

• 基础研究 •

# 补肾活血中药含药血清对滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$ 水平的影响

李念虎

(山东中医药大学附属医院骨科, 山东 济南 250011)

**【摘要】** 目的: 探讨补肾活血中药是否可以抑制兔滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子。方法: 制作补肾活血方含药血清, 体外分离并培养兔滑膜细胞, 并鉴定、传代。实验分含空白血清对照组、含 10% 西乐葆血清组、含 5%、10%、20% 中药血清组等 5 组。以西乐葆含药血清作为对照, 将不同浓度的中西药血清加入培养传代的第 3 代滑膜细胞, 继续培养。观察药物对滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平的影响。结果: 补肾活血方含药血清具有和西乐葆含药血清类似的抑制滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的作用, 其抑制 TNF- $\alpha$  分泌的作用随药物浓度的增加作用增强。结论: 补肾活血中药可抑制滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子。

**【关键词】** 补肾; 活血; 中草药; 血清; 滑膜细胞; 细胞因子类

**Effects of serum containing *Bushen Huoxue* (补肾活血) drugs on level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  of synovocyte** LI Nian-hu *The Affiliated Hospital of Shandong TCM University, Jinan 250011, Shandong, China*

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of serum containing *Bushen Huoxue* drugs on level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in cultured rabbit synovocyte **Methods** Serum containing *Bushen Huoxue* drugs was made and rabbit synovocyte was separated and cultured and passaged in vitro Five groups were divided as blank control group, serum containing 10% Celebrex, 5%, 10% and 20% of serum containing *Bushen Huoxue* drugs respectively. Serum containing Celebrex was the control group, serum containing drugs of different concentration were added into the synovocytes within third generation, and then the synovocytes were cultured continued Observing the effect of different concentration of drugs on the level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  of the synovocytes **Results** The serum containing *Bushen Huoxue* drugs had obvious effect of depression on echylolysis of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from synovocyte cultured in vitro similar to serum containing Celebrex The higher concentration was the more effect of depression on echylolysis of TNF- $\alpha$  was while no such effect on IL-1 $\beta$  was **Conclusion:** *Bushen Huoxue* drugs have the effect of inhibiting synovocyte cell to secret of inflammatory cytokines

**Key words** Reinforcing kidney; Activating blood; Drugs Chinese herbal; Serum; Synovocyte; Cytokines

*Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(5): 302-303 www.zggszz.com*

膝骨性关节炎不仅是软骨的疾病, 也是一种累及骨、滑膜及关节周围支持结构的疾病。根据膝骨性关节炎肾虚血瘀的病理机制, 我们创立补肾活血的治疗原则, 自拟补肾活血方, 制作补肾活血方含药血清, 以西乐葆为对照, 观察其对体外培养滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 补肾活血方及西乐葆含药血清制作** 补肾活血方主要药物组成: 熟附子 10 g 熟地 20 g 巴戟天 15 g 仙茅 10 g 丹参 20 g 等, 加水常规煎煮为 300 ml (两煎相混)。西药西乐葆为西尔大药厂波多黎各分厂生产, 普强苏州制药有限公司进口分包装。生产批号: 427E; 分包装批号: 040302Q 规格: 0.2 g 剂型: 胶囊。采用雌雄各半的新西兰兔, 随机分成 3 组。A 组为中药组; B 组为西药组; C 组为空白组。所有动物均采用灌胃给药, 连续给药 1 周, 于末次给药后 1 h 采血。将血液置入无菌不加抗凝剂的试管中, 使之自然凝结。将所有试管置试管架中, 先在 37℃ 水浴 1 h, 然后 3000 r/min 离心 15 min

分离血清, 置入无菌试管中, -20℃ 冰箱冻存储备。临用时, 56℃ 恒温 30 min 灭活, 用无血清培养基稀释, 过滤除菌。

**1.2 原代滑膜细胞的分离培养与传代** 选 4 周龄健康新西兰乳兔, 切取造模兔膝关节滑膜 (约 1 cm<sup>3</sup>), 注意避免夹带脂肪, 然后用加有青链霉素的 D-Hanks 液 (无钙、镁) 浸泡 10~20 min, 反复漂洗后剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的小组织块, 放入 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内, 同时加入 2 ml 10% 胎牛血清-DMEM 培养液和 2 ml 胶原酶 (终浓度 0.4%), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化 2 h, 将未黏附细胞 (贴壁细胞为滑膜组织的巨噬细胞) 移入离心管, 离心 (1 000 r/min, 10 min), 弃上清液, 再加入 0.25% 胰蛋白酶 4 ml 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内消化 30 min, 经 200 目尼龙网过滤, 离心 (1 000 r/min, 10 min), 计数, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 弃去未黏附细胞 (如淋巴细胞、红细胞), 此时的贴壁细胞为原代滑膜细胞。用台盼蓝排斥试验检测其活力大于 95%, 光镜下计数, 并把细胞悬液稀释成 1 × 10<sup>6</sup> /ml 密度, 接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中。置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞

培养箱中培养,当倒置相差显微镜观察细胞汇合成片,铺满培养瓶壁面积超过 80% 后传代培养。Giemsa 染色鉴定其表型。

**1.3 实验分组** 共分为 5 组:①含空白血清对照组:含 10% 胎牛血清的 DMEM;②含 10% 西乐葆血清组:西乐葆含药血清,以 DMEM 培养液调节浓度至 10%;③含 5% 中药血清组:补肾活血方含药血清,以 DMEM 培养液调节浓度至 5%;④含 10% 中药血清组:补肾活血方含药血清,以 DMEM 培养液调节浓度至 10%;⑤含 20% 中药血清组:补肾活血方含药血清,以 DMEM 培养液调节浓度至 20%。

**1.4 观察项目与方法** 将培养至第 3 代的滑膜细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释成  $2 \times 10^5 / \text{ml}$  全部接种于 24 孔培养板中,每孔培养体积为 1 ml 共分为 5 组,每组设 4 个复孔。培养 24 h 细胞贴壁后,每孔加入脂多糖 (LPS) ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),并按照组别更换相应的培养液,培养 24 h 后收集各孔上清液,重复离心后,收集上清,  $-20^\circ\text{C}$  冻存待测。观察含胎牛血清与西乐葆血清、补肾活血中药血清等分别作用于滑膜细胞后的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的测量均采用放免法。

**1.5 统计学分析** 计量数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 *t* 检验,比较均数的显著性。

**2 结果**

补肾活血方含药血清对滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  水平的影响见表 1。由于 LPS 可诱导滑膜细胞分泌大量的 TNF- $\alpha$ ,故空白组中 TNF- $\alpha$  含量明显高于其他组别,与西乐葆组及中药组相比有显著性意义 ( $P < 0.01$ );20% 补肾活血方含药血清组与 10% 补肾活血方含药血清组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ );提示补肾活血方含药血清与西乐葆含药血清均对体外培养滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  具有明显的抑制作用,而且中药组随药物浓度的增高,对体外培养滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  的作用也增强,差异显著。

由于 LPS 同样可诱导滑膜细胞分泌大量的 IL-1 $\beta$ ,故空白组中 IL-1 $\beta$  含量明显高于其他组别,与西乐葆组及中药组相比差异均有显著性 ( $P < 0.05$ );提示补肾活血方含药血清与西乐葆含药血清均对体外培养滑膜细胞分泌 IL-1 $\beta$  具有

表 1 补肾活血方含药血清对滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

Tab 1 Effect of serum containing Bushen Huoxue drugs on the level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  of the synoviocytes ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

组别	鼠数	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
含空白血清对照组	4	12.32 $\pm$ 0.23	12.50 $\pm$ 6.61
含 10% 西乐葆血清组	4	1.12 $\pm$ 0.54 <sup>*</sup>	1.37 $\pm$ 0.79 <sup>*</sup>
含 5% 中药血清组	4	3.77 $\pm$ 1.92 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	2.01 $\pm$ 0.70 <sup><math>\Delta</math></sup>
含 10% 中药血清组	4	1.09 $\pm$ 0.35 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	1.17 $\pm$ 0.99 <sup><math>\Delta</math></sup>
含 20% 中药血清组	4	0.59 $\pm$ 0.14 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	1.04 $\pm$ 0.52 <sup><math>\Delta</math></sup>

注:与含空白血清对照组相比,\*  $P < 0.05$ ,<sup>\*</sup>  $P < 0.01$ ;同西乐葆组比较, <sup>$\Delta$</sup>   $P > 0.05$  与 10% 中药组比较, <sup>$\Delta$</sup>   $P < 0.05$

Note as compared with blank control group,\*  $P < 0.05$ ,<sup>\*</sup>  $P < 0.01$ ; as compared with celebrex group  <sup>$\Delta$</sup>   $P > 0.05$  as compared with 10% Bushen Huoxue group  <sup>$\Delta$</sup>   $P < 0.05$

明显的抑制作用,但中药组随药物浓度的增高,对体外培养滑膜细胞分泌 IL-1 $\beta$  的抑制作用未见显著增强,没有明显的量效关系。

**3 讨论**

**3.1 补肾活血方抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  释放而控制滑膜炎症** 在 OA 的软骨细胞、滑膜组织及关节滑液中均可检出较高水平的 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$ 。但在体外培养的正常软骨细胞和正常的滑膜组织细胞只能产生微量的 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ ,故本研究采用适当剂量和作用时间的 LPS 诱导滑膜细胞生成较多量的 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$ ,以方便研究之用<sup>[1]</sup>。我们通过以上的研究发现,补肾活血方含药血清对体外培养滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  具有明显的抑制作用,而且中药组随药物浓度的增高,对体外培养滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  的抑制作用也增强,差异显著;对体外培养滑膜细胞分泌 IL-1 $\beta$  也具有明显的抑制作用,但中药组随药物浓度的增高,对体外培养滑膜细胞分泌 IL-1 $\beta$  的抑制作用未见显著增强,没有明显的量效关系。通过对炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的抑制,补肾活血中药可以阻断此类炎症因子介导的滑膜的炎症反应,减少 PGE2 等致痛因子的释放;并可以抑制其激活对软骨细胞凋亡作用而促进软骨细胞增殖,抑制其诱导产生金属蛋白酶而中止其对软骨细胞分解破坏。

**3.2 补肾活血方抑制滑膜细胞 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  分泌的可能机制** 抗炎因子 TGF- $\beta$  是与炎性因子 IL-1 相互平衡的两类因子。TGF- $\beta$  通过抑制 IL-1 的生物活性而延缓关节软骨细胞的溶解,在体外实验中已经得到证实。实验表明,在体内、体外,TGF- $\beta$  1 抑制了 IL-1 所诱导的关节软骨破坏作用,从而抑制了 IL-1 对于基质代谢的影响<sup>[2]</sup>。体外实验证实,IL-1 促 MMPs 的合成,抑制金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMP-1) 产生,同时通过增加胞浆素原激活物 (plasminogen activator) 的分泌,抑制胞浆素原激活物抑制物的合成,促进 MMPs 的活化。而 TGF- $\beta$  则可以降低 MMPs 的含量,增加 TIMP-1 的表达。IL-1 能够抑制关节软骨 PC 的合成,而 TGF- $\beta$  可拮抗 IL-1 抑制关节软骨 PC 合成的作用。TNF- $\alpha$  通过结合细胞表面 TNF 受体发挥调节活性的作用,重组可溶性肿瘤坏死因子受体 II 融合蛋白 Etanercept 竞争性结合 TNF- $\alpha$ ,阻断 TNF- $\alpha$  和细胞表面 TNF 受体结合,降低 TNF- $\alpha$  调节活性<sup>[3]</sup>。

复方中药的组成和作用较复杂,明确其最终作用成分及作用机制十分困难。补肾活血中药是否在对抗 IL-1 $\beta$  方面机制类似于抗炎因子 TGF- $\beta$ ,在抑制 TNF- $\alpha$  方面机制类似于 TNF- $\alpha$  阻断剂 Etanercept 仍需设计相关实验研究以进一步证实。

**参考文献**

- 1 邓廉夫,柴本甫,杨庆铭. 骨关节炎滑膜细胞分泌肿瘤坏死因子的生物学特征研究. 中华骨科杂志, 1999, 19(12): 726-729.
- 2 Fernandes JC, Martel PJ, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Bioorthology, 2002, 39: 237-246.
- 3 Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2000; 343(22): 1586-1593.

(收稿日期: 2006-06-06 本文编辑: 李为农)