

· 基础研究 ·

阳和汤对骨关节炎软骨细胞 HIF-1 α mRNA 影响的实验研究

陈朝蔚, 陈永强

(上海中医药大学附属市中医医院骨伤科, 上海 200071)

【摘要】 目的: 通过检测阳和汤对骨关节炎(OA)软骨细胞缺氧诱导因子-1 α mRNA(HIF-1 α mRNA)表达的影响, 探讨阳和汤改善 OA 软骨退行性变的机制。方法: 30 只新西兰大白兔随机分为正常组、模型组、阳和汤组, 每组 10 只, 按照 Hulth 法建立的膝骨关节炎模型, 分别对关节软骨病理切片后采用 Safranin O 染色, 光镜下观察, 进行 Mankin 评分, 同时实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1 α mRNA 在各组的表达。结果: 正常对照组 Safranin O 染色的 Mankin 评分与模型组差异有统计学意义($P=0.005$), 阳和汤组 Safranin O 染色减少或缺失程度较模型组轻, 差异有统计学意义($P=0.003$)。模型组 HIF-1 α mRNA 表达较正常组明显高, 差异有统计学意义($P=0.035$), 阳和汤组 HIF-1 α mRNA 表达明显低于模型组, 差异有统计学意义($P=0.039$)。结论: 阳和汤可延缓关节软骨退行性变, 其作用可能是通过调控 HIF-1 α mRNA 的作用。

【关键词】 骨关节炎; 中药疗法; 荧光光度测定法; HIF-1 α mRNA

Experiment research on the influence of Yanghe decoction (阳和汤) on the expression of HIF-1 α mRNA in osteoarthritis CHEN Chao-wei, CHEN Yong-qiang. Orthopaedics Department, the City Hospital of TCM Affiliated to the Shanghai University of TCM, Shanghai 200071, China

ABSTRACT Objective: To explore the influence of Yanghe decoction (阳和汤) on the expression of HIF-1 α mRNA in osteoarthritis (OA), so as to study mechanisms of Yanghe decoction (阳和汤) in the improvement of cartilage degeneration. **Methods:** Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups: control group (10 rabbits), OA model group (10 rabbits) and Yanghe decoction (阳和汤) treatment group (10 rabbits). The OA models were established by using Hulth method. The sections were stained with Safranin O for histological examination. Each sample was evaluated the cartilages histological characteristics according to the method of Mankin. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of HIF-1 α mRNA in each group. **Results:** There were significant differences in the Mankin score between the control group and the OA model group ($P=0.005$), either between the OA model group and the Yanghe decoction (阳和汤) treatment group ($P=0.003$). Fluorescent quantitative PCR indicated that HIF-1 α mRNA significantly increased in the OA model group compared to that of the control group ($P=0.035$), but that expression was much lower in Yanghe decoction (阳和汤) treatment group compared to that of the OA model group ($P=0.039$). **Conclusion:** The expression of HIF-1 α mRNA plays an important role in OA. Yanghe decoction (阳和汤) is effective to protect the articular cartilage, which is achieved through regulating the expression of HIF-1 α mRNA.

Key words Osteoarthritis; Treatment with Chinese herbs; Fluorophotometry; HIF-1 α mRNA

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(6):432-434 www.zggszz.com

阳和汤温阳补血、散寒通滞, 广泛用于临床骨关节炎的治疗。我们用实时荧光定量聚合酶链反应技术研究阳和汤对骨关节炎软骨细胞中 HIF-1 α mRNA 表达的影响, 探讨阳和汤防治骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂 6 月龄新西兰大白兔 30 只, 雌雄兼用, 体

质量(2.3 \pm 0.4) kg, 由上海中医药大学实验动物中心提供。动物合格证号: SCXK(沪)2004-0004。标准环境下饲养, 随机分为正常组、模型组、阳和汤组, 每组 10 只。阳和汤由熟地 30 g, 肉桂 3 g, 麻黄 2 g, 鹿角胶 9 g, 白芥子 6 g, 姜炭 2 g, 生甘草 3 g 组成, 以上各味药饮片置砂锅容器内, 加相当于药材体积 5 倍自来水浸泡 2 h, 煮沸 30 min, 经过滤的药渣再加 3 倍自来水继续煎煮, 煮沸 20 min 过滤, 合并 2 次滤液, 于水浴上浓缩, 浓缩过程中烊化鹿角胶, 制成含生药 1 g/ml 的阳和汤水煎剂, 由上海市中医医院制剂科提供。

基金项目: 上海市重点学科建设项目(编号: T0303)

通讯作者: 陈永强 E-mail: chen Yongqiang@medmail.com.cn

1.2 OA 模型建立 用 3%戊比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉,麻醉满意后按照 Hulth 法建立的膝关节炎模型,手术切开家兔左膝关节,剪切断内侧副韧带、前后交叉韧带和完整切除内侧半月板,术中注意保护关节软骨面不受损伤,不予固定。术后肌注庆大霉素(40 000 U/d)1 周。

1.3 给药 从术后第 5 周起至第 7 周结束。阳和汤组给予含阳和汤颗粒饲料(在标准颗粒饲料配方中按每只 6 ml·kg⁻¹·d⁻¹加入阳和汤制成),确保当日吃完。以上剂量均按人兔体表面积换算(Meeh Rubner 氏公式)关系确定,相当于临床等效剂量。正常组及模型组均未给药。全部动物于第 8 周处死,取材。

1.4 标本采集 在左胫骨平台取关节软骨,取材后立即将标本放入液氮罐内,24 h 后取出,即刻放入-80 ℃低温冰箱内保存。其余关节软骨置于多聚甲醛固定,EDTA 脱钙,石蜡包埋,制作 Safranin O-Fast Green 染色关节软骨病理切片。

1.5 观测项目与方法

1.5.1 关节软骨组织评分 关节软骨病理切片采用 Safranin O-Fast Green 染色进行 Mankin^[1]评分,从软骨外观改变、软骨细胞数和形态变化、软骨基质降解导致番红 O 着色改变、软骨钙化层和软骨下骨改变、潮线形态变化、血管穿透潮线和骨赘形成等方面评分。

1.5.2 实时荧光定量 PCR

(1) 试剂与仪器: 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(Fermentas 公司)。实时荧光定量 PCR 仪为 Rotor Gene 3000 (Corbett 公司),荧光染料试剂盒(TaKaRa 公司)。

(2) 引物设计: 根据 GeneBank 中新西兰大白兔 HIF-1 α 基因设计 5' 端引物(5'-cagtgcaaaagacagtgtggaag-3')和 3' 端引物(5'-ccctgtatggtgatgtgtt-3'),扩增产物全长 107 bp。以新西兰大白兔 β -actin 作为内参,5' 端引物(5'-atgggtggcattggctca3'),3' 端引物(5'-gctcgatggggtacttcagg-3'),扩增产物全长为 88 bp。由 TaKaRa 生物工程有限公司合成。

(3) 组织总 RNA 提取: 取-80 ℃冷冻保存的关节软骨,剪取 50~80 mg 放入研钵中,加入少量液氮,迅速研磨,加入 1 ml Trizol。经氯仿处理后离心,上清用异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤沉淀物,弃乙醇,干燥后用 DEPC 处理去离子水 10 μ l 溶解 RNA,取 1:50 稀释后于核酸蛋白分子仪中检测 OD 定量 RNA 浓度,测得提取样品 RNA OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间。电泳检测 RNA 质量。

(4) 逆转录步骤: 得到模板 cDNA 加入 2 μ g 的总 RNA, DEPC 处理去离子水, Oligo DT 1 μ l, 总体积为 12 μ l, 70 ℃ 5 min, 取出插入冰水中, 加入 5 \times Buffer 4 μ l。RNA 酶抑制剂 1 μ l, dNTP 2 μ l, 37 ℃ 5 min。加入 M-MLV 1 μ l, 最终体积为 20 μ l。42 ℃ 60 min, 25 ℃ 10 min, 70 ℃ 10 min, 停止反应, 放入-20 ℃冰箱保存。

(5) 检测目的基因与内参基因的扩增效率: 用目的基因与内参基因 cDNA 模板按 10 倍梯度进行稀释, 制成标准模板系列, 自每个稀释模板中取样 2 μ l, 10 μ l Master Mix, 0.4 μ l 10 uM 上游引物, 0.4 μ l 10 uM 下游引物, 7.2 μ l DEPC 水混成总体积 20 μ l 反应体系, 行实时荧光定量 PCR。扩增条件为: 95 ℃ 15 secs, 60 ℃ 15 secs, 72 ℃ 30 secs, 45 cycles。两组标准曲线的 M 值即斜率为-2.298 和-2.214, 两者的差值<0.1, 这组看家

基因和目的基因可以用 Comparative Delta-delta Ct 法进行相对定量。

(6) 目的基因与内参基因 Ct 值的测定: 将逆转录得到的 cDNA 样品中各取 2 μ l, 加入和上面完全相同的反应体系中, 在同样的反应条件下行 PCR 扩增, 测定各样品的 Ct 值。对荧光 PCR 产物进行电泳鉴定。

(7) 用 Comparative Delta-delta Ct 法进行相对定量: 通过以下公式^[2]分析相对基因表达差异。

$$\text{Amount of target} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (C_{T, \text{Target}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{处理}} - (C_{T, \text{Target}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{对照}}$$

1.6 统计学处理 用 SPSS 12.0 软件处理数据, 各组 Mankin 评分数值及 HIF-1 α mRNA 表达量用均数 \pm 标准差表示, 正常组、模型组、阳和汤组之间比较用 One-Way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 关节软骨组织评分结果 正常对照组 Safranin O 染色示软骨层次清楚, 细胞排列整齐, 番红 O 染色均匀, 软骨细胞少, 分布均匀。模型组软骨面糜烂、剥脱, 软骨变薄, 基质染色不均, 嗜染度下降甚至失染, 纤维组织大量增生, 软骨细胞减少, 排列不均, 出现成簇现象。模型组与正常对照组 Mankin 评分比较差异有统计学意义(P=0.005)。阳和汤组钙化层和浅层着色略淡, Safranin O 染色减少或缺失程度较模型组轻, 阳和汤组与模型组差异有统计学意义(P=0.003)。

2.2 各组关节软骨细胞 HIF-1 α mRNA 表达量分析 模型组 HIF-1 α mRNA 表达较正常组明显高, 差异有统计学意义(P=0.035), 阳和汤组 HIF-1 α mRNA 表达明显低于模型组, 差异有统计学意义(P=0.039), 提示 OA 模型中 OA 软骨病损时存在软骨细胞 HIF-1 α mRNA 表达上调, 而阳和汤干预后可显著下调 HIF-1 α mRNA 的表达(表 1)。

表 1 阳和汤对关节软骨及 HIF-1 α mRNA 影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Influence of Yanghe decoction(阳和汤) on the HIF-1 α mRNA and cartilage($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	Mankin 评分	HIF-1 α mRNA 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}
正常组	10	1.25 \pm 0.21**	0.69 \pm 0.17*
模型组	10	6.25 \pm 0.23	160.35 \pm 72.27
中药组	10	3.22 \pm 0.13**	5.44 \pm 2.36*

注: 与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01

Note: Compared to OA model group, *P<0.05, **P<0.01

3 讨论

HIF-1 是低氧应答时诱导基因表达和恢复细胞内环境的一个核心调节因子。HIF-1 作为转录调节因子, 其激活可调节下游多种基因, 而这些基因的蛋白产物涉及血管生成、能量代谢、红细胞生成、血管舒缩反应、细胞增殖和存活以及血管重建等^[3]。HIF-1 有 2 个亚基: HIF-1 α 和 HIF-1 β , 只有两者形成二聚体后才具备活性, HIF-1 α 蛋白表达是其活性的主要决定因素。

大量的研究报道骨关节炎患者的关节腔为缺氧环境, 进一步研究发现 OA 患者膝关节腔内的氧分压和疾病严重程度负相关^[4]。缺氧条件下, HIF-1 α 感受缺氧信号后, 自身被迅速激活, 进入核内与其他转录因子协同作用并组织靶基因 DNA

· 基础研究 ·

联合注射外源性 IFN γ 和 IGF-1 治疗小鼠骨骼肌损伤

陈疾忤, 陈世益, 李宏云, 尚西亮, 吴子英

(复旦大学运动医学中心 华山医院运动医学与关节镜外科, 上海 200040)

【摘要】 目的: 观察局部联合注射外源性人胰岛素样生长因子-1(human insulin-like growth factor-1, hIGF-1) 和人 γ 干扰素(human interferon γ , hIFN γ) 对于小鼠急性钝挫伤骨骼肌修复过程中再生和纤维化的影响。方法: 64 只 8 周龄雄性 C3H 小鼠, 制作右侧腓肠肌钝挫伤动物模型, 随机分为 4 组, 即 A 组(注射 hIFN γ)、B 组(注射 hIGF-1)、C 组(联合注射 hIFN γ 和 hIGF-1)、D 组(注射生理盐水)。挫伤后第 10 天, A、B、C、D 组小鼠, 腓肠肌损伤处分别注射不同药物进行干预。于干预前(伤后 7 d), 和干预后 4、18、32 d, 各组随机抽取 4 只小鼠进行损伤腓肠肌取材, 以荧光定量 PCR 和免疫荧光化学染色方法检测不同时点 II b 型肌球蛋白重链 (myosin heavy chain- II b, MHC- II b) 及波形蛋白 (Vimentin) 的表达。结果: ①干预后各时点, B、C 组小鼠损伤骨骼肌局部 MHC- II b 表达较 A、D 组明显高; ②干预后各时间点 A、B、C 组小鼠损伤骨骼肌局部 Vimentin 表达较 D 组低, 其中以 A 组和 B 组更明显。结论: ①骨骼肌急性损伤后, 局部注射 hIGF-1 有明显促进骨骼肌纤维再生, 和一定程度抑制纤维化的作用。②局部注射 hIFN γ 仅表现出抑制纤维化的作用, 且比 hIGF-1 更加明显。③联合应用 hIGF-1 和 hIFN γ , 能够同时促进骨骼肌再生和抑制纤维化, 有效地促进损伤骨骼肌的愈合。

【关键词】 人 γ 干扰素; 胰岛素样生长因子-1; 创伤和损伤; 肌, 骨骼; 肌球蛋白重链; 波形蛋白

Effect of exogenous interferon γ on the healing of injured skeletal muscle following injury CHEN Ji-wu, CHEN Shi-yi,

基金项目: 上海市体育局十一五科技攻关计划资助(编号: 06JT0170)

通讯作者: 陈疾忤 Tel: 021-62489999 E-mail: jeevechan@yahoo.com.cn

结合并诱导基因转录, 调控相关基因的表达, 以维持细胞和机体的氧稳态及能量代谢平衡。缺氧有助于 HIF-1 α 的稳定性, 同时滑膜中的致炎因子如白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α) 等也有助于 HIF-1 与 DNA 结合及靶基因的表达^[5]。但 HIF-1 的活化及其参与的低氧信号转录翻译, 不是一条简单清晰的路径, 具有复杂化与多样性。有研究报道 OA 的低氧环境使 HIF-1 α 通过诱导下游 VEGF 表达增强来刺激血管生成建立对缺氧的适应机制^[6]。

本实验采用实时荧光定量 PCR 技术, 在 mRNA 水平准确定量检测 HIF-1 α 表达水平。实时荧光定量 PCR 技术较 RT-PCR 定量更准确, 受循环次数的影响小, 由于其在扩增的同时采集数据, 可避免普通 PCR 后处理对结果的影响。目前, 实时荧光定量 PCR 技术已成为一项可靠而准确的定量技术^[2]。本实验模型组较正常组 HIF-1 α 基因水平明显上调, 这说明 HIF-1 α mRNA 在关节软骨的过度表达对骨关节炎的发生发展可能有一定的意义。OA 病变关节腔的滑膜细胞大量增殖, 滑液量增加, 压迫滑膜毛细血管致其血流减慢, 致 OA 关节腔为缺氧环境, 促使 HIF-1 α mRNA 表达增高。阳和汤温阳补血、散寒通滞, 加速局部的血液循环, 提高局部组织的氧供, 抑制缺氧刺激的 HIF-1 α mRNA 上调, 延缓了关节炎的发展。至于阳和汤其他的作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. J Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
- 2 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 2001, 25: 402-408.
- 3 Maes C, Stockmans I, Moermans K, et al. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. J Clin Invest, 2004, 113 (2): 188-199.
- 4 Pfander D, Swoboda B, Cramer T, et al. The role of HIF-1 α in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): R904-914.
- 5 Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, et al. Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. J Orthop Sci, 2003, 8 (6): 849-857.
- 6 Maes C, Carmeliet P, Moermans K, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. Mech Dev, 2002, 111 (1-2): 61-73.

(收稿日期: 2007-10-30 本文编辑: 连智华)