

六味地黄丸含药血清对 OS-732 细胞增殖分化的影响

★ 夏雄智¹ 樊粤光² 刘武³ (1. 广东省第二中医院 广州 510095; 2. 广州中医药大学一附院 广州 510095; 3. 广西中医学院一附院 南宁 530022)

摘要:目的:观察补肾中药对成骨样细胞增殖分化的影响。方法:制备低、中、高剂量的六味地黄丸含药血清。10%低、中、高剂量的六味地黄丸含药血清培养 OS-732 细胞,显微镜下观察细胞生长情况;进行细胞计数和绘制生长曲线;用 MTT 法检测细胞增殖;进行细胞碱性磷酸酶(ALP)活性测定。结果:含药血清组细胞生长良好,中剂量组与对照组相比 $P < 0.05$,统计学有明显差异;在细胞增殖和细胞碱性磷酸酶(ALP)活性测定方面,中剂量组与对照组相比 $P < 0.05$,统计学有明显差异。结论:合适剂量的补肾中药对成骨样细胞的增殖和分化有明显的促进作用。

关键词:六味地黄丸;OS-732 细胞;增殖分化

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Effect of Pastille Serum of Rehmanniae Pill of Six Ingredients on OS-732 Cell Proliferation and Differentiation.

Abstract: Objective: To investigate the effect of kidney-tonifying herbs on bone osteoblast-like cells proliferation and differentiation. Methods: Preparing pastille serum of Rehmanniae pill of Six Ingredients with low, medium and high doses and using 10% pastille serum with different doses to cultivate OS-732 cells. Observe the cell growth using microscope; count cells and draw growth curve; Detect cell proliferation with MTT method; Determin the activity of cell alkaline phosphatase (ALP). Results: Cell growth of the pastille serum group is satisfactory, medium dose group has significant discrepancy compared with control group ($P < 0.05$); About cell proliferation and cell ALP activity determination, the medium dose group has significant discrepancy compared with control group ($P < 0.05$). Conclusion: Suitable dose of kidney-tonifying herbs can promote osteoblast proliferation and differentiation

Key word: Rehmanniae pill of Six Ingredients; OS-732 cell; proliferation and differentiation

激素性股骨头缺血性坏死(The necrosis of femoral head induced by steroid SANFH)是随着现代医学发展和临床广泛应用糖皮质激素甚至滥用而出现的后果。现代中医学者根据大量临床和实验研究认为,糖皮质激素为助阳、生热之品,在应用激素的过程中,不论外象如何,其内在实质早期属于“阴虚内热”。本实验根据中医“肾主骨”的理论,运用补肾的代表方六味地黄丸含药血清对成骨样细胞的影响,阐明补肾法治疗 SANFH 的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和动物 成骨细胞株 OS-732 由积水潭医院创伤研究所提供;新西兰大白兔由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.1.2 耗材 96 孔细胞培养板:Costar 产品;细胞培养瓶:NUNCLON 产品。

1.1.3 试剂 六味地黄丸:北京同仁堂制药,批号 5010894;RPMI1640 细胞培养基:Gibco 公司,批号 040140;胎牛血清:杭州四季青生物公司产品,批号 040320;WST-8 试剂:日本

同仁化学研究所,批号 PX696;二烷基硫酸钠(SDS):上海生上公司产品,批号 031203, U0403043;链霉素和青霉素:华北制药有限公司,批号 041102, U0405045;二甲基亚砷(DMSO):Sigma 公司产品,批号 094K0574201。

1.1.4 主要仪器 MC0175 CO₂ 培养箱,日本 SANYO 公司; -40℃ 低温冰箱:SANYO, 0IRECT YREEZER, -40℃; -80℃ 低温冰箱:Termo, Forma, -80℃; Q-Pilus 纯水器:型号为 ZFMQ050PE, 美国 Millipore 公司;倒置显微镜:OLYMPUS;实验医用型洁净工作台:DL-CJ-IF, 北京东联哈尔仪器制造有限公司;台式离心机:北京医用离心机;多功能酶标仪:瑞典 TECAN Spectra FLUOR plus;台式冷冻离心机:美国 Beckmen GS-15R;细胞计数板:上海求精生化试剂仪器有限公司;液氮罐:河南新乡市豫新航空低温容器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及六味地黄丸含药血清的制备 新西兰兔 20 只,雌雄各半,体重为 (2.0 ± 0.5) kg,随机分成四组:空白对照组、六味地黄丸低剂量组、六味地黄丸中剂量组、六味地黄丸高剂量组,每组 5 只。按成人每日 2 次,每次 9 g 计算,

低、中、高剂量按1:3:7的比例换算成等效剂量,对照组给予同等容积的生理盐水,每日灌胃1次,连续3d给药,最后一次给药后1h,加强一次。颈总动脉采血,4℃冰箱隔夜存放,3000 r/min离心10 min,56℃水温灭活,过滤后分装,置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 OS-732 细胞复苏、传代培养、冻存 将完全培养液预热至37℃,备用。从液氮罐中取出细胞,置于40℃左右的温水中,使冻存液快速溶解。以75%酒精擦拭冻存管外部,移入无菌操作台内,转移冻存管内液体至事先准备好的离心管中,1000 r/min离心10 min,弃上清,加入新鲜完全培养液,充分吹打成单细胞悬液,接种在75 cm²培养瓶中,置于37℃,5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养。24 h后10%小牛血清 RPMI1640 培养液换液,每天换液一次,6 d后细胞生长至80%~90%融合时,离心收集细胞,以1:2比例传代一次,并记为P₁,再重复以上操作,并标记为P₂、P₃…以此类推。每次传代时冻存一瓶,用于后续实验。

1.2.3 OS-732 细胞培养、计数和生长曲线的绘制 细胞24 h贴壁后弃去10%小牛血清 RPMI1640 培养液,0.25%胰酶消化后,离心收集细胞。将细胞接种于96孔培养板,细胞浓度为1.2×10⁴个细胞,每组为42孔,每孔加入培养液100 μl。分别加入10%低、中、高剂量含药血清的 RPMI1640 培养液,对照组为10%小牛血清 RPMI1640 培养液。37℃,5%CO₂饱和湿度培养箱中培养,每天同一时间消化每组6孔,连续7天,倒置显微镜观察并计数,每一小组计算出平均数。绘制细胞生长曲线。

1.2.4 OS-732 细胞增殖试验(MTT法测定) 上述方法培养24 h后,加入MTT溶液20 μl(浓度5 mg/ml)。继续培养4 h,然后弃上清液,每孔加入100 μl DMSO,让其充分溶解

后,在酶标仪上492 nm处测定吸光值,以空白孔调零,测定各孔OD值,每天测一次。连续5 d。

1.2.5 OS-732 细胞碱性磷酸酶(ALP)活性测定 参照文献[1]方法,细胞接种密度为1.2×10⁴/ml,加入96孔板,A1-A12行为空白调零,每孔100 μl,加药方法同前,细胞加药培养后从3~5 d,每天测一次。培养结束时去除培养液,用PBS冲洗3遍,加0.1% TritonX-100 200 μl裂解12 h,吹打1 min,取50 μl细胞裂解液转移至另一96孔板,用PBS液作空白调零。各孔均加碱性磷酸酶检测试剂盒中新鲜配制底物100 ml,37℃孵育30 min,加1 mmol/L的NaOH终止反应。酶标仪检测,波长为405 nm。

1.2.6 统计分析 实验结果以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS11.5软件进行分析,两组比较用成组 t 检验,多组之间组间比较用方差分析,两两比较应用 q 检验。

2 结果

2.1 OS-732 细胞形态观察

倒置显微镜下观察,接种后24 h细胞开始贴壁,细胞形态为椭圆形、梭形和多角形,呈上皮样排列,胞浆及胞核呈明显的异形性,多核,核浆分界清晰。含药血清组细胞生长良好,分布均匀,细胞形态大,形态规则,对照组细胞生长较缓慢,密度稀疏,有部分悬浮细胞。其中,中剂量组生长最好,在前2天则出现核分裂相,第3天后出现快速对数生长期,5天后细胞密集,部分形成集落,80%的多层融合,均一性较好,并有一定方向性,呈旋涡状。

2.2 细胞计数和生长曲线 细胞计数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,与对照组相比,中剂量组 $P < 0.05$,统计学有明显差异;低剂量与高剂量组 $P > 0.05$,无统计学差异。结果见表1。

表1 不同剂量六味地黄丸含药血清对OS-732细胞生长的影响

组别	n	对OS-732细胞计数($\times 10^4$)						
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照组	6	1.21±0.31	1.31±0.23	3.34±0.67	8.12±1.35	16.58±1.36	15.31±1.80	13.25±1.58
低剂量组	6	1.18±0.43	1.32±0.34	2.38±0.46	8.23±1.42	16.60±1.48	16.42±1.45	11.33±1.67
中剂量组	6	1.36±0.20	1.96±0.21*	5.32±0.87 [△]	11.23±1.52 [▲]	21.35±1.39 [☆]	18.63±1.48 [★]	12.56±1.60 [▼]
高剂量组	6	1.15±0.63	1.28±0.37	3.65±0.50	8.36±1.26	16.47±2.12	14.31±2.83	13.15±1.61

注:与对照组相比,* $P=0.031$, $\triangle P=0.002$, $\triangle P=0.001$, $\star P=0.000$, $\star P=0.001$ 。

2.3 六味地黄丸含药血清对OS-732细胞增殖的影响 3组均对细胞增殖有促进作用,中剂量组3 d后有显著性差异($P < 0.05$),而低剂量和高剂量组无统计学意义。结果见表2。

表2 不同剂量含药血清对OS-732细胞增殖的影响

组别	n	OD值				
		1d	2d	3d	4d	5d
对照组	6	0.89±0.05	0.97±0.02	1.23±0.15	1.36±0.21	1.58±0.08
低剂量组	6	0.89±0.07	1.04±0.18	1.34±0.31	1.65±0.18	1.68±0.21
中剂量组	6	0.89±0.06	1.10±0.04	1.69±0.12*	1.92±0.18	1.96±0.06 [▼]
高剂量组	6	0.89±0.08	1.00±0.12	1.32±0.18	1.56±0.02	1.71±0.17

注:与对照组相比,* $P=0.048$, $\star P=0.026$ 。

2.4 六味地黄丸含药血清对OS-732细胞ALP活性的影响 中剂量组OS-732细胞ALP活性明显提高($P < 0.05$),低剂量组和高剂量组与对照组相比统计学无明显差异,结果见表3。

表3 不同剂量含药血清

对OS-732细胞ALP活性的影响 $u \cdot ml^{-1}$

组别	n	3d	4d	5d
对照组	6	0.96±0.07	1.02±0.08	1.13±0.08
低剂量组	6	1.21±0.09	1.26±0.097	1.33±0.09
中剂量组	6	1.30±0.08*	1.36±0.07 [▲]	1.46±0.05 [▼]
高剂量组	6	1.26±0.06	1.27±0.12	1.30±0.10

注:与对照组相比,* $P=0.49$, $\triangle P=0.049$, $\star P=0.042$ 。

3 讨论

中医学典籍中虽无股骨头坏死这一病名的直接记载,但根据其症状、体征与发病机理,一般认为归属于“骨蚀”、“骨痿”、“骨痹”等范畴。我们认为,本病归属于“骨蚀”比较恰当,而“骨痹”是本病的早期主要表现,“骨痿”则是晚期主要表现。一般认为本病由于先天禀赋不足,外邪内蕴所致。正如中医学所说“邪之所凑,其气必虚”。现代中医学者根据大

40 日龄昆明小鼠主要生物学特性标准化研究

★ 朱大诚 罗小泉 王艳辉 (江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:为建立昆明小鼠生物学特性标准化资料提供实验依据。方法:在昆明小鼠封闭群中随机抽取 40 日龄昆明小鼠 102 只,测定其生长发育指标,采用生化分析仪测定血常规数据、血液生化值,制作血膜片进行白细胞计数和分类。结果:40 日龄昆明小鼠平均体重为 (22.080 ± 3.032) g,平均体全长为 (182.35 ± 7.043) mm、头长 (25.59 ± 2.600) mm、尾长 (91.29 ± 4.404) mm,WBC 计数 $(7.953 \pm 3.335) \times 10^9/L$,WBC 分类 NE $28.32\% \pm 12.13\%$ 、LY $68.31\% \pm 12.75\%$ 、MO $3.37\% \pm 3.01\%$,血常规、生化值结果稳定可靠。结论:确定了江中 40 日龄昆明小鼠主要生物学特性,为中国昆明小鼠生物学特性标准化提供可靠数据。

关键词:昆明小鼠;生物学特性;标准化

中图分类号:R-332 **文献标识码:**A

Standardization of Biological Properties of KM Mice aged 40 days

ZHU Da-cheng, LUO Xiao-quan, WANG Yan-hui

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To afford experimental basis to establishing the datum of the standardization of biological properties of KM Mice. Methods: 102 litters of 40days aged KM mice were randomly selected to detect the indexes of growth. The datum of blood routine examination and blood biochemical indexes were detected by biochemical analyzer. Leucocyte was taken count of and sorted by making blood patch. Results: the average weights of KM mice aged 40 days was (22.080 ± 3.032) g, the average body length was (182.35 ± 7.043) mm, the head length was (25.59 ± 2.600) mm, the tail length was (91.29 ± 4.404) mm and the WBC counting average was $7.953 \pm 3.335 \times 10^9/L$. The category average NE was $28.32\% \pm 12.13\%$, the LY was $68.31\% \pm 12.75\%$, the MO was $3.37\% \pm 3.01\%$, and the blood routine and biochemical value results were stable and reliable. Conclusion: the biological properties of KM mice were studied. It provided a reliable evidence for the standardization of KM mice in China.

Key words: KM mice; Biological properties; Standardization

昆明小鼠于 1944 年 3 月 17 日由印度 Hoffkine 研究所引入的瑞士种小鼠^[1],首先定居我国云南昆明,随后分布至全量临床和实验研究认为,激素为助阳、生热之品,在应用激素的过程中,不论外象如何,其内在实质早期属于“阴虚内热”。刘华^[1]在临床中采用根据药效推测西药中药属性的方法,一认为强的松中药属性应为甘、辛、苦、温热,有温补阳气、散寒活血之功效,故久用有生热耗津、亢阳伤阴之弊。不少学者认为长期或大量使用激素可造成机体的三潜证即瘀血症、肾虚证及正气耗伤。长期或大量使用 GC,血液受热煎熬而粘滞,运行不畅,或灼伤脉络血溢脉外留于投骨头局部而成癰痹,或热舍于肾,内伐肾精,均可致骨缺血性坏死。尽管 SANFH 的临床表现各异,但肾虚是本病的根本。中医理论认为“肾藏精,主骨生髓”,本研究通过补肾中药对 SANFH

的治疗作用,进一步证实了这一理论的科学性。我们认为, SANFH 是由于药物克伐伤及肝肾,肝肾不足则风寒湿之邪乘虚而入。虚邪深入筋骨,寒凝于里,筋脉受阻,肾气不足,气血运行不畅,造成气血瘀滞,闭阻经脉,股骨头失去正常的温煦与濡养故而导致本病。

本研究结果显示:补肾中药能促进成骨样细胞增殖分化。推测补肾中药修复 SANFH 是通过促进成骨细胞增殖分化作用实现的。

参考文献

[1]刘华.强的松治疗混合性结缔组织病的中药属性探讨[J].现代中西医结合杂志,2000,9(16):1 528.

(收稿日期:2007-09-14)