

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.11.003 [http://www.crter.org]

张业勇, 程文丹, 陈哲峰, 范卫民, 刘锋. 人参皂苷 Rg1 对软骨细胞 II 型胶原表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(11):1917-1924.

人参皂苷Rg1对软骨细胞 II 型胶原表达的影响★

张业勇, 程文丹, 陈哲峰, 范卫民, 刘 锋

南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏省南京市 210029

文章亮点:

- 1 骨关节炎早期缺乏有效的特异性治疗药物, 实验从中国传统的中药人参入手, 探索人参的主要成分之一人参皂苷 Rg1 在延缓骨关节炎软骨病变发展中的作用。
- 2 通过反转录 PCT 证实, 一定浓度的人参皂苷 Rg1 可以拮抗白细胞介素 1 β 引起的人软骨细胞中 II 型胶原的 mRNA 表达的降低和环氧合酶 2 mRNA 表达的升高。
- 3 观察中药单体人参皂苷 Rg1 对白细胞介素 1 β 诱导的骨关节炎模型, 证实一定浓度的人参皂苷 Rg1 可以拮抗白细胞介素 1 β 引起的人软骨细胞中 II 型胶原的 mRNA 表达的降低和环氧合酶 2 mRNA 表达的升高。
- 4 实验的创新之处在于从细胞层面上说明了人参皂苷 Rg1 对人软骨细胞的作用。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 人参皂苷 Rg1; II 型胶原; 环氧合酶 2; 软骨细胞; 白细胞介素 1 β ; 反转录聚合酶链反应; 骨关节炎; CCK-8; 组织构建图片文章

摘要

背景: 人参是具有抗炎、抗应激、调节免疫等广泛药理学活性的中草药, 其主要药理活性成分是人参皂苷, 而 Rg1 是含量较多的活性成分。

目的: 探讨人参皂苷 Rg1 对白细胞介素 1 β 诱导的人骨关节炎模型中软骨细胞 II 型胶原及环氧合酶 2 mRNA 表达的影响。

方法: 取因骨关节炎接受全膝关节置换患者的膝关节软骨进行体外培养, 取第 2 代体外培养的软骨细胞, CCK-8 检测 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L 人参皂苷 Rg1 对软骨细胞增殖率的影响。再将第 2 代体外培养的关节软骨细胞, 随机分为空白组、对照组和实验组, 分别加入 DMEM 培养液、10 μ g/L 白细胞介素 1 β , 10 μ g/L 白细胞介素 1 β +0.1, 1, 10, 100 mg/L 人参皂苷 Rg1, 培养 24 h 后反转录 PCR 检测各组细胞中 II 型胶原和环氧合酶 2 mRNA 的表达。

结果与结论: 与对照组相比, 人参皂苷 Rg1 质量浓度为 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/L 时促进软骨细胞的增殖作用不明显, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 当人参皂苷 Rg1 质量浓度为 10, 100 mg/L 时, 促进软骨细胞的增殖作用明显($P < 0.05$)。与空白组相比, 对照组的软骨细胞 II 型胶原的 mRNA 表达明显下降, 而环氧合酶 2 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$); 与对照组相比, 联合加入人参皂苷 Rg1 质量浓度为 0.1 和 1 mg/L 时, 人软骨细胞中 II 型胶原和环氧合酶 2 mRNA 表达没有明显变化($P > 0.05$); 而联合加入人参皂苷 Rg1 质量浓度为 10 和 100 mg/L 时, 人软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 表达增加, 而环氧合酶 2 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。说明一定浓度的人参皂苷 Rg1 可以拮抗白细胞介素 1 β 引起的人软骨细胞中 II 型胶原的 mRNA 表达的降低和环氧合酶 2 mRNA 表达的升高。

张业勇★, 男, 1987 年生, 山东省济南市人, 汉族, 2010 年辽宁医学院毕业, 硕士, 主要从事骨关节炎的机制与预防方面的研究。
402321300@qq.com

通讯作者: 刘锋, 博士, 副教授, 硕士生导师, 南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏省南京市 210029
njliuf@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)11-01917-08

收稿日期: 2012-12-08
修回日期: 2012-12-29
(20121114002/YJ·W)

Effect of ginsenoside Rg1 on type II collagen expression in chondrocytes

Zhang Ye-yong, Cheng Wen-dan, Chen Zhe-feng, Fan Wei-min, Liu Feng

Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Zhang Ye-yong★, Master,
Department of Orthopedics,
First Affiliated Hospital of
Nanjing Medical University,
Nanjing 210029, Jiangsu
Province, China
402321300@qq.com

Corresponding author: Liu
Feng, Doctor, Associate
professor, Master's supervisor,
Department of Orthopedics,
First Affiliated Hospital of
Nanjing Medical University,
Nanjing 210029, Jiangsu
Province, China
njliuf@hotmail.com

Received: 2012-12-08

Accepted: 2012-12-29

Abstract

BACKGROUND: Ginseng has a wide range of pharmacological activities, such as anti-inflammatory, anti-stress, and immunomodulatory roles. Its major pharmacological active ingredient is the ginsenoside, and Rg1 is an active ingredient with a higher content.

OBJECTIVE: To investigate the effect of ginsenoside Rg1 on type II collagen and cyclooxygenase-2 mRNA expression in chondrocytes of an interleukin-1 β -induced osteoarthritis model.

METHODS: Undamaged cartilage from osteoarthritis patients undergoing total knee arthroplasty was harvested and cultured. The effect of ginsenoside Rg1 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L) on proliferation rate of passage 2 chondrocytes was analyzed by Cell Counting Kit-8. Then the passage 2 chondrocytes were divided into blank group, control group and experimental group randomly. Dulbecco's modified Eagle's medium was added into the blank group alone. Interleukin-1 β at a dose of 10 μ g/L was added into the control group to establish an osteoarthritis model. While 10 μ g/L interleukin-1 β and ginsenoside Rg1 with different concentrations (0.1, 1, 10, 100 mg/L) were added into the experimental group concomitantly. After 24-hour *in vitro* culture, the expressions of type II collagen and cyclooxygenase-2 gene in human articular chondrocytes were analyzed by reverse transcription-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Promotive effect of the certain concentration of ginsenoside Rg1 on chondrocyte proliferation was observed by the result of cell counting kit-8 analysis. However, compared with the blank control group, the lower concentration of ginsenoside Rg1 (0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/L) could not stimulate the proliferation rate of chondrocytes significantly ($P > 0.05$); only the higher concentration of ginsenoside Rg1 (10 and 100 mg/L) could stimulate the proliferation rate of chondrocytes significantly ($P < 0.05$). From the results of cell counting kit-8 analysis, compared with the blank group, the type II collagen mRNA expression significantly decreased and cyclooxygenase-2 mRNA expression significantly increased in chondrocytes of the control group ($P < 0.05$). When 10 μ g/L interleukin-1 β and ginsenoside Rg1 of different concentrations (0.1 and 1 mg/L) were added concomitantly in the experimental group, the type II collagen and cyclooxygenase-2 mRNA expression had no obvious changes compared with the control group ($P > 0.05$). Meanwhile, when 10 μ g/L interleukin-1 β and ginsenoside Rg1 of different concentrations (10, 100 mg/L) were added concomitantly in the experimental group, the type II collagen mRNA expression significantly increased and cyclooxygenase-2 mRNA expression significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$). These findings showed that interleukin-1 β induced decreased mRNA expression of type II collagen and increased mRNA expression of cyclooxygenase-2 could be antagonized by somewhat concentration of ginsenoside Rg1.

Key Words: tissue construction; cartilage tissue construction; ginsenoside Rg1; type II collagen; cyclooxygenase-2; chondrocytes; interleukin-1 beta; reverse transcription-PCR; osteoarthritis; Cell Counting Kit-8; tissue construction photographs-containing paper

Zhang YY, Cheng WD, Chen ZF, Fan WM, Liu F. Effect of ginsenoside Rg1 on type II collagen expression in chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(11): 1917-1924.

0 引言

骨关节炎是一种以局限性、进行性关节软骨破坏及关节边缘骨赘形成为特征, 由多病因引起的退行性关节疾病。骨关节炎是引起中老年人关节疼痛的最常见原因, 严重影响中老年人的生活质量^[1]。骨关节炎的病理生理机制尚不完全明确, 目前也没有彻底治愈的方法, 且因发病早期缺乏有效的特异性治疗药物, 晚期患者往往因症状严重而只得接受人工关节置换。

在骨关节炎的发病过程中, 由软骨细胞和滑膜细胞产生的前炎症因子白细胞介素1 β 是重要的驱动因子, 在骨关节炎发病过程中处于核心地位^[2], 可以抑制软骨特异性细胞外基质主要成分 II 型胶原的合成, 激活炎症递质, 激活环氧合酶2, 从而导致关节疼痛和滑膜炎^[3]。

在中国传统医学中, 人参一直是许多中药方剂的重要成分, 具有大补元气, 滋补强壮, 安神益智, 生津, 复脉固脱等功效, 现代医学普遍认为其是一种具有抗炎、抗应激、调节

免疫等广泛的药理学活性的草药, 对中枢神经系统、心血管系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统、泌尿生殖系统有广泛的作用, 可提高人体力、智力的活动能力, 增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力^[4-15]。

人参的主要药理活性成分是人参皂苷, 在30多种人参皂苷中, Rg1是含量较多的活性成分, 是一种四环三萜类衍生物。人参皂苷Rg1具有促进海马神经发生、提高神经可塑性、增强学习、记忆力、抗衰老、抗疲劳、提高免疫力、辅助抗肿瘤、修复性功能等作用^[16]。

研究证实, 人参皂苷Rg1已被证明可以延缓小鼠衰老的造血干细胞^[17], 也可以诱导骨髓干细胞分化, 也可促进兔心肌梗死后血管内皮细胞的再生^[18]。Fang等^[19]发现Rg1对阿尔茨海默症模型小鼠具有多方面神经保护作用。Du等^[20]证实在成骨细胞中人参皂苷Rg1不仅能够有效缓解急性和慢性炎症, 且相比地塞米松不良反应更小。吕振超等^[21]则在体外实验中发现人参皂苷Rg1抑制了软骨细胞凋亡, 有效预防了骨关节炎的发展, 具有类细胞因子的作用。而Kim等^[22]则报道了人参的另一种有效成分Rb1可以降低炎症因子的合成发挥抗胶原诱导的骨关节炎的作用。然而在体外实验方面, 对于人参皂苷Rg1对人的软骨细胞的作用, 尚未发现有关的报道。

实验拟通过体外培养人骨关节软骨细胞, 观察中药单体人参皂苷Rg1对白细胞介素1 β 诱导的骨关节炎模型中关节软骨细胞中II型胶原及环氧合酶2 mRNA表达的影响, 初步探索人参皂苷Rg1治疗骨关节炎的作用。

1 材料和方法

设计: 细胞和分子水平体外研究。

时间及地点: 于2011年3月至2012年6月在江苏省人民医院中心实验室完成。

材料:

组织: 关节软骨标本取自于10例接受全膝关节置换的女性骨关节炎患者, 平均年龄(64.5 $\pm$ 6.3)岁, 实验获得患者及家属知情同意, 并经南京医科大学伦理委员会批准。

药物: 人参皂苷Rg1的化学式为C₄₂H₇₂O₁₄, 化学结构式见图1, 由中国药品生物制剂检定所提供。

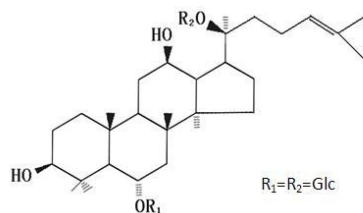


图1 人参皂苷 Rg1 的化学结构式

Figure 1 The chemical Structure of ginsenoside Rg1

分析人参皂苷Rg1对软骨细胞作用的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments for analyzing the effect of ginsenoside Rg1 on chondrocytes:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	美国 GIBCO 公司
PBS; 胰蛋白酶; 高糖 DMEM 培养液; II 型胶原酶; 谷氨酰胺; 白细胞介素 1 β ;	美国 SIGMA 公司
高速冷冻离心机	
Taq DNA 聚合酶	cASARRAY 公司
RNA 酶抑制剂及 Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
DNA 反转录试剂盒	Fermentas 公司
CKK-8 试剂	日本同仁公司
超净工作台	Queue 公司
倒置显微镜及照相系统	日本 Olympus 公司
酶标仪(MultiskanMK3)	美国 Thermo 公司
二氧化碳培养箱(3000T)	REVC0 公司
PCR 循环仪(PTC-220 型)	美国 DYAD 公司
紫外分光光度计; 核酸电泳仪(Gel Doc2000 型); 凝胶成像仪(Gel Doc2000 型)	美国 BioRad 公司

方法:

人软骨细胞分离、原代及传代培养: 根据Cheng等^[23]报道的方法, 切取膝关节置换患者股骨内外侧髁及胫骨平台未磨损的关节软骨, 无菌PBS冲洗3遍, 置入含20%青链霉素双抗PBS中浸泡20 min, 移除液体后将其切成1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm大小, 放入无菌培养皿中, 加入0.05% II型胶原酶, 置于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5%CO₂的温箱中消化1 h, 每隔20 min吹打1次, 然后小心吸出消化液; 再加入2% II型胶原酶置于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5%CO₂的温箱中消化12 h。12 h后用200目过滤网过滤, 1 500 r/min离心5 min, 共离心3次。然后加入含10%高糖的DMEM培养液, 调节细胞浓度至1 $\times$ 10⁹ L⁻¹, 转入10 mL培养瓶中, 置于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5%CO₂的温箱中进行原代细胞培养。待其融合后, 予0.25%胰酶消化传代培养。每48 h换液。

CCK-8检测人参皂苷Rg1的对软骨细胞增殖率的影响: 取原代软骨细胞, 消化、吹打后, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 接种于96孔板, 每孔加入100 μL , 置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 的温箱中培养24 h; 移除96孔板中培养液, 更换为不含血清的DMEM培养液, 置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 的温箱中培养24 h。移除96孔板中无血清DMEM培养液, 随机分为空白对照组和实验组, 空白对照组加入无血清DMEM培养液, 实验组分别加入无血清DMEM培养液作为溶剂配制不同质量浓度的人参皂苷Rg1 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L) 100 μL /孔, 然后将细胞培养于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 的温箱中24 h。根据CCK-8说明书, 实验终止前2 h每孔加入CKK-8试剂10 μL , 培养结束时以酶标仪检测吸光度(A_{450} 值), 按公式计算细胞增殖率, 检测人参皂苷Rg1对软骨细胞增殖的影响。重复操作3次。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{[(\text{实验组平均 } A_{450} \text{ 值} - \text{对照组平均 } A_{450} \text{ 值}) / \text{对照组平均 } A_{450} \text{ 值}] \times 100\%}{}$$

反转录PCR检测白细胞介素1 β 和人参皂苷Rg1对关节软骨细胞II型胶原及环氧合酶2 mRNA的表达: 取培养第2代关节软骨细胞, 待其基本融合后, 移除原培养液, 加入不含血清的DMEM培养液5 mL培养12 h。随机分为空白组仅加入5 mL不含血清的DMEM培养液, 对照组加入5 mL含有10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素1 β 的DMEM培养液, 实验组加入5 mL含有10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素1 β 及0.1, 1, 10, 100 mg/L人参皂苷Rg1的DMEM培养液, 共培养24 h。II型胶原、环氧合酶2及内参 β -actin 引物由上海生工生物工程有限公司代为合成。

引物序列:

Primer sequences:

引物	序列	产物长度(bp)
II型胶原	上游: 5'- TTC AGC TAT GGA GAT GAC AATC -3'	472
	下游: 5'-AGA GTC CTA GAG TGA CTG AG-3'	
环氧合酶2	上游: 5'- CTT ACA ATG CTG ACT ATG GCT AC -3'	242
	下游: 5'- AAA CTG ATG CGT GAA GTG CTG -3'	
β -actin	上游: 5'-CGG GAAATC GTG CGT GAC -3'	443
	下游: 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G -3'	

按 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒说明书操作, 提取总 RNA, 然后再根据反转录 PCR 说明书进行操作, II型胶原反应条件: 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s

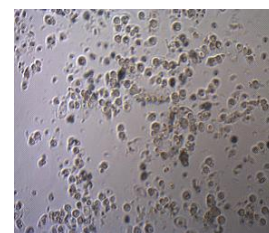
和 72 $^{\circ}\text{C}$ 35 s(32 个循环); 环氧合酶 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 35 s (32 个循环); β -actin 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 35 s(32 个循环)。内参和目的片段 PCR 产物各取 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR Marker 作分子量标准, 在紫外灯下观察照相, 并进行凝胶图像分析。mRNA 相对含量以目的片段和内参的 PCR 产物的吸光度比值表示。实验重复 3 次。

主要观察指标: 软骨细胞增殖和 II 型胶原及环氧合酶 2mRNA 表达。

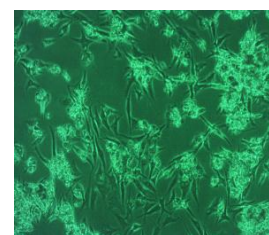
统计学分析: 数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

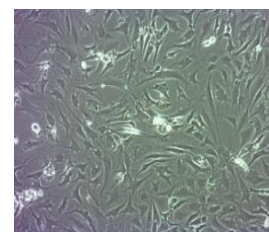
2.1 人关节软骨细胞的培养 见图 2。



A: 原代培养 4 d



B: 原代培养 11 d



C: 第 2 代人关节软骨细胞

注: 第 2 代软骨细胞与原代软骨细胞形态相似, 但形状不规则细胞数量增加

图 2 人关节软骨细胞形态($\times 100$)

Figure 2 Morphology of human chondrocytes ($\times 100$)

原代软骨细胞呈大小均一的折光性较强的球形, 24 h 后贴壁生长, 细胞接种 4 d 后, 外形呈椭圆形、三角形或多边形。10–14 d 后基本融合, 平铺成多角形, 第 2 代软骨细胞类似于原代, 但形状不规则细胞明显增多, 见图 2。

2.2 人参皂苷 Rg1 对正常软骨细胞增殖的影响 见表 1, 图 3。

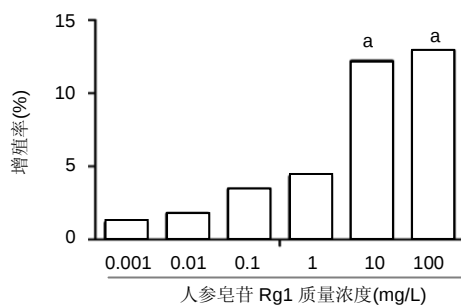
表 1 人关节软骨细胞加入不同浓度的人参皂苷 Rg1 培养 24 h 后的细胞增殖率的变化

Table 1 Changes in proliferation rate of human articular chondrocytes cultured in different concentrations of ginsenoside Rg1 for 24 h

组别	吸光度值($\bar{x} \pm s$)	增殖率(%)
空白对照组	0.788 $\pm$ 0.019	
人参皂苷 Rg1 质量浓度(mg/L)		
0.001	0.797 $\pm$ 0.044	1.14
0.01	0.802 $\pm$ 0.047	1.77
0.1	0.815 $\pm$ 0.046	3.43
1	0.822 $\pm$ 0.039	4.31
10	0.884 $\pm$ 0.057	12.2 ^a
100	0.890 $\pm$ 0.022	12.9 ^a

与 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/L 人参皂苷 Rg1 比, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析)。

注: 细胞增殖率 (%) = [(实验组平均 A_{450} 值 - 空白对照组平均 A_{450} 值) / 空白对照组平均 A_{450} 值] $\times 100\%$ 。结果显示, 当人参皂苷 Rg1 质量浓度为 10, 100 mg/L 时, 促进软骨细胞的增殖作用明显。



与 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/L 人参皂苷 Rg1 比, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析)。

注: 细胞增殖率 (%) = [(实验组平均 A_{450} 值 - 空白对照组平均 A_{450} 值) / 空白对照组平均 A_{450} 值] $\times 100\%$ 。结果显示, 当人参皂苷 Rg1 质量浓度为 10, 100 mg/L 时, 促进软骨细胞的增殖作用明显。

图 3 不同质量浓度的人参皂苷 Rg1 对人关节软骨细胞增殖率的影响

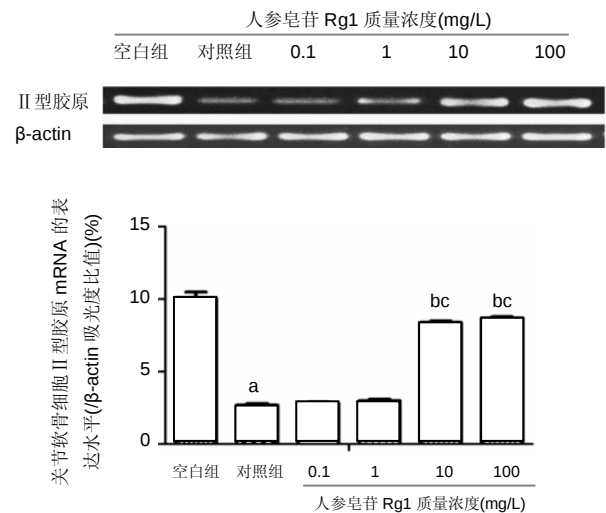
Figure 3 Effects of different concentrations of ginsenoside Rg1 on the proliferation rate of human articular chondrocytes

人关节软骨细胞给予不同质量浓度的人参皂苷

Rg1(0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L)100 μ L/孔培养 24 h, CCK-8 染色结果显示, 不同质量浓度人参皂苷 Rg1 对软骨细胞增殖均有一定促进作用($F=6.144$, $P < 0.05$)。但与对照组相比, 人参皂苷 Rg1 质量浓度为 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/L 时促进软骨细胞的增殖作用不明显, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。当人参皂苷 Rg1 质量浓度为 10, 100 mg/L 时, 促进软骨细胞的增殖作用明显, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 人参皂苷 Rg1 对白细胞介素 1 β 诱导的人骨关节炎模型中软骨细胞 II 型胶原及环氧合酶 2 mRNA 表达的影响

反转录 PCR 结果显示, 24 h 后, 各组软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 表达的差异有显著性意义($F=1028.143$, $P < 0.05$)。空白组软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 的相对表达量为 1.01 ± 0.04 , 而单纯加入白细胞介素 1 β 的对照组中人软骨细胞 II 型胶原 mRNA 的相对表达量下降至空白组的 1/4, 为 0.27 ± 0.01 , 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图 4。



与空白组比, ^a $P < 0.05$; 与对照组, 0.1, 1 mg/L 人参皂苷 Rg1 组比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析)。

注: II 型胶原和 β -actin 条带大小分别为 472, 443 bp。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 设定关节软骨细胞 II 型胶原 mRNA 的表达水平为 1.0。

图 4 人参皂苷 Rg1 对白细胞介素 1 β 诱导的关节软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 表达的影响

Figure 4 Type II collagen mRNA expression in interleukin-1 β -induced chondrocytes cultured with ginsenoside Rg1

与对照组相比, 而联合加入 0.1 和 1 mg/L 人参皂苷 Rg1 时, 人软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 的表达没有明

显变化($P > 0.05$); 随着联合加入人参皂苷Rg1质量浓度的升高, 当人参皂苷Rg1质量浓度为10和100 mg/L时, 人软骨细胞中II型胶原mRNA的表达明显受到抑制($P < 0.05$)。且10和100 mg/L人参皂苷Rg1干预的人软骨细胞中II型胶原mRNA的表达明显高于0.1, 1 mg/L人参皂苷Rg1干预的细胞($P < 0.05$), 说明Rg1质量浓度越高, 对人关节软骨细胞的增殖促进作用越明显。但是10和100 mg/L人参皂苷Rg1干预的人软骨细胞中II型胶原mRNA的表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 说明Rg1质量浓度的升高到一定程度后, 增加Rg1质量浓度对人关节软骨细胞的增殖促进作用不明显, 见图4, 表2。

表2 人参皂苷 Rg1 干预白细胞介素 1 β 诱导的关节软骨细胞中 II 型胶原 mRNA 表达水平

Table 2 Type II collagen mRNA expression in interleukin-1 beta-induced articular chondrocytes cultured with ginsenoside Rg1 ($\bar{x} \pm s$, / β -actin 吸光度比值)

组别	II 型胶原 mRNA 的表达水平
空白组	1.01 $\pm$ 0.04
对照组(加白细胞介素 1 β)	0.27 $\pm$ 0.01
人参皂苷 Rg1 质量浓度(mg/L)	
0.1	0.28 $\pm$ 0.01
1	0.30 $\pm$ 0.01
10	0.84 $\pm$ 0.01
100	0.87 $\pm$ 0.01

注: 目标 mRNA 的相对表达量以目的片段和内参的吸光度比值表示。结果说明随着联合加入的人参皂苷质量浓度增高, 对人关节软骨细胞促增殖作用越明显, 但升高到 10 mg/L 后, 促增殖作用不明显。

反转录PCR结果见表3。

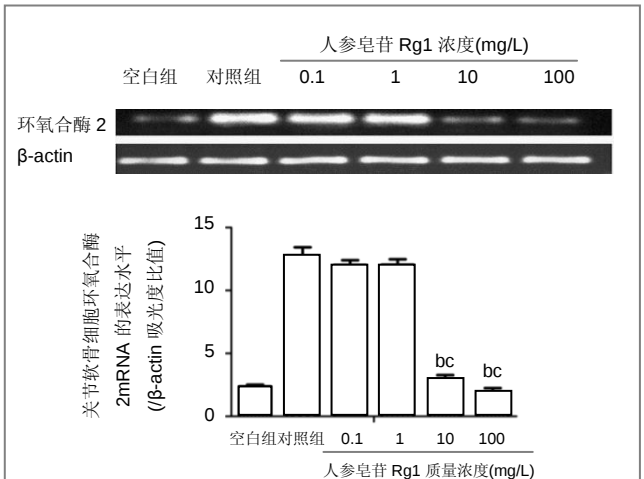
表3 人参皂苷 Rg1 干预白细胞介素 1 β 诱导的关节软骨细胞中环氧合酶 2 mRNA 表达水平

Table 3 Cyclooxygenase-2 mRNA expression in interleukin-1beta- induced chondrocytes cultured with ginsenoside Rg1 ($\bar{x} \pm s$, / β -actin 吸光度比值)

组别	环氧合酶 2 mRNA 的表达水平
空白组	0.23 $\pm$ 0.01
对照组(加白细胞介素 1 β)	1.27 $\pm$ 0.07
人参皂苷 Rg1 质量浓度(mg/L)	
0.1	1.20 $\pm$ 0.04
1	1.20 $\pm$ 0.05
10	0.28 $\pm$ 0.05
100	0.19 $\pm$ 0.03

注: 目标 mRNA 的相对表达量以目的片段和内参的吸光度比值表示。结果显示白细胞介素 1 β 能显著升高细胞中环氧合酶 2 mRNA 表达水平, 联合加入 10, 100 mg/L 人参皂苷 Rg1 能抑制其高表达。

24 h后, 各组软骨细胞中环氧合酶2mRNA表达的差异有显著性意义($F=450.063$, $P < 0.01$)。单纯加入白细胞介素1 β 组细胞中环氧合酶2 mRNA表达水平较空白组升高5倍多($P < 0.05$)。与单纯加入白细胞介素1 β 组相比, 而联合加入Rg1 0.1 mg/L和1 mg/L时, 细胞中环氧合酶2 mRNA表达水平没有明显变化($P > 0.05$); 当Rg1质量浓度升高至10 mg/L和100 mg/L时, 细胞中环氧合酶2 mRNA表达水平受到明显抑制($P < 0.05$), 见表3, 图5。



与空白组比, ^a $P < 0.05$; 与对照组, 0.1, 1 mg/L 人参皂苷 Rg1 组比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析)。

注: 环氧合酶 2 和 β -actin 条带大小分别为 242, 443 bp。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 设定关节软骨细胞环氧合酶 2 mRNA 的表达水平为 1.0。

结果显示白细胞介素 1 β 能显著升高细胞中环氧合酶 2 mRNA 表达水平, 联合加入 10, 100 mg/L 人参皂苷 Rg1 能抑制其高表达。

图5 人参皂苷 Rg1 对白细胞介素 1 β 诱导的关节软骨细胞中环氧合酶 2 mRNA 表达的影响

Figure 5 Cyclooxygenase-2 mRNA expression in interleukin-1beta-induced chondrocytes cultured with ginsenoside Rg1

3 讨论

骨关节炎是一种以关节软骨基质破坏为特征的局限性、进行性关节软骨破坏及关节边缘骨赘形成为特征, 多病因引起的退行性关节病。关节软骨是由高度分化的软骨细胞和细胞外基质构成的, 细胞外基质为软骨细胞提供增殖、分化和生存的环境, II型胶原为细胞外基质的主要成分之一, II型胶原的丢失会导致软骨细胞的死亡和软骨的退变^[24]。目前众多研究发现细胞因子在骨关节炎发病中起着重要作用, 这些细胞

因子主要分为3类^[25]: ①致炎性细胞因子, 如白细胞介素1可通过作用于靶细胞产生活性物质, 从而引起关节炎症和软骨基质降解。②抗炎性细胞因子, 如白细胞介素4, 10具有抑制或拮抗致炎性细胞因子的作用。③合成性细胞因子, 如胰岛素样生长因子1等可作用于软骨细胞, 促进软骨基质合成。在骨关节炎的发病过程中, 由激活的软骨细胞和滑膜细胞产生的前炎症因子白细胞介素1 β 是重要的驱动因子, 它不仅能抑制软骨细胞II型胶原的表达, 还能够诱导基质金属蛋白酶的合成与分泌, 从而导致细胞外基质的降解, 破坏关节软骨, 从而导致骨关节炎的发生, 它的抑制作用可以明显减轻骨关节炎动物模型的病理特征^[26-27]。另外, 白细胞介素1 β 基因敲除后的小鼠骨关节炎动物模型的病变程度明显比未敲除的轻, 进一步说明了其在骨关节炎病理发展过程中的所起的重要作用^[26-27]。

实验发现, 白细胞介素1 β 作用24 h后, 软骨细胞II型胶原mRNA表达明显减少, 而联合加入人参皂苷Rg1, 随着其浓度的增加, 被白细胞介素1 β 抑制的II型胶原mRNA表达逐渐增加, 说明一定浓度的人参皂苷Rg1能抑制由白细胞介素1 β 诱导的II型胶原mRNA表达的降低, 对关节软骨细胞起到保护作用。

由白细胞介素1 β 刺激产生的环氧合酶2是引起骨关节炎中重要的疼痛和炎症递质, 环氧合酶2能催化花生四烯酸产生前列腺素E2, 前列腺素E2能增加外周感受器对痛觉的敏感度引起骨关节炎的疼痛症状^[23]。非类固醇抗炎药通过减少环氧合酶2和前列腺素E2的生成发挥抗炎镇痛的效果^[28]。实验发现白细胞介素1 β 作用24 h后, 软骨细胞环氧合酶2 mRNA表达明显增加, 加入人参皂苷Rg1后, 随着其质量浓度的增加, 环氧合酶2 mRNA的表达逐渐降低, 说明人参皂苷Rg1是一种有效的环氧合酶2抑制剂。

文章结果证实了人参皂苷Rg1体外能够有效作用于人骨关节炎患者关节软骨细胞, 抑制白细胞介素1 β 引起的II型胶原mRNA表达的降低及炎症介质环氧合酶2 mRNA表达的升高, 对关节软骨细胞起到保护作用。CCK-8的结果表明其对入骨关节炎软骨细胞具有一定的促进增殖作用。随着Rg1质量浓度的升高对人关节软骨细胞的增殖促进作用越明显; 但当Rg1质量浓度的升高到一定浓度, 增加Rg1质量浓度对人关节软骨细胞的增殖促进作用不明显。总的来说, 这些

结果为人参皂苷Rg1作为一种天然的预防性药物应用于未来骨关节炎的治疗提供了初步理论依据。由于实验采用人体关节软骨细胞, 因而结果对进一步开发具有治疗作用的骨关节炎药物有重要的指导意义^[29]。

作者贡献: 第二作者进行实验设计, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第二作者审校, 通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验获得患者及家属的知情同意, 并得到南京医科大学伦理学委员会的批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM. Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(1-2):34-48.
- [2] Blom AB, van der Kraan PM, van den Berg WB. Cytokine targeting in osteoarthritis. *Curr Drug Targets*. 2007;8(2):283-292.
- [3] Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, et al. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1434-1445.
- [4] Xia L, Chen Q, Cheng GL. Effects of ginseng total saponin on traumatic brain edema of rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2012;32(12):1671-1674.
- [5] Ginseng helps cancer-related fatigue. *Mayo Clin Health Lett*. 2012;30(12):4.
- [6] Al-Hazmi MA, Rawi SM, Arafa NM, et al. The potent effects of ginseng root extract and memantine on cognitive dysfunction in male albino rats. *Toxicol Ind Health*. 2013, in press.
- [7] Avsar U, Karakus E, Halici Z, et al. Prevention of bone loss by panax ginseng in a rat model of inflammation-induced bone loss. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2013;59 Suppl:OL1835-1841.
- [8] Mucalo I, Rahelić D, Jovanovski E, et al. Effect of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on glycemic control in type 2 diabetes. *Coll Antropol*. 2012;36(4):1435-1440.
- [9] Kim SD, Kim YJ, Huh JS, et al. Improvement of erectile function by Korean red ginseng (*Panax ginseng*) in a male rat model of metabolic syndrome. *Asian J Androl*. 2013, in press.
- [10] Hong SH, Suk KT, Choi SH, et al. Anti-oxidant and natural killer cell activity of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) and urushiol (*Rhus vernicifera* Stokes) on non-alcoholic fatty liver disease of rat. *Food Chem Toxicol*. 2013, in press.

- [11] Lee CS, Lee JH, Oh M, et al. Preventive effect of Korean red ginseng for acute respiratory illness: a randomized and double-blind clinical trial. *J Korean Med Sci.* 2012;27(12): 1472-1478.
- [12] Cheon SY, Cho KJ, Lee JE, et al. Cerebroprotective effects of red ginseng extract pretreatment against ischemia-induced oxidative stress and apoptosis. *Int J Neurosci.* 2013, in press.
- [13] Lei Y, Tao LL, Wang GL. Effect of extracts from *Panax ginseng*, *Panax notoginseng*, and *ligusticum chuanxiong* on vascular smooth muscle cells of aging and hypertension rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2012;32(10):1374-1379.
- [14] Ramesh T, Kim SW, Hwang SY, et al. *Panax ginseng* reduces oxidative stress and restores antioxidant capacity in aged rats. *Nutr Res.* 2012;32(9):718-726.
- [15] Jiao L, Wan D, Zhang X, et al. Characterization and immunostimulating effects on murine peritoneal macrophages of oligosaccharide isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Ethnopharmacol.* 2012;144(3):490-496.
- [16] Shi AW, Wang XB, Lu FX, et al. Ginsenoside Rg1 promotes endothelial progenitor cell migration and proliferation. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(3):299-306.
- [17] Zhou Y, Yang B, Jiang R, et al. Mechanism of ginsenoside Rg1 in the delayed senescence of hematopoietic stem cell. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2010;90(48):3421-3425.
- [18] Wang NY, Lu CJ, Chen XH. Study on effect of ginsenoside Rg1 in promoting myocardial vascular endothelial cell regeneration through induction on bone marrow stem cell's migration and differentiation in rabbits of myocardial infarction. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2005;25(10):916-919.
- [19] Fang F, Chen X, Huang T, et al. Multi-faced neuroprotective effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer mouse model. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(2):286-292.
- [20] Du J, Cheng B, Zhu X, et al. Ginsenoside Rg1, a novel glucocorticoid receptor agonist of plant origin, maintains glucocorticoid efficacy with reduced side effects. *J Immunol.* 2011;187(2):942-950.
- [21] Lv ZC, Guo YX, Cao XY, et al. Shijie Zhongxiyi Jiehe Zazhi. 2010(1):32-34.
吕振超,郭艳幸,曹向阳,等.人参皂苷Rg1、Rb1对体外培养膝软骨细胞凋亡的影响[J].世界中西医结合杂志,2010(1):32-34.
- [22] Kim HA, Kim S, Chang SH, et al. Anti-arthritis effect of ginsenoside Rb1 on collagen induced arthritis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(10):1286-1291.
- [23] Cheng AW, Stabler TV, Bolognesi M, et al. Selenomethionine inhibits IL-1 β inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX2) expression in primary human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(1):118-125.
- [24] Chen XY, Hao YR, Wang Z, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on aggrecan and type II collagen expression in rat articular chondrocytes. *Rheumatol Int.* 2012; 32(11):3359-3364.
- [25] Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1(5):817-829.
- [26] Blom AB, van der Kraan PM, van den Berg WB. Cytokine targeting in osteoarthritis. *Curr Drug Targets.* 2007;8(2): 283-292.
- [27] Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl):S108-115.
- [28] Alvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, et al. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(8):998-1005.
- [29] Giannoni P, Cancedda R. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(1):1-15.