

牛膝含药血清对骨关节炎软骨细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的影响

周江涛¹, 王庆来¹, 赵依娜¹, 吴惠明¹, 王维佳², 徐海孺²

(1. 浙江省温州市中医院, 浙江 温州 325000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:探讨牛膝含药血清对骨关节炎软骨细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的影响。方法:将 20 只雄性新西兰大白兔随机分为空白对照组、模型组、P38 阻断剂组及含药血清组,每组 5 只。分组后含药血清组大白兔以牛膝水煎剂灌胃($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),其余各组以等量生理盐水灌胃,每天 2 次,共 3 d。3 d 后静脉采血,分别配成 10% 含药血清和 10% 空白血清的 DMEM 培养液保存备用。除空白对照组外,其余各组大白兔均采用 Hulth 法行兔膝关节炎造模,空白对照组行假手术。造模成功后处死实验兔分离兔膝关节软骨进行软骨细胞培养,对空白对照组、模型组的第 3 代软骨细胞以空白血清进行干预,P38 阻断剂组以 SB203580 进行干预,含药血清组以牛膝含药血清进行干预。血清干预结束后,分别采用免疫荧光技术和 Western Blot 技术检测各组软骨细胞磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶及 II 型胶原蛋白含量。结果:①免疫荧光检测结果。各组细胞均有磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶阳性表达,其中模型组呈强阳性表达,P38 阻断剂组及含药血清组略弱,空白对照组最弱;各组细胞均有 II 型胶原蛋白阳性表达,其中空白对照组呈强阳性表达,P38 阻断剂组及含药血清组略弱,模型组最弱。②Western Blot 检测结果。各组磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶含量比较,差异有统计学意义($F=3.872, P=0.038$)。进一步两两比较,空白对照组(0.463 ± 0.007)小于模型组(0.856 ± 0.007)、P38 阻断剂组(0.576 ± 0.005)及含药血清组(0.508 ± 0.004),差异有统计学意义($P=0.008; P=0.036; P=0.042$);模型组大于 P38 阻断剂组和含药血清组($P=0.025; P=0.019$);P38 阻断剂组与含药血清组比较,差异无统计学意义($P=0.058$)。各组细胞 II 型胶原蛋白含量比较,差异有统计学意义($F=3.963, P=0.034$)。进一步两两比较,空白对照组(0.884 ± 0.007)大于模型组(0.434 ± 0.007)、P38 阻断剂组(0.616 ± 0.003)及含药血清组(0.565 ± 0.008),差异有统计学意义($P=0.007; P=0.031; P=0.038$);模型组小于 P38 阻断剂组和含药血清组($P=0.035; P=0.028$);P38 阻断剂组与含药血清组比较,差异无统计学意义($P=0.066$)。结论:牛膝含药血清能阻断骨关节炎软骨细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路,进而保护软骨细胞,其效果与 SB203580 相当。

关键词 骨关节炎 软骨细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶类 胶原 II 型 信号传导 牛膝

Effect of achyranthes bidentata medicated serum on signal transduction pathway of p38 mitogen-activated protein kinases within osteoarthritis chondrocytes ZHOU Jiang-tao*, WANG Qing-lai, ZHAO Yi-na, WU Hui-ming, WANG Wei-jia, XU Hai-ru. * Traditional Chinese Medical Hospital of Wenzhou City, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effect of achyranthes bidentata medicated serum on signal transduction pathway of p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) within osteoarthritis chondrocytes. **Methods:** Twenty male New Zealand rabbits were randomly divided into blank control group, model group, p38 blocker group and medicated serum group, 5 cases in each group. After grouping, rabbits in the medicated serum group were intragastric administrated with achyranthes bidentata decoction ($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), while the others in the rest 3 groups were all intragastric administrated with equivalent normal saline, twice a day for 3 days. Then blood were drawn from vein and were prepared into DMEM culture solution with 10% medicated serum and 10% blank serum respectively for standby application. The rabbits in each group were all built models of knee osteoarthritis through Hulth method except for cases in the blank control group which were carried out sham operation. After successful modeling, all of the rabbits were executed and their knee articular cartilages were separated for chondrocytes culture. The 3-generation chondrocytes in blank control group and model group were intervened with blank serum, those in p38 blocker group were intervened with SB203580 and those in medicated serum group were intervened with achyranthes bidentata medicated serum. After serum intervention, the contents of phosphorylated p38 MAPK and collagen protein type II in chondrocytes for all the groups were detected through immunofluorescence technique and Western Blot technique respectively. **Results:** ①Results of immunofluorescence detection:

positive expressions of phosphorylated p38 MAPK were found in all the groups, strong positive expression was found in model group, slightly weak positive expression was found in p38 blocker group, and medicated serum group, and most weak positive expression was found in the blank control group. Positive expressions of collagen type II were found in cells of all of the groups, strong positive expression was found in blank control group, slightly weak positive expression in p38 blocker group and medicated serum group, and most weak positive expression in the model group. ②Western Blot test results: there was statistical difference in phosphorylated p38 MAPK contents among the 4 groups ($F = 3.872, P = 0.038$). As the results of further pairwise comparison showed, the phosphorylated p38 MAPK content of blank control group (0.463 ± 0.007) was less than that of model group (0.856 ± 0.007), p38 blocker group (0.576 ± 0.005) and medicated serum group (0.508 ± 0.004) respectively, and there was statistical difference between them ($P = 0.008; P = 0.036; P = 0.042$); and phosphorylated p38 MAPK content of model group was more than that of p38 blocker group and medicated serum group respectively ($P = 0.025; P = 0.019$); while there was no statistical difference between p38 blocker group and medicated serum group ($P = 0.058$). There was statistical difference in collagen type II contents among the 4 groups ($F = 3.963, P = 0.034$). Further pairwise comparison showed that the content of collagen type II of blank control group (0.884 ± 0.007) was more than that of model group (0.434 ± 0.007), p38 blocker group (0.616 ± 0.003) and medicated serum group (0.565 ± 0.008) respectively, and there was statistical difference between them ($P = 0.007; P = 0.031; P = 0.038$); and the content of collagen type II of model group was less than that of p38 blocker group and medicated serum group respectively ($P = 0.035; P = 0.028$); while there was no statistical difference between p38 blocker group and medicated serum group ($P = 0.066$). **Conclusion:** The achyranthes bidentata medicated serum can block the signal transduction pathway of p38 MAPK within osteoarthritis chondrocytes, and then protect chondrocytes, and it has the comparable effect of SB203580.

Key words Osteoarthritis; Chondrocytes; p38 mitogen-activated protein kinases; Collagen type II; Signal transduction; Achyranthes bidentata

高能量创伤后的关节内骨折和老年退行性变引起的骨关节炎 (osteoarthritis, OA), 其病理基础是关节软骨的损伤和退变。研究表明, P38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路可能参与了软骨细胞退变、凋亡的过程^[1-4]。牛膝是中医运用补肾活血法治疗“骨痹”的常用药物, 为了研究它对 OA 软骨细胞 P38MAPK 信号转导通路的影响, 我们进行了相应的实验研究, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 3 月龄雄性新西兰大白兔 20 只, 体质量 2.5 kg 左右, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: 浙实动单字第 2006138 号。

1.2 实验药物及试剂 中药牛膝; SB203580 (Promega 公司); 兔抗 P38MARK、兔抗 GAPDH (Santa cruz 公司); II 型胶原酶、0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA、DMEM/F-12 细胞培养液 (Gibco 公司)。

1.3 实验仪器 超净工作台、CO₂ 恒温培养箱、分光倒置显微镜、台式离心机、超低温冰箱、培英 DSHZ-300A 旋转式恒温振荡仪、Western Blot 灌胶模具 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 20 只大白兔随机分为空白对照

组、模型组、P38 阻断剂组及含药血清组, 每组 5 只。

2.2 含药血清制备 含药血清组大白兔按 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 牛膝水煎剂灌胃, 每次 20 mL; 其余各组以等量生理盐水灌胃。每天 2 次, 共 3 d。于末次灌胃后 1 h 静脉采血, 经离心、分离血清、水浴灭活及滤器除菌后分别配成 10% 含药血清和 10% 空白血清的 DMEM 培养液, 4 °C 保存备用。

2.3 动物造模 除空白对照组外, 其余各组均采用 Hulth 法^[5]行兔膝关节关节炎造模, 即由兔膝关节内侧入路切断内侧副韧带后, 打开关节囊, 摘除内侧半月板, 离断前交叉韧带, 然后逐层缝合; 空白对照组切开皮肤、膝关节囊后逐层缝合切口。术后以青霉素 40 万单位肌注, 每天 2 次, 连续 3 d。待切口愈合后, 每天驱赶动物行走 1 h, 共计 60 d。

2.4 细胞分离培养及鉴定 造模成功后处死实验兔, 仔细分离兔膝关节软骨, 切成约 1 mm^3 的碎块。用 D-Hanks 液清洗后加入胰蛋白酶 + EDTA 溶液, 37 °C 震荡水浴加热。以 DMEM/F12 培养基终止消化, 加入 II 型胶原酶, 置入 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中消化后, 用 200 目细胞筛过滤, 再将获得的关节软骨细胞接种于 DMEM/F12 培养基中培养。镜下观察细胞生长状况, 隔天换液, 原代细胞 5 d 左右铺满单层, 以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 溶液消化传代, 传代细胞 3 d 左右融合成单层。将各组第 3 代软骨细胞

以 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔细胞培养板中。

2.5 血清干预 待各组细胞融合成单层后,换不含血清的 DMEM 溶液培养 24 h,再以 D-Hanks 液清洗 3 遍后进行药物干预。空白对照组和模型组加入含 10% 空白血清的 DMEM 溶液培养 48 h;P38 阻断剂组加入含 10% 空白血清的 DMEM 溶液培养 48 h,以 D-Hanks 液清洗 3 遍后按 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以 SB203580 干预 1 h;含药血清组加入含 10% 含药血清的 DMEM 溶液培养 48 h。

2.6 指标检测 血清干预结束后分别采用免疫荧光技术和 Western Blot 技术检测各组软骨细胞磷酸化 P38MAPK 与 II 型胶原蛋白。

2.7 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件对所得数据进行统计分析,4 组细胞磷酸化 P38MAPK 与 II 型胶原蛋白含量的比较采用方差分析,各组间的两两比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 免疫荧光检测结果 ①磷酸化 P38MAPK:细胞爬片免疫荧光显示,各组细胞均有磷酸化 P38MAPK 阳性表达,其中模型组呈强阳性,P38 阻断剂组及含药血清组略弱,空白对照组最弱(图 1)。②II 型胶原蛋白:细胞爬片免疫荧光显示,各组细胞均有 II 型胶原蛋白阳性表达,其中空白对照组呈强阳性,P38 阻断剂组及含药血清组略弱,模型组最弱(图 2)。

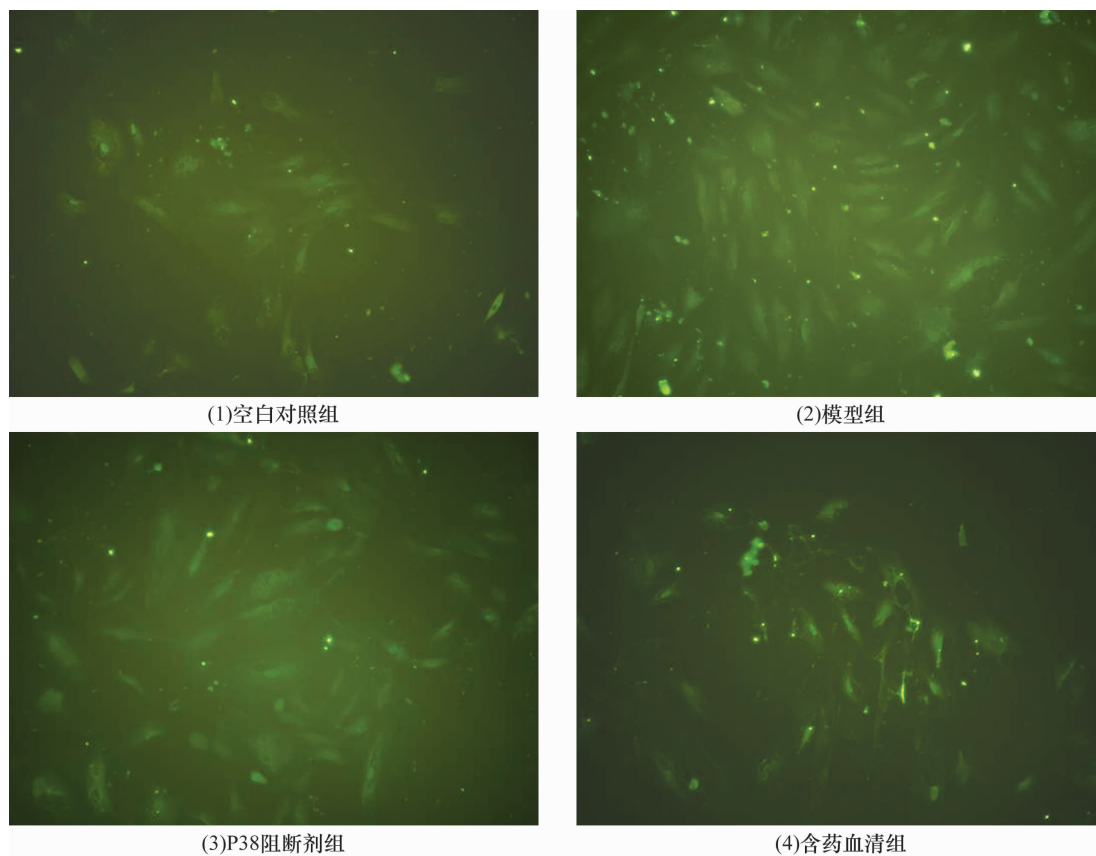


图 1 各组膝关节软骨细胞磷酸化 P38MAPK 免疫荧光检测结果 ($\times 200$)

(1)空白对照组阳性表达细胞约占 30% (2)模型组阳性表达细胞占 90% 以上 (3)P38 阻断剂组阳性表达细胞约占 50% (4)含药血清组阳性表达细胞约占 50%

3.2 Western Blot 检测结果 ①磷酸化 P38MAPK:各组磷酸化 P38MAPK 含量比较,差异有统计学意义。进一步两两比较,空白对照组小于模型组、P38 阻断剂组及含药血清组 ($P = 0.008$; $P = 0.036$; $P = 0.042$);模型组大于 P38 阻断剂组和含药血清组 ($P = 0.025$; $P = 0.019$);P38 阻断剂组与含药血清组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.058$)。②II 型胶原蛋

白:各组细胞 II 型胶原蛋白含量比较,差异有统计学意义。进一步两两比较,空白对照组大于模型组、P38 阻断剂组及含药血清组 ($P = 0.007$; $P = 0.031$; $P = 0.038$);模型组小于 P38 阻断剂组和含药血清组 ($P = 0.035$; $P = 0.028$);P38 阻断剂组与含药血清组比较,差异无统计学意义 ($P = 0.066$)。(表 1)

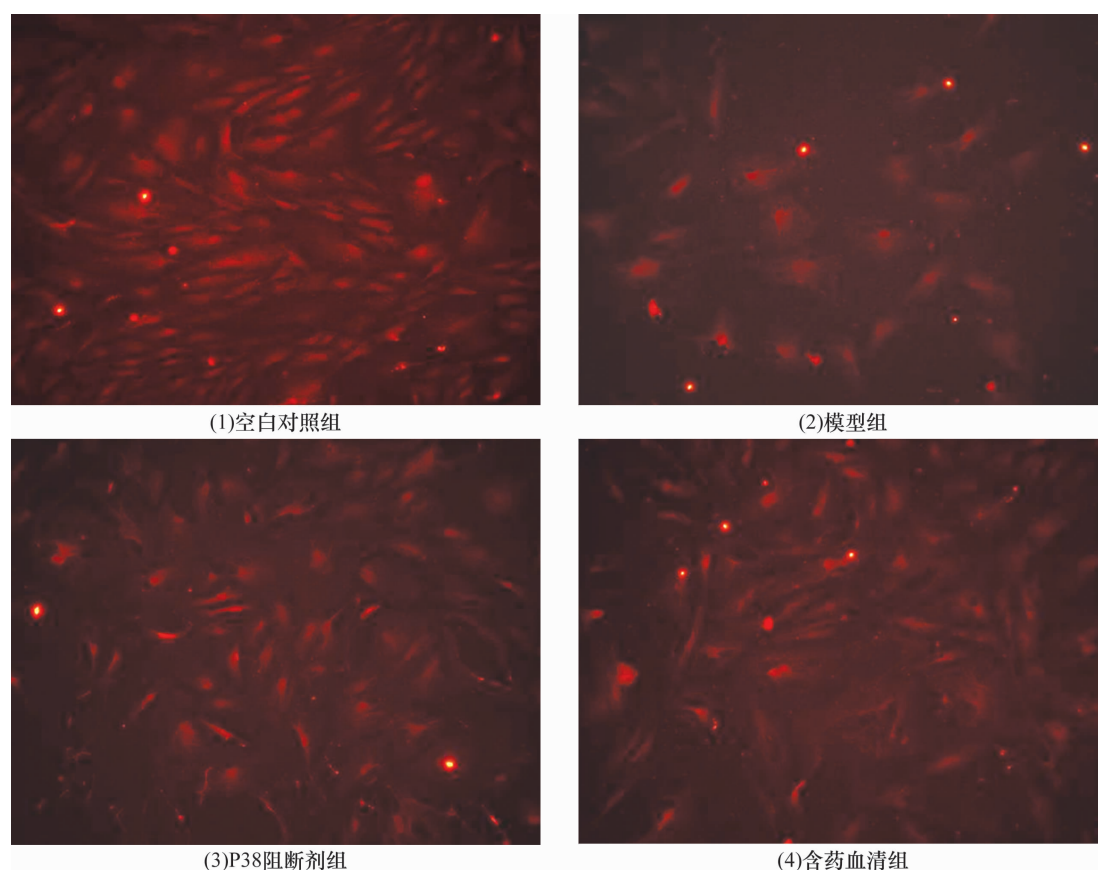


图 2 各组膝关节软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白免疫荧光检测结果(×200)

(1)空白对照组阳性表达细胞约占 90% (2)模型组阳性表达细胞约占 40% (3)P38 阻断剂组阳性表达细胞约占 60% (4)含药血清组阳性表达细胞约占 50%

表 1 各组膝关节软骨细胞中磷酸化 P38MAPK 和Ⅱ型胶原蛋白的表达情况

组别	磷酸化 P38MAPK	Ⅱ型胶原蛋白
空白对照组	0.463 ± 0.007	0.884 ± 0.007
模型组	0.856 ± 0.007	0.434 ± 0.007
P38 阻断剂组	0.576 ± 0.005	0.616 ± 0.003
含药血清组	0.508 ± 0.004	0.565 ± 0.008
F 值	3.872	3.963
P 值	0.038	0.034

4 讨 论

Ⅱ型胶原蛋白是软骨的主要成分^[6],它在软骨基质中形成的纤维直径较小,这些细小的胶原纤维在软骨中形成纤细的网状结构,使胶原能最大限度地分布在蛋白多糖中,这对软骨负重所需的机械稳定性极为重要。纤维网架结构构成软骨的骨架,如遭到破坏,软骨就不能维持正常的结构和功能。因此,OA 的发病可能与软骨细胞的破坏及Ⅱ型胶原蛋白的降解密切相关。

在体外培养的软骨细胞实验中,已证明多种细胞因子、激素、调节剂、药物等对软骨细胞的合成有影

响^[7-8]。当关节软骨发生退变后,软骨细胞及其基质的组成和代谢均发生相应变化,而 P38MAPK 信号转导通路可能参与了这一过程。当细胞外刺激作用于细胞后,即可引起 P38MAPK 磷酸化,磷酸化的 P38MAPK 随即转位到细胞核,激活转录因子,启动相关基因的表达^[9]。关节软骨细胞中的 P38MAPK 信号转导通路被多种机械因素和内环境因素激活后,促进了软骨的破坏,具体的生物学效应包括:①加速软骨细胞凋亡;②影响软骨基质合成;③加速软骨细胞肥大化及钙化进程;④促进基质金属蛋白酶合成;⑤增加环氧化酶-2、前列腺素 E2 的表达而致痛;⑥通过诱导 NO、白细胞介素-1、白细胞介素-6 等致炎因子的产生,使关节软骨的内环境形成恶性循环^[7-8,10]。

中医学认为 OA 的发病原因主要包括肝肾亏虚,气血不足,风、寒、湿、热等外邪侵袭以及跌仆闪挫等。肾精不足,肝血亏虚,加之外邪侵袭,引起气血运行不畅,局部经络痹阻,筋挛拘急,治疗以补肾活血法最为常见。牛膝是中医运用补肾活血法治疗 OA 的常用药物,其主要成分甾酮类化合物能改善肝功能,降低

血浆胆固醇,且有较强的蛋白质合成促进作用,能显著提高氨基酸合成蛋白质的能力^[11-12]。

本研究中免疫荧光检测和 Western Blot 检测结果均提示牛膝含药血清和 SB203580 均能阻断 OA 软骨细胞 P38MAPK 信号转导通路,进而保护软骨细胞,而且二者的疗效相当。

5 参考文献

- [1] 李晶,李忠,莫宝庆. ERK5 MAPK 信号转导通路研究进展[J]. 医学分子生物学杂志,2005,2(4):288-291.
- [2] 彭文芳,张秀珍. MAPK 信号转导通路与破骨细胞[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,3(3):127-129.
- [3] Joos H, Albrecht W, Laufer S, et al. Differential effects of p38MAP kinase inhibitors on the expression of inflammation-associated genes in primary, interleukin-1 beta-stimulated human chondrocytes [J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(5):1252-1262.
- [4] Radons J, Bosserhoff AK, Grässel S, et al. p38MAPK mediates IL-1-induced down-regulation of aggrecan gene expression in human chondrocytes [J]. Int J Mol Med, 2006, 17(4):661-668.
- [5] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis

in rabbits. Preliminary report [J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5):522-530.

- [6] Christgau S, Garnero P, Fledelius C, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation [J]. Bone, 2001, 29(3):209-215.
- [7] 王贤波,蒋青. p38 MAPK 信号转导途径在关节软骨细胞中的激活和作用 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1):46-48.
- [8] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. Nature, 2001, 410(6824):37-40.
- [9] Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury [J]. Lab Invest, 1999, 79(10):1181-1199.
- [10] 唐皓,马中富. p38 MAPK 信号转导通路研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2004, 4(4):501-504.
- [11] 马英,车镇涛,毕开顺,等. 反相高效液相色谱法测定牛膝中羟基促蜕皮甾酮的含量 [J]. 药学学报, 2000, 35(4):313-315.
- [12] 朱婷婷,梁鸿,赵玉英,等. 牛膝甾酮 25 位差向异构体的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 2004, 39(11):913-916.

(2011-11-29 收稿 2012-05-31 修回)

· 通 知 ·

全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任导师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上,结合三氧治疗仪所研发的新技术,研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利,并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材),出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期,来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求,现继续举办以下研修、学习班:

水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:由吴汉卿教授主要传授:水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法,结合尸体刀法入路、水针刀挂图,有专科医院手术病人治疗,同时讲解影像诊断,保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症,对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

中华筋骨三针法学习班:中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上,根据人体生物力学,提出了人体软组织立体三角平衡学说,创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗:颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

脊柱九病区药磁线植入技术:传授独特的脊背九大诊疗区,临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法,快速治疗脊柱相关病,如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫病、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

其他:参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号:390206006)

开学时间:每月 1 日开课,需提前 2 日报到

报到地址:河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

邮政编码:473000 **联系电话:**0377-63282507,13721820657 **联系人:**黄建

网址:www.shuizhendao.com **邮箱:**shuizhendao@163.com