

独活寄生汤含药血清对兔退变软骨细胞 “caveolin-p38MAPK”信号通路调控作用的影响

林飞太¹, 林煜¹, 张怡元¹, 夏春², 张兵³, 肖莉莉¹, 冯尔宥¹, 王武炼¹

【摘要】目的:观察独活寄生汤含药血清对兔退变软骨细胞“caveolin-p38MAPK”信号通路的调控作用,探讨独活寄生汤治疗骨关节炎的作用机制。方法:将20只3月龄新西兰兔随机分为生理盐水组(空白血清组)和独活寄生汤组(含药血清组),每组10只。分别在24 h、36 h、48 h不同采血时间点采集独活寄生汤含药血清和空白血清,将5%、10%、15%、20%不同浓度两种血清作用于体外培养第2代软骨细胞,确定含药血清最佳干预条件;建立体外退变软骨细胞模型,分别给予独活寄生汤含药血清(含药血清组)和空白血清(空白血清组)干预36 h,收集软骨细胞,运用Western Blot法检测血清干预后退变软骨细胞caveolin-1、p38、p-p38蛋白表达,RT-PCR法检测血清干预后退变软骨细胞白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、基质金属蛋白酶(MMP)-3、MMP-13、caveolin-1 mRNA表达。结果:浓度为15%的36 h采血时间点含药血清的促增殖作用最明显;退变软骨细胞中存在“caveolin-p38MAPK”信号通路的激活,独活寄生汤含药血清可抑制caveolin-1、p-p38蛋白表达及IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、caveolin-1 mRNA的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:独活寄生汤能通过抑制“caveolin-p38MAPK”信号通路的激活及其下游效应分子,从而有效抑制软骨细胞凋亡。

【关键词】 骨关节炎;独活寄生汤;软骨细胞;细胞凋亡;信号通路

doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2015.04.001

Effects of Serum Medicated with Duhuo Jisheng Decoction on the Induced Degeneration of Articular Chondrocytes in Vitro Culture Based upon “caveolin-p38MAPK” Signal Pathway

LIN Fei-tai, LIN Yu, ZHANG Yi-yuan, XIA Chun, ZHANG Bing, XIAO Li-li, FENG Er-you, WANG Wu-lian

【ABSTRACT】 Objective: To observe the effects of serum medicated with Duhuo Jisheng Decoction on the induced degeneration of articular chondrocytes in vitro culture based upon “caveolin-p38MAPK” signal pathway and probe the mechanism of Duhuo Jisheng Decoction in the treatment of osteoarthritis. **Methods:** 20 March old New Zealand rabbits were randomly divided into normal saline group (blank serum group) and Duhuo Jisheng Decoction group (drug containing serum group), 10 rats in each group. The second generation of cartilage cells was cultured in vitro using different time points of sample collection such as 24 h, 36 h and 48 h, serums medicated with 5%, 10%, 15% and 20% concentrations of Duhuo Jisheng Decoction and blank serums. The best intervention time of medicated serum was determined, which was then used to deal with the degenerating chondrocytes. The degenerated cartilage cell models in vitro were established, which were intervened by the serum medicated with Duhuo Jisheng Decoction (drug containing serum group) and the blank serum (blank serum

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302986);福建省卫生厅青年科研课题资助计划项目(2012-2-69);福建省自然科学基金(2013J01389);福州市卫生系统科技计划(2013-S-wq6)
作者单位:1.厦门大学附属福州第二医院,福建 福州 350007;2.厦门大学附属中山医院,福建 厦门 361004;3.厦门大学医学院,福建 厦门 361005

group) after 36 h, collecting chondrocytes. The Western Blot method was used to detect the expression of degenerated cartilage cells caveolin-1 and p-p38 protein after serum intervention. The RT-PCR method was used

to detect the expression of degenerated cartilage cells IL-1 β ,TNF- α ,MMP-3,MMP-13 and caveolin-1 mRNA after serum intervention.**Results:**The concentration of 15% and 36 h sampling time point serum on the proliferation;the activation of "caveolin-p38MAPK" signaling pathway in the degeneration of cartilage cell,Duhuo Jisheng decoction containing serum can inhibit the expression of caveolin-1,p-p38 protein expression and IL-1 β ,TNF- α ,MMP-3,MMP-13,caveolin-1,mRNA,the difference was statistically significant ($P < 0.05$).**Conclusion:**Duhuo Jisheng decoction can inhibit the "caveolin-p38MAPK" signal pathway and its downstream effector molecules, which can effectively inhibit the apoptosis of cartilage cells.

【Keywords】 osteoarthritis;Duhuo Jisheng Decoction;chondrocyte;apoptosis;signal pathway

骨关节炎 (osteoarthritis,OA) 是一种进展性的累及全身多关节的高发性疾病,是机械性和生物性因素的共同作用,使关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨合成与降解失去平衡的结果,细胞凋亡是软骨退变的关键因素之一^[1]。独活寄生汤能有效改善 OA 的临床症状,但其确切作用机制尚未完全明了。本实验通过独活寄生汤含药血清对兔退变软骨细胞“caveolin-p38MAPK”信号通路的调控研究,探讨独活寄生汤干预软骨细胞凋亡的作用途径,为揭示其治疗 OA 的作用机制及药效物质基础提供新的研究思路。

1 实验材料

1.1 实验动物 普通级 3 月龄新西兰兔 (体质量约 1.7 ~ 2.2 kg) 20 只,雌雄各半,用于制备血清;4 周龄普通级新西兰兔 6 只,用于建立体外培养软骨细胞的取材 (上海市松江区松联实验动物场)。福建中医药大学实验动物中心提供清洁级医学实验动物环境设施,动物许可证号:SYXK (闽) 2009-0001。

1.2 药物 独活寄生汤由独活、桑寄生、牛膝、杜仲、秦艽、防风、肉桂、细辛、川芎、当归、芍药、干地黄、人参、茯苓、甘草组成,由本院药剂科提供。

1.3 试剂 DMEM/F12 培养基 (Hyclone 公司);胎牛血清 (Gibico 公司);双抗混合液 (100 U · mL⁻¹ 青霉素、100 μ g · mL⁻¹ 链霉素),胰酶、I 型胶原酶 (Sigma 公司);TRIZOL 试剂 (Invitrogen 公司);逆转录试剂盒 (Fermentas 公司);引物合成 (上海生工生物工程公司);Anti-p-p38 α (Thr180/Tyr182) 一抗 (Millipore 公司);p38 一抗 (Millipore 公司);caveolin 1 一抗 (BD biosci-

ence 公司)。

2 方法

2.1 独活寄生汤含药血清的制备 将 20 只普通级 3 月龄新西兰兔随机分为独活寄生汤组 (含药血清组) 和生理盐水对照组 (空白血清组),每组 10 只。根据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比率表换算^[2],含药血清组给予独活寄生汤 3.3 g · kg⁻¹ · d⁻¹,空白血清组给予质量分数 0.9% 生理盐水灌胃;两组均连续灌胃 5 d,上午、下午各给药 1 次,于末次灌胃后 3 h 腹主动脉采血,静置于 4 °C 冰箱 4 h 后 2500 r · min⁻¹ 离心 25 min,分离血清,同组血清混合,于 56 °C 水浴灭活 30 min,0.22 μ m 滤器过滤,分装,-20 °C 保存备用。

2.2 退变软骨细胞模型的建立及含药血清干预软骨细胞最佳量效、时效关系的确定 采用酶消化法从 4 周龄普通级新西兰兔的膝关节软骨中分离得到软骨细胞,进行细胞培养至第 2 代软骨细胞;再予 10 ng · mL⁻¹ 白细胞介素 (IL) -1 β 诱导获得退变软骨细胞^[3];诱导退变干预 24 h 后弃培养液,换用如下 6 种培养体系进行干预。

细胞分为 6 组,正常组用 20% 空白血清加入正常软骨细胞共培养。模型组用 20% 空白血清加入退变软骨细胞共培养。含药血清组用 5%、10%、15%、20% (体积百分比) 含药血清干预退变软骨细胞。每组每个时间段设 6 个复孔,做好标记及记录,分别于培养 24 h、36 h、48 h 后取 1 板运用 MTT 法检测干预后软骨细胞的活性,确定干预软骨细胞的最佳量效与时效关系。

2.3 Western Blot 法检测软骨细胞 caveolin-1、p-p38 蛋白表达 将第 2 代软骨细胞按抽签法随机分为正常组、模型组、含药血清组,见表 1。

表1 血清干预方法

组别	培养液类型	干预时间
正常组	15% 兔空白血清	36 h
模型组	15% 兔空白血清	36 h
含药血清组	15% 兔含药血清	36 h

血清干预结束后，退变软骨细胞中总蛋白的提取，BCA 法测定蛋白含量，Western Blot 法检测蛋白表达，按每个样品总蛋白 40 μg 加样，电泳，转膜，5% 牛奶室温封闭 1 h，加入一抗：caveolin-1 1 1000；Anti-p-p38α (Thr180/Tyr182) 1 6000；p38 11000。4 过夜，TBST 洗膜 4 次，结合二抗 anti-rabbit (1 10 000)，anti-rat (1 10 000)，室温孵育 1 h 后，洗膜 6 次后 ECL 化学发光检测。

2.4 RT-PCR 法检测软骨细胞 IL-1β、肿瘤坏死因子 (TNF) -α、基质金属蛋白酶 (MMP) -3、MMP-13、caveolin-1 mRNA 表达 实验分组及干预方法同 2.3，血清干预软骨细胞结束后，弃掉培养液，用 PBS 轻轻漂洗后，加 1 mL Trizol 进行裂解，提取总 RNA，逆转录反应合成 cDNA，进行目的基因的扩增。PCR 扩增反应液共 20 μL，含 Dream Taq Green PCR Master Mix (2 ×) 10 μL、模板 DNA、上下游引物各 1 μL，灭菌蒸馏水 7 μL，在 PCR 扩增仪上扩增。扩增参数 94 预变性 3 min，94 变性 30 s，52 退火 30 s，72 延伸 45 s，35 次循环后 72 延伸 10 min。将 PCR 产物一起进行琼脂糖凝胶电泳、拍照、结果分析。目的基因引物序列见表 2。

2.5 统计学方法 研究中软骨细胞的培养、干预及指标的检测均经独立重复实验 3 次，采用 SPSS

13.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨细胞的形态及鉴定 分离培养的软骨细胞外观呈多角形，胞质丰富，胞核清楚，核为圆形或椭圆形，位于胞体中心，核仁为 1 ~ 2 个，细胞折光性好，且呈集落生长，甲苯胺蓝染色使正常软骨细胞胞浆呈蓝色，可见 1 ~ 2 个核仁，呈蓝紫色，见图 1 (1)；OA 软骨细胞相对于正常软骨细胞，细胞变狭长，胞浆染色稍浅，胞浆内可见空泡，一部分细胞形态不规则，见图 1 (2)；正常软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色呈阳性反应，细胞胞浆内有黄色颗粒，胞核基本无着色，见图 1 (3)；OA 软骨细胞相对于正常软骨细胞，胞浆颗粒颜色变浅，见图 1 (4)。

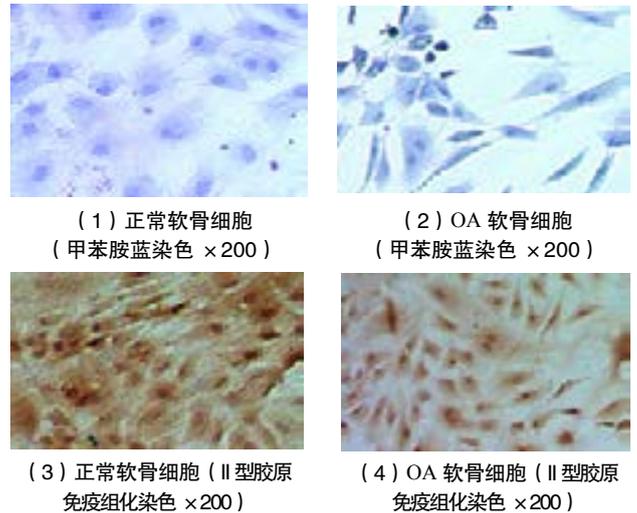


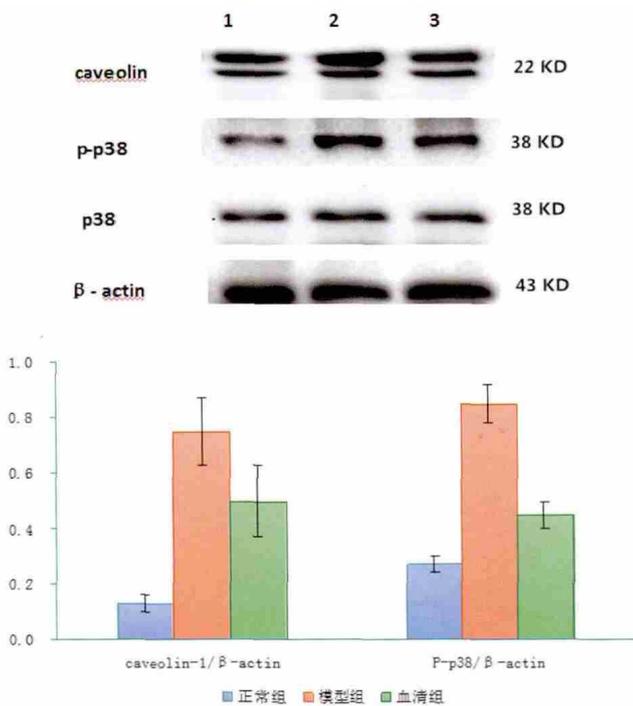
图1 新西兰兔正常和 OA 软骨细胞分离培养组织细胞学光镜切片

表2 目的基因引物序列

基因名称	上游引物 (5' 3')	下游引物 (5' 3')	产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
IL-1β	CTGTCCTGCGTGATGAAAGA	CAGTGGGGTGTCAACAATCTG	344	58.0
TNF-α	CTCCTACCCGAACAAGGTCA	TGAGTCCTGGAAGCCTCAGT	446	60.0
MMP-3	GCCAAGAGATGCTGTTGATG	AGGTCTGTGAAGCGTTGTA	363	56.0
MMP-13	TTCGCTTAGAGGTGACAGG	ACTCTTGCCGGTGTAGGTGT	527	56.0
caveolin-1	CAAATGCCACTTTGCTCAGA	ACAAAGCCATTTCCAAGTG	462	58.0
GAPDH	TTCAACAGTGCCACCCACTCTCTA	TGGAAACTGTGAAGAGGGGCAGATT	278	60.0

3.2 含药血清的最佳干预时间及最佳浓度 经 MTT 法检测, 结果显示, 在不同时间点, 模型组关节软骨细胞的 OD 值均降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 IL-1 β 诱导退变的软骨细胞出现增殖减缓。其中, 10%、15%、20% 浓度的含药血清, 均能促进软骨细胞增殖, 随着干预时间的延长, 促增殖作用越明显, 具有时间依赖性, 其中以 15% 浓度的含药血清, 干预 36 h, 促增殖作用最明显, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 故选择以 15% 含药血清, 36 h 作为后续实验的最佳含药血清干预浓度和干预时间。

3.3 软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 蛋白的检测 Western Blot 检测细胞中 caveolin-1、p-p38 蛋白的表达情况, 各组均可见 caveolin-1、p-p38 蛋白的表达, 其中 p-p38 在正常软骨细胞中仅为微弱表达, 模型组软骨细胞 caveolin-1、p-p38 蛋白的表达可见明显增强 ($P < 0.05$), 而含药血清能降低 caveolin-1、p-p38 的表达, 但仍高于正常组 ($P < 0.05$), 见图 2。

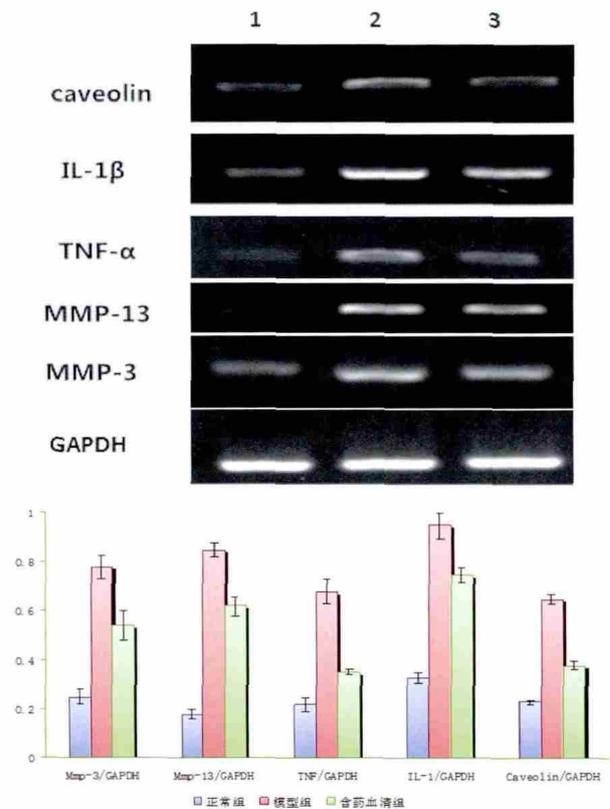


注 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 含药血清组

图 2 各组细胞 caveolin-1、p-p38 蛋白的表达

3.4 独活寄生汤含药血清对 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、caveolin-1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测各组软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、caveolin-1 mRNA 的表达, 各组均可见相关基因的

特异性条带。各目的基因的表达, 在模型组均见明显的增强 ($P < 0.05$), 而含药血清能明显降低这一趋势 ($P < 0.05$)。见图 3。



注 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 含药血清组

图 3 各组细胞 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、caveolin-1 mRNA 的表达

4 讨论

OA 属中医学“痹证”范畴, 主要由于患者机体正气不足, 气血亏虚, 风寒湿侵袭关节, 血运不畅, 气血津液运行障碍造成。独活寄生汤有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血之功, 能够延缓 OA 软骨的退变。既往研究已经发现, 独活寄生汤可以抑制软骨细胞的线粒体凋亡通路^[4-5], 而 caveolin-p38MAPK 信号通路与细胞的生长凋亡密切相关^[6], 通过揭示独活寄生汤多靶点、多层次、多环节的整体调节方式, 会更好针对 OA 的复杂病理。

Caveolae 首先由日本学者 Yamada 在 1955 年使用电子显微镜观察小鼠胆囊上皮细胞质膜时发现, 随着研究的深入, 人们逐渐认识到 Caveolae 不仅与细胞的物质分子和离子转运有关, 还在细胞凋亡中发挥重要的调控作用^[7-8], caveolin-1 对软骨细胞内 p38MAPK 信号转导途径的激活具有重要作用, 是 p38MAPK 上游的关键信号分子^[9], 其

高表达能诱导 p38MAPK 信号通路的激活并且引起软骨细胞合成 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的能力减弱,从而促进软骨细胞的凋亡。p38MAPK 最早在研究细胞外高渗环境对酵母菌的影响时发现的,是细胞外信号引起细胞核内反应的重要通道,能被细胞外环境的改变、促炎因子等多种细胞外刺激所激活,参与细胞的生长、分化、退变、衰老及凋亡等多种生理病理过程。p38MAPK 通路未被激活时,p38 主要分布于胞浆,其激活需要苏氨酸 (Threonine, Thr¹⁸⁰) 和酪氨酸 (Tyrosine, Tyr¹⁸²) 双位点的磷酸化,激活后的 p-p38 能转移入胞核中,磷酸化转录因子,调控特定基因的表达。

在关节软骨中有很多因素可以激活 p38,如各种细胞因子、滑液中的炎症因子、机械应力,甚至是 X 线,而在关节炎发生发展中,力学因素和关节内环境均会发生改变,所以 p38MAPK 信号通路在关节炎中容易被激活。研究表明,p38MAPK 信号通路是关节软骨细胞凋亡的上游信号通路之一,一氧化氮、IL-1 β 均可以通过激活 p38 诱导软骨细胞的凋亡,阻断 p38MAPK 信号通路可以明显阻断 OA 软骨细胞的凋亡。因而 p38MAPK 信号通路在关节软骨的破坏中可能处于一个枢纽地位,它与软骨细胞表型的保持和分化、软骨细胞凋亡、软骨基质金属蛋白酶的合成及软骨促炎性细胞因子的产生等有密切关系。本实验研究发现,独活寄生汤能下调 caveolin-1、p-p38 表达,从而抑制 p38MAPK 凋亡通路的激活,并进一步抑制下游效应指标 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 的表达。IL-1 β 、TNF- α 是重要的分解型细胞因子,其过表达将导致细胞因子合成与分解途径的失衡,造成 OA 关节软骨毁损,而 MMPs 是一系列以降解细胞外基质成分为主要功能的蛋白酶,可引起软骨基质的破坏进而导致关节结构与功能的紊乱,IL-1 β 、TNF- α 、MMPs 均是 p38MAPK 凋亡通路下游的重要效应分子^[11-12],因而独活寄生汤能有效抑制软骨细胞凋亡,本结果为利用独活寄生汤治疗 OA 提供了较好的理论依据。

5 参考文献

- [1] Roland W, Moskowitz RD, Altman MC, et al. 骨关节炎诊断与治疗 [M]. 4 版. 谢利民, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 3-9.
- [2] 吴秉纯. 医学动物实验基础及基本技术方法 [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2008: 184.
- [3] 任志伟, 俞永林, 杨丰建, 等. IL-1 β 对兔关节软骨细胞 MMP-1/-13 mRNA 表达和 NO 的影响 [J]. 复旦学报: 医学版, 2008, 35 (2): 167-170.
- [4] 吴广文, 王武炼, 潘彩彬, 等. 独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞线粒体凋亡通路的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3 (10): 5-9.
- [5] 潘彩彬, 王武炼, 吴广文, 等. 独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3 (12): 30-33.
- [6] Fernández-Hernando C, Yu J, Dávalos A, et al. Endothelial-specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Am J Pathol, 2010, 177 (2): 998-1003.
- [7] Lü XJ, Li YY, Zhang YJ, et al. Over-expression of caveolin-1 aggravate LPS-induced inflammatory response in AT-1 cells via up-regulation of cPLA2/p38 MAPK [J]. Inflamm Res, 2010, 59 (7): 531-541.
- [8] Head BP, Peart JN, Panneerselvam M, et al. Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging [J]. PLoS One, 2010, 5 (12): e15697.
- [9] Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, et al. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54 (3): 818-831.
- [10] Kühn K, Shikhman AR, Lotz M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP Kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis [J]. J Cell Physiol, 2003, 197 (3): 379-387.
- [11] Kunisch E, Gandesiri M, Fuhrmann R, et al. Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF alpha in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66 (8): 1043-1051.
- [12] Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, et al. Dynamic compression counteracts IL-1beta induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10 (2): R35.

收稿日期: 2015-02-05; 修回日期: 2015-03-27