微量元素与朝鲜淫羊藿中黄酮对原代成骨细胞增殖和分化的拮抗与协同效应

张大威[①②] 程 岩[①] 张金超[③④] 王新峦[①] 王乃利[①] 陈 瑶[②] 杨梦甦[②③*] 姚新生[①*]

(① 沈阳药科大学天然药物化学教研室, 沈阳 110016; ② 香港城市大学深圳研究院药用生物芯片重点实验室, 深圳 518057;
③ 香港城市大学生物及化学系, 香港; ④ 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002.
* 联系人, E-mail: bhmyang@cityu.edu.hk; yaoxinsheng@vip.tom.com)

摘要 研究了淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷与淫羊藿中含量较高的微量元素合用以及单独应用对原代成骨细胞增殖以及分化的影响, 并通过统计学分析以期发现是否存在潜在的协同、拮抗与加和效应. 结果表明 10 μmol/L Zn, Ca 和 Mn 与总黄酮/淫羊藿苷合用明显改善成骨细胞的存活率; 同时, 显著促进成骨细胞的分化. 此外, 0.1 和 1 μmol/L Zn 与 10 μmol/L 淫羊藿苷, 10 μmol/L Mn 与 0.06 μg/mL 总黄酮合用对成骨细胞的增殖显示出较强的抑制效应. 同时, 在某些淫羊藿苷-Zn/Mn, 总黄酮-Zn/Ca/Mn 合用时, 对成骨细胞的分化也显示出一定的抑制效应. 结果显示, 3 种矿物元素与淫羊藿苷、总黄酮的某些组合可以有效地提高淫羊藿苷、总黄酮对原代成骨细胞增殖和分化的作用.

关键词 淫羊藿 淫羊藿苷 总黄酮 钙 锌 锰 成骨细胞 增殖 分化 协同作用

骨质疏松是一种以骨密度降低、骨组织微结构破坏为特征, 从而导致骨骼脆性增加和易发生骨折的全身性骨骼病患. 随着人口老龄化社会的到来, 骨质疏松及其引起的骨折构成了对公共健康的巨大威胁. 动物实验表明, 淫羊藿等中药对骨质疏松和骨折具有一定的预防和治疗作用 [1~3]. 中药淫羊藿含有黄酮、植物甾醇等多种药用活性成分, 在心血管疾病、关节炎、不孕不育、腰膝酸软、肢体麻木无力等方面已经有近千年的应用 [4]. 近年来许多研究表明淫羊藿在骨质疏松的治疗方面显示出一定的潜力, 因此, 淫羊藿在治疗骨质疏松的复方中得到广泛应用 [5~7]. 但是, 绝大多数研究都是集中于淫羊藿中的黄酮成分. 实验表明, 淫羊藿粗提物、总黄酮、以及主要黄酮成分(*Epimedium brevicornum* Maxim, *E. koreanum* Nakai)显示一定的促进成骨细胞[8~10]以及成骨细胞样细胞UMR-106 的增殖活性 [11,12].

近年来, 营养素对骨生理的影响引起人们的广泛兴趣. 这些营养素包括: 矿物质, 如钙、镁、锌、铜、锰和硅; 维生素, 如维生素C、维生素K和维生素A; 以及常量营养物, 如蛋白质、脂肪酸和糖等 [13]. 矿物元素在一些基本的生化代谢过程中发挥一定的作用, 而且矿物元素生化重要性的研究也随之增加. 如钙在各种细胞信号传递过程中发挥信使的作用. 在骨骼与外周血之间存在着钙离子的稳态平衡, 且血清中钙离子浓度保持在 1 mg/L水平 [14]. 钙的摄入与上述钙平衡存在密切关系, 而钙补充制剂可以有效减缓绝经期后期妇女脊椎以及四肢骨的骨丢失 [15]. 锌和铜作为酶辅助因子促进骨矿化以及骨胶原结构的形成, 从而在结缔组织代谢中发挥重要作用 [16]. 很多研究显示, 锌补充疗法可以增强人体免疫功能, 促进性成熟, 缓解氧化损伤 [17]. 但是在体外锌抑制成骨细胞的分化从而影响矿化组织的形成 [18]. 近来基于老年健康受试者的一项临床研究显示出骨质疏松与锌缺乏之间的临床关系 [19]. 锰作为酶的组分或激活物在一系列生理过程中发挥重要作用, 而且锰缺乏可以引起许多物种动物的骨发育异常. 如锰是糖基转移酶的首选辅助因子, 而糖基转移酶在合成正常软骨与骨骼形成中发挥重要的作用 [20].

此外, 中药中含有多种微量元素, 而且其含量具有一定的潜在生物效应. 然而中药中的微量元素并没有引起足够的重视, 目前的研究多是分别研究化学成分与微量元素的有效性. 本文中, 我们选择 3 种淫羊藿中含量较高的矿物元素: Ca, Zn, Mn, 来研究微量元素是否以及如何影响总黄酮、淫羊藿苷对成骨细胞增殖和分化的效应.

2007-02-05 收稿, 2007-06-01 接受
国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合基金(批准号: 30418007)、深圳市科技局重点实验室资助项目

1 实验

(ⅰ) 材料. 朝鲜淫羊藿(*E. koreanum* Nakai) 药材于 2003 年 6~7 月份采集于辽宁新宾, 并经过沈阳药科大学生药学专业孙启时教授鉴定. 样本(No. 19980816-1)保存在深圳中药及天然药物研究中心标本室.

新生 NIH 小鼠购自广州中医药大学实验动物中心, SPF 级, 合格证号: SCXK 2003-0001. 胰酶、胎牛血清购自 Gibco. MTT(噻唑蓝)、17β-雌二醇、青霉素、链霉素、Ⅱ型胶原酶和 DMEM 培养基(无酚红)购自 Sigma. 碱性磷酸酶活力试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 蛋白含量试剂盒购自碧云天生物技术研究所. 氯化锌、氯化钙、氯化锰以及其他试剂均为分析纯.

(ⅱ) 测试样品的配制. 淫羊藿苷和总黄酮按照文献方法制备 [21]. 淫羊藿苷和总黄酮以二甲基亚砜(DMSO)分别配成 10 mmol/L, 6 mg/mL 贮备液, 临用前以培养基稀释到工作液浓度. NaF和 17β-雌二醇分别以PBS和无水乙醇配成 10 mmol/L贮备液, 临用前以培养基稀释作为阳性对照. $ZnCl_2$, $CaCl_2$ 以及$MnCl_2$ 溶解方式同NaF. 为了避免DMSO和乙醇对实验结果的影响, 严格控制其含量在 0.1%(体积比)以下, 同时在对照组添加同样浓度的DMSO和无水乙醇.

(ⅲ) 原代成骨细胞的分离. 原代成骨细胞按照文献 [22]方法, 采用酶系列消化方法从新生 24 h NIH 乳鼠颅盖骨制备. 即无菌条件下分离出颅盖骨, 以手术刀刮去骨内外膜. 将骨片切成 1~2 mm^2 大小碎片, 然后顺次以 2.5 g/L胰酶消化 30 min, 1.0 g/L Ⅱ型胶原酶消化 2 次各 1 h. 收集胶原酶消化下来的细胞于含 10%血清, 100 U/mL青霉素, 100 μg/mL链霉素的 DMEM培养基中, 在 37℃, 5% CO_2 条件下培养 24 h, 换液. 取第 2~4 代细胞, 待细胞生长汇合 70%, 以 0.25%胰酶消化后, 调整细胞密度 2.5×10^4 个/cm^2 接种于 96 孔及 48 孔培养板中(0.28 cm^2/孔, 0.95 cm^2/孔)在 10%血清, 100 U/mL青霉素, 100 μg/mL链霉素, 37℃, 5% CO_2 条件下继续培养. 黄酮组分(淫羊藿苷 0.1~10 μmol/L, 总黄酮 0.06~6 μg/mL)与 3 种元素($ZnCl_2$/$CaCl_2$/$MnCl_2$ 0.1~10 μmol/L)为临用前配制, 合用时同时加入. 为了排除类固醇成分对增殖的影响, 选用不含有酚红的培养基添加医用活性碳处理过的血清.

(ⅳ) 测定样品对成骨细胞增殖的影响. 采用噻唑蓝(MTT)方法研究药物对成骨细胞增殖的影响 [23]. 具体如下: 将成骨细胞以 2.5×10^4 个/cm^2 接种于 96 孔培养板中, 静置 24 h后加药, 随后继续培养 48 h. 实验结束前 4 h向培养板中加入MTT (20 μL, 5 mg/mL), 培养 4 h. 实验结束去掉培养基, 每孔加入 100 μL DMSO溶解甲臜, 随后在酶标仪上测定 570 nm吸光度, 参考波长 655 nm (Bio-rad Model 680, USA).

(ⅴ) 测定药物成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性的影响. 在测定碱性磷酸酶活力以及总蛋白含量实验中, 成骨细胞以 2.5×10^4 个/cm^2 接种于 48 孔培养板中, 加药后作用 3 d. 随后经−80℃反复冻融同时超声裂解细胞. 每孔裂解液分别按照碱性磷酸酶活力试剂盒以及蛋白含量试剂盒方法测定碱性磷酸酶活力以及总蛋白含量. 实验结果以蛋白含量归一化. 酶活力单位定义: 1 g 组织蛋白在 37℃与底物作用 15 min 产生 1 μg 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位.

(ⅵ) 统计分析. 所有数据来自至少 3 次独立实验, 采用平均值±标准偏差表示. 数据的组内比较采用方差分析(ANOVA). 组间比较采用双因素方差分析方法. $P<0.05$ 认为具有显著性差异.

2 结果

2.1 淫羊藿苷及总黄酮对原代成骨细胞增殖的影响

如图 1 所示, 阳性对照 1.0×10^{-6} mol/L 17β-雌二醇对原代成骨细胞的增殖促进率为 13%, 而淫羊藿苷(Icariin)与总黄酮(TF)在实验浓度范围内(1.0×10^{-9}~2.0×10^{-5} mol/L 和 6×10^{-7}~1.2×10^{-2} mg/mL)对原代成骨细胞的增殖则显示出一定的抑制作用. 淫

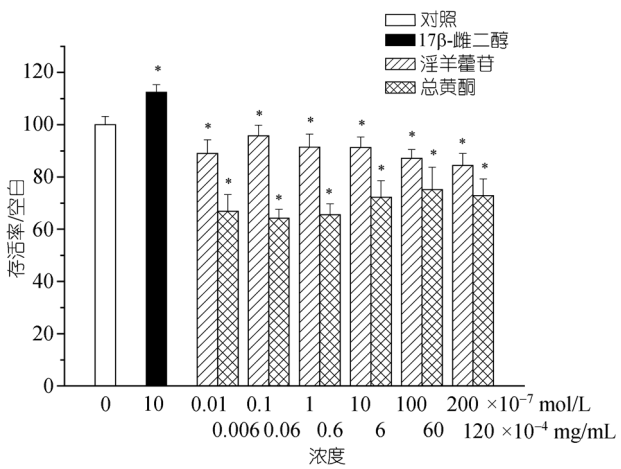


图 1 黄酮成分抑制原代成骨细胞的增殖

$n = 5$, *表示与空白对照组比, $P < 0.05$

羊藿苷与总黄酮的平均抑制率分别在15%和30%左右. 假定黄酮苷的平均分子量为 600, 那么 1.2×10^{-2} mg/mL和6.0×10^{-3} mg/mL 总黄酮相当于 2.0×10^{-5}和 1.0×10^{-5} mol/L 淫羊藿苷. 据此分析, 在同样的浓度下, 总黄酮比淫羊藿苷显示出更强的抑制作用.

2.2 微量元素对成骨细胞增殖的影响

1.0×10^{-6} mol/L 氟化钠对原代成骨细胞的增殖显示出 18%的促进率(图 2). 3 种淫羊藿中含量最高的矿物元素(Ca, Zn, Mn)与黄酮成分一样对成骨细胞的增殖显示出一定的抑制作用. Zn 与 Ca 的抑制效应很相似, 其平均抑制率约 15%; 但是, 在 2.0×10^{-5} mol/L 与对照组比较没有统计学差异. Zn 和 Mn 相比, 相同浓度下Mn显示出更强的抑制效应. 此外, 在 1.0×10^{-9} ~ 1.0×10^{-5} mol/L 浓度范围, 钙、锌和锰显示出持续的抑制效应但没有剂量依赖性.

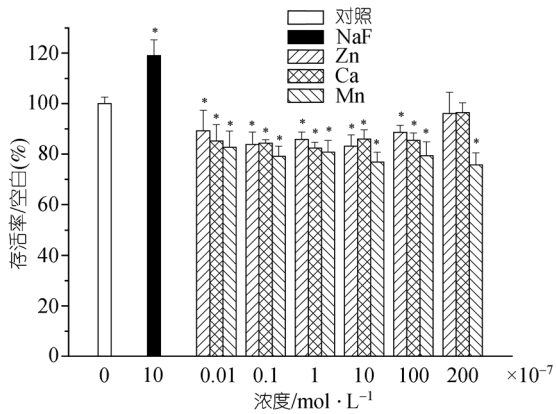


图 2　微量元素抑制原代成骨细胞的增殖

$n = 5$, *表示与空白对照组比, $P < 0.05$

2.3 淫羊藿苷+微量元素及总黄酮+微量元素对原代成骨细胞增殖的影响

为了研究微量元素与黄酮合用是否可以提高黄酮的有效性, 我们研究了微量元素与黄酮合用对原代成骨细胞增殖的影响, 旨在分析其是否存在潜在的协同、加和或拮抗作用. 如图 3 中数据所示, 10 μmol/L Zn, Ca 和 Mn 与黄酮合用与分别单独使用比较对成骨细胞的增殖显示出较强的拮抗作用. 例如, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L 淫羊藿苷, 10 μmol/L Zn/Ca/Mn 单独作用时成骨细胞存活率为 89.9%(淫羊藿苷 0.1 μmol/L), 88.7%(淫羊藿苷 1 μmol/L), 88.6%(Zn), 85.5%(Ca)和 79.3%(Mn), 而其合用 48 h 后成骨细胞的存活率提高到 96.7%, 93.0%, 104.0%, 105.6%, 105.3%, 101.7% (图 3(a), (c) (e)). 同样, 10 μmol/L Zn 和 Ca 与 0.06, 0.6 和 6 μg/mL 总黄酮共同作用 48 h, 成骨细胞的存活率为 97.1%, 102.7%, 106.8%, 100.3%, 98.2%和 98.4%; 而其单独应用时的存活率分别为 88.6%(Zn), 85.5%(Ca), 66.1%(总黄酮 0.06 μg/mL), 72.2%(总黄酮 0.6 μg/mL)和 73.9%(总黄酮 6 μg/mL) (图3(b)和(d)). 此外, 拮抗作用也出现在其他的一些淫羊藿苷-Zn/Ca/Mn 和总黄酮-Ca 的合用中. 与此相反, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L Zn 与 10 μmol/L 淫羊藿苷合用, 10 μmol/L Mn 与 0.06 μg/mL 总黄酮合用, 显示出更强的抑制效应: 71.5%, 67.5%, 58.1% (85.8% Zn (0.1 μmol/L), 83.2% Zn (1 μmol/L); 图 3(a)和(f)).

2.4 淫羊藿苷及总黄酮对原代成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活性的影响

如图 4 所示, 1.0×10^{-6} mol/L 17β-雌二醇对原代成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活力的促进率达 56.2%. 同样, 在不同浓度的淫羊藿苷以及总黄酮对原代成骨细胞的分化过程中碱性磷酸酶活力均显示出不同程度的促进效应. 在 1.0×10^{-7}~1.0×10^{-5} mol/L 浓度下, 淫羊藿苷比总黄酮对原代成骨细胞的分化显示出更强的促进作用. 值得注意的是, 淫羊藿苷在 1.0×10^{-9}, 1.0×10^{-7}, 1.0×10^{-6} mol/L 浓度下对成骨细胞碱性磷酸酶活力的促进率高达 2.1, 3.8 和 4.8 倍.

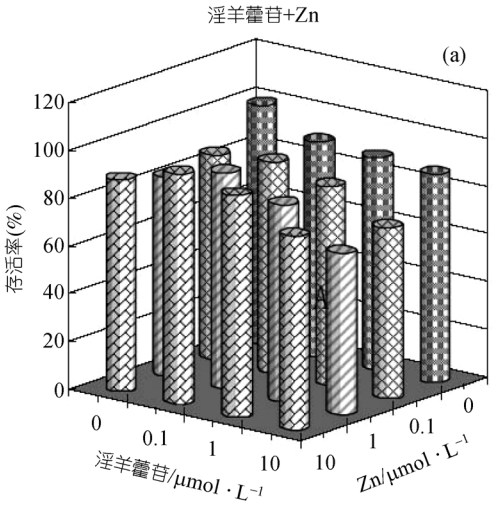
2.5 微量元素对原代成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活力的影响

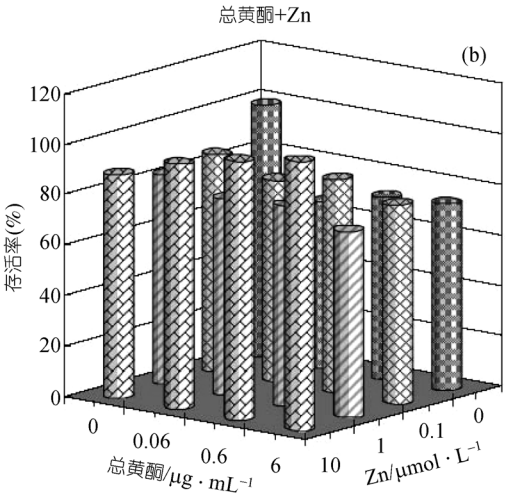
微量元素对成骨细胞分化中碱性磷酸酶活力的影响见图 5. 1.0×10^{-9}~1.0×10^{-5} mol/L 3 种矿物元素显著促进碱性磷酸酶活力, 但是 1.0×10^{-6} mol/L Mn 例外. Zn, Ca 和 Mn 的最大促进率分别出现在 1.0×10^{-8}, 1.0×10^{-7}和 1.0×10^{-5} mol/L, 达到 2.3, 3.4 和 2.1 倍(图 5).

2.6 淫羊藿苷+微量元素以及总黄酮+微量元素对成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活力的影响

黄酮与 3 种矿物元素分别作用 3 天引起成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活力的显著增强(图 4 和 5). 而与单独应用比较, 微量元素的存在非常显著地提高了淫羊藿苷(1.0×10^{-7}~1.0×10^{-5} mol/L)和总黄酮(0.06~6 μg/mL)对成骨细胞分化的作用. 如图 6 所示, 10 μmol/L Zn, Ca 和 Mn 与淫羊藿苷/总黄酮合用对成骨细胞的分化显示较强的协同作用, 而且这一结果与前面对成骨细胞增殖的结果具有相关性(图 3). Zn 显

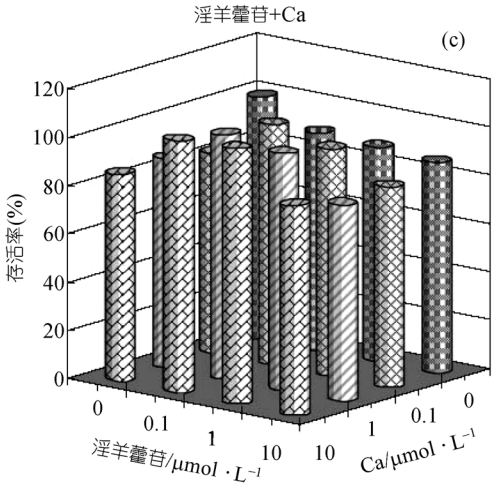
示出最明显的影响, 在多数 Zn 与淫羊藿苷/总黄酮的合用中显示出不同程度的促进或抑制效应. 如 10 μmol/L Zn 与淫羊藿苷(1.0×10^{-7}~1.0×10^{-5} mol/L)或总黄酮(0.06~6 μg/mL)合用提高碱性磷酸酶活力达 3.9, 5.8,

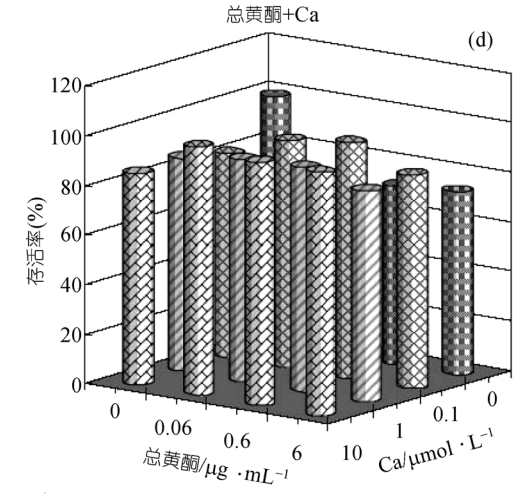




存活率(%)				Zn /μmol·L^{-1}
100.0±3.2	89.9±5.2*	88.7±4.1*	87.2±5.0*	0
85.8±3.0*	88.3±7.6*	83.2±6.9*	71.5±5.1$^{*\#}$	0.1
83.2±4.4*	90.3±7.4*	82.5±3.8*	67.5±6.4$^{*\#}$	1
88.6±2.8*	96.7±8.1$^{\#}$	93.0±8.6$^{*\#}$	81.4±8.7$^{*\#}$	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol·L^{-1}

存活率(%)				Zn /μmol·L^{-1}
100.0±5.8	66.1±4.2*	72.2±3.4*	73.9±6.4*	0
85.8±3.0*	80.0±6.0*	84.7±2.8*	79.0±6.3*	0.1
83.2±4.4*	78.1±6.5*	79.5±2.6*	73.8±5.3*	1
88.6±2.8*	97.1±4.3$^{\#}$	102.7±6.5$^{\#}$	106.8±4.7$^{*\#}$	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg·mL^{-1}

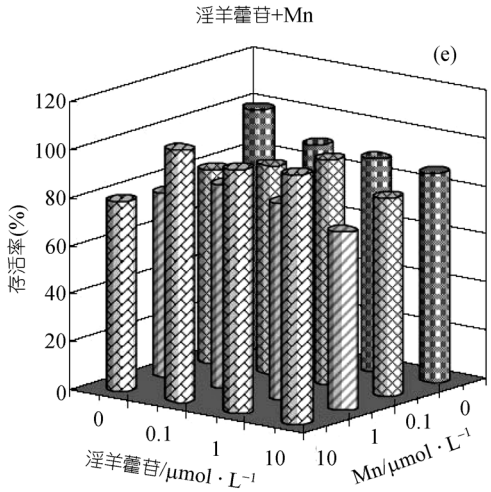


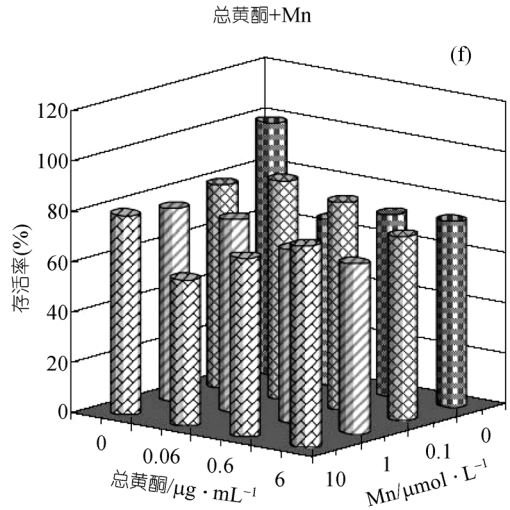


存活率(%)				Ca /μmol·L^{-1}
100.0±1.2	89.9±5.2*	88.7±4.1*	87.2±5.0*	0
82.4±2.3*	99.2±2.9$^{\#}$	93.9±7.2$^{\#}$	82.8±6.6*	0.1
86.0±3.6*	100.7±5.4$^{\#}$	97.8±4.9$^{\#}$	81.2±8.7*	1
85.5±2.9*	104.0±8.0$^{\#}$	105.6±8.0$^{\#}$	86.7±10.3*	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol·L^{-1}

存活率(%)				Ca /μmol·L^{-1}
100.0±4.5	66.1±4.2*	72.2±3.4*	73.9±6.4*	0
82.4±2.3*	91.7±2.3$^{*\#}$	95.2±2.6$^{*\#}$	86.2±5.4*	0.1
86.0±3.6*	89.6±5.3$^{*\#}$	90.6±2.2$^{*\#}$	85.3±7.2*	1
85.5±2.9*	100.3±3.2$^{\#}$	98.2±6.9$^{\#}$	98.4±5.0$^{\#}$	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg·mL^{-1}

(转下页)





存活率(%)				Mn /μmol · L⁻¹
100.0±3.4	89.9±5.2*	88.7±4.1*	87.2±5.0*	0
80.8±4.6*	87.1±2.6*	94.0±8.9*#	82.7±6.5*	0.1
76.9±3.9*	84.8±4.6*	82.0±7.7*	74.5±6.2*	1
79.3±5.6*	105.3±4.0#	101.7±6.6#	104.2±3.7*#	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol · L⁻¹

存活率(%)				Mn /μmol · L⁻¹
100.0±3.5	66.1±4.2*	72.2±3.4*	73.9±6.4*	0
80.8±4.6*	86.7±7.0*#	82.6±4.9*	73.3±3.1*	0.1
76.9±3.9*	76.7±7.4*	69.3±4.4*	67.8±4.3*#	1
79.3±5.6*	58.1±10.8*#	71.1±8.2*	80.2±8.6*	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg · mL⁻¹

图 3　药物合用对原代成骨细胞增殖的影响

(a) 淫羊藿苷+Zn; (b) 总黄酮+Zn; (c) 淫羊藿苷+Ca; (d) 总黄酮+Ca; (e) 淫羊藿苷+Mn; (f) 总黄酮+Mn. 成骨细胞增殖以 $A_{样品}/A_{空白}\times100\%$表示, $A_{空白}$设定为 100. *表示与空白对照比较, $P<0.05$; #表示与淫羊藿苷/总黄酮, 以及 Zn/Ca/Mn 比较, $P<0.05$

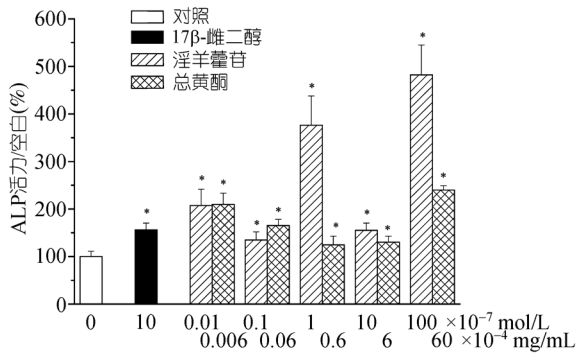


图 4　黄酮成分促进原代成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的活力

$n=5$, *表示与空白对照组比, $P<0.05$

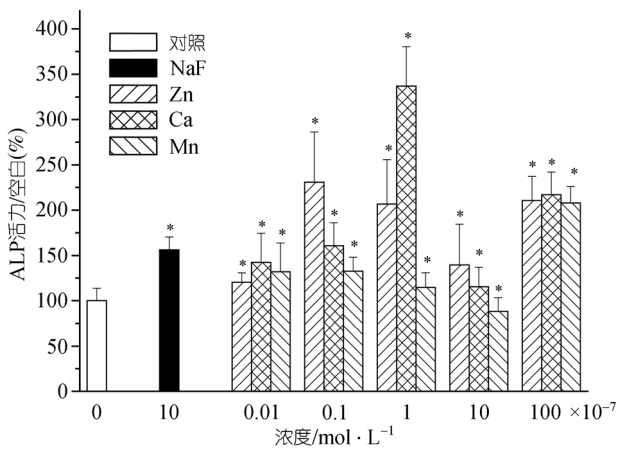
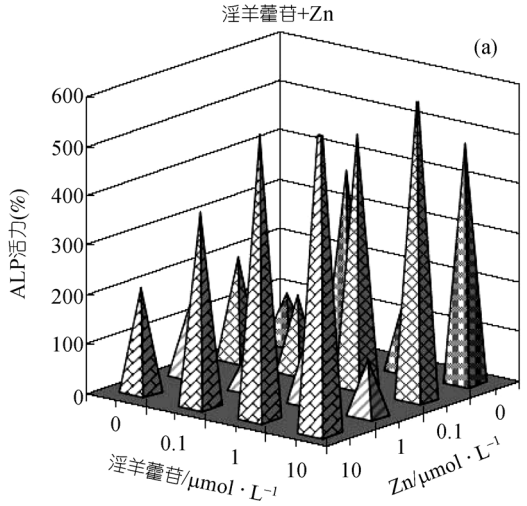


图 5　微量元素促进成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活力

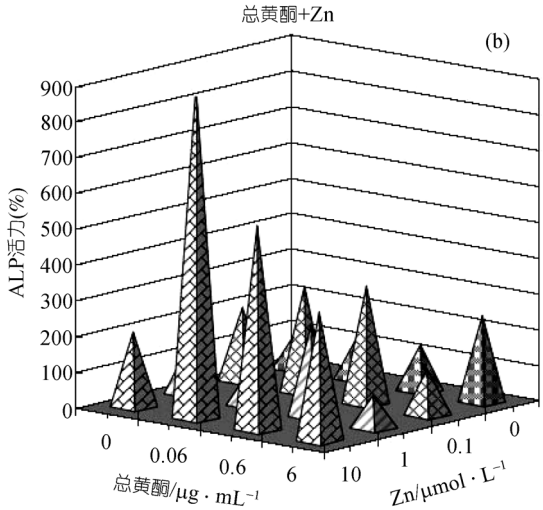
$n=5$, *表示与空白对照组比, $P<0.05$

7.1, 9.4, 5.7 和 3.6 倍, 而其单独作用时仅为 2.1 倍(Zn), 3.8 倍(淫羊藿苷 0.1 μmol/L), 1.6 倍(淫羊藿苷 1 μmol/L), 4.8 倍(淫羊藿苷 10 μmol/L), 1.2 倍(总黄酮 0.06 μg/mL), 1.3 倍(总黄酮 0.6 μg/mL)和 2.4 倍(淫羊藿苷 6 μg/mL) (图 6(a)和(b)). 再如, 在前面的实验中 10 μmol/L Ca 与 0.1 μmol/L 淫羊藿苷或总黄酮(0.6, 6 μg/mL)合用显著减弱了黄酮成分对成骨细胞增殖的抑制效应(图3(c)和(d)), 显著促进了碱性磷酸酶活力达 4.4, 3.5 和 2.6 倍(Ca 2.2 倍, 图 6(c)和(d)). 对于 Mn 而言, 10 μmol/L Mn 分别与 10 和 1 μmol/L 淫羊藿苷合用显示出明显的协同作用(图6(e)), 且前者的作用更加强烈并与对成骨细胞增殖的影响相一致(图3(e)). 与此

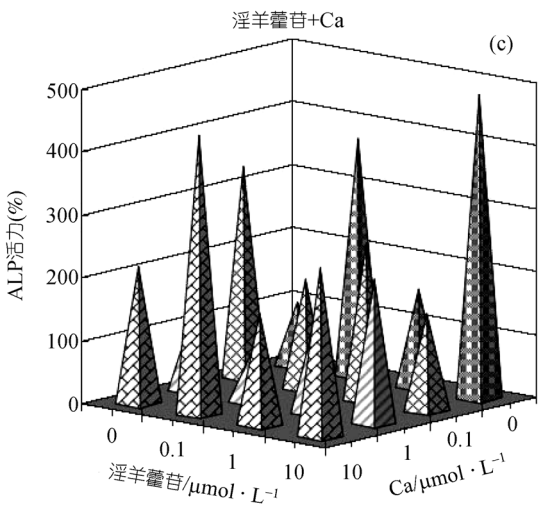
同时, 在某些淫羊藿苷-Zn/Mn合用以及总黄酮-Zn/Ca/Mn合用时, 成骨细胞的碱性磷酸酶活性有所降低. 比如, 10 μmol/L 淫羊藿苷与 1 μmol/L Zn 合用, 以及 0.06 μg/mL 总黄酮与 10 μmol/L Mn 合用, 在抑制成骨细胞增殖的同时(图3(a)和(f)), 对成骨细胞的碱性磷酸酶活力也显示出较强的抑制效应(图 6(a)和(f)).



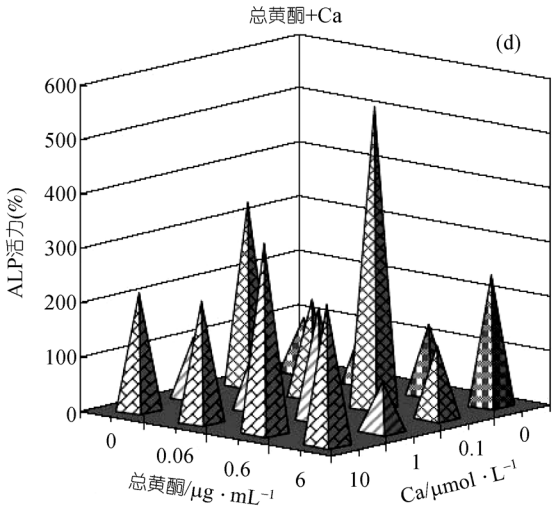
ALP 活力(%)				Zn /μmol·L^{-1}
100.0±8.6	376.5±61.2*	155.1±15.2*	482.0±62.9*	0
206.6±49.2*	156.0±11.9$^{*\#}$	508.3±53.4$^{*\#}$	628.2±34.8$^{*\#}$	0.1
139.6±44.8*	80.9±7.2$^{*\#}$	143.5±7.8*	113.4±11.2$^{*\#}$	1
210.6±26.5*	391.8±28.9$^{*\#}$	575.5±33.2$^{*\#}$	705.8±40.4$^{*\#}$	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol·L^{-1}



ALP 活力(%)				Zn /μmol·L^{-1}
100.0±6.2	124.6±18.4*	130.1±12.8*	239.9±9.3*	0
206.6±49.2*	299.2±10.4$^{*\#}$	327.5±15.2*	129.0±4.1$^{*\#}$	0.1
139.6±44.8*	94.0±5.3$^{\#}$	256.1±10.5*	92.3±2.8$^{\#}$	1
210.6±26.5*	937.1±92.2$^{*\#}$	568.2±13.4$^{\#}$	360.4±24.5$^{*\#}$	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg·mL^{-1}

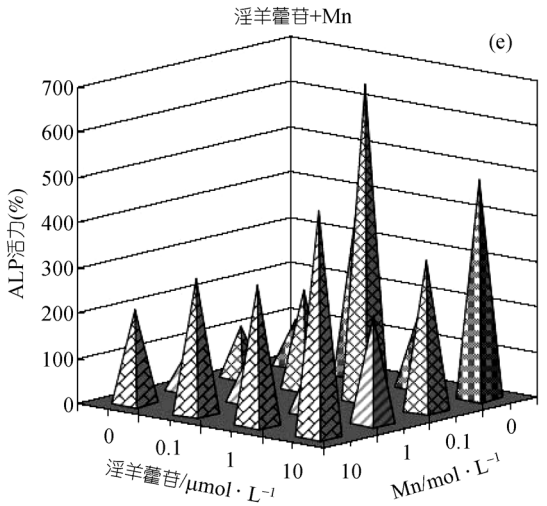


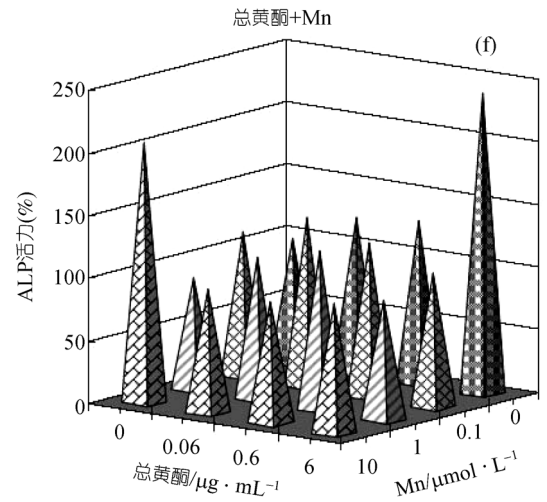
ALP 活力(%)				Ca /μmol·L^{-1}
100.0±9.3	376.5±61.2*	155.1±15.2*	482.0±62.9*	0
336.9±43.3*	175.2±6.3$^{*\#}$	249.2±21.7*	155.3±9.7$^{*\#}$	0.1
110.6±21.2*	78.2±8.6$^{*\#}$	127.8±7.9*	227.7±78.8*	1
216.9±25.1*	444.0±32.4$^{*\#}$	177.7±6.2*	267.2±13.4*	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol·L^{-1}



ALP 活力(%)				Ca /μmol·L^{-1}
100.0±4.8	124.6±18.4*	130.1±12.8*	239.9±9.3*	0
336.9±43.3*	178.6±3.4*	553.4±24.6$^{*\#}$	134.5±3.9$^{*\#}$	0.1
110.6±21.2*	121.2±3.2*	207.9±19.8$^{*\#}$	91.2±2.6$^{\#}$	1
216.9±25.1*	222.6±3.4*	349.1±19.5$^{*\#}$	259.4±15.5$^{*\#}$	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg·mL^{-1}

(转下页)





ALP 活力(%)				Mn /μmol·L^{-1}
100.0±6.1	376.5±61.2*	155.1±15.2*	482.0±62.9*	0
114.8±16.1*	216.8±21.8*	696.2±50.3$^{*\#}$	332.7±9.9*	0.1
88.1±15.4*	104.1±10.2	111.0±7.4*	237.0±5.9*	1
207.8±18.4*	298.4±15.3*	308.5±14.9$^{*\#}$	496.5±21.6$^{*\#}$	10
0	0.1	1	10	淫羊藿苷 /μmol·L^{-1}

ALP 活力(%)				Mn /μmol·L^{-1}
100.0±3.4	124.6±18.4*	130.1±12.8*	239.9±9.3*	0
114.8±16.1*	135.4±13.2$^{*\#}$	122.2±11.5*	106.3±10.4	0.1
88.1±15.4*	113.5±8.2*	126.8±9.9*	94.9±7.4	1
207.8±18.4*	97.9±3.2$^{\#}$	96.1±5.9$^{\#}$	103.3±5.2$^{\#}$	10
0	0.06	0.6	6	总黄酮 /μg·mL^{-1}

图 6　淫羊藿苷+微量元素以及总黄酮＋微量元素对成骨细胞分化中碱性磷酸酶的活力显示出显著协同作用

(a) 淫羊藿苷+Zn; (b) 总黄酮+Zn; (c) 淫羊藿苷+Ca; (d) 总黄酮+Ca; (e) 淫羊藿苷+Mn; (f) 总黄酮+Mn. 碱性磷酸酶活力以 ALP $_{样品}$/ALP $_{空白}$×100% 表示, ALP $_{空白}$ 设定为 100. * 表示与空白对照比较, $P < 0.05$; #表示与淫羊藿苷/总黄酮, 以及 Zn/Ca/Mn 比较, $P < 0.05$

3　结论

营养失调, 特别是微量元素和维生素缺乏, 在更年期变得非常显著. 微量元素在骨基质合成过程中发挥催化作用, 从而影响正常骨骼发育和更新 [24]. 钙作为骨基质的主要组分, 在预防和治疗骨丢失中备受关注; 同样, 其他的矿物元素在骨代谢和钙代谢中也不容忽视. 有研究发现女性骨质疏松患者体内血浆中钙、锌、锰的含量明显降低, 提示骨质疏松与微量元素的缺乏存在一定联系 [19,25]. 此外, 临床研究也证实, 补充Ca, Zn和Mn可以有效提高绝经期后期女性的脊椎骨骨矿物质密度 [26~28].

根据中医药的观点, 人体发生疾病的根源在于人体器官功能失调从而导致人体内部平衡的破坏 [29]. 实际上就其复杂性而言, 每味中药都是一个小复方, 其中多种成分通过复杂的机制恢复上述人体内部的平衡. 多数中药在体内均显示出较好的疗效, 但是从中药中提取分离得到的主要成分或粗提物针对体外细胞模型的作用通常并不明显. 因此, 中药的临床效果有可能存在多种不同的作用模式. 比如, 经过体内代谢以活性代谢产物发挥作用, 或通过中药中各种复杂成分之间的协同、加和等作用. 动物实验显示很多中药对骨质疏松及其引起的骨折具有较好的治疗作用 [2,3]. 可是骨碎补水提物(*Drunaria fortunei*)在体外却显示出抑制成骨细胞增殖与分化的作用 [30]. 再如, 淫羊藿粗提物和黄酮成分在动物实验中显示出较好的治疗和预防骨质疏松功效 [1~3,12]; 然而, 当其作用于成骨细胞时并没有显示出应有的效果 [1]. 但是, 从给药阔叶淫羊藿(*E. sagittatum*)的动物体内分离的血清却显著促进成骨细胞的增殖和分化, 从而提示淫羊藿中黄酮可能通过其活性代谢产物促进成骨细胞的发育成熟 [1].

本研究表明淫羊藿苷/总黄酮与矿物元素(Zn, Ca, Mn)合用对原代成骨细胞的存活率显示出较强的拮抗作用, 而对成骨细胞分化中碱性磷酸酶活力则显示出较强的协同效应. 如图 3 和 6 所示, 10 μmol/L Zn, Ca 或 Mn 与淫羊藿苷/总黄酮合用减弱了黄酮成分对成骨细胞增殖的抑制作用, 同时与黄酮成分和矿物元素单独作用比较, 显著提高了成骨细胞的碱性磷酸酶活力. 如 10 μmol/L Zn 与 1.0×10^{-7} ~ 1.0×10^{-5} mol/L 淫

羊藿苷, 或 0.06~6 μg/mL 总黄酮合用在改善成骨细胞存活率的同时, 显著增强了成骨细胞的碱性磷酸酶活力, 分别达到 3.9, 5.8, 7.1, 9.4, 5.7 和 3.6 倍. 此外, 10 μmol/L Ca 与 0.1 μmol/L 淫羊藿苷, 或 0.6, 6 μg/mL 总黄酮, 10 μmol/L Mn 与 10, 1 μmol/L 淫羊藿苷合用显示出明显的协同作用, 并与对成骨细胞增殖的影响相一致. 相反, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L Zn 与 10 μmol/L 淫羊藿苷, 10 μmol/L Mn 与 0.06 μg/mL 总黄酮合用对成骨细胞的增殖则显示出更强的抑制效应. 同时, 在某些淫羊藿苷-Zn/Mn 以及总黄酮-Zn/Ca/Mn 合用下也出现了对成骨细胞碱性磷酸酶活力促进率降低的拮抗现象. 比如, 淫羊藿苷(10 μmol/L)-Zn(1 μmol/L)以及总黄酮(0.06 μg/mL)-Mn(10 μmol/L)合用, 对成骨细胞的增殖显示出更强的抑制效应, 同时合用时与各自对成骨细胞的分化的促进作用比较也有所降低. 综上所述, 实验结果显示黄酮成分与微量元素之间存在着相互影响, 同时也显示中药中其他成分之间也存在着潜在的相互影响, 而这些影响在一定程度上决定了中药的最终功效. 总之, 中药预防和治疗骨质疏松的作用机制非常复杂, 涉及到多种化学成分和各种微量元素的作用, 有待于进一步的研究. 另外, 按照常规“还原法”的研究思维, 通过化学分离和体外细胞模型或生化指标, 期望找到可以代表中药药效的活性单体, 通常结果是化学成分分离不少, 而真正的活性成分却难以确定. 本文报道的结果表明, 可以按照中医药的观点, 采用“组合法”, 即将几种化学成分或化学成分与矿物元素的组合, 用来研究中药的作用物质基础, 这也是本文希望提出的思考和探讨.

参 考 文 献

1 Chen K M, Ge B F, Ma H P, et al. The serum of rats administered flavonoid extract from *Epimedium sagittatum* but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro*. Pharmazie, 2004, 59(1): 61—64
2 Hidaka S, Okamoto Y, Nakajima K. Preventive effects of traditional Chinese medicines on experimental osteoporosis induced by ovariectomy in rats. Calcif Tissue Int, 1997, 61: 239—246[DOI]
3 Huang H F, You J S. The use of Chinese herbal medicine on experimental fracture healing. Am J Chin Med, 1997, 25: 351—356[DOI]
4 Yeung, H C. Handbook of Chinese Herbs and Formulas. Los Angeles: Institute of Chinese Medicine, 1985
5 黄健, 张金超, 张天蓝, 等. 淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收功能的影响及其作用机制. 科学通报, 2006, 51(24): 2851—2856
6 安胜军, 李桃, 李恩. 补肾方药对绝经后妇女卵巢功能和骨密度的影响. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(2): 55—59
7 Wu H, Lien E J, Lien L L. Chemical and pharmacological investigations of Epimedium species: A survey. Prog Drug Res, 2003, 60: 51—57
8 韩立民, 刘波, 徐彭. 淫羊藿总黄酮对成骨细胞增殖的影响. 上海中医药杂志, 2003, 37(6): 55—57
9 李勇, 季晖, 李萍, 等. 淫羊藿总黄酮对体外培养成骨细胞的影响. 中国药科大学学报, 2002, 33(1): 48—50
10 王俊勤, 胡有谷, 郑洪军, 等. 淫羊藿甙对体外培养成骨细胞增值和分化的影响. 中国临床康复, 2002, 6(9): 1307—1308
11 Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. Phytomedicine, 2005, 12(3): 189—193[DOI]
12 Xie F, Wu C F, Lai W P, et al. The osteoprotective effect of Herba epimedii (HEP) extract *in vivo* and *in vitro*. eCAM, 2005, 2(3): 353—361
13 Tucker K L. Dietary in take and bone status with aging. Curr Pharm Design, 2003, 9: 2687—2704[DOI]
14 Fujita T. Calcium bioavailability from heated oyster shell-seaweed calcium. Active absorbable algae calcium as assessed by urinary calcium excretion. J Bone Miner Metab, 1996, 14: 31—34[DOI]
15 Reid I R, Ames R W, Evans M C, et al. Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. N Engl J Med, 1993, 328: 460—464[DOI]
16 Beattie J, Avenell A. Trace element nutrition and bone metabolism. Nutr Res Rev, 1992, 5: 167—188[DOI]
17 Bray T M, Brettger W J. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Rad Biol Med, 1990, 8: 281—291[DOI]
18 Kishi S, Yamaguchi M. Inhibitory effect of zinc compounds on osteoblast-like cell formation in mouse marrow cultures. Biochem Pharmacol, 1994, 48: 1225—1230[DOI]
19 Relea P, Revilla M, Pipoll E, et al. Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. Age Aging, 1995, 24: 303—307[DOI]
20 Keen C L, Zidenberg-Cherr S. Manganese. In: Ziegler E E, Filer L J, eds. Present Knowledge in Nutrition. 7th ed. Washington: ILSI Press, 1996
21 Zhang D W, Cheng Y, Zhang J C, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. Phytomedicine, doi: 10.1016/j.phymed.2007.04.002
22 Chen T, Fry D. Hormonal regulation of the osteoblastic phenotype expression in neonatal murine calvarial cells. Calcif Tissue Int, 1999, 64: 304—309[DOI]
23 Carmichael J, Degraff W G, Gazdar A F, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 1987, 47: 936—942
24 Gür A, Çolpan L, Nas K, et al. The role of trace minerals in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis and a new effect of calcitonin. J Bone Miner Metab, 2002, 20: 39—43[DOI]
25 Freeland-Graves J, Llanes C. Models to study manganese deficiency. In: Klimis-Tavantzis D L, ed. Manganese in Health and Disease. Boca Raton: CRC Press, Inc, 1994
26 Strause L, Saltman P, Smith K T, et al. Spinal bone loss in postmenopausal women supplemented with calcium and trace minerals. J Nutr, 1994, 124(7): 1060—1064
27 Rico H, Gomez-Raso N, Revilla M, et al. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitomeric study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000, 90(1): 97—101[DOI]
28 Nieves J W, Komar L, Cosman F, et al. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: Review and analysis. Am J Clin Nutr, 1998, 67: 18—24
29 Mo F Z. Multi-disciplinary research in traditional Chinese medicine—an exploration. Sci Found China, 2005, 13(2): 45—53
30 Liu H C, Chen R M, Jian W C, et al. Cytotoxic and antioxidant effects of the water extract of the traditional Chinese herb gusuibu (*Drunaria fortunei*) on rat osteoblasts. J Formos Med Assoc, 2001, 100(6): 383—388