杜仲对大鼠骨髓基质细胞增殖及成骨分化影响的实验研究^{*}

★ 梁翔¹ 彭太平^{2**} 刘胜才² 邹来勇² 谢梅英³ (1. 江西中医学院附属医院 南昌 330006; 2. 江西中医学院 南昌 330006; 3. 江西省进贤县人民医院 进贤 331700)

摘要:目的:观察杜仲含药血清对骨髓基质细胞(BMSCs)增殖、成骨分化的影响,探讨其促进骨折愈合的细胞学机制。方法:SD大鼠18只,随机分为杜仲水提取物、醇提取物和对照组,每组各6只,分别灌胃相应药物取含药血清,观察各含药血清对BMSCs的影响,进行碱性磷酸酶染色、茜素红染色观察和碱性磷酸酶比活性、骨钙素含量测定。结果:碱性磷酸酶染色、茜素红染色除空白对照组外均有钙复合物形成,碱性磷酸酶比活性、骨钙素含量空白较对照组高。结论:杜仲有促进BMSCs增殖和成骨分化的作用。

关键词:杜仲;骨髓基质细胞;增殖;成骨分化

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

由于各种原因造成的骨缺损、骨不连是临床上非常常见的疾病,其修复一直是医学界的棘手问题。本实验以骨伤科常用的接骨圣药杜仲为研究目标,观察其对骨髓基质细胞增殖及诱导成骨作用的影响,从此角度阐述接骨续筋中药促进骨折愈合的细胞学机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物及主要材料

SD大鼠(南昌大学医学院)、苦味酸、杜仲(江西省中医院提供)、DMEM、肝素(100U/ml)、新生牛血清(NCS, HyClone)、青-链霉素溶液(HyClone)(山东鲁抗医药公司)、HEPES(上海生工)、胰蛋白酶(1:250, AMRESCO)、苏木精、伊红Y、噻唑蓝(MTT, AMRESCO)、二甲基亚砷(DMSO, 上海生工)、 α -MEM、地塞米松(Sigma)、 β -甘油磷酸钠(β -GP, Sigma)、VitC(上海化学试剂公司)、茜素红-Tris-HCl、碱性磷酸酶(ALP)和总蛋白试剂盒(南京建成生物工程研究所)、骨钙素(BGP)放免试剂盒(中国原子能科学研究所)。

1.2 杜仲的加工、提取过程

1.2.1 杜仲水提取物的制备 杜仲粉碎至粗颗粒后,取200g,加双蒸水8倍,浸泡2小时,煮沸1小时,收集药液,再加双蒸水6倍,煮沸1小时,收集药液,

再加双蒸水6倍,煮沸1小时,合并3次药液,以3000 r/min离心30分钟,取上清,浓缩,再离心至100 mL,使成2 g/mL生药的混悬液,4℃冰箱保存。

1.2.2 杜仲醇提取物的制备 杜仲粉碎至粗颗粒后,取200g,以60%乙醇回流提取3次,每次1小时,回收乙醇至尽,浓缩,再离心至100 mL,使成2 g/mL生药的混悬液。药液备用,4℃冰箱保存。

1.2.3 血清的制备 将10天的SD大鼠18只随机分成3组:杜仲水提取物组、杜仲醇提取物组、对照组,每组6只。杜仲水提取物组的大鼠给予杜仲水提取物灌胃,20倍临床使用量给予大鼠灌胃,一日剂量分2次灌胃,每次灌2 g/mL的生药0.5 mL/100 g,每天上下午给药,连续给药3天,第3天给药后开始禁食,第4天一次服用全天剂量,给药1小时后开始采血;杜仲醇提取物组的大鼠给予杜仲醇提取物灌胃,给药剂量、给药天数及采血时间同杜仲水提取物给药方法,对照组的大鼠给予生理盐水灌胃,剂量、天数及时间同上两组。各组于末次给药后1小时采血,手术暴露腹主动脉,小心剥离结缔组织,以离心管取血,稍做静置后,以3000 r/min离心15分钟,分离血清,取上清液,再经0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌,56℃水浴,30分钟灭活,-20℃冰箱保存备用,即血清制备完成。

* 基金项目:江西省科技厅资助项目(No. 2004IC0601500)

** 通讯作者:彭太平,教授,博士生导师,长期从事中医骨伤研究。Email:nc-pengtaiping@126.com

1.3 试验分组

试验分为6组:Ⅰ组:用15%杜仲水提物血清的 α -MEM培养液培养F₂代骨髓基质细胞(BMSCs);Ⅱ组:用15%杜仲醇提物血清的 α -MEM培养液培养F₂代的BMSCs;Ⅲ组(空白血清对照组):15%NCS的 α -MEM培养液培养F₂代的BMSCs;Ⅳ组:经典成骨诱导组(15%NCS的 α -MEM培养液中加入地塞米松 1×10^{-8} mol/L + β -甘油磷酸钠 10 mmol/L + VitC50 μ g/ml)培养F₂代的BMSCs;Ⅴ组:用15%杜仲水提物血清的 α -MEM培养液中加入地塞米松 1×10^{-8} mol/L + β -甘油磷酸钠 10 mmol/L + VitC50 μ g/ml培养F₂代的BMSCs;Ⅵ组:用15%杜仲醇提物血清的 α -MEM培养液中加入地塞米松 1×10^{-8} mol/L + β -甘油磷酸钠 10 mmol/L + VitC50 μ g/ml培养F₂代的BMSCs;每3天换液一次。

1.4 形态学观察

用倒置相差显微镜观察和HE染色观察。

1.5 成骨细胞的鉴定

将消化的细胞计数,调节细胞数为 2×10^4 个细胞/mL并且接种6孔培养板,板内放入玻片,每孔3 mL,待细胞贴壁,并且长满玻片时开始进行鉴定。

1.5.1 碱性磷酸酶染色(改良 Gomori 钙钴法) 取第2代细胞,接种于预置盖玻片的6孔培养板,成骨诱导培养液培养。各组诱导至第七天时,细胞中性福尔马林固定后入孵育液(3% β -甘油磷酸钠 10 mL、2%巴比妥钠 10 mL、2%无水氯化钙 20 mL、5%硫酸镁 1 mL和蒸馏水 5 mL),于37℃孵育4小时,2%硝酸钴作用5分钟,1%硫化胺处理1分钟,乙醇脱水,倒置相差显微镜下观察。

1.5.2 茜素红(ARS)染色法 各组诱导至第21天时,吸去成骨细胞诱导液,PBS洗3次,95%酒精固定10分钟,入0.1%茜素红-Tris-HCl(pH 8.3)37℃,30分钟,镜下观察。

1.5.3 碱性磷酸酶比活性的测定 细胞准备同细胞生长与增殖能力检测,调整细胞密度为(1×10^5)/mL,接种于12孔培养板上,分别添加传代培养液和成骨诱导培养液,于第2,4,6,8,10天收集细胞,按照ALP试剂众说明测定ALP活性。测定时取培养液,分别按碱性磷酸酶和总蛋白试剂盒说明书进行操作,碱性磷酸酶比活性计算:碱性磷酸酶比活性(U/mg)=碱性磷酸酶活性(U/L)÷蛋白浓度(mg/L)。

1.5.4 骨钙素含量测定 将 1×10^4 /mL F₂代BMSCs以2 mL/瓶接种于25 mL培养瓶,第2天换

液时每孔加入条件培养液1.9 mL,并按照下列分组加入不同药液各100 μ L,对照组培养液中仅加入含血清培养基,诱导组中加入条件培养基,杜仲醇提物组及杜仲水提物组分别加入该药物,每浓度组均设6瓶。每3天换液一次,经12天后进行细胞内BGP含量测定。消化悬浮后取 10^6 个细胞,离心,加入0.25%胰酶和0.02%的EDTA混合液(1:1)200 μ L收集细胞,以10 000 r/min离心5分钟。取上清100 μ L,按BGP放免试剂盒中的说明书,于每管中分别加入125I-BGP及抗BGP多克隆抗体各100 μ L,混匀,于4℃放置24小时。然后加入500 μ L分离剂充分混匀,于室温放置20 min,4℃以3 500 r/min离心20 min弃上清,测定沉淀物的cpm,并根据标准曲线求得BGP的含量。

1.6 统计学方法

采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法,所有数据分析均在SPSS13.0软件上进行,以 $\alpha = 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察结果

原代细胞形态观察 接种后的BMSCs在培养瓶底呈圆形分布,体积较大,胞体较透亮,细胞与周围的红细胞等血系细胞有混杂现象。24~48小时内BMSCs开始贴壁,初贴壁的BMSCs呈成纤维细胞外观,以后逐渐呈现集落生长,14天左右达到融合生长,融合成片的细胞排列有一定的方向性,细胞有的呈梭形,有的呈椭圆形,三角形等等;传代细胞形态观察传代细胞比原代细胞更快贴壁,刚传代的细胞为圆形,折光性好,接种2~4小时迅速贴壁,伸展,重新恢复梭形、三角形等,24小时基本完成贴壁,细胞呈均匀生长,细胞形态更加单一,5~6天铺满瓶底。

2.2 HE染色观察结果

细胞体呈梭形或不规则三角形,中央有卵圆形细胞核,胞质有2~3个长短不等的向外突起,呈现集落生长,排列呈放射状。

2.3 碱性磷酸酶染色

ALP阳性细胞率可达到80%以上,除Ⅲ组为阴性外,其余各组ALP染色阳性反应;经过地塞米松+ β -甘油磷酸钠+VitC诱导的Ⅳ、Ⅴ组和Ⅵ组比未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组的灰黑色或黑色的ALP团块更多。

2.4 茜素红染色

除Ⅲ组为阴性外,其余各组可见橘红色的钙结节,为茜素红与钙盐形成的橘红色复合物,经过地塞

米松+ β -甘油磷酸钠+VitC 诱导的Ⅳ、Ⅴ组和Ⅵ组比未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组的颜色更深。

2.5 碱性磷酸酶比活性测定结果

其余各组分别与空白对照Ⅲ组比较,结果未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组和经过地塞米松+ β -甘油磷酸钠+VitC 诱导的Ⅴ组和Ⅵ组都有显著的差别,而经过地塞米松+ β -甘油磷酸钠+VitC 诱导的Ⅴ组和Ⅵ组比未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组 ALP 活性有明显的增大。均与血清空白对照Ⅲ组比较, $P < 0.05$, 有显著性差异。

2.6 BGP

其余各组分别与空白对照Ⅲ组比较,结果未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组和经过地塞米松+ β -甘油磷酸钠+VitC 诱导的Ⅴ组和Ⅵ组都有显著的提高,而经过地塞米松+ β -甘油磷酸钠+VitC 诱导的Ⅴ组和Ⅵ组比未经诱导的Ⅰ组、Ⅱ组 BGP 含量提高的幅度更大。均与血清空白对照Ⅲ组比较, $P < 0.05$, 有显著性差异。

3 讨论

杜仲是我国传统的名贵中药,在《神农本草经》中列为上品药材,具有强筋骨、补肝肾、益腰膝、除酸疼、安胎气等作用,并有久服轻身耐老之说。早在两千多年前的古籍中,就有杜仲树皮煎汤饮服可增强肌肉的记载,在悠久的中医药发展历史中,人们一直重视杜仲的强筋健骨、补肝益肾、安胎等作用。近现代化学研究表明,杜仲中含有木脂素类、环烯醚萜类、酚类、黄酮类化合物以及杜仲胶、维生素、微量元素、氨基酸、挥发性成分生物碱、多糖及葡萄糖乙苷等成分^[1]。近年来的研究证明,杜仲中含有一种特殊的成分,可促进人体的皮肤、骨骼、肌肉中的蛋白质胶原的合成与分解,具有促进代谢,防止衰退的功能。王大为等^[2]研究了杜仲对成骨样细胞增殖的作用,表明杜仲中极性大部位可能含有直接作用于成骨细胞的活性成分。杜仲对骨髓基质细胞增殖、成骨分化的影响还未见文献报道。本文通过杜仲对大鼠骨髓基质细胞增殖、成骨分化影响的实验研究,揭示杜仲水提物物和杜仲醇提物通过促进骨髓基质细胞增殖、向成骨细胞分化,从而促进成骨,有利于骨愈合、骨修复。

最近报道提示杜仲叶分离部分可以促进体外培养成骨细胞增殖和代谢作用,同时促进 ALP 分泌^[3]。杜仲叶醇提物具有类似性激素作用,能增进实验动物骨髓生成和增加其骨髓的强度^[4]。本实验在诱导物作用下,骨髓基质细胞由单一的纤维状变成立方形和多角形,细胞大量增殖、重叠,细胞之间界限模糊,逐渐形成了多个散在的细胞结节,钙沉积逐渐出现,最终形成钙化结节。这与成骨细胞有相似的形态和生长特点。成骨细胞分化成熟,除了细胞形态的变化,ALP 活性增强和细胞外基质钙化是两个重要标志。ALP 是成熟成骨细胞的标志酶之一,其主要作用为水解有机磷酸酶,使局部 PO_4^{3-} 浓度升高,结合钙,启动钙化。在钙化期,细胞逐渐出现变性,其分泌的胶原纤维亲和钙盐,形成钙化结节。可见杜仲水提物或醇提物的促进 BMSCs 向成骨细胞分化,与增加细胞内 ALP 的活性、BPG 关系密切。

骨髓对骨组织的生长,修复和重建具有重要作用,BMSCs 是人体内间充质细胞,具有多向分化潜能,在特定体外条件下可向成骨细胞分化,是骨髓成骨的细胞学基础。如果能证明中药能够对骨髓基质细胞有良好的促进作用可能将会有重要的意义,这样不但会证明祖国医学“肾主骨生髓”理论的科学性,也会为研究中药作用机理和开发中药带来新的思路和方法。本实验证实,杜仲(包括水提物、醇提物)能诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化,在经典成骨诱导组(地塞米松、维生素 C 和 β -甘油磷酸钠)中使用杜仲水提物、醇提物含药血清培养,能显著地促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化,且杜仲醇提物的作用强于水提物组。

参考文献

- [1] 赖娟华,徐丽瑛,饶华等.杜仲叶化学成分和药理作用研究概况[J].实用中西医结合临床,2004,4(2):67
- [2] 王大为,高晓燕,李发美.杜仲对成骨样细胞增殖的作用[J].中药药理与临床,2000,16(4):24
- [3] 罗先涛,张耀.临床经验拾贝[J].湖北中医杂志,2000,22(3):4~5
- [4] 王洪复.骨细胞图与骨细胞体外培养技术[M].上海:上海科学技术出版社,2001.61

(收稿日期:2007-01-11)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !