

# 补肾健骨汤对成骨细胞增殖及碱性磷酸酶、骨钙素合成的影响

邢国胜<sup>1</sup>,谈志龙<sup>1</sup>,王淑云<sup>1</sup>,白人骁<sup>1</sup>,沈启捷<sup>1</sup>,禹军<sup>2</sup>

(1. 天津市天津医院,天津 300211; 2. 天津市中医学院附属第一医院,天津 300193)

**摘要:**目的 考察补肾健骨汤体外对大鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶、骨钙素合成的影响。方法 采用酶消化法分离大鼠颅骨成骨细胞,取第3代为实验模型,用常规计数法每日同时间检测成骨细胞增殖情况,连续7d,观察补肾健骨汤提取液及载药血清对成骨细胞增殖的影响;以酶免法测定培养第5天细胞内骨钙素的含量。结果 补肾健骨汤提取液及载药血清对体外培养的成骨细胞增殖均有显著的促进作用,其中提取液的作用在0~100 $\mu$ g/mL浓度范围内呈剂量依赖性;提取液与载药血清均提高细胞内碱性磷酸酶和骨钙素含量,与空白对照组比较均有显著差异( $P < 0.05$ )。结论 补肾健骨汤体外对成骨细胞的增殖及碱性磷酸酶、骨钙素的合成具有促进作用。

**关键词:** 补肾健骨汤;提取液;载药血清;成骨细胞;增殖;碱性磷酸酶;骨钙素

中图分类号: R285.5; R287.21 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1020-03

## *In vitro* effects of BUSHEN JIANGU DECOCTION on proliferation, alkaline phosphatase and osteocalcin composition of osteoblasts of rat

XING Guo-sheng<sup>1</sup>, TAN Zhi-long<sup>1</sup>, WANG Shu-yun<sup>1</sup>, BAI Ren-xiao<sup>1</sup>, SHEN Qi-jie<sup>1</sup>, YU Jun<sup>2</sup>

(1. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China)

**Key words** BUSHEN JIANGU DECOCTION; extract; serum carrying medicine; osteoblast; proliferation; alkaline phosphatase; osteocalcin

补肾健骨汤是我院依据“肾主骨”理论研制而成,以治疗骨质疏松症为主的复方中药制剂,由杜仲、首乌、淫羊藿、丹参、熟地等中药组成。多年临床研究发现补肾健骨汤可以提高患者血中骨钙素水平,改善患者骨密度。近年来经过国内众多学者的不断研究发现某些中药能够使患者的骨量增加,骨小梁面积及密度、成骨细胞体密度、数密度增加<sup>[1]</sup>。但体内实验存在干扰因素较多,难以确切地从细胞生物学方面了解中药与骨形成的关系,包括对成骨细胞的直接作用。本研究通过观察补肾健骨汤提取液和含补肾健骨汤的载药血清体外对大鼠颅骨成骨细胞增殖及其对碱性磷酸酶、骨钙素合成的影响,来观察补肾健骨汤对成骨细胞的直接作用,为探讨中药治疗骨质疏松症及其临床应用提供理论基础。

### 1 材料

1.1 动物: 出生24h内Wistar大鼠(军事医学科学院环境医学研究所动物室);纯种Wistar大鼠,雌性,体重(20 $\pm$ 10)g(军事医学科学院环境医学研究所动物室)。

1.2 主要试剂: RPMI1640培养液(Gibco);胎牛

血清(中国医学科学院血液病研究所);II型胶原酶(Sigma);胰蛋白酶(Difco);碱性磷酸酶酶免试剂盒(北京中生物生物工程高技术公司);骨钙素放免试剂盒(中国原子能科学研究院);补肾健骨汤(本院药理学室提供,浓度33g生药/mL,批号:990221)。

1.3 主要仪器: 倒置显微镜(Olympus,日本);CO培养箱(NU-2500E,美国);全自动生化分析仪(TOSHBA30FR,日本);智能放免 $\gamma$ 测量仪(SN-695型),上海核福光仪器有限公司);24孔细胞培养板(丹麦)。

### 2 方法

2.1 新生大鼠颅骨成骨细胞的分离、培养: 参考文献方法<sup>[2,3]</sup>加以改进。将出生24h内的Wistar大鼠脱臼处死后取其顶骨,去净骨缝及顶骨内外表面的软组织,用预冷的Hank's液漂洗骨组织,搔刮骨面至粗糙,在平皿中尽量剪碎,再用Hank's液冲洗2次。收集洗净的骨组织放入小方瓶中,加入骨消化液(含0.02% EDTA的0.2%胰酶和0.1%II型胶原酶),37 $^{\circ}$ C水浴消化4次,每次20min,弃去第1次消化液,合并后3次的消化液过100目金属筛,

收稿日期: 2001-02-23

作者简介: 邢国胜(1968-),男,天津市人,主管药师,学士学位。1990年毕业于天津市第二医学院药学系,现在天津医院骨研所药理学室工作。

主要研究方向: 中药制剂及药理研究。Tel: 28332917-6293

将含细胞的悬液置于离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用无菌 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清, pH= 7. 2) 制成细胞悬液, 吹打均匀, 计数后接种于培养瓶中, 37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度下孵育, 隔日换液 1 次 待细胞增殖至占据瓶底约 80% 表面时, 用 0. 25% 胰蛋白酶消化, 以 1: 2 比例传代, 并加培养液依上法继续培养并传代, 取第 3 代成骨细胞进行实验。

2. 2 补肾健骨汤载药血清的制备: 选择 Wistar 雌性大鼠 10 只, 体重 (200± 10) g, 每日 ig 补肾健骨汤 16. 5 g 生药 /kg 体重, 1 次 /日; 另取同体重 Wistar 雌性大鼠 10 只, 每日同时 ig 同剂量生理盐水作空白血清对照 连续 ig 7 d, 于末次给药后 2 h 心脏穿刺取血, 无菌分离血清, 56℃ 水浴同时灭活 30 min, 用 0. 22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分别配成含 10% 载药血清 1640 培养液和含 10% 空白血清 1640 培养液作为条件培养液, 4℃ 保存, 备用

2. 3 补肾健骨汤提取液的配制: 将本院药理室提供的补肾健骨汤加热浓缩至 2: 1 后, 加乙醇沉淀, 过滤并回收乙醇, 加热浓缩成每毫升含 2. 64 g 生药的药液, 调 pH 至 7. 2, 1% 活性炭脱色, 精滤后以 1640 培养液配成浓度为 13. 2 mg /mL 的贮备液, 灭菌。以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液分别配成浓度为 0, 10, 50, 100 μg /mL 的供试液, 4℃ 保存, 备用

2. 4 补肾健骨汤对成骨细胞增殖的影响: 取第 3 代成骨细胞消化后用含 10% 胎牛血清的 1640 稀释, 以 1. × 10<sup>5</sup> 细胞 /孔浓度加入 24 孔细胞培养板

中, 培养 24 h 后换无血清的 1640 培养液继续培养 24 h, 吸净培养液, 随机抽取 5 孔计数, 分别换补肾健骨汤载药血清条件培养液和不同浓度的补肾健骨汤提取液继续孵育。每日同时间常规细胞计数法计数并计算细胞增殖率, 每组均设 4 个平行孔, 连续检验 7 d

2. 5 细胞内碱性磷酸酶及骨钙素含量测定: 分别取各组培养至第 5 天的成骨细胞 (每天各取 5 孔), 倒弃原培养液, 用 0. 25% 的胰蛋白酶消化细胞, 吸出消化液后加入生理盐水吹打细胞使其游离, 放置低温冰箱中反复冻溶使细胞破碎, 离心, 上清液以酶免法测定碱性磷酸酶含量, 以放射免疫法测定骨钙素含量。

### 3 结果

3. 1 补肾健骨汤对成骨细胞增殖的影响: 补肾健骨汤载药血清对成骨细胞的增殖有明显的促进作用; 不同浓度的补肾健骨汤提取液对成骨细胞增殖具有促进作用, 且呈剂量依赖性 结果见表 1, 2

表 1 补肾健骨汤载药血清对成骨细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n= 4$ )

培养时间 (d)	成性细胞数 ( $\times 10^5 /mL$ )		细胞增殖率 (%)
	空白血清	载经血清	
1	1. 12± 0. 33	1. 22± 0. 32	8. 93
2	1. 63± 0. 46	1. 93± 0. 37	18. 41
3	2. 22± 0. 66	4. 27± 0. 60	92. 34
4	2. 78± 0. 58	5. 18± 0. 52*	86. 30
5	4. 43± 0. 52	6. 07± 0. 40	37. 02
6	5. 08± 0. 58	7. 07± 0. 92	39. 17
7	6. 10± 0. 48	7. 65± 0. 44	25. 41

与空白血清相比: \*  $P < 0. 05$  \*\*  $P < 0. 01$

表 2 补肾健骨汤提取液对成骨细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n= 4$ )

培养时间 (d)	成骨细胞数 ( $\times 10^5 /mL$ )				细胞增殖率 (%)		
	0	10	50	100	10	50	100
	(μg /mL)	(μg /mL)	(μg /mL)	(μg /mL)	(μg /mL)	(μg /mL)	(μg /mL)
1	1. 52± 0. 42	1. 67± 0. 34	1. 67± 0. 28	1. 69± 0. 22	9. 87	9. 87	11. 18
2	1. 6± 0. 26	1. 69± 0. 32	2. 00± 0. 20	2. 88± 0. 32*	4. 97	24. 22	78. 88
3	2. 15± 0. 64	2. 92± 0. 56	3. 21± 0. 48	4. 00± 0. 52	35. 81	49. 30	86. 04
4	2. 90± 0. 34	3. 42± 0. 28	4. 49± 0. 34*	5. 6± 0. 44*	17. 93	54. 82	93. 45
5	3. 50± 0. 74	3. 95± 0. 44	5. 27± 0. 56	6. 87± 0. 66*	12. 85	50. 57	96. 28
6	4. 09± 0. 68	4. 62± 0. 72	6. 20± 0. 80	7. 88± 0. 96*	12. 96	51. 59	92. 66
7	4. 74± 0. 92	5. 8± 0. 86	7. 04± 0. 88	8. 62± 0. 92*	22. 57	48. 52	81. 86

与 0 μg /mL 组比较: \*  $P < 0. 05$  \*\*  $P < 0. 01$

3. 2 成骨细胞内碱性磷酸酶及骨钙素含量测定: 补肾健骨汤提取液及其载药血清组细胞内碱性磷酸酶及骨钙素的含量均明显高于对照组, 结果见表 3

### 4 讨论

成骨细胞 (osteoblast) 是骨形成过程中最重要的功能细胞, 它不仅分泌骨基质参与成骨, 同时也参

与破骨细胞骨吸收功能的调节<sup>[4]</sup>, 因此在骨代谢过程中起着极为重要的作用。成骨细胞数量减少或功能受损都会导致骨代谢的异常, 从而引起机体多种疾病的发生, 如骨质疏松症 近年来以防治骨质疏松症为目的探讨各种药物对成骨细胞作用的研究极为活跃<sup>[5, 6]</sup>。成骨细胞在体外具有增殖能力已有文献报

表 3 细胞内碱性磷酸酶及骨钙素含量 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	碱性磷酸酶含量 (U/L)		骨钙素含量 (ng/mL)	
	提取液	0 $\mu$ g/mL	3.2 $\pm$ 0.21	3.44 $\pm$ 0.21
	10 $\mu$ g/mL	4.02 $\pm$ 0.27*	4.81 $\pm$ 0.41*	
	50 $\mu$ g/mL	5.89 $\pm$ 0.77*	5.42 $\pm$ 0.54*	
	100 $\mu$ g/mL	7.33 $\pm$ 0.84*	7.02 $\pm$ 0.76*	
血清组	空白对照	2.00 $\pm$ 0.89	4.66 $\pm$ 0.71	
	载药	3.67 $\pm$ 0.82	6.23 $\pm$ 0.79	

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

道<sup>[7]</sup>,只有成骨细胞数量的不断增加才能产生丰富的胶原,从而通过钙化基质的形成产生更多的骨组织;碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP或 AKP)由成骨细胞产生,富含于胞浆中,它既可做为成骨细胞的功能标记物,又可反映其分化成熟程度;骨钙素(osteocalcin)又称 $\gamma$ 羧基谷氨酸蛋白(bone Gla protein, BGP),是成骨细胞合成、分泌的主要非胶原蛋白,其生理功能是保持骨的正常矿化,被认为是成骨细胞分化的主要指标之一<sup>[8]</sup>,故本研究选择上述3项作为观察指标探讨补肾健骨汤体外对成骨细胞的影响。中药体外对成骨细胞作用的研究国内目前采用将中药提取液直接加入细胞培养液中的方法,我们在采用此种体外实验方法的同时应用了血清药理学方法<sup>[9]</sup>,既观察补肾健骨汤原液对成骨细胞的作用,又观察补肾健骨汤进入体内后

的吸收成分对成骨细胞的作用。从实验结果可以看出补肾健骨汤提取液及其吸收进入体内的有效成分在体外对成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶及骨钙素的合成均有明显的促进作用,说明它含促进骨形成的成分,提示我们使用中药治疗骨质疏松症具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 邓伟民,沈有高,贺扬淑,等. 补肾壮骨中药对去势雌性大鼠股骨上段成骨、破骨细胞的影响[J]. 广州中医药大学学报, 1998, 15(4): 281-283.
- [2] Luber R A, Wong G L, Cohn B V. Biochemical characterization with parathormon and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts [J]. Endocrinology, 1976, 99(4): 526-527.
- [3] 徐荣辉,朱雅萍,柴本甫. 胚胎大鼠颅盖骨分离细胞早期体外培养的组织化学观察[J]. 解剖学报, 1988, 19(1): 53-58.
- [4] Suda T, Takahashi N. Osteoblasts are essential for osteoclast formation [J]. Calcif Tissue Int, 1989, 44(1): 45-47.
- [5] 刘秀明,王淑云,李锐,等. 微量元素对大鼠颅盖骨成骨样细胞体外培养增殖分化的影响[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(3): 177-179.
- [6] 张伟国,王丽珍,刘正. 氟对鼠颅骨成骨细胞表型发育影响的体外研究[J]. 上海口腔医学, 1998, 7(2): 88-93.
- [7] 杨小东,陈安玉. 氟对大鼠成骨样细胞增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 11(3): 230-232.
- [8] Lian J B, Gunderg C M. Osteocalcin: Biochemical consideration and clinical applications [J]. Clin Orthop Rel Res, 1987, 226(2): 267-270.
- [9] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1990, 10(2): 95-98.

## 复方丹参滴丸治疗慢性肺心病临床观察

刘学杰,张冬梅,彭旭辉

(河南省平顶山市第二人民医院 心内科,河南 平顶山 467000)

中图分类号: R285.64

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)11-1022-02

慢性肺源性心脏病是由于肺、胸廓或肺动脉血管慢性病变所致肺循环阻力增加,肺动脉高压进而使左心肥厚、扩大甚至发生右心衰竭的心脏病,可出现慢性低氧血症和高碳酸血症,由于慢性缺氧继发红细胞增多,血液粘稠度增加,近3年来我们在常规治疗基础上,辅以复方丹参滴丸降粘治疗,可明显缓解病情、改善愈后,提高患者生活质量。

### 1 临床资料与方法

1.1 一般资料: 68例均为慢性肺心病急性发作住

院患者,诊断标准根据1997年我国修订的“慢性肺心病诊断标准”,无禁忌症随机分为治疗组与对照组各34例,治疗组:男20例,女14例,年龄55~75岁,平均65岁,对照组:男21例,女13例,年龄52~74岁,平均63岁。

1.2 治疗方法: 对照组患者入院后根据病情进行以下常规治疗: 抗感染、扩管、强心、利尿治疗; 治疗组在对照组基础上辅助应用复方丹参滴丸,一次10粒,一日3次,3周为1疗程。