作用,结果见表3。



表2 何首乌菟丝子醇提取物对 RAW264.7 细胞 TRAP 酶活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TRAP 阳性率/%
阴性对照	-	2.12 ± 0.86
RANKL	-	100 ± 18.68
$E_2$	0.01	51.74 ± 11.44 <sup>2)</sup>
	0.10	49.25 ± 5.47 <sup>2)</sup>
	1.00	47.26 ± 7.46 <sup>2)</sup>
	0.20	26.98 ± 10.32 <sup>1)</sup>
何首乌醇提取物	2.00	40.48 ± 15.08 <sup>1)</sup>
	20.00	86.51 ± 50.79
	0.10	59.70 ± 13.43 <sup>1)</sup>
菟丝子醇提取物	1.00	59.20 ± 4.98 <sup>2)</sup>
	10.00	101.00 ± 5.47

注:与 RANKL 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;  $E_2$  剂量单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表3 何首乌菟丝子醇提取物对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	48 h		120 h	
		A	PR/%	A	PR/%
何首乌醇提取物	0	0.340 ± 0.009	100	0.432 ± 0.009	100
	1	0.350 ± 0.018	106.63	0.461 ± 0.021	113.04
	10	0.351 ± 0.013	107.27	0.475 ± 0.017	119.26 <sup>1)</sup>
	50	0.364 ± 0.017	115.84	0.433 ± 0.014	100.30
	100	0.377 ± 0.011	123.97 <sup>1)</sup>	0.404 ± 0.008	86.95
	200	0.387 ± 0.019	130.40 <sup>1)</sup>	0.393 ± 0.012	82.24
菟丝子醇提取物	0	0.356 ± 0.007	100	0.432 ± 0.009	100
	1	0.362 ± 0.014	104.31	0.458 ± 0.007	132.68 <sup>1)</sup>
	10	0.368 ± 0.004	109.43	0.465 ± 0.013	114.68 <sup>1)</sup>
	50	0.349 ± 0.017	94.34	0.400 ± 0.018	78.07
	100	0.314 ± 0.003	65.77	0.363 ± 0.001	56.74
	200	0.331 ± 0.011	79.78	0.356 ± 0.025	52.24

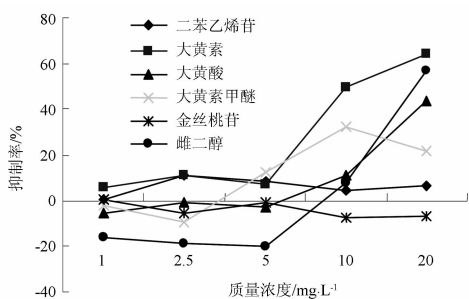


图1 何首乌菟丝子所含单体化合物对 RAW264.7 细胞增殖的影响(36 h)

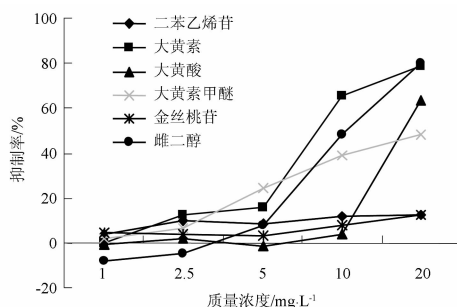


图2 何首乌菟丝子所含单体化合物对 RAW264.7 细胞增殖的影响(60 h)

本实验结果显示,何首乌醇提取物可以促进 MC3T3-E1 细胞的生长,0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的何首乌醇提

何首乌中的单体化合物大黄酸,大黄素,大黄素甲醚均对 RAW264.7 细胞生长有抑制作用,并呈时间剂量依赖性。二苯乙烯苷和菟丝子中的金丝桃苷无此活性,结果见图1,图2。

#### 4 讨论

骨质疏松(OP)是以骨量减少,骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病<sup>[6]</sup>。中医学把骨质疏松归属“骨萎”“骨痹”“虚劳”的范畴,认为“肾亏脾虚是该病发生的基本病理因素”<sup>[7]</sup>。中医运用“肾主骨”理论治疗原发性骨质疏松疗效是肯定的<sup>[8]</sup>。而何首乌和菟丝子2味药都具有补肾益精的作用,是临床上比较常用的抗骨质疏松中药。目前对这2味药材的抗骨质疏松作用研究多以动物造模为主,但它们对骨细胞是否有直接影响研究较少。

物可以抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞的 TRAP 酶活力;500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  何首乌醇提取物



RAW264.7 细胞增殖具有抑制作用;而其所含单体化合物中,二苯乙烯苷对 RAW264.7 细胞增殖没有抑制作用,大黄酸,大黄素和大黄素甲醚对 RAW264.7 细胞增殖抑制作用明显。因此,作者认为,何首乌既可以直接抑制前破骨细胞的生长及分化,又对成骨细胞有一定的促增殖作用。这与张海啸、崔阳等的研究结果一致<sup>[9-10]</sup>。在何首乌所含各种成分中,蒽醌类可能是发挥抗骨质疏松作用的主要成分。当然,也不能排除其他类未进行药效实验的成分起作用的可能性;作为何首乌主要活性成分的二苯乙烯苷则没有直接抑制前破骨细胞的作用。

1.0 mg · L<sup>-1</sup> 菟丝子醇提物能直接促进成骨细胞株 MC3T3-E1 的生长,并可以抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞的 TRAP 酶活力;100 mg · L<sup>-1</sup> 菟丝子醇提物能直接抑制前破骨细胞 RAW264.7 的增殖,而同一浓度对 MC3T3-E1 的抑制作用明显减小,说明菟丝子醇提物对成骨细胞毒性较小;菟丝子所含黄酮类化合物金丝桃苷对前破骨细胞 RAW264.7 的生长没有抑制作用。根据文献的研究,黄酮类是动物体内实验和血清药理实验中促进成骨细胞生长的主要成分<sup>[11-13]</sup>。在本实验中,菟丝子总提物对 RAW264.7 增殖有抑制作用,但不是由黄酮类的金丝桃苷产生的,至于是否是黄酮类的其他化合物或是其他种类的成分起到这种作用仍需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 李茵,于高路,莫少强,等. 治疗骨质疏松症中药复方的数据挖掘[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(4):53.
- [2] 罗瑞芝,贾伟,赵利斌,等. 何首乌研究进展[J]. 中草药,2005,36(7):7901.
- [3] 刘利萍,刘建,陈海丰. 中药菟丝子的研究进展[J]. 中药材,2001,2(11):839.
- [4] 唐琪,陈莉丽,严杰. 骨碎补提取物促小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞增殖,分化和钙化作用的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(2):164.
- [5] 肖新华,周后德,王运林,等. RANKL 诱导小鼠单核细胞 RAW264.7 分化成成熟破骨细胞[J]. 中国骨质疏松杂志,2005,11(2):151.
- [6] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [7] 王婷婷,罗维早. 治疗骨质疏松的中药研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2007,22(2):59.
- [8] 刘维嘉,麦敏军,刘永坤. 中医药治疗原发性骨质疏松症的研究近况[J]. 中国骨质疏松杂志,2009,15(5):374.
- [9] 张海啸,尹智炜,李芳芳,等. 何首乌水提液对去卵巢大鼠骨组织的动态影响[J]. 中日友好医院学报,2006,20(4):217.
- [10] 崔阳,吴铁,刘珏瑜. 环磷酰胺致小鼠骨质疏松及何首乌的防治作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,10(2):165.
- [11] 蔡西国,赵素霞. 菟丝子黄酮干预去卵巢大鼠骨代谢研究[J]. 中药药理与临床,2007,23(6):27.
- [12] 季晖,刘悦,卢耀茹. 复方骨益补对维甲酸诱导大鼠骨质疏松作用的研究[J]. 中国天然药物,2005,3(1):56.
- [13] 谢雁鸣,秦林林,于向东,等. 骨碎补,淫羊藿,菟丝子总黄酮对成骨细胞体外培养影响的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(7):22.

[责任编辑 张宁宁]