

## · 基础研究 ·

## 川芎嗪对人骨关节炎软骨细胞的影响及作用机制研究

王会含, 王永堂, 苗建华, 李凤新

(郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007)

**摘要** 目的:探讨川芎嗪对人骨关节炎软骨细胞的影响及其作用机制。方法:收集接受膝关节置换术患者的膝关节软骨组织,分离并培养软骨细胞,采用肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导建立骨关节炎软骨细胞模型;将骨关节炎软骨细胞随机分为对照组和川芎嗪低、中、高浓度组,对照组加入正常培养基进行培养,川芎嗪低、中、高浓度组分别加入含川芎嗪浓度为  $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的培养基进行培养。培养 24 h 后,分别采用异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶双染色法和 MTT 法测定软骨细胞的凋亡率和活力,分别采用实时定量 PCR 和蛋白印迹法分析软骨细胞凋亡相关基因硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)-2、凋亡信号调节激酶(apoptosis signal regulating kinase, ASK)-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)-3 的 mRNA 和蛋白表达。结果:①软骨细胞培养结果。原代细胞培养至第 15 天,可见组织块周围有细胞成簇生长,细胞呈梭形、三角形或多角形;第 3 代软骨细胞多呈长梭形。②软骨细胞鉴定结果。甲苯胺蓝染色显示,细胞呈长梭形,有 1~3 个细胞核,细胞质呈蓝色;免疫组化染色显示,细胞 II 型胶原蛋白呈阳性,细胞质内可见黄色颗粒,细胞核无着色,表明为软骨细胞。③软骨细胞凋亡率测定结果。4 组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义[( $25.10\pm 0.47$ )%, ( $22.08\pm 0.25$ )%, ( $19.37\pm 0.36$ )%, ( $16.05\pm 0.58$ )%,  $F=13.776$ ,  $P=0.000$ ]。川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞凋亡率均低于对照组( $LSD-t=12.685$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=21.642$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=27.107$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪中、高浓度组软骨细胞凋亡率均低于川芎嗪低浓度组( $LSD-t=13.826$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=21.349$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪高浓度组软骨细胞凋亡率低于川芎嗪中浓度组( $LSD-t=10.875$ ,  $P=0.000$ )。④软骨细胞活力测定结果。4 组软骨细胞活力比较,差异有统计学意义(吸光度值: $0.25\pm 0.04$ ,  $0.41\pm 0.02$ ,  $0.54\pm 0.02$ ,  $0.60\pm 0.01$ ,  $F=131.875$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞活力均高于对照组( $LSD-t=8.000$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=14.500$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=18.981$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪中、高浓度组软骨细胞活力均高于川芎嗪低浓度组( $LSD-t=10.277$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=19.000$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪高浓度组软骨细胞活力高于川芎嗪中浓度组( $LSD-t=6.000$ ,  $P=0.000$ )。⑤软骨细胞凋亡相关基因 mRNA 和蛋白表达分析结果。4 组软骨细胞 Trx-2、ASK-1 及 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于对照组(mRNA:  $LSD-t=6.925$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=15.581$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=16.046$ ,  $P=0.000$ ; 蛋白:  $LSD-t=2.479$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=23.000$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=33.988$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪中、高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于川芎嗪低浓度组(mRNA:  $LSD-t=7.044$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=9.581$ ,  $P=0.000$ ; 蛋白:  $LSD-t=6.149$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=15.321$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于川芎嗪中浓度组( $LSD-t=3.994$ ,  $P=0.004$ ;  $LSD-t=18.605$ ,  $P=0.000$ );川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞 ASK-1 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于对照组(mRNA:  $LSD-t=8.808$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=10.398$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=19.350$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=3.796$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=5.096$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=10.028$ ,  $P=0.000$ ; 蛋白:  $LSD-t=5.041$ ,  $P=0.001$ ;  $LSD-t=13.466$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=21.719$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=2.481$ ,  $P=0.038$ ;  $LSD-t=7.286$ ,  $P=0.001$ ;  $LSD-t=16.865$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪中、高浓度组软骨细胞 ASK-1 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于川芎嗪低浓度组(mRNA:  $LSD-t=3.385$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=20.466$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=3.400$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=9.701$ ,  $P=0.000$ ; 蛋白:  $LSD-t=8.296$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=17.303$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=6.228$ ,  $P=0.000$ ;  $LSD-t=17.365$ ,  $P=0.000$ ),川芎嗪高浓度组软骨细胞 ASK-1 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于川芎嗪中浓度组(mRNA:  $LSD-t=9.550$ ,  $P=0.005$ ;  $LSD-t=3.619$ ,  $P=0.007$ ; 蛋白:  $LSD-t=14.017$ ,  $P=0.005$ ;  $LSD-t=4.985$ ,  $P=0.001$ )。结论:川芎嗪能够抑制人骨关节炎软骨细胞的凋亡,提高软骨细胞活力,且该作用在一定浓度范围内呈浓度依赖性;其作用机制可能与调控 Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路有关。

**关键词** 骨关节炎;川芎嗪;细胞凋亡;软骨细胞;Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路

**A study of the effects of tetramethylpyrazine on human osteoarthritic chondrocytes and its mechanism of action**

WANG Huihan, WANG Yongtang, MIAO Jianhua, LI Fengxin

通讯作者:李凤新 E-mail:jrc2088@163.com

Zhengzhou Central Hospital affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on human osteoarthritic (OA) chondrocytes and its mechanism of action. **Methods:** The chondrocytes were isolated from knee articular cartilage tissues collected from patients undergoing knee replacement and were cultured, and the third-generation ones were intervened by tumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$  for inducing OA chondrocytes. The OA chondrocytes were randomly divided into control group, TMP low-concentration group, TMP middle-concentration group and TMP high-concentration group. The OA chondrocytes in control group were cultured in normal Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), while the ones in TMP low-, middle- and high-concentration group were cultured in DMEM supplemented with TMP with concentration of 25, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  respectively. After 24-hour culture, the chondrocyte apoptosis rate and viability were detected by using annexin V-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC)/propidium iodide (PI) double-staining method and MTT method respectively; and the mRNA and protein expression levels of apoptosis-related genes, including thioredoxin (Trx) - 2, apoptosis signal regulating kinase (ASK) - 1 and cysteine aspartic acid specific protease (Caspase) - 3, were analyzed by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western-blot assays respectively. **Results:** After 15-day culture, the primary cells shaped as fusiform, triangle or polygon and clustered-grown around the tissue blocks, and the third-generation ones shaped mainly as long fusiform. The results of toluidine blue staining showed that the cells, with 1-3 nuclei and blue cytoplasm, shaped as long fusiform; and the immunohistochemical staining exhibited the results as positive type II collagen, yellow particles within cytoplasm and unstained nucleus. As indicated above, the cultured cells were indicated as chondrocytes. There was statistical difference in chondrocyte apoptosis rate between the 4 groups ( $25.10 \pm 0.47, 22.08 \pm 0.25, 19.37 \pm 0.36, 16.05 \pm 0.58\%$ ,  $F = 13.776, P = 0.000$ ). The chondrocyte apoptosis rate was lower in TMP low-, middle- and high-concentration group in contrast to control group (LSD -  $t = 12.685, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 21.642, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 27.107, P = 0.000$ ), and was lower in TMP middle- and high-concentration group compared to TMP low-concentration group (LSD -  $t = 13.826, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 21.349, P = 0.000$ ), and was lowest in TMP high-concentration group (LSD -  $t = 10.875, P = 0.000$ ). There was statistical difference in chondrocyte viability between the 4 groups (absorbance value:  $0.25 \pm 0.04, 0.41 \pm 0.02, 0.54 \pm 0.02, 0.60 \pm 0.01$ ,  $F = 131.875, P = 0.000$ ). The chondrocyte viability was higher in TMP low-, middle- and high-concentration group in contrast to control group (LSD -  $t = 8.000, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 14.500, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 18.981, P = 0.000$ ), and was higher in TMP middle- and high-concentration group compared to TMP low-concentration group (LSD -  $t = 10.277, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 19.000, P = 0.000$ ), and was highest in TMP high-concentration group (LSD -  $t = 6.000, P = 0.000$ ). There was statistical difference in relative expression levels of mRNA and protein of Trx - 2, ASK - 1 and Caspase - 3 in chondrocyte between the 4 groups. The relative expression levels of mRNA and protein of Trx - 2 were higher in TMP low-, middle- and high-concentration group in contrast to control group (mRNA: LSD -  $t = 6.925, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 15.581, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 16.046, P = 0.000$ ; protein: LSD -  $t = 2.479, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 23.000, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 33.988, P = 0.000$ ), and were higher in TMP middle- and high-concentration group compared to TMP low-concentration group (mRNA: LSD -  $t = 7.044, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 9.581, P = 0.000$ ; protein: LSD -  $t = 6.149, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 15.321, P = 0.000$ ), and were highest in TMP high-concentration group (LSD -  $t = 3.994, P = 0.004$ ; LSD -  $t = 18.605, P = 0.000$ ). The relative expression levels of mRNA and protein of ASK - 1 and Caspase - 3 were lower in TMP low-, middle- and high-concentration group in contrast to control group (mRNA: LSD -  $t = 8.808, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 10.398, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 19.350, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 3.796, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 5.096, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 10.028, P = 0.000$ ; protein: LSD -  $t = 5.041, P = 0.001$ ; LSD -  $t = 13.466, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 21.719, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 2.481, P = 0.038$ ; LSD -  $t = 7.286, P = 0.001$ ; LSD -  $t = 16.865, P = 0.000$ ), and were lower in TMP middle- and high-concentration group compared to TMP low-concentration group (mRNA: LSD -  $t = 3.385, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 20.466, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 3.400, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 9.701, P = 0.000$ ; protein: LSD -  $t = 8.296, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 17.303, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 6.228, P = 0.000$ ; LSD -  $t = 17.365, P = 0.000$ ), and were lowest in TMP high-concentration group (mRNA: LSD -  $t = 9.550, P = 0.005$ ; LSD -  $t = 3.619, P = 0.007$ ; protein: LSD -  $t = 14.017, P = 0.005$ ; LSD -  $t = 4.985, P = 0.001$ ). **Conclusion:** TMP can inhibit the apoptosis of human OA chondrocytes and improve the viability of chondrocytes, which exhibits concentration-dependence within a certain range, and its mechanisms of action may be related to the regulation of Trx - 2/ASK - 1/Caspase - 3 signaling pathway.

**Keywords** osteoarthritis; tetramethylpyrazine; apoptosis; chondrocytes; Trx - 2/ASK - 1/Caspase - 3 signaling pathway

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 多发于老年人, 临床主要病理表现为关节软骨退变和关节边缘骨质增生<sup>[1-2]</sup>。随着人们预期寿命的延长, OA 的发病率逐年上升, 而其发病机制目前尚未明确。研究发现, 软骨细胞凋亡在 OA 的发生过程中起重要作用, 阻止或减缓软骨细胞凋亡是防治 OA 的关键<sup>[3-4]</sup>。近年来, 临床多采用以活血和补肝益肾为主的中药防治 OA, 川芎是常用药物之一<sup>[5-6]</sup>。川芎嗪是从川芎中分离的一种生物碱, 朱海泉等<sup>[7]</sup>研究表明其能够有效预防 OA。为了探索川芎嗪对 OA 软骨细胞凋亡的影响及其作用机制, 我们开展了相关的实验研究, 现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** 膝关节软骨组织来自在郑州大学附属郑州中心医院接受膝关节置换的患者。试验方案经医院医学伦理委员会审查通过。

**1.2 实验试剂** Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 购自武汉益普生物科技有限公司, II 型胶原酶、多聚甲醛溶液、二甲亚砜 (美国 Sigma 公司), DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司), 10% 的胎牛血清、苯基甲磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 购自北京孚博生物科技有限公司, 甲苯胺蓝 (北京索莱宝科技有限公司), 鼠抗人 II 型胶原蛋白一抗 (美国 Santa Cruz 公司), 生物素标记的山羊抗兔免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 二抗 (美国 Biotium 公司), 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) -  $\alpha$  (福州迈新生物技术开发有限公司), 川芎嗪 (纯度  $\geq 98\%$ , 成都德思特生物技术有限公司), 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (annexin V - fluorescein isothiocyanate, Annexin V - FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染色试剂盒、Promega 逆转录试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司), MTT 分析试剂盒 (美国 Thermo 公司), SYBR Premix Ex Taq II 染料法荧光定量试剂盒 (日本 Takara 公司), 扩增引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液 (北京百奥莱博科技有限公司), 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量分析试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司), 兔抗人硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) - 2、凋亡信号调节激酶 (apoptosis signal regulating kinase, ASK) - 1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase) - 3、 $\beta$  - 肌动蛋白 ( $\beta$  - actin) 一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗、电化学发光 (electrogenenerated chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (美国 Abcam 公司)。

**1.3 实验仪器** TD - 4M 台式低速离心机 (山东博科生物产业有限公司), 恒温培养箱 (上海喆图科学仪器有限公司), AE31 EF - INV 型荧光显微镜 (上海光学仪器厂), DG5031 酶联免疫检测仪 (南京华东电子集团医疗装备有限责任公司), Amnis 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司), ABI7900 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), E - Gel Imager 凝胶成像仪 (美国 Invitrogen 公司)。

## 2 方法

**2.1 软骨细胞分离和培养方法** 将一定量的软骨组织, 使用 HBSS 冲洗干净, 剪碎后移入直径 10 cm 的培养皿中, 加入 10 mL 含 0.2% II 型胶原酶的 DMEM 培养基, 于  $\text{CO}_2$  浓度 5%、温度 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中。消化 4 ~ 6 h 后, 将含有软骨组织块的液体移入 15 mL 离心管, 以 1200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  (离心半径 8 cm) 离心 5 min。弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。混匀后, 接种于 25  $\text{cm}^2$  贴壁式细胞培养瓶, 将培养瓶置于  $\text{CO}_2$  浓度 5%、温度 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中培养, 每 48 h 更换 1 次培养基, 待约 90% 细胞贴壁时进行传代。按照 1:2 的比例进行传代, 每隔 3 d 传代 1 次。于显微镜下观察原代细胞及第 3 代细胞形态。

**2.2 软骨细胞鉴定方法** 取生长良好的第 3 代软骨细胞, 接种于预先放置爬片的 6 孔板上, 每孔加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。待约 70% 细胞贴壁时, 取出细胞爬片, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 1 mL 浓度为 40  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的多聚甲醛溶液, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜固定。取出爬片, 分别进行甲苯胺蓝染色和免疫组化染色, 免疫组化染色一抗为鼠抗人 II 型胶原蛋白抗体, 使用比例为 1:100, 二抗为生物素标记的山羊抗兔 IgG, 使用比例为 1:1000。染色后分别于显微镜下观察并拍照。

**2.3 OA 软骨细胞模型建立与川芎嗪干预方法** 取生长良好的第 3 代软骨细胞, 采用细胞计数法测定细胞浓度, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。将软骨细胞分别接种至 4 块 6 孔板中, 每块板接种 5 个复孔, 每个复孔接种 1 mL。每孔加入 1 mL 浓度为 100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TNF -  $\alpha$ , 于  $\text{CO}_2$  浓度 5%、温度

37 ℃ 的恒温培养箱中培养 24 h 以建立 OA 软骨细胞模型<sup>[8]</sup>。培养结束后,将 4 块 6 孔板随机分为对照组和川芎嗪低、中、高浓度组。用吸管小心弃去培养基,对照组加入 1 mL 正常的 DMEM 培养基,川芎嗪低、中、高浓度组分别加入 1 mL 含川芎嗪浓度为 25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DMEM 培养基,于 CO<sub>2</sub> 浓度 5%、温度 37 ℃ 的恒温培养箱中继续培养 24 h。

**2.4 软骨细胞凋亡率测定方法** 按照 2.3 的方法进行 OA 软骨细胞模型建立与川芎嗪干预,取干预后的软骨细胞悬液,采用细胞计数法测定细胞浓度,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入流式管中,再加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V - FITC 溶液、5  $\mu\text{L}$  PI 溶液及 0.5 mL 上样缓冲液,混匀后避光放置 15 min,采用流式细胞仪测定软骨细胞凋亡率。

**2.5 软骨细胞活力测定方法** 按照 2.3 的方法进行 OA 软骨细胞模型建立与川芎嗪干预,干预结束后,在每孔中加入浓度为 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,用吸管小心弃去培养基,每孔加 150  $\mu\text{L}$  二甲亚砜,振荡至结晶物完全溶解。采用 DG5031 酶联免疫监测仪测定各孔吸光度,测定波长 490 nm。

**2.6 软骨细胞凋亡相关基因 mRNA 表达分析方法** 按照 2.3 的方法进行 OA 软骨细胞模型建立与川芎嗪干预,采用 Trizol 法提取干预后软骨细胞的总 RNA,参照 Promega 逆转录试剂盒说明书逆转录获得 cDNA 模板。采用 SYBR Premix Ex Taq II 染料法荧光定量试剂盒进行实时定量 PCR 扩增,Trx - 2、ASK - 1、Caspase - 3 及  $\beta$  - actin 基因扩增引物序列见表 1,反应体系参照试剂盒说明书,PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 35 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 35 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。以  $\beta$  - actin 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 Trx - 2、ASK - 1 及 Caspase - 3 mRNA 的相对表达量。

**2.7 软骨细胞凋亡相关基因的蛋白表达分析方法** 按照 2.3 的方法进行 OA 软骨细胞模型建立与川芎嗪干预,将干预后各组软骨细胞以无菌 PBS 清洗 2 次;加入适量的含 PMSF(浓度为 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 RIPA 裂解液后,转移至预冷的 EP 管中,于冰上裂解 20 min;于 4 ℃ 下以 12000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  (离心半径 10 cm) 离心 10 min,取上清。采用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定上清蛋白浓度,调整样品蛋白浓度使蛋白上样量一致,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,将凝胶上的蛋白转至聚偏二氟乙烯膜,采用蛋白印迹法检测 Trx - 2、ASK - 1、Caspase - 3 及  $\beta$  - actin 的蛋白表达量,加入兔抗人 Trx - 2、ASK - 1、Caspase - 3 一抗(1:1000)和  $\beta$  - actin 一抗(1:800),于 4 ℃ 过夜孵育;洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:3000)。采用 ECL 试剂盒显色,于 E - Gel Imager 凝胶成像仪中显影并拍摄照片。采用 Image J 图像处理软件处理图片,提取蛋白条带的灰度值,分别以  $\beta$  - actin 为参照,计算蛋白条带的相对灰度值,分析蛋白表达水平。

**2.8 数据统计方法** 采用 SPSS24.0 统计学软件处理数据。4 组软骨细胞凋亡率、活力吸光度值及 Trx - 2、ASK - 1、Caspase - 3 的 mRNA 和蛋白相对表达量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  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 软骨细胞培养结果** 原代细胞培养至第 15 天,可见组织块周围有细胞成簇生长,显微镜下观察细胞形态显示细胞呈梭形、三角形或多角形[图 1(1)];显微镜下观察第 3 代软骨细胞形态显示,细胞多呈长梭形[图 1(2)]。

**3.2 软骨细胞鉴定结果** 甲苯胺蓝染色显示,细胞呈长梭形,有 1 ~ 3 个细胞核,细胞质呈蓝色[图 2(1)];免疫组化染色显示,细胞 II 型胶原蛋白呈阳性,细胞质内可见黄色颗粒,细胞核无着色[图 2(2)],表明为软骨细胞。

**3.3 软骨细胞凋亡率测定结果** 4 组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义[(25.10  $\pm$  0.47)%, (22.08  $\pm$  0.25)%, (19.37  $\pm$  0.36)%, (16.05  $\pm$  0.58)%,  $F = 13.776$ ,  $P = 0.000$ ]。川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞凋亡率均低于对照组(LSD -  $t = 12.685$ ,  $P = 0.000$ ; LSD -  $t = 21.642$ ,  $P = 0.000$ ; LSD -  $t = 27.107$ ,  $P = 0.000$ ),川芎嗪中、高浓度组软骨细胞凋亡率均低于川芎嗪低浓度组(LSD -  $t = 13.826$ ,  $P = 0.000$ ; LSD -  $t = 21.349$ ,  $P = 0.000$ ),川芎嗪高浓度组软骨细胞凋亡率低于川芎嗪中浓度组(LSD -  $t = 10.875$ ,  $P = 0.000$ )。见图 3。

**3.4 软骨细胞活力测定结果** 4 组软骨细胞活力比较,差异有统计学意义(吸光度值:0.25  $\pm$  0.04, 0.41  $\pm$  0.02, 0.54  $\pm$  0.02, 0.60  $\pm$  0.01,  $F = 131.875$ ,  $P = 0.000$ ),川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞活力均

高于对照组 ( $LSD - t = 8.000, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 14.500, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 18.981, P = 0.000$ ), 川芎嗪中、高浓度组软骨细胞活力均高于川芎嗪低浓度组 ( $LSD - t = 10.277, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 19.000, P = 0.000$ ), 川芎嗪高浓度组软骨细胞活力高于川芎嗪中浓度组 ( $LSD - t = 6.000, P = 0.000$ )。

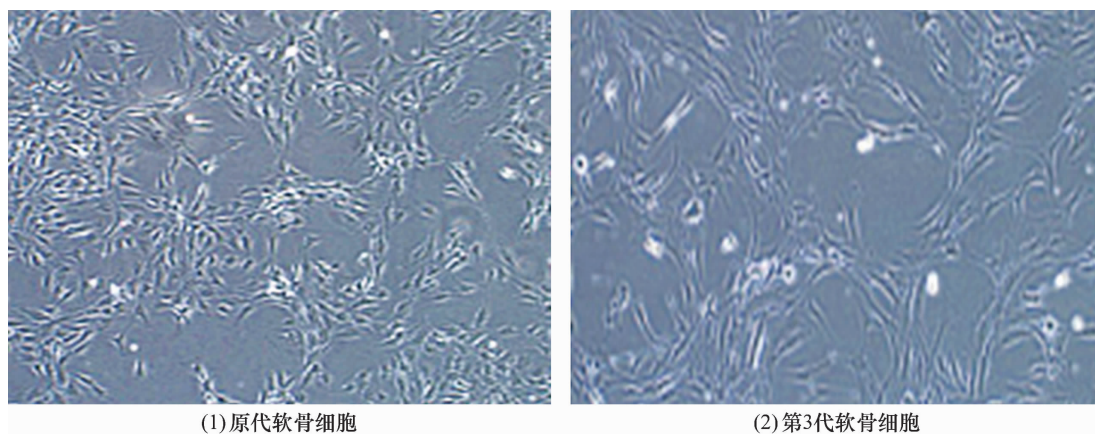
**3.5 软骨细胞凋亡相关基因 mRNA 和蛋白表达分析结果** 4 组软骨细胞 Trx-2、ASK-1 及 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 组间差异均有统计学意义。川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于对照组 (mRNA:  $LSD - t = 6.925, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 15.581, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 16.046, P = 0.000$ ; 蛋白:  $LSD - t = 2.479, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 23.000, P = 0.000$ ;  $LSD -$

$t = 33.988, P = 0.000$ ), 川芎嗪中、高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于川芎嗪低浓度组 (mRNA:  $LSD - t = 7.044, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 9.581, P = 0.000$ ; 蛋白:  $LSD - t = 6.149, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 15.321, P = 0.000$ ), 川芎嗪高浓度组软骨细胞 Trx-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于川芎嗪中浓度组 ( $LSD - t = 3.994, P = 0.004$ ;  $LSD - t = 18.605, P = 0.000$ ); 川芎嗪低、中、高浓度组软骨细胞 ASK-1 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于对照组 (mRNA:  $LSD - t = 8.808, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 10.398, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 19.350, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 3.796, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 5.096, P = 0.000$ ;  $LSD - t = 10.028, P = 0.000$ ; 蛋白:  $LSD - t = 5.041, P = 0.001$ ;  $LSD - t = 13.466, P = 0.000$ ;

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	正义链	反义链
Trx <sup>1)</sup> - 2	5' - TCGCCATTGAGTATGAGCT - 3'	5' - AGGACTCATCCCTGCTTGT - 3'
ASK <sup>2)</sup> - 1	5' - TCACCCGACACGGAGTT - 3'	5' - CTGCTTGTGTTCTCCC - 3'
Caspase <sup>3)</sup> - 3	5' - AAACAAGAGCCAAAGTCC - 3'	5' - AATGAGGGTTGTGATGTG - 3'
$\beta$ -actin <sup>4)</sup>	5' - TACGATTCTCCCATCAACT - 3'	5' - GTCTGGAATCTCGCACTC - 3'

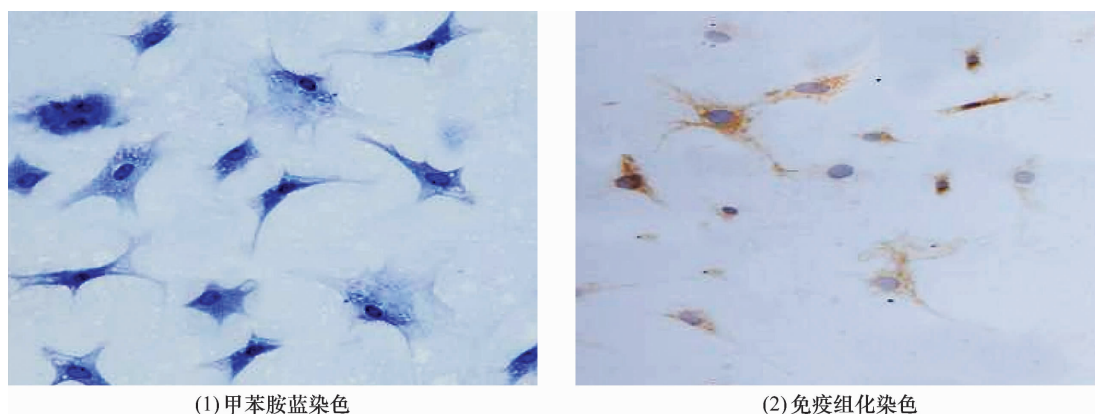
1) 硫氧还蛋白; 2) 凋亡信号调节激酶; 3) 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 4)  $\beta$ -肌动蛋白。



(1) 原代软骨细胞

(2) 第3代软骨细胞

图 1 软骨细胞形态观察结果 ( $\times 100$ )



(1) 甲苯胺蓝染色

(2) 免疫组化染色

图 2 第 3 代软骨细胞鉴定结果 ( $\times 200$ )



LSD -  $t$  = 21. 719,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 2. 481,  $P$  = 0. 038; LSD -  $t$  = 7. 286,  $P$  = 0. 001; LSD -  $t$  = 16. 865,  $P$  = 0. 000), 川芎嗪中、高浓度组软骨细胞 ASK - 1 和 Caspase - 3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于川芎嗪低浓度组 (mRNA: LSD -  $t$  = 3. 385,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 20. 466,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 3. 400,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 9. 701,  $P$  = 0. 000; 蛋白: LSD -  $t$  = 8. 296,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 17. 303,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 6. 228,  $P$  = 0. 000; LSD -  $t$  = 17. 365,  $P$  = 0. 000), 川芎嗪高浓度组软骨细胞 ASK - 1 和 Caspase - 3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于川芎嗪中浓度组 (mRNA: LSD -  $t$  = 9. 550,  $P$  = 0. 005; LSD -  $t$  = 3. 619,

$P$  = 0. 007; 蛋白: LSD -  $t$  = 14. 017,  $P$  = 0. 005; LSD -  $t$  = 4. 985,  $P$  = 0. 001)。见表 2、图 4。

## 4 讨论

OA 是一种以关节软骨磨损和关节边缘骨质增生为主要病理特征的关节疾病<sup>[9]</sup>。软骨组织中没有神经血管, 软骨细胞增殖与凋亡的平衡维系着软骨的生理状态<sup>[10-11]</sup>。在 OA 病理状态下, 软骨细胞增殖与凋亡间的平衡被打破, 软骨细胞表现出过度凋亡, 加速了软骨的破坏<sup>[12]</sup>。研究表明, 细胞凋亡相关因子在 OA 的发生发展过程中发挥重要作用, 其能够促进软骨细胞基质金属蛋白酶的表达, 抑制胶原蛋白和蛋白多糖的合成与分泌, 导致关节软骨损伤, 加速 OA

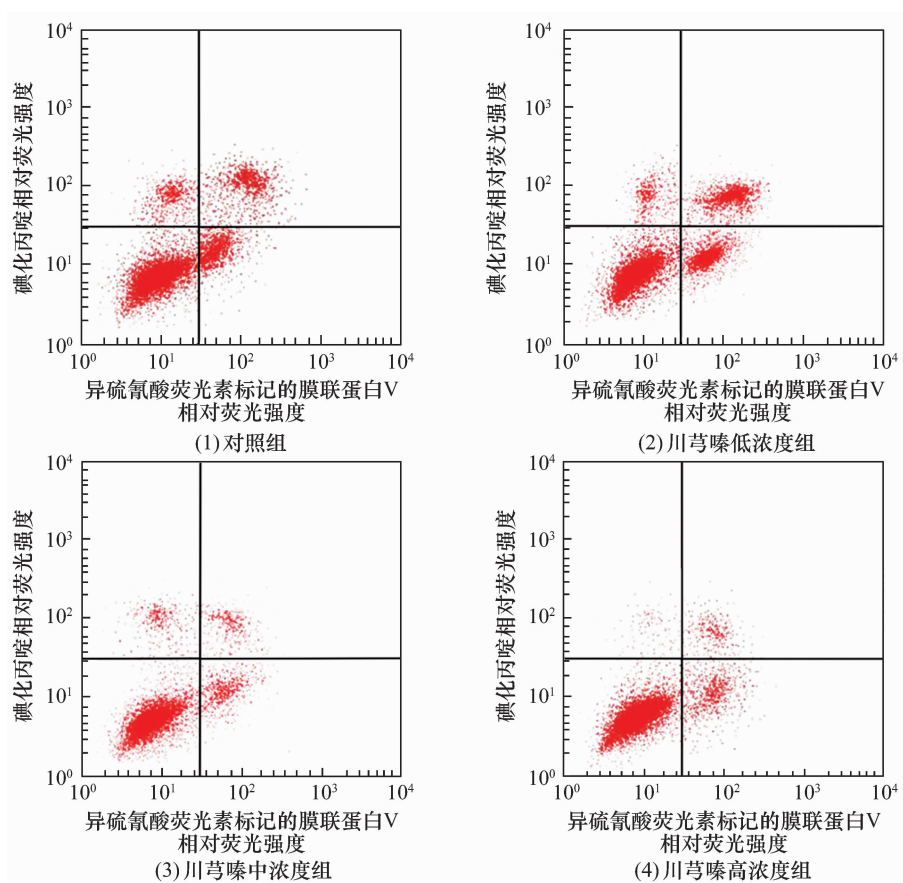
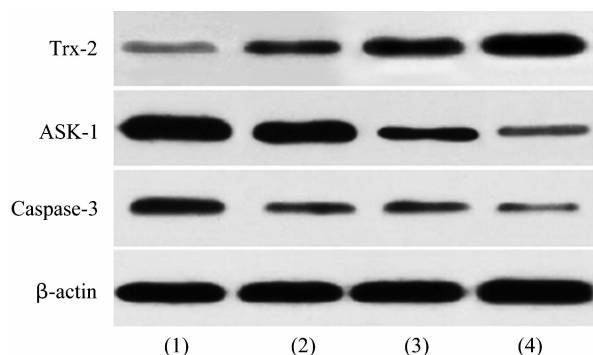


图 3 4 组骨关节炎软骨细胞凋亡率测定结果

表 2 4 组骨关节炎软骨细胞 Trx - 2、ASK - 1 及 Caspase - 3 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/ 孔	Trx <sup>1)</sup> - 2 ( $\bar{x} \pm s$ )		ASK <sup>2)</sup> - 1 ( $\bar{x} \pm s$ )		Caspase <sup>3)</sup> - 3 ( $\bar{x} \pm s$ )	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	5	1. 58 ± 0. 12	0. 21 ± 0. 04	0. 95 ± 0. 07	1. 25 ± 0. 09	0. 85 ± 0. 08	0. 52 ± 0. 03
川芎嗪低浓度组	5	2. 25 ± 0. 18	0. 32 ± 0. 09	0. 65 ± 0. 03	0. 98 ± 0. 08	0. 71 ± 0. 02	0. 48 ± 0. 02
川芎嗪中浓度组	5	3. 03 ± 0. 17	0. 67 ± 0. 02	0. 55 ± 0. 05	0. 63 ± 0. 05	0. 54 ± 0. 11	0. 33 ± 0. 05
川芎嗪高浓度组	5	3. 57 ± 0. 25	0. 97 ± 0. 03	0. 32 ± 0. 02	0. 25 ± 0. 05	0. 31 ± 0. 09	0. 20 ± 0. 03
F 值		150. 147	238. 726	195. 449	236. 147	79. 060	207. 213
P 值		0. 000	0. 000	0. 000	0. 000	0. 000	0. 000

1) 硫氧还蛋白; 2) 凋亡信号调节激酶; 3) 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。



Trx: 硫氧还蛋白; ASK: 凋亡信号调节激酶; Caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;  $\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白; (1) 对照组; (2) 川芎嗪低浓度组; (3) 川芎嗪中浓度组; (4) 川芎嗪高浓度组。

图 4 4 组骨关节炎软骨细胞凋亡相关基因蛋白印迹法检测蛋白表达结果

的进程<sup>[13-14]</sup>。因此,抑制软骨细胞的凋亡进程对于防治 OA 具有重要意义。川芎嗪是从川芎中分离出来的一种生物碱。Fan 等<sup>[15]</sup>研究发现,对于由高半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡,川芎嗪可减轻细胞的氧化损伤,抑制细胞凋亡。曾利红等<sup>[16]</sup>研究发现,川芎嗪能够有效抑制 OA 大鼠软骨细胞凋亡,在阻止 OA 病情发展方面疗效显著。我们研究发现,随着川芎嗪浓度增加,OA 软骨细胞凋亡率下降、活力提高,提示川芎嗪能够抑制人软骨细胞凋亡、提高细胞活力,且该作用在一定浓度范围内呈浓度依赖性。

细胞凋亡机制复杂,Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路是细胞凋亡的重要通路之一。Trx 是一类重要的氧化还原调节分子,广泛存在于生物体内;Trx-2 是 Trx 家族成员,在调控细胞凋亡及氧化应激方面发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。ASK-1 是丝裂原活化蛋白激酶家族成员,活化后的 ASK-1 能够激活细胞凋亡通路,而 ASK-1 在细胞内与 Trx-2 结合形成复合物,可降低自身活性<sup>[18]</sup>。Caspase 家族在细胞凋亡过程中发挥重要作用,其中 Caspase-3 是细胞凋亡的参与者之一,其活化后细胞凋亡将进入不可逆阶段,生理状态下 Caspase-3 以无活性酶原形式存在于细胞质中,Trx-2/ASK-1 复合物可抑制 Caspase-3 活化<sup>[19]</sup>。外界信号可通过多种通路激活 Caspase-3 酶原,促使细胞凋亡,其中 Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路在细胞凋亡过程中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。本研究发现,与对照组比较,川芎嗪干预后关节炎软骨细胞中 Trx-2 的 mRNA 和蛋白表达量均升高,而 ASK-1、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达量均降低;提示川芎

嗪通过调控 Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路发挥抑制软骨细胞凋亡的作用。

本研究结果表明,川芎嗪能够抑制人 OA 软骨细胞的凋亡,提高软骨细胞活力,且该作用在一定浓度范围内呈浓度依赖性;其作用机制可能与调控 Trx-2/ASK-1/Caspase-3 信号通路有关。

## 参考文献

- [1] 王科艇,楼红侃,叶海. 四妙汤口服联合腕踝针治疗轻中度膝骨关节炎湿热蕴结证[J]. 中医正骨,2019,31(5):41-43.
- [2] 张璇,张旻,龚幼波,等. 太极拳对早期膝骨关节炎患者步态影响的研究[J]. 中医正骨,2018,30(9):40-44.
- [3] HE B,JIANG D M. HOTAIR-induced apoptosis is mediated by sponging miR-130a-3p to repress chondrocyte autophagy in knee osteoarthritis[J]. Cell Biol Int,2020,44(2):524-535.
- [4] CHEN R X,YE B Q,XIE H,et al. MiR-129-3p alleviates chondrocyte apoptosis in knee joint fracture-induced osteoarthritis through CPEB1[J]. J Orthop Surg Res,2020,15(1):552.
- [5] YU S Y,WU M F,ZHOU G M,et al. Potential utility of anti-TNF drugs in synovial chondromatosis associated with ankylosing spondylitis[J]. Int J Rheum Dis,2019,22(11):2073-2079.
- [6] ZHAO D Y,YU D D,REN L,et al. Ligustilide protects PC12 cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis via the LKB1-AMPK-mTOR signaling pathway[J]. Neural Regen Re,2020,15(3):473-481.
- [7] 朱海泉,刘子敏,孟祥圣,等. 川芎嗪抑制 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(2):181-185.
- [8] 袁发许,胡松,黄丽霞,等. 基于基因芯片的 TNF- $\alpha$  诱导骨关节炎细胞模型生物信息学分析[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(7):53-60.
- [9] 罗淦,汤样华,康仪,等. 骨关节炎相关信号通路的研究进展[J]. 中医正骨,2019,31(5):31-37.
- [10] 潘秀臣. 自体脂肪干细胞结合 PRP 修复膝关节软骨[J]. 医药界,2019(6):180-181.
- [11] 蒋翠云,任少琳,张纯萍,等. 二氢嗪对氧化损伤状态下软骨细胞增殖和凋亡的影响机制研究[J]. 中国药房,2019,30(14):1890-1893.
- [12] LIU W J,ZHA Z Q,WANG H T. Upregulation of microRNA-27a inhibits synovial angiogenesis and chondrocyte apoptosis in knee osteoarthritis rats through the inhibition of PLK2[J]. J Cell Physiol,2019,234(12):22972-22984.

(下转第 16 页)