

龟鹿二仙胶及其拆方对豚鼠软骨细胞 Ⅱ型胶原合成的影响[※]

● 黄远鹏 李楠[▲] 杜江 李奕修 王和鸣

摘要 目的:通过观察龟鹿二仙胶及其拆方对豚鼠软骨细胞Ⅱ型胶原的表达的影响,比较各药物在方中的作用。方法:取3月龄豚鼠关节软骨,建立软骨细胞体外培养体系,使用免疫组化染色观察比较Ⅱ型胶原的表达。结果:龟鹿二仙胶及其各拆方组都能促进豚鼠软骨细胞的合成,其中全方组效果最佳,龟鹿参组与龟鹿杞组促Ⅱ型胶原合成能力优于龟鹿组,龟鹿杞组较佳。结论:方中君药鹿角龟甲能够有效的促进豚鼠软骨细胞合成Ⅱ型胶原,臣药人参枸杞能够促进君药发挥药效,具有明显的协同辅助作用,其中枸杞效果更佳。

关键词 龟鹿二仙胶 豚鼠 软骨细胞 Ⅱ型胶原

骨性关节炎(osteoarthritis, OA),又称骨关节病,肥大性关节病,增生性关节病,是一种以软骨外基质缺失及异常重建的退行性疾病^[1-2]。其结构性变化特征包括:逐渐丧失关节软骨,在关节边缘骨赘的形成和软骨下骨囊肿的发展^[3-5]。OA在中医理论中属于“痹证”中“骨痹”范畴,以肝肾亏虚为其根本,故治疗上,补肝肾之虚,扶正固本为其治疗原则。临床研究发现,龟鹿二仙胶能够有效的减轻OA患者的症状,改善其关节功能^[6]。前期研究发现,龟鹿二仙胶能够有效的促进SD大鼠及豚鼠软骨细胞的增殖,抑制SD大鼠软骨细胞的凋亡,能够促进豚鼠软骨细胞蛋白多糖和Ⅱ型胶原的合成^[7-9],验证了龟鹿二仙胶的补虚作用对OA的影响。本实验针对人参枸杞在方中配伍的意义而设计,具体报道如下。

1 材料

1.1 主要试剂 DMEM培养基(低糖)、PBS缓冲液、

※ 基金项目 国家自然科学基金(No:30772814);教育部博士学科点专项基金(No:20050393002);福建省自然科学基金(No:2007J0098, No:C0710028);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(No:闽教科[2007]20号)

▲ 通讯作者 李楠,男,医学博士,副教授,硕士研究生导师。研究方向:骨病研究。E-mail:Mr.linan@126.com。

● 作者单位 福建中医药大学(350108)

胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone)、Ⅱ型胶原酶(Sigma)、兔超敏二步发免疫组化检测试剂盒、浓缩型DAB染色试剂盒(中衫金桥)、Rabbit Anti-Collagen Type II(Abcam)。

1.2 主要仪器设备 二氧化碳培养箱(Heal Firce公司212 UV型)、超净工作台(苏净安泰)、倒置显微镜(OLYMPUS IX70型)、万能研究级显微镜(OLYMPUS)、显微图像处理系统(Motic Images Advance 3.2)、数码医学图像分析系统(Motic Med 6.0)(麦克奥迪)。

1.3 实验动物 健康1月龄清洁级雄性Wistar大鼠50只,体重190~210g,实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005;合格证号:0069141。3月龄清洁级豚鼠4只(实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005),以上动物均由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

1.4 实验药物 龟鹿二仙胶由龟甲胶(1:1)、鹿角胶(1:1)、人参(1:5)、枸杞(1:3)四味中药组成,均为农本方中药配方颗粒,生产批号:龟甲胶A101209-01,鹿角胶A100010-01,人参A101134-02,枸杞A100873-02。

2 方法

2.1 动物分组 雄性Wistar大鼠50只,适应性喂养3天后,随机分为5组,每组10只:分别为生理盐水

(对照)组、龟鹿二仙胶(全方)组、龟板鹿角(龟鹿)组、龟板鹿角人参(龟鹿参)组、龟板鹿角枸杞(龟鹿杞)组,苦味酸标记。

2.2 药物制备 参照《中医骨伤科学基础》教材,按照龟板 9g、鹿角 6g、人参 6g、枸杞 9g 的配伍比例定为人体的用药剂量,大鼠给药剂量根据人与大鼠按体表面积换算的药物等效剂量换算公式^[10]计算,得出以下给药剂量:

表 1 各味中药换算后的剂量[g/只(200g)]

| 龟板(1:1) | 鹿角(1:1) | 人参(1:5) | 枸杞(1:3) |
|---------|---------|---------|---------|
| 0.237 | 0.158 | 0.032 | 0.079 |

注:每日取对应药量配置成全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组,均配成 30ml 药液。

2.3 动物给药及含药血清的制备 对照组予相应剂量的 0.9% 氯化钠溶液,连续给药 7 天,每日清晨一次,每次 3ml,最后一次灌药(灌药前禁食不禁水 12 小时)一小时后腹主动脉采血,3000r/min 离心 15 分钟,取上清,56℃ 水浴灭活 30 分钟,0.22μm 微孔滤膜过滤分装、标记,-80℃ 保存备用。

2.4 软骨细胞分离及培养 3 月龄豚鼠处死,消毒,取出膝关节,在超净台上分离关节软骨面,切取软骨,将关节软骨剪成约 1mm³ 大小,PBS 漂洗,37℃ 5ml 0.2% II 型胶原酶消化 45min,取上清,离心收集细胞,重复 4 次,将细胞悬液稀释为 2 × 10⁵ 个/mL,接种于 25cm² 培养瓶,加含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置 37℃ 培养箱培养。

2.5 免疫组化染色检测各组含药血清对豚鼠软骨细胞 II 型胶原合成的影响 将 F1 代的细胞以 1 × 10⁴/ml 的密度传代至铺有 4% 多聚赖氨酸盖玻片的 24 孔板中,24 小时软骨细胞贴壁后,加入各组含 10% 含药血清的 DMEM 培养基培养 48 小时,每组 4 孔,制作细胞爬片,按照试剂盒说明书进行染色,检测各组 II 型胶原含量。

2.6 图像分析 免疫组化染色标本均在万能研究级显微镜下观察,Motic Images Advance 3.2 显微图像处理软件采集图片,每组标本随机选取 6 个视野,拍照保存,图片数据采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统对图像进行分析,测定标本中阳性信号平均灰度值。

2.7 统计学分析 所有数据采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,所有计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,成组数据比较

采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P > 0.05$ 表示无显著差异。

3 结果

免疫组织化学法检测各组含药血清对软骨细胞分泌 II 型胶原的影响,见图 1~6、表 2。可见,五组均有阳性异染,II 型胶原阳性异染部位为胞浆,呈片状或团块状的棕红色颗粒染色。图中,胞核呈蓝紫色染色,是经苏木素复染的结果。其中,全方组异染颜色最深,对照组异染颜色最浅。表 2 显示,与对照组比较,四组含药血清均能明显的促进豚鼠软骨细胞合成 II 型胶原($P < 0.05$)。全方组药效高于其他四组($P < 0.05$),龟鹿参组与龟鹿杞组促 II 型胶原合成能力明显优于龟鹿组($P < 0.05$),龟鹿杞组比龟鹿参组效果更佳。($P < 0.05$)。

表 2 免疫组化染色检测各组软骨细胞 II 型胶原合成的情况($n=6, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 平均灰度值 |
|------|-------------------------------|
| 全方组 | 141.40 ± 1.378 ^{△▲} |
| 龟鹿组 | 128.49 ± 3.384 [*] |
| 龟鹿参组 | 133.63 ± 2.605 ^{△▲*} |
| 龟鹿杞组 | 135.23 ± 5.498 ^{△▲*} |
| 对照组 | 116.27 ± 5.805 [*] |

注:与对照组比较:△ $P < 0.05$;与龟鹿组比较:▲ $P < 0.05$;与全方组比较:* $P < 0.05$;龟鹿参组与龟鹿杞组对比: $P < 0.05$ 。

4 讨论

骨性关节炎是一种以关节软骨损伤和骨质增生为特点的非炎症性疾病。其病理改变是关节软骨的病变。关节软骨由 99% 的软骨外基质和 1% 的软骨细胞组成,胶原蛋白是软骨基质中最主要的成分之一,约占成人关节软骨干重的 2/3^[11]。其中 II 型胶原占 90% 以上,是软骨保持结构的紧密性和生物力学特性的基础。其合成及分解的动态平衡关系到软骨外基质的合成和降解平衡。因此 II 型胶原的表达正常与否是衡量软骨细胞反分化和表型异常的重要依据。豚鼠软骨的降解与人类 OA 的发展非常相似^[12],3 月后豚鼠关节面粗糙,中央呈现小颗粒并有轻度凹陷,软骨面无光泽,干燥呈微黄色^[13]。因此,本实验取 3 月龄豚鼠软骨细胞作为研究对象。

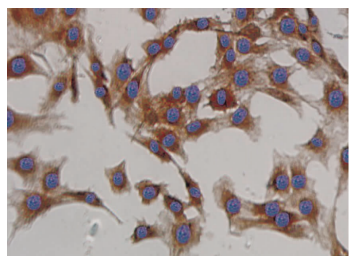


图1 全方组

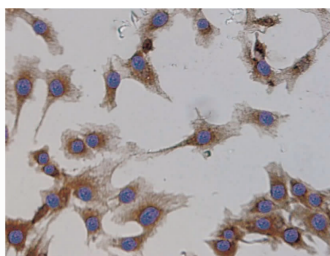


图2 龟鹿组

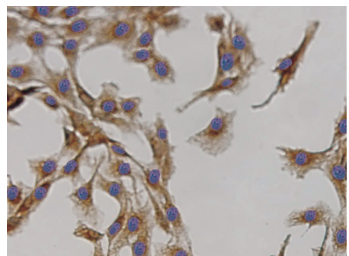


图3 龟鹿参组

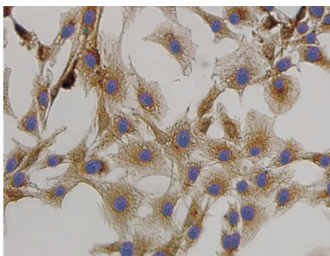


图4 龟鹿杞组

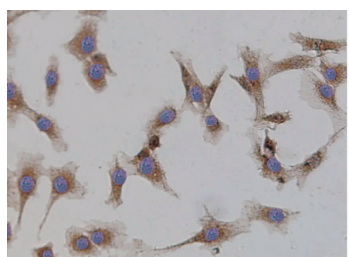


图5 生理盐水对照组

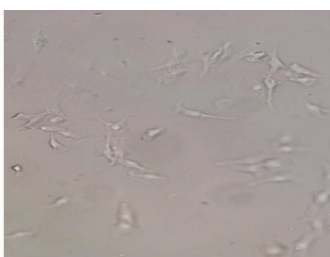


图6 阴性对照组

注:图1-6为各组含药血清对豚鼠软骨细胞II型胶原合成的影响(×200)

中医认为 OA 是受风、寒、湿三邪所致,加以肝血肾精亏虚,气血不足,筋骨失养,形体疲极易发本病。龟鹿二仙胶具有温肾益精,补气养血作用。主治肾中阴阳两虚,任、督精血不足。其中鹿角胶补肾助阳、强筋壮骨,龟甲胶滋阴潜阳、养血补心,两者一温一寒,一阴一阳,合用能峻补阴阳以生气血精髓。人参大补元气,枸杞补肾益精。四药合用,为阴阳气血交补之剂,共具填精补髓、益气壮阳之功。

实验中,各药物组标本均呈现阳性表达,软骨细胞胞浆中呈现棕黄色颗粒或呈团块状。全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组对 II 型胶原阳性染色比生理盐水对照组较深,全方组优于三组拆方组。与龟鹿组对比,龟鹿参组与龟鹿杞组效果更佳,其中龟鹿杞组药效更好。参照前期实验^[7-9],证实了君药龟板和鹿角在促胶原合成药效中发挥的作用,同时臣药人参与枸杞能够促进君药更好的发挥药效,具备明显的协同辅助作用。

有研究表明:枸杞提取液能显著提高小鼠皮肤中 SOD 的活性,增加皮肤中胶原蛋白的含量^[14]。枸杞多糖可以通过抑制肾脏内 IV 型胶原的表达起到肾脏

保护作用^[15]。可见枸杞对胶原的影响根据不同组织出现不同的结果。但前期研究显示^[9],枸杞单独并不能有效的促进 II 型胶原合成。可见枸杞在方中起促进君药龟甲、鹿角药效发挥的作用。其中人参虽然有促进效果,但是不及枸杞,其在方中作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999, 4: D662 - D670.
- [2] Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction; cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 2001, 3: 107 - 113.
- [3] Buckland - Wright JC, Lynch JA, Macfarlane DG. Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1996, 55: 749 - 755.
- [4] Burr DB, Subchondral bone. In: Brandt KD, Lomander S, Doherty M (eds). *Osteoarthritis*. Oxford University Press, Oxford, UK; 1998: 144 - 156.
- [5] Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis*, 1997; 56: 247 - 254.

(下转第 55 页)

23.5%, ARR95% CI = 5.4% ~ 41.6%; NNT = 4, NNT95% CI = 2 ~ 18(例)。

2.4 两组不良事件发生情况 两组在观察期间均未出现不良事件,治疗后检查肝、肾功能均无异常。

3 讨论

中医学认为本病属于“胁痛”、“黄疸”等病证范畴。胆为中清之腑,与肝相表里,同具疏泻功能,以通降为顺,主贮藏及排泄胆汁以助脾胃运化。因情志不畅,肝胆气郁,络脉不和;或饮食不节,多食肥甘煎炸,积湿生热;或外感湿热之邪,郁于少阳,枢机不和。湿热蕴久不化,胆汁凝结,聚成砂石。病久不去,气滞而致血瘀,以致病程迁延,损伤脾胃,化生不足,气血虚弱,呈现出肝郁气滞血瘀、湿热蕴中的病机特点,使病情绵延反复难以根治。治应疏肝利气、活血利胆、降逆和胃、清热利湿,以绝致病之因。基于此,选取“四逆散合三金汤化裁方(郁金易石韦、冬葵子、瞿麦)”,可谓方证对应。四逆散出自《伤寒论》,用于治疗“少阴病,四逆,其人或咳,或悸,或小便不利,或腹中痛,或泄利下重者,四逆散主之。”;三金汤出自上海曙光医院治疗泌尿系结石的经验方,笔者将其进行了化裁,以郁金易石韦、冬葵子、瞿麦,增加活血利胆之效。合方中柴胡与枳实相配,一升一降,调畅升降气机;柴胡与白芍相配,一散一收,调畅出入气机;甘草调和诸药,与白芍相配,缓急止痛。金钱草有清热利湿,排石退黄功效,可促进胆汁分泌和排泄;海金沙有利水通淋作用,治石淋茎痛,助金钱草的排石之功;炙鸡内金具有健脾理肠的作用,郁金有活血行气止痛、利胆的功效,可促进胆汁分泌和排泄。金钱草、郁金相伍,增

强利胆止痛,治疗慢性胆囊炎有着较好的疗效。本研究以清热解毒功效之消炎利胆片(穿心莲、溪黄草、苦木)作为对照组,观察四逆散合三金汤化裁方的疗效,并进行循证医学治疗性疗效评价。

从综合疗效看,四逆散合三金汤化裁方的总有效率高于消炎利胆片(100.0% vs 82.9%),两组经 Ritid 检验分析,差异有统计学意义($u=4.687, P=0.00$)。

循证医学治疗性疗效评价显示,四逆散合三金汤化裁方治疗慢性胆囊炎患者的优势是利胆消炎片的3.12倍,并有95%把握说明其效应值在2.5~3.7倍之间;治疗后再发炎症反应的情况是利胆消炎片的0.45倍,并有95%把握说明其效应值在0.19~0.71倍之间;相对于利胆消炎片而发生或加重慢性胆囊炎者的危险性下降了55%,并有95%把握说明其效应值在29.0%~81.0%之间;利胆消炎片能使慢性胆囊炎再发生的危险下降23.5%,并有95%把握说明其效应值在5.4%~41.6%之间;使1例再发生炎症反应而需治疗4例,并有95%把握说明其效应值在2~18例之间。

参考文献

- [1]刘建平. 临床试验样本含量的计算[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 536-538.
- [2]张定华,郑昱主编. 中医药现代科研方法论[M]. 甘肃:甘肃文化出版社, 2006: 9-10.
- [3]陈灏珠. 实用内科学[M]. 第11版,北京:人民卫生出版社, 2001: 1900-1901.
- [4]王党生,康德英,李量寿. 卫生系统重大科研课题申请书在设计方面的共性问题[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(11): 703.
- [6]李文顺,李楠,余丹丹,等. 龟鹿二仙胶汤治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 福建中医学院报, 2005, 15(6): 30-32.
- [7]李楠,雒焕生,赵诣,等. 龟鹿二仙胶及其拆方对SD大鼠及豚鼠软骨细胞增殖的比较研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(8): 1-6.
- [8]李楠,雒焕生,赵诣,等. 龟鹿二仙胶汤及其拆方对大鼠软骨细胞凋亡基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(7): 1-3.
- [9]李楠,尹玉彪,雒焕生,等. 龟鹿二仙胶及其拆方对豚鼠软骨细胞II型胶原蛋白多糖合成的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2524-2528.
- [10]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理学实验方法学[M]. 北京:北京人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [11]David Eyre. Collagen of articular cartilage. Arthritis Res, 2002, 4: 30-35
- [12]Bendele AM, Human JF. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. Arthritis Rheum, 1988, 31(4): 561-565.
- [13]马强,高永华. 骨关节炎动物模型的生化及磁共振成像研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(8): 473-475.
- [14]邵邻相. 佛手和枸杞提取物对小鼠皮肤胶原蛋白、SOD含量及毛发生长的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(8): 766-768.
- [15]刘萍,何兰杰. 枸杞多糖对糖尿病大鼠肾脏PKC- β II及IV型胶原表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 18: 20-23.

(上接第62页)