

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.33.024 [http://www.crter.org]

颜军礼, 李蒙, 李瑞玉, 吴立萍, 孙艳萍, 李会龙. 中药复方对成骨细胞增殖及骨密度的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(33):6055-6060.

中药复方对成骨细胞增殖及骨密度的影响*

颜军礼¹, 李蒙², 李瑞玉³, 吴立萍⁴, 孙艳萍³, 李会龙³ (¹河北省任县医院, 河北省邢台市 055150; ²武警新疆总队和田地区支队卫生队, 新疆维吾尔自治区和田市 848011; ³邢台医学高等专科学校第二附属医院中西医结合研究所, 河北省邢台市 054000; ⁴河北医科大学附属邢台市人民医院检验科, 河北省邢台市 054031)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 中药在骨质疏松症防治中具有多途径、多靶向的整体调节作用, 筛选出有效治疗骨质疏松症的复方中药以及阐明其作用机制, 是目前中药治疗骨质疏松症研究的主要内容之一。

2 文章增加的新信息: 骨密度是诊断骨质疏松、估计其程度、评价骨质疏松效果的重要指标, 成骨细胞是骨形成、骨骼生长和发育的重要细胞。通过体外成骨细胞培养的方法对复方中药进行研究, 可以排除体内复杂因素的干扰, 有助于确切了解复方中药的作用机制, 也是揭示复方中药能否提高骨质疏松症患者的骨密度, 是评价其药效的依据之一。

3 临床应用的意义: 复方中药治疗骨质疏松症的临床及实验研究越来越多, 但疗效评价标准不完全统一, 故需制定一个统一的标准, 使之评价临床治疗效果更具科学性、可比性和重复性, 建立科学的动物模型和实验方法, 加强有效复方中药的药理、毒理等实验研究, 是未来在众多方药中筛选出高效、速效、低毒副作用的新型复方中药应用于临床的关键环节之一。

关键词:

组织构建; 组织构建学术探讨; 复方中药; 补肾中药; 骨质疏松症; 骨质量; 骨密度; 成骨细胞; 细胞培养; 含药血清; 骨钙素; 去势大鼠; 骨生物力学; 骨矿含量; 省级基金

摘要

背景: 复方中药是由多种矿物植物动物等物质组成的复方药物, 在治疗骨代谢疾病方面, 能通过多途径, 多靶点发挥综合治疗作用。

目的: 研究复方中药对成骨细胞增殖及骨密度的影响, 探讨复方中药对骨质疏松症的药理作用。

方法: 回顾性分析以往经实验研究证实的某些复方中药对骨质疏松动物模型成骨细胞增殖分化及骨密度的影响, 分析影响复方中药促进骨形成的因素, 通过对成骨细胞体外培养方法进行筛选, 找出促进细胞增殖分化、提高骨密度的药物适宜剂量, 与化学药物结果进行对照研究。

结果与结论: 复方中药能够促进成骨细胞增殖分化、提高骨密度, 在治疗骨质疏松症方面具有标本兼治、毒副作用小等优点, 但复方中药在改善骨密度水平方面不及化学药物, 并且应通过长期、大样本的临床研究, 降低骨质疏松性骨折风险的干预作用。

Chinese herbal compound affects osteoblast proliferation and bone mineral density

Yan Jun-li¹, Li Meng², Li Rui-yu³, Wu Li-ping⁴, Sun Yan-fu³, Li Hui-long³ (¹Ren County Hospital, Xingtai 055150, Hebei Province, China; ²Health Team, Hotan Detachment of the Xinjiang Armed Police Corps, Hotan 848011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Institute for Integrated Traditional and Western Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China; ⁴Department of Laboratory Medicine, Xingtai People's Hospital, Hebei Medical University, Xingtai 054031, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Compound Chinese medicine is a kind of compound drugs with the combination of minerals, plants and animals, which play the multi-target integrated treatment effects in the treatment of bone metabolic disease through various methods.

OBJECTIVE: To research the effect of compound traditional Chinese medicine on the proliferation and bone mineral density of osteoblasts, and to explore the pharmacological effect of compound traditional Chinese medicine in the treatment of osteoporosis.

METHODS: A retrospective analysis was performed to analyze the effect of some compound traditional Chinese medicines on the proliferation and bone mineral density of osteoblasts that identified in the previous studies, in order to analyze the factors of compound traditional Chinese medicines that can promote the bone formation. The appropriate dose of the drugs that can promote cell proliferation and differentiation and improve the bone mineral density was screened out through the *in vitro* culture of osteoblasts, and then compared with the results of chemical medicines.

RESULTS AND CONCLUSION: Compound traditional Chinese medicines can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts and improve the bone mineral density, and have the advantages of full treatment and

颜军礼, 男, 1958年生, 河北省任县人, 汉族, 1997年河北中医学院毕业, 副主任中医师, 主要从事中医、中西医结合临床及科研工作。
2656011872@qq.com

通讯作者: 李瑞玉, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 邢台医学高等专科学校第二附属医院中西医结合研究所, 河北省邢台市 054000
liruiyu651021@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)33-06055-06

收稿日期: 2013-05-18

修回日期: 2013-07-27

(201307062/YL·C)

Yan Jun-li, Associate chief physician, Ren County Hospital, Xingtai 055150, Hebei Province, China

Corresponding author: Li Rui-yu, Professor, Chief physician, Institute for Integrated Traditional and Western Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China

Supported by: Project of Hebei Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 2012068*

Received: 2013-05-18

Accepted: 2013-07-27

less side effect in the treatment of osteoporosis. But the effect of compound traditional Chinese medicines in improving the bone mineral density is less than the chemical drugs. The long-term and large-sample clinical studies should be performed to decrease the risk of osteoporotic fracture.

Key Words: tissue construction; tissue construction academic discussion; compound traditional Chinese medicines; Chinese nourishing kidney herbs; osteoporosis; bone mass; bone mineral density; osteoblasts; cell culture; drug-containing serum; osteocalcin; castrated rats; bone biomechanics; bone mineral content; provincial grants-supported paper

Yan JL, Li M, Li RY, Wu LP, Sun YF, Li HL. Chinese herbal compound affects osteoblast proliferation and bone mineral density. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(33):6055-6060.

0 引言

骨质疏松症是一种全身骨代谢性疾病,成骨能力下降而骨吸收加快是骨质疏松症的主要病理学基础,因此,促进成骨细胞增殖、分化,改善成骨细胞功能和调节骨重建对骨质疏松症的治疗具有重要意义^[1-2]。中药具有提高性激素水平,调节钙磷代谢平衡,影响成骨细胞、破骨细胞活性,增加骨密度,促进骨形成的作用,治疗骨质疏松症前景广阔。中药促进成骨细胞增殖的研究主要是从诱导体外培养的成骨细胞增殖着手,按照中药临床单味和复方的用药习惯分别具体的实验,但研究大多处于初期阶段,单味药多,复方药少,中药特色未体现,特别对于从中药中筛选促进成骨细胞增殖分化、增加骨密度的复方中药的开发与研究还并不是很多^[3]。随着研究的深入,单味中药对成骨细胞增殖及骨密度的改善方面表现出一定的局限性,单味中药对骨代谢的调节作用可能仅仅作用于机体某些环节,与复方中药相比存在局限性^[4]。

同时,鉴于西药临床应用的各种弊病,随着中药现代化的逐步深入,目前越来越多的研究集中在复方中药治疗骨质疏松症,对指导临床用药,促进中药现代化,进一步揭示复方中药治疗原发性骨质疏松的作用机制有重要意义^[5]。中国医务工作者通过多年临床实践和实验研究发现许多复方中药能有效的提高骨质疏松患者和骨质疏松模型动物的骨密度,改善其骨代谢,并依此开发出了多种临床有效的复方中药方剂^[6-7]。复方中药中的有效成分,可刺激细胞外基质成分的合成,从而加快细胞外基质重建的速度,促进细胞黏附增殖,提高成骨细胞的增殖率、增加骨密度,因而促进骨形成功能^[8]。

成骨细胞在骨形成过程中要经历成骨细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡4个阶段^[9]。很多因素可调节这几个阶段,从而最终调控骨形成。骨密度降低是骨质疏松时骨变化的特征,骨密度是诊断骨质疏松、评估其程度、评价治疗骨质疏松效果的重要指标。因此,运用成骨细胞体外培养和复方中药血清干预实验的研究,是寻找有效防治骨质疏松药物的重要手段之一,可以客观的阐明中药的

药效及作用机理^[10]。国内已有文献报道复方中药在体内能使患者的骨量增加,成骨细胞增殖、骨小梁面积及密度增加等^[11-12]。但体内实验存在许多复杂因素的干扰,不便于直接观察中药的药理作用^[13]。所以,在临床研究的基础上国内许多学者采用了体外培养的方法来观察复方中药血清是否有直接促进成骨细胞增殖分化、增加骨密度的作用。

2003年,胡冰等^[14]观察复方中药含药血清对大鼠成骨细胞增殖及矿化功能的影响,制备复方中药含药血清,取不同浓度剂量干预体外培养的成骨细胞,用MTT法检测成骨细胞增殖率,MTT比色分析法测定的细胞增殖率,能准确,灵敏的反映复方中药对成骨细胞增殖和功能的影响,进而反映复方中药对骨形成能力的强弱^[15]。结果显示,复方中药含药血清能明显增加成骨细胞增殖率和矿化结节形成数,且与含药血清浓度呈正相关。因此,复方中药能明显促进成骨细胞的增殖,并能促进成骨细胞对骨机质的矿化功能。

文章从细胞分子生物学角度对复方抗骨质疏松中药对成骨细胞及骨密度的作用进行了探讨,与单味中药骨质疏松的治疗效果进行了比较,并提出了目前研究中存在的问题。

1 资料和方法

1.1 资料来源 文章采用检索CNKI数据库的方法获取研究文献^[16],检索时间范围1990至2012年,检索词为“复方中药(compound Chinese medicine);骨质疏松症(osteoporosis);骨质量(bone mass);骨密度(bone mineral density);成骨细胞(osteoblasts);细胞培养(cell culture);含药血清(containing serum);骨钙素(osteocalcin);实验研究(biomechanical);骨矿含量(bone mineral content)”,检索出相关文献36篇,其中学术期刊21篇,学位论文9篇,会议论文6篇。按设定的主题要求,纳入研究的文献共14篇^[17-30]。

1.2 入选标准 ①研究的主题包括复方中药对成骨细胞增殖及骨密度影响的实验研究、相关影响因素分析等。检索的文献中排除与研究主题无关的文献13篇。②研究所撰写的文章类型包括原著、实验分析及病例分析等。检索文献中排除综述类文章4篇。③文

献内容筛选如下,检索的文献中复方中药促进成骨细胞增殖分化的实验研究文献共3篇,3篇文献为同一实验项目,且为同一组实验人员进行的研究,定为重复研究文献,选取其中1篇进行深入分析。同样复方中药增加骨密度的实验研究的3篇文献也为重复文献,选取其中1篇进行深入分析。在影响复方中药促进骨形成的因素研究中,同样检索出重复的2篇研究文献,选取其中1篇进行深入分析。

1.3 质量评估 符合纳入标准的14篇研究中,分析了复方中药促进成骨细胞增殖分化的实验研究^[17-22];并探讨了复方中药增加骨密度的实验研究^[23-27];分析了影响复方中药促进骨形成的因素^[28-30]。

2 复方中药对成骨细胞增殖及骨密度的影响

2.1 复方中药促进成骨细胞增殖分化中的作用 随着中医药研究的不断深入,运用中药诱导成骨细胞增殖的成果获得了肯定,不少学者在细胞分子水平的药理作用方面开展实验研究,分析中药在细胞分子层面上药物具体的作用机制,为中药治疗骨质疏松提供了分子生物学理论依据。

2003年,张荣华等^[17]进行了复方中药对成骨细胞影响的实验研究,采用二次酶消化法从新生SD大鼠颅骨获取成骨细胞进行培养,取第3代成骨细胞为实验模型,将其分为4组,在各组中分别加入双蒸馏水(对照组),低(20 mg/L)、中(40 mg/L)、高(80 mg/L)浓度的复方中药提取液。用MTT法(波长570 nm处A值表示)测定细胞增殖功能,用对硝基苯基磷酸二钠法测定碱性磷酸酶活性,用放免分析方法测定细胞培养液中的骨钙素含量,用茜素红染色法,在40倍光镜下作矿化结节计数。结果显示复方中药中、高浓度组的A值在24, 48, 72 h时明显高于对照组($P < 0.01$),且与药物浓度呈剂量依赖性,低浓度组的A值在72 h时明显高于对照组($P < 0.05$),在24, 48 h时与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$),不同浓度给药组培养48, 72, 96 h后,碱性磷酸酶(除低浓度组培养48 h外)、骨钙素均呈不同程度增加($P < 0.01$),在中、高浓度组矿化结节数量/视野,显著多于对照组($P < 0.01$),低浓度组与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。因此,复方中药具有促进体外培养的新生SD大鼠成骨细胞增殖、分化及矿化作用,这种作用呈剂量相关性。

近年来学者配伍出许多新的方剂用于骨质疏松的治疗,大部分方剂以补肾活血药为主。姚新苗等^[18]用补骨脂、骨碎补、生地黄、仙灵脾、怀山药、丹参等组成复方中药,分为高、中、低剂量组, α -D3对照组及生理盐水空白对照组,制备复方中药含药血清备用。成骨细胞建立采用新生SD乳鼠5只(24 h内颅盖

骨)进行体外细胞传代培养,新生鼠的颅骨富含成骨细胞,体外培养细胞生物学特性改变小^[19]。已有学者证实体外分离培养的大鼠成骨细胞的成骨过程与体内骨生成过程相同^[20]。观察复方中药含药血清对体外培养的新生SD大鼠成骨细胞增殖、分化情况。高、中、低剂量组及 α -D3对照组比较无显著性差异,与生理盐水空白对照组比较细胞增殖分化与碱性磷酸酶影响差异有显著性意义($P < 0.05$)。因此,认为益骨汤含药血清具有促进早期成骨细胞的增殖与分化。

鞠大宏等^[21]通过观察复方中药左归丸含药血清对成骨细胞的影响,探讨其治疗骨质疏松症的作用机制。体外分离、培养成骨细胞,实验分为3组,正常血清组、卵巢切除血清组、卵巢切除含药血清组,采用原位杂交法,检测成骨细胞骨保护素等的表达。得出在大鼠去势状态下,复方中药左归丸含药血清一方面直接抑制细胞核因子 κ B受体活化因子配基mRNA的分泌,使破骨细胞活性降低,另一方面促进成骨细胞分泌骨保护素,使之与细胞核因子 κ B受体活化因子配基的结合增多,进而使破骨细胞活性降低,从而达到治疗骨质疏松的目的。各组成骨细胞骨保护素、细胞核因子 κ B受体活化因子配基mRNA的表达,见表1。

表1 鞠大宏等^[21]研究中通各组成骨细胞成骨细胞骨保护素、细胞核因子 κ B受体活化因子配基 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	成骨细胞骨保护素	细胞核因子 κ B受体活化因子配基 mRNA
正常血清组	0.168±0.031	0.126±0.028
卵巢切除血清组	0.125±0.027 ^b	0.168±0.034 ^a
卵巢切除含药血清组	0.155±0.025 ^c	0.135±0.025 ^c

注:与正常血清组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与卵巢切除血清组比较,^c $P < 0.05$ 。

孙晖等^[22]进行了复方中药六味地黄丸主要血中移行成分对培养大鼠成骨细胞促增殖作用的研究,将六味地黄丸主要血中移行成分以适当浓度添加到大鼠成骨细胞培养液中,用MTT法测定细胞的增殖速度,结果显示,复方中药六味地黄丸主要血中移行成分莫诺昔、獐牙菜昔、马钱子昔的混合物各剂量组均明显表现出对大鼠成骨细胞的促增殖作用。因此,初步确定复方中药六味地黄丸主要血中移行成分莫诺昔、獐牙菜昔、马钱子昔是其治疗骨质疏松的药效物质基础。

2.2 复方中药增加骨密度的效应 骨密度是骨矿代谢中量化骨量的重要指标,是研究骨质疏松和评价药效的重要检测手段^[23]。熊学华等^[24]探讨复方中药对绝经

后骨质疏松大鼠模型血清骨钙素的影响, 采用雌性SD大鼠, 运用随机对照分组的原则, 分别分为正常对照组、模型组、复方中药组及尼尔雌醇组, 去双侧卵巢后造绝经后骨质疏松大鼠模型, 因为大鼠骨代谢与人存在相似之处^[25], 所以对大鼠进行双侧卵巢切除可作为很好的绝经后骨质疏松症模型^[26-27]。分别采用生理盐水、复方中药及尼尔雌醇对其进行灌胃, 灌胃3个月后采用摘眼球取血, 离心分离血清, 放免分析法测定其血清骨钙素含量, 并行体外右胫骨双能X射线扫描, 结果见表2。

表2 各组大鼠处死前血清骨钙素含量及处死后离体右胫骨骨密度结果^[24] ($\bar{x}\pm s$)

组别	右胫骨近端骨密度(g/cm ²)	右胫骨中段骨密度(g/cm ²)	骨钙素(μg/L)
正常对照组	0.217 7±0.017 4	0.150 2±0.006 1	0.88±0.27
模型组	0.179 7±0.017 1	0.147 9±0.005 9	0.56±0.22
复方中药治疗组	0.197 6±0.019 2	0.158 6±0.007 6	0.83±0.35
尼尔雌醇组	0.214 7±0.016 6	0.154 7±0.009 6	0.53±0.26

注: 右胫骨近端为松质骨, 复方中药治疗组与模型组相比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 但稍低于尼尔雌醇组, 右胫骨中段为皮质骨, 实验表明, 复方中药治疗组高于正常对照组及模型组, 与正常对照组相比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 与模型组相比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 且高于尼尔雌醇组, 但两组相比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 骨钙素水平显示, 复方中药治疗组明显高于模型组及尼尔雌醇组, 两者相比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 但复方中药治疗组低于正常对照组。

实验研究表明, 复方中药能显著提高模型大鼠血清骨钙素水平, 并能显著提高其离体骨骨密度, 表明其具有促进去势模型大鼠骨形成的作用, 而且对松质骨及皮质骨均有影响。

2.3 影响复方中药促进成骨细胞数量增殖及骨密度提高的因素 结果见表3。

表3 复方中药水提液对去卵巢大鼠骨密度及成骨细胞数量的影响^[28] ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	骨密度(g/cm ²)	成骨细胞数量
模型组	0.006 6±0.005 8	16.10±6.01
治疗组	0.051 3±0.012 3	29.50±9.87
阳性对照组	0.053 3±0.020 9	28.70±11.98
正常对照组	0.049 4±0.015 0	24.90±9.31

注: 治疗组、阳性对照组、正常对照组的骨密度明显高于模型组($P < 0.01$), 治疗组与阳性对照组的效应相近, 二者之间差异无显著性意义($P > 0.05$); 苏木精-伊红染色结果可见治疗组、阳性对照组、正常对照组的成骨细胞数量均多于模型组($P < 0.01$), 治疗组、阳性对照组、正常对照组之间的差异无显著性意义($P > 0.05$)。

杨林^[28]等观察了复方中药对去卵巢大鼠成骨功

能的影响, 取12周龄Wistar雌性大鼠40只, 随机分为A(模型组)、B(治疗组)、C(阳性对照组)、D(正常对照组)4组, 每组10只, 前3组行完整双侧卵巢摘除, D组行假手术, 术后常规饲养12周, 再分别予以生理盐水、复方中药水提液、 α -D3水溶液及生理盐水灌胃治疗12周, 处死大鼠, 取血清用放免法测定血清中骨钙素水平, 以双能X射线密度仪测定大鼠右股骨上干骺端骨密度, 取右胫骨上端做病理切片, 通过苏木精-伊红染色对成骨细胞进行观察比较。

实验结果可见, 治疗组血清骨钙素、骨矿含量、骨密度明显高于模型组, 苏木精-伊红染色发现其成骨细胞数量明显增加。因此, 复方中药能促进骨细胞增殖, 增加骨密度, 加快骨形成, 具有治疗骨质疏松症的作用。

2.3.1 不同性别动物复方中药含药血清对成骨细胞的影响 王威等^[29]观察不同性别大鼠的复方中药续断含药血清对成骨细胞增殖的影响。首先制备大鼠含药血清, 取雌性与雄性Wistar大鼠各12只, 按性别随机分为4组, 分别为雄性给药组、雄性对照组、雌性给药组、雌性对照组, 每组各6只, 给药组按体质量(4.5 g/kg)分别给予续断水提液灌胃、对照组按体质量分别给予等量生理盐水, 灌胃1周后取血, 离心提取血清, 分离、培养大鼠的原代成骨细胞, 将各组大鼠血清稀释为2.5%、5.0%和10.0%3个浓度分别培养大鼠成骨样细胞, 采用MTT法检测细胞增殖能力。续断对成骨细胞增殖的影响, 见表4。

表4 中药续断对成骨细胞增殖的影响^[29] ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	2.5%血清	5%血清	10%血清
雌性给药组	0.569 0±0.029 5	0.879 3±0.100 7	0.856 0±0.017 5
雌性对照组	0.378 7±0.047 6	0.386 3±0.018 0	0.381 7±0.098 6
雄性给药组	0.361 3±0.098 3	0.356 0±0.048 2	0.561 3±0.196 4
雄性对照组	0.392 0±0.096 6	0.349 7±0.094 3	0.480 7±0.149 1

注: 结果提示复方中药具有促进成骨细胞增殖的作用, 这种作用在雌性大鼠含药血清中表达强于雄性大鼠。

结果显示, 血清浓度为2.5%时的成骨细胞增殖率, 雌性给药组(0.569 0±0.029 5)与雄性给药组(0.361 3±0.098 3)比较差异显著性意义($P < 0.05$), 雌性给药组与雌性对照组(0.378 7±0.047 6)比较差异也有显著性意义($P < 0.01$); 当血清浓度为5%时的成骨细胞增殖率, 雌性给药组(0.879 3±0.100 7)与雄性给药组(0.356 0±0.048 2)比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 雌性给药组与雌性对照组(0.386 3±0.018 0)比较差异也存在显著性意义($P < 0.01$); 当血清浓度为10%时的成骨细胞增殖率, 雌性给药组

(0.856 0±0.017 5)与雌性对照组(0.381 7±0.198 6)比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。在各浓度的血清中, 雄性给药组与雄性对照组之间均无显著性差异。因此, 认为复方中药具有促进成骨细胞增殖的作用, 这种作用在雌性大鼠含药血清中表达强于雄性大鼠, 从而其有可能防治绝经后骨质疏松。至于为何不同性别动物复方中药含药血清对成骨细胞增殖影响产生差异有待进一步研究。

2.3.2 不同剂量复方中药对骨密度的影响 周丽珍等^[30]将3月龄的雌性SD大鼠, 普通饲料喂养1周后, 随机分为假手术组、模型组、尼尔雌醇阳性药物对照组、复方中药小剂量组、复方中药中剂量组、复方中药大剂量组。除假手术组外, 其余都经背部切开切除双侧卵巢, 制造去卵巢模型, 假手术组则背部切开后切除部分脂肪组织再分层缝合, 造模完成后, 假手术组及模型组用生理盐水灌胃, 阳性药物组用尼尔雌醇混悬液灌胃, 复方中药小、中、大剂量组分别给以6.5, 13, 26 g/kg大鼠体质量(按生药计算)的复方中药液, 每日固定在上午九点灌胃1次, 全部动物持续喂养3个月后处死, 测定其股骨的骨密度, 结果见表5。

表5 不同剂量复方中药对去卵巢大鼠股骨骨密度的影响^[30]
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	骨密度(g/cm ²)
假手术组	0.415 7±0.018 7
模型组	0.372 1±0.020 9
尼尔雌醇阳性对照组	0.431 6±0.012 9
复方中药小剂量组	0.425 2±0.013 2
复方中药中剂量组	0.431 5±0.018 9
复方中药大剂量组	0.427 8±0.013 1

注: 与假手术组相比, 模型组大鼠骨密度显著降低($P < 0.01$), 复方中药小剂量、中剂量、大剂量组均较假手术组增高($P > 0.05$), 其中复方中药中剂量组骨密度, 与尼尔雌醇阳性对照组相近。

结果显示, 复方中药组和尼尔雌醇组均较模型组的骨密度显著性增高($P < 0.01$), 复方中药中剂量组的骨密度比小剂量组和大剂量组的增高明显, 而且与阳性对照药尼尔雌醇的结果相近, 提示复方药物的剂量与治疗量有相关性, 而且复方中药能起到和尼尔雌醇相似的作用, 即降低绝经后骨质疏松的高转化率, 从而减慢骨质的丢失。

3 结论

体外培养法的优点是可以排除体内实验复杂因子的相互干扰, 可以从单细胞形态及代谢指标的变

化, 反映某一影响因子的直接作用, 研究单一因素对成骨细胞的调节作用, 以阐明骨代谢调节的细胞分子机制^[31]。通过体外培养的方法进行筛选, 找出对成骨细胞增殖分化有促进作用的药物, 然后提取有效成分联合用药或根据中药配伍进行配方, 则有望找到一种更好的治疗骨质疏松症的复方中药^[32]。不同的复方中药可以作用在不同的环节而预防和治疗骨质疏松症, 其中有关的确切机制尚不明确, 还有待于进一步的研究与探讨。

基金资助: 河北省中医药管理局资助项目(项目编号2012068)。

作者贡献: 李瑞玉进行实验设计, 颜军礼, 李蒙, 进行实验实施及评估, 资料收集为吴立萍, 孙艳浮, 李会龙, 李瑞玉成文, 李瑞玉对实验进行审校并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验获得所在单位的伦理委员会批准, 符合伦理学标准。

学术术语: 成骨细胞-是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基质的合成、分泌和矿化。骨重建过程包括破骨细胞贴附在旧骨区域, 分泌酸性物质溶解矿物质, 分泌蛋白酶消化骨基质, 形成骨吸收陷窝; 其后, 成骨细胞移行至被吸收部位, 分泌骨基质, 骨基质矿化而形成新骨。破骨与成骨过程的平衡是维持正常骨量的关键因素。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] 刘继平, 程玥. 中药促进成骨细胞功能和ALP活性影响研究的意义[J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(1): 7-8.
- [2] 邓敦, 曹成福, 纪斌, 等. 复方中药治疗原发性骨质疏松的实验研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(8): 68-69.
- [3] 秧荣昆, 郭磊磊. 骨碎补提取液对成骨细胞增殖的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(4): 61-62.
- [4] 柴天川, 刘丽芬. 汤剂与单味中药提取物颗粒混合液之比较[J]. 河北中医, 2006, 28(3): 199-200.
- [5] 洪曼杰, 卢丽, 王晓东, 等. 中药复方护骨胶囊治疗原发性骨质疏松症的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(12): 891-895.
- [6] 郭杨, 马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 188-191.
- [7] 孙兰英, 李秀萍, 杨永胜, 等. 中药复方治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(2): 28-30.
- [8] 宋鹏, 姚娟, 马慧萍, 等. 脱水淫羊藿素与山柰素对体外培养成骨细胞成熟矿化影响的比较研究[J]. 药学报, 2012, 47(7): 890-896.
- [9] 唐泉, 孙元明. 经典Wnt信号通路对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 天津医药, 2012, 40(2): 187-189.

- [10] 张宁,李铁男,任燕冬,等.基于方/证/病本质联系的方剂药效物质基础及作用机理研究构想[J].时珍国医国药,2010,21(5):1284-1285.
- [11] Scutt A,Bertram P,Bräutigam M.The role of glucocorticoids and prostaglandin E2 in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage: positive and negative effects.Calcif Tissue Int. 1996;59(3):154-162.
- [12] Petersen DN,Tkalcevic GT,Mansolf AL,et al.Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. J Biol Chem.2000;275(46):172-180.
- [13] 张声鹏,施旭光,桂蜀华,等.关于中药血清药理学中血清供体动物是否造模的思考[J].中国中西医结合杂志,2001,21(5):388-389.
- [14] 胡冰,傅炳国,沈霖,等.复方中药含药血清对大鼠成骨细胞增殖及矿化功能的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2003,11(4):8-10.
- [15] Mosmann T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.J Immunol Methods.1983;65(1-2):55-63.
- [16] 中国知网.中国学术期刊总库[DB/OL].2013-5-15.
<https://www.cnki.net>
- [17] 张荣华,舒晓春.中药复方补肾活血对成骨细胞影响的实验研究[J].中国病理生理杂志,2003,19(6):769-772.
- [18] 姚新苗,陈于东,方芳.益骨汤含药血清对成骨细胞增殖和ALP影响的实验研究[J].浙江中医药大学学报,2007,31(2):158-159.
- [19] 黄洁,程云英.大鼠成骨细胞的体外培养和生物学特性的研究[J].南京铁道医学院学报,2000,19(2):88-90.
- [20] 龚泰芳,夏仁云,段永芳,等.鼠骨组织成骨细胞的离体培养和生长特性[J].中国矫形外科杂志,2002,9(5):470-472.
- [21] 鞠大宏,刘梅洁,赵宏艳,等.左归丸含药血清对成骨细胞OPG、RANKL mRNA表达的影响[J].北京中医药大学学报,2008,31(5):312-315.
- [22] 孙晖,张宁,李力静,等.六味地黄丸主要血中移行成分对培养大鼠成骨细胞促增殖作用的研究[J].中国中药杂志,2008,33(17):2161-2164.
- [23] 李根林,尹君,杜志谦.研究补肾方药对去势大鼠骨质疏松模型骨生物力学性能的影响应注意的几个问题[J].中医正骨,2009,21(7):27-29.
- [24] 熊学华,刘庆思,余克强.中药骨康对去势大鼠血清骨钙素及离体骨密度的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2002,10(2):14-16.
- [25] 贾经汉,邱新建,陈志坚.骨质疏松动物模型的研究进展[J].中国康复医学杂志,2007,22(8):765-768.
- [26] Kalu DN.The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.Bone Miner.1991;15(3):175-191.
- [27] Gilles JA,Carnes DL,Dallas MR,et al.Oral bone loss is increased in ovariectomized rats.J Endod.1997;23(7):419-422.
- [28] 杨林,姚新苗,黄竞,等.益骨汤对去卵巢大鼠骨密度骨钙素及成骨细胞增殖的影响[J].辽宁中医杂志,2006,33(10):1356-1358.
- [29] 王威,何永志,史红,等.不同性别大鼠中药含药血清对成骨细胞增殖的影响[J].天津中医药,2009,26(1):9-11.
- [30] 周丽珍,王淑丽,秦腊梅,等.复方仙贞汤对去卵巢大鼠模型骨密度和骨形态的影响[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(5):492-495.
- [31] 胡光亮,杜靖远,王洪,等.补肾密骨液对骨代谢影响的体外实验研究[J].中国骨伤,2000,13(2):83-85.
- [32] 张丹,马砚涛,邢玉瑞.近十年来中医药治疗骨质疏松症临床研究进展[J].陕西中医学院学报,2009,32(6):89-91.