

雷公藤红素对 IL-1β 致软骨终板退变的影响

陈荣国¹ 孙强^{2*} 曾怿³ 王书奎²

1. 南京中医药大学第三附属医院,南京市中医院骨科,江苏 南京 210001
2. 南京医科大学附属南京医院孙强(骨科 中心实验室), 江苏 南京 210006
3. 南京市六合人民医院骨三科,江苏 南京 211500

中图分类号: R453 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 12-1629-05

摘要: **目的** 通过 IL-1β 与雷公藤红素体外刺激小鼠椎间盘软骨终板细胞,探讨雷公藤红素能否抑制 IL-1β 对软骨终板细胞的影响。**方法** 不同浓度的雷公藤红素刺激软骨终板细胞,CCK-8 法检测不同时间点其对软骨终板细胞增殖作用的影响;实验共分 3 组:空白对照组(无血清 DMEM 培养基),IL-1β 诱导组(IL-1β 5 ng/mL 共同孵育 2 h),雷公藤红素干预组(经 IL-1β 5 ng/mL 共同孵育 2 h 后,再以雷公藤红素共同孵育 24 h)。分组处理后,ELISA 法检测 MMP-1、MMP-3 的水平,同时荧光定量 PCR 检测蛋白多糖及 II 胶原的 mRNA 表达水平。**结果** 与空白对照组相比,IL-1β 刺激软骨终板细胞 2 h 后,MMP-1、MMP-3 表达水平明显增高,雷公藤红素可抑制细胞中 IL-1β 介导的 MMP-1、MMP-3 的表达,同时 IL-1β 明显抑制软骨终板细胞的蛋白多糖及 II 胶原 mRNA 的表达,而雷公藤红素可上调 IL-1β 诱导的蛋白多糖及 II 胶原 mRNA 的表达水平。**结论** 雷公藤红素能够抑制 IL-1β 介导的软骨终板退变进程,上调蛋白多糖及 II 胶原 mRNA 的表达水平,可能在防治椎间盘退变性疾病中发挥重要作用。

关键词: 雷公藤红素;IL-1β;金属蛋白酶;软骨终板细胞

The influence of celastrol on cartilage endplate degeneration of intervertebral disc induced by IL-1β

CHEN Rongguo¹, SUN Qiang^{2*}, ZENG Yi³, WANG Sunkui²

1. Department of Orthopaedics, The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of T. C. M, Nanjing T. C. M Hospital, Nanjing 210001, China
2. Department of Orthopaedics (SQ) and Central Laboratory (WS), Nanjing Medical University Affiliated Nanjing Hospital, Nanjing, 210006, China
3. The Third Orthopaedics Department, Nanjing Liuhe People's Hospital, Nanjing 211500, China

Corresponding author: SUN Qiang, Email:Sunqiang_cn@163.com

Abstract: Objective We aimed to explore the potential mechanism of Celastrol in suppressing the influence of IL-1β on endplate chondrocytes through stimulating chondrocytes of the endplate using IL-1β and Celastrol *in vitro*. **Methods** Chondrocytes of the endplate were induced by different concentrations of Celastrol. The proliferation of chondrocytes of the endplate was determined by CCK-8 assays. The chondrocytes of the endplate were divided into control group with complete medium, IL-1β-induced group with 5 ng/mL IL-1β of complete medium for 2 h and Celastrol treatment group with Celastrol for 24 h after being added with 5 ng/mL IL-1β of complete medium for 2 h. MMP-1 and MMP-3 were measured by ELISA after chondrocytes of the endplate induced by IL-1β and Celastrol, and mRNAs of proteoglycan and type II collagen were assessed by RT-qPCR. **Results** The expression levels of MMP-1 and MMP-3 were significantly upregulated in chondrocytes of the endplate induced by IL-1β for 2 h compared with the blank control, and the effect was markedly inhibited by Celastrol. Moreover, the expression levels of proteoglycan and type II collagen were significantly suppressed in chondrocytes of the endplate induced by IL-1β for 2 h compared with the blank control, and Celastrol could upregulated the expression of proteoglycan and type II collagen. **Conclusion** Celastrol may effectively inhibit the

基金项目: 南京市科技局课题(2014sc513010)
* 通讯作者: 孙强,Email:Sunqiang_cn@163.com
四位作者对本课题是同等贡献

degeneration process of cartilage endplate induced by IL-1 β , contribute to the expression of proteoglycan and type II collagen, and play an important role in the suppression of degenerative disc disease.

Key words: Celastrol; IL-1 β ; Matrix metalloproteinases; Chondrocytes of the endplate

椎间盘退变是导致腰椎间盘突出症、颈椎病等临床常见椎间盘退变性疾病的根本原因。椎间盘由髓核、纤维环和软骨终板三部分组成,其中,软骨终板在营养运输、调控椎间盘内压和稳定椎间盘结构等方面起着重要作用,软骨终板退变会导致其营养运输功能减退、椎间盘营养供给不足,减低椎间盘内压、破坏椎间盘整体结构的稳定性,从而进一步促进椎间盘整体退变^[1]。炎症因子在促进软骨终板退变中扮演着重要角色,其中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是最主要的炎症因子之一, IL-1 β 作用于软骨终板细胞,可刺激软骨终板细胞产生和分泌金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs), MMPs 家族中的 MMP-1 能够降解纤维胶原, MMP-3 能够分解和破坏细胞外基质,以上物质共同作用于软骨终板细胞,抑制作为软骨基质的蛋白多糖和 II 型胶原的合成以及促进其分解,从而加速软骨终板的退变。

雷公藤红素是雷公藤片、雷公藤多甙片等制剂的有效成分之一,是一种具有多种生物活性的天然产物,因其具有显著的抗炎活性,而被广泛应用于类风湿性关节炎、慢性肾炎、红斑狼疮等疾病的治疗^[2],但是雷公藤能否抑制 IL-1 β 对软骨终板细胞的影响,目前尚缺乏相关研究报道。本研究主要通过体外培养小鼠软骨终板细胞,探讨雷公藤红素能否抑制 IL-1 β 介导的软骨终板细胞退变及其可能的作用机制,为椎间盘退变的临床治疗研究提供一个新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

雷公藤红素 (Sigma 公司, 美国); 重组人细胞因子 IL-1 β (Peprotech 公司, 美国); CCK-8 试剂盒 (凯基公司, 中国); TRIzol (Invitrogen 公司, 美国); 逆转录试剂盒及 SYBR Green Mixture (TaKaRa 公司, 日本); 小鼠 MMP-1、MMP-3 ELISA 试剂盒 (上海高创化学科技有限公司, 中国); 96 孔反应板 (ABI 公司, 美国); PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成 (蛋白多糖: Forward Primer 5'-TGATGCTGTATTGCCTGCACC-3' Reverse Primer 5'-CTACATGGTTGTCAGGAATGTGT-3'; II 型胶原:

Forward Primer 5'-TGGACGATCAGGCGAAACC-3' Reverse Primer 5'-GCTGCGGATGCTCTCAATCT-3'); PCR 反应仪器为 ABI 7500 型 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞的分离、培养: 颈椎脱臼法将小鼠处死后, 无菌条件下取下整个腰椎, 解剖显微镜下剥离包裹软骨组织的筋膜和肌肉显露椎间盘, 分离软骨终板, 经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 数次冲洗后剪碎, 再加入 0.2% 的 II 胶原酶 3 mL, 并移入消化瓶里, 37 °C 恒温消化 3 ~ 4 h, 待大部分细胞游离时, 经过滤、收集、离心、弃上清后加入完全培养基 (10% 胎牛血清、25 mmol/L HEPES、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素), 吹打、混匀制成单细胞悬液, 接种于 6 cm 培养皿中, 置于 37 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中孵育, 48 h 后更换培养液, 将未贴壁的细胞团块弃去, 之后每 48 h 更换 1 次培养液, 将该代细胞标记为 P0 代细胞, 当培养皿内细胞生长融合度达 80% 时传代, 取对数期生长的 P2 代细胞进行实验。

1.2.2 雷公藤红素对软骨终板细胞增殖的影响: 取无血清 DMEM 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium) 稀释细胞 (2×10^3 /mL) 接种于 96 孔板, 分别用含 0、0.1、0.25、0.5、1.0 μ mol/L 雷公藤红素的无血清 DMEM 处理细胞 24、48 h 和 72 h, 然后分别加入每孔 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 1.5 h 后, 以荧光分光光度仪检测每孔吸光值。将细胞存活率 > 70% 的实验组相对应的雷公藤红素浓度定为无细胞毒性浓度, 用于后续实验研究。

1.2.3 雷公藤红素对软骨终板细胞 MMP-1、MMP-3 蛋白表达的影响: 将 P2 代细胞按 2×10^5 /孔接种于 6 孔板, 实验分组为: 空白对照组 (无血清 DMEM 培养基); IL-1 β 诱导组 (IL-1 β 5 ng/mL 共同孵育 2 h); 雷公藤红素干预组 (经 IL-1 β 诱导后, 再以雷公藤红素共同孵育 24 h)。ELISA 法检测细胞上清液中 MMP-1、MMP-3 的水平。

1.2.4 雷公藤红素对软骨终板细胞的蛋白多糖、II 型胶原转录表达的影响: 将 P2 代细胞按 2×10^5 /孔接种于 6 孔板, 实验分组为: 空白对照组 (无血清 DMEM 培养基); IL-1 β 诱导组 (IL-1 β 5 模范 ng/mL 共同孵育 2 h); 雷公藤红素干预组 (经 IL-1 β 诱导

后,再以雷公藤红素共同孵育 24 h)。提取总 RNA, RT-qPCR 法测定软骨终板细胞蛋白多糖、II 型胶原 mRNA 的表达。

1.3 统计学处理

数据均以均数 ± 标准差表示,统计分析均采用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理分析,采用独立样本 *t* 检验或方差分析比较各组各项观察指标的统计差异,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤红素对软骨终板细胞增殖的影响

以不同浓度的雷公藤红素分别处理软骨终板细胞 24、48 h 及 72 h, 0.1 μmol/L 和 0.25 μmol/L 的雷公藤红素在各个时间点对软骨终板细胞增殖无明显抑制作用。但雷公藤红素 1.0 μmol/L 在 24 h、0.5 μmol/L 在 48 h 能明显抑制细胞增殖,表明大剂量雷公藤红素对软骨终板细胞有一定毒性作用。因此,本实验选用 0.25 μmol/L 作为进一步研究用剂量,以保证雷公藤红素对细胞增殖的影响最小(图 1)。

2.2 雷公藤红素对软骨终板细胞 MMP-1、MMP-3 蛋白表达的影响

以 5 ng/mL 的 IL-1β 刺激 2 h,再经过 0.25 μmol/L 雷公藤红素干预 24 h 后,以 ELISA 法检测 MMP-1 和 MMP-3 的蛋白表达水平(图 2)。结果显示,MMP-1、MMP-3 经过 IL-1β 刺激后明显升高,当雷公藤红素干预后,其水平明显下调,与空白对照组无明显差异。

2.3 雷公藤红素对软骨终板细胞的蛋白多糖、II 型

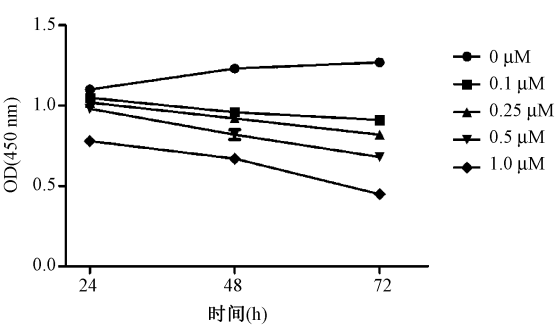


图 1 不同浓度雷公藤红素对软骨终板细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of celastrol on the proliferation of chondrocytes of the endplate

胶原转录表达的影响

以 5 ng/mL 的 IL-1β 刺激 2 h,再经过 0.25 μmol/L 雷公藤红素干预 24 h 后,以 RT-qPCR 检测蛋白多糖、II 型胶原 mRNA 表达水平(图 3)。结果发现,蛋白多糖、II 型胶原 mRNA 的表达随着 IL-1β 的刺激被显著抑制,当雷公藤红素干预 24 h 后,其 mRNA 水平明显被逆转。

3 讨论

椎间盘是由纤维环、髓核和软骨终板构成。软骨终板是椎间盘结构和功能的重要组成部分,也是椎间盘营养物质转运和代谢产物排泄的重要通道,具有维持椎间盘正常形态和结构、缓冲外界压力负荷的作用,因此,椎间盘软骨终板的退变是椎间盘退变的始发阶段,与多种复杂因素密切相关。

IL-1β 是由破骨细胞、软骨细胞等多种细胞分

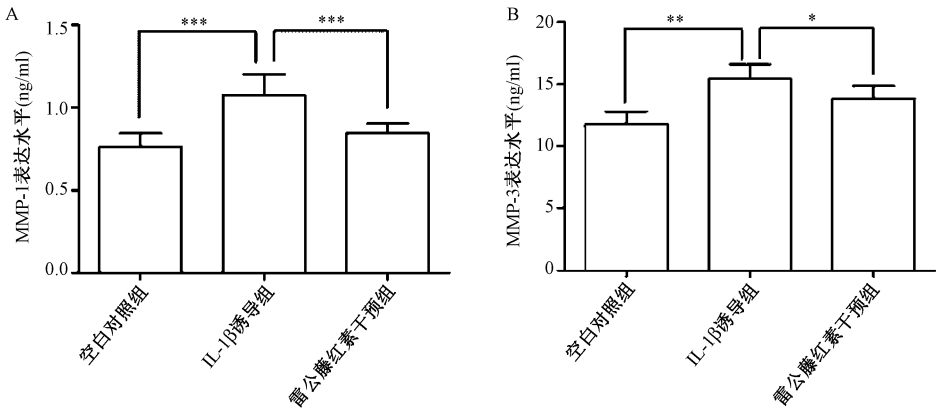


图 2 雷公藤红素对 MMP-1、MMP-3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of celastrol on the protein expression levels of MMP-1 and MMP-3
(* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001)

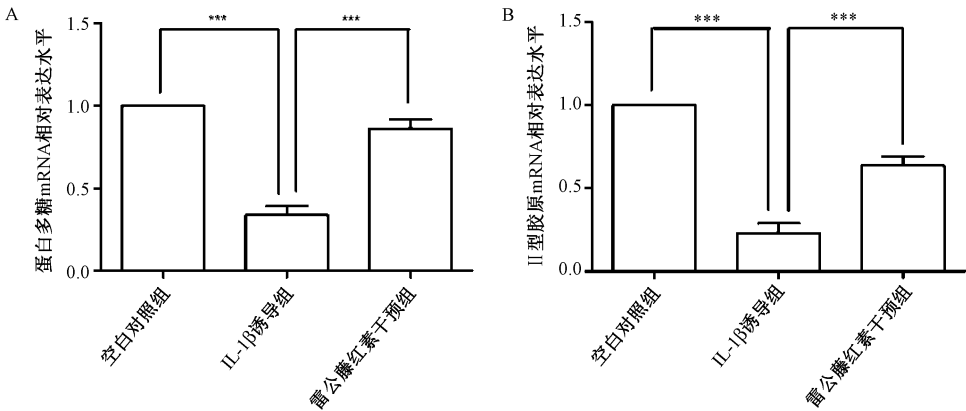


图3 雷公藤红素对蛋白多糖和Ⅱ型胶原的 mRNA 水平的影响
(*** $P < 0.001$)

Fig.3 Effects of celastrol on the mRNA expression levels of proteoglycan and type II collagen
(*** $P < 0.001$)

泌,退变软骨细胞 IL-1 β 异常高表达^[3]。IL-1 β 可通过促进 MMPs 和一氧化氮的合成来加速细胞退变,同时也可通过其他炎性介质来影响椎间盘细胞的继发性病理改变^[4]。蛋白多糖和Ⅱ型胶原是构成软骨终板细胞基质的主要成分。当软骨终板细胞发生退变后,二者表达降低,影响其细胞功能^[5]。金属蛋白酶(MMPs)主要参与细胞基质的代谢过程。先前的研究^[6]显示,IL-1 β 在诱导正常软骨终板细胞后,细胞蛋白多糖、Ⅱ胶原表达水平减少,MMP-1 及 MMP-3 的表达相应增多。本研究结果表明,在原代培养小鼠软骨终板细胞中,IL-1 β 可促进其细胞的 MMP-1 及 MMP-3 表达升高,并抑制蛋白多糖、Ⅱ胶原表达水平,这与上述研究结果相一致。

雷公藤红素来源于中药雷公藤的根皮之中,是雷公藤的一个单体小分子化合物。众多研究揭示雷公藤红素具有抗癌、抗炎、免疫抑制、抑制血管生成、诱导细胞凋亡等作用^[7]。先前研究^[8]表明,雷公藤红素可通过抑制 NF- κ B p65 蛋白表达、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 IL-1 β mRNA 表达,从而对大鼠结肠炎具有保护作用。有学者^[9]通过研究雷公藤红素对小鼠的免疫抑制作用及对细胞因子 IL-6 mRNA 表达的影响,得出的结论为雷公藤红素在一定程度上能抑制小鼠的免疫功能,能抑制炎症细胞因子 IL-6 基因的过度表达。有实验证实雷公藤红素对胶原性关节炎有治疗作用^[10]。另一研究^[11]显示,在 IL-1 β 刺激体外培养的人关节软骨细胞后,雷公藤红素能够明显抑制金属蛋白酶、诱导性一氧化氮等的产生和分泌,在一定程度上阻止关节软骨的退变。而软骨终板细胞是软骨

细胞的一类,其表型与关节软骨类似,因此,本研究通过体外培养原代软骨终板细胞以探讨雷公藤红素对 IL-1 β 介导的软骨终板细胞退变的抑制作用。结果发现,雷公藤红素可逆转 IL-1 β 对软骨终板细胞的效应,抑制 MMP-1 及 MMP-3 表达水平,并促进蛋白多糖、Ⅱ胶原表达水平,这表明雷公藤红素可有效抑制 IL-1 β 介导的软骨终板细胞退变。

综上所述,本研究证实了雷公藤红素可以有效抑制 IL-1 β 对软骨终板细胞的影响,可能在 IL- β 介导的椎间盘软骨终板退变中发挥阻断作用,为治疗椎间盘退变性疾病提供新的方法和思路。

【 参 考 文 献 】

[1] Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. Osteoarthritis Cartilage,2016, 24 (2) :206-212.

[2] Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, et al. Celastrol: Molecular targets of thunder god vine. Biochem Biophys Res Commun,2010, 394(3) :439-442.

[3] Phillips KL, Jordan-Mahy N, Nicklin MJ, et al. Interleukin-1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. Ann Rheum Dis,2013, 72(11) :1860-1867.

[4] Ortvad KF, Austin BS, Scimeca MS, et al. RNA interference mediated interleukin-1 β silencing in inflamed chondrocytes decreases target and downstream catabolic responses. Arthritis, 2016,2016(1) :1-11.

[5] Bessueille L, Fakhry M, Hamade E, et al. Glucose stimulates chondrocyte differentiation of vascular smooth muscle cells and calcification; A possible role for IL-1 β . FEBS Lett,2015, 589 (19 Pt B) :2797-2804.

Foreign Medical (Endocrinology branch), 2003, 23 (2): 111. (in Chinese)

[2] 刘雷,塔拉,杨红云,等. 骨质疏松症中医体质与辨证分型的相关性研究——附 300 例临床分析. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19 (10): 92-96.

Liu L, Ta L, Yang HY, et al. Study on the correlation between TCM physique and syndrome differentiation of osteoporosis, a clinical analysis of 300 cases. Chin J Osteoporosis, 2013, 19 (10): 92-96. (in Chinese)

[3] 张智海,刘忠厚,李娜,等. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014 版). 中国骨质疏松杂志, 2014, 20 (9): 1007-1010.

Zhang Zhi, Liu ZH, Li Na, et al. Expert consensus on diagnosis of osteoporosis in China (third draft, 2014 edition). Chin J Osteoporosis, 2014, 20 (9): 1007-1010. (in Chinese)

[4] 张军喜,王世界,杨金虎. 实用骨外科治疗学. 北京: 科学技术文献出版社, 2014: 776-778.

Zhang JX. Practical osteotherapy. Beijing: Science and Technology Literature Press, 2014: 767-778. (in Chinese)

[5] 肖强,李小飞,刘静莉,等. 鲑鱼降钙素联合钙剂治疗老年骨质疏松症临床效果分析. 江西医药, 2007, 42 (5): 421-422.

Xiao Q, Li XF, Liu JL, et al. Analysis of the clinical effects of combined calcium and calcium calcium in treating senile osteoporosis. Jiangxi Medicine, 2007, 42 (5): 421-422. (in Chinese)

[6] Lyritis GP, Trovas G. Abirritation of salmoncalcitonin. Bone, 2002, 30 (5): 71-74.

[7] 杨惠光,唐天驷,李忠泽,等. 鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松症的临床研究. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14 (10): 751-753.

Yang HG, Tang TS, Li ZZ, et al. Clinical study on the treatment of osteoporosis in elderly patients. Chin J Osteoporosis, 2008, 14 (10): 751-753. (in Chinese)

[8] 陈红霞,李双蕾,陈文辉. “骨肉不相亲”与骨质疏松症关系的探讨. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22 (6): 781-785, 790.

Chen HX, Li SL, Chen WH. Discussion on the relationship between bone meat and osteoporosis. Chin J Osteoporosis, 2016, 22 (6): 781-785, 790. (in Chinese)

[9] 黄宏兴,吴青,李跃华等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22 (10): 1221-1229, 1236.

Huang HX, Wu Q, Li YH, et al. Expert consensus on muscle, bone and osteoporosis. Chin J Osteoporosis, 2016, 22 (10): 1221-1229, 1236. (in Chinese)

[10] Liu BX, Wang LP. Small needle knife therapy over 80 osteoporotic spinal fractures the curative effect of patients with low back pain. The Chinese Elderly Medical Journal, 2011, 31 (10): 3811-3812.

[11] 梁健. 小针刀疗法干预治疗老年性骨质疏松症的疗效观察. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19 (11): 1174-1176.

Liang J. Observation on the curative effect of small needle-knife therapy in treating senile osteoporosis. Chin J Osteoporosis, 2013, 19 (11): 1174-1176. (in Chinese)

[12] 田和炳,李兴勇,蒋晓明,等. 小针刀治疗重症老年性骨质疏松症腰背痛 120 例临床研究. 四川中医, 2013, (10): 66-70.

Tian HB, Li XY, Jiang XM, et al. Clinical study on the treatment of 120 cases of elderly osteoporosis with small needle-knife. Sichuan Traditional Medicine, 2013, 31 (10): 66-70. (in Chinese)

[13] 刘保新,王力平,徐敏,等. 三种治疗方法治疗骨质疏松患者腰背抽掣样疼痛的比较. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15 (10): 769-772.

Liu BX, Wang LP, Xu M, et al. Three treatment methods to treat the comparison of lumbar back twitch pain in patients with osteoporosis. Chin J Osteoporosis, 2009, 15 (10): 769-772. (in Chinese)

(收稿日期: 2017-04-07, 修回日期: 2017-07-24)

(上接第 1632 页)

[6] Rutges JP, Nikkels PG, Oner FC, et al. The presence of extracellular matrix degrading metalloproteinases during fetal development of the intervertebral disc. Eur Spine J, 2010, 19 (8): 1340-1346.

[7] Hu Y, Wang S, Wu X, et al. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma. J Ethnopharmacol, 2013, 149 (3): 601-612.

[8] 周堃,吴叔明,陈晓宇,等. 雷公藤红素对三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的保护作用. 胃肠病学, 2007, 12 (3): 4.

Zhou J, Wu SM, Chen XY. Protective effects of tripterine on rat colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. Gastroenterology, 2007, 12 (3): 4. (in Chinese)

[9] 李孟秋,窦洁,杜伟,等. 雷公藤红素对小鼠的免疫抑制作用及其对 IL-6 mRNA 表达影响的研究. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13 (2): 158-163.

Zhou MQ, Dou J, Du W. Effects of tripterine on the immunosuppression action and expression of IL-6 mRNA in mice. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008, 13 (2): 158-163. (in Chinese)

[10] 力弘,贾永锋,潘雁,等. 雷公藤红素对胶原性关节炎的作用. 中国药理学报, 1997, 18 (3): 273.

Li H, Jia YF, Pan Y, et al. Effect of tripterine on collagen-induced arthritis in rats. Acta Pharmacologica Sinica, 1997, 18 (3): 273. (in Chinese)

[11] 冯小可,谈文峰,王芳,等. 雷公藤红素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中 RANKL、OPG 及炎性因子表达的影响. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33 (6): 759-765.

Feng XK, Tan WF, Wang F, et al. The effect of celastrol on the expressions of RANKL, OPG, IL-6, THF- α and IL-8 in human rheumatoid synovial cell MH7A. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science), 2013, 33 (6): 759-765. (in Chinese)

(收稿日期: 2017-08-17, 修回日期: 2017-09-06)