·基础研究·

不同浓度骨痹舒片含药血清对体外培养软骨细胞增殖的影响

秦梦[1], 王和鸣[1], 娄玉钤[2]
(1.福建中医药大学, 福建　福州　350108; 2.河南风湿病医院)

【摘要】 **目的**: 观察不同浓度骨痹舒片含药血清对体外培养的兔关节软骨细胞增殖的影响。**方法**: 获取 1 月龄兔关节软骨细胞, 随机分为空白组(正常兔血清)及骨痹舒片含药血清组, 每组再分 5%、10%、15%、20% 4 个浓度, 共 8 组。分别于培养第 1、3、5、7、9 天用 MTT 法检测软骨细胞的增殖情况。**结果**: 骨痹舒片含药血清组细胞呈血清浓度依赖型增殖。同一时间点各组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 以 20%组最佳; 空白血清组中 5%、10%组与 20%组相比在各时间点差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 15%组与 20%组相比在第 1、3、5、7 天各时间点相比差异无统计学意义($P>0.05$), 在第 9 天时差异有统计学意义($P<0.05$), 以 20%组最佳。20%骨痹舒片含药血清组与 20%空白血清组相比, 在第 1、3、5、7 天时差异有统计学意义($P<0.05$), 第 9 天差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**: 20%的骨痹舒片含药血清能显著促进软骨细胞的增殖, 并将细胞的指数增长期提前至第 3 天。

【关键词】 软骨细胞; 细胞, 培养的; 中草药; 细胞增殖
DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.10.012

Effects of different concentrations of *Gubishu* containing serum on the proliferation of rabbit articular chondrocytes in vitro culture　*QIN Meng, WANG He-ming*, LOU Yu-qian. *Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou* 350108, *Fujian, China*

ABSTRACT　**Objective**: To investigate the effects of different concentrations of *Gubishu* containing serum on the proliferation of rabbit articular chondrocytes cultured in vitro. **Methods**: Articular chondrocytes were obtained from the cartilage of 1-month rabbit and cultured in vitro. They were randomly divided into 8 groups, blank and *Gubishu* groups in different concentrations(5%, 10%, 15%, 20%), MTT assay method was adopted to observe the influence of *Gubishu* containing serum with different concentrations to the proliferation of chondrocytes after incubated 1, 3, 5, 7 and 9 days. **Results**: The proliferation of chondrocytes was dependent on the concentration in *Gubishu* groups. At same time point, there was significant value between every groups, 20% concentration was greatest($P<0.05$); There was significant differences between 5%, 10% and 20% concentration of the blank groups at same time point ($P<0.05$), and was not between 15% and 20% concentration at the 1, 3, 5 and 7 days ($P>0.05$), 20% concentration of the blank group was greatest. 20% concentrations of *Gubishu* containing serum was significantly greater than 20% concentrations of blank group at the 1, 3, 5 and 7 days ($P<0.05$). **Conclusion**: 20% concentrations of *Gubishu* containing serum can significantly increase the proliferation of chondrocytes, and bring the logarithmic growth period forward to the 3 day.

KEYWORDS　Chondrocytes; Cells, cultured; Drugs, Chinese herbal; Cell proliferation
Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(10): 841-844　www.zggszz.com

骨痹舒片是具有补肾壮骨蠲痹、活血通络作用的中成药, 临床用于治疗骨性关节炎。前期的研究工作发现, 骨痹舒片对实验性膝关节骨关节炎大鼠的关节软骨有保护作用, 可延缓关节软骨的退变[1]。为了深入探讨骨痹舒片的作用机制, 我们期望观察不同浓度骨痹舒片含药血清在不同时间点对体外培养的兔关节软骨细胞增殖的影响, 并确定培养体系中添加骨痹舒片含药血清的最佳浓度与时间, 为后续的研究提供参考依据。

通讯作者: 王和鸣　E-mail: fjzyydxgs@163.com

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器　Gibico F12 培养基, 0.25%胰蛋白酶及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), Sigma Ⅱ型胶原酶, 武汉博士德 SABC-AP 免疫组织化学试剂盒, 北京博奥森兔抗兔Ⅱ型胶原抗体, Amresco 四甲基偶氮唑盐(methy thiazolyl tetrazolium, MTT), 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)。HERAcell 细胞培养箱, Labconco 生物安全柜, Olympus 倒置式研究型显微镜, BIO-Tek 酶标仪。

1.2　药物与实验动物　骨痹舒片由河南风湿病医院提供, 每片 0.3 g(豫药制字: Z04010009)。新西兰

大白兔由上海中医药大学实验动物中心提供(XS 许可证号:SCXK 沪 2004-2007)。

1.3 含药血清的制备　成年新西兰大白兔 8 只,雌雄各半,体重 2.5 kg 左右。随机分成 2 组:正常组与骨痹舒片组,每组 4 只。依据临床常用量按实验动物与人体表面积折算的等效剂量比值换算[2],将骨痹舒片用生理盐水加热溶解,制成水溶液。正常组予生理盐水 2 ml/kg 灌胃,骨痹舒片组予骨痹舒片水溶液 0.56 g·2 ml^{-1}·kg^{-1} 灌胃,每日 2 次,连续 7 d。末次给药后 3 h 心脏采血 30 ml[3],静置后 3 000 rpm 离心 30 min,收集血清,56 ℃恒温水浴灭活 30 min,-20 ℃冰箱保存,临用时过滤除菌。

1.4 软骨细胞的获取及体外培养　1 月龄新西兰大白兔 1 只,体重 1.5 kg。耳缘静脉注射空气致死后立即在无菌条件下切取股骨头、髁和胫骨平台关节软骨。用含双抗(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)[4]的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次后,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,用 0.25%胰蛋白酶于 37 ℃恒温摇床内振荡消化 30 min,弃胰蛋白酶后用 0.2%胶原酶于 37 ℃消化,8 h 及过夜后各收集 1 次消化产物。每次收集的消化产物 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入含 15%FBS 的 F12 培养液,以 2×10^5 个/cm^2 的密度将细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中,置入 37 ℃,5%CO_2 饱和湿度细胞培养箱中培养,每 3 d 进行换液 1 次。待贴壁细胞融合成片铺满培养瓶底 80%~90%后消化传代。以Ⅰ代软骨细胞用于实验。

1.5 实验分组方法　实验分为 5%、10%、15%、20%不同体积分数的空白血清组(正常兔血清)与骨痹舒片含药血清组,共 8 组。空白血清组 4 组,分别为 5%空白血清+ F12 培养基,10%空白血清+ F12 培养基,15%空白血清+ F12 培养基,20%空白血清+ F12 培养基;骨痹舒片含药血清组 4 组,分别为 5%骨痹舒片含药血清+ F12 培养基,10%骨痹舒片含药血清+ F12 培养基,15%骨痹舒片含药血清+ F12 培养基,20%骨痹舒片含药血清+ F12 培养基。

1.6 观测指标与方法

1.6.1 软骨细胞的观察及鉴定　每日于倒置显微镜下观察细胞贴壁情况、细胞形态及增殖情况。取离心收集的原代及Ⅰ代软骨细胞悬液,用含 15%FBS 的 F12 培养液稀释成 2×10^4/ml,加入置有无菌盖玻片的 6 孔培养板中,每孔 2 ml,每组 2 孔。将 6 孔培养板置于细胞培养箱中,每 2~3 d 换液 1 次,待细胞铺满盖玻片 80%后,采用 SABC-AP 免疫组织化学染色试剂盒对培养的软骨细胞进行Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色。

1.6.2 软骨细胞增殖的测定(MTT 法)　取Ⅰ代软骨细胞,以含 15%FBS 的 F12 培养液稀释为 2×10^4/ml,分别接种于 5 块 96 孔培养板,每孔 100 μl,每组 6 个复孔,每板设 6 个调零孔,将培养板置入 37 ℃,5%CO_2 饱和湿度细胞培养箱内培养。待细胞贴壁后,吸弃含 FBS 的培养液,每孔加入 200 μl 的 F12 培养基,将细胞同步 24 h,以洗清牛血清对细胞的影响,并使所有细胞均处于 G0 期[5]。之后按照组别分别加入相应的培养液,并每 3 d 换液 1 次。分别在培养后第 1、3、5、7、9 天检测 1 块培养板。检测时各孔内加入 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μl,在 37 ℃,5%CO_2 饱和湿度细胞培养箱内继续培养 4 h,然后吸弃培养液,每孔加入 150 μl DMSO,室温下将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶联免疫检测仪 490 nm 处检测各孔吸光度值(A 值),此实验重复 2 次。

1.7 统计学处理　用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用一个重复测量的多元方差分析来评价各组之间及各时间点的变化,组间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的形态及生长特点　刚分离的软骨细胞呈球形,具折光性,24 h 后细胞即开始贴壁,呈三角形、纺锥形,随着细胞的分裂生长,细胞间开始相连成片,有的相互聚集,形成集落现象,8 d 左右,可铺满瓶底,呈铺路石样改变(见图 1-3)。Ⅰ代细胞贴壁时间较原代细胞短,约 6 h 即开始贴壁,其增殖速度快,5 d 后软骨细胞即可铺满瓶底。随着传代次数的增加,细胞形态向长梭形转变。

2.2 软骨细胞的鉴定　软骨细胞Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色可见细胞胞浆呈棕黄色,染色阳性,提示有Ⅱ型胶原的表达;原代较Ⅰ代细胞浓染;阴性对照组(PBS 代替一抗)细胞胞浆呈淡红色,染色阴性(图 4-6)。提示本实验所培养的细胞为软骨细胞。

2.3 不同浓度空白血清及骨痹舒片含药血清对软骨细胞增殖的影响　结果见表 1。各时间点、不同浓度组及各时间点和不同浓度组的交互作用均有统计学意义,说明软骨细胞的增殖随时间的变化及血清浓度的不同而不同。在空白血清各组中,5%组、10%组与 20%组相比在第 1、3、5、7、9 天各时间点均有差异,15%组与 20%组相比在第 1、3、5、7 天各时间点无明显差异,在第 9 天时有差异。15%与 20%的空白血清均能在软骨细胞对数生长期的 5~7 d 显著促进细胞的增殖。结果提示 20%组优于其他各组,为空白血清组的最佳浓度。

在骨痹舒片含药血清组中,软骨细胞呈血清浓度依赖型增殖。在 1、3、5、7、9 d 各时间点,5%、10%、

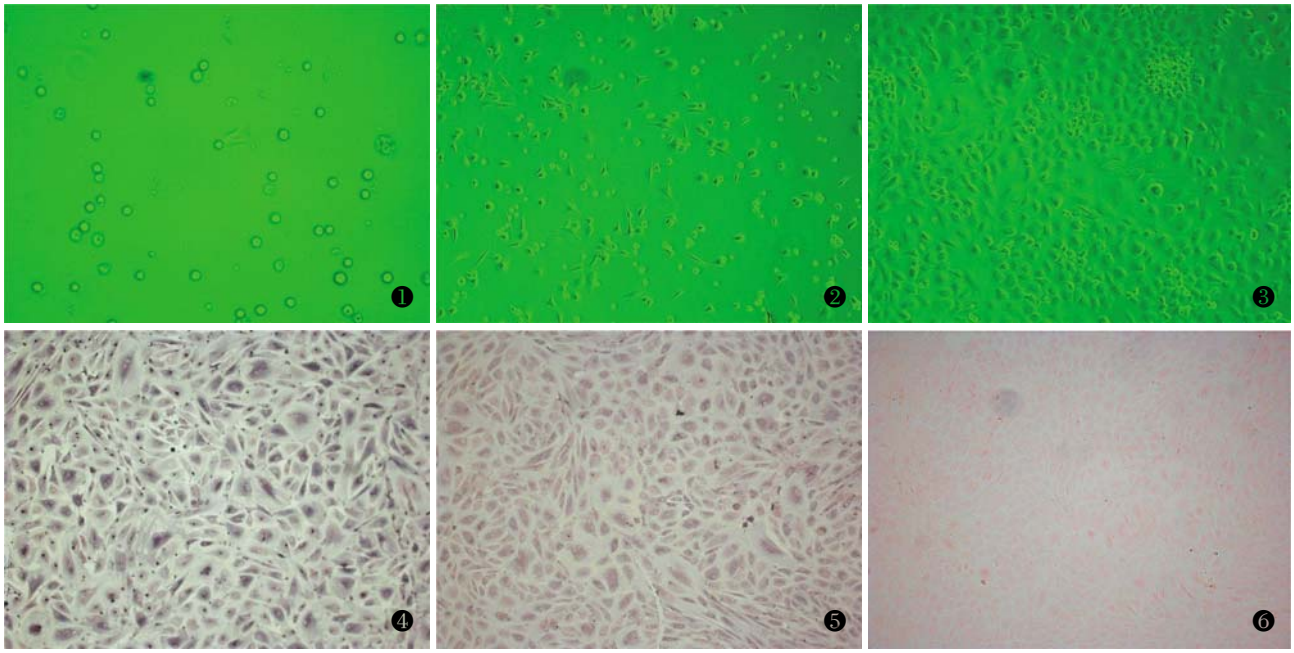

图 1　原代软骨细胞获取后 4 h(×200)　**图 2**　原代软骨细胞培养 24 h(×100)　**图 3**　原代软骨细胞培养第 7 天(×100)　**图 4**　原代软骨细胞Ⅱ型胶原染色(×100)　**图 5**　Ⅰ代软骨细胞Ⅱ型胶原染色(×100)　**图 6**　原代软骨细胞Ⅱ型胶原染色阴性对照组(×100)

Fig.1　Chondrocytes were harvested 4 hours later at passage 0 (×200)　**Fig.2**　Chondrocytes were incubated for 24 hours at passage 0 (×100)　**Fig.3**　Chondrocytes were incubated for 7days at passage 0 (×100)　**Fig.4**　Immunocytochemistry for collagen type Ⅱ expression at passage 0 (×100)　**Fig.5**　Immunocytochemistry for collagen type Ⅱ expression at passage Ⅰ (×100)　**Fig.6**　Immunocytochemistry for collagen type Ⅱ expression at passage 0, negative control(×100)

表 1　不同浓度空白血清及骨痹舒片含药血清对软骨细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab.1　Effects of different concentrations of blank groups and *Gubishu* containing serum on the proliferation of chondrocytes

($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	吸光度值(A 值)				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
5% 空白组	0.07±0.002	0.30±0.038	0.67±0.114	0.88±0.039	0.99±0.053
10%空白组	0.07±0.012	0.40±0.032	0.64±0.089	0.81±0.062	0.94±0.031
15%空白组	0.03±0.003	0.08±0.019	0.83±0.054	1.44±0.090	1.24±0.027
20%空白组	0.03±0.003	0.07±0.010	0.84±0.080	1.48±0.046	1.43±0.065
5%骨痹舒片组	0.06±0.007	0.31±0.030	0.34±0.038	0.56±0.020	0.47±0.019
10%骨痹舒片组	0.06±0.004	0.48±0.064	0.56±0.071	0.71±0.054	0.68±0.041
15%骨痹舒片组	0.07±0.003	0.53±0.047	0.99±0.067	1.28±0.168	1.10±0.038
20%骨痹舒片组	0.08±0.007	0.79±0.031	1.22±0.121	1.60±0.085	1.38±0.236
5%、10%空白组与 20%空白组比较 P 值	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000
15%空白组与 20%空白组比较 P 值	0.526	0.497	0.867	0.286	0.000
5%、10%骨痹舒片组与 20%骨痹舒片组比较 P 值	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000	均为 0.000
15%骨痹舒片组与 20%骨痹舒片组比较 P 值	0.005	0.000	0.000	0.000	0.001
20%空白组与 20%骨痹舒片组比较 P 值	0.000	0.000	0.000	0.011	0.584

15%与 20%组相比较均有差异。20%骨痹舒片含药血清组在软骨细胞生长周期中均能显著促进细胞的增殖。结果提示 20%组优于其他各组,为骨痹舒片含药血清组的最佳浓度。

20%骨痹舒片含药血清组与 20%空白血清组相比，在 1、3、5、7 d 时均有差异，第 9 天时无明显差异。20%骨痹舒片含药血清组细胞在第 1、2 天时处于潜伏期,第 3 天即进入指数增长期,第 7 天开始平台期,自第 8 天开始呈生长抑制。结果提示排除了兔血清自身的影响,20%骨痹舒片含药血清能显著促进细胞的增殖,并且缩短了软骨细胞的潜伏期,使指数增长期明显提前。

3　讨论

3.1　中药含药血清的应用　中药含药血清药理研

究方法是中药及其复方研究较为理想的体外实验方法,虽在规范性、严谨性方面尚有一些争论,但已就动物选择、给药方法、采血时间、采血部位、血清处置等进行了较为系统的研究,从而使中药含药血清药理研究方法渐趋规范,使应用者"有法可依",并显示出较为广阔的应用前景[6]。

近年来有关中药含药血清对体外培养软骨细胞的影响已有较多研究[7-8],大部分研究者选用 10%或 20%体积分数的中药含药血清,然而多少体积分数的含药血清为实验的最佳浓度,何时为实验观察的最佳时间点,对时效与量效的探讨尚鲜见报道。因此,本实验设定 5 个时间点,4 个药物梯度浓度,通过 MTT 法检测软骨细胞的增殖情况,探讨骨痹舒片含药血清的最佳浓度和最佳实验观察时间。实验结果显示,在 4 个浓度中,20%的骨痹舒片含药血清为促进软骨细胞增殖的最佳浓度,并提前细胞的指数增长期至第 3 天,因此,细胞活力最佳的第 3~5 天可作为实验观察点。

3.2　骨痹舒片对软骨细胞增殖的影响　骨性关节炎属于中医"痹证""痿证"范畴。肾主骨,肝主筋,骨性关节炎发病之根源在于肝肾亏虚,无以主骨养筋,筋骨失荣痿弱,关节屈伸不利,筋脉痹阻,发为骨痹。骨痹舒片由桑寄生、骨碎补、制首乌、田三七、络石藤、制马钱子组成,具有补肾壮骨蠲痹、活血止痛的作用。将本方应用于骨性关节炎,主要针对其肝肾亏虚的病理本质而言。方中桑寄生补肾补血,肾得补则筋骨有力,不致痿痹而酸痛;骨碎补补肾强骨;制首乌补益精血,强筋骨;田三七活血养血,祛瘀定痛;络石藤祛风通络;制马钱子止痛散血消肿,与首乌合用,既扶正祛邪,又可制约其毒性。诸药合用,正切中了骨关节炎肝肾俱虚的病机之本,达到益肝肾、强筋骨,扶正祛邪的作用,使组方骨痹舒片临床用药得心应手,无失法度。

骨性关节炎是在力学、生物学因素的共同作用下,软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨三者间分解和合成代谢失衡的结果。软骨细胞是成熟软骨中惟一的细胞,既负责清除坏死退变的基质,又不断合成新的基质,保持关节软骨合成、降解以及修复的平衡,维持其正常功能。因此,软骨细胞在骨性关节炎中起着极其重要的作用。本实验结果发现骨痹舒片能有效促进软骨细胞的增殖,这提示补肾活血类中药可能是通过直接促进软骨细胞的增殖,因增加了软骨细胞的数量,进而间接提高了软骨基质成分的合成,从而延缓了关节软骨的退变,改善了骨关节炎患者的症状。这可能是骨痹舒片治疗骨关节炎的一个作用途径。因此,后续的实验将通过观察骨痹舒片对软骨细胞合成基质等相关功能的影响,更深入的探讨骨痹舒片的作用机制。

参考文献

[1] 秦梦,王和鸣,娄玉钤. 骨痹舒片对实验性膝骨关节炎病理形态及自由基的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(3):1-3.
Qin M, Wang HM, Lou YQ. Effect of Gubishu tablet on pathomorphology and free radical of experimental knee osteoarthritis [J]. Zhuongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2011, 19 (3): 1-3. Chinese.

[2] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:202-205.
Xu SY, Bian RL, Chen X. Experimental Methodology of Pharmacology[M]. 3rd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 202-205. Chinese.

[3] 詹红生,赵咏芳,冯伟,等. 含药血清方法在中药调节骨与代谢基础研究中的应用[J]. 中国骨伤,2000,13(11):661-662.
Zhan HS, Zhao YF, Feng W, et al. Study of the effects of Chinese herbs on metabolism of bone and cartilage using herbal serum [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2000, 13 (11): 661-662. Chinese with abstract in English.

[4] Calamia V, Ruiz-Romero C, Rocha B, et al. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12: R138.

[5] 何丽洁,王汉民,杨桂涛,等. 人肾小管上皮细胞血清饥饿法同步化方法的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(3):275-285.
He LJ, Wang HM, Yang GT, et al. Study of the synchronization method of serum starvation on human renal tubular epithelial cells [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2007, 23(3): 275-285. Chinese.

[6] 阴　宏,李兰芳,金亚宏,等.中药含药血清药理与整体药效相关性的初步观察[J].中国中医药信息杂志,1999,6(10):35-37.
Yin CH, Li LF, Jin YH, et al. To observe the relativity of pharmacology and overall pharmacodynamic effects of Chinese herbs medicated serum[J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi, 1999, 6(10): 35-37. Chinese.

[7] 胡文兴,周小莉,李荣亨. 复元胶囊含药血清对软骨细胞增殖与合成代谢的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(4):275-277.
Hu WX, Zhou XL, Li RH. Effect of drug-contained serum of fuyuan capsule on proliferation and synthesis of chondrocytes[J]. Zhongguo Zhong Yi Ji Chu Yi Xue Za Zhi, 2008, 14(4): 275-277. Chinese.

[8] 宋永周,刘会玲,崔慧先,等. 抗骨增生胶囊含药血清对软骨细胞增殖凋亡及基质金属蛋白酶分泌的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(24):4642-4646.
Song YZ, Liu HL, Cui HX, et al. Seropharmacological effects of Kanggu Zengsheng capsules on the proliferation, apoptosis and matrix metalloproteinase secretion of chondrocytes in vitro[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2008, 12 (24): 4642-4646. Chinese.

(收稿日期:2011-04-11　本文编辑:连智华)