

补肾强筋胶囊含药血清 对膝关节炎软骨细胞模型自噬影响的实验研究

胡子旋¹, 姚楠¹, 黄丹娥¹, 黄雪君², 甘海宁², 赵自明³, 陈玉兴³

(1. 广东省第二中医院, 广东 广州 510095;

2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095;

3. 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要 目的: 基于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)通路探讨补肾强筋胶囊含药血清对膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)软骨细胞模型自噬的影响。方法: 将体外培养的人软骨细胞分为 4 组。正常组给予 10% 空白血清, 模型组给予 10% 空白血清和 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β), 补肾强筋胶囊组给予 10% 补肾强筋胶囊含药血清和 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL- 1β , AMPK 抑制剂组给予 10% 补肾强筋胶囊含药血清、 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL- 1β 及 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Dorsomorphin (AMPK 抑制剂) 进行干预。干预 24 h 后以 CCK-8 法检测细胞增殖率, 以膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染法检测细胞凋亡率, 以丹酰尸胺法检测细胞自噬率, 以实时荧光定量 PCR 技术检测 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、UNC-51 样自噬激活激酶 1 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 的 mRNA 表达水平, 以 Western blot 法检测 Beclin1、LC3B-I、LC3B-II、ULK1、磷酸化 AMPK α (phospho-AMPK α , p-AMPK α)、磷酸化 mTOR (phospho-mTOR, p-mTOR) 的蛋白表达水平。结果: ①软骨细胞增殖率。模型组的细胞增殖率低于正常组 ($P=0.000$), 补肾强筋胶囊组的细胞增殖率高于模型组 ($P=0.019$), AMPK 抑制剂组的细胞增殖率低于补肾强筋胶囊组 ($P=0.002$)。②软骨细胞凋亡率。模型组的细胞凋亡率高于正常组 ($P=0.000$), 补肾强筋胶囊组的细胞凋亡率低于模型组 ($P=0.000$), AMPK 抑制剂组的细胞凋亡率高于补肾强筋胶囊组 ($P=0.000$)。③软骨细胞自噬率。模型组的细胞自噬率低于正常组 ($P=0.000$), 补肾强筋胶囊组的细胞自噬率高于模型组 ($P=0.000$), AMPK 抑制剂组的细胞自噬率低于补肾强筋胶囊组 ($P=0.000$)。④软骨细胞自噬相关基因的 mRNA 表达水平。模型组 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均低于正常组 ($P=0.002, P=0.001, P=0.003$), 补肾强筋胶囊组 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均高于模型组 ($P=0.008, P=0.005, P=0.012$), AMPK 抑制剂组 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均低于补肾强筋胶囊组 ($P=0.000, P=0.038, P=0.004$)。⑤软骨细胞自噬相关基因的蛋白表达水平。模型组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均低于正常组 ($P=0.028, P=0.019, P=0.007, P=0.044$), p-mTOR 的蛋白表达水平高于正常组 ($P=0.025$); 补肾强筋胶囊组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均高于模型组 ($P=0.004, P=0.048, P=0.040, P=0.043$), p-mTOR 的蛋白表达水平低于模型组 ($P=0.031$); AMPK 抑制剂组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均低于补肾强筋胶囊组 ($P=0.032, P=0.005, P=0.035, P=0.047$), p-mTOR 的蛋白表达水平高于补肾强筋胶囊组 ($P=0.033$)。结论: 补肾强筋胶囊含药血清可能通过 AMPK/mTOR 通路上调 KOA 软骨细胞模型的自噬水平, 从而延缓 KOA 病程。

关键词 骨关节炎; 膝; 补肾强筋胶囊; 白细胞介素- 1β ; 软骨细胞; 自吞噬; 腺苷一磷酸; 蛋白激酶类; TOR 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶

The effect of Bushen Qiangjin Jiaonang (补肾强筋胶囊) medicated serum on autophagy in knee osteoarthritis chondrocyte model: an experimental study

HU Zixuan¹, YAO Nan¹, HUANG Dan'e¹, HUANG Xuejun², GAN Haining², ZHAO Ziming³, CHEN Yuxing³

1. Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong, China

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20222011); 广东省医学科研基金项目 (B2022208); 广东省第二中医院科研创新基金项目 (SEZYY2023A02)

通讯作者: 姚楠 E-mail: nanyao2000@126.com

2. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Bushen Qiangjin Jiaonang(补肾强筋胶囊, BSQJJN) medicated serum on autophagy in knee osteoarthritis(KOA) chondrocyte model based on the adenosine monophosphate activated protein kinase(AMPK)/mammalian target of rapamycin(mTOR) pathway. **Methods:** The human primary chondrocytes cultured in vitro were divided into normal group, model group, BSQJJN group, and AMPK inhibitor group. The chondrocytes in normal group were intervened with 10% blank serum, the ones in model group with 10% blank serum and 10 ng/mL interleukin-1 β (IL-1 β), the ones in BSQJJN group with 10% BSQJJN medicated serum and 10 ng/mL IL-1 β , and the ones in AMPK inhibitor group with 10% BSQJJN medicated serum, 10 ng/mL IL-1 β and 10 μ mol/L Dorsomorphin(an AMPK inhibitor). After 24-hour intervention, the chondrocyte proliferation rate, chondrocyte apoptosis rate, and chondrocyte autophagy rate were detected by CCK-8 assay, annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide(FITC/PI) double staining, and dansyl cadaverine method, respectively. Furthermore, the mRNA expression levels of Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3B(LC3B), and UNC-51 like autophagy activating kinase 1(ULK1) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR technology, and the protein expression levels of Beclin1, LC3B-I, LC3B-II, ULK1, phospho-AMPK α (p-AMPK α), and phospho-mTOR(p-mTOR) were detected by using Western blot. **Results:** ①The chondrocyte proliferation rate. The chondrocyte proliferation rate was lower in model group compared to normal group($P=0.000$), and was higher in BSQJJN group compared to model group($P=0.019$), and was lower in AMPK inhibitor group compared to BSQJJN group($P=0.002$). ②The chondrocyte apoptosis rate. The chondrocyte apoptosis rate was higher in model group compared to normal group($P=0.000$), and was lower in BSQJJN group compared to model group($P=0.000$), and was higher in AMPK inhibitor group compared to BSQJJN group($P=0.000$). ③The chondrocyte autophagy rate. The chondrocyte autophagy rate was lower in model group compared to normal group($P=0.000$), and was higher in BSQJJN group compared to model group($P=0.000$), and was lower in AMPK inhibitor group compared to BSQJJN group($P=0.000$). ④The mRNA expression levels of chondrocyte autophagy-related genes. The mRNA expression levels of Beclin1, LC3B and ULK1 were lower in model group compared to normal group($P=0.002$, $P=0.001$, $P=0.003$), and were higher in BSQJJN group compared to model group($P=0.008$, $P=0.005$, $P=0.012$), and were lower in AMPK inhibitor group compared to BSQJJN group($P=0.000$, $P=0.038$, $P=0.004$). ⑤The protein expression levels of chondrocyte autophagy-related genes. The protein expression levels of Beclin1, ULK1, p-AMPK α and the ratio of LC3B-II to LC3B-I were lower, while the protein expression level of p-mTOR was higher in model group compared to normal group($P=0.028$, $P=0.019$, $P=0.007$, $P=0.044$, $P=0.025$). The protein expression levels of Beclin1, ULK1, p-AMPK α and the ratio of LC3B-II to LC3B-I were higher, while the protein expression level of p-mTOR was lower in BSQJJN group compared to model group($P=0.004$, $P=0.048$, $P=0.040$, $P=0.043$, $P=0.031$). The protein expression levels of Beclin1, ULK1, p-AMPK α and the ratio of LC3B-II to LC3B-I were lower, while the protein expression level of p-mTOR was higher in AMPK inhibitor group compared to BSQJJN group($P=0.032$, $P=0.005$, $P=0.035$, $P=0.047$, $P=0.033$). **Conclusion:** BSQJJN medicated serum may up-regulate the autophagy level of KOA chondrocyte model through the AMPK/mTOR pathway, thereby delaying the progression of KOA.

Keywords osteoarthritis, knee; Bushen Qiangjin Jiaonang; interleukin-1 β ; chondrocytes; autophagy; adenosine monophosphate; protein kinases; TOR serine-threonine kinases

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)属中医“膝痹”范畴,肾虚血瘀是其主要病机之一^[1]。广东省第二中医院基于该病机研制的院内制剂补肾强筋胶囊,具有补益肝肾、活血通络化瘀的功效,治疗 KOA 具有良好的疗效和安全性^[2-9]。软骨细胞自噬水平降低被认为是 KOA 软骨退变的主要原因,而维持软骨细胞一定的自噬水平可延缓软骨退变^[10-11]。团队前期的动物实验表明,通过调控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)通路提高 KOA 软骨细胞自噬水平,可能是补肾强筋胶囊治疗 KOA 的作用机制之一^[6]。为进一步在细胞水平验证该机制,本研究基于 AMPK/mTOR 通路探讨了补肾强筋胶囊含药血清对 KOA 软骨细胞模型自噬的影响,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物与软骨细胞

6~8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 10 只, 体质量 180~220 g, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2018-0002。实验在广东省第二中医院 SPF 级动物实验室进行, 实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2020-0059。人关节软骨细胞(江阴齐氏生物科技有限公司)。

1.2 药物与试剂

补肾强筋胶囊(粤药制字 Z20071352), 药物组成包括杜仲 288 g、补骨脂 168 g、骨碎补 480 g、熟地黄 480 g、血竭 48 g、全蝎 48 g, 由广东省第二中医院制剂室提供。兔链霉亲和素-辣根过氧化物酶试剂盒(二氨基联苯胺法)(康为世纪生物科技有限公司), 甲苯胺蓝染色液(南京建成生物工程研究所), 重组人白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体、II 型胶原蛋白多克隆抗体、Bec-1 多克隆抗体、UNC-51 样自噬激活激酶 1 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (重链 + 轻链) (Peprotech 公司), AMPK 抑制剂 Dorsomorphin (Selleck 公司), CCK-8 (东仁化学科技有限公司), 膜联蛋白 V (annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 细胞凋亡试剂盒(杭州联科生物科技股份有限公司), 细胞自噬染色检测试剂盒(丹酰尸胺法)(上海碧云天生物技术有限公司), 5 \times PrimeScript RT Master Mix、Premix Ex Taq II (大连宝生物工程股份有限公司), 重组微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 抗体 (Abcam 公司), 磷酸化 AMPK α (phospho-AMPK α , p-AMPK α) (Thr172) 兔单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司), 磷酸化 mTOR (phospho-mTOR, p-mTOR) (Ser2448) 抗体 (Affinity Biosciences 公司)。

1.3 实验仪器

5424 高速离心机 (Eppendorf 公司), FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司), StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪、Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司), SmartSpec plus 核酸蛋白测定仪 (Bio-Rad 公司), Cellometer Mini 自动细

胞计数仪 (Nexcelom 公司), DMi8 倒置荧光显微镜 (Leica 公司), Tanon5200 Multi 全自动化学发光图像分析系统 (上海天能生命科学有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备

参照团队前期报道的方法制备补肾强筋胶囊含药血清^[2]。将 10 只 SPF 级雌性 SD 大鼠分为 2 组, 其中 5 只按临床等效剂量 ($0.243 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 以补肾强筋胶囊药液灌胃, 另外 5 只用等体积生理盐水灌胃。连续灌胃 7 d, 最后 1 次给药 1 h 后腹主动脉取血, 以 $1000 \times g$ 离心 5 min 后吸取上清液, 在 56°C 灭活, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤除菌。将获得的补肾强筋胶囊含药血清和空白血清分装后在 -80°C 冰箱保存备用。

2.2 软骨细胞鉴定

将购买的人软骨细胞接种在放置了细胞爬片的 6 孔板中, 待细胞汇合度达到 80% 时, 联合应用 II 型胶原蛋白免疫组织化学染色 (苏木素复染) 和甲苯胺蓝染色进行软骨细胞鉴定。

2.3 软骨细胞分组及干预

将培养的人软骨细胞按每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板或按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 待细胞汇合度达到 80% 时, 吸弃培养液, 用杜氏磷酸盐缓冲溶液洗 2 次后分为 4 组。正常组添加 DMEM 高糖培养基、10% 空白血清, 模型组添加 DMEM 高糖培养基、10% 空白血清、 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-1 β , 补肾强筋胶囊组添加 DMEM 高糖培养基、10% 补肾强筋胶囊含药血清、 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-1 β , AMPK 抑制剂组添加 DMEM 高糖培养基、10% 补肾强筋胶囊含药血清、 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-1 β 及 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Dorsomorphin。以上各组细胞继续培养 24 h 后进行相关检测, 其中 96 孔板中的软骨细胞用于细胞增殖率检测, 6 孔板中的软骨细胞用于其余指标检测。

2.4 实验指标检测

2.4.1 软骨细胞增殖率检测 采用 CCK-8 法检测各组软骨细胞增殖率, 细胞增殖率 = (实验组光密度值 - 空白对照组光密度值) / (正常组光密度值 - 空白对照组光密度值) $\times 100\%$ 。

2.4.2 软骨细胞凋亡率检测 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组软骨细胞凋亡率, 以流式细胞仪进行定量分析。

2.4.3 软骨细胞自噬率检测 采用丹酰尸胺法检测各组软骨细胞自噬率,以丹酰尸胺阳性细胞率表示细胞自噬率。

2.4.4 软骨细胞自噬相关基因的 mRNA 表达水平检测 使用实时荧光定量 PCR 技术检测 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平。以 GAPDH 作为内参基因,运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相关基因的 mRNA 相对表达量,引物信息见表 1。

2.4.5 软骨细胞自噬相关基因的蛋白表达水平检测 采用 Western blot 技术检测 Beclin1、LC3B- I、LC3B- II、ULK1、p-AMPK α 、p-mTOR 的蛋白表达水平。以 GAPDH 作为内参蛋白,最终通过 ImageJ 软件测定条带灰度值进行定量分析,计算相关基因的蛋白相对表达量。

2.5 数据统计

采用 SPSS27.0 软件进行数据统计分析。4 组软骨细胞增殖率、凋亡率、自噬率、软骨细胞自噬相关基因的 mRNA 表达水平、软骨细胞自噬相关基因的蛋白表达水平的组间总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 软骨细胞鉴定结果

免疫组织化学染色结果显示,所鉴定细胞的细胞质呈棕黄色或棕褐色,细胞核呈蓝色[图 1(1)];甲苯胺蓝染色结果显示,细胞质呈蓝色[图 1(2)]。上述结果表明所鉴定细胞为软骨细胞。

3.2 软骨细胞增殖率检测结果

模型组的细胞增殖率低于正常组 ($P = 0.000$),补肾强筋胶囊组的细胞增殖率高于模型组 ($P = 0.019$),AMPK 抑制剂组的细胞增殖率低于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.002$)。见表 2。

3.3 软骨细胞凋亡率检测结果

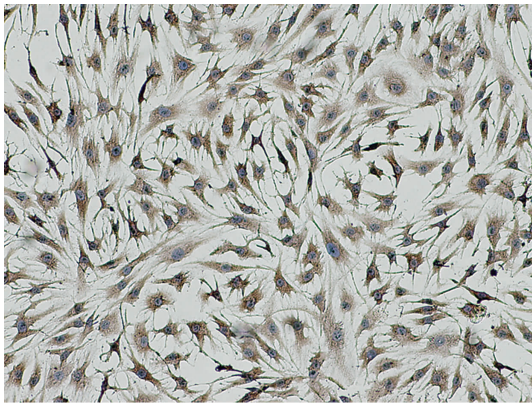
模型组的细胞凋亡率高于正常组 ($P = 0.000$),补肾强筋胶囊组的细胞凋亡率低于模型组 ($P = 0.000$),AMPK 抑制剂组的细胞凋亡率高于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.000$)。见表 2。

3.4 软骨细胞自噬率检测结果

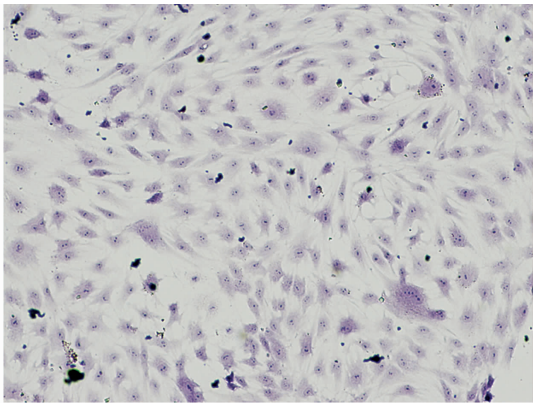
模型组的细胞自噬率低于正常组 ($P = 0.000$),补肾强筋胶囊组的细胞自噬率高于模型组 ($P = 0.000$),AMPK 抑制剂组的细胞自噬率低于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.000$)。见图 2、表 2。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp
Beclin1	上游引物 TGGCACAATCAATAACTTC	100
	下游引物 ATGGAGCAGCAACAC	
微管相关蛋白 1 轻链 3B	上游引物 GGACAAGACCAAGTT	107
	下游引物 CCAGCAGGAAGAAG	
UNC-51 样自噬激活激酶 1	上游引物 GCGGTGGTCTTCAA	81
	下游引物 GGCGAGGTTCTTCTT	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 CCCATCACCATCTTCCAGGAG	105
	下游引物 CTTCTCCATGGTGGTGAAGACG	



(1) 免疫组织化学染色



(2) 甲苯胺蓝染色

图 1 软骨细胞鉴定染色结果 (×100)

3.5 软骨细胞自噬相关基因的 mRNA 表达水平检测结果

模型组的 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均低于正常组 ($P = 0.002, P = 0.001, P = 0.003$), 补肾强筋胶囊组 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均高于模型组 ($P = 0.008, P = 0.005, P = 0.012$), AMPK 抑制剂组 Beclin1、LC3B、ULK1 的 mRNA 表达水平均低于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.000, P = 0.038, P = 0.004$)。见表 3。

3.6 软骨细胞自噬相关基因的蛋白表达水平检测结果

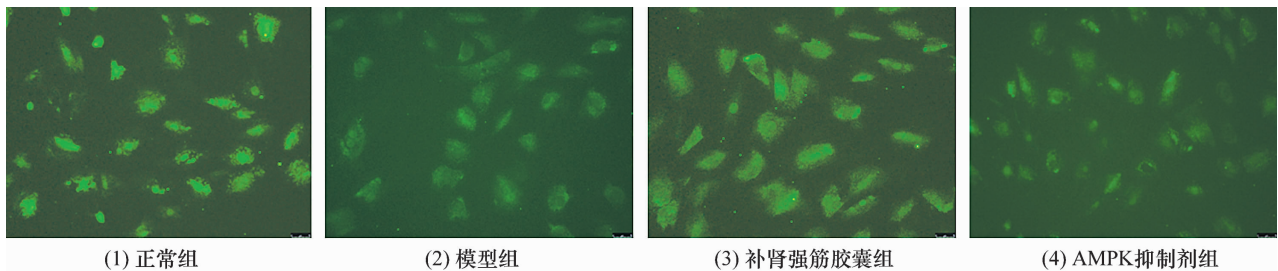
模型组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均低于正常组 ($P = 0.028, P = 0.019, P = 0.007, P = 0.044$), p-mTOR 的蛋白表达水平高于正常组 ($P = 0.025$); 补肾强筋胶囊组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均高于模型组 ($P = 0.004, P = 0.048, P = 0.040, P = 0.043$), p-mTOR 的蛋白表达水

平低于模型组 ($P = 0.031$); AMPK 抑制剂组 Beclin1、ULK1、p-AMPK α 的蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值均低于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.032, P = 0.005, P = 0.035, P = 0.047$), p-mTOR 的蛋白表达水平高于补肾强筋胶囊组 ($P = 0.033$)。见表 4 和图 3。

4 讨论

KOA 是一种涉及关节软骨进行性退变的骨关节疾病, 发病机制目前尚未完全明确, 其病理变化主要包括软骨细胞功能障碍和凋亡^[12]。自噬是一种维持细胞内能量代谢稳定状态的细胞内降解机制, 它可以恢复受损软骨细胞的功能、抑制软骨细胞凋亡, 最终延缓 KOA 的发生和发展^[13]。

与软骨细胞自噬有关的调控因子包括 Beclin1、LC3B 和 ULK1^[14]。LC3B 有 LC3B-I 和 LC3B-II 两种形式, 发生自噬时 LC3B-I 转化为 LC3B-II, 自噬活跃时 LC3B-II/LC3B-I 比值升高。Beclin-1 和 ULK1 在正常人膝关节软骨中处于高表达状态^[15], 而在 KOA



(1) 正常组

(2) 模型组

(3) 补肾强筋胶囊组

(4) AMPK抑制剂组

AMPK 为腺苷一磷酸活化蛋白激酶。

图 2 4 组软骨细胞自噬率检测结果 (丹酰尸胺染色 $\times 200$)

表 2 4 组软骨细胞增殖率、凋亡率及自噬率

组别	样本量/孔	细胞增殖率/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	细胞凋亡率/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	细胞自噬率/ $(\bar{x} \pm s, \%)$
正常组	6	100.000 \pm 1.480	3.304 \pm 0.740	26.212 \pm 2.276
模型组	6	92.292 \pm 2.381	31.327 \pm 1.840	12.139 \pm 1.665
补肾强筋胶囊组	6	95.580 \pm 1.605	22.102 \pm 1.373	19.487 \pm 1.512
AMPK ¹⁾ 抑制剂组	6	91.437 \pm 1.730	32.904 \pm 2.326	12.884 \pm 1.418
F 值		26.954	395.251	84.735
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 1) 腺苷一磷酸活化蛋白激酶。

表 3 4 组软骨细胞自噬相关基因的 mRNA 表达水平

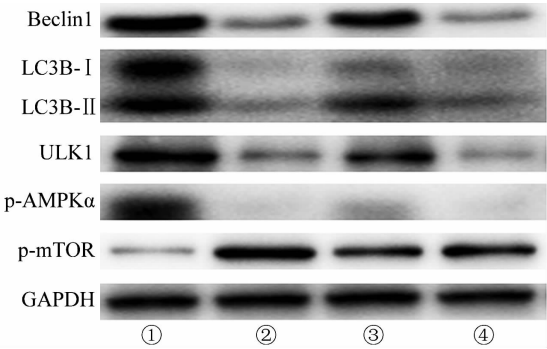
组别	样本量/孔	Beclin1 ($\bar{x} \pm s$)	LC3B ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)	ULK1 ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)
正常组	6	1.000 \pm 0.199	1.000 \pm 0.251	1.000 \pm 0.193
模型组	6	0.484 \pm 0.225	0.483 \pm 0.124	0.609 \pm 0.157
补肾强筋胶囊组	6	0.853 \pm 0.100	0.740 \pm 0.122	0.828 \pm 0.081
AMPK ¹⁾ 抑制剂组	6	0.586 \pm 0.098	0.576 \pm 0.115	0.644 \pm 0.089
F 值		12.376	11.547	10.297
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 1) 腺苷一磷酸活化蛋白激酶; 2) 微管相关蛋白 1 轻链 3B; 3) UNC-51 样自噬激活激酶 1。

表 4 4 组软骨细胞自噬相关基因的蛋白表达水平

组别	样本量/孔	Beclin1 ($\bar{x} \pm s$)	LC3B ²⁾ - II / LC3B ²⁾ - I ($\bar{x} \pm s$)	ULK1 ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)	p-AMPK α ⁴⁾ ($\bar{x} \pm s$)	p-mTOR ⁵⁾ ($\bar{x} \pm s$)
正常组	6	1.594 ± 0.282	1.172 ± 0.146	1.298 ± 0.358	0.829 ± 0.126	0.443 ± 0.033
模型组	6	0.707 ± 0.058	0.868 ± 0.107	0.408 ± 0.189	0.273 ± 0.137	1.621 ± 0.335
补肾强筋胶囊组	6	1.264 ± 0.154	1.115 ± 0.100	0.776 ± 0.124	0.600 ± 0.131	0.973 ± 0.074
AMPK ¹⁾ 抑制剂组	6	0.752 ± 0.226	0.941 ± 0.037	0.360 ± 0.043	0.311 ± 0.091	1.610 ± 0.337
F 值		13.818	5.553	12.476	13.660	16.617
P 值		0.002	0.023	0.002	0.002	0.000

注:1)腺苷一磷酸活化蛋白激酶;2)微管相关蛋白 1 轻链 3B;3)UNC-51 样自噬激活激酶 1;4)磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶 α ;5)磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。



LC3B 为微管相关蛋白 1 轻链 3B,ULK1 为 UNC-51 样自噬激活激酶 1,p-AMPK α 为磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶 α ,p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,①正常组,②模型组,③补肾强筋胶囊组,④腺苷一磷酸活化蛋白激酶抑制剂组。

图 3 软骨细胞自噬相关蛋白表达水平 Western blot 法检测结果

患者膝关节软骨中的表达被明显抑制^[10]。在 KOA 发病过程中,软骨细胞损伤和凋亡会导致上述自噬调控因子的表达被抑制,无法激活自噬,进而无法保护软骨细胞。mTOR 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸激酶,采用药物抑制 mTOR 表达或特异性敲除软骨细胞中 mTOR 基因的方法都可以减轻 KOA 的病变程度,而且抑制 mTOR 通路可以提高 KOA 软骨细胞自噬水平,起到缓解 KOA 病情的作用^[16-17]。AMPK 是一种在结构和功能上高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞能量代谢平衡的重要调节器^[18]。AMPK 是由 α 催化亚基与 β 、 γ 调节亚基组成的异源三聚体,其中 α 催化亚基上的 Thr172 位点的磷酸化是 AMPK 激活所必需的^[19]。mTOR 活化所需的磷酸化位点主要是 Ser2448,该位点可受 p-AMPK α 调控^[20]。p-AMPK α 能够抑制 mTOR 的磷酸化水平,使其活性降低,导致 mTOR 对自噬的抑制作用减弱,从而提高细胞自噬水

平。已有研究证实,AMPK/mTOR 通路是调控自噬的主要通路^[21]。通过对 p-AMPK α 和 p-mTOR 蛋白表达进行检测,团队前期研究发现补肾强筋胶囊可以明显提高 KOA 大鼠软骨中 p-AMPK α 蛋白表达水平、降低 p-mTOR 蛋白表达水平,认为补肾强筋胶囊可能通过激活 AMPK/mTOR 通路提高 KOA 大鼠膝关节软骨细胞自噬水平^[6]。

为了进一步在细胞水平验证该机制,我们通过 IL-1 β 诱导体外培养的软骨细胞建立 KOA 软骨细胞模型,发现在 IL-1 β 存在的情况下,软骨细胞增殖明显减少、凋亡明显增多、自噬水平明显下降;补肾强筋胶囊含药血清干预可明显提高 KOA 软骨细胞增殖率和自噬率,降低凋亡率。为明确自噬在保护软骨细胞中的作用,我们对自噬相关调控因子进行了检测。结果发现,补肾强筋胶囊含药血清可明显提高软骨细胞中 Beclin1、ULK1、LC3B 基因的 mRNA 和蛋白表达水平,以及 LC3B-II/LC3B-I 比值。这表明补肾强筋胶囊含药血清提高了 KOA 软骨细胞自噬水平。研究结果还显示,补肾强筋胶囊含药血清可以明显提高 KOA 软骨细胞 p-AMPK α 蛋白表达水平、降低 p-mTOR 蛋白表达水平,表明其可以在细胞水平上增强 AMPK 活性、降低 mTOR 活性。因此,补肾强筋胶囊含药血清促进自噬相关调控因子的基因和蛋白表达的作用与其激活 AMPK/mTOR 通路有关。该结果与团队前期的动物实验^[6]结果一致。AMPK 是自噬的上游调节剂,本研究中我们采用 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin 进行干预,结果发现补肾强筋胶囊含药血清对 KOA 软骨细胞增殖、凋亡和自噬的影响明显受到了逆转。这表明 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin 能拮抗补肾强筋胶囊含药血清对 KOA 软骨细胞自噬的增强作用,这也进一步验证了补肾强筋胶囊含药血清通过调控 AMPK/mTOR 通路促进软骨细胞自噬的作用。

本研究的结果提示,补肾强筋胶囊含药血清可能通过 AMPK/mTOR 通路上调 KOA 软骨细胞模型的自噬水平,从而延缓 KOA 病程。本研究结果为从细胞自噬角度阐明补肾强筋胶囊治疗 KOA 的作用机制提供了依据。当前,靶向调控自噬途径为 KOA 的治疗提供了一个新的方向,应用中药调控自噬防治 KOA 具有广阔前景和深远意义,而越来越多具有明确调控自噬机制的中药单体成分也已被揭示^[22-24]。但补肾强筋胶囊调控 KOA 软骨细胞模型自噬的有效单体成分尚未明确,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 郝胜坤,纪斌,石继祥,等. 补肾活血中药治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 中医正骨,2017,29(4):31-33.
- [2] 姚楠,陈能,许学猛,等. 补肾强筋胶囊含药血清对 IL-1 β 刺激的人原代软骨细胞的影响[J]. 临床医学工程,2017,24(3):327-329.
- [3] 刘文刚,陈能,许学猛,等. 补肾强筋胶囊治疗围绝经期及绝经后期膝骨性关节炎临床研究[J]. 河南中医,2017,37(5):911-913.
- [4] 李慧,曾明珠,张瑜. 补肾强筋胶囊对早中期膝骨性关节炎滑液中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、前列腺素 E2 及血清前列腺素 E2 的影响[J]. 中国医药导报,2019,16(15):119-123.
- [5] 陈国材,姚楠,刘文刚,等. 补肾活血方含药血清对退变型人原代软骨细胞 microRNA 表达谱的影响[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(5):1086-1089.
- [6] 彭莎,姚楠,卢岩岩,等. 补肾强筋胶囊对膝骨关节炎的治疗作用及分子机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2021,29(4):13-19.
- [7] 姚楠,陈国材,许学猛,等. 补肾强筋胶囊对肾虚型膝骨关节炎大鼠软骨雌激素受体 α 和软骨代谢的影响[J]. 中华中医药杂志,2021,36(12):7043-7048.
- [8] YAO N, CHEN G C, LU Y Y, et al. Bushen Qiangjin capsule inhibits the Wnt/ α -catenin pathway to ameliorate papain-induced knee osteoarthritis in rat[J]. J Tradit Chin Med, 2021,41(6):935-942.
- [9] 柯明婧,梁嘉健,叶翔凌,等. 补肾强筋胶囊的体内安全性评价[J]. 实用医学杂志,2023,39(14):1762-1768.
- [10] CARAMÉS B, TANIGUCHI N, OTSUKI S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2010,62(3):791-801.
- [11] CHENG N T, GUO A, MENG H. The protective role of autophagy in experimental osteoarthritis, and the therapeutic effects of Torin 1 on osteoarthritis by activating autophagy[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016,17:150.
- [12] FUJII Y, LIU L, YAGASAKI L, et al. Cartilage homeostasis and osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(11):6313.
- [13] LV X, ZHAO T, DAI Y, et al. New insights into the interplay between autophagy and cartilage degeneration in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2022,10:1089668.
- [14] DUAN R, XIE H, LIU Z Z. The role of autophagy in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2020,8:608388.
- [15] LUO P, GAO F, NIU D, et al. The role of autophagy in chondrocyte metabolism and osteoarthritis: a comprehensive research review[J]. Biomed Res Int, 2019,2019:5171602.
- [16] ZHANG Y, VASHEGHANI F, LI Y H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015,74(7):1432-1440.
- [17] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nat Cell Biol, 2011,13(2):132-141.
- [18] HARDIE D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007,8(10):774-785.
- [19] DIN F V, VALANCIUTE A, HOUDE V P, et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells[J]. Gastroenterology, 2012,142(7):1504-1515.
- [20] WANG X, ZHAO L, AJAY A K, et al. QiDiTangShen granules activate renal nutrient-sensing associated autophagy in db/db mice[J]. Front Physiol, 2019,10:1224.
- [21] KONG C, WANG C, SHI Y, et al. Active vitamin D activates chondrocyte autophagy to reduce osteoarthritis via mediating the AMPK-mTOR signaling pathway[J]. Biochem Cell Biol, 2020,98(3):434-442.
- [22] 曾凡,王康,陈柏屹,等. 中药复方及单体成分调节自噬改善骨关节炎的研究进展[J]. 中医药学报, 2022,50(8):107-112.
- [23] HUANG J, CHEN Z, WU Z, et al. Geniposide stimulates autophagy by activating the GLP-1R/AMPK/mTOR signaling in osteoarthritis chondrocytes[J]. Biomed Pharmacother, 2023,167:115595.
- [24] 柴居堂,杨倩,宁红霞,等. 中药干预细胞自噬防治骨关节炎研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024,30(2):287-298.