

实验研究

用含药血清方法观察补肾益精方对破骨细胞功能的影响

詹红生¹ 赵咏芳² 石印玉¹ 高建军³ 沈培芝² 徐宇²

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海; 3. 上海医科大学, 上海)

【摘要】目的 探讨补肾益精方含药血清的制备条件及其对体外培养破骨细胞骨吸收功能的影响。方法 取体重 270 ± 20 g 的 SD 大鼠, 雌雄各半, 每组 10 只, 同等条件下制备补肾益精方含药血清和对照血清, 分别观察不同采血时间、不同喂药时间、不同灌胃剂量和血清添加量对骨吸收陷窝数量的影响。结果 末次灌胃后 1h 采血组的骨吸收陷窝数明显少于其他各组 ($P < 0.05$); 灌胃 1d 和 3d、7d 组比较其含药血清的药效无差异, 而与对照血清差异显著; 随着灌胃剂量和含药血清添加量的提高, 其骨吸收陷窝数明显减少。结论 补肾益精方含药血清对破骨细胞骨吸收功能具有明显的抑制作用; 补肾益精方用于破骨细胞药效观察的大鼠含药血清制备条件为等效剂量连续两次 (间隔 2h) 灌胃, 末次灌胃后 1h 采血, 其血清添加浓度为 30%。

【关键词】 中草药 破骨细胞 血清学

The effects of Bushenyijing (invigorating the kidney and supplementing the essence of life) prescription on osteoclasts resorption using drug sera method ZHAN Hong-sheng, ZHAO Yongfang, SHI Yin-yu, et al. Shuguang Affiliated Hospital, Shanghai University of TCM (Shanghai, 200021)

【Abstract】 Objective To explore the preparation method of drug sera of Bushenyijing Fang (BSYJF) (a prescription of traditional Chinese medicine) for invigorating the renal function and the supplement of essence of life. Its effects on osteoclasts resorption tested in vitro were studied. **Methods** 20 SD rats with average weight of 270 ± 20 g, female and male in equal numbers, were divided into two groups randomly: the control group using sera and the group using sera including BSYJF. The effects of the two kind of sera on the quantity of bone resorption lacuna were observed at different blood sampling times, different medicine administration times, different conditions of medicine dosage and sera addition dosage. **Results** The quantity of bone resorption lacuna at one hour after last time of administration of medicine was much more smaller than that of other groups ($P < 0.05$). Durg effects showed no difference at 1st, 3rd and 7th days after medication, but significant difference was seen in comparison with the control sera. With medicine dose and sera addition dose increasing, the bone resorption lacuna decreased obviously. **Conclusion** The drug sera of BSYJF significantly inhibited osteoclast resorption. The preparation conditions of drug sera of BSYJF were as follows: giving medicine of equivalent dose twice between 2 hours, sampling blood at one hour after last medication and adding sera to the concentration of 30%.

【Key Words】 Chinese herbal medicine Osteoclasts Serology

以往研究表明, 阴阳双补而侧重养阴的补肾益精方对原发性骨质疏松症具有治疗作用, 表现为可明显缓解骨痛, 降低过高的骨转换和升高骨量等^[1, 2], 提示该方具有抑制骨吸收

的作用。为了进一步弄清该方作用的细胞学机制, 我们采用含药血清方法观察了补肾益精方对体外培养破骨细胞骨吸收功能的影响, 现报告如下。

1 材料与方

1.1 主要试剂和仪器 Medium 199 培养基胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 为 Gibco 公司产品, 戊二醛、甲苯胺蓝为 E. Merck 公司产品, 24 孔培养板为 Costar 公司产品; Leitz 1600 型锯齿式切片机, SB 2200 型超声波清洗仪, Nikon 102 型

基金项目: 国家九五攻关资助项目 (No. 969060905)

作者简介: 詹红生 (1964 -), 男, 汉族, 河南人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药与推拿防治骨与关节病的研究, 1995 年获浙江省中医药科技进步二等奖, 1996 年、1999 年分获浙江省中医药科技进步三等奖各 1 次。现在浙江中医学院工作。

光学显微镜,日立 S-520 扫描电镜。

1.2 大鼠血清制备 取正常 SD 大鼠,每组 10 只,体重 270 ±20g,雌雄各半,由上海医科大学放射医学研究所实验动物中心提供,以 1.1%氨基甲酸乙酯(广州化学试剂厂产品)腹腔注射(1.1g/kg)麻醉,无菌条件下,颈动脉放血,4 离心 2500rpm、25min,抽取血清,56℃、30min 灭活,经 0.22μm 滤膜抽滤除菌,分装,-30℃ 保存备用。补肾益精方胶囊(上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供,批号 980528)按体表面积折算动物的等效剂量为 0.75g/d,溶于 2ml 生理盐水中。时效关系研究,采用等效剂量灌胃,分为 1d(连续两次,间隔 2h)、3d、7d 灌胃三组,末次灌胃后 1h、2h、3h 采血,以确定合适的给药方案和药效最强的采血时间点;然后分别采用等效剂量的 0.5、1.0、2.5 倍剂量灌胃,进行量效关系研究。同等条件下,以等体积生理盐水灌胃,制备对照血清。

1.3 象牙片制备与处理 取直径 1.5cm 的象牙毛胚,用锯齿式切片器横向切成 50μm 薄片,置蒸馏水中超声波清洗 10min ×3 次,自然晾干,紫外线照射后保存于 4℃ 环境中备用。

1.4 破骨细胞分离与培养 参考文献[3],取 1 日龄 SD 大鼠(来源同上),拉颈处死,75%酒精浸泡 5min,无菌分离四肢长骨,剔净软组织,用 Medium199 培养液清洗 2 次,然后于 Medium 199 全培养液(含 20% FBS、100μg/ml 硫酸链霉素、100u/ml 青霉素钠,pH7.2)中,用解剖刀纵向剖开骨干,将骨质内表面刮入培养液,再以圆头吸管吹打骨碎片 5min,静置 30s,吸取上层细胞悬液均匀接种于预置有象牙薄片的 24 孔培养板中,每孔加全培养液至 1ml,37℃、5%CO₂ 环境中培养 30min,以 Medium 199 培养液冲去未贴壁的细胞,更换为含不同组别大鼠血清的培养液(血清总浓度为 30%)至每孔 2ml,每组 4 孔,继续培养,3d 换液 1 次。

1.5 骨吸收陷窝观察与计数 参考文献[4],培养至第 7d,取出所有象牙薄片,系列梯度酒精脱水,自然晾干,1%甲苯胺蓝染液室温染色 3~4min,蒸馏水清洗,于光镜 100 倍下对整张象牙薄片上的吸收陷窝进行拍照和计数,然后对同一张象牙薄片再经超声波清洗 10min ×3 次,常规处理后进行扫描电镜观察。

1.6 统计学处理方法 各组吸收陷窝计数结果以个/片表示,组间比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 骨吸收陷窝的形态特征 光镜下,经甲苯胺蓝染色后吸收陷窝呈紫色或蓝紫色。培养 1d 的象牙薄片上可偶见着色较淡的吸收陷窝,呈圆形或椭圆形;3d 时有腊肠形吸收陷窝出现;5d 后吸收陷窝绝大部分呈梅花瓣形或腊肠形,边界轮廓清晰,陷窝底部纤维纹路隐约可见(见图 1)。扫描电镜下观察,骨吸收陷窝的变化趋势与光镜结果一致,同一标本可清楚识别形态相似的骨吸收陷窝,边界轮廓清晰,陷窝底部粗糙,纤维纹路清晰可见(见图 2)。

2.2 含药血清的时效关系研究 补肾益精方以等效剂量,连续两次(间隔 2h)灌胃,分别于末次灌胃后 1h、2h、3h 采血,同等条件下制备生理盐水灌胃对照血清。各组血清对破骨细胞骨吸收陷窝数的影响结果见表 1。可以看出,1h 含药血清组的骨吸收陷窝数显著低于其它各组。采用等效剂量补骨

益精方,分为灌胃 1d(连续两次灌胃,间隔 2h)、3d、7d 三组,各组血清对破骨细胞骨吸收陷窝数的影响结果见表 2。可以看出,灌胃 1d 组的骨吸收陷窝数与 3d、7d 组之间无显著性差异。

表 1 培养 7d 骨吸收陷窝计数统计结果 (n=4, x̄ ±s)

组别	采血时间		
	1h	2h	3h
生理盐水组	329.5 ±31.9	324.8 ±33.7	246.3 ±45.4
补肾益精方组	150.0 ±51.5	329.5 ±31.9	263.8 ±49.6

注:示与其它各组比较 P<0.05

表 2 培养 7d 骨吸收陷窝计数统计结果 (n=4, x̄ ±s)

组别	灌胃 1d 组	灌胃 3d 组	灌胃 7d 组
补肾益精方	68.3 ±16.5	80.0 ±19.6	78.2 ±28.5

注:示与其它各组比较 P>0.05

2.3 含药血清的量效关系研究 补肾益精方分别以等效剂量的 0.5、1.0、2.5 倍剂量,连续两次(间隔 2h)灌胃,于末次灌胃后 1h 采血;同等条件下制备生理盐水灌胃对照血清。各组含药血清添加浓度(体积比)又分别为 10%、20%和 30%。各组血清对骨吸收陷窝数影响的结果见表 3。可以看出,补肾益精方含药血清对破骨细胞骨吸收功能的抑制作用呈现明显的剂量依赖。

表 3 培养 7d 骨吸收陷窝计数统计结果 (n=4, x̄ ±s)

组别	含药血清浓度		
	10%	20%	30%
对照组	-	-	141.5 ±18.3
0.5 倍剂量组	139.3 ±20.9	79.8 ±28.1	21.3 ±2.5 [#]
等效剂量组	135.8 ±15.6	19.0 ±1.4 [#]	6.0 ±2.4 [#]
2.5 倍剂量组	73.0 ±11.7	5.0 ±0.8 [#]	4.8 ±1.7 [#]

注:各组血清总浓度均为 30%。[#]示与对照组比较 P<0.01; 示与对照组比较 P<0.05

3 讨论

3.1 体外培养破骨细胞的功能评价 破骨细胞所引起的骨吸收伴随生命活动的始末,体外培养的破骨细胞是否具有噬骨能力,是评价其功能的重要指标之一。本实验结果显示,光镜下骨吸收陷窝轮廓清晰,陷窝计数结果与电镜具有良好相关性(未发表资料),与文献报道^[4]一致,因此可以认为,光镜法骨吸收陷窝计数可以定量反映体外培养破骨细胞的骨吸收功能。

3.2 含药血清方法是中药体外药理实验的一种新方法 长期以来,中药体外药理学实验普遍采用的是中药提取物直接添加法,这种方法明显地忽视了中药的以下特点: 中药绝大部分为口服剂,经胃肠道和肝脏代谢后,最后进入血液的并不完全是原药成分; 中药多成分的整体效应并非等于各部分效应之和; 中医临床注重辨证施治,也就是说,某些中药可能在某一证候存在的前提下(即某种特定的机体状态下)才体现出药效作用; 中药提取物的理化性质不十分恒定,有可能对体外实验产生干扰作用,影响药效的判断和评价。基于以

上情况,近年来,由日本学者田代真一提出的中药含药血清方法开始受到研究者的重视,研究表明,该方法能够较为客观地反映中药的药效^[5-10]。目前,多数研究者认为,药物、制备含药血清的动物和观察指标不同,其含药血清的时效和量效存在差异^[8-10]。通过对时效(不同采血时间和不同喂药时间的含药血清药效)和量效(不同灌胃剂量和不同血清添加量的含药血清药效)关系进行研究,以确定合适的动物给药方案、取血时间、含药血清添加浓度等实验条件。

3.3 不同种属动物血清对破骨细胞活力的影响 我们观察到,血清的种属不同对破骨细胞的骨吸收功能具有明显影响,浓度相同(20%)的大鼠血清与胎牛血清相比,破骨细胞的活力不如后者,但提高大鼠血清浓度至30%以后,破骨细胞的活力明显增强,提示采用大鼠制备含药血清用于观察中药对大鼠破骨细胞的影响时,其血清浓度以30%为宜(未发表资料)。

3.4 补肾益精方含药血清可明显抑制体外培养破骨细胞的骨吸收功能 正常骨重建(bone remodeling)起始于破骨细胞的激活,如果破骨细胞功能过亢,则可引发许多临床病症,如骨质疏松症、Paget氏病、关节置换术后假体松动、牙周病变等。大量临床和动物实验证明^[1,2],中药对于过亢的骨吸收具有抑制作用,进一步开展细胞乃至分子水平上的研究,将对阐明中药的作用机制以及筛选出更为有效的中药制剂具有重要意义。本实验结果显示,补肾益精方对破骨细胞骨吸收功能的影响,以连续两次灌胃后1h采血所获得的含药血清药效最强,并且,其药效强弱与药物剂量呈明显的剂量依赖关系。同时也可以看出,2.5倍剂量灌胃、10%的含药血清其药效不及等效剂量、20%的含药血清,说明通过增加药物灌胃量来提高药效是有限的,所以,采用等效剂量、30%的含药血清浓度更为合适。综上,补肾益精方用于破骨细胞药效观察的含药血清制备条件为等效剂量连续两次(间隔2h)灌胃、末次灌胃后1h采血,其血清添加浓度为30%。

补肾益精方是阴阳双补而侧重养阴的中药复方,它既可促进成骨细胞增殖^[8]又能抑制破骨细胞的骨吸收,这种双向作用是否与不同的药物组成有关,还有待于进一步做拆方研究。

(致谢 本文工作得到上海医科大学老年医学研究中心骨代谢研究室王洪复教授、金慰芳副教授帮助,谨致谢意)

(本文图1~2见插图2)

参考文献

- [1] 石印玉,石鉴玉,沈培芝,等.四组中药防治实验性骨质疏松症的对比研究.中国骨质疏松杂志,1998,4(3):68-70.
- [2] 沈培芝,陈东煜,张戈,等.补肾方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨.中国中西医结合杂志,1998,18(5):290-292.
- [3] 于明香,金慰芳,王洪复,等.破骨细胞体外培养与形态观察.上海医科大学学报,1996,23(1):52-54.
- [4] 高建军,金慰芳,王洪复.骨片吸收陷窝光镜计数法定量测定破骨细胞功能.上海医科大学学报,1998,25(1):71-73.
- [5] 田代真一.血清药理学与血清药化学.现代东洋医学,1992,13(1):113-117.
- [6] Iwama H,Amagaya S,Ogihara Y. Effect of shosaikoto a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharides: a new pharmacological testing method. J Ethnopharmacol,1987,21:45-53.
- [7] 张群豪,钟蓓,陈可冀,等.用血清药理学方法观察血府逐瘀浓缩丸对实验性动脉粥样硬化家兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响.中国中西医结合杂志,1996,16(3):156-159.
- [8] 赵咏芳,石印玉,沈培芝,等.用血清药理学方法研究中药密骨胶囊对体外培养成骨细胞的影响.第四届全国骨代谢研究学术研讨会论文集,珠海,1998:98.
- [9] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等.中药复方血清药理研究方法学探讨一.中国实验方剂学杂志,1998,4(2):13-15.
- [10] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等.中药复方血清药理研究方法学探讨一.中国实验方剂学杂志,1998,4(3):45-46.

(收稿:1999-09-08 修回:2000-02-18 编辑:房世源)

短篇报道

痰瘀并重治疗气滞血瘀型胸部损伤

龙初建

(灵川县潮田乡卫生院,广西 灵川 541205)

笔者自94年以来,采用痰瘀并重兼以利气治疗气滞血瘀型胸部损伤53例,现报道如下。

1 临床资料

53例中男31例,女22例;12~58岁。暴力撞击伤36例,负重屏伤17例。均有不同程度的胸胁窜痛,呼吸牵掣作痛,烦闷气急,咳喘,转侧不利,脉涩症状,临床表现符合气滞血瘀型。

2 治疗方法

方药组成由血府逐瘀汤合导痰汤加减:桃仁、红花、当归、生地、川芎、牛膝、桔梗、柴胡、枳壳、法夏、制南星、槟榔、木香。纳差加山楂、麦芽;痛甚加川楝子、元胡;咳甚加苏子、枇杷叶。服法:每日一剂,水煎,分早晚2次服。治疗期间患者未服其它药品。

3 治疗结果

疗程最短者只服1剂,症状即缓解,重者服5~7剂。53例中,只有1例疗

效不明显,该例出现肺部感染,期间使用了抗菌素。其余52例均收到良好效果。

4 体会

胸部损伤常因暴力而致血逆妄行,血离经脉之外而为瘀血。局部气滞血瘀,气机不畅,津液运化失常而停聚为痰,痰与瘀往往是并存的,故采用痰瘀并重治疗效果良好。

(编辑:连智华)