

黄连碱对软骨细胞增殖及转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 基因的表达式的影响

陈建武 王晓娟

【摘要】 目的 观察黄连碱对 Sprague Dawley 大鼠关节软骨细胞体外增殖及转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 基因表达的影响,探讨其治疗骨关节炎的作用及可能机制。**方法** 取 SD 大鼠关节软骨,剪碎后,采用酶消化法原代分离培养软骨细胞,取处于对数生长期第 3 代细胞随机分组,实验组加入含 $10 \mu\text{m}$ 黄连碱的培养基,对照组仅加入普通培养基。培养 48 小时后在倒置显微镜下观察软骨细胞形态,MTT 法检测黄连碱在 1,3,5,7 天对软骨细胞增殖影响,实时荧光定量 PCR 分别检测培养 7 天后实验组和对照组细胞转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达。**结果** 培养 48 小时后实验组软骨细胞生长密集程度明显优于对照组;MTT 检测也显示实验组细胞增殖情况优于对照组;培养 7 天后实验组转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达显著高于对照组。**结论** 黄连碱能促大鼠软骨细胞增殖,并提高转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 的表达,提示这可能是其治疗骨关节炎的可能机制之一。

【关键词】 黄连碱; 软骨细胞; 增殖; 转化生长因子 $\beta 1$

【中图分类号】 R285.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.04.004

Effect of coptisine on proliferation of rat articular chondrocytes cultured in vitro and mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 CHEN Jian-wu, WANG Xiao-juan. Medical Division of Xinjiang military region, Urumqi 830042, China

Corresponding author: WANG Xiao-juan, E-mail: wangxiaojuan491@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of coptisine on the proliferation of rat articular chondrocyte and transforming growth factor- $\beta 1$ mRNA expression, and then to explore the role and possible mechanism of coptisine in the treatment of osteoarthritis. **Methods** Knee cartilage was shredded after harvested from SD rats under sterile conditions, and chondrocytes were isolated and cultured by the way of enzymatic digestion. After identifying by toluidine blue staining, the third-passage cells in the logarithmic growth phase were cultured in vitro and randomly divided into two groups after adherence. The experimental groups were cultured in DMEM with $10 \mu\text{m}$ coptisine, while the control group was given with normal medium alone. Chondrocytes morphology was observed under an microscope after 48 hours. 1, 3, 5, 7 days later, Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT) assay method was adopted to observe the influence of coptisine on the proliferation of chondrocytes. Transforming growth factor- $\beta 1$ mRNA levels were detected and analysed by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) at 7 days after cell culture. **Results** The cell growth intensity in the co-culture group was significantly better than in the control group observed under microscope after 48 hours after culture. MTT assay showed that cell proliferation in experimental group were higher than in the control group after 3 days of cell culture. transforming growth factor- $\beta 1$ mRNA level in the co-culture group were significantly better than the control group after 7 days of cell culture. **Conclusion** coptisine can promote proliferation of chondrocyte and transforming growth factor- $\beta 1$ mRNA expression, and these may be one of the possible mechanisms that coptisine can work in the treatment of osteoarthritis.

【Key words】 Coptisine; Chondrocyte; Proliferation; Transforming growth factor- $\beta 1$

作者单位: 830042 乌鲁木齐, 新疆军区联勤部卫生处(陈建武); 解放军第 23 医院药械科(王晓娟)

作者简介: 陈建武(1974-), 本科, 主治医师。研究方向: 卫生事业管理。E-mail: chenjianwu491@126.com

通讯作者: 王晓娟(1972-), 女, 本科, 主管药师。研究方向: 药理研究及临床应用。E-mail: wangxiaojuan491@126.com

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床最常见的关节疾病之一,其最主要的病理性改变是进行性关节软骨退变,从而导致周围骨质和关节滑膜发生病理改变,骨性关节炎发展到终末期会导致关节畸形而丧失功能^[1]。关节软骨细胞的过度凋亡是骨性关节炎发生发展的重要原因。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞成分,各种细胞因子调节着软骨细胞的增殖、分化及代谢,并始终贯穿于关节软骨修复的过程中,目前国外研究已经证实转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta 1$) 在软骨细胞修复中起着重要的作用^[2]。中药黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎,中医认为长期应用具有清热、燥湿、解毒、泻火的功效。现代医学研究表明,黄连具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病等作用,黄连碱是黄连主要活性成分之一^[3]。目前关于黄连碱对软骨细胞增殖影响的研究报道较少。本研究采用体外软骨细胞共培养的方法,观察黄连碱对大鼠关节软骨细胞的增殖及转化生长因子 $\beta 1$ 的表达情况,初步探讨其治疗骨关节炎的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

本研究采用的清洁级 Sprague Dawley (SD) 大鼠购置于兰州军区乌鲁木齐总医院实验动物中心;DMEM 培养基 (赛业生物科技有限公司,广州,中国);0.25% 胰蛋白酶、0.2% II 型胶原酶、青链霉素混合液 (Gibco, 美国);胎牛血清 (FBS) (赛默飞世尔生物化学制品有限公司);黄连碱 (成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST10030711);PBS (索莱宝生物科技有限公司);TGF- $\beta 1$ 及 GAPDH 引物均购自上海生物工程有限公司;TRIzol (Invitrogen 公司,加利福尼亚,美国);ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO Life Science, 东京,日本);SYBR Green Realtime PCR master Mix-Plus (TOYOBO Life Science, 东京,日本)。

1.2 仪器与设备

恒温恒湿二氧化碳培养箱 (型号 DH-801 上海三腾仪器有限公司,上海,中国);酶联免疫检测仪 (型号 RJ17DG5033A 中西集团,辽宁沈阳,中国);紫外分光光度计 (Beckman DU530 Germany);实时荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystems Company, Carlsbad, USA);洁净工作台 (苏州安泰空气技术有

限公司);倒置显微镜 (Olympus 公司,东京,日本)。

1.3 大鼠膝关节软骨细胞的分离和培养

脱颈处死 SD 大鼠后,碘酊、75% 乙醇消毒、铺巾,正中切口切开膝关节,用无菌刀片切取股骨髁、滑车及髌骨表面的关节软骨并置于含双抗的 PBS 缓冲液无菌培养皿中,加盖移入超净工作台,首先用含有双抗的 PBS 缓冲液反复漂洗组织 3 次,采用无菌手术器械去除黏附于软骨周围的血液及组织。将冲洗清理干净的软骨用眼科剪剪碎并置入无菌瓶中,依次加入 0.25% 胰蛋白酶、0.2% II 型酶,在磁力搅拌条件下消化,待无明显的软骨组织块时终止消化,取消液置于离心管于 1500 r/min 离心 8 分钟,弃上清,加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 4 ml 重悬细胞,接种到 25 cm² 培养瓶中,静置于恒温 37℃、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中培养,每隔三天更换 1 次培养液,按时在倒置显微镜下观察、拍照,当细胞增殖至瓶底 80% 左右时按适当比例传代培养。

1.4 分组

实验组为 10 μ m 黄连碱与 P3 代大鼠软骨细胞共培养;对照组为 P3 代大鼠软骨细胞普通培养基培养。

1.5 观察指标及实验步骤

1.5.1 镜下观察软骨细胞生长情况及细胞形态

实验组为含黄连碱 (10 μ m) 的 10% 胎牛血清 DMEM 培养液与大鼠关节软骨细胞 (P3 代) 5×10^4 在六孔板中共培养,对照组将大鼠关节软骨细胞 5×10^4 在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液的六孔板中培养。在 37℃ 饱和湿度及 5% 二氧化碳细胞孵育箱中分别进行共培养和单独培养 48 小时后观察细胞生长情况。

1.5.2 MTT 检测 取形态良好并处于对数生长期的 3 代软骨细胞,常规采用胰酶消化离心后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将消化后获得的细胞稀释并计数成 2.5×10^6 /L 后,接种于 96 孔板中每孔 200 μ l,培养条件与既往培养条件一致。分别在第 1、3、5、7 天时,实验组和对照组每个时间点各取 5 个孔,每孔加 MTT 溶液 (5 mg/ml 用 PBS 配) 20 μ l。孵育 4 小时后终止培养,吸弃孔内培养上清液,对于悬浮细胞离心后再吸弃培养上清液。分别在孔中加入 150 μ l 二甲基亚砜 (DMSO),振荡 10 分钟,使结晶物充分融解。在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,检测波长设定为 490 nm 并记录结果^[4]。

1.5.3 软骨细胞 TGF- β 1 mRNA 检测 将培养 7 天后的细胞用胰酶消化后离心收集。移入匀浆器中并加入 1 ml Trizol, 充分研磨后静置 15 分钟, 经氯仿萃取、异丙醇沉淀、乙醇洗涤后加入 30 μ l DEPC 水溶解提取总 RNA, 用分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度。反转录及扩增过程均按试剂盒说明书步骤进行。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 60 秒, 采用三步法测定: 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 57 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒共计进行 40 个循环。TGF- β 1 引物: 上游引物序列为 5'-TTC TCC ACC AAC TAC TGC TTC-3', 下游引物序列为 5'-GGT GTC CAG GCT CCA GAT-3'。采用 GAPDH 作为内参照, 根据荧光定量 PCR 仪显示的 CT 值结果, 以对照组做参照通过 2- $\Delta\Delta$ Ct 方法计算 RQ 值并统计分析两组的相对基因表达差异。

1.6 统计学分析

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有统计分析运用 SPSS 18.0 统计软件进行处理。实验组与对照组间比较采用两独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养软骨细胞

实验组和对照组细胞在相同培养条件下培养 48 小时后, 倒置显微镜 100 倍显微视野下观察, 两组培养细胞均未发现污染及支原体感染迹象, 黄连碱共培养组软骨细胞密集程度明显高于对照组且形态良好, 见图 1。

2.2 MTT 测定结果

两组细胞在体外培养对数生长期第 1、3、5、7 天均呈明显上升趋势, 细胞生长第 1 天两组无统计学差异, 实验组于第 3、5、7 天均高于对照组, 组间差异

具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明与一定浓度的黄连碱共培养液能够促进大鼠关节软骨细胞促增殖, 见表 1。

表 1 软骨细胞体外培养 MTT 检测结果

分组	OD 值			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
实验组	0.15 \pm 0.01	0.19 \pm 0.03 ^a	0.36 \pm 0.04 ^a	0.42 \pm 0.04 ^a
对照组	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03

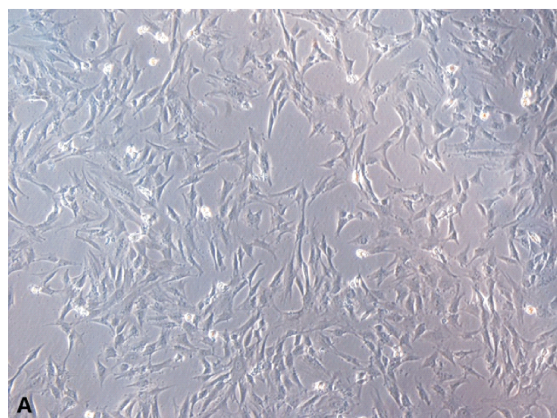
注: 同一时间点实验组与对照组相比^a $P < 0.05$

2.3 qRT-PCR 结果

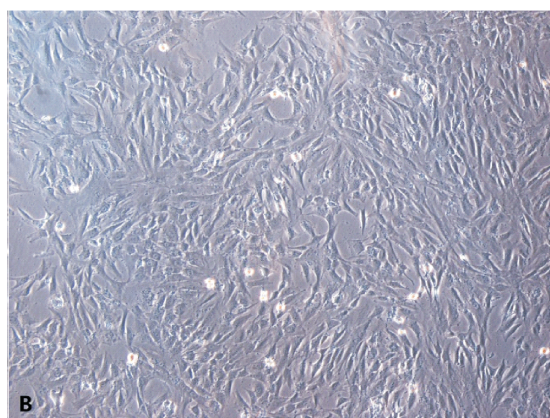
提取 RNA 并稀释 100 倍后用分光光度仪检测吸收波长在 A260 及 A280 的 OD 值, 求得各样本的 A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明提取的 RNA 纯度较高。据 A260 的 OD 值计算得 RNA 浓度。按照试剂盒说明书进行反转录及扩增后行荧光定量, 获得 CT 值, 计算 RQ 值。结果实验组 TGF- β 1 mRNA 的表达显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

3 讨论

依据膝关节骨性关节炎的临床表现等疾病特点, 中医将其归入“痹证”范畴。《诸病源候论·风痹证》曰:“风寒湿三气杂至, 合而为痹, 其状肌肉顽厚或疼痛。”《黄帝内经》对痹症也进行了详细的阐述, 认为风、寒、湿邪气侵袭机体、经络、脏腑, 闭阻不散, 从而导致关节疼痛、肿胀、僵直。可见风寒湿邪在痹证发生发展过程中的起着至关重要的作用。大量临床报道采用中医药方法治疗本病亦多从祛风湿、止痹痛着手, 且取得一定的疗效。而临床常用的痹证验方干预骨关节炎软骨细胞的基础实验从



A 对照组



B 实验组

图 1 体外培养 48 小时后软骨细胞形态

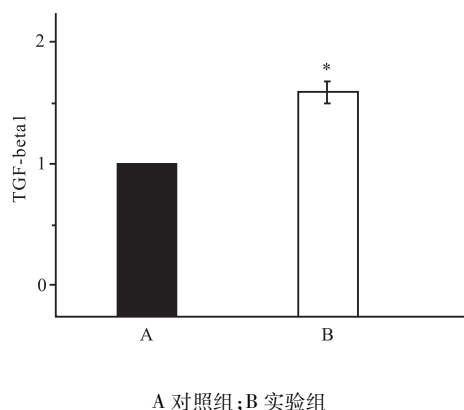


图2 软骨细胞 TGF- β 1 mRNA 表达 qRT-PCR 检测结果

多方面证实祛风湿、止痛治法的有效性^[5]。黄连碱是属于异喹啉生物碱,这类生物碱主要包括小檗碱、黄藤素、表小檗碱和木兰碱等^[6]。这类生物碱具有多种生物学活性,如抗糖尿病、抗炎和抗氧化的作用^[7-9]。目前多数研究都关注于小檗碱的抑制骨吸收作用^[10]。药代动力学研究发现口服黄连碱也具有其生物学活性^[11-12]。日本学者研究发现黄连碱能够有效抑制 RANKL 介导的 NFATc1 基因的表达,从而抑制破骨细胞的增殖和其骨吸收的活性^[13]。回顾文献发现与小檗碱和黄藤素相比,对黄连碱的研究相对较少,因此在本研究中研究了黄连碱对软骨细胞的影响。

TGF- β 1 是一类具有多种功能的细胞因子,广泛存在在动物的正常组织细胞内,其中以骨组织和血小板中的含量最显著。目前研究发现 TGF- β 1 是目前多种调节软骨细胞增殖分化相关因子中作用最强的,在关节软骨的生长和修复中起了关键的作用。一方面,TGF- β 1 具有向软骨分化的诱导作用,其可以诱导骨髓间充质干细胞像软骨细胞分化。另一方面,TGF- β 1 具有促进软骨细胞增殖分化和分泌细胞外基质的作用。其可以促进软骨细胞分泌 II 型胶原和蛋白多糖,这两种细胞外基质是构成关节软骨的主要成分。本研究发现,采用含有黄连碱的培养液体外培养软骨细胞能够显著的增加软骨细胞 TGF- β 1 的表达,从而增加软骨细胞外基质的分泌。然而这种促进软骨细胞 TGF- β 1 表达的机制是否存在剂量依赖和时间依赖关系还需要在进一步的研究中证实。除此以外,还有相关研究证实,TGF- β 1 的表达增加能够显著抑制人软骨细胞金属蛋白酶 1 mRNA 基因的表达,刺激人软骨细胞金属蛋白酶 1 组织抑制剂 mRNA 基因表达,金属蛋白酶

1 表达的增高与人骨关节炎的形成具有密切关系。另外有研究发现 TGF- β 1 可以显著抑制软骨细胞凋亡,其机制是通过 TGF- β 1 信号传导时细胞膜上的 TGF- β 受体 I 和 TGF- β 受体 II 共同参与,并通过受体下游信号分子 Smad 家族实现的,Smad 家族中 Smad2 和 Smad3 可抑制软骨细胞的成熟过程,实际上亦即 TGF- β 1 可以阻止软骨细胞向成熟方向分化,进而阻止其凋亡发生。

本研究发现,黄连碱能够在体外有效维持关节细胞的形态并且促进软骨细胞的增殖,能够显著提高关节软骨细胞的 TGF- β 1 的表达。这可能是其治疗骨关节炎的可能机制之一。然而,黄连碱是通过何种机制促进软骨细胞增殖分化和 TGF- β 1 的表达还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Ayache, N, K. Boumediene, M. Mathy-Hartert, et al. Expression of TGF-betas and their receptors is differentially modulated by reactive oxygen species and nitric oxide in human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10 (5): 344-352.
- [2] Frenkel S. R, P. B. Saadeh, B. J. Mehrara, et al. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 105(3):980-990.
- [3] 陈柏年,于晓彦,孙加琳,等. 黄连碱对 L-NAME 诱导高血压大鼠胸主动脉功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (5):610-613.
- [4] 王晓娟. 丹参多酚酸盐对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响[J]. *环球中医药*, 2013, 6 (7): 492-495.
- [5] 马勇,张允中,陈金飞,等. 威灵仙干预体外培养兔膝关节软骨细胞增殖及转化生长因子 β 1 mRNA 基因的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(11):1901-1906.
- [6] Sun J, J. S. Ma, J. Jin, et al. Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiadu decoction by HPLC-UV/MS [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2006, 41 (4): 380-384.
- [7] Tang L. Q., W. Wei, L. M. Chen, et al. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(1):109-115.
- [8] Kuo C. L., C. W. Chi, T. Y. Liu. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2004, 203 (2):127-137.
- [9] Yokozawa T, A. Satoh, E. J. Cho, et al. Protective role of Coptidis Rhizoma alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57 (3):367-374.
- [10] Qin L, T. Han, Q. Zhang, et al. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal