

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.012 [http://www.crter.org]

陈少清, 林建平, 王诗忠, 洪钰, 陈乐春. 芍药苷促椎间盘纤维环细胞增殖的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 254-258.

芍药苷促椎间盘纤维环细胞增殖的作用***◆

陈少清^{1,2}, 林建平^{1,3}, 王诗忠^{1,2}, 洪钰¹, 陈乐春²

1 福建中医药大学, 福建省福州市 350003

2 教育部省部共建中医骨伤及运动康复重点实验室, 福建省福州市 350003

3 福建省运动功能康复重点实验室, 福建省福州市 350003

文章亮点:

1 椎间盘退变是引起颈椎病的主要因素, 而椎间盘退变又与椎间盘纤维环细胞过度凋亡密切相关。实验拟从椎间盘细胞凋亡层面, 探讨芍药单体对纤维环细胞的保护作用。

2 大鼠椎间盘与人类椎间盘尚存在差异, 今后研究的方向是采用人体椎间盘细胞进行实验。

关键词:

组织构建; 脊柱组织构建; 颈椎病; 芍药苷; FasL; 纤维环细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞保护; 椎间盘退变; 国家自然科学基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 芍药在颈椎病治疗中使用频率超过 30%, 其主要单体之一芍药苷具有抗炎、抗凋亡等作用, 芍药苷对椎间盘纤维环细胞是否有保护作用, 国内外未见报道。

目的: 探讨芍药苷对椎间盘纤维环细胞的增殖和保护作用。

方法: 采用酶消化法体外培养椎间盘纤维环细胞。取第 3 代纤维环细胞, 培养过程中加入 20 μg/L Fas 配体诱导建立纤维环细胞凋亡模型, 通过 MTT 法测定芍药苷干预纤维环细胞的最适宜浓度, Annexin V/FITC-PI 法观察芍药苷对椎间盘纤维环细胞的保护作用。

结果与结论: 芍药苷浓度 20.8 和 2.08 μmol/L 对椎间盘纤维环细胞具有明显的促增殖作用。20 μg/L Fas 配体能诱导细胞凋亡, 20.8 μmol/L 芍药苷对 Fas 配体诱导椎间盘纤维环细胞有保护作用。

陈少清★, 男, 1983 年生, 福建省漳州市人, 汉族, 2009 年福建中医药大学毕业, 硕士, 助教, 医师, 主要从事脊柱病康复研究。
chenshaoqd@163.com

通讯作者: 王诗忠, 博士, 教授, 主任医师, 福建中医药大学, 福建省福州市 350003; 教育部省部共建中医骨伤及运动康复重点实验室, 福建省福州市 350003

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)02-00254-05

收稿日期: 2012-06-27
修回日期: 2012-07-28
(20120427001/M · W)

Paeoniflorin accelerates annulus fibrosus cells proliferation

Chen Shao-qing^{1,2}, Lin Jian-ping^{1,3}, Wang Shi-zhong^{1,2}, Hong Yu¹, Chen Le-chun²

1 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

2 Key Laboratory of Orthopedics and Exercise Rehabilitation of Ministry of Education, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

3 Fujian Rehabilitation Laboratory of Motor Function, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Abstract

BACKGROUND: Chinese herbaceous peony has been usually used in the treatment of cervical spondylosis in a frequency of over 30%. Paeoniflorin, known as one of the main monomers, has cell-protective abilities against inflammation and apoptosis. Despite these compelling observations, whether paeoniflorin protects annulus fibrosus cells is not reported.

OBJECTIVE: To explore the proliferative and protective effects of paeoniflorin on intervertebral disc annulus fibrosus cells.

METHODS: Annulus fibrosus cells derived from the intervertebral disc were digested with trypsin and

Chen Shao-qing★, Master, Assistant teacher, Physician, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; Key Laboratory of Orthopaedics and Exercise Rehabilitation of Ministry of Education, Fuzhou 350003, Fujian Province, China chenshaoqd@163.com

Corresponding author: Wang Shi-zhong, Doctor, Professor, Chief physician, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; Key Laboratory of Orthopaedics and Exercise Rehabilitation of Ministry of Education, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30973764*; Fujian Joint Research Project of Health Education, No. WKJ2008-2-48*; International Cooperation Projects of Fujian Provincial Department of Science and Technology, No. 2009I0010*

Received: 2012-06-27
Accepted: 2012-07-28

collagenase type II for the further culture *in vitro*. The third-passage annulus fibrosus cells were selected to establish an apoptosis model in response to Fas ligand (20 $\mu\text{g/L}$) and were interfered with paeoniflorin. The appropriate concentration of paeoniflorin was detected by the method of MTT. Apoptotic rate was evaluated with Annexin V/FITC double staining.

RESULTS AND CONCLUSION: The 20.8 and 2.08 $\mu\text{mol/L}$ paeoniflorin significantly promoted the proliferation of annulus fibrosus cells. The apoptotic rate of annulus fibrosus cells *in vitro* was significantly increased after induction with the 20 $\mu\text{g/L}$ Fas ligand. 20.8 $\mu\text{mol/L}$ paeoniflorin could protect annulus fibrosus cells against Fas ligand-induced apoptosis.

Key Words: cervical spondylosis; tissue construction; paeoniflorin; FasL; annulus fibrosus cells; apoptosis; proliferation; cytoprotection; disc degeneration; National Natural Science Foundation of China; tissue construction photographs-containing paper

Chen SQ, Lin JP, Wang SZ, Hong Y, Chen LC. Paeoniflorin accelerates annulus fibrosus cells proliferation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(2): 254-258.

0 引言

有资料表明: 中国目前颈椎病的发病率为17.3%, 一生中患颈椎病的概率为60%–90%, 是导致45岁以上成人丧失劳动能力的最常见原因之一^[1-3]。引起颈椎病的原因很多, 椎间盘退变是主要因素, 尤以纤维环破裂被认为是重要的诱发因素, 其在临床和基础研究中倍受关注^[4]。在颈椎病药物治疗中, 芍药使用频率超过30%^[5]。现代研究表明芍药具有抗炎止痛等作用^[6]。芍药有效成分为白芍总苷, 其中芍药苷占总苷量的90%以上, 是芍药的主要有效成分, 具有抗炎、抗凋亡等作用^[7], 但芍药苷对椎间盘纤维环细胞是否有保护作用, 目前国内外未见报道, 实验体外应用Fas配体诱导建立纤维环细胞凋亡模型^[8], 探索芍药苷对椎间盘纤维环细胞的保护作用。

1 材料和方法

设计: 细胞水平实验。

时间及地点: 实验于2009年9月至2011年9月在福建中医药大学康复医学研究所完成。

材料:

实验动物: 取1月龄清洁级SD大鼠2只, 雌雄不拘, 体质量120 g左右, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号SCXX (沪) 2008-0005。

芍药苷对椎间盘纤维环细胞保护作用实验中应用的药物、试剂及仪器:

Drugs, reagents and instruments used in the experiment of exploring the protective effect of paeoniflorin on annulus fibrosus cells from the intervertebral disc:

药物、试剂及仪器	来源
芍药苷	中国药品生物制品检定所, CAT: 23180-57-6
Fas Ligand	RD 公司, 批号: IZN0807011
AnnexinV-FITC Conjugate	Invitrogen 公司, 批号: 72620204A
噻唑蓝、二甲基亚砷	美国 Sigma 公司
II 型胶原酶	Invitrogen 公司, 批号 17101-015
低糖 DMEM 培养基(DMEM-LG)、PBS、胎牛血清及胰蛋白酶	美国 Hyclone 公司
FACSCalibur 流式细胞仪	美国 BD 公司
ELX808 全自动酶标仪	福建省医疗器械公司
倒置显微照相机	日本 OLYMPUS 公司
CO ₂ 培养箱	美国 SHEL-LAB 公司

方法:

细胞培养鉴定: 取1月龄SD大鼠, 麻醉处死, 无菌手术条件下, 剖取背部颈椎, 剔除脊椎周围肌肉韧带等组织, 用眼科剪取下椎间盘, 立即置入盛有PBS的培养皿中, 小心去除髓核, 清理干净纤维环上附着韧带肌肉等组织, 将纤维环于PBS中漂洗3遍, 然后用眼科剪剪成 1 mm^3 的小块, 置0.25%胰蛋白酶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中消化15 min, 使其充分消化, $1\ 000\ \text{r/min}$ (离心半径13.5 cm)离心5 min, 去除胰蛋白酶, 加入0.2%的II胶原酶溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中消化4 h, $1\ 000\ \text{r/min}$ (离心半径13.5 cm)离心5 min, 除去剩余的II型胶原酶溶液, PBS进行酶液清洗, $1\ 000\ \text{r/min}$ (离心半径13.5 cm)离心5 min; DMEM液(含体积分数20%的胎牛血清)稀释, 将细胞连同组织接种到 $25\ \text{cm}^2$ 培养瓶中。通过细胞贴壁分离, 获取纤维环细胞。置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的培养箱中培养。当细胞生长至近培养瓶底面积的80%时(原代细胞培养8–10 d)传代, 培养条件同原代培养。

纤维环细胞的鉴定:

形态学鉴定: 光镜观察细胞的形态。

纤维环细胞甲苯胺蓝染色: 将第3代细胞接种在放有预处理盖玻片的6孔培养板中进行细胞爬片, 待细胞长成单层时, 进行甲苯胺蓝染色。中性树胶封固, 显微镜下观察, 拍照记录。

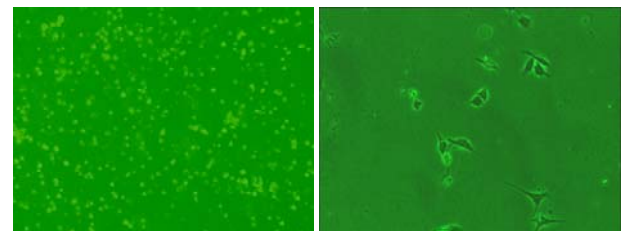
MTT比色实验: 取第3代纤维环细胞接种到96孔板中, 每孔细胞数 4×10^3 – 5×10^3 , 待细胞贴壁后, 弃去上清液, 洗去未贴壁细胞。用含不同浓度芍药苷的DMEM培养液(2 080, 208, 20.8, 2.08, 0.208, 0.020 8 $\mu\text{mol/L}$)干预细胞, 干预24, 36, 48 h后, 加入MTT溶液(5 g/L) $10\ \mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育4 h, 终止培养, 吸弃培养板中的液体, 每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪上以490 nm波长测定各孔吸光度值。

细胞凋亡率检测: 取第3代细胞接种到6孔板, 每孔细胞数 3×10^5 个。先用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液培养, 待细胞长满80%后, 改为含体积分数为1%的胎牛血清的DMEM培养液培养8 h后, 弃掉上清液, 分别用体积分数为1%的胎牛血清配成的 $20\ \mu\text{g/L}$ Fas配体^[8]单独干预以及体积分数为1%的胎牛血清配成的 $20.8\ \mu\text{mol/L}$ 芍药苷联合干预24 h后, 用冷的PBS清洗2遍, 消化收集细胞, 分别加入 $100\ \mu\text{L}$ buffer液悬浮细胞后, 加Annexin V–FITC $5\ \mu\text{L}$ 和PI $10\ \mu\text{L}$, 避光孵育15 min后, 加入 $400\ \mu\text{L}$ buffer液重悬细胞, 随即用流式细胞仪进行凋亡率检测。以正常细胞为对照组。

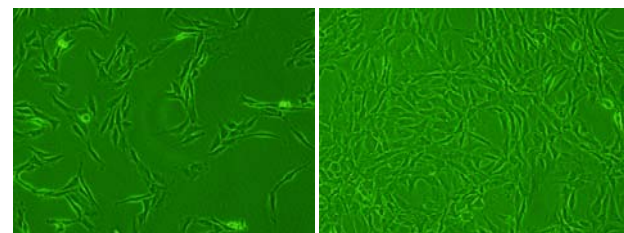
统计学分析: 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 以上数据分析均由SPSS13.0统计软件包完成。

2 结果

2.1 椎间盘纤维环细胞形态观察与鉴定 细胞接种后随即在倒置显微镜下观察, 培养液中存在大小不等的圆形细胞和组织块, 见图1a。随着培养时间延长, 1 d后细胞开始散在贴壁, 见图1b。4 d后, 细胞发生明显变化, 贴壁的基质细胞伸出突起变为梭形, 三角形不等, 体积增大, 细胞数增多, 见图1c。7–9 d后细胞开始融合, 逐渐长满瓶底, 见图1d。传代细胞为圆形, 接种4–6 h即迅速贴壁, 伸展, 重新恢复梭形, 三角形不等。甲苯胺蓝染色可见细胞周围有少量紫色异染色颗粒, 细胞核以圆形或椭圆形为主, 呈深蓝色, 见图1e。



a: 原代取材消化, 培养液中存在大小不等的圆形细胞和组织块 b: 原代细胞培养1 d, 细胞开始散在贴壁



c: 原代细胞培养4 d, 贴壁细胞伸出突起变为梭形、三角形, 细胞数增多 d: 原代细胞培养8 d, 细胞开始融合, 逐渐长满瓶底

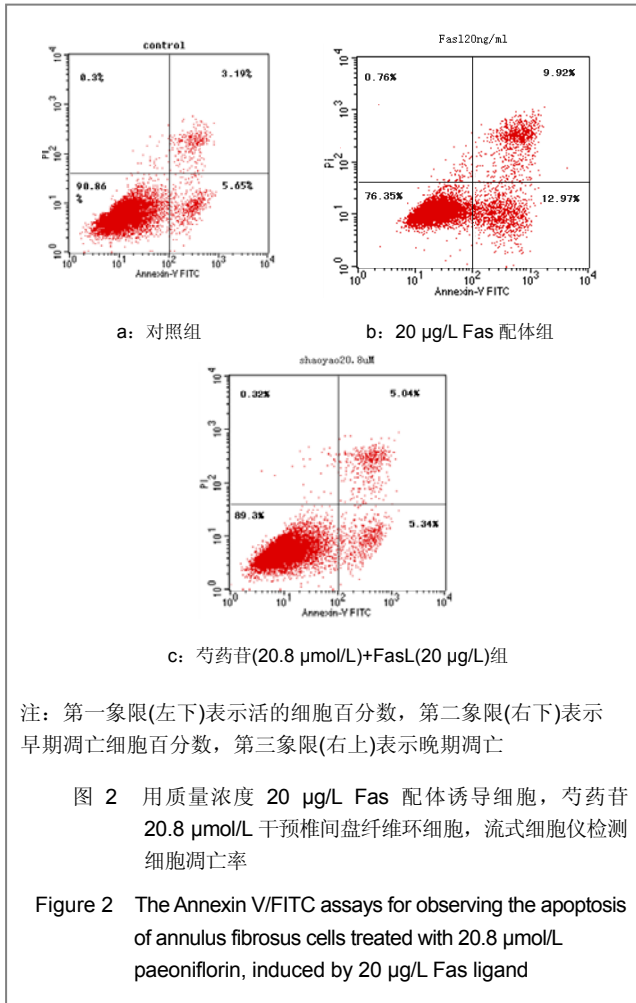


e: 第3代椎间盘纤维环细胞甲苯胺蓝染色, 细胞周围可见少量紫色异染色颗粒, 细胞核以圆形或椭圆形为主, 呈深蓝色

图1 体外鼠椎间盘纤维环细胞培养和鉴定($\times 200$)

Figure 1 Morphology and characterization of rat annulus fibrosus cells *in vitro* ($\times 200$)

2.2 Fas配体诱导及芍药苷对椎间盘纤维环细胞的保护作用 见图2。



细胞凋亡率检测结果显示: 对照组 [(8.762 0 ± 0.283 4)%] 与 Fas 配体 (20 µg/L) 组 [(21.536 0 ± 0.544 6)%] 比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 芍药苷 (20.8 µmol/L)+FasL(20 µg/L) 组 [(10.124 0 ± 0.320 5)%] 与 Fas 配体 (20 µg/L) 组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 芍药苷 (20.8 µmol/L)+Fas 配体 (20 µg/L) 组与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。可见 Fas 配体 (20 µg/L) 就能有效诱导细胞凋亡, 且芍药苷 (20.8 µmol/L) 对 Fas 配体 (20 µg/L) 诱导细胞有一定的保护作用。

镜下观察 Fas 配体 (20 µg/L) 组纤维环细胞明显皱缩、变圆、脱落。芍药苷干预组与对照组无明显差异, 大部分细胞贴壁生长, 呈梭形或三角形, 少数变圆、脱落。

2.3 芍药苷对椎间盘纤维环细胞活力的影响 MTT分

析表明, 芍药苷浓度为 20.8 和 2.08 µmol/L 作用 24, 36, 48 h 吸光度值与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 芍药苷浓度为 20.8 和 2.08 µmol/L 之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。其他浓度组与对照组之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 其他浓度组间差异也无显著性意义 ($P > 0.05$)。可见芍药苷浓度为 20.8 和 2.08 µmol/L 对纤维环细胞具有明显的促增殖作用, 见表 1。

表 1 芍药苷浓度对椎间盘纤维环细胞增殖的影响

Table 1 Proliferation of annulus fibrosus cells treated with paeoniflorin ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{absorbance}$)

芍药苷浓度 (µmol/L)	24 h	36 h	48 h
0(对照组)	0.426 7±0.028 7	0.442 0±0.013 0	0.460 1±0.033 3
2 080	0.426 7±0.028 7	0.442 0±0.013 0	0.433 1±0.022 0
208	0.462 3±0.043 9	0.486 0±0.022 1	0.461 2±0.034 2
20.8	0.663 3±0.072 8 ^a	0.670 0±0.062 8 ^a	0.709 8±0.059 6 ^a
2.08	0.585 0±0.076 1	0.633 6±0.061 8	0.654 8±0.046 6
0.208	0.453 3±0.040 8	0.450 0±0.044 7	0.460 8±0.029 8
0.020 8	0.438 3±0.041 7	0.436 0±0.046 1	0.442 7±0.037 3

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

3 讨论

实验通过 20 µg/L Fas 配体诱导椎间盘纤维环细胞凋亡, 进行芍药苷浓度 20.8 µmol/L 干预后, 发现椎间盘纤维环细胞的凋亡率下降, 表明芍药苷对椎间盘纤维环细胞具有保护作用。关于芍药苷对细胞的保护作用已有较多的相关文献报道: 有报道显示芍药苷可以降低 Abeta(1-4) 诱导的大鼠细胞凋亡率^[9]。吴玉梅等^[10]发现芍药苷促进神经细胞增殖, 降低死亡率。孙蓉等^[11]研究表明芍药苷对硝普钠诱导的 PC12 细胞具有保护作用, 可降低其凋亡率。姜淼等^[12]研究表明芍药苷可保护 KCl 诱导的大鼠皮质损伤的神经元细胞。实验研究结果及文献阅读表明: 芍药苷可降低细胞的凋亡率, 对细胞具有一定的保护作用, 与文献 [9-12] 报道一致。

近年来, 椎间盘细胞的凋亡越来越受到人们的重视, 认为是导致椎间盘细胞数量减少的主要原因, 在椎间盘的衰老和退变过程中起着重要作用^[13-14]。体内和体外试验研究均表明凋亡在椎间盘退变中起了很重要的作用。Fas/Fas 配体系统是椎间盘细胞凋亡的主要途径已经成为共识^[8,14-16]。椎间盘细胞的凋亡可能由其自身

泌或旁分泌的Fas配体来介导的。有作者发现退变、突出椎间盘组织及侧弯患者的椎间盘内均存在Fas和Fas配体的高表达,同时伴有椎间盘细胞的过度凋亡,并且这种高Fas、Fas配体的表达水平能够代表椎间盘内的细胞凋亡水平,同时细胞的凋亡程度和椎间盘退变的严重程度有一定的关联性^[17]。实验表明,芍药苷对Fas配体诱导的椎间盘纤维环细胞有保护作用,但芍药苷对纤维环细胞保护作用的机制是否与Fas/Fas配体系统有关,有待进一步深入研究。

基金资助: 国家自然科学基金(30973764); 福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2008-2-48); 福建省科技厅国际合作项目(2009I0010)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Wang SZ,Chen SJ,Gong DG,et al. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian. 2005;11(10):859-860.
王诗忠,陈水金,龚德贵,等.分期综合疗法治疗颈椎间盘突出症疗效观察[J].中国康复理论与实践,2005,11(10):859-860.
- [2] Wang SZ,Chen SJ,Song HM. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian. 2005;11(11):956.
王诗忠,陈水金,宋红梅.颈椎间歇性拔伸手法治疗青年颈椎病的疗效分析[J].中国康复理论与实践,2005,11(11):956.
- [3] Wang YJ,Shi Q,Jia LS. Zhongguo Zhongyi Gushangke Zazhi. 2006;14(S2):196-200.
王拥军,施杞,贾连顺.关于颈椎病的历史与发展[J].中国中医骨伤科杂志,2006,14(S2):196-200.
- [4] He L,Wang ZF,Han MF. Liaoning Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2007;9(6):59-60.
何磊,王志峰,韩明筋.腰椎间盘退变机理及防治的研究[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(6):59-60.
- [5] Pei QY,Ma Y. Zhongguo Zhongyi Gushangke Zazhi. 2007;15(8): 61-63.
裴庆玉,马勇.治疗神经根型颈椎病常用内服药方分析[J].中国中医骨伤科杂志,2007,15(8):61-63.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Beijing:Chemical Industry Press. 2000:78,125.
中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典2000年版一部[M].北京:化学工业出版社,2000:78,125.
- [7] Tian DH. Beijing:People's Medical Publishing House,2002: 568-575.
田代华.实用中药辞典(上卷)[M].北京:人民卫生出版社,2002: 568-575.
- [8] Cui LY, Liu SL, Ding Y,et al. IL-1beta sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas ligand mediated apoptosis in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2007;28(10):1671-1676.
- [9] Hughes KJ, Chambers KT, Meares GP,et al. Nitric oxides mediates a shift from early necrosis to late apoptosis in cytokine-treated β -cells that is associated with irreversible DNA damage. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;297(5): E1187-E1196.
- [10] Wu YM,Xu HP,Wang CT,et al. Zhongguo Yaolixue yu Dulixue Zazhi. 2002;16(3):172-175.
吴玉梅,许汉鹏,王春婷,等.芍药苷对培养小鼠皮层神经元的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2002,16(3):172-175.
- [11] Sun R,Wu DD,Zhang ZP,et al. Zhongguo Yaolixue yu Dulixue Zazhi. 2006;41(22):1710-1712.
孙蓉,武栋栋,张作平,等.过氧化氢诱导PC12细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J].中国药理学杂志,2006,41(22):1710-1712.
- [12] Jiang M,Yu LY,Bian HM,et al. Zhongguo Zhongyi Jizheng. 2009;18(6):937-941.
姜淼,禹良艳,卞慧敏,等.芍药苷对KCl诱导原代培养大鼠皮层神经元损伤的保护作用[J].中国中医急症,2009,18(6):937-941.
- [13] Takada T, Nishida K, Doita M,et al. Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc. Spine (Phila Pa 1976). 2002;27(14):1526-1530.
- [14] Park JB, Kim KW, Han CW,et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine (Phila Pa 1976). 2001;26(2):142-146.
- [15] Takada T, Nishida K, Doita M,et al. Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc.Spine (Phila Pa 1976). 2002;27(14):1526-1530.
- [16] Li XC,Li L,Wang H,et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2005;85(24): 1718-1720.
李小川,李雷,王欢,等.Fas / FasL基因在退变腰椎间盘组织中的表达及诱导凋亡作用[J].中华医学杂志,2005,85(24): 1718-1720.
- [17] Tegeder I, Löttsch J. Current evidence for a modulation of low back pain by human genetic variants. J Cell Mol Med. 2009; 13(8B):1605-1619.