

# 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖及分化的影响

曲雷鸣\*,龚伟(辽宁中医药大学附属医院,沈阳 110032)

中图分类号 R285;R336 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3283-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.06

**摘要** 目的:研究淫羊藿含药血清对体外培养小鼠MC3T3-E1成骨细胞增殖、分化的影响。方法:大鼠灌胃给予淫羊藿后制备含药血清。取MC3T3-E1成骨细胞,分别加入正常血清(对照组)和含10%、15%、20%的淫羊藿含药血清(淫羊藿含药血清低、中、高浓度组)的培养基培养,MTT法检测MC3T3-E1成骨细胞增殖情况,ELISA法检测细胞中碱性磷酸酶(ALP)骨钙素(BGP)活性。结果:与对照组比较,在24、48、72 h时间点淫羊藿含药血清高、中、低浓度组MC3T3-E1成骨细胞增殖程度显著升高( $P < 0.05$ );与对照组比较,在24、48、72 h时间点淫羊藿含药血清高、中、低浓度组ALP活性显著增强,在6、9、12 d时间点淫羊藿含药血清高、中、低浓度组BGP活性显著增强( $P < 0.05$ )。结论:淫羊藿能促进体外培养的MC3T3-E1成骨细胞增殖与骨向分化。

**关键词** 淫羊藿;含药血清;MC3T3-E1成骨细胞;增殖;分化

## Effects of Serum Containing Epimedii Folium on the Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 *in vitro*

QU Lei-ming, GONG Wei(The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of serum containing Epimedii Folium on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells cultured *in vitro*. METHODS: Rats were intragastrically administered with Epimedii Folium to prepare drug-containing serum. MC3T3-E1 osteoblastic cells were collected and cultured in 10% normal SD rat serum (blank control group) and serum containing 10%, 15%, 20% Epimedii Folium (serum containing Epimedii Folium low, medium and high concentration groups). The proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells was determined by MTT, and the activities of alkaline phosphatase and osteocalcin were determined by ELISA. RESULTS: Compared with control group, the ratio of MC3T3-E1 osteoblastic cells proliferation was increased in serum containing Epimedii Folium low, medium and high concentration groups at 24 h, 48 h and 72 h significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the activities of ALP in serum containing Epimedii Folium low, medium and high concentration groups increased at 24 h, 48 h and 72 h, and the activities of BGP in serum containing Epimedii Folium low, medium and high concentration groups increased on 6, 9 and 12 d significantly ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: Epimedii Folium can promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells cultured *in vitro*.

**KEY WORDS** Epimedii Folium; Serum containing drugs; MC3T3-E1 osteoblastic cells; Proliferation; Differentiation

近年来,老年人群中骨质疏松症的发病率呈明显的上升趋势,严重影响了老年人的生活质量。骨质疏松症存在成骨细胞数量相对不足或功能下降,若能促进成骨细胞的增殖能力,提高细胞的总体功能,可增强成骨能力、改善骨代谢平衡,对骨质疏松的预防有重要作用。中医认为,骨质疏松症的发病机制属于“骨痹”“骨痿”的范畴,常用补益肝肾、益精填髓的

中药治疗。淫羊藿(Epimedii Folium)作为传统的补肾中药,具有补肾阳、强筋骨的作用<sup>[1]</sup>,很早即被应用于治疗骨质疏松症的复方中。本研究运用淫羊藿含药血清培养成骨细胞,观察其对成骨细胞增殖的影响,初步探讨淫羊藿预防骨质疏松的作用机制。

## 1 材料

- liver transplant patients: a prospective study[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65(9):881.
- [9] 陈欣,李玉珍,方翼.CYP3A4 代谢药物的特点及其多态性的研究现状[J].中国药房,2010, 21(22):2 097.
- [10] Wei H, Sun L, Tai Z, et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(1):97.
- [11] Hedayat S, Kershner RP, Su G. Relationship of whole-blood FK506 concentrations to rejection and toxicity in

- liver and kidney transplants[J]. *J Biopharm Stat*, 1996, 6(4):411.
- [12] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bionanalytical method validation-a revisit with a decade of progress[J]. *Pharm Res*, 2000, 17 (12): 1 551.
- [13] Karnes HT, March C. Precision, accuracy and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis[J]. *Pharm Res*, 1993, 10(10):1 420.
- [14] 萧参,陈坚行.生物药剂分析方法的认证[J].中国药学杂志,1993,28(7):425.

(收稿日期:2013-01-06 修回日期:2013-03-09)

\* 主管药师。研究方向:中药复方质量。电话:024-31961551。  
E-mail: office1551@163.com

## 1.1 仪器

311型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Forma公司);Infinite M200型多功能酶标仪(奥地利Tecan公司),CK-40F200倒置显微镜(日本Olympus公司);YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂);离心机(江苏牡丹离心机制造有限公司)。

## 1.2 药材

淫羊藿为市售,经笔者鉴定为真品。

## 1.3 药品与试剂

MTT、DMEM培养基、含10%胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(美国Sigma公司);青霉素、链霉素[石药集团中诺药业(石家庄)有限公司];碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)测试盒(上海高创化学科技有限公司)。

## 1.4 动物与细胞株

健康SD大鼠16只,♀,体质量(200±20)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供[动物使用许可证号:SCXK(辽)2010-0001]。小鼠成骨细胞株MC3T3-E1,购于中科院上海细胞库。

## 2 方法

### 2.1 细胞株的培养

小鼠成骨细胞株MC3T3-E1培养于含FBS的DMEM培养基,置培养箱5%CO<sub>2</sub>、37℃培养,每隔2d换液1次,5d传代1次,细胞长至铺满瓶底约90%时进行实验。

### 2.2 含药血清的制备

16只SD大鼠随机均分为两大组,即对照(等容蒸馏水)组与淫羊藿(1.2 g/kg)组,ig给药,每天1次,连续5d。于末次给药1 h后,ip 10%水合氯醛0.35 ml/100 g麻醉,腹主动脉取血,室温静置3 h,离心半径8 cm 3 000 r/min离心30 min,收集上清液,-20℃贮藏,备用。

### 2.3 分组

实验中的两大组共分为4组,即对照(空白血清)组与淫羊藿含药血清高、中、低浓度[培养液内加入含淫羊藿血清,含淫羊藿血清与不完全培养基的体积比分别为1:9(V/V)、1.5:8.5(V/V)、2:8(V/V),体积分数分别为20%、15%、10%]组,每组药物均设8个平行孔,每孔200 μl总液量。

### 2.4 MC3T3-E1成骨细胞增殖测定

MC3T3-E1成骨细胞用完全培养基稀释成4×10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>的细胞悬液,以200 μl/孔加入96孔培养板,24 h后大部分细胞贴壁,换用0.5%FBS培养液培养,使细胞同步化,24 h后吸弃培养液,每孔分别加入相应含药血清的培养液200 μl,每组8孔,继续培养24、48、72 h后,每孔加入5 mg/ml的MTT溶液10 μl,于37℃、含5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱内孵育4 h后,弃去孵育液,每孔加入150 μl二甲基亚砜(DMSO),振荡孵育10 min。待沉淀完全溶解后,在酶标仪上570 nm波长处测定光密度(OD)值。

### 2.5 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞骨向分化能力的影响

#### 2.5.1 成骨诱导分化过程中ALP活性细胞样品的制备 MC3T3-

E1成骨细胞用FBS的DMEM培养基稀释成2×10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>的细胞悬液,以500 μl/孔加入24孔培养板,24 h后大部分细胞贴壁,换用0.5%FBS的DMEM培养基培养,使细胞同步化,24 h后吸弃0.5%FBS血清培养液,然后每孔加入各组血清的条件培养液500 μl,继续培养24、48、72 h后,吸弃培养液,各孔加PBS洗板3次,用0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,离心半径8 cm 3 000 r/min离心10 min,弃上清液,加PBS(pH7.2~7.4)500 μl,用移液枪反复吹打至液体无细胞团块。再用PBS(pH7.2~7.4)1 ml稀释细胞悬液,使细胞密度达1×10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>左右,-20℃反复冻融3次,以使细胞破坏并释放出细胞内成分,离心半径8 cm 3 000 r/min离心20 min,仔细收集上清液,-20℃贮藏,备用。

2.5.2 成骨诱导分化过程中BGP活性细胞样品的制备 同“2.5.1”项下培养细胞,每3天换1次培养液,继续培养6、9、12 d后,弃上清液,加PBS(pH7.2~7.4)500 μl,用移液器反复吹打至液体无细胞团块。再用PBS(pH7.2~7.4)1 ml稀释细胞悬液,使细胞浓度达到1×10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>左右,-20℃反复冻融3次,以使细胞破坏并释放出细胞内成分,3 000 r/min离心20 min,仔细收集上清,-20℃贮藏,备用。

2.5.3 成骨诱导分化过程中ALP、BGP活性测定 ELISA法,分别按ALP、BGP试剂盒说明检测ALP、BGP活性,简要步骤如下:准备试剂、样品和标准品,加入准备好的样品和标准品,生物素标记的二抗和酶标试剂,37℃反应60 min,洗板5次,加入显色液A、B,37℃显色15 min,加入终止液,10 min内在450 nm波长处测定OD值,计算。

## 2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖的影响

在24、48、72 h时间点,与对照组比较,不同浓度淫羊藿含药血清组MC3T3-E1成骨细胞增殖程度显著升高( $P<0.05$ )。淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖的影响见表1(表中,OD值越大表示细胞活性越强,增殖程度越高)。

表1 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖的影响

$$(\bar{x}\pm s, n=8)$$

Tab 1 Effects of serum containing Epimedii Folium on the proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	OD值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.411 3±0.024 7	0.445 1±0.036 6	0.452 5±0.035 3
淫羊藿含药血清低浓度组	0.450 1±0.040 2*	0.543 8±0.036 2*	0.625 0±0.031 6*
淫羊藿含药血清中浓度组	0.501 3±0.035 6*	0.638 7±0.043 2*	0.707 5±0.039 2*
淫羊藿含药血清高浓度组	0.598 8±0.036 2*	0.682 5±0.029 1*	0.788 8±0.048 5*

与对照组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$

vs.control group:<sup>\*</sup> $P<0.05$

### 3.2 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响

在72 h内,与对照组比较,不同浓度淫羊藿含药血清组

MC3T3-E1 细胞 ALP 活性显著增强( $P<0.05$ ),这种促进作用随时间增加而增强。淫羊藿含药血清对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响见表2(表中,OD 值越大表示活性越强)。

表2 淫羊藿含药血清对 MC3T3-E1 成骨细胞 ALP 活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Tab 2 Effects of serum containing Epimedii Folium on the activities of ALP of MC3T3-E1 osteoblastic cells( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	OD值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	4.925 $\pm$ 0.104 5	7.142 $\pm$ 0.631 6	8.871 $\pm$ 0.735 8
淫羊藿含药血清低浓度组	5.177 $\pm$ 0.140 2*	11.700 $\pm$ 0.545 1*	16.320 $\pm$ 0.906 9*
淫羊藿含药血清中浓度组	5.310 $\pm$ 0.781 4*	12.890 $\pm$ 0.182 7*	16.540 $\pm$ 1.032 1*
淫羊藿含药血清高浓度组	5.288 $\pm$ 0.234 3*	15.200 $\pm$ 1.032 4*	17.270 $\pm$ 0.878 4*

与对照组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$

vs.control group:<sup>\*</sup> $P<0.05$

### 3.3 淫羊藿含药血清对 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性的影响

在 12 d 内,与对照组比较,不同浓度淫羊藿含药血清组 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性显著增强( $P<0.05$ ),这种促进作用随时间增加而增强。淫羊藿含药血清对 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性的影响见表3(表中,OD 值越大表示活性越强)。

表3 淫羊藿含药血清对 MC3T3-E1 成骨细胞 BGP 活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Tab 3 Effects of different concentrations of serum containing Epimedii Folium on the activities of BGP of MC3T3-E1 osteoblastic cells( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	OD值		
	6 d	9 d	12 d
对照组	4.438 $\pm$ 0.262 1	5.504 $\pm$ 0.286 3	5.974 $\pm$ 0.337 5
淫羊藿含药血清低浓度组	5.894 $\pm$ 0.145 8*	7.289 $\pm$ 0.488 7*	8.311 $\pm$ 0.557 9*
淫羊藿含药血清中浓度组	6.198 $\pm$ 0.312 6*	7.401 $\pm$ 0.671 4*	8.735 $\pm$ 0.026 7*
淫羊藿含药血清高浓度组	6.821 $\pm$ 0.557 4*	8.526 $\pm$ 0.921 5*	9.147 $\pm$ 0.574 8*

与对照组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$

vs.control group:<sup>\*</sup> $P<0.05$

## 4 讨论

MC3T3-E1 是从小鼠颅盖骨细胞中建株的成骨细胞,具有成骨细胞的生物学特性,是研究药物对成骨细胞影响的有价值的体外细胞模型<sup>[2]</sup>。

骨质疏松症作为老年人中的一种常见疾病,严重影响着患者的生活质量,是加重社会经济负担的重要因素<sup>[3]</sup>。研究表明,成骨细胞数量减少和成骨功能下降是老年人罹患该病的主要原因。成骨细胞是参与骨组织工程构建的最重要细胞之一,其可进一步生成骨细胞,促进成骨细胞增殖和骨细胞增加。在成骨细胞骨形成过程快,其数量直接影响骨形成能力。利用药物促进成骨细胞增殖、恢复骨代谢平衡已成为目前防治骨质疏松的热点。故本研究主要以成骨细胞的增殖来

考量淫羊藿对成骨细胞代谢的影响。MTT 法是检测细胞增殖活力的一种简便、准确的方法<sup>[4-5]</sup>。实验结果表明,淫羊藿含药血清能促进成骨细胞增殖,这为淫羊藿治疗骨质疏松症提供了依据。

ALP 是主要分布于细胞的钙结合转运蛋白,可促进细胞成熟、钙化,是成熟成骨细胞的重要表面标志,代表成骨细胞的活性,也是骨形成的标志<sup>[6]</sup>,能较准确地反映机体成骨细胞的状况<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,MC3T3-E1 成骨细胞在 10%、15%、20% 浓度的含淫羊藿血清中培养 72 h,均能产生明显的促增殖作用;ALP 活性明显增强,说明含淫羊藿血清促进成骨细胞活动增强时,ALP 活性升高;BGP 与 ALP 高度相关,BGP 是骨基质中重要的非胶原蛋白成分,只有成骨细胞能合成和分泌 BGP,主要在矿化形成期出现,因此它是成骨细胞成熟的标志,被认为是成骨细胞功能的特异性标志<sup>[8]</sup>,成骨细胞活性增强,骨钙素水平升高,反之下降。骨钙素测定结果表明,10%、15%、20% 的含淫羊藿血清中培养 6、9、12 d 时的 BGP 活性明显增强。上述结果提示,含淫羊藿血清具有促进成骨细胞 MC3T3-E1 各时期分化的作用,说明淫羊藿在骨质疏松预防领域有广泛的应用价值。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:306.
- [2] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from new born moHse ealvafia[J]. *J Cell Biol*, 1983, 96(1):191.
- [3] Dempster DW. Osteoporosis and the burden of osteoporosis related fractures[J]. *Am J Manag Care*, 2011, 17(6):164.
- [4] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版社,2004:250.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2):55.
- [6] 黎海芪.正确认识维生素 D 缺乏症佝偻病[J].中华儿科杂志,2008,46(3):161.
- [7] 康新勤,臧伟进,胥晓丽,等.大鼠骨髓间充质干细胞定向成骨细胞分化中碱性磷酸酶的变化[J].西安交通大学学报:医学版,2004,25(4):366.
- [8] Levy MM, Joyner CJ, Virdi AS, et al. Qsteeprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissues: an in vitro study[J]. *Bone*, 2001, 29(4):317.

(收稿日期:2013-06-07 修回日期:2013-07-09)