技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）08-0965-02

汉防己甲素对瘢痕成纤维细胞有丝分裂的调控

曹治东[1]，石崇荣[2]，黄崇本[2]，苟景跃[1]，李邦春[1]，田开熙[1]
（1. 重庆市第四人民医院、重庆市急救医学研究所骨科，重庆 400014；2. 重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨汉防己甲素对瘢痕成纤维细胞有丝分裂的影响。方法：将不同浓度梯度的汉防己甲素与瘢痕成纤维细胞体外共培养，不同时间点分别取细胞标本检测其分裂指数，并使用流式细胞仪检测其细胞周期及不同周期细胞分布。将以上检测值与空白对照及阳性对照比较。结果：汉防己甲素组在各个时间点的分裂指数均较空白对照组明显下降，使峰值时间缩短，具有作用浓度及时间依赖性，汉防己甲素组 G_0-G_1 期细胞比例降低，S 期及 G_2-M 期细胞比例明显增多，S 期与 G_2-M 期时相时间明显延长。结论：汉防己甲素使成纤维细胞分裂停滞于 G_2-M 期，抑制细胞分裂，且具有明显浓度及时间依赖性。

【关键词】汉防己甲素；成纤维细胞；增殖性瘢痕；细胞分裂；细胞周期
【中国图书分类法分类号】R 622.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-23

Inhibition effect of tetrandrine on division of fibroblast from keloid

CAO Zhi-dong[1], SHI Chong-rong[2], HUANG Chong-ben[2], GOU Jing-yue[1], LI Bang-chun[1], TIAN Kai-xi[1]
(1. Department of Orthopaedics, the Forth People's Hospital of Chongqing, the Emergency Medical Research Institute of Chongqing; 2. Department of Burn & Plastics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To probe the effect of tetrandrine on mitosis of scar fibroblast. *Methods*: Fibroblast was cultured with various concentrations of tetrandrine, then the cultured fibroblast samples were gathered on different days of time gradient. Mitosis index was determined by light microscopy. Cell cycle and its distributions were analyzed by flow cytometer. *Results*: Mitosis index of tetrandrine group was reduced obviously compared with blank group at all time points and the peak time was shortened in a dose-and time-dependent manner. In the flow cytometry analysis, it was found that tetrandrine could promote fibroblast to enter S and G_2-M phase from G_0-G_1 phase and extend the time of S & G_2-M phase distinctly. *Conclusion*: Tetrandrine can block the division of fibroblast at G_2-M phase in a dose-and time-dependent manner.

【Key words】tetrandrine; fibroblast; keloid; cell division; cell cycle

成纤维细胞的异常增生及合成、分泌胶原蛋白是瘢痕形成的主要机制[1]。我们的研究曾发现汉防己甲素能抑制瘢痕成纤维细胞的增殖[2]，但其对成纤维细胞有丝分裂的具体作用机制，对细胞周期的影响如何？目前文献尚未见报道，本文拟就此探讨。

1 材料和方法

1.1 主要的试剂与仪器

汉防己甲素购于江西彭泽制药厂，曲安缩松钠购于桂林制药厂，流式细胞仪为 BD 公司 FACS Calibur，其它主要实验仪器及低耗品由重庆医科大学器官移植实验室提供。

1.2 实验分组

将汉防己甲素先用无水乙醇溶解成 1 g/L 溶液，再用培养液稀释为所需浓度的含药培养液（0.5、1、2 mg/L），分别标记为 T_1 组、T_2 组、T_3 组，乙醇在实验中的最终浓度为 1‰（pH=7.456），空白对照组以等量的培养液处理，阴性对照组用等浓度乙醇处理，曲安缩松钠组（H 组）浓度为 80 mg/L。T_2 组和 H 组的浓度为各自的半数有效剂量（IC_{50}）的 1/4，此时不能观察到明显的细胞坏死。

1.3 成纤维细胞的培养及传代

无菌条件下切取人耳垂增殖性瘢痕，参照司徒镇强等[3]的方法。采用组织块贴壁法进行瘢痕成纤维细胞的原代培养，胰酶消化法传代，实验用细胞为第 6~7 代，此时细胞处于对数生长期。

作者介绍：曹治东（1976-），男，主治医师，硕士，研究方向：脊柱外科。
基金项目：重庆市卫生局资助项目（编号：05-2-210）。

1.4　细胞分裂指数的检测

细胞悬液接种于事先放置有小盖玻片的 96 孔培养板内，共接种 7 块，培养 24 h 后按以上分组分别换含药培养液，加药后每 24 h 取出 1 块培养板，按常规方法用 95%酒精固定，HE 染色、封片，连取 7 d。光镜下随机选择 10~20 个视野，共数 1 000 个细胞，计算出每 1 000 个细胞中的分裂相平均数值和所占百分比（以核分裂为准），将所测得的百分数逐日按顺序绘制成细胞分裂指数曲线图。

1.5　细胞周期的检测

接种细胞、加药均同上，从加药后第 24 h 开始，采用胰酶消化分散细胞，将单个细胞悬液离心（3 000 r/min），弃去上清液，连续取 3 d，将细胞重新悬浮于 5 ml 4℃盐水中，缓慢加入-20℃预冷的 95%乙醇 15 ml，使其终浓度为 70%，冰浴 30 min。检测前 PBS 洗 3 遍，去掉乙醇，以不含 DNA 酶的 RNA 酶消化 30 min、PI 染色 30 min 后上机（流式细胞仪）检测，以 488 nm 的激发波长测定并用 Modfit LT2.0 软件分析。

1.6　统计学处理

所有数据按$\bar{x}\pm s$表示，采用 SAS8.1 统计软件包进行统计学分析，各组间细胞分布及时相时间的两两比较采用 Q 检验，P 值<0.05 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　细胞分裂指数

各组细胞分裂指数在细胞接种用药后第 1 天最低，以后逐渐增高，空白对照组及乙醇对照组第 6 天达峰值，T_1 组第 5 天达峰值，T_2 组及阳性对照组第 4 天达峰值，T_3 组第 3 天达峰值，以后逐渐下降，各组分别于第 7、6、5、4 天达最低，如图 1 所示，各用药组较空白对照组各时相点均不同程度的下降，具有明显的剂量及时间依赖性（P<0.01）。阳性对照组与 T_2 组无显著差异（P>0.05）。见图 1。

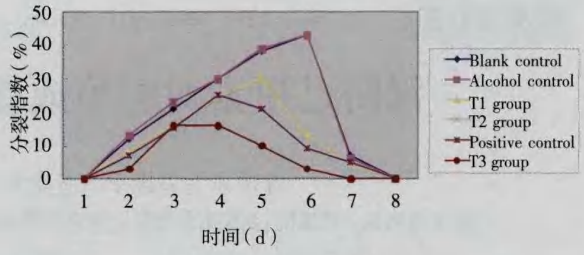


图 1　细胞分裂指数曲线图

2.2　细胞分布及各时相时间

各时期细胞分布及各时相时间见表 1，与空白对照组相比，T_1 及 T_2 组各时相细胞分布为：G_0-G_1 期细胞略有降低，S 期细胞比例略有增加，G_2-M 期细胞比例明显增多（P<0.01），T_3 组 G_0-G_1 期明显降低，S 期与 G_2-M 期均明显增多（P<0.01）。实验各组时相时间为：S 期与 G_2-M 期时相时间明显延长有显著性差异（P<0.01）。阳性对照组主要表现为 G_2-M 期细胞明显增多及时相时间明显延长。见表 1。

3　讨　论

汉防己甲素（Tetrandrine，TET）又名粉防己碱，系千金藤属防己科植物粉防己的主要生物活性成分，属双苄基异喹啉类化合物。研究证明 TET 系 Ca^{2+}拮抗剂，既可阻滞细胞膜电压门控通道介导的 Ca^{2+}内流，还可以阻滞受体门控通道干预细胞内 Ca^{2+}分布，从而阻断有关病理过程[4]，刘学松等[5]采用 PI（碘化丙啶）和 FITC（异硫氰荧光素）染色，流式细胞仪检测 TET 处理后的 3T6 细胞的细胞周期，结果提示 TET（1.0 μg/ml）可阻止细胞由 G_1 期进入 S 期，同时 1.5 μg/ml 和 2.0 μg/ml 还可阻止 3T6 细胞由 G_2 期进入 M 期。有研究认为[6]，胞浆中 Ca^{2+}浓度在 G_1/S 期突发性增加是细胞复制和增殖的信号，TET 可阻止 Ca^{2+}进入细胞“岗位”，破坏了细胞内外 Ca^{2+}的适宜浓度，使细胞受阻于 G_1 期。MPF（M-Phase promoting factor）对 G_2/M 期的调节有重要作用，其活性也受 Ca^{2+}影响[7]，因此推测 TET 对 3T6 细胞 G_2/M 期的影响可能与 MPF 有关。

本实验发现汉防己甲素能降低成纤维细胞分裂指数，抑制细胞分裂，不但使 G_2-M 期延长，同时也使 S 期明显延长，G_0-G_1 期和 S 期细胞分布无明显变化，而 G_2-M 期细胞分布明显增多。还发现汉防己甲素的作用具有明显作用浓度及时间依赖性。

表 1　TET 对成纤维细胞增殖周期的影响（$\bar{x}\pm s$）

浓度（mg/L）	细胞分布（%）			时相时间（h）		
	G_0-G_1	S	G_2-M	G_0-G_1	S	G_2-M
空白对照	80.1 ± 4.1	12.1 ± 1.2	6.9 ± 3.8	92.6 ± 11.0	5.7 ± 1.2	6.7 ± 0.8
阳性对照	89.7 ± 4.9	13.1 ± 1.3	20.6 ± 7.2	103.4 ± 3.6	5.6 ± 1.5	11.1 ± 2.1
T_1 组	72.6 ± 4.3	14.3 ± 1.0	18.1 ± 1.3	81.2 ± 10.0	7.1 ± 0.8	8.3 ± 0.9
T_2 组	65.4 ± 6.1	15.1 ± 1.1	23.5 ± 2.8	96.6 ± 7.4	8.4 ± 0.2	10.1 ± 0.7
T_3 组	62.1 ± 2.8	17.6 ± 0.7	30.3 ± 1.7	111.6 ± 12.8	11.3 ± 0.9	12.3 ± 0.6

细胞分布的分析：阳性对照组与空白对照比较，G_0-G_1 期与 S 期 P>0.05，G_2-M 期 q 值 =2.71，P<0.01；T_1、T_2 与空白对照比较：G_0-G_1 期与 S 期 P<0.05，G_2-M 期 P<0.01；T3 组与空白对照比较：G_0-G_1 期、S 期及 G_2-M 期 P<0.01

时相时间的分析：T_1、T_2 及 T_3 组与空白对照比较，G_0-G_1 期 P>0.05，S 期与 G_2-M 期 P<0.01；阳性对照组与空白对照比较 G_0-G_1 与 S 期 P>0.05，G_2-M 期 P<0.01

临床研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0967-03

经前路中空加压螺钉治疗齿状突骨折 18 例

范 凌,潘显明,邓少林,廖冬发,屈 波,蒋 凯,李 伟
(成都军区总医院骨科,成都 610083)

【摘 要】目的:探讨应用单枚齿状突螺钉固定治疗齿状突骨折的疗效和优越性。方法:回顾 18 例经前路齿状突螺钉内固定手术患者的临床资料,其中男 13 例,女 5 例,Anderson Ⅱ型 11 例,Ⅲ型 7 例,其中浅Ⅲ型 5 例。所有患者均以 1 枚 3.5 mm 空心钛螺钉内固定。术后通过随访结果,分析其临床疗效。结果:18 例患者均获得 6~24 月的随访,平均 9 个月。所有病例骨折愈合良好,无螺钉松动、断裂。15 例临床症状完全消失,大部分患者恢复正常的颈椎活动度。结论:经前路齿状突螺钉内固定手术属于微创术式,其手术操作简单、并发症较少、损伤小、恢复快、固定可靠,可最大限度保留颈椎正常活动度。

【关键词】齿状突;骨折;空心螺钉;内固定
【中国图书分类法分类号】R687 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-20

Direct anterior fixation of odontoid fractures with hollow screw

FAN Ling, PAN Xian-ming, DENG Shao-lin, QU bo, JIANG Kai, LI Wei
(*Department of Orthopedics, Chengdu Command General Military Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the application and efficacy of direct anterior fixation of odontoid fractures with hollow screw. *Methods*: Eighteen patients with odontoid fractures, 13 males and 5 females, and 11 with type Ⅱ fractures and 7 with type Ⅲ fractures, including 5 cases with shallow type Ⅲ fractures, according to Anderson's classification system, underwent percutaneous anterior odontoid screw fixation with one screw plant. The clinical examinations were carried out to observe the therapeutic effects through the follow-up. *Results*: The patients were followed up

作者介绍:范 凌(1977-),男,主治医师,硕士,研究方向:脊柱外科。

3.1 TET 作用的浓度效应

从细胞的分裂指数曲线可以看出,药物在低浓度和高浓度时,对细胞的抑制效果不同。药物作用 24 h,T_1、T_2、T_3 均明显地抑制细胞增殖活力,但 T_1 组细胞数目与初始接种量相比仍有增加,说明对细胞尚无直接杀伤作用。随着药物浓度升高,细胞数目进一步减少,甚至低于原始接种量,说明高浓度时,药物对细胞有直接杀伤作用。结合 TET 对细胞分裂指数的抑制作用及对细胞周期的影响(不但使 G_2-M 期延长,同时也使 S 期明显延长;G_0-G_1 期和 S 期细胞分布无明显变化,而 G_2-M 期细胞分布明显增多),证明 TET 对成纤维细胞生长的抑制,主要通过抑制细胞 DNA 合成、复制和有丝分裂,使细胞周期停滞于 G_2-M 期。

3.2 TET 作用的时间效应

TET 对成纤维细胞增殖的抑制作用,有明显的时间效用关系。随着药物作用时间的延长,抑制强度逐渐增强,尤其当细胞处于对数生长期时这种效应更明显。药物在浓度一定时,细胞分裂指数逐渐增高直至最大值,随着作用时间延长,分裂指数呈近乎直线下降,直至下降为零。

参 考 文 献

[1] Yagmur C, Akaishi S, Ogawa R, et al. Mechanical receptor-related mechanisms in scar management: a review and hypothesis[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 126(2): 426-434.

[2] 曹治东,石崇荣,黄崇本,等.汉防己甲素对增生性瘢痕基质胶原酶活性的影响[J].中华整形外科杂志,2006,22(6):448-450.

[3] 司徒镇强.细胞培养[M],西安:世界图书出版社,1996.69-71.

[4] Liu Q Y, Karpinski E, Rao M R. TET: a novel calcium channel antagonist inhibits type? Calcium channels in neuroblastoma cells[J]. Neuropharmacology, 1991, 30(12A): 1325-1331.

[5] 杨 柳,李 岱.汉防己甲素对体外人眼 Tenon 囊成纤维细胞的抑制效应[J].国际眼科杂志,2009,9(4):653-655.

[6] Short A D, Bian J, Chosh T K, et al. Intracellular Ca^{2+} pool content is linked to control of cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(11): 4986-4990.

[7] Dupont G, Heytens E, Leybaert L. Oscillatory Ca^{2+} dynamics and cell cycle resumption at fertilization in mammals: a modelling approach[J]. Int J Dev Biol, 2010, 54(4): 655-665.

(责任编辑:冉明会)