

· 基础研究 ·

# 独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞蛋白激酶 R 样内质网激酶/免疫球蛋白结合蛋白信号通路的影响

陈俊<sup>1</sup>, 吴广文<sup>2</sup>, 许惠凤<sup>2</sup>, 郑春松<sup>2</sup>, 戴一琛<sup>1</sup>, 邱建清<sup>1</sup>, 刘淑如<sup>1</sup>, 陈振沅<sup>1</sup>, 刘献祥<sup>2</sup>

(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: 观察独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin-binding protein, BiP) 信号通路的影响。方法: 将 36 只 2 月龄清洁级雄性 SD 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组, 每组 18 只。含药血清组按照  $9.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以独活寄生汤灌胃、空白血清组按照  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  以生理盐水灌胃, 每天 1 次。连续灌胃 7 d 后, 麻醉下行腹主动脉采血, 获取独活寄生汤含药血清和空白血清。取 4 周龄 SD 大鼠膝关节, 分离软骨进行软骨细胞培养, 传代至第 3 代, 以白细胞介素-1 $\beta$  干预 24 h 后获得退变软骨细胞。将获得的退变软骨细胞分为 2 组, 分别以独活寄生汤含药血清 (独活寄生汤组) 和空白血清 (空白组) 进行干预。分别在干预 24 h、48 h 和 72 h 后, 测定 2 组退变软骨细胞凋亡率、PERK mRNA 含量、Bip mRNA 含量、真核细胞翻译起始因子-2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF-2 $\alpha$ ) mRNA 含量、转录激活因子-4 (activating transcription factor 4, ATF-4) mRNA 含量、生长抑制 DNA 损伤基因 153 抗原 (growth arrest and DNA damage-inducible 153, GADD153) mRNA 含量、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine containing aspartate specific protease, Caspase)-9 活性及 Caspase-3 活性。结果: ①退变软骨细胞凋亡率。时间因素与分组因素存在交互效应 ( $F = 9.022, P = 0.038$ )。2 组软骨细胞凋亡率总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应 ( $F = 325.246, P = 0.000$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞凋亡率的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 389.768, P = 0.000$ ); 2 组软骨细胞凋亡率随时间变化均呈降低趋势; 干预后各时点独活寄生汤组软骨细胞凋亡率均低于空白组 ( $t = 14.055, P = 0.000; t = 13.264, P = 0.000; t = 12.183, P = 0.000$ )。②退变软骨细胞中 PERK mRNA 含量。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F = 3.002, P = 0.157$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 PERK mRNA 含量总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F = 17.833, P = 0.013$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 PERK mRNA 含量的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 43.060, P = 0.003$ ); 2 组软骨细胞中 PERK mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。③退变软骨细胞中 Bip mRNA 含量。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F = 4.092, P = 0.106$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 Bip mRNA 含量总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F = 15.136, P = 0.018$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 Bip mRNA 含量的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 62.968, P = 0.001$ ); 2 组软骨细胞中 Bip mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。④退变软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F = 2.138, P = 0.201$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F = 155.852, P = 0.000$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 50.328, P = 0.000$ ); 2 组软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势, 且降低趋势基本一致。⑤退变软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量。时间因素与分组因素存在交互效应 ( $F = 14.612, P = 0.017$ ); 2 组软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量总体比较, 组间差异有统计学意义, 即存在分组效应 ( $F = 33.703, P = 0.004$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 187.700, P = 0.000$ ); 2 组软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势; 干预后各时点独活寄生汤组软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量均低于空白组 ( $t = 4.343, P = 0.012; t = 3.915, P = 0.017; t = 10.719, P = 0.000$ )。⑥退变软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F = 3.053, P = 0.116$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F = 16.946, P = 0.015$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F = 88.206, P = 0.000$ ); 2 组软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。⑦退变软骨细胞中 Caspase-9 活性。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F = 1.266, P = 0.327$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 Caspase-9 活性总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F = 21.164, P = 0.010$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 Caspase-9 活性的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F =$

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573801); 福建省自然科学基金杰青项目 (2017J06018); 福建省卫生计生科研人才培养项目 (2017-ZQN-62)

通讯作者: 刘献祥 E-mail: liuxianxiang@163.com

263.384,  $P=0.000$ ); 2 组软骨细胞中 Caspase - 9 活性随时间变化均呈降低趋势, 且降低趋势基本一致。⑧退变软骨细胞中 Caspase - 3 活性。时间因素与分组因素不存在交互效应 ( $F=1.346, P=0.314$ ); 独活寄生汤组软骨细胞中 Caspase - 3 活性总体低于空白组, 即存在分组效应 ( $F=19.422, P=0.012$ ); 干预后不同时间点之间软骨细胞中 Caspase - 3 活性的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ( $F=130.649, P=0.000$ ); 2 组软骨细胞中 Caspase - 3 活性随时间变化均呈降低趋势, 且降低趋势基本一致。结论: 独活寄生汤含药血清可通过调控大鼠退变软骨细胞 PERK/Bip 信号通路, 抑制因内质网应激反应引起的软骨细胞凋亡。

**关键词** 骨关节炎; 软骨细胞; 独活寄生汤; 信号传导; 大鼠

## Effect of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤) medicated serum on protein kinase R - like endoplasmic reticulum kinase/immunoglobulin - binding protein signaling pathway in degenerated chondrocytes of rats

CHEN Jun<sup>1</sup>, WU Guangwen<sup>2</sup>, XU Huifeng<sup>2</sup>, ZHENG Chunsong<sup>2</sup>, DAI Yichen<sup>1</sup>, QIU Jianqing<sup>1</sup>, LIU Shuru<sup>1</sup>, CHEN Zhenyuan<sup>1</sup>, LIU Xianxiang<sup>2</sup>

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 observe the effect of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤, DHJST) medicated serum on protein kinase R - like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/immunoglobulin - binding protein (BiP) signaling pathway in degenerated chondrocytes of rats.

**Methods:** Thirty - six 2 - month - old clean - grade male SD rats were randomly divided into medicated serum group and blank serum group, 18 rats in each group. The rats in medicated serum group were intragastric administrated with DHJST in dosage of 9.3 g/kg, while the others in blank serum group were intragastric administrated with the normal saline in dosage of 10 mL/kg, once a day for consecutive 7 days. After the last intragastric administration, their blood were fetched out from abdominal aorta under anesthesia and were made into DHJST medicated serum and blank serum respectively. The knee joints of 4 - week - old SD rats were fetched out and the chondrocytes were isolated from knee articular cartilage and were cultured. The third - generation chondrocytes were intervened by interleukin - 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ) for 24 hours and then the degenerated chondrocytes were obtained. The obtained degenerated chondrocytes were divided into 2 groups and were intervened by DHJST medicated serum (DHJST group) and blank serum (blank group) respectively. The degenerated chondrocytes apoptosis rate, the contents of PERK mRNA, Bip mRNA, eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF - 2 $\alpha$ ) mRNA, activating transcription factor 4 (ATF - 4) mRNA and growth arrest and DNA damage - inducible 153 (GADD153) mRNA and the activities of cysteine containing aspartate specific protease (Caspase) - 9 and Caspase - 3 in degenerated chondrocytes were detected at 24, 48 and 72 hours after the intervention respectively. **Results:** There was interaction between time factor and group factor in degenerated chondrocytes apoptosis rate ( $F=9.022, P=0.038$ ). There was statistical difference in degenerated chondrocytes apoptosis rate between the 2 groups in general, in other words, there was group effect ( $F=325.246, P=0.000$ ). There was statistical difference in chondrocytes apoptosis rate between different timepoints after the intervention, in other words, there was time effect ( $F=389.768, P=0.000$ ). The chondrocytes apoptosis rate presented a time - dependent decreasing trend in both of the 2 groups. The chondrocytes apoptosis rate was lower in DHJST group compared to blank group at different timepoints after intervention ( $t=14.055, P=0.000; t=13.264, P=0.000; t=12.183, P=0.000$ ). There was no interaction between time factor and group factor in the content of PERK mRNA in degenerated chondrocytes ( $F=3.002, P=0.157$ ). The content of PERK mRNA in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F=17.833, P=0.013$ ). There was statistical difference in content of PERK mRNA in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F=43.060, P=0.003$ ). The content of PERK mRNA in chondrocytes presented a time - dependent decreasing trend in both of the 2 groups. There was no interaction between time factor and group factor in the content of Bip mRNA in degenerated chondrocytes ( $F=4.092, P=0.106$ ). The content of Bip mRNA in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F=15.136, P=0.018$ ). There was statistical difference in content of Bip mRNA in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F=62.968, P=0.001$ ). The content of Bip mRNA in chondrocytes presented a time - dependent decreasing trend in both of the 2 groups. There was no interaction between time factor and group factor in the content of eIF - 2 $\alpha$  mRNA in degenerated chondrocytes ( $F=2.138, P=0.201$ ). The content of eIF - 2 $\alpha$  mRNA in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F=155.852, P=0.000$ ). There was statistical difference in content of eIF - 2 $\alpha$  mRNA in chondrocytes between different timepoints after inter-

vention, in other words, there was time effect ( $F = 50.328, P = 0.000$ ). The content of eIF-2 $\alpha$  mRNA in chondrocytes presented a time-dependent decreasing trend in both of the 2 groups, and the 2 groups were consistent with each other in the decreasing trend of content of eIF-2 $\alpha$  mRNA in chondrocytes. There was interaction between time factor and group factor in the content of ATF-4 mRNA in degenerated chondrocytes ( $F = 14.612, P = 0.017$ ). There was statistical difference in content of ATF-4 mRNA in chondrocytes between the 2 groups in general, in other words, there was group effect ( $F = 33.703, P = 0.004$ ). There was statistical difference in content of ATF-4 mRNA in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F = 187.700, P = 0.000$ ). The content of ATF-4 mRNA in chondrocytes presented a time-dependent decreasing trend in both of the 2 groups. The content of ATF-4 mRNA in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group at different timepoints after intervention ( $t = 4.343, P = 0.012$ ;  $t = 3.915, P = 0.017$ ;  $t = 10.719, P = 0.000$ ). There was no interaction between time factor and group factor in content of GADD153 mRNA in degenerated chondrocytes ( $F = 3.053, P = 0.116$ ). The content of GADD153 mRNA in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F = 16.946, P = 0.015$ ). There was statistical difference in content of GADD153 mRNA in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F = 88.206, P = 0.000$ ). The content of GADD153 mRNA in chondrocytes presented a time-dependent decreasing trend in both of the 2 groups. There was no interaction between time factor and group factor in the activity of Caspase-9 in degenerated chondrocytes ( $F = 1.266, P = 0.327$ ). The activity of Caspase-9 in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F = 21.164, P = 0.010$ ). There was statistical difference in activity of Caspase-9 in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F = 263.384, P = 0.000$ ). The activity of Caspase-9 in chondrocytes presented a time-dependent decreasing trend in both of the 2 groups, and the 2 groups were consistent with each other in the decreasing trend of activity of Caspase-9 in chondrocytes. There was no interaction between time factor and group factor in activity of Caspase-3 in degenerated chondrocytes ( $F = 1.346, P = 0.314$ ). The activity of Caspase-3 in chondrocytes was lower in DHJST group compared to blank group in general, in other words, there was group effect ( $F = 19.422, P = 0.012$ ). There was statistical difference in activity of Caspase-3 in chondrocytes between different timepoints after intervention, in other words, there was time effect ( $F = 130.649, P = 0.000$ ). The activity of Caspase-3 in chondrocytes presented a time-dependent decreasing trend in both of the 2 groups, and the 2 groups were consistent with each other in the decreasing trend of activity of Caspase-3 in chondrocytes. **Conclusion:** DHJST medicated serum can inhibit the chondrocyte apoptosis caused by endoplasmic reticulum stress reaction through regulating PERK/BiP signaling pathway in the degenerated chondrocytes of rats.

**Keywords** osteoarthritis; chondrocytes; Duhuo Jisheng Tang; signal transduction; rats

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种多见于中老年人的骨关节疾病, 发病率随年龄增长而增加<sup>[1-2]</sup>, 易反复发作、缠绵难愈, 具有较高的致残率, 严重影响患者的生活质量<sup>[3-4]</sup>, 治疗方法虽多, 但主要以对症治疗为主。独活寄生汤在临床长期被用于 OA 的治疗, 疗效可靠<sup>[5-10]</sup>。前期研究表明, 独活寄生汤可通过激活 G 蛋白偶联信号传导通路而抑制软骨基质降解, 从而使受损的软骨组织修复<sup>[11]</sup>, 有效抑制软骨细胞凋亡<sup>[12]</sup>, 但是是否是通过调节蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin-binding protein, BiP) 信号通路, 尚不明确。为此, 本实验观察了独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞 PERK/BiP 信号通路的影响, 现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 2 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 36 只, 4

周龄清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2007-0011。实验方案经医学动物实验伦理委员会审查通过。

**1.2 药物及试剂** 独活寄生汤, 药物组成包括独活 9 g、桑寄生 6 g、牛膝 6 g、杜仲 6 g、秦艽 6 g、防风 6 g、肉桂 6 g、细辛 6 g、当归 6 g、川芎 6 g、地黄 6 g、芍药 6 g、人参 6 g、茯苓 6 g、甘草 6 g。由福建中医药大学附属第二人民医院药剂科提供。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒 (BD 公司), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine containing aspartate specific protease, Caspase)-9 和 Caspase-3 活性检测试剂盒、TRIZOL 试剂 (Invitrogen 公司), DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶 (Hyclone 公司), 胎牛血清 (GIBCO 公司), II 型胶原酶粉末 (Sigma 公司), 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司), PERK、BiP、真核细胞翻译起始因子-2 $\alpha$  (eukary-

otic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF - 2 $\alpha$ )、转录激活因子 - 4 (activating transcription factor 4, ATF - 4)、生长抑制 DNA 损伤基因 153 抗原 (growth arrest and DNA damage - inducible 153, GADD153) 引物合成由上海生物工程公司完成。

**1.3 实验仪器** FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 公司), Elx800 酶标仪 (BioTek 公司), S1000PCR 仪 (Beckman Coulter 公司), ChemiDocXRS + 化学发光成像系统 (Bio - Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 血清制备** 将 36 只 2 月龄清洁级雄性 SD 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组, 每组 18 只。根据药理试验中动物与人体间的等效剂量换算关系<sup>[13]</sup>, 含药血清组按照 9.3 g · kg<sup>-1</sup> 以独活寄生汤灌胃、空白血清组按照 10 mL · kg<sup>-1</sup> 以生理盐水灌胃, 每天 1 次。连续灌胃 7 d 后, 麻醉下行腹主动脉采血, 离心后分别获取独活寄生汤含药血清和空白血清, 在 56 °C 水浴灭活 30 min, -20 °C 保存备用。

**2.2 退变软骨细胞造模及药物干预** 参照课题组前期取材方法, 将 4 周龄 SD 大鼠以颈椎脱臼法处死, 用 75% 酒精浸泡 5 min, 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、滑膜等组织后再次以 PBS 充分漂洗。用刀片刮取每个关节表面的软骨, 以 PBS 充分漂洗 3 次, 采用酶消化法消化, 获取软骨细胞<sup>[14]</sup>。培养、传代至第 3 代, 以 10 ng · mL<sup>-1</sup> 白细胞介素 - 1 $\beta$  干预 24 h, 获得退变软骨细胞<sup>[15-16]</sup>。将获得的退变软骨细胞分为 2 组, 分别以独活寄生汤

含药血清 (独活寄生汤组) 和空白血清 (空白组) 进行干预。分别在干预 24 h、48 h 和 72 h 后进行相关指标检测。

**2.3 退变软骨细胞凋亡率检测** 干预结束后, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞沉淀, 用试剂盒内的缓冲液重悬细胞, 调整其浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>。参照 Annexin V - FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书, 取 100  $\mu$ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中, 分别加入 5  $\mu$ L FITC 和 5  $\mu$ L PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 之后每管再加 400  $\mu$ L PBS 缓冲液。以 FACSCalibur 流式细胞仪检测、分析凋亡率。

**2.4 退变软骨细胞中 PERK mRNA、Bip mRNA、eIF - 2 $\alpha$  mRNA、ATF - 4 mRNA、GADD153 mRNA 含量检测** 干预结束后, 以 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行目的基因扩增, 电泳后进行结果分析。目的基因引物序列见表 1。

**2.5 退变软骨细胞中 Caspase - 9 和 Caspase - 3 活性检测** 干预结束后, 去上清, 加入 50  $\mu$ L 细胞裂解液, 冰上孵育 10 min 后, 以 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 1 min (离心半径 15 cm), 转移上清液至新的 EP 管中。采用 BCA 法进行蛋白浓度测定。每份样本按 100  $\mu$ g 蛋白的量加到 96 孔板, 加样量不足 50  $\mu$ L 的用细胞裂解液补齐, 做 3 个复孔, 分别加 50  $\mu$ L 2 × Reaction Buffer (使用前加 10 mM DTT) 至每份样本中, 再加 5  $\mu$ L Leu - Glu - His - Asp - pNA (Caspase - 9 底物) 或 Asp - Glu - Val - Asp - pNA (Caspase - 3 底物), 37 °C 避光孵育 2 h。另取 3 孔加 100  $\mu$ L PBS, 作为阴性对照。酶标仪上检测, 波长 405 nm。各干预组 OD

表 1 目的基因引物序列

基因名称		引物序列	长度
PERK	Sense	5' - CTCAGTGCATATACTGGAAA - 3'	203 bp
	Antisense	5' - ATGTCTGGAATATACCGAAG - 3'	
Bip	Sense	5' - CAAGAACCAACTCACGTC - 3'	213 bp
	Antisense	5' - GTGAGAACCATAGCAGAAAT - 3'	
eIF - 2 $\alpha$	Sense	5' - TAGCCAGTACAGATGTTGAC - 3'	141 bp
	Antisense	5' - AACTAGGATTCCAAGCTACA - 3'	
ATF - 4	Sense	5' - ATGACCGAAATGAGCTTCCTG - 3'	153 bp
	Antisense	5' - GCTGGAGAACCCATGAGGT - 3'	
GADD153	Sense	5' - ATGGCAGCTGAGTCTCTGCC - 3'	560 bp
	Antisense	5' - TGATGGTCTGGGTACACTCC - 3'	
$\beta$ - 肌动蛋白	Sense	5' - GGGAAAGTCTGGATAG - 3'	453 bp
	Antisense	5' - GTGATGTTTCGGATGG - 3'	

PERK: 蛋白激酶 R 样内质网激酶; Bip: 免疫球蛋白结合蛋白; eIF - 2 $\alpha$ : 真核细胞翻译起始因子 - 2 $\alpha$ ; ATF - 4: 转录激活因子 - 4; GADD153: 生长抑制 DNA 损伤基因 153 抗原

值与阴性对照组 OD 值的比值作为 Caspase - 9 与 Caspase - 3 活性相对值。

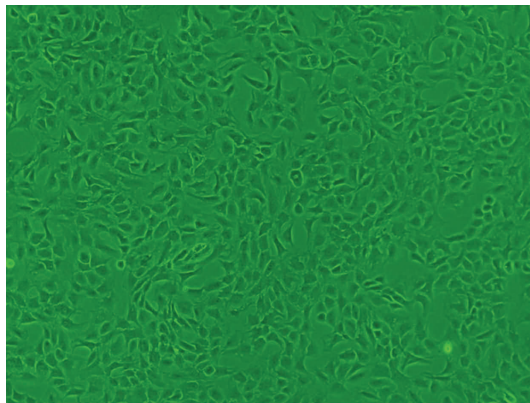
**2.6 数据统计** 采用 SPSS22.0 软件进行数据统计分析。2 组退变软骨细胞凋亡率、PERK mRNA 含量、Bip mRNA 含量、eIF - 2 $\alpha$  mRNA 含量、ATF - 4 mRNA 含量、GADD153 mRNA 含量、Caspase - 9 活性及 Caspase - 3 活性的比较均采用重复测量资料的方差分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

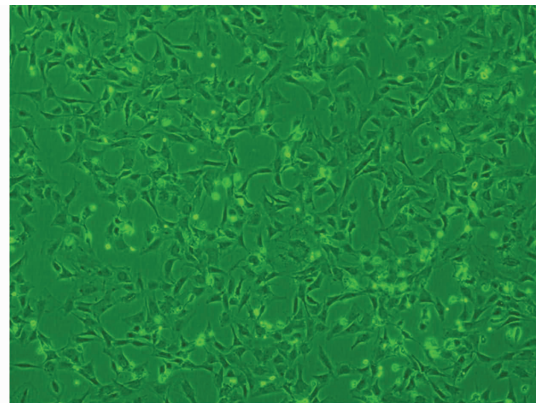
**3.1 造模结果** 培养的第 3 代软骨细胞形态规则、

大小一致,边界清晰;经白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导后的退变软骨细胞,体积变大,边缘出现指状突起,胞膜和胞浆不清晰,细胞呈多边形改变,折光度下降(图 1)。

**3.2 退变软骨细胞凋亡率测定结果** 时间因素与分组因素存在交互效应。2 组软骨细胞凋亡率总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应;干预后不同时点之间软骨细胞凋亡率的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞凋亡率随时间变化均呈降低趋势;干预后各时点独活寄生汤组软骨细胞凋亡率均低于空白组。见表 2、图 2。



(1)正常软骨细胞



(2)退变软骨细胞

图 1 软骨细胞形态 ( $\times 100$ )

表 2 2 组退变软骨细胞凋亡率测定结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	(30.39 $\pm$ 0.51)%	(22.89 $\pm$ 1.59)%	(13.62 $\pm$ 1.26)%	(22.30 $\pm$ 7.35)%	398.686	0.002
独活寄生汤组	9	(17.39 $\pm$ 1.52)%	(9.66 $\pm$ 0.69)%	(4.42 $\pm$ 0.36)%	(10.49 $\pm$ 5.71)%	109.061	0.009
合计	18	(23.89 $\pm$ 7.19)%	(16.28 $\pm$ 7.33)%	(9.02 $\pm$ 5.11)%	(16.40 $\pm$ 8.82)%	389.768 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		14.055	13.264	12.183	325.246 <sup>1)</sup>	$F = 9.022^{2)}$ , $P = 0.038^{2)}$	
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

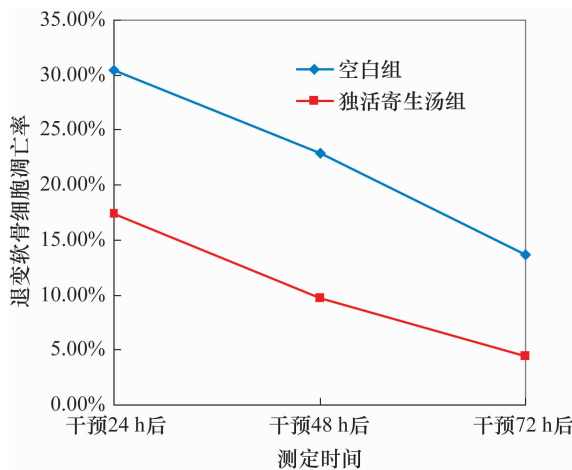


图 2 干预后 2 组退变软骨细胞凋亡率变化趋势图

**3.3 退变软骨细胞中 PERK mRNA、Bip mRNA、eIF - 2 $\alpha$  mRNA、ATF - 4 mRNA、GADD153 mRNA 含量检测结果**

**3.3.1 退变软骨细胞中 PERK mRNA 含量检测结果** 时间因素与分组因素不存在交互效应;独活寄生汤组软骨细胞中 PERK mRNA 含量总体低于空白组,即存在分组效应;干预后不同时点之间软骨细胞中 PERK mRNA 含量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞中 PERK mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。见表 3、图 3。

**3.3.2 退变软骨细胞中 Bip mRNA 含量检测结果** 时间因素与分组因素不存在交互效应;独活寄生汤组

软骨细胞中 Bip mRNA 含量总体低于空白组,即存在分组效应;干预后不同时间之间软骨细胞中 Bip mRNA 含量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞中 Bip mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。见表 4、图 4。

**3.3.3 退变软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量检测结果** 时间因素与分组因素不存在交互效应;独活寄生汤组软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量总体低于空白组,即存在分组效应;干预后不同时间之间软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞中 eIF-2 $\alpha$  mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势,且降低趋势基本一致。见表 5、图 5。

**3.3.4 退变软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量检测结果** 时间因素与分组因素存在交互效应;2 组软骨细

胞中 ATF-4 mRNA 含量总体比较,组间差异有统计学意义,即存在分组效应;干预后不同时间之间软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势;干预后各时点独活寄生汤组软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量均低于空白组。见表 6、图 6。

**3.3.5 退变软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量检测结果** 时间因素与分组因素不存在交互效应;独活寄生汤组软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量总体低于空白组,即存在分组效应;干预后不同时间之间软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量随时间变化均呈降低趋势。见表 7、图 7。

表 3 2 组退变软骨细胞中蛋白激酶 R 样内质网激酶 mRNA 含量检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	0.174 $\pm$ 0.030	0.160 $\pm$ 0.020	0.126 $\pm$ 0.009	0.153 $\pm$ 0.029	8.185	0.101
独活寄生汤组	9	0.141 $\pm$ 0.019	0.108 $\pm$ 0.013	0.058 $\pm$ 0.005	0.102 $\pm$ 0.038	63.146	0.015
合计	18	0.158 $\pm$ 0.029	0.134 $\pm$ 0.032	0.092 $\pm$ 0.038	0.128 $\pm$ 0.042	43.060 <sup>1)</sup>	0.003 <sup>1)</sup>
t 值		1.585	3.847	11.978	17.833 <sup>1)</sup>	$F = 3.002^{2)}$ ,	
P 值		0.188	0.018	0.000	0.013 <sup>1)</sup>	$P = 0.157^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值;2) 交互效应的 F 值和 P 值

表 4 2 组退变软骨细胞中免疫球蛋白结合蛋白 mRNA 含量检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	0.609 $\pm$ 0.107	0.562 $\pm$ 0.067	0.422 $\pm$ 0.049	0.531 $\pm$ 0.108	12.805	0.069
独活寄生汤组	9	0.486 $\pm$ 0.067	0.339 $\pm$ 0.067	0.180 $\pm$ 0.037	0.335 $\pm$ 0.142	98.570	0.003
合计	18	0.548 $\pm$ 0.105	0.451 $\pm$ 0.136	0.301 $\pm$ 0.138	0.433 $\pm$ 0.159	62.968 <sup>1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>
t 值		1.697	4.046	6.867	15.136 <sup>1)</sup>	$F = 4.092^{2)}$ ,	
P 值		0.165	0.016	0.002	0.018 <sup>1)</sup>	$P = 0.106^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值;2) 交互效应的 F 值和 P 值

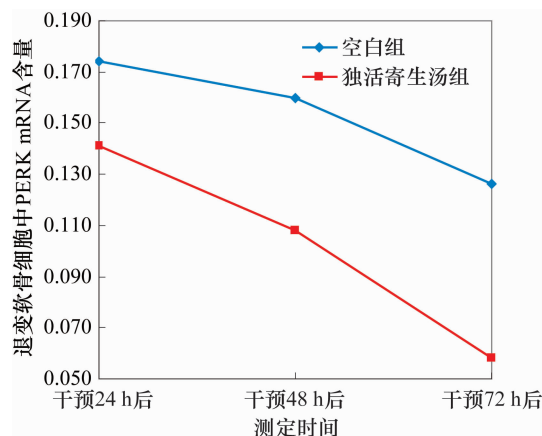


图 3 干预后 2 组退变软骨细胞中 PERK mRNA 含量变化趋势图

PERK: 蛋白激酶 R 样内质网激酶

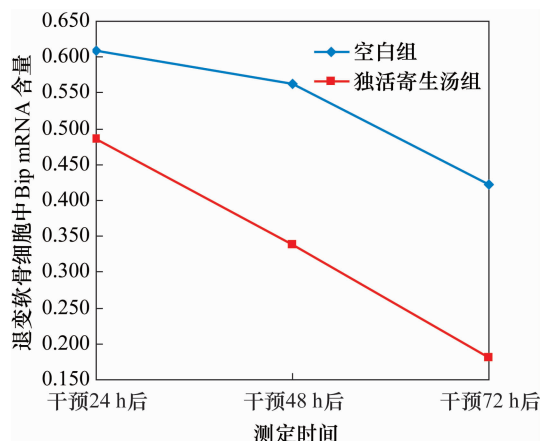


图 4 干预后 2 组退变软骨细胞中 Bip mRNA 含量变化趋势图

Bip: 免疫球蛋白结合蛋白



表 5 2 组退变软骨细胞中真核细胞翻译起始因子 -2α mRNA 含量检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	0.290 ± 0.035	0.249 ± 0.015	0.154 ± 0.023	0.231 ± 0.064	16.156	0.046
独活寄生汤组	9	0.207 ± 0.012	0.118 ± 0.020	0.072 ± 0.015	0.133 ± 0.061	72.565	0.009
合计	18	0.249 ± 0.051	0.184 ± 0.073	0.113 ± 0.048	0.182 ± 0.079	50.328 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		3.842	9.069	5.247	155.852 <sup>1)</sup>	$F = 2.138^{2)}$ ,	
P 值		0.018	0.001	0.006	0.000 <sup>1)</sup>	$P = 0.201^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

表 6 2 组退变软骨细胞中转录激活因子 -4 mRNA 含量检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	0.671 ± 0.024	0.614 ± 0.01	0.493 ± 0.025	0.593 ± 0.081	296.328	0.001
独活寄生汤组	9	0.544 ± 0.045	0.409 ± 0.09	0.226 ± 0.035	0.393 ± 0.148	83.279	0.011
合计	18	0.607 ± 0.077	0.511 ± 0.126	0.360 ± 0.149	0.493 ± 0.155	187.700 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		4.343	3.915	10.719	33.703 <sup>1)</sup>	$F = 14.612^{2)}$ ,	
P 值		0.012	0.017	0.000	0.004 <sup>1)</sup>	$P = 0.017^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

表 7 2 组退变软骨细胞中生长抑制 DNA 损伤基因 153 抗原 mRNA 含量检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	0.384 ± 0.041	0.347 ± 0.045	0.249 ± 0.026	0.327 ± 0.068	40.141	0.008
独活寄生汤组	9	0.309 ± 0.045	0.217 ± 0.035	0.132 ± 0.014	0.220 ± 0.082	49.786	0.002
合计	18	0.346 ± 0.056	0.282 ± 0.079	0.191 ± 0.067	0.273 ± 0.092	88.206 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		2.118	3.969	6.916	16.946 <sup>1)</sup>	$F = 3.035^{2)}$ ,	
P 值		0.102	0.017	0.002	0.015 <sup>1)</sup>	$P = 0.116^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

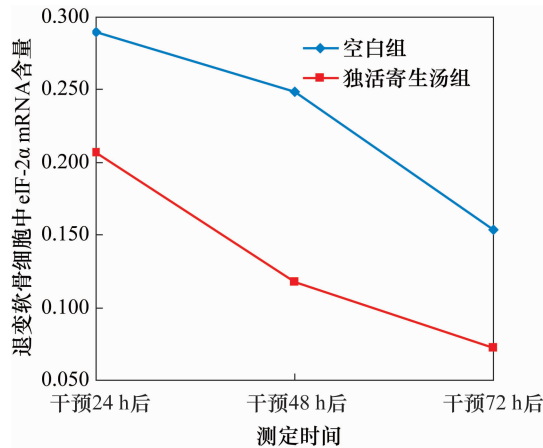


图 5 干预后 2 组退变软骨细胞中 eIF-2α mRNA 含量变化趋势图

eIF-2α: 真核细胞翻译起始因子 -2α

### 3.4 退变软骨细胞中 Caspase -9 和 Caspase -3 活性检测结果

#### 3.4.1 退变软骨细胞中 Caspase -9 活性检测结果

时间因素与分组因素不存在交互效应; 独活寄生汤组软骨细胞中 Caspase -9 活性总体低于空白组, 即存在分组效应; 干预后不同时间之间软骨细胞中 Caspase -

9 活性的差异有统计学意义, 即存在时间效应; 2 组软骨细胞中 Caspase -9 活性随时间变化均呈降低趋势, 且降低趋势基本一致。见表 8、图 8。

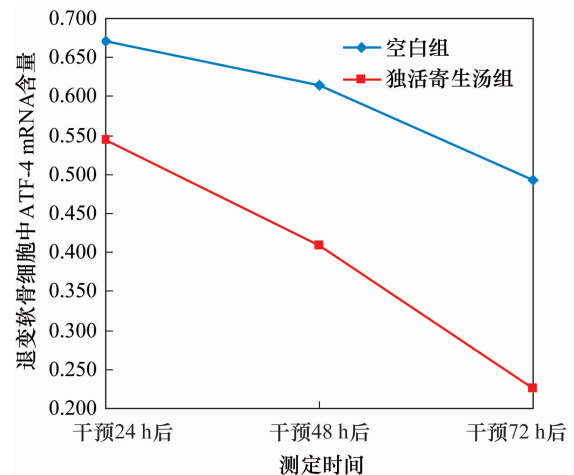


图 6 干预后 2 组退变软骨细胞中 ATF-4 mRNA 含量变化趋势图

ATF-4: 转录激活因子 -4

3.4.2 退变软骨细胞中 Caspase -3 活性检测结果  
时间因素与分组因素不存在交互效应; 独活寄生汤组软骨细胞中 Caspase -3 活性总体低于空白组, 即存在

分组效应;干预后不同时点之间软骨细胞中 Caspase - 3 活性的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组软

骨细胞中 Caspase - 3 活性随时间变化均呈降低趋势,且降低趋势基本一致。见表 9、图 9。

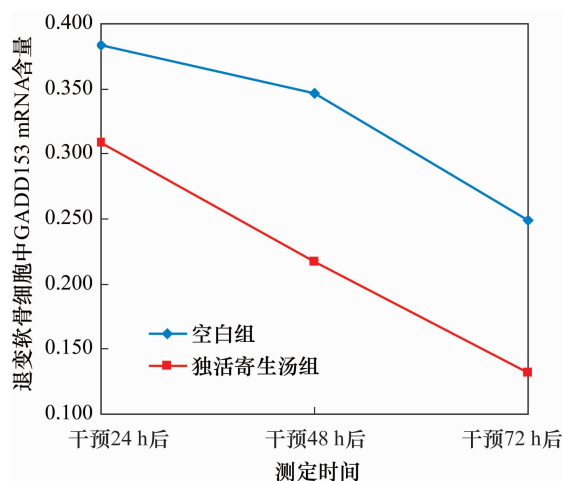


图 7 干预后 2 组退变软骨细胞中 GADD153 mRNA 含量变化趋势图

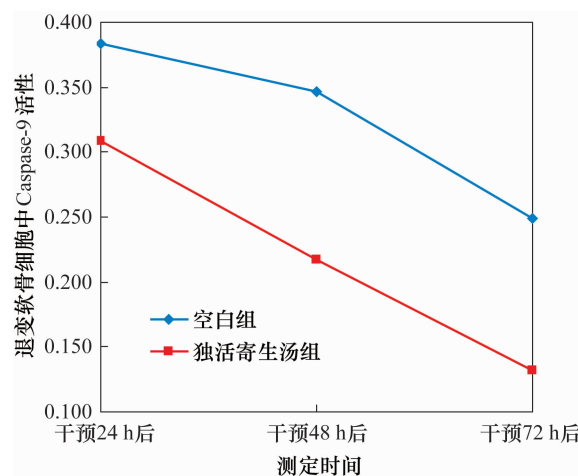


图 8 干预后 2 组退变软骨细胞中 Caspase - 9 活性变化趋势图

GADD153:生长抑制 DNA 损伤基因 153 抗原

Caspase - 9:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 9

表 8 2 组退变软骨细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 9 活性检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	3.238 ± 0.338	2.724 ± 0.24	2.171 ± 0.125	2.711 ± 0.510	74.110	0.013
独活寄生汤组	9	2.533 ± 0.157	1.886 ± 0.125	1.457 ± 0.198	1.959 ± 0.490	554.800	0.001
合计	18	2.886 ± 0.452	2.305 ± 0.490	1.814 ± 0.418	2.335 ± 0.621	263.384 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		3.270	5.375	5.290	21.164 <sup>1)</sup>	$F = 1.266^{2)},$ $P = 0.327^{2)}$	
P 值		0.031	0.006	0.006	0.010 <sup>1)</sup>		

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

表 9 2 组退变软骨细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 3 活性检测结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	干预 24 h 后	干预 48 h 后	干预 72 h 后	合计	F 值	P 值
空白组	9	4.082 ± 0.574	3.114 ± 0.443	2.366 ± 0.173	3.187 ± 0.833	42.293	0.010
独活寄生汤组	9	2.814 ± 0.205	2.085 ± 0.167	1.399 ± 0.188	2.099 ± 0.634	386.268	0.001
合计	18	3.448 ± 0.794	2.600 ± 0.638	1.883 ± 0.554	2.643 ± 0.910	130.649 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		3.603	3.769	6.554	19.442 <sup>1)</sup>	$F = 1.346^{2)},$ $P = 0.314^{2)}$	
P 值		0.023	0.020	0.003	0.012 <sup>1)</sup>		

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

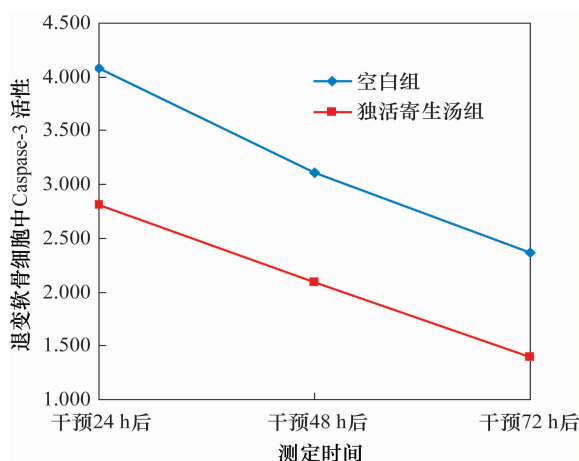


图 9 干预后 2 组退变软骨细胞中 Caspase - 3 活性变化趋势图  
Caspase - 3:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 3

## 4 讨论

OA 属中医“痹证”“痿证”范畴,气血营卫亏虚是致病内因,风寒湿邪外袭是致病外因。独活寄生汤中的独活可祛下焦与筋骨间的风寒湿邪,为君药;细辛散阴经风寒、搜筋骨风湿、通络止痛,秦艽除风湿舒筋,肉桂能温里祛寒、通利血脉,防风可祛一身之风而胜湿,共为臣药;桑寄生、牛膝、杜仲补肝肾、壮筋骨、祛风湿,当归、川芎、地黄、芍药养血活血,人参、茯苓、甘草补气健脾、扶助正气,共为佐药;甘草调和诸药,为使药。诸药合用祛邪扶正、标本兼顾,具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血之功<sup>[17-18]</sup>,可针对 OA 病机起到治疗作用<sup>[19-20]</sup>。



OA 是多种因素共同作用导致软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨降解与合成正常偶联失衡的结果<sup>[21]</sup>。细胞凋亡是关节软骨细胞的中心性特征,是关节软骨退行性改变的病理因素之一<sup>[22-23]</sup>。研究表明,内质网应激反应与软骨细胞凋亡密切相关<sup>[24]</sup>。PERK/Bip 信号通路是调控内质网应激反应,引起软骨细胞凋亡的关键通路<sup>[25-26]</sup>。PERK 信号分子的激活可以磷酸化 eIF-2 $\alpha$ ,后者可激活 ATF-4,上调 GADD153 的表达,而 GADD153 则可抑制 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的表达,导致 Bcl-2/Bax 比例失衡,激活 Caspase-9,活化的 Caspase-9 再激活 Caspase-3,从而启动细胞凋亡程序<sup>[27-29]</sup>。

Annexin V 是一种 Ca<sup>2+</sup> 依赖性磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞膜结合,是检测细胞早期凋亡的灵敏指标。碘化丙啶是一种核酸染料,不能透过完整的细胞膜,但能透过凋亡中晚期的细胞和死细胞,将其细胞核染红。因此,将 Annexin V 与碘化丙啶一起使用可区分不同凋亡时期的细胞。从软骨细胞凋亡检测结果来看,空白血清和独活寄生汤含药血清均能降低软骨细胞凋亡率,而独活寄生汤含药血清的作用更明显。为了进一步探讨独活寄生汤含药血清抑制退变软骨细胞凋亡的机制,我们采用 RT-PCR 法测定了 PERK/Bip 信号通路中关键调节因子 PERK、Bip、eIF-2 $\alpha$ 、ATF-4、GADD153 mRNA 水平,采用分光光度法测定了 Caspase-9、Caspase-3 活性。检测结果表明,空白血清和独活寄生汤含药血清均能降低 PERK mRNA、Bip mRNA、eIF-2 $\alpha$  mRNA、ATF-4 mRNA、GADD153 mRNA 水平和 Caspase-9、Caspase-3 活性,但独活寄生汤含药血清的效果更明显。

本研究的结果提示,独活寄生汤含药血清可通过调控大鼠退变软骨细胞 PERK/Bip 信号通路,抑制因内质网应激反应引起的软骨细胞凋亡。

## 5 参考文献

- [1] DAHM DL, AL RW, DAJANI K, et al. Patellofemoral arthroplasty versus total knee arthroplasty in patients with isolated patellofemoral osteoarthritis [J]. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2010, 39(10): 487-491.
- [2] VUOLTEENAHO K, MOILANEN T, KNOWLES RG, et al. The role of nitric oxide in osteoarthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2007, 36(4): 247-258.
- [3] SHAKOOR MA, RAHMAN MS, AZAD AK, et al. Effects of isometric quadriceps muscle strengthening exercise on chronic osteoarthritis of the knee [J]. Bangladesh Med Res Counc Bull, 2010, 36(1): 20-22.
- [4] 李宁华, 薛庆云, 张毅, 等. 中国六城市中老年人群 X 线膝骨关节炎流行病学分析 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(16): 2887-2888.
- [5] 吴广文, 褚剑锋, 许惠凤, 等. 独活寄生汤的药理作用及其在治疗骨性关节炎中的应用 [J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 37-39.
- [6] 王武炼, 叶锦霞, 刘献祥, 等. 独活寄生汤加减内服外洗治疗膝骨性关节炎 66 例临床观察 [J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(2): 44-45.
- [7] 周腊梅, 王亚克. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎的临床疗效观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(3): 46-48.
- [8] 邝高艳, 严可, 柴爽, 等. 独活寄生汤加减治疗膝骨关节炎疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. 中医药导报, 2016, 22(17): 59-62.
- [9] 万美珍, 邓紫玉, 代龙金. 独活寄生汤治疗肝肾不足型膝骨关节炎的临床疗效观察 [J]. 中国社区医师, 2017, 33(14): 92-93.
- [10] 刘云, 张敏. 独活寄生汤联合运动疗法治疗膝骨关节炎临床观察 [J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(2): 29-32.
- [11] 郑文伟, 翁霞萍, 黄绥心, 等. 独活寄生汤对骨关节炎软骨退变的影响及其作用机制 [J]. 中医正骨, 2017, 29(7): 5-11.
- [12] 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.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] 叶锦霞, 付长龙, 林洁, 等. 透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素诱导的内质网应激 (PERK 信号通路) 介导的大鼠体外培养关节软骨细胞凋亡的影响 [J]. 中医正骨, 2017, 29(6): 1-7.
- [15] 唐芳, 马武开, 姚血明. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与骨关节炎 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(2): 70-73.
- [16] PARK K, HOFFMEISTER B, HAN DK, et al. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1 $\beta$  stimulated cartilage construct in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(2): 286-295.
- [17] 周肃陵, 刘肖瑜, 王正. 独活寄生汤在骨伤科的临床应用 [J]. 中医正骨, 2006, 18(12): 67-69.
- [18] 李西海, 陈文列, 刘献祥. 补肾柔肝法防治骨性关节炎作用机制探讨 [J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(2): 66-69.
- [19] 潘彩彬, 冯阳, 刘献祥. 独活寄生汤的内涵与外延探讨 [J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(6): 39-41.

- [20] 顾程洸,朱艳伟,孙玉明.独活寄生汤在骨伤科的运用[J].河南中医,2013,33(4):605-607.
- [21] ROUSH JK, CROSS AR, RENBERG WC, et al. Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis[J]. J Am Vet Med Assoc, 2010, 236(1): 67-73.
- [22] MALEMUD CJ. Protein kinases in chondrocyte signaling and osteoarthritis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (427 Suppl): 145-151.
- [23] MISTRY D, OUE Y, CHAMBERS MG, et al. Chondrocyte death during murine osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(2): 131-141.
- [24] 熊飞,韦宜山.内质网应激与软骨细胞凋亡[J].中国组织工程研究,2017,21(36):5886-5891.
- [25] ZHANG PC, MCGRATH B, LI S, et al. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(11): 3864-3874.
- [26] WANG FM, GALSON DL, ROODMAN GD, et al. Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells[J]. Exp Hematol, 2011, 39(10): 999-1006.
- [27] RASHEVA VI, DOMINGOS PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14(8): 996-1007.
- [28] GRISHKO V, XU M, WILSON G, et al. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(3): 609-618.
- [29] SEOL JW, LEE HB, LEE YJ, et al. Hypoxic resistance to articular chondrocyte apoptosis—a possible mechanism of maintaining homeostasis of normal articular cartilage[J]. FEBS J, 2009, 276(24): 7375-7385.
- (收稿日期:2018-05-28 本文编辑:李晓乐)