

· 基础研究 ·

透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素诱导的内质网应激(PEKR 信号通路)介导的大鼠体外培养关节软骨细胞凋亡的影响

叶锦霞,付长龙,林洁,吴广文,郑春松,陈俊,叶蕪芝

(福建中医药大学,福建 福州 350122)

摘要 目的:观察透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)诱导的内质网应激(PEKR 信号通路)介导的大鼠体外培养关节软骨细胞凋亡的影响。方法:采用 4 周龄 SD 大鼠膝关节软骨建立软骨细胞体外培养体系,将培养的第 3 代软骨细胞分为空白组、模型组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组。空白组不进行干预;模型组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组先以 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 干预 4 h,然后模型组更换为正常培养基,透骨消痛胶囊高、中、低剂量组分别更换为浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含透骨消痛胶囊培养基干预 24 h。干预后以 MTT 法检测各组软骨细胞活性、以 Annexin V - FITC/PI 双染法流式细胞术检测各组软骨细胞凋亡率、以 Western Blot 法检测各组软骨细胞中激活转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)、结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, BIP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12(cysteine aspartate specific protease 12, Caspase12)和 Caspase3 的表达量。结果:①软骨细胞活性。5 组软骨细胞吸光度比较,差异有统计学意义(0.428 ± 0.009 , 0.226 ± 0.028 , 0.345 ± 0.025 , 0.301 ± 0.035 , 0.269 ± 0.033 , $F = 39.462$, $P = 0.000$)。模型组吸光度低于空白组($P = 0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组吸光度均高于模型组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.022$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的吸光度均低于高剂量组($P = 0.019$, $P = 0.000$);透骨消痛胶囊低剂量组与中剂量组比较,差异无统计学意义($P = 0.085$)。②软骨细胞凋亡率。5 组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义[(3.270 ± 0.231)%, (30.003 ± 4.128)%, (12.383 ± 0.933)%, (15.387 ± 2.961)%, (20.143 ± 3.472)%, $F = 37.560$, $P = 0.000$]。模型组软骨细胞凋亡率高于空白组($P = 0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组软骨细胞凋亡率均低于模型组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.001$);透骨消痛胶囊低剂量组软骨细胞凋亡率低于高剂量组($P = 0.007$),透骨消痛胶囊高、低剂量组与中剂量组比较,差异均无统计学意义($P = 0.216$, $P = 0.063$)。③软骨细胞内质网应激(PEKR 信号通路)关键蛋白含量。5 组软骨细胞中 ATF4 含量比较,差异有统计学意义(0.257 ± 0.028 , 0.435 ± 0.033 , 0.315 ± 0.023 , 0.276 ± 0.038 , 0.351 ± 0.043 , $F = 13.057$, $P = 0.001$)。空白组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 ATF4 含量均低于模型组($P = 0.000$, $P = 0.001$, $P = 0.000$, $P = 0.012$);透骨消痛胶囊低剂量组的 ATF4 含量高于中剂量组($P = 0.022$);透骨消痛胶囊高剂量组的 ATF4 含量与透骨消痛胶囊中、低剂量组比较,差异均无统计学意义($P = 0.188$, $P = 0.229$)。5 组软骨细胞中 BIP 含量比较,差异有统计学意义(0.227 ± 0.026 , 0.432 ± 0.022 , 0.294 ± 0.035 , 0.263 ± 0.020 , 0.339 ± 0.032 , $F = 25.416$, $P = 0.000$)。空白组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 BIP 含量均低于模型组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$);透骨消痛胶囊低剂量组的 BIP 含量高于中剂量组($P = 0.006$);透骨消痛胶囊高剂量组的 BIP 含量与透骨消痛胶囊中、低剂量组比较,差异均无统计学意义($P = 0.185$, $P = 0.072$)。5 组软骨细胞中 Caspase12 含量比较,差异有统计学意义(0.252 ± 0.027 , 0.346 ± 0.028 , 0.294 ± 0.011 , 0.315 ± 0.024 , 0.325 ± 0.019 , $F = 7.345$, $P = 0.005$)。模型组的 Caspase12 含量高于空白组($P = 0.001$);透骨消痛胶囊高剂量组的 Caspase12 含量低于模型组($P = 0.018$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量与模型组比较,差异均无统计学意义($P = 0.126$, $P = 0.277$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量与高剂量组比较,差异均无统计学意义($P = 0.277$, $P = 0.126$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量比较,差异无统计学意义($P = 0.614$)。5 组软骨细胞中 Caspase3 含量比较,差异有统计学意义(0.265 ± 0.028 , 0.380 ± 0.017 , 0.317 ± 0.026 , 0.304 ± 0.019 , 0.333 ± 0.022 , $F = 10.507$, $P = 0.001$)。模型组的 Caspase3 含量高于空白组($P = 0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 Caspase3 含量均低于模型组($P = 0.006$, $P = 0.002$, $P = 0.029$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase3 含量与高剂量组比较,差异均无统计学意义($P = 0.496$, $P = 0.387$),透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase3 含量比较,差异无统计学意义($P = 0.138$)。结论:透骨消痛胶囊能抑制 TG 诱导的大鼠体外培养关节软骨细胞发生由内质网应激(PEKR 信号通路)介导的细胞凋亡,其作用效果与药物剂量无明显关系。

关键词 骨关节炎;透骨消痛胶囊;软骨细胞;软骨;关节;凋亡;内质网应激;毒胡萝卜素;大鼠;动物实验

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81202836);福建省自然科学基金项目(2016J01779)

通讯作者:叶蕪芝 E-mail:yelin0930@163.com

Effect of Tougu Xiaotong Jiaonang (透骨消痛胶囊) on apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress (PEKR signaling pathway) and induced by thapsigargin in rat's articular chondrocytes cultured in vitro

YE Jinxia, FU Changlong, LIN Jie, WU Guangwen, ZHENG Chunsong, CHEN Jun, YE Hongzhi

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350112, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Tougu Xiaotong Jiaonang (透骨消痛胶囊, TGXTJN) on apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress (PEKR signaling pathway) and induced by thapsigargin (TG) in rat's articular chondrocytes cultured in vitro.

Methods: The knee cartilage of 4-week-old SD rats were used to build the in-vitro cultivation system of chondrocytes, and the third-generation chondrocytes of SD rats cultured in vitro were divided into blank group, model group, TGXTJN high-dose group, TGXTJN middle-dose group and TGXTJN low-dose group. The cells in blank group were not be treated and the cells in other groups were treated with TG (2 $\mu\text{mol/L}$) for 4 hours. Then the cells in model group were cultured in normal nutritive medium, and the cells in TGXTJN high-, middle- and low-dose group were cultured in nutritive medium supplemented with TGXTJN with concentration of 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ respectively for 24 hours. After the end of intervention, the chondrocyte activities were detected by using MTT method, the apoptosis rates of chondrocytes were detected by using Annexin V-FITC/PI double-staining flow cytometry (FCM), and the expressions of activating transcription factor 4 (ATF4), binding immunoglobulin protein (BIP), cysteine aspartate specific protease 12 (Caspase12) and Caspase3 in chondrocytes were detected by using Western Blot assays. **Results:** There was statistical difference in the absorbance of chondrocytes between the 5 groups (0.428 \pm 0.009, 0.226 \pm 0.028, 0.345 \pm 0.025, 0.301 \pm 0.035, 0.269 \pm 0.033, $F = 39.462$, $P = 0.000$). The absorbance of chondrocytes were lower in model group compared to blank group ($P = 0.000$) and were higher in TGXTJN high-, middle- and low-dose group compared to model group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.022$) and were lower in TGXTJN middle- and low-dose group compared to TGXTJN high-dose group ($P = 0.019$, $P = 0.000$). There was no statistical difference in absorbance of chondrocytes between TGXTJN low-dose group and TGXTJN middle-dose group ($P = 0.085$). There was statistical difference in apoptosis rate of chondrocytes between the 5 groups (3.270 \pm 0.231, 30.003 \pm 4.128, 12.383 \pm 0.933, 15.387 \pm 2.961, 20.143 \pm 3.472%, $F = 37.560$, $P = 0.000$). The apoptosis rate of chondrocytes was higher in model group compared to blank group ($P = 0.000$) and were lower in TGXTJN high-, middle- and low-dose group compared to model group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.001$) and was lower in TGXTJN low-dose group compared to TGXTJN high-dose group ($P = 0.007$). There was no statistical difference in apoptosis rate of chondrocytes between TGXTJN high-dose group and TGXTJN middle-dose group and between TGXTJN low-dose group and TGXTJN middle-dose group ($P = 0.216$, $P = 0.063$). There was statistical difference in contents of ATF4 in chondrocytes between the 5 groups (0.257 \pm 0.028, 0.435 \pm 0.033, 0.315 \pm 0.023, 0.276 \pm 0.038, 0.351 \pm 0.043, $F = 13.057$, $P = 0.001$). The ATF4 contents were lower in blank group and TGXTJN high-, middle- and low-dose group compared to model group ($P = 0.000$, $P = 0.001$, $P = 0.000$, $P = 0.012$) and were higher in TGXTJN low-dose group compared to TGXTJN middle-dose group ($P = 0.022$). There was no statistical difference in ATF4 contents between TGXTJN high-dose group and TGXTJN middle-dose group and between TGXTJN high-dose group and TGXTJN low-dose group ($P = 0.188$, $P = 0.229$). There was statistical difference in contents of BIP in chondrocytes between the 5 groups (0.227 \pm 0.026, 0.432 \pm 0.022, 0.294 \pm 0.035, 0.263 \pm 0.020, 0.339 \pm 0.032, $F = 25.416$, $P = 0.000$). The BIP contents were lower in blank group, TGXTJN high-, middle- and low-dose group compared to model group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$). The BIP contents were higher in TGXTJN low-dose group compared to TGXTJN middle-dose group ($P = 0.006$). There was no statistical difference in BIP contents between TGXTJN high-dose group and TGXTJN middle-dose group and between TGXTJN high-dose group and TGXTJN low-dose group ($P = 0.185$, $P = 0.072$). There was statistical difference in contents of Caspase 12 in chondrocytes between the 5 groups (0.252 \pm 0.027, 0.346 \pm 0.028, 0.294 \pm 0.011, 0.315 \pm 0.024, 0.325 \pm 0.019, $F = 7.345$, $P = 0.005$). The Caspase 12 contents were higher in model group compared to blank group ($P = 0.001$) and TGXTJN high-dose group ($P = 0.018$). There was no statistical difference in Caspase 12 contents between TGXTJN middle-dose group and model group and between TGXTJN low-dose group and model group ($P = 0.126$, $P = 0.277$). There was no statistical difference in Caspase 12 contents between TGXTJN middle-dose group and TGXTJN high-dose group and between TGXTJN low-dose group and TGXTJN high-dose group ($P = 0.277$, $P = 0.126$). There was no statistical difference in Caspase 12 contents between TGXTJN middle-dose group and TGXTJN low-dose group ($P = 0.614$). There was statistical difference in contents of Caspase 3 in chondrocytes between the 5 groups (0.265 \pm 0.028, 0.380 \pm 0.017, 0.317 \pm 0.026, 0.304 \pm 0.019, 0.333 \pm 0.022, $F = 10.507$, $P = 0.001$). The Caspase 3 contents were higher in model group compared to blank group ($P = 0.000$) and were lower in TGXTJN high-, middle- and low-dose group compared to

model group ($P=0.006, P=0.002, P=0.029$). There was no statistical difference in Caspase 3 contents between TGXTJN middle-dose group and TGXTJN high-dose group and between TGXTJN low-dose group and TGXTJN high-dose group ($P=0.496, P=0.387$). There was no statistical difference in Caspase 3 contents between TGXTJN middle-dose group and TGXTJN low-dose group ($P=0.138$). **Conclusion:** TGXTJN can inhibit the apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress (PEKR signaling pathway) and induced by TG in rat's articular chondrocytes cultured in vitro, and its effect bears no obvious relation to its dosage.

Key words osteoarthritis; Tougu Xiaotong Jiaonang; chondrocytes; cartilage, articular; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; thapsigargin; rats; animal experimentation

骨关节炎是一种常见的慢性、进展性骨关节疾病。关节软骨退变是该病发病的中心环节,软骨细胞的凋亡程度与病变程度明显相关。因此,如何有效抑制软骨细胞凋亡可能是防治骨关节炎的途径之一。前期动物实验和临床试验发现,透骨消痛胶囊可延缓膝骨关节炎关节软骨退变,对关节软骨具有很好的保护作用^[1-6]。本研究拟通过观察透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 诱导的体外培养大鼠关节软骨细胞内质网应激 (PEKR 信号通路) 介导的细胞凋亡的影响,初步探讨其防治骨关节炎的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级雄性 4 周龄 SD 大鼠 20 只, 体重 90~100 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物与试剂 透骨消痛胶囊(福建中医药大学附属第二人民医院院内制剂, 批准文号: 闽制字 Z20100006), 药物组成包括巴戟天 12 g、杭白芍 12 g、川芎 6 g、肿节风 6 g。DMEM 培养基、双抗、0.25% 胰蛋白酶 (Hyclone), 胎牛血清、II 型胶原酶 (Gibco), TG (Sigma), 二甲基亚砜 (国药集团), Hoechst33258 (Invitrogen), MTT (Solarbio), Annexin-V-FITC/PI 试剂盒 (BD), 兔抗大鼠激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)、结合免疫球蛋白 (binding immunoglobulin protein, BIP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (cysteine aspartate specific protease 12, Caspase12) 和 Caspase3 抗体 (北京博奥森公司), 山羊抗兔抗体 (北京中杉公司), Western Blot 相关试剂 (碧云天公司)。

1.3 实验仪器 ELX800 酶联免疫检测仪 (BioTek), 流式细胞仪 (BD), 荧光显微镜 (Olympus), Gel Doc XR+ 全自动凝胶成像系统、垂直电泳槽、转移电泳槽 (Bio-rad), RIEA53548 微孔滤器 (MILLIPORE 公司)。

2 方法

2.1 软骨细胞培养及鉴定 取 2 只大鼠脱颈处死, 用 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下游离并截取膝关

节, 置入无菌培养皿, 带入超净工作台操作。先用 PBS 充分漂洗, 刮除关节周围附着的肌肉、脂肪、骨膜、滑膜等组织后以 PBS 充分漂洗。用刀片削取每个关节表面的软骨, 以 PBS 充分漂洗软骨小块 3 次。用手术刀片将切取的关节软骨切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 置入含 5 mL 0.2% II 型胶原酶的玻璃瓶中, 在 37 °C 水浴摇床消化, 每 2 h 吸取 1 次上清液, 120 目尼龙网筛过滤, 所得滤液以 1000 r · min⁻¹ 离心 5 min (离心半径 7 cm), 弃上清, 收集细胞沉淀, 重复 3 次。以 DMEM 完全培养基重悬细胞, 吹打混匀后接种至培养瓶中, 在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中原代培养, 48 h 后倒置显微镜下观察细胞贴壁情况, 2 d 更换 1 次培养液, 直至长成细胞单层, 选第 3 代软骨细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶消化备用。采用甲苯胺蓝染色法对第 3 代软骨细胞进行鉴定。

2.2 软骨细胞分组 将第 3 代软骨细胞以 1 × 10⁵ 个 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 0.1 mL。72 h 后将细胞分为 5 组: 空白组每孔加入正常培养基 100 μL (以胎牛血清、105 单位 · L⁻¹ 青霉素、100 mg · L⁻¹ 链霉素、DMEM 低糖培养基配制), 4 h 后再换新的正常培养基继续作用 24 h; 模型组每孔加入 2 μmol · L⁻¹ TG 的正常培养基 100 μL, 4 h 后再换为正常培养基继续作用 24 h; 透骨消痛胶囊高、中、低剂量组均加入 2 μmol · L⁻¹ TG 的正常培养基 100 μL, 4 h 后分别更换为浓度为 100 μg · mL⁻¹、50 μg · mL⁻¹、25 μg · mL⁻¹ 的含透骨消痛胶囊培养基 (以正常培养基配制) 作用 24 h。

2.3 软骨细胞活性检测 干预后每组选 5 孔, 每孔加入 100 μL MTT 溶液 (0.5 mg · mL⁻¹, 无血清 DMEM 培养基配制, 过滤), 在 37 °C 孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清液。每孔加入 100 μL 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长测定各孔的吸光度^[7] 观察细胞活性。

2.4 软骨细胞凋亡情况检测 干预后每组选 3 孔,

弃除培养基,用 PBS 洗 1 次,加入 4% 多聚甲醛,固定 5 min。弃除固定液,用 PBS 洗 3 遍,每次摇晃 2 min,加入 Hoechst33258 染色液,15 min 后去除染色液,用 PBS 洗 3 遍,每次摇晃 2 min,最后加入少许 PBS,在荧光显微镜下观察软骨细胞形态。

干预后每组选 1 孔,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,1000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 7 cm)。根据 Annexin - V - FITC/PI 试剂盒说明书操作,先加 Binding buffer (1 ×) 100 μL ,重悬至流式管中,再分别加入 5 μL FITC 和 PI,混匀后室温避光 15 min,然后加入 400 μL Binding buffer (1 ×) 混匀。用流式细胞仪检测软骨细胞凋亡率,实验重复 3 次。

2.5 软骨细胞内质网应激 (PEKR 信号通路) 关键蛋白含量测定 干预后每组选 3 孔,用细胞裂解液抽提。将含有等量蛋白的细胞裂解液用样品缓冲液溶解后,将细胞的蛋白样品定量,变性,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,脱脂牛奶封闭 2 h 后洗膜,加入 Bcl - 2 和 Bax (稀释倍数 1:1000) 的一抗以及 β - actin (稀释倍数 1:1000) 作为阳性对照,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡过夜,加入

辣根过氧化物酶标记的二抗后 (稀释倍数 1:25 000) 室温孵育 1 h,然后用含 0.25% tween - 20 的 TBS 洗膜,加入 1:1 的 ECL 发光液,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min,立即曝光,用凝胶成像系统扫描并进行数据分析测定 ATF4、BIP、Caspase12 及 Caspase3 含量。

2.6 数据统计学分析 采用 SPSS16.0 软件进行数据统计学分析,5 组软骨细胞活性、吸光度、ATF4 含量、BIP 含量、Caspase12 含量及 Caspase3 含量的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD - t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 软骨细胞形态

3.1.1 接种后软骨细胞形态 接种后细胞呈圆形,漂浮于培养液中,24 h 后大多数软骨细胞开始贴壁,伸展并形成伪足样突起;第 8 天左右,软骨细胞增殖逐渐融合成单层,呈不规则“铺路石”样;第 2 代、第 3 代软骨细胞形态规则、大小一致,边界清晰;第 3 代软骨细胞进行甲苯胺蓝染色后,可见细胞内蓝紫色异染颗粒,细胞周围可见异染颗粒 (图 1)。

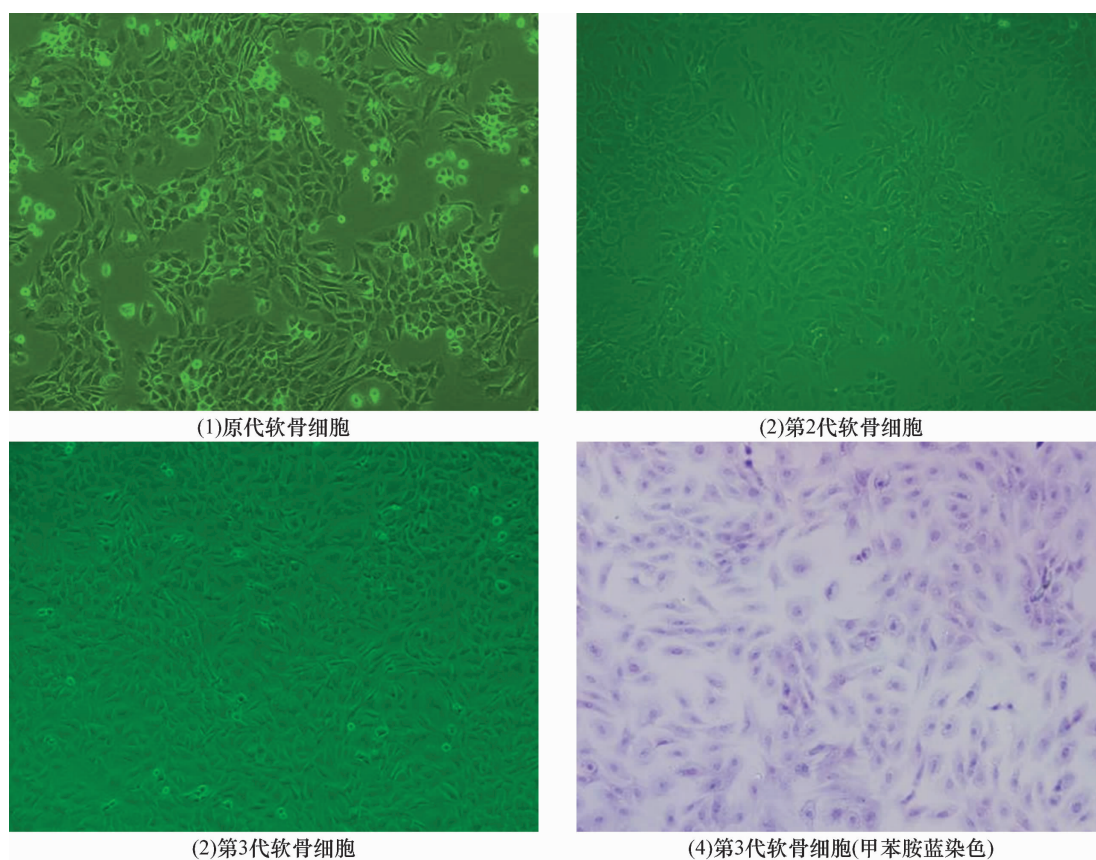


图 1 软骨细胞形态及鉴定结果 ($\times 100$)

3.1.2 干预后软骨细胞形态 干预后透骨消痛胶囊高、中剂量组细胞形态与空白组相似,呈单层铺路石

状生长,无显著性变化;模型组和透骨消痛胶囊低剂量组细胞形态发生明显变化,呈多角形,伪足变长,部

分细胞呈皱缩状态,细胞间隙变大、数量减少(图 2)。

3.2 软骨细胞活性 5 组软骨细胞吸光度比较,差异有统计学意义。模型组吸光度低于空白组($P = 0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组吸光度均高于模型组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.022$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的吸光度均低于高剂量组($P = 0.019, P = 0.000$);透骨消痛胶囊低剂量组与中剂量

组比较,差异无统计学意义($P = 0.085$)。见表 1。

3.3 软骨细胞凋亡情况 荧光显微镜下观察,空白组大部分细胞核均为弥散均匀的低密度亮蓝色荧光;模型组凋亡细胞数量明显增多,且固缩程度比较明显;透骨消痛胶囊各剂量组的凋亡细胞数比模型组明显减少,只有少量凋亡细胞呈高密度的亮蓝色(图 3)。

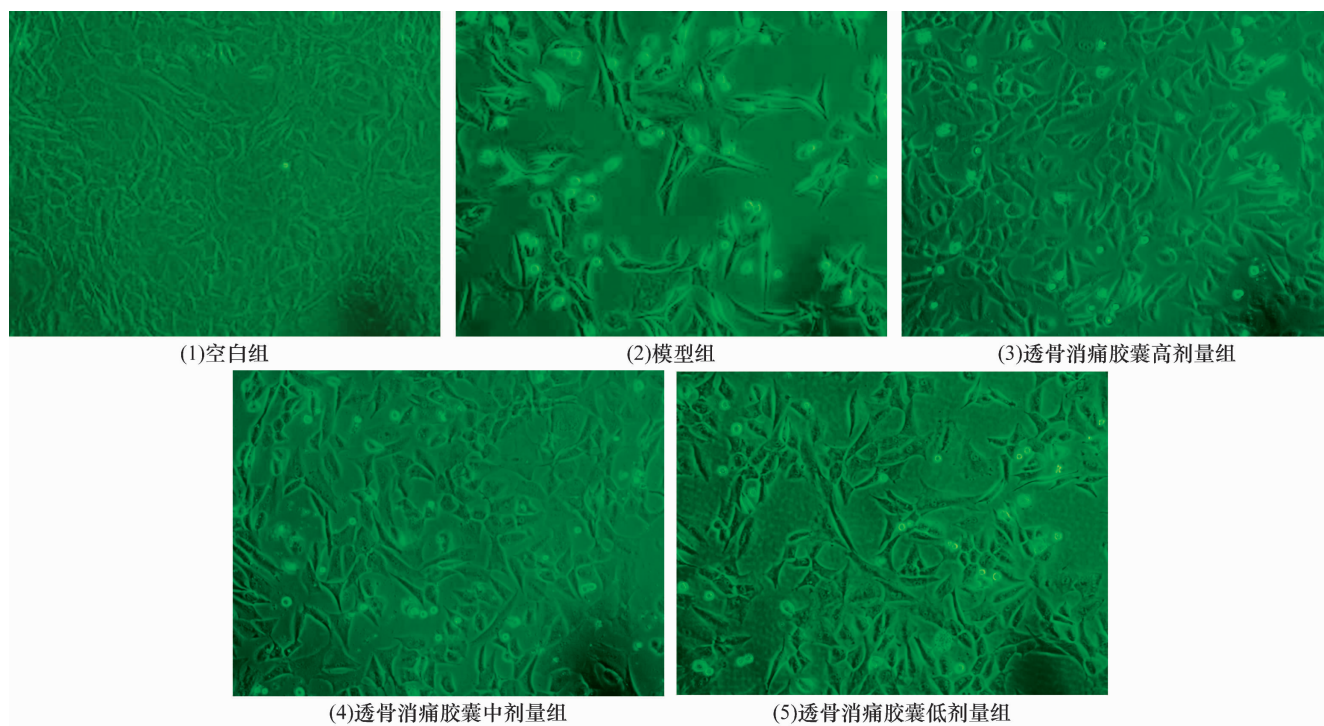


图 2 干预后各组软骨细胞形态($\times 200$)

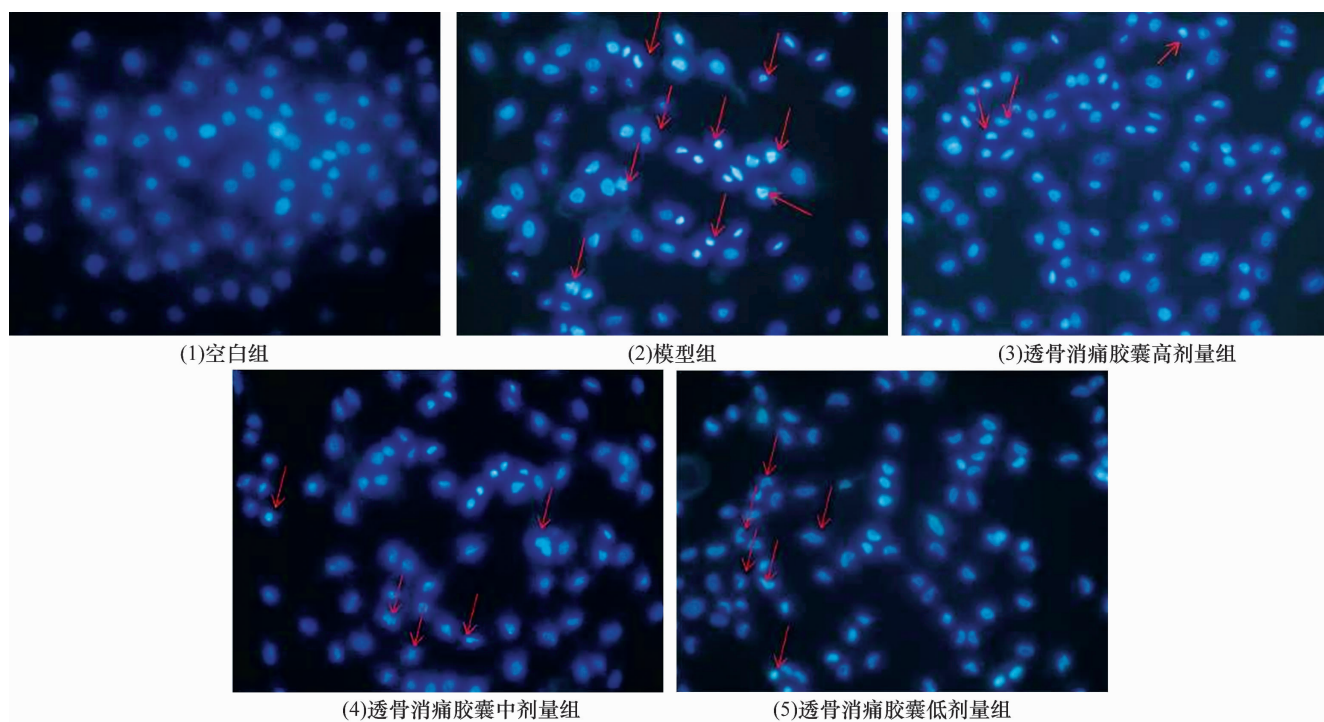


图 3 各组软骨细胞凋亡情况(Hoechst33258 染色 $\times 400$)

5 组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义。模型组软骨细胞凋亡率高于空白组 ($P=0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组软骨细胞凋亡率均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.001$);透骨消痛胶囊低剂量组软骨细胞凋亡率低于高剂量组 ($P=0.007$),透骨消痛胶囊高、低剂量组与中剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.216, P=0.063$)。见表 1。

3.4 软骨细胞内质网应激 (PEKR 信号通路) 关键蛋白含量 5 组软骨细胞中 ATF4 含量比较,差异有统计学意义。空白组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 ATF4 含量均低于模型组 ($P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.012$);透骨消痛胶囊低剂量组的 ATF4 含量高于中剂量组 ($P=0.022$);透骨消痛胶囊高剂量组的 ATF4 含量与透骨消痛胶囊中、低剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.188, P=0.229$)。见表 1。

5 组软骨细胞中 BIP 含量比较,差异有统计学意义。空白组及透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 BIP 含量均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.002$);透骨消痛胶囊低剂量组的 BIP 含量高于中剂量组 ($P=0.006$);透骨消痛胶囊高剂量组的 BIP

含量与透骨消痛胶囊中、低剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.185, P=0.072$)。见表 1。

5 组软骨细胞中 Caspase12 含量比较,差异有统计学意义。模型组的 Caspase12 含量高于空白组 ($P=0.001$);透骨消痛胶囊高剂量组的 Caspase12 含量低于模型组 ($P=0.018$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量与模型组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.126, P=0.277$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量与高剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.277, P=0.126$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase12 含量比较,差异无统计学意义 ($P=0.614$)。见表 1。

5 组软骨细胞中 Caspase3 含量比较,差异有统计学意义。模型组的 Caspase3 含量高于空白组 ($P=0.000$);透骨消痛胶囊高、中、低剂量组的 Caspase3 含量均低于模型组 ($P=0.006, P=0.002, P=0.029$);透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase3 含量与高剂量组比较,差异均无统计学意义 ($P=0.496, P=0.387$),透骨消痛胶囊中、低剂量组的 Caspase3 含量比较,差异无统计学意义 ($P=0.138$)。见表 1。

表 1 5 组软骨细胞活性、凋亡率及内质网应激关键蛋白含量 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (孔)	软骨细胞活性 (吸光度)	样本量 (孔)	软骨细胞凋亡率	样本量 (孔)	ATF4 含量	BIP 含量	Caspase12 含量	Caspase3 含量
空白组	5	0.428 ± 0.009	3	(3.270 ± 0.231)%	3	0.257 ± 0.028	0.227 ± 0.026	0.252 ± 0.027	0.265 ± 0.028
模型组	5	0.226 ± 0.028	3	(30.003 ± 4.128)%	3	0.435 ± 0.033	0.432 ± 0.022	0.346 ± 0.028	0.380 ± 0.017
透骨消痛胶囊 高剂量组	5	0.345 ± 0.025	3	(12.383 ± 0.933)%	3	0.315 ± 0.023	0.294 ± 0.035	0.294 ± 0.011	0.317 ± 0.026
透骨消痛胶囊 中剂量组	5	0.301 ± 0.035	3	(15.387 ± 2.961)%	3	0.276 ± 0.038	0.263 ± 0.020	0.315 ± 0.024	0.304 ± 0.019
透骨消痛胶囊 低剂量组	5	0.269 ± 0.033	3	(20.143 ± 3.472)%	3	0.351 ± 0.043	0.339 ± 0.032	0.325 ± 0.019	0.333 ± 0.022
F 值		39.462		37.560		13.057	25.416	7.345	10.507
P 值		0.000		0.000		0.001	0.000	0.005	0.001

4 讨 论

内质网的功能主要是膜蛋白和分泌性蛋白的折叠、蛋白质糖基化修饰等。各种理化因素,如紫外线、缺氧、营养物质缺乏、病毒、氧化应激等均可使内质网发生应激反应。内质网应激有 3 条信号通路,即 PERK、Ire1 和 ATF6^[8-10],其中 PERK 信号分子的激活可以磷酸化 eIF2 α ,后者可以激活 ATF4,上调 BIP 表达。

近年对内质网应激的研究发现,在应激条件下,

细胞可以整合应激反应,调动应激反应蛋白,减轻应激因素对细胞的损伤,使内质网适应新的内环境要求,同时细胞表达的内质网应激蛋白也可以启动细胞凋亡来处理不能修复的损伤细胞,但过度的内质网应激反应可导致细胞凋亡。有研究证实内质网应激能影响软骨细胞分化,同时也可抑制软骨细胞合成功能,减少异常蛋白合成,减轻应激对细胞的损害^[11-14]。在骨关节炎大鼠的软骨细胞中存在内质网应激,并且随着病情的发展,内质网过载,会通过

GADDA153 和 CHOP 的高表达诱导软骨细胞凋亡^[15]。近年来的研究表明,人骨关节炎软骨细胞对内质网应激敏感^[16],在病情进展过程中软骨细胞的内质网应激增加,可能增加软骨细胞凋亡并降低其保护性反应。

TG 是 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂,可使未折叠或异常折叠的蛋白在软骨细胞内蓄积或使内质网内 Ca^{2+} 稳定失衡,常被用来制作软骨细胞内质网应激模型。用 TG 处理后,细胞内质网 Caspase12 活性升高,从内质网转运至胞浆,在胞浆激活 Caspase9 和 Caspase3 等,最后引发细胞凋亡。

本研究的结果提示,透骨消痛胶囊能抑制 TG 诱导的大鼠体外培养关节软骨细胞发生由内质网应激(PEKR 信号通路)介导的细胞凋亡,其作用效果与药物剂量无明显关系。

5 参考文献

- [1] 刘献祥. 基于陈可冀学术思想之骨性关节炎研究[J]. 康复学报, 2016, 26(1): 2-5.
- [2] 吴广文, 陈俊, 潘彩彬, 等. 膝关节炎治疗仪治疗对兔膝骨性关节炎关节软骨形态结构及 NF- κ B 炎症通路的影响[J]. 康复学报, 2016, 26(2): 28-32.
- [3] 林木南, 刘献祥. 透骨消痛方治疗膝骨性关节炎 30 例[J]. 福建中医药, 2005, 36(4): 15-16.
- [4] 李民, 陈文列, 刘献祥, 等. 透骨消痛胶囊干预膝骨性关节炎软骨下骨重塑分子机制探讨[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(6): 35-39.
- [5] 李西海. 透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞周期与凋亡影响的研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2010.
- [6] 吴广文, 褚剑锋, 许惠凤, 等. 透骨消痛胶囊含药血清对退变关节软骨细胞表达 TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(4): 295-298.
- [7] ANDERSON JW, DIWADKAR VA, BRIDGES SR. Selective effects of different antioxidants on oxidation of lipoproteins from rats[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 218(4): 376-381.
- [8] WAN S, JIANG L. Erratum to: Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants[J]. Protoplasma, 2016, 253(3): 753-764.
- [9] GARDNER BM, PINCUS D, GOTTHARDT K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(3): a013169.
- [10] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, et al. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress[J]. Curr Mol Med, 2016, 16(6): 533-544.
- [11] 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 283-288.
- [12] 方欢, 申宗候. 内质网应激[J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(1): 36-39.
- [13] OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 381-389.
- [14] YANG L, CARLSON SG, MCBURNEY D, et al. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(35): 31156-31165.
- [15] 叶锦霞, 吴广文, 赖舜森, 等. 透骨消痛胶囊对膝骨关节炎大鼠内质网应激影响的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(11): 5-11.
- [16] TAKADA K, HIROSE J, SENBA K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(4): 232-242.

(2017-03-27 收稿 2017-05-09 修回)

· 通 知 ·

关于启用《科技期刊学术不端文献检测系统(AMLC)》的通知

为了保证学术论文的真实性和原创性,杜绝学术论文抄袭、剽窃、伪造、篡改、不当署名、一稿多投等现象的发生,本着对本刊论文作者和读者负责的态度,《中医正骨》编辑部于 2010 年 4 月开始启用《科技期刊学术不端文献检测系统(AMLC)》。该系统以《中国学术文献网络出版总库》为全文比对数据库,本刊编辑使用该系统对所有来稿的文字复制情况进行检测,检测结果包括与已发表论文比对后的文字复制比率,所涉及论文的题目、作者、发表期刊和发表时间。按规定文字复制比超过 20% 的来稿即视为存在学术不端行为的可能,经人工比对后才能进入下一个审稿程序,特此提醒广大作者,注意所投稿件的原创性与真实性。特此通知。