

益气生骨注射液促进体外成肌细胞增殖作用的研究

谢 艳 朱太咏 秦 娜

(河南省正骨研究院,河南省洛阳市启明南路 82 号,471002)

摘要 目的:研究益气生骨注射液对体外培养的成肌细胞的增殖作用。方法:将成肌细胞进行体外培养,实验组加入不同浓度的益气生骨注射液,对照组分别加入不同浓度的黄芪注射液和复方当归注射液,空白组不加任何药物。筛选出各药物对细胞增殖的最适生长浓度,并观察其对细胞的增殖作用。结果:益气生骨注射液对成肌细胞的增殖作用最强,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与对照组比较,差异无统计学意义。结论:益气生骨注射液有促进成肌细胞增殖的作用。

关键词 @ 益气生骨注射液;成肌细胞

Effect of Yiqi Shenggu Parenteral Solution on in vitro Proliferation of Myoblasts

Xie Yan, Zhu Taiyong, Qin Na

(Orthopedics-Traumatology Institute of He'nan, Add.: No. 82, Qiming South Road, Luoyang City, He'nan Province, Post code: 471002)

Abstract Objective: To research the effect of Yiqi Shenggu parenteral solution on in vitro proliferation of myoblast. **Methods:** Yiqi Shenggu parenteral solution was compared with Huangqi parenteral solution, Compound Angelica parenteral solution and blank group on cultured myoblasts at various concentrations. The optimal growth concentration of myoblasts proliferation was filtered for each parenteral solution and their impacts on proliferation were observed. **Results:** Not statistically different with other two medicated solutions, Yiqi Shenggu had significant stimulating effect than the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yiqi Shenggu parenteral solution can promote the proliferation of myoblasts.

Key Words @ Yiqi Shenggu parenteral solution, myoblast

益气生骨注射液由黄芪、党参、当归、川芎等 9 味中药组成,是我们开发的一种新药制剂,具有益气活血、行气散瘀、养血生新的功效。我们对其与其他 2 种对照中药(黄芪注射液和复方当归注射液)对体外培养的成肌细胞的增殖作用进行了研究,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器 超净工作台(型号 VS-1300-V,苏州安泰空气技术有限公司制造),高速离心机(LDZ5-2 型,北京医用离心机厂生产),血球计数板(XB-K-25 型,上海市求精生化试剂仪器有限公司),双目显微镜(型号 CH,OLYMPUS,日本),倒置显微镜(IMT-2 型,OLYMPUS,日本),二氧化碳培养箱(ALSCO 型,美国)。

1.2 试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(凌飞科技),HEPES(凌飞科技),苏木素伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.3 药物 青链霉素(国药准字 H13021632,批号 07029363,中诺药业有限公司),黄芪注射液,复方当归注射液,益气生骨注射液(自制)。

2 方法

2.1 成肌细胞的分离与培养 取回 9 日新罗曼品种鸡胚,每个鸡胚用酒精棉球擦拭 2~3 遍消毒,打开鸡胚的圆端气室,轻轻挑破外膜,用镊子轻轻挑出鸡胚,放入培养皿内,用 PBS 冲洗两遍,用眼科镊剥离背部及腿部皮肤,取肌肉放入另 1 个培养皿,用眼科剪剪成糊状,加入 10mL 0.25% 胰蛋白酶,反复吹打后吸入 10mL 小瓶中,37℃ 消化 30min,期间摇动 2 次。拿出后过滤,转入试管中,1500rpm 离心 10min,取出后倒掉上清液,加入 6mL RPMI1640 培养液(含有 20% 胎牛血清,此液为生长培养液)反复吹打后计数,用生长培养液稀释至 6×10^5 个/mL 于培养皿中,于 CO₂ 培养箱内反复差贴 3 次,以消除成纤维细胞^[1]。收集差贴后的细胞悬液接种至 24 孔培养板,每孔 1mL。

2.2 实验分组 接种好的细胞每组加入相应的药物。不加任何药物为空白组。实验组(加入益气生骨注射液)使药物浓度为 2%,1%,0.5%,0.25%,0.125%,0.0625%。黄芪组(加入黄芪注射液)使药物浓度为 4%,2%,1%,0.5%,0.25%,0.125%。当归组(加入复方当归注射液)使药物浓度为 2%,1%,0.5%,0.25%,0.125%,0.0625%。每 1 个药物浓度重复 2 孔。放入 37℃,5% CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。

基金项目:河南省科技攻关项目(991170632)

表1 各组药物最适浓度促进成肌细胞增殖的作用比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	相同面积内成肌细胞个数				
	2天	3天	4天	5天	6天
空白组	7.20 ± 2.97	10.10 ± 4.07	13.10 ± 3.25	19.20 ± 4.44	26.40 ± 5.23
实验组	10.17 ± 4.02	18.83 ± 5.71*	24.50 ± 5.21*▲	27.67 ± 5.99*	34.50 ± 7.31*
黄芪组	9.83 ± 2.14	15.50 ± 3.62*	23.67 ± 4.41*▲	22.33 ± 4.03	28.00 ± 5.33
当归组	8.17 ± 1.47	13.83 ± 3.13	15.50 ± 3.27	23.17 ± 6.11	25.33 ± 6.12

注: * 为与空白组比较 $P < 0.05$, ▲ 为与当归组比较 $P < 0.05$ 。

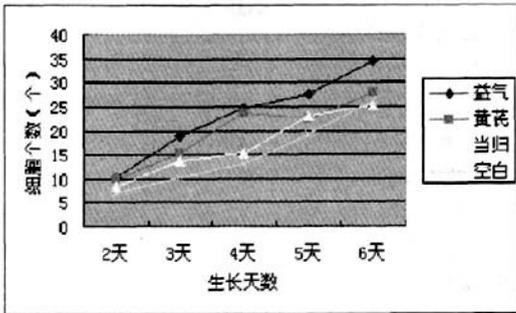


图1 成肌细胞生长曲线图

2.3 最适药物浓度的筛选和对成肌细胞增殖的作用

每天观察细胞生长情况并计数视野中最小方框内 (650 × 430 μm) 成肌细胞个数。每1个浓度药物随机重复计数10个视野。计数至有细胞融合成片无法计数为止。从中挑选出每种中药最适宜成肌细胞生长的浓度,并用SPSS11.5统计软件进行统计,对每组药物促进成肌细胞增殖的作用进行比较。

2.4 成肌细胞的鉴定(HE染色) 融合后的细胞更换融合培养液(含5%胎牛血清的RPMI1640培养液)^[2]。培养6天后进行HE染色。

3 结果

3.1 最适药物浓度的筛选和对成肌细胞增殖的作用

接种后2天细胞贴壁完成,形成梭形细胞。至接种后7天,实验组已形成单层融合,细胞铺满视野,无法计数。计数接种后2、3、4、5、6天每天的各组细胞数,发现实验组药物促进成肌细胞生长的最适浓度为0.125%,黄芪注射液组促进成肌细胞生长的最适浓度为0.5%,而复方当归注射液的最适浓度为0.25%。每组成肌细胞生长计数结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,见表1。生长曲线见图1。从统计结果可以看出,实验组(益气生骨注射液)对成肌细胞增殖的促进作用最明显,第3、4、5、6天与空白组差异均有统计学意义,第4天与复方当归对照组差异有统计学意义。同一时间点相同面积内(最小视野框中)实验组成肌细胞增殖较空白组明显增多。

3.2 成肌细胞的鉴定 细胞更换融合培养液后6天HE染色结果显示相邻成肌细胞接触后,细胞间胞膜

模糊,融合成肌小管。肌小管呈长条形,内含多个细胞核,证明培养的细胞是成肌细胞。

4 讨论

成肌细胞是前体细胞,体外生长表现出良好的增殖与分化能力。在低细胞密度情况下以增殖为主,合成代谢旺盛,含20%胎牛血清的生长培养基能提供增殖所需营养。在高密度时则以分化为主,含5%胎牛血清的融合培养基不能提供细胞增殖所需营养,但能引发、促进成肌细胞分化^[2]。本实验结果显示,除培养后第2天外,其余3、4、5、6天实验组的成肌细胞个数均较空白组多,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明益气生骨注射液在细胞增殖期确实有促进成肌细胞增殖的作用。益气生骨注射液主要由益气活血化瘀药物组成。有研究发现动脉缺血、静脉瘀血和局部的失神经和神经病变是慢性难愈性创面的直接原因,因而促进创面的血液循环对于促进创面愈合非常重要^[4]。另有研究证明活血药物可改善伤口的血循环,诱导多种细胞进入伤口,释放细胞因子,促进毛细血管的生成及胶原的沉积,从而提高愈合组织的抗断裂强度,起到生肌固皮的作用^[5],这也可能正是益气生骨注射液促进成肌细胞生长,促进肌肉愈合的原因所在。其具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 廖华,余磊,熊绍虎,等.与雪旺细胞联合培养的成肌细胞生物学特性研究.中华骨科杂志,2003,23(11):682-686.
 [2] 杨志明,岑石强,解慧强,等.原代人胚成肌细胞体外培养增殖及分化特性.中国修复重建外科杂志,2001,15(5):261-264.
 [3] 易成刚,郭树忠,陈建宗.生肌类中药的理论实验研究.中国临床康复,2004,8(29):6470-6471.
 [4] 李萍,黄启福,盛巡,等.珠珀散对阿霉素大鼠伤口愈合影响的研究.中医外治杂志,1998,7(5):6-7.

(2008-09-18 稿)

