

# 草薢总皂苷对骨关节炎体外软骨细胞增殖及炎性因子的影响

李强<sup>1</sup> 张亚斌<sup>1</sup> 赵秋芳<sup>1</sup> 李良<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:观察草薢总皂苷(TRI)含药关节液对豚鼠骨关节炎(OA)体外软骨细胞增殖及炎性因子的影响。方法:将 30 只豚鼠进行 OA 造模,OA 造模成功后体外提取关节软骨细胞进行培养、鉴定。将 P3 代软骨细胞分为 TRI 组、阳性药物牛膝总皂苷组(TSA)和空白对照组,分别用 TRI+10% FBS+DMEM:F12(1:1)和 10% FBS+DMEM:F12(1:1)培养液进行培养,对培养后的软骨细胞进行细胞形态学观察,用 CCK-8 法检测细胞增殖情况,免疫荧光检测Ⅱ型胶原蛋白表达,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和基质金属蛋白酶 13(MMP-13)。结果:OA 软骨细胞体外分离成功,经甲苯胺蓝染色和细胞电镜观察鉴定细胞为来源于软骨细胞;CCK-8 法观察 3 组细胞生长曲线,TRI 组在第 2~6 天细胞增殖速度明显高于其他 2 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );连续培养 7 d 后,与空白对照组和 TSA 组比较,TRI 组Ⅱ型胶原蛋白表达显著,差异有统计学意义( $P<0.05$ );ELISA 检测显示,与空白对照组和 TSA 组比较,TRI 组细胞炎性因子 IL-1、TNF- $\alpha$  和 MMP-13 炎性因子显著减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:TRI 含药关节液能有效提高细胞活力,促进软骨细胞增殖,提高Ⅱ型胶原蛋白表达,且降低软骨细胞炎性因子的表达,对证实 TRI 是草薢作用于软骨细胞的主要物质基础具有重要意义。

**[关键词]** 草薢总皂苷;骨关节炎;增殖;炎性因子

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)08-0001-04

## Effects of Total Saponins of Involucate on Proliferation and Inflammatory Factors of Osteoarthritis in Vitro

LI Qiang<sup>1</sup> ZHANG Yabin<sup>1</sup> ZHAO Qiufang<sup>1</sup> LI Liang<sup>1△</sup>

<sup>1</sup> The Fourth People's Hospital of Shaanxi, Xi'an 710043, China.

**Abstract Objective:** To observe the effects of total saponins of rabdosia involucate (TRI) on the proliferation of chondrocytes and inflammatory factors in guinea pig osteoarthritis (OA). **Methods:** Thirty guinea pigs were subjected to OA modeling, and the articular chondrocytes were cultured and identified in vitro after successful OA modeling. P3 chondrocytes were divided into TRI group, positive drug total saponins of achyranthes (TSA) and blank control group (control); TRI +10% FBS+DMEM:F12 (1:1) and 10% FBS+DMEM:F12 (1:1) medium was cultured, the morphology of the cultured chondrocytes was observed, the cell proliferation was detected by CCK-8 method, and the expression of type II collagen was detected by immunofluorescence interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and matrix metalloproteinase (MMP-13). **Results:** The OA chondrocytes were successfully isolated in vitro. The cells were identified as chondrocytes by toluidine blue staining and cell electron microscopy. The growth curves of the three groups were observed by CCK-8 method, and the growth curve was drawn. The cell proliferation rate of the TRI group on days 2~6 compared with the other two groups, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After 7 d of continuous culture, the expression of type II collagen in TRI group was significantly compared with the blank control group and TSA group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); ELISA showed that compared with the blank control group and TSA group, the inflammatory factors IL-1, TNF- $\alpha$  and MMP-13 inflammatory factors in the TRI group were significantly decreased, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** TRI-containing articular fluid can effectively improve cell viability, promote chondrocyte proliferation, increase collagen type II protein expression, and reduce the secretion of inflammatory factors in chondrocyte. It is of great signifi-

基金项目:陕西省自然科学基金面上项目(2017JM8034)

<sup>1</sup> 陕西省第四人民医院(西安, 710043)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: 285747843@qq.com

cance to study that TRI is the main material basis of chondrocyte action by razor.

**Keywords:** total saponins of rhabdosia involucre (TRI); osteoarthritis (OA); proliferation; inflammatory factors

骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) 是骨科临床常见的一种多发性软骨退行性关节炎, 多发于老年人<sup>[1]</sup>, 目前尚无针对性的理想治疗药物<sup>[2]</sup>。人类骨关节软骨是由软骨细胞和大量的软骨基质组成的高度分化的无血管组织, 导致其自我组织修复能力比较差<sup>[3]</sup>。草薢具有利湿去浊和祛风通痹等功效, 主要用于治疗风湿痹痛, 关节不利, 腰膝疼痛等疾病。草薢总皂苷作为草薢提取物的最主要成分, 其是否对治疗骨关节炎发挥主要作用, 目前尚无报道。本研究通过细胞增殖和免疫荧光等实验探讨草薢主要有效成分草薢总皂苷含药关节液对豚鼠 OA 模型软骨细胞体外增殖及胶原表达的影响, 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

DH 豚鼠由西安交通大学实验动物中心提供, 动物合格证号 XAJD2018-1203, 鼠龄 10 个月, 体质量  $(300.00 \pm 2.09) \text{g}$ , 雌雄不限。饲养环境安静, 噪声在 50 dB 以下, 温度  $20 \sim 24^\circ\text{C}$ , 湿度保持在  $40\% \sim 60\%$ , 气流速度  $10 \sim 25 \text{ cm/s}$ 。

### 1.2 实验材料

CCK-8 试剂盒 (美国 GLPBIO)、ELISA 试剂盒 (美国罗氏)、DMEM:F12(1:1)、优级胎牛血清、胰蛋白酶消化液均购自美国 HyClone, 青链霉素混合液、4% 多聚甲醛、甲苯胺蓝染色液均购自北京碧云天有限公司, Collagen II 购自英国 Abcam。草薢总皂苷 (TRI) (陕西省食品药品鉴定所), 硫酸氨基葡萄糖 (批号 6MK2109, 国药产品注册证号 HC2012-0037, 陕西步长医药有限公司提供)。

### 1.3 方法

**1.3.1 骨关节炎模型动物造模与鉴定** 将豚鼠右膝关节包裹在骨关节炎模型造模支具内, 固定 6 周。期间豚鼠正常饮食, 保持足够活动空间, 每天记录豚鼠肢端血液循环情况、支具固定的稳定性、豚鼠活动量等情况。6 周后, 进行骨关节炎模型鉴定。

**1.3.2 含药关节液的制备** 按照药理试验中动物与人体间的等效剂量进行换算: TRI 组, TRI,  $240 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ; TSA 组, TSA,  $200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ; 空白对照组, 蒸馏水 10 mL。药物用蒸馏水稀释成 10 mL 后连续灌服 7 d, 2 次/d。灌胃 7 d 后按照分组对豚鼠膝关节抽吸关节液。操作方法: 无菌条件下行双侧膝关节穿刺注入 DMEM:F12(1:1) 培养液 0.5 mL 等比例冲洗关节液, 并抽取关节液, 经离心、过滤、灭菌, 然后将关节液放入  $-80^\circ\text{C}$  的冰箱保存。

**1.3.3 骨关节炎软骨细胞体外分离培养和鉴定** 造

模成功后, 取豚鼠软骨组织剪成  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  的碎块, 随后依次使用透明质酸酶、胰蛋白酶、II 型胶原酶三种试剂进行消化处理, 最后加入  $10\%$  FBS+DMEM:F12(1:1) 培养液制成单细胞悬液, 等细胞贴壁后传代培养, 并且使用细胞扫描电镜和甲苯胺蓝染色进行软骨细胞鉴定。

**1.3.4 CCK-8 增殖实验** 调整软骨细胞数  $4 \times 10^5$  个/孔, 直接铺板, 待细胞密度至  $80\%$  左右。TRI 组,  $10\%$  TRI 含药关节液+ $10\%$  FBS+DMEM:F12(1:1) 培养液; TSA 组,  $10\%$  TSA 含药关节液+ $10\%$  FBS+DMEM:F12(1:1) 培养液; 空白对照组,  $10\%$  空白含药关节液+ $10\%$  FBS+DMEM:F12(1:1) 培养液。处理结束后,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱内 1~8 d。培养结束后每孔加入  $20 \mu\text{L}$  的 CCK-8,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱内培养避光孵育 3 h, 室温于摇床震荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长测出同一时间点 OD 值, 用测得的 OD 值进行细胞增殖影响的分析。

**1.3.5 免疫荧光染色检测 II 型胶原** 各组对数生长期细胞, 铺板爬片, 4% 多聚甲醛固定, 细胞破膜液浸泡破膜, PBS 清洗, 加入一抗后  $4^\circ\text{C}$  过夜, 次日室温 30 min 后吸取一抗 PBS 清洗, 加入二抗孵育 2 h, 随后显色脱水, 封片, 荧光显微镜下观察 II 型胶原蛋白表达情况。

**1.3.6 ELISA 测细胞上清 IL-1, TNF- $\alpha$  和 MMP-13 表达水平** 细胞以  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞数接种于 24 孔板中。各实验分组和处理同 1.3.4 节。设 6 个复孔, 共培养 48 h 后取出孔板, 采用 ELISA 检测细胞的上清液 IL-1, TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量。

**1.3.7 扫描电镜观察细胞形态** 各组对数生长期细胞接种至 24 孔板,  $10\%$  FBS+DMEM:F12(1:1) 培养液, 18 h 后用 4% 戊二醛在  $4^\circ\text{C}$  冰箱固定 6 h。固定结束后,  $50\%$ ,  $70\%$  及  $90\%$  乙腈依次梯度脱水一次, 每次 10 min,  $100\%$  乙腈脱水 3 次, 每次 15 min。脱水结束后真空干燥培养液。镀金仪电压 1 100 V, 电流 5 mA, 镀金 20 min, 扫描电镜下观察细胞形态。

### 1.4 统计学方法

所有数据应用 SPSS 17.0 软件统计分析, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较用  $F$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OA 模型造模及软骨细胞分离

首先, 用甲苯胺蓝染色和细胞电镜观察豚鼠软骨细胞分离是否成功。实验动物灌胃时操作规范, 细胞分离后正常贴壁生长, 细胞电镜下观察细胞呈多边形

(见图 1A),经甲苯胺蓝染色鉴定细胞呈蓝色(见图 1B),均符合软骨细胞特征,说明实验中 OA 模型造模成功,鉴定分离细胞来源于软骨细胞。

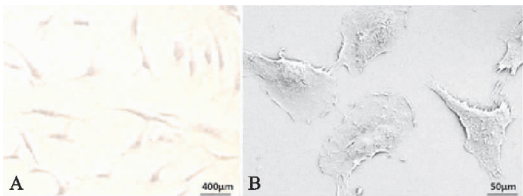


图 1 OA 动物模型分离的软骨细胞鉴定

2.2 CCK-8 检测软骨细胞增殖

CCK-8 检测不同药物处理组细胞之间的增殖能力的差异,结果为第 1~3 天 3 组细胞增殖能力基本相同,第 4~7 天 TRI 组细胞增殖能力明显强于其他 2 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但是随着时间的增加,3 组细胞增殖能力呈逐渐下降趋势,而 TRI 组细胞活力依旧强于其余 2 组,说明 TRI 促进软骨细胞增殖

作用强于 TSA,见图 2。

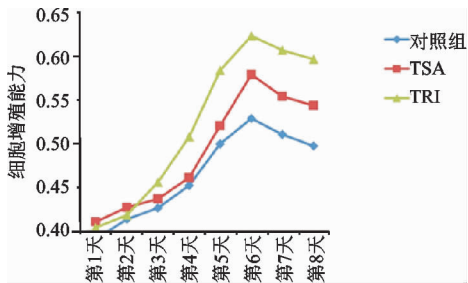


图 2 不同给药处理对 OA 模型软骨细胞增殖能力的影响

2.3 免疫荧光染色检测 II 型胶原蛋白表达

免疫荧光染色检测不同药物处理组之间 II 型胶原蛋白表达情况,结果显示与对照组相比,TRI 和 TSA 均可以显著促进 II 型胶原蛋白表达,但是 TRI 组 II 型胶原荧光染色明显阳性且 II 型胶原蛋白表达多于 TSA 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),说明 TRI 促进软骨细胞 II 型胶原蛋白作用强于 TSA,见图 3。

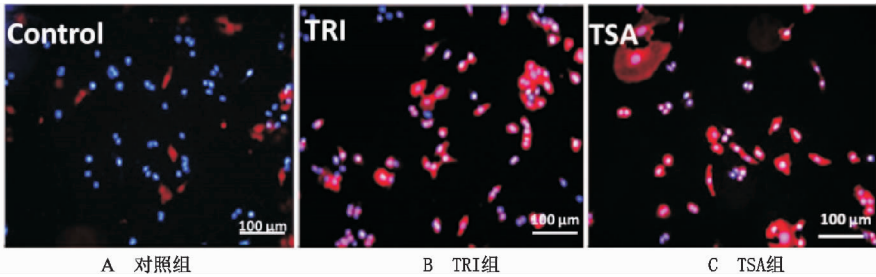


图 3 不同给药处理对 OA 模型软骨细胞 II 型胶原蛋白表达的影响

2.4 ELISA 检测细胞上清液 IL-1, TNF- $\alpha$  和 MMP-13 表达

20 ng/mL TGF- $\beta$  刺激 3 组细胞后 ELISA 检测 3 组细胞培养液中炎症因子的表达,结果显示与空白对照组比较,TRI 组和 TSA 组细胞炎症因子显著减少且 TRI 组炎症因子表达低于 TSA 组,说明 TRI 抑制软骨细胞炎症因子分泌作用强于 TSA<sup>[4]</sup>,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 4。

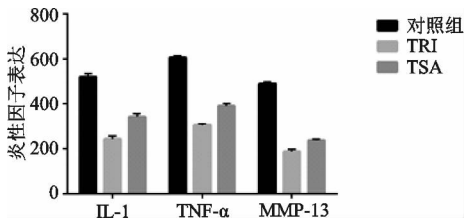


图 4 不同给药处理对 OA 模型软骨细胞炎症因子表达的影响

3 讨论

中医骨伤科研究是祖国传统医学研究的特色领域,具有悠久的历史。软骨关节损伤是骨科临床常见的疾病,尤其以骨关节炎最为常见<sup>[4]</sup>。目前对骨关节炎的发病机制尚不完全清楚,随着老龄化社会的加快,骨关节炎已经成为影响人民身心健康的常见疾病<sup>[5]</sup>。现代医学对骨关节炎的病因尚无明确的答案,很多研究者认为其致病与年龄、肥胖、创伤甚至遗传因素等相

关<sup>[6,7]</sup>。目前针对骨关节炎的药物治疗主要是口服非甾体类抗炎药以及硫酸氨基葡萄糖,或者关节内注射玻璃酸钠,需要患者长期用药,效果不确切,胃肠道反应大<sup>[8-10]</sup>。

传统中药在临床治疗骨科疾病的应用越来越广泛,特别是针对西医没有特别好的治疗策略的骨科慢性疾病,例如骨关节炎。目前很多中药提取物对骨关节炎的治疗作用能够起到和西药类似的疗效,其中以牛膝提取物牛膝总皂苷为代表。但是牛膝根部入药,采集不方便,产量较小,炮制工艺较为繁琐<sup>[11]</sup>。而萆薢也是中药中常用来治疗骨损伤性疾病的,同时取得了良好的临床效果<sup>[12]</sup>。萆薢主要是叶部入药,采集方便,炮制简单,目前萆薢主要有效成分包含多糖类、皂苷类、甾酮类等<sup>[13]</sup>,萆薢有效成分实验研究表明多糖类具有抗氧化和免疫调节作用,皂苷类具有促进蛋白质的合成、使受损细胞再生等作用<sup>[14,15]</sup>。

现有研究表明牛膝含药关节液可以有效促进关节软骨细胞的增殖和胶原表达,由此提出假设萆薢提取物萆薢总皂苷含药关节液对关节软骨细胞是否具有和牛膝总皂苷相同作用。因此本研究通过萆薢总皂苷含药关节液对豚鼠 OA 软骨细胞进行体外共培养,观察 TRI 含药关节液对软骨细胞增殖及胶原表达的影响,

与空白对照组和 TSA 组比较, CCK-8 增殖实验结果表明 TRI 含药关节液能显著促进软骨细胞增殖, 免疫荧光染色检测结果显示 TRI 含药关节液能够促进体外软骨细胞 II 型胶原的表达。有研究指出草薢总皂苷给药干预实验兔骨关节炎模型关节滑膜组织, 结果表明草薢总皂苷可以缓解骨关节炎滑膜病变的严重程度<sup>[16,17]</sup>。Jayasuriya 等<sup>[18]</sup>研究表明 IL-1, MMP-13 和 TNF- $\alpha$  因子具有抑制软骨合成、加快关节软骨降解的作用, 在骨关节炎病理过程中起到重要介导作用。本研究通过 ELISA 检测共培养后细胞上清中 IL-1, TNF- $\alpha$  和 MMP-13 炎性因子表达情况, 结果表明 TRI 组炎性因子明显低于对照组和 TSA 组, 说明 TRI 可以促进软骨的合成、抑制关节软骨的降解。

综上所述, 本研究通过观察 TRI 干预豚鼠体外软骨细胞增殖, 结果显示 TRI 能提高细胞活力、促进软骨细胞增殖、提高 II 型胶原蛋白表达, 并降低 TGF- $\beta$ C 刺激下软骨细胞炎性因子的表达, 对证实 TRI 是草薢作用于软骨细胞的主要物质具有重要意义, 为中药草薢有效成分制剂的开发提供了广阔的前景和科学依据。

## 参考文献

- [1] 杨小莉, 甘永勇, 陈慕芝. 50 例类风湿关节炎与骨关节炎患者临床特点分析[J]. 新疆中医药, 2019, 37(1): 20-21.
- [2] 郭梦如, 何东仪. 骨关节炎治疗的中医药研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(1): 73-75.
- [3] 谭乔燕, 李灿, 谢杨丽, 等. 关节软骨干/祖细胞治疗关节软骨缺损研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2019, 40(2): 104-107.
- [4] 黄峰泉, 胡玉洁, 池雷霆. 中西医结合治疗踝关节软骨损伤研究概况[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(3): 92-94.
- [5] 陈志豪, 沈磊, 赵静婷, 等. 关节软骨损伤的外科治疗进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 95-100.
- [6] HUANG Y Z, XIE H Q, SILINI A, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells derived from articular cartilage, synovial membrane and synovial fluid for cartilage regen-

eration; current status and future perspectives[J]. Stem Cell Rev, 2017, 13(5): 575-586.

- [7] DECKER R S. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 62: 50-56.
- [8] 王睿翔, 唐良华, 杨伟瑞, 等. 近几年现代药物治疗膝骨关节炎进展的概述[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(9): 50-53.
- [9] 吴江怡, 陈昊, 杨柳. 骨关节炎的关节腔内注射药物及生物制剂治疗现状[J]. 骨科临床与研究杂志, 2019, 4(2): 113-119.
- [10] 刘环, 杨鹏. 糖皮质激素联合抗风湿类药物治疗类风湿关节炎的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4(7): 33-34.
- [11] 屠万倩, 张留记, 刘晓苗, 等. 牛膝及其炮制品中甾酮类和皂苷类成分的含量比较[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 89-93.
- [12] 张哲旗, 张文举, 杨豪. 草薢消痛饮治疗急性痛风性关节炎的临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(24): 100-101.
- [13] 陈冲, 曾臣红, 张斯琪, 等. 草薢的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3488-3496.
- [14] 晁利平, 刘艳霞, 瞿璐, 等. 绵草薢的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 325-330.
- [15] 肖扬, 李国政. 草薢药理作用研究进展[J]. 山西中医, 2018, 34(7): 54-56.
- [16] 马笃军, 彭力平, 曹亚飞, 等. 牛膝总皂苷含药关节液对骨关节炎体外软骨细胞增殖及凋亡的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(3): 1-5.
- [17] 孙雪莲, 刘渊, 周红海. 牛膝总皂苷对兔膝骨关节炎软骨组织形态变化及关节液中 IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 含量的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 321-326.
- [18] JAYASURIYA C T, HU N, LI J, et al. Molecular characterization of mesenchymal stem cells in human osteoarthritis cartilage reveals contribution to the OA phenotype[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7044-7048.

(收稿日期: 2019-04-07)