

· 基础研究 ·

独活寄生汤含药血清抑制白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制研究

何晓娟¹, 林平冬¹, 马玉环¹, 翁霞萍¹, 郑文伟¹, 李西海¹, 林洁², 付长龙², 邵翔², 叶蕪芝², 刘献祥¹

(1. 福建中医药大学, 福建 福州 350122;

2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要 目的:探讨独活寄生汤含药血清抑制白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制。**方法:**将 10 只 2 月龄雄性 SD 大鼠随机分为正常组和独活寄生汤组,独活寄生汤组以 9.3 g·kg⁻¹剂量的独活寄生汤灌胃,正常组给予等量生理盐水灌胃;每日灌胃 2 次,连续 1 周;末次灌胃后,经腹主动脉取血,分别制备独活寄生汤含药血清及空白血清,低温保存备用。截取 6 只 4 周龄 SD 大鼠膝关节软骨,采用酶消化法分离并培养软骨细胞,光学显微镜下观察软骨细胞形态,并用 II 型胶原酶免疫组化鉴定。取生长良好的第 2 代软骨细胞,采用 MTT 法检测含药血清培养 24 h、36 h、48 h、72 h 后的软骨细胞活性,采用酶联免疫吸附法测定不同浓度 IL-1 β 干预后软骨细胞的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 含量。将培养好的第 2 代软骨细胞随机分为空白血清组、模型组、独活寄生汤含药血清组,其中空白血清组以含 10% 空白血清的培养基(dulbecco modified eagle medium, DMEM)培养;模型组加入浓度为 15 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预 24 h 后,采用含 10% 空白血清的 DMEM 培养;独活寄生汤含药血清组加入浓度为 15 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预 24 h 后,采用含 10% 独活寄生汤含药血清的 DMEM 培养;3 组均连续培养 48 h,采用 Western blot 法检测软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达情况。**结果:**①软骨细胞形态及免疫组化鉴定结果。第 2 代软骨细胞胞浆丰富,细胞周围可见具有折光性的细胞外基质,细胞长势呈“铺路石”状,胞浆呈棕黄色阳性染色。②独活寄生汤含药血清培养不同时间后的软骨细胞活性。含药血清培养 24 h、36 h、48 h、72 h 后的软骨细胞活性比较,差异有统计学意义(1.01 \pm 0.01, 1.03 \pm 0.02, 1.07 \pm 0.01, 1.02 \pm 0.02, $F=8.300$, $P=0.008$)。含药血清培养 24 h 时的软骨细胞活性低于培养 48 h 时的软骨细胞活性($t=-4.648$, $P=0.002$);与培养 36 h、72 h 时的软骨细胞活性比较,差异无统计学意义($t=-1.549$, $P=0.160$; $t=-0.775$, $P=0.461$)。③不同浓度 IL-1 β 干预后的 MMP-13 含量。在含 IL-1 β 浓度为 0 ng·mL⁻¹、5 ng·mL⁻¹、10 ng·mL⁻¹、15 ng·mL⁻¹、20 ng·mL⁻¹、25 ng·mL⁻¹的 DMEM 中培养 24 h 后软骨细胞 MMP-13 含量比较,差异有统计学意义[(0.07 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, (0.08 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, (0.09 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, (0.10 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, (0.08 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, (0.06 \pm 0.01)ng·mL⁻¹, $F=6.823$, $P=0.001$]。未经 IL-1 β 干预时的软骨细胞 MMP-13 含量与浓度为 5 ng·mL⁻¹、20 ng·mL⁻¹、25 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量比较,差异均无统计学意义(LSD- $t=-2.049$, $P=0.055$; LSD- $t=-2.083$, $P=0.052$; LSD- $t=0.496$, $P=0.626$);浓度为 10 ng·mL⁻¹、15 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量高于未经 IL-1 β 干预时的软骨细胞 MMP-13 含量(LSD- $t=-3.412$, $P=0.003$; LSD- $t=-4.216$, $P=0.001$);浓度为 10 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量与浓度为 15 ng·mL⁻¹的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量比较,差异无统计学意义(LSD- $t=-0.804$, $P=0.432$)。④软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达。空白血清组、模型组和独活寄生汤含药血清组的 G α s、G α q、G α o 和 G α i 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义[(0.81 \pm 0.09)kDa, (0.31 \pm 0.07)kDa, (0.78 \pm 0.13)kDa, $F=23.669$, $P=0.001$; (0.22 \pm 0.04)kDa, (0.14 \pm 0.02)kDa, (0.20 \pm 0.02)kDa, $F=6.500$, $P=0.031$; (0.25 \pm 0.02)kDa, (0.12 \pm 0.01)kDa, (0.18 \pm 0.03)kDa, $F=27.214$, $P=0.001$; (0.21 \pm 0.02)kDa, (0.26 \pm 0.02)kDa, (0.19 \pm 0.03)kDa, $F=6.882$, $P=0.028$];空白血清组 G α s、G α q、G α o 蛋白表达量高于模型组(LSD- $t=6.134$, $P=0.001$; LSD- $t=7.370$, $P=0.000$; LSD- $t=3.465$, $P=0.013$), G α i 蛋白表达量低于模型组(LSD- $t=2.572$, $P=0.042$);模型组 G α s、G α q、G α o 蛋白表达量低于独活寄生汤含药血清组(LSD- $t=5.766$, $P=0.001$; LSD- $t=3.401$, $P=0.014$; LSD- $t=2.599$, $P=0.041$), G α i 蛋白表达量高于独活寄生汤含药血清组(LSD- $t=3.609$, $P=0.011$)。结论:独活寄生汤含药血清可以抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症反应,其作用机制可能与 G 蛋白偶联信号传导系统的调控有关,但其具体作用靶点有待进一步深入研究。**关键词** 骨关节炎;软骨细胞;独活寄生汤;软骨退变;G 蛋白偶联信号通路;白细胞介素 1 β ;基质金属蛋白酶 13;炎症反应;动物实验

基金项目:国家自然科学基金项目(81373818)

通讯作者:刘献祥 E-mail:liuxianxiang@163.com

Study on mechanism of action of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤)medicated serum in inhibiting inflammatory reaction induced by interleukin - 1 beta in chondrocytes

HE Xiaojuan¹, LIN Pingdong¹, MA Yuhuan¹, WENG Xiaping¹, ZHENG Wenwei¹, LI Xihai¹, LIN Jie², FU Changlong², SHAO Xiang², YE Hongzhi², LIU Xianxiang¹

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

2. Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of action of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤, DHJST) medicated serum in inhibiting inflammatory reaction induced by interleukin - 1 beta (IL - 1 β) in chondrocytes. **Methods:** Ten 2 - month - old male SD rats were randomly divided into normal group and DHJST group. The rats in DHJST group were intragastric administrated with DHJST in dosage of 9.3 g/kg, while the others in normal group were intragastric administrated with the same dose of normal saline, twice per day for 1 consecutive week. After the last intragastric administration, their blood were fetched out from abdominal aorta and were made into DHJST medicated serum and blank serum respectively and the serum were reserved at low temperature for future use. The knee articular cartilage of six 4 - week - old SD rats were fetched out and the chondrocytes were isolated and cultured by using enzymatic digestion method. The chondrocytes morphology were observed under optical microscope, and immunohistochemical identification were carried out by using type II collagenase. The well - grown second - generation chondrocytes were fetched out, and their cytoactive were detected by using MTT method after cultured in medicated serum for 24, 36, 48 and 72 hours, and the matrix metalloproteinase (MMP) - 13 content of chondrocytes were detected by using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) after intervention with different concentrations of IL - 1 β . The second - generation chondrocytes were randomly divided into blank serum group, model group and DHJST medicated serum group. The chondrocytes in blank serum group were cultured in dulbecco modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% blank serum, while the chondrocytes in model group and DHJST medicated serum group were intervened by IL - 1 β with concentration of 15 ng/ml for 24 hours and then were cultured in DMEM supplemented with 10% blank serum and 10% DHJST medicated serum respectively. The protein expression of key regulating factor of G protein coupled signal transduction systems in chondrocytes were detected by using Western blot method after the chondrocytes were cultured for continuous 48 hours in the 3 groups. **Results:** The second - generation chondrocytes had plentiful cytoplasm and the refractive extracellular matrix (ECM) could be found around the cells. The cells grew in the form of paving - stone and their cytoplasm presented with tawny positive staining. There was statistical difference in the cytoactive between chondrocytes cultured in medicated serum for 24, 36, 48 and 72 hours ($1.01 \pm 0.01, 1.03 \pm 0.02, 1.07 \pm 0.01, 1.02 \pm 0.02, F = 8.300, P = 0.008$). The chondrocyte activities were lower at 24 hours compared to at 48 hours after cultivation in medicated serum ($t = -4.648, P = 0.002$). There was no statistical difference in the chondrocyte activities between 24 - hour cultivation and 36 - and 72 - hour cultivation ($t = -1.549, P = 0.160; t = -0.775, P = 0.461$). There was statistical difference in the MMP - 13 contents between chondrocytes cultured in DMEM supplemented with IL - 1 β with concentration of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 ng/ml for 24 hours ($0.07 \pm 0.01, 0.08 \pm 0.01, 0.09 \pm 0.01, 0.10 \pm 0.01, 0.08 \pm 0.01, 0.06 \pm 0.01, F = 6.823, P = 0.001$). There was no statistical difference in the MMP - 13 contents of chondrocytes between pre - intervention by IL - 1 β and post - intervention by IL - 1 β with concentration of 5, 20 and 25 ng/ml respectively ($LSD - t = -2.049, P = 0.055; LSD - t = -2.083, P = 0.052; LSD - t = 0.496, P = 0.626$). The MMP - 13 contents of chondrocytes were higher after intervention by IL - 1 β with concentration of 10 and 15 ng/ml compared to pre - intervention by IL - 1 β ($LSD - t = -3.412, P = 0.003; LSD - t = -4.216, P = 0.001$). There was no statistical difference in the MMP - 13 contents between chondrocytes intervened by IL - 1 β with concentration of 10 ng/ml and those intervened by IL - 1 β with concentration of 15 ng/ml ($LSD - t = -0.804, P = 0.432$). There was statistical difference in the protein expression of key regulating factor of G protein coupled signal transduction systems including G α_s , G α_q , G α_o and G α_i in chondrocytes between the 3 groups ($0.81 \pm 0.09, 0.31 \pm 0.07, 0.78 \pm 0.13$ kDa, $F = 23.669, P = 0.001; 0.22 \pm 0.04, 0.14 \pm 0.02, 0.20 \pm 0.02$ kDa, $F = 6.500, P = 0.031; 0.25 \pm 0.02, 0.12 \pm 0.01, 0.18 \pm 0.03$ kDa, $F = 27.214, P = 0.001; 0.21 \pm 0.02, 0.26 \pm 0.02, 0.19 \pm 0.03$ kDa, $F = 6.882, P = 0.028$). The protein expressions of G α_s , G α_q and G α_o were higher and the protein expressions of G α_i were lower in blank serum group compared to model group ($LSD - t = 6.134, P = 0.001; LSD - t = 7.370, P = 0.000; LSD - t = 3.465, P = 0.013, LSD - t = 2.572, P = 0.042$). The protein expressions of G α_s , G α_q and G α_o were lower and the protein expressions of G α_i were higher in model group compared to DHJST medicated serum group ($LSD - t = 5.766, P = 0.001; LSD - t = 3.401, P = 0.014; LSD - t = 2.599, P = 0.041; LSD - t = 3.609, P = 0.011$). **Conclusion:** DHJST medicated serum can inhibit

inflammatory reaction induced by interleukin - 1 beta in chondrocytes. The mechanisms of action may be related to the regulation of G protein coupled signal transduction systems. However, its specific action targets need to be further studied.

Key words osteoarthritis; chondrocytes; Duhuo Jisheng Tang; cartilage degeneration; G protein coupled signaling pathway; interleukin - 1 beta; matrix metalloproteinase 13; inflammatory reaction; animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种致病因素复杂的慢性进行性关节疾病, 以软骨退变、骨赘生成、软骨下骨重塑及关节内炎症反应为主要病理特点^[1]。G 偶联信号传导系统是一类具有重要作用的细胞跨膜信号传导系统, 能传递生物信息至所有细胞类型, 介导大量生理反应^[2]。G 蛋白偶联信号传导系统包括 G 蛋白偶联受体 (G protein - coupled receptor, GPCR)、G 蛋白和效应器分子, 其中 G 蛋白能够激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 进而诱导白细胞介素 1 β (interleukin - 1 beta, IL - 1 β) 等炎症因子的产生, 促进基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 的表达, 使软骨基质降解, 导致关节软骨退变。OA 的病因较为复杂, 且病情反复难以治愈, 独活寄生汤作为临床治疗 OA 的常用药, 可减轻患者炎症反应, 改善患者临床症状, 对 OA 肝肾亏虚型具有显著疗效。已有研究发现, 独活寄生汤能够下调 MMP 水平, 有效地抑制炎症细胞因子释放, 其含药血清亦具有延缓 OA 退变的作用^[3-4]。本实验旨在探讨独活寄生汤含药血清抑制 IL - 1 β 诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制, 以期独活寄生汤治疗 OA 提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 2 月龄雄性 SD 清洁级大鼠 10 只, 4 周龄雄性 SD 清洁级大鼠 6 只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 由福建中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2012-0001。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验药物 独活寄生汤方药组成: 独活 9 g, 细辛 3 g, 桑寄生、牛膝、杜仲、秦艽、防风、肉桂、川芎、当归、芍药、干地黄、人参、茯苓、甘草各 6 g 组成, 上述药物均购于福建中医药大学承创堂。准确称取上述药物后, 将其置于 3 L 圆底烧瓶中, 加入 8 倍药量体积的蒸馏水, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 真空旋转蒸发浓缩, 浓缩至含生药量为 9.3 g · mL⁻¹ 的药液, 4 ℃ 条件下储存备用。

1.3 实验试剂 II 型胶原酶 (美国 Sigma 公司);

MMP13 酶联免疫吸附法 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (美国 Cloud - Clone 公司); MTT 试剂盒、IL - 1 β 诱导剂 (美国 Sigma 公司); 二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); RIPA 裂解液 (强)、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司); 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (美国 Millipore 公司); 一抗 Collagen II (cell signaling technology 公司), 一抗 G α s、G α i、G α q、G α o (Santa Cruz 公司), 二抗羊抗兔 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.4 实验仪器 ELx - 800 酶标仪 (美国 Bio - tek 公司); 化学发光成像系统 (美国 Bio - RAD 公司); 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 10 只 2 月龄清洁级雄性 SD 大鼠随机分为正常组、独活寄生汤组, 每组 5 只。

2.2 含药血清制备 大鼠给药剂量按人和动物药物等效剂量换算公式^[5]计算, 独活寄生汤组以 9.3 g · kg⁻¹ 剂量的独活寄生汤灌胃, 正常组给予等量生理盐水灌胃。每日灌胃 2 次, 连续 1 周。采血前禁食 12 h, 末次灌胃后 0.5 ~ 1 h, 采用 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉, 无菌条件下经腹主动脉取血, 室温下静置 1 ~ 2 h 后, 4 ℃ 下用离心机离心 15 min (转速 3 000 r · min⁻¹, 离心半径 $r = 8.4$ cm), 吸取上层血清, 56 ℃ 水浴灭活 30 min 后, 用直径 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装, 于 -20 ℃ 的环境下保存备用。

2.3 软骨细胞分离、培养及鉴定 取 6 只 4 周龄清洁级雄性 SD 大鼠, 采用 10% 水合氯醛麻醉处死, 无菌条件下截取膝关节软骨, 采用酶消化法分离软骨细胞并进行原代、传代培养及鉴定。将装有软骨细胞的培养瓶置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 48 h 后更换培养液, 此为原代软骨细胞, 之后每 2 d 更换一次培养液, 细胞长满至培养瓶底 80% ~ 90% 时, 传第 1 代软骨细胞, 继续培养并传代, 获得第 2 代软骨细胞。取长势良好的第 2 代软骨细胞, 接种于含盖玻片的 6

孔板中,爬片,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的培养基(dulbecco modified eagle medium, DMEM)培养 48 h, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)洗 3 次; 0.5% 曲拉通 X-100 处理 15 min, PBS 洗 3 次; 3% H_2O_2 处理 15 min, PBS 洗 3 次; 羊血清封闭 60 min, 吸干封闭液, 一抗 Collagen II (1: 200) 孵育(阴性对照组不加一抗 Collagen II), 以 PBS 代替, 4 °C 过夜; PBS 洗 3 次, 二抗室温孵育 1 h, 再用 PBS 洗 3 次, DAB 显色 10 min 后自来水漂洗; 苏木素复染 45 s 后自来水冲洗, 晾干, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察软骨细胞形态。

2.4 独活寄生汤含药血清培养不同时间后的软骨细胞活性检测 采用 MTT 法。取生长良好的第 2 代软骨细胞按 5×10^4 个 $\cdot mL^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板(每孔 100 μL), 细胞贴壁后更换含 10% 独活寄生汤含药血清的培养液分别培养 24 h、36 h、48 h、72 h, 每个时间段设 12 个复孔。弃培养液, 每孔加入 100 μL 的 1% MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 弃 MTT 溶液, 加 150 μL 的二甲基亚砜, 充分振荡 10 min。用酶标仪以 490 nm 波长下测定各孔的吸光度, 观察细胞活性。

2.5 不同浓度 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量检测 采用 ELISA 法。取生长良好的第 2 代软骨细胞按 5×10^4 个 $\cdot mL^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板(每孔 2 mL), 细胞贴壁后弃培养液, 加入含 IL-1 β 浓度为 0 ng $\cdot mL^{-1}$ 、5 ng $\cdot mL^{-1}$ 、10 ng $\cdot mL^{-1}$ 、15 ng $\cdot mL^{-1}$ 、20 ng $\cdot mL^{-1}$ 、25 ng $\cdot mL^{-1}$ 的不含 FBS 的 DMEM, 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱内培养。分别收集培养 24 h 后的细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书处理细胞上清液样品, 用多功能酶标仪以 450 nm 波长检测样品中 MMP-13 的浓度。

2.6 软骨细胞分组 将培养好的第 2 代软骨细胞以 5×10^4 个 $\cdot mL^{-1}$ 接种于 6 孔培养板中, 每孔 2 mL。细胞贴壁后, 将细胞随机分为空白血清组、模型组、独活寄生汤含药血清组, 其中空白血清组以含 10% 空白血清的 DMEM 培养; 模型组加入浓度为 15 ng $\cdot mL^{-1}$ 的 IL-1 β 干预 24 h 后, 采用含 10% 空白血清的 DMEM 培养; 独活寄生汤含药血清组加入浓度为 15 ng $\cdot mL^{-1}$ 的 IL-1 β 干预 24 h 后, 采用含 10% 独活寄生汤含药血清的 DMEM 培养; 3 组均连续培养 48 h。

2.7 软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达检测 采用 Western blot 法。于 6 孔培养板内以不同浓度 IL-1 β 干预各组软骨细胞后, 每孔细胞用 PBS 洗 1 次, 弃去 PBS, 加入 200 μL 蛋白裂解液(RAPI: PMSF = 100: 1), 将培养板置于 4 °C 冰箱, 裂解细胞 30 min, 每隔 10 min 晃动 1 次; 细胞裂解完毕后, 用细胞刮刀轻轻将裂解物刮下, 收集并转移入 1.5 mL 的环氧树脂(epoxy epoxide, EP)管, 离心 30 min(转速 14 000 $r \cdot min^{-1}$, 离心半径 8.4 cm), 吸取上清至另一干净的 EP 管, 得到总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 按照定量结果, 每孔上样 20 μg , 以 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 将蛋白湿转至 PVDF 膜上, 转膜结束后用 TBST 荡洗 PVDF 膜, 加封闭液, 室温下摇床上封闭 2 h, 4 °C 下分别加入一抗孵育(分别孵育 Gas、Gai、Gaq、Gao、 β -actin)过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 然后加入二抗, 室温摇床孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入适量 ECL 显影液反应 1 min, 曝光、显影。应用 Image Lab 图像处理软件分析目的蛋白和内参 β -actin 条带灰度值, 计算机自动读取并记录每条条带的灰度值。

2.8 数据统计学分析 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数据进行统计学处理, 独活寄生汤含药血清培养不同时间软骨细胞活性的比较采用重复测量资料的方差分析, 不同浓度 IL-1 β 干预软骨细胞 24 h 后的 MMP-13 含量的比较以及 3 组大鼠软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子蛋白表达量的组间比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 软骨细胞形态 原代软骨细胞呈圆球形悬浮于培养液中[图 1(1)]; 培养 24 h 后, 软骨细胞基本贴壁; 培养第 3 天后软骨细胞分裂增殖加快, 呈三角形或多角形[图 1(2)]; 培养第 7 天, 软骨细胞核清晰, 可见 1~2 个核仁[图 1(3)]。传代后细胞生长速度加快, 第 1 代软骨细胞主要呈圆形或椭圆形, 具有细胞密度依赖性[图 1(4)]; 第 2 代软骨细胞胞浆丰富, 细胞周围可见具有折光性的细胞外基质, 细胞长势呈明显的“铺路石”状[图 1(5)]; 第 3 代软骨细胞生长速度相对减慢, 细胞开始呈长梭形变化[图 1(6)]。

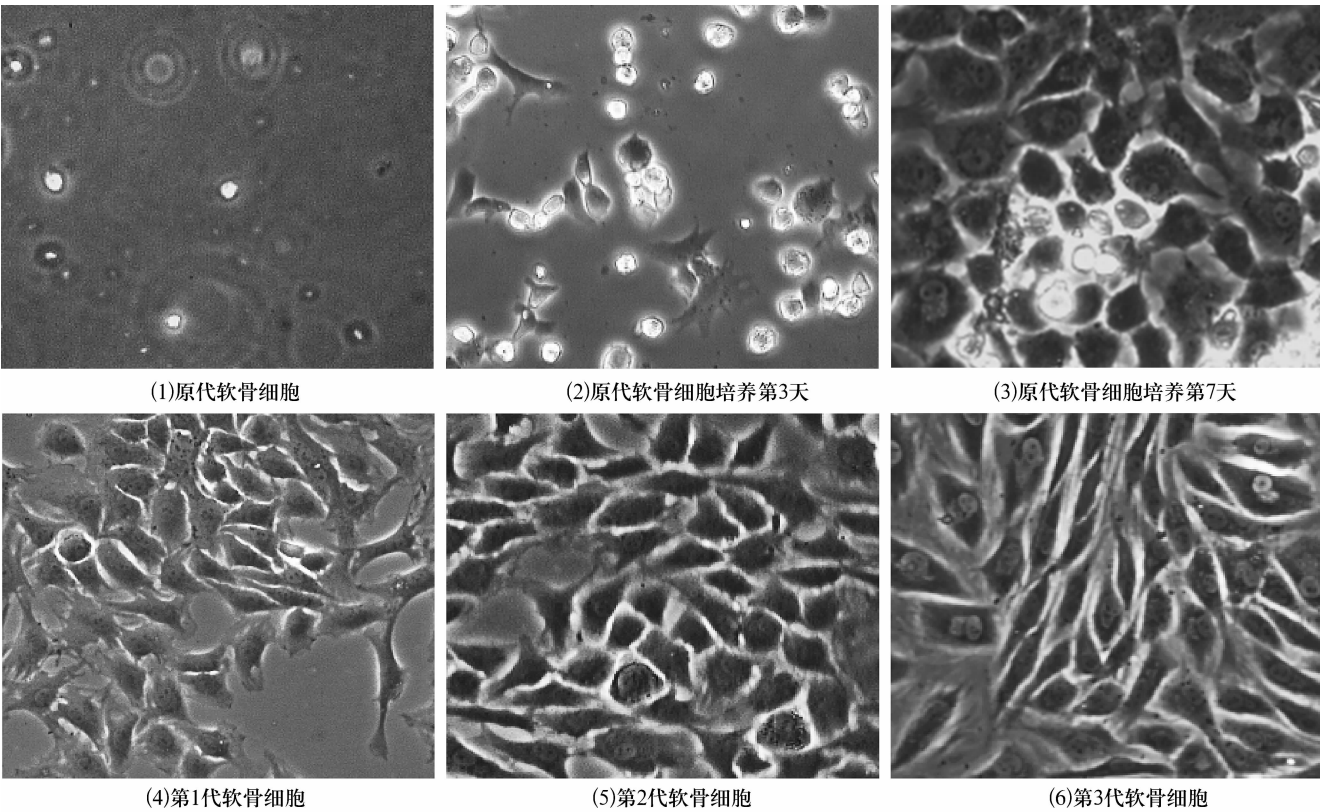


图 1 显微镜下大鼠膝关节软骨细胞形态(×200)

3.2 软骨细胞鉴定结果 第 2 代软骨细胞胞浆被染成棕黄色,细胞生长密集的地方比细胞相互接触较少的地方棕黄色深,细胞外也能见到棕黄色(图 2)。

3.3 独活寄生汤含药血清培养不同时间后的软骨细胞活性 独活寄生汤含药血清培养不同时间第 2 代

软骨细胞活性比较,差异有统计学意义。培养 24 h 时的软骨细胞活性低于培养 48 h 时的软骨细胞活性($t = -4.648, P = 0.002$);与培养 36 h、72 h 时的软骨细胞活性比较,差异无统计学意义($t = -1.549, P = 0.160$; $t = -0.775, P = 0.461$)。见表 1。

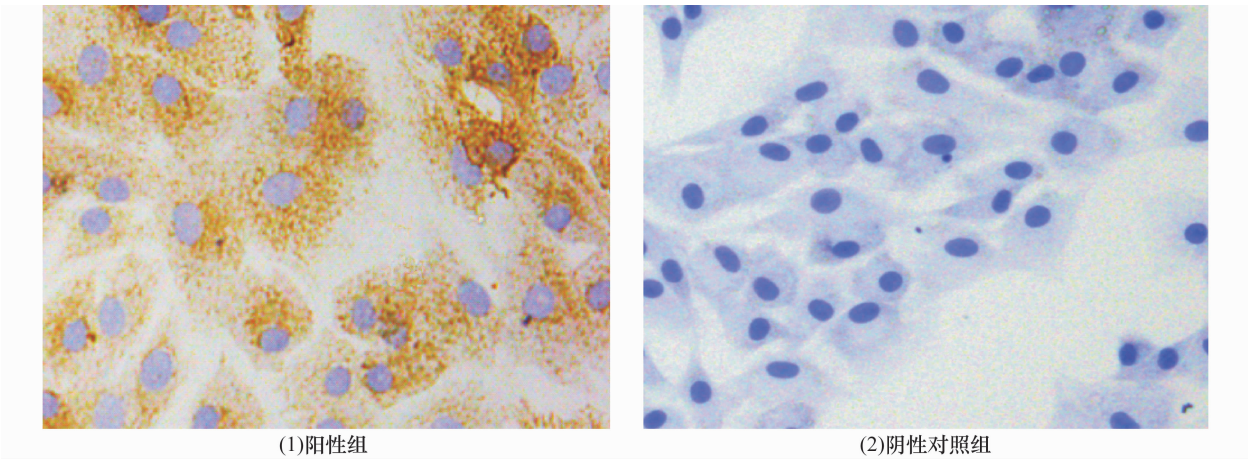


图 2 第 2 代软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色结果(×200)

表 1 独活寄生汤含药血清培养不同时间后的软骨细胞活性 $\bar{x} \pm s$

培养时间	24 h	36 h	48 h	72 h	F 值	P 值
软骨细胞活性	1.01 ± 0.01	1.03 ± 0.02	1.07 ± 0.01	1.02 ± 0.02	8.300	0.008

3.4 不同浓度 IL-1β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量 不同浓度 IL-1β 干预软骨细胞 24 h 后 MMP-13 含量比较,差异有统计学意义。未经 IL-1β 干预

时的软骨细胞 MMP-13 含量与浓度为 5 ng · mL⁻¹、20 ng · mL⁻¹、25 ng · mL⁻¹ 的 IL-1β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量比较,差异均无统计学意义(LSD- $t =$

$-2.049, P=0.055$; $LSD-t=-2.083, P=0.052$; $LSD-t=0.496, P=0.626$); 浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量高于未经 IL-1 β 干预时的软骨细胞 MMP-13 含量 ($LSD-t=-3.412, P=0.003$; $LSD-t=-4.216,$

$P=0.001$); 浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量与浓度为 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 干预后软骨细胞 MMP-13 含量比较, 差异无统计学意义 ($LSD-t=-0.804, P=0.432$)。见表 2。

表 2 不同浓度白细胞介素 1 β 干预软骨细胞 24 h 后的基质金属蛋白酶 13 含量

白细胞介素 1 β 浓度 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	5	10	15	20	25	F 值	P 值
基质金属蛋白酶 13 含量 ($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	6.823	0.001

3.5 软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达 空白血清组、模型组和独活寄生汤含药血清组的 G α s、G α q、G α o 和 G α i 蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义; 空白血清组 G α s、G α q、G α o 蛋白表达量高于模型组 ($LSD-t=6.134, P=0.001$; $LSD-t=7.370, P=0.000$; $LSD-t=3.465,$

$P=0.013$), G α i 蛋白表达量低于模型组 ($LSD-t=2.572, P=0.042$); 模型组 G α s、G α q、G α o 蛋白表达量低于独活寄生汤含药血清组 ($LSD-t=5.766, P=0.001$; $LSD-t=3.401, P=0.014$; $LSD-t=2.599, P=0.041$), G α i 蛋白表达量高于独活寄生汤含药血清组 ($LSD-t=3.609, P=0.011$)。见表 3。

表 3 3 组大鼠软骨细胞中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子蛋白表达量的比较 $\bar{x} \pm s, \text{kDa}$

组别	G α s	G α q	G α o	G α i
空白血清组	0.81 ± 0.09	0.22 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.02
模型组	0.31 ± 0.07	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.26 ± 0.02
独活寄生汤含药血清组	0.78 ± 0.13	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03
F 值	23.669	6.500	27.214	6.882
P 值	0.001	0.031	0.001	0.028

4 讨论

软骨细胞包埋于致密的软骨基质中, II 型胶原是软骨基质的主要成分之一, 它的合成与分泌是衡量软骨细胞是否维持分化表型的特征性指标。软骨细胞通过 II 型胶原免疫荧光染色后, 可见软骨细胞胞浆呈棕黄色, 胞外基质也有黄色颗粒出现, 胞核不着色, 说明体外培养的软骨细胞和软骨基质中均有 II 型胶原表达, 表明体外分离、培养的第 2 代关节软骨细胞具有典型生物学特性^[6-7]。第 2 代软骨细胞胞浆丰富, 细胞周围可见具有折光性的细胞外基质, 细胞长势呈明显的“铺路石”状, 具有良好的软骨细胞形态学特征, 故而本实验选择第 2 代代关节软骨细胞进行后续实验。

用于体外细胞培养的含药血清浓度一般认为不应超过 20%^[8]。我们前期实验研究表明, 独活寄生汤含药血清对体外培养的软骨细胞的最佳干预浓度为 10%^[9]。本实验采用时间梯度法优化独活寄生汤对软骨细胞的最佳干预时间, 结果显示 10% 的独活寄生汤含药血清作用时间为 48 h 时, 对软骨细胞活性促

进作用相对最明显, 故而可以选择 48 h 作为 10% 独活寄生汤含药血清对软骨细胞的较佳培养时间。

IL-1 β 是一种常见的促炎细胞因子, 其主要作用包括刺激激活其他炎症介质, 在诱导软骨细胞炎症以及凋亡过程中具有重要作用^[10]。体外培养的软骨细胞正常状态下无一氧化氮产生, 加入外源性 IL-1 β 后能够刺激软骨细胞产生诱导型一氧化氮合酶, 继而产生大量一氧化氮引起细胞脂质过氧化, 调节细胞凋亡基因, 诱导软骨细胞凋亡^[11-12]。IL-1 β 可通过调节 mRNA 表达, 诱导炎症介质如 MMPs 的产生, 促进软骨退变并抑制软骨修复^[13-14]; 同时能抑制软骨细胞 II 型前胶原 miRNA 的表达及 II 型胶原和蛋白多糖的合成, 促进软骨和滑膜组织中胶原酶和蛋白聚糖酶的表达, 导致胶原纤维网状结构破坏, 软骨基质降解, 最终加剧关节软骨退变。因此本实验选择 IL-1 β 作为软骨细胞炎症模型建立的诱导剂, 以 MMP-13 为检测指标, 采用 ELISA 法优化 IL-1 β 诱导软骨细胞炎症模型的量效关系, 结果显示以浓度为 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-1 β 刺激软骨细胞 24 h 后, 软骨细

胞产生 MMP-13 的浓度最大。

GPCR 是一大类偶联受体家族,具有 7 个跨膜 α 螺旋的识别特征,在信号转导过程中,细胞外信号通过激活的跨膜受体和跨膜功能蛋白的协助作用将信息传达入细胞内,传至细胞内的信号激活 G 蛋白,结合离子通道,形成第 2 信使激活后续酶系统,通过不同信号通路产生不同的生物学效应^[15-16]。MAPK 有多个亚家族,其中 p38 MAPK、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)这 3 条信号通路与 OA 密切相关,且 p38 MAPK 和 JNK 信号转导通路是参与调控炎症反应的重要信号通路^[17]。哺乳动物细胞的 GPCRs 能够特异性激活 ERK、JNK 和 p38MAPK 信号通路^[18]。活化的 MAPK 磷酸化转录子,会引起相关基因转录,产生一系列致炎因子、趋化因子、MMPs 等,继而影响软骨细胞的正常代谢活动,使软骨细胞正常结构以及功能被改变、导致软骨细胞凋亡、软骨基质降解,致使软骨退变。本研究结果显示,在 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞中, G α s、G α q、G α o 蛋白表达水平下调, G α i 蛋白表达水平上调。用独活寄生汤含药血清干预 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞,发现 G α s、G α q 及 G α o 蛋白表达水平明显上升, G α i 蛋白表达水平明显下降。这提示,独活寄生汤含药血清调控 G 蛋白偶联信号传导通路,调节相关 G 蛋白的表达,抑制软骨细胞炎症反应的进一步发展。

本研究结果显示,独活寄生汤含药血清可以抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症反应,其作用机制可能与 G 蛋白偶联信号传导系统的调控有关,但其具体作用靶点有待进一步深入研究。在以后的研究中,我们将以 G 蛋白偶联信号传导系统介导的 MAPK 信号通路为切入点,检测 MAPK 信号通路中丝裂原细胞外信号调节激酶、ERK 等基因蛋白的表达,进一步为独活寄生汤的临床应用提供科学性的实验依据。

5 参考文献

- [1] TAMURA T, HIGUCHI Y, KITAMURA H, et al. Erratum to: novel hyaluronic acid-methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee; efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1):121.
- [2] ZHANG P, KOFRON CM, MENDE U. Heterotrimeric G protein-mediated signaling and its non-canonical regulation in the heart[J]. Life Sci, 2015, 129:35-41.
- [3] 林飞太,林煜,张怡元,等. 独活寄生汤含药血清对兔退变软骨细胞“caveolin-p38MAPK”信号通路调控作用的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(4):5-9.
- [4] 郑春松,叶蕻芝,李西海,等. 独活寄生汤含药血清对白细胞介素 1 β 诱导的退变关节软骨细胞中基质金属蛋白酶和环氧化酶 2 表达的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(12):1-6.
- [5] GAO Y, LIU S, HUANG J, et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes[J]. Biomed Res Int, 2014, (2):648459.
- [6] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:356-358.
- [7] 闫虎,苏友新,林学义,等. II型胶原酶消化法培养兔关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50):8647-8653.
- [8] 王宁生,雷燕,刘平. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5):263-265.
- [9] 吴广文,王武炼,潘彩彬,等. 独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(10):5-9.
- [10] LEE AS, ELLMAN MB, YAN D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain[J]. Gene, 2013, 527(2):440-447.
- [11] 邵越峰,陈维毅,卫小春,等. 周期性张应变对重组人白细胞介素-1 β 诱导的一氧化氮表达作用的实验研究[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(4):265-267.
- [12] 黄建花,何英,赖国旗. 川芎嗪对 IL-1 β 诱导的兔原代软骨细胞 iNOS 表达和 NO 合成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(16):1642-1645.
- [13] 贺牡丹,王小平,陈同生. 白介素-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(1):49-54.
- [14] NAKAMURA DS, HOLLANDER JM, UCHIMURA T, et al. Pigment Epithelium-Derived factor (PEDF) mediates cartilage matrix loss in an age-dependent manner under inflammatory conditions[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1):39.
- [15] 程建昕,唐赞. G 蛋白偶联受体的结构与功能研究进展[J]. 生命科学, 2015, 27(4):445-452.
- [16] ROSENBAUM DM, RASMUSSEN SG, KOBILKA BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors[J]. Nature, 2009, 459(7245):356-363.
- [17] 高世超,殷海波,刘宏潇,等. MAPK 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 27(5):441-444.
- [18] 韦娜,糜漫天. G 蛋白偶联受体激活 Rho GTPases 的研究[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(z1):91-94.

(2017-03-19 收稿 2017-05-19 修回)