

· 基础研究 ·

右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓骨活性影响的实验研究

吴云刚¹△, 肖鲁伟², 童培建²

(1.温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000; 2.浙江中医药大学)

【摘要】 目的: 观察右归饮含药血清对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓体外分化为成骨细胞的影响。方法: 将右归饮含药血清加入人骨髓间充质细胞诱导分化成骨细胞的培养体系, 采用观察细胞学形态、MTT 法、细胞内 ALP 含量及矿化结节形成, 并与普通血清组进行比较。结果: 与普通血清组相比, 形态学观察及 MTT 法表明, 右归饮含药血清对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓体外分化成骨细胞的增殖起促进作用 ($P < 0.01$); 矿化结节染色及细胞内 ALP 含量测定表明右归饮对成骨细胞的活性有促进作用 ($P < 0.01$)。结论: 右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞的增殖和活性起促进作用。

【关键词】 右归饮; 股骨头坏死; 骨髓间充质细胞; 成骨细胞; 碱性磷酸酶

Effects of *Yougui* drink (右归饮) on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the proximal femur in steroid-induced avascular necrosis of femoral head WU Yun-gang*, XIAO Lu-wei, TONG Pei-jian. *The First Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of *Yougui* drink on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in the proximal femur in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in vitro. **Methods:** The BMSCs were induced to osteoblasts in vitro with a conditional medium. The cells cultured with *Yougui* drink serum were compared with the ordinary one, which both were examined by microscopy, MTT method, ALP and calcium node. **Results:** Microscopy and MTT studies showed that *Yougui* drink could improve proliferation of the osteoblasts. ALP and calcium node studies showed that *Yougui* drink could improve the activity of the osteoblasts ($P < 0.01$). **Conclusion:** *Yougui* drink has positive effects on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the proximal femur in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in vitro.

Key words *Yougui* drink; Femur head necrosis; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteoblasts; Alkaline phosphatase

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(2): 115-117 www.zggszz.com

基金项目: 浙江省中医药管理局科技计划项目基金(编号: 2002C078)

通讯作者: 吴云刚 E-mail: zjwyg@126.com

△浙江中医药大学博士在读

目前中医常将激素性股骨头坏死 (steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH) 归属于“骨痹”和“骨痿”的范畴, 病机主要为肾虚血瘀, 骨枯髓减。右归饮方具有温补

炼创造有力条件。而下肢的主要功能是负重与行走; 在扶拐下锻炼负重行走, 能促进骨组织增生, 加速骨折愈合, 并减少肢体因石膏制动而致的废用性骨钙丢失。加上外敷我院制剂如意金黄膏(由如意金黄散加适量蜂蜜调制而成), 如意金黄散方中天花粉可清热生津, 消肿排脓, 又能消散瘀血; 大黄、姜黄、白芷、黄柏清热解毒, 活血止痛; 厚朴、陈皮理气消滞; 苍术、生天南星燥湿消肿; 甘草解毒散结止痛。全方有清热解毒、散瘀消肿之功效^[4], 根据现代中药药理研究, 如意金黄散具有消炎解热镇痛之功效, 能令气血流通, 代谢增强, 促进患部肿胀消退, 加快软组织修复、骨折愈合及功能恢复。

参考文献

- [1] 国家中医药管理. 中医病证诊断疗效标准. 南京: 南京大学出版社, 1994. 174.
- [2] 林军, 汤冠辉. 第五跖骨基底部骨折漏诊 60 例分析. 广州医药, 2002, 33(1): 31.
- [3] 董明非, 郑林. 运用相对固定、适当活动观点治疗踝关节扭伤. 中国骨伤, 2008, 21(5): 389-390.
- [4] 张帆, 张崇权. 如意金黄散合硫酸镁溶液治疗桡骨茎突腱鞘炎疗效观察. 中医正骨, 2004, 16(12): 714.

(收稿日期: 2008-10-26 本文编辑: 王玉蔓)

肾阳、益骨生髓的功效,在治疗早期 SANFH 方面取得良效。本实验拟利用血清药理学和细胞培养相结合的方法,着重探讨右归饮对 SANFH 患者股骨近端骨髓间充质细胞分化为成骨细胞能力的影响,从细胞学角度探讨右归饮治疗激素性股骨头坏死的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 3111 型二氧化碳培养箱(德国 Thermo 电子公司)、AIRTECH SW-CJ-2FD 超净工作台(中日合资苏州安泰空气技术有限公司)、Stat Fax-2100 型酶标仪(美国贝克曼-库儿特公司)、IX71-F22PH2 Olympus 倒置显微镜(日本 OLYMPUS);Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM,美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)、Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT,美国 Sigma 公司)、碱性磷酸酶试剂盒(上海虹桥医用试剂研究所)、地塞米松(Sigma D1756 100 mg)、 β -甘油磷酸钠(Sigma G6251 50 g)、维生素 C(Sigma 25 g)。

1.2 右归饮制剂的制备 右归饮制剂(浙江省中医院制剂室提供):熟地 15 g、枸杞子 15 g、山茱萸 10 g、淮山药 15 g、杜仲 15 g、制附子 10 g、肉桂 5 g、炙甘草 5 g。加蒸馏水 500 ml 低温浸泡 12 h,取出放置室温,煮沸后文火煎 30 min,纱布过滤,药渣加水 300 ml,煮沸后再文火煎 30 min,滤液合并,90℃水浴浓缩至 1:1(相当于生药 1 g/ml),4℃冰箱冷藏备用。

1.3 含药血清的制备 根据王力倩等^[1]方法,取 SD 雄性大鼠 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只。右归饮药物组,灌胃给药,给药量按成人日临床剂量,经大鼠体表面积换算为成人剂量,再以 6 倍量给药,2 次/d,每次 3.5 ml(含生药 2.64 g/ml),连续 7 d,于末次给药后 1 h 采血(灌药前 12 h 禁食、但不禁水),分离血清(取血 5~10 ml,静置 0.5 h 后 1 000 r/min 离心 15 min),56℃灭活 30 min,过滤分装,置-20℃冰箱备用。按以上方法用同体积生理盐水灌胃,制备普通血清,用作对照。

1.4 MSC 的分离和培养 实验用骨髓取自 6 例 SANFH 患者,取材前均向其说明并经本人同意志愿捐献,其中 Ficat III 期 4 例,IV 期 2 例,男、女各 3 例,年龄 51~65 岁,平均 56.3 岁。注射器肝素化后抽取 4~5 ml 骨髓,置入装有 DMEM 培养液的 20 ml 无菌离心管中带至实验室。以 Percoll(1.073 g/ml)为分离介质,用梯度离心法分离单个核细胞。多次洗涤后重新悬浮于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中,3~5 d 后换液,去除未贴壁的细胞,每 3 d 换液 1 次,每天观察细胞形态、贴壁及生长情况。待细胞融合达 80%~90%,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.5 体外成骨的诱导 根据实验设计,当第 3 代 MSCs 细胞贴壁生长达到 70%~80%融合时,加入含地塞米松(5 nmol/L)、 β -磷酸甘油钠(10 mmol/L)和维生素 C(50 $\mu\text{mol/L}$)的 DMEM 成骨条件培养液,制成细胞悬液,按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种 75 cm^2 的培养皿,置 37℃、5% CO_2 的培养箱培养。每例患者的细胞随机分为 2 组,右归饮含药血清组和普通血清组。前者加入 10%右归饮含药血清培养液,后者加入 10%含普通血清培养液。每次每组设 6 孔,重复上述实验 4 次。

1.6 现实项目与方法

1.6.1 细胞形态学观察

1.6.2 MTT 法测定细胞增殖 将细胞以 $5 \times 10^3/\text{ml}$ 细胞数接种于 96 孔板中,培养 72 h,选择 6 孔细胞,每孔加入 MTT 溶液 20 μl ,37℃孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μl DMSO,振荡 15 min 裂解细胞,使沉淀物充分溶解。在酶联免疫检测仪上测定每孔的 OD₄₉₀ 值。

1.6.3 碱性磷酸酶染色及细胞内 ALP 含量检测 取诱导培养 2 周后的细胞,PBS 冲洗后,丙酮固定 10 min 后,蒸馏水冲洗。入孵育液中,37℃孵育 5 h,自来水冲洗后,2%硝酸钴中浸透 5 min,蒸馏水洗数次,再用 1%的硫化铵(现配)浸 2~3 min,自来水冲洗,自然干燥后封固。

取生长状态良好的第 3 代细胞,按 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 密度接种于 2 个 24 孔板内,在采用条件培养基诱导后分别加入含右归饮含药血清、含普通血清培养液培养,于第 72 h 各取 6 孔细胞用 0.1% Triton X-100 裂解后,收集裂解液按 ALP 检测试剂盒的说明进行加样操作,用分光光度计检测各管 OD,然后按公式计算出 ALP 的含量:ALP(金氏单位/100 ml)=测定管吸光度/标准管吸光度 \times 标准管含酚量(0.005 mg) \times 稀释倍数(100 ml/0.05 ml)。

1.6.4 钙结节染色(Von Kossa 法) 细胞爬片用 PBS 冲 2 次,经冷丙酮固定 10 min 后,蒸馏水冲洗,放入 2%硝酸银内置暗处 1 h,蒸馏水洗 3 次,5%硫代硫酸钠还原 1 h(硫代硫酸钠 5 g,0.1 mol/L,氢氧化钠 0.2 ml,蒸馏水 100 ml),干燥,封片。

1.7 统计学处理 用 SPSS 14.0 进行统计分析,各数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 原代培养时,细胞接种 5~7 d 后,可见贴壁的细胞中有大量圆形细胞,其中有少量呈成纤维细胞样外形的贴壁细胞;传代培养时,使用右归饮含药血清组的细胞贴壁、增殖速度明显高于普通血清组,集落数目增加,并见集落体积增大(见图 1)。

2.2 MTT 法测定细胞增殖 MTT 值右归饮含药血清组(0.216 ± 0.012)与普通血清组(0.185 ± 0.035)比较差异有统计学意义($P < 0.01$),表明右归饮对 SANFH 患者股骨近端骨髓分化为成骨细胞的增殖有促进作用,与上述形态学观察结果一致。

2.3 ALP 染色及细胞内 ALP 含量测定 染色后成骨细胞呈强阳性反应,细胞质中出现黑色、灰褐色颗粒状或片状沉淀(见图 2)。右归饮含药血清组细胞内 ALP 值与普通血清组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1),表明右归饮对 SANFH 患者股骨近端的骨髓分化为成骨细胞的活性有促进作用。

2.4 钙结节染色 条件培养基培养组细胞呈集落生长后开始形成钙结节,细胞间出现的致密、圆形不透光团块呈现片状的棕染,着色区域范围广、面积大。加含右归饮含药血清培养组细胞,上述表现更为明显(见图 3)。由表 1 可知,右归饮含药血清组矿化结节与普通血清组比较差异有统计学意义($P <$

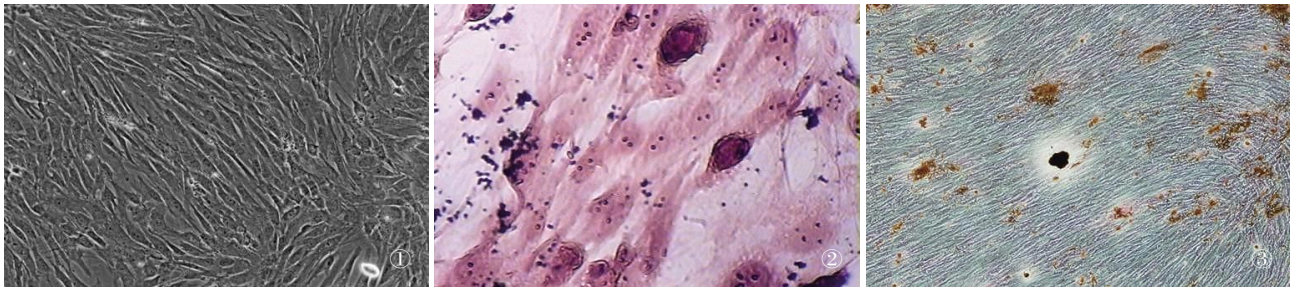


图 1 HE 染色×20: 传代培养时, 使用右归饮含药血清组的细胞贴壁、增殖速度明显高于普通血清组, 集落数目增加, 并见集落体积增大 图 2 碱性磷酸酶染色×200: 右归饮含药血清组, 成骨细胞 2 周, 成骨细胞胞质内灰褐色颗粒状阳性颗粒 图 3 矿化结节染色 (Von-Kossa)×10: SANFH 患者右归饮血清组, 显示棕黄色的矿化钙结节形成, 细胞间出现的致密的、不透光呈片状的棕染

Fig.1 HE Staining ×20: In the process of passage culture, the cell adherent and proliferation rate of *Yougui* drink containing serum group were higher than that of common serum group, with the colonies' number and their volume increased **Fig.2** Alkaline phosphatase staining ×200: In *Yougui* drink containing serum group, dust color granular positive particles could be seen in osteoblastic cytoplasm when osteoblast was induced 2 weeks **Fig.3** Von-Kossa×10: In *Yougui* drink containing serum group, brown-yellow mineralized calcium nodules were formed, and compact opacity, flaky and brown granules could be found between cells

表 1 右归饮含药血清对成骨细胞 ALP 和矿化结节的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.1 Effect of serum containing *Yougui* drink on osteogenic ALP and calcium node ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞内 ALP(U/g)	矿化结节数(个)
普通血清组	2.39±0.15	21.00±1.85
右归饮含药血清组	2.81±0.89*	23.33±1.25*

注: 与普通血清组相比, *P<0.01

Note: As compared with normal serum group, *P<0.01

0.01), 表明右归饮对 SANFH 患者股骨近端的骨髓分化为成骨细胞形成矿化结节有促进作用。

3 讨论

《医经精义》云:“肾藏精, 精生髓, 髓生骨, 故骨者肾之所合也; 髓者精之所生也, 精足则髓足。髓在骨内, 髓足则骨强”。说明骨为髓之主, 骨的生长发育有赖于髓的濡养。若肾精肾气充足, 骨骼化生有源, 则身健力强; 若肾气不足, 肾精亏虚, 骨髓失充, 骨骼失养, 则脆弱乏力。SANFH 患者肾虚血瘀, 骨枯髓减, 骨髓功能下降, 分化为成骨细胞的能力及其活性下降, 导致了骨细胞的坏死及再生的障碍^[2]。

右归饮方中熟地益肾填精; 山药健脾固肾益精; 山茱萸补肝益肾固精; 肉桂温肾, 补命门之火; 附子峻补元阳, 益火之源; 杞子补肝肾, 益精气; 杜仲, 滋阴补肾、强壮筋骨。激素诱发的股骨头坏死其临床表现与肾阳虚症相对应, 右归饮在治疗激素性股骨头坏死方面, 能有效的拮抗股骨头坏死 HPA 轴从形态到功能的抑制, 并能改善股骨头的坏死^[3]。俞索静等^[4]认为右归饮能促进大鼠成骨细胞的增殖, 加速成骨细胞的分化和矿化结节的形成, 推理右归饮在某种程度上通过调节骨坏死局部的骨代谢环境, 促进成骨细胞的成骨活性。肖鲁伟等^[5]采用贴壁分离法获取胎兔骨髓间充质细胞, 在不使用生长因子的前提下, 将右归饮含药血清加入高糖 DMEM 培养基中, 高密度传代培养, 成功地使 MSCs 向软骨细胞诱导分化。在我们的前期研究工作中, 也证明了右归饮可以促进急性创伤性股骨颈骨折患者股骨近端的骨髓间充质细胞向成骨细胞转化

并增殖, 认为右归饮能增加碱性磷酸酶的活性, 抑制破骨细胞活动, 促进钙盐在骨床的沉积^[6]。

本实验培养 SANFH 患者股骨近端的骨髓间充质细胞结果显示, 右归饮能促进 SANFH 患者股骨近端受抑制的骨髓间充质细胞活化并分化为成骨细胞, 促进 ALP 的分泌和矿化结节的形成。因此, 推理右归饮在某种程度上能拮抗激素对机体 HPA 轴、甲状腺轴、性腺轴的影响, 增强机体的免疫功能, 有效的促进靶器官骨髓间充质细胞的定向分化为成骨细胞的增殖和活性, 增强碱性磷酸酶的分泌和钙盐的沉着。这可能是其治疗 SANFH 的作用机制之一。本实验结果同时也为中医“肾主骨”理论提供了实验依据, 反证了 SANFH 患者肾阳虚的发病机制。

但右归饮为复方制剂, 成分复杂, 有效作用成分不清; 另一方面, 在体外该制剂到底是通过抑制激素对骨细胞的细胞毒作用、抑制骨细胞脂肪变性, 抑或减缓骨细胞凋亡等何种途径起作用, 依然不清。相信经过不懈的努力, 随着现代科学技术的发展, 学科的交叉和技术的创新与共享, 中药制剂的有效成分的作用机制会得到进一步揭示。

参考文献

- [1] 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 等. 血清药理学方法研究与探索. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 29-31.
- [2] 吴云刚, 肖鲁伟, 童培建. 激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓成骨活性下降的研究. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16 (6): 18-20.
- [3] 肖鲁伟, 童培建, 赵万军, 等. 激素诱导的股骨头坏死与肾阳虚证之间的关系. 中医正骨, 1998, 10(4): 3-4.
- [4] 俞索静, 肖鲁伟, 吴承亮. 右归饮对体外成骨细胞增殖和分化影响的实验研究. 浙江临床医学, 2004, 6(12): 1027-1028.
- [5] 肖鲁伟, 武中庆, 季卫锋, 等. 右归饮诱导胎兔骨髓基质细胞向软骨细胞分化的实验研究. 中国中医药科技, 2005, 12(3): 154-155.
- [6] 吴云刚, 张志平. 右归饮含药血清对人骨髓基质干细胞诱导为成骨细胞的影响. 江西中医药, 2006, 37(7): 57-58.

(收稿日期: 2008-08-01 本文编辑: 桑志成)