

· 基础研究 ·

补骨脂黄酮对乳鼠颅骨成骨细胞增殖和矿化成熟的影响

孔西建, 翟远坤, 刘玉珂, 叶进, 吴丹, 毛春焕

(河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471002)

摘要 目的:探讨补骨脂黄酮对体外培养的成骨细胞增殖和矿化成熟的影响。**方法:**取新生 SD 大鼠颅骨, 体外培养成骨细胞, 取第 1 代细胞进行以下实验。①将细胞分为 6 组, A 组不进行干预, B、C、D、E、F 组分别采用终浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的补骨脂黄酮进行干预, 检测细胞增殖情况。②将成骨诱导培养的细胞分为 6 组, a 组不进行干预, b、c、d、e、f 组分别采用终浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的补骨脂黄酮进行干预, 9 d 后检测碱性磷酸酶活性, 将碱性磷酸酶活性最高者确定为补骨脂黄酮的最佳浓度。③采用 ELISA 法检测 a 组和碱性磷酸酶活性最高组成骨诱导培养 3 d、6 d、9 d、12 d 和 15 d 时培养液中骨钙素、骨形态发生蛋白-2、骨桥蛋白和 I 型胶原蛋白的含量。④成骨诱导第 12 天, 采用茜素红染色法检测 a 组和碱性磷酸酶活性最高组钙化结节的形成情况。⑤采用 PCR 法测定 a 组和碱性磷酸酶活性最高组成骨培养开始后 72 h 内碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、胰岛素样生长因子-1 mRNA、转录因子 Runx-2 mRNA 和 Osterix mRNA 的表达水平。**结果:**①细胞增殖测定结果。6 组吸光度值比较, 差异无统计学意义 [(0.512 ± 0.046), (0.448 ± 0.051), (0.528 ± 0.043), (0.525 ± 0.041), (0.522 ± 0.039), (0.517 ± 0.049), $F = 1.438$, $P = 0.282$]。②碱性磷酸酶活性检测结果。6 组吸光度值比较, 差异有统计学意义 [(2.637 ± 0.221), (2.136 ± 0.168), (3.678 ± 0.235), (3.153 ± 0.201), (3.001 ± 0.224), (2.934 ± 0.188), $F = 15.442$, $P = 0.000$]; a 组吸光度值高于 b 组 ($P = 0.018$), 低于其余 4 组 ($P = 0.000$, $P = 0.003$, $P = 0.016$, $P = 0.043$), c 组高于 b、d、e、f 组 ($P = 0.000$, $P = 0.034$, $P = 0.013$, $P = 0.001$)。③骨相关蛋白检测结果。除 3 d 外 ($P = 0.264$), c 组骨钙素分泌量在 6 d、9 d、12 d 和 15 d 均大于 a 组 ($P = 0.027$, $P = 0.002$, $P = 0.005$, $P = 0.033$); 除 3 d 和 15 d 外 ($P = 0.085$, $P = 0.132$), c 组骨形态发生蛋白-2 分泌量在 6 d、9 d 和 12 d 均大于 a 组 ($P = 0.023$, $P = 0.001$, $P = 0.002$); 除 3 d 外 ($P = 0.312$), c 组骨桥蛋白分泌量在 6 d、9 d、12 d 和 15 d 均大于 a 组 ($P = 0.022$, $P = 0.008$, $P = 0.001$, $P = 0.038$); 除 15 d 外 ($P = 0.785$), c 组 I 型胶原蛋白分泌量在 3 d、6 d、9 d 和 12 d 均大于 a 组 ($P = 0.042$, $P = 0.002$, $P = 0.003$, $P = 0.037$)。④钙化结节形成情况。成骨诱导培养 12 d 后, c 组的钙化结节明显多于 a 组。⑤成骨相关基因表达情况。除 72 h 外 ($P = 0.255$), c 组碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达水平在 6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组 ($P = 0.027$, $P = 0.009$, $P = 0.002$, $P = 0.006$, $P = 0.022$); 除 6 h 和 72 h 外 ($P = 0.092$, $P = 0.114$), c 组胰岛素样生长因子-1 mRNA 表达水平在 12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组 ($P = 0.007$, $P = 0.005$, $P = 0.003$, $P = 0.026$); 除 6 h 和 72 h 外 ($P = 0.186$, $P = 0.359$), c 组 Runx-2 mRNA 表达水平在 12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 c 组 ($P = 0.001$, $P = 0.004$, $P = 0.003$, $P = 0.023$); 除 72 h 外 ($P = 0.271$), c 组 Osterix mRNA 表达水平在 6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组 ($P = 0.024$, $P = 0.001$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.021$)。**结论:**补骨脂黄酮对体外培养成骨细胞的增殖并无明显影响, 但可以促进体外培养的成骨细胞矿化成熟, 有一定的促骨形成活性。

关键词 补骨脂 黄酮 成骨细胞 矿化 动物实验

Effect of bavachin on proliferation and maturation of cranioaural osteoblast in neonatal rats Kong Xijian*, Zhai Yuankun, Liu Yuke, Ye Jin, Wu Dan, Mao Chunhuan. * Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital, Luoyang 471002, Henan, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of bavachin on proliferation and maturation of osteoblast cultured in vitro. **Methods:** The skulls were taken from SD neonatal rats for osteoblast culture, and the first-generation cells were chosen for the following experiments. The cells were divided into 6 groups, and cells in group A were not intervened, while cells in other groups were placed in the culture fluids respectively added with bavachin which final concentration were $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (group B), $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (group C), $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (group D), $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (group E), $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ (group F), and the cells proliferation were detected. The cells were divided into 6 groups after osteogenic induction, and cells in group a were not intervened, while cells in other groups were placed in the culture fluids

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073037, 3071043)

通讯作者: 孔西建 E-mail: kxjian1962@126.com

respectively added with bavachin which final concentration were 1×10^{-4} mol/L (group b), 1×10^{-5} mol/L (group c), 1×10^{-6} mol/L (group d), 1×10^{-7} mol/L (group e), 1×10^{-8} mol/L (group f). The alkaline phosphatase (ALP) activities were detected 9 days later and the optimal concentration of bavachin was determined by the highest ALP activities. The content of osteocalcin (OC), bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2), osteopontin (OPN) and type-I collagen protein in the culture solution of group a and the group with the highest ALP activity were detected through ELISA 3, 6, 9, 12 and 15 days after osteogenic induction respectively. The numbers of calcified nodules in group a and the group with the highest ALP activity were detected through alizarin red staining 12 days after osteogenic induction. The expression level of basic fibroblast growth factor (bFGF) mRNA, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA, Runx-2 mRNA and Osterix mRNA in group a and the group with the highest ALP activity were detected through PCR within 72 hours after the culture. **Results:** The cells proliferation detection showed there were no statistical differences in optical density (OD) among group A, B, C, D, E and F ((0.512 ± 0.046) , (0.448 ± 0.051) , (0.528 ± 0.043) , (0.525 ± 0.041) , (0.522 ± 0.039) , (0.517 ± 0.049) , $F = 1.438$, $P = 0.282$). The ALP activities detection showed there were statistical differences in OD among group a, b, c, d, e and f ((2.637 ± 0.221) , (2.136 ± 0.168) , (3.678 ± 0.235) , (3.153 ± 0.201) , (3.001 ± 0.224) , (2.934 ± 0.188) , $F = 15.442$, $P = 0.000$); The OD of group a was higher than that of group b ($P = 0.018$) and lower than that of the other 4 groups ($P = 0.000$, $P = 0.003$, $P = 0.016$, $P = 0.043$), and the OD of group c was higher than that of group b, d, e and f ($P = 0.000$, $P = 0.034$, $P = 0.013$, $P = 0.001$). The content of OC of group c was higher than that of group a 6, 9, 12 and 15 days after the culture ($P = 0.027$, $P = 0.002$, $P = 0.005$, $P = 0.033$). The content of BMP-2 of group c was higher than that of group a 6, 9 and 12 days after the culture ($P = 0.023$, $P = 0.001$, $P = 0.002$). The content of OPN of group c was higher than that of group a 6, 9, 12 and 15 days after the culture ($P = 0.022$, $P = 0.008$, $P = 0.001$, $P = 0.038$). The content of type-I collagen protein of group c was higher than that of group a 3, 6, 9 and 12 days after the culture ($P = 0.042$, $P = 0.002$, $P = 0.003$, $P = 0.037$). The number of calcified nodules of group c was obviously more than that of group a 12 days after the culture. The expression level of bFGF mRNA of group c was higher than that of group a 6, 12, 24, 36 and 48 hours after the culture ($P = 0.027$, $P = 0.009$, $P = 0.002$, $P = 0.006$, $P = 0.022$). The expression level of IGF-1 mRNA of group c was higher than that of group a 12, 24, 36 and 48 hours after the culture ($P = 0.007$, $P = 0.005$, $P = 0.003$, $P = 0.026$). The expression level of Runx-2 mRNA of group c was higher than that of group a 12, 24, 36 and 48 hours after the culture ($P = 0.001$, $P = 0.004$, $P = 0.003$, $P = 0.023$). The expression level of Osterix mRNA of group c was higher than that of group a 6, 12, 24, 36 and 48 hours after the culture ($P = 0.024$, $P = 0.001$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.021$). **Conclusion:** Bavachin have no obvious effect on proliferation of osteoblasts cultured in vitro, while it can promote the mineralization and maturity of osteoblasts cultured in vitro, so it has promotive effect on bone formation.

Key words Psoralea corylifolia; Flavone; Osteoblasts; Mineralization; Animal experimentation

补骨脂具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻等功效^[1], 常用于抗骨质疏松的复方制剂中^[2]。现代药理学研究证实, 补骨脂的确具有较强的抗骨质疏松活性^[3-4]。补骨脂的主要成分包括补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂黄酮、补骨脂查尔酮、补骨脂酚等多种物质^[5], 而目前关于补骨脂抗骨质疏松活性基础的研究主要集中于补骨脂素和异补骨脂素^[6-7], 对于补骨脂黄酮的研究相对较少。补骨脂黄酮又称补骨脂甲素, 相关实验研究表明, 它具有抑制癌细胞功能及雌激素样作用等药理活性^[8-9]。为此, 我们研究了补骨脂黄酮对成骨细胞增殖和矿化成熟的影响, 现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 新生 SD 大鼠 6 只, 购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK 军 2007-007。

1.2 实验试剂 α -MEM 培养基 (Gibco 公司), 甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸 (2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, ASAP)、地塞米松、茜素红、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma 公司), 类标准胎牛血清 (Hyclone 公司), 补骨脂黄酮 (上海融禾医药科技发展有限公司), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙素 (osteocalcin, OC) ELISA 检测试剂盒 (武汉 Cusabio 公司), I 型胶原 ELISA 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司), 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及荧光定量扩增试剂盒 (TIANGEN 公司)。引物自行设计, 由 TaKaRa (大连) 公司合成。

1.3 实验仪器 CO₂ 细胞培养箱 (上海力申科学仪

器有限公司),倒置相差显微镜(OLYMPUS 公司),紫外分光光度计(SHIMADZU 公司),台式高速冷冻离心机(Heraeus 公司),实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司),多功能酶标仪(Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 成骨细胞培养 将大鼠置于 75% 酒精中浸泡处死,在无菌条件下取其颅骨,用棉球擦除表面的骨髓和结缔组织后以 PBS 清洗 3 次。将颅骨剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的碎片后移至培养瓶中进行培养,先以 0.25% 胰酶消化 1 次(37 ℃,10 min),弃上清液;然后以混合酶(0.25% 胰酶:0.1% II 型胶原酶 = 1:1)消化 1 次(37 ℃,10 min),弃去上清液;再以 0.1% 的 II 型胶原酶消化 4 次(37 ℃,每次 20 min),收集合并上清液。在培养瓶中加入 5 mL 含胎牛血清的培养基中止消化,200 目滤网过滤 3 次,以 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 13.5 cm),弃上清液后加入 α-MEM 培养基(内含 10% FBS、青霉素、链霉素各 100 IU · mL⁻¹),吹打均匀并计数。将原代细胞悬液以 3 × 10⁴ 个 · mL⁻¹ 接种于培养皿,每皿 10 mL,在 37 ℃,5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养,3 d 换液 1 次。当细胞铺满 80% 皿底后,胰蛋白酶(含 1 mmol · L⁻¹ EDTA)消化传代。

2.2 成骨细胞增殖和矿化成熟指标测定

2.2.1 细胞增殖 第 1 代细胞以每孔 2 × 10³ 个接种于 96 孔板中。24 h 后加入不同浓度的补骨脂黄酮,终浓度分别为 1 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ (B 组)、1 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ (C 组)、1 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ (D 组)、1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹ (E 组)、1 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹ (F 组),A 组不干预,每组平行做 6 孔。48 h 后弃培养液,PBS 洗 2 次,换含 0.5% MTT 的无血清 α-MEM 培养液,继续培养

4 h。弃培养液,每孔加入 100 μL 的 DMSO,振荡 10 min,在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度(optical density,OD)。

2.2.2 ALP 活性检测 第 1 代细胞以每孔 3 × 10³ 个接种于 96 孔板,待其铺满孔底后更换为成骨诱导性培养基(0.1 mol · L⁻¹ β-甘油磷酸钠、10⁻⁸ mol · L⁻¹ 地塞米松和 50 mg · L⁻¹ ASAP),然后分别加入 DMSO(a 组)和终浓度为 1 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ (b 组)、1 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ (c 组)、1 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ (d 组)、1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹ (e 组)、1 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹ (f 组)的补骨脂黄酮,3 d 换液 1 次,诱导培养 9 d 后弃培养液,采用碱性磷酸酶试剂盒测定各组细胞的 ALP 活性,将 ALP 活性最高者确定为补骨脂黄酮的最佳浓度,后续实验皆采用此浓度的补骨脂黄酮。

2.2.3 骨相关蛋白检测 成骨诱导培养开始后 3 d 换液 1 次,每次换液时留取 1 mL 旧培养液,于 -20 ℃ 保存,分别取 3 d、6 d、9 d、12 d 和 15 d 的培养液,采用 ELISA 法检测 a 组和 ALP 活性最高组的骨相关蛋白(OC、BMP-2、OPN 和 I 型胶原蛋白)的分泌量。

2.2.4 钙化结节分析 于成骨诱导第 12 天,采用茜素红染色法进行钙化结节的组织化学染色,肉眼或镜下观察钙化结节的形成情况,并照相保存结果^[8]。

2.2.5 成骨相关基因检测 采用 PCR 法测定 a 组和 ALP 活性最高组成骨培养开始后 72 h 内碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) mRNA、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factors-1, IGF-1) mRNA、转录因子 Runx-2 mRNA 和 Osterix mRNA 表达水平。所用引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

| 名称 | 序号 | 引物序列 | | 引物长度(bp) |
|---------|----------------|---------|----------------------------------|----------|
| bFGF | NM_019305.2 | Forward | 5' - AAGCAGAAGAGAGAGGAGTTG - 3' | 154 |
| | | Reverse | 5' - CGGTAAGTGTGTAGTTATTGG - 3' | |
| IGF-1 | NM_001082477.2 | Forward | 5' - TTCAGTTCGTGTGTGGACCAAG - 3' | 120 |
| | | Reverse | 5' - GATCACAGCTCCGGAAGCAA - 3' | |
| Runx-2 | NM_053470.1 | Forward | 5' - GCACCCAGCCCATAATAGA - 3' | 165 |
| | | Reverse | 5' - TTGGAGCAAGGAGAACCC - 3' | |
| Osterix | NM_001037632.1 | Forward | 5' - GCCTACTTACCCGTCTGACTTT - 3' | 131 |
| | | Reverse | 5' - GCCCACTATTGCCAACTGC - 3' | |
| GAPDH | NM_017008.3 | Forward | 5' - TATCGGACGCCTGCTTAC - 3' | 140 |
| | | Reverse | 5' - CTGTGCCGTTGAACCTGC - 3' | |

2.3 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件对所得数据进行统计分析,细胞增殖、ALP 活性、骨相关蛋白分泌

量和成骨相关基因表达水平测定结果的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检

验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结 果

3.1 细胞增殖测定结果 6 组 OD 值比较,差异无统计学意义(表 2)。

表 2 补骨脂黄酮对成骨细胞增殖的影响

| 组别 | OD 值 |
|-----|---------------|
| A 组 | 0.512 ± 0.046 |
| B 组 | 0.448 ± 0.051 |
| C 组 | 0.528 ± 0.043 |
| D 组 | 0.525 ± 0.041 |
| E 组 | 0.522 ± 0.039 |
| F 组 | 0.517 ± 0.049 |
| F 值 | 1.438 |
| P 值 | 0.282 |

3.2 ALP 活性检测结果 6 组 OD 值比较,差异有统计学意义;a 组 OD 值高于 b 组 ($P=0.018$),低于其余 4 组 ($P=0.000, P=0.003, P=0.016, P=0.043$),c 组高于 b、d、e、f 组 ($P=0.000, P=0.034, P=0.013, P=0.001$) (表 3)。

表 3 补骨脂黄酮对 ALP 活性的影响

| 组别 | OD 值 |
|-----|---------------|
| a 组 | 2.637 ± 0.221 |
| b 组 | 2.136 ± 0.168 |
| c 组 | 3.678 ± 0.235 |
| d 组 | 3.153 ± 0.201 |
| e 组 | 3.001 ± 0.224 |
| f 组 | 2.934 ± 0.188 |
| F 值 | 15.442 |
| P 值 | 0.000 |

3.3 骨相关蛋白检测结果 ①OC 分泌量:除 3 d 外 ($P=0.264$),c 组 OC 分泌量在 6 d、9 d、12 d 和 15 d 均大于 a 组 ($P=0.027, P=0.002, P=0.005, P=0.033$) [图 1(1)]。②BMP-2 分泌量:除 3 d 和 15 d 外 ($P=0.085, P=0.132$),c 组 BMP-2 分泌量在 6 d、9 d 和 12 d 均大于 a 组 ($P=0.023, P=0.001, P=0.002$) [图 1(2)]。③OPN 分泌量:除 3 d 外 ($P=0.312$),c 组 OPN 分泌量在 6 d、9 d、12 d 和 15 d 均大于 a 组 ($P=0.022, P=0.008, P=0.001, P=0.038$) [图 1(3)]。④I 型胶原蛋白分泌量:除 15 d 外 ($P=0.785$),c 组 I 型胶原蛋白分泌量在 3 d、6 d、9 d 和 12 d 均大于 a 组 ($P=0.042, P=0.002, P=0.003, P=0.037$) [图 1(4)]。

3.4 钙化结节形成情况 成骨诱导培养 12 d 后,c 组的钙化结节明显多于 a 组(图 2)。

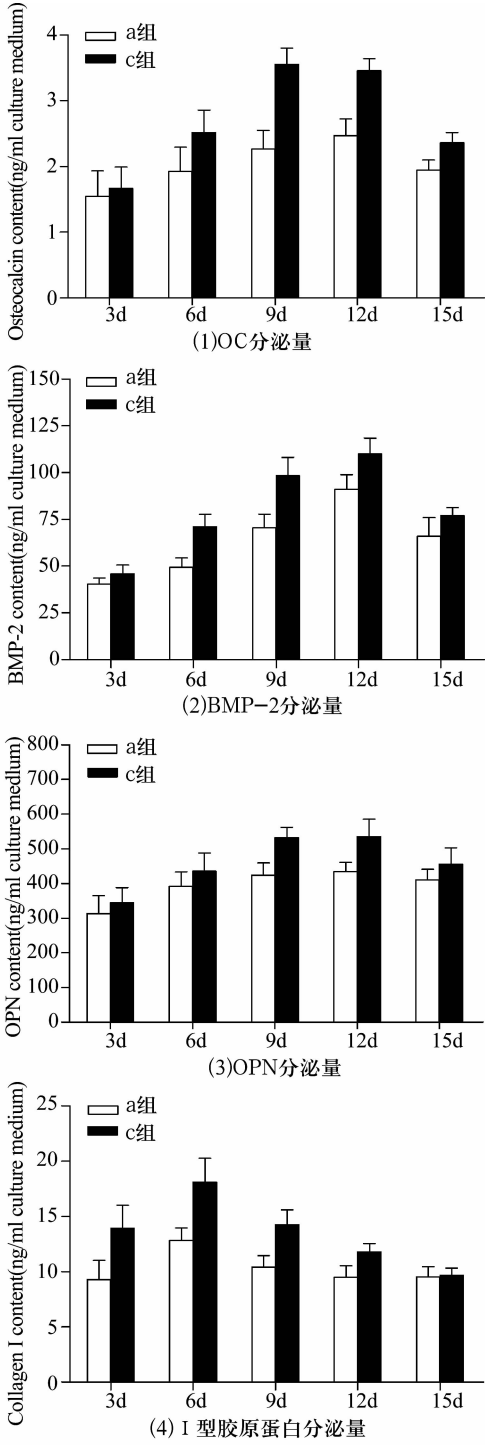


图 1 成骨诱导后不同时间点骨相关蛋白分泌情况

3.5 成骨相关基因表达情况 ①bFGF mRNA 表达水平:除 72 h 外 ($P=0.255$),c 组 bFGF mRNA 表达水平在 6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组 ($P=0.027, P=0.009, P=0.002, P=0.006, P=0.022$) [图 3(1)]。②IGF-1 mRNA 表达水平:除 6 h 和 72 h 外 ($P=0.092, P=0.114$),c 组 IGF-1 mRNA 表达水平在 12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组 ($P=0.007, P=0.005, P=0.003, P=0.026$) [图 3(2)]。③Runx

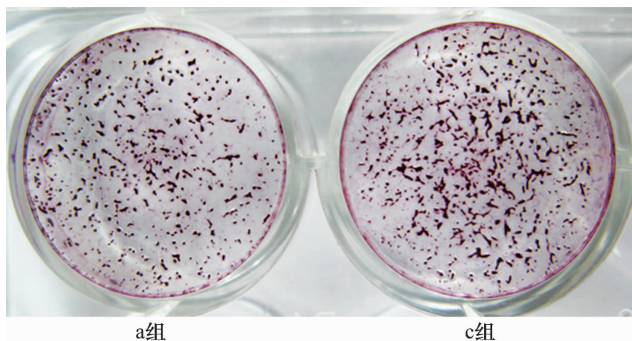


图2 成骨诱导培养 12 d 后的钙化结节

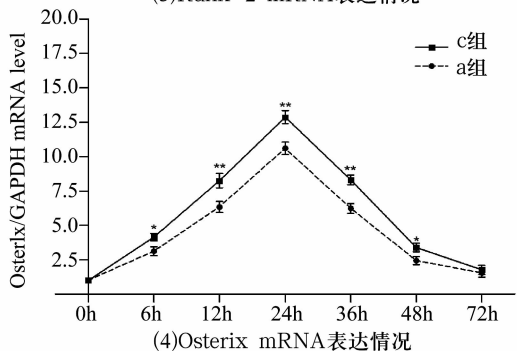
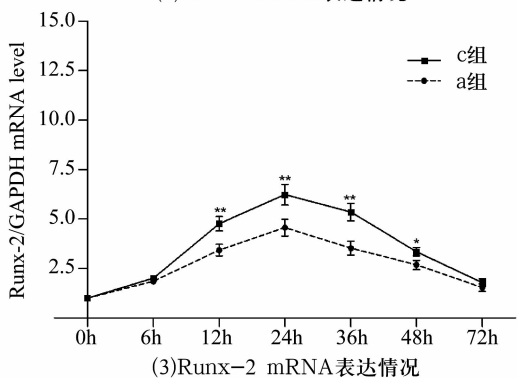
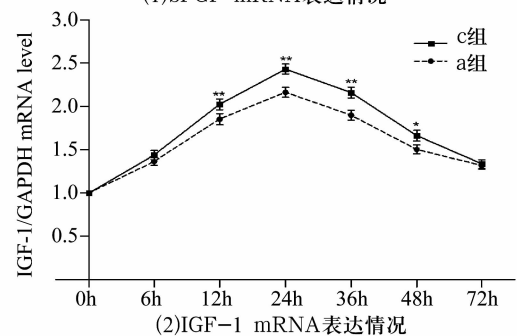
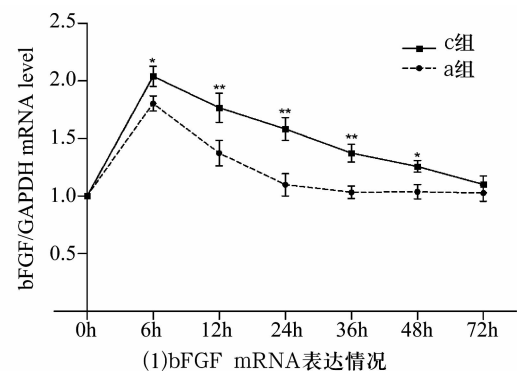


图3 成骨诱导培养不同时点成骨相关基因表达情况

-2 mRNA 表达水平:除 6 h 和 72 h 外($P=0.186, P=0.359$), c 组 Runx-2 mRNA 表达水平在 12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组($P=0.001, P=0.004, P=0.003, P=0.023$)[图 3(3)]。④Osterix mRNA 表达水平:除 72 h 外($P=0.271$), c 组 Osterix mRNA 表达水平在 6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 均高于 a 组($P=0.024, P=0.001, P=0.000, P=0.000, P=0.021$)[图 3(4)]。

4 讨论

骨质疏松症被称为悄无声息的流行病,是主要以骨量减少、骨显微结构退化为特征,从而导致骨骼脆性增加,易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[10]。骨组织中存在多种细胞,其中与骨质疏松症关系最为密切的当属成骨细胞和破骨细胞。破骨细胞吸收旧的骨组织,而成骨细胞则负责新骨形成,二者的平衡协调形成了生物体内正常的骨转换,而二者的失衡导致了骨质疏松症的发生。目前对于骨质疏松症的治疗尚无经济有效的药物。经典的雌激素替代疗法虽然曾风靡一时,但因其应用导致乳腺癌、宫颈癌的发病率剧增,现已不被推荐使用^[11-12]。双膦酸盐可以抑制破骨细胞的骨吸收活性,甲状旁腺素可以刺激新骨形成,但其不良反应限制了他们的临床应用范围^[13]。我国有着丰富的中草药资源,而且中医药治疗骨质疏松也已有上千年的历史,安全性和有效性已经得到广泛认可。补骨脂就是中医治疗骨质疏松方剂中常用的一味中草药,对其抗骨质疏松有效成分的探讨也是近年来的研究热点,但多集中于补骨脂素与异补骨脂素的抗骨质疏松活性研究。黄酮是补骨脂的重要组成部分,然而关于其生物活性的研究却相对较少,目前仅有 1 篇文献报道补骨脂总黄酮具有促进成骨细胞增殖和抗氧化作用^[14],但未见对补骨脂黄酮单体的相关研究。

从本研究的结果可以看出,补骨脂黄酮对体外培养成骨细胞的增殖并无明显影响,但可明显提高 ALP 活性,促进骨相关蛋白(OC、BMP-2、OPN 和 I 型胶原)分泌,增加钙化结节数量,并可刺激成骨相关基因 bFGF、IGF-1、Runx-2 和 Osterix 的表达,说明补骨脂黄酮具有促进成骨细胞矿化成熟的能力,可能是补骨脂抗骨质疏松的主要有效成分。补骨脂黄酮属黄酮类物质,而且具有微弱的雌激素活性^[8],而骨质疏松症的发生正是与雌激素的缺乏有关,因此补骨脂黄酮的抗骨质疏松活性很可能与其雌激素样作用有关,但

还需进行相关的研究。另外,近年来关于异戊烯基基团与抗骨质疏松活性关系的探讨引起了多数学者的注意^[15],我们发现补骨脂黄酮的结构中也带有 1 个异戊烯基基团,其抗骨质疏松活性是否与异戊烯基基团相关也有待于深入探讨。

本研究的结果提示,补骨脂黄酮对体外培养成骨细胞的增殖并无明显影响,但可以促进体外培养的成骨细胞矿化成熟,有一定的促骨形成活性,具备开发为抗骨质疏松新药的潜力,但其具体作用机制尚需进一步研究。

5 参考文献

[1] 翟远坤,武祥龙,潘亚磊,等. 补骨脂抗骨质疏松研究概况[J]. 中医杂志,2012,53(14):1244-1248.

[2] 王全权,陈海林,宗芳,等. 补骨脂复方制剂干预绝经后骨质疏松症的作用[J]. 中国临床康复,2006,10(35):145-147.

[3] Tsai MH, Huang GS, Hung YC, et al. Psoralea corylifolia extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats[J]. Am J Chin Med, 2007, 35(4):669-680.

[4] Lim SH, Ha TY, Kim SR, et al. Ethanol extract of Psoralea corylifolia L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats[J]. Br J Nutr, 2009, 101(7):1031-1039.

[5] 刘桦,白焱晶,陈亚云,等. 中药补骨脂化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):1410-1412.

[6] Wong RW, Rabie AB. Effect of psoralen on bone formation[J]. J Orthop Res, 2011, 29(2):158-164.

[7] 翟远坤,潘亚磊,牛银波,等. 补骨脂素与异补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(3):355-361.

[8] Ohno O, Watabe T, Nakamura K, et al. Inhibitory effects of bakuchiol, bavachin, and isobavachalcone isolated from Piper longum on melanin production in B16 mouse melanoma cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(7):1504-1506.

[9] Cheng CC, Chen YH, Chang WL, et al. Phytoestrogen bavachin mediates anti-inflammation targeting Ikappa B kinase-I kappaB alpha-NF-kappaB signaling pathway in chondrocytes in vitro[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 636(1-3):181-188.

[10] Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2003, 32(1):15-24.

[11] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial[J]. JAMA, 2002, 288(3):321-333.

[12] Vahle JL, Sato M, Long GG, et al. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone(1-34) for 2 years and relevance to human safety[J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(3):312-321.

[13] Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures[J]. J Clin Invest, 2008, 118(2):421-428.

[14] 邱印利,刘娟. 补骨脂淫羊藿总黄酮对兔成骨细胞增殖及抗氧化作用的影响[J]. 中国兽医杂志,2010,46(3):55-57.

[15] Zhang Y, Li XL, Yao XS, et al. Osteogenic activities of genistein derivatives were influenced by the presence of prenyl group at ring A[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(12):1534-1539.

(2012-12-05 收稿 2013-04-08 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》广告业务范围

- 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍
- 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍
- 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍
- 各种形式的骨伤科讯息,如书刊征订、招生启事、会议通知等

《中医正骨》2013—2014 年度广告收费标准

| 刊登位置 | 印刷规格 | 版面 | 每期收费标准(元) | 半年收费标准(元) | 全年收费标准(元) |
|------|---------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| 封二 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 9 000 | 54 000 | 75 600 |
| 封三 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 8 000 | 48 000 | 67 200 |
| 封底 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 10 000 | 60 000 | 84 000 |
| 前插页 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 7 000 | 42 000 | 58 800 |
| 后插页 | 大 16 开彩色铜版纸印刷 | 全版 | 6 000 | 36 000 | 50 400 |
| 内文图文 | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 全版 | 3 000 | 18 000 | 25 200 |
| | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 1/2 版 | 1 800 | 10 800 | 15 120 |
| 内文文字 | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 全版 | 3 000 | 18 000 | 25 200 |
| | 大 16 开黑白铜版纸印刷 | 1/2 版 | 1 800 | 10 800 | 15 120 |