

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.07.016

补骨脂素对大鼠腰椎间盘软骨细胞炎性退变的影响

姚长风^{*}, 张晓军², 杨永晖², 白良川¹, 赵永见³,
王洪伸³, 舒冰³, 杨燕萍³, 施杞³, 王拥军³

(1. 安徽中医药大学针灸骨伤临床学院, 安徽省合肥市梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽中医药大学; 3. 上海中医药大学脊柱病研究所)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2010CB530400); 上海市教育委员会上海市教育发展基金会曙光跟踪计划项目(10GG20)

摘要 目的 探讨补骨脂素延缓椎间盘退变的内在机制。方法 体外分离 1 月龄雌性 SD 大鼠腰椎间盘软骨板, 采用组织块法培养, 通过 HE 染色、甲苯胺蓝染色和免疫荧光进行细胞辨别、鉴定。通过细胞增殖实验和 RT-PCR 法进行补骨脂素最佳浓度筛选。取第 3 代生长状况良好的椎间盘软骨细胞, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞置于 6 孔板内, 分为空白对照组、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 诱导组 (10 ng/ml)、补骨脂素组 (IL-1 β 10 ng/ml + 补骨脂素最佳浓度), 每组 3 孔, 检测各组 II 型胶原基因 (Col2a1)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5 (ADAMTS-5)、IL-1 β 和环氧化酶-2 (COX-2) mRNA 的表达。结果 补骨脂素浓度在 100、150、200、400 μ M 时, 细胞活性较浓度为 0 时明显减弱 ($P < 0.01$)。补骨脂素在 12.5、25 μ M 时较浓度为 0 时能上调 Col2a1 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补骨脂素组 Aggrecan mRNA 高于空白对照组 ($P < 0.01$); 与 IL-1 β 诱导组比较, 补骨脂素组 Col2a1 mRNA 升高, ADAMTS-5 mRNA 降低 ($P < 0.01$)。结论 补骨脂素可以一定程度缓解 IL-1 β 诱导的椎间盘软骨细胞的退变进程, 并对 IL-1 β 炎性信号通路的相关因子产生影响。

关键词 补骨脂素; 白细胞介素-1 β ; 软骨细胞; 椎间盘退变

随着社会的发展、生活节奏的逐步加快, 脊柱退行性改变已成为威胁人们健康、降低生活质量的因素之一。白细胞介素-1 β (IL-1 β) 是椎间盘退变过程中的重要炎症因子之一, 它可以诱导椎间盘软骨板软骨细胞的退变^[1]。补骨脂素是治疗椎间盘退行性疾病的常用药物, 具有补肝肾作用, 补骨脂素是其重要的有效成分之一。本研究观察补骨脂素对 IL-1 β 诱导的体外培养的椎间盘软骨板细胞分泌的 II 型胶原基因 (Col2a1)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5 (ADAMTS-5)、IL-1 β 和环氧化酶-2 (COX-2) mRNA 表达的影响, 以进一步明确补骨脂素在治疗椎间盘退行性病变中的内在作用机制。

1 材料

1.1 动物

1 月龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 5 只, 体重 (180 $\pm$ 20) g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCKK (沪) 2007-0005。

1.2 主要试剂及仪器

盐酸氯胺酮注射液 (福建古田药业有限公司, 批号 H35020148), DMEM (美国 Gibco 公司, 批号 S10479L0103), 胎牛血清 (FBS, 美国 HyClone 公司, 批号 NXC0583)、1% 青霉素-链霉素 (美国 Invitrogen 公司, 批号 S08493L0022), IL-1 β (美国 Sigma 公司, 批号 1305CY12), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号 BCB5259V), CCK-8 细胞增殖和活性检测试剂盒 (日本 Dojindo 公司, 批号 EW728), 转录试剂盒 (大连 TaKaRa 生物有限公司, 批号 DRR037A)。Thermo forma-

* 通讯作者: yaochangfengxx@163.com, 13003003840

3111 二氧化碳培养箱、SW-CJ-4BU 超净工作台 (Airtect 公司), DP-71 倒置相差显微镜 (Olympus 公司), 6 孔和 96 孔培养板 (美国 Corning 公司), Beckman DU 800/VIS 紫外线分光光度计 (美国 Beckman 公司), 四通道荧光实时定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (新加坡 Biorad 公司, C1000 Thermal cycler 型), 基因扩增仪 (德国 Eppendorf 公司, Mastercycler Personal 型)。

1.3 实验药品

补骨脂素由中国药品生物制品检验所 (上海) 提供, 编号 110739。

2 方法

2.1 原代软骨细胞分离和培养

将 SD 大鼠腹腔注射 0.4 ml 盐酸氯氨酮致死, 无菌条件下分离脊柱, 清除脊柱上附着的韧带、肌肉, 切除后椎板, 用咬骨钳掰开椎体, 显露椎间盘, 用眼科手术剪和镊子分离椎间盘, 仔细去除纤维环髓核, 得到软骨板, PBS 溶液冲洗 3 次, 将其剪成小碎块 (小于 0.3 mm^3), 均匀放入 $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ 培养皿中, 轻轻倒扣置于 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱内, 2 h 后加入含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养, 等待细胞生长至汇合后, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 传代至 10 cm 的培养皿中, 观察细胞形态。第 3 代培养细胞用于实验。

2.2 软骨细胞的辨别与鉴定

2.2.1 细胞 HE 染色 将盖玻片放置于 6 孔板内, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞放置于 6 孔板内的盖玻片上, 用 2 ml 含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养细胞, 待细胞 80% 融合后, 取出玻片, 加入 4% 多聚甲醛固定, 依次乙醇梯度脱水、苏木素染色、1% 盐酸乙醇溶液分化、氨水返蓝、伊红染色, 乙醇脱水至蜡, 中性树胶封片, 烤片, 镜下观察。

2.2.2 细胞甲苯胺蓝染色 将盖玻片放置于 6 孔板内, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞放置于 6 孔板内的盖玻片上, 用 2 ml 含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养细胞, 待细胞 80% 融合后, 取出玻片, 加入 4% 多聚甲醛固定, 加 0.5% 甲苯胺蓝浸染 10 min, 乙醇脱水至蜡, 镜下观察满意后晾干, 中性树胶封片。

2.2.3 细胞免疫荧光 将盖玻片放置于 6 孔板内, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞放置于 6 孔板内的盖玻片上, 用 2 ml 含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉

素的 DMEM 培养细胞, 待细胞 80% 融合后, 取出玻片, PBS 轻轻冲洗, 加入 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 蛋白酶 K 消化, PBS 冲洗, 加入一抗兔多克隆抗体 II 型胶原 (1: 200 稀释, 美国 Abcam 公司), 4°C 过夜, PBS 洗 $2\text{ min} \times 3$ 次, 加入二抗兔抗 (1: 500 稀释, 美国 Abcam 公司), 避光, 37°C 孵育 45 min, PBS 冲洗, 封片, 荧光显微镜下观察。

2.3 补骨脂素药物浓度初步筛选

采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。以每孔 1×10^4 的细胞数, 放置于 96 孔板中, 并用含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 0.1 ml DMEM 培养。培养 1 天后, 吸干培养液, 用无血清培养基培养过夜, 吸干培养液, 加入补骨脂素 (0、12.5、25、50、100、150、200、400 μM), 6 个复孔, 用含有 0.5% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养 48 h。第 48 h 时, 每孔加入 $10\text{ }\mu\text{M}$ CCK-8, 置入 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱内, 2 h 后设定检测波长为 450 nm, 酶标仪测光密度 OD 值。根据 OD 值结果初步筛选出试验用补骨脂素药物浓度。

2.4 不同浓度补骨脂素对软骨细胞 Col2a1 mRNA 的影响

根据补骨脂素药物浓度初步筛选结果, 取第 3 代生长状况良好的椎间盘软骨细胞, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞置于 6 孔板内, 用 2 ml 含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养细胞, 3 天后, 改用无血清培养基培养过夜, 接着换为含有 0.5% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的加入不同浓度补骨脂素的 DMEM, 培养 48 h。采用 RT-PCR 法检测不同浓度补骨脂素对 Col2a1 mRNA 表达的影响, 进一步确定实验用补骨脂素最佳浓度。

2.5 RT-PCR 法检测 Col2a1、Aggrecan、ADAMTS-5、IL-1 β 和 COX-2 mRNA 表达

取第 3 代生长状况良好的椎间盘软骨细胞, 以每孔 1×10^5 的浓度将细胞置于 6 孔板内, 分为空白对照组、IL-1 β 诱导组、补骨脂素组, 每组 3 孔, 用 2 ml 含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养细胞, 3 天以后, 改用无血清培养基培养过夜, 接着换为含有 0.5% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的加入 0 (空白对照组)、IL-1 β 10 ng/ml (IL-1 β 诱导组)、IL-1 β 10 ng/ml + 补骨脂素最佳浓度 (补骨脂素组) 的 DMEM, 培养 48 h。提取细胞总 RNA, 所提 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整性, 经紫外分光光度仪检测 RNA 含量和纯度。按照逆

转录试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA。反应条件如下: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s。配 20 μ l 反应体系: sybreen mix 10 μ l, Rnase free water 7 μ l, 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, 模板 cDNA 1 μ l, 每个样本设立 3 个复孔, 95℃ 变性, 退火温度根据每个引物设计的要求确定, 72℃ 延伸。同一样本同时作 β -actin 内参 PCR 反应。引物从 Genbank 数据库中检索大鼠基因名, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物序列如下: ADAMTS-5: F-GCAT-CATCGGCTCAAAGCTACA, R-TCAGGGATCCTCA-CAACGTCAG; Aggrecan: F-TCCGCTGGTCTGATGGA-CAC, R-CCAGATCATCACTACGCAGTCTCTC; Col2a1: F-TCCTAAGGGTGCCAATGCTGA, R-AGGACCAAC-TTTCCTTGAGGAC; IL-1 β : F-AGGTGCTCATCATC-CCACGAG, R-GCTGTGGCAGCTACCTATGTCTTG; COX-2: F-GGAGCATCCTGAGTGGATGA, R-AAG-CAGGTCTGGTTCGAAGTCTG; β -actin: F-GGAGAT-TACTGCCCTGGCTCCTA, R-GACTCATCGTACTCCT-GCTTGCTG。将所得 Ct 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行处理后, 再进行统计分析。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对各数值变量进行方差齐性和正态性检验, 检验水准取 $\alpha = 0.10$, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 q 检验。

3 结果

3.1 软骨细胞的辨别与鉴定结果

倒置显微镜下观察组织块培养法培养的细胞生长过程, 7 天后细胞逐渐游离出组织, 呈棱形、三角形, 后伸展为多角形, 核为圆形或椭圆形, 有时可见有双核, 胞浆内可以看到空泡、分泌的颗粒, 约 20 天后铺满直径 10 cm 的培养皿。细胞 HE 染色可见细胞核呈蓝色, 胞浆中、细胞周围有紫红色或红色异染出现。甲苯胺蓝染色细胞核为紫色, 胞浆为深蓝色, 原代细胞与第二代细胞之间形态和结构无明显差别。免疫荧光显示绿色荧光表明检测的细

胞浆及细胞间质中大量表达 II 型胶原。

3.2 补骨脂素药物浓度初步筛选结果

表 1 示, 外源性加入补骨脂素时, 随浓度递增细胞活性由强逐渐减弱, 浓度在 100、150、200、400 μ M 时, 细胞活性较浓度为 0 时明显减弱 ($P < 0.01$)。

3.3 不同浓度补骨脂素软骨细胞 Col2a1 mRNA 表达的影响

根据初步和筛选结果, 选用浓度为 0、12.5、25、50 μ M 的补骨脂素对椎间盘软骨细胞进行干预。表 2 示, 补骨脂素在 12.5 μ M、25 μ M 时, 能上调 Col2a1 mRNA 表达, 与浓度为 0 时比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示 12.5 μ M 的补骨脂素具有较好的细胞增殖活性和 Col2a1 mRNA 表达功能, 故选用最佳浓度为 12.5 μ M。

3.4 各组细胞 Col2a1、Aggrecan、ADAMTS-5、IL-1 β 和 COX-2 mRNA 表达的比较

表 3 示, 与空白对照组比较, IL-1 β 诱导组 Col2a1 mRNA 降低, Aggrecan mRNA 和 ADAMTS-5 mRNA 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 补骨

表 1 不同浓度补骨脂素干预软骨细胞 48 h 细胞活性 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

补骨脂素浓度 (μ M)	样本数	OD 值
0	6	0.91 $\pm$ 0.07
12.5	6	0.93 $\pm$ 0.13
25	6	0.93 $\pm$ 0.20
50	6	0.79 $\pm$ 0.11
100	6	0.76 $\pm$ 0.08*
150	6	0.67 $\pm$ 0.05*
200	6	0.69 $\pm$ 0.07*
400	6	0.41 $\pm$ 0.13*

注: 与补骨脂素浓度为 0 时比较, * $P < 0.01$

表 2 不同浓度补骨脂素对软骨细胞 Col2a1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

补骨脂素浓度 (μ M)	样本数	Col2a1 mRNA
0	3	1.00 $\pm$ 0.06
12.5	3	1.75 $\pm$ 0.23*
25	3	2.15 $\pm$ 0.13**
50	3	1.84 $\pm$ 0.82

注: 与浓度为 0 时比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 各组细胞 Col2a1、Aggrecan、ADAMTS-5、IL-1 β 、COX-2 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Col2a1	Aggrecan	ADAMTS-5	IL-1 β	COX-2
空白对照组	3	1.01 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.08
IL-1 β 诱导组	3	0.67 $\pm$ 0.13*	1.55 $\pm$ 0.05*	1.39 $\pm$ 0.05*	1.22 $\pm$ 0.23	1.10 $\pm$ 0.03
补骨脂素组	3	1.68 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$	1.76 $\pm$ 0.21*	1.04 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$	0.98 $\pm$ 0.29	0.92 $\pm$ 0.06 Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 IL-1 β 诱导组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

脂素组 Aggrecan mRNA 亦高于空白对照组 ($P < 0.01$)。与 IL-1 β 诱导组比较, 补骨脂素组 Col2a1 mRNA 升高, ADAMTS-5 mRNA 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组 IL-1 β mRNA 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 补骨脂素组 COX-2 mRNA 低于 IL-1 β 诱导组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 讨论

软骨板是椎间盘结构的重要部分, 具有 4 个最主要的功能: 支撑功能、屏蔽功能、营养通道和代谢通道^[1]。主要由软骨细胞和基质两部分组成, 基质主要为 II 型胶原和蛋白多糖, II 型胶原发挥一个纤维网状支架的作用, 蛋白多糖起维持椎间盘结构、代谢、生物力学性能的作用, 它对调节基质大分子间的有效孔径大小, 控制带电溶质在椎间盘中的分布和转运, 保护椎间盘组织和外界环境间的物质交换, 防止终板自身的钙化等方面具有重要的作用^[2], 而聚集蛋白聚糖酶的异常表达可以降解椎间盘中的大量聚集蛋白聚糖。有证据表明椎间盘的退变源于软骨板的退变^[3], 它可以继发相邻关节、组织的进一步损害^[4]。因而延缓软骨终板的退变, 对于椎间盘退变的修复和再生意义重大^[5]。

椎间盘为人体内最大的无血管和封闭组织, 物质代谢能力有限, 自身修复能力不足, 损伤易于积累, 从而使由炎症细胞因子、蛋白水解酶等介导的慢性炎症易于发生^[6], 因而可以说炎症既是椎间盘退变病理变化的结果, 又是椎间盘继发性病变的始动因素, 大量炎症因子的表达, 恶化了椎间盘细胞的生存环境, 影响了其正常的生长进程和功能发挥。在这些炎症因子当中, 有研究认为 IL-1 在椎间盘退变的过程中扮演了重要的角色^[7], 在人退变的椎间盘软骨细胞中存在着高表达的 IL-1 β 受体^[8], 它可以刺激或激发其他炎症因子的表达, 如白细胞介素-6 (IL-6)、一氧化氮 (NO) 和 COX-2^[9], 产生坐骨神经痛^[10], 诱导椎间盘细胞的凋亡, 抑制蛋白多糖的产生, 启动多重软骨细胞信号转导级联, 使基质金属蛋白酶 (MMPs) 表达上调, 进一步诱导 II 型胶原的降解。因此通过抑制 IL-1 的产生可以预防甚至逆转椎间盘退变的发生^[11]。

补骨脂具有温肾助阳、纳气、止泻之功效。《本草经疏》: “能暖水脏; 阴中生阳, 壮火益土之要药也。”补骨脂素是补骨脂含有的一种具有重要

生物活性的药化组分, 属于呋喃香豆素类化合物, 也是植物雌激素中的一种^[12], 它可以促进大鼠成骨细胞的增殖和分化^[13-15], 抑制分离破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝的增加与扩张^[16]。本研究通过细胞增殖实验和 RT-PCR 检测, 筛选出可以最佳增殖细胞活性、提高 Col2a1 mRNA 表达的补骨脂素浓度, 且发现此浓度下的补骨脂素可以上调 IL-1 β 诱导的椎间盘软骨细胞 Col2a1 和 Aggrecan mRNA 的表达, 下调 ADAMTS-5、COX-2 mRNA 的表达, 这表明补骨脂素对于缓解 IL-1 β 诱导的椎间盘软骨细胞退变具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 张宇, 赵永见, 周泉, 等. IL-1 β 诱导小鼠椎间盘软骨终板细胞炎症性退变的细胞模型研究 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8): 665-668.
- [2] 徐理忠, 王拥军, 施杞. 成人颈椎间盘退变机理研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(9): 526-528.
- [3] Roberts S, Urban JP, Evans H, et al. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1996, 21(4): 415-420.
- [4] Peng B, Hou S, Shi Q, et al. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study [J]. Chin Med J, 2001, 114(3): 308-312.
- [5] Brown KR, Polintine P, Adams MA. Biomechanical implications of degenerative joint disease in the apophyseal joints of human thoracic and lumbar vertebrae [J]. Am J Phys Anthropol, 2008, 136(3): 318-326.
- [6] Boyd LM, Carter AJ. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc [J]. Eur Spine J, 2006, 15(Suppl 3): 414-421.
- [7] Buser Z, Kuelling F, Liu J, et al. Biological and biomechanical effects of fibrin injection into porcine intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(18): 1201-1209.
- [8] Goupille P, Mulleman D, Chevalier X. Is interleukin-1 a good target for therapeutic intervention in intervertebral disc degeneration: lessons from the osteoarthritic experience [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(6): 110.
- [9] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): 732-745.
- [10] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain [J]. Rheu-

matology (Oxford), 2009, 48(1):5-10.

- [[1] Valdes AM, Hassett G, Hart DJ, et al. Radiographic progression of lumbar spine disc degeneration is influenced by variation at inflammatory genes: a candidate SNP association study in the Chingford cohort [[]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(21):2445-2451.
- [[2] Gorth DJ, Mauck RL, Chiaro JA, et al. IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro [[. Arthritis Res Ther, 2012, 14(4):R179.
- [[3] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 补骨脂素的植物雌激素

作用及其机制探讨 [[. 中国中药杂志, 2008, 33(1):59-63.

- [[4] 武密山, 赵素芝, 任立中, 等. 补骨脂素对成骨细胞核因子 κ B 受体激活配体和骨保护素表达的影响 [[. 中国老年医学杂志, 2012, 32(1):66-69.
- [[5] 王建华, 王艳, 潘永梅. 补骨脂素对体外培养的成骨细胞增殖和分化的影响 [[. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5):844-846.
- [[6] 张润荃, 史凤芹, 庞淑珍. 补骨脂素对破骨细胞的作用 [[. 现代口腔医学杂志, 1995, 9(3):136-138.

Effect of Psoralens on Cartilage Degeneration in Lumbar Intervertebral Disc of Rats

YAO Changfeng¹, ZHANG Xiaojun¹, YANG Yonghui¹, BAI Liangchuan¹, ZHAO Yongjian², WANG Hongshen², SHU Bing², YANG Yanping², SHI Qi², WANG Yongjun²

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Province 230038; 2. Institute of Spinal Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Psoralens on cartilage degeneration in lumbar intervertebral disc of rats induced by interleukin-1 β (IL-1 β) and research its internal mechanism of delaying disc degeneration.

Methods The cartilages of lumbar intervertebral disc in 1-month-old female SD rats were isolated in vitro. The cells were cultured by tissue explant method and the cells were identified by HE staining, toluidine blue staining and immunofluorescence. The optimal concentration of Psoralens was screened by cell proliferation assay and RT-PCR method. The 3rd generation cartilage cells were selected and placed in a 6-well plate at a concentration of 1×10^5 /well. The cells were divided into the blank control group, IL-1 β -induced group (10 ng/ml IL-1 β) and Psoralens group (10 ng/ml IL-1 β , added with the optimal concentration of Psoralens), with 3 wells in each group. The expressions of type II collagen gene (Col2a1), Aggrecan, A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 5 (ADAMTS-5), IL-1 β and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA were detected. **Results** Comparing with concentration of zero, the cell activity of Psoralens was significantly weakened at concentrations of 100, 150, 200 and 400 μ M ($P < 0.01$). Comparing with concentration of zero, the expression of Col2a1 mRNA was significantly increased at concentrations of 12.5 and 25 μ M ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of Aggrecan mRNA in the Psoralens group was significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.01$). Comparing with the IL-1-induced group, the expression of Col2a1 mRNA was significantly increased but the expression of ADAMTS-5 mRNA was significantly decreased in the Psoralens group ($P < 0.01$). **Conclusion** Psoralens can alleviate IL-1 β -induced cartilage degeneration of intervertebral disc and affect the related factors of IL-1 β signaling pathway

Keywords Psoralens; interleukin-1 β ; chondrocytes; disc degeneration

(收稿日期: 2013-09-05; 修回日期: 2013-10-15)

编辑: 邓 媛