DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.014
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
1830 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1830-04

葛根素对体外破骨细胞性骨吸收的影响

李灵芝[1],刘启兵[1],姜孟臣[2],陈 虹[1],王 舒[3] (武警医学院:[1]药学教研室,[2]附属医院烧伤科,[3]临床医学4队,天津 300162)

提 要:目的 研究葛根素对体外破骨细胞性骨吸收的影响。方法 分离破骨细胞,与牛骨磨片共培养,分别加入10^{-8}、10^{-7}、10^{-6} mol/L的葛根素,以17β-雌二醇10^{-8} mol/L为阳性对照药,利用相差倒置显微镜观察破骨细胞吸收牛骨磨片的情况。于培养3、5、7 d计数各组骨吸收陷窝数目的变化,并进行显微摄片和图像分析。结果 与正常对照组相比,葛根素10^{-8}、10^{-7}、10^{-6} mol/L及17β-雌二醇10^{-8} mol/L能使体外培养破骨细胞性骨吸收数目和吸收陷窝面积呈剂量依赖性减少。结论 葛根素在体外能直接抑制破骨细胞性骨吸收。

关键词:葛根素;17β-雌二醇;破骨细胞;骨吸收陷窝
中图法分类号:R282.71;R322.71;R329.24 文献标识码:A

Inhibitory effect of *puerarin* on osteoclastic bone resorption *in vitro*

LI Ling-zhi[1], LIU Qi-bing[1], JIANG Meng-chen[2], CHEN Hong[1], WANG Shu[3] ([1]Department of Pharmacy, [2]Department of Burns, Affiliate Hospital, [3]Team 4, Department of Clinical Medicine, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To study the effects of puerarin on the bone resorption of osteoclasts *in vitro*. Methods Puerarin at the doses of 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, and 10^{-6} mol/L were added into the isolated osteoclasts for co-culture with bovine bone slices *in vitro*. 17β-estradiol was employed as the control. The absorption of bovine bone slices by osteoblasts was observed by an inverted phase contrast microscope. Results Compared with at in the control, puerarin at the doses of 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, and 10^{-6} mol/L and 17β-estradiol at the dose of 10^{-8} mol/L could significantly reduce the number and the suface area of absorption lacuna in a dose-dependent manner. Conclusion Puerarin *in vitro* can inhibit the bone resorption of osteoclasts by suppressing the activity of osteoclasts.

Key words: *puerarin*; 17β-estradiol; osteoclast; absorption lacuna

葛根是豆科植物葛(*Pueraria lobata*)和野葛(*P. thunbergiana*)的块根,具有解表退热,生津止渴的作用,临床用于治疗感冒无汗、口渴和麻疹不透等症[1]。异黄酮类化合物葛根素(*puerarin*)是葛根的主要活性成分,具有降低血压,减慢心率,扩张血管的作用,临床上用于高血压、心绞痛、脑供血不足和脑梗塞的治疗[2]。最新研究表明,葛根中的另一种异黄酮类活性成分葛根大豆甙元具有良好的抗氧化和抗癌作用[3,4],对妇女更年期综合症和绝经后骨质丢失有一定的预防作用[5],被称为植物雌激素。葛根素与葛根大豆甙元结构极其相似,仅在8-位相差一糖基,但该化合物影响骨代谢的文献报道甚少。本研究采用体外培养的兔破骨细胞考察葛根素对破骨细胞性骨吸收的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 新生24 h内新西兰大耳白兔3窝,共24只,雌雄兼用,购自中国兽药监察所动物室,实验动物许字第004号;新鲜牛股骨购于市场,-70 ℃冰箱保存,临用前取出。

1.1.2 药品与试剂 α-MEM培养基购自Gibco公司;Hepes为Sigma公司产品;胎牛血清(FBS)购自中国医学科学院血液学研究所;葛根素(Pur)购自中国药品生物制品检定所,实验前用不含血清的α-MEM培养基溶解,过滤除菌后分别配成浓度为10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} mol/L的溶液,临用时加入到培养基中,使终浓度为10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L。17β-雌二醇(E_2)用二甲基亚砜(DMSO)溶解,过滤除菌后配成浓度为10^{-7} mol/L的溶液,临用时加入到培养基中,使终浓度为10^{-8} mol/L。

1.1.3 主要仪器 Forma 3111型CO_2培养箱(美国);CK-40型OLYMPUS倒置光相差显微镜(日本);Strong-101.101L.108E型技工打磨机(韩国);BioMias图像分析处理系统(四川大学图

基金项目:武警总部科研基金资助项目(WKH2001019)
Supported by the Scientific Research Foundation of the General Department of Chinese People's Armed Police Forces (WKH2001019)

作者简介:李灵芝(1963-),女,内蒙巴彦淖尔盟人,博士,教授,主要从事抗骨质疏松药物方面的研究。电话:(022)60578184,E-mail:lizhx@tom.com

收稿日期:2003-12-03;修回日期:2004-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

像研究所)。

1.2　方法

1.2.1　分离破骨细胞[6,7]　采用 Chambers 法, 断头术将新生兔处死, 无菌条件下分离其股骨、胫骨和肱骨, 除去表面附着的软组织和软骨后, 将骨干和干骺端在 Hanks 液中漂洗 2 遍, 放入装有 12 ml 完全α-MEM 培养基(含 15%胎牛血清, 25 mmol/L 的 HEPES, 2.2 g/L $NaHCO_3$, 100 μg/ml 氨苄青霉素及 100 μg/ml 链霉素)的培养皿中。将骨干纵行剖开, 去净骨髓。用吸管吹打振荡细胞悬液 2 min, 使附着在碎骨片上的破骨细胞冲入培养液中, 再静置 1 min, 使碎骨片沉降, 细胞悬液即可用于实验。

1.2.2　骨磨片的制备和处理　取新鲜牛股骨, 用技工打磨机将骨皮质分切成约 6 mm× 6 mm 大小, 厚约 200 μm 的骨片, 再用金刚砂石将骨片磨至约 10 μm 厚, 蒸馏水清洗后浸泡于 α-MEM 培养基(含 1 mg/ml 氨苄青霉素、1 mg/ml 链霉素)中备用。

1.2.3　破骨细胞与骨磨片共培养[6,7]　取 24 孔培养板, 每孔加入 1 ml 完全α- MEM 培养液, 再加入 1 个骨磨片, 置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h, 加入上述细胞悬液, 每孔 0.5 ml, 继续培养。

1.2.4　分离的破骨细胞与骨磨片共培养约 16 h(隔夜), 吸取完全α-MEM 培养液冲掉未附着的细胞, 更换新鲜培养液, 并加入待测 Pur 和 E_2, 除正常对照组外, 另设 Pur 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L 组及 E_2 10^{-8} mol/L 组, 每组设 8 个复孔。

1.2.5　骨吸收陷窝的动态观察、计数及显微摄片　分别于破骨细胞与骨磨片共培养的第 3 天、第 5 天和第 7 天, 在倒置光相差显微镜下观察骨片上吸收陷窝形态及其变化, 计数每张骨片上吸收陷窝数的动态变化, 同时摄片。

1.2.6　图像分析系统计算吸收陷窝面积　采用图像分析处理系统对各组照片进行扫描分析, 计算吸收陷窝的面积。

1.2.7　统计学处理　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行双因素方差分析。

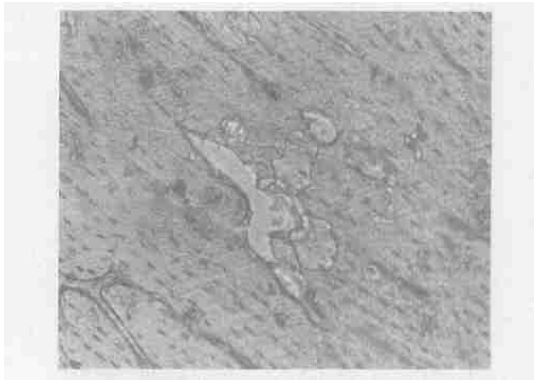
2　结果

2.1　Pur 对破骨细胞骨吸收陷窝形态学的影响

分别于培养的第 3、5、7 天在倒置光相差显微镜下观察各组骨片上的吸收陷窝形态及其变化, 发现骨吸收陷窝开始为单个圆形或椭圆形, 少数为不规则形。随着培养时间的延长, 正常对照组骨片上的吸收陷窝增加明显, 由单个独立的陷窝连成梅花形、串珠样和多环状。10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L Pur 及 10^{-8} mol/L E_2 均能减慢骨片上吸收陷窝形成速度, 而且陷窝多呈单个圆形, 难以连接成片(图 1~4)。

2.2　Pur 对破骨细胞骨吸收陷窝数目的影响

与对照组相比, 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L Pur 在破骨细胞与骨磨片共培养的不同时间, 均可使破骨细胞在骨磨片上形成的骨吸收陷窝数减少, 并呈剂量依赖性。在培养的第 3 天和第 5 天, 10^{-6} mol/L Pur 与 10^{-8} mol/L E_2 的作用无统计学差异($P>0.05$), 在培养的第 7 天, 10^{-6} mol/L Pur 的作用强于 10^{-8} mol/L E_2($P<0.05$)。在培养的不同天数 10^{-7} mol/L 和 10^{-8} mol/L Pur 组作用均弱于 10^{-8} mol/L E_2 组(表 1)。



The arrow points out the lacunae

图 1　空白对照组破骨细胞与骨磨与共培养 3 d 形成的骨吸收陷窝　(倒置相差显微镜× 100)

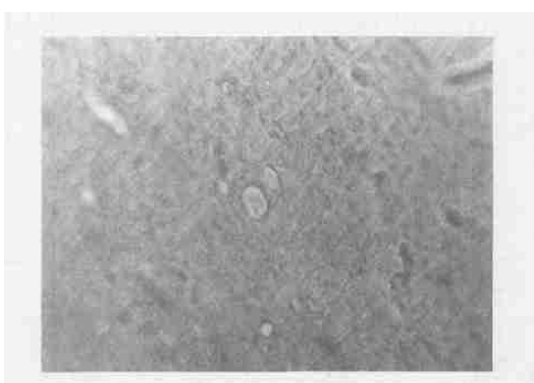
Fig 1　The bone resorption lacunae in control group at 3 d after co-culture　(Phase contrast microscope× 100)



The arrow points out the lacunae

图 2　同一部位第 7 天骨吸收陷窝明显增大增多　(倒置相差显微镜× 100)

Fig 2　The lacunae enlarged and increased obviously at the same site at 7 d　(Phase contrast microscope× 100)



The arrow points out the lacunae

图 3　骨片与破骨细胞共培养 16 h 后加入葛根素(10^{-6} mol/L), 第 3 天可见 2 个吸收陷窝　(倒置相差显微镜× 100)

Fig 3　*Puruerin* (10^{-6} mol/L) was added after the osteoclasts were cultured with bone slice for 16 h, and 2 bone lacunae appeared at 3 d after culture　(Phase contrast micrograph× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



The arrow points out the lacunae

图 4 同一部位第 7 天骨吸收陷窝无变化 (倒置相差显微镜× 100)

Fig 4 The lacunae had no change at the same site at 7 d after culture (Phase contrast microscope× 100)

表 1 葛根素对破骨细胞性骨吸收陷窝数的影响

Tab 1 Effects of *puerarin* on the number of osteoclastic absorption lacunae ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	Concentration (mol/ L)	Numbers of lacunae		
		3 d	5 d	7 d
Control	——	46.6±8.4	86.0±4.3	157.1±10.4
Pur	10^{-8}	45.4±8.4△△	63.8±5.2**△△	98.6±7.1*△△
	10^{-7}	31.5±5.4**△	42.6±4.6**△△	74.9±7.1*△△
	10^{-6}	20.4±3.7**	27.9±3.0**	33.9±3.3*△
E_2	10^{-8}	22.1±5.1**	28.3±3.5**	43.0±3.5**

Osteoclasts were cultured with bone slices for 3, 5, and 7 d. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* E_2; $F_d=7.917$, $P=0.013$, $F_G=6.485$, $P=0.013$

2.3 Pur 对破骨细胞形成骨吸收陷窝面积的影响

与正常对照组相比, 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/ L Pur 在破骨细胞与骨磨片共培养的不同天数, 均可剂量依赖地使破骨细胞在骨磨片上形成的骨吸收陷窝面积减小($P<0.01$)。E_2 10^{-8} mol/ L 也能明显减少骨吸收陷窝面积, 此与文献[8]报道一致。在培养的第 3 天, 10^{-6} mol/ L Pur 作用与 E_2 10^{-8} mol/ L 无统计学差异($P>0.05$), 培养的第 5 天, 10^{-6} mol/ L Pur 作用均强于 10^{-8} mol/ L E_2($P<0.01$)。在培养的不同天数, 10^{-7} mol/ L 和 10^{-8} mol/ L Pur 的作用弱于 10^{-8} mol/ L E_2($P<0.01$)(表 2)。

表 2 葛根素对破骨细胞性骨吸收陷窝面积的影响

Tab 2 Effects of *puerarin* on the area of osteoclastic bone absorption lacunae ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration (mol/ L)	Area of lacunae (μm^2)		
		3 d	5 d	7 d
Control	——	757.57±26.57	1 562.12±131.53	3 146.72±303.15
Pur	10^{-8}	425.11±20.72**△△	939.58±17.72*△△	1 798.26±162.60**△△
	10^{-7}	299.73±17.29**△△	655.99±20.55*△△	999.14±31.34**△△
	10^{-6}	109.62±14.35**	270.83±24.17*△△	446.75±18.28**
E_2	10^{-8}	115.47±19.53**	346.23±21.97**	497.75±25.44**

Photomicrography (× 100) and computer image scan analysis after osteoclasts were cultured with bone slices for 3, 5, and 7 d. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ control; △△: $P<0.01$, *vs* E_2; $F_d=6.921$, $P=0.018$, $F_G=6.233$, $P=0.014$

3 讨论

女性绝经后由于雌激素撤退性降低, 破骨细胞骨吸收过度, 造成进行性骨丢失, 乃至骨质疏松, 临床常采用雌激素替代疗法进行防治[9]。但长期使用雌激素存在增加子宫内膜癌和乳腺癌的发病率的危险, 目前倾向于使用具有组织选择性的选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs)如 raloxifene。大豆异黄酮类植物雌激素来源于植物, 具有与 17β-雌二醇和 SERMs 相似的空间结构, 是一种弱雌激素。流行病学、实验室研究和临床资料表明该类化合物降低心血管疾病、乳腺癌和子宫内膜癌的发病率[10], 而对脂蛋白[3]和骨密度则产生有益影响, 能维持去卵巢动物的骨量[11], 还可改善绝经症状, 有学者称其为"天然SERM"。文献[12]报道葛根总黄酮能改善去卵巢大鼠骨密度。葛根总黄酮主要由葛根素及其甙以及大豆甙元及其甙组成。目前关于大豆甙元对骨的作用已有不少文献报道, 葛根素是大豆甙元 8 位碳与葡萄糖相联生成的化合物, 鉴于其结构与大豆甙元极其相似, 我们推测其可能具有与大豆甙元相似的作用。但迄今为止, 极少见有关该化合物对骨的作用的研究报道。

破骨细胞是骨吸收的主要功能细胞。已证实破骨细胞存在雌激素受体, 意味着雌激素可通过受体介导直接作用于骨。Kameda 等[8]的研究发现, 17β-雌二醇能通过雌激素受体途径直接诱导成熟破骨细胞的凋亡, 从而抑制破骨细胞骨吸收功能。本研究应用体外破骨细胞分离培养技术, 观察了雌二醇和葛根素对破骨细胞性骨吸收的直接作用, 结果证实 17β-雌二醇能明显抑制兔破骨细胞的骨吸收功能, 与文献[8]报道一致。实验结果还显示葛根素在 10^{-8}~10^{-6} mol/ L 范围内可使破骨细胞在牛骨磨片上形成的吸收陷窝数和吸收陷窝面积明显较对照组减少, 且呈剂量依赖关系。10^{-6}mol/ L 的葛根素的作用强于 10^{-8}mol/ L 的 17β-雌二醇。这表明葛根素对破骨细胞的骨吸收功能具有直接抑制作用, 提示其对骨可能具有雌激素样活性, 可能具有与异黄酮类植物雌激素相似的作用特点, 但究竟该化合物对成骨细胞以及乳腺和子宫的影响如何, 目前我们正在进一步研究之中。

参考文献:

[1] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 472.

[2] 朱庆磊, 吕欣然. 葛根素的药理学和临床应用研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(11): 693-696.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] Tikkanen M J, Wahala K, Ojala S, *et al*. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3106－3110.
[4] Kwon C S, Kwon T W, Kim J S. Effects of soy isoflavone-supplemented diets on benzopyrene-induced lung and forestomach tumorigenesis in mice[J]. Food Sci Biotechnol, 2000, 9(4): 249－252.
[5] Chen X, Anderson J J B. Isoflavones and bone: animal and human evidence of efficiency[J]. J Musculoskel Neutron Interact, 2002, 2(4): 352－359.
[6] 史风芹, 于世凤. 体外破骨细胞分离培养方法的建立[J]. 中华骨科杂志, 1994, 14(1): 43－46.
[7] Takeda H, Ozaki K, Yasuda H, *et al*. Sphingomyelinase and ceramide inhibit formation of F-actin ring in and bone resorption by rabbit mature osteoclasts[J]. FEBS Lett, 1998, 422(2): 255－258.
[8] Kameda T, Mano H, Yuasa T, *et al*. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts[J]. J Exp Med, 1997, 186(4): 489－495.
[9] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998. 142.
[10] Vincent A, Fitzpatrick L A. Soy isoflavones: are they useful in menopause[J]? Mayo Clin Proc, 2000, 75(11): 1174－1184.
[11] 徐 霞, 贡沁燕, 鲁映青, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和雌激素活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(6): 321－325.
[12] 郑高利, 张信岳, 方晓林, 等. 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨矿密度和骨强度的影响[J]. 中草药, 2001, 32(5): 422－425.

（编辑 刘洪娥）

文章编号: 1000-5404(2004)20-1833-01

个案与短篇

CT 导引下肺部穿刺活检的扫描技术探讨

CT scan technology with transthoracic biopsy of the pulmonary

谢 兵, 王 健, 黄学全 （第三军医大学西南医院放射科, 重庆 400038）

非血管介入的开展在目前已广泛运用于全身各部位, CT 引导下的肺部穿刺活检由于其易行、效果显著而最为普及。在穿刺过程中, CT 扫描的参数设置、病灶定位的准确性及 CT 透视的参数设置都与穿刺能否成功, 同时也和受检病人及穿刺医生的射线防护密切相关[1]。本研究就我们在肺部穿刺活检扫描时的简易定位器的自制和使用, 扫描及透视相关参数的调整设置作了一些探讨和研究。

1 材料和方法

1.1 资料

89 例患者中, 男 56 例, 女 33 例。年龄 18～79 岁。其中左肺病灶 35 例, 占 39%; 右肺病灶 54 例, 占 61%。

1.2 方法

使用设备为德国 SIEMENS PLUS4 螺旋 CT, 通常根据病灶大小、位置等情况摆放病人体位, 扫描前常规训练病人吸闭气。先行定位扫描, 与普通胸部 CT 定位像扫描相同; Spiral 扫描的参数设置为, 层厚 5 mm, 螺距 5 mm, 扫描方向通常采用进扫, 若病灶很小时可将层厚设置为 3 mm。扫描距离 120 mm, 螺距时间(Rot. Time) 0.75 s, 140 kV, 171 mA, 重建模式 Metro Recom, 重建层厚 5 mm, 卷积函数 Kernel AB50。CT 透视时采用低剂量体部(Low dose body)或超低剂量体部(Xlow dose body), 参数设置为, 层厚 10.0 mm, 床面移动距离(Table movement) 5.0 mm, 螺距时间(Rot. Time)0.75 s, 最大透视时间 49.5 s, 80 kV, 105 mA, 最大毫安秒 5 198 mAs, 重建速度 standard, 卷积函数(Kernel) RB10。

扫描时所用定位器是利用废旧导管简易自制, 具体方法是将 9 根 5F 导管均裁减为 10 cm, 将其以 1 cm 的间距平行排列并用胶布固定。CT 扫描时可以清楚显示作为定位标志的导管, 而且并没有金属伪影产生; 扫描时利用定位器测量病灶在体表的垂直投影点, 运用 CT 机中的测量距离工具测量体表投影点到胸腔壁及到病灶近侧边缘的准确距离, 若病灶较大而且安全性好, 可以直接根据测量数据进行穿刺。小病灶和危险性较大的穿刺须在 CT 透视下进行, 在病人闭气的同时由穿刺医生踩透视脚开关并进穿刺针, 穿刺助手根据透视屏幕中的情况移动检查床, 在穿刺针到达病灶边缘时停止透视。透视图像的窗值调整一般是窗中心设在 40 左右, 然后手动调节窗宽, 通常在 900～1 800 之间, 这样使得穿刺针与病灶可以清楚的为操作者观看到。

2 结果

我们所开展的 89 例均穿刺成功, 获得组织学材料, 能做出明确病理诊断者。对穿刺后作为资料所拍摄的 CT 片进行质量分析, 包括对比度和清晰度的统计分析。扫描图像中 85%达到优类, 没有 1 例图像评为差类, 透视图像也有 75%达到优类, 仅有 1 例由于病员在穿刺时由于疼痛产生移动伪影致使多数透视图像无法使用, 见表 1。

作者简介: 谢 兵(1966－), 男, 四川省乐山县人, 硕士, 主管技师, 主要从事磁共振功能成像及放射技术学方面的研究, 发表论文 9 篇。电话: 13752821246, E-mail: xinbing@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-03-02; 修回日期: 2004-09-05

（下转 1837 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net