

自然铜及其煅淬品中金属元素对促进成骨细胞增殖的谱效关系研究

王聃¹, 侯婧霞¹, 吴育^{1,2}, 高倩倩³, 陈志鹏¹, 李伟东¹ (1. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学南通附属医院药剂科, 江苏 南通 226000; 3. 南京一诺医药科技有限公司, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 探讨自然铜及其煅淬品中 Fe、Zn、Mg、Cu 等多种金属元素与促进成骨细胞增殖的谱效关系。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为空白组、生品组(7.5 g·kg⁻¹)和煅淬品组(7.5 g·kg⁻¹), 按照相应剂量灌胃给药。采用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)法测定给药 0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 后大鼠血清中 Fe、Zn、Mg、Cu 等元素的含量。取新生 24 h 内的 SD 大鼠, 制备成骨细胞, 并以不同时间点含药血清进行干预; 采用 MTT 法测定成骨细胞的增殖情况。采用偏最小二乘回归(PLSR)法对含药血清中的金属元素含量与血清对成骨细胞的增殖作用进行谱效相关性分析, 计算偏回归系数与 VIP 值。**结果** 与空白组比较, 除 12 h 外, 其他各时间点的生品组及煅淬品组的成骨细胞增殖率明显升高($P < 0.01$); 在 3、4 h 2 个时间点, 与生品组比较, 煅淬品组的成骨细胞增殖率明显升高($P < 0.01$)。自然铜生品组 Fe 元素的 VIP 值 > 1 , 煅淬品组中 Fe、Mg 元素的 VIP 值均 > 1 , 且 Fe 元素 VIP 值 $> Mg$ 元素 VIP 值; 自然铜含药血清中 Fe 元素与促进成骨细胞增殖作用的相关性最强, 其次为 Mg、Zn、Cu 元素。**结论** 自然铜生品与煅淬品均能促进成骨细胞增殖, 与其所含 Fe、Zn、Mg、Cu 等金属元素有关, 且与 Fe 的相关性最大。

关键词: 自然铜; 煅淬品; 金属元素; Fe; 成骨细胞增殖; 偏最小二乘回归法; 谱效相关

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)08-1109-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.007

Spectrum-effect Relationships of the Metal Elements in Pyritum, Its Processed Products and Their Activities on Proliferation of Osteoblasts

WANG Dan¹, HOU Jingxia¹, WU Yu^{1,2}, GAO Qianqian³, CHEN Zhipeng¹, LI Weidong¹ (1. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 2. Department of Pharmacy, Nantong Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226000 Jiangsu, China; 3. Nanjing Yinuo Pharmaceutical Technology Co. LTD, Nanjing 210009 Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the spectrum-effect relationships between Fe, Mg, Zn, Cu and other metal elements in pyritum and its processed product and their effect on proliferation of osteoblasts. **Methods** Male SD rats were randomly divided into blank group, raw pyritum group (7.5 g·kg⁻¹) and processed pyritum group (7.5 g·kg⁻¹), and were given intragastric administration according to the corresponding doses. The contents of metal elements in the serum of rats were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) after intragastric administration for 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h. Osteoblasts were prepared from SD rats within 24 h of birth, and drug containing serum was used for intervention at different time points and the proliferation of osteoblasts was determined by MTT assay. Partial least squares regression (PLSR) was used to analyze the spectral-effect

收稿日期: 2020-05-19

作者简介: 王聃, 男, 本科生, 研究方向: 中药学。Email: 2452894367@qq.com。通信作者: 李伟东, 男, 研究员, 研究方向: 中药炮制机理。Email: liweidong0801@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373970)。

correlation between the contents of metal elements in drug serum and the effect of serum on the proliferation of osteoblasts. The partial regression coefficient and the VIP value were calculated. **Results** Compared with the blank group, except for 12 h, the proliferation of osteoblasts was significantly enhanced in the raw pyritum group and the processed pyritum group ($P < 0.01$); and compared with the raw pyritum group, the proliferation rate of osteoblasts in processed pyritum group was significantly increased at 3 h and 4 h ($P < 0.01$). The VIP value of Fe in raw pyritum group was >1 ; and the VIP value of Fe and Mg in processed pyritum group were both >1 , of which the VIP value of Fe was $>$ Mg. Fe has the strongest correlation with the proliferation promoting effect of osteoblasts in drug-containing serum of pyritum, followed by Mg, Zn, and Cu elements. **Conclusion** Both pyritum and its processed products can promote the proliferation of osteoblasts, which may be related to the metal elements contained therein, and the correlation with Fe is the greatest.

Keywords: Pyritum; processed pyritum; metal elements; Fe; osteoblast proliferation; partial least squares regression method; spectrum-effect correlation

自然铜(Pyritum)为硫化物类矿物黄铁矿族黄铁矿, 主要含有二硫化铁(FeS_2), 具有散瘀止痛、续筋接骨的功效, 临床上常用于促进骨折的愈合^[1]。研究^[2]表明, 自然铜能提供骨折愈合所必需的多种金属元素如 Fe、Mg、Zn、Cu 等, 促进胶原纤维形成和钙、磷沉积, 使多种酶的活性增强, 促进骨痂的形成。但是, 这些元素对于促进骨折愈合的作用强弱尚不明确。中药谱效学是以中医药现代理论研究为基础, 探究中药化学成分与药效之间的关系, 以确定发挥药效作用的活性成分的一种方法^[3]。本研究拟采用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)法测定自然铜给药后的入血成分含量, 并采用成骨细胞模型评价自然铜含药血清对成骨细胞的增殖作用, 建立两者之间的“谱”-“效”相关性, 以期确定自然铜促进骨折愈合作用的效应元素, 为阐明自然铜促进骨折愈合的分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 18 只, 体质量 (200 ± 20)g; 新生 24 h 内 SD 大鼠, SPF 级, 10 只, 动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0002, 均由浙江省实验动物中心提供。

1.2 药物及主要试剂 自然铜饮片(批号: 141401), 购于南京海源中药饮片有限公司, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为硫化物类黄铁矿族黄铁矿。胎牛血清(批号: 1495527)、胰蛋白酶(批号: 25200-056)、胶原酶(批号: 101496182), 均购自美国 Gibco 公司; 噻唑蓝(MTT), 合肥 Biosharp 公司, 批号: BS030A; PBS, 美国 Hy-Clone 公司, 批号:

AAE202904; 硝酸(优级纯), 美国 Merck 公司; 金属元素混合标准溶液, 国家有色金属及电子材料分析测试中心, 批号: 05B05。

1.3 主要仪器 OPTIMA5300DV 型电感耦合等离子体发射光谱仪, 美国 PE 公司; Synergy2 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; Axion A1 型倒置显微镜, 德国 Zesis 公司; Forma 88000 型超低温冰箱, 美国 Thermo 公司。

1.4 自然铜药液制备 取净自然铜饮片, 依照煅淬法[2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)0213 炮制通则]煅至暗红, 醋淬至表面呈黑褐色, 光泽消失并酥松, 即为自然铜煅淬品。取自然铜生品、煅淬品各 100 g, 置于砂锅中, 第 1 次加 8 倍量水, 武火煎煮至沸, 文火煎煮 60 min, 过滤; 第 2 次加 6 倍量水, 煎煮 30 min, 过滤; 合并 2 次滤液, 使用旋转蒸发仪浓缩至 $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4°C 保存备用。

1.5 成骨细胞培养 取新生 24 h 内 SD 大鼠 10 只, 以 75%乙醇浸泡 5 min, 无菌条件下取其头盖骨, 置于含双抗的 D-Hanks 溶液中; 清除骨膜、血管等结缔组织, 以 D-Hanks 溶液清洗至骨质发白, 加入 5 mL 0.25%胰蛋白酶, 37°C 下振荡消化 30 min。吸弃上清液, 将头盖骨剪成 1 mm^3 大小骨片, 移入另一直径 60 mm 的培养皿中; 加入 5 mL 0.1% II 型胶原酶, 37°C 下振荡消化 2 h; 轻轻吹打, 收集消化液, 重复消化 1 次; 合并 2 次消化液, 过 200 目细胞筛, 以 $137 \times g$ 离心 10 min; 弃去上清液, 用正常培养液洗去胶原酶, 加入含 15%胎牛血清的培养液, 将沉淀的细胞团块吹打为细胞悬液; 细胞计数后, 以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于细胞瓶, 置于 5% CO_2 培

养箱中培养; 12 h 后更换培养液, 待细胞汇合铺满细胞瓶后, 使用胰蛋白酶消化, 1:3 传代培养, 实验均采用 P3 代细胞。

1.6 分组、给药及含药血清制备 取雄性 SD 大鼠 18 只, 随机分为空白组、生品组 ($7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和煅淬品组 ($7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 6 只, 实验前 12 h 禁食不禁水, 实验 12 h 后饮水。生品组、煅淬品组按照自然铜生品、煅淬品水煎液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的灌胃剂量给药, 空白组灌胃等体积的生理盐水。分别于给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 经大鼠眼球后静脉丛采血约 0.5 mL, 置于 1.5 mL 离心管中, 室温下静置 1 h 后, 以 $9700 \times g$ 离心 5 min, 分离血清, -80°C 冷冻保存, 备用。

1.7 ICP-OES 法测定血清中金属元素含量 取各组不同时间点采集的大鼠血清各 100 μL , 置于 1.5 mL 离心管中, 加入优级纯硝酸 100 μL , 90°C 水浴加热至溶液澄清透明; 放冷, 用超纯水定容至 2 mL 容量瓶中, 摇匀, 得供试品溶液。采用电感耦合等离子体发射光谱仪测定血清中 Fe、Mg、Zn 和 Cu 元素的含量。ICP-OES 工作条件如下, 进样系统: 气动雾化器; 功率: 1 300 W; 冷却气: Ar; 冷却气流速: $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流速: $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样泵流速 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 冲洗时间: 20 s; 积分时间: 5 s。4 种待测元素分析波长如下, Fe: 238.204 nm; Mg: 285.213 nm; Zn: 206.200 nm; Cu: 327.393 nm。以标准品浓度 (X) 为横坐标, 谱线强度 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线如下, Fe 元素标准曲线: $Y=9\ 810X+630.2$, $r=0.999\ 93$; Mg 元素标准曲线: $Y=45\ 250X+3\ 628.0$, $r=0.999\ 70$; Zn 元素标准曲线: $Y=8\ 403X+506.3$, $r=0.999\ 94$; Cu 元素标准曲线: $Y=17\ 490X+817.5$, $r=0.999\ 96$; 上述元素的线性范围均为 $0 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.8 MTT 法检测成骨细胞的增殖 取培养的 P3 代成骨细胞, 按每孔 10^4 个接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL 。于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 24 h, 弃去原培养液, 更换无血清培养液, 饥饿细胞 24 h; 弃去无血清培养液, 向 96 孔板中加入各组不同时间点含药血清培养液和空白组血清培养液 (5%), 以含 10% 胎牛血清的培养液为空白对照, 每组重复 6 个孔。培养 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 180 μL 无血清培养液和 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 4 h; 弃去孔内上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 在振荡器上震荡 10 min 后, 于 490 nm 波长下测定

各孔光密度 (OD) 值。计算: 细胞增殖率 (%) = $[(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) - 1] \times 100\%$ 。

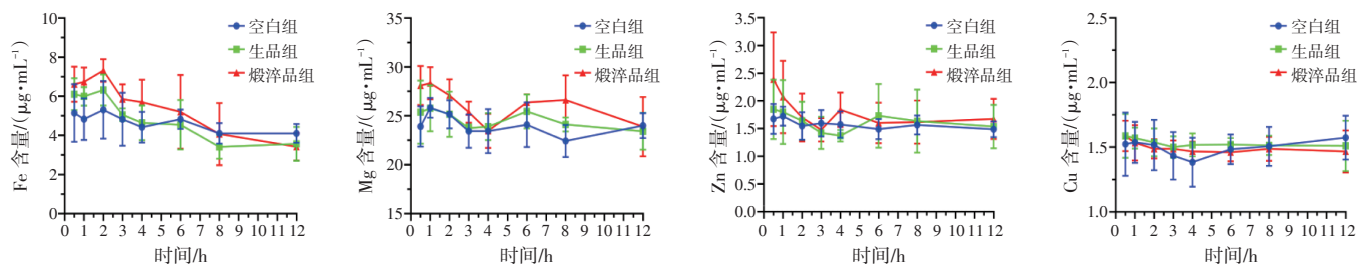
1.9 谱效相关性分析 采用偏最小二乘回归 (PLSR) 法对灌胃后血清中的金属元素含量与血清对成骨细胞的增殖作用进行谱效相关性分析。PLSR 分析法是一种多元统计方法, 主要解决多元回归分析中的变量多重相关性或解释变量多于样本点等实际问题^[4]。利用 SIMCA-P 11.5 Demo 软件对各时间点大鼠含药血清中各金属元素的含量与各时间点大鼠含药血清对成骨细胞增殖率进行 PLSR 分析。将含药血清中 4 种金属元素 (Fe、Mg、Zn、Cu) 的含量设为自变量 $X_1 \sim X_4$, 将成骨细胞增殖率设为因变量 Y , 建立含药血清中金属元素含量与促进成骨细胞增殖作用的回归模型, 记录回归系数与变量投影重要性指标 VIP 值。偏回归系数反映了该元素对药效指标的影响, 回归系数为正数表明该元素含量与该药效指标呈正相关, 负数则相反; 回归系数绝对值越大, 表明该元素对该药效指标的影响越大。变量投影重要性指标 VIP 值用来描述自变量对因变量的解释能力, VIP 值越大 (> 1), 则自变量对因变量的解释能力越强^[5]。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 自然铜对大鼠血清中各金属元素含量的影响 灌胃给予自然铜生品、煅淬品水煎液后 Fe、Mg、Zn、Cu 4 种金属元素在大鼠血清中的含量变化见图 1。灌胃后, 血清中各元素含量总体呈现先上升再下降趋于稳定的趋势。Fe、Zn 元素的上升趋势最为明显, Cu 元素并未有明显上升的趋势。

2.2 自然铜不同时间点含药血清对成骨细胞增殖作用的影响 结果见表 1。与空白组比较, 除 12 h 外, 其他各时间点的生品组及煅淬品组的成骨细胞增殖率均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 在 3、4 h 2 个时间点, 与生品组比较, 煅淬品组的成骨细胞增殖率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明, 自然铜生品及煅淬品含药血清均能促进成骨细胞增殖, 在某些时间点自然铜煅淬品含药血清对成骨细胞的促增殖作用强于生品含药血清。

图1 自然铜对大鼠血清中金属元素含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Figure 1 Effect of pyritum on the contents of metal elements in rats serum($\bar{x} \pm s$, $n=6$)表1 自然铜含药血清对成骨细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 1 Effect of pyritum drug-contained serum on proliferation of osteoblasts($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间/h	成骨细胞增殖率/%		
	空白组	生品组	煅淬品组
0.5	28.41 ± 6.40	46.98 ± 7.22**	53.14 ± 12.53**
1	28.35 ± 5.65	56.41 ± 2.17**	53.86 ± 9.99**
2	19.34 ± 13.11	51.36 ± 19.88**	61.39 ± 14.15**
3	20.52 ± 6.49	46.50 ± 8.93**	73.25 ± 15.35***
4	18.09 ± 4.99	45.73 ± 5.05**	65.12 ± 8.05***
6	25.50 ± 4.49	47.92 ± 11.02**	60.74 ± 9.95**
8	19.22 ± 12.20	48.22 ± 7.71**	56.94 ± 7.06**
12	22.24 ± 7.06	26.75 ± 17.00	30.19 ± 8.32

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$; 与生品组相比, *** $P < 0.01$

2.3 谱效关系分析 结果见表2。除了生品组 Mg 元素的偏回归系数 < 0 外, 生品组与煅淬品组其余元素的偏回归系数均 > 0 。提示在自然铜生品组中, Mg 元素对成骨细胞增殖有抑制作用, 而在煅淬品中则起到了促进作用。其余元素无论在生品组还是煅淬品组中均对成骨细胞增殖起到了促进作用。自然铜生品组 Fe 元素的 VIP 值 > 1 , 煅淬品组中 Fe、Mg 元素的 VIP 值均 > 1 , 且 Fe 元素 VIP 值 $> Mg$ 元素 VIP

表2 自然铜含药血清中金属元素含量与成骨细胞增殖的谱效关系分析结果

Table 2 Result of the spectral-effect correlation between the contents of metal elements in pyritum drug-contained serum and the effect of serum on the proliferation of osteoblasts

元素	生品组		煅淬品组	
	偏回归系数	VIP 值	偏回归系数	VIP 值
Fe	0.290	1.437	0.223	1.308
Mg	-0.066	0.885	0.197	1.154
Zn	0.123	0.805	0.129	0.757
Cu	0.174	0.709	0.106	0.620

值, 说明含药血清中 Fe 元素对成骨细胞增殖的促进作用最强, 提示其对成骨细胞增殖的影响最为显著。

3 讨论

自然铜作为一味具有接骨疗伤功效的矿物类药物, 能够促进骨折愈合, 但其作用机制目前尚不清楚。本研究依据“谱效相关”的中药研究模式, 将自然铜看作一个由 Fe、Mg、Zn、Cu 等多种元素组成的小复方, 并对其进行“拆方”研究。基于偏最小二乘回归(PLSR)法, 以自然铜含药血清中各金属元素含量为“谱”, 与含药血清促成骨细胞增殖的“效”建立关联, 并进行 PLSR 相关性分析。结果表明, Fe 元素对于促进骨折愈合的作用最强, 其次为 Mg、Zn、Cu 元素。

Fe、Mg、Zn、Cu 等 4 种金属元素均是骨骼生长所必需的, 能促进骨折的愈合。Cu 元素以金属酶的形式存在于酶的活性部位, 能增强赖氨酰氧化酶的活性, 提高胶原纤维的韧性, 促进胶原堆积, 进而促进新骨的形成, 并且能起到抗菌、抗炎的作用^[6-8]。Zn 和 Mg 元素能通过促进成骨细胞增殖、胶原合成, 以及促进碱性磷酸酶(ALP)活性来增强成骨细胞的作用^[9-10]。Fe 元素在人体内发挥重要的生物学功能, 是合成血红蛋白、肌红蛋白、铁蛋白的必需原料, 并参与组织氧气的转运及促进血液中脂质的转运, 且参与了骨代谢^[11-13]。铁摄入过多也会引起铁过载, 进而引发骨质疏松等一系列疾病^[14]。

本实验还对自然铜生品与煅淬品进行了比较研究, 大鼠灌胃给药后, 2 组大鼠血清中的 Fe、Mg、Zn、Cu 元素含量的差异无统计学意义($P > 0.05$), 但是 3、4 h 煅淬品组的大鼠血清在促进成骨细胞增殖的作用上显著优于生品组血清($P < 0.01$)。推测该差异可能是自然铜中 Fe、Mg、Zn、Cu 各元素协同作用

的结果。谱效相关性分析结果显示, Fe 元素的 VIP 值在自然铜生品组与煅淬品组中均最大, 表明其与自然铜促进成骨细胞增殖作用的相关性最大。Mg 元素的偏回归系数在生品组中 <0 , 说明 Mg 元素在自然铜生品中与促进成骨细胞增殖具有负相关性; 经过炮制后, 相关系数 >0 , 与促进成骨细胞增殖呈正相关。这也为自然铜炮制的必要性提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 141.
- [2] 蔡仁诚, 王培民. 自然铜在中医伤科古籍中的应用及现代研究[J]. 中国中医急症, 2012, 21(3): 414, 420.
- [3] 刘廷, 王海丹, 狄留庆, 等. 基于甲型H1N1流感病毒致MDCK细胞损伤保护作用的双黄连组方HPLC特征图谱谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(21): 4194-4199.
- [4] 潘学强, 黄菊英, 龚慕辛, 等. 谱效相关分析方法在中药药效物质基础研究中的应用进展[J]. 北京中医药, 2013, 32(10): 731-735.
- [5] 曾令军, 林兵, 宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1425-1432.
- [6] LIANG D, YANG M W, GUO B L, et al. Zinc inhibits H_2O_2 -induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 148(3): 420-429.
- [7] LIN R C, DENG C J, LI X X, et al. Copper-incorporated bioactive glass-ceramics inducing anti-inflammatory phenotype and regeneration of cartilage/bone interface[J]. Theranostics, 2019, 9(21): 6300-6313.
- [8] KONG N, LIN K L, LI H Y, et al. Synergy effects of copper and silicon ions on stimulation of vascularization by copper-doped calcium silicate[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(8): 1100-1110.
- [9] QIAO Y Q, ZHANG W J, TIAN P, et al. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials[J]. Biomaterials, 2014, 35(25): 6882-6897.
- [10] 王健, 马翔宇, 冯亚非, 等. 镁离子对成骨细胞活力和分化的促进作用及其机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(15): 2836-2839.
- [11] ANDERSON G J. Iron absorption and metabolism[J]. Current Opinion In Gastroenterology, 2009, 25(2): 129-35.
- [12] 王冰, 徐又佳, 钱忠明. 铁与骨代谢研究的新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(10): 743-745.
- [13] MACKENZIE E L, IWASAKI K, TSUJI Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2008, 10(6): 997-1030.
- [14] 王晨萌, 张耀辉, 张轲淇, 等. 铁过载对骨代谢的影响研究[J]. 国外医学(医学地理分册), 2018, 39(2): 113-115.

(编辑: 邹元平)