论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1642-04

川芎嗪对IL-1β诱导的兔原代软骨细胞iNOS表达和NO合成的影响

黄建花[1],何 英[1],赖国旗[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院中西医结合科[1];400016 重庆,重庆医科大学实验动物中心[2])

[摘要] **目的** 观察川芎嗪(tetramethylpyrazine,TMP)对IL-1β(interleukin-1β,IL-1β)诱导的兔原代软骨细胞诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)表达及一氧化氮(NO)合成的影响。**方法** 体外培养兔软骨细胞,用甲苯胺蓝染色检测蛋白多糖,免疫荧光检测兔原代软骨细胞Ⅱ型胶原;用IL-1β 10 ng/ml和(或)不同浓度(5、10、15、20 μg/ml)川芎嗪共培养兔原代软骨细胞48 h后,RT-PCR和免疫组化检测iNOS基因及蛋白表达;用硝酸还原法检测细胞培养上清液NO的表达。**结果** 软骨细胞呈三角形或多角形,蛋白多糖表达于细胞质中,Ⅱ型胶原主要表达于细胞质,少见于细胞核。与对照组比较,IL-1β单独作用软骨细胞iNOS和NO的表达显著增加($P<0.01$);IL-1β和川芎嗪联合作用后,软骨细胞iNOS和NO的表达较IL-1β单独作用显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),但仍显著高于对照组($P<0.01$)。**结论** 川芎嗪能有效抑制IL-1β诱导兔软骨细胞iNOS的表达和NO的合成。

[关键词] 川芎嗪;软骨细胞;IL-1β;诱导型一氧化氮合酶;一氧化氮
[中图法分类号] R285.5;R392.12;R684.3 [文献标志码] A

Tetramethylpyrazine inhibits interleukin-1β-induced iNOS expression and NO synthesis in rabbit articular chondrocytes

Huang Jianhua[1], He Ying[1], Lai Guoqi[2] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicine, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical Univelsity, [2]Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of tetramethylpyrazine (TMP) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and NO synthesis in interleukin-1β (IL-1β)-induced rabbit articular chondrocytes. **Methods** The chondrocytes derived from the joint of rabbits were cultured *in vitro*. Toluidine blue staining was applied to detect proteoglycan, and immunofluorescence assay was applied to detect type Ⅱ collagen in primary culture of rabbit articular chondrocytes. The primary cultures were incubated with IL-1β 10 ng/ml plus different concentrations of TMP (5, 10, 15 and 20 μg/ml) for 48 h. Then the gene and protein expression of iNOS was determined by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively, and the NO synthesis level was determined by nitrate reduction assay. **Results** The rabbit articular chondrocyte appeared as a triangle or a polygon. Proteoglycan and type Ⅱ collagen were mainly expressed in the cytoplasm, and type Ⅱ collagen was rarely located in the nucleus. Compared with the control group, iNOS expression significantly increased in the articular chondrocytes incubated with IL-1β alone ($P<0.01$), but the increase was inhibited in the articular chondrocytes incubated with IL-1β plus different concentrations of TMP ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Tetramethylpyrazine can inhibit iNOS expression and NO synthesis in rabbit articular chondrocytes induced by IL-1β.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; chondrocytes; interleukin-1β; inducible nitric oxide; nitric oxide

Corresponding author: He Ying, Tel: 86-23-89012864, E-mail: hycjcsy@163.com

骨性关节炎(osteoarthritis,OA)的发病率正在迅速增加,可能在今后几十年成为第四大致畸原因[1]。OA是一种多因素致病的疾病,其中一些细胞因子在OA的发病过程中起着重要作用,它可加速软骨基质的分解代谢,加速软骨退行性改变。软骨细胞凋亡已被认为是老年性OA细胞丢失的关键原因[2]。IL-1β被认为在OA炎症及软骨细胞凋亡中起到关键作用,是OA病因之一[3]。研究表明致炎因子白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)及炎症介质NO在关节软骨的病理变化中起重要作用[4]。由于川芎具有活血化瘀、抗血栓等多种作用,而广泛应用于OA的临床治疗。川芎嗪(tetramethylpyrazine,TMP)为川芎的主要有效成分,尽管川芎嗪治疗OA的相关临床及实验研究[5-6]已有报道,但是对于其对IL-1β诱导iNOS表达及NO

[通信作者] 何 英,电话:(023)89012864,E-mail: hycjcsy@163.com

合成的影响有待研究。本实验用 IL-1β 诱导兔原代软骨细胞，观察川芎嗪对 IL-1β 诱导的兔软骨细胞 iNOS 表达及 NO 合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高糖 DMEM 培养基（Gbico，美国），胎牛血清（Gbico，美国），胰蛋白酶（Sigma，美国），Ⅱ型胶原酶（Invitrog 公司），兔抗兔Ⅱ型胶原（北京博奥森公司），Cy3 标记山羊抗兔 IgG（碧云天生物技术研究所），IL-1β（Peprotech，美国），川芎嗪（Sigma，美国），DSMO（北京中杉金桥生物科技公司），一氧化碳检测试剂盒（碧云天生物技术研究所），兔抗兔 iNOS（武汉博士德），SABC 免疫组化试剂盒（武汉博士德）。

1.2 实验方法

1.2.1 软骨细胞的分离、传代培养及鉴定[7]

1.2.1.1 软骨细胞的获取与培养　取 2 周龄普通级新西兰大白兔 1 只[由重庆医科大学动物实验中心提供，生产许可证号：SCXK（渝 2007-0001）]，苯巴比妥钠麻醉后处死，75% 乙醇内浸泡 20～30 min，无菌条件下完整切取髋关节、膝关节、肘关节、肩关节及其周围软组织（必须保证关节囊完整），移至超净工作台上去除关节周围软组织，暴露关节腔，削取关节软骨，采用机械-酶联消化法获取软骨细胞后，加入 DMEM 完全培养基（含 15% 胎牛血清），移入 37 ℃ 5% CO_2 细胞孵育箱中培养，3 d 后首次换液，以后每 2 天换液 1 次，传代培养，隔日换液 1 次。

1.2.1.2 软骨细胞鉴定　取第 1 代软骨细胞爬片，当细胞长满 70%～80% 时用 4% 多聚甲醛固定 40 min，PBS 冲洗 3 次，常温下采用 1% 甲苯胺蓝染色 40 min，双蒸水冲洗，自然干燥，中性树胶封片，镜下观察蛋白多糖表达情况；同时，取上述 4% 多聚甲醛固定的细胞爬片，3% H_2O_2 去除非特异性过氧化物酶，正常山羊血清封闭 20 min，加入一抗（1∶100 稀释）4 ℃过夜，避光加入二抗（1∶100 稀释），镜下观察Ⅱ型胶原荧光表达情况。

1.2.2 川芎嗪制备　川芎嗪用 DMSO 溶解，过滤灭菌，实验前以 DMEM 培养基稀释成 5、10、15、20 μg/ml 不同浓度，DMSO 终浓度 <0.1%。

1.2.3 细胞实验分组　分为 6 组：IL-1β 10 ng/ml 组、IL-1β 10 ng/ml + TMP 5 μg/ml 组、IL-1β 10 ng/ml + TMP 10 μg/ml 组、IL-1β 10 ng/ml + TMP 15 μg/ml 组、IL-1β 10 ng/ml + TMP 20 μg/ml 组及对照组。对照组只有细胞，不加任何细胞因子。

1.2.4 RT-PCR 检测软骨细胞 iNOS mRNA 的表达　将第 3 代兔原代软骨细胞以 1×10^5/ml 接种于 6 孔板，待细胞长满 70%～80% 时，按 1.2.3 实验分组，处理细胞 48 h 后，收集细胞，采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。iNOS 及 GAPDH 的引物：iNOS 正义链：5′-ATCCCGAAACGCTACACTT-3′，反义链：5′-CTAACAAGAAGCGGTCTGG-3′，产物长度 316 bp；GAPDH 正义链：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，反义链：5′-TCCACCA-CCCTGTTGCTGTA-3′，产物长度 450 bp。反应条件：94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，[56 ℃ 30 s（iNOS），60 ℃ 30 s（GAPDH）]，72 ℃ 50 s，30 个循环，72 ℃ 8 min，取 5 μl 扩增产物，加 1 μl Loading Buffer，1.5 g/dl 琼脂糖凝胶，80 V 电泳，自动凝胶成像分析仪分析。

1.2.5 免疫组化检测各组 iNOS 蛋白表达　将软骨细胞以 1×10^5/ml 接种于预置玻片的 6 孔板中，待细胞长满玻片 70%～80% 时，按照 1.2.3 分组继续培养 48 h，用 4% 多聚甲醛固定，一抗为兔抗兔 iNOS（1∶100 稀释），二抗为山羊抗兔 IgG（1∶100 稀释），免疫组化 SABC 法检测 iNOS 蛋白表达情况。具体操作方法按说明书进行。

1.2.6 硝酸还原酶法检测 NO　将软骨细胞以 2×10^4/孔接种于 24 孔板，实验分组每组平行复孔 6 个。待细胞长满 70%～80% 时，按照 1.2.3 分组处理细胞 48 h 后，取细胞培养孔内的上清液。样品分为对照组、5 个实验组、标准管组（仅加标准品）和空白管组（加等量完全培养液）。采用硝酸还原酶法测定各组 NO，具体操作方法按说明书进行。利用酶联免疫检测仪测定波长 540 nm 处各孔的光密度值[D(540)]。NO 含量计算公式如下。

NO 含量（μmol/L）=（测定管光密度值 − 空白管光密度值）/（标准管光密度值 − 空白管光密度值）× 标准品浓度 × 样本测试前稀释倍数

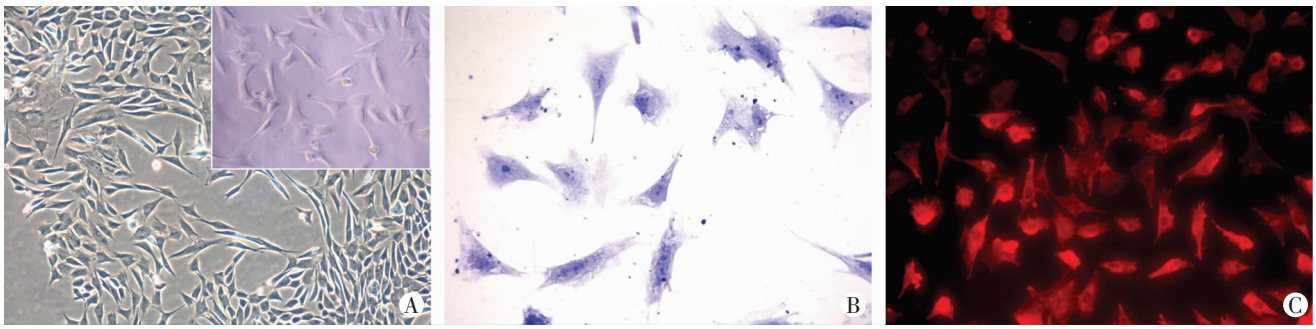
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件行单因素方差分析，组间均数比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 软骨细胞的形态及鉴定

镜下可见软骨细胞呈三角形或多角形，有明显突起，立体感强，可见 1～3 个细胞核，核仁明显。甲苯胺蓝染色后，兔软骨细胞细胞质中有蓝紫色蛋白多糖的异染颗粒，细胞间隙也有少量异染颗粒出现。通过Ⅱ型胶原免疫细胞荧光实验，在荧光显微镜下可见细胞质有红色荧光表达，少见于细胞核（图 1）。

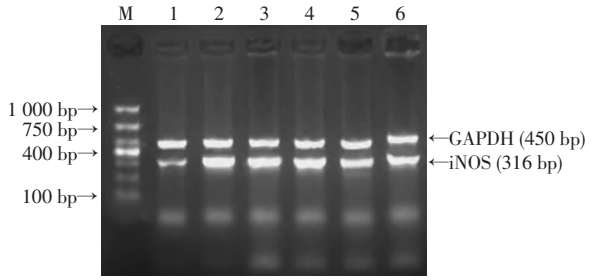


A：倒置显微镜观察兔软骨细胞（×100），放大部分为 200 倍；B：兔软骨细胞甲苯胺蓝染色（×200）；C：免疫荧光鉴定Ⅱ型胶原表达（×200）

图 1　兔软骨细胞显微形态学观察及鉴定

2.2 RT-PCR 检测各组 iNOS mRNA 表达情况

与对照组比较，余5组 iNOS mRNA 表达显著增加（$P<0.01$），其中 IL-1β 10 ng/ml 组增加最显著；与 IL-1 10 ng/ml 组比较，加入川芎嗪各组 iNOS mRNA 表达显著减少（$P<0.05$，$P<0.01$），其中以联合 10 μg/ml 及 15 μg/ml 川芎嗪组作用最明显（图2、表1）。



M：标准；1：对照组；2：IL-1β 10 ng/ml 组；3：IL-1β 10 ng/ml + TMP 5 μg/ml 组；4：IL-1β 10 ng/ml + TMP 10 μg/ml 组；5：IL-1β 10 ng/ml + TMP 15 μg/ml 组；6：IL-1β 10 ng/ml + TMP 20 μg/ml 组

图2 RT-PCR 检测各组 iNOS mRNA 表达

表1 各组软骨细胞 iNOS mRNA 及蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	mRNA 表达	蛋白表达
对照组	6	0.262 ± 0.052^{c}	292.203 ± 50.863^{c}
IL-1β 10 ng/ml 组	6	1.241 ± 0.149^{a}	1 466.440 ± 51.892^{a}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 5 μg/ml 组	6	0.993 ± 0.096^{ab}	1 071.821 ± 93.405^{ab}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 10 μg/ml 组	6	0.898 ± 0.099^{ac}	888.526 ± 24.877^{ac}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 15 μg/ml 组	6	0.929 ± 0.147^{ac}	870.098 ± 28.892^{ac}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 20 μg/ml 组	6	0.959 ± 0.157^{ab}	1 056.746 ± 42.264^{ab}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 IL-1β 10 ng/ml 组比较

2.3 免疫组化检测各组 iNOS 蛋白表达情况

与对照组比较，余5组 iNOS 蛋白表达显著增加（$P<0.01$），其中 IL-1β 10 ng/ml 组增加最显著；与 IL-1β 10 ng/ml 组比较，加入川芎嗪各组 iNOS 蛋白表达明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$），其中以联合 10 μg/ml 及 15 μg/ml 川芎嗪组作用最明显（表1、图3）。

2.4 硝酸还原酶法检测细胞上清液 NO 的含量

与对照组比较，余5组软骨细胞 NO 的含量显著增加（$P<0.01$），其中 IL-1β 10 ng/ml 组增加最明显；与 IL-1β 10 ng/ml 组比较，加入川芎嗪能明显降低 IL-1β 导致的软骨细胞培养液中 NO 的升高（$P<0.05$，$P<0.01$），其中以联合 10 μg/ml 及 15 μg/ml川芎嗪组作用最明显（表2）。

表2 川芎嗪对白细胞介素-1β 诱导的软骨细胞产生 NO 的影响（$\bar{x}\pm s$）

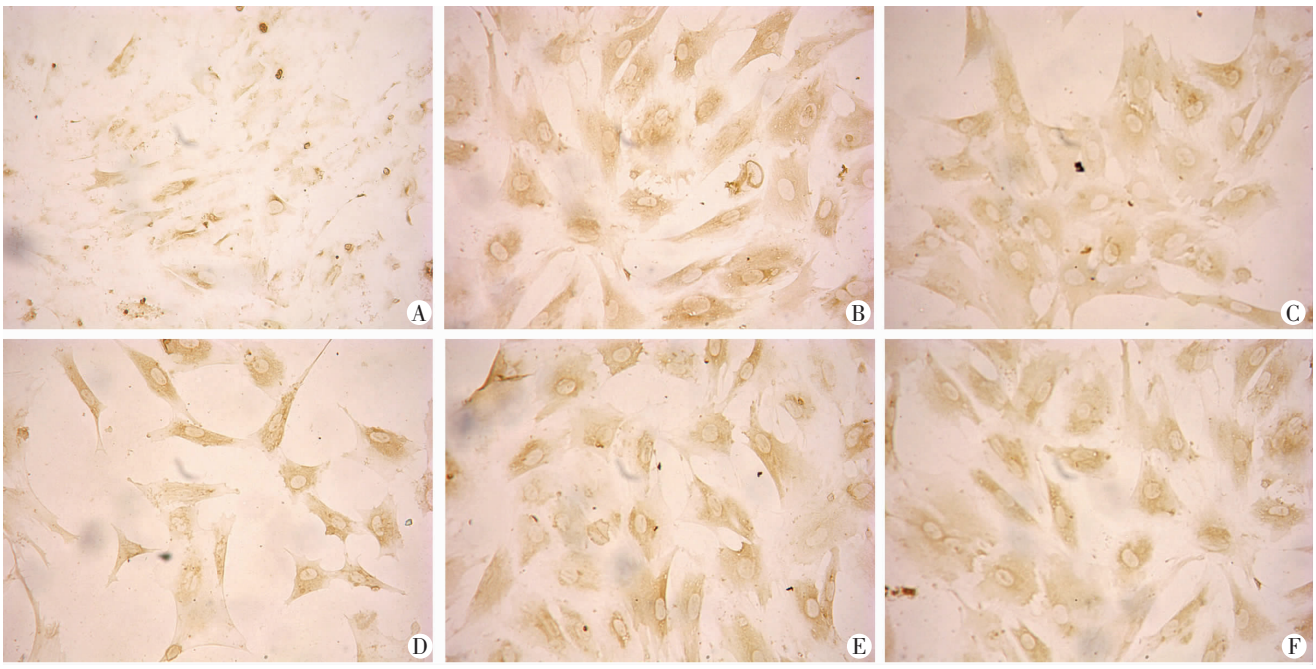
组别	n	NO（μmol/L）
对照组	6	9.994 ± 0.277^{c}
IL-1β 10 ng/ml 组	6	33.963 ± 1.164^{a}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 5 μg/ml 组	6	31.870 ± 0.179^{ab}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 10 μg/ml 组	6	30.618 ± 1.399^{ac}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 15 μg/ml 组	6	30.640 ± 1.453^{ac}
IL-1β 10 ng/ml + TMP 20 μg/ml 组	6	32.116 ± 0.446^{ab}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 IL-1β 10 ng/ml 组比较

3 讨论

OA 是一种常见的慢性关节退行性疾病，其发生、发展与生物力学、年龄、雌激素缺乏、遗传、创伤、骨质疏松等因素有关外，近年诸多学说均认为细胞因子与炎性介质在 OA 病的发生发展过程中起到重要作用[8-9]。

iNOS 途径是软骨细胞凋亡的重要途径之一，其在正常软骨细胞中极少表达，但在 OA 关节中，IL-1β 刺



A：对照组；B：IL-1β 10 ng/ml 组；C：IL-1β 10 ng/ml + TMP 5 μg/ml 组；D：IL-1β 10 ng/ml + TMP 10 μg/ml 组；E：IL-1β 10 ng/ml + TMP 15 μg/ml 组；F：IL-1β 10 ng/ml + TMP 20 μg/ml 组

图3 免疫组化检测各组 iNOS 蛋白表达 （×200）

激可导致 iNOS 激活并大量表达。本研究采用 IL-1β 诱导兔原代软骨细胞,模拟 OA 时软骨细胞所处的病理环境。经过对 iNOS 表达的相关检测,发现 IL-1β 在 10 ng/ml 可以明显增强诱导的兔软骨细胞 iNOS 表达,具有统计学意义($P<0.01$),与 Cardile 等[10]研究结果相符。另有研究表明,NO 是生物体内一种结构简单的双原子自由基,同时也是新型信号分子、炎症介质和免疫调节因子[11],OA 关节中 iNOS 的激活是 NO 生成的主要原因,而 NO 在 OA 的病理结果是最终诱导软骨细胞凋亡[12-13]。本研究通过硝酸还原酶法检测 NO 水平,与对照组比较,IL-1β 诱导下兔原代软骨细胞 NO 的合成显著增加($P<0.01$)。由此可见,NO 与 iNOS之间关系密切。如果能够抑制 iNOS 的表达,就可有效减少 NO 的合成,对控制 OA 病情的发展将起到重要的作用。

川芎嗪是中药川芎的一种有效单体提取物,其化学名为四甲基吡嗪,具有活血化瘀、抗血小板聚集、抗炎消肿等多种作用。已有相关临床及实验研究报道在 OA 过程治疗中,川芎嗪可降低早期 OA 软骨组织中 IL-1β 的水平,减轻软骨破坏,抑制软骨基质中基质金属蛋白酶-13(MMP-13),刺激基质金属蛋白酶抑制物-1(TIMP-1)的合成,从而延缓软骨细胞退变[5-6]。川芎嗪可降低 OA 动物模型血清中的 NO 的水平[14]。而川芎嗪对 IL-1β 所诱导软骨细胞是否可以有效减少 iNOS 表达以及影响 NO 的合成仍值得进一步研究。本实验中发现,加入川芎嗪各组均能明显抑制 IL-1β 诱导软骨细胞 iNOS 的基因表达和蛋白表达水平($P<0.05$,$P<0.01$),其中以 10 μg/ml 及 15 μg/ml 川芎嗪组作用最明显。采用硝酸还原酶法,通过对细胞上清液 NO 的含量检测,显示川芎嗪能降低 IL-1β 导致的兔软骨细胞培养液中 NO 的浓度升高($P<0.05$,$P<0.01$)。事实上,川芎嗪对于 iNOS 的影响在其他病种已经有相关报道,证明川芎嗪可以有效减少急性百草枯中毒大鼠一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶的表达,并且达到有效治疗的目的[15]。川芎嗪可以有效减少脑缺血后不同脑区神经元型 NO 合酶表达增高[11],能有效抑制多巴胺诱导的 PC12 细胞 NO 的合成,抑制细胞凋亡等[16]。说明川芎嗪对于炎性因素刺激增加引起的 iNOS 和 NO 均有较好的抑制作用。

综上,本实验采用 IL-1β 诱导兔原代软骨细胞,模拟 OA 时软骨细胞所处的病理环境,发现川芎嗪能有效抑制 IL-1β 诱导兔原代软骨细胞 iNOS 的表达和 NO 的合成,是川芎嗪保护 OA 软骨细胞的重要机制之一。为川芎嗪应用于临床防治 OA 软骨的进行性退变提供实验与理论依据。

志谢 衷心感谢汤为学、荣晓凤、向廷秀等老师在我课题设计及完成中提供的帮助和支持;感谢重庆医科大学神经病学实验室提供的良好实验平台!

参考文献:

[1] Urquhart D M, Soufan C, Teichtahl A J, *et al*. Factors that may mediate the relationship between physical activity and the risk for developing knee osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1): 203.

[2] Johnson E O, Charchandi A, Babis G C, *et al*. Apoptosis in osteoarthritis: morphology, mechanisms, and potential means for therapeutic intervention [J]. J Surg Orthop Adv, 2008, 17(3): 147-152. de-Isla, -N-G

[3] Bian Q, Wang Y J, Liu S F, *et al*. Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2012, 4: 74-100.

[4] de-Isla N G, Stoltz J F. *In vitro* inhibition of IL-1beta catabolic effects on cartilage: a mechanism involved on diacerein anti-OA properties [J]. Biorheology, 2008, 45(3/4): 433-438.

[5] 李应池, 王晓霞, 邱桐, 等. 川芎嗪对鼠骨关节炎软骨组织病理学和 IL-1β 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(7): 7-10.

[6] 何建新, 侯炜, 李晨光, 等. 川芎嗪对骨关节炎模型大鼠软骨内 MMP-13 及 TIMP-1 的调节作用[J]. 江苏中医药, 2010, 42(7): 72-73.

[7] 周国顺, 李雄峰, 管国华, 等. 兔软骨细胞的高密度培养及生物学特征[J]. 浙江医学, 2008, 30(7): 669-671.

[8] Guilak F, Fermor B, Keefe F J, *et al*. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (423): 17-26.

[9] 刘加钱, 牛维. 膝骨关节炎病因及发病机制研究进展[J]. 长春中医药大学报, 2008, 24(3): 344-345.

[10] Cardile V, Frasca G, Libra M, *et al*. Dehydroxymethylepoxyquinomicin inhibits expression and production of inflammatory mediators in interleukin-1beta-induced human chondrocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 25(4/5): 543-550.

[11] 邱芬, 刘勇, 马波, 等. 川芎嗪对脑缺血后不同脑区神经元型 NO 合酶表达的影响[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2009, 30(5): 540-545.

[12] Vuolteenaho K, Moilanen T, Jalonen U, *et al*. TGFbeta inhibits IL-1-induced iNOS expression and NO production in immortalized chondrocytes [J]. Inflamm Res, 2005, 54(10): 420-427.

[13] 王吉兴, 孙炜, 金大地. 一氧化氮合酶抑制剂调控白细胞介素1β和脂多糖对关节软骨的损害[J]. 中华风湿病学杂志, 2002, 6(1): 21-24.

[14] 欧阳建江, 黄有荣, 熊仁英, 等. 川芎嗪对大白兔膝关节骨性关节炎血清 SOD, MDA 及 NO 的影响[J]. 广西中医药, 2004, 27(5): 40-42.

[15] 刘会芳, 赵燕燕, 崔玉英, 等. 川芎嗪对急性百草枯中毒大鼠一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶的影响及其治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1631-1632.

[16] 李志刚, 臧雷, 刘松青. 川芎嗪对 PC12 细胞抗凋亡作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1643-1645.

(**收稿**:2012-02-24;**修回**:2012-03-23)

(编辑 张 维)