

痛痹颗粒对兔软骨细胞增殖及其分泌 NO 影响的实验研究

★ 董朝岚 (南京中医药大学 2003 级硕士研究生 南京 210029)

★ 朱莹莹 (江苏省中医院临床研究所 南京 210029)

摘要:目的:观察痛痹颗粒含药血清对兔软骨细胞增殖的影响,并初步探讨其作用机制。方法:兔软骨细胞体外培养技术及血清药理学方法。结果:痛痹颗粒含药血清能显著促进软骨细胞增殖,并降低软骨细胞培养上清液中 NO 的含量。结论:痛痹颗粒含药血清促进软骨细胞增殖、抑制 NO 的分泌可能是其防治骨性关节炎的机理之一。

关键词:痛痹颗粒;兔软骨细胞;NO;实验研究

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

痛痹颗粒是江苏省中医院风湿科治疗 OA 的经验方,临床疗效显著,本研究拟采用兔软骨细胞体外培养技术及血清药理学方法,观察痛痹颗粒含药血清对兔软骨细胞增殖和软骨细胞分泌 NO 的影响,进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂:RPMI1640 培养液(Gibco)、II 胶原酶(南京夏斯生物公司)、胰蛋白酶(上海伯奥生物技术有限公司)、MTT(南京夏斯生物公司)、DMSO(分析纯)、新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。

司)、NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

仪器:酶标分析仪(BIO-RAD3550)、培养箱(HeraeusBB16 CO₂)、超净台(苏州安泰空气技术有限公司 SW-CJ-1F)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂 XDS-1B)。

动物来源:由南京青龙山动物饲养厂提供。

1.2 方法

1.2.1 兔血清制备 分别制备正常兔血清和痛痹颗粒含药血清:取正常新西兰大白兔,每组 3 只,雄性,体重在 2.25~2.50 kg 之间。痛痹颗粒为江苏省中医院院内制剂,按体表面积折算动物的等效剂

3 讨论

章赣湘^[1]曾报道核桃枝中含有肌醇、咖啡酸、没食子酸、挥发油等成分,对肿瘤有抑制作用。根据我们前期实验结果表明,山核桃树枝水煎剂对小鼠体内 S₁₈₀肉瘤生长有抑制作用,抑瘤率为 34.03%,山核桃树枝水煎剂与 CTX 合用,抑瘤效果更加明显,可达到 79.17%。体外实验未见山核桃树枝水煎剂对 S₁₈₀肉瘤细胞有直接杀伤作用,由此推测,山核桃树枝水煎剂的抗肿瘤作用是通过机体免疫系统的调节来完成的。

研究表明,抗肿瘤免疫反应主要是细胞免疫反应,其中 T 淋巴细胞亚群起主导作用。若 T 淋巴细胞亚群间数量的增减,功能改变或比例失衡,均可导致机体免疫功能紊乱,从而引起免疫缺陷病或肿瘤等疾病的发生。

本实验表明,荷瘤小鼠外周血 T 细胞亚群中不同细胞比例出现异常,表现为 CD₄⁺ 细胞减少,CD₈⁺ 细胞增多,这些变化可通过 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞比值得到更敏感的反映。荷瘤机体 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞比值下降,使小鼠机体免疫功能在很多方面都表现出减弱。而用山核桃树枝水煎剂治疗后,CD₄⁺ T 细胞增加,CD₈⁺ T 细胞降低,可明显改善 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞的失衡状态,恢复机体正常的免疫状态,而发挥抗肿瘤的作用。

综上所述,山核桃树枝水煎剂在荷瘤机体中抑瘤作用可能是通过调节荷瘤机体异常的免疫状态而发挥抗肿瘤作用的。

参考文献

[1]章赣湘.晚期恶性肿瘤的中医药治疗[J].江西中医学院学报,2000,12(3):6~7

(收稿日期:2005-09-22)

量,再配成 2 ml/kg 溶液灌胃,正常兔血清以生理盐水 2 ml/kg 灌胃。连续 3 天,最后 1 天连续 2 次灌胃,中间间隔 2 小时,在末次灌胃 3 小时耳缘静脉采血。放置 1 小时,离心(2 500 r/min)30 分钟,抽取血清,56 ℃、30 分钟灭活,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,分装, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 软骨细胞的分离与培养 参考文献[1]方法并略加改动,取 4 周龄的新西兰大白兔,无菌条件下取后肢膝关节软骨,剔除滑膜和骨组织,用 PBS 溶液清洗 2 次,然后将软骨组织机械分离成约 1 mm³ 大小的组织块,移入培养瓶,按 1:6 体积比加入 0.1% II 胶原酶,37 ℃ 消化 7 小时,200 目网筛过滤后,将上清液离心 8 分钟(1 200 r/min),然后倒掉上清液,加入 PBS 溶液清洗 2 次,最后加入 15% 小牛血清 1640 培养液,反复吹打后将软骨细胞接种在 75 cm² 的培养瓶中,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中。逐日观察,2~3 天换 1 次液,原代细胞长满后传代,取 1~3 代细胞作实验用。传代细胞接种在 96 孔板中,接种密度 2×10⁴ 个细胞/孔,正常培养待细胞贴壁后,分别换用含有正常兔血清(对照组)和痛痹颗粒血清(痛痹颗粒组)的培养液培养,血清浓度分别为 5%、10%、20%。48 小时后加入 5 mg/mL MTT 20 μL/孔,孵育 4 小时后,加 DMSO 200 μL/孔,15 分钟后在酶标仪上测 OD 值,波长为 595 nm。

1.2.3 NO 的检测 参照试剂盒说明书操作。

1.2.4 统计学方法 各组数据以 $\bar{x} + s$ 表示,用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对软骨细胞增殖的影响

见表 1。

表 1 痛痹颗粒对家兔软骨细胞增殖的影响

组别	n	OD 值		
		5% 血清	10% 血清	20% 血清
对照组	8	0.4262 ± 0.0476	0.4103 ± 0.0279	0.4650 ± 0.0693
痛痹颗粒组	8	0.5606 ± 0.0435 **	0.6307 ± 0.0566 **	0.6834 ± 0.0826 **

注:与相应浓度血清的对照组比较, * * *P* < 0.01。下表同。

2.2 对软骨细胞分泌 NO 的影响

见表 2。

表 2 痛痹颗粒对家兔软骨细胞分泌 NO 的影响

组别	n	NO		
		5% 血清	10% 血清	20% 血清
对照组	8	17.3077 ± 0.0476	17.8846 ± 1.5247	19.5192 ± 1.1584
痛痹颗粒组	8	12.4038 ± 2.2684 **	13.1731 ± 1.3284 **	13.2692 ± 1.4094 **

3 讨论

骨关节炎是一种慢性退行性关节疾病,其主要的病理特征是软骨骨质的降解和软骨中细胞数目明显减少,软骨基质的合成和分解代谢失调,最终关节软骨被破坏。而软骨中唯一的细胞是软骨细胞,软骨基质主要是由软骨细胞合成和分泌,关节软骨损伤后主要由软骨细胞的增殖和分化来修复。在正常生理情况下,关节软骨生化代谢保持着动态平衡,并受众多细胞因子的调控,其中 NO 等细胞因子在关节软骨的破坏中起重要作用。正常关节软骨细胞有少量的 NO 分泌,从而维持细胞—细胞间信息传递,拮抗氧自由基的氧化损害反应^[2]。而骨关节炎患者关节内软骨组织在诸如滑液内低氧分压液、pH 值降低、软骨缺血、细胞因子、创伤等多种病例因素刺激下,NO 被过度的表达和调控,明显高于正常人。研究表明,高浓度 NO 可通过抑制软骨细胞增殖,促进软骨细胞凋亡,改变蛋白多糖和胶原蛋白的合成与分泌功能,抑制软骨细胞合成软骨基质,促进软骨细胞糖酵解,从而导致关节软骨修复能力降低、软骨破坏增加,加速软骨退变^[3]。

中医学将骨关节炎纳入“骨痹”的范畴,是由于正气不足,感受风寒湿热之邪注于经络,留于关节,使气血痹阻而为痹证。因此中医治疗 OA 内治法则多以祛风除湿、散寒、清热、舒经通络为基本原则,日久参以益气养血、补养肝肾、扶正祛邪^[4]。痛痹颗粒是以独活为君药,祛下焦与筋骨间风寒湿邪;桑寄生、淫羊藿、怀牛膝补肝肾、强筋骨、通经络;当归养血柔肝、舒筋活血;川芎活血行气;制南星燥湿化痰、消肿止痛;虎杖活血清热解暑,同时防诸药辛燥太过。

本实验结果表明,痛痹颗粒含药血清具有促进软骨细胞增殖和抑制软骨细胞分泌 NO 的作用,这可能是痛痹颗粒治疗 OA 作用机理的两个方面。痛痹颗粒能促进软骨细胞的增殖则可能是通过其抑制 NO 的分泌实现的。

参考文献

- [1]魏玉玲,刘晋杰,梁克玉. 消痹灵治疗骨性关节的机制探讨[J]. 现代康复,2001,5(4):66
- [2]彭丹,孙材江,陈游. 膝关节骨关节炎患者中一氧化氮的动态变化及其临床意义[J]. 现代康复,2000,4(8):1 192
- [3]Tomita M, Sato EF, Nishikawa M, et al. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2001, 41: 96
- [4]张伯史. 中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990. 265

(收稿日期:2005-09-13)