

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.11.006 [http://www.crter.org]
黎晓敏, 卢昌均, 周艳芳, 周志昆, 冯鑫, 郑丽华. 黄芪三仙汤干预成骨细胞护骨素及护骨素配体的表达[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(11):1939-1945.

黄芪三仙汤干预成骨细胞护骨素及护骨素配体的表达*

黎晓敏¹, 卢昌均², 周艳芳¹, 周志昆¹, 冯鑫¹, 郑丽华¹

1 广东医学院药学院, 广东省东莞市 523808
2 广西柳州市中医院, 广西壮族自治区柳州市 545001

文章亮点:

- 1 在原有临床研究的基础上, 从分子生物学水平探讨黄芪三仙汤治疗骨质疏松症的作用机制。
- 2 采用与仙灵骨葆胶囊进行实验对比, 探讨黄芪三仙汤对成骨细胞护骨素和护骨素配体蛋白基因调节存在正相关作用还是负相关作用。
- 3 通过探讨补肾活血方黄芪三仙汤的疗效机制, 进一步阐明肾主骨生髓、补肾活血理论对治疗骨质疏松症的指导意义。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 黄芪三仙汤; 补肾活血; 成骨细胞; 护骨素; 护骨素配体; 骨质疏松; 细胞培养; 破骨细胞; 骨吸收; 骨形成; 省级基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 长期研究表明黄芪三仙汤对骨质疏松症有一定的治疗作用, 基础实验研究也表明黄芪三仙汤能改善实验动物的生物力学指标。在此基础上实验拟从细胞分子水平上探讨黄芪三仙汤对成骨细胞的相关作用。

目的: 观察黄芪三仙汤对体外培养成骨细胞护骨素、护骨素配体基因调节的作用, 探讨黄芪三仙汤治疗骨质疏松的作用机制。

方法: 制备黄芪三仙汤和仙灵骨葆胶囊含药血清及空白血清, 对体外培养新生 SD 大鼠成骨细胞进行干预, 应用细胞形态观察、MTT、Western blot 分析及蛋白浓度测定法, 观察各含药血清对体外培养成骨细胞的增殖及成骨细胞护骨素、护骨素配体表达的影响。

结果与结论: 经药物干预后成骨细胞变为长梭形、条索状, 融合成片, 分界较为模糊, 细胞生长较密集。黄芪三仙汤可明显促进成骨细胞护骨素蛋白浓度的提高($P < 0.01$), 同时也提高了护骨素配体蛋白浓度($P < 0.01$), 而护骨素/护骨素配体浓度比例水平明显升高($P < 0.01$)。结果可见黄芪三仙汤可能是通过调节成骨细胞分化调控因子护骨素、护骨素配体的表达来调节成骨细胞的生长, 从而实现其对骨质疏松症的治疗作用。

黎晓敏, 女, 1986年生, 广东省江门市人, 汉族, 2010年广东医学院毕业, 主要从事中药防治骨质疏松症研究。
zhouzhkun@126.com

通讯作者: 周志昆, 博士, 教授, 广东医学院药学院, 广东省东莞市 523808

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2013)11-01939-07

收稿日期: 2012-07-25
修回日期: 2012-08-24
(20120525005/M·W)

Huangqi Sanxian decoction is involved in gene regulation of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in osteoblasts

Li Xiao-min¹, Lu Chang-jun², Zhou Yan-fang¹, Zhou Zhi-kun¹, Feng Xin¹, Zheng Li-hua¹

1 School of Pharmacology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong Province, China

2 Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Li Xiao-min, School of Pharmacology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhou Zhi-kun, Doctor, Professor, School of Pharmacology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong Province, China
zhouzhikun@126.com

Supported by: the Science and Technology Plan Program of Guangdong Province, No. 2006B35601005*

Received: 2012-07-25
Accepted: 2012-08-24

Abstract

BACKGROUND: Long-term clinical research has demonstrated that *Huangqi Sanxian* decoction exerts a certain curative effect on osteoporosis. In addition, experimental studies have also showed that *Huangqi Sanxian* decoction can improve the biomechanical indexes in experimental animals. The present study aimed to investigate the effect of *Huangqi Sanxian* decoction on osteoblasts in the cellular level.

OBJECTIVE: To observe the effects of *Huangqi Sanxian* decoction on gene regulation of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in osteoblasts cultured *in vitro* and to investigate the action mechanism underlying the curative effect of *Huangqi Sanxian* decoction on osteoporosis.

METHODS: *Huangqi Sanxian* decoction, *Xianlinggubao* capsule containing serum and blank serum were prepared to intervening osteoblasts from newborn Sprague-Dawley rats cultured *in vitro*. Cellular morphology was observed, and western blot analysis and determination of protein concentration were used to observe the effects of drug-containing serum on osteoblast proliferation, gene expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in osteoblasts cultured *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: After drug intervention, osteoblasts were spindle-shaped and trabs-shaped, which were concentrated and confluent with undefined boundary. *Huangqi Sanxian* decoction could increased the protein expression of osteoprotegerin in osteoblasts ($P < 0.01$), and also increased the protein expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand ($P < 0.01$) to increase ratio of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand ($P < 0.01$). *Huangqi Sanxian* decoction can achieve the therapeutic effect on osteoporosis through regulating the expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand.

Key Words: tissue construction; bone tissue construction; *Huangqi Sanxian* decoction; supplementing kidney and promoting blood circulation; osteoblasts; osteoprotegerin; osteoprotegerin ligand; osteoporosis; cell culture; osteoclasts; bone resorption; bone formation; provincial grants-supported paper; tissue construction-containing paper

Li XM, Lu CJ, Zhou YF, Zhou ZK, Feng X, Zheng LH. *Huangqi Sanxian* decoction is involved in gene regulation of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(11): 1939-1945.

0 引言

骨质疏松是一种全身性的代谢性骨病,以骨量减少、骨的微结构损伤为特征,导致骨强度下降、骨折危险性增加^[1]。中医理论认为,骨质疏松症属于“骨痿”、“骨痹”的范围,其发病的始动因素是肾精亏损。肾为先天之本,主藏精,主骨生髓,肾精充足则骨髓生化有源,骨骼得到滋养而强劲有力;若肾精亏虚,则骨髓生化乏源,骨骼失养,骨矿物质含量下降,就易发生骨质疏松症。

根据骨质疏松症所呈现的临床症状及发病机制,临床采用具有补肾活血之功效的“黄芪三仙汤”来治疗骨质疏松症。“黄芪三仙汤”是以仙茅、仙灵脾、肉苁蓉等温阳补肾,黄芪、当归、田七等养血活血药物组合成方的一种汤剂。经过临床研究发现,“黄芪三仙汤”具有改善患者肾虚症状积分,提高血清雌二醇水平,增加绝经后妇女的骨密度,抑制骨吸收的作用^[2-3]。

通过制备黄芪三仙汤和仙灵骨葆胶囊含药血清及空白血清对体外培养成骨细胞进行干预实验,应用细胞形态观察、Western blot分析法及蛋白浓度测定法,探讨黄芪三仙汤对护骨素及护骨素配体基因调节机制,从分子生物学角度进一步证实黄芪三仙汤对骨质疏松症的治疗作用。

1 材料和方法

设计: 分子生物学对比观察。

时间及地点: 实验于2007年7月至2010年7月在广东医学院肿瘤研究实验室完成。

材料:

实验动物: 新生SD大鼠10只, 体质量250-300 g左右SD大鼠12只, 雌雄各半, 由广东医学院实验动物中心提供。

主要试剂:

Main reagents:

试剂	来源
小牛血清	兰州荣华生物科技有限公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶、I 型胶原酶、琼脂糖	GiBco
噻唑蓝、十二烷基肌氨酸钠、 β -巯基乙醇、十二烷基磺酸钠	Sigma
二甲基亚砜	Bioml
硫氰酸胍	北京赛白盛基因技术公司
TritonX-100	北京夏斯生物公司
预染标准蛋白分子量 marker	美国 BIO-RAD
聚偏二氟乙烯膜	上海西塘生物科技有限公司
护骨素(N-20), 护骨素配体(N-19)	SANTA CRUZ 公司
二抗及显色剂	

实验方法:

黄芪三仙汤的制备: 黄芪三仙汤制剂—黄芪三仙胶囊(黄芪、威灵仙、仙茅、仙灵脾、川芎、肉苁蓉、田三七、地龙等), 由广东医学院药学院药剂实验室提供。称取黄芪三仙胶囊药粉约9.0 g, 用量筒量取蒸馏水100 mL, 将药粉溶解于蒸馏水中, 加热搅拌, 使药粉均匀分散在蒸馏水中, 留待灌胃。

仙灵骨葆的制备: 仙灵骨葆胶囊(淫羊藿、续断、补骨脂、地黄、丹参、知母等), 由贵州同济堂制药有限公司生产, 蒸馏水100 mL溶解约9.0 g药粉, 留待灌胃。

含药血清的制备^[4]: 取体质量250-300 g的SD大鼠12只, 雌雄各半, 随机分为3组, 每组4只, 即空白组(蒸馏水灌胃组)、仙灵骨葆组(仙灵骨葆灌胃组)、黄芪三仙汤组(黄芪三仙汤灌胃组), 每只大鼠每次灌胃5 mL, 3次/d, 连续7 d。最后一次灌胃2 h后心脏取血, 倾斜静置4 h, 3 000 r/min(离心半径约13 cm)离心15 min后收集血清, 56 °C水浴灭活30 min, 经0.22 μ m滤膜过滤除菌分装, -20 °C保存备用。

成骨细胞培养: 参照文献[4-7], 并略作改进。取24 h内新生的SD大鼠10只, 在体积分数为75%的乙醇溶液中浸泡一两分钟后, 无菌条件下取颅盖骨, 在PBS中剔除软组织, 冲洗2次后, 置于0.1% I 型胶原酶中, 同时将骨片剪成1-3 mm²大小, 室温振荡消化20 min后吸弃

I 型胶原酶; 然后将颅盖骨加入0.1% I 型胶原酶和0.25%的胰蛋白酶混合液中(0.1% I 型胶原酶:0.25%的胰蛋白酶=2:1), 室温振荡消化30 min, 吸取上清液, 加入等量含体积分数为10%小牛血清的DMEM培养基终止消化后, 1 500 r/min(离心半径约13 cm)离心10 min, 弃掉溶液, 加入含体积分数为20%小牛血清DMEM培养基, 用吹打管吹打, 让细胞完全悬浮在溶液中。重复以上步骤2次后, 合并细胞悬液, 调整细胞浓度为 10^8 L⁻¹, 将细胞悬液吸到25 mL的培养瓶中于37 °C, 体积分数为5%CO₂, 饱和湿度下培养。细胞完全贴壁后每2 d换液1次, 待细胞长满后传代。传代时, 先用PBS冲洗2次, 在0.25%胰蛋白酶中消化3-8 min, 倒置显微镜下观察细胞皱缩变圆时加入含体积分数为10%小牛血清的DMEM培养基终止消化, 用吸管吸培养基吹打瓶底, 使细胞悬浮于培养基中, 调整细胞浓度为 10^8 L⁻¹后分装入25 mL的培养瓶中继续孵育。第3代成骨细胞进行下一步实验。

含药血清干预成骨细胞: 取第3代成骨细胞, 25 mL/瓶, 加入不同浓度的各组合药血清5 mL, 放置培养箱中孵育48 h后, 进行其他定量分析。

细胞形态学观察: 每日通过倒置显微镜观察细胞的形态, 生长状况。

MTT法测细胞增殖^[8-9]: 选用生长良好的第3代成骨细胞, 用0.25%胰酶消化制成单个细胞悬液, 调整细胞浓度为 5.0×10^7 L⁻¹, 接种到96孔培养板中, 每孔接种100 μ L细胞悬液。接种24 h后, 用无血清的DMEM培养液再培养24 h, 再换用含各浓度黄芪三仙汤含药血清及空白血清的DMEM培养液培养。于接种后第3, 4, 5天, 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 37 °C继续孵育4 h终止培养, 观察到各培养孔内有紫色结晶物出现, 小心吸弃孔内上清液。每孔加入150 μ L 二甲基亚砜, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值, 记录结果。

Western blot分析法^[10-11]: ①选择第3代药物干预后的成骨细胞, 用裂解液裂解细胞, 收集蛋白样品并测定蛋白质浓度, 计算含40 μ g蛋白的溶液体积即为上样量。②电泳: 制备好4 mL 12%分离胶及1.5 mL 5%浓缩胶, 加样后接通电源, 调节电压至100 V开始电泳, 直至溴酚蓝到达分离胶底部。③转膜(Transfer): 选用聚偏二氟乙烯膜, 使用Bio-Rad的标准湿式转膜装置, 设定转膜电流为400 mA, 转膜时间为60 min。④封闭(Blocking): 转膜完毕后, 立即把蛋白膜放置到预先准备好的Western洗涤液中, 漂洗一两分钟, 以洗去膜上的转膜

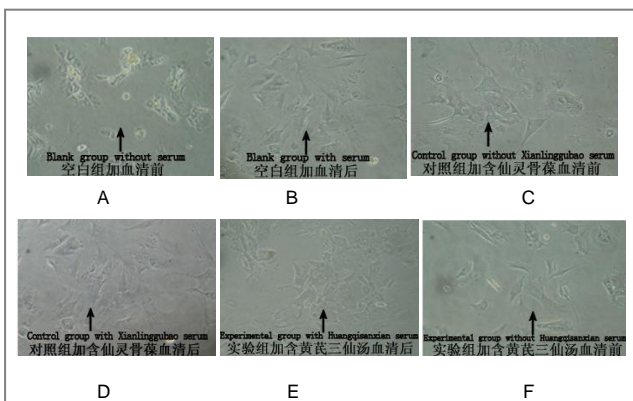
液;加入脱脂奶粉封闭液在摇床上缓慢摇动,室温封闭180 min后在4 ℃ 封闭过夜。⑤一抗孵育(Primary antibody incubation)和二抗孵育(Secondary antibody incubation)。⑥蛋白检测(Detection of proteins):参考显色剂说明书,给膜染色完成,观察结果。

主要观察指标:①含药血清干预后成骨细胞增殖情况。②含药血清干预后成骨细胞护骨素及护骨素配体蛋白表达。

统计学分析:采用SPSS 12.0软件进行统计学处理,各组间数据比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 新生SD大鼠成骨细胞形态学变化 在倒置显微镜下可以观察到,接种24 h后大部分细胞贴壁、伸展,初时细胞形态多样化,呈多边形、梭形,胞浆丰富,为单核,胞核大而清晰,呈圆形或卵圆形,含一两个核仁^[4]。培养3 d后,细胞伸出较多突起,突起相互连接,细胞形态变为长梭形、条索状,融合成片,分界较为模糊。传至3代后,细胞形态仍保持长梭形、条索状,细胞形态变化不大,且各代增长速度较为接近。第3代成骨细胞经含药血清处理后,细胞密集程度比较,见图1及表1。



注: A, C, E: 加空白血清、仙灵骨葆血清、黄芪三仙汤血清前,成骨细胞生长速度、细胞形态与前两代速度相似。

B: 加空白血清后,由于血清浓度没有原来培养基浓度高,所以生长速度缓慢,但细胞形态良好。

D, F: 加仙灵骨葆血清、黄芪三仙汤血清后,细胞生长速度略有加快,细胞依然能保持原有的形态。

图1 黄芪三仙汤血清、仙灵骨葆血清、空白血清干预第3代新生SD大鼠成骨细胞后形态学变化($\times 100$)

Figure 1 Morphological changes in osteoblasts after *Huangqi Sanxian* decoction, *Xianlinggubao* and blank serum intervened the third generation of newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts ($\times 100$)

表1 黄芪三仙汤血清、仙灵骨葆血清、空白血清对第3代新生SD大鼠成骨细胞数量的影响

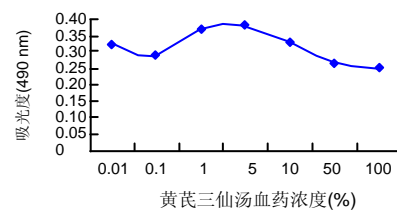
Table 1 Effect of *Huangqi Sanxian* decoction, *Xianlinggubao*, and blank serum on the number of the third generation of osteoblasts from newborn Sprague-Dawley rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	成骨细胞(个/ μm^2)
空白组	0.033 7 \pm 0.027 7
仙灵骨葆组	0.035 4 \pm 0.015 6 ^a
黄芪三仙汤组	0.036 3 \pm 0.020 3 ^{ab}

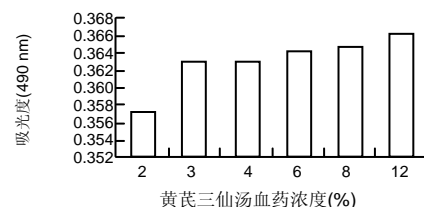
与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组比较, ^b $P < 0.05$ 。

由图1及表1可见,黄芪三仙汤组、仙灵骨葆组与空白组相比细胞数均明显增多($P < 0.01$);总体上看,黄芪三仙汤组的细胞数增长多于仙灵骨葆组($P < 0.05$)。

2.2 不同浓度黄芪三仙汤含药血清干预后成骨细胞增殖结果 从MTT分析结果可见黄芪三仙汤含药血清的浓度在1%~10%之间有一个峰,说明黄芪三仙汤含药血清的浓度在1%~10%适合成骨细胞的生长,见图2A。在适合浓度范围中再选取浓度为2%, 3%, 4%, 6%, 8%, 12%浓度进行MTT分析,见图2B及表2。可见在加药后24 h,黄芪三仙汤血药浓度为12%, 6%, 3%比血药浓度为8%, 4%, 2%的细胞增殖明显增多($P < 0.01$),因此选用12%, 6%, 3% 3个浓度作为实验的血药浓度。



A: 可见含药血清浓度在1%~10%适合成骨细胞的生长



B: 可见血清浓度为12%, 6%, 3%时细胞增殖明显增多

图2 MTT法检测第3代新生SD大鼠成骨细胞经不同浓度黄芪三仙汤含药血清干预后MTT法检测各孔吸光值

Figure 2 MTT detection after the third generation of newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts were intervened by different concentrations of *Huangqi Sanxian* decoction-containing serum

表 2 不同浓度黄芪三仙汤含药血清促进第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞的增殖作用

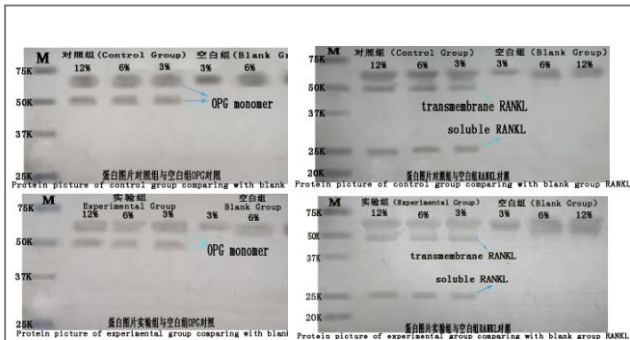
Table 2 Effect of different concentrations of *Huangqi Sanxian* decoctin-containing serum on the proliferation of the third generation newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n=8$)

黄芪三仙汤血药浓度(%)	吸光度(490 nm)
2	0.357 0±0.165 7
3	0.362 7±0.166 5 ^a
4	0.363 0±0.166 8
6	0.364 0±0.167 4 ^b
8	0.364 8±0.167 6
12	0.366 0±0.168 6 ^c

与血药浓度 2% 比较, ^a $P < 0.01$; 与血药浓度 4% 比较, ^b $P < 0.01$; 与血药浓度 8% 比较, ^c $P < 0.01$ 。

注: 选择 3%, 6%, 12% 作为实验血药浓度。

2.3 Western blot 分析法观察黄芪三仙汤对第 3 代 SD 大鼠成骨细胞护骨素、护骨素配体蛋白表达的影响 见图 3。根据 Western blot 分析法得出的结果观察到黄芪三仙汤组、仙灵骨葆组均有护骨素、护骨素配体蛋白的表达, 而空白组此两种蛋白的表达不明显。



注: 黄芪三仙汤组、仙灵骨葆组均有护骨素、护骨素配体蛋白的表达, 而空白组此两种蛋白的表达不明显。

图 3 黄芪三仙汤对第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素、护骨素配体蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of *Huangqi Sanxian* decoction on the protein expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in the third generation of newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts

2.4 不同浓度含药血清对第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素蛋白表达的影响 仙灵骨葆组和黄芪三仙汤

组血药浓度 3%, 6%, 12% 与空白组血药浓度 3%、6%、12% 相比, 护骨素蛋白表达均有明显升高, 且与空白组相比差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 结果表明, 黄芪三仙汤含药血清、仙灵骨葆含药血清与正常血清组相比, 成骨细胞护骨素蛋白的表达明显增强。由此可以说明黄芪三仙汤含药血清与仙灵骨葆含药血清可能都是通过促进成骨细胞表达护骨素, 使之与护骨素配体的结合增多, 从而抑制了护骨素配体的活性, 进而抑制破骨细胞的功能达到治疗骨质疏松的目的。黄芪三仙汤组血药浓度 3%, 6%, 12% 与仙灵骨葆组血药浓度 3%, 6%, 12% 相比, 黄芪三仙汤组血清干预成骨细胞后护骨素表达明显较仙灵骨葆组高 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 不同浓度含药血清干预后新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素蛋白表达

Table 3 Protein expression of osteoprotegerin in newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts after the intervention with different concentrations of drug-containing serum ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血药浓度	吸光度
空白组	3%	0.578 0±0.033 1
	6%	0.605 0±0.065 9
	12%	0.633 0±0.076 9
仙灵骨葆组	3%	0.801 0±0.017 6 ^a
	6%	0.899 0±0.026 1 ^b
	12%	1.039 0±0.074 3 ^c
黄芪三仙汤组	3%	0.819 0±0.018 4 ^{ad}
	6%	0.922 0±0.015 2 ^{be}
	12%	1.091 0±0.073 7 ^{cf}

与空白组血药浓度 3% 比较, ^a $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 6% 比较, ^b $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 12% 比较, ^c $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组血药浓度 3% 比较, ^d $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组血药浓度 6% 比较, ^e $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组血药浓度 12% 比较, ^f $P < 0.01$ 。

注: 说明黄芪三仙汤含药血清与仙灵骨葆含药血清可能都是通过促进成骨细胞表达护骨素, 抑制了护骨素配体的活性, 进而抑制破骨细胞的功能达到治疗骨质疏松的目的, 黄芪三仙汤效果优于仙灵骨葆。

2.5 不同浓度含药血清对第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素配体蛋白表达的影响 仙灵骨葆组和黄芪三仙汤组血药浓度 3%, 6%, 12% 与空白组血药浓度 3%, 6%, 12% 相比, 护骨素配体蛋白浓度均有明显升高, 且与空白组相比有明显差异 ($P < 0.01$), 由此可以说明黄芪三仙汤含药血清和仙灵骨葆含药血清可能都不是通过抑制成骨细胞表达护骨素配体, 抑制破骨细胞的活性, 达到治疗骨质疏松的目的, 见表 4。

表 4 不同浓度含药血清干预后第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素配体蛋白表达

Table 4 Protein expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts after the intervention with different concentrations of drug-containing serum ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血药浓度	吸光度
空白组	3%	0.478 0±0.033 1
	6%	0.505 0±0.065 9
	12%	0.533 0±0.076 9
仙灵骨葆组	3%	0.671 0±0.021 1 ^a
	6%	0.637 0±0.016 4 ^b
	12%	0.605 0±0.028 3 ^c
黄芪三仙汤组	3%	0.651 0±0.041 2 ^{ad}
	6%	0.624 0±0.033 9 ^{be}
	12%	0.577 0±0.066 5 ^{cd}

与空白组血药浓度 3% 比较, ^a $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 6% 比较, ^b $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 12% 比较, ^c $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组血药浓度 3% 比较, ^d $P < 0.05$; 与仙灵骨葆组血药浓度 6% 比较, ^e $P < 0.05$; 与仙灵骨葆组血药浓度 12% 比较, ^f $P < 0.05$ 。

注: 说明黄芪三仙汤含药血清和仙灵骨葆含药血清可能都不是通过抑制成骨细胞表达护骨素配体, 抑制破骨细胞的活性, 达到治疗骨质疏松的目的。

2.6 不同浓度含药血清对第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素/护骨素配体蛋白表达比值的影响 见表 5。

表 5 不同浓度含药血清干预后第 3 代新生 SD 大鼠成骨细胞护骨素/护骨素配体蛋白表达比值

Table 5 Ratio of osteoprotegerin to receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in newborn Sprague-Dawley rat osteoblasts after the intervention with different concentrations of drug-containing serum ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血药浓度	吸光度
空白组	3%	1.210 0±0.148 0
	6%	1.201 0±0.284 0
	12%	1.391 0±0.298 0
仙灵骨葆组	3%	1.195 0±0.037 2 ^a
	6%	1.413 0±0.057 8 ^b
	12%	1.719 0±0.129 8 ^c
黄芪三仙汤组	3%	1.267 0±0.102 7 ^a
	6%	1.484 0±0.115 1 ^b
	12%	1.910 0±0.172 5 ^{cd}

与空白组血药浓度 3% 比较, ^a $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 6% 比较, ^b $P < 0.01$; 与空白组血药浓度 12% 比较, ^c $P < 0.01$; 与仙灵骨葆组血药浓度 12% 比较, ^d $P < 0.05$ 。

注: 说明黄芪三仙汤含药血清与仙灵骨葆含药血清可能都是通过刺激成骨细胞表达护骨素, 使之与护骨素配体的结合增多, 进而对破骨细胞产生抑制作用。

由表 5 可见, 黄芪三仙汤组、仙灵骨葆组比空白组护骨素/护骨素配体比例水平明显升高($P < 0.01$), 从而得知黄芪三仙汤含药血清与仙灵骨葆含药血清可能都是通过刺激成骨细胞表达护骨素, 使之与护骨素配体的结合增多, 进而对破骨细胞产生抑制作用。黄芪三仙汤组血药浓度 3%、6% 与对照组血药浓度 3%、6% 相比无明显升高($P > 0.05$), 黄芪三仙汤组血药浓度 12% 与仙灵骨葆组血药浓度 12% 相比总体上有升高($P < 0.05$), 从而得知: 黄芪三仙汤含药血清各浓度组护骨素/护骨素配体水平与仙灵骨葆含药血清各浓度组差异不明显。

3 讨论

成骨细胞是来源于未分化间充质中的多潜能干细胞, 是由具有多种形态和功能特点的细胞亚群构成, 参与了骨的吸收、形成及改建。成骨细胞可分泌胰岛素样生长因子、成纤维生长因子、转化生长因子、护骨素、护骨素配体等因子影响了成骨细胞增殖、分化。骨保护因子是一种缺乏跨膜结构域的分泌性糖蛋白, 在骨髓, 护骨素主要由成骨细胞系和骨髓基质细胞产生。

护骨素是一种可溶性的诱饵受体, 其作用是结合或中和可溶性的护骨素配基及成骨细胞/基质细胞结合的护骨素配体, 竞争性阻断护骨素配体与核激活因子受体结合从而封闭成骨细胞诱导的破骨细胞前体分化、存活与融合, 抑制成熟破骨细胞活化, 诱导破骨细胞的凋亡^[12]。Kwan 等^[13]用鼠单克隆细胞测试护骨素作用时, 证实护骨素/护骨素配体在破骨细胞样细胞的骨吸收中起强大的抑制作用, 并且护骨素的生理活性具有以护骨素配体依赖性。

护骨素配体是一种跨膜蛋白, 由成骨细胞和激活的 T 细胞表达, 是惟一能直接刺激破骨细胞发育和使之激活的细胞因子, 它与破骨细胞表面受体护骨素配体结合, 强有力的促进破骨细胞的形成、分化、成熟, 并抑制破骨细胞凋亡, 延长其存活。护骨素配体可增强破骨细胞运动能力并抑制破骨细胞的凋亡而间接抑制成骨细胞骨形成功能^[14]。

护骨素/护骨素配体/核激活因子受体信号传导通路直接影响了骨形成和骨吸收这两个骨代谢的基本过程, 以护骨素配体和护骨素比率的平衡在骨改建中起重要的控制作用。通常情况下骨形成与骨吸收之间保持平

衡,即成骨细胞与破骨细胞保持功能性偶联,但是当某种原因使这种功能性偶联破坏,骨吸收超过骨形成,骨量减少时,即可引起骨质疏松。成骨细胞和破骨细胞都是骨代谢过程中的重要核心细胞,而成骨细胞不仅参与骨形成,而且还参与破骨细胞性骨吸收的调节。有研究表明,成骨细胞能表达护骨素配体,与破骨细胞的前体细胞表面的核激活因子受体结合后,促进破骨细胞的分化及骨吸收活性;成骨细胞又可分泌护骨素与护骨素配体竞争性结合,阻止护骨素配体与核激活因子受体结合,进而抑制其骨吸收活性^[15]。

实验采用Westernblot分析法与蛋白浓度检测技术,对成骨细胞表达的护骨素、护骨素配体及护骨素/护骨素配体比例水平进行了观察。通过实验表明,黄芪三仙汤含药血清对护骨素/护骨素配体/核激活因子受体系统有明显的激活作用,其主要途径可能是一方面促进成骨细胞分泌护骨素,使之与护骨素配体的结合增多,进而使破骨细胞活性降低;另一方面使护骨素配体与核激活因子受体的结合率增加,更多地激活了破骨细胞,进而以正反馈方式激活成骨细胞,更好地使破骨细胞完成了骨的吸收功能,从而使骨形成和骨吸收达到新的动态平衡,促进了成骨细胞主导骨形成的功能,改善了骨内的微环境,达到了骨髓充足之效。由于黄芪三仙汤与仙灵骨葆的护骨素/护骨素配体比例水平差异不大,从而可知两药在对护骨素/护骨素配体/核激活因子受体重要信号传导通路作用上具有相似的作用机制,两药都是通过调节破骨细胞分化调控因子护骨素、护骨素配体的表达来实现对骨质疏松症的治疗作用。

基金资助: 广东省科技计划项目(2006B35601005)。

作者贡献: 实验设计为周志昆,实验实施为黎晓敏、周艳芳、冯鑫、郑丽华,实验评估为周志昆、周艳芳,资料收集为卢昌均。黎晓敏、卢昌均成文,周志昆审校,黎晓敏对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他

人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Licata A. Bone density vs bone quality: what's a clinician to do. *Cleve Clin J Med.* 2009;76(6):331-336.
- [2] Zhou ZK, Zhu XQ, Xia LY, et al. *Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi.* 2001;7(9):49-50.
周志昆,朱学强,夏凌云,等. 补肾活血法治疗绝经后骨质疏松症30例[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001,7(9):49-50.
- [3] Xu ZM, Zhou ZK. *Zhongyiyao Daobao.* 2009;15(5):9-11.
徐志明,周志昆. 黄芪三仙汤治疗绝经后骨质疏松症36例临床研究[J]. *中医药导报*, 2009,15(5):9-11.
- [4] Zhou Y. *Shijiazhuang: Hebei Yike Daxue.* 2005:19-20.
周游. 补肾方药对成骨细胞增殖、分化和OPG、RANKL mRNA表达的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2005:19-20.
- [5] Liu L, Chang H, Huang GW, et al. *Tianjin Yike Daxue Xuebao.* 2004;10(1):39-40.
刘莉,常红,黄国伟,等. 体外培养大鼠成骨细胞实验模型的建立[J]. *天津医科大学学报*, 2004,10(1):39-40.
- [6] Cai XX, Luo E, Yuan Q. *Interaction between Schwann cells and osteoblasts in vitro. Int J Oral Sci.* 2010;2(2):74-81.
- [7] Liu YQ. *Wulumuqi: Xinjiang Yike Daxue.* 2007:7-8.
刘岳强. 氟对体外培养的成骨细胞中Ras基因表达的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2007:7-8.
- [8] Li YC, Li XH, Gao TL, et al. *Shanghai Kouqiang Yixue.* 2009;18(6):624-629.
李蕴聪,李晓红,高陶磊,等. 辛伐他汀对大鼠颅骨成骨细胞生物学特性的影响[J]. *上海口腔医学*, 2009,18(6):624-629.
- [9] Zhang YH. *Taiyuan: Shanxi Yike Daxue.* 2010: 6-7.
张艳红. rhIGF-1对成骨细胞增殖、BMP-2及Cbfa1基因表达的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2010: 6-7.
- [10] Tang WJ. *Shanghai: Fudan Daxue.* 2010:11-13.
唐雯菁. 成骨细胞FGF23的表达与局部调节研究[D]. 上海:复旦大学, 2010:11-13.
- [11] Liu YS. *Changsha: Zhongnan Daxue.* 2007:6-7.
刘幼硕. 脂联素调节成骨细胞OPG/RANKL的表达和TIMP-3诱导成骨细胞凋亡[D]. 长沙:中南大学, 2007:6-7.
- [12] Hofbauer LC, Heufelder AE. *Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2355-2363.
- [13] Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):49-60.
- [14] Clohisy D. *Cellular mechanisms of osteolysis. J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 1:S4-6.
- [15] Yu FL. *Beijing: Zhongguo Zhongyi Kexueyuan.* 2007.
于福祿. 滋补肾阴法和温补肾阳法对去卵巢所致骨质疏松大鼠OPG、RANKL表达的影响[D]. 北京:中国中医科学院, 2007.