

蜂毒注射液对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡影响的研究

谭宁¹, 王科澎², 贺守第³, 罗晓光¹, 朱辉军¹, 黄胜光¹

1. 广东医学院附属深圳南山医院中医风湿科, 广东 深圳 518052

2. 深圳市福田区中医院, 广东 深圳 508060

3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410006

[摘要] 目的: 探究蜂毒注射液对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (FLS-RA) 凋亡的影响。方法: 原代培养 FLS-RA, MTT 法测定蜂毒注射液对细胞增殖及细胞毒性作用, hoechst 染色法观察凋亡小体, Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率。结果: 组织块培养法培养 2 周后细胞向心性排列, 呈梭形及三角形。经过 3~5 次传代, FLS-RA 细胞逐渐纯化, 以 FLS 为主 (>95%), 体外生长稳定。倒置相差显微镜观察细胞形态: 细胞排列整齐, 向心性排列, 呈梭形或三角形, 偶见圆形细胞, 细胞核成卵圆形, 居细胞中央, 胞质均匀透亮。干预 24 h: 各组生存率低于空白对照组 ($P < 0.05$), 浓度越高, 生存率越低; 蜂毒注射液处理 48 h: 各组生存率低于空白对照组 ($P < 0.05$), 浓度越高, 生存率越低; 同浓度蜂毒注射液处理 24 h 生存率与 48 h 比较: 48 h 组小于 24 h 组 ($P < 0.05$)。利用 ORIGIN 5.0 软件计算蜂毒注射液的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 (16.79 ± 0.13) mg/L。实验组与阳性对照组中凋亡小体形态相似, 细胞核呈致密浓染, 颜色发白, 而阴性对照组未见明显凋亡小体, 细胞核未见固缩的染色质。B1 区为细胞碎片, B2 区为晚期凋亡和死亡的细胞, B3 区为正常细胞, B4 区为早期凋亡的细胞。由于 B2 区包含死亡的细胞, 多选择 B4 区比较早期凋亡率。低浓度组蜂毒注射液作用 FLS-RA 细胞 24 h, 早期凋亡率大于空白对照组 ($P < 0.05$); 高浓度组蜂毒注射液早期凋亡率明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 且大于低浓度组 ($P < 0.05$)。结论: 蜂毒注射液可诱导成纤维样滑膜细胞凋亡, 这可能是蜂毒治疗类风湿关节炎的机理之一。

[关键词] 类风湿关节炎 (RA); 蜂毒注射液; 成纤维样滑膜细胞 (FLS-RA); 细胞凋亡

[中图分类号] R593.22 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0280-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.130

Study of Apistoxin Injection on Apoptosis of Fibroblast-like Synovial Cells of Rheumatoid Arthritis Patients

TAN Ning, WANG Kepeng, HE Shoudi, et al

Abstract: Objective: To explore the influence of Apistoxin injection on the apoptosis of fibroblast-like synovial cells of rheumatoid arthritis patients. Methods: Rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells (FLS-RA) was concentrated by the primary culture in vitro. Effect of Apistoxin injection on cell proliferation and cell toxicity was measured by MTT technique, and apoptotic body was observed by Hoechst staining, apoptotic rate was detected after Annexin V/PI double staining. Results: After primary culture for 2 weeks, the cells were fusiform or triangle-like, arranged around the center. After passage culture for 3-5 generations, FLS-RA became pure and the percentage of FLS was over 95%, growing steady in vitro. The results under inverted phase contrast microscope showed that the cells were arranged around the center in order, were fusiform or triangle-like, and seldom were round with oval nucleus in the center of the cell. The cytoplasm was well-distributed and lucency. After intervention with Apistoxin injection for 24 and 48 hours, the survival rate of FLS-RA was lower in the intervention groups than that in the blank control group ($P < 0.05$), and the survival rate decreased with the increase of Apistoxin injection concentration ($P < 0.05$). The survival rate induced by the same concentration of Apistoxin injection was lower after intervention for 48 hours than that after 24 hours ($P < 0.05$). The 50% inhibiting concentration (IC_{50}) of Apistoxin injection was 16.79 ± 0.13 mg/L. The apoptotic body was found in both observation group and positive control group, while was not shown in the negative control group. The cells in B4 region were chosen for the calculation of early apoptotic rate, and the results

[收稿日期] 2014-12-29

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (201303177)

[作者简介] 谭宁 (1977-), 女, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合风湿病。

[通讯作者] 黄胜光, E-mail: 282111306@qq.com.

showed that low- and high-concentration Apistoxin injection groups had higher early apoptotic rate than the blank control groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the high-concentration groups had the highest early apoptotic rate ($P < 0.05$). Conclusion: Apistoxin injection can induce the apoptosis of fibroblast-like synovial cells, which may be one of the therapeutic mechanisms of Apistoxin injection for rheumatoid arthritis.

Keywords: Rheumatoid arthritis; Apistoxin injection; Fibroblast-like synovial cells; Apoptosis.

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节肿痛为主要临床表现的一种系统性自身免疫性疾病,以关节滑膜慢性炎症、关节进行性破坏、关节畸形及功能丧失为主要病理表现。临床表现为对称性多关节肿胀、疼痛、晨僵以及全身多系统的受累,此病病因未明,具有发病率高、致残率高的特点,严重影响了患者的劳动力及生活质量^[1-2]。蜂毒对类风湿关节炎病人具备较好的疗效,但蜂毒通过何种机制起作用很少有人探究,国内外研究发现成纤维样滑膜细胞(FLS-RA)增生特点类似于肿瘤细胞增生特点,蜂毒可通过多条途径诱导肿瘤细胞凋亡,故设计本实验探究蜂毒对 FLS-RA 凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 标本取材 4 例类风湿关节炎滑膜标本均取自深圳市第六人民医院骨科行关节置换或关节镜手术患者,所有 RA 患者诊断均符合 2009 年 ACR/EULAR 制定的 RA 分类标准和评分系统,得分均 >6 分。

1.2 仪器和试剂 恒温 CO₂ 细胞培养箱、流式细胞仪(美国 beckman coulter 公司)、蜂毒注射液(长春博奥生物有限公司)、胎牛血清(美国 Sigma 公司)、DMEM/F12 细胞培养基(Hyclone 公司)、MTT 试剂盒(碧云天公司)、hoechst 试剂盒(碧云天公司)、Annexin V/PI 试剂盒(invitrogen 公司)、细胞凋亡阳性对照试剂盒(碧云天公司)。

1.3 成纤维样滑膜细胞的分离培养 将术后 RA 滑膜组织放入盛有 DMEM/F12 培养基的 15 mL 离心管内低温保存,除去附着的脂肪组织及血块,用预冷 PBS 液冲洗 3 次,将组织块修剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 的小块,放置于培养瓶中,加入 DMEM/F12 完全培养基,放置于细胞培养箱细胞培养箱内培养,每 3 天更换培养基,观察滑膜细胞生长情况,待成纤维样滑膜细胞长满至覆盖瓶底细胞 $>80\%$,进行传代,一般采用一传二。将 3~5 代的细胞在倒置光学显微镜下进行鉴定及实验。

1.4 MTT 检测实验 蜂毒浓度配置参照临床蜂毒注射液浓度稀释于 DMEM/F12 完全培养基中。取 96 孔细胞培养板,设置空白对照组、低浓度组(0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)、中浓度组(2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L)、高浓度组(16 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L),每个浓度设置 3 个复孔,首先加入 100 μ L 细胞混悬液(FLS-RA 细胞数 5×10^4 /mL),细胞培养箱培养 24 h,吸除培养基,加入 100 μ L 上述浓度配置的蜂毒注射液培养基,细胞培养箱培养 24 h,加入 100 μ L MTT 液,培养箱

孵育 4 h,再加入 100 μ L 甲瓩溶解液,培养箱孵育 4 h 后,在酶标仪下采用 570 nm 波长测定吸光度。

1.5 hoechst 染色法观察凋亡小体 实验设置阴性对照组、实验组(根据 MTT 实验的半数抑制浓度确定蜂毒注射液浓度 16 mg/L)、阳性对照组。将盖玻片放置于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 细胞混悬液(FLS-RA 细胞数 1×10^4 /mL),显微镜下观察细胞爬片成功后,分别加入完全培养基、16 mg/L 蜂毒注射液培养基、细胞凋亡诱导试剂 A+B,放入培养箱孵育 24 h,吸除玻片表面培养基,加入 0.5 mL 固定液,室温固定 10 min,无菌 PBS 冲洗 2 次,滴入适量 Hoechst 染色液染色 9 min,无菌 PBS 冲洗 2 次,封片液封片,倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

1.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率 根据 MTT 实验结果选择最佳浓度,设置低浓度组(4 mg/L),高浓度组(16 mg/L),空白对照组(完全培养基)。6 孔培养板每孔加入 1 mL 细胞重悬液(FLS-RA 细胞数 5×10^4 个 /mL)中。按照实验设计依次加入蜂毒注射液培养基混悬液,孵育 24 h,无菌 PBS 冲洗两次,胰酶消化后转移至流式管中,离心去上清,无菌 PBS 冲洗 1 次,加入 $1 \times$ AnnexinV 重悬,将重悬液稀释至 1×10^6 /mL,各组取 100 μ L 至流式管中,同时加入 5 μ L Alexa Fluor 488 Annexin V 和 1 μ L 100 μ g/mL PI 工作液,室温孵育 15 min,离心去上清后,加入 1X Annexin V 定容至 500 μ L,细胞滤网过滤,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

1.7 统计学方法 所有实验数据均使用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,利用 SPSS19.0 系统进行统计学分析,所有数据都采用正态、方差分析,若不满足,用秩和检验。

2 实验结果

2.1 FLS 原代培养及鉴定 组织块培养法培养 2 周后细胞向心性排列,呈梭形及三角形。经过 3~5 次传代,FLS-RA 细胞逐渐纯化,以 FLS 为主($>95\%$),体外生长稳定。倒置相差显微镜观察细胞形态:细胞排列整齐,向心性排列,呈梭形或三角形,偶见圆形细胞,细胞核成卵圆形,居细胞中央,胞质均匀透亮。

2.2 各组 OD 值比较 见表 1。干预 24 h: 各组生存率低于空白对照组($P < 0.05$),浓度越高,生存率越低;蜂毒注射液处理 48 h: 各组生存率低于空白对照组($P < 0.05$),浓度越高,生存率越低;同浓度蜂毒注射液处理 24 h 生存率与 48 h 比较: 48 h 组小于 24 h 组($P < 0.05$)。利用 ORIGIN 5.0 软件计算蜂毒注

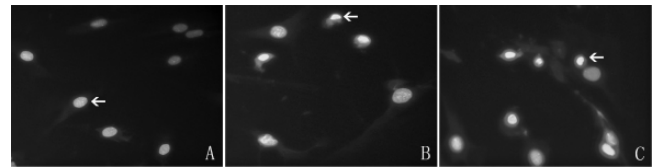
射液的半数抑制浓度(IC₅₀)为(16.79± 0.13)mg/L。

表1 各组 OD值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	蜂毒注射液 浓度(mg/L)	OD值	
		24 h	48 h
空白对照组	0	0.0291± 0.0015	0.0312± 0.0012
低浓度组	0.1	0.0279± 0.0020 ^①	0.0266± 0.0016
低浓度组	0.5	0.0261± 0.0019 ^①	0.0244± 0.0020 ^②
低浓度组	1	0.0248± 0.0017 ^①	0.0232± 0.0019 ^②
中浓度组	2	0.0232± 0.0019 ^①	0.0180± 0.0010 ^②
中浓度组	4	0.0194± 0.0013 ^①	0.0154± 0.0015 ^②
中浓度组	8	0.0174± 0.0017 ^①	0.0121± 0.0012 ^②
高浓度组	16	0.0153± 0.0206 ^①	0.0074± 0.0151 ^②
高浓度组	20	0.0093± 0.0020 ^①	0.0016± 0.0012 ^②
高浓度组	25	0.0038± 0.0011 ^①	0.0008± 0.0009 ^②

与空白对照组比较, ①P<0.05; 与同组 24 h 比较, ②P<0.05

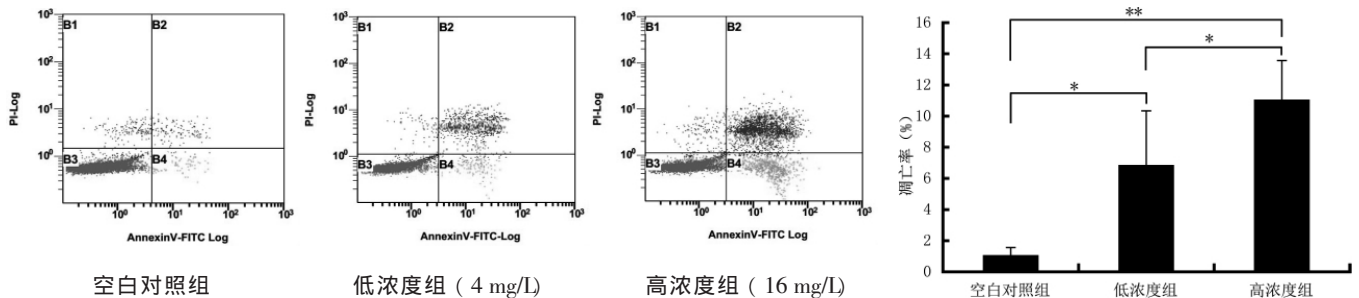
2.3 hoechst 染色观察凋亡小体 见图1。实验组与阳性对照组中凋亡小体形态相似, 细胞核呈致密浓染, 颜色发白, 而阴性对照组未见明显凋亡小体, 细胞核未见固缩的染色质。



A: 阴性对照组 B: 实验组 C: 阳性对照组

图1 hoechst 染色观察凋亡小体

2.4 各组细胞凋亡率比较 见图2。B1区为细胞碎片, B2区为晚期凋亡和死亡的细胞, B3区为正常细胞, B4区为早期凋亡的细胞。由于B2区包含死亡的细胞, 多选择B4区比较早期凋亡率。低浓度组蜂毒注射液作用 FLS-RA 细胞 24 h, 早期凋亡率大于空白对照组(P<0.05); 高浓度组蜂毒注射液早期凋亡率明显高于空白对照组(P<0.01), 且大于低浓度组(P<0.05)。



注: *P<0.05, **P<0.01

图2 各组细胞凋亡率比较

3 讨论

RA 是以对称性多关节损害的一种自身免疫性疾病, 其病理表现为滑膜组织异常增生。滑膜组织是包裹在关节外面的一层膜组织, 正常的滑膜组织在解剖学上可分为两个部分: 滑膜内层(衬里层)和滑膜下层(衬里下层), 滑膜内层介于滑膜下层与滑液之间, 这层有两种主要类型的细胞: 巨噬样细胞(又称 A 型滑膜细胞)和成纤维样细胞(又称 B 型滑膜细胞)^[3-4]。大量的研究证实, FLS-RA 拥有超常的增殖能力以及高强度的侵蚀力, 衬里层的滑膜细胞异常增生可能与细胞凋亡受到不同程度的抑制相关^[5-6]。

蜂毒是经受长时期考验的天然药物, 在风湿病的治疗中占有重要地位^[7]。药理研究表明, 蜂毒具备镇痛、抗炎、降血压、抗凝血、抗菌、防辐射、抗肿瘤等作用。近年来用于治疗自身免疫性疾病、神经系统疾病、运动系统疾病、心血管疾病、变态反应性疾病等。临床试验研究表明, 蜂毒有抗炎、调节免疫作用, 可改善类风湿因子、血沉、C-反应蛋白、抗环

瓜氨酸抗体等指标^[8-11]。体外研究及动物实验发现, 蜂毒可以有效抑制大鼠体内多种细胞因子的水平, 这对抑制滑膜组织炎症和阻断关节软骨基质的降解有正面作用, 进而起到保护关节软骨的作用^[12-14]。

本实验通过蜂毒注射液作用于体外原代培养的 FLS, MTT 实验显示在一定范围内[(0.1~25)mg/L]随着蜂毒注射液浓度升高, FLS 的生存率逐渐下降, 通过 hoechst 染色法可观察到凋亡小体, 利用 AnnexinV/PI 双染法联合流式细胞术检测发现蜂毒注射液诱导 FLS-RA 凋亡, 且高剂量组的早期凋亡率大于低剂量组以及阴性对照组。有动物实验研究发现, 蜂毒肽是蜂毒治疗 RA 的活性成分^[15], 是否蜂毒通过蜂毒肽而诱导 FLS 的凋亡有待进一步探究。

[参考文献]

[1] Liu AL, Shen PW, Chen PJ. Strontium ranelate in fracture healing and joint pain improvement in a rheumatoid arthritis

- patient[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2013, 10(3): 206-209.
- [2] Karlson EW, Deane K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 38(2): 405-426.
- [3] Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, et al. Synovial activation in rheumatoid arthritis [J]. Frontiers in Bioscience, 2004, 9: 2323-2334.
- [4] Melinte R, Jung I, Georgescu L, et al. VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints [J]. Rom J Morphol Embryol, 2012, 53 (4): 911-915.
- [5] Wang F, Xu L, Feng X, et al. Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2012, 14(5): R228.
- [6] Fan W, Zhou ZY, Huang XF, et al. Deoxycytidine kinase promotes the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2013, 6(12): 2733-2744.
- [7] 黄胜光, 谭宁, 朱辉军. 雷公藤、附子、蜂毒在风湿病中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(6): 20-22.
- [8] 张金禄, 刘喜德. 蜂针疗法治疗类风湿关节炎膝关节滑膜炎的临床随机对照研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1904-1906.
- [9] 邓鸣, 张炜宁. 蜂针疗法治疗类风湿性关节炎 20 例临床观察[J]. 中医药导报, 2011, 14(6): 71-73.
- [10] 马辉, 袁敏哲, 姚卓. 蜂疗对类风湿性关节炎的治疗[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1063-1064.
- [11] 刘喜德, 张金禄, 郑汉光, 等. 蜂针疗法对类风湿关节炎患者外周血 TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 996-997.
- [12] 赵争敏, 薛鸾, 曹瑶. 蜂毒对胶原诱导大鼠关节炎 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 的影响[J]. 河南中医, 2009, 29(12): 1169-1170.
- [13] 周颖芳, 段颖华, 李万瑶. 蜂针对胶原诱导关节炎大鼠 HPA 轴的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(4): 233-235.
- [14] 杨顺益, 刘金芝, 冯淑兰, 等. 蜂针对实验性类风湿关节炎动物细胞因子影响的研究[J]. 中国自然医学杂志, 2002, 4(1): 41-43.
- [15] 李晶华, 马静, 李军昌. 蜂毒肽对类风湿关节炎模型大鼠患侧关节的影响[J]. 武警医学, 2011, 22(9): 741-743.

(责任编辑: 骆欢欢)

内病外治新疗法常年招生(教社证字 G03005 号)

一、鼻炎头痛学习班: 重点讲解为什么鼻炎、鼻窦炎、过敏性鼻炎不在鼻部肺部治疗能快速神奇治愈。顽固性正偏头痛、头晕、三叉神经痛、牙痛、口腔溃疡, 结膜炎, 失眠神经衰弱, 不在头部治疗的新理论和快速治愈方法。二、颈肩腰腿痛学习班: 重点讲解为什么腰痛不治腰, 腿疼不治腿, 足跟痛不治脚, 肩周炎有真假, 骨质增生能软化, 治股骨头坏死与膝关节炎取穴一样等关节软组织疼痛的新理论和快速治愈方法。三、内科病学习班: 讲解 2 型糖尿病, 胃病, 结肠炎, 冠心病, 胆囊炎, 小儿腹泻, 厌食同治一个病根新理论。四、男科妇科病学习班: 讲解男女乳腺增生, 痛经, 前列腺炎, 阳痿, 早泄, 慢性肾炎, 同治一个病根的外治新理论。五、皮肤病科: 讲解点耳穴, 根治青春痘, 湿疹, 皮炎, 各种癣疣等皮肤病的外治方法。六、快速查病诊断班: 患者无需开口, 看一眼患者的双腿便知道患者的病根在哪里, 超前诊断患者现在或将来易患什么病。让患者心服口服, 是大夫接诊快速准确诊断不可少的绝招技术。七、特效针法学习班: 一秒钟埋线法治疗各种慢性疑难病。泻血法, 六针法, X 针法, 穿针法一次性治疗肱骨外上髁炎, 急性腰扭伤, 牙痛, 尾骨痛, 足跟痛, 踝关节扭伤, 棘上韧带损伤等症收效神速, 大多患者入针即效, 拔针即愈。以上各科明确全身慢性疑难病原发病因和继发病症的鉴别诊断治疗, 本疗法防治结合治未病, 可作为大夫本人即家庭治疗保健康复之首选。本校为学员可代为办理劳动和社会保障部门颁发的全国通用高级按摩师证书, 中医康复保健证书, 高级针灸师证书, 网上可查, 凭证可开业。每月 1 号, 15 号开班。本疗法把疑难病的诊断治疗简单化。有无医学基础 7~10 天即可学会, 学校有实习门诊, 患者很多, 不熟练可多学几天, 学会为止。七个科学费 5000 元。地址: 河北省石家庄市健康路省第四人民医院西 200 米, 石家庄内病外治新疗法培训学校, 联系人: 王卫平。手机 13930962015。详情登陆 www.nbwzxf.com, 农行卡号: 6228481250018026419, 邮政账号: 601331001200114327, 乘车路线: 石家庄火车站乘 131 路省四院下西行 200 米即到或石家庄北站乘 5 路省四院下西行 200 米即到。