

骨康胶囊组方药物对成骨细胞 SaOS-2 增殖分化及矿化的影响^{*}

杨 健^{1,2}, 李 靖^{1,2}, 彭 潇^{2,3}, 董 莉¹, 沈艳珍⁴, 李勇军³, 席晓岚^{1,2**}, 刘 亭^{1**}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州维康子帆药业股份有限公司, 贵州 修文 550200)

[摘要] 目的: 研究骨康胶囊组方药物续断、三七、芭蕉根对体外培养人成骨细胞 SaOS-2 增殖、分化和矿化的影响。方法: 以不含药培养基培养 SaOS-2 作为对照组, 给药组 SaOS-2 分别用 1、10、100、200、400、800 mg/L 续断、芭蕉根及三七水提物作用, MTT 法测定 SaOS-2 细胞增殖情况, 磷酸苯二钠比色法检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性, ELISA 法检测钙离子和骨钙素 (OTC) 的分泌以及用茜素红染色法测定成骨细胞矿化结节数。结果: 与对照组比较, 续断各浓度水提物可显著促进 SaOS-2 细胞的增殖、增强 ALP 活性且对细胞 Ca^{2+} 的分泌有促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 浓度为 100、200 mg/L 的续断水提物对 SaOS-2 细胞分泌 OTC 能力及对细胞的矿化有促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 三七水提物除了浓度为 200 mg/L 时有明显促进 OTC 分泌的作用 ($P < 0.05$) 外, 浓度为 10、100 mg/L 的三七水提物及各浓度的芭蕉根水提物对成骨细胞增殖、分化和矿化作用均不明显 ($P > 0.05$)。结论: 骨康胶囊治疗骨质疏松作用可能与其组方续断的促进成骨细胞的增殖、分化及矿化的作用有关。

[关键词] 骨康胶囊; 续断; 三七; 芭蕉根; 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化; 碱性磷酸酶; 骨钙素

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0158-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.007

Effects of the Components of Gukang Capsules on Proliferation, Differentiation and Mineralization of Osteoblasts SaOS-2

YANG Jian^{1,2}, LI Jing^{1,2}, PENG Xiao^{2,3}, DONG Li¹, SHEN Yanzhen⁴, LI Yongjun³, XI Xiaolan^{1,2}, LIU Ting¹

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and

TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

4. Guizhou Weikang Zifan Pharmaceutical Co., Ltd, Xiuwen 550200, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate in vitro effects of components (including *Dipsacus asper*, *Panax notoginseng*, *Musa basjoo* Sieb) of GuKang capsule on cell proliferation, differentiation and mineralization of human osteoblast SaOS-2 cells. **Methods:** SaOS-2 cells were cultured and treated with different concentrations of water extracts of *Dipsacus asper*, *Panax notoginseng*, *Musa basjoo* Sieb. Cell proliferation was determined using MTT assay. Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured by benzene disodium phosphate colorimetry, and secretions of Ca^{2+} , osteocalcin (OTC) were detected by ELISA assay. Osteoblast mineralization nodules were measured by alizarin red staining. **Results:** Compared with untreated group, water extract of *Dipsacus asper* at 10, 100 and 200 mg/L concentrations signifi-

^{*}[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合 J 重大字(2015)2002、黔科合 LH 字(2016)7373]; 贵州省教育厅项目[黔教合重大专项字(2015)040]; 贵州省创新人才团队项目[黔科合平台人才(2016)5613、黔科合平台人才(2016)5677]

^{**} 通信作者 E-mail: 970088464@qq.com; t-liu@163.com

网络出版时间: 2019-02-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.007.html>

cantly promoted the proliferation of osteoblasts, enhanced ALP activity and Ca^{2+} secretion *in vitro* ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Water extract of *Dipsacus asper* at 100 and 200 mg/L concentrations could promote the secretion of OTC and osteoblasts mineralization ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while its effects were not obvious at 10 mg/L concentration ($P > 0.05$). Water extract of *Panax notoginseng* at 200 mg/L concentration could significantly promote OTC secretion ($P < 0.05$). However, water extract of *Panax notoginseng* at 10 and 100 mg/L showed no significant effect on the proliferation, differentiation and mineralization of SaOS-2 cells ($P > 0.05$). Furthermore, water extract of *Musa basjoo* Sieb had no significant effect on proliferation, differentiation and mineralization of SaOS-2 cells. **Conclusions:** The anti-osteoporosis effect of Gukang Capsule may be associated with its roles of *Dipsacus asper* in promoting the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts SaOS-2.

[**Key words**] Gukang capsule; *Dipsacus asper*; *Panax notoginseng*; *Musa basjoo* Sieb; osteoblast; proliferation; differentiation; mineralization; alkaline phosphatase; osteocalcin

成骨细胞(osteoblasts, OB)是骨组织中的重要细胞,起源于具有多向分化潜能的骨髓间质细胞,主要作用是负责骨基质的合成、分泌,参与骨矿化。体外培养的成骨细胞是进行抗骨质疏松新药筛选和药效学评价的重要模型^[1-3]。骨康胶囊是由补骨脂、续断、三七、芭蕉根、酢浆草组方而成的中药复方制剂,治疗骨质疏松有较好疗效,且补骨脂是治疗骨质疏松症的常用药物,为历代医家广泛应用于各类补肾健骨方,有调节骨转化,促进成骨细胞增殖等活性^[4-5]。本实验室前期研究发现骨康胶囊中的补骨脂和酢浆草成分对体外培养的成骨细胞的增殖、分化和矿化有促进作用^[6-7],为进一步了解骨康胶囊的促骨形成作用机制,本实验以骨康胶囊处方中的其他三味药材续断、三七和芭蕉根为研究对象,以成骨细胞的增殖、分化和矿化为指标,观察组方中的单味药材对成骨细胞 SaOS-2 增殖、分化和矿化的影响,为骨康胶囊的组方优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 SaOS-2 人成骨肉瘤细胞株购自武汉普诺赛科技生物有限公司,McCoy's 5a 培养基购自上海生工生物工程股份有限公司,胎牛血清、胰蛋白酶、青-链霉素,购自美国 Gibco 公司,碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司,Triton X-100、噻唑蓝(MTT)购自 Solarbio 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、哺乳动物蛋白抽提试剂盒均购自中国康为世纪公司,茜素红购自 sigma 公司,人骨钙素(OTC)ELISA 试剂盒、人钙离子(Ca^{2+})ELISA 试剂盒均购自上海蓝基公司。

1.1.2 仪器 EL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo scientific 公司),TS-100F 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司),Allegra 64R 冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司),680 型酶标仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人成骨肉瘤细胞 SaOS-2 用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 McCoy's 5a 培养基,在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养,将细胞分为对照组及芭蕉根、续断、三七给药组,在 SaOS-2 细胞增殖实验中,给药组分别以 1、10、100、200、400 和 800 mg/L 芭蕉根、续断、三七作用于 SaOS-2 细胞,对照组加入不含药培养基。

1.2.2 药物配制 芭蕉根、续断、三七提取物由贵州维康子帆药业股份有限公司提供,用 DMSO 配制成含芭蕉根、续断、三七生药量为 1 g/mL 的溶液,于 -20 ℃ 保存备用,实验时用培养基稀释至相应的终浓度(DMSO 含量小于 5%)。

1.2.3 SaOS-2 细胞增殖检测 采用 MTT 法。取对数生长期各组 SaOS-2 细胞接种于 96 孔板,1 × 10⁴ 个/孔,每组 5 孔,培养 24 h 后换液;继续培养 48 h 后,加入 MTT 液 20 μL,继续培养 4 h;弃去培养液后加 DMSO 100 μL/孔,于 490 nm 波长检测各组吸光度值。

1.2.4 SaOS-2 细胞 ALP 活性测定 取对数生长期的 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板,10 × 10⁴ 个/孔。培养 24 h 后,各给药组更换为含生药浓度的终浓度分别为 10、100 及 200 mg/L 的培养基,对照组为不含药培养基,每个浓度 5 孔;继续培养 48 h 后,弃上清培养液,培养板用 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 200 μL 0.1% Triton X-100,于冰上裂解 10 min,取

上清液,用 ALP 试剂盒测定细胞 ALP 活性,并用 BCA 试剂盒测定细胞裂解液中的蛋白质含量。用碱性磷酸酶/蛋白总浓度表示 ALP 的活性。

1.2.5 SaOS-2 细胞 Ca^{2+} 和 OTC 检测 采用 ELISA 法。取对数生长期的 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板, 10×10^4 个/孔;培养 24 h 后,更换为各组含药培养基,药物浓度同 1.2.5,每组 5 孔;培养 48 h 后弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入哺乳动物蛋白抽提试剂 200 μL ,冰浴 10 min。取上清液按人钙离子 ELISA 试剂盒和人骨钙素 ELISA 试剂盒说明分别测定细胞 Ca^{2+} 和 OTC 含量。

1.2.6 SaOS-2 细胞矿化结节数测定 采用茜素红染色法。取对数生长期的 SaOS-2 细胞接种于 24 孔板, 30×10^4 个/孔,培养 24 h 后,更换为各组含药培养基,药物浓度同 1.2.5,每组 5 孔,隔天更换一次培养基,连续观察 2 周,待形成大量的矿化结节后,弃培养液,加 PBS 清洗 2 遍,95% 乙醇固定 10 min,蒸馏水洗涤 3 次后,加 pH 8.3 的 0.1% 茜素红-Tris-HcL 染色 30 min,蒸馏水洗涤、干燥,最后于显微镜下观察各孔矿化结节的数目。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18.0 软件进行处理,结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SaOS-2 细胞增殖

与对照组比较,芭蕉根水提物浓度在 1 ~ 800 mg/L 时 SaOS-2 细胞增殖活性无明显变化 ($P > 0.05$)。

续断水提物浓度在 10 ~ 200 mg/L 时能显著增高 SaOS-2 细胞增殖活性 ($P < 0.01$),浓度为 200 mg/L 时,增殖促进作用达最大,浓度至 800 mg/L 时, SaOS-2 细胞的增殖被明显抑制 ($P < 0.01$)。三七水提物浓度在 1 ~ 400 mg/L 时对 SaOS-2 细胞增殖活性无明显影响 ($P > 0.05$),浓度至 800 mg/L 时, SaOS-2 细胞的增殖被明显抑制 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 骨康胶囊组方中续断、芭蕉根及三七对 SaOS-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

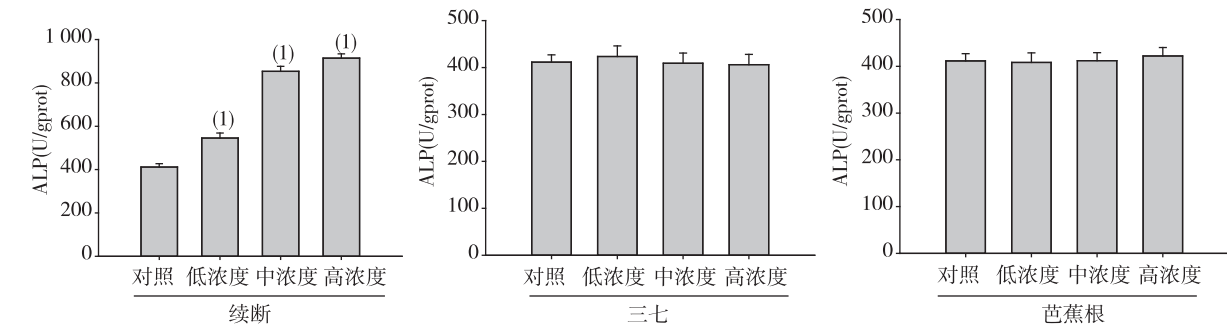
Tab.1 The Effects of *Dipsacus asper*, *Panax notoginseng* and *Musa basjoo* Sieb on Saos-2 proliferation

组别	细胞增殖 (%)		
	续断	芭蕉根	三七
对照组	100.00 \pm 0.53	100.00 \pm 0.53	100.00 \pm 0.53
1 mg/L 组	99.88 \pm 0.33	99.99 \pm 0.75	101.54 \pm 0.98
10 mg/L 组	106.00 \pm 0.64 ⁽¹⁾	100.01 \pm 0.15	98.35 \pm 0.74
100 mg/L 组	115.431 \pm 0.67 ⁽¹⁾	100.01 \pm 0.51	99.88 \pm 0.57
200 mg/L 组	118.39 \pm 0.56 ⁽¹⁾	98.89 \pm 0.46	101.78 \pm 0.74
400 mg/L 组	105.39 \pm 0.56 ⁽¹⁾	100.09 \pm 0.67	99.03 \pm 0.66
800 mg/L 组	94.11 \pm 0.65 ⁽¹⁾	97.01 \pm 0.53	91.78 \pm 0.74 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 SaOS-2 细胞 ALP 活性

由 MTT 检测结果可知,续断及三七水提物组 SaOS-2 细胞的增殖随着药物浓度的增大而受到明显抑制,故以 10、100 和 200 mg/L 为各实验组的低、中、高浓度,检测 SaOS-2 细胞 ALP 活性,结果显示,与对照组比较,续断水提物组的低、中、高浓度能提高 ALP 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),芭蕉根、三七水提物的低、中、高浓度对 SaOS-2 细胞 ALP 水平无明显影响 ($P > 0.05$)。见图 1。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.01$

图 1 骨康胶囊组方中不同浓度续断、芭蕉根及三七对 SaOS-2 细胞 ALP 活性的影响
Fig.1 The Effects of *Dipsacus asper*, *Panax notoginseng* and *Musa basjoo* Sieb on ALP activity of Saos-2 proliferation

2.3 SaOS-2 细胞 Ca^{2+} 和 OTC

Ca^{2+} 检测结果表明,与对照组比较,各浓度的续断水提物对 SaOS-2 细胞 Ca^{2+} 的分泌有非常明显的促进作用($P < 0.01$),芭蕉根、三七水提物的低、中、高浓度对 SaOS-2 细胞钙离子分泌均无明显影响($P > 0.05$),见表 2。OTC 检测结果表明,与对照组比较,续断水提物低浓度组对 SaOS-2 细胞 OTC 分泌无明显影响,中、高浓度组可增加 SaOS-2 细胞 OTC 分泌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);三七水提物低、中浓度组对 OTC 分泌无明显影响,高浓度有明显促进 OTC 分泌的作用($P < 0.05$);芭蕉根水提物各浓度对 OTC 分泌无明显变化,见表 3。

表 2 骨康胶囊组方中不同浓度续断、芭蕉根及三七对 SaOS-2 细胞 Ca^{2+} 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	Ca^{2+} ($\mu\text{g/L}$)		
	续断	芭蕉根	三七
对照组	25.25 \pm 1.47	25.25 \pm 1.47	25.25 \pm 1.47
10 mg/L 组	80.59 \pm 6.97 ⁽¹⁾	23.81 \pm 2.75	25.49 \pm 2.73
100 mg/L 组	178.66 \pm 6.43 ⁽¹⁾	24.15 \pm 1.67	26.11 \pm 2.41
200 mg/L 组	140.72 \pm 5.81 ⁽¹⁾	26.04 \pm 1.98	28.26 \pm 3.10

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.01$

表 3 骨康胶囊组方中不同浓度续断、芭蕉根及三七对 SaOS-2 细胞 OTC 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	OTC ($\mu\text{g/L}$)		
	续断	芭蕉根	三七
对照组	11.41 \pm 0.63	11.41 \pm 0.63	11.41 \pm 0.63
10 mg/L 组	13.58 \pm 0.75	10.98 \pm 0.63	11.50 \pm 0.49
100 mg/L 组	14.58 \pm 0.69 ⁽¹⁾	11.78 \pm 0.57	12.36 \pm 0.61
200 mg/L 组	15.32 \pm 0.76 ⁽²⁾	12.78 \pm 0.48	14.29 \pm 0.44 ⁽¹⁾

与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

2.4 SaOS-2 细胞矿化结节数

培养 2 周后,各给药组细胞矿化结节染色结果呈阳性。与对照组比较,续断水提物中、高浓度组的矿化结节数目明显高于对照组($P < 0.05$),而续断水提物低浓度组和三七、芭蕉根水提物的各浓度组对矿化结节数目形成无明显影响($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 骨康胶囊组方中不同浓度续断、芭蕉根及三七对 SaOS-2 细胞矿化结节形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	矿化结节数(n)		
	续断	芭蕉根	三七
对照组	4.20 \pm 0.60	4.20 \pm 0.60	4.20 \pm 0.60
10 mg/L	6.08 \pm 0.49	3.80 \pm 0.36	5.50 \pm 0.66
100 mg/L	8.92 \pm 0.58 ⁽¹⁾	4.80 \pm 0.55	4.36 \pm 0.45
200 mg/L	10.10 \pm 0.37 ⁽¹⁾	3.91 \pm 0.46	6.00 \pm 0.74

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

中药复方是传统中医朴素的系统思想的产物,通过不同药物之间的配伍产生不同的疗效,且各药物的剂量不同,也有可能会表现出不同的药效。因此,在组方优化过程中,探明复方药物中某一药效起作用的主要药物显得尤为重要。

MTT 法表明,在浓度小于 800 mg/L 时,续断水提物对成骨细胞增殖有很明显的促进作用,而芭蕉根与三七水提物作用不明显;而较高浓度(800 mg/L)时,各给药组 SaOS-2 细胞的增殖被明显抑制,说明各给药组高浓度对于成骨细胞可能具有一定的毒性。这可能是因为高浓度的药材水提物中,对细胞产生毒性的有关成分含量也有所增加。

ALP 是主要分布于细胞膜的钙结合转运蛋白,与细胞成熟及骨的钙化作用密切相关,被认为是细胞外基质成熟的早期标志;OTC 是由成骨细胞合成和分泌的一种活性多肽,是骨质钙化必需的因子,起到维持骨组织正常矿化的作用^[8-9]。因此,ALP 和 OTC 分别是成骨细胞早期和中期分化的标志物^[10]。与对照组比较,续断水提物各浓度均能显著增加 ALP 的活性,且能有效的促进 OTC 的分泌,与程志安等^[11]的研究结果一致;三七水提物除了高浓度对成骨细胞 OTC 的分泌有明显的促进作用外,其余浓度对 ALP 活性及 OTC 的分泌作用与对照组相比差异均无统计学意义,而吴丽萍等^[12]的研究表明三七总甙可促进成骨细胞的增殖和分化,这可能是由于三七水提物中的三七总甙含量不高所致。类似的,在细胞 Ca^{2+} 分泌的检测中,续断水提物各浓度对 Ca^{2+} 分泌有明显的促进作用,而三七、芭蕉根水提物与对照组相比无明显差异。矿

化结节的形成是成骨细胞分化的最后阶段,包括胶原的沉积和基质的矿化两个步骤。被认为是成骨细胞分化成熟的晚期标志^[13]。培养 2 周后,各给药组矿化结节染色结果呈阳性;与对照组比较,除芭蕉根水提物外,各组均有增加成骨细胞矿化结节的趋势。

综上所述,骨康胶囊组方中的续断可以显著促进体外培养的成骨细胞 SaOS-2 的增殖、分化和矿化。结合之前的研究,提示续断、补骨脂和酢浆草可能为骨康胶囊促成骨细胞骨形成的主要作用药物,而三七及芭蕉根在骨康胶囊抗骨质疏松中的作用有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 郭丽艳, 王金兰, 谭音玲, 等. 沙格列汀对高糖环境下成骨细胞增殖、分化和凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(28):16-19.
- [2] 翟远坤, 牛银波, 潘亚磊, 等. 柚皮苷对体外培养乳鼠颅骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1):105-111.
- [3] 易显富, 张泽月, 程蕊, 等. $1\alpha,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对体外培养的成骨细胞分化及矿化成熟影响[J]. 浙江临床医学, 2014, 16(2):169-172.
- [4] 李娜, 颜冬梅, 张金莲, 等. 炮制方法对补骨脂中抗骨质疏松效应成分含量的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(1):127-132.
- [5] 安亚兰, 王建舫, 许水明, 等. 补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2):266-271.
- [6] 刘晓艳, 董莉, 刘亭, 等. 酢浆草提取物对成骨细胞增殖及分化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1):117-120.
- [7] 杨健, 陆定艳, 彭潇, 等. 不同来源、不同炮制方法的补骨脂对成骨细胞 SaOS-2 骨形成功能的影响[J]. 海南医学, 2018, 29(15):2140-2143.
- [8] HOWLETT C R, CAVE J, WILLIAMSON M, et al. Mineralization in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. [J]. Clin Orthop Relat Res, 1986, 213(213):251-263.
- [9] 户小伟, 李巍, 韦达隆, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(48):8-11.
- [10] 唐琪, 陈莉丽, 严杰. 骨碎补提取物促小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和钙化作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2):164-168.
- [11] 程志安, 吴燕峰, 黄智清, 等. 续断对成骨细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期的影响[J]. 中医正骨, 2004, 16(12):1-3.
- [12] 吴丽萍, 陶天遵, 石义刚, 等. 三七总甙对成骨细胞增殖、分化及 OPG 表达影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2):239-241.
- [13] MCCORMICK R K. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. [J]. Alternative Medicine Review, 2007, 12(2):113-145.

(2018-11-12 收稿, 2019-01-27 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳