

密骨胶囊含药血清对骨吸收陷窝面积和深度的影响

詹红生, 石印玉, 赵咏芳, 徐宇, 沈培芝

(上海中医药大学附属曙光医院 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 200021)

摘要 目的:探讨密骨胶囊含药血清对破骨细胞骨吸收陷窝面积和深度的影响。方法:自 1d 龄 SD 大鼠四肢长骨分离破骨细胞,接种于象牙薄片底物上,设密骨胶囊组、西药倍美力组和生理盐水对照组,同等条件下制备含药血清和对照血清,以 30% 的浓度添加于培养体系中;第 7 天终止培养,经甲苯胺蓝染色,每组随机拍摄照片各 6 张,采用计算机图像分析系统测算陷窝与背景面积的比值,以及陷窝的平均光密度值。结果:对照组、倍美力组和密骨胶囊组陷窝面积比值分别为 0.275 ± 0.062 、 0.096 ± 0.010 和 0.065 ± 0.013 ,密骨胶囊和倍美力含药血清抑制陷窝面积增大的作用非常显著 ($P < 0.01$);对照组、倍美力组和密骨胶囊组陷窝平均光密度值分别为 1.643 ± 0.356 、 1.088 ± 0.449 和 0.635 ± 0.345 ,密骨胶囊含药血清可明显抑制陷窝的加深 ($P < 0.01$),而倍美力含药血清的作用不明显 ($P > 0.05$)。结论:密骨胶囊含药血清能够明显抑制象牙薄片上骨吸收陷窝面积的增大和深度的加深,这可能是其提高骨质量的机制之一。

关键词 破骨细胞; 骨质吸收; 中草药; 体外研究

Study on the effect of Migu capsule on the area and depth of resorption lacunae ZHAN Hongsheng, SHI Yin-yu, ZHAO Yongfang, XU Yu, SHEN Pei-zhi. Shuguang Hospital of Shanghai University of TCM (Shanghai, 200021, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Migu capsule on the area and depth of resorption lacunae. **Methods:** Osteoclasts from 1-day SD rat extremity were cultured on the ivory slices for 7 days, dyed with Toluidine blue. Computer images analysis system was employed to observe the effect of Migu capsule group, physiological saline group and Estrogen group on the area and depth of resorption lacunae. **Results:** The area ratio of resorption lacunae of physiological saline group, Estrogen group and Migu capsule group were 0.275 ± 0.062 , 0.096 ± 0.010 and 0.065 ± 0.013 respectively. Estrogen group and Migu capsule group could significantly limit the increase of resorption area ($P < 0.01$). The depth of resorption lacunae of physiological saline group, Estrogen group and Migu capsule group were 1.643 ± 0.356 , 1.088 ± 0.449 and 0.635 ± 0.345 respectively. Migu capsule could significantly reduced the depth ($P < 0.05$), but not significant for the Estrogen group. **Conclusion:** Migu capsule can significantly limit the increase of resorption area and reduce the depth of resorption lacunae, that may be one of the mechanism of Migu capsule for improving the quality of bone.

Key words Osteoclasts; Bone resorption; Drugs, Chinese herbal; In vitro

以往研究表明,密骨胶囊具有升高原发性骨质疏松症患者和模型大鼠的骨矿密度、降低过高的骨转换作用^[1];体外实验结果显示,该方可显著抑制骨吸收陷窝数量的增多。本研究进一步观察该方对破骨细胞骨吸收陷窝面积和深度的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 Medium 199 培养基、胎牛血

基金项目:上海市自然科学基金(02ZB14089)

清(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 型锯式切片机,SB 2200 型超声波清洗仪, Heraeus CO₂ 培养箱,SHU-CTJ 超净工作台,CKZ Olympus 倒置相差显微镜,Nikon 102 型光学显微镜,日立 S-520 扫描电镜,MTDS-B 多功能显微影像真彩色数字化分析系统。

1.2 含药血清制备 取 15 月龄正常 SD 大鼠,每组 10 只,体重(270 ± 20) g,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;密骨胶囊由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供(批号 980528),倍美力为美国惠氏—艾尔斯特公司艾尔斯特大药厂产品(批号 A974055),按体表面积折算动物的等效剂量分别为 0.750 g/d 和 0.017 mg/d,溶于 2 ml 生理盐水中,连续 2 次(间隔 2 h)灌胃,末次灌胃后 1 h,以 1.1% 氨基甲酸乙酯(广州化学试剂厂产品)腹腔注射(1.1 g/kg)麻醉,无菌条件下,颈动脉放血,4 离心 2 500 rpm、25 min,抽取血清、混匀,56 ℃、30 min 灭活,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,分装, - 30 ℃ 保存备用。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 1.5 cm 的象牙毛胚 1 只,用锯式切片机横向切成 50 μm 薄片,置蒸馏水中超声波清洗 10 min ×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 参照文献[2],取 1 d 龄 SD 大鼠 6 只(来源同上),拉颈处死,75% 酒精浸泡 5 min,无菌分离四肢长骨,剔净软组织,用 Medium 199 培养液清洗 2 次,然后于 Medium 199 全培养液(含 20% FBS、100 μg/ml 硫酸链霉素、100 U/ml 青霉素钠, pH 7.2)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 5 min,静置 30 s,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,每组 4 孔,每孔加全培养液至 1 ml,37 ℃、5% CO₂ 环境中培养 5 h,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 2 ml,继续培养,3 d 换液 1 次。

1.5 骨吸收陷窝定量分析 按照文献[3],培养至第 7 d,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 3~4 min,蒸馏水清洗,于光镜下对整张象牙薄片上的吸收陷窝进行观察,同等条件下每组(共 4 孔)随机拍摄照片 6 张,采用计算机图像分析系统分别测算陷窝与背景面积的比值,以及陷窝的平均光密度值。对于同一张象牙薄片再经超声波清洗 10 min ×3 次,常规处理后进行扫描电镜观察。

1.6 统计学处理方法 组间比较采用 *q* 检验,可信区间为 95%。

2 结果

2.1 密骨胶囊含药血清对骨吸收陷窝面积的影响 取同一批次的陷窝照片,由计算机图像分析系统

勾画出骨吸收陷窝的轮廓(见图 1),并分别测算陷窝和背景的面积,结果以两者的比值表示(表 1)。统计处理结果显示,密骨胶囊含药血清和倍美力含药血清均可显著减小骨吸收陷窝的面积,且前者作用强于后者。

表 1 培养 7 d 吸收陷窝面积统计结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The area of bone absorption lacunae of three groups at 7th day after culture

组 别	<i>n</i>	陷窝面积比值
生理盐水组	6	0.275 ± 0.062
倍美力组	6	0.096 ± 0.010 [#] *
密骨胶囊含药血清组	6	0.065 ± 0.013 [#]

注:[#]示与生理盐水组比较,*P* < 0.01; *示与密骨胶囊含药血清组比较,*P* < 0.01。

2.2 密骨胶囊含药血清对骨吸收陷窝深度的影响

实验中观察到,经甲苯胺蓝染色的骨吸收陷窝存在明显的深浅差别,与扫描电镜对照观察发现,这种陷窝着色的深浅与其深度有关(见图 2)。因此,取同一批次的陷窝照片,运用计算机图像分析系统,对每一张照片上骨吸收陷窝的平均光密度值进行测定,以此间接反映陷窝的深度,结果见表 2。可以看出,密骨胶囊含药血清可显著减少骨吸收陷窝的深度,而倍美力组的陷窝平均光密度值虽低于生理盐水组,但无统计学意义。

表 2 培养 7 d 吸收陷窝深度统计结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The depth of bone absorption lacunae of three groups at 7th day after culture

组 别	<i>n</i>	陷窝平均光密度值
生理盐水组	6	1.643 ± 0.356
倍美力组	6	1.088 ± 0.449
密骨胶囊含药血清组	6	0.635 ± 0.345 [#]

注:[#]示与生理盐水组比较,*P* < 0.01, 示 *P* > 0.05; 示与密骨胶囊含药血清组比较,*P* > 0.05。

3 讨论

3.1 体外培养破骨细胞功能的定量评定 骨吸收陷窝观察是评价体外培养破骨细胞功能的可靠方法之一,以往多在扫描电镜下进行陷窝计数,通常是采用计算机图像分析系统对随机拍摄的同一次陷窝照片进行分析,结果以陷窝面积与背景面积的比值表示^[3-5]。我们在实验中观察到,同一张象牙薄片经甲苯胺蓝染色后,陷窝着色存在明显的深浅差异,即使同一陷窝有时也存在类似现象,与扫描电镜对照观察发现,着色深的部位陷窝也较深,着色浅的部位陷窝则较浅,基于这一现象,通过计算机图像分析系统,测定被甲苯胺蓝异染的陷窝光密度值,然后再

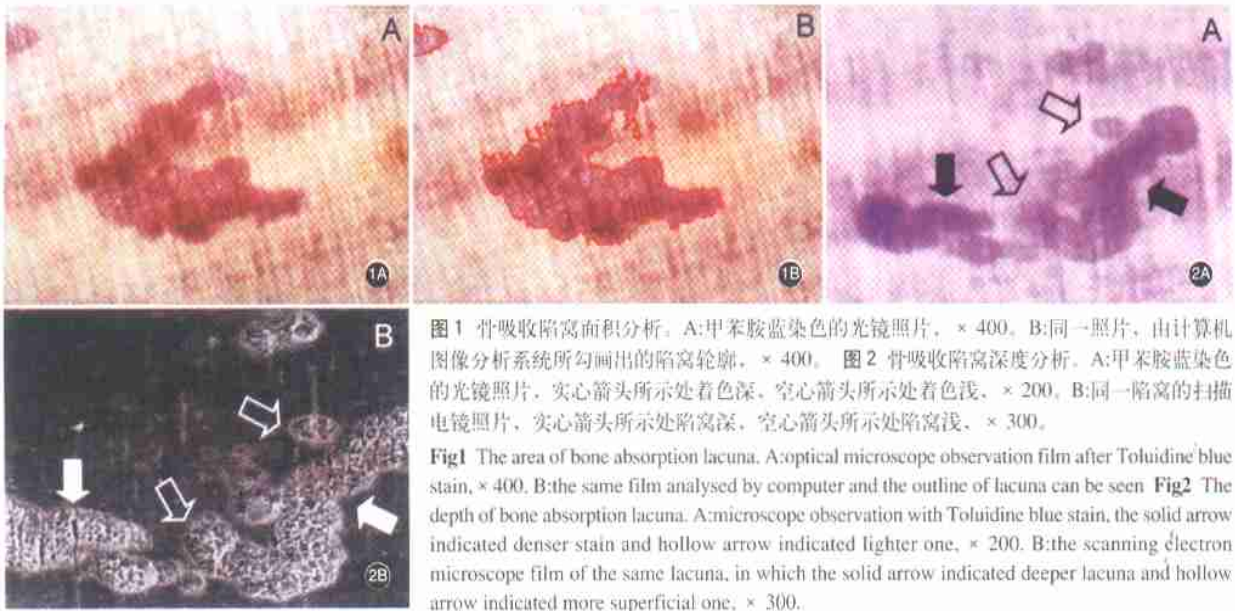


图1 骨吸收陷窝面积分析。A:甲苯胺蓝染色的光镜照片, $\times 400$ 。B:同一照片,由计算机图像分析系统所勾画出的陷窝轮廓, $\times 400$ 。图2 骨吸收陷窝深度分析。A:甲苯胺蓝染色的光镜照片,实心箭头所示处着色深,空心箭头所示处着色浅, $\times 200$ 。B:同一陷窝的扫描电镜照片,实心箭头所示处陷窝深,空心箭头所示处陷窝浅, $\times 300$ 。

Fig1 The area of bone absorption lacuna. A:optical microscope observation film after Toluidine blue stain, $\times 400$. B:the same film analysed by computer and the outline of lacuna can be seen. Fig2 The depth of bone absorption lacuna. A:microscope observation with Toluidine blue stain, the solid arrow indicated denser stain and hollow arrow indicated lighter one, $\times 200$. B:the scanning electron microscope film of the same lacuna, in which the solid arrow indicated deeper lacuna and hollow arrow indicated more superficial one, $\times 300$.

除以陷窝的面积,以陷窝的平均光密度值来间接反映其深度^[3]。总之,将陷窝计数、面积和深度测定相结合,可以较为全面地评价体外培养破骨细胞的骨吸收功能。

3.2 密骨胶囊含药血清对破骨细胞活性的抑制作用 以往临床和动物实验均表明,密骨胶囊能够降低骨质疏松症过高的骨转换^[1],提示该方具有一定的抗骨吸收作用。体外实验发现,该方含药血清还可显著减少骨吸收陷窝的数量^[6];本实验结果显示,该方既可减小陷窝的面积,又可减低陷窝的深度,抑制率分别为 76.3% 和 61.4%,与生理盐水对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)。以上结果提示,密骨胶囊抗骨吸收的作用是具有细胞学基础的。

3.3 密骨胶囊含药血清抑制破骨细胞纵向骨吸收的意义 从结构力学的角度而言,一根粗大但连接性不好的骨小梁,其力学性能远远低于虽细但连接性好的骨小梁;就临床治疗而言,变细的骨小梁通过药物干预或一定的力学刺激,可以使其增粗,而对于已经断裂的小梁,则很难使其再连接^[7]。因此,对于骨吸收异常活跃的骨质疏松症患者,抑制破骨细胞的纵向骨吸收显得尤为重要。本研究结果提示,密骨胶囊含药血清不仅能够抑制陷窝数量的增多和面积的扩大,还可极其显著地减低象牙片上的骨陷窝深度,而倍美力在这方面的作用强度不及密骨胶囊含药血清。令人感兴趣的是,经密骨胶囊治疗的切卵模型大鼠的血清也可明显抑制破骨细胞的骨吸收

活力^[8,9],对该大鼠股骨和腰椎生物力学性能检测的结果,其结构力学和材料力学指标均有显著改善,尤其在改善结构力学参数股骨结构硬度、椎体弹性载荷和弹性变形以及材料力学参数股骨弹性模量、椎体弹性骨强度和弹性变形强度方面,密骨胶囊优于倍美力,这可能与密骨胶囊能够较强地抑制破骨细胞的纵向骨吸收有关,同时也提示,密骨胶囊和倍美力干预细胞生物学行为的作用方式可能存在一定差异。

参考文献

- 1 朱太咏,石印玉,张戈,等. 补肾益精方提高卵巢切除大鼠骨质疏松模型松质骨质量的实验研究. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(9): 688-691.
- 2 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.
- 3 詹红生,石印玉,赵咏芳. 体外培养破骨细胞功能的定量评定. 浙江中医学院学报, 2000, 24(5): 9-11.
- 4 Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, et al. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. J Clin Invest, 1990, 85(2): 456-461.
- 5 史凤芹,于世凤. IL-2, TNF- α 和 PGE₂ 对破骨细胞性骨吸收的作用. 中华骨科杂志, 1995, 15: 458-461.
- 6 詹红生,赵咏芳,石印玉,等. 用含药血清方法观察补肾益精方对破骨细胞功能的影响. 中国骨伤, 2001, 14(3): 145-147.
- 7 戴成戎. 骨质疏松症导致骨力学性能下降的机理. 中华骨科杂志, 1997, 17: 405-406.
- 8 詹红生,石印玉,赵咏芳. 含补肾益精方的切卵大鼠血清对破骨细胞骨吸收功能的影响. 中药新药与临床药理, 2001, 12(5): 326-328.
- 9 张戈,石印玉,朱太咏,等. 补肾益精方对卵巢切除后骨质疏松大鼠皮质骨截面几何结构、骨密度和生物力学性能的影响. 医用生物力学, 2002, 17(2): 89-93.

(收稿日期:2003-05-20 本文编辑:李为农)