

# II 型碳酸酐酶阻断剂对体外破骨细胞的抑制作用

王文军<sup>1</sup> 李建军<sup>2</sup> 李小春<sup>3</sup> 冷向阳<sup>3</sup>

(1. 吉林大学中日联谊医院骨科, 吉林 长春 130031; 2. 吉林大学第一医院骨科; 3. 长春中医学院)

**【摘要】** 目的 研究 II 型碳酸酐酶阻断剂对体外破骨细胞骨吸收过程的影响。方法 由一日龄 SD 大鼠四肢长骨分离破骨细胞并接种于象牙骨片上共同培养, 在培养液中分别加入不同浓度的 II 型碳酸酐酶阻断剂乙酰唑胺, 观察 3 天和 9 天时破骨细胞骨吸收能力的变化, 从而证实 II 型碳酸酐酶对破骨细胞性骨吸收的影响。结果  $10^{-6}$  M 乙酰唑胺使骨吸收陷窝数和吸收面积均显著减少, 浓度为  $10^{-8}$  M 时只对骨吸收面积有显著抑制作用。结论 II 型碳酸酐酶阻断剂通过调整破骨细胞内 pH 值影响破骨细胞分化、成熟及活化进而影响骨吸收。可以对老年性骨质疏松症疾病的治疗发挥早期、连续、持久作用。

**【关键词】** 骨质疏松; 组织学; 碳酸酐酶; 细胞培养

**Inhibition of osteoclasts in vitro by carbonic anhydrase II inhibitor** WANG Wenjun, LI Jianjun, LI Xiaochun, et al. The Japan-China Union Hospital of Jilin University (Jilin Changchun, 130021, China)

**【Abstract】 Objective** To study effects of carbonic anhydrase II inhibitor on bone resorption process of osteoclasts in vitro **Methods** The osteoclasts from long bones of SD rats aged one day were isolated and seeded in ivory bones for culture. Carbonic anhydrase II inhibitor acetazolamide with different concentrations was added to culture media. Changes of the bone resorption ability of the osteoclasts were observed in 3rd and 9th days. The effects of carbonic anhydrase II on osteoclast bone resorption were confirmed. **Results** Both the pit numbers and the pit areas were significantly reduced after using acetazolamide at the concentration of  $10^{-6}$  M, while only the pit areas were reduced at the concentration of  $10^{-8}$  M. **Conclusion** Carbonic anhydrase II inhibitor played a major role in osteoclast differentiation, maturity and activation by effecting the steady state of pH. Thus, it affected the bone resorption and could play an earlier, successive, continual role in treatment of senile osteoporosis.

**【Key words】** Osteoporosis; Histology; Carbonate dehydratase; Cell culture

随着人类寿命的延长, 骨质疏松症 (OP) 已成为广泛的日益增长的公共健康问题, 并带来巨大的社会和经济负担。破骨细胞 (OC) 数量增多及其骨吸收活动增强是骨质疏松症骨量丢失的一个重要方面, 通过抑制破骨细胞性骨吸收来治疗骨质疏松症已在临床上取得较好效果。而 II 型碳酸酐酶 (CA II) 的表达是 OC 分化早期的特征, 可逆性催化  $H^+$  产生, 为破骨细胞骨吸收提供酸源, 许多研究表明<sup>[1-3]</sup> 无论在体内还是体外 CA II 对骨吸收均起着重要作用, 但 CA II 对破骨细胞性骨吸收程序的影响还不十分清楚。因此, 本文采用 CA II 阻断剂乙酰唑胺 (Az) 来研究 CA II 对破骨细胞 (OC) 分化、成熟及活化的影响, 从而为老年性骨质疏松症疾病的治疗开辟一个新的方向。

## 1 材料与方法

1.1 动物 一日龄 SD 大鼠 50 只, 雌雄不限。

1.2 实验材料 PBS (碳酸缓冲液)、199 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (GIBCO), 小牛血清 (华美公司), 乙酰唑胺 (由亨曼博士馈赠, Creative Biomolecules, MA), 1% 甲苯胺蓝染液, 锯齿式切片 (Japan), 超声波清洗仪, Luzex F 型图像分析仪 (Japan)。

1.3 薄骨片制备与处理 取直径 20 mm 的象牙经锯齿式切片切成 50  $\mu$ m 厚 5 mm  $\times$  5 mm 大小骨片, 蒸馏水中超声清洗, 紫外线消毒后存放备用。

1.4 破骨细胞分离和培养 50 只新生 SD 大鼠经 75% 酒精浸泡消毒 5 min, 拉颈处死后分离四肢长骨, 仔细消除附着于骨表面的软组织和骨髓, 骨干部分用 PBS 清洗后放入盛有 15% 199 培养液 (含 10%

小牛血清、5%胎牛血清、100 μg/ml 硫酸链霉素、100 μ/ml 青霉素钠, pH 7.2) 的玻璃平皿中, 用解剖刀将骨质内表面轻刮入培养液, 再用圆头吸管反复吹打骨质碎片 2 min, 静置 0.5 min 后将上层细胞悬液(细胞密度  $1 \times 10^6$ /ml) 均匀接种于预置薄骨片的 24 孔培养板内(每孔 4 片, 每组 4 孔, 共 80 张骨片)。每孔分别加入破骨细胞悬液 1 ml 及含血清的细胞培养液 1 ml, 常规培养 30 min, 用 PBS 冲掉未贴壁细胞, 更换培养液, 继续培养, 培养液每天换一次。

**1.5 药物干预** 实验组分为 a, b 两组, 培养 4 h 后分别加入含乙酰唑胺  $10^{-8}$  M 和  $10^{-6}$  M 的培养液 1 ml, 空白对照组(C 组) 加入等量培养液。

**1.6 骨片吸收陷窝计数及吸收陷窝面积测定** 采用骨片吸收陷窝甲苯胺蓝染色光镜法<sup>[4]</sup> 100 倍下计数 a, b, c 三组第三天和第九天每张骨片上的吸收陷窝数, 同时随机选取 10 个视野, 利用 Luzex-F 型图像分析系统进行吸收陷窝面积测定。

**1.7 统计学分析** 各组吸收陷窝数及吸收面积采用 SPSS 软件的配对 *t* 检验进行分析。

**2 结果**

**2.1 骨吸收陷窝形态观察** 培养 9 d 后 C 组骨吸收陷窝密集成片, 深在, 并清晰显示破骨细胞移动轨迹。b 组骨吸收陷窝散在、孤立分布, 成串及片状, 吸收陷窝少见, 陷窝小而浅。

**2.2 功能测定** 见表 1 和表 2。

表 1 各组的骨吸收陷窝数随培养天数的变化结果( $\bar{X} \pm S$ ,  $n = 16$ )

组别	3 d	9 d
Az $10^{-8}$ M (a 组)	100.70 ± 26.3	331.60 ± 92.37
Az $10^{-6}$ M (b 组)	16.75 ± 7.8	18.25 ± 9.4
对照组(c 组)	108.00 ± 36.4	352.90 ± 96.1

表 2 各组的骨吸收陷窝面积( $\text{mm}^2$ )随培养天数的变化结果( $\bar{X} \pm S$ ,  $n = 10$ )

组别	3 d	9 d
Az $10^{-8}$ M (a 组)	162.35 ± 30.47	972.47 ± 215.78
Az $10^{-6}$ M (b 组)	105.84 ± 24.26	126.85 ± 34.18
对照组(c 组)	437.56 ± 105.28	2107.66 ± 406.93

经统计学分析: ①随时间延长, a 组和 c 组的吸收陷窝数及吸收面积均增加( $P < 0.01$ ) 而 b 组无差别( $P > 0.05$ )。②与对照组相比, a 组对吸收陷窝数的抑制作用不显著( $P > 0.05$ ), 对吸收面积有明显抑制作用( $P_{3d} < 0.05, P_{9d} < 0.01$ ) ③b 组对吸收陷窝数及吸收面积均有显著抑制作用( $P < 0.01$ )。④a 组与 b 组相比, 吸收陷窝

数及吸收面积差异无显著性意义。

以上结果表明, 乙酰唑胺对 OC 体外骨吸收有抑制作用,  $10^{-6}$  M 乙酰唑胺对吸收陷窝数及吸收面积均有显著抑制作用, 而  $10^{-8}$  M 乙酰唑胺主要抑制吸收面积, 随时间延长, 其骨吸收仍显著增加。

**3 讨论**

CA II 是一种金属蛋白酶, 可逆性催化产生  $H^+$ , 我们用乙酰唑胺特异性阻断了 OC 泌酸的主要来源, 破骨细胞脱矿和溶解有机质也受到了影响, 从而抑制了分离 OC 性骨吸收陷窝的形成, 也从反面证明了分泌酸是 OC 引起骨吸收的一个途径。

CA II 对骨吸收的影响不仅通过控制  $H^+$  的分泌, 而且可能影响 OC 的分化和移动, 并且对组织蛋白酶 L 的分泌也产生一定影响<sup>[5,6]</sup>, 其机制是通过调整细胞内 pH 值和  $Ca^{2+}$  浓度来实现的。因此, 我们在一定时期加入不同浓度的 CA II 阻断剂, 中小体积陷窝数量及吸收面积明显减少, 一方面是由于成熟 OC 的吸收活性受到抑制, 另一方面是由于不断分化成熟的 OC 数量减少及移动粘附能力受到抑制所致。本实验同时证明: ①CA II 表达量的多少影响骨吸收程度; ②加入  $10^{-8}$  M Az 后陷窝吸收面积减少而个数并不减少表明 CA II 首先影响 OC 性骨吸收, 其次影响 OC 分化、成熟; ③Az 完全阻断 CA II 的作用后, 破骨细胞仍能形成骨吸收陷窝, 说明在 CA II 对骨吸收起主要作用的同时亦存在其他因素的协同调节。因此, II 型碳酸酐酶阻断剂可以在骨吸收过程的分化、成熟及活化各个环节发挥作用, 因而可以对老年性骨质疏松症引起的骨吸收增强的治疗发挥早期、连续、持久影响。

CA II 在何时表达, 表达量多少与什么有关呢? 骨髓单核破骨细胞前体与骨髓基质细胞接触以后即表达 CA II mRNA。基质细胞分泌 MCSF 等活化因子, 形成一个有利于 OC 分化的骨髓微环境, 并使 CA II mRNA 启动区 AP-1 位点对 1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ 、PTH 等全身性激素的敏感性增高, 从而使 CA II 表达增加<sup>[7]</sup>。在 OC 分化成熟过程中 CA II 的表达逐渐增加, 这种增加受骨髓多细胞体系如成骨细胞、基质细胞等分泌产生的细胞因子调控, 因此, OC 的功能结构如 CA II 的表达并不是孤立变化, 而是一个复杂的、程序化的调控过程。对 c fos 和 c jun 转录因子的刺激可影响 CA II mRNA 的表达<sup>[7]</sup>。

Biskobing 等<sup>[8]</sup>报道细胞内酸性增强可以上调降钙素受体和 CA II 两种破骨细胞功能基因表达, 并且

得出结论:降钙素通过作用于降钙素受体间接影响 CA II 的表达从而使单核 OC 前体细胞的数量减少,进而抑制骨吸收。这提示其他一些抗骨吸收药物最终可能都是通过抑制 CA II 途径发挥作用,这为我们研究抗骨质疏松药物开辟了一个新的方向。通过阻断 CA II,抑制骨吸收,将为今后治疗老年性骨质疏松症疾病提供广阔前景。

#### 参考文献

- 1 David JP, Rincon M, Neff L, et al. Carbonic anhydrase II is an AP-1 target gene in osteoclasts. *J Cell Physiol*, 2001, 188(1): 89-97.
- 2 McMahon C, Wil A, Hu P, et al. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood*, 2001, 97(7): 1 947-1 950.
- 3 Hentunen TA, Harkonen PL, Vaananen HK. Carbonic anhydrases in

calcified tissues. *EXS*, 2000, 90: 491-497.

- 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 Lehenkar P, Hentunen TA, Laitala Leinonen T, et al. Carbonic anhydrase II plays major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and  $Ca^{2+}$ . *Exp Cell Res*, 1998, 242(1): 128-137.
- 6 Saco T, Foged NT, Delaisse JM. The migration of Purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(1): 59-66.
- 7 Diane M, Biskobing DM, Fan DJ, et al. Induction of carbonic anhydrase II expression in osteoclast progenitors requires physical contact with stromal cells. *Endocrinology*, 1997, 138(11): 4 852-4 857.
- 8 Biskobing DM, Fan DJ. Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*, 2000, 67(2): 178-183.

(收稿: 2002-11-18 修回: 2003-01-20 编辑: 李为农)

## • 骨伤护理 •

# 可吸收线张力带治疗髌骨骨折的术后康复

黄瑾青

(嘉善县第一人民医院, 浙江 嘉善 314100)

我科自 1998 年 4 月开始采用可吸收线环扎张力带内固定治疗髌骨骨折, 术后进行系统的康复治疗取得了良好效果, 现报道如下。

### 1 临床资料

64 例中男 39 例, 女 25 例; 年龄 16~94 岁, 平均 47.28 岁。左侧 42 例, 右侧 22 例。致伤原因: 跌伤 45 例, 车祸伤 15 例, 高处坠落伤 3 例, 重物轧伤 1 例。骨折类型: 粉碎性骨折 31 例, 下极骨折 17 例, 横形骨折 16 例。伤后手术时间: 最短 4 h, 最长 13 d, 平均 3.4 d。

### 2 术后康复

第一阶段: 术后 1~3 d, 此时患膝尚处于手术后组织反应期, 创面易渗出, 因而处理以静态锻炼和理疗为主, 包括抬高患肢, 股四头肌收缩, 踝的屈伸及按摩、热敷等。具体做法是: 抬高患肢  $20^{\circ}$ ~ $30^{\circ}$ , 这样有利于静脉回流消除肿胀。踝关节的活动要求每天 3~4 次, 每次 20~30 min, 完成屈伸及环绕运动各 40~50 次左右, 并尽量做到全幅运动。股四头肌主要为等张收缩和舒张, 方法是尽力背屈踝关节, 尽量伸膝, 紧张股四头肌, 使髌骨向近端牵拉, 然后放松, 可做 40~50 次/h, 分 2~3 次进行, 其目的是促进静脉血和淋巴液回流, 加速渗出液的吸收。锻炼时并辅以向心性按摩、热敷等措施。第二阶段: 术后 4~7 d, 创伤反应开始减轻, 肿胀逐渐消退, 组织开始修复, 但较脆弱, 故本阶段的康复以适度的屈膝及直腿抬高锻炼为主。屈膝幅度要求在  $25^{\circ}$  以上, 但不宜超过  $45^{\circ}$ 。直腿抬高训练应在不加重关节疼痛的情况下进行, 以增加股四头肌的肌力。方法是仰卧, 患肢屈膝伸膝, 作直腿抬高, 抬高过程中患膝保持伸直。第三阶段: 伤后第二周, 创伤反应基本消退。此期的目的以增强肌力为主, 除了保持已获得的膝关节活动度外, 继续增

加屈膝度, 在此阶段一般要求屈膝至  $90^{\circ}$ , 并继续作直腿抬高训练。但锻炼时幅度由小到大, 循序渐进。第四阶段: 伤后 3~5 周, 伤口已愈合, 组织修复趋于完成, 骨折开始愈合, 可逐步进行患肢不负重、部分负重及充分负重的站立、下蹲及步行练习, 但必须避免摔倒及不正确的过度活动。

### 3 结果

本组 64 例均获随访, 时间 4~36 个月, 平均 21 个月。所有骨折全部愈合, 愈合时间为 1~1.5 个月, 按胫少汀<sup>[1]</sup>评分法评定: 优 42 例, 良 22 例。

### 4 讨论

4.1 早期康复锻炼的重要性和必要性 功能训练的作用主要在于加速骨与软组织的愈合, 缩短疗程并促进患者运动功能的恢复。故术后尽早进行有计划、有目的、有指导的康复练习。早期功能锻炼有利于肢体血液循环, 促进肢体肿胀消退, 预防关节粘连、僵硬。只有通过肌肉收缩运动和关节活动才能借助张力带内固定以保持骨折端的良好接触, 使骨折端产生加压作用, 促进骨折愈合。

4.2 康复锻炼的注意事项 康复治疗应在医生及护士指导下进行, 早期锻炼若创口疼痛, 可适量服用止痛剂, 整个锻炼过程均应在不加重关节疼痛的情况下进行。锻炼应循序渐进, 避免过强、过急、摔倒及不正确的过度活动。本组有 2 例术后 1 个月时因为病人跌倒和扭伤致患肢再骨折。对于粉碎性骨折则适当减慢进程, 保证愈合。

#### 参考文献

- 1 胫少汀. 改良张力带钢丝内固定治疗髌骨骨折的试验研究及临床应用. *中华骨科杂志*, 1987, 7(5): 309.

(收稿: 2002-09-23 编辑: 李为农)