

苍术类药材提取物体外对成骨细胞增殖及酶活性的影响

张怡文¹,汪六英^{2*},张颖²,张瑱³,周琳琳²

(1. 中国人民解放军 306 医院药学部,北京 100101; 2. 扬子江药业集团南京海陵
药业有限公司,南京 210049; 3. 上海医药工业研究院,上海 200437)

【摘要】 目的:观察不同产区苍术的不同提取部位体外对成骨细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响。方法:分别以苍术生药量 1×10^{-4} 、 1×10^{-6} g·mL⁻¹ 2 个质量浓度进行新生大鼠成骨细胞、MG-63 成骨细胞株增殖和碱性磷酸酶活性测定。结果:茅苍术对大鼠成骨细胞、MG-63 成骨细胞株增殖的效果比北苍术好;在挥发油、水煎液、醇提液 3 个不同提取部位比较中,发现水煎液的效果较好,且道地产区茅苍术的效果最佳,对成骨细胞、MG-63 细胞株增殖率分别是 11.27%,13.57%;大鼠成骨细胞的 ALP 活性测定,以茅苍术的水煎液和挥发油的碱性磷酸酶活性最高,均为 5.22 U·L⁻¹。结论:苍术类药材对骨质疏松症的治疗有一定的疗效,且茅山地区产茅苍术水煎液对 MG-63 细胞株、成骨细胞增殖效果最佳。

【关键词】 茅苍术;骨质疏松症;体外;成骨细胞;碱性磷酸酶

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 B 【文章编号】 1005-9903(2011)22-0226-04

苍术为菊科植物茅苍术或北苍术的干燥根茎。始载于《神农本草经》,性辛苦、温,归脾、胃、肝经。具有燥湿健脾、祛风散寒、明目作用。主治脘腹胀满、泄泻、水肿、风湿痹痛、风寒感冒、足萎、夜盲以及筋骨萎软等^[1-2]。现代中医学研究表明苍术具有健脾、抗溃疡、保肝、促进胃肠道代谢,以及许多有关苍术在临床用于治疗胃肠道疾病、肾病、糖尿病方面的报道。但有关苍术的骨质疏松体外药效学评价,目前国内外还没有报道;体内药效学的评价仅山东中医药大学的学者^[3]有所研究,但不够全面。骨质疏松症(osteoporosis,OP)的发生主要与骨重建过程中成骨细胞(osteoblast,OB)骨形成功能衰退和破骨细胞(osteoclast,OC)骨吸收功能增强有关。应用骨细胞体外培养实验技术,可对成骨细胞的骨形成功能和破骨细胞的骨吸收功能进行体外观察。本实验在进行苍术不同提取部位骨质疏松体外药效研究时选用了成骨细胞、MG-63 细胞为筛选的对象^[4-6],测定了苍术对成骨细胞和 MG-63 细胞增殖和碱性磷酸酶活性^[7-8]。

1 材料

1.1 动物和细胞株 新生(<24 h)SD 大鼠,清洁级,上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号

SCXK(沪)2007-0005;成骨 MG-63 细胞株,购于中国科学院上海细胞所。

1.2 仪器 Heraeus 5060 型 CO₂ 培养箱(Germany), Nikon TS100 型倒置相差显微镜(Japan), ELX2800 型酶标测试仪(USA), 恒温离心机(Heraeus Germany), Nikon 光学显微镜(Japan), 形态计量分析软件(IPP USA)。

1.3 试剂 MEM 培养基(Gibico 公司),小牛血清(杭州四季青生物公司),去类固醇小牛血清(上海生物制品所用 Gibico 的 NCS 处理制备),Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司),胰蛋白酶(进口分装);二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(Fluka 进口分装),碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒和 ALP 活性测定试剂盒(南京建成生物公司),对硝基苯磷酸二钠盐(PNPP MERCK Germany); SDS(SERVA 进口分装),二乙醇胺(DEA,上海化学试剂厂),茜素红(天津市化学试剂研究所),苯甲酸雌二醇,武汉大华伟业医药化工有限公司,批号 070910。

1.4 药物及供试品溶液制备 不同产区苍术由南京中医药大学段金廛教授鉴定,茅山地区苍术和湖北英山地区苍术为茅苍术 *Atractylodes lancea* DC., 呼伦贝尔盟地区苍术为北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz。茅山地区苍术和湖北英山地区苍术为自行采挖,呼伦贝尔盟地区苍术为亳州药材市场购买。

供试品溶液的处理如表 1。

【收稿日期】 20110328(004)
【第一作者】 张怡文,主管药师, Tel:010-66356729
【通讯作者】 *汪六英,工程师,从事新药研发工作, Tel:
02583505999, E-mail: wanglly1234@tom.com

表 1 不同产地 2 种苍术供试品溶液的处理

序号	编号	药材产地	提取方法	提供量/mL	相当于生药量/g·mL ⁻¹
1	A1	茅山地区	SFE-CO ₂ 萃取	1.5	16.28
2	B1	呼伦贝尔蒙		1	16.29
3	C1	湖北英山		8.4	13.70
4	A2	茅山地区	水蒸气蒸馏	—	—
5	B2	呼伦贝尔蒙		2	32.54
6	C2	湖北英山		1.8	29.41
7	A3	茅山地区	60% 醇提取	10	0.5
8	B3	呼伦贝尔蒙		10	0.937 5
9	C3	湖北英山		10	1.25
10	A4	茅山地区	水煎	10	0.5
11	B4	呼伦贝尔蒙		10	1.0
12	C4	湖北英山		10	0.909

挥发油先用适量的 DMSO 溶解,然后用 MEM 培养基稀释至生药 1×10^{-4} , 1×10^{-6} g·mL⁻¹, 阳性药苯甲酸雌二醇稀释至 1×10^{-4} , 1×10^{-6} μg·mL⁻¹, 醇提液、水提液直接用 MEM 培养基稀释至生药 1×10^{-4} , 1×10^{-6} g·mL⁻¹。

2 方法

2.1 成骨细胞的培养 新生 (< 24 h) SD 大鼠, 70% 乙醇浸泡消毒 10 min, 无菌机械取下头盖骨, 置 PBS 液内清除结缔组织后, 剪成 1 mm² 大小, 0.25% 胰蛋白酶 37 ℃ 下预消化 20 min, 弃预消化液, 再将骨片置 0.1% II 型胶原酶振荡消化 1 h × 2 次, 合并 2 次消化液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 细胞沉淀用 10% 小牛血清 MEM 重悬, 吹打, 然后置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养。24 h 后换液 1 次清除未贴壁细胞以后, 2 d 换液 1 次。待细胞长至半汇合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取第 2 继代细胞供实验用^[7]。

2.2 新生大鼠成骨细胞的鉴定 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色第 2 继代细胞接种于铺有玻片的 24 孔板内, 待细胞生长至汇合时取出玻片, PBS 洗, 2.5% 戊二醛固定 10 min, 用 ALP 染色试剂盒按操作步骤染色, 培养成骨细胞经 ALP 组化染色, 胞浆显示蓝色 ALP 阳性颗粒光镜下观察并摄影。见图 1。

2.3 MG-63 细胞株 MG-63 细胞株为具有人成骨细胞表型特征的成骨细胞模型。购于中国科学院上海细胞所, 自行传代培养, 于 -70 ℃ 冻存。

2.4 增殖率实验 大鼠成骨细胞和 MG-63 细胞以

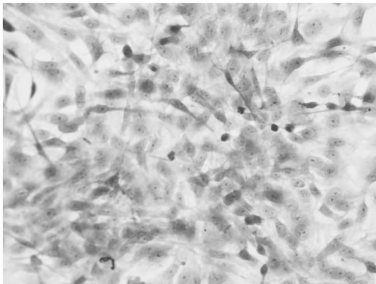


图 1 成骨细胞 ALP 染色 (×400)

1×10^5 /孔密度接种于 96 孔培养板中, 每板加细胞液 100 μL, 加完后在培养箱中放置 2 h, 然后在每板加药液 100 μL, 置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养; 44 h 后取出 96 孔培养板, 吸取细胞上清液 100 μL, 加入 20 μL 5 g·L⁻¹ 的 MTT 显色剂, 置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养 4 h。第 48 h 后取出 96 孔培养板, 吸弃上清液, 用 DMSO 100 μL 溶解, 振摇, 用酶标仪 490 nm 测定吸光度 (A)。

2.5 ALP 活性测定 成骨细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 24 孔培养板中, 每板加细胞液 500 μL, 加完后在培养箱中放置 2 h, 然后在每板加入高浓度药液 200 μL, 置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养 72 h。72 h 后取出 24 孔板, 用对硝基苯磷酸盐法在酶标仪上 420 nm 处测 A, 比较药物对成骨细胞 ALP 活性的影响。

2.6 数据统计方法 数据用 SPSS 10.0 软件处理, 采用 t 检验。P < 0.05 有统计学意义, P < 0.01 具有显著性差异。

3 结果

3.1 增殖率实验 从表 2 ~ 3 中可以得知,在药物对细胞作用 48 h 后,除呼伦贝尔盟产北苍术的醇提物和水提物外,药物在高浓度时,茅山地区产茅苍术的挥发油、醇提物、水煎液,英山地区产茅苍术的挥发油、醇提物、水煎液,呼伦贝尔蒙产北苍术的挥发油对成骨 MG-63 细胞株、大鼠成骨细胞增殖促进均有统计学意义,茅山地区产茅苍术水煎液,英山地区产茅苍术的水煎液、挥发油对 MG-63 细胞株、成骨细胞增殖有显著促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 不同产区苍术的不同提取部位对 MG-63 细胞的增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	高浓度组/ $1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$		低浓度组/ $1 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	A	增殖率/%	A	增殖率/%
空白溶剂	1.40 ± 0.04	—	—	—
雌二醇对照 ³⁾	1.48 ± 0.03 ¹⁾	4.95	1.49 ± 0.09	6.27
A1	1.54 ± 0.08 ¹⁾	10.41	1.43 ± 0.10	2.20
B1	1.49 ± 0.07	6.55	1.48 ± 0.08	5.91
C1	1.51 ± 0.04 ²⁾	8.37	1.477 ± 0.07	5.65
B2	1.49 ± 0.06	6.53	1.46 ± 0.06	4.26
C2	1.51 ± 0.05 ²⁾	6.58	1.53 ± 0.05 ²⁾	1.99
A3	1.52 ± 0.07 ¹⁾	9.00	1.48 ± 0.05	4.97
B3	1.45 ± 0.05	3.93	1.37 ± 0.05	-2.01
C3	1.5 ± 0.05 ¹⁾	7.34	1.43 ± 0.05	9.79
A4	1.59 ± 0.06 ²⁾	13.57	1.52 ± 0.11	8.85
B4	1.50 ± 0.07	7.41	1.49 ± 0.12	6.94
C4	1.53 ± 0.02 ²⁾	9.38	1.49 ± 0.10	6.41

注:与空白溶剂组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 雌二醇对照高浓度组质量浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,低浓度为 $1 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 3 ~ 4 同)。

表 3 不同产区茅苍术的不同提取部位对大鼠成骨细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	高浓度组/ $1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$		低浓度组/ $1 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	A	增殖率/%	A	增殖率/%
空白溶剂	1.41 ± 0.04	—	—	—
雌二醇对照 ³⁾	1.51 ± 0.09 ¹⁾	7.09	1.50 ± 0.08 ¹⁾	6.59
A1	1.53 ± 0.07 ¹⁾	8.32	1.48 ± 0.10	1.70
B1	1.50 ± 0.07 ¹⁾	6.03	1.49 ± 0.08	5.94
C1	1.52 ± 0.04 ¹⁾	7.78	1.49 ± 0.09	5.43
B2	1.50 ± 0.08	6.40	1.46 ± 0.07	3.51
C2	1.52 ± 0.04 ²⁾	7.77	1.42 ± 0.07	0.50
A3	1.53 ± 0.11 ¹⁾	8.30	1.45 ± 0.07	1.51
B3	1.47 ± 0.06	4.28	1.38 ± 0.05	-2.41
C3	1.50 ± 0.09 ¹⁾	6.24	1.49 ± 0.05	1.47
A4	1.57 ± 0.08 ²⁾	11.27	1.43 ± 0.06	1.54
B4	1.51 ± 0.07 ¹⁾	6.76	1.49 ± 0.11	5.86
C4	1.57 ± 0.06 ²⁾	10.94	1.48 ± 0.10	10.94

低浓度时,只有英山地区产茅苍术醇提物对 MG-63 细胞株增殖有显著性差异,对成骨细胞有统计学意义。

综合实验结果显示,茅山地区产茅苍术水煎液对 MG-63 细胞株、成骨细胞促进增殖效果最佳。根据实验结果,将高浓度药物对细胞作用的强弱进行了排序:对成骨 MG-63 细胞作用 A4 > A1 > C4 > A3 > C1 > C2 > C3 > B4 > B1 > B2 > 雌二醇 > B3; 对大鼠成骨细胞作用 A4 > C4 > A1 > A3 > C1 > C2 > 雌二醇 > B4 > B2 > C3 > B1 > B3。

3.2 大鼠成骨细胞的 ALP 活性 对茅苍术的不同提取部位进行了成骨细胞的 ALP 活性测定,均有显著性的差异,发现茅苍术使成骨细胞 ALP 活性升高,水煎液和挥发油的活性相当,醇提液次之。见表 4。

表 4 茅山产茅苍术 3 种提取物对成骨细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	浓度/g·mL ⁻¹	ALP
		/U·L ⁻¹
空白	—	2.71 ± 0.09
雌二醇对照	1 × 10 ⁻⁷	4.85 ± 0.65 ²⁾
β-桉叶醇	1 × 10 ⁻⁴	4.85 ± 0.63 ²⁾
茅苍术 SFE-CO ₂ 萃取物	1 × 10 ⁻⁴	5.22 ± 1.77 ²⁾
茅苍术 60% 乙醇提取物	1 × 10 ⁻⁴	4.85 ± 1.31 ²⁾
茅苍术水煎液	1 × 10 ⁻⁴	5.22 ± 1.67 ²⁾

4 讨论

由以上可知,茅山道地产区的茅苍术水煎液对 MG-63 细胞、成骨细胞增殖率分别是 13.57%, 11.27%, 其次挥发油和醇提液,这可能解释了几千年来中药为何以水煎液服用;挥发油药效居其次,这提示我们苍术类药材中挥发油含有很多活性物质,值得我们去探讨和研究,尤其是英山产区茅苍术的挥发油。其次,由体外药效可知,茅苍术对成骨细胞的促增殖及对碱性磷酸酶活性的促进作用优于北苍术,且茅苍术中以茅山地区的茅苍术药效最佳,这可能解释了茅山苍术为道地性药材的原因之一。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:1066.

[2] 谢宗万. 全国中草药汇编:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:441.

[3] 闫雪生. 苍术油软胶囊的研制[D]. 济南:山东中医药大学硕士论文,2002:64.

[4] Manolagas S C, Jilka R L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling[J]. New Engl J Med, 1995, 332(5): 305.

[5] Stein G S, Lian J B. Molecular mechanisms mediating proliferation/ differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype[J]. Endocr Rev, 1993, 14(4):424.

[6] Rifas L, Fausto A, Scott M J, et al. Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis[J]. Endocrinology, 1994, 134(1): 213.

[7] 任艳,李萍萍. 舒肝健骨方对成骨样细胞增殖分化的影响及雌激素活性的检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):141.

[8] Young-Sook Cho, Won-Kyo Jung, Jung-Ae Kim. Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4):990

[责任编辑 聂淑琴]