

# 基于瞬时受体电位香草素亚家族 4 信号通路探讨牛蒡子苷元对体外培养软骨细胞增殖及 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖表达的影响

陈世宣<sup>1</sup>, 刘益杰<sup>1</sup>, 胡笑燊<sup>1</sup>, 张增乔<sup>1</sup>, 李安琪<sup>1</sup>, 厉坤鹏<sup>1</sup>, 冯伟<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市第七人民医院, 上海 201137)

**摘要** 目的: 基于瞬时受体电位香草素亚家族 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 信号通路探讨牛蒡子苷元对体外培养软骨细胞增殖及 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖表达的影响。方法: 自新生 SD 大鼠膝关节软骨组织提取软骨细胞, 进行体外培养, 取第 1 代软骨细胞分别加入不同培养液进行干预。空白组仅加入常规培养液, 牛蒡子苷元组加入含 10  $\mu\text{mol}$  牛蒡子苷元的培养液, 牛蒡子苷元联合阻断剂组加入含 10  $\mu\text{mol}$  牛蒡子苷元和 10  $\mu\text{mol}$  GSK205 的培养液, 激动剂组加入含 1  $\mu\text{mol}$  4 $\alpha$ -PPD 的培养液, 阻断剂联合激动剂组加入含 10  $\mu\text{mol}$  GSK205 和 1  $\mu\text{mol}$  4 $\alpha$ -PPD 的培养液, 阻断剂组加入含 10  $\mu\text{mol}$  GSK205 的培养液。分别于干预 24 h 和 72 h 后以 CCK-8 法检测软骨细胞增殖情况, 48 h 后以 Western blot 法检测软骨蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白水平。结果: ①软骨细胞增殖测定结果。干预 24 h 后, 6 组的吸光度比较, 差异有统计学意义 ( $1.03 \pm 0.72, 1.32 \pm 0.11, 1.01 \pm 0.05, 1.33 \pm 0.34, 1.04 \pm 0.50, 1.10 \pm 0.06$ ;  $F = 18.309, P = 0.000$ )。牛蒡子苷元组、激动剂组的吸光度均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组、阻断剂组的吸光度与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $P = 0.632, P = 0.840, P = 0.164$ ); 牛蒡子苷元组的吸光度高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元组与激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.834$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的吸光度低于激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与阻断剂联合激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.498$ ); 激动剂组的吸光度高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。干预 72 h 后, 6 组的吸光度比较, 差异有统计学意义 ( $1.66 \pm 0.02, 2.21 \pm 0.05, 1.84 \pm 0.04, 1.92 \pm 0.07, 1.71 \pm 0.10, 1.74 \pm 0.08$ ;  $F = 37.629, P = 0.000$ )。牛蒡子苷元组、牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组的吸光度均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ); 阻断剂联合激动剂组、阻断剂组与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $P = 0.326, P = 0.104$ ); 牛蒡子苷元组的吸光度高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组及阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的吸光度低于激动剂组 ( $P = 0.010$ ), 与阻断剂联合激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.098$ ); 激动剂组的吸光度高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。②软骨蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白水平测定结果。5 组软骨细胞中软骨蛋白聚糖水平比较, 差异有统计学意义 ( $1.00 \pm 0.00, 20.74 \pm 5.01, 4.20 \pm 0.66, 22.87 \pm 1.82, 2.09 \pm 0.63$ ;  $F = 194.544, P = 0.000$ )。牛蒡子苷元组、激动剂组的软骨蛋白聚糖水平均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $P = 0.136, P = 0.593$ ); 牛蒡子苷元组的软骨蛋白聚糖水平高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元组与激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.305$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的软骨蛋白聚糖水平低于激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与阻断剂联合激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.310$ ); 激动剂组的软骨蛋白聚糖水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。5 组软骨细胞中 II 型胶原蛋白水平比较, 差异有统计学意义 ( $1.00 \pm 0.00, 2.94 \pm 0.11, 1.92 \pm 0.17, 2.04 \pm 0.12, 0.78 \pm 0.09$ ;  $F = 58.701, P = 0.000$ )。牛蒡子苷元组、牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组的 II 型胶原蛋白水平均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 阻断剂联合激动剂组的 II 型胶原蛋白水平低于空白组 ( $P = 0.032$ ); 牛蒡子苷元组的 II 型胶原蛋白水平高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组、阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的 II 型胶原蛋白水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.193$ ); 激动剂组的 II 型胶原蛋白水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。结论: 牛蒡子苷元可通过 TRPV4 信号通路促进体外培养软骨细胞的增殖及软骨细胞中 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖的表达。

**关键词** 骨关节炎; 牛蒡子苷元; 软骨细胞; 瞬时受体电位香草素亚家族 4; 细胞增殖; 胶原 II 型; 软骨蛋白聚糖类

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目 (15ZR1441000)

通讯作者: 冯伟 E-mail: fwginger@126.com

## An experimental study of effect of arctigenin on proliferation of chondrocyte cultured in vitro and expression of type II collagen protein and aggrecan based on the transient receptor potential vanilloid 4 signaling pathway

CHEN Shixuan<sup>1</sup>, LIU Yijie<sup>1</sup>, HU Xiaoshen<sup>1</sup>, ZHANG Zengqiao<sup>1</sup>, LI Anqi<sup>1</sup>, LI Kunpeng<sup>1</sup>, FENG Wei<sup>2</sup>

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. The Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 201137, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effect of arctigenin on proliferation of chondrocyte cultured in vitro and expression of type II collagen protein and aggrecan based on the transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) signaling pathway. **Methods:** The chondrocytes were extracted from the knee cartilage tissues of newborn SD rats and were cultured in vitro, then the first-generation chondrocytes in blank group, arctigenin group, arctigenin-blocker group, agonist group, blocker-agonist group and blocker group were cultured in conventional culture medium, arctigenin (10  $\mu\text{mol}$ ) culture medium, arctigenin (10  $\mu\text{mol}$ ) - GSK205 (10  $\mu\text{mol}$ ) culture medium, 4 $\alpha$ -PPD (1  $\mu\text{mol}$ ) culture medium, GSK205 (10  $\mu\text{mol}$ ) - 4 $\alpha$ -PPD (1  $\mu\text{mol}$ ) culture medium and GSK205 (10  $\mu\text{mol}$ ) culture medium respectively. The chondrocyte proliferation was detected by using CCK-8 method after 24- and 72-hour intervention respectively, and the expression of aggrecan and type II collagen protein were detected by using Western blot method after 48-hour intervention. **Results:** After 24-hour intervention, there was statistical difference in the absorbance between the 6 groups (1.03  $\pm$  0.72, 1.32  $\pm$  0.11, 1.01  $\pm$  0.05, 1.33  $\pm$  0.34, 1.04  $\pm$  0.50, 1.10  $\pm$  0.06;  $F = 18.309, P = 0.000$ ). The absorbance was higher in arctigenin group and agonist group compared to blank group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ). There was no statistical difference in the absorbance between arctigenin-blocker group and blank group and between blocker-agonist group and blank group and between blocker group and blank group ( $P = 0.632, P = 0.840, P = 0.164$ ). The absorbance was higher in arctigenin group compared to arctigenin-blocker group and blocker-agonist group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ). There was no statistical difference in the absorbance between arctigenin group and agonist group ( $P = 0.834$ ). The absorbance was lower in arctigenin-blocker group compared to agonist group ( $P = 0.000$ ). There was no statistical difference in the absorbance between arctigenin-blocker group and blocker-agonist group ( $P = 0.498$ ). The absorbance was higher in agonist group compared to blocker-agonist group ( $P = 0.000$ ). After 72-hour intervention, there was statistical difference in the absorbance between the 6 groups (1.66  $\pm$  0.02, 2.21  $\pm$  0.05, 1.84  $\pm$  0.04, 1.92  $\pm$  0.07, 1.71  $\pm$  0.10, 1.74  $\pm$  0.08;  $F = 37.629, P = 0.000$ ). The absorbance were higher in arctigenin group, arctigenin-blocker group and agonist group compared to blank group ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ). There was no statistical difference in the absorbance between blocker-agonist group and blank group and between blocker group and blank group ( $P = 0.326, P = 0.104$ ). The absorbance was higher in arctigenin group compared to arctigenin-blocker group, agonist group and blocker-agonist group ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in arctigenin-blocker group compared to agonist group ( $P = 0.010$ ). There was no statistical difference in the absorbance between arctigenin-blocker group and blocker-agonist group ( $P = 0.098$ ), and the absorbance was higher in agonist group compared to blocker-agonist group ( $P = 0.000$ ). There was statistical difference in aggrecan level in chondrocytes between the 5 groups (1.00  $\pm$  0.00, 20.74  $\pm$  5.01, 4.20  $\pm$  0.66, 22.87  $\pm$  1.82, 2.09  $\pm$  0.63;  $F = 194.544, P = 0.000$ ). The aggrecan level was higher in arctigenin group and agonist group compared to blank group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ). There was no statistical difference in aggrecan level between arctigenin-blocker group and blank group and between blocker-agonist group and blank group ( $P = 0.136, P = 0.593$ ). The aggrecan level was higher in arctigenin group compared to arctigenin-blocker group and blocker-agonist group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ). There was no statistical difference in aggrecan level between arctigenin group and agonist group ( $P = 0.305$ ). The aggrecan level was lower in arctigenin-blocker group compared to agonist group ( $P = 0.000$ ), and there was no statistical difference in aggrecan level between arctigenin-blocker group and blocker-agonist group ( $P = 0.310$ ). The aggrecan level was higher in agonist group compared to blocker-agonist group ( $P = 0.000$ ). There was statistical difference in type II collagen protein level between the 5 groups (1.00  $\pm$  0.00, 2.94  $\pm$  0.11, 1.92  $\pm$  0.17, 2.04  $\pm$  0.12, 0.78  $\pm$  0.09;  $F = 58.701, P = 0.000$ ). The type II collagen protein levels were higher in arctigenin group, arctigenin-blocker group and agonist group compared to blank group ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in blocker-agonist group compared to blank group ( $P = 0.032$ ), and was higher in arctigenin group compared to arctigenin-blocker group, agonist group and blocker-agonist group ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was higher in arctigenin-blocker group compared to blocker-agonist group ( $P = 0.000$ ). There was no statistical difference in type II collagen protein level between arctigenin-blocker group and agonist group ( $P = 0.193$ ), and the type II collagen protein level was higher in agonist group compared to blocker-agonist group ( $P = 0.000$ ). **Conclusion:** Arctigenin can promote the proliferation of chondrocyte cultured in vitro and the expression of type II collagen protein and aggrecan through the TRPV4 signaling pathway.

**Key words** osteoarthritis; arctiin; chondrocytes; TRPV4; cell proliferation; collagen type II; aggrecans

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性骨关节病,其病因复杂。目前很多学者认为,多种因素引起的软骨细胞和细胞外基质功能与结构异常是 OA 发生与发展的始动环节。瞬时受体电位香草素亚家族 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 信号通路是广泛存在于关节软骨中的力学信号感受器,对维持关节软骨的正常功能具有重要作用。

OA 属中医“痹证”范畴,石氏伤科理论认为其主要病机为痰湿阻络。牛蒡子汤是石氏伤科治疗痰湿阻络型 OA 的经验方,牛蒡子苷元是其君药牛蒡子中的主要活性成分。本研究基于 TRPV4 信号通路探讨了牛蒡子苷元对体外培养软骨细胞增殖及 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖表达的影响。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 清洁级新生 24 h 内 SD 大鼠 3 只,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。

**1.2 药物与试剂** 牛蒡子苷元(纯度 >99%)(上海江莱生物科技有限公司);改良型 RPMI-1640 培养基(Hyclone);胎牛血清、D-Hanks 液、0.25% 胰蛋白酶(Gibco);II 型胶原抗体、软骨蛋白聚糖抗体(Abcam);GAPDH 抗体和抗兔荧光二抗(Cell Signaling Technology);甲苯胺蓝染色液(Sigma);DAPI(日本东仁公司);RIPA 蛋白裂解液(中等强度)、100 mmol PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、PAGE 凝胶快速配制试剂盒、SDS-PAGE 电泳液、转膜液、ECL 显影液(碧云天生物技术研究);PageRuler Prestained Protein Ladder(Thermo)。

**1.3 实验仪器** SW-CJ-1FD 超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);HF151 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);3K15 低温高速台式离心机(Sigma);Synergy2 酶标仪、Powerpac Basic 041BR 电泳仪(BIO-TEK);FluorChemE 化学发光成像仪(ProteinSimple);Leica TCS SP8 MP 激光共聚焦显微镜(Leica)。

## 2 方法

**2.1 软骨细胞分离和培养** 将新生 SD 大鼠脱颈处死,置于 75% 酒精中浸泡消毒 10 min,用 PBS 溶液清洗 3 遍,分离膝关节软骨组织,D-Hanks 液清洗 3

遍。将膝关节软骨组织用无菌刀片尽量切碎,再转移至 15 mL 离心管中,加入 0.25% 胰蛋白酶 5 mL,于 37 °C 恒温水浴锅中消化 40 min,弃上清液,加入 0.2% 的 II 型胶原酶 5 mL,37 °C 恒温水浴锅中消化约 90 min,弃上清液,加入 12 mL 含 10% 胎牛血清的培养液并转移至培养皿中,于 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,2 d 换液 1 次。

**2.2 CCK-8 法测定软骨细胞增殖情况** 将生长状态良好的第 1 代软骨细胞按每孔  $6 \times 10^3$  个接种于 96 孔培养中板,设置空白组、牛蒡子苷元组、牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组、阻断剂联合激动剂组、阻断剂组,隔夜贴壁后弃上清液。空白组仅加入常规培养液(含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 RPMI-1640 培养基),牛蒡子苷元组加入含 10 μmol 牛蒡子苷元的培养液,牛蒡子苷元联合阻断剂组加入含 10 μmol 牛蒡子苷元和 10 μmol GSK205 的培养液,激动剂组加入含 1 μmol 4α-PPD 的培养液,阻断剂联合激动剂组加入含 10 μmol GSK205 和 1 μmol 4α-PPD 的培养液,阻断剂组加入含 10 μmol GSK205 的培养液,48 h 后换液 1 次。分别于干预 24 h、72 h 后吸弃培养液,每孔加入 100 μL CCK-8 母液与无血清培养基按 1:9 比例混合的液体,37 °C 避光孵育 2 h,以酶标仪检测波长 490 nm 下的吸光度。

**2.3 甲苯胺蓝染色法观察软骨蛋白聚糖表达情况** 在 6 孔培养板中置入直径 14 mm 的圆形玻片,将第 1 代软骨细胞以每块  $3 \times 10^4$  个的密度接种于玻片上,隔夜贴壁后分别加入常规培养液(含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 RPMI-1640 培养基)(空白组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元的培养液(牛蒡子苷元组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元和 10 μmol GSK205 的培养液(牛蒡子苷元联合阻断剂组)、含 1 μmol 4α-PPD 的培养液(激动剂组)、含 10 μmol GSK205 和 1 μmol 4α-PPD 的培养液(阻断剂联合激动剂组)。48 h 后弃上清液,PBS 洗涤 3 遍,4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min,弃上清液,PBS 洗 3 次,1% 甲苯胺蓝染色液染色 60 min,PBS 充分清洗,无水乙醇迅速漂洗 1 次,晾干后拍照。

**2.4 免疫荧光染色观察 II 型胶原蛋白表达情况** 将第 1 代软骨细胞以每块  $5.4 \times 10^4$  个的细胞密度接种

于直径 25 mm 的激光共聚焦培养皿中,隔夜贴壁后分别加入常规培养液(含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 RPMI - 1640 培养基)(空白组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元的培养液(牛蒡子苷元组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元和 10 μmol GSK205 的培养液(牛蒡子苷元联合阻断剂组)、含 1 μmol 4α - PPD 的培养液(激动剂组)、含 10 μmol GSK205 和 1 μmol 4α - PPD 的培养液(阻断剂联合激动剂组)。48 h 后弃上清液, PBS 清洗 3 遍, 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, 弃上清液, 0.1% Triton - x100 室温透膜 10 min, 5% BSA 室温封闭 1 h, 加入兔抗大鼠 II 型胶原抗体(1:200 稀释), 4 ℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 遍, 避光抗兔二抗(1:100 稀释)室温孵育 1 h, DAPI 室温避光染核 2 min, TBST 洗涤 3 遍, 封片, 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

**2.5 Western blot 法检测软骨蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白水平** 将第 1 代软骨细胞按每孔  $1.8 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板中, 隔夜贴壁后分别加入常规培养液(含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 RPMI - 1640 培养基)(空白组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元的培养液(牛蒡子苷元组)、含 10 μmol 牛蒡子苷元和 10 μmol GSK205 的培养液(牛蒡子苷元联合阻断剂组)、含 1 μmol 4α - PPD 的培养液(激动剂组)、含 10 μmol GSK205 和 1 μmol 4α - PPD 的培养液(阻断剂联合激动剂组)。干预 48 h 后弃上清液, 用细胞刮刀将细胞从 6 孔培养板中刮下, 并分别转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 加入中等强度 RIPA 蛋白裂解液充分裂解, BCA 蛋白定量法测定蛋白量, 加入 SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 ℃ 恒温水浴锅中变性 10 min, 各组取相等量的蛋白加样于 8% 的 SDS - PAGE 凝胶中电泳 1.5 h, 之后转膜 2 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。各组分别加入 II 型胶原蛋白抗体(1:5000 稀释)、软骨蛋白聚糖抗体(1:1000 稀释)和 GAPDH(1:2000 稀释), 于 4 ℃ 层析柜中孵育过夜。TBST 洗膜 5 遍, 加入抗兔二抗(1:2000 稀释)室温孵育 2 h, 加 ECL 显影液并于凝胶成像系统中显影、拍照, 采用 Image pro plus 6.0 软件分析各条带。

**2.6 数据统计分析** 采用 SPSS18.0 软件进行数据统计分析。软骨细胞吸光度、软骨蛋白聚糖水平和 II 型胶原蛋白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 软骨细胞增殖测定结果** 干预 24 h 后, 6 组的吸光度比较, 差异有统计学意义。牛蒡子苷元组、激动剂组的吸光度均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组、阻断剂组的吸光度与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $P = 0.632, P = 0.840, P = 0.164$ ); 牛蒡子苷元组的吸光度高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元组与激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.834$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的吸光度低于激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与阻断剂联合激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.498$ ); 激动剂组的吸光度高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。见表 1。

干预 72 h 后, 6 组的吸光度比较, 差异有统计学意义。牛蒡子苷元组、牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组的吸光度均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ); 阻断剂联合激动剂组、阻断剂组与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $P = 0.326, P = 0.104$ ); 牛蒡子苷元组的吸光度高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组及阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的吸光度低于激动剂组 ( $P = 0.010$ ), 与阻断剂联合激动剂组相比, 差异无统计学意义 ( $P = 0.098$ ); 激动剂组的吸光度高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。见表 1。

表 1 CCK - 8 法测定的 6 组软骨细胞吸光度  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (孔)	干预 24 h 后	干预 72 h 后
空白组	4	1.03 ± 0.72	1.66 ± 0.02
牛蒡子苷元组	4	1.32 ± 0.11	2.21 ± 0.05
牛蒡子苷元联合阻断剂组	4	1.01 ± 0.05	1.84 ± 0.04
激动剂组	4	1.33 ± 0.34	1.92 ± 0.07
阻断剂联合激动剂组	4	1.04 ± 0.50	1.71 ± 0.10
阻断剂组	4	1.10 ± 0.06	1.74 ± 0.08
<i>F</i> 值		18.309	37.629
<i>P</i> 值		0.000	0.000

**3.2 甲苯胺蓝染色结果** 各组软骨细胞胞浆中均可见蓝紫色异染颗粒, 细胞核呈深蓝色, 其中牛蒡子苷元组和激动剂组阳性染色均强于空白组, 阻断剂联合激动剂组阳性染色弱于牛蒡子苷元组和牛蒡子苷元联合阻断剂组(图 1)。

**3.3 免疫荧光染色结果** 各组软骨细胞胞浆中均可见均匀的Ⅱ型胶原蛋白阳性染色,其中牛蒡子苷元组和激动剂组阳性染色均强于空白组,阻断剂联合激动剂组阳性染色弱于牛蒡子苷元组,阻断剂联合激动剂组阳性染色弱于激动剂组(图 2)。

**3.4 软骨蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白水平测定结果** 5 组软骨细胞中软骨蛋白聚糖水平比较,差异有统计

学意义。牛蒡子苷元组、激动剂组的软骨蛋白聚糖水平平均高于空白组( $P = 0.000, P = 0.000$ );牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组与空白组比较,组间差异均无统计学意义( $P = 0.136, P = 0.593$ );牛蒡子苷元组的软骨蛋白聚糖水平高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、阻断剂联合激动剂组( $P = 0.000, P = 0.000$ );牛蒡子苷元组与激动剂组比较,差异无统计

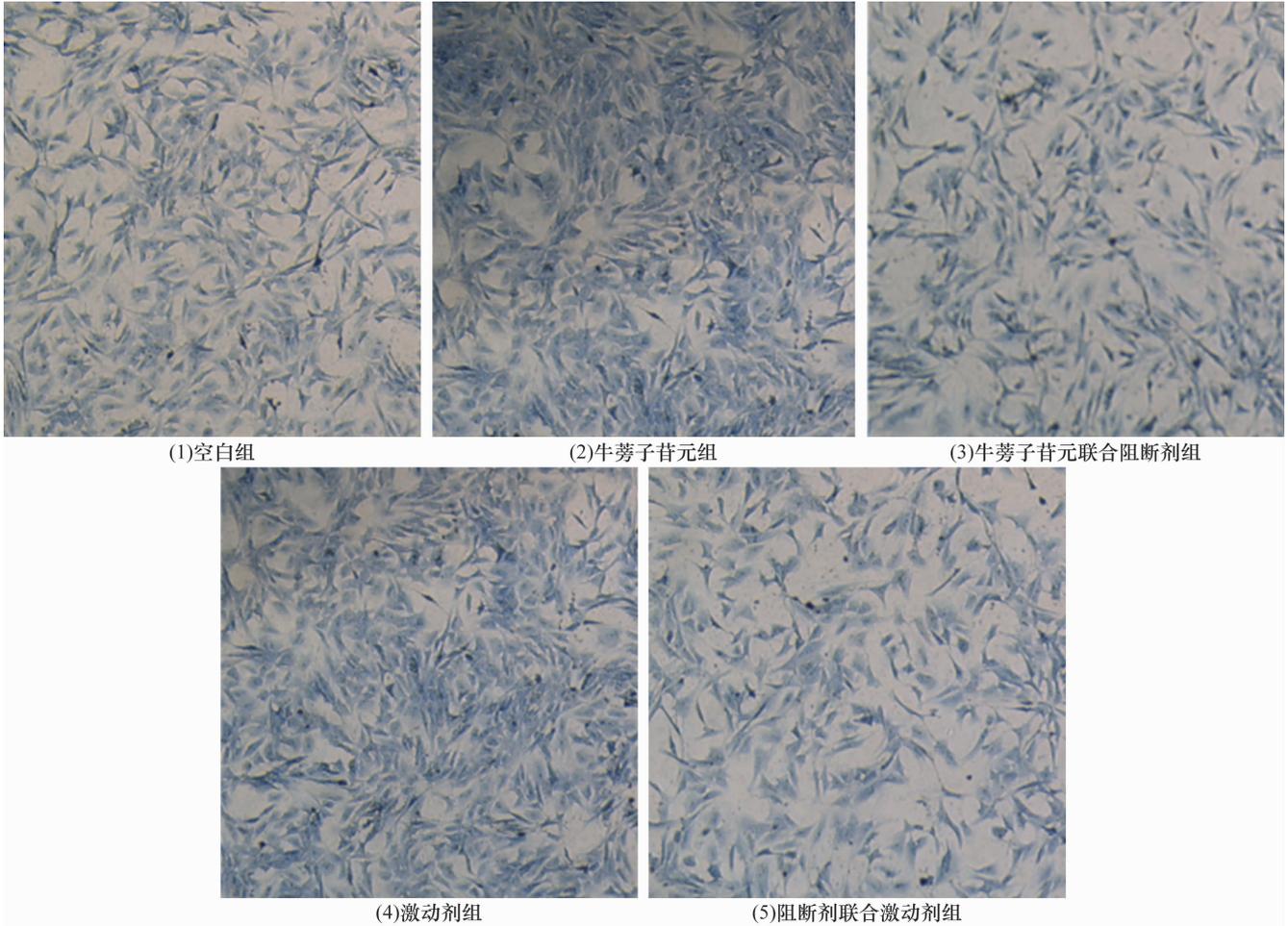
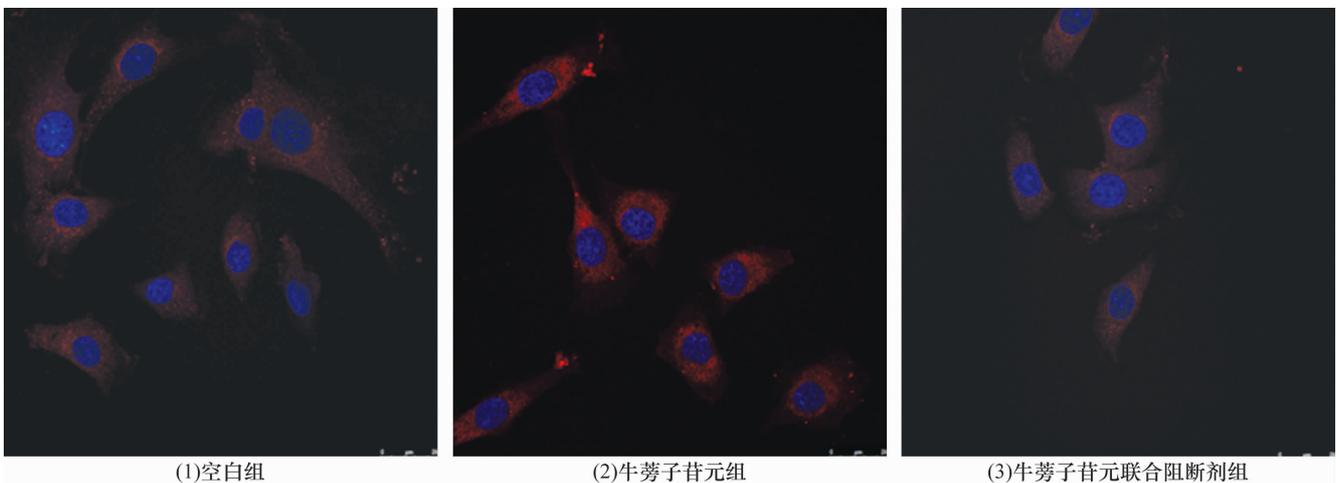


图 1 5 组软骨细胞中软骨蛋白聚糖表达情况(甲苯胺蓝染色 ×20)



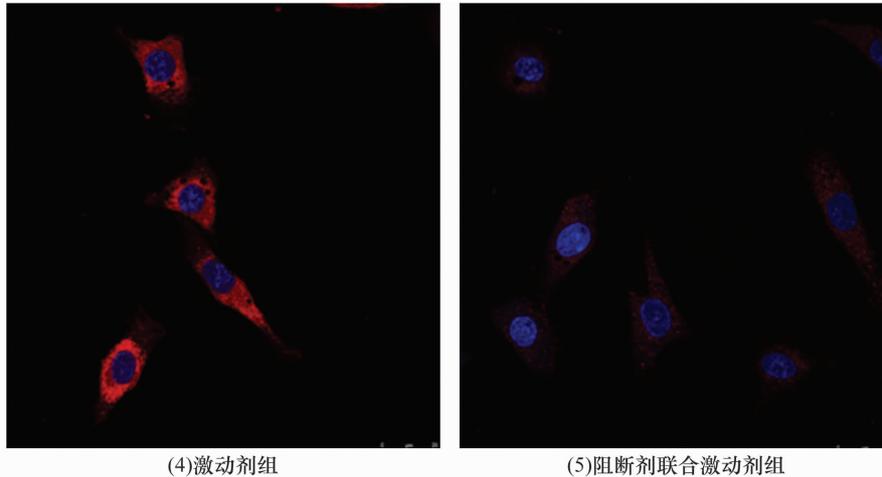


图 2 5 组软骨细胞中 II 型胶原蛋白表达情况 (免疫荧光染色  $\times 600$ )

蓝色为 DAPI 所染细胞核,红色为 II 型胶原蛋白阳性染色

学意义 ( $P = 0.305$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的软骨蛋白聚糖水平低于激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与阻断剂联合激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.310$ ); 激动剂组的软骨蛋白聚糖水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。见图 3、表 2。

5 组软骨细胞中 II 型胶原蛋白水平比较, 差异有统计学意义。牛蒡子苷元组、牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组的 II 型胶原蛋白水平均高于空白组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 阻断剂联合激动剂组的 II 型胶原蛋白水平低于空白组 ( $P = 0.032$ ); 牛蒡子苷元组的 II 型胶原蛋白水平高于牛蒡子苷元联合阻断剂组、激动剂组、阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 牛蒡子苷元联合阻断剂组的 II 型胶原蛋白水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ ), 与激动剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.193$ ); 激动剂组的 II 型胶原蛋白水平高于阻断剂联合激动剂组 ( $P = 0.000$ )。见图 3、表 2。

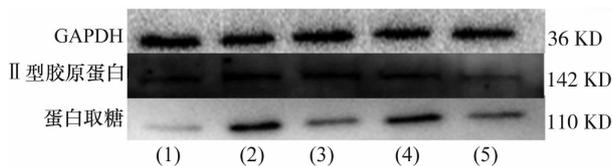


图 3 Western blot 法检测软骨蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白水平 (1)空白组 (2)牛蒡子苷元组 (3)牛蒡子苷元联合阻断剂组 (4)激动剂组 (5)阻断剂联合激动剂组

#### 4 讨论

关节软骨由软骨细胞和细胞外基质组成, 而软骨细胞主要由胶原纤维和软骨蛋白聚糖聚合而成, 构成独特的网状结构以缓冲机械应力。软骨细胞是关节

表 2 5 组软骨细胞中软骨蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白水平  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (孔)	软骨蛋白聚糖	II 型胶原蛋白
空白组	3	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
牛蒡子苷元组	3	20.74 $\pm$ 5.01	2.94 $\pm$ 0.11
牛蒡子苷元联合阻断剂组	3	4.20 $\pm$ 0.66	1.92 $\pm$ 0.17
激动剂组	3	22.87 $\pm$ 1.82	2.04 $\pm$ 0.12
阻断剂联合激动剂组	3	2.09 $\pm$ 0.63	0.78 $\pm$ 0.09
<i>F</i> 值		194.544	58.701
<i>P</i> 值		0.000	0.000

软骨中唯一的细胞, 分散于细胞外基质中, 负责感受、整合、分析各种刺激, 转换为细胞内信号并作出应答, 调控着细胞外基质中有机成分的合成与降解平衡。因而, 在以软骨退变为核心的疾病防治过程中, 众多学者都将软骨细胞作为首要治疗靶点<sup>[1]</sup>。不可否认, 细胞外基质在关节软骨发挥其生理功能中亦占有相当重要的地位, 细胞外基质中 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖的含量变化通常也被视为反映软骨细胞功能的重要指标。因此, 本研究将软骨细胞作为研究对象, 通过检测其增殖情况以观察药物对软骨细胞的影响, 通过检测 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖的表达情况以反映细胞外基质代谢的变化情况。

OA 病因复杂, 与肥胖、关节过度使用、创伤、遗传因素及生物因素等有关<sup>[2]</sup>。目前, 力学刺激对关节软骨生物学特性的影响日益成为相关领域研究的热点问题。研究发现, 载荷作用于关节软骨会使其发生一系列变化, 如软骨内液体流动、激发动作电位、改变电荷密度, 以及软骨细胞发生形状、体积和渗透压的变

化等。软骨细胞在感受上述变化后转换为细胞内信号并引发级联反应,以适应长期的力学刺激。TRPV4 信号通路是广泛存在于关节软骨中的力学信号通路,属于瞬时受体电位香草素亚家族中的一员,可被渗透压、机械应力、热及化学刺激等多种理化刺激直接激活<sup>[3]</sup>。研究发现,TRPV4 基因位点突变与人类多种关节软骨病变关系密切,如 3 型短躯干症、变形性骨骼发育不良等<sup>[4-5]</sup>,其具体机制与 TRPV4 突变后出现关节软骨骨化、蛋白多糖丢失、软骨下骨骨量和钙化半月板增加等有关<sup>[6]</sup>。Liedtke 等<sup>[7]</sup>报道,TRPV4 信号通路具有细胞体积调节功能,这在关节肿胀的 OA 早期维持软骨细胞内渗透压稳态和延缓疾病进程中起到重要作用。TRPV4 信号通路在促进干细胞向软骨细胞分化中亦起着相当重要的作用<sup>[8]</sup>。

石氏伤科是海派中医骨伤科的代表,经过几代人的努力,在运用中医药防治 OA 方面积累了丰富的临床经验。石氏伤科认为 OA 的基本病机为痰湿阻络,其化痰祛湿经典方牛蒡子汤在临床防治 OA 方面取得了良好的临床疗效<sup>[9]</sup>,方中牛蒡子具有祛痰化湿、通行十二经络、利腰膝凝滞之气以滑利关节的功效,为君药。牛蒡子昔元是牛蒡子的主要活性成分,我们前期研究发现牛蒡子昔元可促进软骨细胞增殖,并可较好地维持软骨细胞表型的稳定<sup>[10]</sup>。本研究中,牛蒡子昔元可促进软骨细胞增殖、上调 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖表达,其作用趋势与 TRPV4 信号通路特异性激活剂 4 $\alpha$ -PPD 一致,且可被 TRPV4 信号通路特异性阻断剂 GSK205 阻断。

本研究的结果提示,牛蒡子昔元可通过 TRPV4 信号通路促进体外培养软骨细胞的增殖及软骨细胞中 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖的表达。牛蒡子昔元促进体外培养软骨细胞 II 型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖表达的具体作用机制,是通过激活 TRPV4 通路从而上调相关 mRNA 表达,还是抑制蛋白降解酶如基质金属蛋白酶、解聚蛋白样金属蛋白酶,将是我们今

后研究的方向。

## 5 参考文献

- [1] VINCENT TL. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: a focus on the pericellular matrix [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(3): 449-454.
- [2] 原晓强, 金王东, 周云婧, 等. 纯化血小板对大鼠软骨细胞增殖及膝关节炎大鼠软骨修复的作用研究 [J]. *中医正骨*, 2016, 28(12): 6-12.
- [3] MCNULTY AL, LEDDY HA, LIEDTKE W, et al. TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015, 388(4): 437-450.
- [4] NISHIMURA G, LAUSCH E, SAVARIRAYAN R, et al. TRPV4-associated skeletal dysplasias [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2012, 160C(3): 190-204.
- [5] KANG SS, SHIN SH, AUH CK, et al. Human skeletal dysplasia caused by a constitutive activated transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) cation Channel mutation [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(12): 707-722.
- [6] CLARK AL, VOTTA BJ, KUMAR S, et al. Chondroprotective role of the osmotically sensitive ion Channel transient receptor potential vanilloid 4: age- and sex-dependent progression of osteoarthritis in Trpv4-deficient mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 2973-2983.
- [7] LIEDTKE W, CHOE Y, MARTI-RENO MA, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated Channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor [J]. *Cell*, 2000, 103(3): 525-535.
- [8] O'CONNOR CJ, GRIFFIN TM, LIEDTKE W, et al. Increased susceptibility of Trpv4-deficient mice to obesity and obesity-induced osteoarthritis with very high-fat diet [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(2): 300-304.
- [9] 石琤, 屠安琪, 吴军豪. 石氏经验方牛蒡子汤在伤科的临床应用 [J]. *中医文献杂志*, 2015, 33(2): 44-46.
- [10] 陈世宣, 冯伟, 周一心, 等. 牛蒡子昔元对关节软骨细胞增殖及 II 型胶原表达的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(7): 69-71.

(2017-09-03 收稿 2017-09-29 修回)

### · 作者须知 ·

### 请作者在写论文时使用参考文献

参考文献不仅增加论文的学术性,而且表明论文的科学依据,也是对他人劳动成果的尊重。另外,凡无参考文献的文章,国家进行论文统计时不予统计。因此,希望作者在撰写论文时,凡在文中引用他人数据或观点时,应使用参考文献。并希望作者使用参考文献时参照本刊稿约,按参考文献的书写要求书写完整,且依论文中引用的先后顺序进行参考文献排序并在论文中作相应标注。参考文献宜选用近 1~2 年内的权威性学术期刊文献。