

# 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

马笃军<sup>1</sup> 彭力平<sup>1</sup> 曹亚飞<sup>1</sup> 高坤<sup>1</sup> 王立新<sup>1△</sup> 余闾<sup>1</sup> 肖伟<sup>1</sup> 廖州伟<sup>1</sup> 胡烈奎<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:观察牛膝总皂苷(TSA)含药关节液对兔骨关节炎(OA)体外软骨细胞增殖及凋亡的影响。方法:将 30 只兔分为 TSA 组、硫酸氨基葡萄糖组、空白对照组,每组 10 只,分别予 TSA、硫酸氨基葡萄糖、蒸馏水灌胃 7 d 后制备含药关节液;进行 OA 造模,鉴定 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 TSA 组、硫酸氨基葡萄糖组、空白对照组、经典软骨增殖组,分别用 10% TSA 含药关节液+10% FBS+DMEM:F12(1:1)培养液、10% 硫酸氨基葡萄糖含药关节液+10%FBS+DMEM:F12(1:1)培养液、10% 空白含药关节液+10% FBS+DMEM:F12(1:1)培养液、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,免疫荧光染色检测Ⅱ型胶原蛋白表达,Annexin V-PE/7-AAD 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:OA 软骨细胞体外分离成功,经甲苯胺蓝染色鉴定细胞为软骨细胞来源;CCK-8 法观察四组细胞生长曲线,绘制的生长曲线符合 Logistic 生长曲线规律,TSA 组在第 2~7 天细胞增殖速度明显高于其它 3 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );连续培养 7 d 后,与空白对照组比较,TSA 组Ⅱ型胶原蛋白表达显著,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),硫酸氨基葡萄糖组、经典软骨增殖组Ⅱ型胶原蛋白表达明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ );流式细胞仪检测显示,与空白对照组(总凋亡率为  $17.61\% \pm 1.19\%$ )比较,经典软骨增殖组(总凋亡率为  $16.50\% \pm 1.42\%$ )细胞凋亡减少不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与空白对照组比较,TSA 组(总凋亡率为  $5.15\% \pm 1.96\%$ )、硫酸氨基葡萄糖组(总凋亡率为  $7.76\% \pm 1.72\%$ )细胞凋亡减少明显,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论:TSA 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,且降低软骨细胞早期、晚期凋亡率,对证实 TSA 是牛膝作用于软骨细胞的主要物质基础具有重要意义。

**[关键词]** 骨关节炎;牛膝;牛膝总皂苷;关节液;软骨细胞

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)03-0001-05

## The Experimental Research of Medicated Joint Fluid of Total Saponins of Achyranthes from Experimental Rabbit Model of OA for Cartilage Cell Proliferation and Apoptosis

MA Dujun<sup>1</sup> PENG Liping<sup>1</sup> CAO Yafei<sup>1</sup> GAO Kun<sup>1</sup> WANG Lixin<sup>1△</sup>  
YU Tian<sup>1</sup> XIAO Wei<sup>1</sup> LIAO Zhouwei<sup>1</sup> HULieku<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong China;

<sup>2</sup>Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China.

**Abstract Objective:** To observe the effect of total saponins of achyranthes(TSA)containing pharmaceutical articular fluid on the proliferation and apoptosis of chondrocytes in vitro in the OA model of experimental rabbits. **Methods:** 30 experi-

mental rabbits were divided into TSA group, glucosamine sulfate group and blank control group, 10 of which were treated with TSA glucoside, glucosamine sulfate and distilled water respectively for 7 d. After the successful modeling of OA model, articular chondrocytes were extracted in vitro for culture and identification. P3 generation chondrocytes were divided into four groups: TSA group, glucosamine sulfate group, blank control group and classic chondrogenic prolifer-

基金项目:国家自然科学基金项目(81804124)

广东省自然科学基金(2018A0303130138)

广东省中医药管理局项目(20182123)

<sup>1</sup> 广东深圳市中医院(深圳, 518033)

<sup>2</sup> 广州中医药大学

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:535709914@qq.com

ation group were cultured with 10% TSA drug-containing joint fluid+10% FBS+DMEM:F12(1:1) medium, 10% glucosamine sulfate drug-containing joint fluid+10% FBS+DMEM:F12(1:1) medium, 10% blank drug-containing joint fluid+10% FBS+DMEM:F12(1:1) medium, 10% FBS+DMEM:F12(1:1) medium. To cultivate the cartilage cell to cell morphological observation, after using CCK-8 cases, immunofluorescence staining method to detect cell proliferation test type II collagen expression, Annexin V-PE/7-AAD double flow cytometry to detect cell apoptosis rate. **Results:** OA chondrocytes were isolated successfully in vitro, and the cells were identified as chondrocytes by toluidine blue staining. The growth curves of the cells in the four groups were observed by the cck-8 method, and the growth curves were consistent with the Logistic growth curves. The proliferation rate of cells in the TSA group was significantly higher than that in the other three groups on the 2nd to 7th day ( $P < 0.05$ ). Continuous culture after 7 d, compared with blank control group, the TSA type II collagen expression significantly ( $P < 0.01$ ), glucosamine sulfate group, classic cartilage proliferation type II collagen expression obviously ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry showed that compared with the blank control group (total apoptosis rate:  $17.61\% \pm 1.19\%$ ), apoptosis was not significantly reduced in the classic chondrogenic proliferation group (total apoptosis rate:  $16.50\% \pm 1.42\%$ ) ( $P > 0.05$ ). Compared with the blank control group, TSA group (total apoptosis rate:  $5.15\% \pm 1.96\%$ ) and glucosamine sulfate group (total apoptosis rate:  $7.76\% \pm 1.72\%$ ) showed significant decrease in apoptosis ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The TSA medicated joint fluid can effectively improve the cell vitality, promote cartilage cell proliferation, improve type II collagen protein expression, and decrease the rate of early and late apoptosis of cartilage cells, to confirm the TSA is applied to chondrocytes cultured the main material foundation has an extremely important theoretical significance, its mechanism needs further exploration.

**Keywords:** osteoarthritis; achyranthes bidentata; total saponins of achyranthes; joint fluid; cartilage cells

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种软骨退行性的关节病,为骨科常见病、多发病之一<sup>[1]</sup>。随着人口的老齡化,OA患病率呈上升趋势,该病已成为中老年人致残的主要因素之一,严重影响了人体健康,目前尚无理想药物治疗<sup>[2]</sup>。在前期研究基础上,已证实怀牛膝能促进兔OA关节软骨修复及牛膝总皂苷(TSA)含药血清能促进软骨细胞增殖<sup>[3,4]</sup>,依据关节软骨的营养来自于关节液的理论,故课题组深入研究牛膝主要有效成分TSA含药关节液对实验兔OA模型软骨细胞体外增殖及凋亡的影响,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

新西兰大白兔(广东省实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(粤)2014-0035),兔龄2~3个月,体重 $(1.53 \pm 0.57)$  kg,雌雄不限。

### 1.2 药物及试剂

DMEM:F12(1:1)(HyClone);倒置相差显微镜(Leica);流式细胞仪(BD);Cy3标记山羊抗小鼠IgG(广州易锦生物技术有限公司);DAPI染液(碧云天生物研究所);抗荧光衰减封片剂(碧云天生物研究所);倒置荧光显微镜(DMI6000B, Leica);胎牛血清(FBS)(Gibco);10%甲醛标本固定液;CO<sub>2</sub>培养箱(Heraeus);CCK-8试剂盒(C0037, 碧云天);0.25%胰蛋白酶(含EDTA)(Gibco);Collagen II抗体(abcam);牛膝总皂苷(TSA)(深圳市中医院药剂科制备);硫酸氨基葡萄糖,批号7KB0102,国药产品注册证号HC2012-0036,信东生科技股份有限公司提供;甲苯胺蓝染色液

(北京雷根);Annexin V-PE/7-AAD流式凋亡检测试剂盒(BD)等。

### 1.3 实验时间、场所

于2017年11月至2018年11月在深圳北京大学-香港科技大学医学中心完成,实验动物中心许可证号SYXK(粤)2010-0106,实验操作符合2006年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.4 方法

**1.4.1 实验分组** 健康新西兰兔30只,适应性喂养1周后进行实验分组,随机将动物分配至TSA组、硫酸氨基葡萄糖组、空白对照组,各10只。上述一兔一笼进行标准喂养,兔笼大小为80 cm×60 cm×40 cm,允许其在笼内自由活动。混合饲料喂养,自由饮水,每日去除兔粪和食物残渣,保证饲养环境清洁。每天观察实验兔的食量、活动度、大小便、步态及精神状况。

**1.4.2 含药关节液的制备** 参照药理试验中动物与人体间的等效剂量进行换算:TSA组(TSA, 200 mg/(kg·d<sup>-1</sup>));硫酸氨基葡萄糖组(硫酸氨基葡萄糖77 mg/(kg·d<sup>-1</sup>));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后按照分组行兔膝关节抽吸关节液,操作方法:于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-20℃的冰箱中保存待用。

**1.4.3 OA模型动物造模、鉴定** 将实验兔右膝关节用骨关节炎模型造模支具(专利号201720079394.3)

包裹好后于伸直位固定制动 6 周。造模 6 周后,验证骨关节炎造模是否成功。每天记录实验兔肢端血液循环、支具固定稳定度、活动量等情况,固定 6 周后行 OA 模型鉴定<sup>[3]</sup>。

**1.4.4 OA 软骨细胞体外分离、培养及鉴定** 无菌切取 OA 模型组关节软骨,用解剖刀将软骨剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右的碎块,经透明质酸酶、胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶依次消化,加入含 10% FBS 的 DMEM:F12(1:1)培养液制成单细胞悬液,并传代培养,以甲苯胺蓝染色进行软骨细胞鉴定。

**1.4.5 含药关节液与软骨细胞体外分组混合共同培养** 取生长良好的 P3 代细胞,调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  /mL 接种于 24 孔板中,将孔板盲法随机分为 4 组,每组 6 个孔,每个孔板内放置多聚赖氨酸预处理过的无菌细胞爬片,上述每孔保证液体为 3 mL,将培养板置于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱内孵育,分组如下:TSA 组,10% TSA 含药关节液 + 10% FBS + DMEM:F12(1:1)培养液;硫酸氨基葡萄糖组,10% 硫酸氨基葡萄糖含药关节液 + 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;经典软骨增殖组,10% FBS + DMEM:F12(1:1)培养液。

## 1.5 观察指标

**1.5.1 细胞形态学观察** 每天用倒置相差显微镜观察细胞形态的变化和生长状况等情况。

**1.5.2 CCK-8 法检测软骨细胞增殖情况** 应用酶标仪,在 450 nm 双波长处测得各组相应 OD 值,绘制软骨细胞增殖曲线。

**1.5.3 免疫荧光染色检测Ⅱ型胶原蛋白表达** 取出实验组细胞爬片后,经固定,浸泡,依次加入:一抗,4 ℃ 过夜,二抗,然后显色,脱水,透明,封片,计算Ⅱ型胶原蛋白表达阳性率。

**1.5.4 流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡** 将软骨细胞以  $1.0 \times 10^5$  /mL 密度接种于 4 个 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中;待细胞生长至 70% ~ 80% 融合时,按 1.4.5 节实验方法分组和处理;经胰酶消化、离心、重悬细胞计数 ( $>5 \times 10^5$  个细胞);取  $1 \times 10^5$  个重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;按 Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒说明书在流式细胞仪上操作,分析各组软骨细胞凋亡情况。

## 1.6 统计学方法

用 SPSS23.0 统计软件分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,

对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,组间比较用 *t* 检验,不满足方差分析时用非参数检验,检验水准  $\alpha=0.05$ , $P<0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

OA 模型造模实验动物造模成功,实验动物灌胃时因操作不当致空白对照组死亡 1 只,OA 软骨细胞体外分离成功,细胞贴壁生长,呈多边形,经甲苯胺蓝染色鉴定细胞为软骨细胞来源(见图 1)。

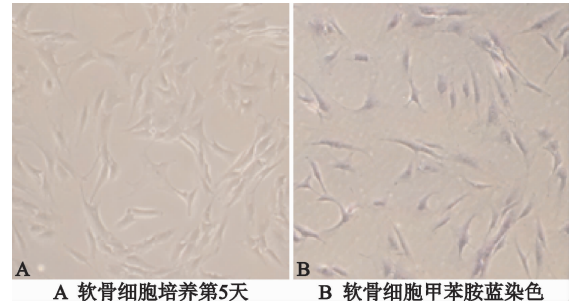


图 1 软骨细胞生长形态(200×)

### 2.2 CCK-8 法检测软骨细胞增殖

选择 CCK-8 法观察 4 组细胞生长曲线,生长曲线呈 Logistic 生长曲线规律。细胞培养第 1~2 天为生长潜伏期,第 3~6 天为对数增殖期,对数增殖期结束后进入平台期和下降期。第 1~2 天 4 组细胞增殖能力基本相同,第 2~7 天 TSA 组细胞增殖速度明显高于其它 3 组( $P<0.05$ ),细胞活力增强,随着时间的增加,4 组细胞增殖能力开始减弱(见图 2)。

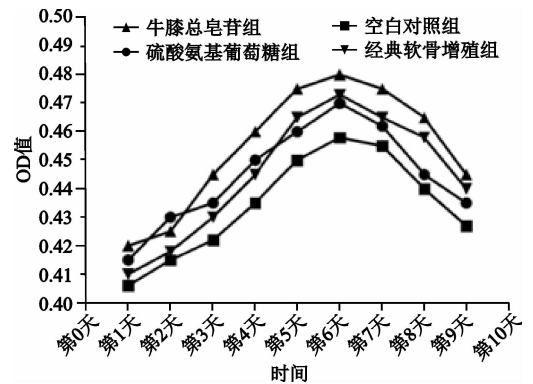


图 2 软骨细胞生长曲线

### 2.3 免疫荧光染色检测Ⅱ型胶原蛋白表达

连续培养 7 d 后,空白对照组轻度Ⅱ型胶原荧光染色,TSA 组、硫酸氨基葡萄糖组、经典软骨增殖组Ⅱ型胶原荧光染色明显阳性,说明 TSA 组、硫酸氨基葡萄糖组、经典软骨增殖组软骨细胞分泌的Ⅱ型胶原蛋白表达明显( $P<0.05$ ),见图 3-4。

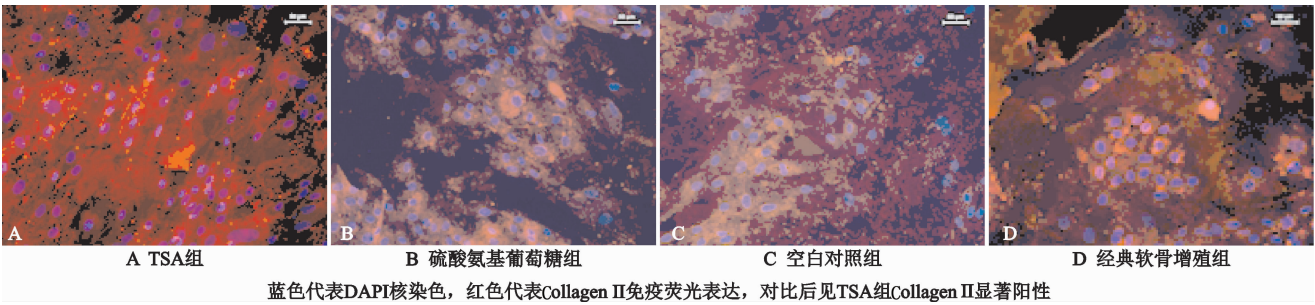


图 3 用 TSA 含药关节液干预培养兔软骨细胞 7 d 后 II 型胶原蛋白免疫荧光表达 (200×) 胞凋亡

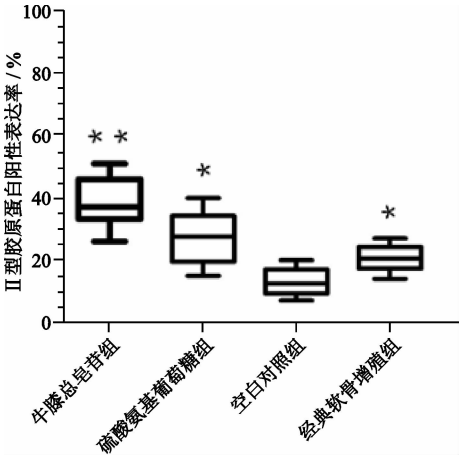


图 4 II 型胶原蛋白阳性表达率比较 (与空白对照组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ )

2.4 Annexin V-PE/7-AAD 双染流式细胞仪检测细

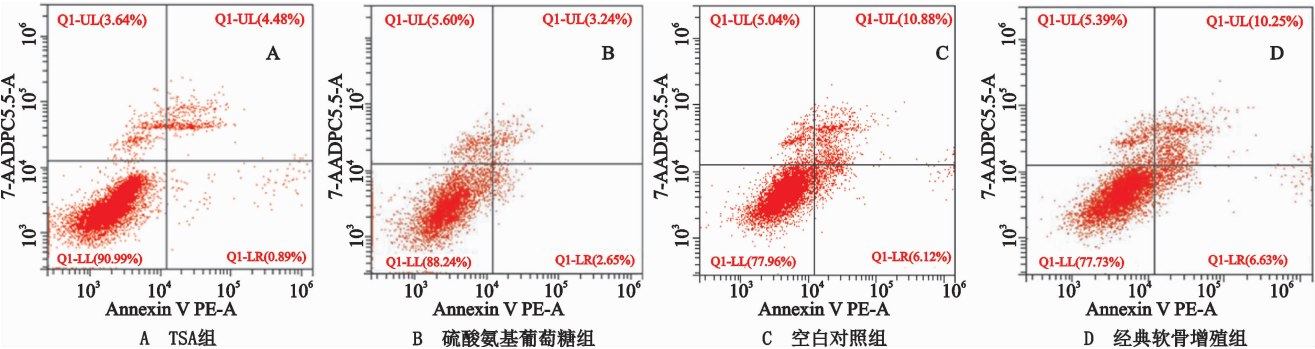


图 5 Annexin V-PE/7-AAD 双染流式细胞仪检测软骨细胞凋亡

表 1 4 组含药关节液对软骨细胞凋亡率的影响比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	早期凋亡率 / %	晚期凋亡率 / %	总凋亡率 / %
TSA 组	$0.83 \pm 1.32^{1)}$	$4.32 \pm 1.68$	$5.15 \pm 1.96^{2)}$
硫酸氨基葡萄糖组	$2.79 \pm 1.61^{1)}$	$4.97 \pm 2.01$	$7.76 \pm 1.72^{2)3)}$
空白对照组	$6.58 \pm 0.94$	$11.03 \pm 1.25$	$17.61 \pm 1.19^{1)}$
经典软骨增殖组	$6.47 \pm 1.15$	$10.03 \pm 1.54$	$16.50 \pm 1.42^{1)}$

注:与空白对照组比较,1) $P<0.05$ ,2) $P<0.01$ ;与牛膝总皂苷组比较,3) $P>0.05$ ,4) $P<0.01$ .

目前利用中药修复组织损伤性疾病的研究逐年增加,已证实有些方药能够起到同类西药相当的疗效。而牛膝是治疗软骨损伤性疾病(如 OA)的使用频率最高中药,临床效果良好。目前牛膝主要有效成分包含多糖类、皂苷类、甾酮类等,牛膝有效成分实验研究结论有:多糖类具抗氧化、免疫调节作用,牛膝总皂苷含药血清具有促进软骨细胞增殖和抗软骨细胞凋亡的作

用,甾酮类具有促进蛋白质的合成、使受损细胞再生等作用。

流式细胞仪检测结果表明,与空白对照组比较,经典软骨增殖组细胞凋亡减少不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。TSA 组、硫酸氨基葡萄糖组,与空白对照组比较,细胞凋亡减少明显,差异有统计学意义( $P<0.01$ )(见图 5 及表 1)。

3 讨论

目前对 OA 的发病机制尚不完全清楚,发病年龄越来越年轻化,严重影响了患者的生活质量。现代医学对 OA 尚无明确统一的归因,多数研究者认为其发病与年龄、肥胖、创伤及遗传因素等有关,药物治疗主要是口服非甾体抗炎药以及硫酸氨基葡萄糖,关节腔内注射玻璃酸钠,需要患者长期用药,效果不确切,胃肠道反应大<sup>[5]</sup>。手术属于有创治疗,长期效果不理想。

课题组前期研究证实怀牛膝醇提物含药血清能有效促进体外软骨细胞增殖、II 型胶原蛋白表达<sup>[6]</sup>。目前已证实关节软骨细胞的生长来源于关节液的营养,笔者由此提出的假设是牛膝作用于关节软骨细胞的作用途径是经过 TSA 含药关节液对软骨细胞发挥的作

用,因此通过牛膝总皂苷含药关节液对兔 OA 软骨细胞进行体外共培养,观察含药关节液对软骨细胞增殖及凋亡的影响,与空白对照组、硫酸氨基葡萄糖组、经典软骨增殖组比较,CCK-8 法表明 TSA 含药关节液组能促进软骨细胞增殖,免疫荧光细胞学检测显示 TSA 含药关节液组Ⅱ型胶原蛋白强荧光率表达,细胞核染色数量明显多于对照组,再用 Annexin V-PE/7-AAD 双染流式细胞仪检测细胞凋亡证实 TSA 含药关节液组总凋亡率  $5.15\% \pm 1.96\%$ ,明显低于其它 3 组,与文献报道相符合<sup>[4,7]</sup>。余闾等<sup>[8]</sup>用 TSA 干预实验兔 OA 模型关节滑膜组织,证实了 TSA 能减轻 OA 滑膜病变的严重程度,同时能明显降低关节液中 TNF-1,IL-1 $\beta$  和 MMP-3 等炎症因子含量并降低滑膜组织  $\beta$ -catenin 蛋白表达。Osta 等<sup>[9]</sup>研究表明 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  因子具有抑制软骨合成、加快关节软骨降解的作用,在 OA 病理过程中起到重要介导作用。丁婷婷等<sup>[10]</sup>采用酶联免疫吸附法(ELISA)对 60 例 KOA 患者研究表明,OA 患者血清  $\beta$ -catenin 蛋白表达较正常组降低。因此,TSA 含药关节液组降低体外软骨细胞凋亡率的作用机制,可能与降低关节液 TNF-1,IL-1 $\beta$  及 MMP-3 等炎症因子含量及降低  $\beta$ -catenin 蛋白表达相关,但是该实验是通过实验兔灌胃后再抽吸关节液,利用关节液培养软骨细胞,而不是直接把牛膝总皂苷加入到关节液当中,因此关节液里的具体有效物质尚未知,有待下一步研究。

本研究通过观察 TSA 含药关节液干预兔 OA 体外软骨细胞增殖及凋亡,结果显示 TSA 含药关节液能提高细胞活力、促进软骨细胞增殖、提高Ⅱ型胶原蛋白表达,并降低软骨细胞早期、晚期凋亡率,对证实 TSA 是牛膝作用于软骨细胞的主要物质具有重要意义,为中药牛膝有效成分制剂的开发提供了广阔的前景和科学依据,但关节液里的药物有效物质及其具体作用机

理还需进一步证实。

## 参考文献

- [1] 帖小佳,郑如庚,赵梦,等. 中国中老年人膝关节骨关节炎患病率的 Meta 分析[J]. 中国组织工程研究,2018,22(4):650-656.
- [2] 许杰. 骨关节炎的非药物及药物阶梯治疗[J]. 中华关节外科杂志,2018,12(1):131-140.
- [3] 彭力平,马笃军,林栋栋,等. 牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察[J]. 湖南中医杂志,2013,29(2):126-129.
- [4] 刘渊,孙雪莲,周红海,等. 牛膝总皂苷含药血清对兔膝软骨细胞增殖与凋亡的实验研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(10):2382-2385.
- [5] 徐方琼,于德宁,石立鹏,等. 中医药治疗膝骨关节炎研究进展[J]. 中医临床研究,2018,10(10):140-143.
- [6] 肖伟,马笃军,彭力平,等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎软骨细胞体外增殖及糖胺聚糖的干预作用[J]. 中国医药导报,2017,14(5):20-24.
- [7] 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.
- [8] 余闾,彭力平,马笃军,等. 牛膝总皂苷对实验兔骨关节炎滑膜组织的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2017,25(6):1-5.
- [9] OSTA B, ROUX J P, LAVOCAT F, et al. Differential effects of IL-17A and TNF- $\alpha$  on osteoblastic differentiation of isolated synoviocytes and on bone explants from arthritis patients[J]. Front Immunol,2015,6:151.
- [10] 丁婷婷,江超,李季青,等. 骨关节炎合并骨质疏松患者血清  $\beta$ -catenin、DKK-1 和 MMP-9 的水平变化及其与临床指标的相关性[J]. 山西医科大学学报,2018,49(3):289-292.

(收稿日期:2018-11-10)