

补肾密骨液对骨代谢影响的体外实验研究

胡光亮¹ 杜靖远² 王洪² 谢晶²

(1. 青岛市市立医院, 山东 青岛 266011; 2. 同济医科大学附属协和医院, 湖北 武汉)

【摘要】 目的 探讨补肾密骨液影响骨代谢的作用机制。方法 利用组织培养技术, 将不同浓度的补肾密骨液与分离培养制得的新生大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞共同培养, 用 MTT 比色分析法和 ³H-TdR 掺入法观察补肾密骨液对成骨细胞样细胞增殖的影响, 用原子吸收分光光度法观察补肾密骨液对颅盖骨吸收的影响, 并与鲑鱼降钙素进行对照。结果 补肾密骨液以剂量依赖的方式促进成骨细胞样细胞的增殖, 并抑制颅盖骨的吸收; 而鲑鱼降钙素对成骨细胞样细胞的增殖无影响, 但对颅盖骨的吸收有明显的抑制作用。结论 补肾密骨液直接参与骨代谢的调节, 促进骨形成, 同时抑制骨吸收。

【关键词】 中草药 药理学 成骨细胞

Extracorporeal Experimental Study of the Effect of Bushen Migu Ye on Bony Metabolism H U Guang-liang, D U Jing-yuan, WANG Hong, et al. Qingdao Municipal Hospital (Shandong Qingdao, 266011)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of action of Bushen Migu Ye (BSMGY) on bony metabolism. **Methods** Using tissue culture technology, the suspension of osteoblast like cells which obtained from new born mouse skullcap and BSMGY of different concentration were cultured together. The effect of BSMGY on proliferation of osteoblast like cells was analysed by the colorimetric analytical method and ³H-TdR incorporation method. The effect of BSMGY on bone absorption was studied with atomic absorption spectrophotometry. Salmon calcitonin acted as comparison. **Results** BSMGY directly promoted proliferation of osteoblast-like cells at a dose dependent manner and inhibited bone absorption; while salmon calcitonin had no effect on proliferation of osteoblastic cells, but inhibited bone absorption obviously. **Conclusion** BSMGY directly affect bony metabolism by promoting bone formation and inhibiting bone absorption.

【Key Words】 Drugs, Chinese herbal Pharmacology Osteoblasts

临床观察^[1]和动物实验^[2]证实补肾密骨液对骨质疏松症有良好的防治作用, 但这些研究均是在体内进行的, 影响因素较多, 难以明确补肾密骨液影响骨代谢的作用方式。为此我们采用实验条件更加单一的组织培养技术, 观察了补肾密骨液对成骨细胞样细胞增殖和骨块吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 补肾密骨液的制备 补肾密骨液由淫羊藿、杜仲、胡桃肉、干地黄、天花粉、淮牛膝各 10g 组成, 经水煎醇沉制成相当于生药 2g/ml 的药液, 调 pH 值至 7.0, 用 1% 活性炭脱色 3 次, 精滤, 分装, 高压蒸气灭菌, 密封备用。制得的药液符合中国药典注射剂的规定。

1.2 成骨细胞样细胞的分离、培养 将新生的 SD 大鼠(由同济医科大学实验动物中心提供)放入 75% 酒精中浸泡消毒 15 分钟, 无菌操作下取出颅盖骨, 除去附着的血管及结缔组织, 用平衡盐溶液清洗 3 次, 剪碎。洗净的碎骨块用少量 410u/ml 的 II 型胶

原酶(Sigma)预消化 15 分钟, 吸掉消化液, 再用平衡盐溶液清洗干净后, 加入 5 倍于骨块体积的前述胶原酶, 于 37℃ 水浴中振荡下消化 1.5 小时。120 目尼龙网过滤后, 滤液经 1000 转/分离心 5 分钟, 弃上清液, 所得白色沉淀物即为制得的成骨细胞样细胞团。加入含 10% 胎牛血清、青霉素 100u/ml、链霉素 100μg/ml 的 RPMI1640 培养液, 稀释成 2×10^5 /ml 的细胞悬液, 装入无菌培养瓶内, 置入 37℃, 含 5% CO₂ 的培养箱内进行培养, 每 3 天更换 1 次培养液。待细胞会和后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取第 II 继代的成骨细胞样细胞供实验应用。

1.3 补肾密骨液对成骨细胞样细胞增殖的影响 第 II 继代成骨细胞样细胞用培养液稀释成 2×10^5 /ml 的细胞悬液, 以每孔 100μl 加入 96 孔培养板内, 放入 CO₂ 培养箱内孵育 24 小时, 以 6 孔为一平行样本, 分别加入不同浓度的补肾密骨液或鲑鱼降钙素(Sandoz) 20μl, 同时每孔再加入培养液 80μl, 空白对照组只加入 100μl 培养液。这样每孔的培养体

积达 200 μ l。补肾密骨液的作用浓度分别为相当于生药 10 μ g/ml、100 μ g/ml、1000 μ g/ml、5000 μ g/ml；鲑鱼降钙素的作用浓度分别是 10 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml。上述物质加完后，继续培养 72 小时，用溴化二甲基噻唑联苯四唑 (3-(4, 5-dimethylthiazol)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 比色分析法或³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入法检测细胞增殖情况。

1.4 补肾密骨液对体外培养骨块吸收的影响 在无菌操作下取出 5 天龄 SD 大鼠的颅盖骨(左右两块不从中缝剪开，去除附着的神组织，保留完整的骨膜)，置于 24 孔培养板内的自制铜网支架上，使骨块刚好与培养液相平。所用培养液为含 10% 胎牛血清、1mM 磷酸盐的 PRMI1640 培养液，每孔用量为 1ml。将 24 孔培养板置 37℃、5% CO₂ 培养箱内预培养 24 小时，将骨块从中缝剪开，转移至盛有新鲜培养液的相同培养板内，进行配对分组实验，其中一块放于含观察组药物的培养液中，另一块放于含对照组药物的培养液中，具体分组情况见表 1。作用 72 小时后，分别收集每孔内的培养液，经去离子水稀释后于 WFX-IF₂ 原子吸收分光光度计上测量培养液中钙离子的含量。培养骨块于 50% 甲酸溶液 1ml 内溶解后，用同样的方法测出骨块中剩余钙离子的量，并用下列公式计算出钙离子释放百分率：钙离子释放百分率= 培养液中钙离子含量 ÷ (骨块中剩余钙离子含量+ 培养液中钙离子含量) × 100%。钙离子释放百分率的大小反映骨块吸收程度。

表 1 颅盖骨吸收配对实验分组及各组所用药物

实 验	观察组	对照组	每组例数
骨吸收模型实验	甲状旁腺激素 (PTH) (10ng/ml)	培养液	6
补肾密骨液抑制骨吸收实验	补肾密骨液 (1000 μ g/ml) + PTH (10ng/ml)	PTH (10ng/ml)	6
降钙素抑制骨吸收实验	鲑鱼降钙素 (10mU/ml) + PTH (10ng/ml)	PTH (10ng/ml)	6

2 结果

2.1 补肾密骨液对成骨细胞样细胞增殖的影响

2.1.1 MTT 比色分析法结果: 如表 2 所示，补肾密骨液组 OD(吸光度)值随着浓度的增加而增大，与对照组 10 μ g/ml 组比较，差异即有显著性意义 ($P < 0.05$)，与 100 μ g/ml 组比较， $P < 0.01$ ，与 1000 μ g/ml

组比较， $P < 0.001$ 。不同浓度的鲑鱼降钙素组 OD 值变化不大，与对照组相比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 2 成骨细胞样细胞增殖的 MTT 比色分析法结果

分 组	样本数(n)	OD 值($\bar{x} \pm S\bar{x}$)
对照组	6	0.2075 \pm 0.0026
10 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	0.2178 \pm 0.0032*
100 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	0.2258 \pm 0.0040**
1000 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	0.2341 \pm 0.0037***
5000 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	0.2328 \pm 0.0031***
10mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	0.2090 \pm 0.0035 Δ
50mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	0.2100 \pm 0.0029 Δ
100mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	0.2120 \pm 0.0034 Δ

注 与对照组相比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $\Delta P > 0.05$ (表 3,4 同此)

2.1.2 ³H-TdR 掺入法结果: 如表 3 所示，CPM(放射性每分钟计数)值变化规律与 OD 值变化规律完全吻合。

上述实验结果表明：补肾密骨液以剂量依赖的方式促进成骨细胞样细胞的增殖，而鲑鱼降钙素对细胞增殖无影响。

表 3 成骨细胞样细胞增殖的³H TdR 掺入法结果

分 组	样本例数 (n)	CPM 值($\bar{x} \pm S\bar{x}$)
对照组	6	377.5 \pm 32.3
10 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	546.7 \pm 57.7*
100 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	790.5 \pm 89.7**
1000 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	1050.8 \pm 76.1***
5000 μ g 生药/ml 补肾密骨液组	6	1100.5 \pm 102.0***
10mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	385.2 \pm 29.8 Δ
50mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	355.8 \pm 36.3 Δ
100mU/ml 鲑鱼降钙素组	6	392.0 \pm 37.5 Δ

2.2 补肾密骨液对骨块吸收的影响

如表 4 所示，10ng/ml 的甲状旁腺激素使培养骨块钙离子释放百分率由 8.1% \pm 0.3% 升高到 17.6% \pm 0.5% ($P < 0.01$)，提示甲状旁腺激素促进体外培养骨块的吸收，骨吸收模型成立。补肾密骨液与鲑鱼降钙素均能明显地抑制甲状旁腺激素引起的骨块钙离子释放百分率的增加 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)，表明补肾密骨液与鲑鱼降钙素均能抑制体外培养骨块的吸收。

表 4 各组骨块钙离子释放百分率 (%)

分 组	每组例数	观察组	对照组
骨吸收模型实验	6	17.6 \pm 0.5**	8.1 \pm 0.3
补肾密骨液抑制骨吸收实验	6	14.8 \pm 0.4*	17.3 \pm 0.4
鲑鱼降钙素抑制骨吸收实验	6	13.9 \pm 0.3**	17.4 \pm 0.5

3 讨论

本研究结果表明:补肾密骨液不仅能促进体外培养成骨细胞样细胞的增殖,而且还抑制体外培养骨块的吸收,而治疗骨质疏松症的常用药物鲑鱼降钙素仅对体外培养骨块的吸收有抑制作用,对成骨细胞样细胞的增殖无影响,说明补肾密骨液是治疗骨质疏松症的理想药物。

成骨细胞是骨发生和骨形成的基础,只有成骨细胞数量不断增加,并产生丰富的胶原(基质)、分泌较多的钙离子,才能通过钙化基质产生更多的骨组织。但在体内成骨细胞本身是不分裂的,其数量的增加完全依赖于其前身细胞的不断增殖、分化。体外培养的成骨细胞样细胞来源于组织内的前成骨细胞,具有分裂增殖能力^[3]。本研究的结果发现补肾密骨液对体外培养的成骨细胞样细胞的增殖有明显促进作用,由此我们可以推断:在体内,补肾密骨液可通过刺激前成骨细胞的不断增殖、分化,使成骨细胞数量不断增加,进而促进骨形成。这与以往体内研究的结果^[2]相一致。

骨吸收是由破骨细胞来完成的,包括以下三个连续的过程:①破骨细胞的产生及其在骨组织中的聚集;②破骨细胞在骨组织吸收区的激活;③激活的破骨细胞分泌化学物质,溶解基质中的无机盐和有机质。影响骨吸收的物质分别作用于以上三个环节,特别是破骨细胞的产生及活化。甲状旁腺激素

促进前破骨细胞向破骨细胞的分化,使破骨细胞的数目增加;同时甲状旁腺激素还促进破骨细胞的活化。因此甲状旁腺激素促进骨吸收。相反,降钙素直接抑制骨原始细胞向破骨细胞的转化并通过和破骨细胞表面的受体结合而抑制破骨细胞激活,因而降钙素抑制骨吸收。给去势诱导骨质疏松模型大鼠灌服补肾密骨液后,骨组织计量学研究发现,用药组破骨细胞指数比对照组明显降低^[2],提示补肾密骨液有可能通过抑制破骨细胞的产生而抑制骨吸收。

补肾密骨液以淫羊藿、杜仲、胡桃肉为主药。有文献^[4]报道:淫羊藿注射液对体外培养鸡胚股骨生长有直接的促进作用,用药组股骨干重、长度和³⁵S掺入强度均明显增加。也有国外学者^[5]报道:杜仲对实验性骨质疏松动物骨量的减少有明显的抑制作用。本研究结果表明了补肾密骨液体外研究与体内研究、复方药物作用与单方药物作用的一致性。

参考文献

- [1] 沈霖,杜靖远,杨家玉,等. 补肾密骨液防治绝经后妇女代谢性骨质丢失的初步临床研究. 中国中医骨伤科, 1994, 2(4): 13.
- [2] 杜靖远,沈霖,杨家玉,等. 补肾密骨液对大鼠卵巢切除诱导的实验性骨质疏松症的影响. 中华骨科杂志, 1996, 16(7): 462.
- [3] 徐荣辉,朱雅萍,柴本甫,等. 胚胎大鼠颅盖骨分离细胞早期体外培养的组织化学观察. 解剖学报, 1988, 19(1): 53.
- [4] 高子范,杨宗智,马克昌. 淫羊藿注射液对试管内鸡胚股骨生长的促进作用. 中西医结合杂志, 1985, 5(3): 172.
- [5] 川口敦弘. 利用软 X 线评价杜仲对骨萎度的作用. 国外医学·中医中药分册, 1992, 14(6): 48.

(收稿:1998 06 11;修回:1998 09 28 编辑:房世源)

• 病例报告 •

双侧腕关节背侧脱位一例

王世文

(吉林市中医院,吉林 吉林 132011)

李某,男,24岁,1984年7月19日下午6时许,酒后沿铁路线路行走,在过一小桥时,因身体失去平衡,从4米左右桥上坠落于河泥之中致伤双侧腕部,伤后30分钟来院就诊。

检查:双腕部疼痛,伴有银叉样畸形,腕关节活动明显障碍,桡动脉搏动存在,手指感觉正常,颜面部有轻微擦伤,全身情况良好,X线摄片侧位片显示双侧腕骨向背侧脱位,腕骨掌侧面突出于桡尺骨远端背侧面,重叠右腕约有0.5cm,左腕约有0.7cm;正位片显示双

关节间隙消失,近排腕骨与桡尺骨远端呈重叠影像,无腕骨间脱位及骨折。

诊断:双侧腕关节背侧脱位

治疗:患者取仰卧位,前臂纵轴位,以牵引折顶手法,脱位得以整复,腕关节于轻度掌屈位,给予石膏托固定4周。

患者伤后3个月恢复工作,无不适主诉,检查手指和腕关节活动范围正常,一年后X线摄片,腕部诸骨未见缺血性坏死征象,远期随访5年有余,未见腕关节病理改变征象。

讨论 不伴有桡骨损伤的双侧腕关

节背侧脱位,临床上极为罕见,其临床特征与Colles骨折相似,易误诊为Colles骨折,故必须依靠X线摄片,以便于诊断和治疗。该患因酒后身体失于平衡,从小桥上坠落河泥时,腕部肌肉和韧带可能处于松弛状态,双腕着地时又过度伸展所致脱位。而河泥又有缓冲腕着地时的暴力一面,故不伴有桡骨远端骨折。腕关节脱位易酿成腕骨缺血性坏死,必须追踪随访,经过验证确实未见腕关节有病理改变征象时为准。

(编辑:李为农)