

补肾健脾方对微应力下成骨细胞骨架调控的影响

魏国强, 吴卓, 张志海, 万雷, 李颖

广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240

[摘要] 目的: 探讨补肾健脾方对微应力下成骨细胞骨架的调控作用。方法: 新西兰兔 18 只, 分为中药组、西药组和空白组。培养细胞用雌性 SD 大鼠 20 只。分别施加 3 min 和 6 min 应力后中药组和西药组分别以相应药物的含药血浆培养, 空白组给予常规培养。采用激光共聚焦显微镜检测细胞的形态学变化及荧光强度变化。结果: 施加应力后, 各组细胞形态发生明显变化, 出现细胞骨架发生解聚和重排, 微丝向核周集聚, 微管发生断裂, 变短, 弯曲。以 6 min 应力最为明显。中药组在 3 min 和 6 min 应力下, 其培养 1 h 和 6 h 后的荧光强度无明显变化, 但经过 24 h 培养后, 中药组的荧光强度增强, 与空白组、西药组比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。西药组在 3 min 应力下, 其培养 6 h 的荧光强度明显高于 1 h ($P < 0.05$), 但与 24 h 比较无明显变化。但在 6 min 应力下, 各个时段的荧光强度无明显变化。结论: 施加的应力对细胞造成一定的损伤, 应力时间越长, 其对细胞的损伤越严重。补肾健脾中药能修复细胞的损伤, 促进细胞骨架的重组, 但其起效作用时间较长。

[关键词] 补肾健脾方; 成骨细胞; 微应力; 细胞骨架; 药物干预

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 12-0194-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.12.092

Regulative Effect of *Bushen Jianpi* Decoction on Osteoblast Cytoskeleton Under Microstress in Vitro

WEI Guoqiang, WU Zhuo, ZHANG Zhihai, et al

Abstract: Objective: To investigate the protective effect of *Bushen Jianpi* decoction on osteoblast cytoskeleton in vitro under microstress. Methods: Eighteen New Zealand rabbits were divided into the blank group, western medicine group and Chinese medicine group. Primary cultured calvaria osteoblasts (OB) were obtained from 20 female SD rats. After given mechanical strain for 3-min and 6-min, OB of western medicine group and Chinese medicine group were cultured with the corresponding medicated serum. OB of the blank group were cultured by routine medium. The changes of morphology and fluorescence intensity of OB were measured with laser scanning confocal microscope. Results: After given microstress, the changes of cell morphology were obvious in each group, manifested as cytoskeleton depolymerization and rearrangement, perinuclear concentration of microfibril, and microtubule fracture, shortening, and curving. The changes were the most obvious after stress for 6 min. The fluorescence intensity of Chinese medicine group had no significant changes after culturing for one hour and 6 hours under 3-min and 6-min microstress. While after 24-hour culture, the fluorescence intensity of Chinese medicine group was significantly increased ($P < 0.05$ compared with the blank group and western medicine group). Under 3-min microstress, the fluorescence intensity of western medicine group was significantly higher after 6-hour culture than that after one-hour culture ($P < 0.05$), but did not differ from that after 24-hour culture. Under 6-min microstress, the fluorescence intensity of western medicine group remained unchanged after culturing for different time. Conclusion: The microstress can cause damage to OB, and the damage increases with the stress time. *Bushen Jianpi* decoction can repair cell damage and promote reconstruction of OB cytoskeleton, but the effect starts after a time.

Keywords: *Bushen Jianpi* decoction; Osteoblasts; Microstress; Cytoskeleton; Drug intervention

骨组织微损伤是影响骨脆性的一个重要因素, 而骨质疏松症发生前、发展过程和其所导致骨折中, 从形态结构上看, 都

伴有骨微损伤的改变。从理论上讲, 这些微损伤应是骨生物量下降的较早期改变。基于这种理论, 本研究通过对成骨细胞

[收稿日期] 2014-07-11

[基金项目] 广东省中医药局立项课题 (编号: 20111186)

[作者简介] 魏国强 (1969-), 男, 副主任医师, 主要从事中医骨伤科临床工作。

施加一定量的重复的机械应力以模拟骨微损伤,观察补肾健脾中药对成骨细胞细胞骨架的调控及再建的影响,以期了解补肾健脾方对微应力下细胞骨架的解聚重组情况,为在细胞形态水平上研究骨质疏松性的病理机制和治疗方法提供一种新的思维模式。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康新西兰兔 18 只,3 月龄,体重 2 000~2 200 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,分为中药组、西药组和空白组。培养细胞用 1~3 日龄清洁级健康雌性 SD 大鼠 20 只。

1.2 实验药物 中药组以补肾健脾法拟方,药物包括:补骨脂、制淫羊藿、肉苁蓉、熟地黄、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣等。该方的提取药物,含生药量 1.43 g/mL,由本院制剂室提供。西药组选用的药物为阿仑膦酸钠片,由杭州默沙东公司提供,根据临床用药剂量及新药研究中动物用药剂量要求,阿仑膦酸钠片配制成 0.055 mg/mL 浓度的混悬液,每天灌胃 1 次,连续灌胃 7 天。空白组以常规饮食。

1.3 含药血清的制备 3 组动物连续灌胃 1 周,最后 1 次灌胃后 2 h,分别行心脏采血,将获得的全血置于含抗凝剂的试管中,5~10 min 后,于 3 000×g 离心 15 min,获含药血清,再灭活,抽滤除菌,置 -20℃ 保存备用。

1.4 成骨细胞的培养 取 1~3 日龄 SD 大鼠,去头皮,取出头盖骨,用骨剪及剪刀切碎,磷酸缓冲液多次冲洗至骨片发白,放入锥形瓶内,用胰蛋白酶和胶原酶于 37℃ 消化,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,用含胎牛血清 DMEM 培养液悬浮细胞并接种于培养瓶中,于细胞孵箱中培养。每 2~3 天更换培养液,待细胞融合成单层后传代培养,将第 3 代细胞用于实验。

1.5 骨微损伤模型的构建 将成骨细胞按 1×10^5 个/片接种到盖玻片上,制成细胞爬片,每组置于一块六孔板内,添加含药物血清的培养基,培养 48 h 后,用于离心力作用实验。所采用的离心力为 200×g,时间为 3 min 和 6 min。应力施加后继续培养的时间分 1 h、6 h 和 24 h。各个小组均在加力完成后开始细胞骨架的荧光染色工作。

1.6 激光共聚焦显微镜的观察 将染色后的细胞爬片置于激光共聚焦显微镜下观察。选择参数如下:激光光源为 12 W 氩离子激光器,可输出 488 nm、514 nm 波长;激光功率:15 mW;扫描长度:30%;步距速度,Z 轴步距:0.2 μm;扫描方式:镜扫描;扫描速度,扫描强调:100%。按 Z 轴步距逐层往细胞底部进行断层扫描,获取清晰三维图象。计算机采集和保存图像,应用用图像处理软件 Image-Proplus 测定单个细胞。

1.7 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多个样本均数两两比较用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 应力为 3 min 的细胞荧光强度的比较 见表 1。施加 3 min 应力后培养 1 h,各组的荧光强度差异无显著性意义($P > 0.05$);经过 6 h 的培养后,西药组的荧光强度显著增强,与空白组、中药组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),与本组 1 h 的荧光强度比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。但中药组的荧光强度未见明显变化。再培养 24 h 后,中药组的荧光强度增强,与空白组、西药组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),与本组 6 h 的荧光强度比较,差异有显著性意义($P < 0.05$);西药组的荧光强度与 6 h 的荧光强度比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表 1 应力为 3 min 的细胞荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 h	6 h	24 h
空白组	6	78.38 ± 2.67	79.18 ± 1.82	79.30 ± 2.54
西药组	6	80.82 ± 5.49	89.12 ± 5.46	89.60 ± 2.93
中药组	6	81.28 ± 3.89	82.62 ± 2.50	100.02 ± 7.51

与空白组、中药组 6 h 比较,① $P < 0.05$;与空白组、西药组 24 h 比较,② $P < 0.05$;与本组 1 h 比较,③ $P < 0.05$;与本组 6 h 比较,④ $P < 0.05$

2.2 应力为 6 min 的细胞荧光强度的比较 见表 2。施加 6 min 应力后的各组细胞的荧光强度均明显低于 3 min 应力时的荧光强度。培养 1 h 和 6 h,各组的荧光强度差异无显著性意义($P > 0.05$)。经过培养 24 h 后,中药组的荧光强度增强,与空白组、西药组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),与本组 6 h 的荧光强度比较,差异有显著性意义($P < 0.05$);西药组的荧光强度与空白组的荧光强度无明显变化($P > 0.05$)。

表 2 应力为 6 min 的细胞荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 h	6 h	24 h
空白组	6	75.20 ± 2.51	75.02 ± 1.81	76.75 ± 1.89
西药组	6	74.52 ± 2.72	74.22 ± 2.06	75.45 ± 1.36
中药组	6	75.23 ± 2.34	76.35 ± 2.16	79.43 ± 1.84

与空白组、西药组 24 h 比较,① $P < 0.05$;与本组 6 h 比较,② $P < 0.05$

2.3 细胞形态学的观察 施加应力 3 min 的培养 1 h 后,各组细胞荧光强度无明显的变化,但细胞骨架发生解聚和重排,微丝向核周集聚,微管发生断裂,变短,弯曲等变化。培养 6 h 后,空白组和中药组细胞的荧光强度无明显变化,但西药组细胞荧光强度增强,但肌动蛋白(actin)纤维细且分布不均匀;培养 24 h 后,中药组和西药组荧光强度增起,细胞形态趋于规则,边缘清晰,细胞骨架趋于整齐 actin 荧光染色强度逐渐恢复到加力前形态。施加应力 6 min 的细胞相比 3 min 细胞,形态不规则,沿力的方向排列不整齐,actin 纤维细且分布不均匀,微管发生断裂,变短,弯曲更加严重。西药组和

空白组经过 6 h 和 24 h 的培养后, actin 荧光染色强度没有恢复到加力前形态, 但中药组经过 24 h 的培养后细胞 actin 荧光染色强度增强, 细胞形态趋于规则, 边缘开始清晰。

3 讨论

骨质疏松症发生是由于日常活动中骨骼不断承受一定量的重复性的循环负荷导致骨组织的疲劳损伤或显微损伤。现在已证实当骨的正常负荷减弱或者消失时, 与外力负荷相对应的骨重建随之发生, 引起骨质萎缩, 机械强度下降, 因此在日常生活中, 反复、低强度负荷引起骨组织的脆性增多和积累性损伤, 并随年龄而增加^[1]。因此, 骨组织的内部结构与应力分布有关。既往的研究表明, 应力只有达到一定的阈值水平才能使静止的表面衬层细胞转化为活跃的成骨细胞, 不同部位不同组织的骨细胞的应力敏感性不同, 而在人的生长期, 由于体重与肌力不断增加, 使骨骼系统持续处于轻度超负荷状态。Urban NH 等^[2]研究后认为, 骨改建是一个复杂的生理或病理过程, 其中主要是由成骨细胞和破骨细胞在各种环境因素的作用下细胞增殖活性、功能状态的改变活跃所致。成骨细胞具有多种重要功能并能调节破骨细胞的生成和功能。成骨细胞对机械刺激的反应可根据细胞来源、环境如激素水平、施加力的大小、性质的不同和供体年龄而有所差异, 但大量在体或离体研究均表明机械力对成骨细胞的增殖活性、细胞外形和附着以及表型蛋白表达和功能有影响^[3-5]。黄男安等^[6]将这种改变总结为以下几点, 细胞形态方面的改变、细胞增殖活性的改变、细胞结构成分的改变和细胞功能的改变。目前认为骨在机械负荷下, 体内骨组织细胞所识别的机械应力刺激信号主要包括以下两种类型: 一种是认为成骨细胞和骨细胞能识别骨组织受到外力时产生的细微变形或应变; 戚孟春等^[7]在研究中发现成骨细胞在未受力时, F-actin 纤维束粗大而分布均匀, 应力纤维清晰可见; 受力后大多数细胞的 F-actin 纤维束变得纤细而稀疏, 分布不均匀, 方向性变差, 应力纤维数目变少, 这种现象随加力时间延长而更加显著。另一种是骨在生理性机械负荷下诱导产生的毛细血管外液流能调节骨组织细胞的功能, 是正常骨改建必要的外部信号, 骨组织细胞, 特别是位于骨表面的成骨细胞将受到负荷诱导的液流作用。液流通过刺激产生细胞因子, 改变成骨细胞和破骨细胞活性的动态平衡, 调节骨改建。

中医学认为骨质疏松症病机为多虚、多瘀、多系统、多脏器、多因多果的全身性骨骼疾病, 前期研究发现补肾健脾方含药血清中含有类性激素样作用的物质; 能促进成骨细胞增殖和矿化, 并促进成骨细胞分泌 I 型胶原^[8-9]。赵献银等^[10]认为高应力可减缓骨质疏松所引起的下颌骨骨小梁的吸收, 低应力则可加速骨吸收, 雌激素的补充治疗阻止了去势后大鼠下颌骨质的吸收, 并抑制低应力环境下颌骨的进一步丢失, 进了骨形成。因此, 在本研究中, 笔者分别采用不同的时间施加相同的应力, 通过激光共聚焦显微镜观察发现 3 min 的细胞无论在荧光强度, 还是在后续培养的细胞形态中均优于 6 min 的应

力, 说明应力时间越长, 其对细胞的损伤越严重。在 3 min 应力下, 中药组培养的细胞在继续培养的 1 h 和 6 h, 荧光强度无明显变化, 但在 24 h 后, 其荧光强度均强于空白组和西药组; 而西药组在 6 h 和 24 h 后的荧光强度无明显变化。在 6 min 应力下, 空白组和西药组的荧光强度均无明显变化, 中药组直至 24 h 后其荧光强度明显高于各组及各个时间段。这说明了补肾健脾中药能修复细胞的损伤, 促进细胞骨架的重组, 但其起效作用时间较长。

【参考文献】

- [1] Arlot ME, Burt-Pichat B, Roux JP, et al. Microarchitecture influences microdamage accumulation in human vertebral trabecular bone[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(10): 1613-1618.
- [2] Urban NH, Chamberlin B, Ramage S, et al. Effects of alpha/beta-androstenediol immune regulating hormones on bone remodeling and apoptosis in osteoblasts[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 110(3-5): 223-229.
- [3] Kido S, Kuriwaka-Kido R, Imamura T, et al. Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation[J]. Bone, 2009, 45(6): 1125-1132.
- [4] Young SR, Gerard-O'Riley R, Kim JB, et al. Focal adhesion kinase is important for fluid shear stress-induced mechanotransduction in osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(3): 411-424.
- [5] 王常德, 夏亚一, 张成俊. 流体剪切力和细胞骨架阻断对肌动蛋白丝的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(19): 1930-1933.
- [6] 黄男安, 李娟. 机械力刺激对成骨细胞的作用[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(增刊): 309-311.
- [7] 戚孟春, 胡静, 韩立赤, 等. 成骨细胞在机械力刺激下细胞骨架及细胞形态改变的体外研究[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2004, 2(3): 181-184.
- [8] 庄洪, 邵敏. 中药骨康对去势大鼠骨吸收与骨形成影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(4): 26-29.
- [9] 庄洪, 魏合伟, 林一峰. 中药骨康含药血清中类雌二醇物质含量的测定[J]. 中医正骨, 2003, 15(11): 14-16.
- [10] 赵献银, 李晓红, 郭三萍, 等. 雌激素和应力环境改变对骨质疏松大鼠下颌骨骨小梁结构的影响[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2005, 6(1): 4-8.

(责任编辑: 马力)