

马钱子对三种软骨细胞凋亡模型的影响

张梅¹, 李平¹, 汪健¹, 翟志敏¹, 陈朝晖²

(1. 安徽省立医院, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽中医学院)

摘要 目的: 观察中药马钱子对三种软骨细胞凋亡模型的影响。方法: 在兔软骨细胞培养体系中分别加入 2 mmol/L 亚硝酸钠(SNP)、2 mmol/L SNP+ 马钱子、 10^{-4} mol/L 全反式维甲酸(ATRA)、 10^{-4} mol/L ATRA+ 马钱子; 在人胚胎软骨细胞培养体系中加入 30 ng/L 肿瘤坏死因子 α (TNF α)、TNF α + 马钱子, 各组培养 24 h 后, 采用 Annexin V/PI 双参数法对软骨细胞凋亡进行定量检测。结果: 软骨细胞在加入 SNP、ATRA、TNF- α 发生凋亡时, 加入马钱子能降低 SNP、ATRA 诱导的软骨细胞凋亡率($P < 0.01$, $P < 0.05$), 但对 TNF- α 诱导的软骨细胞凋亡, 无明显抑制作用($P > 0.05$)。结论: 中药马钱子对部分软骨细胞凋亡有一定抑制作用。

关键词 马钱子; 软骨细胞; 凋亡

Effects of Semen strychni on three types of chondrocytes apoptosis ZHANG Mei*, LI Ping, WANG Jian, ZHAI Zhi min, CHEN Zhaohui. * Anhui Prinvince Hospital, Anhui Hefei, 230001, China

Abstract Objective: To evaluate the effects of Semen strychni on three types of chondrocytes apoptosis.

Methods: Chondrocytes of rabbits were respectively cultured with ①2 mmol/L sodium nitroprusside(SNP), ② Semen strychni and 2 mmol/L SNP, ③ 10^{-4} mol/L all trans retinoic acid (ATRA), ④Semen strychni and 10^{-4} mol/L ATRA. Fetac chondrocytes were respectively cultured with ①30 ng/L tumor necrosis factor- α (TNF α), ②Semen strychni and 30 ng/L TNF- α . The rates of chondrocytes apoptosis in every group were detected by Annexin V/PI with flow cytometry after being cultured for 24 h. **Results:** The chondrocyte apoptosis could be induced by SNP, ATRA and TNF- α respectively. Adding Semen strychni into cultured could decrease chondrocytes apoptosis induced by SNP, ATRA ($P < 0.01$, $P < 0.05$), but had no effects on apoptosis induced by TNF α ($P > 0.05$). **Conclusion:** Semen strychni has inhibitory effects on some chondrocyte apoptosis.

Key words Semen strychni; Chondrocyte; Apoptosis

中药马钱子临床上既有通络止痛作用, 又有强筋壮骨功效, 能行能补, 配伍可寒可热、一药多能, 是治疗骨关节炎的良药。现代药理学研究表明, 马钱子除具有显著镇痛抗炎作用外, 还能调节免疫能力, 诱生细胞因子等^[1]。我们在前期实验中, 分别将亚硝酸钠、全反式维甲酸、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 加入软骨细胞培养体系, 建立三种不同药物诱导的软骨细胞凋亡模型^[2], 本实验着重观察马钱子对不同药物诱导的软骨细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及药品 II 型胶原酶、胰蛋白酶、二甲亚砜、四氮唑蓝(MTT)均为美国 Sigma 公司产品, 甲苯胺蓝染色剂(toluidinblu noch hoyer 德国), 由安徽

省立医院病理科提供, 培养基 DMEM 为 Gibco 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, 亚硝酸钠(sodium nitroprusside, SNP) 为北京双鹤药业产品(批号: 0205171, 京卫药准字 1996 年 107043 号) 50 mg/支, 全反式维甲酸(all trns retinoic acid, ATRA) 由 Sigma 公司提供(NO: 206-129-0), TNF- α (人) 由迈新公司提供, 连接素 V 导硫氰酸荧光素标记(annexin V FITC) 型号 Kit Protocol ct NO 2375、碘化丙啶(PI) 试剂均由苏州库尔特免疫技术公司提供。

1.2 动物 2~3 日龄新西兰兔 2 只用于细胞培养, 成年新西兰兔 2 只用于含药血清制备, 由安徽医研所提供。

1.3 人胚胎 自愿节育者孕 3 个月人工流产, 由安徽省立医院妇产科门诊提供。

1.4 仪器 CO₂ 培养箱(BB5060, 美国), 流式细胞

基金项目: 国家中医药管理局课题(编号: 2000JP 58)

通讯作者: 张梅 Tel: 0551-3917270 E-mail: zhang69@sohu.com

仪(EPICS XL MCL, 美国) 光学显微镜(OLYMPUS PM20, 日本), 透射电镜(JEM-1230 日本电子), 倒置显微镜(日本 OLMPUS TOKYO, CK 型)。

1.5 马钱子含药血清的制备 取健康新西兰兔 2 只, 体重在 2.25 kg 左右, 马钱子组和空白对照组各 1 只。马钱子组按马钱子 100 mg/kg 剂量配成溶液灌胃, 空白对照组按 2 ml/kg 剂量生理盐水配成溶液灌胃, 每天 1 次, 均连续给药 3 d, 末次灌药 2 h 后, 硫喷妥钠麻醉后, 无菌条件下于腹主动脉取血, 离心后取血清, 过滤后经 56 °C 30 min 灭活处理, 备用。

1.6 细胞凋亡的定量检测(采用 Annexin V/PI 双参数法) 收集培养的软骨细胞, 将培养板中软骨细胞消化后收集, 离心去上清液, PBS 洗 2 遍, 留取约 100 μl 的细胞悬液, 加入 1 μl Annexin V 和 2.5 μl PI, 避光孵育 15 min, 再加缓冲液至 500 μl 上流式细胞仪分析。光温为 488 氩离子激光器, FITC 受激光后发绿色荧光, PI 受激光后发红色荧光。每份标本收集 5×10^4 细胞, 分析软件为 System II TM。

1.7 实验方法 软骨细胞按每孔 5×10^4 个细胞种植于 24 孔板, 每孔培养液为 1 ml, 实验分组: 正常组 I (兔软骨细胞), 正常组 II (人胚胎软骨细胞), SNP 组, ATRA 组, TNF-α 组, 马钱子+ SNP 组, 马钱子+ ATRA 组, 马钱子+ TNF-α 组在培养体系中分别加入 2 mmol/L SNP、 10^{-4} mol/L ATRA、30 ng/L 人 TNF-α, 加入药物后(SNP 组, STRA 组, TNF-α 组按建立诱导凋亡模型剂量), 同时分别加入马钱子含药血清, 共同孵育 24 h, 终止培养。收集细胞, 流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理 各项数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 11.0 进行 *t* 检验。

2 结果

在软骨细胞培养体系分别加入 2 mmol/L SNP, 10^{-4} mol/L ATRA, 30 ng/L 人 TNF-α 发生凋亡过程中, 马钱子含药血清加入 SNP 后与 SNP 组比较, 二者有显著性差异($P < 0.01, t = 6.27$), 马钱子含药血清加入 ATRA 后与 ATRA 组比较, 二者有显著性差异($P < 0.05, t = 2.83$)。马钱子含药血清加入 TNF-α 组后与 TNF-α 组比较, 二者无显著性差异($P > 0.05, t = 0.07$)。见表 1。

3 讨论

骨关节炎发病主要与年龄、性别、遗传因素及种族有关; 而肥胖、关节面上机械应力改变、关节畸形、

表 1 马钱子对软骨细胞三种凋亡模型的影响 ($n = 5$)

Tab. 1 Effects of Semen strychni on three types of chondrocytes apoptosis ($n = 5$)

| Groups | Rate of apoptosis(%) |
|-----------------------|----------------------------|
| Normal group I | 2.70 ± 2.50 |
| Normal group II | 3.48 ± 1.54 |
| SNP | 65.07 ± 5.68 [▲] |
| ATRA | 45.87 ± 12.99 [▲] |
| TNF-α | 92.16 ± 3.44 [▲] |
| Semen strychni+ SNP | 32.31 ± 10.21 [*] |
| Semen strychni+ ATRA | 27.40 ± 6.67 [#] |
| Semen strychni+ TNF-α | 92.00 ± 3.46 ^{▲▲} |

Note: Compare with normal group, [▲] $P < 0.01$; compare with SNP group, ^{*} $P < 0.01$; compare with ATRA group, [#] $P < 0.05$; compare with TNF-α group, ^{▲▲} $P > 0.05$

损伤及代谢紊乱则是构成发病的危险因素, 共同的病理学特征是由于内外因素的作用引起关节软骨的受损, 发病中心环节是关节软骨发生退行性改变^[3]。近期发现 OA 中软骨细胞的凋亡有异常的表现, 且凋亡可能在骨关节发病机制起重要作用, 与骨关节预后关系密切^[4, 5]。

骨关节炎属中医“痹症”“骨痹”“腰腿痛”的范畴, 痹病初期, 多由虚而致, 正气虚弱为其内在因素, 外邪侵犯, 跌扑损伤等为其外来因素, 痹病发展到后期, 正虚痰瘀, 相致为患, 胶固难去, 络脉瘀滞不通, 不通则痛, 故病情日久不解, 疼痛反复发作。

骨关节炎临床表现为缓慢发展的关节疼痛、僵硬、肿大, 伴活动受限, 病变可见于全身多处关节, 病情时轻时重, 迁延难愈, 病程较长。其临床表现符合络病特征, 即“久、瘀(痛)、顽、杂”, 无论是正虚还是邪侵, 骨关节炎最终病机与络脉有关。表现为络脉不荣(络虚)或络脉不通(络实)或二者并见, 络虚是肝肾不足, 气血亏虚, 络脉失养, 络实主要是痰瘀互结, 邪滞络脉。络虚为始动因素, 络脉瘀滞为其病变形成的最终病理基础^[6]。因此, 骨关节炎临床上应加强对通络药的使用。我们从 1994 年始依据清·龙马自来丹和药典复方马钱子散化裁组方“腰痛舒胶囊”, 其功效主要为温肾散寒, 通络止痛, 目前该药已进入临床 III 期研究, 临床显示该药对骨关节炎有明显疗效。2001 年“腰痛舒胶囊”对骨关节炎的作用机制研究, 获国家中医药管理局资助, 在进行大量拆方试验研究基础上, 发现原“腰痛舒胶囊”中通络药马钱子在保护软骨上起主要药效学作用。

我们在前期实验中, 将硝普钠、全反式维甲酸、

肿瘤坏死因子-α 加入软骨细胞培养体系中,建立了软骨细胞三种凋亡模型。NO 和 ATRA 诱导的软骨细胞凋亡是以早期凋亡为主。而 TNF-α 诱导的人胚胎软骨细胞凋亡主要以晚期凋亡为主。本次实验中,我们着重观察马钱子对不同药物诱导的软骨细胞凋亡的影响。实验中,在以上诱导的软骨细胞凋亡体系中,加入马钱子含药血清 24 h 后各组凋亡率与模型组相比,马钱子加入 SNP 后与 SNP 组比较,二者有显著性差异($P < 0.01$),马钱子加入 ATRA 后与 ATRA 组比较,二者有显著性差异($P < 0.05$)。马钱子加入 TNF-α 后与 TNF-α 组比较无明显差异($P > 0.05$),说明马钱子能降低 SNP、ATRA 诱导的软骨细胞早期凋亡,而对 TNF-α 诱导的软骨细胞的晚期凋亡,无明显抑制作用。马钱子为什么对人 TNF-α 诱导的软骨细胞的凋亡无抑制作用,我们考虑可能与以下原因有关,一是 TNF-α 诱导的软骨细胞凋亡,主要是细胞的晚期凋亡,可能是马钱子及马钱子碱对软骨细胞早期凋亡有一定抑制作用,而对

细胞的晚期凋亡无明显影响。二可能是马钱子对软骨细胞的保护作用起效较慢或是对软骨细胞某些特异性受体直接作用和亲和力不及 TNF-α。马钱子能降低 SNP、ATRA 诱导的软骨细胞早期凋亡,其抑制凋亡的途径是什么,这些都有待于我们今后进一步探讨。

参考文献

- 1 唐迎雪. 马钱子的药性与临床应用. 山东中医药大学学报, 1998, 22 (6): 452.
- 2 张梅, 李平, 汪健, 等. 软骨细胞凋亡三种模型的建立. 上海实验动物科学, 2004, 23(1): 11.
- 3 邱贵兴, 荣国威. 骨科学. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002. 506.
- 4 Blinco FJ, Guin R, Viquez Mrtul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. Rthritis Rheum, 1998, 41: 284.
- 5 Hshimoto S, Ochs RL, Komiy S, et al. Linkge of chondrocyte poptosis and crtilge degraion in human osteoarthritis. Rthritis Rheum, 1998, 41: 1632.
- 6 张梅, 李平. 浅谈骨关节炎从络论治. 中华中医药杂志, 2003, 18 (10): 5.

(收稿日期: 2004- 11- 02 本文编辑: 连智华)

• 短篇报道 •

电锯致手部非离断性损伤 82 例治疗体会

张春喜, 曹清峰

(巩义市中医院手足外科, 河南 巩义 451200)

自 1999 年 8 月 - 2003 年 8 月, 共收治电锯致手部非离断性损伤患者 82 例, 分别采用急诊修复或延期手术治疗, 现将治疗结果报告如下。

1 临床资料

82 例均为男性; 年龄 16~ 65 岁, 平均 41 岁。左侧 29 例, 右侧 46 例, 双侧 7 例; 手指 28 例, 掌侧 31 例, 背侧 23 例。均为非离断性损伤。合并伤: 骨关节损伤或缺损 47 例, 肌腱损伤或缺损 42 例, 动脉损伤 39 例, 重要神经损伤 31 例。

2 治疗方法

本组 41 例(A 组) 受伤后急诊行清创骨折复位内固定血管神经肌腱修复术; 41 例(B 组) 先急诊清创, 3~ 7 d 后创面行显微有限清创后再行创部损伤修复。所有病例骨折内固定方式采用克氏针交叉固定或细钢丝内固定, 固定时间 3~ 4 周。动脉缺损取前臂浅静脉桥接移植, 肌腱缺损取掌长肌腱移植, 重要神经缺损以桡神经浅支或腓肠神经桥接移植修复, 血管神经肌腱移植长度每根 2~ 5 cm。创面皮肤缺损 37 例, 采用局部转移皮瓣、近位岛状皮瓣或髂腹股沟皮瓣修复, 皮瓣大小 1.5 cm × 2 cm~ 6 cm × 10 cm。术后抗感染治疗。功能锻炼, 动静结合, 1~ 2 周以被动活动为主, 3 周后以主动活动

为主。

3 治疗结果

A 组创面 I 期愈合 9 例, II 期扩创皮瓣或植皮修复 32 例。其中骨不愈合行骨缩短或取髂骨植骨后恢复 7 例; B 组创面延期术后愈合 38 例, 再行植皮修复 3 例。随访 3~ 12 个月, 上肢及手功能综合评价[中华手外科杂志, 2000, 16(3): 130-135], A 组: 优 5 例, 良 12 例, 差 18 例, 劣 6 例, 优良率 41.5%; B 组: 优 27 例, 良 12 例, 差 2 例, 优良率 95.1%。

4 讨论

电锯所致的创伤常有不同程度的组织缺损, 创伤组织受锯齿牵拉撕扯损伤, 还可能受到烧伤。创伤性炎症反应于 48~ 72 h 达到高峰, 炎症反应使局部水肿及微循环障碍加重, 故在损伤当时不易准确判断创部组织损伤程度, 伤后急诊行清创修复手术, 容易出现清创不彻底, 导致创部感染缠绵不愈, 创缘皮肤坏死, 病程延长。而在伤后 3~ 7 d 延期行创部修复, 可以正确判断创部有活力组织, 并予以最大限度地保留; 对继发性坏死组织予以彻底清除, 减轻了创部炎症反应, 使病程缩短, 加快了创部康复进程, 同时也减轻了患者的痛苦。

(收稿日期: 2004- 10- 28 本文编辑: 王宏)