

黔岭藿对体外培养的破骨细胞作用的研究

陈坤 于世风 史凤芹 庞淑珍

摘要 从新生兔四肢长骨中分离的破骨细胞与牛骨片在体外培养后,加入不同浓度黔岭藿注射液再培养,并设立对照,用倒置相差显微镜观察黔岭藿对破骨细胞形成骨吸收陷窝的影响。结果显示黔岭藿3个浓度组(0.15mg/ml、1.5mg/ml、15mg/ml)与对照组比较均能抑制破骨细胞在骨片上形成吸收陷窝的数量,增加药物浓度抑制作用亦趋增强($P<0.05$)。

关键词 黔岭藿 破骨细胞 骨吸收

Effect of Chinese herb *epimedium leptorrhizum* Stearn on osteoclastic bone resorption

Chen Kun, Yu Shifeng, Shi Fengqin and Pang Shuzhen

(Department of Stomatology, Affiliated Hospital of
Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract Osteoclasts were isolated from the long bones of newborn rabbits and cultured on bovine slices in vitro. Each bone slice was placed in a well of a 24-well culture plate containing various concentrations of Chinese herb *epimedium leptorrhizum* Stearn in medium 199 or in control medium. Under phase-contrast microscope, the effect of *epimedium leptorrhizum* Stearn on bone resorption lacunae generated by osteoclasts was observed. The results show that all of the concentrations of *epimedium leptorrhizum* Stearn (0.15mg/ml, 1.5mg/ml, 15mg/ml) have significant inhibitory effect ($P<0.05$), which is increased with concentration of drugs.

Key words Chinese herb *epimedium leptorrhizum* Stearn Osteoclast Bone resorption

中医理论认为“肾主骨”,肾虚与骨质疏松密切相关,骨质疏松症等骨病常用补肾中药得以治疗。黔岭藿是补肾中药之一。已有资料表明该药有抑制去势大鼠破骨细胞的骨吸收活动的作用^[1]。本文采用已建立的体外破骨细胞分离培养技术^[2,3],以观察黔岭藿对体外破骨细胞性骨吸收的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:出生24小时内的日本大耳白兔6只,由中国兽药研究所实验动物室提供合格动物。

1.1.2 药品及试剂:(1)黔岭藿注射液:由北京医科大学药学院及药厂制备,含3g/2ml生药;(2)199培养液(Gibco Laboratories, USA);(3)胎牛血清(浙江省金华市清湖接牛利用研究所出品);(4)HEPES(Sino-American Biotechnology公司出品);(5)青霉素与链霉素(华北制药厂出品)。

1.1.3 新鲜牛股骨。

1.2 方法

1.2.1 破骨细胞的分离:参照Chambers与于世风改良^[2,3]法,将6只动物断头处死,在无菌条件下,分离股骨、肱骨及胫骨,去净骨面的软组织及软骨骺。骨干及干骺端在Hank's液中

洗2次,再放入已盛有22ml 199培养液的培养皿中(199培养液中含有25mol/L HEPES缓冲液,15%胎牛血清,100 μ g/ml青霉素,100 μ g/ml链霉素),将骨干纵行剖开,用手术刀轻刮骨髓腔表面,用尖吸管吸取培养液反复冲洗骨髓腔和骨的内表面,直至骨面变白为止。最后用吸管吸吹振荡细胞悬液2分钟,使附着在碎骨片上的破骨细胞游离进入培养液中,再静置1分钟使碎骨片自然沉降,吸取细胞悬液即用于实验。

1.2.2 骨磨片的制备:新鲜牛股骨的骨皮质,用金钢砂片分切成约6mm $\times$ 6mm大小,厚约100 μ m的小骨片。再用粗细不同的磨刀石磨成约10 μ m厚的骨片。使用前,所有的骨磨片均置蒸馏水中,在超声清洗器内清洗3次,每次5分钟。然后,将骨片浸泡于含抗菌素(青霉素1000U/ml,链霉素1mg/ml)的培养液中,更换3次培养液,每次20分钟。

1.2.3 破骨细胞的培养:于24孔培养板中加入1ml/孔199培养液和一片骨磨片,置二氧化碳培养箱内,5%CO₂,37℃条件下,孵育1小时,加入上述分离的细胞悬液,每孔1ml,继续培养。

1.2.4 黔岭霍的添加:细胞悬液与骨磨片共同培养20小时,用199培养液中洗骨片上未附着的细胞(主要为红细胞)。另取无菌24孔培养板1块,18个孔中加入2ml用199培养液配制的黔岭霍注射液,浓度为0.15mg/ml、1.5mg/ml及15mg/ml,每种浓度6个培养孔;另4个孔仅加199培养液2ml作为对照。然后,每孔随机加入一片上述处理的骨片,继续培养。

1.2.5 吸收陷窝的动态观察和计数:应用Olympus倒置相差显微镜,于不同时间观察破骨细胞在骨片上形成吸收陷窝的动态改变,并选择有代表性的数个视野,进行显微摄影。培养7天,每个骨片选取有代表性的5个20倍视野,计数骨吸收陷窝数。统计学用 t 检验。

2 结果

2.1 骨吸收陷窝的形态变化,分离的破骨细胞

与骨片共同培养28小时,骨片上出现少量骨吸收陷窝,多为圆形或椭圆形,少数不规则形。随着培养时间的增加,对照骨片上吸收陷窝都有不同程度的增加和扩大,形成贝壳形、腊肠形或不规则形的骨吸收弯曲(图1,2)。三种浓度黔岭霍对骨吸收陷窝均见不同程度的抑制(图3,图4)。

2.2 骨片骨吸收陷窝数的改变详见附表。

附表 骨片上吸收陷窝数(个/5个20倍视野)

组别 孔号	对照组	黔 岭 霍		
		0.15mg/ml	1.5mg/ml	15mg/ml
1	204	93	92	75
2	177	111	66	33
3	97	75	54	40
4	118	86	78	73
5		89	49	34
6		31	34	28
$\bar{x} \pm s$	118.25 $\pm$	81.00 $\pm$	58.83 $\pm$	48.66 $\pm$
	49.97 $\sim$	27.31*	19.44**	20.85**

注:与对照组相比 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

由附表可见,黔岭霍不同浓度组与对照组比较均能减少对培养破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈量效关系。

3 讨论

黔岭霍系单叶淫羊藿属,为中医常用补肾药物。早在《本草纲目》中就有“益精气、坚筋骨、补腰膝、强心力”的记载。淫羊藿主要有效成份为淫羊藿甙、淫羊藿总黄酮及多糖,此外,微量元素锌、锰含量也很高^[4]。高子范等报道淫羊藿对鸡胚股骨的生长和骨蛋白多糖的合成有明显促进作用^[5],能显著提高“阳虚”动物骨髓细胞增殖及DNA合成率^[6]。吴非等报道黔岭霍对去势大鼠能增加成骨细胞的衍化和增殖,抑制破骨细胞的吸收功能^[7]。本文用体外破骨细胞分离培养技术,观察黔岭霍对破骨细胞性骨吸收的直接作用,见破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝明显较对照组减少,且呈量效关系,浓度增加时,陷窝数进一步减少,这表明黔岭霍对破骨细胞有直接的抑制作用,但其作用机制有待

进一步研究。

本研究是本文第一作者在北京医科大学口腔医学院病理研究室研修期间完成。

本文图1~图4见插页第2页

参考文献

- 1 吴非,时光达. 补肾中药黔岭藿对去势大白鼠骨质疏松模型骨计量学参数的影响,见:刘忠厚主编. 骨质疏松症. 北京:化学工业出版社,1992:604~607.
- 2 Chambers TJ, Magnus GJ. Calcitonin alters behavior of

isolated osteoclast. J Pathol, 1982, 136: 27.

- 3 于世风,金六纯也. 制酸剂 Omeprazole 对分离破骨细胞性骨吸收影响的研究. 现代口腔医学杂志, 1991, 5: 85.
- 4 朱梅年,柴立. 试论中医“肾”的物质基础——有关微量元素锌、锰的探讨. 中医杂志, 1983, 5: 66.
- 5 高子范,杨宗智,马克昌,等. 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: 172.
- 6 刘福春,丁光霞,李菊仙. 淫羊藿多糖对羟基脲所致“阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率的影响. 中国中药杂志, 1991, 16: 620.

新疆老年学学会骨质疏松委员会成立

新疆老年学学会骨质疏松委员会成立大会于1996年8月23日在乌鲁木齐市隆重召开。自治区老龄委、老年学学会、民政厅、卫生厅、乌鲁木齐市卫生局、中华医学会新疆分会等单位领导到会祝贺。

中国老年学学会骨质疏松委员会主任委员、《中国骨质疏松杂志》主编刘忠厚教授、《中国骨质疏松杂志》副主编、中日友好医院妇产科主任邢淑敏教授专程从北京前来祝贺,并就骨质疏松症的诊断、治疗、预防等作了专题报告。

来自全疆各地(州)、市、县医疗卫生单位的代表根据《新疆老年学学会骨质疏松委员会章程》和各单位推荐,经过充分酝酿选举产生了第一届委员会。乌鲁木齐矿务局骨质疏松研究所所长、新疆煤矿总医院院长刘培成主任医师任主任委员。乌鲁木齐矿务局骨质疏松研究所副所长、新疆煤矿总医院骨科主任医师张福才任秘书长。

(徐瑞英供稿)



图 1 正常对照组, 分离的破骨细胞与牛骨片共同培养 44 小时, 骨片上出现 4 个吸收陷窝, 相差显微镜(40 $\times$)

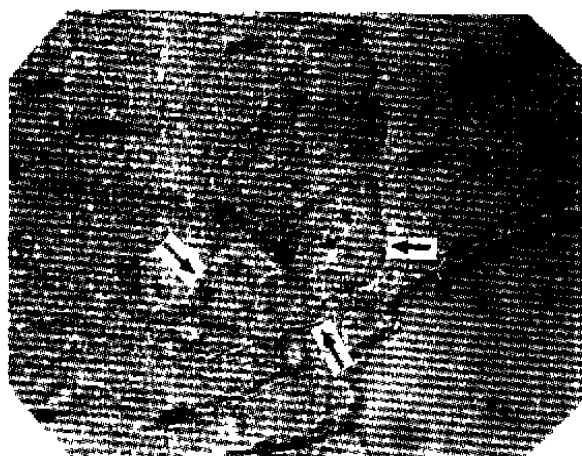


图 2 2 小时后, 与图 1 同一视野内, 增加 4 个吸收陷窝(箭头示), 相差显微镜(40 $\times$)

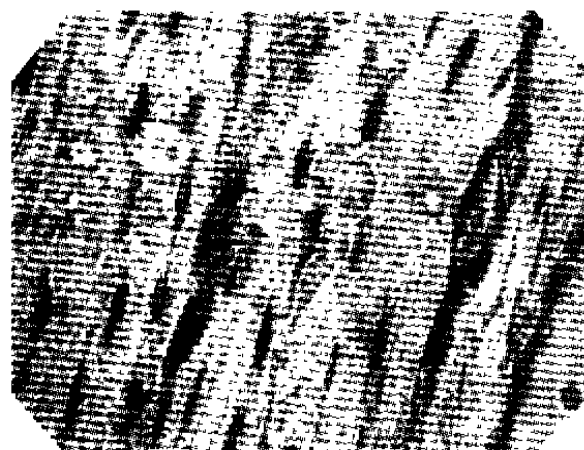
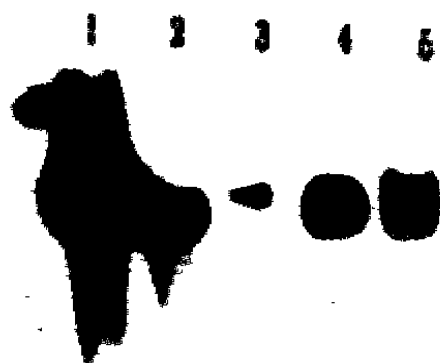


图 3 黔岭霍组, 分离的破骨细胞与牛骨片共同培养 28 小时, 骨片上出现 4 个吸收陷窝, 相差显微镜(40 $\times$)



图 4 加入黔岭霍(0.15mg/ml)培养 100 小时后, 与图 2 同一视野内, 仅增加 1 个吸收陷窝(箭头示), 相差显微镜(40 $\times$)



1. 地塞米松短期应用的兴奋作用 2. 正常 2 月龄大鼠 3. 地塞米松长期应用的兴奋作用 4. 中药的影响 5. 维生素 D 的影响

图 1 Northern blotting 结果

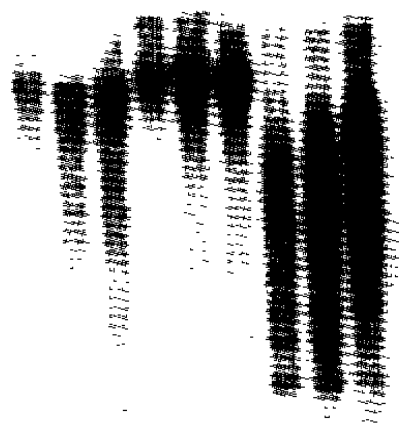


图 2 E 为 EcoRI, H 为 Hind III, R 为 Rsa I, Southern blotting 杂交结果显示, CaBP-D9k 基因没有突变