

· 基础研究 ·

京尼平苷对硝普钠诱导软骨细胞凋亡与细胞周期的影响

陈万军, 鲍同柱, 陈恳, 朱长谋, 万峰, 谭玉林, 鄢飞
(三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院骨科, 湖北 宜昌 443002)

【摘要】目的:研究京尼平苷(Geniposide)对硝普钠(SNP)诱导软骨细胞凋亡与细胞周期的影响。**方法:**3 周龄 SD 大鼠, 用于分离培养软骨细胞。将第 II 代软骨细胞进行分组, 噻唑兰染色(MTT)法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率, 硝酸还原酶法检测培养液中 NO 含量。**结果:**京尼平苷干预 SNP 诱导软骨细胞凋亡后, 细胞处于 G0/G1 期的百分比减少, S 及 G2/M 期的细胞百分比增加; 同时显著降低软骨细胞凋亡率及培养液中 NO 含量 ($r=0.917, P<0.01$)。**结论:**京尼平苷干预 SNP 诱导软骨细胞凋亡, 可降低培养液中 NO 含量, 促进细胞增殖, 这可能是京尼平苷治疗骨性关节炎的作用机制之一。

【关键词】 骨关节炎; 软骨细胞; 细胞, 培养的; 细胞凋亡; 一氧化氮

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.03.015

Effects of Geniposide on SNP-induced apoptosis of chondrocyte and cell cycle CHEN Wan-jun, BAO Tong-zhu, CHEN Ken, ZHU Chang-mou, WAN Feng, TAN Yu-lin, and YAN Fei. Department of Orthopaedics, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443002, Hubei, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of Geniposide on SNP(sodium nitroprusside)-induced apoptosis of chondrocyte in vitro and cell cycle. **Methods:** The chondrocyte of three-week-old SD rats were separated and cultivated. The second generation of chondrocyte cells were involved in experiment. Chondrocyte proliferation was measured by MTT assay; flow cytometer were adopted to observe cell cycle and apoptosis rate; NO examination adopted nitrate reductase method. **Results:** Geniposide could significantly decrease the percentage of SNP-induced chondrocytes in G0/G1 phase and increased percentage in S phase and G2/M phase. The apoptosis of chondrocyte and the concentration of NO in the culture supernatants was reduced significantly ($r=0.917, P<0.01$). **Conclusion:** Geniposide could impact SNP-induced apoptosis of chondrocyte by reducing the concentration of NO in the culture supernatants, promoting proliferation of chondrocytes, which is a probable and important mechanism of Geniposide preventing osteoarthritis.

KEYWORDS Osteoarthritis; Chondrocytes; Cells, cultured; Apoptosis; Nitric oxide

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(3):232-235 www.zggszz.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨基质降解为特征的退行性关节疾病, 软骨细胞过度凋亡在其发病过程中起着重要作用^[1-2]。中药栀子临床上用于治疗 OA 有明显疗效的复方制剂, 其主要成分京尼平苷(Geniposide)常用于热病心烦、高热烦躁、湿热黄疸、小便短赤、热淋、血淋、血热出血、痈肿疮毒以及外用治疗扭挫伤痛等^[3]。本课题组前期研究发现, 栀子浸膏可改善兔 OA 模型组织学评分, 减缓关节软骨退变^[4]; 京尼平苷可调节细胞周期, 减少不增殖细胞比例, 促进软骨细胞增殖^[5]。本研究通过提取正常大鼠膝关节软骨细胞原代培养, 传代并鉴

定, 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)诱导建立软骨细胞凋亡模型, 采用不同浓度京尼平苷干预后, 噻唑兰染色(MTT)法检测软骨细胞增殖, 流式细胞术(FCM)检测细胞周期及凋亡率, 硝酸还原酶法检测 NO 含量, 进一步探讨京尼平苷治疗 OA 的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器 SW-CJ-2A 型净化工作台(重庆汇诚空调净化设备制造公司); 2001-13 型二氧化碳培养箱(上海常思工贸有限公司); IX-700 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 酶标仪(美国 Thermo 公司); 流式细胞分析仪(美国 Becton Coulter 公司)。

1.2 试剂 京尼平苷(又名栀子苷, 上海源叶生物科技有限公司); 硝普钠(北京双鹤现代医药技术有限责任公司, 批号: H111021635); 胎牛血清(杭州四季青); II 型胶原酶(美国 Sigma 公司); 硝酸还原酶

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(编号: 2010CDB10701)
Fund program: Provided by Science and Technique Fund of Hubei Province (No. 2010CDB10701)
通讯作者: 鲍同柱 E-mail: baotongzhu1963@163.com

法 NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 实验动物 3 月龄清洁级健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体质量 200~250 g,由华中科技大学同济医学院提供,合格证号 SCXK2004-0007。实验过程中动物的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

1.4 分组 选用第 II 代软骨细胞种植于 25 cm² 培养瓶中,待细胞贴壁后,用不含血清的 DMEM 培养基“饥饿”培养 24 h,使细胞同步化。分为空白组(10% DMEM 培养基培养),模型组(1.5 mmol/L SNP + 10% DMEM 培养基培养),50 μg/ml 京尼平苷干预组(1.5 mmol/L SNP + 50 μg/ml 京尼平苷 + 10% DMEM 培养基培养),100 μg/ml 京尼平苷干预组(1.5 mmol/L SNP + 100 μg/ml 京尼平苷 + 10% DMEM 培养基培养),200 μg/ml 京尼平苷干预组(1.5 mmol/L SNP + 200 μg/ml 京尼平苷 + 10% DMEM 培养基培养)。

1.5 软骨细胞的分离、培养与传代 按参考文献[7]分离培养方法,台盼蓝染色检测所获得的软骨细胞的活性。加入全培养液吹打、混匀,接种于 6 孔细胞培养板内,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内进行原代培养。倒置显微镜观察、照相记录细胞形态及贴壁生长情况,待细胞贴壁达到 85%~90% 后传代。

1.6 观察项目与方法

1.6.1 软骨细胞形态学观察及鉴定 软骨细胞形态学观察:在倒置显微镜下观察培养的软骨细胞形态学变化并照相。II 型胶原免疫细胞化学染色法鉴定原代培养软骨细胞:软骨细胞接种于半径约 1.5 cm 的圆形盖玻片上,盖玻片置于 6 孔板内,10% DMEM 培养基培养 24 h 后,细胞爬片以 4% 多聚甲醛固定 15 min,新鲜配制 0.5% H₂O₂/甲醇室温处理 30 min,灭活内源性过氧化物酶。细胞爬片上滴加山羊血清封闭液,室温 20 min;滴加兔抗鼠型 II 型胶原单克隆抗体,37 ℃ 恒温箱 20 min, PBS 洗涤;滴加羊抗鼠 II 抗,37 ℃ 恒温箱 20 min, PBS 洗涤;滴加 SABC,37 ℃ 恒温箱 20 min, PBS 充分洗涤后二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,充分水洗;酒精脱水,二甲苯透明,封片,观察,照相。

1.6.2 描绘软骨细胞生长曲线 取生长良好的第 II 代软骨细胞制备细胞悬液,接种在 24 孔板内,每天取 3 孔细胞计数,持续 7 d。将所获得的细胞计数值标记在对数坐标纸上,将各点连成曲线即为生长曲线。

1.6.3 噻唑蓝染色(MTT)法检测软骨细胞增殖 取第 II 代软骨细胞计数后接种于 96 孔板中,每孔(2~3)×10³ 个细胞,每孔加入 100 μl 细胞悬液,培养

24 h 后按分组相应浓度药物处理。每个浓度设置 3 个复孔,重复 3 次。分别在 24、48、72 h 3 个时间点加入 MTT 10 μl(5 g/L),培养 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min 至结晶溶解。空白对照调零,后于酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值。

1.6.4 流式细胞仪分析细胞周期 将培养的待测细胞置于 1.5 ml EP 管中, PBS 漂洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入预冷的无水乙醇 1 ml 快速混匀,固定细胞(乙醇终浓度为 60%~70%)。弃固定液, PBS 漂洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入适量打孔液(0.1% TriTon + RNA 酶)转入流式测定管中,加入 90 μl DNA 荧光染料(PI),室温下避光染色 30 min, 300 目尼龙膜过滤,于流式细胞仪测定,分析细胞周期。

1.6.5 流式细胞分析法检测软骨细胞凋亡 胰酶消化细胞收集于离心管中, 4 ℃、12 000 r/min 离心成细胞团块,按 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒说明书操作,流式细胞仪分析检测。

1.6.6 硝酸还原酶法检测培养液中 NO 含量 收集各组培养液,按试剂盒说明书检测培养液中 NO 含量。

1.7 统计学处理 动物及细胞分组均随机取样,每个样本 3 次重复实验。实验数据应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,相关性分析采用 Spearman 相关检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养软骨细胞形态及鉴定 HE 染色显示第 II 代软骨细胞呈星形、多边形,触角明显,胞浆丰富,胞核清晰,可见 1~2 个核仁,与倒置显微镜下所见细胞形态吻合。II 型胶原免疫细胞化检测显示软骨细胞胞浆及细胞外基质被染成棕黄色,表明培养的原代软骨细胞具有软骨细胞特征(图 1)。

2.2 软骨细胞生长曲线 软骨细胞生长呈“S”形曲线,第 II 代软骨细胞在 1~2 d 生长缓慢,处于潜伏生长期,3~5 d 为快速增殖期,5~6 d 增值趋于平缓,6~7 d 增值基本停滞,软骨细胞倍增时间(DT)约在第 4 天(图 2)。

2.3 京尼平苷对 SNP 诱导软骨细胞凋亡细胞增殖的影响 结果见表 1。MTT 比色显示:与对照组比较,SNP 可促进软骨细胞凋亡,其 OD 值在培养的不同时期均低于空白组;而高中低浓度京尼平苷干预 1.5 mmol/L SNP 诱导软骨细胞凋亡后可促进细胞增殖,不同浓度干预组在培养不同时期的 OD 值均高于模型组。

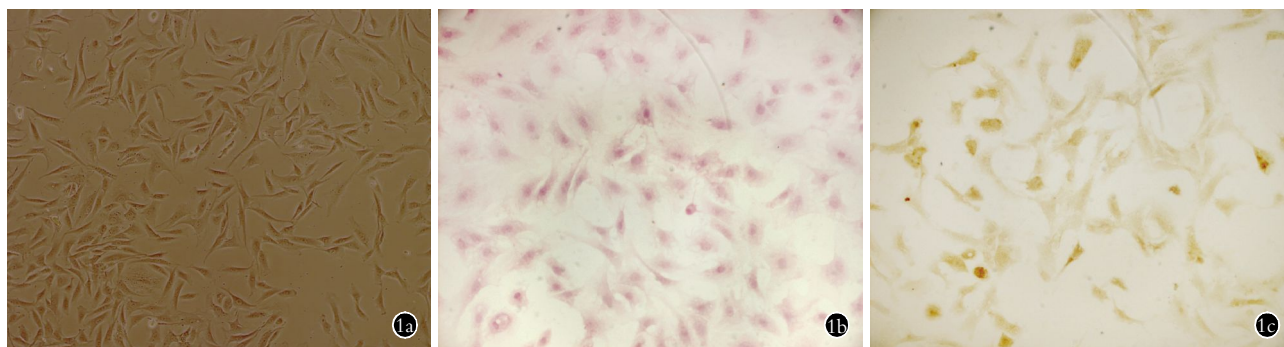


图 1 第二代软骨细胞形态及鉴定 1a. 倒置显微镜($\times 100$) 1b. HE 染色($\times 200$) 1c. II 型胶原免疫细胞化学染色($\times 200$)
Fig.1 Morphology of second passage chondrocyte identified by immunocytochemistry 1a. Inverted microscope ($\times 100$) 1b. HE stain ($\times 200$)
 1c. Collagen II of immunocytochemistry ($\times 200$)

表 1 京尼平苷对 SNP 诱导软骨细胞凋亡细胞增殖、细胞周期以及 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Geniposide on the proliferation, cell cycle and NO contents of SNP-induced apoptosis of chondrocyte($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (个)	OD 值			细胞周期(%)			细胞凋亡率 (%)	NO 含量 ($\mu\text{mmol/L}$)
		培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h	G0/G1	S	G2/M		
空白组	3	0.272 \pm	0.342 \pm	0.448 \pm	78.90 \pm	6.00 \pm	14.39 \pm	3.83 \pm	35.47 \pm
		0.110	0.136	0.008	2.29	0.16	0.82	0.51	0.83
模型组	3	0.194 \pm	0.162 \pm	0.152 \pm	83.77 \pm	3.86 \pm	12.24 \pm	13.49 \pm	247.30 \pm
		0.111**	0.009**	0.023**	1.27*	0.19*	0.86*	1.85**	4.22**
50 $\mu\text{g/L}$ 京尼平苷干预组	3	0.346 \pm	0.386 \pm	0.473 \pm	78.16 \pm	6.72 \pm	14.52 \pm	9.27 \pm	179.87 \pm
		0.010 [#]	0.200 [#]	0.181 [#]	2.71	10.5 [#]	0.74 [#]	0.36 [#]	3.23 [#]
100 $\mu\text{g/L}$ 京尼平苷干预组	3	0.352 \pm	0.410 \pm	0.52 \pm	73.2 \pm	9.68 \pm	16.80 \pm	6.54 \pm	106.93 \pm
		0.117 [#]	0.167 [#]	0.022 [#]	0.87 [#]	0.58 [#]	1.29 [#]	0.21 [#]	1.40 [#]
200 $\mu\text{g/L}$ 京尼平苷干预组	3	0.352 \pm	0.435 \pm	0.515 \pm	73.5 \pm	9.39 \pm	17.52 \pm	5.45 \pm	71.07 \pm
		0.127 [#]	0.026 [#]	0.027 [#]	1.39 [#]	0.87 [#]	1.10 [#]	0.19 [#]	2.41 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: Compared with blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; Compared with model group,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

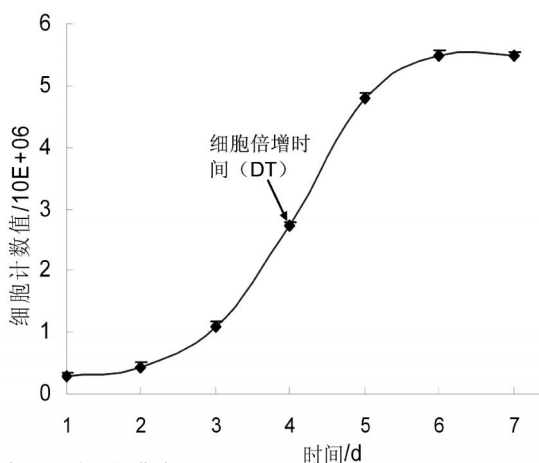


图 2 软骨细胞生长曲线
Fig.2 Chondrocyte cell growth curve

2.4 京尼平苷对 SNP 诱导软骨细胞凋亡细胞周期的影响 与模型组比较,不同浓度京尼平苷干预组细胞处于 G0/G1 期百分比减少,S 及 G2/M 期细胞百分比增加,说明京尼平苷可以调节软骨细胞周期,增加增殖期细胞比例,促进软骨细胞增殖(见表 1)。

2.5 京尼平苷对 SNP 诱导软骨细胞凋亡及培养液中 NO 含量的影响 与空白组比较,模型组细胞凋

亡率增高,同时培养液中 NO 含量增高,说明 NO 含量增高可能是导致软骨细胞凋亡增加的关键因素之一。与模型组比较,不同浓度京尼平苷干预组的细胞凋亡率降低,培养液中 NO 含量减少。Spearman 相关性分析显示:NO 含量与软骨细胞凋亡率呈正相关($r = 0.917, P < 0.01$),说明京尼平苷可能是通过降低培养液中 NO 含量从而减少软骨细胞凋亡(见表 1)。

3 讨论

OA 是一种常见的慢性退行性关节病变,发病机制尚不清楚,目前认为 OA 病理学特征是关节软骨损伤,而关节软骨重要成分是软骨细胞,因此研究 OA 发病机制应从软骨细胞着手,防治 OA 应以延缓甚至阻断软骨退行性改变,保护软骨细胞为目标。

OA 在中医中属于“痹证”、“骨痹”范畴,中医药治疗骨关节炎有着悠久的历史,因其效果显著、不良反应小、适合长期治疗而独具优势。中药栀子临床上用于治疗 OA 有明显疗效的复方制剂,其重要成分京尼平苷常用于热病心烦、高热烦躁、湿热黄疸、小便短赤、热淋、血淋、血热出血、痈肿疮毒,以及外用治疗扭挫伤等^[3]。在前期研究^[4-5]的基础上,本研

究从京尼平苷对软骨细胞凋亡影响的角度进一步探讨其治疗机制。

在 OA 病变过程中有软骨细胞凋亡的特征性形态,如染色质凝聚、核碎片、细胞皱缩、凋亡小体等,软骨细胞过度凋亡已被公认为关节软骨退行性改变的病理因素之一^[8-9]。用 NO 供体硝普钠(SNP)诱导建立软骨细胞凋亡模型已成为一种常用的实验手段^[10]。SNP 诱导细胞凋亡可能存在以下关系:低浓度时抑制细胞凋亡,高浓度时引起细胞凋亡,过高浓度则导致细胞坏死^[11]。

本研究结果表明,SNP 诱导软骨细胞凋亡后,细胞凋亡率明显增高,与文献报道一致^[10]。京尼平苷可促进软骨细胞增殖,与本课题组前期研究结果吻合。本研究表明京尼平苷可调节软骨细胞周期,促进软骨细胞增殖,降低软骨细胞凋亡率及 NO 含量。京尼平苷可能是通过减少 NO 含量抑制软骨细胞凋亡,这可能是京尼平苷治疗 OA 的重要机制之一。本研究初步揭示了京尼平苷抑制软骨细胞凋亡、调节细胞周期的作用,至于如何通过相关信号转导途径实现则需进一步研究。

参考文献

- [1] Kim DY, Taylor HW, Moore RM, et al. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis[J]. Vet J, 2003, 166(1): 52-57.
- [2] Kimura T. Progress of research in osteoarthritis. An overview of the recent knowledge on osteoarthritis: pathogenesis, evaluation and therapies[J]. Clin Calcium, 2009, 19(11): 1565-1571.
- [3] 吴虹,魏伟,宋礼华. 栀子总苷抗炎镇痛作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 26(1): 67-69.
Wu H, Wei W, Song LH. Study on anti-inflammatory and analgesic effect of Geniposide[J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi, 2006, 26(1): 67-69. Chinese.
- [4] 吴剑, 鲍同柱. 栀子对兔膝关节炎模型关节软骨病理改变及白细胞介素-1 β 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1674-1675.
Wu J, Bao TZ. Effect of Geniposide on expression of IL-1 β and pathology changes of cartilago articularis of knee joints in rabbits[J]. Shi Zhen Guo Yi Guo Yao, 2009, 20(7): 1674-1675. Chinese.
- [5] 谭玉林, 鲍同柱, 柳琴, 等. 京尼平苷对大鼠软骨细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 41(10): 7619-7622.
Tan YL, Bao TZ, Liu Q, et al. Effect of Geniposide on chondrocyte proliferation of rats[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2011, 41(10): 7619-7622. Chinese.
- [6] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[R]. 2006-09-30.
The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals[R]. 2006-09-30.
- [7] Hu DN, Yang PY, Ku MC, et al. Isolation and cultivation of human articular chondrocytes[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2002, 18(3): 113-120.
- [8] Pennock AT, Robertson CM, Emmerson BC, et al. Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(5): 1529-1536.
- [9] Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models[J]. Mol Cells, 2008, 25(1): 1-6.
- [10] Kim HA, Lee KB, Bae S. The mechanism of low-concentration sodium nitroprusside mediated protection of chondrocyte death[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7: R526-535.
- [11] 张梅, 李平, 汪健, 等. 马钱子对 3 种软骨细胞模型的影响[J]. 中国骨伤, 2005, 18(7): 410-412.
Zhang M, Li P, Wang J, et al. Effects of *Maqianzi* on models of three types of chondrocyte[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2005, 18(7): 410-412. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2012-09-20 本文编辑: 连智华)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊关于“通讯作者”有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜均与通信作者联系。如文内未注明通讯作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

《中国骨伤》杂志社