

· 综 述 ·

抗骨质疏松中药对成骨细胞作用的研究进展

程婉,许兵,应航,吴飞飞,刘慧

(浙江中医药大学,浙江 杭州 310053)

摘 要 骨质疏松症是一种全身骨代谢性疾病,成骨能力下降而骨吸收加快是骨质疏松症的主要病理学基础,因此,促进成骨细胞增殖、分化,改善成骨细胞功能和调节骨重建对骨质疏松症的治疗具有重要意义。抗骨质疏松中药具有提高性激素水平,调节钙磷代谢平衡,影响成骨细胞、破骨细胞活性,延缓性腺组织衰老的作用,治疗骨质疏松症前景广阔。本文从细胞分子生物学角度对单味和复方抗骨质疏松中药对成骨细胞的作用进行了综述,并提出了目前研究中存在的问题。

关键词 骨质疏松 中草药 成骨细胞 文献综述

骨质疏松症是以骨组织显微结构受损,骨矿成分和骨基质等比例的不断减少,骨质变薄,骨小梁数量减少,骨脆性增加和骨折危险度升高的一种全身骨代谢性疾病。其发病率近年来呈持续上升趋势,已经成为一种严重影响人们生活质量的公共卫生问题,逐渐受到临床医学界重视。成骨能力下降而骨吸收加快是骨质疏松症的主要病理基础,提高成骨细胞功能对其治疗有直接意义,骨内外膜中成骨细胞的增生和产生新生骨质又是骨折愈合的基础,可见促进成骨细胞增殖、分化,改善成骨细胞功能和调节骨重建,对治疗骨质疏松症具有重要意义。中国传统医学中虽无“骨质疏松”之名,但是类似本病的症状则早在《内经》中就有记载,并散见于历代医书中,由于其临床表现症状与“骨萎”较为相似,故将骨质疏松定义为“骨萎”比较准确。齐尚峰等^[1]认为肾虚是骨萎发病的关键病理基础,脾胃亏虚是骨萎发病的重要病机,肝对骨萎发病也有一定影响,血瘀是骨质疏松病理产物和加重因素。所以补益脾肝肾,活血化瘀是中医药治疗骨质疏松的原则之一。现代药理研究证明,抗骨质疏松中药具有广泛的作用,如提高性激素水平,调节钙磷代谢平衡,影响成骨细胞、破骨细胞活性,延缓卵巢子宫、睾丸等性腺组织的衰老,并且克服了许多化学合成药物的毒副作用,便于患者长期服用^[2],治疗前景广阔。近年来不少学者从细胞分子生物学角度开展了中医药对成骨细胞影响的实验研究,为中医药治疗骨质疏松症进一步开发提供了相关依据,本文就这方面研究综述如下。

1 单味中药对成骨细胞的作用

1.1 补阳药对成骨细胞的作用 补阳药一般味甘、性温,归肾经,具有补肾助阳的作用,用于治疗肾阳虚证。现在用于治疗骨质疏松的中药一般有鹿茸、巴戟

天、续断等。研究表明,补阳中药具有促进成骨细胞增殖及相关因子分泌增多的作用。李银清等^[3]用醇提法提取鹿茸胶原,将鹿茸胶原作用于大鼠成骨细胞,得出鹿茸胶原具有促进大鼠成骨细胞贴壁和增殖的作用。李楠等^[4]取 24 h 内新生 SD 大鼠头盖骨成骨细胞,用巴戟天多糖及巴戟天水提物药物血清进行体外培养,72 h 后提取成骨细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 相对表达量,发现巴戟天水提物组与巴戟天多糖组核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 与对照组相比具有非常显著差异,且巴戟天多糖组非常显著优于巴戟天水提物组。表明巴戟天多糖是巴戟天提高成骨细胞活性的有效成分之一。王威等^[5]取雄性与雌性 Wistar 大鼠各 12 只,按性别随机分为雄性给药组、雌性给药组、雄性对照组、雌性对照组,每组 6 只。给药组给予续断水提液灌胃,对照组给予等量生理盐水,灌胃 1 周后取血,将各组大鼠血清稀释为 2.5%、5% 和 10%,3 个浓度分别培养大鼠成骨细胞,采用 MTT 法检测细胞增殖能力。研究发现三种浓度的大鼠的续断含药血清均有刺激成骨细胞增殖的作用,且这种作用在雌性大鼠的血清中表达强于雄性大鼠。

1.2 活血化瘀药对成骨细胞的作用 活血化瘀药是指能促进血行,改善和消除瘀血病症的药物,其药味多辛、苦、咸,性寒、温、平不一,主要归肝、心二经。目前研究用于骨质疏松的活血化瘀药主要有丹参、牛膝等。范焕琼等^[6]从中药丹参中分离出水溶性成分丹酚酸 B,用其作用于体外培养的成骨细胞,研究发现丹酚酸 B 浓度在 $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可刺激成骨细胞分泌 ALP,浓度在 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显刺激成骨细胞分泌骨钙素,浓度在

$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可明显增加成骨细胞骨结节总面积。中药牛膝为治疗骨质疏松方剂中出现频率较高的药物,有学者对牛膝醇提物的乙酸乙酯萃取物进行提取、分离、纯化,发现脱皮甾酮是牛膝中促成骨样细胞增殖的活性成分之一^[7]。卢建华等^[8]通过红曲含药血清诱导体外培养的骨髓基质细胞向成骨细胞分化,表明了含红曲血清可以呈剂量依赖性地促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化、增殖。蔡莹等^[9]将 1 日龄 SD 大鼠分离原代成骨细胞培养后传代,将细胞分为 3 组,分别进行骨碎补总黄酮含药血清、丙酸睾酮、空白血清进行干预,用 RT-PCR 法测定成骨细胞雄激素受体(AR) mRNA 表达的结果。结果显示,雄激素干预组及骨碎补干预组的 ARmRNA 表达率差异无统计学意义,得出骨碎补总黄酮可促进 ARmRNA 表达,可能与其拟雄激素效应有关,从而可抑制骨吸收和促进骨形成,最终达到治疗雄激素水平下降所致骨质疏松症的目的。

1.3 补气药对成骨细胞的作用 中医理论认为脾胃亏虚是骨萎发病的主要病机,补气药一般可以补气健脾,故常用于骨质疏松的治疗。用于治疗骨质疏松的补气药主要有黄芪、西洋参等。郭海玲等^[10]观察黄芪注射液对体外培养的新生大鼠颅盖骨成骨细胞增殖及分泌 I 型胶原能力的影响。结果显示,与对照组比较,各体积分数的黄芪注射液均能促进成骨细胞的增殖,其中含体积分数 15% 和 10% 的黄芪注射液培养的成骨细胞 I 型胶原的表达量明显高于对照组。得出黄芪可以促进体外培养的成骨细胞增殖和分泌 I 型胶原的能力,但具有一定的量效趋势。

1.4 其他药物对成骨细胞的作用 除上述三类外,其他中药抗骨质疏松的作用见报道的比较少,比较常见的有收涩药五味子和解表药葛根。赵文君等^[11]用不同浓度的甘肃华中五味子乙醇提取物含药血清对大鼠成骨细胞进行体外培养,发现培养 48 h 的血清浓度分别为 10%、15% 和 72 h 的血清浓度为 5%、10% 的华中五味子 75% 乙醇提取物血清组的细胞增殖率较对照组快;培养 48 h 的血清浓度为 10%、15% 和 72 h 的血清浓度为 10% 华中五味子 75% 乙醇提取物血清组的碱性磷酸酶活性较对照组增加;培养 2 周的矿化结节计数显示,血清浓度为 10% 的华中五味子 75% 乙醇提取物血清组多于对照组,得出甘肃华中五味子 75% 乙醇提取物对体外大鼠成骨细胞的增殖与分化具有促进作用的结论。郭辉等^[12]应

用 MTT 法,对硝基苯磷酸盐法和 RT-PCR 法观察葛根素对体外培养成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶活性和骨保护素(OPG),核因子 κB 受体激活因子配体(RANKL) mRNA 表达的影响,结果示葛根素能促进成骨细胞的增殖、分化,增加骨保护素 mRNA 的表达,对核因子 κB 受体激活因子配体的表达无明显影响。

1.5 几类中药作用于成骨细胞的比较研究 近年来有学者用几种不同类的常用中药分别作用或联合作用于成骨细胞后进行比较,亦为抗骨质疏松中药的选取使用提供了一定思路。谢雁鸣等^[13]用骨碎补总黄酮、淫羊藿总黄酮及菟丝子总黄酮分别对成骨细胞进行体外培养,并进行比较,得出 3 种中药总黄酮对成骨细胞活性均有促进作用,其中以骨碎补总黄酮最为广泛,淫羊藿总黄酮次之,菟丝子总黄酮最差的结论。

2 复方中药对成骨细胞的作用

2.1 传统补益剂对成骨细胞的影响 传统的补肾方剂近年来用于骨质疏松的治疗取得了良好的效果,学者研究了不同方剂的含药血清对成骨细胞的作用,发现一些方药对成骨细胞有促增殖作用,且能抑制破骨细胞的活性。鞠大宏等^[14]通过观察左归丸含药血清对成骨细胞骨保护素(OPG)、核因子 κB 受体激活因子配体(RANKL) mRNA 表达的影响,探讨其治疗骨质疏松症的作用机制。得出在大鼠去势状态下,左归丸含药血清一方面直接抑制 RANKL 的分泌,使破骨细胞活性降低;另一方面促进成骨细胞分泌 OPG,使之与 RANKL 的结合增多,使破骨细胞活性降低,从而达到治疗骨质疏松的目的结论。孙晖等^[15]将六味地黄丸主要血中移行成分以适当浓度添加到大鼠成骨细胞培养液中,用 MTT 法测定细胞的增殖速度,结果表明,六味地黄丸主要血中移行成分莫诺昔、獐牙菜昔、马钱子昔的混合物各剂量组均明显表现出对大鼠成骨细胞的促增殖作用,初步确定六味地黄丸主要血中移行成分莫诺昔、獐牙菜昔、马钱子昔是其治疗骨质疏松的药效物质基础。

2.2 新研发方药对成骨细胞的作用 近年来学者配伍出许多新的方剂用于骨质疏松的治疗,大部分方剂亦以补肾活血药为主,兼以益气。姚新苗等^[16]分别用益骨汤(由补骨脂、骨碎补、生地黄、仙灵脾、怀山药、丹参等组成)高、中、低剂量组, $\alpha\text{-D3}$ 对照组,及生理盐水空白对照组,制备动物含药血清对 SD 大鼠成骨细胞进行体外培养,发现前 4 组比较无显著性差异,与空白对照组比较细胞增殖分化与 ALP 影响具

有显著性差异。说明益骨汤含药血清具有促进早期成骨细胞增殖与分化的作用。赵可伟等^[17]用中药骨康颗粒(由补骨脂、炙淫羊藿、肉苁蓉、熟地黄、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣组成)含药血清对成骨细胞进行体外培养,用酶联免疫检测培养上清液中胰岛素样生长因子 I 的含量,得出骨康用药达到一定程度时,在促进成骨细胞生成胰岛素生长因子 I 方面的能力与雌二醇一致,从一个方面说明骨康颗粒可以作为雌激素的替代品治疗骨质疏松。

3 小 结

中药对成骨细胞作用的研究是中药防治骨质疏松症研究的热点之一,大多数研究者多从补肾药及活血药入手,在量化指标方面多采用衡量骨形成的生化指标进行评价,为中药抗骨质疏松提供了分子生物学依据。但目前中医药对成骨细胞的研究存在不少问题亟待解决。

3.1 成骨细胞培养方面的问题 ①成骨细胞培养取材:取材的实验动物不同,同一种属的动物取材的部位不同,及取材实验动物的年龄不同均会影响实验。②实验方法:一般培养方法有酶消化法和组织块法。酶消化法可获得大量细胞,但操作方法较复杂,酶处理后对细胞膜表面受体和抗原成分有损坏,影响了培养细胞的贴壁和成活率。组织块培养法可靠、简便,且所得细胞较纯,但细胞产出率低,一定程度上限制了它的应用。③在细胞培养中,各种环节很容易造成细胞的污染,而尚无很好的办法解决。

3.2 中药血清制备存在的问题 ①含药血清的处理与保存:周明眉等^[18]通过研究发现,含药血清经长期低温保存(-20°C , 2 个月)后药效显著降低($P < 0.01$),提示低温冰冻保存仍影响含药血清药效。崔晓兰等^[19]证实,保存 3 d 或不保存处理的对药效无任何影响,故在进行实验时宜使用新鲜或保存时间较短的含药血清。②体外实验中含药血清的添加量的确立:有学者报道含药血清在高浓度可抑制细胞增殖,所以实验中既要避免高浓度血清对细胞的毒性作用,又要使含药血清的浓度接近于血药浓度。③供体动物的选择,给药的剂量与次数等方面也需要确立一个统一的标准。

3.3 研究药物的选取 在抗骨质疏松的中药的选取上,学者对单味药的研究多集中于补肾活血药,而对其他有效中药的研究尚需进一步加强。且对药物的有效成分提取方法各不相同,有待统一。对复方的中

药研究亦以补肾活血方剂为主,对传统方剂的应用和新药开发均应加强。

3.4 关于抗骨质疏松中药的研究 中药防治骨质疏松症在骨骼系统可以在骨吸收和骨形成两方面体现调整作用,对全身则是在整体调节背景上的多靶点、多环节发挥作用。由于机体的统一性、复杂性决定了仅用药物对体外培养的成骨细胞的作用不能完全代替动物造模实验研究,更不能高于临床研究,故单单观察中药对体外培养成骨细胞的直接作用是不够的,还需要从多方面入手来研究中药抗骨质疏松的作用与机理,以便今后能更好的用于临床的治疗。

4 参考文献

- [1] 齐尚峰,张永波. 中医药防治骨质疏松的研究概况[J]. 中国骨质疏松杂志,2009,15(3):230-235.
- [2] 廖二元. 内分泌学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:1802-1803.
- [3] 李银清,赵雨,范冬艳,等. 鹿茸胶原促进大鼠成骨细胞生长的实验研究[J]. 吉林中医药,2009,29(12):1089-1090.
- [4] 李楠,王和鸣,郭素华,等. 巴戟天多糖对体外培养成骨细胞核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(8):517-519.
- [5] 王威,何永志,史红,等. 不同性别大鼠中药含药血清对成骨细胞增殖的影响[J]. 天津中医药,2009,26(1):9-11.
- [6] 范焕琼,崔焱. 丹酚酸 B 对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响[J]. 中国药理学通报,2008,24(7):978-979.
- [7] 孟彦彬,高晓燕. 牛膝中脱皮甾酮的含量测定及促成骨样细胞增殖活性[J]. 承德医学院学报,2009,26(4):441-442.
- [8] 卢建华,钱煦岱,华江,等. 红曲对大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞诱导分化的影响[J]. 中华中医药杂志,2008,23(6):541-543.
- [9] 段冠清,蔡莹,沈慧. 骨碎补总黄酮含药血清对大鼠成骨细胞 AR mRNA 表达的影响[J]. 中医药导报,2010,16(2):61-64.
- [10] 郭海玲,王翔,詹红生,等. 黄芪调控体外培养大鼠成骨细胞型胶原蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(7):1257-1261.
- [11] 赵文君,樊秦,孙少伯,等. 甘肃华中五味子对成骨细胞成骨能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(2):32-33.
- [12] 郭辉,刘奕琛. 葛根素对大鼠成骨细胞代谢调控机制的实验研究[J]. 现代中医药,2008,28(1):48-50.
- [13] 谢雁鸣,秦林林,于向东,等. 骨碎补、淫羊藿、菟丝子总

- 黄酮对成骨细胞体外培养影响的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(7): 22 - 24.
- [14] 鞠大宏, 刘梅洁, 赵宏艳, 等. 左归丸含药血清对成骨细胞 OPG、RANKLmRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(5): 312 - 315.
- [15] 孙晖, 张宁, 李丽静, 等. 六味地黄丸主要血中移行成分对培养大鼠成骨细胞促增殖作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2161 - 2164.
- [16] 姚新苗, 陈于东, 方芳. 益骨汤含药血清对成骨细胞增殖和 ALP 影响的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(2): 158 - 159.
- [17] 赵可伟, 潘昆如, 尹凌凡, 等. 中药骨康对成骨细胞分泌胰岛素样生长因子 1 的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康, 2008, 12(28): 5414 - 5417.
- [18] 周明眉, 杨奎, 姜远平, 等. 中药血清药理学的方法学研究 - 含药血清低温保存和血清灭活的影响 [J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 46.
- [19] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨 - I [J]. 中国实验方剂学杂志, 1995, 4(2): 13.
- (2011-03-15 收稿 2011-08-01 修回)