

# 补肾活血中药对激素性 股骨头坏死家兔骨髓基质干细胞增殖的影响\*

袁普卫<sup>1\*\*</sup> 康武林<sup>2</sup> 董博<sup>1</sup> 杨锋<sup>1</sup> 刘德玉<sup>1</sup> 殷继超<sup>3</sup>

(1. 陕西中医学院附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046;

3. 西安市中医医院, 陕西 西安 710054)

**摘要:**目的 探讨补肾活血中药对激素性股骨头坏死家兔的骨髓基质干细胞(BMSCs)增殖的影响。方法 对正常家兔及激素性股骨头坏死家兔骨髓基质干细胞分离、筛选、培养后,选择第3代家兔BMSCs,将5%、10%、20%体积分数补肾活血方含药血清对上述第3代家兔BMSCs进行干预,通过MTT法观察不同时间BMSCs增殖情况。**结果** (1)经过含药血清的培养基培养的第3代细胞增殖速度明显的优于前者;(2)补肾活血方含药血清组A490值均高于同体积分数正常血清组( $P<0.05$ ),同时,补肾活血方含药血清组A490值随着含药血清体积分数增加而上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 补肾活血生骨法对激素性股骨头坏死家兔BMSCs增殖和分化有明显促进作用,其作用强度随浓度、时间而改变。

**关键词:**股骨头坏死;骨髓基质干细胞;补肾活血法;骨复生胶囊

**中图分类号:** R 681.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-168X(2015)01-0068-04

**DOI:** 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.01.027

股骨头缺血性坏死(Avascular necrosis of femoral head, ANFH)是由不同病因引起的股骨头血液供应中断或骨细胞变形导致骨的有活力成分(骨细胞、骨髓造血细胞和脂肪细胞)死亡引起的病理过程,其在临床上是一种常见的骨科疑难病症。目前临床对于中晚期ANFH的治疗主要采用手术治疗,但其高昂的费用及不确定的远期疗效很难被更多患者接受,所以早期的非手术治疗成为首选<sup>[1]</sup>。中医药在防治ANFH方面已经取得了较好的临床疗效<sup>[2]</sup>。本课题组认为股骨头缺血性坏死属气血凝滞,经脉痹阻,不能濡养关节所致,我们以补肾活血生骨法为治法,精心研制的代表方药骨复生胶囊对各类股骨头坏死具有较强的镇痛作用<sup>[3]</sup>。为了进一步揭示补肾活血生骨法治疗激素性股骨头坏死的机理,我们设计了本实验,希望能进一步为中医药防治激素性股骨头坏死提供更确

切的立法依据。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** 6月龄健康家兔60只,雄性各半,体重(2.50±0.25)kg,2月龄正常家兔20只。室温下分笼饲养,各组动物均给予相同的食物及饮水。动物由西安交通大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK陕2008-008。

**1.2 实验药品及试剂** 补肾活血处方组成(黄芪,丹参,三七,土元,鹿角胶,牛膝,生甘草),由陕西中医学院附属医院中药房提供。胎牛血清,DMEM培养液,胰蛋白酶等由北京索莱宝生物科技有限公司提供。

**1.3 实验器材** HB-2型奥林帕斯显微镜、CBQ-II型硬质材料超薄切片机及高速DL-8R低温冷冻离心机、ELX808IU酶标仪(美国Bio-Tek生物仪器公司)、超净工作台(苏州安泰空气技术有限

\* 基金项目:陕西省重点科技创新团队项目(2013KCT-26);陕西省科学技术研究发展计划项目(2009K01-63);全国名老中医药专家李堪印传承工作室建设项目资助

\*\* 作者简介:袁普卫,医学博士,教授,副主任医师,研究方向:中西医结合防治骨退行性疾病。Email:spine\_surgeon@163.com.

公司)。

## 2 实验方法

**2.1 动物分组** 取6月龄家兔60只,雌雄各半,采用随机数字表法,将60只家兔随机分为,A组(正常组)、B组(模型组)、C组(中药高剂量治疗组)、D组(中药中剂量治疗组)、E组(中药低剂量治疗组),每组12只。以上各组动物均在相同条件下,自由饮水、摄食,适应性喂养一周后对各组动物进行造模。

**2.2 造模方法** C、D、E三组给予每周两次肌注醋酸泼尼松龙注射液8 mg/(kg·次),B组给予每周两次肌注生理盐水0.32 mg/(kg·次),以上各组连续注射8周,共计16次。每次注射均在上午9点到10点之间,同时为预防感染,动物每周两次肌注青霉素钠,每次5万单位/只。正常组同时予以青霉素注射。8周后,分离、培养骨髓基质干细胞并观测相应细胞的增殖情况。

**2.3 家兔 BMSCs 的分离与培养** 参照《药理实验方法学》<sup>[4]</sup>中的方法进行。以上各组动物脱颈处死后,经体积分数75%乙醇浸泡5分钟,无菌棉垫拭干后在超净工作台中取出大鼠双侧后肢胫骨和股骨,并剔除附着的肌肉、骨膜等,减去两端骨骺。用5 mL一次性注射器从骨的一端采集骨髓3~5 mL,加有肝素抗凝的PBS液1:1混和均匀后,加至等量密度为1.073 g/mL percoll分离液,然后经2000 r/分的离心机离心,经半小时,并收取散在的单个核细胞层[如图1]。用PBS液洗涤反复洗涤两次,再在1500 r/分离离心机离心10分钟,加入20%胎牛血清LG-DMEM培养基,移液器吹打成单细胞混悬液,接种于25 cm<sup>2</sup>培养皿中,37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的恒温二氧化碳培养箱中培养,每天观察生长情况,每隔3天进行全量换液。并于倒置相差显微镜下观察监测细胞培养的全过程,以后每周换液两次直到骨髓基质干细胞达到90%融合,然后用0.25%胰蛋白酶常规消化并进行传代。

**2.4 家兔 BMSCs 传代培养** 取出放置在二氧化碳孵箱中的培养皿。然后在超净台上进行操作,将培养皿中的培养液析出并用不含胎牛血清的LG-DMEM培养液,轻轻反复冲洗培养皿2~3遍,

加入1 mL的0.25%胰蛋白酶溶液培养,放置在37℃,含5%二氧化碳饱和湿度的二氧化碳孵箱培养约1分钟,在倒置相差显微镜下观察,待细胞形态开始皱缩变圆时加入20%胎牛血清LG-DMEM培养基终止消化,吹打成细胞混悬液,1000 r/min离心5分钟后弃上清液,加入20%胎牛血清LG-DMEM培养基吹打均匀,以 $5 \times 10^4$ 个/mL的密度接种到25 cm<sup>2</sup>培养皿中,每瓶接种5 mL,完成一次传代培养。

**2.5 含药血清的制备** 选取2月龄正常家兔15只,平均分为3组,每日给予补肾活血中药(9 g/kg·d)灌胃,另设5只对照组以生理盐水灌胃,连续7天,于最后一次灌药后1小时(灌药前禁食,不禁水12小时),麻醉后腹主动脉取血并分离血清(取血5~10 mL,静置0.5小时后,1000 r/min离心15分钟),经56℃,30分钟灭活,无菌过滤后,置-20℃冰箱保存备用。

**2.6 实验分组和含药血清干预** 选择第3代兔BMSCs,按 $3 \times 10^4$ 个/mL接种于96孔培养板,每孔100 μL,进行分组。实验分为5组,分别为空白组、对照组和补肾活血方含药血清组。其中补肾活血方含药血清组包括3组,分别为5%、10%、20%补肾活血方含药血清+LG-DMEM培养基(低剂量组、中剂量组、高剂量组)。各组分别对应该体积分数的含药血清进行药物干预。

## 3 观察指标及方法

**3.1 家兔 BMSCs 形态学观察和鉴定** 自原代开始,每天在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况、细胞形态和生长状况,根据细胞形态特点对培养细胞进行初步鉴定。家兔BMSCs鉴定采用细胞表面抗原CD45和CD90表达阳性检测法,以确认培养细胞为BMSCs。

**3.2 家兔 BMSCs 增殖能力** 上述各组在加入对应体积分数血清和20%胎牛血清LG-DMEM培养基后,培养条件设置为:37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的恒温二氧化碳培养箱,共培养1天、7天、14天及21天,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法,测定490 nm处吸光度值(A<sub>490</sub>),评价BMSCs增殖能力。

## 4 统计学处理

各组实验数据均以标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 $t$

检验评价组间差异。对体外不同骨复生浓度及不同培养时间、体内不同服药时间及不同培养时间所得实验数据进行统计分析,应用 SPSS17.0 软件对所得数据进行统计学处理, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

5 结果

5.1 形态学观察(如图 1) 骨髓基质干细胞接种后原代培养,初期可以看见数量很多的悬浮细胞呈圆形或椭圆形,细胞形态清晰(如图 A),24~72 小时开始见到细胞贴壁现象,早期类似圆形或椭圆形。经过培养 5 天后,观察贴壁细胞数量有较明显变化(如图 B)。血清培养 7 天细胞梭形或不规则状态、并有突起、核较大,有些已经呈不规则变化。经过培养,14 天以后细胞不断增殖。镜下观察可以看见细胞已经大量贴壁生长,贴壁细胞多呈三角形或不规则形态、集落生长,细胞膨大,伸出长短不均匀的突起和前相比较细胞核大,核仁有 1~2 个,位于胞体同侧。培养 21 天后可见,细胞逐渐铺满培养瓶底,其形状略呈漩涡状排列(如图 C)。细胞经胰蛋白酶消化然后呈圆形或椭圆形,经吹打后脱落传代细胞 5~6 小时开始贴壁生长变形(如图 D),经过培养 2~3 天生长后贴壁,细胞形态由圆形逐渐不规则形有突起,待培养 7 天后贴壁生长较前完全,经 14 天血清培养后,有明显增殖变化。经过血清培养第 21 天后细胞快速生长,整个瓶底已基本爬满。细胞大多呈梭形、多角形或椭圆形,或逐渐形成多层的生长,高密度区域,细胞形态逐渐向成骨细胞方向转化。细胞基质分泌亦较前逐渐增多,并且包绕整个细胞。经含药血清诱导培养第 2 代细胞,观察细胞增殖速度明显增快(如图 E)。补肾活血药物含药血清组细胞接种后 24 小时,可见有较多圆形细胞贴壁生长,培养 3 天后贴壁细胞逐渐增多。经含药血清培养第 5 天,观察得贴壁细胞逐渐由圆形变成纺锤形或梭形。培养到 7~14 天后细胞明显成长呈群落,大小不等,培养细胞呈多种形态,如椭圆形或三角形等,其中大部分细胞带有突起。突起数目较对照组细胞数目多,较短小,其间混有少量圆形、梭形细胞。经含药血清培养 14~21 天后见群落中的细胞逐渐快速增殖,呈放射状向周围扩散。细胞群落之间相互融合,之后细胞融合成单层,连续培养

可以观察到细胞呈复层生长,没有观察到密度抑制现象(如图 F)。伴随着培养时间不断延长,后形成多个圆形或椭圆形致密的小岛状细胞序列结构,细胞逐渐被周围分泌物包围,不断钙化,形成钙化结节。

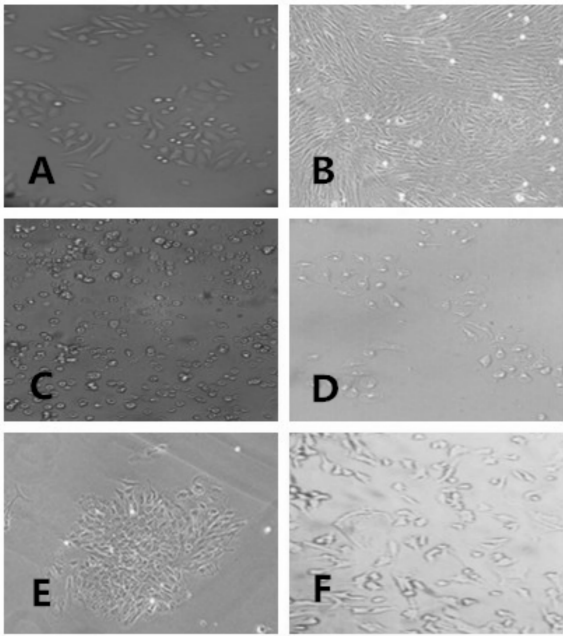


图 A 为骨髓基质干细胞原代培养 24~72 小时结果;  
图 B 为原代培养第 5 天时的情况;  
图 C 为低倍镜下原代培养 21 天时的细胞形态;  
图 D 为传代细胞 5~6 小时时的细胞形态;  
图 E 为经含药血清诱导培养第 2 代细胞形态;  
图 F 为经含药血清培养 21 天时的细胞形态。  
图 1 骨髓基质干细胞细胞培养形态学观察结果

5.2 生长曲线 经过基础培养液培养的第 3 代细胞生长曲线呈倒“S”形传代后第 1 天细胞数目略有减少;第 3~7 天开始即大量增加,到第 7~14 天继续增殖进入指数增长,到第 14~18 天左右达到平台期。而经过含药血清的培养基培养的第 3 代的细胞增殖速度明显的优于前者。见图 2。

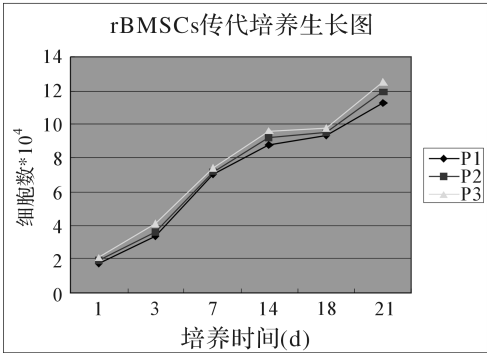


图 2 家兔 BMSCs 传代培养生长图



5.3 骨复生对 rBMSCs 增殖的影响 见表 1。

表 1 MTT 方法检测不同时间细胞的增殖活性 ( $\bar{x}\pm s$ , A490)

组 别	0 d	1 d	7 d	14 d	21 d
空白组	0.18±0.04	0.24±0.04	0.35±0.06	0.39±0.08	0.44±0.08
对照组	0.18±0.04	0.19±0.06	0.21±0.05	0.22±0.06	0.24±0.08
低剂量组	0.19±0.04	0.22±0.06	0.25±0.05 *	0.31±0.06 *	0.33±0.08 *
中剂量组	0.19±0.04	0.23±0.06	0.25±0.05 *	0.33±0.05 *	0.36±0.08 *
高剂量组	0.19±0.04	0.24±0.06	0.26±0.06 *	0.36±0.06 * #	0.43±0.08 * #

注:与对照组比较, \*  $P<0.05$ ;与中药血清低浓度组比较, #  $P<0.05$ 。

结果表明,补肾活血方含药血清组 A490 值均高于同体积分数正常血清组 ( $P<0.05$ ),同时,补肾活血方含药血清组 A490 值随着含药血清体积分数增加而上升,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

6 讨论

股骨头缺血性坏死是髋关节的多发病,主要症状是髋关节固定性疼痛、关节活动功能受限,跛行及下肢肌肉萎缩等。股骨头缺血性坏死属中医“骨痹”“骨蚀”范畴,其主要病因病机为气血凝滞,经脉痹阻,不能濡养关节所致,因此治疗股骨头缺血性坏死的基本原则是活血化瘀,补肾壮骨。现代医学研究发现 BMSCs 有向多种终末细胞分化的储备基因,糖皮质激素可能在基因水平上直接诱导骨髓基质干细胞分化,同时可能通过降低股骨头骨髓基质干细胞的增殖活性和增殖分化能力从而导致骨坏死<sup>[5]</sup>。李春峰等<sup>[6]</sup>研究发现活血化瘀类中药能有效对抗激素的作用,改善激素性股骨头坏死的微循环。因此,补肾活血法能有效地防治激素性股骨头坏死。

补肾活血方(骨复生方)是陕西中医学院骨科多年来应用于临床治疗早、中期股骨头缺血性坏死的验方。全方由黄芪、丹参、三七、土元、鹿角胶、牛膝、生甘草等药物组成,方中黄芪起补脾肺之气,益气生血的作用,作为君药。丹参活血化瘀,行气止痛;三七活血化瘀,消肿止痛;鹿角胶作用为温补肝肾强筋壮骨,活血消肿,通调督脉,为血肉有情之品,性温味咸,入肝肾二经,三药公为臣药。土元破血逐瘀,接骨续筋,为佐药。牛膝主下焦血分,善活血通络,引血下行,与调和诸药之甘草共为使药。诸药合用,共奏行气通络、补益肝肾、活血化瘀之功。前期研究发现:骨复生能提高激素性股骨头缺血性坏死骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)、转化生长因子-β、IGF-1 表达水平及降低血浆内皮素及 TNF-α 水平等不利因素对股骨头骨细胞的破坏来促进坏死骨组织的修复与重建。从而起到预防和治疗股骨头缺血性坏死<sup>[7-9]</sup>。

本次实验研究中,基于中医“补肾活血法”,研究不同浓度补肾活血方含药血清对 BMSCs 增殖、分化的影响,从细胞、分子生物水平探讨对股骨头坏死的作用机制。实验结果显示:对照组的 rBMSCs 增殖能力明显低于实验组 ( $P<0.05$ ),且其作用强度随浓度、时间而改变 ( $P<0.05$ ),说明补肾活血生骨法对激素性股骨头坏死家兔 BMSCs 增殖和分化有明显促进作用,这可能就是骨复生能有效治疗股骨头坏死的机理。

参考文献

[1]康武林,袁普卫.股骨头坏死与骨髓间充质干细胞移植研究进展[J].中国矫形外科杂志,2013,10(19)1954-1957.  
[2]何伟,陈镇秋,张庆文,等.补肾活血中药治疗股骨头坏死临床研究[J].新中医,2012,44(4)50-51.  
[3]袁普卫,殷继超,朱超,等.骨复生对小鼠镇痛作用的实验研究[J].时珍国医国药,2011,22(1)158-159.  
[4]魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2010:1698.  
[5]邵阳,赵晓艳,马勇.激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2011,20(8):88-90.  
[6]李春峰,孙志涛,周正新.不同剂量骨蚀宁胶囊对兔激素性股骨头坏死微循环的影响[J].中国组织工程研究,2013,17(20):3723-3729.  
[7]Yuan Puwei, Zhou Haizhe, He xijing. Experimental study on Gufusheng in Treatment of Steroid-Induced Ischemic Necrosis of Femoral Head in Rabbits[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine;2005,25(4):300-303.  
[8]袁普卫,殷继超,贺西京,等.中药复方骨复生对激素性股骨头缺血性坏死家兔 TNF-α 的影响[J].中国骨伤,2004,17(11):662-664.  
[9]袁普卫,贺西京,周海哲,等.骨复生胶囊对实验性股骨头缺血性坏死家兔血清中 IGF-1 的影响[J].中国中医骨伤科学杂志,2007,15(2):40-41.