文章编号:1000-5404(2013)18-1961-04

论著

川芎嗪抑制 IL-1β 诱导的兔软骨细胞 caspase-8 和 CytC 的表达

田 媛[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],实验动物中心[2])

[摘要] **目的** 观察川芎嗪(tetramethylpyrazine,TMP)对白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)诱导的兔原代软骨细胞 caspase-8 和 CytC 表达的影响。**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;分为对照组、IL-1β 10 ng/mL 单独作用组、IL-1β 10 ng/mL 和不同浓度 TMP 联合作用组,按分组方法培养兔软骨细胞 48 h,用 Western blot 和免疫组化检测 caspase8 蛋白表达;用 ELISA 法检测细胞内 CytC 的表达。**结果** 软骨细胞呈三角形或多角形,贴壁生长。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。实验组与对照组比较,IL-1β 单独作用及 IL-1β 联合 TMP 作用软骨细胞后,caspase-8 和 CytC 的表达均显著增加($P<0.01$)。实验组之间比较,IL-1β+15 μg/mL 川芎嗪联合作用组 caspase-8 和 CytC 的表达显著低于 IL-1β 单独作用组($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 川芎嗪能有效抑制 IL-1β 诱导兔软骨细胞 caspase-8 和 CytC 的表达,从而起到抑制细胞凋亡的作用。

[关键词] 川芎嗪;软骨细胞;白细胞介素 1β;caspase-8;CytC
[中图法分类号] R285.5;R322.71;R392.11 [文献标志码] A

Tetramethylpyrazine inhibits expression of caspase-8 and CytC in rabbit articular chondrocytes induced by interleukin-1β

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

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of tetramethylpyrazine (TMP) on the expression of caspase-8 and CytC in interleukin-1β (IL-1β) induced rabbit articular chondrocytes. **Methods** The chondrocytes derived from the joint of rabbits were isolated and primarily cultured. Toluidine blue staining was used to detect proteoglycan, and immunofluorescence assay was employed to detect collagen type Ⅱ to identify rabbit primary cartilage cells. Rabbit cartilage cells were divided into control group, IL-1β group (10 ng/mL), IL-1β plus TMP groups (10 ng/mL IL-1β plus TMP at different concentrations of 5, 10, 15, and 20 μg/mL respectively) for 48 h. Caspase-8 expression was detected by Western blotting and immunohistochemical assay. And the intracellular expression of CytC was measured by ELISA. **Results** Our obtained primarily cultured chondrocytes grew in adherence, in a triangle or polygon shape. Proteoglycan and collagen type Ⅱ were mainly expressed in the cytoplasm, but the later was rarely located in the nucleus. Compared with the control cells, the expression of caspase-8 and CytC was significantly enhanced in the chondrocytes treated by IL-1β alone or combined with TMP at different concentrations ($P<0.01$), and the expression was obviously lower in the cells treated by IL-1β+15 μg/mL TMP than in the cells treated by IL-1β alone ($P<0.05$,$P<0.01$). **Conclusion** TMP inhibits the expression of caspase-8 and CytC in rabbit chondrocytes induced by IL-1β, and thus, suppresses cell apoptosis.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; chondrocytes; interleukin-1beta; caspase-8; CytC

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

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种常见的慢性关节疾病,是进行性的关节软骨消失及关节边缘和软骨下骨质反应性改变,主要见于老年人,其导致的痛苦和残疾严重损害患者的生活质量,成为引起老年人病残和社会经济负担的最主要原因之一[1]。软骨细胞凋亡异常是 OA 的重要原因[2-3],在 OA 中诱导关节软骨细胞凋亡有 2 条途径,一个为 NO 途径,另一个是 Fas 途径。川芎有活血行气之功效,是首选的活血化瘀中药。川芎嗪(tetramethylpyrazine,TMP)是中药川芎中

[通信作者] 何 英,电话:(023)89012864,E-mail:hycjcsy@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1557.012.html(2013-06-19)

提取的生物碱,化学名为四甲基吡嗪,已证明它可改变血液流变学,具有改善脑血管、肝、肾疾病等作用[4]。目前,已有川芎嗪通过抑制 NO 途径治疗 OA 的研究[5],但其对 IL-1β 诱导的兔软骨细胞凋亡的 Fas 途径有何影响尚不清楚。在 Fas 介导的死亡受体途径中,caspase-8 是关键的启动型 caspase。线粒体是细胞凋亡调控中心,线粒体释放 CytC 是细胞凋亡的关键步骤。因此,本研究选择 caspase-8 和 CytC 作为主要检测指标,用 IL-1β 诱导兔软骨细胞,观察川芎嗪对 IL-1β 诱导的兔软骨细胞 caspase-8 及 CytC 表达的影响,以期以此作为骨性关节炎研究的切入点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(Gibco 公司,美国),高糖 DMEM 培养基、Ⅱ型胶原酶(Invitrogen 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),兔抗兔Ⅱ型胶原(北京博奥森公司),DMSO(北京中杉金桥生物科技公司),IL-1β(Peprotech 公司,美国),川芎嗪(Sigma 公司,美国),Cy3 标记山羊抗兔 IgG、caspase-8 抗体(碧云天生物技术研究所),兔细胞色素 C(CytC)酶联免疫分析试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司),SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 软骨细胞的分离、传代培养及鉴定[6]

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[重庆医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(渝 2007-0001)],耳缘静脉空气栓塞处死,75% 乙醇浸泡 30 min,完整切取双侧髋关节、膝关节、肘关节及肩关节(保持关节囊完整),无菌条件下剔除关节周围软组织,削取关节软骨,采用机械-酶联消化法获得软骨细胞,加入含 15% 胎牛血清高糖 DMEM,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞孵育箱中培养,3 d 后首次换液,之后每 2 天换液 1 次。传代培养,至第 3 代细胞之前应用[7]。

1.2.1.2 软骨细胞鉴定 取第 1 代软骨细胞做细胞爬片,细胞长至约 80% 时,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 冲洗。①蛋白多糖检测:室温下取部分爬片于用 1% 甲苯胺蓝染色 30 min,双蒸水冲洗,自然干燥后用中性树胶封片,显微镜下观察;②Ⅱ型胶原检测:取固定好的爬片,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),荧光显微镜下观察。

1.2.2 川芎嗪制备 用 DMSO 溶解川芎嗪,用高糖 DMEM 稀释为 1 μg/mL,过滤灭菌,DMSO 终浓度 <0.1%。

1.2.3 实验分组 对照组(不做任何处理);实验组:①单独作用组:IL-1β 10 ng/mL 组;②联合作用组: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 组及 IL-1β 10 ng/mL + TMP 20 μg/mL 组。

1.2.4 Western blot 法检测软骨细胞 caspase-8 蛋白的表达

按照 1.2.3 分组处理细胞并常规培养 48 h 后,收集贴壁细胞,加入裂解液提取总蛋白,加变性缓冲液煮沸 10 min 变性。SDS-PAGE 凝胶电泳,200 mA 湿转 2 h。5% 脱脂奶粉室温封闭膜 2 h,caspase-8 一抗(1∶100)4 ℃孵育过夜,TBS 漂洗,ECL 光化学法显色。内参 β-actin 蛋白测定:除一抗为抗 β-actin 抗体外,余步骤同前。使用凝胶成像分析系统扫描结果。

1.2.5 免疫组化检测各组 caspase-8 蛋白表达 取 2 代软骨细胞以 1×10^5/mL 接种于预置盖玻片的 6 孔板中,待玻片上细胞长至 70% ~80% 时,按照 1.2.3 实验方法处理细胞,48 h 后用 4% 多聚甲醛固定,一抗为兔抗兔 caspase-8(1∶100 稀释),4 ℃过夜;二抗为山羊抗兔 IgG(1∶100 稀释),湿盒内 37 ℃恒温孵育 1 h,免疫组化 SABC 法检测 caspase-8 蛋白表达情况。

1.2.6 酶联免疫分析法检测 CytC 将第 2 代软骨细胞以 2×10^4/孔接种于 24 孔板,每组设 4 个平行复孔。待细胞长至 70% ~80% 时,按照 1.2.3 分组和处理细胞,培养 48 h 后收集细胞行细胞裂解后取上清液。分为空白组、标准物组、对照组和 5 个实验组。采用 ELISA 法测定各组 CytC 表达,具体操作方法同说明书。利用酶联免疫检测仪测定各孔的光密度值[D(450)]。用标准物浓度与 D(450)计算标准曲线的直线回归方程,计算样品浓度,最后乘以稀释倍数(5 倍),得到样本 CytC 最终浓度。

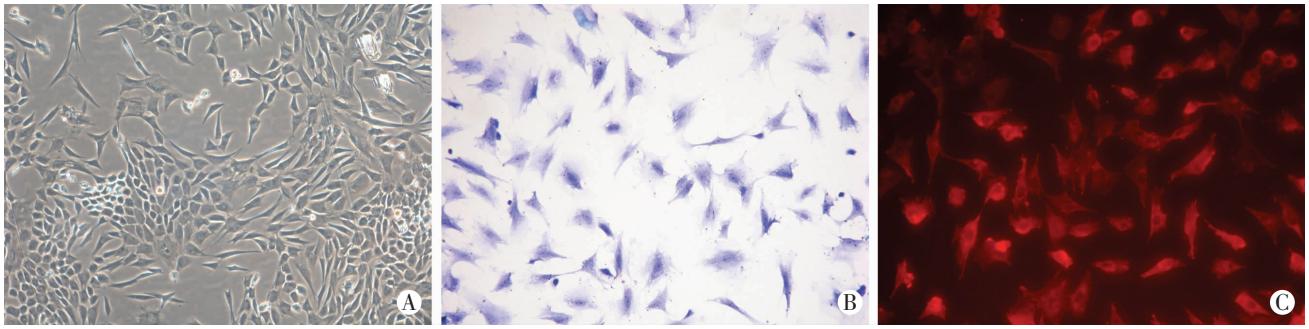
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间差异行 q 检验。

2 结果

2.1 软骨细胞的形态及鉴定

显微镜下可见兔软骨细胞贴壁生长,呈三角形或多角形。兔软骨细胞经过甲苯胺蓝染色后,细胞质中可见蛋白多糖的紫蓝色异染颗粒。在免疫荧光检测Ⅱ型胶原实验中,细胞质有红色荧光表达,而细胞核少见。见图 1。

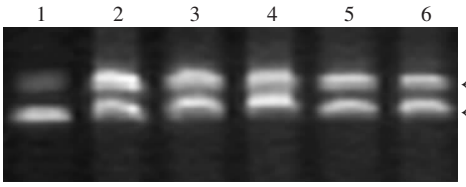


A:倒置显微镜下观察兔软骨细胞(×100);B:兔软骨细胞甲苯胺蓝染色(×200);C:免疫荧光鉴定Ⅱ型胶原表达(×200)

图 1 兔软骨细胞形态学观察及鉴定

2.2 Western blot 检测软骨细胞 caspase-8 蛋白的表达

与对照组比较，各实验组 caspase-8 蛋白均显著增加（$P<0.01$）；各实验组中，与 IL-1β 单独作用组比较，联合川芎嗪作用组 caspase-8 蛋白均有降低，以 IL-1β 10 μg/mL + TMP 15 μg/mL 组最明显（$P<0.01$，$P<0.05$）。见图 2、表 1。



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 Western blot 检测各组软骨细胞 caspase-8 蛋白的表达

表 1 各组软骨细胞 caspase-8 蛋白表达（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Western blot	免疫组化
对照组	0.262 ± 0.052	297.203 ± 50.863
IL-1β 10 ng/mL 组	1.241 ± 0.149[a]	1 566.440 ± 51.892[a]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 5 μg/mL 组	0.993 ± 0.096[ab]	1 171.821 ± 93.405[ab]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 10 μg/mL 组	0.898 ± 0.099[ab]	1 079.526 ± 24.877[ab]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 15 μg/mL 组	0.823 ± 0.147[ab]	979.098 ± 28.892[ab]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 20 μg/mL 组	0.959 ± 0.157[ab]	1 156.746 ± 42.264[ab]

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

2.3 免疫组化检测软骨细胞 caspase-8 蛋白的表达

与对照组比较，各实验组 caspase-8 蛋白表达均显著增加（$P<0.01$）；各实验组中，与 IL-1β 单独作用组比较，联合川芎嗪作用组 caspase-8 蛋白表达均降低（$P<0.05$），其中以 IL-1β 10 ng/mL + TMP 15 μg/mL 组作用最明显。见图 3、表 1。

2.4 ELISA 检测软骨细胞 CytC 含量

与对照组比较，各实验组软骨细胞 CytC 的表达显著增加（$P<0.01$）；各实验组之间，与 IL-1β 单独作用组比较，联合川芎嗪作用组各组 CytC 表达明显降低（$P<0.05$），其中以 IL-1β 10 ng/mL + TMP 15 μg/mL 组作用最明显。见表 2。

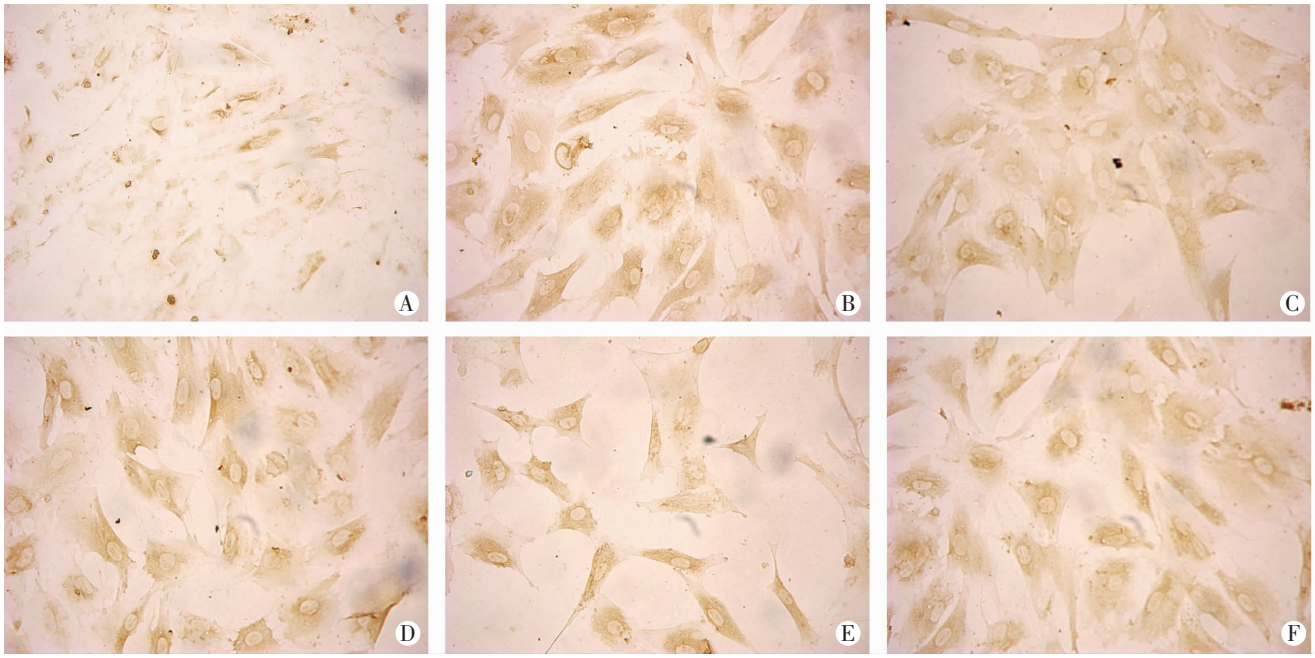
表 2 川芎嗪对 IL-1β 诱导的软骨细胞 CytC 表达的影响（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	CytC(ng/μL)
对照组	9.993 ± 0.276
IL-1β 10 ng/mL 组	33.943 ± 1.167[a]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 5 μg/mL 组	32.870 ± 0.189[ab]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 10 μg/mL 组	32.638 ± 1.389[ab]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 15 μg/mL 组	21.660 ± 1.443[ac]
IL-1β 10 ng/mL + TMP 20 μg/mL 组	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

关节软骨细胞的过度凋亡可引起关节软骨破坏导致 OA 发生，细胞凋亡机制可能包括诱导因子、信号转导系统、蛋白水解链式反应等方面。凋亡诱导因子 Fas-L 与细胞表面受体相结合，依次激活链式反应酶，将死亡信号放大。因此，抑制软骨细胞凋亡，可能是防治 OA 的关键途径之一[8]。现发现有两条途径在 OA 中诱导关节软骨细胞凋亡，一条为 NO 途径，另一条为 Fas-caspase-8-CytC 途径[9]，二者使软骨细胞数量减少，软骨修复功能下降，凋亡的软骨细胞脱落后，形成



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 免疫组化检测软骨细胞 caspase-8 蛋白表达（SABC ×200）

碎片进入滑液,可刺激骨膜,引起滑膜炎,同时释放炎症介质和自由基等刺激源,进一步诱导软骨细胞发生凋亡,甚至坏死。周而复始,形成恶性循环,最终破坏关节完整性。Hashimoto 等[10]研究表明 Fas 激发的软骨细胞凋亡途径独立于 NO 途径之外。而 Fas 系统属于死亡受体介导的细胞凋亡信号转导途径,Fas 途径激活 caspase-8,而 caspase-8 又诱导内质网膜释放钙离子,共同促进线粒体释放凋亡蛋白(CytC、Smac 等),引发凋亡[11]。

本研究发现 caspase-8 在正常软骨细胞中表达较少,但 IL-1β 刺激可使兔软骨细胞 caspase-8 和 CytC 的表达明显增加($P < 0.01$)。由此可见,如果能抑制 caspase-8 和 CytC 的表达,将对 OA 的防治发挥重要作用。

川芎是一种临床常用中药,具有行气活血、祛风止痛之效用,为血中之气药,是首选的活血化瘀中药。川芎嗪是中药川芎中分离提纯的一种生物碱单体,化学名为四甲基吡嗪,有行气、活血和化瘀等功效。研究表明,川芎嗪科能促进 Bcl-2 的表达,抑制软骨中 MMPs 的表达,可减少软骨细胞凋亡,其保护软骨的作用优于部分活血化瘀药[12]。有研究[13]表明川芎嗪不影响关节软骨细胞活性,并可促进软骨细胞增殖。其药理作用可能为抑制血小板聚集及抗凝作用,扩张血管,改善微循环,降低骨内压;抑制软骨和滑膜的炎症,促进软骨细胞增殖和蛋白合成,调节免疫功能及细胞因子间的动态平衡,抑制软骨细胞凋亡等。

相关研究[14-15]表明在 OA 治疗过程中,川芎嗪可降低早期 OA 软骨组织中 IL-1β 水平,减轻软骨破坏,延缓软骨细胞退变。而川芎嗪可通过下调 Fas 和 FasL 蛋白的表达,抑制细胞凋亡[16]。Chang 等[17]发现川芎嗪可将庆大霉素产生的 caspase-8 及 NF-κB 失活病抑制庆大霉素诱导的 CytC 的释放。但川芎嗪是否能使 IL-1β 诱导的软骨细胞减少 caspase-8 和 CytC 的表达尚待进一步研究。本实验发现,联合川芎嗪各组均能使 IL-1β 诱导的兔软骨细胞 caspase-8 蛋白和 CytC 表达减少($P<0.05$,$P<0.01$),以 15 μg/mL 川芎嗪组作用最明显。说明川芎嗪可明显抑制炎性因子(IL-1β)刺激引起的 caspase-8 和 CytC 表达增加。

综上所述,本实验模拟 OA 软骨细胞所处的病理环境,尝试将川芎嗪和 IL-1β 联合应用于体外研究,发现川芎嗪能对 IL-1β 诱导的 caspase-8 的表达及 CytC 的表达起到有效的抑制作用,可能成为川芎嗪保护 OA 软骨细胞的机制之一,将为川芎嗪应用与临床治疗骨和软骨破坏性疾病进一步提供理论依据。

志谢 衷心感谢重庆医科大学神经病学重点实验室汤为学老师、附属第一医院中西医结合科荣晓凤老师等在本课题设计与完成中提供的学术支持和帮助,感谢重庆医科大学神经病学实验室提供的良好的实验平台

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] 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.

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

[4] 杨雪梅. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 215-216.

[5] 黄建花, 何英, 赖国旗. 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[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(16): 1642-1645.

[6] 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): 669-670, 674.

[7] 宋鸿, 陈炜. 兔软骨细胞的分离培养及其生物学特征的检测[J]. 遵义医学院学报, 2008, 31(6): 573-575, 758.

[8] 谢肇, 许建中, 周强, 等. 组织工程化关节软骨细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 544-546.

[9] 许鹏, 靳卫章, 郭雄. 骨关节病关节软骨细胞凋亡的研究进展[J]. 实用老年医学, 1999, 13(6): 312-313.

[10] Hashimoto S, Setareh M, Ochs R L, *et al*. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(10): 1749-1755.

[11] Roth W, Reed J C. Apoptosis and cancer: When BAX is TRAILing away[J]. Nat Med, 2002, 8(3): 216-218.

[12] 舒冰, 周重建, 马迎辉, 等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1043-1047.

[13] 李西海, 刘献祥. 川芎嗪干预骨性关节炎作用机制的探讨[J]. 福建中医药, 2009, 40(4): 61-62.

[14] 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.

[15] 何建新, 侯炜, 李晨, 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.

[16] 李诗, 范妤, 刘芳. 川芎嗪对肝纤维化大鼠 Fas 和 FasL 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(10): 1468-1469.

[17] Chang Y, Hsiao G, Chen S H, *et al*. Teramethylpyrazine suppresses HIF-1alpha, TNF-alpha, and activated caspase-3 expression in middle cerebral artery occlusion-induced brain ischemia in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(3): 327-333.

(**收稿**:2013-03-26;**修回**:2013-05-28)

(编辑 王小寒)