



原代培养技术在中医药研究中的应用

董 杨, 施建蓉

(上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

[关键词] 原代培养; 医学, 中国传统; 药理学

[中图分类号] R394.26 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)01-0090-04

Application of primary culture technique to traditional Chinese medicine research

Yang DONG, Jian-Rong SHI

(Center of Experimental Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS primary culture; medicine, Chinese traditional; pharmacology

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao J Chin Integr Med, 2006, 4(1):90-93 www.jcimjournal.com

原代培养(primary culture)又名初代培养,是从供体取得组织细胞后的首次培养。其特点是细胞或组织刚离开机体,生物性状尚未发生很大的改变,一定程度上反映了它们在体内的状态,表现出原组织或细胞的特性。对于药物实验研究,原代培养是一种很好的实验技术。由于原代培养的组织含有多种细胞成分,即使生长出同一种类型的细胞,细胞间也存在很大差异。如果供体不同,即使组织的类型、部位相同,个体差别也可以在细胞上反映出来。因此原代培养细胞的部分生物学特征尚不够稳定,在进行较为严格的对比性实验研究时,还需先对细胞进行短期传代。近年来,原代培养技术已被广泛应用于中医药研究尤其是中药研究之中。

1 原代培养技术

1.1 组织块培养法 组织块培养法即将组织剪切成小块后接种于培养瓶,简便易行且成功率较高。但由于反复剪切和接种过程对组织块易造成损伤,因此并不是每个小块都能长出细胞。此法适于细胞数量较少的原代培养,如骨髓细胞培养等。

1.2 消化培养法 用酶制剂(最常用的是胰蛋白酶)处理组织块,除去细胞间质,使细胞相互分离形成单细胞悬液,大多形成单层细胞生长方式。本法的优点在于单层细胞更易摄取营养及排出代谢产物,因此生长较快。但操作不慎易于造成污染,且消

化处理须恰到好处,否则会对细胞产生一定的损伤。随着实验技术水平的提高,目前此方法已被较多地应用于研究之中^[1]。

2 原代培养技术在中医药研究中的应用

综合近十年来的文献报道,体细胞、血细胞和肿瘤细胞的原代培养技术较为成熟,已被应用于中医药的研究之中,尤其是肝细胞和神经细胞的原代培养,其应用更为广泛。

2.1 用于中药药理学研究 中药药理学研究是目前应用原代培养技术最广泛的领域,被称为中药的生物学效应研究,用以了解中药的细胞药理与毒理作用。与体内整体实验相比,体外实验具有简便迅速、条件易控制、药理靶点与环节较为清楚等优点。

2.1.1 用于药效学研究 利用原代培养技术研究中药有效成分和复方的作用效果和机制,是从分子水平研究药效的重要手段。

朱陵群等^[2]研究发现:原代培养的大鼠海马神经细胞缺氧、缺糖 5 h 后再给氧,可诱导神经细胞凋亡和细胞坏死,并显著增加细胞内 Ca^{2+} 浓度和乳酸脱氢酶的释放,且随再给氧时间的延长而增加;三七总皂苷能降低神经细胞凋亡及坏死的百分率,降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,减少乳酸脱氢酶的释放,且其作用随剂量增加而增强。Shih 等^[3]发现,川芎提取物川芎嗪可以保护原代培养的大鼠海马神经元线粒

体,减少自由基的产生并帮助清除自由基,从而对红藻氨酸所致的细胞损伤起到保护作用。刘晓玲等^[4]原代培养大鼠滑膜细胞,发现青藤碱可以通过抑制滑膜细胞恶性增殖及白细胞介素 6 mRNA 基因的表达来阻断滑膜炎的进程。林爱华等^[5]报道,粉防己碱可以明显抑制气道平滑肌细胞的增殖活性。粉防己碱对组胺激发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高表现出明显的抑制效应,推测粉防己碱抑制培养的气道平滑肌细胞增殖活性的作用可能是通过阻断细胞膜 Ca^{2+} 通道而降低 $[Ca^{2+}]_i$ 实现的。Bickmeyer 等^[6]研究报道,粉防己碱可以阻滞原代培养的牛嗜铬细胞电压依赖式钙离子通道,促进儿茶酚胺释放,增加细胞内钙离子的水平。崔云华等^[7]原代培养大鼠肝星状细胞,发现丹参酸乙可降低活化的以及经丙二醛刺激后的肝星状细胞内的氧化程度、抑制增殖细胞核抗原的表达量,在抗氧化和抗增殖作用之间可能存在一定的联系。Li 等^[8]原代培养中脑神经元及神经胶质细胞,发现雷公藤提取物雷公藤内酯可以对抗脂多糖所致的多巴胺吸收减少和细胞中酪氨酸羟化酶免疫活性的丢失、抑制小神经胶质细胞的活动和肿瘤坏死因子及一氧化氮的过度生成。雷公藤内酯还可保护脂多糖所致的多巴胺能神经元的损伤,其机制可能是抑制小神经胶质细胞的活动。Kamei 等^[9]采用原代培养技术培养大鼠脂肪细胞和心肌细胞,首次证实中药提取物紫草素在体外实验中具有胰岛素样作用。Hsu 等^[10]采用原代培养技术培养嗜中性粒细胞,发现灵芝多糖可促进嗜中性粒细胞的移动,增强蛋白激酶 C、丝裂酶原激活蛋白激酶和酪氨酸激酶的活性,从而增强嗜中性粒细胞的趋化性和吞噬作用。Wang 等^[11]报道,从白术中提取的有效成分苍术酮对原代培养的人白血病单核细胞有一定的细胞毒性。

万文成等^[12]发现清开灵能减少谷氨酸所致的原代培养大鼠大脑皮层神经细胞内乳酸脱氢酶的漏出量、减轻细胞的形态学改变,表明清开灵能够对抗谷氨酸介导的兴奋性毒性,对培养的大鼠皮层脑细胞具有保护作用。李彧等^[13]原代培养大鼠系膜细胞,经脂多糖刺激 10 h 后,核转录因子- β 的活性达到最高峰,且最高荧光强度位于细胞核内;大剂量温脾汤药物血清可明显抑制核转录因子- β 的活性;大剂量药物血清能明显抑制核转录因子- β 抑制剂 I β 的降解。李彤等^[14]采用血清药理学方法及原代培养心肌细胞技术,发现在通脉汤含药血清干预下,缺氧心肌细胞游离钙离子的浓度明显下降,同时细胞膜 L 型钙离子通道的表达在缺氧条件下亦明显下降,表明通脉汤可以减轻缺氧心肌细胞钙的超负

荷。尤红等^[15]的实验结果显示,一定浓度的复方 861(由丹参、黄芪等十味中药组成)可以促进体外分离培养的大鼠肝细胞 DNA 的合成,对肝细胞的凋亡则无明显影响。张斌等^[16]观察抗纤复方对大鼠纤维化肝原代培养贮脂细胞自分泌的影响,结果表明抗纤复方药物血清能明显抑制贮脂细胞产生转化生长因子-1,阻断肝纤维化时贮脂细胞的自分泌。Imanishi 等^[17]采用原代培养技术培养肝星状细胞,并用硫代乙酰胺造成肝纤维化模型。结果表明,茵陈蒿汤主要是通过抑制血小板源生长因子 b 受体的磷酸化及下行信号传导通路来抑制 DNA 的合成与转录,可能是茵陈蒿汤治疗肝纤维化的机制。Zhang 等^[18]原代培养胎鼠皮层神经细胞,用谷氨酸盐造成细胞损伤,使细胞中胆碱酯酶和链亲合素标记的过氧化物酶活性降低、乳酸脱氢酶释放增加。加入清脑益智方药物血清后,上述酶的活性可恢复至正常水平,一氧化氮的生成及细胞凋亡亦受到抑制。

2.1.2 用于方剂配伍机制的研究 刘成海等^[19]将扶正化瘀 319 方进行拆方,各自制备药物血清并作用于原代培养肝细胞。结果显示,各药物血清对细胞形态无明显影响,对肝细胞白蛋白分泌及其前白蛋白原 mRNA 表达则有不同程度的促进作用,其中尤以扶正化瘀 319 方全方的作用最为显著。

2.2 用于针灸学研究 梁希彬等^[20]观察电针后大鼠中脑腹侧部粗提液对体外培养多巴胺能神经元表达数目、神经元胞体直径及神经突起长度的影响。实验证实,电针后大鼠中脑腹侧部粗提液能够促进多巴胺能神经元胞体的发育和突起的生长,但对多巴胺能神经元表达数目则无明显影响。

2.3 用于中医证候本质的研究 陈云波等^[21]采用血瘀证兔模型血管内皮细胞直接培养以及血瘀证兔模型血清培养血管内皮细胞两种方法,建立血瘀证细胞损伤模型。原代培养的血管内皮细胞出现了病理性损伤及内分泌功能的改变。此外,模型组原代细胞培养液中一氧化氮的含量比对照组明显减少,而内皮素含量则有上升趋势。证明实验建立的细胞损伤模型从功能和结构上能反映血瘀证整体动物模型及部分临床病人的病理特征,可用于血瘀证实质和活血化瘀作用机制的研究。

3 原代培养技术应用于中医药研究存在的问题及前景

3.1 加强相关的基础研究 原代培养经首次传代成功即成细胞系,通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培

养物称为细胞株。各种已被命名和经过细胞生物学鉴定的细胞系或细胞株,都是一些形态比较均一、生长增殖比较稳定、生物性状较为明确的细胞群。细胞系分裂繁殖过程中形成单层有利于培养,细胞亦可冻存,以备以后的培养。一般来说,细胞系优于原代培养。细胞系在中医药研究中已被广泛应用,如各种肿瘤细胞、肝星状细胞系、巨嗜细胞系、经乙肝病毒基因转染的肝细胞等,主要用于中药的药效学研究。但毕竟还有许多细胞尚无法获得细胞系(株),尤其在现阶段的中国,稳定的细胞系、细胞株不易获得,原代培养细胞至少提供了体外细胞水平实验的工具。因此,须加强细胞培养的基础研究,将更多的细胞系(株)应用于中医药研究领域,使中医药研究在细胞水平上有所提高。

目前,国内外已有许多取材于人的细胞培养研究,其细胞多取材于器官捐献者。国内在此方面的研究工作开展较少,在中医药领域中的研究才刚刚开始。由于存在伦理学等方面因素的制约,其应用范围仍然较窄,目前主要用于一些比较容易获得的细胞,如子宫内膜细胞、人牙髓细胞、角质细胞(来源于手术切除的包皮)、血细胞及血管内皮细胞(来源于脐带)等,还有一些来源于手术切除的细胞,如肿瘤细胞及腹主动脉瘤血管平滑肌细胞等。

细胞培养技术研究中药时的一个关键技术是中药的给药方法,关于这方面的基础研究正日益受到重视。目前在中药药效学研究中主要存在两种给药方式:(1)直接添加法。将中药复方以水煎醇提等方法进行粗提,直接添加于培养体系,或将粗提物冷冻干燥,再用培养液稀释后添加于培养体系。该方法简便,但易受制剂的杂质、pH 值、渗透压、电解质等因素影响。国内外相关研究中已有使用中药有效成分进行直接添加的实验报道。(2)间接添加法(血清药理学方法)。给予动物复方灌胃给药,收集服药后的动物血清,将含药血清添加于培养细胞。该法避免了体外用药的一些干扰因素,但起步较晚,尚有待进一步完善。

3.2 用于中医理论的研究 细胞培养技术在中医药研究中主要用于中药尤其是药效学的研究,并已取得不少成果。迄今为止,研究目的多限于验证临床有效复方或探索其可能的作用机制,但这显然是不够的。应充分发挥体外实验的优势,深入研究中药复方在组方、剂量、辨证论治上的奥妙,进而推陈出新,给临床以启示或指导^[22],这对于开发中药、推进中医药走向世界有重要意义。

此外,运用细胞培养技术阐明中医理论的实质亦是值得探索的领域。如吴正正等^[23]提出中医

“证”(虚证和部分实证)的本质是细胞内基因诱生性表达的细胞因子。中医“证”发生的分子机制是由于细胞因子网络自稳态平衡破坏的结果。阴虚证的本质可能是由于白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子基因表达增强、生物学活性相对升高,引起细胞因子网络自稳态平衡失调的结果。现已有一些研究证候实质的实验,如血瘀证血管内皮细胞病理模型的建立及其相关研究。郑爱华等^[24]探讨了肝郁证、脾虚证模型动物干扰素 及白细胞介素 4 mRNA 表达的变化。由于传统中医理论比较重视整体而忽视微观的原因,因而从细胞、分子水平来研究中医基础理论的工作目前还相对较少,利用细胞培养技术深入进行这方面的研究,可以促进中医基础理论研究的进一步发展。

[参考文献]

- 1 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 68-73.
- 2 朱陵群, 范吉平, 黄启福, 等. 三七总皂苷抗缺氧缺糖再给氧诱导大鼠海马神经细胞凋亡的研究. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 52-55.
- 3 Shih YH, Wu SL, Chiou WF, *et al*. Protective effects of tetramethylpyrazine on kainate-induced excitotoxicity in hippocampal culture. *Neuroreport*, 2002, 13(4): 515-519.
- 4 刘晓玲, 陈光星, 李晓娟, 等. 青藤碱对 型胶原诱导关节炎大鼠滑膜炎症的抑制作用及其机理探讨. 广州中医药大学学报, 2002, 19(3): 214-217.
- 5 林爱华, 宋立强, 李 妍, 等. 粉防己碱抑制气道平滑肌细胞增殖活性的作用. 第四军医大学学报, 2003, 24(21): 1980-1982.
- 6 Bickmeyer U, Weinsberg F, Muller E, *et al*. Blockade of voltage-operated calcium channels, increase in spontaneous catecholamine release and elevation of intracellular calcium levels in bovine chromaffin cells by the plant alkaloid tetrandrine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1998, 357(4): 441-445.
- 7 崔云华, 王晓玲, 严振国, 等. 丹参酸乙对大鼠肝星状细胞细胞内氧化水平及增殖细胞核抗原的影响. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(4): 210-212.
- 8 Li FQ, Lu XZ, Liang XB, *et al*. Triptolide, a Chinese herbal extract, protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage through inhibition of microglial activation. *J Neuroimmunol*, 2004, 148(1-2): 24-31.
- 9 Kamei K, Kitagawa Y, Kadokura M, *et al*. Shikonin stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes via an insulin-independent tyrosine kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(3): 642-651.

- 10 Hsu MJ, Lee SS, Lee ST, *et al* . Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* . *Br J Pharmacol*, 2003, 139(2): 289-298 .
- 11 Wang CC, Chen LG, Yang LL . Cytotoxic activity of sesquiterpenoids from *Atractylodes ovata* on leukemia cell lines . *Planta Med*, 2002, 68(3): 204-208 .
- 12 万文成, 李杰芬, 罗海燕, 等 . 清开灵对大鼠皮层神经细胞保护作用的实验研究 . *中医药研究*, 2002, 18(4): 45-46 .
- 13 李 彧, 牛建昭, 吕 青, 等 . 温脾汤药物血清对体外培养的大鼠系膜细胞核转录因子- B 活化的影响 . *解剖学报*, 2003, 34(3): 294-297, 311 .
- 14 李 彤, 孙 明, 周宏研, 等 . 通脉汤含药血清对缺氧心肌细胞游离钙及 L 型钙通道的作用 . *中国病理生理杂志*, 2004, 20(3): 391-394 .
- 15 尤 红, 王宝恩, 马雪梅, 等 . 复方 861 对原代培养大鼠肝细胞增殖和凋亡的作用 . *中国实验方剂学杂志*, 2001, 7(2): 34-35 .
- 16 张 斌, 王灵台 . 抗纤复方对大鼠纤维化肝贮脂细胞自分泌转化生长因子 1 的影响 . *中国中医药科技*, 1998, 5(5): 280-282 .
- 17 Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, *et al* . Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats . *J Hepatol*, 2004, 41(2): 242-250 .
- 18 Zhang J, Li L, Chen X, *et al* . Effects of a traditional Chinese medicine, Qing Nao Yi Zhi Fang, on glutamate excitotoxicity in rat fetal cerebral neuronal cells in primary culture . *Neurosci Lett*, 2000, 290(1): 21-24 .
- 19 刘成海, 王晓玲, 谭英姿, 等 . 扶正化痰 319 方对肝细胞白蛋白生成的拆方配伍作用 . *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(4): 36-39 .
- 20 梁希彬, 田德全, 赵英侠, 等 . 电针后大鼠中脑腹侧部粗提液对体外培养的多巴胺能神经元生长发育的影响 . *针刺研究*, 1999, 24(3): 179-183 .
- 21 陈云波, 王 奇, 赖世隆 . 血瘀证动物细胞损伤模型的研制 . *广州中医药大学学报*, 2001, 18(2): 109-114 .
- 22 黄海茵, 郭映华, 于尔辛 . 体外细胞培养应用于中药复方研究的进展 . *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(5): 394-396 .
- 23 吴正正, 黄秀榕, 祁明信 . 中医药与细胞因子研究进展 . *中草药*, 2003, 34(9): 10-12 .
- 24 郑爱华, 李家邦, 蔡光先, 等 . 肝气郁结证与脾气虚证的 Th 细胞分化中的相关性实验研究 . *中国医师杂志*, 2004, 6(3): 357-358 .

[收稿日期] 2005-05-31

中国康复医学会颈椎病专业委员会第九次学术年会征文通知

为了加深对颈椎病的认识,提高诊治康复水平,展现现代康复技术,中国康复医学会主办,中国康复医学会颈椎病专业委员会、第二军医大学附属长海医院、上海中医药大学脊柱病研究所、上海中医药大学附属龙华医院承办的“中国康复医学会颈椎病专业委员会第九次学术年会”拟定于 2006 年 10 月在上海召开。会议正在征文,现将具体征文事宜通知如下。

1 征文内容 (1)颈椎病、腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症康复研究进展;(2)关于颈椎病、腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症的“围手术期”治疗;(3)颈椎病、腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症基础与应用研究进展;(4)颈椎病、腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症手术治疗进展;(5)颈椎病、腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症的非手术(中药、针灸、推拿、导引等)治疗进展;(6)脊柱相关疾病研究进展(椎体骨质疏松、椎体不稳、骨质疏松性骨折、脊柱肿瘤等)。

2 来稿要求 (1)来稿请寄全文或 1200 字左右中、英文摘要(或中文摘要)一份,建议使用电子版,请自留底稿,恕不退稿。来稿提供工作单位、详细地址、邮政编码及电话(有条件的请提供 e-mail)。(2)来稿地址:上海市宛平南路 725 号 77 信箱脊柱病研究所王拥军、李晨光收;邮政编码:200032;电话及传真:021-54232267;E-mail: yjwang88@hotmail.com, light7711@yahoo.com.cn。(3)被录用论文将编入学术交流会论文集,优秀论文将在大会报告,并授予优秀论文奖。提交论文的参会代表可获论文证书及国家级继续教育学分 12 分。(4)截稿日期:2006 年 7 月 31 日。

中国康复医学会颈椎病专业委员会
上海中医药大学脊柱病研究所