

• 基础研究 •

补肾强骨方含药血清对滑膜成纤维细胞增殖及 PCNA 和 Bcl-2 表达的影响

高华利¹, 欧阳桂林¹, 黄新星¹, 李宁丽², 肖涟波¹

(1. 光华中西医结合医院关节外科, 上海 200052; 2. 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

【摘要】 目的: 探讨补肾强骨方是否可以抑制类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞增殖及 PCNA mRNA、Bcl-2 mRNA 表达。**方法:** 制作补肾强骨方含药血清, 体外分离培养类风湿关节炎患者的滑膜细胞, 并鉴定、传代。实验分组: 含 20% 空白血清组、20% 补肾强骨方高剂量含药血清组、20% 补肾强骨方低剂量含药血清组、20% 雷公藤多苷片含药血清组。以雷公藤多苷片含药血清组含药血清作为阳性对照, 将 20% 浓度的含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增殖及 PCNA mRNA、Bcl-2 mRNA 表达的影响。**结果:** 与空白对照组相比, 补肾强骨方含药血清具有抑制滑膜成纤维细胞增殖的作用 ($P < 0.000 1$), 且高剂量更显著。与空白对照血清相比, 补肾强骨方含药血清均能显著抑制滑膜成纤维细胞 PCNA mRNA、Bcl-2 mRNA 表达 ($P < 0.000 1$)。**结论:** 补肾强骨方含药血清能够显著抑制滑膜成纤维细胞增殖, 可能是通过调节 PCNA mRNA、Bcl-2 mRNA 表达来实现的。

【关键词】 滑膜; 成纤维细胞; 中草药; 补肾

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.11.016

Effect of Bushen Qianggu decoction (补肾强骨方) on the proliferation of synovial fibroblasts and expression of PCNA and Bcl-2 GAO Hua-li, OUYANG Gui-lin, HUANG Xin-xing, LI Ning-li, XIAO Lian-bo*. *Department of Orthopaedics Surgery, Guanghua Integrated Traditional and Western Medicine Hospital of Shanghai, Shanghai 200052, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Bushen Qianggu decoction (补肾强骨方, BQD) on synovial fibroblasts proliferation and PCNA and Bcl-2 expression. **Methods:** Serum containing BQD was made and synovial fibroblasts were separated and cultured and passaged in vitro. Four groups were divided as 20% blank control group, serum containing 20% Tripterygium wilfordii multi-glycosides drug (TWMD), 20% of serum containing high and low of BQD, respectively. Serum containing drugs of different concentration were added into the synovial fibroblasts of the third generation, and then the synovial fibroblasts were cultured continued. The effects of different drugs on synovial fibroblasts and PCNA and Bcl-2 expression were observed. **Results:** Compared with the control serum, BQD-containing serum promoted the apoptosis of synovial fibroblasts ($P < 0.000 1$); especially, high dose could inhibit proliferation. The expression of PCNA and Bcl-2 was significantly lower in BQD-containing serum ($P < 0.000 1$ vs control group). **Conclusion:** BQD can promote the apoptosis of synovial fibroblasts by improving of expression of PCNA and Bcl-2, which may be one of the mechanisms of BQD in preventing and treating osteoporosis of rheumatoid arthritis.

KEYWORDS Synovial membrane; Fibroblasts; Drugs, Chinese herbal; Reinforcing kidney

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11):942-945 www.zggszz.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜炎为主的免疫性疾病, 易造成关节和软骨破坏、畸形, 继发局部骨丢失与全身骨质疏松症^[1-2]。在 RA 的发病机制中成纤维样滑膜细胞 (FLS) 异常增生, 加速 T 淋巴细胞和巨噬细胞浸润以及血管翳的形成, 其数量增加和形态改变, 并侵蚀邻近的软骨和骨组织^[3]。故寻求高效控制滑膜增生, 阻止其骨丢失

的途径是近年来治疗策略的又一重点^[4-5]。中医理论认为本病痰湿凝滞、筋骨失养, 系肝肾虚损所致。本实验就自拟的补肾强骨方, 制作含药血清, 探讨其对体外培养滑膜成纤维细胞增殖影响及对增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 Bcl-2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体质量 (200±10) g 的雌性 Wistar 大鼠 20 只, 均为 SPF 级, 购自中国科学院上海实验动物中心, 动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2007 0005, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2008 0050。滑膜组织来自上海光华医院类风湿关节炎外科, 均为女性患者, 年龄 (48.23±5.36) 岁, 病程

基金项目: 上海市科委资助项目 (编号: 09411967400); 上海市长宁区青年课题项目 (编号: 20094Q03001)

Fund programs: Science and Technology Commission-funded Project of Shanghai (No.09411967400)

通讯作者: 肖涟波 E-mail: xlb@medmail.com.cn

(7.00±11.45)年,诊断均符合 1987 年美国风湿病学诊断标准。

1.2 药品与主要试剂及仪器 自拟补肾强骨方 (*Bushen Qianggu* decoction, BQD)。高剂量:骨碎补 40 g,白芍 18 g,仙灵脾 20 g,青风藤 15 g,黄芪 18 g。低剂量采用高剂量各药量减半,中药均购自上海同仁堂药房。上述药物水煎 2 次,煎液过滤,混合后加热浓缩至高剂量含生药量 2.6 g/ml,低剂量含生药 1.3 g/ml,4℃保存备用。雷公藤多苷片,购自黄石飞云制药有限公司,生产批号为 20110301。DMEM(高糖)、青霉素、链霉素,购自美国 HyClone 公司。HEPES 缓冲液、I 型胶原酶和胎牛血清,购自美国 Gihco 公司。二甲基亚砜 (DMSO)(美国 Sigma-Aldrich 公司),噻唑基四唑 (MTT)(瑞士 Fluka 公司),CO₂ 培养箱(Heraeus 公司),倒置显微镜(Nikon 公司),酶联免疫检测仪(美国 BIO-RAD680 公司),高速台式离心机(Eppendorf 公司),高速低温离心机(HITACHI 公司),IX70 倒置相差显微镜及数码摄像装置(日本,OLYMPUS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备 Wistar 大鼠 20 只随机分为空白对照组(灭菌用水灌胃)、补肾强骨方高剂量组、补肾强骨方低剂量组、雷公藤多苷片组。空白对照组:灭菌用水每只 3 ml/d,灌胃。补肾强骨方组:按照美国 FDA 提出的临床等效剂量换算公式 [$Db = Da \times (Kb / Ka) \times (Wa / Wb)^{1/3}$] 计算用量。其中 Da 和 Db 分别为动物 A 和动物 B 的剂量;Ka 和 Kb 分别是动物 A 和动物 B 的体型系数;Wa 和 Wb 分别是动物 A 和动物 B 的体重。成人体重按 60 kg 计算,每只大鼠按 200 g 体重计算。根据人的使用剂量换算为大鼠的等效剂量,每只大鼠 3 ml/d,分 2 次灌胃。雷公藤多苷片组:雷公藤多苷片每日每只 1.2 mg,溶解于水中,分 2 次灌胃。所有动物均连续给药 3 d,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 3 000 r/min,离心 15 min 分离血清。置入无菌试管中,-20℃冰箱冻存备用。临用时,56℃恒温 30 min 灭活,用无血清培养基稀释,过滤除菌。参照相关文献^[6-9]确定制备方法。

1.3.2 原代滑膜细胞的分离培养与传代 无菌取下滑膜组织置盛有 5%FBS DMEM 的 15 ml 离心管中,2 h 内放入盛有 DMEM 培养液的无菌培养皿,无菌条件下将表面脂肪及血块剥离,并清洗 3 次。将滑膜组织剪碎至 1 mm³ 的小块置 6 cm² 培养皿中,加入 4 ml DMEM 培养液,再加 500 μl I 型胶原酶 (4 mg/ml),37℃5% CO₂ 培养箱消化 4 h,可见组织

块呈絮状。用 100 目不锈钢滤网过滤,加 PBS 冲洗,滤液离心 1 500 r/min 5 min,弃上清。打散细胞,加 15% FBS DMEM,置 10 cm² 培养皿中,37℃5%CO₂ 培养箱,待细胞密集>80%则消化传代培养,传至第 3 代予胰酶消化待用。Giemsa 染色鉴定其表型。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 含药血清对体外滑膜成纤维细胞增殖作用的影响 第 3 代成骨细胞调整浓度为 2×10³ 个/ml,以每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板,含 2%胎牛血清培养液饥饿培养 24 h 后,分为 4 组:20%空白血清组;20%补肾强骨方高剂量含药血清组;20%补肾强骨方低剂量含药血清组;20%雷公藤多苷片含药血清组。每组 8 孔,37℃5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,弃 100 μl 培养液后,每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml),37℃孵育 4 h。弃上清,每孔加 150 μl DMSO 溶解结晶,置酶联免疫检测仪上测定吸光值 (波长 490 nm)。计算方法:细胞存活率%=(OD 试验孔/OD 对照孔)×100%。

1.4.2 含药血清对体外滑膜成纤维细胞 PCNA mRNA 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响 取第 3 代的成骨细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化后,反复吹吸使成单细胞悬液。调整细胞浓度为 2×10⁴ 个/ml,接种于 12 孔细胞培养板中,每孔 1 ml,37℃5%CO₂ 培养箱内培养 24 h。吸净孔板里的培养液,更换成 1%胎牛血清培养液饥饿 12 h。吸净孔板里的培养液,更换成 20%空白对照血清、20%补肾强骨方高剂量含药血清、20%补肾强骨方低剂量含药血清、20%雷公藤多苷片含药血清,每组 3 孔,再培养 24 h。按 Trizol 一步法试剂说明书提取滑膜成纤维细胞 RNA,取 1 μg 总 RNA 为模板,逆转录成 cDNA。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列见表 1。实时定量 PCR:将荧光染料 SYBR Green 和目的基因 Bcl-2 以及内参 Actin 的引物按 5 μl SYBR Green+0.15 μl 引物混匀,封膜后,放入实时 PCR 仪 (ABI 7900) 进行 PCR 反应,测定出 PCNA mRNA 表达, Bcl-2 基因表达的 CT 值,根据公式 2^{-ΔΔCT} 计算基因的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾强骨方含药血清对体外培养滑膜成纤维细胞的影响 见表 2,与空白对照组比较,5%、10%补肾强骨方含药血清作用 48 h 时,对滑膜成纤维细胞增殖影响差异无统计学意义;5%、10%补肾强骨

表 1 定量 PCR 检测基因及引物序列

Tab.1 Gene and primer sequence for real-time PCR

基因	序列(5'→3')	长度(bp)
Actin	AGGCCAACCGTGAAAAGATG(forward)	70
	ACCAGAGGCATACAGGGACAA(reverse)	
PCNA	AAGCCGAAACCAGCTAGACTTTC(forward)	71
	TGGCGGAGTGGCAACAA(reverse)	
Bcl-2	GGCATCTGCACACCTGGAT(forward)	81
	AGACAGCCA GGAGAAATCAAACA(reverse)	

表 2 不同浓度及不同剂量的补肾强骨方含药血清刺激 48 h 对外培养滑膜成纤维细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Different concentrations and doses of BQD containing serum stimulate the RA-FLS 48 h in vitro ($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	OD 值	与空白对照组比较 t 值	P 值
空白对照组	8	1.501 5±0.012 5	-	-
补肾强骨方				
5%高剂量组	8	1.921 2±0.134 7	2.564	0.1243
低剂量组	8	1.924 5±0.195 5	2.380	0.1403
10%高剂量组	8	1.841 5±0.107 5	3.142	0.0881
低剂量组	8	1.626 0±0.164 0	0.757	0.5281
20%高剂量组	8	1.074 0±0.037 0	10.950	0.0082
低剂量组	8	1.286 5±0.015 5	10.80	0.0085

方高剂量、低剂量含药血清之间对滑膜成纤维细胞增殖差异亦无统计学意义;20%含药血清作用时,补肾强骨方高剂量含药血清可显著抑制滑膜成纤维细胞增殖。与空白对照组比较,20%含药血清作用时,补肾强骨方高剂量、低剂量及雷公藤多苷含药血清均能抑制滑膜成纤维细胞增殖,见表 3。

2.2 含药血清对外培养滑膜成纤维细胞 PCNA mRNA 表达的影响 如表 3 所示,与空白对照组比较,20%含药血清作用时,补肾强骨方高剂量、低剂量及雷公藤多苷片含药血清均能抑制滑膜成纤维细胞 PCNA mRNA 表达。

2.3 含药血清对外培养滑膜成纤维细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响 如表 3 所示,与空白对照组比较,补肾强骨方高剂量、低剂量及雷公藤多苷片含药

血清均能抑制滑膜成纤维细胞 Bcl-2 mRNA 表达。

3 讨论

类风湿关节炎患者的体内滑膜成纤维细胞可通过分泌各种蛋白酶类、花生四烯酸代谢产物及其细胞因子等产物,在炎症与关节破坏过程中发挥着重要作用^[10-12],是 RA 病理改变的最终靶细胞,其过度增殖导致滑膜增生是 RA 主要病理特征之一^[13-14]。目前的抗炎治疗可减轻炎症引起的疼痛及骨丢失等,但由于高效治疗药物,如 TNF-α 抗体等,其费用昂贵以及副作用较大^[15-17],所以尚未在临床得到广泛应用。

类风湿性关节炎属于中医“痹症”“骨痿”范畴。痹症的病机为本虚标实,肝肾脾虚为本,湿滞、瘀阻为标。骨痿为肾虚精亏,髓虚脉痹所致,肾主骨,肾水既涸,则诸骨皆枯,其病位在骨,其本在肾,从肾着手治疗是根本大法之一。笔者自拟补肾强骨方正是依据“肾主骨生髓”理论,肝肾亏虚导致 RA 及继发骨破坏来组方。

PCNA 是 DNA 多聚酶 8 的辅助蛋白,又称为细胞周期蛋白,是一种仅在增殖细胞中合成和表达的 36 ku 蛋白多肽,在细胞增殖的启动上起重要作用,其含量和表达强弱与 DNA 合成及复制的活跃程度一致,可作为评价细胞增殖状态的一个指标。本研究显示补肾强骨方高剂量、低剂量含药血清均能抑制滑膜成纤维细胞 PCNA mRNA 表达。

Bcl-2 基因家族及其相关蛋白 Bcl-2 是研究最早的与凋亡有关的基因,也是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族。Bcl-2 是一个重要的细胞凋亡调节基因,通过抑制多种形式的细胞死亡,使细胞寿命延长,导致细胞数目增多,而且使遗传物质的突变率增加。本研究显示补肾强骨方高剂量、低剂量含药血清均能抑制滑膜成纤维细胞 Bcl-2 mRNA 表达。

本研究采用中药血清药理学研究方法,在细胞水平观察补肾强骨方含药血清对外培养滑膜成纤维细胞增殖及凋亡的影响,结果表明 20%补肾强骨

表 3 20%含药血清体外刺激对滑膜成纤维细胞增殖及 PCNA mRNA 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 20% serum containing stimulate the RA-FLS 48 h in vitro and PCNA mRNA, Bcl-2 mRNA expression ($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	OD 值	PCNA mRNA 表达	Bcl-2 mRNA 的表达
空白对照组	8	1.625 9±0.036 9	19.797 2±6.927 7	14.696 1±7.571 4
补肾强骨方				
高剂量组	8	0.946 6±0.152 6 ^{a1}	3.739 6±2.230 3 ^{b1}	3.739 6±2.230 3 ^{c1}
低剂量组	8	1.070 3±0.319 2 ^{a2}	6.451 0±4.032 9 ^{b2}	6.451 0±4.032 9 ^{c2}
雷公藤多苷组	8	1.286 5±0.015 5 ^{a3}	4.238 2±1.873 0 ^{b3}	5.510 8±4.334 2 ^{c3}

注:与空白对照组比较,^{a1}t=11.500, P<0.000 1; ^{a2}t=6.073, P<0.000 1; ^{a3}t=6.253, P<0.000 1。 ^{b1}t=6.049, P<0.000 1; ^{b2}t=4.884, P=0.000 4; ^{b3}t=5.745, P=0.000 4。 ^{c1}t=5.785, P<0.000 1; ^{c2}t=4.756, P=0.000 5; ^{c3}t=4.751, P=0.000 5

Note: Compared with control group, ^{a1}t=11.500, P<0.000 1; ^{a2}t=6.073, P<0.000 1; ^{a3}t=6.253, P<0.000 1。 ^{b1}t=6.049, P<0.000 1; ^{b2}t=4.884, P=0.000 4; ^{b3}t=5.745, P=0.000 4。 ^{c1}t=5.785, P<0.000 1; ^{c2}t=4.756, P=0.000 5; ^{c3}t=4.751, P=0.000 5

方含药血清能够促进体外培养滑膜成纤维细胞增殖。通过应用实时定量 PCR 技术进一步证实:经过含药血清的作用,PCNA 与 Bcl-2 表达下降,说明滑膜成纤维细胞增殖受到抑制,与 MTT 实验的结果一致,这也可能是补肾强骨方含药血清能够下调滑膜成纤维细胞增殖的作用机制之一。该研究在细胞水平和分子水平上为补肾强骨方用于临床 RA 治疗提供了有力的理论依据,也为后续深入探讨其作用机制提供了实验数据。

参考文献

- [1] 魏天佑,崔燎.骨质疏松与类风湿性关节炎[J].中国骨质疏松杂志,2007,13(8):592-593.
Wei TY, Cui L. Osteoporosis and rheumatoid arthritis[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2007, 13(8):592-593. Chinese.
- [2] Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, et al. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2002, 41(11):1232-1239.
- [3] Kammouni W, Wong K, Ma G, et al. Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3 [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(9):2854-2863.
- [4] 张志强,卫小春.关节镜下治疗膝关节骨性关节炎(221例随访)[J].实用骨科杂志,2005,11(6):544-545.
Zhang ZQ, Wei XC. Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee (221 cases) [J]. Shi Yong Gu Ke Za Zhi, 2005, 11(6):544-545. Chinese.
- [5] Ikeuchi M, Takahashi T, Tani T. Localized synovial hypertrophy in the anteromedial compartment of the osteoarthritic knee [J]. Arthroscopy, 2005, 21(12):1457-1461.
- [6] 李念虎.补肾活血中药含药血清对滑膜细胞分泌 TNF- α 、IL-1 水平的影响[J].中国骨伤,2007,20(5):302-305.
Li NH. Effects of serllnl containing Bushen Huoxue drugs on level of TNF- α and IL-1 of synoviocyte [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2007, 20(5):302-305. Chinese with abstract in English.
- [7] 杨志霞,李振彬,李焱,等.雷公藤多苷含药血清对大鼠成纤维样滑膜细胞增殖及 MIF 表达的影响[J].中国药理学通报,2008,24(6):838-839.
Yang ZX, Li ZB, Li Y, et al. Effect of Tripterygium wifordii multiglycoside drug serum on the proliferation of fibroblast like synoviocytes and the expression of macrophage migration inhibitory factor in vitro [J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao, 2008, 24(6):838-839. Chinese.
- [8] 林薇,赵锦燕,郑良朴,等.不同浓度血府逐瘀汤含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J].中国比较医学杂志,2010,20(5):57-60.
Lin W, Zhao JY, Zheng LP, et al. Effect of different concentration of Xuefu Zhuyu decoctions on proliferation, migration and invasion of vascular smooth muscle cells in rats [J]. Zhongguo Bi Jiao Yi Xue Za Zhi, 2010, 20(5):57-60. Chinese.
- [9] 黄志明,欧阳桂林,肖涟波,等.骨碎补总黄酮在肿瘤坏死因子- α 介导下对成骨细胞凋亡的影响[J].中西医结合学报,2011,9(2):173-178.
Huang ZM, Ouyang GL, Xiao LB. Effects of Drynaria total flavonoids on apoptosis of osteoblasts mediated by tumor necrosis factor [J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2011, 9(2):173-178. Chinese.
- [10] 周振华,徐卫东,吴岳嵩.滑膜成纤维细胞与类风湿性关节炎相关研究的进展[J].中华关节外科杂志,2008,2(6):52-55.
Zhou ZH, Xu WD, Wu YS. The synovial into fibroblasts and rheumatoid arthritis-related progress of the study [J]. Zhonghua Guan Jie Wai Ke Za Zhi, 2008, 2(6):52-55. Chinese.
- [11] Yamanishi Y, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2001, 27(2):355-371.
- [12] Fox DA, Gizinski A, Morgan R, et al. Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2010, 36(2):311-323.
- [13] 黄学应,陈飞虎,张晓明,等.重组人内抑素对佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞周期和 PCNA 表达的影响[J].中国药理学通报,2009,25(5):649-653.
Huang XY, Chen FH, Zhang XM, et al. Effects of recombinant human endostatin on cell cycle and PCNA expression in fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis [J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao, 2009, 25(5):649-653. Chinese.
- [14] Nishioka K, Hasunuma T, Kato T, et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis: a novel pathway in the regulation of synovial tissue [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(1):1-9.
- [15] Scott DL, Kingsley GH, Ch B, et al. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 2006, 355:704-712.
- [16] Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, et al. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials [J]. JAMA, 2006, 295(19):2275-2285.
- [17] Bernatsky S, Hudson M, Suissa S. Anti-rheumatic drug use and risk of serious infections in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2007, 46(7):1157-1160.

(收稿日期:2012-05-04 本文编辑:连智华)