

尼莫地平对体外培养成骨细胞的影响

朱建民¹ 方浩¹ 陈新刚¹ 曾明¹ 金蔚芳² 王洪复²

(1. 上海市第八人民医院, 上海 200032; 2. 复旦大学医学院骨代谢研究室)

【摘要】 目的 观察尼莫地平对体外培养成骨细胞的作用。方法 在新生 SD 大鼠头颅骨第 2 继代成骨细胞(OB₂) 培养液中分别加入不同浓度(10⁻¹~ 10⁻⁹g/L) 尼莫地平, 分别观察 OB₂ 的增殖功能(用波长 570nm 处 OD 值表示), 分化功能(用碱性磷酸酶 ALP 活性表示) 和矿化功能(用矿化结节数量/视野表示)。结果 增殖功能 OD 值为 0.12±0.01~ 0.41±0.04; ALP 活性为 0.09±0.01U/mg 蛋白质; 矿化结节数量/视野为 1.3±0.9 个。结论 与对照组比较, 尼莫地平各浓度对 OB₂ 的增殖、分化和矿化功能作用各异。当尼莫地平浓度为 10⁻⁶g/L 时, 对 OB₂ 的增殖和分化功能具有刺激作用, 对 OB₂ 的矿化功能具有显著的抑制作用; 当浓度升高(10⁻²g/L) 时, 对 OB₂ 的增殖功能具有明显的抑制作用; 当浓度降低(10⁻⁸g/L) 时, 对 OB₂ 的增殖功能失去作用。

【关键词】 钙通道阻滞药 成骨细胞 组织培养

The effect of Nimodipine on culture of osteoblasts in vitro ZHU Jianmin, FANG Hao, CHEN Xingang, et al. *The 8th People's Hospital of Shanghai (Shanghai, 200032)*

【Abstract】 Objective To observe the effect of nimodipine on culture of osteoblasts in vitro **Methods** The culture medium with different nimodipine concentrations(10⁻¹~ 10⁻⁹g/L) and the second generation osteoblasts(OB₂) from the skull of new born SD rats were mixed for the observation respectively about the proliferation(OD value at wavelength 570nm), the differentiation(ALP activity) and the mineralization(mineralized nodes/field of vision) of OB₂. **Results** The proliferation function was 0.12±0.01~ 0.41±0.04 OD value (mean and standard deviation); the ALP activity(mean and standard deviation) was 0.09±0.01U/mg protein and the mineralized nodes(mean and standard deviation) was 1.3±0.9. **Conclusion** In comparison with control groups, the proliferation and differentiation of the OB₂ were remarkably increased by 10⁻⁶g/L nimodipine concentration and the mineralization was significantly inhibited. The proliferation of the OB₂ was significantly inhibited with the increase of nimodipine concentration to 10⁻²g/L, the proliferation was of no effect when the concentration of nimodipine was decreased to 10⁻⁸g/L.

【Key Words】 Calcium channel blockers Osteoblasts Tissue culture

钙通道阻滞剂(Calcium channel blocker); 又称“钙进入阻断剂”(Calcium entry blocker); 也称“钙拮抗剂”(Calcium antagonist) 是目前广泛使用于临床治疗心脑血管疾病的一大类药物^[1]。由于其药理作用均涉及钙生理和钙代谢问题, 因而必然影响骨钙代谢和骨折愈合过程。近来, 临床长期使用钙通道阻滞剂对正常骨骼的影响以及导致骨质疏松症的可能性已引起人们的关注^[2]。本文旨在观察钙通道阻滞剂——尼莫地平(Nimodipine) 对体外培养成骨细胞的作用, 从细胞水平阐述此类药物对正常骨骼和骨折愈合影响的机制。

1 材料与方 法

1.1 药物 选用山东新华制药股份有限公司生产的尼莫地平注射液, 批准文号: (95) 卫药准字 X-121 号, 批号:

19990312, 规格: 每支 10ml: 2mg, 用细胞培养液分别稀释至 10⁻¹~ 10⁻⁹g/L。

1.2 细胞培养 取新生(出生 24h 内)SD 大鼠头颅骨, 用 0.25% 胰蛋白酶预消化 15~ 20min, 以清除掉纤维组织细胞。再用 0.1% II 型胶原酶, 在 37℃ 环境中振荡(50 次左右/min) 消化 60min, 以 200g 离心收集成骨细胞。将分离收集的成骨细胞以 1×10⁴/cm² 的密度接种于培养瓶中, 置 5% CO₂、37℃ 培养箱培养。24h 可见细胞贴壁生长, 胞浆开始伸展, 换新鲜培养液, 以后每隔 48h 替换培养液。于接种后第 4 天(半汇合) 取第 2 继代成骨细胞(OB₂) 培养, 先以 0.25% 胰蛋白酶使贴壁细胞消化松散, 轻摇细胞即脱壁。以 1×10⁴/cm² 的密度移入含培养液的新培养瓶中继续培养, 加入不同浓度尼莫地平作药效试验(n=6)。采用 MEM (Minimum eagle medium) 培养液, 内含 10% 小牛血清、青霉素、钠离子(133.3×10⁻³

mol/L)、钾离子(5.4×10^{-3} mol/L)、钙离子(1.8×10^{-3} mol/L)等,新鲜配置,冷冻保存^[3]。

1.3 对照组设计 采用去离子水设定药物空白对照组($n=6$)。

1.4 统计学方法 数据处理采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

1.5 观察指标

1.5.1 OB₂ 增殖功能测定 OB₂ 以每孔 6×10^3 密度接种于 24 孔培养板上,24h 后换入含不同浓度药物的培养液中,于加药后 72h 用 MTT{[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]} 方法在酶标仪(美国 Inc 公司生产,型号为:EL×800)上进行测试。测试条件为:①测定时换成无血清培养液;②测定波长为 570nm;③37℃,5% CO₂, MTT 孵育 4h;④MTT 50μl(5g/L),检测细胞数 1×10^6 ,光密度(OD)值与活细胞数相关系数 $r=0.9701$ 。以波长 570nm 处的 OD 值表示 OB₂ 增殖功能,结果与对照组比较^[3]。

1.5.2 OB₂ 分化功能测定 OB₂ 以每孔 2×10^4 密度接种于 24 孔培养板上,24h 后换入含敏感浓度药物的培养液中,每 48h 更换培养液 1 次,待汇合后用对硝基苯磷酸盐(PNPP)法和分光光度计测定细胞溶液中的 ALP 活性(条件为 pH10.5,37℃,波长为 405nm);再用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,以 U/mg 蛋白质表示 ALP 活性,结果与对照组比较。ALP 活性是 OB₂ 分化功能指标^[3]。

1.5.3 OB₂ 矿化功能测定 OB₂ 以每孔 2×10^4 密度接种于 6 孔 Costor 培养板上,10 天后换入含敏感浓度药物的培养液中,14 天后用 90% 乙醇固定,0.1% 茜素红染色。以橘红色结节、边界清晰、>200μm 为标准。在 40 倍光镜下作矿化结节计数,结果与对照组比较^[3]。

2 结果

2.1 对 OB₂ 增殖功能的作用 与对照组比较,尼莫地平 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ g/L 各浓度组对 OB₂ 的增殖功能影响各异($n=6$,表 1)。

表 1 不同浓度尼莫地平对成骨细胞增殖功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	n	OD 值
对照组	6	0.35±0.04
尼莫地平 10^{-2}	6	0.12±0.01***
尼莫地平 10^{-4}	6	0.38±0.14*
尼莫地平 10^{-6}	6	0.41±0.04**
尼莫地平 10^{-8}	6	0.35±0.03*

与对照组比较: * $P > 0.05$ ** $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

2.2 对 OB₂ 分化功能的作用 参考不同浓度尼莫地平对 OB₂ 增殖功能的作用结果,选取一个敏感浓度作 OB₂ ALP 活性实验研究。结果显示,当取尼莫地平敏感浓度 10^{-6} g/L 时,ALP 活性为 0.09 ± 0.01 U/mg 蛋白质。对照组 ALP 活性为 0.08 ± 0.004 U/mg 蛋白质。与对照组比较,敏感浓度的尼莫地平对 OB₂ 的分化功能具有明显的刺激作用($P < 0.05$, $n=6$)。

2.3 对 OB₂ 矿化功能的作用 参考不同浓度尼莫地平对 OB₂ 增殖功能的作用结果,选取一个敏感浓度作 OB₂ 矿化功

能实验研究。结果显示,当取尼莫地平敏感浓度 10^{-6} g/L 时,每视野矿化结节数量为 1.3 ± 0.9 个。对照组每视野矿化结节数量为 1.5 ± 1.0 个。与对照组比较,敏感浓度的尼莫地平对 OB₂ 矿化功能具有显著的抑制作用($P < 0.01$, $n=6$)。

3 讨论

钙通道阻滞剂大致可分成非选择性和选择性两大类。非选择性钙通道阻滞剂主要包括芬地林(Fendiline),普尼拉明(Prenylamine),苄普地尔(Bepridil)和一些金属离子,如锰离子(Mn^{2+}),镍离子(Ni^{2+}),镧离子(La^{3+}),钆离子(Gd^{3+})等。选择性钙通道阻滞剂又可根据其作用不同类型钙通道而进一步分类,其中尼莫地平属于选择性作用于 L-型钙通道阻滞剂^[1,4,5]。

1998 年 Kosaka 和 Uchii^[6]研究了贝尼地平(Benidipine)对体外培养小鼠成骨细胞功能的影响,浓度为 $0.1 \sim 10$ nmol/L 时具有促进成骨细胞分化功能和抑制成骨细胞增殖功能的作用^[6]。作者采用尼莫地平研究其对体外培养大鼠成骨细胞的影响。当尼莫地平浓度为 10^{-6} g/L 时具有刺激 OB₂ 增殖功能的作用($P < 0.05$, $n=6$);随着浓度递增至 10^{-2} g/L 时则对 OB₂ 增殖功能具有显著的抑制作用($P < 0.01$, $n=6$);当浓度递减至 10^{-8} g/L 时,尼莫地平对 OB₂ 增殖功能没有影响($P > 0.05$, $n=6$)。当尼莫地平浓度为 10^{-6} g/L 时,对成骨细胞的分化功能具有刺激作用($P < 0.05$),而对成骨细胞的矿化功能具有显著的抑制作用($P < 0.01$),与 Kosaka 和 Uchii 的研究结果相仿,尼莫地平对成骨细胞矿化功能的抑制作用说明临床上长期使用钙通道阻滞剂对正常骨钙代谢和骨折愈合过程中的矿化作用具有负面影响,具有导致骨质疏松症的危险,应足够引起临床医师的重视。

此外,1989 年 Takuwa 等^[7]研究显示,内皮素 1(Endothelin 1)对体外培养成骨细胞刺激作用可被细胞外缺钙和钙通道阻滞剂所抑制。1994 年 Sugimoto 等^[8]研究显示,含胰岛素样生长因子 I (Insulin like growth factor IGF-I) 和高浓度钙 ($3 \sim 5$ mmol/L) 培养液可刺激体外培养成骨细胞增殖,但可被钙通道阻滞剂和环氧化酶抑制剂所抑制。1995 年 Loza 等^[9]研究显示,表皮生长因子 I (Epidermal growth factor EGF) 刺激体外成骨细胞增殖的条件是细胞外钙内流,而钙通道阻滞剂可有效地加以抑制。由此可见,钙通道阻滞剂还可通过细胞因子对成骨细胞的介导作用,影响正常骨骼生理活动,影响正常骨折愈合和导致骨质疏松症等,也应引起人们对钙通道阻滞剂的警觉。

参考文献

[1] 陈修,陈维洲,曾贵云. 心血管药理学,第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1997. 213-232.
 [2] Ringe D. Long term therapy with calcium antagonists. Effects on calcium homeostasis and risk of osteoporosis? Med Monatschr Pharm, 1992, 15(3): 70.
 [3] 王洪复,金尉芳,高建军. 骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价. 中国骨质疏松杂志,1999, 5(2): 58.
 [4] Dasculu A, Oron Y, Nevo Z, et al. Hyperosmotic modulation of the cytosolic calcium concentration in a rat osteoblast like cell line. J Physiol Lond, 1995, 486(1): 97.
 [5] Hoffman La, Roche AG. Mibefradil the first selective T-channel

blocker. New World Health, 1997, 7(1): 73.

[6] Kosaka N, Uchii M. Effect of benidipine hydrochloride, a dihydropyridine type calcium antagonist, on the function of mouse osteoblastic cells. Calcif Tissue Int, 1998, 62(6): 554.

[7] Takuwa Y, Ohue Y, Takuwa N, et al. Endothelin 1 activates phospholipase C and mobilizes Ca²⁺ from extr and intracellular pools in osteoblastic cells. Am J Physiol, 1989, 257(6): 797.

[8] Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, et al. IGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. J Physiol(Am), 1994, 266(5): 709.

[9] Loza J, Carpio L, Lawless G, et al. Role of extracellular calcium influx in EGF induced osteoblastic cell proliferation. Bone, 1995, 161(4): 341.

(收稿: 2000 11-08 修回: 2001 01-20 编辑: 李为农)

临床研究

套式皮瓣治疗手指离断伤 120 例

苏永宾
(五河县人民医院, 安徽 五河 233300)

手指离断伤后因游离残部毁损严重, 丢失或限条件因素无法再植时, 采用从伤指残端软组织内自远端行环状分离呈套式游离皮瓣, 前移覆盖伤指残端, 称之为套式皮瓣^[1]。我们自 1994 年 10 月以来采用该方法修复手指离断伤残端创面 120 例(142 指), 取得良好疗效。现总结如下。

1 临床资料

本组共 120 例(142 指), 男 92 例(106 指), 女 28 例(36 指); 年龄 5~71 岁, 平均 28.5 岁。伤因: 切割伤 30 例(42 指), 绞轧伤 58 例(62 指), 挤压伤 32 例(38 指)。受伤手指及损伤部位见表 1。

表 1 受伤手指及损伤部位

指别	远节指骨	远指间关节	中节指骨	近指间关节	近节指骨	合计
拇指*	6	5			4	15
食指	16	16	21	7	2	62
中指	5	11	12	2	1	31
环指	2	2	3	2	1	10
小指	3	6	6	5	4	24
合计	32	40	42	16	12	142

* 其中远指间关节 5 例系指拇指指间关节部位损伤

2 治疗方法

采用指根神经阻滞麻醉(64 例)、屈指肌腱鞘管内麻醉^[2](36 例)或腕部桡、尺、正中神经阻滞麻醉, 小儿加用基础麻醉。在指根部置止血带。先行创面清创术, 然后从残端创面向手指近端游离解剖皮瓣。掌面在屈指肌腱鞘表面进行, 背侧在伸指肌腱鞘膜表面进行, 两侧在指固有动脉和指神经深面进行^[1]。注意不要损伤指固有动脉和指神经, 保护肌腱鞘管的完整。游离过程中试牵拉、推移皮瓣, 以能前后对合为度。一般分离长度为 4~6cm。皮瓣可向远端推移 1~1.5cm, 修整手指残端、锉平滑外露指骨, 将游离的套式皮瓣修成鱼口状缝合, 包扎。

术后 3 日开始活动患指, 渐进功能锻炼, 10~14 日拆线继续做较大范围患指屈伸收展运动, 自行揉推按摩皮肤, 皮肤较紧明显影响手指活动者可每日 2~3 次患手热水浴。

3 治疗结果

全部病例得到 3 个月~3 年随访, 平均随访 4.5 个月。术后 3 个月结果: 118 例(140 指)套式皮瓣成活, 手指残部活动自如, 指端痛觉、温度觉、触觉正常, 两点分辨力 2~5mm, 2 例(2 指)因感染失败, 拆线引流抗炎治疗后改手指短缩缝合治愈。满意率 98.6%。

4 讨论

手指或指端离断伤后无法再植的病例, 传统上多行“V-Y”皮瓣或带蒂皮瓣消灭创面, 也有的行短缩缝合术。前者手术易出现皮瓣坏死, 手指创伤疤痕增加, 带蒂皮瓣还需二期手术, 疗程长, 制动时间长, 皮瓣成活后感觉欠佳。后者进一步短缩了患指, 功能进一步丢失。而采用套式皮瓣, 无需再做创口, 修复后局部皮肤色泽、弹性、厚薄等一致, 外形美观。加之皮瓣内存在指神经, 手感正常, 又不需要短缩伤指, 手术一次完成, 简便易行, 病人易于接受。

因手指套状皮瓣内有两指固有动脉, 皮瓣不受长宽比例限制, 易于成活。皮肤具有弹性伸展潜力, 关节部位、指间或掌指间皮横纹舒展均可使皮肤推进拉长, 在近节指端成形; 皮瓣的游离可跨越掌指关节达手掌部或手背部, 一般推移长度可达 1cm 以上, 可修复 2cm 以内的指端皮肤缺损。

进行套状皮瓣潜行分离前, 一定要彻底清创, 创指浸泡消毒 10 分钟, 更换无菌巾和器械。本组 2 例因感染致手术失败, 教训深刻。潜行分离时, 可采用锐性分离和钝性分离相结合的办法, 注意避免损伤指固有动脉和指神经, 分离完成后要放开止血带, 进行伤指皮瓣的压迫出血, 确无渗血的情况下行修整缝合。皮肤缝合前要修整圆滑, 对有甲根残留的应连同甲床一并剔除, 以免形成嵌甲。皮肤使用较粗缝线(1 号丝线), 术后 3 日即可开始功能锻炼, 在锻炼中进一步拉长皮肤, 使手指渐进灵活便利。

参考文献

[1] 张信英, 贾继峰, 毕郑钢, 等. 手指套式皮瓣. 中华手外科杂志, 1994, 10(2): 88

[2] 王爱民, 蒋祖言, 刘怀琼, 等. 屈指肌腱鞘管麻醉的临床应用. 中华创伤杂志, 1991, 7(3): 165.

(收稿: 2000 02-28 编辑: 李为农)