

发现 SQDS 是 PI3-K 的抑制剂。这和其他证据<sup>[6~8]</sup>均表明, SQDS 具有生物学活性。SQDS 抑制 PI3-K 的活性, 因此抑制了 PI3-K 介导的信号转导通路而发挥作用。SQDS 既具有槲皮素的作用, 又增加其水溶性, 达到结构改造的目的。

本实验进一步阐明了 SQDS 的作用机制, 这为今后将 SQDS 应用于临床提供了一定的实验依据。本实验结果还提示重组人 PI3-K p110 $\beta$  催化亚基可作为一种较为简便地筛选和开发有效的 PI3-K 抑制剂的分子靶点。

References:

[1] Wymann M P, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling— which way to target? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 366-376.

[2] Ward S G, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3: 426-434.

[3] Stein R C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment [J]. *Endocr-Related Cancer*, 2001, 8: 237-248.

[4] She J, Mo L E, Kang T B, *et al.* Preparation of water-soluble quercetin derivatives and their biological activities [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1998, 8(4): 287-289.

[5] She J, Mo L E, Liang N C. Effects of temperature on preparation of quercetin sulphates [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 1998, 15(2): 22-23.

[6] Weng Y, She J, Cai K R, *et al.* Comparison of effects of quercetin and its derivatives on the growth of HL-60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(2): 154-157.

[7] Liu W, Liang N C. Inhibitory effect of disodium quercetin-7, 4'-disulfate on aggregation of pig platelets induced by thrombin and its mechanism [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2000, 21(8): 737-741.

[8] Liu X G, Liang N C, Liu W, *et al.* Inhibitory effect and kinetic analysis of disodium quercetin-7, 4'-disulfate on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, 37(3): 165-168.

[9] Liu W, Liang N C. Prokaryotic expression of recombinant human PI3-K p110 $\beta$  catalytic subunit [J]. *J Guangdong Med Coll* (广东医学院学报), 2003, 21(1): 18-20.

[10] Bao T Z, Wang Q L, Liao Z H. Research advances of quercetin [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 1998, 10(2): 90-91.

## 塞隆骨提取物对体外大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 的影响

潘明<sup>1,2</sup>, 谭言飞<sup>3</sup>, 杨志荣<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学院, 四川成都 610064; 2. 四川理工学院生物工程系, 四川自贡 643000; 3. 四川大学生物材料工程研究中心, 四川成都 610064)

**摘要:**目的 研究塞隆骨提取物对体外培养大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 代谢功能的调节作用, 从而在细胞水平上阐述塞隆骨防治骨质疏松的作用机制及药效成分的筛选。方法 采用超临界萃取法制备塞隆骨的脂、醇、水提液及水煎提取液, 用 MTT 法测定塞隆骨脂、醇、水提液及水煎液对成骨样细胞的增殖作用; 测定碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 观察上述提取液对细胞分化的影响。结果 10 mg/mL 塞隆骨脂提液和水提液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 有显著的增殖作用 ( $P < 0.01$ ); ALP 检测结果显示, 10 mg/mL 脂提液能极显著增强成骨样细胞内 ALP 活性 ( $P < 0.01$ ), 1.0、0.1 mg/mL 能提高 ALP 活性 ( $P < 0.05$ ); 10 mg/mL 水提液能使 ALP 活性升高 ( $P < 0.05$ )。结论 塞隆骨脂和水提取液中分别存在有较高活性的促成骨样细胞增殖、分化的物质, 可作为虎骨的替代中药。

**关键词:** 塞隆骨; 成骨样细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)06-0881-04

### Effect of Sailong bone extracts on rat osteoblastoid cells ROS17/2.8 *in vitro*

PAN Ming<sup>1,2</sup>, TAN Yan-fei<sup>3</sup>, YANG Zhi-rong<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Department of Bioengineering, Sichuan Institute of Technology, Zigong 643000, China; 3. Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract: Objective** To investigate the modulation of Sailong bone extracts on rat osteoblastoid cells ROS17/2.8 *in vitro* so as to clarify the mechanism of osteoporosis prevention and active component screening of Salong bone. **Methods** Sailong bone fat-soluble extract, Sailong bone ethanol extract and Sailong

收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 四川省科技厅科技攻关项目 (01SG003-14)

作者简介: 潘明 (1966-), 女, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 研究方向为天然产物开发及药理药效的分子机制研究。

Tel: (028) 85410362 E-mail: panming106@163.com

\* 通讯作者 杨志荣

bone aqueous extract were extracted with super critical fluid extraction (SCFE), and Sailong bone boiling-water component was extracted with distilled water directly. MTT assay was applied to determine the proliferation of the cell promoted by four Sailong bone extracts at different doses. Differentiating effects of the extracts with different concentrations on the cell were evaluated by the examinations of alkali phosphatase (ALP) activity. **Results** Sailong bone fat-soluble and aqueous extract (each 10 mg/mL) could significantly improve the proliferation of rat osteoblastoid cells ROS17/2.8 ( $P < 0.01$ ). Sailong bone fat-soluble extract (10 mg/mL) significantly enhanced ALP activity ( $P < 0.01$ ). Fat-soluble extract (1.0, 0.1 mg/mL) could improve the ALP activity ( $P < 0.05$ ). Aqueous extract (10 mg/mL) could improve the ALP activity ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In the Sailong bone fat-soluble extract and Sailong bone aqueous extract, there are some components promoting the proliferation and differentiation of osteoblast, and Sailong bone can be the substitute of the bone of tiger as a Chinese materia medica.

**Key words:** Sailong bone; osteoblastoid cells; proliferation; differentiation

高原麝鼠,藏名塞隆,是青藏高原特有动物,其风干全骨——塞隆骨是国家一类动物新药材。塞隆骨性微温、味辛咸,入肝肾经,主要功能为祛风除湿散寒、舒筋活络、强筋健骨及增强机体抵抗力,有机化学、无机元素和药理学作用与传统名贵中药材虎骨(已禁用)类似<sup>[1,2]</sup>。虎骨入药已有上千年历史,在治疗骨代谢疾病中应用相当广泛,因此对塞隆骨进行骨代谢疾病的药理作用的探讨及有效成分的筛选,以塞隆骨代替虎骨入药,使因禁止使用虎骨而停止的传统中成药生产得以恢复,挽回国家经济损失是很有价值和意义的。

骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的,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>[3]</sup>。随着人口日趋老龄化,骨质疏松已列为三大老年人疾病之一,严重威胁我国老年人健康。研究报道塞隆骨对骨质疏松大鼠的骨密度、骨灰分、骨钙水平以及骨组织形态学均有明显的改善作用<sup>[4]</sup>,但其作用机制尚不明了。成骨细胞是骨组织中的重要细胞,其增殖与分化是骨形成、发育、修复的关键<sup>[5]</sup>。本实验以大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 为细胞模型,通过 MTT 法和碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测分析塞隆骨不同的提取组分对大鼠成骨细胞代谢功能的影响,为研究塞隆骨能否取代虎骨防治骨质疏松提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药材制备:供本试验用的高原麝鼠,于 2003 年 5~6 月采自四川省阿坝州若尔盖县。样本为成鼠,随机取样。将选择的样鼠剥皮剔肉,取其骨骼,风干。用去离子水冲洗干净,在 60 ℃ 恒温箱中烘干,经粉碎过 30~60 目筛制成骨粉,备用。

1.2 细胞:大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8,由四川大学医学院病原生物学教研室提供。

1.3 主要试剂:DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (Gibco),5 mg/mL MTT 液 (Sigma),ALP 试剂盒 (Roche, 美国)。

## 2 方法

### 2.1 塞隆骨各提取物的制备

2.1.1 脂溶物提取:用 MF-37K-380 型超临界萃取仪 (德阳二重四创科技有限公司) 分 2 次提取,每次装 200 g 粉碎骨粉于提取桶中,在压力 35~40 MPa、温度 40 ℃、CO<sub>2</sub> 流量 20 L/h 条件下连续提取 4 h,得率 2.5%,获骨粉脂溶部分。

2.1.2 醇溶物提取:超临界萃取后的残渣用 75% 乙醇在沸水浴上回流提取,每次回流 2 h,待提取液冷却后抽滤,分离清液,重复 3 次;合并提取液,减压蒸馏回收乙醇,浓缩至含生药 1 g/mL,得率 1.64%,获骨粉醇溶液。

2.1.3 水溶物提取:75% 乙醇提取残渣用蒸馏水在沸水浴上回流提取,每次 2 h,待提取液冷却后用纱布滤过其渣质,重复 3 次,合并 3 次的提取液,减压蒸去水分,浓缩至含生药 1 g/mL,得率为 1.42%,获骨粉水溶性成分。

2.1.4 水煎液提取:塞隆骨制备好的骨粉直接用蒸馏水提取,每次 2 h,重复 3 次,合并 3 次的提取液,减压浓缩至含生药 1 g/mL,得率为 2.75%,获骨粉水煎部分。

2.2 大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 的培养:大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养。在培养瓶中长满至单层后,用 0.1% EDTA、0.25% 胰酶消化传代。传代培养的细胞在实验前一天换液,实验时用 0.1% EDTA、0.25% 胰酶消化 1~2 min,加 10% FBS 的 DMEM 细胞培养液将细胞浓度调为  $1.0 \times 10^4$  /mL,以每孔 200 μL 加入 96 孔细胞培养

板中。培养 24 h 后,弃去原培养液,换成无血清 DMEM 培养液,培养 24 h。

2.3 实验分组:脂提液试验组;醇提液试验组;水提液试验组;水煎液试验组;正常对照组。

2.4 细胞增殖测定:用 MTT 法<sup>[6]</sup>检测成骨样细胞增殖情况,确定所需药物作用于成骨样细胞的适合浓度。弃掉 96 孔板中的培养液,加入 180  $\mu$ L 培养基和 20  $\mu$ L 各组药物,每个浓度组复孔为 6 个。培养 24、72 h 后,弃掉孔内液体,各孔细胞用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 洗涤 2 次,加入 200  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养液和 20  $\mu$ L MTT 液,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h;移去 MTT 溶液,每孔加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砷(DMSO),微量振荡仪振荡 3 min,待沉淀完全溶解后,用酶联免疫检测仪(Bio-Rad,美国)测  $A_{490}$  值。

弃掉 96 孔板中的培养液,每孔加入培养基 180  $\mu$ L 及不同质量浓度的提取液(用 DMEM 稀释)20  $\mu$ L,使最终每孔水煎液的质量浓度为 10、5.0、2.5、1.2、0.6、0.3 mg/mL。每个药物浓度及对对照组均作平行孔 6 孔。其余操作步骤同上。

2.5 ALP 活性测定:96 孔板每孔接种  $1.0 \times 10^4$  /mL 成骨样细胞 ROS17/2.8,分别加入不同质量浓度塞隆骨脂提液、水提液,使其终质量浓度为 100、10、1.0、0.1 mg/mL,每个药物组均作平行孔 6 孔。分别培养 1、3、6 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,每孔加入 0.25 mL 0.1% Triton X-100 裂解液。10 min 后,收集每孔溶液,按试剂盒要求测定 ALP 活性。

2.6 统计学处理:数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示;组间差异用  $t$  检验。

### 3 结果与分析

3.1 筛选药物质量浓度的确定:从表 1 得知,塞隆骨水煎液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 的生长没有抑制作用。各组之间对成骨样细胞的增殖作用差异显著 ( $P < 0.05$ ),其中 10 mg/mL 组与其他质量浓度组和空白对照组比较,有明显的促进细胞增殖作用。而塞隆骨水煎液含有骨粉脂、醇、水提取物的全成分,因此选用塞隆骨水煎液作为药物质量浓度筛选物是可行的。本实验选用 10 mg/mL 作为筛选药效成分的样品质量浓度。

3.2 塞隆骨脂、醇、水提取物及水煎液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 增殖的影响:从图 1 可以看出:与对照组比,在培养 2 d 时 10 mg/mL 塞隆骨脂提液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 有极显著的增殖作用 ( $P < 0.01$ );10 mg/mL 塞隆骨水提液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 有显著的增殖作用 ( $P <$

表 1 塞隆骨水煎液对成骨细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 1 Effect of Sailong bone aqueous decoction on proliferation of osteoblastoid cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| $\rho /$<br>(g $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) | A 值                |                    |
|---|--------------------|--------------------|
|   | 1 d                | 3 d                |
| 0.01                                      | 0.189 $\pm$ 0.003* | 0.794 $\pm$ 0.018* |
| $5.0 \times 10^{-3}$                      | 0.174 $\pm$ 0.003  | 0.678 $\pm$ 0.039  |
| $2.5 \times 10^{-3}$                      | 0.153 $\pm$ 0.001  | 0.619 $\pm$ 0.022  |
| $1.2 \times 10^{-3}$                      | 0.162 $\pm$ 0.002  | 0.705 $\pm$ 0.018  |
| $6.0 \times 10^{-4}$                      | 0.159 $\pm$ 0.001  | 0.647 $\pm$ 0.064  |
| $3.0 \times 10^{-4}$                      | 0.164 $\pm$ 0.002  | 0.667 $\pm$ 0.031  |
| 0 (对照)                                    | 0.175 $\pm$ 0.001  | 0.768 $\pm$ 0.002  |

组间比较: \*  $P < 0.05$  (以质量浓度最低组为参比组)

\*  $P < 0.05$  group vs group (lowest concentration group is considered as control)

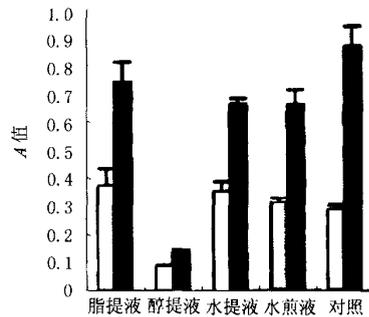


图 1 不同提取物对成骨样细胞的增殖作用 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 1 Effect of different extracts on proliferation of osteoblastoid cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

0.05);水煎液对大鼠成骨样细胞 ROS17/2.8 有增殖作用,但差异无显著性;而醇提液对成骨样细胞有明显的抑制作用。说明其药效成分可能是脂溶液和溶于水的某些成分。在培养 4 d 时,所有组别的 A 值与同组别 2 d 时相比均有增加,但与空白对照组比较,差异均无显著性。

3.3 ALP 活性检测结果:从图 2 得出,在细胞培养期间,10 mg/mL 脂提液明显抑制细胞内 ALP 活性,并且随着培养时间的延长,抑制效果越强。在细胞培养 1 d 时,脂提物 10 mg/mL 组能极显著增强成骨样细胞内 ALP 活性 ( $P < 0.01$ ),1.0、0.1 mg/mL 组能显著增强成骨细胞内 ALP 活性 ( $P < 0.05$ );水提物的几个浓度组与对照组相比,均无促进 ALP 活性的作用。在细胞培养 3 d 时,脂提物 10、0.1 mg/mL 组与对照组相比,能增强成骨样细胞内 ALP 活性,但差异无显著性;水提物 10 mg/mL 组能显著增强成骨样细胞内 ALP 活性 ( $P < 0.05$ );1.0 mg/mL 组能增强成骨样细胞内 ALP 活性,但差异无显著性。在细胞培养 6 d 时,脂提物 10 mg/mL 组能显著增强成骨细胞内 ALP 活性 ( $P <$

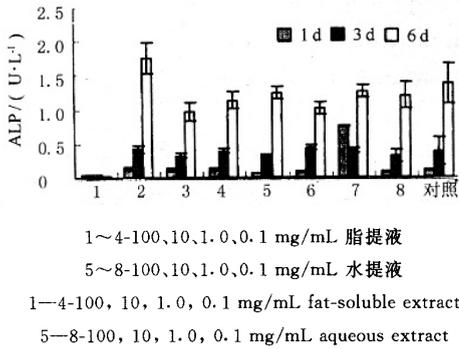


图 2 脂提液和水提液对成骨样细胞 ALP 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 Effect of fat-soluble and aqueous extrats on ALP activity of osteoblastoid cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

0.05);水提物各浓度组与对照组相比,均无促进 ALP 活性的作用。

4 讨论

近年来的动物实验、细胞培养和流行病学研究都显示了多聚不饱和脂肪酸以及镁、锌、锰、铜、氟、锶等多种微量元素在骨质疏松症的治疗和预防中的价值。根据文献报道塞隆骨含有铜、锌、铁、锰、镁、硒等生命活动必需微量元素<sup>[7,8]</sup>,而且塞隆骨脂肪油含有多种不饱和脂肪酸,可见从塞隆骨中分离促成骨样细胞增殖和分化的生物活性物质,有其临床实践及生物学理论基础。

ALP 为成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,特异性很高,它主要分布于细胞膜的钙结合转运蛋白,促进细胞成熟、钙化<sup>[9]</sup>。结合细胞增殖率可有效反映成骨细胞的代谢功能<sup>[10]</sup>。研究证明,ALP 活性是成骨细胞功能及分化程度的指标,其活性的高低可反映成骨细胞的成熟状态<sup>[11]</sup>。目前,有关塞隆骨的研究集中在治疗风湿性关节炎的方面,海平等<sup>[4]</sup>的研究表明,塞隆骨对大鼠佐剂性关节炎原发病变和继发性病变尾结节有明显的预防和治疗作用,同剂量的塞隆骨相当虎骨作用强度。徐立等<sup>[12]</sup>观察中华鼯鼠骨提取物对多种炎症模型的影响,结果表明其具有抗炎镇痛作用。但对塞隆骨在治疗骨质疏松方面的研究还不够深入。本实验从细胞水平上对其作用机制进行了探讨,选用大鼠 ROS17/2.8 成骨样细胞与塞隆骨不同提取物进行复合培养后,发现塞隆骨的

脂、水提液具有促进成骨样细胞增殖与分化的作用。细胞培养 2 d 后,其脂提液促增殖的最佳质量浓度为 10 mg/mL,细胞培养 6 d 促分化的最佳质量浓度亦为 10 mg/mL,2 d 后水提液促增殖的最佳质量浓度为 10 mg/mL;3 d 促分化的最佳质量浓度亦为 10 mg/mL。提示在塞隆骨水相和脂相提取物中分别存在较高活性的促成骨细胞增殖、分化的物质,它们可能与塞隆骨中的微量元素和不饱和脂肪酸有关,具有进一步研发成抗骨质疏松或骨质吸收新药的前景,也从细胞水平上为塞隆骨作为虎骨替代品提供了理论依据,证实了塞隆骨可作为虎骨治疗骨质疏松的替代品;同时,本实验也为塞隆骨下一步进行治疗骨质疏松药物的有效成分分离、纯化提供了依据,以及进一步探讨骨相关基因表达打下了基础。

References:

- [1] Zhang B C. Sailonggu: a substitute of tiger bone with great perspective [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 1996, 3(7): 38-39.
- [2] Zhou Q D. Sailonggu substitutes tiger bone [J]. *Wild Animal* (野生动物), 1998, 19(5): 38.
- [3] Liu Z H. *Osteoporosis* (骨质疏松学) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [4] Hai P. Study on Sailong bone in treating osteoporotic rats [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2002, 21(4): 231-233.
- [5] Banerjee C. An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteoclastin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(10): v4968.
- [6] Mos mann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(12): 55.
- [7] Zhang X F, Zhang B C. Studies on the chemical constituents of bone oil in *mysopalaxbaileyi* [J]. *Acta Theriol Sin* (兽类学报), 1997, 17(2): 155-157.
- [8] Yi F S, Suo Y R, Zhang B C. Studies on the inorganic chemical composition in skeletons of plateau zoker and plateau pika essential trace elements [J]. *Acta Theriol Sin* (兽类学报), 1997, 17(3): 221-226.
- [9] Howlett C R, Cave J, Williamson M, et al. Mine ralization *in vitro* cultures of rabbit marriwstromal cells [J]. *Clin Orthop*, 1986, 213: 251.
- [10] Zhou H. Latest research advance of biology research of osteoblast [J]. *Osteoporosis* (骨质疏松症), 1999, 17: 21.
- [11] Wang J Q, Hu Y G, Zheng H J. The effect of icariin on proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro* [J]. *Chin J Clin Rehab* (中国临床康复), 2002, 6(9): 1307-1308.
- [12] Xu L, Fang T H. Effect of bony extracts of *mysopalox fontanieril* on inflammation [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13(6): 373-376