

## · 基础研究 ·

# 柔肝复方及单味药提取物对体外培养人骨关节炎软骨细胞增殖及关节软骨低聚基质蛋白分泌的研究

曹月龙<sup>1</sup>, 王翔<sup>1</sup>, 冯伟<sup>2</sup>, 王顺春<sup>3</sup>, 徐宇<sup>1</sup>, 詹红生<sup>1</sup>, 石印玉<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学骨伤研究所, 上海 201203; 2. 上海市伤骨科研究所; 3. 上海中医药大学中药标准化研究中心)

**【摘要】** 目的: 探讨柔肝单味药提取物金利胶囊及复方养血软坚胶囊对体外培养人骨关节炎(OA)软骨细胞增殖能力及关节软骨低聚基质蛋白(COMP)分泌的影响。方法: 分阶段酶消化法体外培养人骨关节炎软骨细胞, 以  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  密度接种 3代内细胞, 研究设正常对照组及金利胶囊与养血软坚胶囊 2个药物干预组。药物直接添加体外培养体系, 添加终浓度为  $10 \text{ mg/ml}$ 。以 MTS/PMS法观察不同药物对体外培养的软骨细胞在接种 1、3、5 d时增殖情况的影响, 采用 ELISA法检测药物对体外培养的人软骨细胞 COMP分泌的影响。结果: 与空白组相比, 金利胶囊及养血软坚胶囊未表现出明显的促进人骨关节炎软骨细胞增殖能力 ( $P > 0.05$ ), 但在各用药组内, 细胞增殖能力在 1~3 d时间段较 3~5 d时间段明显增强 ( $P > 0.05$ )。各药物组有上调人 OA软骨细胞分泌 COMP的作用, 但组间未见有明显差异 ( $P > 0.05$ )。结论: 用药干预后, 柔肝单味药提取物金利胶囊及复方养血软坚胶囊可以促进人骨关节炎软骨细胞分泌 COMP, 细胞增殖能力在 1~3 d时间段较 3~5 d时间段明显增强, 但 2组药物之间未见有明显差异。

**【关键词】** 骨关节炎; 细胞增殖; 柔肝

**In vitro study the effect of both extract and compound from Liver-softening herbs on chondrocyte proliferation and COMP expression of human osteoarthritis** CAO Yue-long\*, WANG Xiang, FENG Wei, WANG Shun-chun, XU Yu, ZHAN Hong-sheng, SHI Yin-yu\* Research Institute of Orthopaedics, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of both extract(RGL) and compound(BNHS) from Liver-softening herbs on chondrocyte proliferation and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) expression of human osteoarthritis chondrocyte cultured in vitro. **Methods:** Chondrocytes isolated by enzymatic digestion from human knee osteoarthritis cartilage were cultured within 3 generations with the density of  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ . There were one control group and two study groups treated with RGL and BNHS respectively in this study. After directly adding drugs  $10 \text{ mg/ml}$  to cultures, chondrocyte proliferation was observed at 1st, 3rd and 5th days by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay kit. COMP level from culture supernatant was tested by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Results:** Although both RGL and BNHS had no significant effects on chondrocyte proliferation as compared to the control group ( $P > 0.05$ ), cell number in 1 to 3 days interval increased much more rapidly than in 3 to 5 days interval ( $P < 0.05$ ) in each group. Compared with the control group, both extract and compound group had high COMP level, but no significant difference was demonstrated between the two groups. **Conclusion:** The finding suggests that both extract and compound from Liver-softening herbs could promote COMP expression of chondrocyte in vitro, but significant effect of stimulating cell proliferation is not yet be validated.

**Key words** Osteoarthritis; Cell proliferation; Nourishing liver

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(6): 389-390 www.zggszz.com

基金项目: 上海市重点学科(编号: T0303), 国家自然科学基金(编号: 30300459, 30472222), 教育部新世纪优秀人才计划(编号: NCET-04-0438), 上海市曙光计划(编号: 035SG1029), 上海市科委重点项目(编号: 03DZ19530), 上海市自然科学基金(编号: 04ZR14128), 上海市卫生局项目(编号: 034065)

通讯作者: 曹月龙 Tel: 021-51322440 E-mail: caoyuebng@yahoo.com

关节炎共有 100多种类型, 其中以软骨退变为主要特点的骨关节炎(OA)是最常见类型之一。中医认为本病系筋骨失养、肝肾虚衰所致, 中药多以补肾或柔肝为主。在继往研究基础上<sup>[1-2]</sup>, 本研究探讨柔肝单味药提取物及复方对体外培养软骨细胞增殖能力及关节软骨低聚基质蛋白(COMP)分泌的影响。

### 1 材料与方法

1.1 细胞取材与药品 膝骨关节炎软骨由上海瑞金医院骨科关节镜手术时患者提供,平均年龄 53岁, Kellgren/Lawrence (1957)膝骨关节炎影像学分级量化评判为 Ⅱ级。柔肝复方为养血软坚胶囊 (BNHS),由白芍、牡蛎等组成 (曙光医院院内制剂,批号:20021209)。柔肝单味药提取物为金利胶囊 (RGL),曙光医院院内制剂,批号:20020805。

1.2 软骨细胞的分离与培养 无菌条件下用尖刀片仔细分离胫骨平台、股骨髁以及髌骨关节面的软骨。切取软骨时,尽量避免切到软骨下的骨质,一般以不渗血为度。将软骨块用 D-Hanks液漂洗 3次后,切碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,置 0.25 %胰蛋白酶 37 °C 孵育,搅拌 15 min, DMEM (含 20 %小牛血清)终止消化, 120目尼龙网筛过滤,留软骨碎块,以去除可能存在的软骨膜细胞。将软骨块置 0.05 %的粗品胶原酶溶液中, 37 °C 孵育、消化,分阶段进行,每阶段 45 min,共 4阶段。120目尼龙网筛过滤,细胞悬液 1 000 rpm 离心 5 min,弃上清液。D-Hanks液悬浮细胞, 1 000 rpm 离心 5 min,进行酶液清洗,清洗后的细胞接种在 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶 (Unclon, 丹麦)中,置 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,逐日倒置显微镜观察。隔 2~3 d 换液,原代贴壁细胞生长细胞铺满后,进行传代培养或冻存备用。

#### 1.3 观察项目与方法

1.3.1 MTS/FMS法观察柔肝单味药提取物及复方对外培养人 OA 软骨细胞增殖的影响 软骨细胞分离方法同前。将传代细胞 (第 1代)接种在 96孔板中,分 RGL及 BNHS 2个药物干预组及空白对照组,每组 6孔,接种密度 1 × 10<sup>5</sup> /cm<sup>2</sup>,药物添加终浓度为 10 mg/ml,观察时间点分别为 1、3、5 d。检测日每孔加入 20 μl 的 MTS/FMS,孵育 4 h后,在酶标仪上测 OD 值, λ = 490 nm。

1.3.2 ELISA法观察柔肝单味药提取物及复方对外培养的人 OA 软骨细胞 COMP 分泌的影响 传代 OA 软骨细胞 (第 1代)以 1 × 10<sup>5</sup> /cm<sup>2</sup> 密度接种在 96孔培养板中,连续培养 3 d,药物添加终浓度为 10 mg/ml,每组 6个复孔。收集细胞上清,混合冻存备用。

COMP Kit试剂盒购自 W ielisa-kit公司,标准品和样品均加 60 μl 于准备的培养板中,添加 COMP 一抗,置振荡器中孵浴 5 min, 4 °C 过夜,自准备的培养板中每孔取 100 μl 至抗原包被板中,室温孵育 60 min,彻底冲洗 3次并以吸水纸吸干。加入 100 μl 联接液底物,室温孵育 60 min,彻底冲洗 3次并以吸水纸吸干,室温下加入 100 μl PNPP液。室温孵育 60 min, 30 min 内完成光密度测定, λ = 405 nm<sup>[3]</sup>。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 11.0 软件进行数据分析,采用重复测量方法对不同组不同观察时间的结果进行检验,同时间点不同组间采用方差分析 (ANOVA)。

### 2 结果

2.1 药物对外培养人 OA 软骨细胞增殖的影响 见表 1。重复测量的方差分析,时间作为干预因素的组间比较,显示各组间无统计学差异, P = 0.696,说明各组药物在促进 OA 软骨细胞增殖能力方面无显著差异。同组内不同时间点相比,随观察时间推移,表现一定促增殖能力,且在培养的 1~3 d 较 3

~5 d 更为明显。

表 1 药物对外培养人骨性关节炎软骨细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 1 The effect of drugs on chondrocyte proliferation of human osteoarthritis in vitro ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	不同时间点的 OD 值		
	1 d	3 d	5 d
正常组	1.43 ± 0.03	1.69 ± 0.05	1.79 ± 0.27
养血软坚胶囊组	1.46 ± 0.07	1.68 ± 0.03	1.86 ± 0.11
金利胶囊组	1.46 ± 0.07	1.74 ± 0.05	1.75 ± 0.07

#### 2.2 药物对外培养的 OA 软骨细胞 COMP 分泌的影响

正常组软骨细胞 COMP 表达为 (5.46 ± 2.97) ng/ml (95% CI = 3.57, 7.36)。BNHS 干预组 COMP 表达为 (9.67 ± 2.02) ng/ml (95% CI = 8.38, 10.96),与正常组比较 P = 0.001。RGL 干预组 COMP 表达为 (7.69 ± 2.18) ng/ml (95% CI = 6.61, 8.78),与正常组比较, P = 0.042。统计结果显示,在蛋白表达层面,各中药组有上调人 OA 软骨细胞分泌 COMP 的作用,但中药组间未见有明显差异。

### 3 讨论

体外培养软骨细胞,必须通过控制软骨细胞的传代代数来保持软骨细胞的功能和表现型,文献报道软骨细胞代数一般控制在 1~3 代<sup>[4]</sup>。本研究采用了药物直接添加培养体系的方法。

本研究采用 MTS/FMS 法检测细胞增殖能力,具有特异性强、灵敏度高以及快速、准确、重复性好的特点。由于 MTS/FMS 经活细胞转化后没有结晶形式,直接溶于水,不需使用有机溶剂,因而也不会因为溶解的不彻底而影响检测结果<sup>[5]</sup>。

COMP 的高水平表达作为一种关节软骨早期退变的较为灵敏的标志物,正越来越多地受到关注和研究。虽然由基质游移于体液内的 COMP 可能是病情的标志物,然而这种细胞分泌于基质中的 COMP 究竟起到怎样的生理或病理性作用尚待在今后研究中进一步阐明。

#### 参考文献

- 曹月龙,史万忠,石印玉,等.养血软坚胶囊抗炎镇痛作用的实验研究.上海中医药大学学报,2004,18(1):49-51.
- Cao YL, Shi YY, Lo SK, et al Blood-nourishing and hard-softening capsule costs less in the management of osteoarthritic knee pain: a randomized controlled trial Evid Based Complement Alternat Med, 2005, 2(3):363-368.
- Piscocya JL, Femor B, Kraus VB, et al The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis-related biomarkers in articular cartilage explants Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(12):1092-1099.
- 詹红生,赵咏芳,冯伟.含药血清方法在中药调节骨与软骨代谢基础研究中的应用.中国骨伤,2000,13(11):661-662.
- Einheim HU, Bundgaard C, Nielsen HM. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. Toxicol In Vitro, 2004, 18(5):649-657.

(收稿日期:2006-07-20 本文编辑:李为农)