

通痹散对体外培养的强直性脊柱炎患者成纤维细胞成骨作用的研究

王萧枫¹, 高根德², 程春葵³

(1. 温州市中西医结合医院骨科, 浙江 温州 325000, 2. 浙江中医药大学, 3. 中国人民解放军武装警察部队杭州一支队门诊部)

【摘要】 目的: 观察通痹散对体外培养的强直性脊柱炎(AS)人成纤维细胞成骨的药理作用。方法: 采用 2例 AS患者的髌关节囊, 体外培养 AS成纤维细胞, 以中药血清药理学方法制备不同浓度的通痹散含药大鼠血清, 分别通过 MTT法、羟脯氨酸(HYP)比色法、¹²⁵I标记放射免疫(RIA)法测定其对 AS成纤维细胞的增殖、分泌胶原和骨钙素的影响。结果: 不同浓度的通痹散含药大鼠血清对 AS成纤维细胞的增殖、分泌胶原和骨钙素均有抑制作用($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。结论: 通痹散对 AS成纤维细胞的成骨潜能有明显的抑制作用。

【关键词】 脊柱炎, 强直性; 成纤维细胞; 中药疗法

Effect of Tongbi powder(通痹散) on osteogenesis of cultured fibroblasts obtained from patients with ankylosing spondylitis WANG Xiaofeng^{*}, GAO Gen-de, CHENG Chun-kui^{*} Department of Orthopaedic, the Integration Hospital of Traditional and Western Medicine of Wenzhou, Wenzhou 325000 Zhejiang, China

ABSTRACT Objective To study pharmacological actions of Tongbi powder(通痹散) on osteogenesis of cultured fibroblasts obtained from patients with ankylosing spondylitis(AS). **Methods** Fibrous tissues were obtained from capsula articularis coxae of AS patients after replacement of total hip and fibroblasts were cultured in vitro. The drug-containing serum of the rats treated with different doses of Tongbi powder(通痹散) was prepared by using serum pharmacological method of Chinese herbs. MTT assay, HYP determination and ¹²⁵I radioimmunoassay methods were adopted to study effects of Tongbi powder(通痹散) on proliferation capacity, synthesis of collagen and osteocalcin (OCN) of the third generation of AS fibroblasts cultured in vitro. **Results** Three different doses of drug-containing serum greatly inhibited the proliferation capacity and the synthesis of both collagen and OCN of AS fibroblasts ($P < 0.05$), and the inhibition was in a dose-dependent manner. **Conclusion** Tongbi powder(通痹散) could inhibit the osteogenic ability of AS fibroblasts.

Key words Spondylitis ankylosing; Fibroblasts; Treatment with Chinese herbs

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)患者随着病变的进展, 脊柱韧带、纤维环、椎间盘、髌关节囊有较显著的骨化倾向, 最终往往导致关节纤维骨性强直。我们的实验发现体外培养的 AS患者的棘上棘间韧带成纤维细胞较腰椎间盘突出患者的同名细胞有更强烈的增殖与成骨能力, 从而认识到成纤维细胞在 AS脊柱韧带骨化中的重要作用^[1]。通痹散是我们临床治疗 AS的特定制剂, 本实验旨在观察通痹散对体外培养的 AS成纤维细胞的影响。

1 材料与方

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养粉(Gibco), 超级小牛血清(杭州四季青生物工程研究所), 胰蛋白酶, MTT(Sigma), 羟

脯氨酸标准粉(华美生物工程公司), 骨钙素试剂盒(中国原子能科研院所)。

1.2 药物 通痹散药材由浙江中医药大学中药库提供, 主要由生黄芪、露蜂房、白芥子、海藻、昆布、冬虫夏草、血竭、青风藤等组成, 常规提取 3种浓度的水煎液 500 ml 含药浓度分别为 1、2、4 g/ml。

1.3 动物及含药血清制备 将浙江省实验动物中心提供的清洁级 SD 雄性成年大鼠 24 只, 体重(300 ± 10) g 随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别灌胃上述 3 种浓度药液及蒸馏水, 作为低、中、高 3 个剂量组和空白对照组, 每日 2 次, 每次 4 ml 连灌 7 d 于第 8 天末次灌胃后 1 h 始, 无菌条件下颈静脉采血, 静置 1 h 后离心(2 000 rpm, 15 min)分离血清, 同一组大鼠血清相混合, -20℃ 保存备用。

1.4 细胞组织来源 材料均取自浙江省中医院骨伤科 2 例

基金项目: 中国人民解放军武警总部课题(编号: WKH2001038 10-1)

通讯作者: 王萧枫 Tel: 0577-88931789 E-mail: wwxkf@yahoo.com.cn

AS患者全髌置换术中切下的髌关节囊, 年龄分别为 34-42岁, 均为男性。无菌手术中, 用锐刀切除患者髌关节囊组织 2 cm × 1 cm 2~3块, 立即置于 D-Hanks液中, 转入细胞培养室。

1.5 成纤维细胞的体外培养 将髌关节囊组织块彻底剔除滑膜, 经 D-Hanks液反复漂洗后, 采用组织块培养法, 详见我们已建立的方法^[1]。

1.6 实验项目与方法

1.6.1 细胞增殖抑制率的测定 采用改良 MTT 比色法: 将第 3代 AS成纤维细胞分别以每孔 1×10^4 细胞数接种于 96孔培养板中, 每孔体积 200 μ l 37℃培养 24 h后吸弃培养液, 换成无血清的 RPM I 1640液继续孵育 24 h使已贴壁的细胞同步进入 G0期, 再吸弃上清后加含 10%低、中、高剂量组含药大鼠及对照大鼠血清的 RPM I 1640培养液, 每种设 6个复孔, 每孔加 200 μ l, 继续培养 72 h后, 小心吸去各孔上清液(另作测细胞胶原用), 加入无血清的 RPM I 1640液 180 μ l和 5 mg/ml的 MTT液 20 μ l继续孵育 4 h, 吸弃上清后, 每孔加二甲亚砜(DMSO) 150 μ l振荡 10 min在酶联检测仪(DG 3200型, 南京电子仪器厂)上测 570 nm波长的各孔光吸引值(OD)。本实验重复 3次, 采用 t检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。增殖抑制率 = (1 - 药物组 OD值 / 对照组 OD值) × 100%。

1.6.2 细胞排泌胶原的测定 羟脯氨酸(HYP)比色法^[2]: 将上实验中各组分别取 4孔的上清液 50 μ l在 100℃烤箱内烘干, 加入 4 mmol/L的 NaOH 200 μ l沸水浴中裂解胶原蛋白 30 min依次加 0.05 mmol/L氯胺 T摇匀, 于室温下放置 20 min加高氯酸 1 ml摇匀, 放置 5 min加 10%对二甲氨基苯甲醛 1 ml充分摇匀, 于 60℃水浴中放置 20 min冷却后, 在紫外分光光度仪(美国产 SPECTRONIC)测吸光度值, 再配制不同浓度的羟脯氨酸标准液, 同法测得 560 nm处吸光度值, 绘制标准曲线, 查阅曲线即可得出细胞上清液中羟脯氨酸含量。样品中胶原浓度(μ g/ml培养基) = 样品中羟脯氨酸浓度 × 7.46(7.46是羟脯氨酸换算成胶原时的计算常数)。

1.6.3 骨钙素(OCN)的测定 取第 3代成纤维细胞计数后, 用含 10%小牛血清的 RPM I 1640液以每毫升 1×10^5 细胞接种于 12孔板, 每孔 1 ml 3d后吸弃原培养液, 换成各组 10%含药及对照大鼠血清的 RPM I 1640液, 每种各 4个复孔。于培养第 6、9天取各孔上清 100 μ l检测 OCN含量, 采用 OCN试剂盒,¹²⁵I放射免疫法(RIA)。智能放免 γ 测量仪(SN-695型, 上海原子核研究所日环仪器一厂)直接测样品 OCN含量。测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t检验。并计算对骨钙素的抑制率。骨钙素抑制率 = (1 - 药物组骨钙素量 / 对照组骨钙素量) × 100%。

1.7 统计学处理 实验数据输入计算机, 利用 SPSS 9.0统计软件进行处理。组间比较用方差分析和 q检验。

2 结果

2.1 含药血清对 AS成纤维细胞增殖的影响 通痹散含药血清对体外培养的 AS成纤维细胞增殖有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性, 详见表 1。

表 1 各组药物血清对 AS成纤维细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Inhibitory effects of drug containing serum on proliferation of AS fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AS成纤维细胞	
		吸光 OD值	抑制率(%)
低剂量组	6	0.211 ± 0.07*	16.94
中剂量组	6	0.187 ± 0.07**	25.50
高剂量组	6	0.154 ± 0.08**	41.27
对照组	6	0.251 ± 0.05	—

注: 与空白对照组相比较, * P < 0.05 ** P < 0.01 下同

Note: As compared with control group, * P < 0.05 ** P < 0.01, follows the same

2.2 含药血清对 AS成纤维细胞细胞外胶原合成的影响 不同浓度的通痹散含药血清对 AS成纤维细胞合成细胞外胶原都有抑制作用, 并有剂量依赖倾向, 详见表 2。

表 2 各组血清对成纤维细胞上清液胶原生成的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of drug-containing serum s on the production of collagen in supernate of fibroblasts($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AS成纤维细胞	
		胶原浓度(μ g/ml)	抑制率(%)
低剂量组	4	398.46 ± 29.34*	19.09
中剂量组	4	349.63 ± 27.64**	28.96
高剂量组	4	285.72 ± 67.28**	47.81
对照组	4	492.13 ± 83.25	—

2.3 含药血清对 AS成纤维细胞 OCN分泌的影响 测定显示不同浓度的通痹散含药血清对 AS成纤维细胞的 OCN分泌有明显抑制作用, 详见表 3。

表 3 各组血清对 AS成纤维细胞 OCN分泌量排泌的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of drug serum s on osteocalcin synthesis of AS fibroblasts($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨钙素含量 (ng/ml)	
		第 6天	第 9天
		低剂量组	4
中剂量组	4	1.98 ± 0.27*	2.55 ± 0.28**
高剂量组	4	1.57 ± 0.25**	2.13 ± 0.17**
对照组	4	2.63 ± 0.23	3.38 ± 0.34

3 讨论

AS的最明显和最终的病理改变是脊柱韧带、椎间盘等软组织渐进性骨化为“竹节椎”。对手术中切取的 AS髌关节囊、棘上棘间韧带进行超微结构研究, 扫描电镜与 X线能谱仪上显示韧带的胶原纤维排列紊乱, 其间有钙颗粒沉积, 从而了解到 AS韧带和关节中的骨化是由钙颗粒沉积在胶原纤维之间逐渐形成的^[3]。

OCN是成骨细胞的特征性表达产物, 已发现 AS成纤维细胞能合成胶原、AKR 钙颗粒^[1], 本次实验又表明其能分泌 OCN, 这进一步证实了 AS成纤维细胞成骨潜能。有理由认为成纤维细胞极可能是 AS患者脊柱韧带等组织骨化的靶细

胞^[4], 因此把治疗 AS 的控制环节放在抑制 AS 成纤维细胞过度增殖、分泌骨基质上, 以达到抗骨化的目的, 从而阻断 AS 的病情发展是非常必要的。

通痹散是根据扶正化痰、软坚散结的治则而设立的, 作为协定制剂在临床上应用已取得良好的疗效。通痹散含药血清对体外培养的 AS 成纤维细胞的增殖、分泌胶原和骨钙素有抑制作用, 并呈剂量依赖性, 可能是其临床上取得良好疗效的重要药理机制之一。

参考文献

- 1 高根德, 刘耀升. 强直性脊柱炎棘上棘间韧带成纤维细胞在体外培养中的成骨作用. 中华风湿病学杂志, 1998, 2(4): 196-199.
- 2 王强, 鲁开化, 杨力, 等. 透明质酸刺激因子对成纤维细胞活性功能和胶原合成的影响. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15(2): 89-91.
- 3 高根德, 刘耀升, 童培建, 等. 强直性脊柱炎棘上棘间韧带的扫描电镜与成纤维细胞培养研究. 中国中医骨伤科杂志, 2001, 14(6): 338-340.
- 4 王萧枫, 高根德. 强直性脊柱炎成纤维细胞分泌骨钙素的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2002, 9(4): 367-369.

(收稿日期: 2006-06-20 本文编辑: 李为农)

• 技术与方法 •

自制弹性钢套治疗闭合性指骨骨折

赵福林

(建水县中医院, 云南 建水 654300)

2000年 1月 - 2005年 2月, 采用自制弹性钢套治疗闭合性指骨骨折 72例, 取得满意疗效, 现报告如下。

1 临床资料

本组 72例患者中, 女 57例, 男 15例; 年龄 17~76岁, 平均 46岁。粉碎性骨折 33例, 横断形骨折 21例, 斜形骨折 18例。近侧指骨向掌侧移位成角 54例, 中节向背侧成角移位 12例, 远节向掌侧成角移位 6例。损伤 1~3 d 来诊 54例, 4~10 d 来诊者 15例, 10 d 后来诊者 3例。损伤原因: 砸伤 48例, 跌伤 24例。

2 方法

2.1 弹性钢套制作 用 0.8 mm 厚的钢片, 剪成宽 3~5 cm (与指节宽), 长 7~9 cm 的钢片, 形似创可贴。长方形两端剪成半圆形, 把长方形部分折成圆柱形, 圆柱形上打一些小孔透气, 把两端半圆靠紧, 半圆中央打一些圆孔, 上一螺丝钉, 磨光滑备用 (见图 1)。

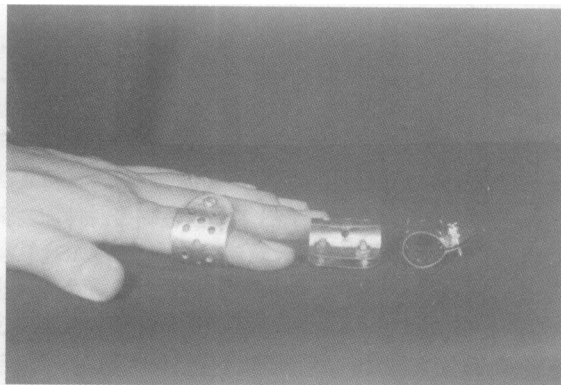


图 1 自制弹性钢套示意图

2.2 治疗方法 在牵引下徒手复位, 矫正重叠、侧方成角旋转等骨折移位, 尽量达到解剖复位后, 套上适合的弹性小钢套, 拧紧螺丝钉。根据指端血液循环情况调整螺丝钉松紧,

使钢套既起到固定作用, 又不影响指端血液循环及骨折断端的修复生长, 配合早期功能锻炼。固定 2~3 周后拆掉钢套。

3 治疗结果

疗效标准^[1]: 优, 关节活动正常, 无疼痛, X 线片示骨折解剖复位, 愈合良好; 良, 关节活动稍差, 过劳时有轻度痛感, 但能胜任日常工作, X 线片示骨折愈合, 近解剖复位, 骨痂生长过多。72 例均获随访, 时间 1~3 年。本组优 68 例, 良 4 例。

4 讨论

指骨骨折的治疗, 传统以手法复位、石膏或小夹板外固定为主^[2-3]。石膏固定常使骨折成角或旋转移位, 以致畸形愈合。而小夹板固定, 频繁拆卸夹板固定物, 远不足以防止此类骨折的移位, 指骨骨折成角可旋转移位。畸形愈合后与其他功能障碍存在着直接关系, 故治疗时就应力求恢复其原有的正常解剖关系, 并保持此种位置至骨折愈合。指骨骨折手法复位容易达到解剖复位, 使用钢套外固定使骨折断端保持在整复后的位置上, 是极为可靠的。在我们的治疗病例中没有一例发生再脱位现象, 同时可以随时调整螺丝的松紧度; 避免了石膏外固定所产生的束缚压迫感又不致影响指端血液循环及其余正常骨关节的活动, 利于早期功能锻炼。弹性小钢套物美价廉, 小巧且使用方便, 用其治疗指骨闭合性骨折较传统方法具有明显的优点。

参考文献

- 1 孙继革. 微型竹帘夹板在手指外固定中的作用. 中国骨伤, 2000, 13(4): 235.
- 2 马有兵, 丰健民, 李成永, 等. 前臂石膏指夹板治疗手部骨折. 中国骨伤, 2000, 13(11): 680.
- 3 张中林. 支架固定治疗指骨骨折 120 例体会. 中国骨伤, 2000, 13(12): 750.

(收稿日期: 2006-04-18 本文编辑: 王玉蔓)