

白藜芦醇诱导佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡

杨 珺^{1,2} 张俊强¹ 赵 欢¹ 安 梅³ 孙和炎⁴ 陈晓宇¹

摘要 目的 探讨白藜芦醇对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜细胞增殖和凋亡的影响。方法 0.1 ml 弗氏完全佐剂注射SD大鼠左后足跖皮内复制AA模型,28 d后,采用组织块培养法分离、培养大鼠踝关节滑膜细胞,CCK-8法检测白藜芦醇对滑膜细胞增殖的影响;Hoechst 33258荧光染色、琼脂糖凝胶电泳观察滑膜细胞凋亡情况。结果 CCK-8法表明白藜芦醇可以抑制滑膜细胞增殖,并且呈剂量依赖性趋势;高浓度白藜芦醇(20、50 μmol/L)能诱导滑膜细胞凋亡,Hoechst 33258染色观察到细胞核出现凋亡小体,电泳呈现出阶梯状条带。结论 白藜芦醇可能会通过抑制AA大鼠滑膜细胞的增生,促进滑膜细胞的凋亡而达到治疗类风湿性关节炎的作用。

关键词 白藜芦醇; 佐剂性关节炎; 滑膜细胞; 细胞凋亡; 大鼠

中图分类号 R 322.72

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0041-04

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病^[1]。其病理特征主要表现为滑膜细胞类肿瘤样增生,引起软骨及骨的破坏,最终导致骨关节强直及功能障碍。佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)是目前研

究RA的主要动物模型之一。白藜芦醇是一种主要存在于虎杖、葡萄等植物中的天然活性多酚化合物,其抗增殖和调节免疫的功效为RA等疾病的治疗提供了新的思路^[2]。目前研究^[3]认为,RA患者关节滑膜组织增生,关节滑膜细胞原位增殖过剩,且滑膜细胞凋亡障碍。为进一步揭示白藜芦醇对RA患者治疗的可能机制,该研究以AA大鼠的踝关节滑膜为实验样本,采用组织块培养法分离、培养大鼠踝关节滑膜细胞,从细胞凋亡的角度观察白藜芦醇对AA大鼠的踝关节滑膜细胞形态学改变,旨在探讨白藜芦醇对AA大鼠的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 IX70-SIF2型倒置显微镜购于日本Olympus公司;全自动多功能型酶标仪购于美国BIO-RAD公司;DMEM培养基、胎牛血清、胰酶购于美国Gibco公司;白藜芦醇购于美国Sigma公司,纯度≥99.9%;兔抗鼠血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、Hoechst 33258、CCK-8购于美国Santa Cruz Biotechnology公司。

1.2 细胞培养

1.2.1 AA模型大鼠建模 普通级SD雄性大鼠20只,180~200 g,购于安徽医科大学实验动物中心,大鼠左后足跖皮内注射0.1 ml 弗氏完全佐剂(卡介苗80℃灭活1 h,与高压灭菌的液体石蜡充分碾磨混匀,配成10 g/L乳剂)致炎。

1.2.2 大鼠踝关节滑膜细胞培养与鉴定 24 d后,AA模型大鼠建模成功,处死大鼠,参照先前实验方法^[4],AA模型大鼠置0.1%新洁尔灭液中15 min

2014-09-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373421);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201310366007)

作者单位:¹安徽医科大学组织胚胎学教研室,合肥 230032

安徽医学高等专科学校²病理学教研室、³解剖与组胚学教研室,合肥 230601

⁴安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:杨 珺,女,实验师,硕士研究生;

陈晓宇,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: cxyayd@163.com

contact angle analysis showed that the surface of age group was hydrophobic while the surface of UV irradiated group was superhydrophilic. *In vitro* cell culture showed that UV irradiation was conducive to cell adhesion, proliferation and differentiation. **Conclusion** UV radiation can remove hydrocarbon contamination on surface of titanium, improve the surface hydrophilicity, and delay the bioactive decrease of titanium-based TiO₂ nanotube surface by time factors.

Key words TiO₂ nanotubes; anodization; ultraviolet catalysis; hydrophilicity; bone marrow stromal cells

浸泡消毒,于 AA 大鼠非致炎侧(即右侧)踝关节正中纵行切开皮肤,小心分离肌肉,见肌肉下光亮平滑的滑膜组织;手术刀背钝性分离关节囊的纤维层和滑膜层,取出滑膜层组织(每只大鼠双侧共约 10 mg),剔除周围脂肪、纤维组织等,将其剪为 1~2 mm² 大小,无 Ca²⁺、Mg²⁺ D-Hank 液轻轻漂洗 3 次。将小块滑膜组织均匀排列在培养瓶的底壁,置饱和湿度条件下 37 °C、5% CO₂ 培养箱内贴壁培养 2 h。然后加入少许 37 °C 预温的 20% 小牛血清 DMEM 培养液,再置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。每隔 2 d 更换培养基(含 20% 小牛血清 DMEM) 1 次,待组织块周边长出较多成纤维样滑膜细胞后,弃除组织块,在 5% CO₂、37 °C 饱和湿度条件下继续培养(20% 胎牛血清的 DMEM 培养基),待细胞长满后,1 ml 0.25% 37 °C 胰蛋白酶消化细胞 2~3 min,待 80%~90% 细胞由梭形收缩成圆形,加入含血清的培养液终止消化,培养 3~4 d 后再传代培养;选择生长旺盛、形态良好、致密单层的细胞,消化后冻存于含 20% 血清、10% DMSO 的培养液中,再置于 -80 °C 保存或转至液氮中贮存。实验中用传代 3~5 次滑膜细胞。免疫荧光细胞化学鉴定滑膜细胞:6 孔板底部放置清洁盖玻片,95% 的冷乙醇溶液固定滑膜细胞 30 min;加入一抗(兔抗大鼠 VCAM-1 多克隆抗体,1:500),37 °C 孵育 30 min,PBS 反复洗 3 次;加入二抗(羊抗兔 Ig-G-FITC),37 °C 孵育 30 min,封片,荧光显微镜下观察。

1.2.3 CCK-8 法测定白藜芦醇对滑膜成纤维细胞增殖的影响 将传代(3~5 代)的滑膜细胞以 5 × 10⁵ 个/L 的密度接种于 24 孔培养板中。37 °C 培养 48 h,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液配制的不同浓度的白藜芦醇溶液(0、1、5、20、50 μmol/L) 100 μl,每组设 4 个平行孔,培育 48 h。反应结束后,去除培养基,加入不含药物的培养基后,每孔加入 20 μl 的 CCK-8 溶液,37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 2 h。取出培养板,酶标仪(Elx800,美国 BioTek 公司) 450 nm 检测吸光度值(absorbance, A),实验重复 3 次。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色 消化对数生长期的成纤维样滑膜细胞,将浓度为 5 × 10⁶ 个/L 细胞接种于 6 孔板中,板中放入包被了多聚赖氨酸的盖玻片。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后更换培养液,并加入白藜芦醇(终浓度分别为 0、5、20、50

μmol/L) 继续培养 48 h 后,取出培养板,甲醇:冰醋酸 = 3:1 在 4 °C 固定 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;1% Triton X-100 透化 10 min,加入 Hoechst 33258(终浓度 5 mg/L) 避光染色 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,封片,荧光显微镜观察。实验重复 3 次。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳 按试剂盒说明书进行,简略步骤如下:对数生长期的滑膜细胞,以 1 × 10⁶ 个/L 细胞接种于培养瓶,用白藜芦醇(0、5、20、50 μmol/L) 处理 48 h,将细胞收集于 1.5 ml Eppendorf 管中,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。采用上海碧云天生物技术有限公司提供的 DNA Ladder 抽提试剂盒提取 DNA,取 5 μl DNA,75 V,60 min 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外透射仪下观察,凝胶成像系统照相。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 滑膜细胞培养和鉴定 倒置显微镜下观察滑膜细胞的形态及生长状况,培养 24 h 后可见贴壁并伸出突起,滑膜细胞呈梭形。培养 7 d 后细胞长满并对细胞进行传代。培养 24 h 后倒置荧光显微镜下,传代滑膜细胞兔抗鼠 VCAM-1 多克隆抗体标记阳性,细胞呈梭形,生长状况良好,核卵圆形,位于细胞中央。见图 1。

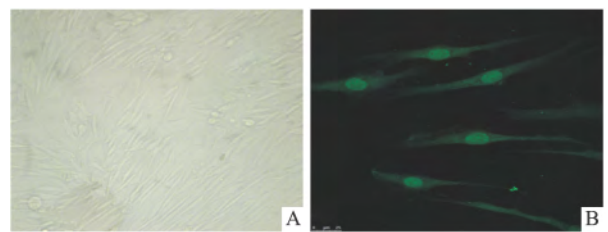


图 1 倒置显微镜下滑膜细胞形态

A: 培养的滑膜细胞 ×100; B: 免疫细胞化学荧光染色反应示滑膜细胞 VCAM-1 阳性 ×200

2.2 白藜芦醇对培养的滑膜细胞生长活性的影响

为了探讨白藜芦醇对 AA 大鼠滑膜细胞增殖活性的影响,采用 CCK-8 法检测传代滑膜细胞与不同浓度白藜芦醇共孵育 48 h,检测滑膜细胞增殖活性。结果表明,白藜芦醇(20、50 μmol/L) 能够显著地降低 AA 大鼠滑膜细胞活力(P < 0.01)。表明高浓度

的白藜芦醇具有诱导 AA 大鼠滑膜细胞活性下降的作用。见图 2。

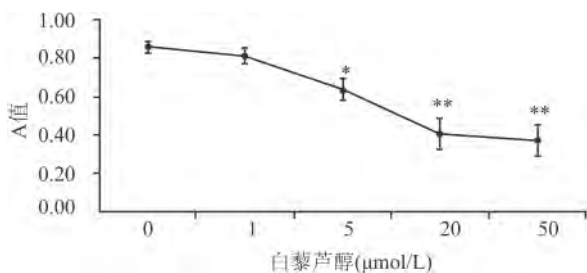


图2 采用 CCK-8 法检测不同浓度白藜芦醇对大鼠成纤维样滑膜细胞增殖的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 Hoechst 33258 荧光染色结果 白藜芦醇(0、5、20、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理大鼠成纤维样滑膜细胞 48 h 后,经紫外光激发,在荧光显微镜下,可见高浓度的白藜芦醇(20、50 $\mu\text{mol/L}$) 出现典型的凋亡形态学改变,核染色质聚集、核碎裂、胞质浓缩。而未给药对照组白藜芦醇(0 $\mu\text{mol/L}$) 细胞核呈均匀的蓝色荧光。见图 3。

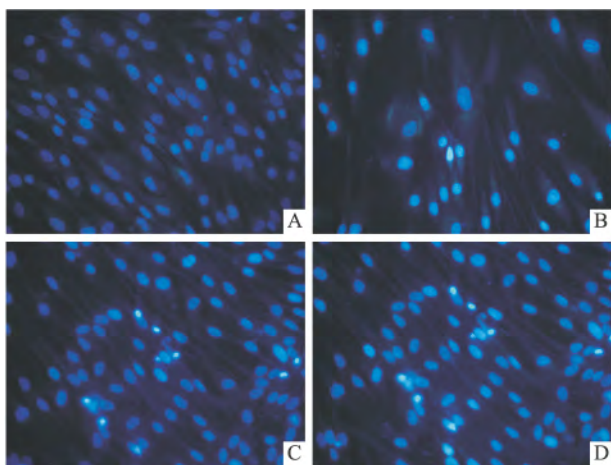


图3 Hoechst 33258 荧光染色结果 $\times 200$

A: 白藜芦醇(0 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; B: 白藜芦醇(5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; C: 白藜芦醇(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; D: 白藜芦醇(50 $\mu\text{mol/L}$) 处理组

2.4 琼脂糖凝胶电泳结果 可见未用白藜芦醇处理组和白藜芦醇低剂量组(5 $\mu\text{mol/L}$) 仅见离点样孔不远的基因组 DNA, 而白藜芦醇高剂量组(20、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理滑膜细胞 48 h 后,经 DNA 凝胶电泳,可见明显的 DNA 梯度条带。见图 4。

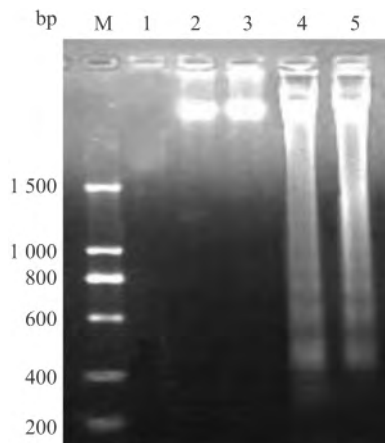


图4 不同白藜芦醇处理组的 DNA Ladder 分析

M: Marker; 1: 标准 DNA 分子量; 2: 未处理组; 3: 白藜芦醇 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: 白藜芦醇 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: 白藜芦醇 50 $\mu\text{mol/L}$ 组

3 讨论

滑膜细胞是关节滑膜层的最大细胞群体,其中最主要的细胞成分是成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS),即 B 型细胞,占 70% ~ 80%, FLS 也是 RA 患者关节和软骨损伤的最终效应细胞。在 RA 中,滑膜组织过度增生、血管翳侵蚀关节软骨及下面的骨组织^[5]。本实验在前期实验基础上^[4]通过组织块移植法培养滑膜细胞,通过贴壁方式去除巨噬细胞样滑膜细胞,以传代培养方式在体外培养较长时间,获取较纯的 FLS。VCAM-1 为滑膜细胞表达分子标记之一,在正常人和 RA 患者关节 FLS 上均有表达,而来源于其他组织,如皮肤的成纤维细胞不表达 VCAM-1^[6]。本实验中,通过传代培养的滑膜细胞,经免疫细胞荧光化学染色反应,培养的细胞中胞质 VCAM-1 阳性,表明 FLS 培养成功。FLS 在体外可传代培养,本研究所用的滑膜细胞为第 3 ~ 5 代。

在本实验中,加入 CCK-8 试剂的滑膜细胞,在未加入白藜芦醇时,其滑膜细胞增殖活性较高,随着白藜芦醇浓度的升高,滑膜细胞增殖活性逐渐降低,高浓度的白藜芦醇(20、50 $\mu\text{mol/L}$) 使大鼠滑膜细胞活力显著下降,表明高浓度的白藜芦醇抑制了滑膜细胞的生长。

荧光显微镜观察细胞核染色质的形态学改变可评判细胞凋亡情况^[7],常用的 DNA 特异性染料包括 Hoechst 33258、DAPI 等。Hoechst 33258 为特异性 DNA 染料,通过 A-T 键结合。本研究观察到 Ho-

echst 33258 荧光染色在无白藜芦醇作用下,细胞核呈弥散、均匀荧光,当白藜芦醇浓度升高至 20 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,滑膜细胞的细胞质浓染致密的颗粒块状荧光,细胞核染色质聚集、碎裂,胞质浓缩,白藜芦醇(50 $\mu\text{mol/L}$) 处理组凋亡的滑膜细胞明显增多,表明凋亡增加。

琼脂糖凝胶电泳是检测细胞凋亡的另一种常用方法^[8],正常活细胞 DNA 基因条带位于加样孔附近,坏死细胞其 DNA 不规则降解,呈现一条连续的膜状条带。本研究中可见 AA 模型组滑膜细胞和低浓度的白藜芦醇(5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组仅见离点样孔不远的基因组 DNA,没有明显梯状条带出现,而高浓度白藜芦醇(20、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 AA 大鼠滑膜细胞 48 h 后,经琼脂糖凝胶电泳可见规则的、间隔 180 ~ 200 bp 的凋亡细胞特征性梯状条带。

综上所述,本研究通过组织块移植法成功培养滑膜细胞,所做相关实验表明白藜芦醇在一定浓度($\geq 20 \mu\text{mol/L}$) 下可以诱导传代的 AA 大鼠滑膜细胞凋亡,此种现象可以认为是白藜芦醇抵抗滑膜细胞增生作用的机制之一。但白藜芦醇是通过何种途径来实现其促进滑膜细胞凋亡的作用,还有待于进一步加以阐明。

参考文献

[1] Demoruelle M K, Deane K D, Holers V M. When and where does

inflammation begin in rheumatoid arthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol* 2014 26(1): 64-71.

- [2] Chen X, Lu J, An M, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E_2 [J]. *Mol Med Rep* 2014 9(6): 2592-8.
- [3] Böhm B B, Freund I, Krause K, et al. ADAM15 adds to apoptosis resistance of synovial fibroblasts by modulating focal adhesion kinase signaling[J]. *Arthritis Rheum* 2013 65(11): 2826-34.
- [4] Chen X Y, Li J, Cheng W M, et al. Effect of total flavonoids *Chrysanthemum indicum* on the apoptosis of synoviocytes in joint of adjuvant arthritis rats[J]. *Am J Chin Med* 2008 36(4): 695-704.
- [5] Chen X Y, Wang Z C, Li J, et al. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis[J]. *Exp Ther Med* 2013 6(1): 172-6.
- [6] Wakamatsu K, Nanki T, Miyasaka N, et al. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells[J]. *Arthritis Res Ther* 2005 7(6): 1348-59.
- [7] Zurek-Biesiada D, Kedracka-Krok S, Dobrucki JW. UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms[J]. *Cytometry A* 2013 83(5): 441-51.
- [8] 顾芳,秦宜德,桂丽,等.乳源免疫调节肽诱导人食管癌 Eca-109 细胞凋亡的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(1): 1-4.

Resveratrol-induced apoptosis of synovial cell in adjuvant arthritis rats

Yang Jun^{1,2}, Zhang Junqiang¹, Zhao Huan¹, et al

(¹Dept of Tissue Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pathology, Anhui Medical College, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of resveratrol on synovial cell proliferation and apoptosis in adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** 0.1 ml of Freund's complete adjuvant was injected into the left foot plantar skin of SD rats to copy the AA model. After 28 days, rats ankle synovial cells were isolated and cultured with tissue pieces culture method, the effect of resveratrol on synovial cell proliferation was detected by CCK-8 method; synovial cells apoptosis was observed by Hoechst 33258 fluorescent dye and agarose gel electrophoresis. **Results** CCK-8 method showed that resveratrol could inhibit the synovial cell proliferation, and showed a trend of dose dependent. High dose of resveratrol (20, 50 $\mu\text{mol/L}$) could induce the apoptosis of synovial cells, apoptotic body of synovial cells nucleus appeared with Hoechst 33258 dyeing, electrophoresis showed ladder-like stripe. **Conclusion** Resveratrol can inhibit AA rats synovial cell proliferation and promote apoptosis of synovial cell which improves the treatment of rheumatoid arthritis.

Key words resveratrol; adjuvant arthritis; synovial cells; cell apoptosis; rats