

葛根素对 IL-1 β 损伤大鼠关节软骨细胞核因子- κ B 的影响^{*}

张汉庆¹, 刘 勇², 古 鹏³, 王 飞³, 赵文平³

(1. 武汉市中医医院, 湖北武汉 430014; 2. 武汉市黄陂区中医医院, 湖北武汉 432200;

3. 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北武汉 430060)

摘要:目的 观察葛根素(Pue)对 IL-1 β 损伤大鼠关节软骨细胞核因子- κ B(NF- κ B)的影响。方法 取 10 日龄大鼠关节软骨作体外细胞培养, 培养后软骨细胞随机分为正常组、IL-1 β 组、地塞米松组、Pue50 组、Pue100 组、Pue200 组等 6 组。后 5 组分别给药后 24h, 用实时定量 PCR 法检测各组 NF- κ Bp65 的表达。结果 IL-1 β 损伤软骨细胞核内 NF- κ Bp65 的表达明显增强, 后 4 组与 IL-1 β 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且随着剂量上升 (50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L)使其 NF- κ B 的表达量逐步下降。结论 葛根素具有一定的抑制 NF- κ Bp65 活化的作用, 为防治骨性关节炎提供新的途径。

关键词: 葛根素; 软骨细胞; IL-1 β ; 核因子- κ B

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)05-0004-03

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是目前常见的以关节软骨变性为特征的骨关节疾病。越来越多的研究结果显示细胞因子在 OA 的发生、发展中起着重要的作用, 最密切相关的是 IL-1 β ^[1]。NF- κ B 和活性蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是 IL-1 β 诱导 OA 软骨的胶原及聚合素降解所必需的。目前通过多种细胞模型证实 Pue 具有调节 NF- κ B 的核移位的作用。结合前面的实验(拟发表), 葛根素能够清除 NO, 降低 iNOS 的活性, 减少 NO 生成, 可以推测葛根素通过抑制 NF- κ Bp65 的活性, 减少胶原及聚合酶的降解, 从而起到保护软骨的作用。本实验试图探讨葛根素对 IL-1 β 损伤软骨细胞的转录因子 NF- κ Bp65 活化的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 10 日龄 SD 大鼠, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2010-0009。

1.2 器材

CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司)、超净工作台(苏净安泰)、生物倒置显微镜(重庆光电仪器总公司)、台式高速冷冻离心机(Heal Force)、PCR

仪(杭州博日科技有限公司)、荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗科技有限公司)。

1.3 药物与试剂

DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司, 批号: SH30023.01B)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 110311)、胰蛋白酶(Amresco 公司, 批号: 0457)、II 型胶原酶(北京博奥森生物技术有限公司, 批号: 808a1311)、重组大鼠白介素-1 β (rratIL-1 β , PeproTech 公司, 批号: 400-01b)、地塞米松磷酸钠注射液(Solarbio 公司, 批号: d8040)、葛根素标准品(Sigma 公司)、无钙镁磷酸缓冲液(PBS), 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen Life Technologies); 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒(东洋纺生物科技有限公司); 定量 PCR 试剂盒(东洋纺生物科技有限公司); 所用 PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, R-actin 引物: 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3' (上游), 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAA-TCT-3' (下游), 扩增产物长 110bp; NF- κ Bp65 引物: 5'-CACCAAAGACCCACCTCACC-3' (上游), 5'-CCGCATTCAAGTCATAGTCCC-3' (下游), 扩增产物长 239bp。

^{*} 基金项目: 武汉市卫生局中医药及中西医结合课题[武卫 2003(228)号]

收稿日期: 2013-10-16 修回日期: 2013-10-24

作者简介: 张汉庆(1969~), 男, 湖北武汉人, 副主任医师, 主要从事中医药防治骨性关节炎的研究。

2 方法

2.1 软骨细胞的培养

2.1.1 软骨细胞的原代培养

取 SPF 级 10 日龄大鼠,脱颈处死后,在无菌条件下取出髌膝关节处的软骨组织块,于超净工作台内置入含 10% 双抗的 PBS 培养皿中,清洗 1 遍,再用不含双抗的 PBS 清洗 3 遍。然后将软骨组织块移入 EP 管,向 EP 管中滴入 2~3 滴 PBS,然后用眼科剪将组织块剪至约 1 mm³ 大小。将 EP 管中的 PBS 吸出,加入 0.2% II 型胶原酶使组织块处于悬浮状态,置于 37℃ 条件下消化过夜。消化完成后,将 EP 管在振荡器上振荡 2 min,使消化下来的细胞从组织中离散。离心弃上清,取出下层细胞加入盛 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。72 h 后更换培养液,观察细胞生长情况,以后隔 2 d 更换 1 次培养液,当细胞长满单层的 80%~90% 左右后进入传代培养。

2.1.2 软骨细胞的传代培养

将培养瓶中的培养液吸弃,用 PBS 冲洗 2 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶 2 mL 消化 5 min 左右,在倒置显微镜下见细胞变圆后,立即弃去消化液终止消化,加入含血清的培养液冲洗、吹打,使细胞悬浮起来,根据需要调节细胞浓度分瓶接种于新的培养瓶中。置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

2.2 实验分组及给药方法

①正常软骨细胞组;②IL-1 β 组,按浓度 5 μ g/L 加入 IL-1 β 10 μ mol;③IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol + 地塞米松 (10⁻⁹ mol/L);④、⑤、⑥组加入 IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol 同时分别加入葛根素 50, 100, 200 μ mol/L。

2.3 实验方法

参考细胞培养文献的方法^[2],取生长良好的传代软骨细胞,用 0.25% 胰蛋白酶常规消化,用培养液配制成浓度为 1 $\times$ 10⁵ 个/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔加 200 μ L,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中。待培养 24 h 细胞贴壁后,分别加入含 IL-1 β 和药物的培养基,共设 6 组,每组 3 孔。培养 24 h 后弃去培养液,收集细胞,提取总 RNA,按实时定量 PCR 试剂盒说明检测各组 NF- κ Bp65 的表达。

2.4 统计学分析

所有数据均由 SPSS 17.0 软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样本均数 t

检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

结果表明,IL-1 β 损伤软骨细胞,NF- κ Bp65 核移位显著增加 ($P < 0.01$)。葛根素能对抗 IL-1 β 的这种效应,剂量依赖性地减少 NF- κ Bp65 磷酸化 ($P < 0.05$);地塞米松也有同样的效应 ($P < 0.05$)。(下表 1)

表 1 软骨细胞 NF- κ Bp65 的表达

组别	NF- κ Bp65
正常组	1.104 $\pm$ 0.083 [△]
IL-1 β 组	4.734 $\pm$ 0.113
地塞米松 10 ⁻⁹ mol/L	2.136 $\pm$ 0.063 [△]
葛根素 50 μ mol/L	2.855 $\pm$ 0.039 [△]
葛根素 100 μ mol/L	1.935 $\pm$ 0.020 [△]
葛根素 200 μ mol/L	1.395 $\pm$ 0.044 ^{△▲}

与 IL-1 β 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 葛根素 200 μ mol/L 与葛根素 100 μ mol/L 相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

4 讨论

NF- κ B 蛋白家族是一种多效性的转录因子,可以与多种基因启动子部位的 κ B 位点发生特异性的结合从而促进其转录表达。随着对 NF- κ B 研究的深入,发现其参与多种基因的调控,特别是细胞因子、细胞因子受体、趋化因子受体、黏附分子、急性期蛋白和诱导型一氧化氮合酶等的表达调控^[3],与感染、炎症反应、免疫应答,以及细胞的增生、转化和凋亡等生理病理过程密切相关^[4]。静息状态下,NF- κ B 以 p65/p50 二聚体的形式存在于细胞内,并与 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitors of NF- κ B, I κ B) 结合,存在于细胞质内^[5]。在多种因素 (TNF- α 、IL-1、过氧化氢及 NO 等) 的刺激下,使 I κ B 磷酸化,再在蛋白水解酶作用下发生降解,p65/p50 从胞质易位入核与靶基因结合,增强其转录水平,从而使 NF- κ B 活化发挥其调控作用^[6]。激活的 NF- κ B 信号途径导致下游一系列靶基因的转录,从而引起相应的生物学效应^[7],其中包括炎症因子的产生和软骨细胞的凋亡^[8-9]。研究表明 TNF- α 、IL-1 在骨性关节炎的发生中起重要作用,正是通过 NF- κ B 信号途径发挥效应的^[10-11]。NO 可激活 NF- κ B 的 DNA 结合活性^[12]。NO 是由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化生成的,诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的启动子部位含有 NF- κ B 的结合部位,为 iNOS 转录所必须。根据 NF- κ B 在 OA 发病中的作用,调节 NF- κ B 的活性,发掘靶细胞特异、高效的

拮抗 NF- κ B 的药物,将成为一种新的治疗骨性关节炎的手段。

本实验显示 IL-1 β 损伤的软骨细胞核内 NF- κ Bp65 超过正常组,同之前的实验研究中 NO 生成超过正常组、iNOS 的活性也超过正常组的结果相应,反映出 NO 体系在受到 IL-1 β 刺激后产生的连锁反应在核内的转录是通过 NF- κ B 实现的。后 4 组核内 NF- κ Bp65 明显低于 IL-1 β 组,表明地塞米松及葛根素均有一定的抑制 IL-1 β 损伤软骨细胞的作用,且显示出明显的剂量相关性。结果证实,葛根素清除 NO、降低 iNOS 活性同葛根素抑制 NF- κ Bp65 核移位密切相关。葛根素抑制 NF- κ Bp65 核移位,保护软骨的胶原和聚合素不被降解,从而具有保护软骨的效应,可能作为一种全新的防治 OA 的药物。

参考文献

- [1] 徐东红. 白介素与骨关节炎 [J]. 药学服务与研究, 2005, 5(1):231.
- [2] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2004.
- [3] 张劲松, 王兴宇, 单佑安, 等. 转录因子 NF- κ B 的研究进展[J]. 科学通报, 2002, 47(5):323.
- [4] Fei C, Vince C, Xianglin S, et al. New Insight into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases[J]. Clin Chem, 1999, 45:7-17.
- [5] Chen F E, Huang DB, Chen YQ, et al. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA[J]. Nature, 1998, 391(6665):410-413.
- [6] Whiteside S T, Israel A I B proteins: Structure, function and regulation[J]. Semin Cancer Bio1, 1997, 8:75-82.
- [7] Chen F, Demers LM, Shi X. Upstream signal transduction of NF- κ B activation [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002, 1(2):137-149.
- [8] Krakauer T. Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF- κ B [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004, 3(3):317-324.
- [9] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et al. To be, or not to be: NF- κ B is the answer—role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis [J]. Oncogene, 2003, 22(56):8961-8982.
- [10] 何耀华, 翁习生, 邱贵兴. 白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 在膝关节原发性骨关节炎发病中的作用[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(5):181-184.
- [11] Grall F, Gu X, Tan L, et al. Responses to the proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in cells derived from rheumatoid synovium and other joint tissues involve nuclear factor kappaB-mediated induction of the Ets transcription factor ESE-1 [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(5):1249-1260.
- [12] Toyoshima T, Kami jo R. Nitric oxide up-regulates the expression Of intercellular adhesion molecule-1 on cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 257:395-399.

(编辑:迟 越)

The Influence of Puerarin on Nuclear Factor- κ B of Rat Articular Chondrocytes Injured by IL-1 β

ZHANG Han-qing¹, LIU Yong², GU Peng³, WANG Fei³, ZHAO Wen-ping³

(1. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Hubei 430014, China;

2. Wuhan Huangpi District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Hubei 432200, China;

3. Institute of Acupuncture and Orthopaedics Program of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan Hubei 430060, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the influence of Puerarin (Pue) on Nuclear factor- κ B (NF- κ B) of rat articular chondrocytes injured by IL-1 β . **Methods** The chondrocytes in vitro were got from articular cartilage of ten-day old rat. Cultured chondrocytes were randomly divided into six groups including normal group, IL-1 β group, dexamethasone group, Pue 50 group, Pue 100 group, Pue 200 group. The last five groups were treated with 10 μ mol IL-1 β (5 μ g/L), IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol+Dexamethasone 10⁻⁹ mol, IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol+Pue 50 μ mol/L, IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol+Pue 100 μ mol/L, IL-1 β (5 μ g/L) 10 μ mol+Pue 200 μ mol/L. The expressions of NF- κ Bp65 were assessed by Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction. **Results** The expressions of NF- κ Bp65 were increased obviously in damaged chondrocytes nucleus. The last four groups were superior to the group of IL-1 β ($P < 0.05$) severally. And with the dose increased (50 μ mol/L, 100 μ mol/L, 200 μ mol/L) the expressions of NF- κ Bp65 were rising gradually. **Conclusion** Pue can markedly inhibit the activities of NF- κ Bp65, and it maybe one of the new method of prevention and treatment of osteoarthritis.

KEY WORDS: Puerarin; articular chondrocyte; Interleukin-1 β ; Nuclear factor- κ B