

· 基础研究 ·

附子含药血清对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的影响及作用机制研究

陈德塔¹, 樊天佑¹, 谢晓亮¹, 朱海霞¹, 沈雪², 圣小平¹

(1. 上海中医药大学附属市中医医院, 上海 200071;

2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要 目的:观察附子含药血清对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的影响,并从线粒体功能角度探讨其作用机制。**方法:**体外分离培养裸鼠膝关节软骨细胞,通过观察细胞形态和甲苯胺蓝染色进行软骨细胞鉴定。通过脂多糖诱导建立软骨细胞退变模型,并采用实时荧光 PCR 法测定软骨细胞中白细胞介素-6 mRNA、肿瘤坏死因子- α mRNA、基质金属蛋白酶-3 mRNA、基质金属蛋白酶-13 mRNA 表达量进行模型鉴定。分别按照 $0.001\ 2\ \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $0.002\ 4\ \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $0.004\ 8\ \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量以制备的附子汤剂和 0.9% 生理盐水(1 mL)给 SD 大鼠灌胃,获取低、中、高剂量附子含药血清及空白血清,经 CCK-8 法检测含药血清细胞毒性,确定 2% 含药血清为最佳浓度。取培养的第 3 代软骨细胞,设置 6 组,附子低、中、高剂量组及空白血清组分别置于加入含 $1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖、2% 含药血清、8% FBS 的 DMEM 完全培养基中培养,脂多糖组置于含 $1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖的 DMEM 完全培养基中培养,对照组在 DMEM 完全培养基中培养,各组均干预 24 h。干预结束后,检测各组软骨细胞中的 ATP 含量(荧光发光法)、Caspase-3 mRNA 表达量(实时荧光 PCR 法)、Caspase-3 蛋白表达量(Western Blot 法)及细胞凋亡率(流式细胞术)。**结果:**①软骨细胞中 ATP 含量。各组软骨细胞中 ATP 含量比较,差异有统计学意义(1.294 ± 0.132 , 1.000 ± 0.000 , 1.668 ± 0.092 , 2.633 ± 0.244 , 2.056 ± 0.110 , 1.854 ± 0.107 , $F=99.725$, $P=0.000$)。脂多糖组的 ATP 含量低于对照组和空白血清组($P=0.046$, $P=0.000$);附子低、中剂量组的 ATP 含量均高于空白血清组($P=0.018$, $P=0.013$),附子高剂量组与空白血清组 ATP 含量的差异无统计学意义($P=0.238$);附子低剂量组的 ATP 含量高于附子高剂量组($P=0.031$),附子中剂量组与附子低、高剂量组 ATP 含量的差异均无统计学意义($P=0.086$, $P=0.298$)。②软骨细胞中 Caspase-3 mRNA 和 Caspase-3 蛋白表达量。各组 Caspase-3 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义(0.783 ± 0.020 , 0.996 ± 0.086 , 0.929 ± 0.083 , 0.680 ± 0.189 , 0.739 ± 0.125 , 0.656 ± 0.044 , $F=5.003$, $P=0.010$)。脂多糖组的 Caspase-3 mRNA 表达量高于对照组($P=0.030$),脂多糖组与空白血清组 Caspase-3 mRNA 表达量的差异无统计学意义($P=0.455$);附子低、中、高剂量组的 Caspase-3 mRNA 表达量均低于空白血清组($P=0.014$, $P=0.049$, $P=0.008$);附子低剂量组与附子中、高剂量组 Caspase-3 mRNA 表达量的组间差异均无统计学意义($P=0.512$, $P=0.779$),附子中、高剂量组 Caspase-3 mRNA 表达量的差异无统计学意义($P=0.355$)。各组 Caspase-3 蛋白表达量比较,差异有统计学意义(0.780 ± 0.031 , 1.000 ± 0.000 , 0.963 ± 0.055 , 0.757 ± 0.011 , 0.671 ± 0.114 , 0.669 ± 0.034 , $F=20.213$, $P=0.000$)。脂多糖组的 Caspase-3 蛋白表达量高于对照组($P=0.032$),脂多糖组与空白血清组 Caspase-3 蛋白表达量的差异无统计学意义($P=0.455$);附子低、中剂量组与空白血清组 Caspase-3 蛋白表达量的组间差异均无统计学意义($P=0.089$, $P=0.165$),附子高剂量组的 Caspase-3 蛋白表达量低于空白血清组($P=0.019$);附子低剂量组与附子中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达量的组间差异均无统计学意义($P=0.878$, $P=0.180$),附子中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达量的差异无统计学意义($P=0.999$)。③软骨细胞凋亡率。各组软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义[(6.460 ± 0.806)%, (17.293 ± 1.143)%, (15.413 ± 0.145)%, (13.383 ± 2.290)%, (11.023 ± 1.950)%, (8.920 ± 0.484)%, $F=27.103$, $P=0.000$]。脂多糖组的细胞凋亡率高于对照组($P=0.000$),脂多糖组与空白血清组细胞凋亡率的差异无统计学意义($P=0.115$);附子低剂量组与空白血清组细胞凋亡率的差异无统计学意义($P=0.105$),附子中、高剂量组的细胞凋亡率均低于空白血清组($P=0.003$, $P=0.000$);附子低剂量组的细胞凋亡率高于附子高剂量组($P=0.030$),附子中剂量组与附子低、高剂量组细胞凋亡率的组间差异均无统计学意义($P=0.076$, $P=0.100$)。**结论:**附子含药血清可以抑制脂多糖诱导的软骨细胞凋亡,这可能与其作用于线粒体依赖性 Caspase-3 信号通路有关。**关键词** 骨关节炎;软骨细胞;细胞凋亡;附子;含药血清;脂多糖类;线粒体

Effect and mechanism of Aconiti Lateralis Radix Praeparata medicated serum on apoptosis of chondrocytes induced by lipopolysaccharide

CHEN Deta¹, FAN Tianyou¹, XIE Xiaoliang¹, ZHU Haixia¹, SHEN Xue², SHENG Xiaoping¹

基金项目:上海中医药大学“研究生创新培养”专项科研项目(Y2020040)

通讯作者:圣小平 E-mail:shengxiaop@126.com

1. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata (ALRP) medicated serum on the apoptosis of chondrocytes induced by lipopolysaccharide (LPS) and explore the underlying mechanism from the perspective of mitochondrial function. **Methods:** The knee chondrocytes of nude mice were isolated and cultured in vitro and identified by observation of cell morphology and toluidine blue staining. The degeneration model was induced by LPS in chondrocytes, and the mRNA expression levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in chondrocytes were determined by real-time fluorescence-based PCR for model identification. SD rats received ALRP decoction at 0.001 2, 0.002 4, and 0.004 8 mL/g and 0.9% normal saline (1 mL) by gavage, and low-, medium-, and high-dose ALRP-medicated serum and blank serum were obtained. The cytotoxicity of ALRP-medicated serum was determined by CCK-8 method, and 2% was the optimal concentration. The chondrocytes of the third generation were cultured and divided into six groups. The cells in the low-, medium-, and high-dose ALRP groups and the blank serum group were cultured in DMEM complete medium containing 1 μ g/mL of LPS, 2% ALRP-medicated serum, and 8% FBS, and those in the LPS group were cultured in DMEM complete medium containing 1 μ g/mL of LPS. The cells in the control group were cultured in DMEM complete medium. After 24 h of intervention, the content of ATP (fluorescence method), mRNA expression of Caspase-3 (real-time fluorescence-based PCR), protein expression of Caspase-3 (Western blot) and apoptosis rate of chondrocytes (flow cytometry) in each group were determined. **Results:** ① ATP content in chondrocytes. There were significant differences in the content of ATP in chondrocytes of different groups (1.294 ± 0.132 , 1.000 ± 0.000 , 1.668 ± 0.092 , 2.633 ± 0.244 , 2.056 ± 0.110 , 1.854 ± 0.107 , $F = 99.725$, $P = 0.000$). ATP content in the LPS group was lower than that in the control group and the blank serum group ($P = 0.046$, $P = 0.000$). The content of ATP in the low- and medium-dose ALRP groups was higher than that in the blank serum group ($P = 0.018$, $P = 0.013$). There was no significant difference in the ATP content between the high-dose ALRP group and the blank serum group ($P = 0.238$). The ATP content of the low-dose ALRP group was higher than that of the high-dose ALRP group ($P = 0.031$), and there was no significant difference in the ATP content between the medium-dose ALRP group and the low- and high-dose ALRP groups ($P = 0.086$, $P = 0.298$). ② Caspase-3 mRNA and protein expression in chondrocytes. There were significant differences in mRNA expression of Caspase-3 between different groups (0.783 ± 0.020 , 0.996 ± 0.086 , 0.929 ± 0.083 , 0.680 ± 0.189 , 0.739 ± 0.125 , 0.656 ± 0.044 , $F = 5.003$, $P = 0.010$). The mRNA expression of Caspase-3 in the LPS group was higher than that in the control group ($P = 0.030$), but there was no significant difference between the LPS group and the blank serum group ($P = 0.455$). The mRNA expression of Caspase-3 in the low-, medium-, and high-dose ALRP groups was lower than that in the blank serum group ($P = 0.014$, $P = 0.049$, $P = 0.008$). There was no significant difference in Caspase-3 mRNA expression between the low-dose ALRP group and the medium- and high-dose ALRP groups ($P = 0.512$, $P = 0.779$), and no significant difference in Caspase-3 mRNA expression between the medium-dose ALRP group and the high-dose ALRP group was observed ($P = 0.355$). The differences in Caspase-3 protein expression between different groups were statistically significant (0.780 ± 0.031 , 1.000 ± 0.000 , 0.963 ± 0.055 , 0.757 ± 0.011 , 0.671 ± 0.114 , 0.669 ± 0.034 , $F = 20.213$, $P = 0.000$). The protein expression of Caspase-3 in the LPS group was higher than that in the control group ($P = 0.032$), but there was no significant difference between the LPS group and the blank serum group ($P = 0.455$). There was no significant difference in Caspase-3 protein expression between the low- and medium-dose ALRP groups and the blank serum group ($P = 0.089$, $P = 0.165$). The expression of Caspase-3 protein in the high-dose ALRP group was lower than that in the blank serum group ($P = 0.019$). There was no significant difference in the expression of Caspase-3 protein between the low-dose ALRP group and the medium- and high-dose ALRP groups ($P = 0.878$, $P = 0.180$). There was no significant difference in Caspase-3 protein expression between the medium-dose ALRP group and the high-dose ALRP group ($P = 0.999$). ③ Apoptosis rate of chondrocytes. The differences in the apoptosis rate of chondrocytes in different groups were statistically significant (6.460 ± 0.806 , 17.293 ± 1.143 , 15.413 ± 0.145 , 13.383 ± 2.290 , 11.023 ± 1.950 , 8.920 ± 0.484 , $F = 27.103$, $P = 0.000$). The apoptosis rate of the LPS group was higher than that of the control group ($P = 0.000$), but there was no significant difference between the LPS group and the blank serum group ($P = 0.115$). There was no significant difference in the apoptosis rate between the low-dose ALRP group and the blank serum group ($P = 0.105$). The apoptosis rates in the medium- and high-dose ALRP groups were lower than that in the blank serum group ($P = 0.003$, $P = 0.000$). The apoptosis rate of the low-dose ALRP group was higher than that of the high-dose ALRP group ($P = 0.030$), and there was no significant difference between the medium-dose ALRP group and the low- and high-dose ALRP

groups ($P=0.076, P=0.100$). **Conclusion:** The ALRP-medicated serum can inhibit the apoptosis of chondrocytes induced by LPS, which may be attributed to its effect on mitochondria-dependent Caspase-3 signaling pathway.

Keywords osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis; aconiti lateralis radix praeparata; medicated serum; lipopolysaccharides; mitochondria

软骨变性破坏是骨关节炎的重要病理改变之一,在该病的发生、发展中具有重要作用^[1]。已有研究证实,线粒体功能障碍是导致软骨退变、诱发骨关节炎的一个重要因素^[2-4]。《本草汇言》云:“附子,回阳气,散阴寒,逐冷痰,通关节之猛药也。”现代医学研究表明,附子相关复方具有抑制软骨细胞凋亡、抗炎、抗血管新生等作用^[5-7]。本研究通过体外实验,从线粒体功能角度探讨了附子含药血清对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的影响,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 3 月龄清洁级 SD 大鼠 40 只、48 h 内清洁级 SD 裸鼠 10 只,购自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 2018-0004)。实验方案通过医院医学动物实验伦理委员会审查通过。

1.2 实验药物和试剂 附子 12 g,购于上海中医药大学附属市中医医院中药房;将药物加入 800 mL 生理盐水浸泡 30 min,煎煮浓缩至 500 mL, -20 ℃ 保存备用,使用前加热至室温;按照人和动物给药剂量换算标准^[8],大鼠用药剂量为 0.005 mL · g⁻¹。脂多糖、TBST 缓冲液、电泳液、转膜液(Sigma 公司),DMEM 完全培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司),高级 FBS(Gibco 公司),PVDF 膜(Millipore 公司),增强型 ATP 检测试剂盒、增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),CCK-8 试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司],Caspase-3 抗体、山羊抗兔二抗(CST 公司),大鼠内参引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 实验仪器 3-30KS 离心机(Sigma 公司),1653308 制胶板、1658005 电泳仪、1708265 凝胶成像仪、CFX96 荧光 PCR 仪(Bio-rad 公司),Nanodrop2000 酶标仪(Thermo 公司)。

2 方法

2.1 软骨细胞分离培养及鉴定 将裸鼠脱颈处死,放入 75% 酒精中浸泡 10 min 消毒。切取双下肢,剥离股骨和胫骨周围肌肉组织,剪下膝关节,游离软骨,在 PBS 中清洗 2 次,剪碎后加入适量组织消化液,放

入 4 ℃ 冰箱过夜。弃消化液,加入 0.5 mg · mL⁻¹ 胶原酶在 37 ℃ 摇床中消化 3 h,见骨块变絮状沉淀后用 70 目滤网过滤,以 150 × g 离心 5 min,离心后放入培养皿中,在 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养。48 h 后首次换液,之后 2~3 d 换液 1 次,待细胞在培养皿中长到 80% 左右时以 1:2 传代。取培养的第 3 代软骨细胞,倒置显微镜下观察形态后去除培养基, PBS 洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛固定液固定细胞 2 h,去除固定液, PBS 洗 3 次,加入 1% 甲苯胺蓝染色液,37 ℃ 孵育 1 h,去除染色液, PBS 洗涤 3 次,置于倒置显微镜下观察。

2.2 脂多糖诱导软骨细胞退变模型建立及鉴定 取培养的第 3 代软骨细胞,按每孔 1 × 10⁶ 个铺板 6 孔板,待细胞贴壁汇合至 80%,设置 2 组,造模组加入含 1 μg · mL⁻¹ 脂多糖的 DMEM 完全培养基、常规培养组加入 DMEM 完全培养基。孵育 24 h,收集细胞提取 RNA,逆转录后采用实时荧光 PCR 法测定软骨细胞中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) mRNA、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) mRNA、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-3 mRNA、MMP-13 mRNA 表达量,以 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因 mRNA 表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

2.3 含药血清制备及细胞毒性检测

2.3.1 含药血清制备 将 SD 大鼠分为 4 组,每组 10 只,分别按照 0.001 2 mL · g⁻¹、0.002 4 mL · g⁻¹、0.004 8 mL · g⁻¹ 体质量以制备的附子汤剂和 0.9% 生理盐水灌胃(1 mL),每天早晚各 1 次,连续给药 3 d。末次给药 1 h 后腹主动脉取血,以 1000 × g 离心 15 min,分离血清,56 ℃ 水浴 30 min 灭活补体,依次用 0.45 μm 和 0.2 μm 过滤器过滤后,分别获得低、中、高剂量附子含药血清及空白血清, -20 ℃ 保存备用。

2.3.2 含药血清细胞毒性检测 取培养的第 3 代软骨细胞,按每孔 1 × 10⁵ 个铺板 96 孔板,待细胞贴壁后设置 4 组, L 组、M 组、H 组、NS 组分别加入 10% 的低、中、高剂量附子含药血清及空白血清,24 h 后弃上清液,加入含 10% CCK-8 检测液的 DMEM 完全培养

基,孵育 4 h 后,使用酶标仪在 450 nm 测定各组 OD 值。按照上述方法再分别测定以 5% 和 2% 低、中、高剂量附子含药血清及空白血清干预后各组的 OD 值;以 5% 和 2% 附子含药血清和空白血清时干预时,均须以 FBS 补充血清含量至 10%。

2.4 附子含药血清对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的作用效果观察

2.4.1 软骨细胞分组及干预 取培养的第 3 代软骨细胞,按每孔 1×10^6 个铺板 6 孔板,设置 6 组。细胞贴壁后,附子低、中、高剂量组及空白血清组分别置于加入含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖、2% 含药血清、8% FBS 的 DMEM 完全培养基中培养,脂多糖组置于含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖的 DMEM 完全培养基中培养,对照组在 DMEM 完全培养基中培养,各组均干预 24 h。

2.4.2 软骨细胞中 ATP 含量检测 取干预后的各组软骨细胞,吸除培养液,加入裂解液裂解后,在 4°C 以 $12\,000 \times g$ 离心 5 min。取上清液,根据 ATP 检测试剂盒操作说明书步骤提取 ATP,加入 ATP 检测工作液,室温放置 3~5 min。检测孔内加样品,迅速混匀,至少间隔 2 s 后用化学发光仪测定相对光单位值。

2.4.3 软骨细胞中 Caspase-3 mRNA 和 Caspase-3 蛋白表达量检测 采用实时荧光 PCR 法测定各组软骨细胞中 Caspase-3 mRNA 表达量,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目标基因 mRNA 表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。采用 Western Blot 法检测各组软骨细胞中 Caspase-3 蛋白表达量,以 Image G 图像处理软件分析蛋白条带灰度值。

2.4.4 软骨细胞凋亡率检测 取各组干预后的软骨细胞,吸除培养液,PBS 洗 2 次,加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞、5 μL Annexin V-FITC,混匀后加入

5 μL Propidium Iodide,混匀后在室温、避光条件下反应 10 min,以流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.5 数据统计 采用 SPSS20.0 软件进行数据统计分析。造模组和常规培养组 IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、MMP-3 mRNA、MMP-13 mRNA 表达量的组间比较均采用 t 检验;不同浓度含药血清干预后 NS 组、L 组、M 组、H 组 OD 值的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;对照组、脂多糖组、空白血清组及附子低、中、高剂量组 ATP 含量、Caspase-3 mRNA 表达量、Caspase-3 蛋白表达量、细胞凋亡率的组间总体比较,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 软骨细胞培养及鉴定结果 镜下观察结果显示,细胞贴壁,排列稀疏部位细胞呈长梭形或多角形,排列密集部位细胞呈现椭圆形或“铺路石样”[图 1(1)];经甲苯胺蓝染色后细胞内呈深蓝色[图 1(2)]。

3.2 脂多糖诱导软骨细胞退变模型鉴定结果 造模组 IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、MMP-3 mRNA、MMP-13 mRNA 表达量均高于常规培养组(表 2)。

3.3 含药血清细胞毒性检测结果 采用 10% 和 5% 含药血清干预后,4 组的 OD 值比较,差异均有统计学意义。采用 10% 含药血清干预后,L 组、M 组、H 组的 OD 值均低于 NS 组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。采用 5% 含药血清干预后,H 组的 OD 值低于 NS 组($P=0.000$);L 组、M 组的 OD 值与 NS 组比较,组间差异均无统计学意义($P=0.473$, $P=0.113$)。采用 2% 含药血清干预后,4 组的 OD 值比较,差异无统计学意义。见表 3。

表 1 实时荧光 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'—3')
白细胞介素-6	上游引物 ACTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG 下游引物 TGGTCTGTGTGGGTGGTATCCTC
肿瘤坏死因子- α	上游引物 ATGGGCTCCCTCTCATCAGTTCC 下游引物 CCTCCGCTTGGTGGTTTGCTAC
基质金属蛋白酶-3	上游引物 CAGCCCTATCCCTTGATGCCATTAC 下游引物 GGGTGCAGACGCCAGAAGAATC
基质金属蛋白酶-13	上游引物 CGTCGGTGGCTTCAGTACCTTTC 下游引物 TCACCTCCTCCAGACCTTCAAAG
Caspase-3	上游引物 ACGAACGGACCTGTGGACCTG 下游引物 GTTTCGGCTTTCAGTCAGACTCC

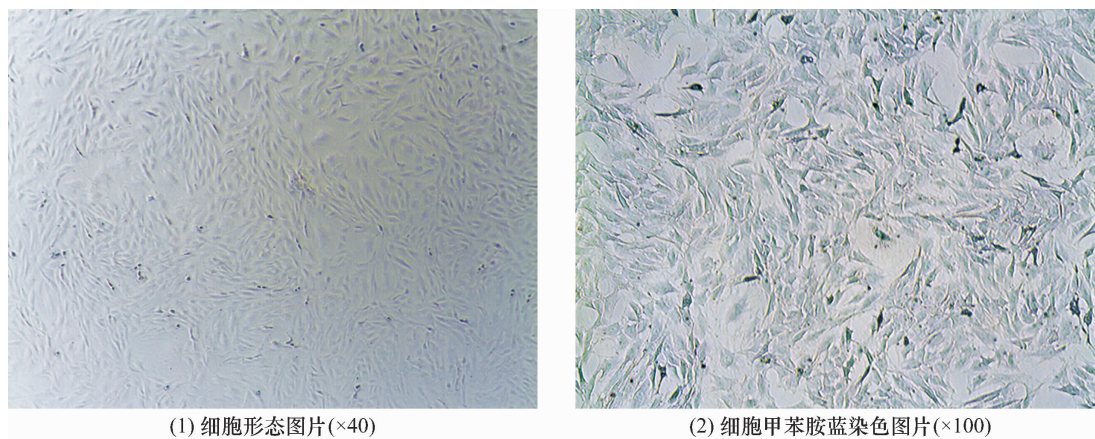


图 1 体外培养软骨细胞镜下观察结果

表 2 脂多糖干预后软骨细胞中 IL-6¹⁾ mRNA、TNF- α ²⁾ mRNA、MMP-3³⁾ mRNA、MMP-13³⁾ mRNA 表达量

组别	样本量/孔	IL-6 ¹⁾ mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)	TNF- α ²⁾ mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)	MMP-3 ³⁾ mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)	MMP-13 ³⁾ mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)
常规培养组	3	1.200 \pm 0.841	1.273 \pm 0.342	1.094 \pm 0.101	0.965 \pm 0.036
造模组	3	144.496 \pm 33.319	14.489 \pm 2.777	14.473 \pm 1.167	13.937 \pm 0.926
<i>t</i> 值		7.447	8.181	19.787	24.257
<i>P</i> 值		0.002	0.001	0.000	0.000

注:IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、MMP-3 mRNA、MMP-13 mRNA 表达量统计计算时,均设定对应指标常规培养组中 1 个样本的测定值为 1,其余样本的表达量均以该值为标准进行归一化处理。

1)白细胞介素-6;2)肿瘤坏死因子- α ;3)基质金属蛋白酶。

表 3 不同浓度含药血清细胞毒性检测结果

组别	样本量/孔	软骨细胞 OD 值($\bar{x} \pm s$)		
		10% 含药血清干预	5% 含药血清干预	2% 含药血清干预
NS 组	5	2.694 \pm 0.056	3.992 \pm 0.055	1.372 \pm 0.149
L 组	5	1.758 \pm 0.070	3.907 \pm 0.035	1.585 \pm 0.153
M 组	5	1.683 \pm 0.202	3.792 \pm 0.172	1.423 \pm 0.067
H 组	5	1.578 \pm 0.280	2.540 \pm 0.204	1.214 \pm 0.365
<i>F</i> 值		25.151	73.972	1.529
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.280

3.4 软骨细胞中 ATP 含量检测结果 各组软骨细胞中 ATP 含量比较,差异有统计学意义。脂多糖组的 ATP 含量低于对照组和空白血清组 ($P=0.046$; $P=0.000$);附子低、中剂量组的 ATP 含量均高于空白血清组 ($P=0.018$, $P=0.013$),附子高剂量组与空白血清组 ATP 含量的差异无统计学意义 ($P=0.238$);附子低剂量组的 ATP 含量高于附子高剂量组 ($P=0.031$),附子中剂量组与附子低、高剂量组 ATP 含量的差异均无统计学意义 ($P=0.086$, $P=0.298$)。见表 4。

3.5 软骨细胞中 Casepase-3 mRNA 和 Casepase-3 蛋白表达量检测结果 各组 Casepase-3 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义。脂多糖组的 Casepase-3 mRNA 表达量高于对照组 ($P=0.030$),脂多糖组与空

白血清组 Casepase-3 mRNA 表达量的差异无统计学意义 ($P=0.455$);附子低、中、高剂量组的 Casepase-3 mRNA 表达量均低于空白血清组 ($P=0.014$, $P=0.049$, $P=0.008$);附子低剂量组与附子中、高剂量组 Casepase-3 mRNA 表达量的组间差异均无统计学意义 ($P=0.512$, $P=0.779$),附子中、高剂量组 Casepase-3 mRNA 表达量的差异无统计学意义 ($P=0.355$)。各组 Casepase-3 蛋白表达量比较,差异有统计学意义。脂多糖组的 Casepase-3 蛋白表达量高于对照组 ($P=0.032$),脂多糖组与空白血清组 Casepase-3 蛋白表达量的差异无统计学意义 ($P=0.455$);附子低、中剂量组与空白血清组 Casepase-3 蛋白表达量的组间差异均无统计学意义 ($P=0.089$, $P=0.165$),附子高剂量组的 Casepase-3 蛋白表达量低于空白血清组

($P = 0.019$); 附子低剂量组与附子中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达量的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.878, P = 0.180$), 附子中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达量的差异无统计学意义 ($P = 0.999$)。见表 4。

3.6 软骨细胞凋亡率检测结果 各组软骨细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义。脂多糖组的细胞凋亡率高于对照组 ($P = 0.000$), 脂多糖组与空白血清组细胞凋亡率的差异无统计学意义 ($P = 0.115$); 附子低剂量组与空白血清组细胞凋亡率的差异无统计学意义 ($P = 0.105$), 附子中、高剂量组的细胞凋亡率均低于空白血清组 ($P = 0.003, P = 0.000$); 附子低剂量组的细胞凋亡率高于附子高剂量组 ($P = 0.030$), 附子中剂量组与附子低、高剂量组细胞凋亡率的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.076, P = 0.100$)。见表 4。

4 讨论

骨关节炎是一种以关节疼痛、肿胀、活动障碍为主要表现的慢性退行性骨关节病, 其病理特征包括关节内炎症、软骨退变等^[9-10]。本研究自新生裸鼠膝关节软骨提取细胞进行体外培养, 细胞鉴定结果显示提取的细胞为软骨细胞; 使用脂多糖刺激裸鼠软骨细胞构建软骨细胞退变模型^[11], 实时荧光 PCR 检测结果显示软骨细胞中 IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、MMP-3 mRNA、MMP-13 mRNA 表达均上调, 提示造模成功。

附子味辛、甘, 性大热, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效, 常与桂枝、白术、甘草等合用治疗风寒湿痹^[6]。现代药理学研究表明, 附子具有强心、抗炎、镇痛、抗衰老等作用^[12]。临床研究发现, 附子汤及其类方可缓解关节炎患者的疼痛症状, 改善膝关节

功能^[13-14]。相关基础研究也表明, 附子汤及其类方可降低关节炎小鼠滑膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 表达量, 改善滑膜增生、抑制滑膜炎^[15-16]。杜盼盼^[17]构建膝骨关节炎小鼠模型, 并以附子汤灌胃干预, 结果显示附子汤可抑制膝骨关节炎小鼠关节软骨中 MMP 表达。祝震亚^[18]对经过附子汤干预的关节炎小鼠进行关节软骨病理学研究, 发现相比模型组, 经附子汤灌胃干预的小鼠关节软骨破坏减少, 且未见与模型组类似的骨缺损、软骨下骨硬化、软骨下骨囊肿。Zheng 等^[19]通过微量量热法评估附子对大鼠肝线粒体生物活性的刺激反应, 发现附子能促进线粒体能量代谢。刘颖等^[20]的研究发现, 附子多糖具有抗细胞氧化、抑制细胞凋亡的作用, 可保护线粒体膜电位稳定, 促进 B 淋巴细胞瘤-2 mRNA 表达, 从而抑制心肌细胞凋亡。

软骨细胞线粒体功能障碍被认为与骨关节炎的发生有关^[2-4]。线粒体的功能主要体现在线粒体氧化磷酸化反应, 后者是 ATP 的主要来源方式; 在氧化还原反应中, 当电子从供体转移到受体时, 线粒体氧化磷酸化系统会产生 ATP。细胞凋亡或过度氧化应激可能会降低线粒体的代谢活性, 从而使 ATP 的产生减少^[21]。线粒体损伤不仅会使 ATP 生成减少, 也会使细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中, 这也是 Caspase-3 激活的基础^[22]。

本研究制备附子含药血清, 观察了其对脂多糖诱导的软骨细胞 ATP 生成、Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响。为排除含药血清本身对软骨细胞增殖的影响, 选择合适浓度的含药血清, 本研究分别观察了浓度为 10%、5% 和 2% 的含药血清对软骨细胞的影响, 其中浓度为 10%、5% 的含药血清会对软骨细胞增殖

表 4 各组软骨细胞中 ATP 含量、Caspase-3 mRNA 表达量、Caspase-3 蛋白表达量及细胞凋亡率

组别	样本量/孔	ATP 含量 ($\bar{x} \pm s$)	Caspase-3 mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)	Caspase-3 蛋白 表达量($\bar{x} \pm s$)	细胞凋亡率/ (%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	3	1.294 \pm 0.132	0.783 \pm 0.020	0.780 \pm 0.031	6.460 \pm 0.806
脂多糖组	3	1.000 \pm 0.000	0.996 \pm 0.086	1.000 \pm 0.000	17.293 \pm 1.143
空白血清组	3	1.668 \pm 0.092	0.929 \pm 0.083	0.963 \pm 0.055	15.413 \pm 0.145
附子低剂量组	3	2.633 \pm 0.244	0.680 \pm 0.189	0.757 \pm 0.011	13.383 \pm 2.290
附子中剂量组	3	2.056 \pm 0.110	0.739 \pm 0.125	0.671 \pm 0.114	11.023 \pm 1.950
附子高剂量组	3	1.854 \pm 0.107	0.656 \pm 0.044	0.669 \pm 0.034	8.920 \pm 0.484
F 值		99.725	5.003	20.213	27.103
P 值		0.000	0.010	0.000	0.000

注: ATP 含量、Caspase-3 mRNA 表达量、Caspase-3 蛋白表达量统计计算时, 均设定对应指标脂多糖组中 1 个样本的测定值为 1, 其余样本的表达量均以该值为标准进行归一化处理。

产生较大抑制作用,故选取浓度为 2% 的含药血清进行后续实验。通过检测软骨细胞中 Caspase - 3 表达量,发现脂多糖诱导后软骨细胞中 Caspase - 3 表达上调,提示线粒体损伤;经附子含药血清干预后,脂多糖诱导的软骨细胞中 Caspase - 3 表达下调。这提示附子含药血清可能通过作用于 Caspase - 3 相关信号通路抑制 Caspase - 3 表达。此外,我们检测了软骨细胞中的 ATP 含量,发现空白血清组的 ATP 含量较脂多糖组升高。线粒体通常位于细胞质中,但有研究发现人和动物血液中存在循环线粒体^[23],这可能就是空白血清组 ATP 含量较脂多糖组升高的原因。为排除大鼠血清本身带来的影响,我们对附子低、中、高剂量组及空白血清组的 ATP 含量进行了比较,结果显示附子含药血清可在一定程度上促进软骨细胞中 ATP 生成。这提示附子含药血清可通过作用于细胞线粒体促进 ATP 生成、抑制 Caspase - 3 表达,从而保护软骨细胞。流式细胞术检测软骨细胞凋亡的结果也显示,附子含药血清可抑制脂多糖诱导引起的软骨细胞凋亡。从附子低、中、高剂量组 ATP 含量、Caspase - 3 mRNA 表达量、Caspase - 3 蛋白表达量、细胞凋亡率的比较结果来看,附子含药血清对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的影响可能存在一定的剂量依赖性,但本研究的结果尚不能有效支持该结论。

本研究的结果提示,附子含药血清可以抑制脂多糖诱导的软骨细胞凋亡,这可能与其作用于线粒体依赖性 Caspase - 3 信号通路有关。本研究未对附子含药血清抑制脂多糖诱导的软骨细胞凋亡的信号通路机制进一步探讨,也未明确附子中何种单体或成分起关键作用,以后还需针对这些问题进一步研究。

参考文献

[1] KRAUS V B, BLANCO F J, ENGLUND M, et al. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(8): 1233 - 1241.

[2] BLANCO F J, REGO - PÉREZ I. Mitochondria and mitophagy: biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(8): 989 - 991.

[3] LIU H, LI Z, CAO Y, et al. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: a possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3308 - 3316.

[4] BLANCO F J, JUNE R K 2nd. Cartilage metabolism, mitochondria, and osteoarthritis [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2020, 28(6): e242 - e244.

[5] LIN S, LIU K, WU W, et al. Study on pretreatment of FPS - 1 in rats with hepatic ischemia - reperfusion injury [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(2): 323 - 337.

[6] 陈德塔, 李玉梅, 陈林, 等. 附子复方在类风湿关节炎动物模型中的研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(12): 2675 - 2678.

[7] 张晨晨, 金镭, 陈慧慧, 等. 桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织中 MAPK 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5): 130 - 134.

[8] 陈修, 徐淑云, 卞如濂. 药理实验学方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202.

[9] BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(1): 16 - 21.

[10] 詹红生, 潘富伟. 膝关节炎治疗中不可或缺的基础治疗——《膝关节炎中医诊疗指南(2020 年版)》解读 [J]. *中医正骨*, 2021, 33(8): 1 - 6.

[11] 陈谱, 阮安民, 周俊, 等. 基于 NF - κ B 信号通路探讨芍药苷对 LPS 诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(11): 903 - 909.

[12] ZHOU G, TANG L, ZHOU X, et al. A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 160: 173 - 93.

[13] 刘福存, 单乐天, 童培建, 等. 附子汤治疗轻中度膝骨关节炎寒湿痹阻证的临床研究 [J]. *中医正骨*, 2016, 28(1): 10 - 13.

[14] 周奇. 附子汤治疗轻中度膝骨关节炎寒湿痹阻证的疗效分析 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(28): 5498.

[15] 蔡悦, 张博, 郭静. 甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠滑膜成纤维样细胞增殖的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(11): 29 - 33.

[16] 蔡悦, 梁红玉, 王建立, 等. 甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠的治疗作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14): 142 - 146.

[17] 杜盼盼. 附子汤加味方干预骨性关节炎小鼠 IL - 1 β 、TNF - α 、MMP - 13 表达的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.

[18] 祝震亚. 去毒附子对骨性关节炎的生物行为学研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.

[19] ZHENG Q, ZHAO Y, WANG J, et al. Spectrum - effect relationships between UPLC fingerprints and bioactivities of crude secondary roots of *Aconitum carmichaelii* Debeaux (Fuzi) and its three processed products on mitochondrial growth coupled with canonical correlation analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 615 - 623.

- [2] KINOSHITA H, MIYAKOSHI N, KOBAYASHI T, et al. A case report of revision occipital – cervical fusion after atlanto-axial instrumentation failure for neurofibromatosis type I[J]. BMC Surg, 2019, 19(1): 44.
- [3] VENDER J R, REKITO A J, HARRISON S J, et al. The evolution of posterior cervical and occipitocervical fusion and instrumentation[J]. Neurosurg Focus, 2004, 16(1): E9.
- [4] GROB D. Posterior occipitocervical fusion in rheumatoid arthritis and other instabilities[J]. J Orthop Sci, 2000, 5(1): 82 – 87.
- [5] LAVANO A, GUZZI G, STROSCIO C A, et al. Occipitocervical fusion[J]. Acta Neurochir Suppl, 2019, 125: 243 – 245.
- [6] 周树一, 李豪杰, 王扬, 等. 上颈椎后路内固定技术的研究进展[J]. 中医正骨, 2020, 32(11): 24 – 28.
- [7] BURTSEV A V, SERGEENKO O M, GUBIN A V. An alternative way of C1 screwing: supralaminar C1 lateral mass screws[J]. J Craniovertebr Junction Spine, 2021, 12(2): 191 – 196.
- [8] 王扬, 李豪杰, 周树一, 等. 寰椎椎弓根螺钉联合经寰枢关节螺钉内固定稳定性的生物力学研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2021, 31(12): 1129 – 1135.
- [9] 吴超, 邓佳燕, 谭伦, 等. 逐级扩大型 3D 打印导板系统辅助寰枢椎椎弓根植钉准确性分析及临床应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2019, 33(2): 212 – 218.
- [10] LEE Y M, LU A Y, OH T, et al. C2 translaminar screw fixation in pediatric occipitocervical fusion[J]. Childs Nerv Syst, 2022, 38(6): 1125 – 1135.
- [11] NAGATA K, BABA S, CHIKUDA H, et al. Use of C2 spinous process screw for posterior cervical fixation as substitute for laminar screw in a patient with thin laminae[J/OL]. BMJ Case Rep, 2013, 2013: bcr2013009889 [2022 – 03 – 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23814004/>.
- [12] 马生辉, 冯煜, 管江衡, 等. 齿状突切除术后前路与后路 C1 ~ C2 经关节螺钉内固定的生物力学分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2020, 25(10): 696 – 700.
- [13] IZEKI M, NEO M, FUJIBAYASHI S, et al. Utility of the analysis of intracranial venous sinuses using preoperative computed tomography venography for safe occipital screw insertion[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(18): E1149 – 1155.
- [14] SUCHOMEL P, BUCHVALD P, BARSA P, et al. Single – stage total C – 2 intralesional spondylectomy for chordoma with three – column reconstruction. Technical note[J]. J Neurosurg Spine, 2007, 6(6): 611 – 618.
- [15] 程杭清, 马维虎, 王扬, 等. 后路枕骨髁螺钉内固定系统的生物力学研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(1): 73 – 78.
- [16] 李国庆, 马维虎, 孙韶华, 等. 后路枕骨髁螺钉通道的影像解剖学研究[J]. 中华创伤杂志, 2015, 31(3): 273 – 277.
- [17] 王扬, 马维虎, 李国庆, 等. 后路枕骨髁螺钉置钉参数对安全性的影响[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(10): 587 – 594.
- [18] 王扬, 马维虎, 李国庆, 等. 后路枕骨髁螺钉置钉参数对安全性的影响[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(10): 587 – 594.
- [19] 马维虎, 王扬, 娄桢祺, 等. 枕骨髁螺钉治疗上颈椎不稳的有限元分析[J]. 中华创伤杂志, 2018, 34(4): 305 – 311.
- [20] 吴玉学, 吕青, 于龙广, 等. 人体斜坡区断层解剖及三维重建研究[J]. 局解手术学杂志, 2018, 27(2): 79 – 82.
- [21] 周树一, 许楠健, 李豪杰, 等. 后路寰枢关节 – 枕骨髁 – 斜坡置钉技术的数字化解剖学研究[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(25): 1973 – 1977.
- [22] 李豪杰, 马维虎, 彭宇杰, 等. 经关节斜坡螺钉内固定技术的生物力学研究[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(16): 1100 – 1107.
- [23] 高坤, 余正红, 邵佳, 等. 颅颈交界不稳定 3D 打印导向器辅助枕颈融合术[J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29(21): 1978 – 1981.
- [24] 马维虎. 上颈椎骨折手术技术的选择与应用[J]. 中华创伤杂志, 2019, 35(11): 966 – 969.
- [25] 董瑞一, 朱仕文, 苏永刚. TiRobot 辅助骨折手术的应用进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2022, 24(2): 179 – 184.

(收稿日期: 2022-05-26 本文编辑: 时红磊)

(上接第 7 页)

- [20] 刘颖, 纪超, 吴伟康. 附子多糖对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的保护机制[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(4): 281 – 284.
- [21] HUANG L W, HUANG T C, HU Y C, et al. Zinc protects chondrocytes from monosodium iodoacetate – induced damage by enhancing ATP and mitophagy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(1): 50 – 56.
- [22] ZUO H, LIN T, WANG D, et al. Neural cell apoptosis induced by microwave exposure through mitochondria – dependent caspase – 3 pathway[J]. Int J Med Sci, 2014, 11(5): 426 – 435.
- [23] SONG X, HU W, YU H, et al. Existence of circulating mitochondria in human and animal peripheral blood[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2122.

(收稿日期: 2022-03-13 本文编辑: 李晓乐)