

补肾中药防治原发性骨质疏松症的细胞学研究

石印玉¹ 詹红生² 赵咏芳¹ 沈培芝³ 徐宇³

摘要 为了比较补肾复方对成骨细胞(OB)、破骨细胞(OC)的药效异同,用 MTT 法测定 OB 增殖能力,骨陷窝计数定量评定 OC 骨吸收活性。结果,金匱肾气丸、补肾益精方、知柏地黄丸、西药倍美力对 OB 增殖的平均影响率分别为 159.2%、121.5%、21.6%、75.7%;对骨陷窝数的平均影响率分别为 50.2%、21.0%、19.8%、38.1%。表明平补阴阳药既促进 OB 增殖又抑制 OC 活性,加重温阳药促 OB 增殖作用加强,加重养阴药的作用则相反,养阴并加入泻火药则对 OC 活性和 OB 增殖均表现为抑制。

主题词 骨质疏松/预防和控制 补肾药/治疗应用 骨和骨组织/细胞学

按中医学“肾主骨”的理论,已有诸多用补肾中药防治原发性骨质疏松症的实验或临床研究^[1,2]。中医学理论中的肾有肾阴肾阳之分。我们通过证型调查,认为绝大部分原发性骨质疏松症患者属肾虚而偏于肾阴虚,结合考虑高龄人群的群体状态,制订了以补肾阴为主,兼顾补肾阳,并佐以益气活血的补肾益精方,临床和实验显示此方能增加骨量、改善骨结构、提高骨强度。为了解补肾中药对于原发性骨质疏松症相关的成骨细胞(OB)、破骨细胞(OC)活性的影响,作者用含药血清方法观察了补肾益精方及温肾阳代表方金匱肾气丸、滋阴泻火代表方知柏地黄丸干预离体培养的成骨细胞和破骨细胞,今报告研究的初步结果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器:MEM 和 Medium199 培养基、胎牛血清(FBS)、小牛血清(NCS)为 Gibco 公司产品,胰蛋白酶为 Difco 公司产品,Ⅰ型胶原酶为 Sigma 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;723 型分光光度计,Leitz1600 型锯式切片机,SB2200 型超声波清洗仪,Nikon102 型光学显微镜,日立 S-520 型扫描电镜。

1.2 成骨细胞分离与培养:参照文献^[3],取 1 日龄 SD 大鼠(由上海医科大学放射医学研究所实验动物中心提供,沪医实验动物合格证号 34),75%乙醇浸泡

15min,揭去头皮,取出头盖骨,剔净附着的结缔组织,PBS 冲洗 3 遍,用 0.25%胰蛋白酶预消化 25min,再用 0.1%Ⅰ型胶原酶消化,37℃振荡、60 次/分、1h×2 次,离心 1000rpm、10min。细胞经 PBS 洗后,加入含 10%的 NCS-MEM 培养液中,37℃、5%CO₂ 环境中培养,次日换液,以后每 2~3 天换液 1 次。

1.3 破骨细胞分离与培养:参照文献^[4~6],取 1 日龄 SD 大鼠(来源同上),拉颈处死,75%酒精浸泡 5min,无菌分离四肢长骨,剔净软组织,用 Medium199 培养液清洗 2 次,然后于 Medium199 全培养液(含 20% FBS、100μg/ml 硫酸链霉素、100U/ml 青霉素钠,pH7.2)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 5min,静置 30s,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,37℃、5%CO₂ 环境中培养 30min,以 Medium199 培养液冲去未贴壁的细胞,更换全培养液至每孔 2ml,继续培养,3 天更换 1 次培养液。

1.4 大鼠血清制备:参照文献^[7~9],取正常 SD 大鼠(来源同上),每组 10 只,体重 270±20g,雌雄各半。按体表面积方法计算动物等效给药量,补肾益精方(何首乌、石斛、淫羊藿、黄芪、骨碎补等)胶囊(上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供,批号 980528),金匱肾气丸(兰州佛慈药厂产品,批号 981138),知柏地黄丸(兰州佛慈药厂产品,批号 980716),倍美力(美国惠氏—艾尔斯特公司艾尔斯特大药厂产品,批号 A974055)分别以生理盐水溶解,连续 2 次(间隔 2h)灌胃,末次灌胃后 1h 采血,制备含药血清。动物以 1.1%氨基甲酸乙酯(广州化学试剂厂产品)腹腔注射(1.1g/kg)麻醉,无菌条件下颈动脉放血,4℃离心 2500rpm、25min,抽取血清,56℃、30min 灭活,经 0.22μm 滤膜抽滤除菌,分装,-30℃保存备用。同等条件下制备正常大鼠血清和生理盐水灌胃对照血清。

1.5 MTT 法测定成骨细胞增殖:细胞以 5×10³/孔接种于 24 孔培养板内,第 2 天更换为含有加药血清或对照血清的培养液,培养 2 天后,PBS 冲洗,更换无血清的 MEM 培养液,同时加入 MTT,孵育 4h 后加入 SDS 终止反应,在波长 570nm 处读取 OD 值。

1.6 骨吸收陷窝观察与计数:参照文献^[6]培养 8h 后更换为加有含药血清或对照血清的培养液,培养至第

基金项目:国家“九五”攻关项目基金资助(969060905)

1 上海中医药大学附属曙光医院骨伤科,上海市普安路 185 号(200021)

2 浙江中医学院

3 上海市中医药研究院骨伤科研究所

收稿日期:2000-04-12;修回日期:2000-08-03

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 含药血清对成骨细胞增殖能力的影响(OD值, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	OD值		
		第1批次	第2批次	第3批次
对照血清	8	0.048 $\pm$ 0.016	0.067 $\pm$ 0.021	0.098 $\pm$ 0.012
倍美力	8	0.026 $\pm$ 0.008 Δ^*	0.054 $\pm$ 0.023 $*$	0.094 $\pm$ 0.021 $*$
补肾益精方	8	0.081 $\pm$ 0.0003 $^{\#}$	0.082 $\pm$ 0.013 Δ	0.078 $\pm$ 0.001 $^{\#}$
金匱肾气丸	8	0.107 $\pm$ 0.007 $^{\#*}$	0.099 $\pm$ 0.010 $^{\#*}$	0.111 $\pm$ 0.017 $*$
知柏地黄丸	8	0.017 $\pm$ 0.011 $^{\#*}$	0.015 $\pm$ 0.005 $^{\#*}$	0.008 $\pm$ 0.001 $^{\#*}$

与对照血清组比较, $\#P<0.01$, $\Delta P<0.05$; 与补肾益精方组比较, $*$ $P<0.01$

表2 含药血清培养象牙片上吸收陷窝计数结果(个/片, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	吸收陷窝数			
		第1批次	第2批次	第3批次	第4批次
对照血清	4	136.7 $\pm$ 74.0	168.8 $\pm$ 27.0	241.8 $\pm$ 77.6	183.3 $\pm$ 70.0
倍美力	4	84.5 $\pm$ 58.5 $\blacktriangle$	7.3 $\pm$ 7.9 $^{\#}$	141.3 $\pm$ 25.6 Δ	50.0 $\pm$ 7.5 $^{\#}$
补肾益精方	4	17.5 $\pm$ 9.4 $^{\#}$	22.0 $\pm$ 17.6 $^{\#}$	99.5 $\pm$ 40.7 Δ	31.5 $\pm$ 15.0 $^{\#}$
金匱肾气丸	4	98.7 $\pm$ 67.6 $\blacktriangle$	71.5 $\pm$ 13.5 $^{\#*}$	125.0 $\pm$ 56.3	68.0 $\pm$ 42.0 Δ
知柏地黄丸	4	29.7 $\pm$ 28.6 $^{\#}$	18.8 $\pm$ 11.2 $^{\#}$	90.5 $\pm$ 11.2 $^{\#}$	16.5 $\pm$ 1.3 $^{\#}$

与对照血清组比较, $\#P<0.01$, $\Delta P<0.05$; 与补肾益精方组比较, $*$ $P<0.01$, $\blacktriangle P<0.05$

7天,取出所有象牙薄片,2.5%戊二醛固定7min,于0.25mol/L氢氧化铵中超声波清洗5min $\times$ 3次,系列梯度酒精脱水,自然晾干,1%甲苯胺蓝染液室温染色3~4min,蒸馏水清洗,于光镜100倍下对整张象牙薄片上的吸收陷窝计数,结果以陷窝数/片表示。然后对同一张象牙薄片再经超声波清洗10min $\times$ 3次,常规处理后进行扫描电镜观察。

1.7 统计学处理:所有数据输入Excel表,进行两样本等方差双侧 t 检验,可信区间为95%。

2 结果

2.1 对成骨细胞增殖的影响:表1示,MTT法测定3批实验结果趋同,金匱肾气丸有恒定的促进成骨细胞增殖作用,补肾益精方也显示能促进增殖,知柏地黄丸则表现为明显的抑制作用,西药倍美力也略显对增殖有所抑制。

如果将对照血清组的OD值作为100%,那么,倍美力、补肾益精方、金匱肾气丸、知柏地黄丸对成骨细胞增殖的平均影响率分别为75.7%、121.5%、159.2%、21.6%。

2.2 对破骨细胞活性的影响:表2示,计数骨吸收陷窝,4批次实验结果呈一致趋势。知柏地黄丸组的骨吸收陷窝减少极其明显,补肾益精方组的骨吸收陷窝减少也很明显,但稍逊于知柏地黄丸组,金匱肾气丸组不如前二组,倍美力组则介乎前二组与后一组之间,也显示明显地减少了骨吸收陷窝数。

如果将对照血清组的陷窝数作为100%,那么,倍美力、补肾益精方、金匱肾气丸、知柏地黄丸对破骨细胞骨吸收陷窝数的平均影响率分别为38.1%、

21.0%、50.2%、19.8%。

3 讨论

原发性骨质疏松症在发病年龄段开始的很长一段时间里是以骨吸收明显增加为特征的高转换类型,临床应用的有效西药主要作用往往是抑制骨吸收明显,促进骨形成的药物较少且效果不尽如人意。因此有些学者评价中药的作用时,寄希望于促进骨形成。本研究从细胞学角度观察,倍美力有明显的抑制破骨细胞活性的作用,而对成骨细胞也略显抑制作用;补肾中药的复方中补阳的金匱肾气丸或如补肾益精方中或含有淫羊藿、骨碎补等补阳药的复方都显示有促进成骨细胞增殖的作用;另一方面,养阴药如补肾益精方含何首乌、石斛等一定数量养阴药的复方都显示有抑制破骨细胞活性的作用。而若处方中含知母、黄柏等养阴为主而兼具泻火作用的药物就明显表现出对破骨细胞活性的抑制,同时也抑制成骨细胞的增殖。我们的工作初步揭示,平补阴阳的补骨药表现为温和的促进成骨细胞增殖作用和一定的抑制破骨细胞的作用,加重补阳药则对成骨细胞的促进增殖加强,对破骨细胞的活性抑制减弱;加重养阴药的作用相反,即对成骨细胞促进增殖的作用有所减弱,而对破骨细胞活性的抑制作用加强;养阴而同时加入泻火药则明显增强对破骨细胞活性的抑制,甚至对成骨细胞增殖也由促进减弱而成为抑制。

补肾中药只是一个笼统的“法”——治疗原则的概念,以上所提到的养阴、补阳、泻火等也同样如此,同一类的不同中药在作用上还有差异。从目前中药防治原发性骨质疏松症的大趋势来看,一种趋势是辨证基础

上的复方,一种是单味中药中的单体或一定纯度的单体。如何体现中医药的传统特点,我们认为小复方更能表达中医特色,从以上研究结果看,在这一趋势方面似乎应有一个以平补阴阳为基本内容的通用方。另外,在高转换型的典型的绝经后骨质疏松症宜强化养阴乃至泻火药物,尤其是这一时期中有明显的阴虚火旺症状者,抑制活跃的骨吸收,同时也适当抑制业已增强的骨形成。而步入更老的年龄段则宜增加补阳药,因为高龄患者多属低转换型骨质疏松症,中医辨证也往往阳虚不足更加明显,要以促进骨形成为主,对本身并不活跃的骨吸收不必有太多的抑制。

肾主骨是中医学中肾作用的一个方面,中医学的肾是一个十分广泛的含义,涉及多个系统多个器官,骨质疏松可以看作是全身衰老过程在骨骼系统的表现。我们测定用于研究防治老年性痴呆的补肾药物的实验动物骨骼,也得到可以提高皮质骨和松质骨的骨密度和增强骨强度的结果,因此中药防治骨质疏松症在骨骼系统可以在骨吸收和骨形成两方面体现调整作用,对全身则是在整体调治背景上的多靶点发挥作用。这是中药的优势和特色,也提示中药在原发性骨质疏松症防治方面具有良好前景。

志谢 本研究的细胞培养技术学习得到上海医科大学放射医

学研究所王洪复教授、金慰芳副教授的指导和高建军的帮助,特此致谢。

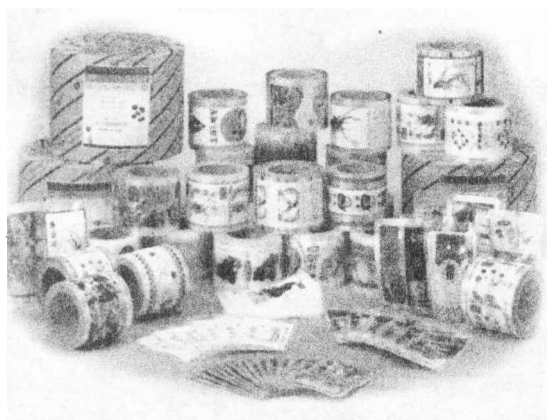
参考文献

- 1 石印玉,石鉴玉,沈培芝,等.四组中药防治实验性骨质疏松症的对比研究.中国骨质疏松杂志,1998,4(3):68-70.
- 2 沈培芝,陈东煜,张戈,等.补肾方防治地塞米松致雄性大鼠骨质疏松及其生化机制探讨.中国中西医结合杂志,1998,18(5):290-292.
- 3 王洪复,关本博,林光义,等.由胎鼠头盖骨培养成骨细胞的实验技术和细胞形态观察.上海医科大学学报,1991,18(6):475-477.
- 4 Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J Pathol, 1982, 136(1):27-39.
- 5 Boyde A, Ali NN, Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. Br Dent J, 1984, 156(6):216-220.
- 6 高建军,金慰芳,王洪复.骨片吸收陷窝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.
- 7 田代真一.ヒト由来培養細胞を用いた漢方薬理学研究系の開発.和漢医学学会誌,1985,2:106-107.
- 8 Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shoshaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method. J Ethnopharmacology, 1984, 21(1):45-53.
- 9 刘平,朱剑亮,黄耀羲,等.虫草菌丝及其药物血清对肝脏枯否氏细胞生成 IL-1、IFN 及 TNF 的影响.中国中药杂志,1996,21(6):367-369.

欢迎选购中药煎药机 中药药液包装机

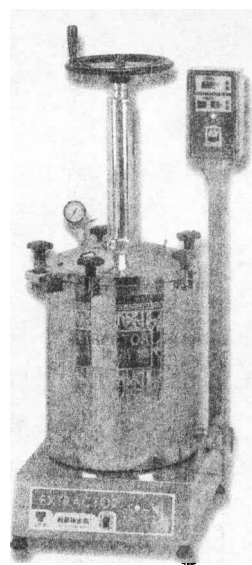
韩国 ERAE 特殊包装(株)荣获以下证书:

- 1、ISO9002 国际证书(AC-02071 号)
- 2、韩国卫生安全合格证书(HS99-05 号)
- 3、韩国商品质量合格证书(Q98-104 号)



中药药液包装材料

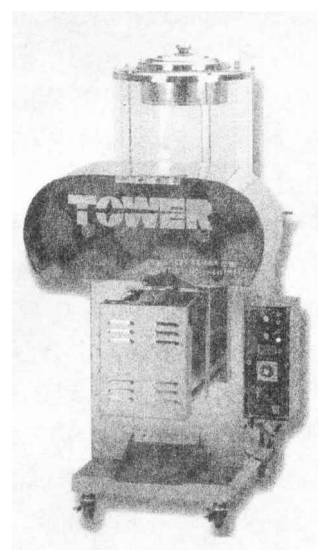
可为客户在包装材料上印制各种文字及图片



中药煎药机

容量: 8000ml 25000ml 44000ml

产地: 韩国京西机械产业



包装机

经销商: 北京阿卡细亚经贸有限责任公司 地址: 北京市朝阳区安外大街 胜古庄 2 号 A 座 611 室
电话: 010-64446171 64446172 传真: 010-64446173 手机: 13901096325 邮编: 100029

(广告编号: 200110-20)

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Clinical Observation on Treatment of 288 Cases of Correlative Gastric Diseases Infected by Pyloric Helicobacterium with Kang Wei Granules

Chen Feisong, Wei Beihai, Yao Wei, et al.

Kang Wei Granules which can strengthen the spleen, replenish Qi, clear away heat and remove dampness was used to treat 288 cases of correlative gastric disease infected by pyloric helicobacterium. Seventy-four cases were treated with triple therapy (Bismuth being the mainly ingredient) as control group. Results indicated that the treatment group was significantly superior to the control group in improvement of main symptoms, especially for the types of deficiency of spleen and stomach, and internal accumulation of dampness-heat ($P < 0.05$). There was no significant difference between the two groups in gastroscopy, pathological examination and the positive grade of pyloric helicobacterium ($P > 0.05$). It is suggested that Kang Wei Granules has a better clinical therapeutic effect for treatment of correlative gastric disease infected by pyloric helicobacterium.

Authors' address: Beijing Municipal Institute of TCM, Beijing 100010

Key words: Gastric diseases/microbiology infection of pyloric helicobacterium/ Chinese drug therapy @Kang Wei Granules
(Original article on page 599)

Effects of Jin Long She Oral Liquid Combined with Shen Mai Injectio on Tumor Marker and Immunological Function in the Patient of Intermediate and Late Gastric Cancer

Qin Zhifeng, Wei Pinkang, Li Xiangyong

Jin Long She Oral Liquid combined with Shen Mai Injectio was used to treat 35 cases of intermediate and late gastric cancer as treatment group, and chemotherapy was used to treat 16 cases as control. Results indicated that the index of physical strength (Karnofsky score assessment) and natural killer (NK) cell activity in the treatment group increased significantly, CD₄, CD₄/CD₈ increased and CD₈ decreased as compared with those before treatment ($P < 0.05$). In the chemotherapy group besides CD₄/CD₈ improved slightly, NK cell activity and CD₄, CD₈ decreased; tumor marker CEA and CA₁₉₋₉ decreased to a certain degree in the two groups, with no significant difference compared with those before treatment. It is suggested that combination of Jin Long She Oral Liquid and Shen Mai Injectio has a good effect on intermediate and late gastric cancer.

Authors' address: Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003

Key words: Gastric tumor/traditional drug therapy Shen Mai Injectio/therapeutic use @Jin Long She Oral Liquid
(Original article on page 605)

Effect of Administration of Herba Epimedii at the Optimal Time on Levels of Sexual Hormones

Wang Fei, Zheng Yang, Xiao Hongbin, et al

In order to confirm the theory of administration at the optimal time in *The Yellow Emperor's Internal Classic*, effects of administration of Herba Epimedii at the optimal time on the level of sexual hormones in young mice were investigated to explore the relationship between the time of administration and the effect. Results indicated that (1) Yin Yang Huo Decoction had sexual hormone-like actions, increasing weight of uterus and serum estradiol (E₂) content in the female mice, increasing serum testosterone (T) content in the male mice; (2) The administration at Mao (the period of the day from 5 a. m. to 7 a. m.) and You (from 5 p. m. to 7 p. m.), hours influenced the increases of uterus weight and serum E₂ content in the female mice and serum T content in the male mice to a certain degree, the action at Mao being stronger than that at the You. It is suggested that administration for tonifying the kidney and strengthening Yang in the early morning has the best effect.

Authors' address: Helongjiang University of TCM, Harbin 150040

Key words: Sexual hormones/metabolism Herba Epimedii
(Original article on page 619)

Cytologic Study on Prevention and Treatment of Primary Osteoporosis with Chinese Drugs for Tonifying the Kidney

Shi Yinyu, Zhan Hongsheng, Zhao Yongfang, et al.

In order to compare differences of effects of complex prescription for reinforcing the kidney on osteoblast (OB) and osteoclast (OC), MTT method was used to determine proliferous capability of OB, bone lacuna count was used for quantitative assessment of absorbent activity of OC. Results showed that the mean influencing rate of Jin Gui Shen Qi Pill, Bu Shen Yi Jing Prescription, Zhi Bai Di Huang Pill, and Western medicine Premarin tablet for proliferous capability of OB was 159.2%, 121.5%, 21.6% and 75.7% respectively; the mean influencing rate for bone lacuna count was 50.2%, 21.0%, 19.8% and 38.1% respectively, suggesting that the drug for even reinforcing Yin and Yang can improve proliferation of OB and inhibit activity of OC, and increase of the drug for warming Yang can strengthen the promoting action on proliferation of OB, but increase of the drug for nourishing Yin had opposed action, the drugs for nourishing Yin plus the drugs for purging the pathologic fire can inhibit activity of OC and proliferation of OB.

Authors' address: Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021

Key words: Osteoporosis/bone and bone tissue/cytology
(Original article on page 621)