

# 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>,很早就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*. Bionalytical 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 °C 培养, 每隔 2 d 换液 1 次, 5 d 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 5 d。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 °C 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 °C、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 二甲基亚砷 (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内无细胞团块。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 °C 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 °C 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内无细胞团块。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 °C 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 °C 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 °C 反应 60 min, 洗板 5 次, 加入显色液 A、B, 37 °C 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 Epimedium 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: \*P < 0.05

vs. control group: \*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 0±0.104 5	7.142 0±0.631 6	8.871 0±0.735 8
淫羊藿含药血清低浓度组	5.177 0±0.140 2*	11.700 0±0.545 1*	16.320 0±0.906 9*
淫羊藿含药血清中浓度组	5.310 0±0.781 4*	12.890 0±0.182 7*	16.540 0±1.032 1*
淫羊藿含药血清高浓度组	5.288 0±0.234 3*	15.200 0±1.032 4*	17.270 0±0.878 4*

与对照组比较: \* $P<0.05$   
vs. control group: \* $P<0.05$

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 0±0.262 1	5.504 0±0.286 3	5.974 0±0.337 5
淫羊藿含药血清低浓度组	5.894 0±0.145 8*	7.289 0±0.488 7*	8.311 0±0.557 9*
淫羊藿含药血清中浓度组	6.198 0±0.312 6*	7.401 0±0.671 4*	8.735 0±0.026 7*
淫羊藿含药血清高浓度组	6.821 0±0.557 4*	8.526 0±0.921 5*	9.147 0±0.574 8*

与对照组比较: \* $P<0.05$   
vs. control group: \* $P<0.05$

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, 反之下降低。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 calvaria[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 缺乏性佝偻病[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, Viridi As, et al. Osteoprogenitor 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)