

· 基础研究 ·

透骨消痛胶囊含药血清 对软骨细胞 Cyclin D1 mRNA 表达的影响

叶蕻芝¹, 李西海¹, 陈加守², 郑春松³, 杨建萍², 翁霞萍², 曾宗鹏², 郑志², 刘献祥¹

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350108; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350108)

摘要 目的:观察透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达的影响,探讨透骨消痛胶囊治疗骨性关节炎的可能作用机制。**方法:**采用抽签法将 16 只 12 周龄雄性新西兰大白兔随机分为空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 4 只。低剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃,中剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃,高剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃,空白组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以生理盐水灌胃。每天灌胃 2 次,连续 7 d,最后 1 d 连续 2 次灌胃,中间间隔 2 h。末次灌胃后 3 h 提取各组实验兔含药血清低温保存备用。将 6 只 4 周龄雄性新西兰兔处死,取其膝关节软骨,置入盛有 II 型胶原酶的培养皿中进行消化,建立软骨细胞体外培养体系,并采用甲苯胺蓝染色法鉴定细胞功能。将体外培养的第 3 代软骨细胞随机分为空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,并分别加入含空白血清、低剂量中药血清、中剂量中药血清、高剂量中药血清的 DMEM 培养液中继续培养 72 h 后,采用 MTT 法检测软骨细胞的增殖情况,采用 RT-PCR 法检测 CyclinD1 mRNA 的表达,并在透射电子显微镜下观察细胞形态。**结果:**II 型胶原酶消化法成功建立了软骨细胞的体外培养体系,甲苯胺蓝染色可见软骨细胞内呈紫红色异染颗粒。干预 72 h 后,各组软骨细胞光密度值比较,差异有统计学意义 ($F=6.209, P=0.004$);中剂量组、高剂量组软骨细胞光密度值高于空白组 ($P=0.005, P=0.002$);中剂量组、高剂量组软骨细胞光密度值高于低剂量组 ($P=0.034, P=0.011$)。各组软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义 ($F=8.262, P=0.001$);中剂量组、高剂量组软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量高于空白组 ($P=0.002, P=0.001$);中剂量组、高剂量组软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量高于低剂量组 ($P=0.012, P=0.004$);中剂量组、高剂量组可见较多处于分裂期的细胞。**结论:**透骨消痛胶囊的含药血清能促进软骨细胞 G1 期正性调节因子 CyclinD1 mRNA 的表达,从而促进软骨细胞增殖,这可能是透骨消痛胶囊在临床上治疗骨性关节炎具有较好疗效的部分机理,而有关透骨消痛胶囊治疗骨性关节炎的具体作用机制还需作更进一步的深入研究,以便为临床应用提供理论依据。

关键词 骨关节炎 透骨消痛胶囊 细胞周期蛋白 D1 软骨细胞 含药血清

Study on the effect of TOUGU XIAOTONG capsule medicated serum on the expression of Cyclin D1 mRNA in Chondrocytes YE Hong-zhi*, LI Xi-hai, CHEN Jia-shou, ZHENG Chun-song, YANG Jian-ping, WONG Xia-ping, ZENG Zong-peng, ZHENG Zhi, LIU Xian-xiang. *Academy of Integrated Traditional Chinese Medicine with Western Medicine of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of TOUGU XIAOTONG capsule medicated serum on the expression of Cyclin D1 mRNA in chondrocytes, and explore the possible mechanism of TOUGU XIAOTONG capsule in the treatment of osteoarthritis (OA). **Methods:** Sixteen male New Zealand white rabbits of 12 weeks old were randomly divided into blank group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group by drawing lots, 4 cases in each group. Rabbits in the low-dose group were intragastric administrated with $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TOUGU XIAOTONG solution ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), rabbits in the middle-dose group were intragastric administrated with $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TOUGU XIAOTONG solution ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), rabbits in the high-dose group were intragastric administrated with $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TOUGU XIAOTONG solution ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), and rabbits in the blank group were intragastric administrated with normal saline ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$). All the rabbits were intragastric administrated twice a day for 7 consecutive days, and they were intragastric administrated continuous 2 times with interval of 2 hours on

基金项目:国家自然科学基金(81102609),福建省自然科学基金(2011J05074),福建省自然科学基金重点项目(2010Y0032),福建省中医药科研重点课题资助课题(WZZG0901)

通讯作者:刘献祥 E-mail:liuxianxiang@163.com

the last day. Three hours after the last administration, medicated serums of experimental rabbits in every group were extracted and preserved in low temperature. Six male New Zealand white rabbits of 4 weeks old were executed and their knee articular cartilages were fetched and placed in the Petri dish with type II collagenase for digestion. The culture system of cartilage cell in vitro was built, meantime, cell function was evaluated through toluidine blue staining method. The third-generation cartilage cell cultured in vitro were randomly divided into blank group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, and they were placed in the DMEM culture fluid respectively added with blank serum, low-dose traditional Chinese medicine (TCM) serum, middle-dose TCM serum and high-dose TCM serum for further culture. Seventy-two hours later, the cartilage cell proliferation was detected by MTT method, Cyclin D1 mRNA expression was inspected through RT-PCR method, and the cell shape was observed under transmission electron microscope. **Results:** Culture system of cartilage cell in vitro was successfully built through collagenase II digestion and purple metachromatic granules were found in cartilage cell through toluidine blue staining method. There were statistical differences in optical density (OD) of cartilage cell among the 4 groups after 72 hours' intervention ($F=6.209, P=0.004$); the OD of cartilage cell in middle-dose group and high-dose group were higher than that of blank group ($P=0.005, P=0.002$); the OD of cartilage cell in middle-dose group and high-dose group were higher than that of low-dose group ($P=0.034, P=0.011$). There were statistical differences in protein expression of CyclinD1 mRNA in cartilage cell among the 4 groups ($F=8.262, P=0.001$); CyclinD1 mRNA in cartilage cell of middle-dose group and high-dose group were higher than that of blank group ($P=0.002, P=0.001$) and low-dose group ($P=0.012, P=0.004$); more chondrocytes in dividing phase were found in middle-dose group and high-dose group. **Conclusion:** TOUGU XIAOTONG capsule medicated serum can promote the proliferation of chondrocytes through promoting the expression of positive regulator CyclinD1 mRNA in G1 period, and it may be partial mechanisms of the better curative effect of TOUGU XIAOTONG capsule in the treatment of OA. However, further research is needed to determine the concrete mechanism of action of TOUGU XIAOTONG capsule on purpose of providing theoretical basis for the clinic.

Key words Osteoarthritis; TOUGU XIAOTONG capsule; Cyclin D1; Chondrocytes; Medicated serum

透骨消痛胶囊是福建中医药大学附属第二人民医院的院内制剂,长期用于临床治疗骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 有较好的疗效^[1]。研究表明透骨消痛胶囊通过调节线粒体信号通路相关蛋白的表达、抑制环氧化酶-2 及改变软骨下骨重塑的速率和模式等生物效应来抑制软骨细胞的凋亡,从而可以有效延缓关节宏观形态、软骨基质及软骨细胞退变^[2-4]。本研究是在中医理论的指导下,运用细胞生物学的研究方法,在前期实验、临床研究的基础上,观察不同剂量透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达的影响,旨在从细胞分子水平探讨透骨消痛胶囊调控软骨细胞增殖的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 12 周龄雄性新西兰大白兔 16 只, 体重 2.0~2.5 kg; 4 周龄雄性新西兰大白兔 6 只, 体重 0.4~0.6 kg。均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物合格证号: SCXK (沪) 2007-0011。

1.2 实验药物 透骨消痛胶囊由福建中医药大学附属第二人民医院制剂中心提供 (批号: 闽制字 Z20100006)。药物组成: 巴戟天 12 g、白芍 12 g、川芎

6 g、肿节风 6 g。将胶囊内药粉取出,加入蒸馏水分别配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液在 4°C 的环境下保存备用。

1.3 实验试剂及仪器 DMEM 培养液 (Hy-clone 公司), 胎牛血清 (Hy-clone 公司), 胰蛋白酶 (Hy-clone 公司), 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑 [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazolium bromide, MTT] (Sigma 公司), II 型胶原酶 (Sigma 公司), 甲苯胺蓝染液 (北京华美生物公司), 细胞周期测定试剂盒 (美国 BD 公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus), 透射电子显微镜 (日立 HU-12A 型), CO_2 培养箱 (德国 Heraeus 公司), 流式细胞分析仪器及软件 (美国 BD 公司), ELX800 酶标仪 (美国 BIO-Tek 公司), 9600DNA 扩增仪 (美国 PE 生物系统公司), GEL DOC2000 凝胶成像系统 (美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 采用抽签法将 16 只 12 周龄雄性新西兰大白兔随机分为空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 4 只。低剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重^[5]以 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃, 中

剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃,高剂量组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液灌胃,空白组按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以生理盐水灌胃,每天 2 次,连续 7 d,最后 1 d 连续 2 次灌胃,中间间隔 2 h。末次灌胃后 3 h 在盐酸氯胺酮麻醉下从实验兔的腹主动脉取血,经离心灭活后于 -20°C 的环境下保存备用。

2.2 软骨细胞培养体系的建立 采用耳缘静脉空气栓塞法将 6 只 4 周龄新西兰兔处死,消毒其双膝并离断,用 75% 酒精将其浸泡 5 min 后,放入含青霉素 100 单位 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 中。在超净台内剥离关节周围肌肉韧带,打开关节腔,清除软骨表面的滑膜,用刀片取下软骨,剪成 1 mm^3 大小的碎块,经 PBS 冲洗 3 次后,置入盛有 5 mL 0.2% II 型胶原酶的培养皿中进行消化,将其放于 37°C 培养箱中,每 45 min 取上清液,离心收集细胞沉淀,并更换消化液继续消化,重复 4 次。用 DMEM 完全培养液 (含 10% 胎牛血清、维生素 C $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、青霉素 100 单位 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 重悬细胞,血球计数板细胞计数法调整细胞悬液浓度为 $(2 \sim 3) \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种培养,48 h 后首次更换细胞培养液,以后每 2 d 换 1 次。

2.3 软骨细胞的鉴定 甲苯胺蓝染色检测硫酸化糖胺多糖分泌情况。

2.4 MTT 法检测软骨细胞的增殖 取生长良好的第 3 代软骨细胞以 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板,细胞培养 24 h,按分组不同分别加入含空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组血清的 DMEM 培养液中 72 h (含药血清与 DMEM 培养液的体积之比为 1:4),使各孔的终体积均为 200 μL 。干预 72 h 后,在每孔中加入 0.5% MTT 溶液 20 μL , 37°C 细胞培养箱中孵育 4 h,弃除 MTT,加入 150 μL 二甲基亚砜,振荡 10 min,用 ELX800 酶标仪读取每孔光密度 (optical density, OD) 值,测量波长 570 nm。

2.5 透骨消痛胶囊含药血清的干预方法 取生长良好的第 3 代软骨细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 传代接种于 25 mL 培养瓶中,细胞培养 6 h 贴壁后,随机分为空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,分别加入含空白组、低剂量组、中剂量组、高剂量组血清的 DMEM 培养液中 72 h (含药血清与 DMEM 培养液的体积之比

为 1:4)。干预 72 h 后,采用荧光定量 RT-PCR 法检测软骨细胞 CyclinD1 mRNA 的表达,在透射电子显微镜下观察软骨细胞超微结构。

2.6 RT-PCR 法检测软骨细胞 CyclinD1 mRNA 的表达 收集第 3 代细胞,按 Trizol 操作说明提取总 RNA,取 1 μg RNA 逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板行 PCR 扩增。扩增 CyclinD1 基因的引物序列 A (antisense) 为 $5' - \text{GCC AAC CTG CTC AAC G} - 3'$, S (sense) 为 $5' - \text{AGG CGG CTC TTC TTC A} - 3'$,扩增片段的长度为 239 bp,退火温度为 56°C ;扩增磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因的引物序列 A 为 $5' - \text{ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT} - 3'$, S 为 $5' - \text{ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC} - 3'$,扩增片段的长度为 444 bp,退火温度为 57°C 。PCR 扩增反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 终止保存。扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳后,用凝胶成像系统分析电泳结果。

2.7 透射电子显微镜观察软骨细胞的超微结构 消化收集各组干预 72 h 后的细胞,经 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛前固定 24 h (4°C)、1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定 1.5 h,用 PBS 漂洗;70% 酒精饱和醋酸铀染液块染,酒精-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋。超薄切片 80 nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5 min;在日立 HU-12A 型透射电镜下观察。

2.8 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,各组软骨细胞 OD 值及软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 软骨细胞形态及鉴定 接种细胞为小圆形,悬浮于培养液中。静置 24 h 后,大多数细胞开始贴壁,圆形增大,细胞伸长,形成突起。早期细胞一般呈多角形,胞核为圆形或椭圆形,位于胞体中心 [图 1(1)],核仁为 1~3 个,致密程度和大小不等。胞体越大,核和核仁越清晰,胞核较稳定。培养 4 d,可见细胞成簇现象,保持圆形或椭圆形生长状态,且出现重叠生长现象 [图 1(2)];8 d 左右,细胞增殖,逐渐融合形成单层,呈不规则立体“铺路石”样 [图 1(3)]。原代、第 2

代、第 3 代细胞生长良好,增殖、分化及分泌基质的能力强,细胞增殖速度快。第 4、5 代细胞体积开始变大,边缘出现一些指状突起,核也变大,胞膜和胞浆不

清晰,增殖速度减慢,细胞呈纤维细胞样[图 1(4)]。甲苯胺蓝染色可见软骨细胞内呈紫红色异染颗粒,细胞周围有少量异染颗粒出现[图 1(5)]。

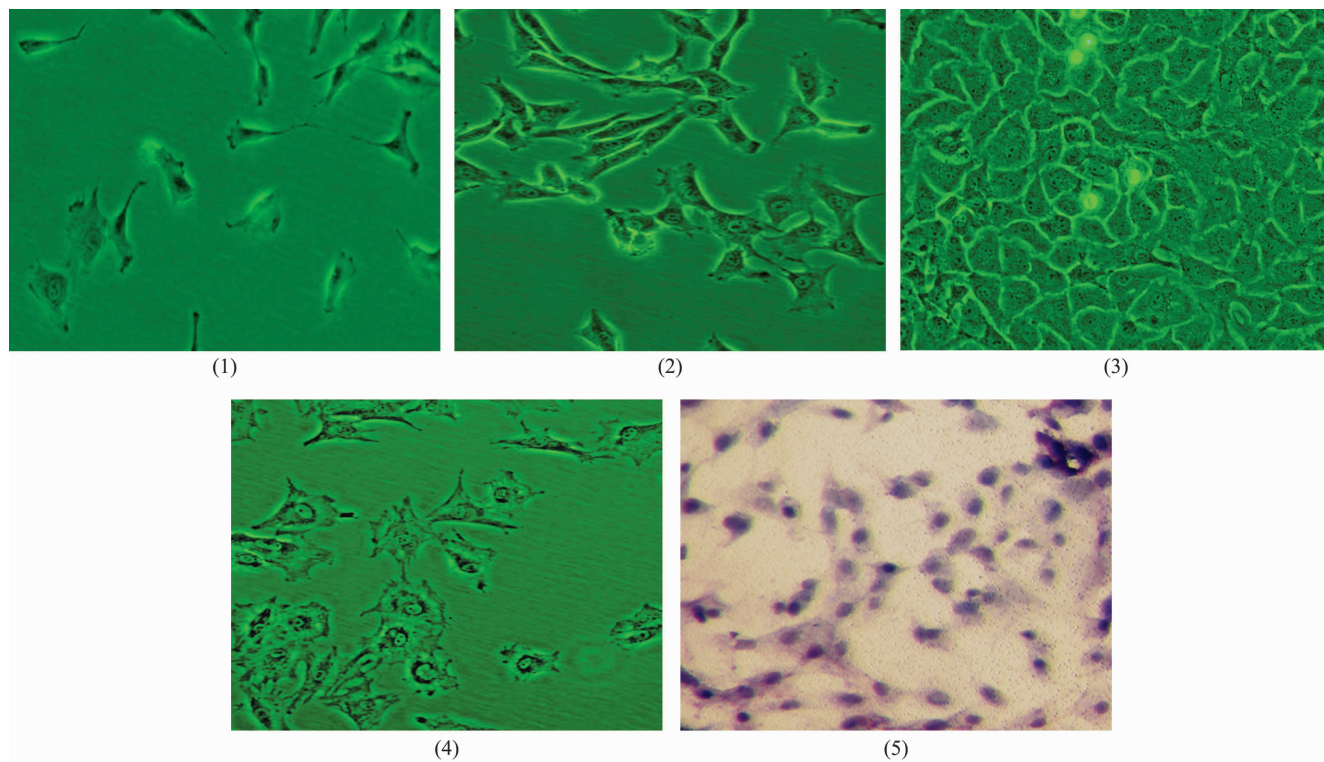


图 1 荧光倒置显微镜下观察软骨细胞形态 ×200

(1)原代细胞第 2 天 (2)原代细胞第 4 天 (3)原代细胞第 8 天 (4)第 5 代细胞第 2 天 (5)软骨细胞甲苯胺蓝染色

3.2 软骨细胞 OD 值 干预 72 h 后,各组软骨细胞 OD 值比较,差异有统计学意义。组间两两比较:中剂量组、高剂量组软骨细胞 OD 值高于空白组 ($P=0.005, P=0.002$);中剂量组、高剂量组软骨细胞 OD 值高于低剂量组 ($P=0.034, P=0.011$)。(表 1)

3.3 软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量 干预 72 h 后,各组软骨细胞 CyclinD1 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义。组间两两比较:中剂量组、高剂量组 CyclinD1 mRNA 表达量高于空白组 ($P=0.002, P=0.001$);中剂量组、高剂量组 CyclinD1 mRNA 表达量高于低剂量组 ($P=0.012, P=0.004$)。(表 1、图 2)

表 1 各组软骨细胞 OD 值与 CyclinD1 mRNA 表达量的比较

组别	OD 值	CyclinD1 mRNA 表达量
空白组	0.52 ± 0.07	0.70 ± 0.07
低剂量组	0.55 ± 0.04	0.74 ± 0.07
中剂量组	0.63 ± 0.07	0.87 ± 0.09
高剂量组	0.65 ± 0.06	0.89 ± 0.08
<i>F</i> 值	6.209	8.262
<i>P</i> 值	0.004	0.001

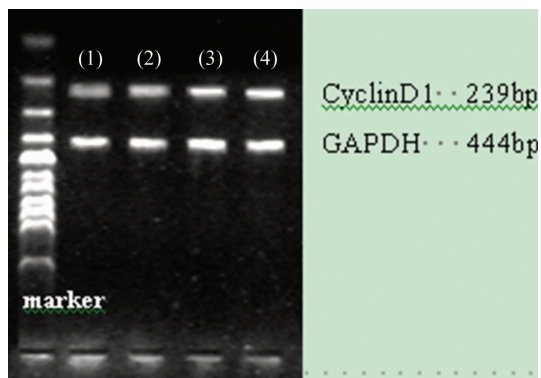


图 2 RT-PCR 法检测干预软骨细胞 G1 期
CyclinD1 mRNA 电泳图

(1)空白组 (2)低剂量组 (3)中剂量组 (4)高剂量组

3.4 软骨细胞形态结构 第 3 代软骨细胞干预 72 h 后,各组细胞呈圆形、椭圆形、多角形,细胞核以圆形为主,呈分叶状,形态不规则,染色质均匀,核仁清晰,中剂量组、高剂量组的胞质中粗面内质网丰富,可见细胞核的分裂(图 3)。

4 讨论

血清药理学方法是指采用动物的含药血清进行

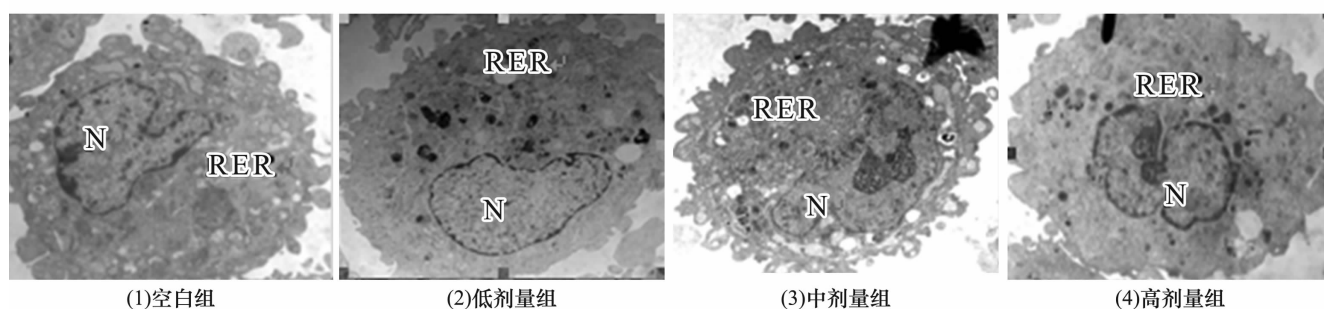


图 3 各组干预后软骨细胞形态结构 ×10 000

(1) 细胞呈圆形,核不规则、染色质均匀、核仁清晰 (2) 细胞呈椭圆形,核不规则、染色质均匀、核仁清晰 (3) 细胞呈圆形,胞内粗面内质网丰富,核分叶、染色质均匀、核仁清晰,分裂早期 (4) 细胞呈圆形,胞内粗面内质网丰富,双核不规则、染色质均匀、核仁清晰,细胞处于分裂期(图中 N 表示细胞核,RER 表示粗面内质网)

体外实验的方法^[6],这种研究方法避免了中药粗制剂直接加入体外实验体系所造成的干扰,又因含药血清能反映实验药物在体内作用后体内各种细胞因子的变化,因此血清药理学研究结果更能反映中药在体内的药理作用。故本研究采用中药血清为受试药物,通过含药血清作用于体外培养的软骨细胞,从细胞分子水平来探索关节软骨的生物学特性,从而模拟了透骨消痛胶囊在体内发生作用的过程,为探索中药治疗 OA 的作用机制提供了有效而简便的方法。

细胞周期是影响细胞功能的重要因素,调节着细胞的增殖、分化和凋亡。细胞周期的调控可分为外源性调控和内源性调控,外源性调控主要由细胞因子和外界刺激引起,而内源性调控主要是通过细胞周期蛋白 D1/细胞周期蛋白依赖性激酶/细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂进行复杂的网络调控实现。真核细胞周期的 4 个时期中 G1 期是能接受外界信息刺激的主要时期,细胞一旦从 G1 期跨入 S 期则不再依靠外来信息刺激而自动完成细胞周期的其他过程。因此,该点决定着细胞是继续增殖或是进入静止 G0 期。而 CyclinD1 在细胞周期关键限速点 G1/S 期转换中起着重要的调控作用,在细胞增殖过程中的作用最大,是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白^[7]。本研究结果表明,透骨消痛胶囊的含药血清能有效促进软骨细胞 G1 期调节蛋白 CyclinD1 mRNA 的表达,促进软骨细胞顺利通过 G1/S 限制点,进入 S 期继而完成增殖周期,从而有效促进软骨细胞增殖。

透骨消痛胶囊的含药血清能促进软骨细胞 G1 期

正性调节因子 CyclinD1 mRNA 的表达,从而促进软骨细胞增殖,这可能是透骨消痛胶囊在临床上治疗 OA 具有较好疗效的部分机理,而有关透骨消痛胶囊治疗 OA 的具体作用机制还需作更进一步的深入研究,以便为临床应用提供理论依据。

5 参考文献

- [1] 郑春松,林珠灿,许惠风,等.透骨消痛胶囊治疗骨性关节炎的多向药理学研究[J].福建中医药大学学报,2011,21(1):43-47.
- [2] 吴迫乐,李西海,吴广文,等.透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞线粒体凋亡通路的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(2):343-346.
- [3] 刘伯龄,梁珪清,高雪伟,等.透骨消痛胶囊干预膝骨性关节炎早期 COX-2 炎症途径的实验研究[J].福建中医药大学学报,2011,21(4):13-15.
- [4] 李民,陈文列,刘献祥,等.透骨消痛胶囊干预膝骨性关节炎软骨下骨重塑分子机制探讨[J].福建中医学院学报,2009,19(6):35-39.
- [5] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验学方法[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:202.
- [6] Li XH, Wu MX, Ye HZ, et al. Experimental study on the suppression of sodium nitroprussiate-induced chondrocyte apoptosis by Tougu Xiaotong Capsule-containing serum[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(6): 436-443.
- [7] Hult J, Lee RJ, Russell RG, et al. ErbB-2-induced mammary tumor growth: the role of cyclin D1 and p27kip1[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 827-836.

(2011-12-06 收稿 2011-12-23 修回)

反映学术进展 引领学科发展