

“肾主骨”理论与破骨细胞骨吸收

高 俊^{1*} 张前德²

1. 南京中医药大学 2009 博士研究生, 江苏省南京市汉中路 282 号, 210029;

2. 南京医科大学第一临床医学院

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助(20093237110005); 常州市科技计划资助项目(CJ20112014)

* 通讯作者: gaojungk@126.com

[摘 要] 从骨的现代定义及“肾主骨”理论的内涵出发, 结合实验研究分析肾主骨与抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性、骨吸收陷窝对破骨细胞骨吸收机制的影响作用, 为中药防治破骨细胞骨吸收类疾病及其作用机制研究提供思路。

[关键词] 肾主骨; 破骨细胞; 骨代谢; 抗酒石酸酸性磷酸酶

破骨细胞是参与骨代谢的主要细胞, 与成骨细胞共同维持骨重建平衡。目前对骨的基础研究已经深入到分子生物学和基因的水平, 临床治疗手段也日渐丰富。在中医骨学理论中, “肾主骨生髓”理论居于核心地位, 也是中医骨学理论发生的基础。为深刻理解肾在中医骨学理论中的核心和基础地位, 就必须了解“肾主骨”理论发生的相关背景, 使从事该专业者在明晰自己“以肾治骨”原由的前提下, 更能掌握“以肾治骨”的主动权。我们拟从破骨细胞骨吸收的现代医学认识出发, 探讨“肾主骨”理论的内涵。

1 “肾主骨”理论的内涵

中医学中肾与骨的关系早在《黄帝内经》中就已经被精辟地概括为“肾主骨”。“肾主骨”理论解释了肾与骨之间的生理病理关系。认为肾主五脏之精, 为生命之根, 骨为藏髓之器, 受髓之充, 血所养, 精而生。然髓、血、精同类, 均为肾精所化。所以《医经精义·中卷》曰: “骨内有髓、骨者髓所生, 肾藏精, 精生髓, 故骨者, 肾之所合也。”说明骨骼的发育、生长、代谢有赖于肾精滋养, 肾气的推动作用。当人体肾精充足时, 则髓足骨坚, 筋骨坚固有力, 正如《医法心传》所云: “在骨内髓足则骨强, 所以能作强, 耐力过人也。”否则“肾衰则形体疲极也”。古代对肾与骨的关系认识, 充分说明了骨的生理病理受肾支配, 肾之精气的盛衰决定骨的强弱。

中医学对“肾”的功能的定义可以概括为以下两个方面: ①解剖学意义上的肾脏功能, 即“肾者水脏, 主津液”, 明确指出维持体内津液代谢平衡是肾脏的主要功能之一, 这与现代医学中肾脏在泌尿系统的重要功能是一致的。②作为广义的综合功能意义上的“肾”, 具有“藏精, 主生长、发育与生殖”等功能, 即包括了生殖系统、内分泌系统, 乃至于神经系统的功

能。中医学中“肾”的上述两方面功能均与骨代谢的调节有关。

2 破骨细胞骨吸收机制

破骨细胞的骨吸收是在骨髓微环境中与其他细胞(如骨髓基质细胞、成骨细胞等)相互作用、在多种细胞因子调控下的复杂过程。首先, 在骨骼表面破骨细胞发生极化, 胞浆、胞膜折叠形成裙状的皱褶缘。皱褶缘附着于骨表面, 并在其周围形成环状的封锁带^[1], 使破骨细胞与密切接触的骨骼之间形成与外界相对隔绝的骨吸收微环境。封锁带中富含纤维肌动蛋白无细胞器。纤维肌动蛋白位于类似伪足的点状细胞膜突起中, 这些伪足的确切生理功能尚不清楚, 可能有助于构成破骨细胞与骨骼之间的吸收微环境, 或者将整合素传递的细胞外启动骨吸收的信号传送给破骨细胞^[2]。而封锁带中含有的 α -辅肌动蛋白等可将识别骨基质的整合素与破骨细胞的细胞骨架连接在一起。这些伪足构成的环状装置只有在破骨细胞附着于骨表面并发挥吸收功能时才形成, 在破骨细胞从骨表面脱离后消失。

在破骨细胞附着于骨骼表面、并形成相对隔绝的细胞外骨吸收微环境后, 先发生骨矿物质的溶解、其后才是骨基质(胶原、非胶原性蛋白等)的降解。分布在破骨细胞皱褶缘上的质子泵——空泡型氢离子三磷酸腺苷酸酶将 H^+ 转运到吸收微环境中, 再通过能量非依赖性的 Cl^- 、 HCO^+ 交换机制分泌 Cl^- 维持电离平衡, 结果是破骨细胞分泌 HCl 使吸收微环境内的 pH 值达到4.5左右^[3]。骨矿物质在酸性环境中被溶解后, 有机成分被组织蛋白酶K降解。骨骼的降解产物经破骨细胞吞噬、转运后排泄, 破骨细胞从骨表面脱离后转移到新的位点。

诸多细胞因子参与了骨吸收的调控, 如降钙素、

甲状旁腺激素、前列腺素、活性维生素 D₃、白细胞介素、TGF- β 及肿瘤坏死因子 TNF 等。而骨保护素(OPG, 或称破骨细胞生成抑制因子)及其配体(或称破骨细胞分化因子)的发现给骨吸收和骨修复理论开启了一个崭新的视野^[4]。OPG 由骨髓基质细胞和成骨细胞产生,具有抑制破骨细胞分化、抑制成熟破骨细胞的活性并诱导其凋亡的功能。OPG mRNA 在胎儿和成人的多种组织中(如肺、心、肾、胎盘、肝和骨组织)及骨髓基质细胞、成骨细胞、成纤维细胞、成骨肉瘤 MG63 细胞中均有稳定、高水平的分布,但目前发现,OPG 仅在骨骼内发挥作用,作用机理尚不清楚。

3 “肾主骨”理论与实验研究

3.1 对骨形成—吸收平衡的影响

近年来,随着中西医结合理论及临床研究的不断发展,对中医的“肾主骨”理论和补肾法治疗骨代谢相关疾病的方法也有了更深入的认识。李媛等^[5]研究发现,补肾药能够改善实验性骨质疏松大鼠的骨代谢,作用机制部分是通过提高雌激素、睾酮和降钙素的水平,降低甲状旁腺激素(PTH)水平,进而影响钙磷代谢和钙盐沉积实现的。柯青等^[6]观察健骨方对绝经后骨质疏松症患者骨密度及血钙、血清碱性磷酸酶的影响,证实补肾方药具有提高绝经后骨质疏松患者雌激素水平及骨密度的作用。骨形成所需的骨基质是由成骨细胞所分泌,同时骨吸收主要是由破骨细胞完成的。研究认为,补肾中药具有抑制破骨细胞和促进成骨细胞增殖分化的双向调节作用。研究表明成熟的成骨细胞能特异性分泌 I 型胶原、骨钙素和大量碱性磷酸酶,并赋予骨形成的必要条件^[7]。涂平生等^[8]认为,成骨细胞分泌骨保护素能特异性结合可溶性护骨素配体,从而抑制破骨细胞生成、分化和成熟。邵敏等^[9]则对补肾药的药理作用进行研究,发现补肾药含药血清能够促进成骨细胞的增殖与分化,可促进骨形成,也并可抑制成骨细胞分泌 IL-6 而防止骨的吸收。沈霖等^[10]以建立的成骨细胞、破骨细胞及骨髓基质细胞培养体系进行体外实验,在骨细胞及分子水平观察了补肾法防治骨质疏松作用环节,证明补肾法抑制骨吸收、促进骨形成的双重药效作用机理是在 mRNA 水平上,通过对骨细胞内的 TGF- β ₁、MMP-9 等影响骨代谢的细胞因子及蛋白酶的调控而达到的。

3.2 对 TRACP 活性的影响

抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid

phosphatase, TRACP)作为酸性磷酸酶同工酶之一,在骨吸收活动过程中,参与骨基质中固体钙磷矿化底物的降解,参与骨吸收陷窝的形成,因此,被认为直接参与破骨细胞的骨吸收过程^[11-12]。吴贺勇等^[13]研究结果显示,补肾中药骨灵丸高、中剂量组具有抑制破骨细胞分泌 TRACP 的作用。破骨细胞分泌 TRACP 受多种因素调节。在破骨细胞内,环磷酸腺苷、细胞内钙和鸟苷酸结合蛋白等物质参与 TRACP 的分泌调节。郑洪新等^[14]发现,补肾中药能增加去势骨质疏松症大鼠红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺ATP 酶活性,改善红细胞膜磷脂组分,调节细胞内钙离子的浓度。由此可推断补肾中药也可能具有调节环磷酸腺苷、细胞内钙和鸟苷酸结合蛋白等物质在破骨细胞内的分布,达到抑制破骨细胞分泌 TRACP 的功能。此外,细胞脂多糖、单核细胞刺激因子、 γ -干扰素等细胞因子可抑制 TRACP 的分泌。补肾中药本身是否具有如细胞脂多糖、单核细胞刺激因子、 γ -干扰素等细胞因子作用,抑制破骨细胞分泌 TRACP 的作用还待进一步探讨。

3.3 对骨吸收陷窝的影响

实验研究中,骨片上吸收陷窝是破骨细胞骨吸收的直接结果,陷窝数量、大小直接反映破骨细胞骨吸收的能力,因此,检测骨吸收陷窝的数目及面积是反映破骨细胞骨吸收功能的客观指标^[15]。Arnett 等^[16]发现,骨吸收陷窝可被甲苯胺蓝深染,骨吸收陷窝的面积与其体积存在正相关关系,可间接地反映破骨细胞对骨质的吸收程度。骨吸收陷窝计数也是定量评定体外培养破骨细胞活性的可靠方法之一。詹红生等^[17]采用正常大鼠制备的补肾方含药血清能够显著抑制陷窝数量的增多。本实验结果显示,在切卵大鼠血清的作用下,陷窝数量增加了 74.1%,而经补肾方和倍美力治疗的大鼠血清,其陷窝数量分别下降了 65.7%和 59.3%,与假切卵组之间的差异非常显著($P < 0.01$)。提示补肾方具有明显的抑制破骨细胞活性的作用。吴贺勇等^[13]实验结果显示补肾中药高、中剂量组可减少骨片上的骨吸收陷窝的数目,提示破骨细胞的骨吸收功能受抑制。证明了补肾中药具有雌激素样作用,可抑制破骨细胞的活性,考虑骨吸收陷窝面积及数目的减少与雌激素样作用相关。樊粤光等^[18]研究结果显示,较高浓度骨碎补抑制破骨细胞性骨吸收有显著作用($P < 0.01$),使破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝数和面积比空白对照明显小,而低浓度则可部分

抑制破骨细胞功能,但它使破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝数和面积与空白对照组相比无显著差别($P>0.05$)。吕明波等^[6]实验结果显示, 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L 浓度的淫羊藿苷组破骨细胞生成数量均明显减少,与空白对照组相比差异有显著性,并且具有剂量依赖性。目前对补肾药物作用于破骨细胞的机理尚不清楚,结果显示,补肾药物对破骨细胞性骨吸收起抑制作用,且与浓度有关。补肾药物在增强成骨细胞的功能与活性,促进新骨形成,可能同时作用于成骨细胞,抑制其产生或分泌一些破骨细胞促进因子,使破骨细胞生成减少,影响骨的吸收。

4 展望

中医学肾主骨理论与破骨细胞骨吸收的相关性,为中医学肾本质及补肾中药研究提供了新思路;同时为中药防治破骨细胞骨吸收类疾病及其发病机制研究奠定一定的理论基础,并为今后骨吸收的细胞学机制以及中药防治研究提供新思路,这对补肾中药的药理学研究补肾法的临床应用都有重要的指导意义。当然中医肾主骨理论防治骨代谢疾病的机制研究还存在许多未完全解决的问题。一是由于中药复方的复杂性,对其详细作用机制的分析不够明确,缺乏针对性。二是补肾药治疗骨质疏松症的实验研究的指标尚应加强,尤其是细胞水平与分子生物水平的研究方面。三是受相关动物模型设计的局限,补肾药物的作用机制与肾主骨理论指导在联系上不够紧密。因此,今后的研究应该进一步深入,以期提高实验的科学性与客观性,从而更好地指导临床。

参考文献

- [1] Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure [J]. J Cell Sci, 1995, 108(Pt 8): 2729-2732.
- [2] Stenbeck G, Horton MA. A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts [J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 9): 1577-1587.
- [3] Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, et al. Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption [J]. J Biol Chem, 1997, 272(30): 18636-18643.
- [4] Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling [J]. Science, 1994, 266(5184): 443-448.
- [5] 李媛,蔡德培. 补肾中药对青春期大鼠下丘脑生长抑素基因表达与蛋白表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2003,

23(5): 50-52.

- [6] 吕明波,刘兴炎,葛宝丰,等. 淫羊藿对破骨细胞活性的影响 [J]. 中国骨伤, 2007, 20(8): 529-531.
- [7] 黄少慧,李娟,赵毅. 补肾中药骨灵片对人成骨细胞功能和 P38 活化蛋白激酶通路的影响 [J]. 热带医学杂志, 2007, 5(7): 418-420.
- [8] 涂平生,徐杰. 护骨素的研究进展 [J]. 解剖学研究, 2004, 4(26): 301-304.
- [9] 邵敏,庄洪. 含药血清对体外培养成骨细胞的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 117-119.
- [10] 沈霖,杜靖远,杨艳萍,等. 补肾法防治原发性骨质疏松症的细胞、分子作用机理研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(1): 1-4.
- [11] Hayman AR, Cox TM. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast [J]. Biol Chem, 1994, 269(2): 1294-1300.
- [12] 吕明波,刘兴炎,葛宝丰,等. 淫羊藿苷对小鼠骨髓源性破骨细胞诱导生成及骨吸收功能的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(5): 305-319.
- [13] 吴贺勇,李娟,唐井钢. 补肾中药对破骨细胞骨吸收功能的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(4): 248-250.
- [14] 郑洪新,崔家鹏,刘景峰,等. 肾虚骨质疏松症病理机制及补肾方药对其防治作用的实验研究 [J]. 中国医药学报, 1998, 13(4): 22-25.
- [15] Kanchisa J, Heersche JN. Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts [J]. Bone, 1988, 9(2): 73-79.
- [16] Arnett TR, Dempster DW. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins [J]. Endocrinology, 1987, 120(2): 602-608.
- [17] 詹红生,石印玉,赵咏芳. 补肾方治疗的骨质疏松症模型大鼠血清对破骨细胞骨吸收功能的影响 [J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(5): 24-25.
- [18] 樊粤光,黄永明,曾意荣,等. 骨碎补提取液对体外分离破骨细胞性骨吸收的作用 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2003, 11(6): 4-5.

(收稿日期:2011-10-10;修回日期:2011-11-09)

[编辑:黄健]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年(4 张光盘)480 元;1987—1994 年(1 张光盘)260 元;1995—2004 年(1 张光盘)280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。

汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志北京医海林音像书店,邮政编码:100700,电话:(010)64035632。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。