

苦参碱对人成纤维样滑膜细胞生长的影响^{*}

蒋 红¹, 雷佳红^{1,3}, 何 城³, 郭晓兰^{1,2,3}, 杨明辉¹, 蔡 燕^{1,2,3△} (川北医学院附属医院: 1. 风湿免疫研究所; 2. 检验科, 四川南充 637000; 3. 川北医学院检验系, 四川南充 637007)

【摘要】 目的 探讨苦参碱对类风湿关节炎的潜在治疗作用。**方法** 原代培养人关节成纤维样滑膜细胞, 传至第 3~5 代时, 以 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 等不同浓度的苦参碱处理细胞, 分别于作用后 24、48 h 用倒置显微镜观察细胞形态。采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测不同浓度苦参碱处理的细胞生长情况, 计算抑制率。**结果** 不同浓度的苦参碱均可抑制人成纤维样滑膜细胞生长, MTT 检测结果显示细胞抑制率为 2.52%~25.74%, 随苦参碱药物浓度增加和处理时间延长, 抑制作用增强。**结论** 苦参碱可抑制人成纤维样滑膜细胞生长, 可作为治疗类风湿关节炎的潜在药物。

【关键词】 苦参碱; 人成纤维样滑膜细胞; 类风湿关节炎

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.18.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)18-2510-03

Effect of matrine on the growth of human fibroblast-like synovial cells^{*} JIANG Hong¹, LEI Jia-hong^{1,3}, HE Cheng³, GUO Xiao-lan^{1,2,3}, YANG Ming-hui¹, CAI Yan^{1,2,3△} (1. Institute of Rheumatism Immunity; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Faculty of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the potential therapeutical effect of matrine on patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The human fibroblast-like synovial cells were collected from patients with RA and cultured to 3th to 5th generation, then treated with different concentrations of matrine (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL). Microscope was used to observe the shape of cells after treating 24 hours or 48 hours. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the inhibitor rates of cells in different concentrations of matrine. **Results** Matrine could inhibit the growth of human fibroblast-like synovial. The result of MTT method showed the inhibition rate was 2.52%—25.74% under different concentrations of matrine, as the incubated concentration and incubated time increased, the inhibition rate increased too. **Conclusion** Matrine could inhibit the growth of human fibroblast-like synovial cells, which could be used as a potential drug for patients with RA.

【Key words】 matrine; human fibroblast-like synovial cells; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎 (RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫疾病, 主要表现为慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变, 常累及全身多个系统, 严重影响患者的生存质量。RA 在国内发病率约为 0.3%~0.4%, 女性发病率高于男性^[1]。目前临床上多采用甲氨蝶呤、环磷酰胺等抗肿瘤药物, 阻断淋巴细胞刺激因子的 Kineret、肿瘤坏死因子阻断剂英利昔单抗等生物制剂治疗 RA 患者, 虽然这些药物疗效明显, 但都有不良反应多或价格昂贵等缺点, 增加了患者的痛苦和经济负担。研究显示人成纤维样滑膜细胞的过度增生和分泌在 RA 的发病和发展中具有重要作用^[2]。本研究拟从中医中药的角度研究苦参碱对人成纤维样滑膜细胞生长的影响, 探讨苦参碱对 RA 的潜在治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 人成纤维样滑膜细胞 采集 2013 年 1~8 月川北医学院附属医院风湿科收治的 7 例 RA 患者关节积液标本, 体外原代培养人成纤维样滑膜细胞。7 例患者中男 2 例、女 5 例; 年龄

36~60 岁, 平均 50.4 岁。

1.2 仪器与试剂 生物安全柜 (安泰公司); HF90 CO₂ 培养箱 (力康公司); IX71 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS); 酶标仪 (美国 Bio-RAD)。DMEM 培养基 (美国 Gibco); 胎牛血清 (杭州四季青); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (美国 Sigma); 胰蛋白酶 (美国 Amresco); 苦参碱 (每瓶 100 mg, 购自南京替斯艾么中药研究所, 纯度大于 98.0%), 配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的药物备用。

1.3 方 法

1.3.1 人成纤维样滑膜细胞培养 无菌采集患者关节腔积 10~30 mL, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬沉淀, 经 100 目筛网过滤, 将滤液以 1 000 r/min 离心 10 min, 再以 PBS 清洗沉淀 2 次后, 以含 10% 胎牛血清及青霉素和链霉素各 100 U 的 DMEM 培养基重悬细胞, 用计数板计数细胞, 按 1×10^7 接种于 25 cm² 培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。3 d 后观察细胞生长情况, 视情况进

^{*} 基金项目: 四川省教育厅科研项目 (10ZB069); 川北医学院附属医院科研基金项目 (2012-院 30)。

作者简介: 蒋红, 女, 主管护师, 本科, 主要从事关节炎症性疾病研究。△ 通讯作者, E-mail: 1094585751@qq.com。

行传代,一般于培养后 10 d 可取第 3~5 代细胞按(1~5)×1 000 个/孔接种至 2 个 96 孔板中备用,每块板上每个药物浓度接种 6 个孔,设只加培养液的空白组和不加药物处理的对照组。每位患者均重复检测 3 次。

1.3.2 药物处理 96 孔板中细胞培养 24 h 后,以培养基稀释药物,将浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 苦参碱分别加入相应培养孔中继续培养。分别于药物处理 24、48 h 后用倒置显微镜观察细胞生长情况。

1.3.3 MTT 法检测 培养 24、48 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL 二甲亚砜,室温振荡 10 min,在酶标仪上测定 490 nm 处吸光度值(A 值)。每孔减去空白对照 A 值均值后计算每组平均数,抑制率(%)=(1-处理组 A 值/对照组 A 值)×100%。

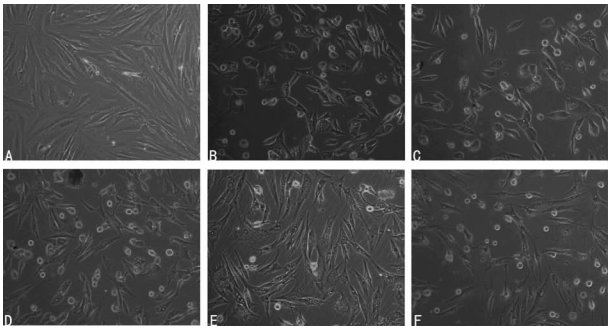
1.4 统计学处理 采用软件 SPSS16.0 进行数据处理及统计学分析,平均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 表示比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞培养结果 7 例患者的关节滑液经处理后均成功获得大量成纤维样细胞,经鉴定该细胞为 CD68 阴性细胞^[3],即人成纤维样滑膜细胞,传代至第 3~5 代时 90%以上细胞为该类型细胞。人成纤维样滑膜细胞多为长梭形,胞质透亮、均匀,细胞轮廓清晰,见较多分裂期细胞,表明细胞状态良好,适合后续研究。

2.2 苦参碱处理后细胞形态变化 苦参碱作用于细胞后,细

胞的数量减少,细胞间的连接减少乃至消失,胞体变小,细胞质内可见大量空泡样结构,并随着药物浓度的增加和处理时间的延长,空泡增加。见图 1。



A:对照组细胞;B:1.6 mg/mL 处理 24 h 后的细胞;C:2.0 mg/mL 处理 24 h 后的细胞;D:1.2 mg/mL 处理 48 h 后的细胞;E:1.6 mg/mL 处理 48 h 后的细胞;F:2.0 mg/mL 处理 48 h 后的细胞。

图 1 不同浓度苦参碱处理后的人成纤维样滑膜细胞形态(×200)

2.3 MTT 法检测结果 苦参碱处理后,处理组各浓度的 A 值低于对照组,其中处理 24 h 后的 1.6、2.0 mg/mL 浓度,处理 48 h 后 1.2、1.6、2.0 mg/mL 浓度的 A 值明显低于对照组,比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。各组细胞抑制率为 2.52%~25.74%,随药物浓度增加和处理时间延长,抑制作用增强。见图 2。

表 1 苦参碱对人成纤维样滑膜细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h			48 h		
	A 值	<i>t</i> *	<i>P</i> *	A 值	<i>t</i> *	<i>P</i> *
对照组(mg/mL)	0.520 2±0.006 9			0.522 0±0.057 0		
处理组(mg/mL)						
0.4	0.507 1±0.077 4	0.334	0.744	0.504 0±0.064 3	0.553	0.590
0.8	0.475 9±0.078 5	1.121	0.284	0.485 3±0.057 3	1.199	0.254
1.2	0.456 0±0.079 6	1.613	0.133	0.440 4±0.064 6	2.505	0.028
1.6	0.428 9±0.079 1	2.304	0.040	0.402 6±0.072 3	3.429	0.005
2.0	0.412 9±0.074 6	2.797	0.016	0.387 6±0.074 3	3.796	0.003

注:*表示与对照组比较的 *t*、*P* 值。

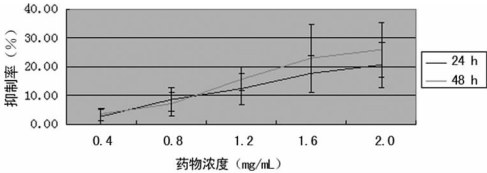


图 2 不同浓度苦参碱对人成纤维样滑膜细胞增殖的影响

3 讨 论

RA 是目前临床上比较常见的一种自身免疫性疾病,病因复杂。研究表明人成纤维样滑膜细胞过度增生和分泌是 RA 发病的重要基础,参与关节的炎性反应和关节破坏。人成纤维样滑膜细胞可表现出转化细胞的特征,呈类肿瘤细胞样异常增殖,侵入到软骨和软骨下的骨质,并产生炎性介质、促炎性细胞

因子及抗炎性细胞因子、分泌基质金属蛋白酶等。因此抑制人成纤维样滑膜细胞的增殖和活化是目前研究 RA 的热点,可能为临床上治疗 RA 提供新的思路或靶点。

苦参碱是苦参根部分离的一种生物碱,具有抗肿瘤、抗病毒、抗心律失常、抗炎等作用^[4]。其不良反应较少,目前主要用于抗病毒性肝炎治疗。研究发现苦参碱能抑制食管癌、胃癌 SGC-7901 细胞、前列腺癌 PC-3M 细胞等肿瘤细胞的增殖^[5-7]。人成纤维样滑膜细胞具有肿瘤细胞样异常增殖的特性,故本研究拟探讨苦参碱是否能影响人成纤维样滑膜细胞的生长。结果表明,人成纤维样滑膜细胞经不同浓度的苦参碱处理后,细胞生长均受到不同程度的抑制,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,抑制作用增强。其中处理 24 h 后的 1.6、2.0 mg/

mL 浓度,处理 48 h 后 1.2、1.6、2.0 mg/mL 浓度,与对照组细胞的 A 值比较差异有统计学意义($P<0.05$)。提示苦参碱能抑制人成纤维样滑膜细胞的增殖。

滑膜增生是 RA 的特征性病理表现,增生的滑膜可形成血管翳依附于软骨表面,介导骨和软骨的破坏,人成纤维样滑膜细胞凋亡不足与滑膜增生有关^[8]。介导人成纤维样滑膜细胞凋亡可能是治疗 RA 的有效途径。有研究显示,苦参碱能诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 survivin 基因的表达有关^[9]。李海军等^[10]发现苦参碱能通过上调 Fas 蛋白的表达促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。而范悦等^[11]研究提示苦参碱能诱导肝癌 HepG2 发生自噬作用。自噬和凋亡均可导致细胞死亡、细胞数目减少,本研究通过光镜和 MTT 法检测苦参碱对人成纤维样滑膜细胞的生长具有抑制作用,但细胞数目的减少是自噬还是凋亡导致的结果有待进一步探讨。总之,苦参碱可影响人成纤维样滑膜细胞的生长,可作为治疗 RA 的潜在药物。

参考文献

[1] 田东林,潘磊,高国卫,等. 类风湿关节炎治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(11):137-139.

[2] 王燎原,戴生明. 滑膜成纤维细胞在类风湿关节炎中的作用[J]. 中华风湿病学杂志,2009,13(6):412-414.

[3] 蒋红,刘青松,凡瞿明,等. 丹参体外抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的研究[J]. 中华临床医师杂志,

2010,4(4):425-429.

[4] 陈晓峡,向小庆,叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):361-364.

[5] 雷佳红,蒋红,刘素兰,等. 苦参碱对 EC109 肿瘤细胞增殖的影响[J]. 检验医学与临床,2012,9(2):129-130.

[6] Song S, Zhu S, Zhang Z, et al. A study on the inhibitory effect of matrine on gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(6):435-438.

[7] 金光虎,夏海波,李海峰,等. 苦参碱对前列腺癌 PC-3M 细胞生长抑制和凋亡的影响[J]. 内蒙古医学杂志,2013,45(1):1-5.

[8] 冯小辉,欧阳桂林. 类风湿关节炎滑膜细胞凋亡机制的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(9):1543-1545.

[9] 陈立波. 苦参碱对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡及 Survivin 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):235-238.

[10] 李海军,王俊明,田亚汀,等. 苦参碱对 MCF-7 细胞 Fas、VEGF 及端粒酶活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(9):1247-1251.

[11] 范悦,王世明,石青青. 苦参碱对肝癌细胞增殖及其细胞自噬的影响[J]. 中国当代医药,2013,20(7):11-13.

(收稿日期:2013-12-12 修回日期:2014-05-13)

(上接第 2509 页)

关^[3-4]。(2)主动外排机制:PAE 获得染色体介导的 qacEΔ1-sulI 抗菌药物外排泵基因,从而产生针对抗菌药物的主动外排作用^[5]。(3)形成生物被膜:群体感应系统、表面黏附蛋白、二价阳离子、菌毛合成系统、温度等环境因素等均参与 PAE 生物被膜的形成,但相关分子机制仍不十分明确^[6-7]。本研究结果显示,2011 年部分药物耐药率高于 2012 年,与文献报道的耐药率逐年升高有所不同^[8]。其中,哌拉西林/他唑巴坦、妥布霉素耐药率下降明显($P<0.05$),可能与临床用药逐渐趋于规范化有关。

在临床工作中,合理选择抗菌药物、加强抗菌药物质量监督、严格执行消毒隔离制度、保护性使用抗菌药物是防止耐药菌传播的关键。

参考文献

[1] 孙珊,张莉萍. 233 株铜绿假单胞菌在临床细菌感染中的分布及敏感性分析[J]. 重庆医学,2012,41(8):790-791.

[2] 俞建,王飞,严伟. 我院 2009 年铜绿假单胞菌感染分布与耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(10):2514-2515.

[3] Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo-β-lactamases genes among Pseudomonas aeruginosa strains[J]. Int J Burns Trauma, 2013, 3

(2):122-124.

[4] 陈华彬,王冬国,王红戟,等. 多药耐药铜绿假单胞菌耐药基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(3):488-491.

[5] EL Almin N, Giske CG, Jalal S, et al. Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates[J]. APMIS, 2005, 113(3):187-196.

[6] Zhang L, Fritsch M, Hammond L, et al. Identification of genes involved in Pseudomonas aeruginosa biofilm-specific resistance to antibiotics[J/OL]. PLoS One, 2013-04-24 [2014-03-24], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637868>.

[7] 陈列彬,郭雪君,陈峰. 医院获得性肺炎铜绿假单胞菌生物被膜形成能力与基因型分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(24):5431-5433.

[8] 翟如波,张昊,邱方斌. 2008~2010 年某院院内感染铜绿假单胞菌临床分布及耐药性变迁分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2012,6(3):65-69.

(收稿日期:2014-02-16 修回日期:2014-04-17)