

川芎嗪对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激的影响及作用机制研究

李科¹, 曹玉净¹, 钱亚男², 李光辉¹, 周松林¹

(1. 河南省中医院, 河南 郑州 450002;

2. 河南中医药大学骨伤学院, 河南 郑州 450002)

摘要 目的:观察川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激的影响, 并探讨其作用机制。**方法:**选用 ATDC5 小鼠软骨细胞进行实验, 加入 IL-1 β 模拟骨关节炎环境, 通过测定不同浓度 TMP 干预后的细胞存活率确定本实验中 TMP 的浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 ATDC5 小鼠软骨细胞分为 4 组。对照组常规培养, 模型组、TMP 低剂量组、TMP 高剂量组均按照 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β , TMP 低剂量组、TMP 高剂量组在此基础上分别按照 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP。采用 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率, 采用 Western Blot 法检测 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X (B-cell lymphoma-2 Associated X, Bax) 蛋白含量、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白含量确定细胞凋亡情况, 采用 ELISA 测定技术检测炎症因子含量[IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)], 分别采用硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法和比色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)等氧化应激指标含量, 采用 Western Blot 法检测核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路相关蛋白[Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、Nrf2、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、SOD2] 含量。将 ATDC5 小鼠软骨细胞分为 4 组。空白组常规培养; 诱导组按照 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ; TMP 组按照 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β , 并按照 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP; Nrf2 抑制剂组先按照 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β 、按照 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 Nrf2 抑制剂 ML385, 最后按照 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP, 采用 Western Blot 法检测 Nrf2 下游蛋白 (HO-1、SOD2) 含量。**结果:**①软骨细胞增殖情况检测结果。模型组的细胞增殖抑制率高于对照组 ($P=0.043$), TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的细胞增殖抑制率均低于模型组 ($P=0.030, P=0.033$), TMP 低剂量组的细胞增殖抑制率高于 TMP 高剂量组 ($P=0.049$)。②软骨细胞凋亡情况检测结果。模型组的 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值高于对照组、TMP 低剂量组及 TMP 高剂量组 ($P=0.000, P=0.005, P=0.000$), TMP 高剂量组的 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值低于 TMP 低剂量组 ($P=0.003$)。③软骨细胞中炎症因子含量检测结果。模型组的 IL-6 和 TNF- α 含量均高于对照组、TMP 低剂量组及 TMP 高剂量组 (IL-6: $P=0.035, P=0.024, P=0.049$; TNF- α : $P=0.017, P=0.039, P=0.032$); TMP 低剂量组的 IL-6 和 TNF- α 含量均高于 TMP 高剂量组 ($P=0.019, P=0.028$)。④软骨细胞中氧化应激指标含量检测结果。模型组的 MDA 含量高于对照组 ($P=0.027$), SOD 和 GSH 含量均低于对照组 ($P=0.013, P=0.028$); TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的 MDA 含量均低于模型组 ($P=0.020, P=0.040$), SOD 和 GSH 含量均高于模型组 (SOD: $P=0.048, P=0.039$; GSH: $P=0.031, P=0.022$); TMP 高剂量组的 MDA 含量低于 TMP 低剂量组 ($P=0.040$), SOD 和 GSH 含量均高于 TMP 低剂量组 ($P=0.026, P=0.038$)。⑤软骨细胞中 Nrf2 信号通路相关蛋白含量检测结果。模型组的 Keap1 蛋白含量高于对照组 ($P=0.000$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均低于对照组 ($P=0.003, P=0.004, P=0.003$); TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的 Keap1 蛋白含量均低于模型组 ($P=0.002, P=0.000$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均高于模型组 (Nrf2: $P=0.002, P=0.008$; HO-1: $P=0.000, P=0.001$; SOD2: $P=0.002, P=0.000$); TMP 高剂量组的 Keap1 蛋白含量低于 TMP 低剂量组 ($P=0.034$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均高于 TMP 低剂量组 ($P=0.000, P=0.039, P=0.029$)。⑥Nrf2 抑制剂干预后软骨细胞中 Nrf2 下游蛋白含量测定结果。诱导组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均低于空白组 ($P=0.000, P=0.001$), TMP 组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均高于诱导组 ($P=0.023, P=0.030$), Nrf2 抑制剂组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均低于 TMP 组 ($P=0.040, P=0.000$)。**结论:** TMP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激具有保护作用, 其作用机制可能与激活 Nrf2 信号通路, 增强软骨细胞抗氧化能力有关。

关键词 川芎嗪; 骨关节炎; 软骨细胞; 细胞凋亡; 氧化性应激; 白细胞介素-1 β ; 核转录因子红系 2 相关因子 2; 体外试验

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题 (2024ZYZD06, 2023ZY1008, 2019ZYBJ15)

通讯作者: 曹玉净 E-mail: bravecao@163.com

Effects and mechanism of tetramethylpyrazine on chondrocyte apoptosis and oxidative stress induced by interleukin-1 β : an experimental study

LI Ke¹, CAO Yujing¹, QIAN Yanan², LI Guanghui¹, ZHOU Songlin¹

1. Henan Province Hospital of TCM, Zhengzhou 450002, Henan, China

2. College of Orthopaedics and Traumatology of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, Henan, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on interleukin (IL)-1 β -induced chondrocyte apoptosis and oxidative stress, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** The ATDC5 mouse chondrocytes (ATDC5 cells) were selected and cultured in the Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) added with IL-1 β aimed at simulating the environment of osteoarthritis. The concentrations of TMP for the following experiment were determined to be 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ by measuring the cell survival rate after intervention with different concentrations of TMP. The ATDC5 cells were divided into control group, model group, low-dose TMP (L-TMP) group, and high-dose TMP (H-TMP) group. The ATDC5 cells in the control group were cultured in the conventional DMEM; while the ones in model group, L-TMP group, and H-TMP group in the DMEM adding with IL-1 β with concentration of 10 ng/mL ; and the DMEM in L-TMP group and H-TMP group were further added with TMP with concentration of 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively. After 24-hour culture, the proliferation inhibition rate of the ATDC5 cells in each group was determined by using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay; the levels of B-cell lymphoma-2 Associated X (Bax) protein and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein in the ATDC5 cells were detected by using Western blotting to determine the cellular apoptosis; the levels of inflammatory cytokines including IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the ATDC5 cells were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the levels of oxidative stress markers including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) in the ATDC5 cells were determined by using the thiobarbituric acid (TBA) method, xanthine oxidase (XO) method, and colorimetry, respectively; and the levels of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway-related proteins including Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), and SOD2 in the ATDC5 cells were detected by using Western blotting. Furthermore, another ATDC5 cells were divided into blank group, induction group, TMP group, and Nrf2 inhibitor group. The ATDC5 cells in the blank group were cultured in the conventional DMEM; while the ones in induction group in the DMEM adding with IL-1 β with concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$; the ones in TMP group in the DMEM adding with IL-1 β with concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ and TMP with concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$; and the ones in Nrf2 inhibitor group in the DMEM adding with IL-1 β with concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$, ML385 with concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ and TMP with concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. The levels of Nrf2 downstream proteins including HO-1 and SOD2 in the ATDC5 cells were detected by employing Western blotting. **Results:** ①The proliferation of the ATDC5 cells. The proliferation inhibition rate of the ATDC5 cells was higher in model group compared to control group ($P = 0.043$), and was lower in L-TMP group and H-TMP group compared to model group ($P = 0.030$, $P = 0.033$), and was higher in L-TMP group compared to H-TMP group ($P = 0.049$). ②The apoptosis of the ATDC5 cells. The ratio of Bax protein level to Bcl-2 protein level was greater in model group compared to control group, L-TMP group and H-TMP group ($P = 0.000$, $P = 0.005$, $P = 0.000$), and was smaller in H-TMP group compared to L-TMP group ($P = 0.003$). ③The levels of inflammatory cytokines in the ATDC5 cells. The levels of IL-6 and TNF- α in the ATDC5 cells were higher in model group compared to control group, L-TMP group and H-TMP group (IL-6: $P = 0.035$, $P = 0.024$, $P = 0.049$; TNF- α : $P = 0.017$, $P = 0.039$, $P = 0.032$), and were higher in L-TMP group compared to H-TMP group ($P = 0.019$, $P = 0.028$). ④The levels of oxidative stress markers in the ATDC5 cells. The level of MDA was higher, while the levels of SOD and GSH were lower in model group compared to control group ($P = 0.027$, $P = 0.013$, $P = 0.028$). The level of MDA was lower, while the levels of SOD and GSH were higher in L-TMP group and H-TMP group compared to model group (MDA: $P = 0.020$, $P = 0.040$; SOD: $P = 0.048$, $P = 0.039$; GSH: $P = 0.031$, $P = 0.022$). The level of MDA was lower, while the levels of SOD and GSH were higher in H-TMP group compared to L-TMP group ($P = 0.040$, $P = 0.026$, $P = 0.038$). ⑤The levels of Nrf2 signaling pathway-related proteins in the ATDC5 cells. The level of Keap1 was higher, while the levels of Nrf2, HO-1 and SOD2 were lower in model group compared to control group ($P = 0.000$, $P = 0.003$, $P = 0.004$, $P = 0.003$). The level of Keap1 was lower, while the levels of Nrf2, HO-1 and SOD2 were higher in L-TMP group and H-TMP group compared to model group (Keap1: $P = 0.002$, $P = 0.000$; Nrf2: $P = 0.002$, $P = 0.008$; HO-1: $P = 0.000$, $P = 0.001$; SOD2: $P = 0.002$, $P = 0.000$). The level of Keap1 was lower, while the levels of Nrf2, HO-1 and SOD2 were higher in H-TMP group compared to L-TMP group ($P = 0.034$, $P = 0.000$, $P = 0.039$, $P = 0.029$). ⑥The levels of Nrf2 downstream proteins in the ATDC5 cells after intervention with inhibitor. The levels of HO-1 and SOD2 in the ATDC5 cells were lower in induction group compared to blank group ($P = 0.000$, $P = 0.001$), and were higher in TMP group compared to induction group ($P = 0.023$, $P = 0.030$), and were lower in Nrf2 inhibitor group

compared to TMP group ($P = 0.040, P = 0.000$). **Conclusion:** TMP has a protective effect against chondrocyte apoptosis and oxidative stress induced by IL-1 β . It may exert the effects by activating Nrf2 signaling pathway and enhancing the antioxidant capacity of chondrocytes.

Keywords tetramethylpyrazine; osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis; oxidative stress; interleukin-1 beta; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; in vitro test

骨关节炎是一种由多种因素引起的关节疾病,主要表现为关节软骨退变、纤维化、破裂、溃疡和脱失,导致关节功能障碍,严重影响患者的生活质量^[1-3]。骨关节炎的发病机制目前尚不完全清楚。研究表明,氧化应激反应可激活凋亡信号调节激酶介导的细胞凋亡,导致软骨破坏,加速骨关节炎进程^[4]。目前对于早中期骨关节炎的治疗主要以药物治疗为主,但长期服用非甾体抗炎药等药物会对人体多个系统造成损伤。因此,寻找更加安全、有效的治疗药物具有重要价值^[5-7]。中药川芎是伞形科植物川芎的干燥根茎,味辛,性温,归肝、胆、心包经,具有活血通络、祛风止痛和养血调经的功效^[8-9]。川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是川芎的主要活性成分之一^[10-11]。研究表明, TMP 可缓解白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 诱导的内质网应激导致的软骨细胞凋亡和炎症反应^[12];关节腔注射 TMP 微球可有效缓解炎症反应,减少蛋白多糖消耗,改善关节病变^[13]。本研究探讨了 TMP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激的影响及作用机制,以期为临床应用 TMP 治疗骨关节炎提供参考。

1 材料与仪器

1.1 软骨细胞

ATDC5 小鼠软骨细胞系,购自武汉尚恩生物技术有限公司。

1.2 实验主要试剂

TMP(南京化学试剂股份有限公司),DMEM 高糖培养基(武汉普诺塞生命科技有限公司),胎牛血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒、IL-6 ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司),重组小鼠 IL-1 β (上海皓元医药股份有限公司),细胞总蛋白提取裂解液(武汉博士德生物

科技有限公司), ML385 (Selleck 公司), B 细胞淋巴瘤-2 相关 X (B-cell lymphoma-2 Associated X, Bax) 蛋白重组兔单克隆抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 重组兔单克隆抗体、 β -actin 小鼠单克隆抗体(HUABIO 公司),抗 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 抗体、抗核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抗体 (Abcam 公司), SOD2 多克隆抗体、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 多克隆抗体 (Proteintech 公司)。

1.3 实验主要仪器

Multiskan FC 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司), Image Quant LAS4000 化学发光成像仪 (GE 公司), Centrifuge 5430R 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 软骨细胞培养

将 ATDC5 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞融合度达到 80% 时传代,使用对数生长期细胞进行实验。

2.2 TMP 浓度筛选

将对数生长期的 ATDC5 细胞按每孔 2.5×10^5 个接种在 96 孔板中,培养 12 h 后分为 6 组,每组 3 孔。除正常组外,其余 5 组均按照 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ;在此基础上,除 IL-1 β 组外,IL-1 β + $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组分别按照 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP。培养 24 h 后,各组均加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后在 450 nm 波长处测定吸光度,计算细胞存活率,细胞存活率 = (实验组吸光度/正常组吸光度) $\times 100\%$ 。根据结果确定后续实验的 TMP 浓度。

2.3 软骨细胞增殖情况检测

将对数生长期的 ATDC5 细胞按每孔 2.5×10^4 个接种到 96 孔板中,培养 12 h 后分为 4 组,每组 3 孔。对照组不进行干预,其余 3 组均按照 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ;在此基础上,除模型组外,TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组分别按照 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP。培养 24 h 后加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后在 450 nm 波长处测定吸光度,计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率 = $[(1 - \text{实验组吸光度}) / \text{对照组吸光度}] \times 100\%$ 。

2.4 软骨细胞凋亡情况检测

细胞分组及干预同 2.3。从各组收集细胞,冰上裂解 30 min, $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 12 mm)。吸取上清液,使用 BCA 法检测细胞裂解液蛋白浓度,采用 Western Blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白含量,以 ImageJ 软件测定的条带灰度值表示目标蛋白含量,计算 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值。

2.5 软骨细胞中炎症因子含量检测

细胞分组及干预同 2.3。从各组收集细胞培养液,在 4°C 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 10 cm)。吸取上清液,使用 ELISA 技术检测 IL-6 和 TNF- α 含量。

2.6 软骨细胞中氧化应激指标含量检测

细胞分组及干预同 2.3。从各组收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,以 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 12 mm)。吸取上清液,以硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量、以黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 含量、以比色法测定 GSH 含量。

2.7 软骨细胞中 Nrf2 信号通路相关蛋白含量检测

细胞分组及干预同 2.3。从各组收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,以 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 12 mm)。吸取上清液,使用 BCA 法检测细胞裂解液蛋白浓度,采用 Western Blot 法检测 Keap1、Nrf2、HO-1、SOD2 蛋白含量。使用 ImageJ 软件测定条带灰度值,目标蛋白含量采用目标蛋白灰度值和 β -actin 灰度值之比表示。

2.8 Nrf2 抑制剂干预后软骨细胞中 Nrf2 下游蛋白含量检测

将对数生长期的 ATDC5 细胞按每孔 2.5×10^5 个接种在 6 孔板上,培养 12 h 后分为 4 组,每组 3 孔。空白组正常培养;诱导组按照 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ;

TMP 组按照 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ,并按照 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP;Nrf2 抑制剂组先按照 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 IL-1 β ,再按照 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 ML385,30 min 后再按照 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 TMP。24 h 后收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,以 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 12 mm)。吸取上清液,使用 BCA 法检测细胞裂解液蛋白浓度。采用 Western Blot 法检测 HO-1 和 SOD2 蛋白含量,使用 ImageJ 软件测定条带灰度值,目标蛋白含量采用目标蛋白灰度值和 β -actin 灰度值之比表示。

2.9 数据统计

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析。各组软骨细胞存活率、增殖抑制率、Bax/Bcl-2 蛋白含量比值、炎症因子含量、氧化应激指标含量、Nrf2 信号通路相关蛋白含量及 Nrf2 下游蛋白含量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。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 TMP 浓度筛选结果

6 组细胞存活率总体比较,差异有统计学意义 $[(100.00 \pm 0.00)\%, (49.76 \pm 7.74)\%, (65.13 \pm 7.06)\%, (78.89 \pm 4.57)\%, (78.26 \pm 5.95)\%, (79.15 \pm 6.23)\%, F = 27.872, P = 0.027]$ 。IL-1 β 组的细胞存活率低于正常组 ($P = 0.021$),IL-1 β + $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组的细胞存活率均高于 IL-1 β 组 ($P = 0.036, P = 0.025, P = 0.042, P = 0.013$),IL-1 β + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组的细胞存活率高于 IL-1 β + $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组 ($P = 0.015$),IL-1 β + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组、IL-1 β + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMP 组细胞存活率的组间差异均无统计学意义。故确定后续实验中 TMP 的浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 软骨细胞增殖情况检测结果

4 组细胞增殖抑制率总体比较,差异有统计学意义 $[(0.00 \pm 0.00)\%, (60.12 \pm 2.01)\%, (40.34 \pm 1.12)\%, (25.68 \pm 1.89)\%, F = 421.739, P = 0.000]$ 。模型组的细胞增殖抑制率高于对照组 ($P = 0.043$),TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的细胞增殖抑制率均低于模型组 ($P = 0.030, P = 0.033$),TMP 低剂量组的细胞增殖抑制率高于 TMP 高剂量组 ($P = 0.049$)。

3.3 软骨细胞凋亡情况检测结果

4 组细胞 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值总体比较,差异有统计学意义($1.04 \pm 0.19, 2.18 \pm 0.08, 0.93 \pm 0.05, 0.60 \pm 0.02, F = 8.739, P = 0.019$)。模型组的 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值高于对照组、TMP 低剂量组及 TMP 高剂量组 ($P = 0.000, P = 0.005, P = 0.000$), TMP 高剂量组的 Bax/Bcl-2 蛋白含量比值低于 TMP 低剂量组 ($P = 0.003$)。

3.4 软骨细胞中炎症因子含量检测结果

模型组的 IL-6 和 TNF- α 含量均高于对照组、TMP 低剂量组及 TMP 高剂量组 (IL-6: $P = 0.035, P = 0.024, P = 0.049$; TNF- α : $P = 0.017, P = 0.039, P = 0.032$); TMP 低剂量组的 IL-6 和 TNF- α 含量均高于 TMP 高剂量组 ($P = 0.019, P = 0.028$)。见表 1。

3.5 软骨细胞中氧化应激指标含量检测结果

模型组的 MDA 含量高于对照组 ($P = 0.027$), SOD 和 GSH 含量均低于对照组 ($P = 0.013, P = 0.028$); TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的 MDA 含量均低于模型组 ($P = 0.020, P = 0.040$), SOD 和 GSH 含量均高于模型组 (SOD: $P = 0.048, P = 0.039$; GSH: $P = 0.031, P = 0.022$); TMP 高剂量组的 MDA 含量低于 TMP 低剂量组 ($P = 0.040$), SOD 和 GSH 含量均高于 TMP 低剂量组 ($P = 0.026, P = 0.038$)。见表 2。

3.6 软骨细胞中 Nrf2 信号通路相关蛋白含量检测结果

模型组的 Keap1 蛋白含量高于对照组 ($P = 0.000$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均低于对照组 ($P = 0.003, P = 0.004, P = 0.003$); TMP 低剂量组和 TMP 高剂量组的 Keap1 蛋白含量均低于模型组 ($P = 0.002, P = 0.000$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均高于模型组 (Nrf2: $P = 0.002, P = 0.008$; HO-1: $P = 0.000, P = 0.001$; SOD2: $P = 0.002, P = 0.000$); TMP 高剂量组的 Keap1 蛋白含量低于 TMP 低剂量组 ($P = 0.034$), Nrf2、HO-1 及 SOD2 蛋白含量均高于 TMP 低剂量组 ($P = 0.000, P = 0.039, P = 0.029$)。见表 3。

3.7 Nrf2 抑制剂干预后软骨细胞中 Nrf2 下游蛋白含量检测结果

诱导组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均低于空白组 ($P = 0.000, P = 0.001$), TMP 组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均高于诱导组 ($P = 0.023, P = 0.030$), Nrf2 抑制剂组的 HO-1、SOD2 蛋白含量均低于 TMP 组 ($P = 0.040, P = 0.000$)。见表 4。

4 讨论

骨关节炎的发生与多种因素有关,其中氧化应激被认为是导致该病发生、发展的关键因素之一^[14-15]。氧化应激是指机体内氧化与抗氧化作用的失衡状态,可导致大量氧化中间产物积累,进而对机体造成损

表 1 4 组软骨细胞中炎症因子含量检测结果

组别	样本量/孔	IL-6 ²⁾ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	TNF- α ³⁾ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照组	3	79.98 ± 2.38	129.89 ± 3.28
模型组	3	271.28 ± 5.18	456.78 ± 3.90
TMP ¹⁾ 低剂量组	3	158.09 ± 4.97	307.91 ± 5.19
TMP ¹⁾ 高剂量组	3	87.10 ± 5.29	197.37 ± 6.12
F 值		11.539	11.943
P 值		0.028	0.019

注:1) 川芎嗪, 2) 白细胞介素-6, 3) 肿瘤坏死因子- α 。

表 2 4 组软骨细胞中氧化应激指标含量检测结果

组别	样本量/孔	MDA ²⁾ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1})$	SOD ³⁾ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{单位} \cdot \text{L}^{-1})$	GSH ⁴⁾ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照组	3	10.98 ± 2.39	22.23 ± 3.19	39.12 ± 4.34
模型组	3	18.23 ± 3.54	15.48 ± 2.09	24.12 ± 3.27
TMP ¹⁾ 低剂量组	3	15.29 ± 2.45	18.23 ± 1.96	30.64 ± 2.17
TMP ¹⁾ 高剂量组	3	11.87 ± 2.12	21.17 ± 2.76	36.11 ± 3.21
F 值		10.832	12.731	11.256
P 值		0.039	0.012	0.038

注:1) 川芎嗪, 2) 丙二醛, 3) 超氧化物歧化酶, 4) 谷胱甘肽。

表 3 4 组软骨细胞中核转录因子红系 2 相关因子 2 信号通路相关蛋白含量检测结果

组别	样本量/ 孔	Keap1 ²⁾ 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)	Nrf2 ³⁾ 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)	HO-1 ⁴⁾ 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)	SOD2 ⁵⁾ 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	3	1.09 ± 0.12	1.12 ± 0.16	1.13 ± 0.08	1.20 ± 0.09
模型组	3	1.50 ± 0.20	0.49 ± 0.07	0.55 ± 0.05	0.51 ± 0.08
TMP ¹⁾ 低剂量组	3	0.93 ± 0.10	0.72 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.75 ± 0.06
TMP ¹⁾ 高剂量组	3	0.63 ± 0.02	0.95 ± 0.04	1.01 ± 0.03	0.96 ± 0.05
<i>F</i> 值		8.641	9.852	7.964	8.842
<i>P</i> 值		0.002	0.001	0.000	0.003

注:1)川芎嗪,2)Kelch 样 ECH 相关蛋白 1,3)核转录因子红系 2 相关因子 2,4)血红素加氧酶-1,5)超氧化物歧化酶 2。

表 4 4 组软骨细胞中核转录因子红系 2 相关因子 2 下游蛋白含量检测结果

组别	样本量/孔	HO-1 ³⁾ 蛋白含量($\bar{x} \pm s$)	SOD2 ⁴⁾ 蛋白含量($\bar{x} \pm s$)
空白组	3	1.23 ± 0.07	1.15 ± 0.03
诱导组	3	0.49 ± 0.03	0.50 ± 0.05
TMP ¹⁾ 组	3	0.85 ± 0.08	0.95 ± 0.03
Nrf2 ²⁾ 抑制剂组	3	0.58 ± 0.01	0.51 ± 0.02
<i>F</i> 值		10.527	9.904
<i>P</i> 值		0.010	0.000

注:1)川芎嗪,2)核转录因子红系 2 相关因子 2,3)血红素加氧酶-1,4)超氧化物歧化酶 2。

伤^[16]。研究表明,氧化应激与细胞凋亡之间存在密切联系。过度的氧化应激会改变线粒体内外膜的电势差,从而导致线粒体中的 Ca^{2+} 信号传导受阻,引发线粒体依赖的细胞凋亡^[17]。氧化应激可导致关节软骨细胞凋亡、基质金属蛋白酶活性增强及细胞外基质降解,从而加速关节软骨退变^[16]。此外,氧化应激产生的自由基分子会降低骨细胞活性,抑制骨细胞成熟和增殖,进而导致骨缺血、缺氧等问题,加速骨关节炎的发生和发展。氧化应激在骨关节炎发病过程中的关键作用,使抗氧化干预成为治疗骨关节炎的新思路^[18]。然而,目前关于氧化应激与骨关节炎关系的研究仍处于探索阶段,我们需要进一步深入探讨其具体的作用机制和最佳的干预策略。通过更深入地理解氧化应激在骨关节炎中的作用,为该病的治疗提供更加有效的方法和策略。

本研究发现,经 IL-1 β 干预后,软骨细胞增殖活性降低,促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 的比值升高,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 含量升高,氧化应激指标 SOD 和 GSH 含量降低、MDA 含量升高,而 TMP 能改善上述问题,而且其作用效果呈现剂量依耐性。这可能是由于 TMP 的抗氧化和抗炎特性有助于减轻骨关节炎进程中的氧化应激和炎症反应。

Nrf2 是一种氧化还原敏感转录因子,可调节抗氧化反应元件基因转录及抗氧化酶(如 HO-1、SOD2)表达,在机体抗氧化反应中起关键作用^[19]。在生理状态下,Keap1 与 Nrf2 结合,促进 Nrf2 泛素化和降解。

在受到氧化应激刺激时,Keap1-E3 泛素连接酶构象发生变化,干扰 Nrf2 泛素化,Nrf2 移位至细胞核,结合到靶基因的抗氧化反应元件上,诱导抗氧化蛋白表达^[20]。本研究发现,TMP 能改善 IL-1 β 干预引起的 Keap1 蛋白含量升高,Nrf2 及下游蛋白 HO-1、SOD2 蛋白含量降低;经 Nrf2 抑制剂 ML385 干预后,Nrf2 下游蛋白 HO-1 和 SOD2 蛋白含量降低。这提示 TMP 可能通过激活 Nrf2 信号通路,增强软骨细胞的抗氧化能力,发挥治疗骨关节炎的作用。

本研究的结果提示,TMP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激具有保护作用,其作用机制可能与激活 Nrf2 信号通路,增强软骨细胞抗氧化能力有关。尽管本研究初步探讨了 TMP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡和氧化应激的影响及作用机制,但仍需进一步的研究来深入探究其确切的作用机制。如通过基因敲除或 RNA 干扰技术特异性阻断 Nrf2 表达,以验证 Nrf2 在 TMP 治疗骨关节炎中的作用。此外,本研究为体外试验,未来还需通过动物实验和临床试验来进一步明确 TMP 对骨关节炎的治疗效果和安全性。

参考文献

- [1] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(2): 293–311.
- [2] CHO Y, JEONG S, KIM H, et al. Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: current status and future directions[J]. EXP MOL MED, 2021, 53(11): 1689–1696.

- [3] ECCLESTON A. Cartilage regeneration for osteoarthritis[J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(2) :96.
- [4] ZENG C Y, WANG X F, HUA F Z. HIF-1 α in osteoarthritis: from pathogenesis to therapeutic implications[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 927126.
- [5] MAO L, WU W, WANG M, et al. Targeted treatment for osteoarthritis: drugs and delivery system[J]. Drug Deliv, 2021, 28(1) :1861 – 1876.
- [6] WOLFF D G, CHRISTOPHERSEN C, BROWN S M, et al. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Phys Sportsmed, 2021, 49(4) :381 – 391.
- [7] CHANG M C, CHIANG P F, KUO Y J, et al. Hyaluronan-loaded liposomal dexamethasone-diclofenac nanoparticles for local osteoarthritis treatment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2) :665.
- [8] HU P Y, YUE P F, ZHENG Q, et al. Pharmacokinetic comparative study of gastrodin after oral administration of gastrodia elata Bl. extract and its compatibility with the different ingredients of ligusticum chuanxiong Hort. to rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 191: 82 – 86.
- [9] ZHANG K, FANG K L, WANG T, et al. Chemical constituents from the rhizome of ligusticum chuanxiong hort. and their Nrf2 inducing activity[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(11) :e2100302.
- [10] DONKOR P O, CHEN Y, DING L, et al. Locally and traditionally used ligusticum species—a review of their phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194: 530 – 548.
- [11] BAI Y, WEI W, YAO C, et al. Advances in the chemical constituents, pharmacological properties and clinical applications of TCM formula Yupingfeng San[J]. Fitoterapia, 2023, 164: 105385.
- [12] HU S, WANG S, HE J, et al. Tetramethylpyrazine alleviates endoplasmic reticulum stress activated apoptosis and related inflammation in chondrocytes[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(1) :12.
- [13] ZHANG X, SHI Y, ZHANG Z, et al. Intra-articular delivery of tetramethylpyrazine microspheres with enhanced articular cavity retention for treating osteoarthritis[J]. Asian J Pharm Sci, 2018, 13(3) :229 – 238.
- [14] HUANG Y F, WANG G, DING L, et al. Lactate-upregulated NADPH-dependent NOX4 expression via HCAR1/PI3K pathway contributes to ROS-induced osteoarthritis chondrocyte damage[J]. Redox Biol, 2023, 67: 102867.
- [15] DING D F, XUE Y, WU X C, et al. Recent Advances in reactive oxygen species (ROS)-responsive polyfunctional nanosystems 3.0 for the treatment of osteoarthritis[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 5009 – 5026.
- [16] PARK W H. Effects of antioxidants and MAPK inhibitors on cell death and reactive oxygen species levels in H(2)O(2)-treated human pulmonary fibroblasts[J]. Oncol Lett, 2013, 5(5) :1633 – 1638.
- [17] WU Y, JIA C, LIU W, et al. Sodium citrate targeting Ca(2+)/CAMKK2 pathway exhibits anti-tumor activity through inducing apoptosis and ferroptosis in ovarian cancer[J]. J Adv Res, 2024, 65: 89 – 104.
- [18] ARRA M, SWARNKAR G, KE K, et al. LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1) :3427.
- [19] ISHII T, ITOH K, TAKAHASHI S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages[J]. J Biol Chem, 2000, 275(21) :16023 – 16029.
- [20] DONG Y, KANG H, PENG R, et al. A clinical-stage Nrf2 activator suppresses osteoclast differentiation via the iron-ornithine axis[J]. Cell Metab, 2024, 36(8) :1679 – 1695.

(收稿日期: 2024-05-14 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 20 页)

- [22] WANG X, ZHOU L. The many roles of macrophages in skeletal muscle injury and repair[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 952249.
- [23] MURRAY P J. Macrophage polarization[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 541 – 566.
- [24] 周琦, 孙慧娟, 于栋华, 等. 巨噬细胞 M1/M2 型极化在不同疾病中的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11) :1502 – 1506.
- [25] 王馨慧, 王苏童, 吕穆杰, 等. 黄芪桂枝五物汤调节 M1/M2 巨噬细胞改善炎症反应的分子机制研究[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6) :801 – 810.
- [26] LUO Z, LIN J, SUN Y, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes promote muscle healing following contusion through macrophage polarization[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(3) :135 – 148.
- [27] LI J, SUN Z, LUO G, et al. Quercetin attenuates trauma-induced heterotopic ossification by tuning immune cell infiltration and related inflammatory insult[J]. Front Immunol, 2021, 12: 649285.
- [28] SHEN X, SUN C, CHENG Y, et al. cGAS mediates inflammation by polarizing macrophages to M1 phenotype via the mTORC1 pathway[J]. J Immunol, 2023, 210(8) :1098 – 1107.

(收稿日期: 2024-02-23 本文编辑: 郭毅曼)