

## · 基础研究 ·

## 龟鹿二仙胶含药血清对膝骨关节炎小鼠软骨细胞模型自噬和凋亡的影响及作用机制研究

沈默金<sup>1</sup>, 郑珍萍<sup>1</sup>, 吴伟欣<sup>1</sup>, 杨美鑫<sup>1</sup>, 顾富城<sup>1</sup>, 耿秋东<sup>1</sup>, 王和鸣<sup>1</sup>, 李楠<sup>2</sup>

(1. 福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122;

2. 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建 福州 350122)

**摘要 目的:**探讨龟鹿二仙胶含药血清对白细胞介素-1 $\beta$  诱导的膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)小鼠软骨细胞模型自噬和凋亡的影响及作用机制。**方法:**将 10 只 SD 大鼠随机分为龟鹿二仙胶含药血清制备组和空白血清制备组,分别给予龟鹿二仙胶药液和生理盐水灌胃,连续灌胃 1 周后,采集腹主动脉血,制备龟鹿二仙胶含药血清和空白血清。取培养至第 2 代的 C57BL/6 小鼠膝关节软骨细胞,分为空白血清组、模型组、龟鹿二仙胶含药血清组。模型组、龟鹿二仙胶含药血清组加入终浓度为 10 ng · mL<sup>-1</sup> 的白细胞介素-1 $\beta$ ,诱导培养 24 h 后,空白血清组、模型组加入 10% 空白血清,龟鹿二仙胶含药血清组加入 10% 龟鹿二仙胶含药血清,继续培养 24 h。采用流式细胞分析仪检测各组软骨细胞凋亡率,采用电子显微镜观察各组软骨细胞自噬小体,分别采用实时定量 PCR 和 Western Blot 法检测腺苷一磷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、UNC-51 样自噬激活激酶 1(UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)、自噬相关蛋白 5(autophagy related protein 5, ATG5)、微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13、趋化因子配体 2(chemokine ligand 2, CCL2)的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**①软骨细胞凋亡率检测结果。模型组软骨细胞凋亡率高于空白血清组( $P=0.000$ ),龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞凋亡率低于模型组( $P=0.000$ )。②软骨细胞自噬小体观察结果。空白血清组可见双层膜封闭的球状自噬小体,模型组自噬小体数量较空白血清组减少,龟鹿二仙胶含药血清组自噬小体数量较模型组增加。③软骨细胞自噬和凋亡相关基因 mRNA 和蛋白表达水平检测结果。模型组软骨细胞 AMPK、ULK-1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于空白血清组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ;  $P=0.002, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于空白血清组( $P=0.002, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ;  $P=0.004, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞 AMPK、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于模型组( $P=0.000, P=0.003, P=0.001, P=0.001, P=0.001$ ;  $P=0.020, P=0.002, P=0.000, P=0.008, P=0.004$ ), mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于模型组( $P=0.008, P=0.001, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ;  $P=0.040, P=0.000, P=0.001, P=0.000$ )。结论:龟鹿二仙胶含药血清能够增强 KOA 软骨细胞自噬,抑制其凋亡与细胞外基质降解,且龟鹿二仙胶含药血清可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路发挥作用。

**关键词** 骨关节炎;膝;龟鹿二仙胶;软骨细胞;自吞噬;细胞凋亡;信号传导;TOR 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶;小鼠

**Exploring the effects and mechanism of Guilu Erxian Jiao(龟鹿二仙胶) medicated serum on autophagy and apoptosis of knee osteoarthritis mice chondrocyte model: an experimental study**

SHEN Mojin<sup>1</sup>, ZHENG Zhenping<sup>1</sup>, WU Weixin<sup>1</sup>, YANG Meixin<sup>1</sup>, GU Fucheng<sup>1</sup>, GENG Qiudong<sup>1</sup>, WANG Heming<sup>1</sup>, LI Nan<sup>2</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology and Rehabilitation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Fuzhou 350122, Fujian, China

基金项目:国家自然科学基金项目(81973880)

通讯作者:李楠 E-mail:MR. LiNan@126.com

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects and underlying mechanism of Guilu Erxian Jiao ( 龟鹿二仙胶, GLEXJ) medicated serum on autophagy and apoptosis of interleukin (IL)-1 $\beta$ -induced knee osteoarthritis (KOA) mice chondrocyte model. **Methods:** Ten Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into GLEXJ medicated serum preparation group and blank serum preparation group, with 5 ones in each group. The rats in the 2 groups were intervened by intragastric administration with GLEXJ solution and normal saline, respectively, twice a day for consecutive 7 days. Two hours after the end of the last intervention, the blood was drawn from the abdominal aorta of rats in each group for making GLEXJ medicated serum and blank serum. The chondrocytes extracted from the knee cartilage tissues of C57BL/6 mice were cultured, and the second-generation ones were collected and divided into blank serum group, model group and GLEXJ medicated serum group. The second-generation chondrocytes in model group and GLEXJ medicated serum group were intervened by IL-1 $\beta$  at a final concentration of 10 ng/mL. After 24-hour culture, the chondrocytes in blank serum group and model group were further intervened by 10% blank serum, whereas, the ones in GLEXJ medicated serum group by 10% GLEXJ medicated serum. After 24-hour culture, the apoptosis rate of chondrocytes in each group was detected by flow cytometry, and the autophagosomes in chondrocytes in each group were observed by electron microscopy. Furthermore, the mRNA and protein expression levels of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR), UNC-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1), autophagy related protein 5 (ATG5), microtubule associated protein 1 light chain 3B (LC3B), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), matrix metalloproteinase (MMP)-13, and chemokine ligand 2 (CCL2) were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. **Results:** ①The apoptosis rate of chondrocytes. The apoptosis rate of chondrocytes was higher in model group compared to blank serum group and GLEXJ medicated serum group ( $P = 0.000$ ;  $P = 0.000$ ). ②The autophagosomes in chondrocytes. The spherical autophagosomes enclosed by double membrane were observed in chondrocytes of blank serum group, besides, the number of autophagosomes decreased in model group compared to blank serum group, while that increased in GLEXJ medicated serum group compared to model group. ③The mRNA and protein expression levels of autophagy and apoptosis-related genes in chondrocytes. The mRNA and protein expression levels of AMPK, ULK1, ATG5, LC3B and Bcl-2 in chondrocytes were lower, while, that of mTOR, Bax, MMP-13 and CCL2 were higher in model group compared to blank serum group ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ;  $P = 0.002$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ;  $P = 0.004$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ). The mRNA and protein expression levels of AMPK, ULK1, ATG5, LC3B and Bcl-2 in chondrocytes were higher, while, that of mTOR, Bax, MMP-13 and CCL2 were lower in GLEXJ medicated serum group compared to model group ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.003$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.001$ ;  $P = 0.020$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.008$ ,  $P = 0.004$ ;  $P = 0.008$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ;  $P = 0.040$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.000$ ). **Conclusion:** GLEXJ medicated serum can enhance the autophagy of KOA chondrocytes, thereby inhibiting their apoptosis and extracellular matrix degradation. It may exert the effects by activating the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

**Keywords** osteoarthritis, knee; Gui Lu Er Xian Jiao; chondrocytes; autophagy; apoptosis; signal transduction; TOR serine-threonine kinases; mice

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以膝关节软骨退变、软骨下骨硬化和滑膜炎症为特征的慢性退行性疾病<sup>[1]</sup>。软骨细胞代谢失衡引起的细胞外基质分解和细胞凋亡是导致膝关节软骨退变的主要原因<sup>[2-3]</sup>。自噬是细胞的一种自我保护机制,通过吞噬和降解受损的细胞器和蛋白质为细胞提供物质和能量,维持细胞内环境稳定,避免细胞走向凋亡<sup>[4-5]</sup>。腺苷—磷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)/UNC-51 样自噬激活激酶 1 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 信号通路是与自噬密切相关的信号通路,在

维持机体正常生命活动中起着重要作用<sup>[5-6]</sup>。我们前期研究发现,采用龟鹿二仙胶灌胃 KOA 模型小鼠,能够促进软骨细胞自噬<sup>[7]</sup>。为了进一步探讨龟鹿二仙胶对 KOA 软骨细胞自噬和凋亡的影响及作用机制,我们进行了相关细胞实验,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

2 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量 (200  $\pm$  20) g; 4 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只, 体质量 (20  $\pm$  5) g; 均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [许可证号: SCXK (沪) 2017-0005]。大鼠和小鼠均于福建中医药大学实验动物中心 [许可证号: SYXK

(闽)2020-0002] 饲养。实验方案经福建中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: FJTCM-2022153。

## 1.2 实验药物

龟鹿二仙胶, 药物组成包括龟甲胶 9 g、鹿角胶 6 g、人参片 6 g、枸杞子 9 g。将上述中药饮片用蒸馏水煎煮, 用旋转蒸发仪将中药煎液浓缩为生药含量为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液。将药液置于无菌器皿中, 密封保存于  $4^\circ\text{C}$  冰箱备用。

## 1.3 实验试剂

乌拉坦(上海源叶生物有限公司), II 型胶原酶、胎牛血清(美国 Sigma 公司), DMEM 培养基(武汉博士德生物工程有限公司), 甲苯胺蓝(北京索莱宝科技有限公司), 白细胞介素(interleukin, IL)- $1\beta$  重组蛋白、Annexin V-EGFP/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司), 胰酶(美国 Gibco 公司), 细胞计数试剂盒-8(美国 Apexbio 公司), 电镜固定液(北京索莱宝科技有限公司), HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green qPCR)(美国 Biosharp 公司), 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒(长沙艾碧维生物科技有限公司), AMPK、mTOR、ULK1、自噬相关蛋白 5 (autophagy related protein 5, ATG5)、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13、趋化因子配体 2 (chemokine ligand 2, CCL2) 抗体(英国 Abcam 公司), 超敏 ECL 化学发光试剂(武汉莫纳生物科技有限公司)。

## 1.4 实验仪器

SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司), HERAcell 150i 型  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), MILLI-Q IQ7000 型超纯水装置(美国 Millipore 公司), Spark 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司), DMIL 型倒置显微镜(德国 Leica 公司), CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司), H-7650 透射电子显微镜(日本日立公司), CFX

Opus 96 型荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc MP 多功能成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 血清的制备

将 10 只 2 月龄雄性 SD 大鼠应用随机数字表随机分为龟鹿二仙胶含药血清制备组和空白血清制备组, 每组 5 只。龟鹿二仙胶含药血清制备组按照生药  $2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的剂量给予龟鹿二仙胶药液灌胃, 空白血清制备组按照  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的剂量给予生理盐水灌胃, 每日早晚各灌胃 1 次, 连续灌胃 1 周。第 7 天大鼠禁食, 在早晨灌胃后间隔 2 h 进行第 2 次灌胃。第 2 次灌胃后 2 h, 按照  $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠<sup>[8]</sup>。采集腹主动脉血。将血液于室温静置 2 h, 以  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min (离心半径 10 cm), 取上层血清于离心管中, 并  $56^\circ\text{C}$  水浴 30 min, 灭活。灭活后以  $0.22 \mu\text{m}$  无菌滤膜过滤除菌, 于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

### 2.2 软骨细胞的提取、培养及鉴定

取 4 周龄 C57BL/6 小鼠膝关节软骨组织, 采用 0.2% II 型胶原酶消化后, 分离获取软骨细胞。将软骨细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内培养; 待细胞贴壁后, 每隔 2 d 更换 1 次培养液; 待细胞汇合度达 80% 时, 用 PBS 漂洗 2 次, 加入胰酶消化, 按 1:3 的比例进行传代。取第 2 代软骨细胞, 以甲苯胺蓝染色后, 采用光学显微镜观察细胞形态。

### 2.3 龟鹿二仙胶含药血清对 KOA 小鼠软骨细胞模型的干预及相关指标检测

**2.3.1 分组与干预** 在第 2 代软骨细胞培养至汇合度达到 60% 时, 取软骨细胞接种于 6 孔板中, 分为空白血清组、模型组、龟鹿二仙胶含药血清组, 每组设 3 个复孔。模型组、龟鹿二仙胶含药血清组加入终浓度为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IL- $1\beta$ <sup>[9]</sup>, 诱导培养 24 h 后, 空白血清组、模型组加入 10% 空白血清, 龟鹿二仙胶含药血清组加入 10% 龟鹿二仙胶含药血清, 继续培养 24 h。采用下述方法检测各项指标。

**2.3.2 软骨细胞凋亡率检测** 采用胰蛋白酶消化并收集各组细胞, 于  $4^\circ\text{C}$  以  $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min (离心半径 10 cm), 弃去上清液, 以 PBS 悬浮细胞。于显微镜下进行细胞计数。取  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  个细胞, 再次离心后, 用结合缓冲液悬浮细胞。依次加入

AnnexinV-FITC、PI 溶液进行标记,采用流式细胞分析仪检测软骨细胞凋亡率。

**2.3.3 软骨细胞自噬小体观察** 采用胰蛋白酶消化并收集各组细胞,于 4℃以 2000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min(离心半径 10 cm),弃去上清液。将细胞样品依次进行固定、漂洗、脱水,包埋后进行切片。分别采用 2% 醋酸铀溶液和 3% 枸橼酸铅溶液依次染色 15 min,乙醇梯度洗脱,漂洗后室温过夜干燥,置于电子显微镜下观察,并采集图像。

**2.3.4 软骨细胞自噬和凋亡相关基因 mRNA 表达水平检测** 采用胰蛋白酶消化并收集各组细胞,提取总 RNA,逆转录获得 cDNA。采用实时定量 PCR 检测 AMPK、mTOR、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2、Bax、MMP-13、CCL2 的 mRNA 表达水平。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

**2.3.5 软骨细胞自噬和凋亡相关基因蛋白表达水平检测** 采用胰蛋白酶消化并收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液充分裂解细胞,于 4℃以 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min(离心半径 10 cm),取上清液,采用 BCA 法测定上清液蛋白浓度。取等量蛋白样品处理后,采

用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束后,将凝胶上的蛋白湿转至硝酸纤维素膜。用 1×PBST 配制的 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1.5 h。分别加入不同蛋白的一抗(1:1000),于 4℃孵育过夜;洗膜后加入二抗(1:5000),室温孵育 1.5 h;洗膜后,采用超敏 ECL 化学发光试剂显影。以 ChemiDoc MP 多功能成像系统拍照后,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,计算 AMPK、mTOR、ULK1、ATG5、LC3B、Bax、Bcl-2、MMP-13、CCL2 的蛋白相对表达量。

**2.4 数据统计**

采用 SPSS26.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。3 组软骨细胞凋亡率,以及 AMPK、mTOR、ULK1、ATG5、LC3B、Bax、Bcl-2、MMP-13、CCL2 的 mRNA 和蛋白表达水平的组间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 α=0.05。

**3 结 果**

**3.1 软骨细胞鉴定结果**

细胞甲苯胺蓝染色结果显示,细胞呈圆形或多边形,细胞核被染成蓝色,呈圆形(图 1);提示细胞为软骨细胞。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp
AMP 活化蛋白激酶	上游引物 GCAGTTGGATTATGAATGGAAGGT	133
	下游引物 CCGATCTCTGTGGAGTAGCA	
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白	上游引物 CAAGGCTTCTTCCGTTCTATCTC	175
	下游引物 AACCTGTAACCAAGTGCAATCTG	
UNC-51 样自噬激活激酶 1	上游引物 AAGTTCTGGAGATTGCAGCC	116
	下游引物 CCACTCTCGGCTCAACTGAC	
自噬相关蛋白 5	上游引物 TGTGCTTCGAGATGTGTGGTT	120
	下游引物 GTCAAATAGCTGACTCTTGCGAA	
微管相关蛋白 1 轻链 3B	上游引物 TAATCAGACGGCGCTTGCAG	102
	下游引物 CGTACACTTCGGAGATGGGAG	
B 淋巴细胞瘤-2	上游引物 AGCCTGAGAGCAACCCAATG	165
	下游引物 GACGGTAGCGACGAGAGAAG	
B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白	上游引物 AGATGAACTGGACAGCAATATGG	199
	下游引物 GATCAGCTCGGGCACTTTAG	
基质金属蛋白酶-13	上游引物 CTTCTTCTTGTTGAGCTGGACTC	173
	下游引物 CTGTGGAGGTCACTGTAGACT	
趋化因子配体 2	上游引物 CACCTGCTGCTACTCATTAC	160
	下游引物 TGTCTGGACCCATTCTTCTT	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 TGGAAAGCTGTGGCGTGATG	189
	下游引物 TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG	

### 3.2 软骨细胞凋亡率检测结果

空白血清组、模型组、龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义 $[(6.97 \pm 0.32)\%, (23.3 \pm 0.51)\%, (15.53 \pm 0.13)\%, F = 1\,600.998, P = 0.000]$ 。模型组软骨细胞凋亡率高于空白血清组 $(P = 0.000)$ ,龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞凋亡率低于模型组 $(P = 0.000)$ 。见图 2。

### 3.3 软骨细胞自噬小体观察结果

电子显微镜观察结果显示,空白血清组可见双层膜封闭的球状自噬小体,模型组自噬小体数量较空白血清组减少,龟鹿二仙胶含药血清组自噬小体数量较模型组增加(图 3)。

### 3.4 软骨细胞自噬和凋亡相关基因的 mRNA 表达水平检测结果

3 组软骨细胞 AMPK、mTOR、ULK1、ATG5、LC3B、Bax、Bcl-2、MMP-13、CCL2 的 mRNA 表达水平比较,组间差异均有统计学意义。模型组软骨细胞 AMPK、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的 mRNA 表达水平均低于空白血清组 $(P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000)$ ,mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的 mRNA 表达水平均高于空白血清组 $(P = 0.002, P =$

$0.000, P = 0.000, P = 0.000)$ ;龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞 AMPK、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的 mRNA 表达水平均高于模型组 $(P = 0.000, P = 0.003, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001)$ ,mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的 mRNA 表达水平均低于模型组 $(P = 0.008, P = 0.001, P = 0.000, P = 0.000)$ 。见表 2。

### 3.5 软骨细胞自噬和凋亡相关基因的蛋白表达水平检测结果

3 组软骨细胞 AMPK、mTOR、ULK1、ATG5、LC3B、Bax、Bcl-2、MMP-13、CCL2 的蛋白表达水平比较,组间差异均有统计学意义。模型组软骨细胞 AMPK、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的蛋白表达水平均低于空白血清组 $(P = 0.002, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000)$ ,mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的蛋白表达水平均高于空白血清组 $(P = 0.004, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000)$ ;龟鹿二仙胶含药血清组软骨细胞 AMPK、ULK1、ATG5、LC3B、Bcl-2 的蛋白表达水平均高于模型组 $(P = 0.020, P = 0.002, P = 0.000, P = 0.008, P = 0.004)$ ,mTOR、Bax、MMP-13、CCL2 的蛋白表达水平均低于模型组 $(P = 0.040, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000)$ 。见表 3、图 4。

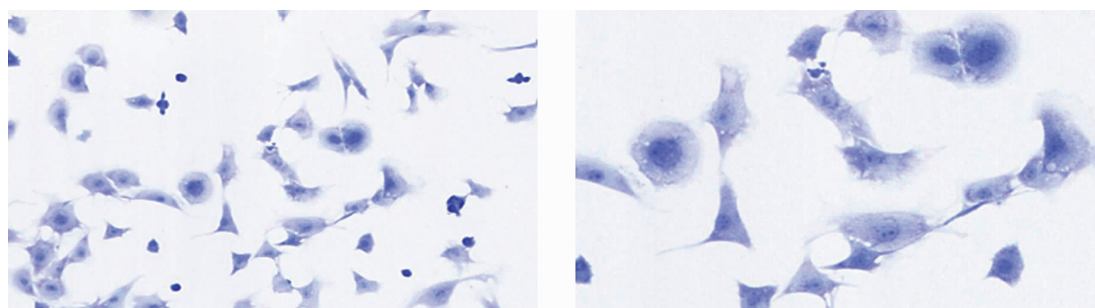


图 1 软骨细胞甲苯胺蓝染色图片

注:左图放大 100 倍,右图放大 200 倍。

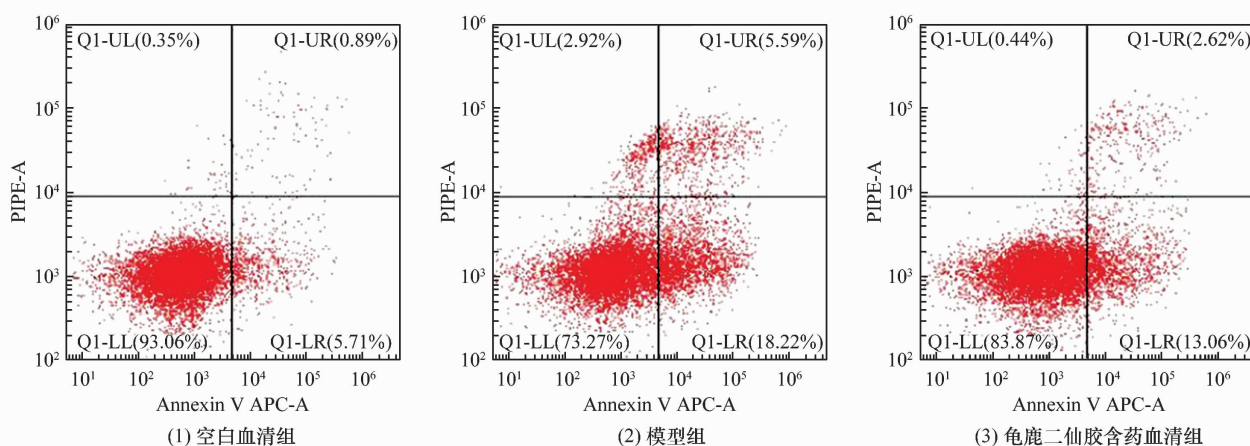
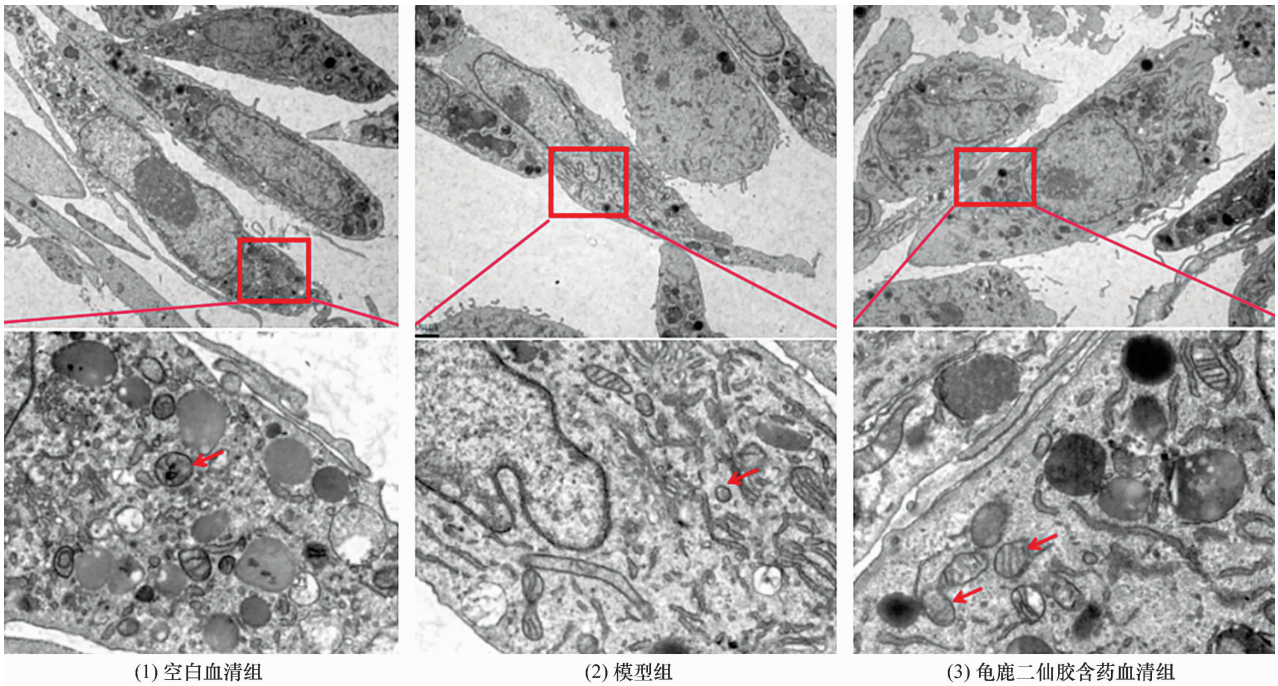


图 2 3 组软骨细胞凋亡率流式细胞仪检测结果





箭头所指为自噬小体。

图3 3组软骨细胞自噬小体电子显微镜观察图片

注:上图放大 1000 倍,下图放大 6000 倍。

表2 3组软骨细胞自噬和凋亡相关基因的 mRNA 表达水平

组别	样本量/ 孔	AMPK <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	mTOR <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	ULK1 <sup>3)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	ATG5 <sup>4)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白血清组	3	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.21	1.01 ± 0.19	1.00 ± 0.09
模型组	3	0.34 ± 0.02	1.57 ± 0.06	0.27 ± 0.06	0.43 ± 0.03
龟鹿二仙胶含药血清组	3	0.73 ± 0.01	1.15 ± 0.07	0.73 ± 0.04	0.71 ± 0.02
F 值		144.890	14.855	30.979	75.575
P 值		0.000	0.005	0.001	0.000

组别	LC3B <sup>5)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Bcl-2 <sup>6)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Bax <sup>7)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	MMP-13 <sup>8)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	CCL2 <sup>9)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白血清组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.03
模型组	0.29 ± 0.07	0.61 ± 0.02	1.63 ± 0.08	2.13 ± 0.14	1.86 ± 0.02
龟鹿二仙胶含药血清组	0.63 ± 0.05	0.82 ± 0.03	1.23 ± 0.08	1.39 ± 0.02	1.42 ± 0.03
F 值	82.004	73.872	53.504	68.533	671.967
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)AMP 活化蛋白激酶;2)哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;3)UNC-51 样自噬激活激酶 1;4)自噬相关蛋白 5;5)微管相关蛋白 1 轻链 3B;6)B 淋巴细胞瘤-2;7)B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;8)基质金属蛋白酶-13;9)趋化因子配体 2。

4 讨论

KOA 的关键病机为“阳化气”不足,“阴成形”太过,证属本虚标实。“阳化气”不足,则“气”之温煦、推动、气化功能减弱;“阴成形”太过,则痰浊、瘀血等积聚;最终导致 KOA 的发生和发展。因此,“扶阳”是中医治疗 KOA 的重要思想,贯穿 KOA 治疗的始末。“扶阳”可为“阳化气”提供动力,减缓或抑制“阴成形”的过程,使机体逐渐达到“阴阳平衡”的状态<sup>[10]</sup>。龟鹿二仙胶包括龟甲胶、鹿角胶、人参、枸杞子 4 味中

药;其中龟甲胶和鹿角胶为君药,龟甲胶滋阴潜阳、养血补心,鹿角胶补肾壮阳、益精养血,二者一阴一阳,相辅相成;人参为臣药,大补元气;枸杞子为佐药,补肝肾、益精血<sup>[11]</sup>。在该方中,补阳药与补阴药、益气药与养血药相平衡,以达求“和”之意,最终使筋骨、气血、经络达到阴阳自和的状态<sup>[12]</sup>。刘俊锋<sup>[13]</sup>研究发现,龟鹿二仙胶治疗早期 KOA,能够显著缓解膝关节疼痛、改善膝关节功能。我们前期采用龟鹿二仙胶灌胃 KOA 模型小鼠发现,龟鹿二仙胶治疗 KOA 与促进

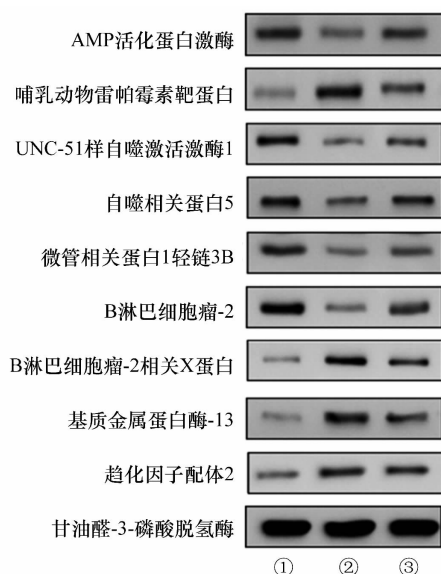
表 3 3 组软骨细胞自噬和凋亡相关基因的蛋白表达水平

组别	样本量/ 孔	AMPK <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	mTOR <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	ULK1 <sup>3)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	ATG5 <sup>4)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白血清组	3	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.26 ± 0.02
模型组	3	0.12 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.02
龟鹿二仙胶含药血清组	3	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02
<i>F</i> 值		13.896	10.441	59.175	100.619
<i>P</i> 值		0.006	0.011	0.000	0.000

组别	LC3B <sup>5)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Bcl-2 <sup>6)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Bax <sup>7)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	MMP-13 <sup>8)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	CCL2 <sup>9)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白血清组	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.06	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
模型组	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03
龟鹿二仙胶含药血清组	0.15 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.02
<i>F</i> 值	28.878	36.479	73.494	46.453	74.553
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)AMP 活化蛋白激酶;2)哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;3)UNC-51 样自噬激活激酶 1;4)自噬相关蛋白 5;5)微管相关蛋白 1 轻链 3B;6)B 淋巴细胞瘤-2;7)B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;8)基质金属蛋白酶-13;9)趋化因子配体 2。



①为空白血清组,②为模型组,③为龟鹿二仙胶含药血清组。

图 4 3 组软骨细胞自噬和凋亡相关基因蛋白表达 Western Blot 法检测结果

膝关节软骨细胞自噬有关<sup>[7]</sup>。为了进一步探索龟鹿二仙胶治疗 KOA 的作用机制,我们采用 IL-1 $\beta$  诱导小鼠膝关节软骨细胞,建立了 KOA 小鼠软骨细胞模型,并采用龟鹿二仙胶含药血清进行干预,进而分析了龟鹿二仙胶含药血清对 KOA 小鼠软骨细胞模型自噬和凋亡的影响及可能的作用机制。

在正常关节软骨中,细胞外基质的代谢处于动态平衡状态;对于 KOA 患者,各种炎症因子、趋化因子直接或者间接作用于软骨细胞,引起细胞外基质降解和细胞凋亡,最终导致关节软骨病变、损伤<sup>[14-17]</sup>。因此,抑制膝关节软骨细胞凋亡和细胞外基质降解可能

是遏制 KOA 进程的有效途径。Bcl-2 家族具有调控细胞凋亡的功能,其中 Bcl-2 能够抑制细胞凋亡,而 Bax 能够促进细胞凋亡<sup>[18]</sup>。MMP-13 是基质金属蛋白酶家族的重要成员,其表达受到炎症反应等因素的影响,与 KOA 的发展关系密切<sup>[19-20]</sup>。CCL2 是趋化因子受体 2 的关键配体,在炎症反应过程中能够招募单核细胞,是 KOA 中重要的趋化因子之一<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,模型组 Bcl-2 蛋白表达量降低,Bax、MMP-13、CCL2 蛋白表达量升高,而龟鹿二仙胶含药血清能够促进 Bcl-2 表达,抑制 Bax、MMP-13、CCL2 表达,进而抑制细胞凋亡和细胞外基质降解。

自噬是细胞的一种保护机制,激活软骨细胞自噬能够恢复软骨细胞活力,延缓 KOA 软骨退变<sup>[22-23]</sup>。ATG5 是重要的自噬相关蛋白,参与自噬体的形成和内容物降解过程的调控<sup>[24]</sup>。LC3B 是自噬体标志性基因 LC3 的亚型之一;在细胞自噬过程中,LC3B 的表达量随着自噬小体的增加而增加<sup>[25-26]</sup>。因此,LC3B 被认为是自噬的有效检测指标。相关研究<sup>[27]</sup>的结果表明,在正常软骨中,ATG5 和 LC3B 均有表达;而 KOA 患者软骨中,ATG5 和 LC3B 的表达量降低。本研究结果显示,模型组自噬小体数量减少,ATG5 和 LC3B 的 mRNA 和蛋白表达量均降低,提示软骨细胞自噬能力下降;与模型组比较,龟鹿二仙胶含药血清组自噬小体数量增加,ATG5 和 LC3B 的 mRNA 和蛋白表达量增加,提示龟鹿二仙胶能够激活 KOA 软骨细胞自噬,进而保护软骨细胞。AMPK/mTOR/ULK1 信号通路参与自噬的激活<sup>[24]</sup>。在生理状态下,细胞内部能量充足,AMPK 处于无活性状态,mTOR 磷酸化

ULK1 复合物的 s757 位点,进而抑制自噬;在病理状态时,细胞内部能量降低,AMPK 被激活,在抑制 mTOR 表达的同时磷酸化 ULK1 蛋白激酶复合物的 s777 和 s317 位点,进而激活自噬<sup>[28]</sup>。本研究结果显示,龟鹿二仙胶含药血清能够促进 AMPK 和 ULK1 的表达,抑制 mTOR 的表达,进而激活软骨细胞自噬。

本研究结果表明,龟鹿二仙胶含药血清能够增强 KOA 软骨细胞自噬,抑制其凋亡与细胞外基质降解,且龟鹿二仙胶含药血清可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路发挥作用。

### 参考文献

- [1] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.
- [2] YUNUS M H M, NORDIN A, KAMAL H. Pathophysiological perspective of osteoarthritis[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(11): 614.
- [3] HAO X, SHANG X, LIU J, et al. The gut microbiota in osteoarthritis; where do we stand and what can we do? [J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 42.
- [4] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2021, 384(1): 51-59.
- [5] 沈翀, 黄泓钧. 自噬在骨关节炎中的研究进展[J]. 华夏医学, 2022, 35(3): 155-159.
- [6] 杨云昊, 陶春鹤, 庞芳, 等. 电针通过调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对衰老小鼠肝脏自噬与氧化应激的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(1): 7-14.
- [7] 刘新根. 基于 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路探讨龟鹿二仙胶对小鼠软骨细胞自噬的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2022.
- [8] 卢晓, 于灵芝, 周聪颖, 等. 常用实验动物全身性麻醉药物的使用[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 18-25.
- [9] 吴伟欣, 郑珍萍, 顾富城, 等. 龟鹿二仙胶对 IL-1 $\beta$  诱导的 AMPK/mTOR/ULK1 通路介导的体外培养软骨细胞自噬的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(4): 799-804.
- [10] 胡仕力, 龚志贤, 卢敏, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨膝骨关节炎的内涵[J]. 风湿病与关节炎, 2023, 12(6): 54-56.
- [11] 宾东华, 李玲, 唐宇, 等. 基于中医哲学思维探析龟鹿二仙胶组方及临床运用[J]. 中医杂志, 2020, 61(17): 1559-1561.
- [12] 陈元, 何清湖, 朱珊莹, 等. 和——中医学的健康观[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2870-2872.
- [13] 刘俊锋. 龟鹿二仙胶汤对膝骨关节炎早期干预的临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [14] 陶盼, 刘凡, 李智斌. 基于炎症因子探讨膝骨关节炎的中医药研究进展[J]. 河北中医, 2024, 46(8): 1403-1408.
- [15] 雷宁波, 闫文, 谢兴文, 等. 中药干预软骨细胞外基质降解治疗骨关节炎的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(8): 1239-1244.
- [16] 何至, 许凯, 裴新武, 等. 沉默 miR-126 对关节软骨细胞增殖、凋亡和炎症反应的影响及其机制[J]. 山东医药, 2024, 64(25): 40-43.
- [17] 胡翔宇, 张伟夫, 王子东, 等. 杜仲-牛膝药对调控软骨细胞凋亡和炎症反应治疗骨关节炎的分子机制[J]. 湖北中医药大学学报, 2024, 26(4): 5-8.
- [18] 郭凯, 岳晓萱, 姜俊宇, 等. 姜黄素通过调控 miR-1227 表达对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(15): 3808-3813.
- [19] 易林, 向文远, 张文豪, 等. 补肾痹通方联合骨髓间充质干细胞对损伤软骨细胞的保护机制及 SOX9、MMP-13 表达的影响[J]. 陕西中医, 2024, 45(6): 728-732.
- [20] 易林, 张文豪, 向文远, 等. 基于 SOX9/NF- $\kappa$ B/MMP-13 信号通路探讨补肾痹通方含药血清对 IL-1 $\beta$  诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(4): 241-247.
- [21] 谢芳, 简功辉, 戴斌玉, 等. 基于 CCL2/CCR2/NF- $\kappa$ B 通路探讨活膝汤含药血清对软骨细胞焦亡的影响[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(5): 30-36.
- [22] 雒永生, 王想福, 杨正汉, 等. 基于细胞自噬与凋亡探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在骨关节炎中的作用及中医药干预研究进展[J/OL]. 辽宁中医药大学学报, 2024 [2024-09-12]. <https://chkdx.cnki.net/kcms/detail/21.1543.r.20240827.1357.012.html>.
- [23] 邱峰, 周爱珍, 华臻, 等. 自噬在膝骨关节炎发病机制中的作用初探[J]. 华南国防医学杂志, 2021, 35(9): 694-696.
- [24] 卢曼, 黄小双, 孟德鸿, 等. 针刀对膝骨关节炎大鼠 mTOR/Atg/ULK1/Beclin-1 轴及软骨细胞自噬的影响[J]. 中国针灸, 2022, 42(1): 59-65.
- [25] POHL C, DIKIC I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. Science, 2019, 366(6467): 818-822.
- [26] CAVALLI G, CENCI S. Autophagy and protein secretion[J]. J Mol Biol, 2020, 432(8): 2525-2545.
- [27] YANG H, WEN Y, ZHANG M, et al. MTORC1 coordinates the autophagy and apoptosis signaling in articular chondrocyte in osteoarthritic temporomandibular joint[J]. Autophagy, 2020, 16(2): 271-288.
- [28] 李瑞乾. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 通路研究 BCG 诱导巨噬细胞自噬对其凋亡的调控作用[D]. 银川: 宁夏大学, 2022.

(收稿日期: 2024-08-25 本文编辑: 吕宁)