

人参皂甙 Rb1 对体外软骨细胞 Ⅱ型胶原 mRNA 表达的影响

王昭佩, 杨仁轩, 许树柴, 郭玉海, 邓晋丰

(广州中医药大学附属广东省中医院骨科, 广东 广州 510407)

摘要 目的:探讨兔体外软骨细胞不同代系间 Ⅱ型胶原 mRNA 表达的差异以及人参皂甙 Rb1 对第 2 代软骨细胞 Ⅱ型胶原表达的影响。**方法:**在成功分离培养软骨细胞后,以细胞爬片法检测原代及第 2、4 代软骨细胞 Ⅱ型胶原 mRNA 表达的差异。以浓度为 $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Rb1 作用于贴壁 3 d 后的第 2 代病理软骨细胞,观察各浓度组软骨细胞 Ⅱ型胶原 mRNA 表达情况。**结果:**原代、第 2 代、第 4 代软骨细胞 Ⅱ型胶原 mRNA 表达的程度依次下降,适宜浓度的 Rb1 可增强第 2 代软骨细胞 Ⅱ型胶原的表达,维持软骨细胞的正常表型。**结论:**兔软骨细胞不同代系间 Ⅱ型胶原 mRNA 的表达存在一定差异,人参皂甙 Rb1 可能有利于第 2 代软骨细胞 Ⅱ型胶原的表达。

关键词 软骨细胞; 基因表达; 中草药

Effects of ginsenoside Rb1 on the expression of collagen Ⅱ mRNA of chondrocytes in vitro WANG Zhao-pei, YANG Ren-xuan, XU Shu-chai, GUO Yu-hai, DENG Jin-feng. Department of Orthopedics, the Second Affiliated TCM Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510407, Guangdong, China

Abstract Objective: To study collagen Ⅱ mRNA expression of chondrocytes in different generations and the effects of ginsenoside Rb1 on the expression of collagen Ⅱ mRNA of the second generation chondrocytes in rabbits. **Methods:** After the rabbits' chondrocytes were cultured successfully, the expressions of collagen Ⅱ mRNA of the first, the second and the third generation chondrocytes were detected. Different density ginsenoside Rb1, including $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, were exerted to the second generation chondrocyte, and then the expressions of collagen Ⅱ mRNA were observed. **Results:** The expression intensity of collagen Ⅱ mRNA of the first, the second and the third generation chondrocytes decreased gradually. The ginsenoside Rb1 with suitable density could strengthen the expression of collagen Ⅱ mRNA, and restrain the expression of specific collagen. **Conclusion:** The expressions of collagen Ⅱ mRNA in different generation chondrocytes is different. Ginsenoside Rb1 may be benefit to increase the expression of collagen Ⅱ mRNA in the second generation chondrocytes.

Key words Chondrocytes; Gene expression; Drugs, Chinese herbal

随着全球老龄人口的增加,骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发病率也逐年上升。据美国流行病学调查,55 岁以上人群中 50% 有 OA 放射学证据^[1]。软骨细胞是 OA 的靶细胞之一,软骨细胞形态及其胶原表型的异常,常作为软骨变性的标志之一。在我们以前的实验中发现人参皂甙 Rb1 在适宜的浓度时可促进体外软骨细胞的增殖,清除氧自由基,提高 SOD 活性^[2]。但 Rb1 单体对软骨胶原的作用是否

存在基因水平的改变,尚无直接的实验依据。本研究以体外不同代系软骨细胞的 Ⅱ型胶原表达为基础,检测人参皂甙 Rb1 对第 2 代软骨细胞 Ⅱ型胶原表达的影响,从而阐述人参皂甙单体治疗骨关节炎的机制。

1 材料与方法

1.1 主要组织材料 兔原代、第 2 代、第 4 代软骨细胞(本课题已培养的软骨细胞)。

1.2 主要试剂及配方 IL-1 (Sigma 公司),原位杂交专用盖玻片,多聚赖氨酸液,4% 多聚甲醛(0.1M

基金项目:广东省中医药管理局资助项目(编号:102038)

通讯作者:王昭佩 Tel:020-87351238 E-mail:yrxtcm@Tom.com

PBS, pH 7.2 ~ 7.6), 1% 多聚甲醛 (0.1M PBS, pH 7.2 ~ 7.6), 20% 甘油缓冲液, 3% 柠檬酸 (100 ml 蒸馏水中加柠檬酸 3.0 g, PH 2.0 左右), 2 × SSC (1 000 ml 蒸馏水中加氯化钠 17.6 g, 柠檬酸三钠 8.8 g) 0.5 × SSC 及 0.2 × SSC (以 2 × SSC 分别稀释), 原位杂交用 PBS (0.02M phosphate 加 0.5M NaCl, pH 7.2 ~ 7.6), Collagen Type 原位杂交检测试剂盒 (博士德, NO:MK1172)。

Collagen 靶基因 mRNA 序列如下:

5' TCCCC AGTCG CTGGT GCTGC TGACG CTGCT-3'

5' CATCG ACATG TCCGC CTTTG CTGGC TTAGG-3'

5' CCCTG CAGTA CATGC GGGCC GACCA GGCA-3'

1.3 软骨细胞原位杂交方法

1.3.1 细胞爬片法检测 Collagen mRNA 表达: 将盖玻片消毒灭菌后涂以多聚赖氨酸, 以玻璃刀去角以标志细胞生长面。将原代、第 2 代、第 4 代软骨细胞分别种植于铺满盖玻片的培养皿中培养, 条件为 37 和 5% 的 CO₂, 所用培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM, 24 h 细胞贴壁后更换培养基继续培养 3 d (若制备病理软骨细胞则加入 1 × 10⁴ U · L⁻¹ 的 IL-1 诱导)。终止培养后以 0.1M PBS 洗 2 min × 3 次, 4% 多聚甲醛及 0.1M PBS 室温固定 25 min 后, 以中性树脂将盖玻片粘在载玻片上。以 30% H₂O₂ 与纯甲醇混合液固定爬片 30 min, 在爬片上滴加新鲜稀释的胃蛋白酶, 室温消化 30 s 以暴露 mRNA 核酸片段, 原位杂交用 PBS 洗 5 min × 3 次, 以 1% 多聚甲醛及 0.1M PBS 室温固定爬片 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次。按每张盖玻片 20 μl 加预杂交液, 置于 39 恒温箱 3 h, 吸取多余液体; 按每张盖玻片 20 μl 加入杂交液, 39 恒温箱杂交过夜; 揭掉盖玻片, 以 37 的 2 × SSC 洗涤 5 min × 2 次, 37 的 0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1 次, 37 的 0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1 次。滴加封闭液 37 温度下孵育 30 min; 滴加生物素化鼠抗地高辛于 37 温度下反应 60 min, 原位杂交用 PBS 液洗 5 min × 4 次; 滴加 SABC 液于 37 温度下反应 20 min; 滴加生物素化过氧化物酶后置于室温 20 min, 原位杂交用 PBS 洗 5 min × 4 次。使用 DAB 显色试剂显色 25 min, 必要时苏木素复染, 充分水洗; 乙醇脱水, 二甲苯透明, 再以盖玻片封片, 显微镜下观察。

1.3.2 细胞爬片法检测 Rb1 对软骨细胞 Collagen mRNA 表达的影响 方法基本同 1.3.1, 将第 2 代软骨细胞按相同浓度分 3 组种植于铺着一张盖玻片的培养皿中培养 24 h, 所用培养基仍为含 10% 胎牛血清的 DMEM。正常组共 12 个培养皿, 其培养基既不加 IL-1, 也不加 Rb1。IL-1 对照组共 12 个培养皿, 其培养基加入含 1 × 10⁴ 的 IL-1。Rb1 试验组分 5 个组, 每组 12 个培养皿, 培养基中除含 1 × 10⁴ 的 IL-1 外, 各组分别加入终末浓度 0.01 μmol · L⁻¹, 0.1 μmol · L⁻¹, 1 μmol · L⁻¹, 10 μmol · L⁻¹, 100 μmol · L⁻¹ 的 Rb1 后继续培养 3 d。

1.4 结果评定 软骨细胞 Collagen mRNA 阳性表达可在胞质内, 也可在核内。本实验胞质或胞核内出现棕黄色物, 可判断为阳性。以 EMAL 200 真彩图分析系统对原位杂交阳性染色强度 (灰度值) 进行半定量测定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 组间灰度值之间的比较采用 ² 检验, 当 P < 0.05 时, 认为统计学上, 差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同代兔软骨细胞中 Collagen mRNA 表达的差异 原代软骨细胞的 型胶原杂交试验中, 胞浆区着色最深, 高倍镜下见染色均匀一致 (图 1); 在第 2 代细胞的实验组中, 型胶原杂交也呈阳性反应, 肉眼观与原代差别不大, 但从半定量图像分析来看, 仍有细微差别 (图 2); 第 4 代软骨细胞 型胶原杂交偶有阳性染色 (图 3)。以未加 mRNA 探针为阴性对照, 阴性对照不着色, 基本排除了探针非特异性吸附的可能 (图 4)。

2.2 Rb1 对 IL-1 诱导兔软骨细胞 型胶原表达的影响 与正常组相比, 浓度为 1 × 10⁴ U · L⁻¹ 的 IL-1 能抑制软骨细胞表达 型胶原 (P < 0.05)。Rb1 各浓度组分别与 IL-1 组相比, 浓度为 0.1 μmol · L⁻¹ 及 0.01 μmol · L⁻¹ 的 Rb1 能对抗 IL-1 的抑制作用, 但差异无显著性意义 (P > 0.05); 浓度为 1 μmol · L⁻¹ 的 Rb1 可明显对抗 IL-1 的抑制作用 (P < 0.01); 而浓度为 10 μmol · L⁻¹ 及 100 μmol · L⁻¹ 的 Rb1 反而加强 IL-1 的抑制作用。Rb1 实验组中 1 μmol · L⁻¹ 浓度组与其余 3 个浓度组相比, 1 μmol · L⁻¹ 能明显促进软骨细胞 型胶原的表达 (P < 0.05), 见表 1。

3 讨论

人参皂甙是从人参中提取的主要有效成分, 通

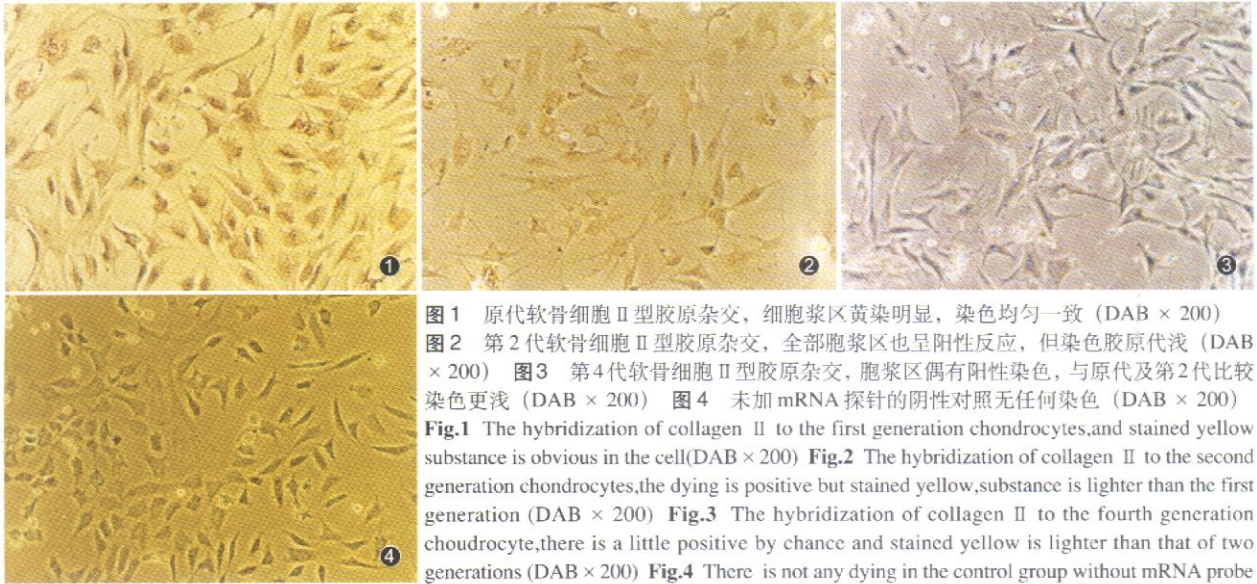


图 1 原代软骨细胞 II 型胶原杂交, 细胞浆区黄染明显, 染色均匀一致 (DAB × 200) 图 2 第 2 代软骨细胞 II 型胶原杂交, 全部胞浆区也呈阳性反应, 但染色较原代浅 (DAB × 200) 图 3 第 4 代软骨细胞 II 型胶原杂交, 胞浆区偶有阳性染色, 与原代及第 2 代比较染色更浅 (DAB × 200) 图 4 未加 mRNA 探针的阴性对照无任何染色 (DAB × 200)
 Fig.1 The hybridization of collagen II to the first generation chondrocytes, and stained yellow substance is obvious in the cell (DAB × 200) Fig.2 The hybridization of collagen II to the second generation chondrocytes, the dyeing is positive but stained yellow substance is lighter than the first generation (DAB × 200) Fig.3 The hybridization of collagen II to the fourth generation chondrocyte, there is a little positive by chance and stained yellow is lighter than that of two generations (DAB × 200) Fig.4 There is not any dyeing in the control group without mRNA probe

表 1 Rb1 对 IL-1 诱导软骨细胞 II 型胶原表达的影响
 Tab. 1 The effect of ginsenoside Rb1 on the collagen mRNA expression of chondrocytes

Group	IL-1 (U L ⁻¹)	Rb1 (μmol L ⁻¹)	Content of collagen ($\bar{x} \pm s, U \cdot ml^{-1}$)
Normal group	0	0	3.54 ± 0.67
IL-1 contrast group	1 × 10 ⁴	0	1.53 ± 0.20
Rb1 test group	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁻²	1.78 ± 0.27
	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁻¹	1.76 ± 0.25
	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁰	3.36 ± 0.60 *
	1 × 10 ⁴	1 × 10 ¹	1.17 ± 0.14
	1 × 10 ⁴	1 × 10 ²	1.01 ± 0.13

注:与正常组比较, P < 0.05; Rb1 实验组与 IL-1 对照组相比较, * P < 0.01, P > 0.05, P > 0.05; Rb1 实验组中 1 μmol L⁻¹ 浓度组与其余 4 个浓度组相比, P < 0.05。

Note: IL-1 contrast group compared to normal group, P < 0.05; Rb1 test group compared to IL-1 contrast group, * P < 0.01, P > 0.05, P > 0.05. Among Rb1 test groups, 1 μmol L⁻¹ density group compared to other four groups, P < 0.05.

过多层次、多模型、多指标的研究,其中人参皂甙 Rb1 已确定为参的有效代表成分之一。以往的研究认为 Rb1 有延缓衰老及抗凋亡作用,其延缓衰老的机制与清除自由基、提高 SOD 活性有关,而其抗凋亡作用与阻滞细胞膜上钙离子通道的活性、减轻细胞内钙离子的积聚有关^[3]。但过去的研究多集中在 Rb1 对心肌及神经细胞上,而对软骨作用的研究在国内外尚属空白。本实验采用多相寡核苷酸探针

和高敏感标记技术,并配合敏感性加强型原位杂交检测方法,对不同代的软骨细胞进行 II 型胶原 mRNA 原位杂交试验。在此实验中我们发现正常兔原代及第 2 代体外培养软骨细胞主要合成 II 型胶原,但在同一时间点上,表达 II 型胶原的能力是不相同的。本实验中 Collagen II mRNA 表达强度依次为:原代 > 第 2 代 > 第 4 代,这说明不同代系之间的细胞表型是有差别的。当传代越多,这种差别越大,甚至出现反分化情况,其详细机制值得进一步探讨。以 IL-1 诱导第 2 代软骨细胞,使其形成类似骨关节炎的细胞病理变化,发现适宜浓度为 1 μmol L⁻¹ 的 Rb1 有对抗 IL-1 的抑制软骨细胞合成 II 型胶原的作用。其机制可能与 Rb1 与 IL-1 竞争结合软骨细胞膜上受体有关,而过大浓度出现了细胞毒作用,反而促进了软骨细胞的表型改变。通过体外软骨细胞病理变化的探讨,对于认识 OA 的发病机制及药物的筛选均起到积极的推动作用。

参考文献

- 1 Towheed TE, Tanveer E. Glucosamine and chondroitin for treating symptoms of osteoarthritis. JAMA, 2000, 283 (11): 1483-1484.
- 2 王昭佩, 杨仁轩, 许树柴, 等. 人参皂甙 Rb1 对体外软骨细胞代谢的影响. 中医正骨, 2004, 16 (6): 5.
- 3 Schnabel M, Marlovits S, Echkhoff G, et al. Differentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in culture. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10: 62-70.

(收稿日期: 2004 - 12 - 02 本文编辑: 王宏)