

● 论著 ●

黄板树根提取液对骨性关节炎作用的实验研究*

肖智青¹ 张雄辉¹ 王凤龙¹ 朱锦忠¹ 王爱明¹ 江建明² 肖军²

(1 广东省河源市中医院 河源 517000; 2 南方医院 广东广州 510515)

摘要:目的:探讨滑膜细胞体外培养方法,了解黄板树根在骨性关节炎(osteoarthritis, OA)中的作用及意义。方法:取 OA 患者(n=22)关节滑膜组织,随机分为对照组(n=11)和干预组(n=11),分别原代培养滑膜细胞,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量检测两组滑膜细胞培养上清液中炎症因子 IL-18 蛋白的表达水平。结果:酶消化加组织块贴壁培养法可适用于体外培养试验用滑膜细胞;ELISA 检测 OA 患者对照组细胞培养上清液中 IL-18 的含量为 (61.324 ± 19.281) pg/mL, 干预组细胞培养上清液中 IL-18 的含量为 (20.823 ± 2.746) pg/mL, 具备组间统计学差异($P < 0.05$)。结论:黄板树根可以使 OA 关节滑膜细胞中炎症因子 IL-18 表达下调,提示其可能对 OA 有治疗作用。

关键词:骨性关节炎;黄板树根;白细胞介素-18;滑膜细胞;细胞因子

Abstract:Objective:To explore the culture method in vitro about synoviocyte, to study the effect and significance of Huang Ban tree in osteoarthritis.Methods:Gathered the synovium from OA patients (n=22),divided control group (n=11) and intervention group (n=11), then take primary cell culture. The concentrations of IL-18 were measured in human OA synoviocyte culture fluid of two group by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).Results: Enzymatic digestion and tissue culture were refer to synoviocyte culture in vitro. The average value of IL-18 in control group was (61.324 ± 19.281) pg/mL.The average value in intervention group was (20.823 ± 2.746) pg/mL. There was a significant statistics difference between them ($P < 0.05$).Conclusion:Huang Ban tree could decrease the expression of IL-18 in synoviocyte of OA.It may play an important therapeutical effect role in OA.

Key words:Osteoarthritis;Huang Ban tree;Interleukin 18; Synoviocyte;Cytokine

中图分类号:R 684.3

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.02.001

骨性关节炎(OA)是一种十分常见的老年退行性病变^[1],随着生活节奏的加快和社会人口老龄化的发展,各种因素造成关节软骨损伤和退变已成为骨科最普遍、最重要的问题。调查表明,美国 OA 患者 4 500 万,发病率约占总人口的 20%。在我国 OA 的发病率也在逐步升高。OA 病变主要是对关节滑膜和软骨造成破坏,而关节滑膜和软骨的再生修复能力非常有限,一旦破坏几乎不能逆转。其发生机制主要是抗炎因子与促炎因子失衡导致的关节软骨破坏和滑膜炎反应。多年来,医学研究工作者试图找到一种有效治疗 OA 的方法,从早期的关节腔注射、中期关节镜治疗、后期的人工关节置换,这些都给病人带来沉重的心理压力和经济负担。采用中医药治疗 OA 是否可以取得较好的疗效,长期以来一直是中医学研究者探索的问题,本院采用黄板树根治疗 OA 患者取得满意疗效,但其作用机制尚未见报道。本课题采用单味中药黄板树根进行干预,检测对照组与干预组滑膜细胞培养上清液中炎症因子白细胞介素-18^[2]蛋白的表达水平,明确黄板树根在 OA 中的作用及意义,为 OA 患者的临床治疗提供新的理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2008 年 6 月~2011 年 3 月由河源市中医院收集南方医科大学南方医院行全膝关节置换的 22 例 OA 患者关节滑膜组织,男 8 例,女 14 例,年龄 40~80 岁,平均 (59.9 ± 12.2) 岁,将收集的

滑膜组织随机分为对照组(n=11)和干预组(n=11,加入黄板树根提取液)。所有 OA 患者均符合美国风湿病协会于 2001 年提出的膝 OA 诊断标准,所有对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及器材 含 10%胎牛血清(Gibco)的 DMEM 培养液(Gibco),0.25%胰蛋白酶(Sigma),25 cm 培养瓶,EP 管,离心管,倒置相差显微镜(Olympus),CO₂ 细胞培养箱,超净工作台,人白细胞介素 18 (IL-18),ELISA Kit (Uscnlife Science & Technology Company 武汉中美科技有限公司进口组),黄板树根提取液。

1.3 滑膜细胞体外培养、分组干预及上清液收集 试验主要采用的是滑膜细胞的组织块培养法^[3-4]加酶消化培养法:将前述收取的滑膜组织放入有 PBS 的无菌瓶内,在超净台内弃去 PBS,用 D-Hanks 液漂洗滑膜组织 3 次,尽可能将组织剪碎,然后加入组织培养液离心;离心后用吸管吸取上清液,直接置入培养瓶底进行培养;将离心管下层组织块中加入 0.1%II 型胶原酶,酶量以组织块 3 倍为宜,放 37℃温箱消化 6~8 h,漂洗离心取上清加培养液置于培养瓶培养,剩余滑膜组织块以间距 5 mm 左右放入瓶内,将培养瓶放置入培养箱内,待 4 h 后组织块贴牢,再缓慢加入 3 mL 培养液覆盖组织小块。培养 3 d 后更换培养液,除去未贴壁的组织块,每瓶中加入 4 mL 新鲜培养液,倒置相差显微镜下逐日观察细胞形态,待组织块周围细胞铺满 90%培养瓶底

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30571890)

广东省中药管理局课题(编号 2007309)

• 2 •

面,用胰蛋白酶消化细胞并调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,以 2 mL/孔的量加入至 6 孔板内,并于干预组中以每孔 100 μ L 加入黄板树根提取液,分别培养 1 d 后收集培养液上清,编号,-80 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 将 -80 $^{\circ}$ C 保存的细胞培养上清液放于冰盒完全解冻后,按 ELISA 检测试剂盒说明操作:加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外,余孔分别加标准溶液或待测样品 100 μ L,注意不要有气泡,轻轻混匀,酶标板加上盖,37 $^{\circ}$ C 反应 120 min,弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,60 min。洗板 3 次,350 μ L/每孔,甩干。每孔加检测溶液 B 工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,60 min,洗板 5 次,甩干。依序每孔加底物溶液 90 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光显色 30 min(此时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色,后 3~4 孔梯度不明显)。依序每孔加终止溶液 50 μ L,终止反应(此时蓝色立转黄色)。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,对对照组及干预组滑膜细胞培养上清液 IL-18 含量进行比较,采用 one-way ANOVA 方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 培养细胞的观察 培养细胞相差显微镜下观察,组织块原代培养 3 d 后,细胞从滑膜组织块边缘爬出,5 d 后可见大量的细胞从滑膜组织块边缘爬出,呈长梭状极向排列,大部分为成纤维细胞样细胞,也有部分树突样细胞和巨噬细胞样细胞,7~10 d 形成密集的单层细胞铺满 90% 瓶壁,部分区域呈漩涡状生长。

2.2 ELISA 法检测滑膜细胞中 IL-18 含量 对对照组及干预组滑膜细胞培养上清液 IL-18 含量进行检测后再进行统计学分析, $F=100.882$, $P<0.001$,两组间 IL-18 含量差异有统计学意义。见表 1。

分组	n	IL-18 含量	F 值	P 值
对照组	11	61.324 \pm 19.281	100.282	0.000
干预组	11	20.823 \pm 2.746		

3 讨论

OA 为中老年的常见病,其发病率在 55 岁以上人群中仅次于心血管疾病,位居第二位。研究表明,多种生长因子和细胞因子,如骨形态蛋白(BMPs)、转移生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素 1(IL-1)等都参与 OA 的致病过程。在 OA 病变过程中:关节软骨破坏和滑膜炎反应是 OA 病变的中

心环节。在 OA 中关节软骨在致病因素作用下破坏后,释放碎片进入滑液,刺激滑膜引起滑膜炎。滑膜炎释放炎性介质,进一步降解软骨,从而周而复始,造成恶性循环,故滑膜炎的存在是 OA 软骨损伤及 OA 慢性持续化的重要原因^[5]。

白细胞介素 18(Interleukin-18, IL-18)是近年来人们研究发现的一种新型细胞因子。它具有多种生物学功能,最近研究表明,IL-18 与骨性关节炎的发生发展有密切关系。在关节炎患者的滑液、滑膜、半月板、软骨细胞中均可找到 IL-18,而且在患者血清中也可以找到 IL-18,但是含量比关节液中低,我们前期的试验也证实 IL-18 表达水平与骨性关节炎活动期密切相关^[6-8]。

黄板树根是在吸收河源民间疗法的基础上发掘的单方验方,该药性平,味甘微涩,长期临床实践和民间考察发现该药具有显著清热解毒、消炎镇痛、活血化瘀等作用,对感染性疾病、类风湿性关节炎及 OA 的治疗均获得良好的临床疗效。

对于滑膜细胞的培养,试验中我们采取酶消化法加组织块培养法。大多数滑膜细胞体外培养都采用组织块贴壁培养法,但通过前期试验我们发现:单纯的组织块贴壁法所需滑膜组织量大,且细胞贴壁及生长速度缓慢;在本试验中我们先将滑膜细胞充分剪碎,直接离心提取上清进行培养;然后用 II 型胶原酶对剩余组织进行消化,消化后再行离心,上清液直接提取培养,下层未消化组织行组织块贴壁培养,通过上述三步分离培养,我们可以获得种类较纯且比单纯组织块培养法数量更多的滑膜细胞,酶消化法加组织块培养法可以充分利用所收集滑膜组织,并取得我们试验所需细胞。

本试验通过体外单独培养 OA 患者滑膜细胞,采用黄板树根提取液干预后并对细胞培养上清液进行 IL-18 检测分析,证实了黄板树根可以使 OA 中炎性因子 IL-18 表达下调,体外培养可以排除体内病变时全身免疫系统及内分泌系统可能对 IL-18 分泌造成的影响,能更直接地反应黄板树根在 OA 中的治疗作用,该研究为后期研究提供了理论基础。

参考文献

- [1]Hamerman D.Aging and osteoarthritis:basic mechanisms [J].J Am Geriatr Soc,1993,41:760-770
- [2]Ushio S,Namba M,Okura T,et al.Cloning of the cDNA for human IFN-gamma inducing factor,expression in escherichia coli,and studies on the biologic activities of the protein[J].Immunol,1996, 156 (11): 4 274
- [3]司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版西安公司,2004.72-73

温阳活血利水法对充血性心力衰竭患者甲状腺激素的影响

李林 方家 刘中勇 邓鹏 赖小美

(江西中医学院附属医院 南昌 330006)

摘要:目的:观察温阳活血利水法治疗充血性心力衰竭疗效及对甲状腺激素的影响。方法:将 60 例患者分为两组各 30 例,对照组给予缬沙坦、地高辛、美托洛尔片、螺内酯等西药治疗;治疗组在对照组治疗的基础上予温阳活血利水中药汤剂治疗,均治疗 8 周。观察两组治疗前后心脏功能、6 min 步行距离、甲状腺激素水平变化。结果:总有效率治疗组为 83.33%,对照组为 56.67%;两组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。两组 6 min 步行距离比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。治疗组治疗后 T_3 、 rT_3 、TSH 有改善,与治疗前比较,有显著性意义($P < 0.05$);且优于对照组,有显著性意义($P < 0.05$)。两组治疗前后 T_4 值比较均无显著性差异($P > 0.05$)。结论:温阳活血利水法治疗充血性心力衰竭有效,可改善甲状腺激素水平。

关键词:充血性心力衰竭;温阳活血利水法;疗效观察;甲状腺激素

Abstract:Objective:Observe the effect of Wen-yang-huo-xue-li-shui (WYHXLS) method in treatment of congestive heart failure, and the effects of thyroid hormone.Methods:60 Patients were divided into 2 groups of 30 patients each,the control group was given valsartan, digoxin, metoprolol tablets, spironolactone,and other western medicine therapy;the treatment group was taken the same western medicine as the control group,and also taken the chinese medicine treatment for WYHXLS method.Two group were treated for 8 weeks. Observed the cardiac function six minutes walking distance,thyroid hormone index changes before and after treatment in 2 groups.Results: The total effective rate in treatment group was 83.33%,the control group was 56.67%.The difference of the six minutes walking distance was significant($P < 0.05$). T_3 , rT_3 ,TSH had improved in the treatment group,compared with before treatment,there were significant($P < 0.05$); and was better than the control group, there was significant ($P < 0.05$);before and after treatment, T_4 value showed no significant difference ($P > 0.05$)in 2 groups.Conclusion:WYHXLS method in treatment of congestive heart failure is effective.

Key words:Congestive heart failure;Wen-yang-huo-xue-li-shui method;Clinical observation;Thyroid hormone

中图分类号:R 541.61

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.02.002

充血性心力衰竭(CHF)是各类心血管疾病发展的终末期综合征,临床治疗难度较大。笔者在西药治疗的基础上采用温阳活血利水中药汤剂治疗 CHF 30 例,并与单纯西药治疗 CHF 30 例进行比较。结果报道如下:

1 临床资料

1.1 诊断标准 参照 Framingham 心力衰竭诊断标准、2002 年《中药新药治疗 CHF 的临床研究指导原则》^[1]及中医心肾阳虚型辨证标准^[2-3]。

1.2 一般资料 观察病例为 2010 年 2 月~2011 年 6 月江西中医学院附属医院的心肾阳虚型充血性心力衰竭患者,共 60 例,查阅随机数字表分为对照组、治疗组,每组各 30 例。治疗组男 18 例,女 12 例;年龄 28~69 岁;病程 2~20 年;冠状动脉硬化性心脏病 13 例,高血压性心脏病 8 例,扩张性心肌病 4 例,风湿性心脏病 5 例;心功能 II 级者 8 例,III 级者 16 例,IV 级者 6 例。对照组男 17 例,女 13 例;年龄 26~70 岁;病程 3~21 年;冠状动脉硬化性心脏病 14 例,高血压性心脏病 8 例,扩张性心肌病 3 例,风湿性心脏病 5 例;心功能 II 级者 7 例,III 级者 17 例,IV 级者 6 例。两组在性别、年龄、病程、基础疾

病、主症、体征、心功能分级等方面比较无显著差异($P > 0.05$)。

1.3 治疗方法

1.3.1 对照组 单纯给予西药治疗,用药方法如下:缬沙坦,起始剂量 6.25~12.5 mg,2 次/d;目标剂量 50 mg,2 次/d。地高辛用于心功能 III、IV 级患者,剂量 0.125~0.25 mg,1 次/d,依据心率调整用量。出现液体潴留或有液体潴留者给予利尿剂,先从小剂量开始。高血压患者利尿剂一般选择氢氯噻嗪片,25~50 mg,1 次/d,每日最大量不超过 100 mg。液体潴留明显者选用呋塞米,由起始剂量每日 20 mg 开始逐渐加量,严重时短期使用静脉利尿剂,或者两种以上利尿剂联合使用。螺内酯用于心功能 III、IV 级患者,由起始剂量每日 20 mg 开始逐渐加量。心功能 IV 级患者,每日限钠限水,可依据病情适当输氧,静脉使用短效洋地黄制剂,快效利尿剂或硝酸酯药物。合并感染者,合理选择抗生素抗感染。

1.3.2 治疗组 在对照组西药治疗基础上,给予温阳活血利水剂,方药如下:制附片 10 g、炙黄芪 20 g、桂枝 10 g、丹参 20 g、桃仁 10 g、红花 10 g、茯苓 20 g、益母草 15 g、泽兰 10 g、五加皮 10 g、葶苈子 10 g、

[4]包乐媛,李会强,毕晓阳,等.人滑膜细胞的分离培养与鉴定[J].中国医学检验杂志,2004,5(5):386-388

[5]Haynes MK,Hume JB,Smith JB.Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids[J]. Clin Immunol,2002,105(3):315-325

[6]王凤龙,江建明,杨德鸿,等.IL-18 在骨性关节炎滑膜细胞中的表达

及意义[J].中华风湿病学杂志,2010,14(4):260-262

[7]王凤龙,江建明,王飞,等.IL-18 和 PGE2 在骨性关节炎滑膜细胞中的表达及相互关系[J].南方医科大学学报,2010,30(4):731-733

[8]李勇,江建明,杨德鸿,等.骨关节炎关节滑液中白细胞介素 18 及其它相关因子含量测定[J].南方医科大学学报,2009,29(4):729-731

(收稿日期:2012-01-12)