

MTT 法检测通络止痛方对人膝骨关节炎滑膜成纤维细胞增殖的影响

杨黎黎 王庆甫 王 欢 张 栋 王伟利 丁昊彬 甘 稳 徐铭康 杜汪洋 郭玉茹

(北京中医药大学第三附属医院,北京,100029)

摘要 目的:探讨通络止痛方对人膝关节骨性关节炎(Knee Osteoarthritis,KOA)滑膜成纤维细胞增殖的影响。方法:取本院行全膝关节置换术患者术中废弃滑膜组织,经 I 型胶原酶消化后进行原代培养,取 3~4 代成纤维细胞进行高、中、低浓度通络止痛方干预。应用四甲基偶氮唑盐法测定(MTT)法检测 KOA 滑膜细胞的增殖水平,并用倒置显微镜下观察各浓度下的细胞形态。结果:加药组组间与加药组与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 法检测随通络止痛方浓度减小 KOA 滑膜细胞在 490 nm 波长处吸光 OD 值数越大;高中浓度组抑制率为正值,随浓度增加抑制率增大,低浓度抑制率为负值,随浓度降低抑制率减少。结论:高、中浓度通络止痛方对滑膜细胞增殖有抑制作用,低浓度组的通络止痛方对滑膜细胞有增殖有促进作用。

关键词 通络止痛方;MTT 法检测;人膝骨关节炎;成纤维细胞

Effect of Tongluo Zhitong Decoction on Proliferation of Synovial Fibroblasts in Patients with Knee Osteoarthritis by MTT

Yang Lili, Wang Qingfu, Wang Huan, Zhang Dong, Wang Weili, Ding Haobin, Gan Wen, Xu Mingkan, Du Wangyang, Guo Yuru
(The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Tongluo Zhitong Decoction on the proliferation of knee osteoarthritis (KOA) synovial fibroblasts. **Methods:** The abandoned synovial tissues were taken from patients who had knee replacement surgery in the hospital. The tissues were primarily cultured after digestion in I type collagenase. Three to four generation fibroblasts were taken for high-medium-low concentration intervention. The proliferation of KOA synovial cells was detected by 4-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) and the cell morphology was observed under the inverted microscope. **Results:** Comparisons between the drug groups and comparisons between the drug groups and the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). MTT assay showed that the light OD number of KOA synovial cells became greatest in the wavelength of 490 nm when Tongluo Zhitong Decoction concentration decreased. The inhibition rates of high-medium concentration groups were positive. With the increase of the concentration, the inhibition rate increased and the inhibition rate of the low concentration group was negative. With the concentration decreased, the inhibition rate reduced. **Conclusion:** The medium-high concentrated Tongluo Zhitong Decoction may inhibit the proliferation of synovial cells, while low concentrated Tongluo Zhitong Decoction may promote the proliferation of synovial cells.

Key Words Tongluo Zhitong Decoction; MTT method; Knee osteoarthritis; Fibroblast

中图分类号:R274.9;R-332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.05.038

膝关节骨性关节炎(Knee Osteoarthritis,KOA)是多发于老年人中的常见退行性疾病,严重影响老年人的生活质量,但目前为止该病病因尚不明确,也没有一种治疗方法可以从根本上预防、改变或中止 KOA^[1]滑膜炎性反应在骨关节炎病程进展中起到的重要作用^[2]。其中滑膜细胞主要分为巨噬样细胞(A型细胞),成纤维样细胞(B型细胞)和树突状细胞。成纤维细胞是一种介导关节破坏的主要细胞,

抑制成纤维细胞的增殖,可以有效缓解骨关节炎性反应的症状及进展。通络止痛方通过超声促透的方法治疗 KOA 患者的治疗取得了满意的疗效^[3,4]。为了明确通络止痛方对 KOA 滑膜炎性反应细胞的作用,本实验应用 MTT 法检测通络止痛方对 KOA 滑膜炎性反应细胞增殖的影响,进一步明确该方对滑膜成纤维细胞的作用,并探讨其机制。为其进一步研究和临床应用提供基础,现将结果报道如下。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81373662);北京中医药大学自主选题项目(编号:2016-JYB-XS192)

作者简介:杨黎黎(1987.07—),男,博士研究生,研究方向:中医药防治退行性骨关节炎,E-mail:105381902@qq.com

通信作者:王庆甫(1956.10—),男,硕士研究生,教授,主任医师,副院长,研究方向:中医药防治退行性骨关节炎,E-mail:qingpu-wang@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织 人 KOA 炎性滑膜组织源于北京中医药大学第三附属医院行关节置换治疗的 KOA 患者废弃滑膜组织。无菌条件下将取得的滑膜组织去除脂肪、纤维等,加入 PBS 洗涤,PBS 清洗 2 次后放在无菌小青霉素瓶中用解剖剪切碎成糊状。置于 2 mL 0.4% I 型胶原酶的 25 cm² 培养瓶中消化 2.5 h (期间摇匀数次)。经 200 目金属筛过滤。取未黏附的细胞移至离心管中,用 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,反复吹打后将细胞接种在 25 cm² 的培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中。1~2 d 换液 1 次,选取 3~4 代细胞,纯度大于 98%,经鉴定后用于实验。

1.1.2 试剂与仪器 胎牛血清购自四季青公司。RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)、I 型胶原酶均购自 Gibco 公司。MTT(噻唑蓝)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。ELX800 型酶联免疫检测仪(美国生物技术仪器公司)、BH-2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);96 孔细胞培养板,美国 Corning;CO₂ 培养箱,美国 Thermo Scientific;25 cm² 培养瓶,丹麦 NUCU 公司;四环冻干机,北京四环科学仪器厂有限公司。

1.1.3 药物制备 通络止痛处方由桃仁、红花、桂枝、白芍、制草乌、细辛、川椒、牛膝、乳香、没药组成,购于北京中医药大学第三附属医院药房。将上述中药饮片按成方比例置煎煮容器内,加水浸泡,煮沸 30 min,弃药渣取汤剂,经过离心机 2 000 r/min 离心,弃药渣取汤剂,利用冷冻干燥机进行冷冻干燥,粉末状,PBS 溶解,用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,配制成高、中、低浓度 3 组依次为:高浓度组:10/4² mg/mL、10/4³ mg/mL、10/4⁴ mg/mL;中浓度组:10/4⁵ mg/mL、10/4⁶ mg/mL、10/4⁷ mg/mL;低浓度组:10/4⁸ mg/mL、10/4⁹ mg/mL、10/4¹⁰ mg/mL;空白组:0 mg/mL。-20 ℃储存备用。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 KOA 滑膜细胞增殖活性 取生长状况良好的成纤维细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,无菌条件下与含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液经吹打制成滑膜细胞悬液,接种于 96 孔培养板,100 μL/孔,每孔细胞约 1 000 个。每块 96 孔板周边孔用 PBS 填充以避免边缘效应。将细胞放置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 24 h,细胞贴壁并进入对数增长期。

弃上清液,加入已配置的不同浓度通络止痛方 100 μL/孔,每种浓度设置 4 个复孔。置于培养箱中,36 ℃、5% CO₂ 培育 24 h。培养箱培育后吸弃各孔药物,用 PBS 洗 3 遍。换入 5 mg/mL 的 MTT-PBS 液 10 μL/孔,无血清的 RPMI-1640 培养基 100 μL 继续培养 4~6 h 后,终止培养。弃上清,加 DMSO 100 mL/孔震荡 10 min 后,在 ELX800 型酶标仪上测其在 490 nm 波长处的吸光 OD 值(A)。用 A 值按如下公式计算各浓度药物干预后的细胞抑制率,公式如下:

抑制率(%) = (A_{空白} - A_{药液}) / A_{空白} × 100%,抑制率为正数时,表明该药物对细胞的增殖有抑制作用,抑制率为负数时表明该药物对细胞的增殖有促进作用。

1.2.2 形态学观察 倒置显微镜观察各组不同浓度细胞的生长特点及形态。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,采用 One-way ANOVA 分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下观察滑膜细胞的生长 原代培养细胞 4 h 可见细胞贴壁(图 1),细胞成星状,通过 3~4 条树突与培养瓶相贴,细胞器不明显,细胞密度稀疏。随培养时间至 3~4 代细胞(图 2),形态成滑膜成纤维细胞呈梭形、树突样,胞核狭长,增殖旺盛,细胞器可见。低浓度通络止痛方对人 KOA 滑膜细胞生长有促进作用,细胞数量明显增多。高浓度通络止痛方对于细胞生长有抑制作用,可见少量细胞漂浮,紧密排列无规则,外观多由梭形皱缩为圆形。

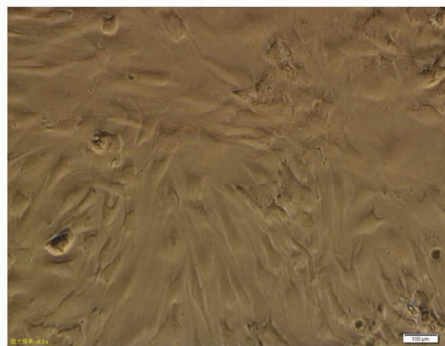


图1 原代培养 4 h 贴壁 KOA 滑膜细胞

2.2 MTT 法测定不同浓度组 KOA 滑膜细胞增殖活性 加药组组间与加药组与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 法检测随通络止痛方浓度减小 KOA 滑膜细胞在 490 nm 波长处吸光 OD 值

数越大。见表 1。高、中浓度组通络止痛方对于 KOA 滑膜细胞的增殖有抑制作用,随浓度的增加,抑制作用增强,高浓度较中浓度的抑制率明显增加,但高浓度中,随着浓度增加,抑制率的增长幅度减小。低浓度组的通络止痛方对滑膜细胞有增殖有促进作用。随浓度的减低,促进作用增强,但低浓度中,随着浓度减低,促进作用的增强幅度减低。见表 2、图 3。

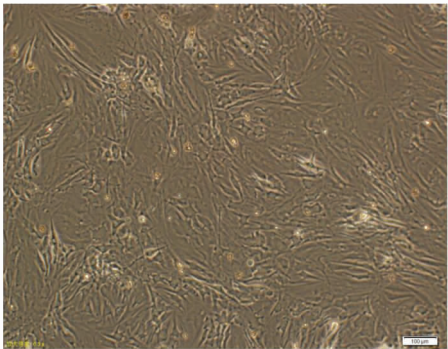


图 2 KOA 滑膜 3~4 代细胞细胞

表 1 通络止痛方干预对 KOA 滑膜细胞增殖影响的 OD 值($\bar{x} \pm s$)

分组	通络止痛方剂量 (mg/mL)	OD
高浓度组	10/4 ²	1.407 ± 0.042 *
	10/4 ³	1.466 ± 0.032 *
	10/4 ⁴	1.623 ± 0.038 *
	10/4 ⁵	1.888 ± 0.070 *
中浓度组	10/4 ⁶	2.076 ± 0.059 *
	10/4 ⁷	2.412 ± 0.081 *
	10/4 ⁸	2.784 ± 0.075 *
低浓度组	10/4 ⁹	3.005 ± 0.096 *
	10/4 ¹⁰	3.059 ± 0.114 *
空白组	0	2.656 ± 0.075

注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度通络止痛方对 KOA 滑膜细胞增殖抑制率 (%)

分组	通络止痛方剂量 (mg/mL)	抑制率
高浓度组	10/4 ²	47.02%
	10/4 ³	44.82%
	10/4 ⁴	38.88%
	10/4 ⁵	28.92%
中浓度组	10/4 ⁶	21.82%
	10/4 ⁷	9.19%
	10/4 ⁸	-4.82%
低浓度组	10/4 ⁹	-13.15%
	10/4 ¹⁰	-15.16%
空白组	0	—

3 讨论

KOA 是关节炎里最常见的疾病,根据人口统计学资料预测,到 2020 年,受关节疾病影响的人口比

例将占到全世界人口的 50%,将有 5.7 亿人受到 KOA 的困扰。KOA 是世界上导致残疾的第八大疾病^[5]。尽管如此,但 KOA 发病机制还不清楚。并且到目前为止,还没有一种治疗方法可以从根本上预防、改变或中止 KOA 的疾病进程^[6]。最后多数 KOA 晚期患者不得不通过接受膝关节置换术,来“治愈”KOA。而很多 KOA 患者由于自身身体条件及家庭经济承受能力所限,无法接受膝关节置换术。因此,研究 KOA 的发病机制,并寻找防治 KOA 的有效治疗药物及手段是保证国民健康,提高 KOA 患者生活质量和减轻国家医疗负担的迫切需求。尽管 KOA 被普遍认为是一种退行性疾病,但滑膜炎性反应在 KOA 病理和临床的重要作用逐渐被认识^[7]。骨性关节炎的病因学主要表现在 2 个方面:一是关节软骨破坏导致软骨细胞生物学特性改变,二是滑膜炎性反应致使滑膜细胞释放炎症反应递质。有研究报道,骨性关节炎中关节软骨在致病因素作用下被破坏后,释放碎片进入滑液,刺激滑膜引起滑膜炎。滑膜炎释放炎症反应递质,进一步降解软骨,而复始造成恶性循环,故滑膜炎的存在是骨性关节炎软骨损伤及骨性关节炎慢性持续化的重要原因^[8]。因此,因此探讨对于滑膜炎的干预药物,对研究治疗滑膜炎及延缓治疗 KOA 有重要意义。

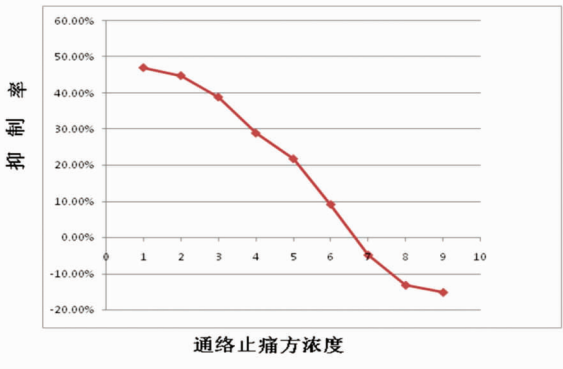


图 3 不同浓度通络止痛方对 KOA 滑膜细胞增殖抑制率 (%)

注:1~9 代表浓度 10/4²~10/4¹⁰ mg/mL。

了解细胞的存活与增殖情况,在细胞水平研究中是非常重要的。目前,主要的检测方法有同位素掺入法和活细胞计数法。前者利用放射同位素,机器价格昂贵,污染较大。后者结果易受主观因素影响,操作繁琐,误差大。因此 2 种方法都有一定的使用限制。MTT 法应用原理是线粒体 MTT 法的主要原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的紫色结晶物甲瓚 (Formazan),并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。

以其简便、经济、安全等特点,而被广泛使用。

通络止痛方是我们导师凭借多年治疗 KOA 的经验总结而成,组成包括:桃仁、红花、桂枝、白芍、制草乌、细辛、川椒、牛膝、乳香、没药。主要功效包括活血化瘀,通络止痛。其中白芍、桂枝为通络止痛汤的君药,桂枝辛甘温,有温通经脉,助阳化气之功效;白芍苦、酸、微寒,有养血敛阴,柔肝止痛之功效。两者合用一敛一散,一补一开,解肌发表,调和营卫,使发汗而不伤阴,气血调而不伤气。两药合用亦可治疗气血不调导致的四肢酸楚、麻木、疼痛等。以桃仁、红花、乳香、没药为臣药,可活血祛瘀、行气止痛、舒筋通络。红花、桃仁为活血化瘀常用药对。红花辛温,主入心、肝经,散瘀止痛。《医学衷中参西录》云:“乳香、没药,二药并用,为宣通脏腑、流通经络之要药,……具通气活血之力,又善治风寒湿痹,周身麻木,四肢不遂及一切疮疡肿疼,或其疮硬不疼。”这 4 味药可加强行气活血化瘀的药力,正所谓“治风先治血,血行风自灭”。制草乌、细辛为本方的佐药,具有祛风除湿、温经散寒、消肿止痛之效。川椒为本方的使药,具有活血祛瘀、祛风利湿之效。牛膝“性善下行”,具有良好的引经作用,且有补肝肾,强筋骨之功。全方组成严谨,配伍精湛。

为了增加该方有效的理论依据,我们进行了一系列临床及基础研究。临床试验发现,通络止痛外治法治疗 KOA 可有效减轻患者疼痛、改善膝关节功能^[3];动物实验发现,通络止痛外治法能够显著抑制兔 KOA 滑膜细胞炎症反应因子生成^[9-10];作用于大鼠不同程度 KOA 中通过降低血清中软骨基质相关细胞因子 CTX-II、COMP 和 MMP-3 含量可以有效减缓或阻止膝关节软骨的退行性变^[11-12];将该方君药桂枝的有效成分桂皮醛作用于人 KOA 滑膜细胞,证明 DAMPs/Toll 样受体(TLRs)介导的 NF- κ B 炎症反应通路在骨性关节炎滑膜炎性反应中起到重要的调控作用,NF- κ B 通路上的许多基因均参与骨性关节炎滑膜炎性反应^[13]。将该方君药桂枝、白芍的有效成分桂皮醛、白芍总苷作用于人 KOA 滑膜细胞,对骨性关节炎滑膜炎性反应起到调控作用,参与骨性关节炎滑膜炎性反应^[14]但是该方作为成方进行的研究还没有开展,导致作用机制尚不清楚,限制了其在临床的广泛应用。本实验建立人 KOA 滑膜成纤

维细胞体外培养体系,以 MTT 法^[15]观察不同浓度通络止痛方对人成纤维细胞增殖的影响,筛选出合适药物浓度。进一步探讨通络止痛方的作用机制,为该方剂进行新药开发研制、走向市场提供一定的实验参数。

参考文献

- [1] FAWAZ-ESTRUP F. The osteoarthritis initiative: an overview [J]. Med HealthRI, 2004, 87(6): 169-171.
- [2] Benito MJ, Veale DJ, Fitzgerald O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(9): 1263-1267.
- [3] 殷岳杉. 低频超声促透通络止痛汤治疗膝关节骨性关节炎 30 例病例报告及促透机理研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [4] 王庆甫, 祁印泽, 陈兆军, 等. 超声电导透射通络止痛中药外治膝骨性关节炎的临床观察 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(4): 283-285.
- [5] Irehfield, P. C. Osteoarthritis overview [J]. Geriatr Nurs, 2001, 22(3): 124-130, quiz 130-131.
- [6] Fawaz-Estrup, F. The osteoarthritis initiative: an overview [J]. Med Health RI, 2004, 87(6): 169-171.
- [7] Jan B, Blom AB, Shane W, et al. The role of synovial macrophages and macrophageproduced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62: 647-657.
- [8] Haynes M K, Hume J B. Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids [J]. Cln Immunol, 2002, 105(3): 315.
- [9] 王庆甫, 马玉峰, 殷岳杉, 等. 低频超声促透中药对兔膝关节炎细胞因子的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(2): 108-112.
- [10] 殷岳杉, 王庆甫, 马玉峰, 等. 低频超声促进中药桂枝局部透入的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 825-828.
- [11] 戚晴雪, 马玉峰, 吴忌, 等. 低频超声促透通络止痛中药对不同程度膝骨关节炎大鼠模型 CTX-II、COMP 及 MMP-3 的影响 [J]. 世界中医药, 2015, 10(4): 564-569.
- [12] 戚晴雪, 马玉峰, 吴忌, 等. 低频超声促透通络止痛方对大鼠不同程度膝骨关节炎的影响 [J]. 南京中医药大学学报:自然科学版, 2014, 30(3): 244-248.
- [13] 石鑫超. 通络止痛外治法通过 Toll 样受体通路干预骨关节炎滑膜炎炎症机制的研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [14] 王欢, 王庆甫, 杨黎黎, 等. 白芍总苷对人膝骨关节炎滑膜成纤维细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4853-4856.
- [15] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版社, 1996: 187.

(2016-06-16 收稿 责任编辑:白桦)