维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0865-03

丹参对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响

刘国良[1],黄孝庆[1],刘 渝[1],李小玉[2]

(1.重庆医科大学附属口腔医院口腔内科,重庆 400015;
2.四川大学华西口腔医学院口腔生物医学工程教育部重点实验室,四川 成都 600041)

【摘 要】目的:了解丹参对 SD 大鼠成骨细胞增殖和分化的影响。方法:取新生的 SD 大鼠头盖骨,胶原酶法培养成骨细胞,用 MTT 法来测定不同浓度丹参对体外培养成骨细胞在 24、48、72h 不同时段的促细胞增殖作用;采用碱性磷酸(ALP)活性观察上述药物的促细胞分化作用。结果:0.05%、0.10%、0.15%的丹参可促进成骨细胞增殖率提高($P<0.05$);不同浓度丹参可使碱性磷酸酶(ALP)活性增强($P<0.05$)。结论:丹参具有促进成骨细胞增殖及分化的作用。

【关键词】丹参;细胞培养;成骨细胞
【中国图书分类法分类号】R781.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-12

Effect of salvia miltiorrhiza bunge on proliferation and differentiation of osteoblasts in rats

LIU Guoliang, et al

(*Department of Oral Medicine, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of Salvia Miltiorrhiza Bunge on cell proliferation and differentiation of osteoblasts in rats cultured in vitro. *Methods*: Osteoblasts from cranium of newborn SD rats were cultured by collagenase method. MTT was used to determine the proliferation of cultured osteoblasts affected by different concentrations of Salvia Miltiorrhiza Bunge at different time points(24,48,72 hrs after medication). Differentiating effect of different concentrations of Salvia Miltiorrhiza Bunge in the cell was evaluated through the examination of alkali phosphate (ALP) activity. *Results*: 0.05%, 0.10%, 0.15% of Salvia Miltiorrhiza Bunge could enhance the cell proliferation rate ($P<0.05$), and different concentrations of Salvia Miltiorrhiza Bunge could enhance ALP activity ($P<0.05$). *Conclusion*: Salvia Miltiorrhiza Bunge could promote the proliferation and differentiation of the osteoblasts.

【Key words】Salvia Miltiorrhiza Bunge; Cell culture; Osteoblasts

牙周病是口腔的常见病与多发病,我国约有70%的人群患有各种牙周炎[1]。牙周炎主要的病理改变是牙周袋形成和牙槽骨吸收,导致牙松动甚至脱落[2]。至今临床上不能根治牙周炎的主要原因之一是无效果良好的阻断牙槽骨吸收或促进牙槽骨再生的药物[3]。丹参是具有活血化淤作用的传统中药。近年的研究表明,其除了具有促进局部微循环的作用外,同时还具有改善成骨细胞功能作用[4]。本研究通过大鼠成骨细胞体外培养来研究丹参对其增殖和分化的影响,初步探讨丹参改善牙周骨吸收方面的可行性。

作者介绍: 刘国良(1969-),男,主治医师,硕士,
主要研究方向:牙周病学和牙体牙髓病学。

1 材料和方法

1.1 动物

选用出生 3~5 天的 SD 大鼠 5 只,体重不限,四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

离心机(Sorvall Super T21,德国),酶标仪(BIO-RAD),HTS 700 plus 高效分析仪(美国 PE 公司),超净工作台(苏州净化设备厂),倒置相差显微镜(OLYMPUS CK40,日本),二氧化碳孵箱(SANYO 17AI,.日本),F-12 HAM's 培养基(Hyclone,美国),细胞培养板(BIOFIL,加拿大),小牛血清(成都哈里生物制剂公司),胰酶及四甲基偶氮唑盐(MTT 试剂)和Ⅰ型胶原酶(均为 Sigma 公司产品),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(柏定生物工程(北京)有限公司提供)。

1.3 药物

丹参注射液购于四川省宜宾制药有限责任公司,根据

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验要求以含 10%小牛血清的 F-12 HAM's 培养液中加入丹参注射液分别配成浓度为 0.05%、0.10%、0.15%的供试液，以不含丹参注射液的 F-12 HAM's 培养液为对照组，4℃保存、备用。

1.4 方法

1.4.1 成骨细胞的分离与培养 参照文献的方法，取出生 3~5 天内的 SD 大鼠 5 只(性别、体重不限，四川大学华西医学中心实验动物中心提供)的头盖骨，彻底剥离骨膜等软组织，置入含 F-12 HAM's 培养液的培养皿中修剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的骨片。加入 0.1 % Ⅰ型胶原酶在 37℃环境下振荡消化 50min，再加入等体积的小牛血清终止消化。收集消化液，在 4℃，1000 r/min 条件下离心 10min 使细胞沉淀。沉淀细胞放置于含 10%小牛血清 F-12 HAM's 培养基和 PEST (青霉素 100 U/ml.链霉素 100mg/ ml)的培养皿内。并以约 $5 \times 10^4/cm^2$ 的密度接种于培养瓶中，.放入 37℃，5% CO_2 培养箱内培养。每 2~3 天换液 1 次。待细胞长满后进行传代，使用第 3 代细胞进行实验。

1.4.2 细胞增殖功能测定 成骨细胞以每孔 5×10^4 个 /ml 密度接种于 96 孔培养板中，每孔加入含 10%胎牛血清的培养基. 在 37℃，5% CO_2 条件下培养。24h 后分别换入不同浓度丹参的 F-12 HAM's 培养基继续培养 24，48，72 h，以 F-12 HAM's 培养液为对照组。采用 MTT 法，于 570 nm 波长测光吸收值(OD 值)，在酶标仪上进行测试。

1.4.3 细胞分化功能测定 (ALP 活性测定) 成骨细胞以每孔 5×10^4 个 /ml 密度接种于 24 孔培养板中，加不同浓度丹参的 F-12 HAM's 培养基培养 72 h，以 F-12 HAM's 培养液为对照组，采用碱性磷酸酶试剂盒(柏定生物工程(北京)有限公司提供)、IFCC(国际临床化学联合会)推荐法，用 HTS 700 plus 高效分析仪(美国 PE 公司)测 ALP 活性。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 软件(10.0 版本)进行方差分析。

2 结 果

2.1 不同浓度丹参对成骨细胞增殖的影响(见表1)

在 24、48、72h 时，0.05%、0.10%和 0.15%丹参能促进成骨细胞增殖($P<0.05$)。

表 1 不同浓度丹参作用的成骨细胞 MTT 法光密度(OD)值 ($A, \bar{x}\pm s, n=6$)

	对照组	0.05%	0.10%	0.15%
24h	0.42 ± 0.04	0.48 ± 0.13	0.58 ± 0.21*	0.82 ± 0.10*
48h	0.58 ± 0.16	0.69 ± 0.11	0.76 ± 0.23*	1.02 ± 0.32*
72h	0.76 ± 0.22	0.87 ± 0.24	0.98 ± 0.31*	1.23 ± 0.40*

注：与对照组比较，$P<0.05$

2.2 不同浓度丹参对 ALP 活性的影响(见表 2)

0.05%、0.10%和 0.15%丹参在 72 h 时 ALP 活性高于对照组($P<0.05$)。

表 2 不同浓度丹参作用的成骨细胞 ALP 活性($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	药物浓度(%)	LP活性(u/mg)
丹参	0.05	0.0279*
	0.10	0.0326*
对照	0.15	0.0415*
		0.0163*

注：与对照组比较，$P<0.05$

3 讨 论

丹参(Salvia Miltiorrhiza Bunge)系唇形科鼠尾草属植物的根，有活血通络之效，是具有活血化淤作用的传统中药。丹参在骨的钙化方面也起着重要的作用，在骨折治疗中应用丹参后成骨细胞在数量及分布部位均较对照侧有明显增多。史炜镔[5]等认为丹参不仅可以促进间充质细胞向成骨细胞转化，还能促进软骨细胞向成骨细胞转化；林润台[6]等从微观角度观察到丹参治疗后成骨细胞形态不规则，胞质内线粒体及粗面内质网明显扩张肿大，表现出旺盛的合成能力。

MTT 比色分析法是免疫学衡量细胞增殖的经典方法。通过与细胞计数法比较，MTT 法具有简便易行、灵敏度高、结果客观可靠等优点。

在生化和组织学上，成骨细胞富含碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性，主要合成Ⅰ型胶原(此点区别于成软骨细胞，后者主要合成Ⅱ型胶原)、表达骨钙素(Osteocalcin)和骨桥蛋白(Osteopontin)基因，受甲状旁腺激素(Parathy-roid hormone, PTH)和前列腺素 E2(Prostaglandin E2，PGE2)的刺激而使环磷酸腺苷 (Cyclic 3/,5/-adenosine mono phosphate, cAMP) 增加，并且在条件培养基中可以钙化(Von Kossa 染色阳性)等典型特征。长期以来，均以具有上述特征作为成骨细胞鉴定及其成骨作用和代谢调节评价的标准，并将这些特征作为成骨细胞的表型标志[7,8]。ALP 的定量检测可以反映成骨细胞的分化水平。ALP 活性越高，说明前成骨细胞向成熟的成骨细胞分化的越明显[9]。

实验结果显示，0.05%、0.10%和 0.15%浓度的丹参均可促进成骨细胞增殖率提高($P<0.05$)，而且使碱性磷酸酶(ALP)活性增强，提示中药丹参能促进

维普资讯 http://www.cqvip.com

成骨细胞的分化。

牙周病是口腔的常见病与多发病，主要的病理改变是牙周袋形成和牙槽骨吸收，导致牙松动甚至脱落。牙周炎所致的牙槽骨吸收是非可逆的，牙周附着也难以完全恢复至生理状态，因而目前临床上仅能控制、但不能根治牙周炎。缺乏疗效确切的阻断牙槽骨吸收、促进牙槽骨再生的药物，是根治牙周炎困难的主要原因[3]。筛选抑制骨吸收、促进骨再生的有效中药，是发现治疗牙周炎新药的途径之一。本实验在细胞水平观察了丹参对成骨细胞的直接作用，结果表明丹参在促进成骨细胞的增殖和分化方面有比较明显的作用，为中药丹参进一步应用于牙周病的治疗奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 全国牙病防治指导组. 第二次全国口腔健康流行病学抽样调查[M]. 北京:人民卫生出版社，1999.

[2] Mombelli A，Gmurn R，Lang N P，et al.Actinobacillus actinomvcetem-comitans in chinese adults. serotype distrihution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus[J]. J Clin Periordontol，1999；26(8)：505.

[3] Ramamurthv N S，Rifkin B R，Greenwald R A，et al.Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats:a comparison of 6 chemicallv modified tetracvclines[J]. J Periodontol，2002；73(7)：726.

[4] 王俊国，曹 斌.丹参促进骨折愈合的研究进展[J]. 中国骨伤，2003；16(10)：637-638.

[5] 史炜镔，符诗聪，杜 宁，等.丹参有效部位对骨折愈合过程中胶原基因表达的影响[J].中国中西医结合杂志，2000；20(4)：269-271.

[6] 林润台，王 忠、刘立波，等.丹参促进下颌骨骨折愈合的超微结构研究[J].中华口腔医学杂志，1992；27(4)：215-216.

[7] Aronow M A，Gerstenfeld L C，Owen T A，et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cell[J].J Cell Physiol，1990；143(2)：213-221.

[8] 曾 敬，徐栋梁.成骨细胞移植促进骨质疏松性骨折愈合过程中相关因子的动态表达[J].中国临床康复，2003；7(3)：448-449,463.

[9] Aubin JE.Advances in the osteoblast linage [J].Biochem Cell Boil，1998；76(6)：899-910.

(上接第 850 页)

合肿瘤越到晚期，越容易发生淋巴转移及远处转移的特性。

以上结果证实，VEGF-C 在乳腺癌的生长及转移过程中发挥重要作用，乳腺癌组织 VEGF-C 高表达可促进肿瘤淋巴管转移，影响患者预后。VEGF-C 不但可作为预示乳腺肿瘤发生恶变的早期肿瘤标志物，还可作为判断患者预后的生物学指标。

(通讯作者：吴诚义，教授，博士生导师 023-89011192)

参 考 文 献

[1] Page DL.Cancer risk assessment in benign breast biopsies [J].Hum Pathol，1986；17(9)：871.

[2] 许良中.乳腺病理学[M].第 1 版，上海：上海医科大学出版社，1999.395.

[3] Joukov V，Pajusola K，Kaipainen A，et a1. A novel vascular endothelial growth factor，VEGF-C，is a ligand for the Flt4 and KDR receptor tyrosine kinases[J].EMBO J，1996；15(2)：290-298.

[4] Jeltsch M，Kaipainen A，Joukov V，et al.Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice[J].Science，1997；276(5317)：1423-1425.

[5] Yonemura Y，Fushida S，Bando E，et a1.Lmphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor-3 in gastric cancer[J].Eur J cancer，2001；37(7)：918-923.

[6] Arinaga M，Noguchi F，Takeno S，et a1.Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma[J].Cancer，2003；97(2)：457- 464.

[7] Akagi K，Ikeda Y，Miyazaki M，et al.Vascular endothelial growth fac tor C(VEGF-C)expression in hunman colorectal cancer tissues[J].Br J Cancer，2000；83(7)：887-889.