

本文引用:廖亮英,李 点,伍参荣.黄芪虫藤饮对类风湿关节炎大鼠关节滑膜细胞生长增殖的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):31-35.

黄芪虫藤饮对类风湿关节炎大鼠关节滑膜细胞生长增殖的影响

廖亮英¹,李 点^{1*},伍参荣²

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨黄芪虫藤饮对类风湿关节炎大鼠关节滑膜细胞增殖的影响。**方法** 无菌条件下分离正常大鼠和类风湿关节炎(RA)模型大鼠关节滑膜组织,制成单个滑膜细胞,流式细胞术鉴定后,取培养第三代的关节滑膜细胞进行药物干预,用MTT法测定药物对细胞增殖抑制作用;用流式细胞术检测细胞凋亡率以及细胞周期。**结果** 正常组大鼠关节滑膜细胞增长率与RA空白组(0.00 mg/L)比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同浓度(100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 0 mg/L)黄芪虫藤饮对RA大鼠关节滑膜细胞增殖均有明显的抑制作用,细胞凋亡率明显高于空白组($P<0.05$),并能诱导滑膜细胞G0/G1期的细胞生长停滞,且呈现典型的剂量依赖性。**结论** 黄芪虫藤饮能抑制RA关节滑膜细胞的活性,促进细胞凋亡,可以较好地应用于临床。

[关键词] 黄芪虫藤饮;类风湿关节炎;关节滑膜细胞;细胞增殖

[中图分类号]R593.22;R289.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.01.008

Effects of Huangqi Chongteng Drink on the Growth and Proliferation of Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis Rats

LIAO Liangying¹, LI Dian^{1*}, WU Canrong²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Huangqi Chongteng drink on the proliferation of synovial cells in rats with rheumatoid arthritis. **Methods** The synovial cells of normal rats and RA model rats were isolated under aseptic condition to prepare single synovial cells. Flow cytometry was used to identify the third synovial synoviocytes. The inhibitory effect of the drug on cell proliferation was measured by MTT assay. The apoptotic rate and cell cycle were measured by flow cytometry. **Results** The growth rate of synovial cells in the normal group was significantly higher than that in the blank group (0.00 mg/mL) ($P<0.05$). Different concentrations of Huangqi Chongteng drink (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 0 mg/mL) had obvious inhibition effect on the proliferation of synovial cells in RA rats, and the cell death rate was significantly higher than that of the blank group ($P<0.05$). The cell growth rate of G0/G1 phase in synovial cells was significantly higher than that in the blank group. **Conclusion** Huangqi Chongteng drink can inhibit the activity of synovial cells in RA model rats and promote cell apoptosis, which can be applied in clinical practice.

[Keywords] Huangqi Chongteng drink; rheumatoid arthritis; synovial cells; cell proliferation

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种和破坏性的自身免疫性疾病^[1-2]。滑膜组织的炎性增生、关节软骨的进行性破坏是RA典型的病理改变,以关节滑膜为主要靶组织的慢性、系统性、炎症性

[收稿日期]2017-09-14

[基金项目]湖南省科技计划项目资助(2012SK3140)。

[作者简介]廖亮英,女,硕士,助理研究员,研究方向:风湿性疾病的中医药防治研究。

[通讯作者]*李 点,女,教授,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:1103968933@qq.com。

而在这一病理过程中起着关键作用的是成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)^[3-4]。因此,促进 FLS 凋亡,抑制其异常增殖有可能成为治疗 RA 的一条有效途径。黄芪虫藤饮系国医大师熊继柏教授自创方,辨治本病临床已取得显著疗效^[5],本课题组前期实验研究初步证明了中药复方黄芪虫藤饮对 II 型 CIA 具有较好的抗炎、免疫调节作用^[6]。本实验通过研究黄芪虫藤饮对 RA-FLS 增殖的影响,探讨其作用机制,为黄芪虫藤饮在临床上的应用提供更充实的实验依据。

1 材料

1.1 药物

黄芪虫藤饮由黄芪、海风藤、络石藤、僵蚕、甘草等中药组成,由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供,浓度:1×10⁶ mg/L,批号:151242,过滤除菌后,4℃保存备用,供实验用。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只,♀♂各半,体质量(100±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产批号:SCXK(湘)2011-0003,所有动物 SPF 实验室适应性饲养 1 周后进行实验。

1.3 试剂

胶原酶 II (Collagen II):购自美国 sigma 公司,20 mg 溶于 10 mL PBS 溶液,配制成浓 2 mg/mL 溶液,用 0.22 μm 过滤器滤过除菌,放置于-20℃备用。0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)、DMEM/F-12 培养基:购自 GIBICO 公司,放置于-20℃备用。D-hanks 溶液:购自 GIBICO 公司,放置室温备用。PBS 溶液:购自 GIBICO 公司,放置室温备用。100×青霉素链霉素双抗液:杭州吉诺生物公司,分装后放置于-20℃备用。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 CD90 单克隆抗体:北京中科晨宇生物有限公司(美国 sigma 原装产品),货号:163043。MTT:购自 sigma 公司;二甲亚砜(DMSO):购买自 sigma 公司。

1.4 主要仪器

MK3 酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司产品);Aria II 流式细胞仪(美国 BD 公司产品);BX43 奥林巴斯荧光显微镜(日本奥林巴斯公司产品)。

2 方法

2.1 II 型 CIA 模型的建立^[6]

用 0.5 mol/L 醋酸溶解 II 型胶原蛋白(2 mg/mL,

4℃,过夜),再与等量的弗氏不完全佐剂(IFA)混合,于冰浴中充分乳化。用生理盐水配置 2%戊巴比妥钠麻醉剂,按 0.2 mL/100 g 腹腔注射麻醉。用手术剪剪掉尾部皮毛,75%酒精消毒。取乳化后大鼠 CIA 造模剂,按 0.2 mL/只于大鼠尾根部、背部、右后肢足趾多点皮内注射,见到局部圆形皮丘肿起,为注射成功。造模后第 7 天按原方法注射 II 型胶原蛋白 0.2 mL/只做加强免疫 1 次。

2.2 大鼠关节滑膜细胞的培养与传代

实验方法参考文献^[7]改良后进行操作,于超净工作台内分别取出正常组和模型组大鼠关节滑膜组织,用含青霉素和链霉素双抗的 PBS 漂洗 3 遍,分离并弃去混杂的脂肪组织和少量肌肉组织后剪碎、剪成 1 mm 大小泥样碎片,加入含 II 型胶原酶 1.0 mg/mL 的 DMEM(浸盖组织碎屑),置入 5%CO₂、37℃孵箱中消化 5 h,900 r/min,5 min,吸弃上清,用含双抗(1×10⁵U/L 青霉素,100 mg/L 链霉素)的 DMEM/F-12 培养液(USA Gibco)重悬滑膜细胞,按 5×10⁴个/cm²接种于培养皿中,放于 37℃、5% CO₂孵箱中,3 d 后换液,弃去不贴壁的细胞,之后每 2 天换 1 次液,待细胞培养至 90%融合时进行传代,第 3 代对数生长期细胞用于实验。

2.3 滑膜细胞的鉴定

实验方法参考文献^[8]改良后进行操作,取第 2 代滑膜细胞,将其接种于盛有载玻片的 6 孔板中爬片,待细胞贴壁后,采用 PBS 清洗 5 min,之后用多聚甲醛(40 g/L)固定 30 min,再用 PBS 漂洗 2 次(每次 5 min),用 1%甲苯胺蓝溶液染色 30 min,经蒸馏水漂洗后于倒置相差显微镜下进行鉴定观察。

2.4 大鼠关节滑膜细胞表面标记检测

取培养第三代的 FLS 细胞,调整细胞浓度 1×10⁸/mL/管加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 CD90(标记成纤维滑膜细胞)单克隆抗体 20 μL,置于冰上避光孵育 20 min,用不加抗体的试管作为阴性对照。每管加入至少 2 mL PBS,1 000 r/min 离心 6 min 后,去上清液,重复 2 次,用 0.5 mL PBS 重悬。流式细胞仪上样检测,重复 3 次。

2.5 不同浓度黄芪虫藤饮对 FLS 细胞增殖影响的测定

实验方法参考文献^[9]改良后进行操作,取对数生长期 FLS 细胞,将其细胞浓度调整为 5×10⁷/L,铺

入96孔板中,每孔0.1 mL,37℃、5% CO₂培养24 h。加入用不含血清的DMEM/F-12培养液稀释的黄芪虫藤饮液(湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供)浓度分别为100.0、50.0、25.0、12.5、6.25、0 mg/L继续培养48 h后,弃上清,每孔加入50 μL MTT液(2.5 g/L),继续培养4 h,弃上清,每孔加入150 μL 二甲基亚砷,摇床低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪490 nm处测得吸光度(A)值。

2.6 不同浓度黄芪虫藤饮对RA大鼠关节滑膜细胞周期与细胞凋亡影响的测定

取培养第三代的模型组对数生长期FLS细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,铺入6孔板中,每孔1 mL,37℃、5% CO₂培养24 h。加入用不含血清的DMEM/F-12培养液稀释的黄芪虫藤饮液,浓度分别为100.0、50.0、25.0、12.5、6.25、0 mg/L继续培养48 h,同时设正常组关节滑膜细胞作对照。收集各组滑膜细胞放置于EP管内,用0.1 mmol/L PBS液洗涤1次,以1 000 r/min离心5 min后,弃掉上清液。

2.6.1 不同浓度黄芪虫藤饮对RA大鼠关节滑膜细胞周期影响的测定

实验方法参考文献^[9]改良后进行操作:(1)将以上处理过的滑膜细胞,用预冷PBS清洗2次后制成细胞悬液。(2)加入胰酶,消化3 min后,加入3 mL DMEM,慢慢吹打细胞成单细胞悬液。(3)1 000 r/min离心3 min。(4)去上清,加入预冷PBS,1 000 r/min离心3 min。(5)去上清,加入预冷的0.5 mL PBS悬浮细胞。(6)加入1.5 mL无水乙醇在漩涡器上涡旋(缓慢滴入)。(7)-20℃条件下固定过夜。(8)取出已固定细胞,1 000 r/min离心3 min后去上清。(9)加入预冷PBS,1 000 r/min离心3 min。(10)去上清,加入500 μL预冷PBS,悬浮细胞。(11)加入10 μL RNA酶37℃水浴消化30 min。(12)400目尼龙网过滤,注入EP管,用封口膜封口。(13)将细胞加入流式管,加PI 1滴上样流式细胞仪。

2.6.2 不同浓度黄芪虫藤饮对RA大鼠关节滑膜细胞凋亡影响的测定

用Annexin-V-FITC标记:取190 μL结合缓冲液悬浮细胞,加入5 μL Annexin-V-FITC,混匀后室温下避光放置10 min;再加入10 μL PI,混匀后室温下避光放置10 min。检测时加入补充结合液300 μL,1 h内用流式细胞仪检测。对照组的细胞,不加Annexin-V-FITC和PI,操作时,用两个标准对照调节荧光补偿,空白对照来调节电压。

2.7 统计学方法

实验数据采用SPSS 16.0统计软件处理,实验结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组前后比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞的形态

对原代培养的FLS进行贴壁分离纯化,细胞传代培养,倒置显微镜观察细胞形态。培养1周正常FLS细胞,细胞呈长梭状,见图1A培养1周模型组FLS细胞,细胞生长迅速,部分形成集落见图1B;甲苯胺蓝染色培养1周正常FLS细胞形态。

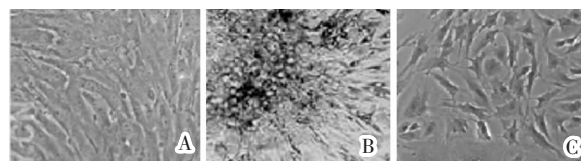


图1 FLS细胞形态光镜图(×400)

3.2 大鼠关节滑膜细胞表面标记CD90检测结果

流式细胞术鉴定所培养的大鼠关节滑膜细胞纯度为:正常组(90.12 ± 1.65),模型组(90.38 ± 1.91),两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见图2。

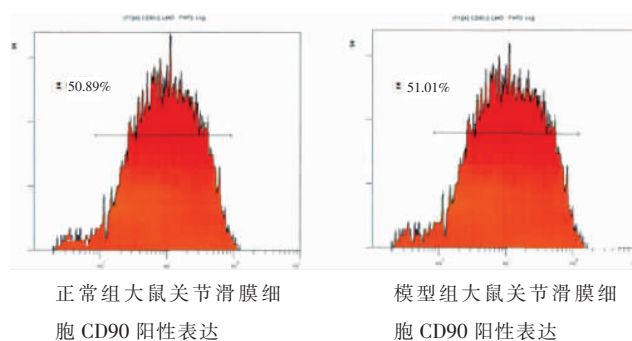


图2 流式细胞术鉴定结果图

3.3 不同浓度的黄芪虫藤饮对关节滑膜细胞增殖的抑制作用

表1 MTT实验结果显示,黄芪虫藤饮对正常细胞基本无毒作用,虽然在100.00 mg/L时与0.00 mg/L组比较A值下降($P < 0.05$),但最大无毒浓度没有超过50%,其他各孔含药浓度与0.00 mg/L组比较,其对正常滑膜细胞未显示出细胞毒性($P > 0.05$),因此,实验中仍按设置浓度用于模型组治疗。表中可以看出空白组大鼠关节滑膜细胞(0.00 mg/L)A值明显高于正常对照组(0.00 mg/L)($P < 0.05$);相同浓度的黄芪虫藤饮比较,模型组A值高于正常对照组,差异有统

计学意义($P<0.05$);模型组大鼠关节滑膜细胞增殖活力随黄芪虫藤饮的浓度增加而逐渐下降,各浓度之间比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示黄芪虫藤饮对病变的关节滑膜细胞增殖有较好的抑制作用。

3.4 黄芪虫藤饮对 RA 大鼠关节滑膜细胞细胞周期的影响

经流式细胞仪检测结果显示:与正常对照组比

较,RA 模型大鼠空白组 (0.00 mg/L)S 期和 G_2/M 期的细胞百分比显著升高,而 G_0/G_1 期的细胞百分比明显下降($P<0.05$);黄芪虫藤饮干预组 S 期和 G_2/M 期的细胞百分比随药物浓度增加而显著下降,而 G_0/G_1 期的细胞百分比明显升高($P<0.05$),具有浓度依赖性,提示:黄芪虫藤饮能诱导滑膜细胞 G_0/G_1 期的细胞生长停滞。见表 2。

表 1 不同浓度的黄芪虫藤饮对关节滑膜细胞增殖的吸光值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	黄芪虫藤饮浓度(mg/L)					
	100.00	50.00	25.00	12.50	6.250	0.00
正常组	0.263±0.019 [#]	0.284±0.016	0.298±0.021	0.289±0.019	0.301±0.022	0.289±0.021
模型组	0.277±0.021 [*]	0.298±0.017 ^{*#}	0.310±0.019 [#]	0.321±0.021 ^{*#}	0.332±0.023 [*]	0.348±0.019 [*]
t 值	2.364	2.473	1.257	2.531	2.516	3.457
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与正常组比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 2 不同浓度黄芪虫藤饮液对 RA 关节滑膜细胞细胞周期的影响结果 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	黄芪虫藤饮浓度/mg·L ⁻¹	G_0/G_1	S	G_2/M	细胞增殖指数
干预组 1	100.00	82.23±3.16 [#]	5.79±1.21 [#]	12.46±1.24 [#]	18.25±2.45 [#]
干预组 2	50.00	79.42±3.22 [#]	7.49±1.15 [#]	14.12±1.27 [#]	21.61±2.42 [#]
干预组 3	25.00	74.67±2.97 [#]	8.36±1.11 [#]	18.34±2.41 [#]	26.70±3.52 [#]
干预组 4	12.50	70.85±3.18 [#]	9.57±1.15 [#]	20.43±1.96 [#]	30.00±3.31
干预组 5	6.250	68.41±3.24	10.33±1.20	22.35±2.21 [#]	32.65±3.42 [#]
空白组	0.00	69.49±2.79 [*]	11.24±1.21 [*]	19.41±1.76 [*]	30.65±2.97 [*]
正常细胞对照组	-	79.74±2.55	7.87±1.18	12.47±1.59	20.34±2.77
F 值		74.73	8.08	10.26	20.33
P 值		$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与正常组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3.5 不同浓度黄芪虫藤饮液对 RA 关节滑膜细胞凋亡率的影响结果

图 3 所示,用不同浓度的黄芪虫藤饮液干预滑膜细胞 48 h 后,用 Annexin-V-PI 复染法定量分析

凋亡细胞的结果显示:与空白组比较,黄芪虫藤饮液干预组的凋亡细胞增多,差异有统计学意义($P<0.05$);黄芪虫藤饮液各剂量干预组组间比较,凋亡细胞的数量随着药物干预浓度的升高而增多。

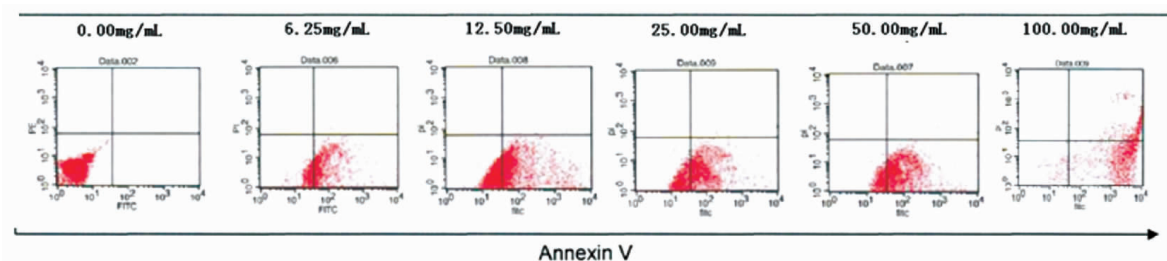


图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡百分率

表 3 所示,与正常对照组比较,空白组大鼠关节滑膜细胞凋亡百分率有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$);黄芪虫藤饮液各剂量组大鼠关节滑膜

细胞凋亡百分率则随药物浓度增加而明显升高,提示:黄芪虫藤饮液有促进类风湿性关节炎大鼠关节滑膜细胞凋亡作用,且显示出药物剂量效应。

表 3 不同浓度黄芪虫藤饮液对 RA 关节滑膜细胞凋亡

组别	率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	
	黄芪虫藤饮浓度 mg/L ⁻¹	凋亡率/%
干预组 1	100.00	41.36±4.15 [#]
干预组 2	50.00	34.24±3.46 [#]
干预组 3	25.00	29.19±3.22 [#]
干预组 4	12.50	20.81±3.34 [#]
干预组 5	6.250	12.43±3.17 [#]
空白组	0.00	4.25±2.81 [*]
正常细胞对照组	-	6.72±2.12
<i>F</i> 值		24.56
<i>P</i> 值		<i>P</i> <0.05

注:与正常组比较,**P*<0.05;与空白组比较,#*P*<0.05。

4 讨论

RA 是一种病因尚未明确的以关节组织炎性疾病为主的系统性自身免疫性疾病。FLS 的异常增生是造成 RA 关节组织损伤和畸变的主要原因之一。其病理表现为 FLS 对凋亡刺激的抵抗增加,引起 FLS 持续增殖,导致关节滑膜慢性炎症改变,关节软骨遭到破坏^[10-11]。FLS 的增殖,是血管翳形成的基础^[12],其可以通过分泌蛋白酶、细胞因子、趋化因子等成分,发挥促侵蚀、趋化炎性细胞、促炎等作用^[13]。

迄今为止,现代医学治疗 RA 尚无特效药物,主要应用是生物制剂,但该类药物长期使用有明显毒副作用^[14]。中医药对 RA 的作用是多方面、多靶点的,在 RA 的治疗方面有独特优势。开展中医药抑制 RA 滑膜炎、促进滑膜细胞凋亡的研究意义重大。黄芪虫藤饮为国医大师熊继柏教授的自创方(黄芪、海风藤、络石藤、僵蚕、甘草等组成),方中以黄芪为君药,“气行则血行”,取其益气通络之用;以僵蚕等虫类药,深入经络驱邪外出,搜风剔络驱邪、止痛;以海风藤、络石藤通利关节,祛瘀生新,流利经脉,共为臣药;再加甘草为使,调和诸药,全方共成补气、活血、通络之剂。前期的临床研究已取得显著疗效,前期相关实验研究初步证明了中药复方黄芪虫藤饮可降低 CIA 大鼠关节症状评分,抑制血清 ESR、RF 升高,对 II 型 CIA 具有较好的抗炎、免疫调节作用^[6]。

本实验研究发现,不同浓度黄芪虫藤饮对 RA 大鼠关节滑膜细胞增殖均有明显的抑制作用,细胞凋亡率明显高于空白组,并能诱导滑膜细胞 G₀/G₁

期的细胞生长停滞,且呈现典型的剂量依赖性。研究表明,黄芪虫藤饮能抑制 RA 关节滑膜细胞的活性,促进细胞凋亡,可以较好的应用于临床。

参考文献:

- [1] 熊旭东.内科学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:314.
- [2] HUANG Y J, SHIQU A L, CHEN S Y, et al. Multivalent structure of galectin-1-nanogold complexeserves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering[J]. Eur Cell Mater,2012,13(23):170-181.
- [3] MIYABE Y, MIYABE C, IWAI Y, et al. Activation of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis via lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor 1 cascade[J]. Arthritis Res Ther, 2014,16(5):461-469.
- [4] EK WALL A K, WHITAKER J W, HAMMAKER D, et al. The Rheumatoid Arthritis Risk Gene LR H Regulates Growth in Fibroblast-like Synoviocytes [J]. Arthritis Rheumatol, 2015,67(5): 1193-1202.
- [5] 李 点.熊继柏教授用黄芪虫藤饮治疗痹证经验[J].湖南中医杂志,2011,27(1):66-67.
- [6] 廖亮英,李 点.黄芪虫藤饮对 II 型胶原性关节炎大鼠抗炎作用及 ESR、RF 的影响[J].湖南中医药大学学报,2014,34(5):18-22.
- [7] 高皖皎,邓秋狄,白殊同,等.佐剂性关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析[J].中国药理学通报,2015,31(12):1693-1698.
- [8] 高皖皎.扁蒴藤素抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及其机制研究[D].广州:南方医科大学,2016:11-14.
- [9] 朱丽艳,杨 林.姜黄素对 CIA 大鼠滑膜细胞增殖及细胞周期的影响[J].时珍国医国药,2013,24(1):87-89.
- [10] 陈秀敏,林昌松,刘清平,等.昆母汤对类风湿关节炎滑膜细胞增殖及凋亡的影响[J].实用医学杂志,2015,31(17):2793-2796.
- [11] BARI C D. Are mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis the good or bad guys[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17(1):113-121.
- [12] SWANSON C D, Akama-Garren E H, EA Stein, et al. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Ameliorates Collagen-Induced Arthritis[J]. Journal of immunology, 2012,188(7):3513-3521.
- [13] BOTTINI N, FIRESTEIN G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1):24-33.
- [14] CONN D L, LIM S S. New role for an old friend: prednisone is a disease-modifying agent in early rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(3):193-196.

(本文编辑 李 杰)