

· 基础研究 ·

蠲痹方含药血清对绝经后膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬的影响及其作用机制

马靖哲¹, 康武林¹, 姚彬¹, 黄文博¹, 李越¹, 陈小林², 李思聪¹, 袁普卫¹

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘 要 目的:探讨蠲痹方含药血清对绝经后膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠软骨细胞自噬的影响及其作用机制。

方法:①绝经后 KOA 动物模型的建造和蠲痹方含药血清的制备。采用摘取大鼠卵巢,并切断膝关节内侧副韧带、前交叉韧带,摘除膝关节内侧半月板的方法,建造绝经后 KOA 大鼠模型。造模成功后,对模型大鼠进行蠲痹方浓缩液灌胃,制备蠲痹方含药血清。②大鼠软骨细胞的提取。分别取正常大鼠和模型大鼠的膝关节软骨分离、提取软骨细胞。③蠲痹方含药血清最佳作用浓度筛选。将模型大鼠软骨细胞分为模型组及 1.25%、2.5%、5%、10%、20% 含药血清组 6 组,除模型组外,其余各组分别加入相应体积分数的蠲痹方含药血清干预 24 h。检测各组软骨细胞的活力,筛选蠲痹方含药血清最佳作用浓度。④蠲痹方含药血清对大鼠软骨细胞 G 蛋白耦联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)表达影响的检测。将模型大鼠软骨细胞分为模型组及 1.25%、2.5%、5%、10% 含药血清组,并取正常大鼠软骨细胞设为空白组。除模型组和空白组外,其他各组软骨细胞用相应体积分数的蠲痹方含药血清干预 24 h。检测各组大鼠软骨细胞 GPR30 的相对表达量。⑤蠲痹方含药血清对大鼠软骨细胞自噬相关蛋白表达和 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路影响的检测。将模型大鼠软骨细胞分为模型组、含药血清组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组,并取正常大鼠软骨细胞设为空白组。除模型组和空白组外,含药血清组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组分别用 10% 蠲痹方含药血清、10% 蠲痹方含药血清 + Compound C 及 Compound C 干预 24 h。检测各组软骨细胞中自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3 β (microtubule-associated protein light chain 3 beta, MAPLC3 β)、Beclin-1、p62,及 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白磷酸化 AMP 活化蛋白激酶(phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)的相对表达量。**结果:**①动物模型鉴定结果。造模 8 周后,可见造模大鼠膝关节表面软骨毛糙或缺损,关节间隙变窄,滑膜增生,绝经后 KOA 大鼠模型造模成功。②软骨细胞鉴定结果。甲苯胺蓝染色及 II 型胶原蛋白免疫荧光鉴定结果显示,所提取的细胞符合软骨细胞特征。③蠲痹方含药血清最佳作用浓度筛选结果。5%、10%、20% 含药血清组细胞活力均高于 1.25%、2.5% 含药血清组和模型组(LSD- t = 6.767, P = 0.003, LSD- t = 7.666, P = 0.002, LSD- t = 5.091, P = 0.007; LSD- t = 5.080, P = 0.007, LSD- t = 6.690, P = 0.003, LSD- t = 3.433, P = 0.027; LSD- t = 7.590, P = 0.002, LSD- t = 8.200, P = 0.001, LSD- t = 6.031, P = 0.004); 10% 含药血清组细胞活力高于 5% 含药血清组和 20% 含药血清组(LSD- t = 3.204, P = 0.033, LSD- t = 4.671, P = 0.010)。④蠲痹方含药血清对大鼠软骨细胞 GPR30 表达影响的检测结果。模型组 GPR30 相对表达量低于空白组及 5%、10% 含药血清组(LSD- t = 5.695, P = 0.005, LSD- t = 5.400, P = 0.006, LSD- t = 9.006, P = 0.001), 5%、10% 含药血清组 GPR30 相对表达量均高于 1.25% 含药血清组(LSD- t = 2.782, P = 0.049, LSD- t = 4.473, P = 0.011), 10% 含药血清组 GPR30 相对表达量高于 2.5% 含药血清组(LSD- t = 4.544, P = 0.011)。⑤蠲痹方含药血清对大鼠软骨细胞自噬相关蛋白表达影响的检测结果。模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 MAPLC3 β 相对表达量均低于空白组、含药血清组(LSD- t = 6.855, P = 0.002, LSD- t = 8.675, P = 0.001; LSD- t = 5.096, P = 0.007, LSD- t = 5.931, P = 0.004; LSD- t = 5.560, P = 0.005, LSD- t = 5.354, P = 0.006); 模型组、Compound C 组 MAPLC3 β 相对表达量均低于含药血清 + Compound C 组(LSD- t = 4.627, P = 0.010, LSD- t = 8.677, P = 0.001)。模型组、Compound C 组 Beclin-1 相对表达量低于空白组、含药血清组、含药血清 + Compound C(LSD- t = 12.912, P = 0.000, LSD- t = 7.401, P = 0.002, LSD- t = 5.360, P = 0.006; LSD- t = 2.950, P = 0.042, LSD- t = 5.484, P = 0.005, LSD- t = 3.903, P = 0.018); 含药血清 + Compound C 组 Beclin-1 相对表达量低于空白组(LSD- t = 26.840, P = 0.000)。含药血清组、空白组 p62 相对表达量低于模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组(LSD- t = 3.925, P = 0.017, LSD- t = 3.985, P = 0.019, LSD- t = 0.016, P = 0.001; LSD- t =

基金项目:陕西省教育厅青年创新团队建设科研计划项目(21JP035);陕西省教育厅服务地方专项计划项目(21JC010);咸阳市重点研发计划项目(2019k01-53)

通讯作者:袁普卫 E-mail:spine_surgeon@163.com

3.149, $P=0.035$, $LSD-t=5.094$, $P=0.007$, $LSD-t=8.740$, $P=0.001$), 含药血清 + Compound C 组 p62 相对表达量低于 Compound C 组 ($LSD-t=3.455$, $P=0.026$)。⑥ 蠲痹方含药血清对大鼠软骨细胞 AMPK/mTOR 信号通路影响的检测结果。含药血清组 p-AMPK 相对表达量高于模型组、Compound C 组 ($LSD-t=3.623$, $P=0.022$, $LSD-t=6.537$, $P=0.003$), 空白组 p-AMPK 相对表达量高于模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 ($LSD-t=4.149$, $P=0.014$, $LSD-t=2.791$, $P=0.049$, $LSD-t=5.734$, $P=0.004$), 含药血清 + Compound C 组 p-AMPK 相对表达量高于 Compound C 组 ($LSD-t=5.958$, $P=0.004$)。空白组、含药血清组、含药血清 + Compound C 组 p-mTOR 相对表达量均低于模型组 ($LSD-t=8.722$, $P=0.001$, $LSD-t=8.849$, $P=0.001$, $LSD-t=5.558$, $P=0.005$), 含药血清组、空白组 p-mTOR 相对表达量均低于含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 ($LSD-t=4.201$, $P=0.014$, $LSD-t=10.030$, $P=0.001$; $LSD-t=4.879$, $P=0.008$, $LSD-t=9.782$, $P=0.001$), 含药血清 + Compound C 组 p-mTOR 相对表达量低于 Compound C 组 ($LSD-t=6.934$, $P=0.002$)。结论: 蠲痹方含药血清作用于绝经后 KOA 大鼠软骨细胞, 可增加细胞活力, 并通过上调 MAPLC3 β 、Beclin-1 的表达和抑制 p62 的表达增强细胞自噬能力; 其作用机制可能与促进 GPR30 表达, 上调 AMPK 磷酸化水平, 下调 mTOR 磷酸化水平, 激活 GPR30 和 AMPK/mTOR 信号通路有关。

关键词 骨关节炎; 膝; 绝经后期; 软骨细胞; 自吞噬; 蠲痹方; 大鼠

Effects and mechanism of Juanbi Fang (蠲痹方) medicated serum on autophagy of chondrocytes in postmenopausal rats with knee osteoarthritis: an experimental study

MA Jingzhe¹, KANG Wulin¹, YAO Bin¹, HUANG Wenbo¹, LI Yue¹, CHEN Xiaolin², LI Sicong¹, YUAN Puwei¹

1. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effects of Juanbi Fang (蠲痹方, JBF) medicated serum on autophagy of chondrocytes in postmenopausal rats with knee osteoarthritis (KOA), and to explore its mechanism. **Methods:** ① Twenty rats were subjected to ovariectomy, transection of knee medial collateral ligament (MCL) and anterior cruciate ligament (ACL), followed by knee medial meniscectomy for inducing postmenopausal KOA. After successful modeling, 15 model rats were intragastric administrated with JBF concentrate for making JBF medicated serum. ② The normal rats and model rats were sacrificed and their knee cartilages were harvested for isolating and extracting chondrocytes. ③ The chondrocytes extracted from the model rats were divided into model group, 1.25% medicated serum group, 2.5% medicated serum group, 5% medicated serum group, 10% medicated serum group, and 20% medicated serum group. Except for the model group, the chondrocytes in the other groups were intervened with JBF medicated serum in their corresponding volume fraction for consecutive 24 hours. After the end of intervention, the viability of chondrocytes in each group was detected, and the optimal acting concentration of the JBF medicated serum was screened. ④ The chondrocytes extracted from the model rats were assigned into model group, 1.25% medicated serum group, 2.5% medicated serum group, 5% medicated serum group, and 10% medicated serum group, and the chondrocytes from the normal rats were taken as blank group. Except for the model group and blank group, the chondrocytes in other 4 groups were intervened with JBF medicated serum in their corresponding volume fraction for consecutive 24 hours. After the end of intervention, the relative expression level of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in chondrocytes was detected by using Western blotting assay. ⑤ The chondrocytes extracted from the model rats were divided into model group, medicated serum group, medicated serum + Compound C group, and Compound C group, and the chondrocytes from the normal rats were taken as blank group. Except for the model group and blank group, the chondrocytes in medicated serum group, medicated serum + Compound C group, and Compound C group were intervened with 10% JBF medicated serum, 10% JBF medicated serum combined with Compound C, and Compound C, respectively, for consecutive 24 hours. After the end of intervention, the relative expression levels of autophagy-related protein microtubule-associated protein light chain 3 beta (MAPLC3 β), Beclin-1 and p62, as well as the relative expression levels of AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway-related protein phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK) and phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) in chondrocytes was detected by using Western blotting assay. **Results:** ① Eight weeks after the modeling, the coarse or defective cartilage on the knee surface, narrowed joint space, and proliferated synovial membrane were observed in the model rats, which suggested the models were successfully built. ② The primary cells were stained with toluidine blue, and the intracellular type II collagen was detected by immunofluorescence staining, the results showed that the extracted cells were indicated as chondrocytes. ③ The chondrocyte viability was higher in 5%, 10%, and 20% medicated serum group compared to 1.25%, 2.5% medicated serum group and model group ($LSD-t=6.767$, $P=0.003$,

LSD- t = 7.666, P = 0.002, LSD- t = 5.091, P = 0.007; LSD- t = 5.080, P = 0.007, LSD- t = 6.690, P = 0.003, LSD- t = 3.433, P = 0.027; LSD- t = 7.590, P = 0.002, LSD- t = 8.200, P = 0.001, LSD- t = 6.031, P = 0.004), and was higher in 10% medicated serum group compared to 5% and 20% medicated serum group (LSD- t = 3.204, P = 0.033, LSD- t = 4.671, P = 0.010). ④The relative expression level of GPR30 in chondrocytes was lower in model group compared to blank group, 5%, and 10% medicated serum group (LSD- t = 5.695, P = 0.005, LSD- t = 5.400, P = 0.006, LSD- t = 9.006, P = 0.001), and was higher in 5% and 10% medicated serum group compared to 1.25% medicated serum group (LSD- t = 2.782, P = 0.049, LSD- t = 4.473, P = 0.011), and was higher in 10% medicated serum group compared to 2.5% medicated serum group (LSD- t = 4.544, P = 0.011). ⑤The relative expression level of MAPLC3 β was lower in model group, medicated serum + Compound C group, and Compound C group compared to blank group and medicated serum group (LSD- t = 6.855, P = 0.002, LSD- t = 8.675, P = 0.001; LSD- t = 5.096, P = 0.007, LSD- t = 5.931, P = 0.004; LSD- t = 5.560, P = 0.005, LSD- t = 5.354, P = 0.006), and was lower in model group and Compound C group compared to medicated serum + Compound C group (LSD- t = 4.627, P = 0.010, LSD- t = 8.677, P = 0.001). The relative expression level of Beclin-1 was lower in model group and Compound C group compared to blank group, medicated serum group, and medicated serum + Compound C group (LSD- t = 12.912, P = 0.000, LSD- t = 7.401, P = 0.002, LSD- t = 5.360, P = 0.006; LSD- t = 2.950, P = 0.042, LSD- t = 5.484, P = 0.005, LSD- t = 3.903, P = 0.018), and was lower in medicated serum + Compound C group compared to blank group (LSD- t = 26.840, P = 0.000). The relative expression level of p62 was lower in medicated serum group and blank group compared to model group, medicated serum + Compound C group, and Compound C group (LSD- t = 3.925, P = 0.017, LSD- t = 3.985, P = 0.019, LSD- t = 0.016, P = 0.001; LSD- t = 3.149, P = 0.035, LSD- t = 5.094, P = 0.007, LSD- t = 8.740, P = 0.001), and was lower in medicated serum + Compound C group compared to Compound C group (LSD- t = 3.455, P = 0.026). ⑥The relative expression level of p-AMPK was higher in medicated serum group compared to model group and Compound C group (LSD- t = 3.623, P = 0.022, LSD- t = 6.537, P = 0.003), and was higher in blank group compared to model group, medicated serum + Compound C group, and Compound C group (LSD- t = 4.149, P = 0.014, LSD- t = 2.791, P = 0.049, LSD- t = 5.734, P = 0.004), and was higher in medicated serum + Compound C group compared to Compound C group (LSD- t = 5.958, P = 0.004). The relative expression level of p-mTOR was lower in blank group, medicated serum group and medicated serum + Compound C group compared to model group (LSD- t = 8.722, P = 0.001, LSD- t = 8.849, P = 0.001, LSD- t = 5.558, P = 0.005), and was lower in medicated serum group and blank group compared to medicated serum + Compound C group and Compound C group (LSD- t = 4.201, P = 0.014, LSD- t = 10.030, P = 0.001; LSD- t = 4.879, P = 0.008, LSD- t = 9.782, P = 0.001), and was lower in medicated serum + Compound C group compared to Compound C group (LSD- t = 6.934, P = 0.002). **Conclusion:** JBF medicated serum can increase the viability of chondrocytes and enhance the autophagy ability of chondrocytes via up-regulating the expression of MAPLC3 β and Beclin-1 and inhibiting the expression of p62 in postmenopausal rats with KOA. It may work by promoting the expression of GPR30, up-regulating the phosphorylation level of AMPK, down-regulating the phosphorylation level of mTOR, and activating signaling pathways of GPR30 and AMPK/mTOR.

Keywords osteoarthritis; knee; postmenopause; chondrocytes; autophagy; Juanbi Fang; rats

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以关节软骨退变、软骨下骨改变、滑膜炎症等为特征的慢性退行性疾病^[1-3], 主要表现为关节疼痛、僵硬和活动受限^[4]。调查显示, 我国 40 岁以上人群中女性 KOA 的患病率明显高于男性^[5]。伴随着雌激素水平的下降, 女性 KOA 的发病率呈陡增趋势^[6]。骨关节炎的发病与炎症及软骨细胞外基质合成和降解的失衡密切相关^[7-8]。软骨细胞外基质代谢异常可导致关节软骨细胞分解代谢加速^[9]。自噬是维持细胞内环境稳定的重要过程, 细胞可通过吞噬和降解功能失调的蛋白质与衰老受损的细胞器来维持自身的代谢需求^[10]。软骨细胞自噬功能异常与 KOA 的发生密切相关, 通过激活细胞自噬可以抑制软骨细胞的凋

亡, 延缓关节软骨退变^[11]。蠲痹胶囊为陕西中医药大学附属医院院内制剂, 在临床上用于 KOA 的治疗取得了满意的疗效^[12-13]。本团队前期研究^[14]证实, 蠲痹胶囊治疗 KOA 的作用机制可能与降低滑膜中炎症因子的表达, 抑制炎症反应有关。但该药对软骨细胞的影响, 尚缺乏相关研究。我们根据蠲痹胶囊的组方药物制备蠲痹方含药血清, 观察其对绝经后 KOA 大鼠软骨细胞自噬的影响, 并对其作用机制进行了探讨, 现总结报告如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄 SD 雌性大鼠 25 只, 体质量 (200 ± 30) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证

号:SCXK(湘)2019-0004。实验动物于陕西中医药大学动物实验中心喂养,使用许可证号:SCXK(陕)2021-001。实验室温度 18 ~ 25℃,相对湿度 50% ~ 80%,适应性饲养 1 周后开始实验。本研究实验方案经陕西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:SUCMDL20220621002。

1.2 实验药物

蠲痹胶囊药物组成:熟地黄 12 g、肉苁蓉 10 g、骨碎补 15 g、淫羊藿 15 g、白芍 12 g、生黄芪 30 g、当归 15 g、牛膝 12 g、甘草片 6 g。以上药物由陕西中医药大学附属医院药剂科提供。药物加水浸泡 30 min,文火煎煮 2 次,2 次煎煮的药液合并后,用 100℃ 恒温水浴将药液加热浓缩至每毫升含生药 1.0 g 的蠲痹方药物浓缩液,4℃ 保存备用。

1.3 实验试剂

细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8 购自北京博奥森生物科技有限公司,Compound C 购自上海皓元生物医药科技有限公司,Ⅱ型胶原蛋白抗体购自常州市祥泰生物技术有限公司,G 蛋白耦联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)抗体购自美国 Abcam 公司,微管相关蛋白轻链 3 β (microtubule-associated protein light chain 3 beta, MAPLC3 β)抗体、Bec-1 抗体、p62、AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抗体、磷酸化 AMP 活化蛋白激酶(phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK)抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)抗体购自美国 CST 公司。

1.4 实验仪器

生物安全柜、CO₂ 培养箱(新加坡 ESCO 公司),倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司),全自动酶标仪(美国 ELX808 公司),电泳仪(美国 BIO-RAD 公司),微量移液器(德国 Eppendorf 公司),YP601N 电子天平(哈尔滨众汇衡器公司),3K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司),Western Blot 仪器(美国 BIO-RAD 公司),BG-gdsAUTO 710 MINI 发光成像仪(北京百晶生物公司)。

2 方 法

2.1 绝经后 KOA 动物模型建造

25 只 SD 雌性大鼠,按照体重由高至低排序,

依次编号 1 ~ 25。从随机数字表中随机选取 1 行随机数字,连续抄录 25 个随机数字与大鼠编号依次对应,将抄录的随机数字由大到小排序(随机数字相同则按照出现顺序排序)。对随机数字排序在前 20 位的大鼠,采用摘取卵巢及切断内侧副韧带、前交叉韧带,摘除内侧半月板的方法^[15]进行绝经后 KOA 造模,其余大鼠不做处理。

2.2 蠲痹方含药血清制备

造模成功后,根据蠲痹胶囊成人口服剂量及成人和大鼠等效剂量公式^[16]计算出大鼠用药剂量,按上述随机方法随机选取 15 只模型大鼠进行蠲痹方药物浓缩液(0.014 mL · g⁻¹)灌胃,其余大鼠正常喂养。灌胃每日早晚各 1 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后腹主动脉取血,采集血浆,4℃ 下静置 2 h 后,于低温离心机 4℃、3500 r · min⁻¹(离心半径 155 mm)离心 15 min。离心后转移至超净工作台内取上清液。将离心好的血清用移液枪转移到事先标记好的无菌离心管中,56℃ 水浴灭活 30 min 后用 0.22 μ m 的滤膜过滤,移入无菌离心管中,置于 -80℃ 冰箱内保存备用。

2.3 大鼠软骨细胞提取

采用过量麻醉法处死大鼠,取下大鼠整个膝关节,分别进行软骨细胞提取。将大鼠膝关节浸泡于 75% 乙醇中 15 min 后,转移至生物安全柜中。用手术剪剔除皮毛,暴露并打开膝关节,剥离膝关节表面的透明软骨层。将剥离的透明软骨层置于 15 mL 无菌离心管中,加入胰蛋白酶,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 30 min,然后用 0.2% 的Ⅱ型胶原酶消化 3 h,过 200 目滤网,1500 r · min⁻¹(离心半径 155 mm)离心 10 min。PBS 缓冲液洗涤 3 次,收集细胞。模型大鼠和正常大鼠分别进行软骨细胞提取。

2.4 蠲痹方含药血清最佳作用浓度筛选

将模型大鼠软骨细胞以 5000 个 · 孔⁻¹ 的浓度接种至 96 孔板,分为模型组及 1.25%、2.5%、5%、10%、20% 含药血清组 6 组,每组设 3 个复孔。待细胞贴壁后,除模型组用新鲜 DMEM 完全培养基培养外,其余组分别加入相应体积分数的蠲痹方含药血清进行干预。24 h 后,参照 CCK-8 试剂盒说明,每孔避光加入 CCK-8 溶液 10 μ L,在培养箱内继续孵育 1 h 后,用酶标仪检测 450 nm 处的光密度。光密度值越高,细胞活力越强。

2.5 罂痹方含药血清对大鼠软骨细胞 GPR30 表达影响的检测

将模型大鼠软骨细胞以 $5000 \text{ 个} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的浓度接种至 96 孔板,分为模型组及 1.25%、2.5%、5%、10% 含药血清组,并取正常大鼠软骨细胞设为空白组,每组设 3 个复孔。除空白组和模型组用新鲜 DMEM 完全培养基培养外,其余组分别加入相应体积分数的罂痹方含药血清进行干预。24 h 后,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参蛋白,用蛋白免疫印迹法检测各组软骨细胞 GPR30 的相对表达量。

2.6 罂痹方含药血清对大鼠软骨细胞自噬相关蛋白表达及 AMPK/mTOR 信号通路影响的检测

将模型大鼠软骨细胞以 $5000 \text{ 个} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的浓度接种至 96 孔板,分为模型组、含药血清组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组,并取正常大鼠软骨细胞设为空白组,每组每项实验设 3 个复孔。除模型组和空白组用新鲜 DMEM 完全培养基培养外,含药血清组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组分别加入 10% 罂痹方含药血清、10% 罂痹方含药血清 + Compound C 及 Compound C 进行干预。24 h 后,采用蛋白免疫印迹法, GAPDH 为内参蛋白,检测软骨细胞中自噬相关蛋白 MAPLC3 β 、Beclin-1、p62 的相对表达量;分别以 AMPK、mTOR 为内参蛋白检测 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白 p-AMPK、p-mTOR 的相对表达量。

2.7 数据统计

采用 SPSS26.0 统计软件处理数据。各组软骨细胞细胞活力、GPR30、MAPLC3 β 、Beclin-1、p62、p-AMPK、p-mTOR 相对表达量的组间总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,检验

水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 动物模型鉴定结果

造模 8 周后,处死造模大鼠 1 只,见造模大鼠膝关节表面软骨毛糙或缺损,关节间隙变窄,滑膜增生,绝经后 KOA 大鼠模型造模成功。

3.2 软骨细胞鉴定结果

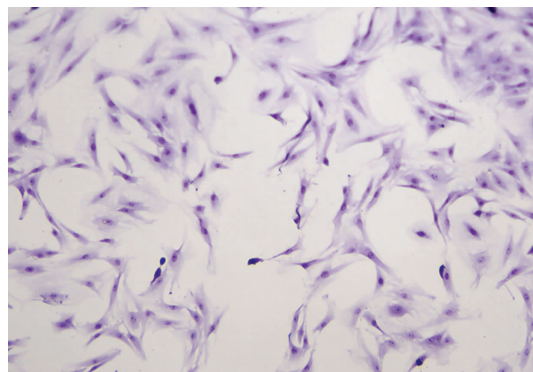
所提取的原代细胞,甲苯胺蓝染色见细胞浆呈浅蓝色,细胞核呈深蓝色[图 1(1)]; Collagen II 免疫荧光染色见细胞浆和细胞膜上有 Collagen II 的特征性表达[图 1(2)]; 鉴定为软骨细胞。

3.3 罂痹方含药血清最佳作用浓度筛选结果

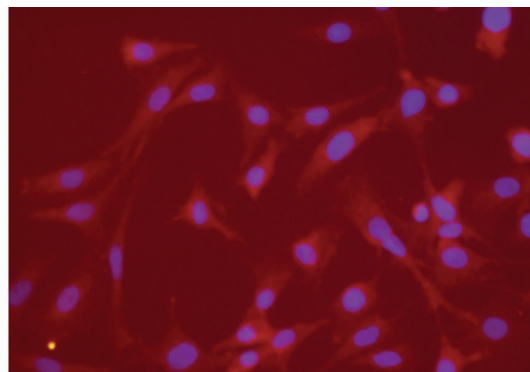
5 组软骨细胞细胞活力的组间总体比较,差异有统计学意义(表 1)。5%、10%、20% 含药血清组细胞活力均高于 1.25%、2.5% 含药血清组和模型组 (LSD- $t = 6.767, P = 0.003$, LSD- $t = 7.666, P = 0.002$, LSD- $t = 5.091, P = 0.007$; LSD- $t = 5.080, P = 0.007$, LSD- $t = 6.690, P = 0.003$, LSD- $t = 3.433, P = 0.027$; LSD- $t = 7.590, P = 0.002$, LSD- $t = 8.200, P = 0.001$, LSD- $t = 6.031, P = 0.004$); 1.25%、2.5% 含药血清组细胞活力与模型组比较,组间差异均无统计学意义 (LSD- $t = 1.182, P = 0.303$, LSD- $t = 1.785, P = 0.187$); 10% 含药血清组细胞活力高于 5% 含药血清组和 20% 含药血清组 (LSD- $t = 3.204, P = 0.033$, LSD- $t = 4.671, P = 0.010$)。

3.4 罂痹方含药血清对大鼠软骨细胞 GPR30 表达影响的检测结果

各组大鼠软骨细胞 GPR30 相对表达量组间总体比较,差异有统计学意义(表 2、图 2)。模型组 GPR30 相对表达量低于空白组及 5%、10% 含药血清组 (LSD- $t = 5.695, P = 0.005$, LSD- $t = 5.400, P = 0.006$, LSD- $t = 9.006, P = 0.001$); 模型组 GPR30



(1) 甲苯胺蓝染色($\times 100$)



(2) II 型胶原蛋白免疫荧光染色($\times 200$)

图 1 大鼠软骨细胞染色图片

相对表达量与 1.25%、2.5% 含药血清组比较,组间差异均无统计学意义 ($LSD-t = 0.776, P = 0.481$, $LSD-t = 1.585, P = 0.170$); 5%、10% 含药血清组 GPR30 相对表达量均高于 1.25% 含药血清组 ($LSD-t = 2.782, P = 0.049$, $LSD-t = 4.473, P = 0.011$); 10% 含药血清组 GPR30 相对表达量高于 2.5% 含药血清组 ($LSD-t = 4.544, P = 0.011$); 5% 含药血清组 GPR30 相对表达量与 2.5% 含药血清组比较,差异无统计学意义 ($LSD-t = 2.521, P = 0.065$); 5%、10% 含药血清组 GPR30 相对表达量与空白组比较,组间差异均无统计学意义 ($LSD-t = 2.274, P = 0.085$, $LSD-t = 0.997, P = 0.375$); 5% 含药血清组 GPR30 相对表达量与 10% 含药血清组比较,差异无统计学意义 ($LSD-t = 2.578, P = 0.062$)。

表 1 不同浓度罂粟方含药血清干预后大鼠软骨细胞活力

组别	样本量/孔	光密度值($\bar{x} \pm s$)
模型组	3	0.604 ± 0.220
1.25% 含药血清组	3	0.624 ± 0.021
2.5% 含药血清组	3	0.643 ± 0.031
5% 含药血清组	3	0.773 ± 0.032
10% 含药血清组	3	0.895 ± 0.058
20% 含药血清组	3	0.724 ± 0.027
<i>F</i> 值		32.029
<i>P</i> 值		0.000

表 2 不同浓度罂粟方含药血清干预后大鼠软骨细胞 G 蛋白耦联受体 30 的相对表达量

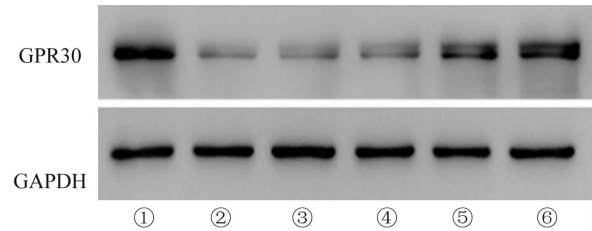
组别	样本量/孔	G 蛋白耦联受体 30 相对表达量($\bar{x} \pm s$)
空白组	3	1.000 ± 0.168
模型组	3	0.377 ± 0.087
1.25% 含药血清组	3	0.460 ± 0.162
2.5% 含药血清组	3	0.523 ± 0.134
5% 含药血清组	3	0.753 ± 0.084
10% 含药血清组	3	0.899 ± 0.051
<i>F</i> 值		12.825
<i>P</i> 值		0.000

3.5 罂粟方含药血清对大鼠软骨细胞自噬相关蛋白表达影响的检测结果

各组软骨细胞 MAPLC3 β 、Beclin-1、p62 相对表达量组间总体比较,差异均有统计学意义(表 3、图 3)。

模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 MAPLC3 β 相对表达量均低于空白组、含药血清组 ($LSD-t = 6.855, P = 0.002$, $LSD-t = 8.675, P = 0.001$; $LSD-t = 5.096, P = 0.007$, $LSD-t = 5.931, P = 0.004$; $LSD-t = 5.560, P = 0.005$, $LSD-t = 5.354, P = 0.006$);

模型组、Compound C 组 MAPLC3 β 相对表达量均低于含药血清 + Compound C 组 ($LSD-t = 4.627, P = 0.010$, $LSD-t = 8.677, P = 0.001$); 模型组 MAPLC3 β 相对表达量与 Compound C 组比较,组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 2.605, P = 0.060$); 含药血清组 MAPLC3 β 相对表达量与空白组比较,组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 1.677, P = 0.169$)。



GPR30 为 G 蛋白耦联受体 30, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶, ①为空白组, ②为模型组, ③为 1.25% 含药血清组, ④为 2.5% 含药血清组, ⑤为 5% 含药血清组, ⑥为 10% 含药血清组。

图 2 不同浓度罂粟方含药血清干预后大鼠软骨细胞 G 蛋白耦联受体 30 表达蛋白免疫印迹法检测结果

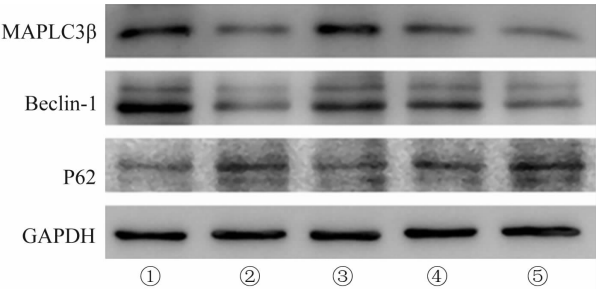
模型组、Compound C 组 Beclin-1 相对表达量低于空白组、含药血清组、含药血清 + Compound C 组 ($LSD-t = 12.912, P = 0.000$, $LSD-t = 7.401, P = 0.002$, $LSD-t = 5.360, P = 0.006$; $LSD-t = 2.950, P = 0.042$, $LSD-t = 5.484, P = 0.005$, $LSD-t = 3.903, P = 0.018$); 含药血清 + Compound C 组 Beclin-1 相对表达量低于空白组 ($LSD-t = 26.840, P = 0.000$)。模型组 Beclin-1 相对表达量与 Compound C 组比较,组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 0.346, P = 0.767$); 含药血清组 Beclin-1 相对表达量与含药血清 + Compound C 组、空白组比较,组间差异均无统计学意义 ($LSD-t = 4.648, P = 0.358$, $LSD-t = 1.032, P = 0.361$)。

含药血清组、空白组 p62 相对表达量低于模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 ($LSD-t = 3.925, P = 0.017$, $LSD-t = 3.985, P = 0.019$, $LSD-t = 0.016, P = 0.001$; $LSD-t = 3.149, P = 0.035$, $LSD-t = 5.094, P = 0.007$, $LSD-t = 8.740, P = 0.001$), 含药血清 + Compound C 组 p62 相对表达量低于 Compound C 组 ($LSD-t = 3.455, P = 0.026$)。模型组 p62 相对表达量与含药血清 + Compound C 组、Compound C 组比较,组间差异均无统计学意义 ($LSD-t = 0.787, P = 0.476$, $LSD-t = 1.565, P = 0.193$); 空白组 p62 相对表达量与含药血清组比较,组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 1.972, P = 0.120$)。

表 3 5 组大鼠软骨细胞自噬相关蛋白的相对表达量

组别	样本量/孔	MAPLC3β ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Beclin-1 ($\bar{x} \pm s$)	p62 ($\bar{x} \pm s$)
空白组	3	1.000 ± 0.123	1.000 ± 0.324	1.000 ± 0.146
模型组	3	0.483 ± 0.044	0.440 ± 0.075	1.935 ± 0.386
含药血清组	3	0.866 ± 0.063	0.805 ± 0.041	1.206 ± 0.108
含药血清 + Compound C 组	3	0.627 ± 0.031	0.680 ± 0.021	1.737 ± 0.204
Compound C 组	3	0.401 ± 0.033	0.413 ± 0.117	2.338 ± 0.222
<i>F</i> 值		24.014	7.292	16.242
<i>P</i> 值		0.000	0.005	0.000

注:1)为微管相关蛋白轻链 3β。



MAPLC3β 为微管相关蛋白轻链 3β,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,①为空白组,②为模型组,③为含药血清组,④为含药血清 + Compound C 组,⑤为 Compound C 组。

图 3 5 组大鼠软骨细胞自噬相关蛋白表达蛋白免疫印迹法检测结果

3.6 痼痹方含药血清对大鼠软骨细胞 AMPK/mTOR 信号通路影响的检测结果

5 组软骨细胞 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR 相对表达量组间总体比较,差异均有统计学意义(表 4、图 4)。

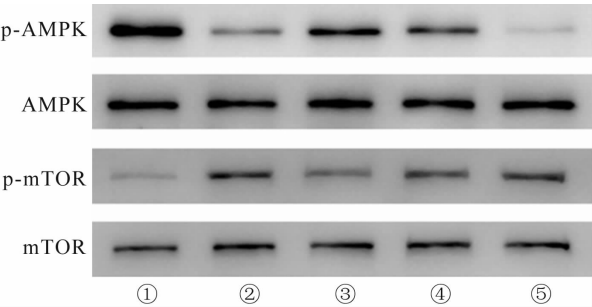
表 4 5 组大鼠软骨细胞 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白的相对表达量

组别	样本量/孔	p-AMPK ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	p-mTOR ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)
空白组	3	1.000 ± 0.242	1.000 ± 0.117
模型组	3	0.368 ± 0.106	1.800 ± 0.107
含药血清组	3	0.685 ± 0.109	1.141 ± 0.072
含药血清 + Compound C 组	3	0.585 ± 0.088	1.387 ± 0.071
Compound C 组	3	0.140 ± 0.096	1.936 ± 0.117
<i>F</i> 值		16.147	50.335
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:1)磷酸化 AMP 活化蛋白激酶;2)磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。

含药血清组 p-AMPK 相对表达量高于模型组、Compound C 组 (LSD-*t* = 3.623, *P* = 0.022, LSD-*t* = 6.537, *P* = 0.003),空白组 p-AMPK 相对表达量高于模型组、含药血清 + Compound C 组、Compound C 组

(LSD-*t* = 4.149, *P* = 0.014, LSD-*t* = 2.791, *P* = 0.049, LSD-*t* = 5.734, *P* = 0.004);含药血清 + Compound C 组 p-AMPK 相对表达量高于 Compound C 组 (LSD-*t* = 5.958, *P* = 0.004)。模型组 p-AMPK 相对表达量与含药血清 + Compound C 组、Compound C 组比较,组间差异均无统计学意义 (LSD-*t* = 2.739, *P* = 0.052, LSD-*t* = 2.774, *P* = 0.050);含药血清组 p-AMPK 相对表达量与空白组、含药血清 + Compound C 组比较,组间差异均无统计学意义 (LSD-*t* = 2.055, *P* = 0.109, LSD-*t* = 1.236, *P* = 0.284)。



p-AMPK 为磷酸化 AMP 活化蛋白激酶,AMPK 为 AMP 活化蛋白激酶,mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,①为空白组,②为模型组,③为含药血清组,④为含药血清 + Compound C 组,⑤为 Compound C 组。

图 4 5 组软骨细胞 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达蛋白免疫印迹法检测结果

空白组、含药血清组、含药血清 + Compound C 组 p-mTOR 相对表达量均低于模型组 (LSD-*t* = 8.722, *P* = 0.001, LSD-*t* = 8.849, *P* = 0.001, LSD-*t* = 5.558, *P* = 0.005);含药血清组、空白组 p-mTOR 相对表达量低于含药血清 + Compound C 组、Compound C 组 (LSD-*t* = 4.201, *P* = 0.014, LSD-*t* = 10.030, *P* = 0.001;LSD-*t* = 4.879, *P* = 0.008, LSD-*t* = 9.782, *P* = 0.001);含药血清 + Compound C 组 p-mTOR 相对表达量低于 Compound C 组 (LSD-*t* = 6.934, *P* = 0.002)。

模型组 p-mTOR 相对表达量与 Compound C 组比较, 组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 1.476, P = 0.214$); 含药血清组 p-mTOR 相对表达量与空白组比较, 组间差异无统计学意义 ($LSD-t = 1.708, P = 0.150$)。

4 讨论

KOA 属中医学“骨痹”“痹症”的范畴。《素问·上古天真论》曰:“女子七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也。”绝经后 KOA 的内因为肝肾亏虚、精血不足, 外因为风寒湿邪外侵, 多为本虚标实之证^[17]。蠲痹胶囊的药物组成由陕西省名老中医李堪印教授的临床经验方加减而得, 具有补肾益气、舒筋通络之功效^[18]。本研究结果表明蠲痹方含药血清可增强绝经后 KOA 大鼠软骨细胞的活力, 最佳作用浓度为 10%。

GPR30 是一种 7 次跨膜 G 蛋白耦联雌激素受体, 能介导快速细胞反应。成冬等^[19]的研究表明, 17 β -雌二醇通过 GPR30 和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路保护 ATDC5 软骨细胞免于线粒体自噬。本研究结果表明蠲痹方含药血清可上调绝经后 KOA 大鼠软骨细胞 GPR30 的表达, 最低作用浓度为 5%。

软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型, 炎症和氧化应激等病理因素可导致软骨细胞过度凋亡、细胞密度降低和细胞外基质降解, 从而加速骨关节炎的发展。因此, 预防软骨细胞过度凋亡可能是预防骨关节炎进展的有效方法^[20]。细胞自噬是细胞内损坏的蛋白或细胞器经溶酶体降解成可循环利用的细胞成分的过程^[21]。关节软骨细胞处于特殊的低氧环境中, 营养物质缺乏, 细胞自噬对于维持软骨细胞的生存和功能十分重要^[22]。软骨细胞自噬活性降低, 清除自身衰老、受损的细胞器的能力下降, 细胞稳态被打破, 代谢失衡, 可致细胞发生炎症反应, 出现细胞损伤。Luo 等^[23]的研究表明, 自噬在维持关节软骨细胞的稳态中起着重要作用, 软骨细胞自噬能力增强, 可增强其基质代谢活性, 从而延缓 KOA 的进展。细胞中自噬相关蛋白 MAPLC3 β 、Beclin-1、p62 的表达量可反映细胞自噬情况^[24]。软骨细胞中 MAPLC3 β 、Beclin-1 的表达量上调, p62 的表达量下调, 说明细胞自噬能力增强。

AMPK 是一种异源三聚体复合物, 包含 1 个催化亚基 α 和 2 个调节亚基 β 和 γ , 每个亚基由 2 个或 3 个不同的基因编码, 导致不同 AMPK 复合物有 12 种

不同的 $\alpha/\beta/\gamma$ 组合^[25]。AMPK 能感知能量稳态调节因子三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的水平, 当细胞 ATP 处于低水平时, AMPK 可以通过调节代谢酶来对 ATP 与磷酸腺苷比率下降作出反应, 以促进 ATP 的产生并抑制 ATP 的消耗^[26]。当细胞能量较低时, α 亚基中的 Thr172 被磷酸化, 导致 AMPK 复合物的激活。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞自噬的过程中发挥着关键作用。mTOR 有两种蛋白质复合物亚基, 即 mTOR 复合体 1 和 mTOR 复合体 2^[27]。mTOR 复合体 1 受生长因子调节, 并对不利于细胞生长的环境 (如 DNA 损伤、缺氧、低 ATP 水平和氨基酸耗尽等) 作出反应, 可促进细胞中脂质和核苷酸的合成, 并通过促进葡萄糖代谢促进细胞生长^[28]。mTOR 复合体 2 主要通过磷酸化和激活蛋白激酶 B 来调节细胞增殖^[26]。此外, mTOR 复合体 2 通过磷酸化 AGC 蛋白激酶家族成员来控制细胞生长和代谢^[28]。AMPK 是自噬激活因子, mTOR 复合体 1 是主要的自噬抑制因子。当 AMPK 激活后, 可阻断 mTOR 信号通路的磷酸化, 抑制细胞中 mTOR 的表达, 增强 AMPK 和细胞自噬相关蛋白之间的相互作用, 进而激活细胞自噬^[29-30]。Li 等^[31]的研究表明, 二甲双胍通过以 AMPK 介导的方式抑制 mTOR 信号通路, 诱导细胞自噬, 从而延缓 H_2O_2 诱导的脂肪间充质干细胞衰老。本研究结果表明, 蠲痹方含药血清可上调绝经后 KOA 大鼠软骨细胞中 AMPK 磷酸化水平, 下调 mTOR 磷酸化水平, 引入 AMPK 抑制剂 Compound C 干预后, 发现 Compound C 抑制了绝经后 KOA 大鼠软骨细胞的自噬并减弱了蠲痹方含药血清的作用。

本研究结果表明, 蠲痹方含药血清作用于绝经后 KOA 大鼠软骨细胞, 可增加细胞活力, 并通过上调 MAPLC3 β 、Beclin-1 的表达和抑制 p62 的表达增强细胞自噬能力; 其作用机制可能与促进 GPR30 表达, 上调 AMPK 磷酸化水平, 下调 mTOR 磷酸化水平, 激活 GPR30 和 AMPK/mTOR 信号通路有关。本研究分别提取了正常大鼠与绝经后 KOA 模型大鼠的膝关节软骨细胞, 由于未对 2 组大鼠软骨细胞的形态及炎症因子水平进行比较, 不能确认所提取模型大鼠的软骨细胞完全反映了绝经后 KOA 软骨细胞的状态, 但经鉴定所提取的细胞均为软骨细胞。未来的研究需要继续完善实验设计, 进一步阐明蠲痹方含药血清影响绝

经后 KOA 大鼠软骨细胞自噬的具体作用机制。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393: 1745 – 1759.
- [2] SOFAT N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(5): 463 – 479.
- [3] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee Osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. Genes (Basel), 2020, 11(8): 854.
- [4] LOESER R F, GOLDRING S R, SCANZELLO C R, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697 – 1707.
- [5] 王欢, 孙贺, 张耀南, 等. 中国 40 岁以上人群原发性膝骨关节炎各间室患病状况调查[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2019, 12(7): 528 – 532.
- [6] SRIKANTH V K, FRYER J L, ZHAI G, et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(9): 769 – 781.
- [7] CHARLIER E, DERoyer C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 49 – 65.
- [8] FAVERO M, BELLUZZI E, TRISOLINO G, et al. Inflammatory molecules produced by meniscus and synovium in early and end-stage osteoarthritis: a coculture study[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11176 – 11187.
- [9] MOBASHERI A, RAYMAN M P, GUALILLO O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(5): 302 – 311.
- [10] KLIONSKY D J, ABDALLA F C, ABELIOVICH H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445 – 544.
- [11] SHAPIRO I M, LAYFIELD R, LOTZ M, et al. Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology[J]. Autophagy, 2014, 10(1): 7 – 19.
- [12] 王军威, 朱添, 郭小兰, 等. 关节镜手术联合薏苡仁胶囊治疗膝骨性关节炎[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(4): 693 – 696.
- [13] 楚向东, 李玥. 关节镜结合内服薏苡仁胶囊为主治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. 陕西中医, 2015, 36(8): 995 – 997.
- [14] 袁普卫, 李小群, 康武林, 等. 薏苡仁胶囊对膝骨关节炎豚鼠关节软骨组织形态及滑膜中 Toll 样受体 4、NF- κ B p65 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中医正骨, 2016, 28(9): 5 – 12.
- [15] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hult 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1104 – 1108.
- [16] 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.
- [17] 许学猛, 刘文刚, 许树柴, 等. 膝骨关节炎(膝痹)中西医结合临床实践指南[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(22): 2827 – 2833.
- [18] 胡兴律, 冯伟, 袁普卫, 等. 薏苡仁胶囊治疗早期膝骨性关节炎 45 例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(21): 43 – 44.
- [19] 成冬, 郭磊, 姜天龙, 等. 17 β -雌二醇通过 GPR30 和 PI3K/Akt 信号通路影响 ATDC5 软骨细胞线粒体自噬的机制[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(4): 289 – 294.
- [20] LI M, ZHANG L, LIU Z, et al. Sanse powder essential oil nanoemulsion negatively regulates trpa1 by ampk/mtor signaling in synovitis: knee osteoarthritis rat model and fibroblast-like synoviocyte isolates[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 4736670.
- [21] DONG J, ZHANG J, LI G C, et al. CDDO-Im ameliorates osteoarthritis and inhibits chondrocyte apoptosis in mice via enhancing Nrf2-dependent autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(7): 1793 – 1802.
- [22] VALENTI M T, DALLE CARBONARE L, ZIPETO D, et al. Control of the autophagy pathway in osteoarthritis: key regulators, therapeutic targets and therapeutic strategies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2700.
- [23] LUO P, GAO F, NIU D, et al. The role of autophagy in chondrocyte metabolism and osteoarthritis: a comprehensive research review[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 5171602.
- [24] SHIMODA M, ODA S, SHIBATA M, et al. Change in regional cerebral blood flow following glycerol administration predicts. Clinical result from shunting in normal pressure hydrocephalus[J]. Acta Neurochir (Wien), 1994, 129(3/4): 171 – 176.
- [25] YAN Y, ZHOU X E, XU H E, et al. Structure and physiological regulation of AMPK[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3534.
- [26] YAO Q, WU X, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 56.
- [27] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth,

metabolism, and disease [J]. Cell, 2017, 169 (2): 361 - 371.

- [28] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. Science, 2005, 307 (5712): 1098 - 1101.

- [29] CARAMÉS B, HASEGAWA A, TANIGUCHI N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71 (4): 575 - 581.

- [30] LEIDAL A M, LEVINE B, DEBNATH J. Autophagy and the cell biology of age-related disease [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20 (12): 1338 - 1348.

- [31] LI Z, LIU L, YANG Y, et al. Metformin ameliorates senescence of adipose-derived mesenchymal stem cells and attenuates osteoarthritis progression via the ampk-dependent autophagy pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4620254.

(收稿日期: 2023-09-04 本文编辑: 杨雅)

(上接第 3 页)

- [13] ZHANG Y, CHAI Y, PAN X, et al. Tai chi for treating osteopenia and primary osteoporosis: a meta-analysis and trial sequential analysis [J]. Clin Interv Aging, 2019, 14: 91 - 104.

- [14] LI J, GUO J, WANG X, et al. Efficacy and safety of tai chi exercise on bone health: an umbrella review [J]. Osteoporos Int, 2023, 34 (11): 1853 - 1866.

- [15] 孟凡莉. 太极拳运动对骨量减少女性老年人平衡能力改善效果的实验研究 [D]. 北京: 首都体育学院, 2019.

- [16] 王昌. 负重太极拳运动对绝经后骨质疏松症患者平衡及运动功能的影响 [D]. 开封: 河南大学, 2023.

- [17] GIANREGORIO L M, PAPAIOANNOU A, MACINTYRE N J, et al. Too fit to fracture: exercise recommendations for individuals with osteoporosis or osteoporotic vertebral fracture [J]. Osteoporos Int, 2014, 25 (3): 821 - 835.

- [18] 姚鑫, 罗琳, 洪邦辉, 等. 太极拳运动对老年男性骨质疏松患者锻炼情绪及骨密度和生理指标的影响 [J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2016, 34 (3): 32 - 36.

- [19] 何伟涛, 孙全谓, 史晓林. 太极拳与原发骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14 (8): 587 - 590.

- [20] 梁丽霞, 林松, 刘利花, 等. 八段锦操对腰椎骨折术后病人康复效果的影响研究 [J]. 护理研究, 2019, 33 (6): 1090 - 1092.

- [21] 刘保新, 蔡迎峰, 陈兵, 等. 中药膏方、八段锦联合钙剂预防

骨质疏松性椎体压缩骨折 PVP 术后再骨折的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (4): 448 - 455.

- [22] 曾云贵, 周小青, 王安利, 等. 健身气功·八段锦锻炼对中老年人体形态和生理机能影响的研究 [J]. 北京体育大学学报, 2005, 28 (9): 1207 - 1209.

- [23] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南 (2011 年) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4 (1): 2 - 17.

- [24] 杜雪莲, 陈湛超, 彭映, 等. 基于五禽戏功法的肩关节操对肩部损伤患者术后功能的影响 [J]. 河南中医, 2022, 42 (5): 786 - 789.

- [25] 谷磊, 刘毅. 健身功法新编五禽戏对老年女性骨密度的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41 (1): 79 - 82.

- [26] 祁曼迪. 健身气功·五禽戏对社区老年人平衡能力、步态、下肢肌力及生活质量的影响 [D]. 上海: 上海师范大学, 2020.

- [27] 侯晏绍. 健身气功八段锦与五禽戏对老年人下肢稳定性影响的对比研究 [D]. 石家庄: 河北师范大学, 2016.

- [28] 刘会子, 张敏, 陈娟, 等. 骨质疏松性椎体压缩性骨折病人术后早期功能锻炼依从性的影响因素 [J]. 循证护理, 2023, 9 (20): 3754 - 3757.

- [29] 曹琼雅. 基于微信提高全膝关节置换术患者居家功能锻炼依从性的干预效果研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.

(收稿日期: 2023-11-12 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 6 页)

- [30] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组. 骨质疏松性骨折诊疗指南 [J]. 中华骨科杂志, 2017, 37 (1): 1 - 10.

- [31] 邱贵兴, 裴福兴, 胡侦明, 等. 中国骨质疏松性骨折诊疗指南 (骨质疏松性骨折诊断及治疗原则) [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2015, 8 (5): 371 - 374.

- [32] 张艳梅, 马晓霞, 赫继梅, 等. 失能老人跌倒的影响因素及长期照护服务需求 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (17): 4355 - 4357.

- [33] WONG R M Y, CHEUNG W H, CHOW S K H, et al. Re-

commendations on the post-acute management of the osteoporotic fracture-patients with "very-high" refracture risk [J]. J Orthop Translat, 2022, 37: 94 - 99.

- [34] 阮文东, 王沛, 雪原, 等. 骨质疏松骨折后再骨折的临床风险因素 [J]. 中华骨科杂志, 2011, 31 (7): 789 - 793.

- [35] 朱佩佩, 曹玉霖, 刘勇, 等. 骨质疏松性骨折与再骨折风险评估的研究进展 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2019, 21 (11): 1005 - 1008.

(收稿日期: 2023-12-24 本文编辑: 杨雅)