

烟碱对膝骨关节炎模型大鼠的保护作用及机制研究

朱辰蕾^{1,2}, 惠宇坚¹, 张翔海³, 吴东迎¹, 范卫民¹, 胡 军^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; ²苏州大学附属第三医院骨科, 江苏 常州 213000; ³马鞍山市人民医院骨科, 安徽 马鞍山 243000)

[摘要] 目的:研究烟碱对碘乙酸(monoiodoacetic acid, MIA)诱导的大鼠膝骨关节炎模型的保护作用,并对其作用机制作初步探讨。方法:通过 MIA 膝关节腔注射法构建大鼠膝骨关节炎模型,将造模成功的 30 只 SD 大鼠随机分为模型组(MIA 组)10 只,烟碱干预组 20 只(MIA+Nic 0.25 mg/kg 与 MIA+Nic 0.5 mg/kg 组各 10 只)。另外,将 10 只大鼠作为假手术组(对照组)。造模 30 d 后提取大鼠右膝关节软骨组织标本,进行大体光镜和组织学病理切片观察关节软骨破坏情况;并用 RT-PCR 法对各组大鼠右膝关节软骨内的 II 型胶原、蛋白聚糖的表达进行检测;采用 Western blot 法检测磷酸化 Akt 蛋白表达。结果:与 MIA 组相比,烟碱可明显改善模型大鼠膝关节大体光镜评分和 Mankin's 评分($P < 0.01$),提高关节软骨 II 型胶原和蛋白聚糖表达水平($P < 0.01$),并显著增加磷酸化 Akt 蛋白水平($P < 0.01$)。结论:烟碱可有效缓解 MIA 诱导的大鼠膝关节软骨退变,这种保护作用可能与 PI3K/Akt 信号途径有关。

[关键词] 骨关节炎;大鼠;烟碱;烟碱乙酰胆碱受体

[中图分类号] R684.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-129-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140201

Chondroprotective effects and mechanisms of nicotine on osteoarthritis in rat models

Zhu Chenlei^{1,2}, Hui Yujian¹, Zhang Xianghai³, Wu Dongying¹, Fan Weimin¹, Hu Jun^{1*}

(¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 213000; ³Department of Orthopedics, Ma'anshan People's Hospital, Ma'anhang 243000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of nicotine on cartilage of monoiodoacetic acid (MIA)-induced rat osteoarthritis model. **Methods:** A total of 40 rats were randomly divided into four groups (control group, MIA group, MIA+Nic 0.25 mg/kg group and MIA+Nic 0.5 mg/kg group). Each group rats were sacrificed on 30th day after they received the first intra-articular injection of MIA (1mg) surgery. The right knee samples were carefully dissected. Generally light microscope and histological pathological examination were used to observe the destruction of articular cartilage. Reverse-transcription PCR was used to detect the gene expression of type II collagen and aggrecan. The protein expression of phosphor-Akt was measured by Western blot test. **Results:** Compared with the MIA group, nicotine treatment significantly decreased the light microscopy score and the Mankin's score ($P < 0.01$) of the knee samples, and significantly increased the mRNA levels of type II collagen and aggrecan ($P < 0.01$) and the protein levels of phosphor-Akt ($P < 0.01$). **Conclusion:** Nicotine attenuates the severity of cartilage degeneration in the experimental rat model. These protective effects may partially benefit from the increase of phosphor-Akt expression.

[Key words] osteoarthritis; rat; nicotine; nicotinic acetylcholine receptor

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 129-134]

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性退行性关节疾病,以缓慢发展的关节疼痛、僵硬、肥大伴

活动受限等为主要临床特点。关节软骨细胞的变性退变是 OA 的病理生理基础,但对其确切的病因机制目前仍不清楚^[1]。近年来,炎性细胞因子在 OA 发生、发展中的作用成为最受关注的内容之一^[2-3]。最新的研究证据显示,烟碱可以激活烟碱型乙酰胆碱受

[基金项目] 国家自然科学基金(30901800)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: junhu89@vip.sina.com

体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs),通过烟碱抗炎通路发挥免疫调节作用,被认为是机体神经免疫的重要调节机制之一^[4-5]。有研究发现烟碱可改变佐剂性关节炎大鼠体内免疫反应,发挥关节保护作用^[6]。这种保护作用亦在胶原诱导的类风湿关节炎小鼠模型上得到验证^[7]。但烟碱是否在骨关节炎动物模型中发挥保护作用尚缺乏相应的研究。本研究通过评价烟碱对糖酵解抑制剂单体碘乙酸(monoiodoacetic acid, MIA)制备的OA大鼠的膝关节软骨大体光镜和病理评分、关节软骨Ⅱ型胶原和蛋白聚糖 mRNA 表达水平及Akt蛋白水平的影响,探讨烟碱对OA病理生理过程的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

3月龄SD大鼠40只,由南京医科大学动物实验中心提供,雌雄各半,体重200~250 g。MIA、烟碱(Sigma公司,美国),磷酸化Akt、Akt抗体、辣根过氧化物酶标记的IgG抗体(CST公司,美国)。电泳仪、电泳槽(Bio-Rad公司,美国)。

1.2 方法

实验大鼠用2.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,仰卧位固定。取大鼠右膝正中切口,切开皮肤,暴露关节囊及韧带,在直视下用微量注射器通过韧带刺入膝关节腔,注射1 mg MIA,术中操作轻柔,避免损伤关节面软骨。生理盐水冲洗后,用丝线逐层缝合至皮肤。术后每天每只大鼠肌肉注射青霉素20万U预防感染,连续3 d。膝关节不固定,置于笼内自由活动。

将40只SD大鼠随机分为4组,其中假手术组(对照组)10只,模型组(MIA组)10只,烟碱干预组20只(MIA+Nic 0.25 mg/kg为MIA+Nic1组;MIA+Nic 0.5 mg/kg为MIA+Nic2组,各10只)。烟碱干预组在手术前1周分别腹腔注射烟碱(0.25或0.5 mg/kg)预处理,每日1次,对照组和MIA组手术前1周持续注射生理盐水。预处理结束后,MIA组、MIA+Nic1组

和MIA+Nic2组的大鼠右膝关节行MIA(1 mg)膝关节腔内注射,对照组大鼠右膝关节行生理盐水膝关节腔内注射。每周造模1次,共造模4次。烟碱干预组大鼠在造模前、造模中、造模后均每日每只腹腔注射烟碱0.25或0.50 mg/kg 1次。各组大鼠于第1次造模术后第30天处死,处死后大鼠提取右膝关节软骨组织标本,进行实验。

1.2.1 大体光镜观察

大鼠处死后,在解剖显微镜下观察右膝髌骨关节面、股骨内外髁、股骨髁间沟和胫骨平台。大体观察按以下标准评分:0分,关节面光整,色泽如常;1分,关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2分,软骨缺损深达软骨中层;3分,关节面溃疡形成,软骨缺损深达软骨深层;4分,软骨剥脱,软骨下骨质裸露^[6]。

1.2.2 组织病理观察

新鲜大鼠关节样本迅速投入4%多聚甲醛固定,然后将标本放入EDTA脱钙液中脱钙3周,每3 d更换脱钙液。常规脱水,石蜡包埋,3 μm厚度连续切片,行HE常规染色,快速甲苯胺蓝染色。评分标准参照Mankin's评分^[8-9]。

1.2.3 RT-PCR

用刀片迅速刮下股骨内外髁、髁间沟及胫骨平台关节面的软骨组织,分别置于预先冷冻的研钵中,按照操作手册应用RNAiso™Plus (TaKaRa公司,日本)抽提总RNA。逆转录使用PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa公司,日本)。

PCR反应液为:0.125 μl *Taq* (5 U/μl)、2.5 μl 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Free)、1.5 μl MgCl₂(25 mmol/L)、2 μl dNTP Mixture、共1 μl上下游引物和2 μl模板DNA,用RNase Free dH₂O配置终体系25 μl。引物信息见表1。PCR反应条件为:95℃ 10 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s(共35个循环),72℃ 10 min。用含有0.1%溴乙锭的3%琼脂糖凝胶电泳分析PCR的终产物。上海天能GIS 1D成像系统成像及分析。

1.2.4 Western blot

表1 RT-PCR引物

Table 1 Primers used for RT-PCR

名称	GenBank 序列号	方向	序列(5'→3')	产物大小(bp)
GAPDH	NM_017008	Forward	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143
		Reverse	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	
Ⅱ型胶原	NM_012929.1	Forward	GAGGGCAACAGCAGGTTTAC	95
		Reverse	TGTGATCGGTAAGTCCGATGATGG	
蛋白聚糖	NM_022190.1	Forward	GAAGTGATGCATGGCATTGAGG	146
		Reverse	ATGATGGCCGCTGTTCTGAAGG	

取出大鼠膝关节软骨,使用蛋白提取试剂盒提取蛋白,测量其蛋白浓度。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用半干转移法将凝胶电泳分离的蛋白分子转移到 PVDF 膜上。5%牛血清白蛋白室温封闭 1 h,加入相应一抗,抗磷酸化 Akt 抗体(1:1 000 稀释)和抗 Akt 抗体(1:1 000 稀释),4℃孵育过夜。用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗 4 次。ECL 显影,最后对结果进行扫描分析,磷酸化 Akt 相对于 Akt 的灰度值之比代表蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

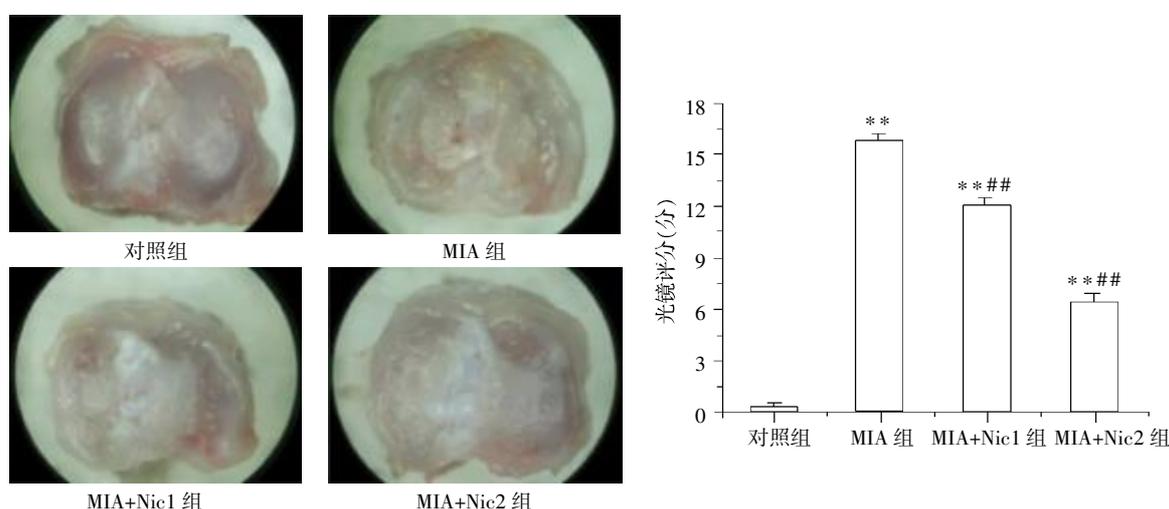
所有数据应用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组

比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD,以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体光镜改变

模型组与对照组相比出现明显的关节破坏症状($P < 0.01$)。Nic(0.25 mg/kg)药物干预组(MIA+Nic1组)与模型组相比软骨破坏症状有所改善,周边滑膜炎明显减轻,但各关节面仍有明显的软骨缺损。Nic(0.5 mg/kg)组(MIA+Nic2组)各个关节面可见显著的软骨增生修复,关节面趋于平整、光滑。滑膜炎明显减轻,关节腔内结构清晰(图 1A)。但与对照组相比仍有差异($P < 0.01$,图 1B)。



A:各组胫骨平台典型大体标本;B:半定量光镜评分评价各组大鼠膝关节病损结果。与对照组比较,** $P < 0.01$;与 MIA 组比较,## $P < 0.01$ ($n = 5 \sim 6$)。

图 1 各组大鼠大体光镜观察结果

Figure 1 Macroscopic features of osteoarthritic lesions in various groups studied

2.2 组织病理改变

模型组 HE 染色显示:滑膜明显破坏,软骨细胞数量显著减少,甲苯胺蓝染色显示软骨细胞蓝染大量消失,软骨层塌陷,仅存少数软骨细胞淡染区域。Nic(0.5 mg/kg)组 HE 染色关节面趋于平整,滑膜增生肥厚较模型组减少,软骨细胞数量显著增加,甲苯胺蓝染色可见明显的软骨层蓝染区域,软骨细胞增生明显(图 2A),与模型组相比有统计学差异($P < 0.01$),但未恢复到对照组水平($P < 0.01$,图 2B、C)。

2.3 II 型胶原和蛋白聚糖的表达改变

RT-PCR 半定量结果示模型组 II 型胶原及蛋白聚糖在关节软骨中的表达均明显减少,II 型胶原较对照组下降 43.4%($P < 0.01$),蛋白聚糖较对照组下降 39.6%($P < 0.01$),Nic(0.5 mg/kg)组 II 型胶原及

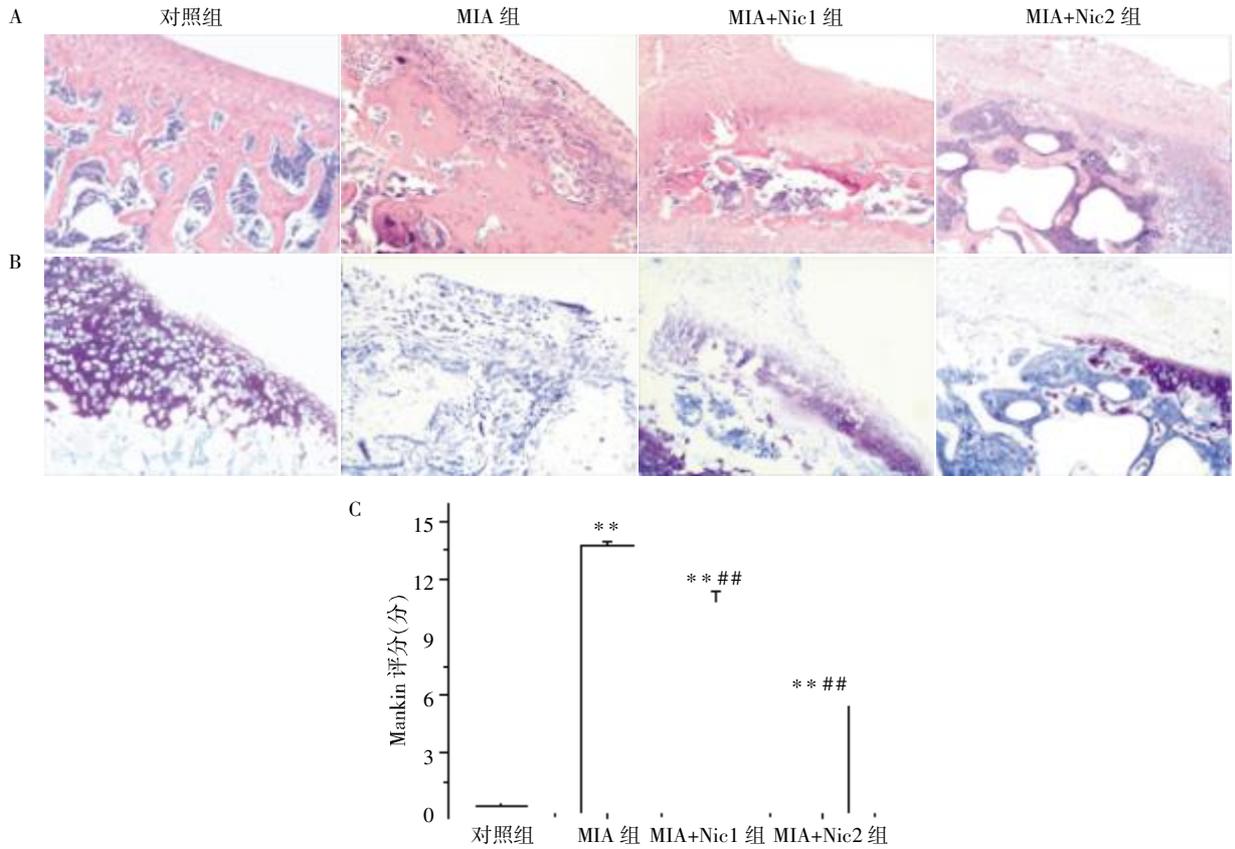
蛋白聚糖的表达与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),表明烟碱可完全逆转 MIA 对关节软骨 II 型胶原及蛋白聚糖的毒性作用(图 3)。

2.4 磷酸化 Akt 蛋白的表达改变

与对照组相比,模型组 Akt 磷酸化水平显著降低约 51.4%($P < 0.01$)。与模型组相比,Nic(0.5 mg/kg)组可明显升高 Akt 磷酸化水平($P < 0.01$),并且与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$,图 4)。

3 讨论

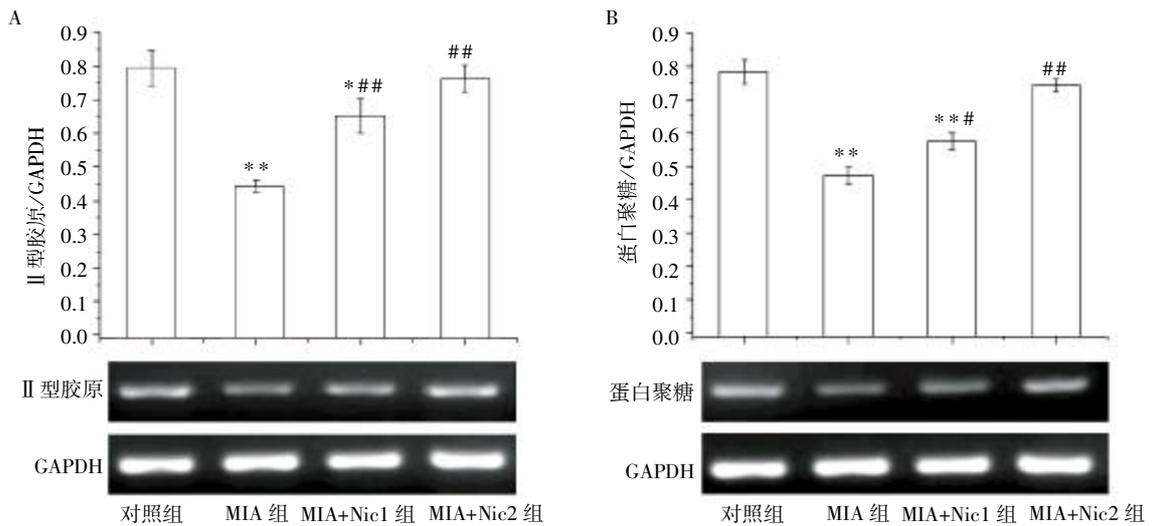
关节腔内注射化学物质可以人工诱发 OA 模型,该造模方式创伤小,所需时间短,病理生理改变与 OA 相似性高。已有研究表明选用 MIA 进行膝关节腔内注射,可明显破坏关节内环境的稳定,使软骨



A: HE染色;B:甲苯胺蓝染色;C:半定量组织病理评分各组大鼠膝关节病理结果。与对照组比较,** $P < 0.01$;与MIA组比较,## $P < 0.01$ ($n = 5\sim 6$)。

图2 各组大鼠膝关节组织病理切片观察

Figure 2 Histologic sagittal section of osteoarthritic lesions in various groups studied



与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与MIA组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ ($n = 3\sim 4$)。

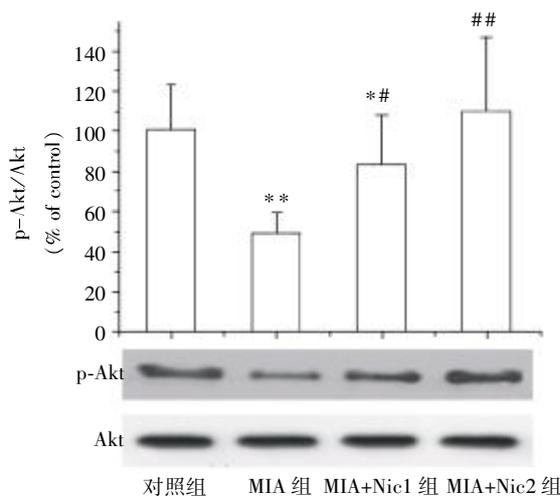
图3 烟碱对MIA诱导的骨性关节炎大鼠膝关节软骨II型胶原(A)及蛋白聚糖(B)mRNA表达的影响

Figure 3 Effects of nicotine on mRNA expressions of type II collagen and aggrecan of the knee cartilage of MIA-induced rat osteoarthritis model

细胞凋亡,软骨磨损,并造成关节内其他结构的损伤,关节周围纤维组织增生形成骨赘,最终发展为

OA^[10-12]。

本研究发第1次注射MIA 30 d后大鼠膝关



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MIA 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n = 3 \sim 4$)。

图 4 烟碱对 MIA 诱导的骨性关节炎大鼠膝关节软骨磷酸化 Akt 蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of nicotine on the protein expressions of phosphor-Akt of the knee cartilage of MIA-induced rat osteoarthritis model

节髌骨关节面、股骨内外髌、髌间沟以及胫骨平台关节面见软骨糜烂缺损,软骨下骨质暴露,软骨细胞显著减少,基质染色重度减退甚至消失,说明软骨细胞退变进入中晚期。从大体评分、光镜下 Mankin's 评分、RT-PCR 这 3 项半定量指标看,随造模后时间延长,软骨退变逐渐加重,II 型胶原及蛋白聚糖表达逐渐降低,说明该模型较好地反映了 OA 病理进程。

Felson 等^[13]评估了 1983~1985 年 1 415 例膝关节 OA 患病率与吸烟的相关度,发现吸烟者 OA 的患病率(28%)低于不吸烟者(37.5%),吸烟对于膝关节 OA 有适度的保护作用($RR = 0.74, 95\%CI: 0.57 \sim 0.95$),特别是严重 OA ($RR = 0.70, 95\%CI: 0.49 \sim 0.98$),效果更加明显。随后, Felson 等^[14]对该人群继续调查研究,分别在 1983~1985 年和 1992~1993 年拍摄负重位膝关节 X 线片,结果发现吸烟人群的 OA 发病率低于不吸烟人群 ($OR=0.4, 95\%CI: 0.2 \sim 0.8$),提示了吸烟对膝 OA 有保护作用,但具体机制仍不清楚。

近年来的研究证据显示,烟草中的主要成分烟碱可以激活 ChRs,通过胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)发挥免疫炎症调节作用,被认为是机体最重要的免疫抗炎机制之一。已知磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)信号

途径可促进人骨性关节炎软骨细胞 II 型胶原、蛋白聚糖等分泌增多^[15]。其中磷酸化 Akt 蛋白与多种靶分子相关,例如促凋亡蛋白 caspase 和转录因子 NF- κ B 等,调节关节软骨细胞炎症、凋亡等病理反应,提示可作为临床上治疗骨性关节炎的靶点^[16]。而烟碱是否可通过 Akt 信号通路在 MIA 大鼠骨关节炎模型中发挥保护作用未见报道。

本实验发现,烟碱大鼠腹腔内给药可明显阻断 OA 病理进程,大体评分、光镜下 Mankin's 评分显著减少,II 型胶原及蛋白聚糖表达量明显增加,同时,关节软骨中磷酸化 Akt 蛋白水平也随之上调,表明 PKB/Akt 信号通路参与了烟碱对关节软骨的保护作用机制。

但是,骨性关节炎的病理生理是一个复杂的过程,不是单一信号通路作用的结果,不同的信号通路间存在交叉,烟碱对关节软骨的保护作用所涉及的 Akt 上、下游的一些信号通路都还有待于进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] Iagnocco A, Naredo E. Osteoarthritis: research update and clinical applications [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(Suppl7): vii2-5
- [2] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 33-42
- [3] Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? [J]. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(5): 451-455
- [4] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 384-388
- [5] Bencherif M. Neuronal nicotinic receptors as novel targets for inflammation and neuroprotection: mechanistic considerations and clinical relevance [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(6): 702-714
- [6] Yu H, Yang YH, Rajaiah R, et al. Nicotine-induced differential modulation of autoimmune arthritis in the Lewis rat involves changes in interleukin-17 and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(4): 981-991
- [7] van MMA, Lebre MC, der Poll Tv, et al. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1): 114-122
- [8] Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-

response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9): 1670-1679

[9] van MMA, Stoop SP, Larosa GJ, et al. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis; aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene knockout mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1717-1723

[10] Lee SW, Lee HJ, Chung WT, et al. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 534-542

[11] Schuelert N, McDougall JJ. Cannabinoid-mediated antinociception is enhanced in rat osteoarthritic knees [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(1): 145-153

[12] Lee SW, Song YS, Shin SH, et al. Cilostazol protects rat chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis in vitro and prevents cartilage destruction in a rat model of osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(3): 790-800

[13] Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, et al. Does smoking protect against osteoarthritis? [J]. *Arthritis Rheum*, 1989, 32(2): 166-172

[14] Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the framingham study[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(4): 728-733

[15] Chen J, Crawford R, Xiao Y. Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of osteoarthritis[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(2): 245-249

[16] 程亮, 赵洪海, 曾国庆, 等. Akt与ERK1/2在人骨关节炎软骨细胞中的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(5): 889-894

[收稿日期] 2013-05-13

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨荣, 张浩, 等. *NOMO1* 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何维. *医学免疫学*[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. *美国出版业概况*[M]//陆本瑞. *世界出版概况*. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. *非线性规划在可燃毒物配置中的应用* [C]//赵玮. *运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集*. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)