

BM₂₁₀₉₅₅对破骨细胞骨吸收的抑制作用

金慰芳 高建军 王洪复 王博诚 胡名扬



摘要 细胞水平研究国产双磷酸盐药物-BM₂₁₀₉₅₅的骨吸收抑制作用。由1日龄SD大鼠四肢长骨分离破骨细胞(OC)并接种于牛皮质骨薄片上,在不同浓度BM₂₁₀₉₅₅作用下培养,定时取骨片作TRAP免疫组化染色,计数阳性多核细胞后,经超声去除细胞后作甲苯胺蓝染色,光镜下作吸收陷窝计数,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并与对照比较作 t 检验。结果显示:①BM₂₁₀₉₅₅能降低体外培养OC的数目,10⁻⁶mol/L组的TRAP阳性多核细胞较对照组减少73%,差异具有非常显著性, $P < 0.01$ 。②BM₂₁₀₉₅₅抑制OC的陷窝形成能力,10⁻¹⁰、10⁻⁸mol/L组的抑制率分别为76.32%和87.99%,均与对照有明显差异, $P < 0.01$ 。③上述结果与剂量有关,剂量越高,抑制效应越明显。

关键词 BM₂₁₀₉₅₅ 破骨细胞 TRAP 吸收陷窝

Inhibitory effect of BM₂₁₀₉₅₅ on bone resorption osteoclasts

Jin Weifang, Gao Jianjun, Wang Hongfu, et al

Research Center of Geriatric Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

Abstract The aim of this study was to evaluate the effects of BM₂₁₀₉₅₅ (a compound of bisphosphonate manufactured in China) on resorption capacity of osteoclasts *in vitro*. The osteoclasts isolated from the long bone of 1-day-old rats were cultured on bone slices. After incubation in different concentrations of BM₂₁₀₉₅₅, the cells were fixed and stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). TRAP-positive multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. After the cells were stripped off by ultrasonication, the bone slices were stained in toluidine blue. The excavated lacunae were counted under light microscope (LM). The results showed that the TRAP-positive multinucleated cells were reduced by 73% ($P < 0.01$) in BM₂₁₀₉₅₅ treated group then in control. The decrease rates of pit number in 10⁻¹⁰mol/L and 10⁻⁸mol/L BM₂₁₀₉₅₅ group were 76.32% ($P < 0.01$) and 87.99% ($P < 0.01$).

Key words BM₂₁₀₉₅₅ Osteoclasts TRAP Resorption Lacunae

破骨细胞骨吸收功能活跃是骨质疏松症发生的病理生理之一。对OC骨吸收功能的抑制是防治OP的主要药理基础^[1]。双磷酸盐(BP)是一类与骨基质焦磷酸结构相类似的骨吸收抑制药物,具有高效、稳定的特点,在OP防治中

的作用已为国内外所肯定^[2]。BM₂₁₀₉₅₅为江苏省原子核研究所研制合成的新型双磷酸盐药物,本文在细胞水平定量研究其药效并阐明其抑制OC骨吸收机制将会为其临床推广应用提供重要依据。

本课题受卫生部“九五”攻关课题资助

作者单位:200032 上海医科大学老年医学研究中心(金慰芳、高建军、王洪复);江苏省原子医学研究所(王博诚、胡名扬)

作者简介:金慰芳,女,46岁,副教授。上海医科大学老年医学研究中心骨代谢研究室副主任。主要从事骨代谢实验室工作。

1 材料与方法

1.1 材料:1日龄 SD 大鼠(上海医科大学放射医学研究所动物房,合格证34);MEM、胎牛血清(Gibco);BM₂₁₀₉₅₅(江苏省原子核研究所);TRAP 孵育液^[3](萘酚 AS-BI 磷酸钠、六偶氮副品红、酒石酸钾钠)为自配;甲苯胺蓝(E-Merck)染液、锯式切片机(Leitz 1600型德国);光学显微镜(Nikon 日本);超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司 SB2200型)。

1.2 薄骨片制备 取新鲜牛股骨皮质-30℃贮存,临用时经锯式切片机纵向切成50μm厚5mm×5mm大小骨片,蒸馏水中超声清洗10分钟×3次自然干燥,紫外线照射消毒备用。

1.3 破骨细胞分离和培养 参照文献^[3],取新生 SD 大鼠(1日龄)分离四肢长骨(股骨、肱骨、胫骨),清除骨表面软组织和骨髓,骨干部分放入盛有 MEM 培养液(15%胎牛血清,100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素,pH7.0~7.1)的玻璃平皿中,用解剖刀纵剖后将骨质内表面轻刮入培养液,吸管反复吹打骨质碎片2分钟,静止30秒钟后将上层细胞悬液均匀接种于预置薄骨片的24孔培养板中,每孔4片,加培养液至1ml,常规培养(37℃ 5%CO₂ 95%空气)30分钟,用 MEM 培养液冲掉未贴壁细胞,更换培养液,每孔2ml,继续培养,每24小时换液一次。

1.4 药物干预 培养5小时后分别加入不同浓度 BM₂₁₀₉₅₅100μl,对照组加等量生理盐水。培养液每24小时换1次,药物同时加入。

1.5 TRAP 阳性细胞观察与计数 参照文献^[3]方法,设药物加入时间为0时,分别于0时、培养3天取骨片,经2.5%戊二醛,4℃固定10分钟,蒸馏水洗3次,浸入 TRAP 孵育液,37℃孵育50分钟,蒸馏水冲洗后光镜观察,作多核 TRAP 阳性细胞计数。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果与对照组作 *t* 检验。

1.6 骨片吸收陷窝计数 参照文献^[4],每24小时取出骨片,25%戊二醛固定7分钟,0.25mol/L 氢氧化铵超声清洗5分钟×3次,系列酒

精脱水,1%甲苯胺蓝室温下染色3~4分钟,蒸馏水清洗后光镜下观察,100倍下对整张骨片作陷窝计数,结果以陷窝数/骨片表示。每时相点4张,骨片数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 对体外培养 OC 生存力的影响

OC 生存力是影响其骨吸收的重要方面,利用 TRAP 染色观察 BP 对 OC 生存数的影响结果见表1。

表1 各组骨片 TRAP 阳性多核细胞计数结果

组别	培养时间(天)	
	0	3
对照组	132.63±46.5	26.75±7.8
10 ⁻¹² mol/L	—	23.00±13.6
10 ⁻¹⁰ mol/L	—	17.75±7.4
10 ⁻⁸ mol/L	—	7.00±6.9*

注: $\bar{x} \pm s$, n=4,与对照组比,*P<0.01

OC 接种密度为每张骨片130个左右,经过3天培养,对照组 TRAP 阳性多核细胞为30个左右,接近25%,10⁻¹²mol/L、10⁻¹⁰mol/L 组的 OC 细胞数较对照组减少14%和33.6%,与对照组比较无统计学意义。10⁻⁸mol/L 组是7个左右,较对照组减少73.8%,明显低于对照,P<0.01。BP 浓度越大,OC 数下降越明显。

2.2 对 OC 骨吸收能力的影响

BP 的主要药理基础是抑制骨吸收。采用破骨细胞骨片吸收陷窝光镜计量法观察 BM₂₁₀₉₅₅对体外培养 OC 骨吸收功能的影响结果如图1。

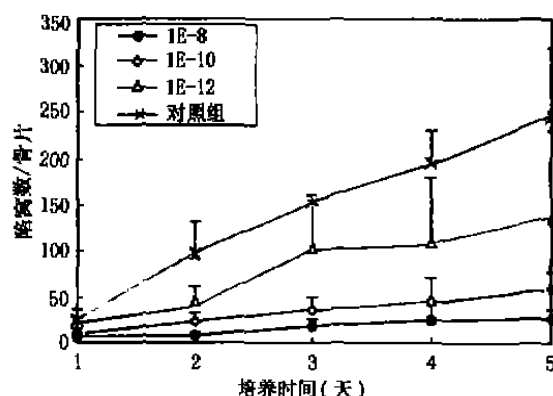


图1 BM₂₁₀₉₅₅对破骨细胞骨吸收能力的抑制作用

注: $\bar{x} \pm s$, n=4

随着培养时间的延长,吸收陷窝数增加,药物组的吸收陷窝增加受到抑制,抑制作用与药物剂量有关,剂量越高,抑制效应越明显。培养3天的结果(表2)表明, 10^{-10} 、 10^{-8} mol/L 的吸收陷窝数量分别为36、18个/骨片,明显低于对照组, $P < 0.01$ 。

表2 培养3天骨片吸收陷窝数及 BM_{210955} 抑制率

组别	陷窝数/骨片	抑制率(%)	P 值
对照组	152.00±9.09	—	—
10^{-10} mol/L	104.00±46.20	31.58	>0.05
10^{-10} mol/L	36.00±14.76	76.32	<0.01
10^{-8} mol/L	18.25±7.27	87.99	<0.01

3 讨论

BP 是 P-C-P 基团为特征的磷酸盐复合物,在体内非常稳定,不被酶水解。根据其 α -C 上侧链的不同分为不同种类,共同特征是与磷酸钙和骨矿盐特异结合,并也是其影响骨代谢的结构基础。与矿盐结合后的 BP 对骨代谢主要表现为二个方面的作用,一是抑制矿盐结晶的形成而抑制骨矿化,另一作用是抑制骨吸收。前者只有在较高浓度下出现,如人口服 Etidronate 800 mg/d 才表现出对骨矿化的抑制作用,而抑制骨吸收的有效剂量为 400 mg/d。骨矿化抑制作用限制了该药的推广应用。OP 防治的要求是较强的骨吸收抑制作用,较弱或无矿化抑制作用,为此新一代 BP 不断问世,在药效、安全性和耐受性等方面有了较大的提高^[2], BM_{210955} 为新一代中最具有潜力的药物。

BP 的主要药理基础是抑制骨吸收,普遍认为这种抑制作用是其对 OC 直接作用的结果。BP 依其与磷酸盐高度的亲和力而与暴露的骨矿盐紧密结合,骨吸收过程中随 OC 对骨矿盐的溶解释放出来,抑制 OC 的分化成熟和骨吸收活性。其直接作用表现为干扰细胞骨架系统、引起 OC 伪足收缩、抑制皱褶缘形成和溶酶体释放^[5]。鉴于 BP 能引起 OC 形态和功能的变化,Fleisch 认为这与 BP 对 OC 的代谢功能直

接损伤有关。也有报道 BP 也能引起成骨细胞(OB)形态改变,为 BP 骨吸收机制的研究提供了新的思路,Sahni 应用成骨细胞克隆-CRP10/30 细胞证实 BP 抑制 OC 骨吸收中 OB 的介导作用^[6],并认为这是由于 BP 抑制 CRP10/30 细胞促骨吸收因子的释放的结果,尤其在低浓度这种作用更明显。本文在骨片上培养 OC 数天,通过骨片形成陷窝的数目来衡量 OC 骨吸收功能,并观察国产 BP BM_{210955} 的作用。结果表明 BM_{210955} 对 OC 骨吸收功能有明显抑制作用并与剂量有关。

抑制 OC 分化成熟和诱导 OC 凋亡是 BP 作用的另一形式。OC 的分化成熟需要 OB 的参与和调控,OB 通过 M-CSF、IL-6、IL-11 及膜蛋白分子调控 OC 的分化成熟,同样在 BP 药效中发挥作用。Evans 和 Braidman^[7]通过对胎鼠头盖骨 OC 观察发现 BP 能抑制 OC 的成熟,后被 Hughes^[8]和 Nishikawa^[9]通过骨髓细胞诱导培养、TRAP 染色计数证实。这种作用与剂量相关并具有可恢复性,对 OC 分化后期的抑制作用比对 OC 前体增殖更重要。Nishikawa 认为这种 BP 诱导 OB 分泌抑制因子,而不是抑制活化因子的作用。Hughes^[10]观察到 BP 能促进 OC 凋亡,是正常的 4~24 倍。本文采用 TRAP 技术,通过比较骨片上 OC 培养不同时间的数目,观察 BM_{210955} 对 OC 生存力的作用。结果表明 10^{-8} mol/L BM_{210955} 明显促进体外培养 OC 数目下降,这可能与其促进 OC 凋亡和抑制 OC 分化成熟有关,其机理有待进一步研究阐明。

参 考 文 献

- 1 孟迅吾. 骨质疏松症的预防和治疗对象. 全国代谢性骨病学术研讨会论文汇编, 1996. 52-55.
- 2 Fleisch H. Prospective use of bisphosphonates in osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76(6):1397.
- 3 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.
- 4 高建军, 金慰芳, 王洪复. 骨片吸收陷窝光镜计量法与益钙宁抑制骨吸收作用评价. 上海医科大学学报.

骨小梁组织学显示,更年鼠与青年鼠比骨皮质变薄,骨小梁变细、萎缩,甚至较大区域骨小梁消失,周围覆盖的类骨质减少,髓腔明显扩大而大中剂量组骨皮质较厚,骨小梁变粗,骨皮质周围覆盖的类骨质活跃,股骨颈周围骨小梁计数显示与模型组比,大中剂量、己烯雌酚组有显著性差异。本制剂能明显改善骨组织形态学。

本研究已证实更年平调冲剂具有性激素样作用,可多层次调节垂体-下丘脑-性腺轴,调节神经内分泌系统,改善卵巢的形态功能,提高雌激素水平,能有效地增加前臂桡骨远端骨量,能提高骨钙素,促进骨组织形成,改善骨组织形态学,增加骨钙含量,增加骨密度。本方能恢复失

骨,维持骨量,故能防治骨质疏松的发生,实验证明更年平调冲剂对子宫内膜无增生作用。

参 考 文 献

- 1 程化奇,熊舜华,殷新猷.大鼠更年期实验模型研究.上海实验动物科学,1993,13(4):192-196.
- 2 刘忠厚.骨质疏松症的诊断、预防及治疗.中国中西医结合杂志,1996,16(5):263.
- 3 Eriksen EF. Osteoporosis: pathophysiology, prevention, diagnosis, and treatment. J Bone Miner Res, 1987, 107: 923.
- 4 Brown JP. Serum bone Gla protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. Lancet, 1984, 19: 1091.

(上接第76页)

密钙息注射液系人工合成的鲑鱼降钙素制剂,通过抑制破骨细胞活性、抑制溶骨和刺激成骨细胞形成、增加活性等机制,对骨质疏松性骨折有明显的止痛、固钙作用。我们采用小剂量间歇注射疗法治疗骨质疏松性骨折,平均用药8.8次,临床观察证明确有显著缓解骨痛和增加骨

密度的作用。表明密钙息是治疗骨质疏松性骨折的安全有效药物。

参 考 文 献

- 1 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998. 160.
- 2 徐济民.临床实用新药手册.上海:上海科技出版社,1996. 511.

(上接第12页)

- 5 Sato M, Grosser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. J Bone Miner Res, 1990, 5: 31.
- 6 Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the medication of osteoblasts. J Clin Invest, 1993, 91: 2004.
- 7 Evans. C E, Braudman IP. Effects of two novel bisphosphonates on bone cells *in vitro*. Bone Miner, 1994, 38: 822-825.
- 8 Hughes DE, MacDonald BR, Russell RGG, et al. Inhibition

- of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. J Clin Invest, 1989, 83: 1930.
- 9 Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone, 1996, 18: 9.
- 10 Hughes DE, Wright K, Sasaki A, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. J Bone Miner Res, 1995, 10(10): 1478.