

淫羊藿抑制颌骨骨吸收的体外实验研究

王晶 于世凤 庞淑珍

【摘要】 从乳兔长骨分离出培养破骨细胞,并与人下颌骨骨磨片体外共同培养,分别加入不同浓度(0,0.15,1.5 和 15 mg/ml)的淫羊藿注射液,倒置相差显微镜观察破骨细胞形成的骨吸收陷窝,并对陷窝数目和面积进行图像分析,探讨淫羊藿对破骨细胞性颌骨骨吸收的影响。结果显示,与对照组相比,淫羊藿 3 个实验组(0.15,1.5 和 15 mg/ml)均能有效抑制破骨细胞在下颌骨片上形成的吸收陷窝的数量和面积,并且抑制作用呈剂量依赖性递增。

【关键词】 淫羊藿; 破骨细胞; 颌骨; 骨吸收

Effect of *Epimedium grandiflorum* Morr on osteoclastic bone resorption WANG Jing, YU Shifeng, PANG Shuzhen. Department of Oral Pathology, Stomatological Hospital of Peking University, Beijing 100081, China

【Abstract】 Osteoclasts were isolated from long bones of newborn rabbits and cultured on human mandible slices *in vitro*. Each bone slice was placed in a 24-well culture plate containing various concentrations of Chinese herb *Epimedium grandiflorum* Morr in α -MEM. The effect of *Epimedium grandiflorum* Morr on bone resorption lacunae generated by osteoclasts was observed under phase-contrast microscope. The results showed that *Epimedium grandiflorum* Morr various concentrations(0.15 mg/ml, 1.5 mg/ml, 15 mg/ml) have significant inhibitory effect, which is increased with concentration of the drug.

【Key words】 *Epimedium grandiflorum* Morr; Osteoclast; Mandible; Bone resorption

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨脆性增加为特征的全身性系统性疾病。颌骨作为全身骨骼系统的一个组成部分,其骨质的丧失与全身性骨质疏松关系密切^[1,2]。有研究显示,绝经后妇女的骨质疏松常明显累及下颌骨,引起颌骨的骨矿丧失。颌骨骨质丧失与全身骨质疏松机理一致,也是破骨细胞(osteoclast, OC)直接作用的结果^[3]。随着对全身骨质疏松机理的逐步深入研究,如何有效防治全身各部位骨质疏松就成为该领域的热点问题之一。因此,以颌骨为研究对象,探讨颌骨骨吸收的防治,对局部乃至全身 OP 的防治具有重要意义。

目前临床上对防治骨质疏松及其并发症尚无特效药,中草药具有很好的发掘潜力。从肾主骨、肾生骨髓等理论出发,中医多从补肾着手来防治骨质疏松。其中,淫羊藿是传统的补肾壮阳药,在临床上被广泛应用在治疗 OP 的复方中,疗效已被肯定。本研究从乳兔长骨分离出培养骨细胞,并与人下颌骨

骨磨片体外共同培养,分别加入不同浓度的淫羊藿注射液,观察淫羊藿对体外颌骨骨吸收的影响,为研究颌骨骨吸收的防治奠定实验基础。

材料和方法

1. 动物与试剂

新生 24 h 日本大耳白兔 6 只(购自中国兽药监察所), α -MEM 培养基(Sigma, Chemical Co),胎牛血清(浙江三利公司)。

2. 方法

(1)颌骨骨磨片的制备:取临床手术切除的病人下颌骨,将下颌骨骨皮质切为 6 mm × 6 mm,厚为 20 μ m 的小片,再用金刚砂石磨至 10 μ m。使用前,将骨片超声清洗 3 次,每次 5 min,再将其浸泡于含青霉素 1 U/ml,链霉素 1 U/ml 的 D-Hank 液中,每次 20 min,共 3 次。取无菌 24 孔培养板一块,每孔加 1 片骨磨片,置 37℃ 二氧化碳培养箱内孵育 1 h。

(2)兔破骨细胞的分离及培养:参照于世民等^[4]的方法,将出生 24 h 内的新生乳兔断颈处死,无菌取其四肢长骨,在 D-Hank 液中去净附着在其表面的软组织 and 软骨。将其骨干在含 15% 胎牛血清的 α -

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39830430)

作者单位:100081 北京大学口腔医院口腔病理科

王晶 E-mail: wangjingyh@126.com

MEM 培养液中纵行剖开,轻刮骨髓腔表面直至颜色变白,用尖吸管吸取培养液反复冲洗骨髓腔和骨干内表面,去掉骨片,保留细胞悬液备用^[4]。

(3)淫羊藿的添加:细胞悬液与骨片共同培养 20 h 后,用含 15% 胎牛血清的 α -MEM 培养液冲洗骨片上未附着的细胞(主要为红细胞),再将骨片置于另一无菌 24 孔板培养板。根据添加淫羊藿注射液浓度的不同,分为 4 组:a 组,0 mg/ml;b 组,0.15 mg/ml;c 组,1.5 mg/ml;d 组 15 mg/ml。每组 6 孔。

(4)骨吸收陷窝测量:骨磨片上形成的吸收陷窝采用 Olympus 倒置相差显微镜观察。采用 Studio DC 10 Plus 软件计算机彩图,LEICA 550IW 图像分析系统分析培养第 3 天,5 天,7 天的骨吸收陷窝的数目和面积,每组各取 6 个视野。其中骨吸收陷窝以每一个圆形或椭圆形陷窝计数为 1。

(5)统计学分析:结果以均值 $\pm$ 标准差表示, $n = 6$,采用 SPSS 软件的 one way ANOVA 方差分析。

结 果

1. 倒置相差显微镜观察

OC 在骨片上培养第 3 天,a 组(对照组)可见骨吸收陷窝,其余各组未见明显骨吸收陷窝(图 1)。在培养第 7 天,a 组吸收陷窝成簇出现,明显增多(图 2)。b,c,d 组(给药组)陷窝少于 a 组,并且面积较小,呈明显抑制(图 3)。



图 1 正常对照组,分离破骨细胞与下颌骨片共同培养 3 d,骨片上出现骨吸收陷窝像(倒置相差显微镜 100 $\times$)

2. 淫羊藿对体外 OC 培养骨吸收陷窝数目的影响

体外共同培养第 3,5 和 7 天,b,c,d 组的陷窝数目均显著少于 a 组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。其中,d 组第 3 天的陷窝数目还显著少于 b 组($P < 0.01$)和 c 组($P < 0.05$);d 组第 5 天的陷窝数目显著少于 c 组($P < 0.05$);c,d 组第 7 天的陷窝数目显著少于 b 组($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 淫羊藿对体外骨吸收陷窝数目的影响(个)

组别	3 d	5 d	7 d
a	28.1667 $\pm$ 6.4317	21.8333 $\pm$ 5.9805	38.6667 $\pm$ 6.8605
b	19.6667 $\pm$ 6.3823 *	19.1667 $\pm$ 4.9565	23.1667 $\pm$ 4.9565 *
c	15.5000 $\pm$ 4.2308 * *	17.8333 $\pm$ 5.4924	14.1667 $\pm$ 4.3851 * *
d	7.6667 $\pm$ 2.9439 * * $\Delta\Delta\Delta\Delta$	12.1667 $\pm$ 3.8116 * * $\Delta\Delta\Delta\Delta$	12.8333 $\pm$ 5.0865 * * $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与 a 组相比,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与 b 组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与 c 组相比,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$

3. 淫羊藿对体外 OC 培养骨吸收陷窝面积的影响

随培养时间的延长,各组吸收陷窝的面积都有显著增加,对照组与实验组相比都有显著差异。第 3,5 和 7 天 c,d 组陷窝面积显著低于 a 组和 b 组,两组之间也有显著差异;第 7 天,b 组陷窝面积也显著低于 a 组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 淫羊藿对体外骨吸收陷窝面积的影响(mm^2)

组别	3 d	5 d	7 d
a	151.3705 $\pm$ 54.6790	186.6201 $\pm$ 73.4715	611.0574 $\pm$ 166.1186
b	82.6150 $\pm$ 4.7251	76.0472 $\pm$ 6.3431	261.0070 $\pm$ 22.8623 *
c	47.9303 $\pm$ 5.5767 * $\Delta\Delta$	46.4037 $\pm$ 9.3639 * Δ	158.5154 $\pm$ 18.7992 * $\Delta\Delta\Delta$
d	17.8719 $\pm$ 2.3522 * $\Delta\Delta\Delta$ * *	28.5610 $\pm$ 3.7857 * $\Delta\Delta\Delta$ * *	87.1925 $\pm$ 38.7923 * * $\Delta\Delta\Delta$ *

注:与 a 组相比,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与 b 组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与 c 组相比,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$

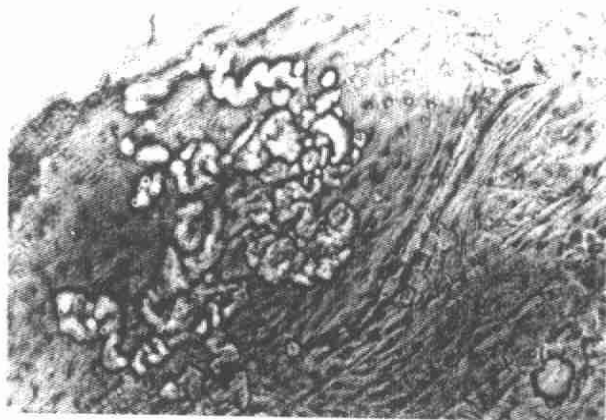


图 2 7 d 后,与图 1 同一视野内骨吸收陷窝成簇出现(倒置相差显微镜 100 $\times$)

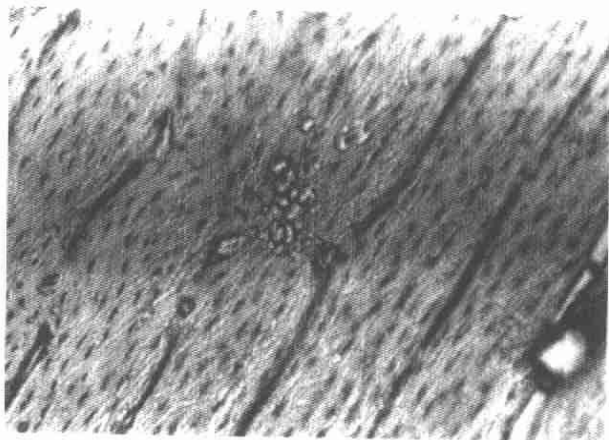


图 3 给药组,7 d 后陷窝少于对照组,面积小,呈明显抑制趋势(倒置相差显微镜 100 $\times$)

讨 论

颌骨骨质丢失的原因有全身因素和局部因素两种。全身因素包括骨质疏松症、HIV 感染、中性白细胞减少症和一些综合症(如 Papillon-lefevre Syndrome, Down Syndrome 等),局部因素主要为细菌感染引起的牙周炎、根尖炎导致的颌骨或牙槽骨的吸收,以及拔牙后的剩余牙槽骨吸收。采用双能 X 线骨密度仪对骨质疏松症患者、牙周病患者及健康人检查表明:骨质疏松不仅累及椎骨、髌骨、指骨,也累及颌骨;骨质疏松症伴牙周病患者与牙槽骨的吸收导致无牙颌患者增多;严重的下颌剩余牙槽骨吸收患者的骨骼活检可见骨小梁稀疏,骨量明显降低。因此,骨质疏松症患者的颌骨也疏松。针对全身系统的各种抗骨质疏松症药物均是通过抑制破骨细胞增殖、活化、阻止其泌酸而发挥抗骨吸收作用的,而牙槽骨和颌骨是整个骨骼体系的一部分,所以,抗骨质疏松的药物也可以用于治疗颌骨骨吸收。

动物试验提示,去势后造成骨质疏松模型的猴在雌激素治疗后,剩余牙槽骨表面出现成骨活动,Ⅱ型胶原 mRNA 表达显著增加^[5]。因此,对口腔骨吸收性疾病的治疗要考虑到全身因素。中医理论认为“肾主骨”,肾虚与骨质疏松有关。骨质疏松等骨病常用补肾中药治疗。淫羊藿是补肾中药之一,其主要成分是淫羊藿甙和多糖,并含有多种微量元素,特别是锌和锰的含量很高,具有多方面的药理作用。淫羊藿对老年性骨质疏松症的疗效已基本得到肯定。体外实验已证实,淫羊藿对破骨细胞有直接的抑制作用^[6],其提取物可以抑制骨髓来源的破骨细胞的分化形成^[7]。同时它又促进成骨细胞合成分泌碱性磷酸酶和Ⅰ型胶原,促进成骨细胞分化,从而促进骨形成^[8]。动物实验证明,淫羊藿能选择性的部分抑制去睾丸后的骨转化率,而不减少已经增加的骨矿化;具有促进骨髓细胞 DNA 的合成作用^[9]。据张喜德等统计,100 味治疗骨质疏松的常用中药中,淫羊藿的使用频率仅次于熟地而居第 2 位,在补阳类药物中则居首位。据国内多家单位报道,由淫羊藿等制成的复方制剂以及单味淫羊藿均在抑制骨质丢失、改善骨质疏松症状方面有明显的临床疗效。现代药理研究表明:淫羊藿可活跃成骨细胞,抑制破骨细胞的吸收功能,又能保护性腺组织而维持性激素水平。本研究应用体外破骨细胞分离培养技术观

察淫羊藿对破骨细胞性颌骨骨吸收的直接作用,结果显示用药组的破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝数目和面积明显较对照组少,且基本呈量效关系。随着淫羊藿浓度的增加,吸收陷窝进一步减少,表明淫羊藿对颌骨吸收有直接抑制作用。

口腔领域的研究显示,淫羊藿可以诱导破骨细胞凋亡,抑制破骨细胞吸收牙片^[10]。体内实验同样提示黔岭藿具有增加骨矿含量,促进骨形成的作用^[11]。给予实验大鼠淫羊藿注射液,可以明显预防拔牙后的剩余牙槽嵴吸收。以往体外研究大多是将分离培养的破骨细胞与灭活的牛骨片共同培养。虽然能够说明破骨细胞的功能,但没有把其与口腔组织的特殊结构特点联系起来。本研究将破骨细胞与人下颌骨磨片共同培养,很好地模拟了口腔内的环境,为研究颌骨骨吸收防治机理提供了新的体外模型。

总之,全身因素的治疗也是口腔骨吸收疾病治疗的重要组成部分。今后随着 OP 发病机理和防治研究的进一步深入,口腔骨吸收疾病的防治必将进入一个新的阶段。

参 考 文 献

- 1 朱晓滨,于世凤,史凤芹,等. 牙周炎患者下颌骨骨密度的分析研究. 中国骨质疏松杂志,1997,3:16-18.
- 2 吴运堂,于世民,张万林,等. 牙槽突吸收和骨密度关系的 X 线分析. 现代口腔医学杂志,1996,10:146-148.
- 3 于世民. 破骨细胞与骨吸收. 中国骨质疏松杂志,1997,3(2):72-74.
- 4 史凤芹,于世民. 兔破骨细胞体外分离培养方法的改良. 中华病理学杂志,1996,25:379-380.
- 5 Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. J Prosthet Dent, 1997,77:435-444.
- 6 陈坤,于世凤,史凤芹,等. 黔岭藿对体外培养的破骨细胞作用的研究. 中国骨质疏松杂志,1996,2(3):59.
- 7 郑洪军,吕振华,胡有谷. 淫羊藿对体外培养破骨细胞的影响. 中华实验外科杂志,2000,17:460-461.
- 8 刘素彩,孔德娟,赵京山,等. 淫羊藿甙对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响. 中国中医基础医学杂志,2001,7(8):28-30.
- 9 李青男,吴铁,谢华,等. 淫羊藿提取液对去睾丸大鼠骨代谢的影响. 中草药,1993,24(2):637-638, 658.
- 10 李晶晶,于世凤,等. 淫羊藿调控口腔各矿化组织的实验研究. 中华口腔医学杂志,2002,37:172-175.
- 11 于世民,陈坤,李盛琳,等. 中药对骨吸收作用的实验研究. 现代口腔医学杂志,1999,13(1):1-3.

(收稿日期:2004-03-08)