

三七对骨重建偶联中细胞因子 IGF-1, IL-6 表达影响

Expression and effects of panax on cytokines IGF-1,

IL-6 in coupling of bone remodeling

郭 福

(深圳市宝安区中医院, 广东 深圳, 518133)

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2011) 15-0020-02

【摘要】 目的: 探讨三七对骨重建偶联中细胞因子 IGF-1 和 IL-6 的表达影响。方法: 通过三七总皂苷被小白兔吸收后, 将其血清放入体外成骨细胞和破骨细胞共培养体系, 观察培养体系中 IGF-1 和 IL-6 的变化。结果: 三七组的成骨细胞含量和 IGF-1 含量均高于对照组, 并随着三七的浓度升高而逐渐升高; 破骨细胞含量和 IL-6 含量均低于对照组, 并随着三七的浓度升高而逐渐降低。结论: 三七能够促进成骨细胞增长, 促进成骨细胞分泌 IGF-1, 抑制成骨细胞分泌 IL-6, 从而抑制破骨细胞增长, 抑制骨吸收功能, 达到治疗骨质疏松症的作用。

【关键字】 三七; 骨重建; 偶联; IGF-1; IL-6

【Abstract】 Objective: To explore expression and effects of panax on cytokines IGF-1, IL-6 in coupling of bone remodeling. Methods: After panax were absorbed by rabbits, put serum in vitro into osteoblasts and osteoclasts co-culture system, then observe the change of IGF-1 and IL-6 in co-culture system. Results: Osteoblasts content and IGF-1 levels in panax notoginseng were higher than control group, and increasing with the increasing of panax concentration. Osteoclasts content and IL-6 levels were lower than control group, and decreasing with the decreasing of panax concentration. Conclusion: Panax could promote growth of bone cells and osteoblasts secrete IGF-1, at the same time, which also could inhibition of osteoblasts secrete IL-6, so that it inhibit the growth of osteoclasts and resorption function, then get to the role of treatment of osteoporosis.

【Keywords】 Panax; Bone remodeling; Coupling; IGF-1; IL-6

骨质疏松症是中老年患者中常见病之一, 严重影响了人们的身体健康和生活质量。骨质疏松易导致骨折, 不仅给患者自身带来极大的痛苦, 同时也给患者的家人和社会带来了沉重的经济和生活负担。骨组织的代谢异常, 成骨细胞调节的骨形成减少, 破骨细胞调节的骨吸收增加就会产生骨质疏松症。所以说, 骨形成是促进人体骨组织的正常生长和维持其正常功能的重要因素。有研究表明, 中药对治疗骨质疏松症具有明显的治疗效果^[1-2]。本实验采用酶联免疫的方法, 通过三七总皂苷被小白兔吸收后, 将其血清放入体外成骨细胞和破骨细胞共培养体系, 观察培养体系中 IGF-1 (类胰岛素 1 号增长因子) 和 IL-6 (白介素 6) 的变化, 来探讨三七对骨重建偶联中细胞因子 IGF-1 和 IL-6 的表达影响, 现将详细报告如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象

取新生 24h 内和 4~8 周龄的 SD 鼠, 用于建立体外成骨细胞和破骨细胞共培养体系; 取大白兔 8 只 (由广州中医药大学动物实验中心提供), 雌雄各半, 体重 2.5~3.0kg, 用于制备实验用血清。

1.2 主要仪器设备

Olympus 倒置相差显微镜, 由 Olympus 公司生产; 超净工作台, 上海净化设备厂生产; CO₂ 培养箱, 由德国 Heraeus 公司生产; 还有流式细胞仪、液体闪烁谱仪、酶标仪、分光光度仪等等。主要的器械: 消毒钢碗、咬骨钳、玻璃培养皿等。

1.3 方法

1.3.1 成骨细胞和破骨细胞共培养体系制备

1.3.1.1 成骨细胞的分离培养

据 Vicky 等^[3]方法, 夹颈处死新生小鼠, 在无菌条件下, 剪取头盖骨, PBS 中漂洗 3 次, 加入 0.25% 胰酶, 37℃ 消化 20min, 剔除周围结缔组织, 用眼科剪剪碎, 加入 0.1% II 型胶原酶, 37℃ 震荡消化 1h, 终止酶反应后充分吹打, 200 目筛网过滤, 1000r/min, 离心 5min, DMEM 培养基重悬后接种; 每次传代时采取反复贴壁法去除成纤维细胞来达到钝化的目的。选取第三代成骨细胞接种于直径 35mm 培养皿中用于共培养实验。

1.3.1.2 破骨细胞的分离和培养

根据 Takahashi 等^[4]方法, 夹颈处死 4~8 周龄的小鼠, 在无菌条件下分离股骨和肱骨, 剪断两侧骨骺端, 用 1ml 注射针头吸取 α -MEM 培养液冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞混合液, 于 200 目筛网过滤并接种于直径 100mm 培养皿中, 37℃, 5% CO₂, 95% 湿度下培养 24h。收集未贴壁细胞 (骨髓单核细胞), 1000r/min, 离心 5min, 沉淀用 α -MEM 培养液重悬, 计数调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml 后接种于预先置放 0.1% 明胶处理过的 24mm × 24mm 玻片或 5mm × 5mm 骨片的培养皿中。

1.3.1.3 共培养体系的建立

将接种骨髓单核细胞 24h 的玻片或骨片在 PBS 中充分漂洗, 以去除未贴壁细胞的骨髓单核细胞和血细胞, 然后把玻片或骨片置入提前 24h 接种了成骨细胞的 35mm 培养皿中进行共培养, 培养皿中置放金属网作为支架。细胞每 2 天更换新鲜培养液 1 次, 换液时务必小心, 以防玻片或骨片浮起。

1.3.2 含药血清制备

将 8 只大白兔, 雌雄各一只一组, 分成四组, 空白对照组、三七总皂苷 10 μ g/ml、50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 组。对每组大白兔

实行药物及生理盐水灌胃,灌胃给药容积为 17.5ml/kg,每天 2 次,间隔 5h/次,连续灌胃 7d。每组大白兔最后次用药后 2h 行心脏采血,离心 3000r/min,20min,取上清,56℃水浴灭活 30min,经 0.45μm 滤膜虑除菌,分装,-20℃保存备用。

将培养液平均分成 4 组,分别将提取的血清放入培养液中,观察细胞因子 IGF-1 和 IL-6 的表达。

表 1 各培养液对成骨细胞和破骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	成骨细胞	破骨细胞
空白对照组	0.387±0.039	0.389±0.040
三七总皂苷 10μg/ml 组	0.413±0.027	0.376±0.029
三七总皂苷 50μg/ml 组	0.675±0.042*	0.302±0.017*
三七总皂苷 100μg/ml 组	0.827±0.039*	0.223±0.021*

2.2 各组培养液中 IGF-1 和 IF-6 含量的测定,见表 2。

表 2 各组培养液中 IGF-1 和 IL-6 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IGF-1	IL-6 (ng/L)
空白对照组	11.72±1.92	78.3±5.96
三七总皂苷 10μg/ml 组	14.78±3.91*	53.2±6.09*
三七总皂苷 50μg/ml 组	19.06±3.12*	48.2±5.21*
三七总皂苷 100μg/ml 组	21.31±6.54*	36.0±6.31*

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,下同。

3 讨论

体外成骨细胞和破骨细胞共培养及药物干预研究是研究有效治疗骨质疏松症的重要手段之一。成骨细胞是骨发生和骨形成的重要细胞,具有合成、分泌组成骨基质的重要元素的作用,破骨细胞是骨吸收的重要细胞,两者公共维持机体内环境的稳定、生理机制调节和骨代谢平衡,发挥重要的作用。

胰岛素生长因子 IGF-1 是骨基质中含量最丰富的生长因子,由成骨细胞生产,能够刺激成骨细胞先祖出现^[5-7],促进成骨细胞前体增殖,增加有功能的成骨细胞数目增加,抑制细胞的凋亡,提高成骨细胞的存活能力^[8]。同时 IGF-1 也能调节骨吸收功能,在体外,IGF-1 通过成骨细胞的作用间接促进破骨细胞的生成,并能增强其活性,它是成骨细胞-破骨细胞的偶联因子,在骨重建中,同时促进骨形成和骨吸收两个过程,促进骨吸收是通过骨保护素/RANKL 系统介导,在骨重建偶联过程中起关键作用。

IL-6 具有破骨细胞激活因子的性质,其产生细胞也很多,绝经后雌激素水平的下降会导致 IL-6 升高。有研究发现成骨细胞膜上有功能性雌激素受体,而破骨细胞上有 IL-6 受体,又有研究显示,新生 SD 鼠成骨细胞能分泌 IL-6,说明雌激素对破骨细胞的影响可能是通过成骨细胞起作用,雌激素下降,会诱发成骨细胞分泌 IL-6 等细胞因子,使得骨组织微环境内 IL-6 等细胞因子的含量上升,从而增强骨吸收,导致骨质疏松的出现^[9]。

本次研究数据中,各培养液对成骨细胞和破骨细胞增殖的影响发现,三七组的成骨细胞含量均高于对照组,破骨细胞含量均低于对照组,且三七总皂苷 50μg/ml 组和三七总皂苷 100μg/ml 组与对照组有明显差异, $P < 0.05$,说明低浓度的三七对成骨细胞和破骨细胞影响都不大,高浓度的三七才能促进成骨细胞增长,抑制破骨细胞增长,从而达到治疗骨质疏松的作用。

本次研究数据,各组培养液中 IGF-1 和 IF-6 含量测定发现,含三七总皂苷组的 IGF-1 含量均高于对照组,并且随着三七总

1.4 统计学处理

检测数据应用 SPSS 13.0 统计软件处理,计量资料以均数 ($\bar{x} \pm s$) 标准差,计量资料采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各培养液对成骨细胞和破骨细胞增殖的影响,见表 1。

皂苷浓度的升高,IGF-1 的含量也随之明显升高,具有统计学意义, $P < 0.05$,说明高浓度的三七能够促进成骨细胞的生成,同时促进成骨细胞分泌 IGF-1,在骨重建偶联过程中起关键作用;而三七组的 IL-6 含量均低于对照组,并随着三七总皂苷浓度的升高,IGF-1 的含量也随之降低,具有统计学意义, $P < 0.05$,说明高浓度的三七可抑制成骨细胞分泌 IL-6,从而达到抑制骨吸收的功能。

综上所述,三七能够促进成骨细胞增长,促进成骨细胞分泌 IGF-1,抑制成骨细胞分泌 IL-6,从而抑制破骨细胞增长,抑制骨吸收功能,达到治疗骨质疏松症的作用。

参考文献:

- [1]杜莹,魏合伟,陈超,等.骨康冲剂治疗绝经后骨质疏松症临床观察[J].中医正骨,2005,17(8):17-18
- [2]杜莹,谢杰,魏合伟,等.应用补肾健脾活血治则防治骨质疏松症[J].中国临床康复,2005,9(35):108-110
- [3]Kartsogiannis V,Ng KW.Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2004,228:79-102
- [4]Takahashi N,Udagawa N,Tanaka S,et al.Bone Research Protocols.Methods in Molecular Medicine,2005,80:129-144
- [5]Jia D,Heersche JN.Insulin-like growth factor-I and-2 stimulate osteoprogenit-or proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell populations derived from adult rat bone[J].Bone 2000,27(6):785-794
- [6]cAMP-induced insulin-like growth factor-I gene activation in primary rat osteoblast cultures[J].Biol Chem 1997,272(29):18132-18139
- [7]储诚兵,陈艺新,尹培荣,等.胰岛素样生长因子-1(IG-1)对成骨细胞的成骨影响[J].中国矫形外科杂志,2002,9(11):1104-1105
- [8]Tumber A,Meikle MC,Hill PA.Autocrine signals promote osteoblast survival in culture[J].J Endocrinol 2000,167(3):383-390
- [9]邵敏,赵静,王斌.不同中药含药血清对体外培养成骨细胞影响的实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2006,14(5):19-21

编号:EA-11022309(修回:2011-08-10)