

丹参酮 II A 对软骨细胞 II 型胶原及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

宋奕¹ 朱寅^{1△} 丁道芳^{2,3}

[摘要] 目的:探讨不同浓度丹参酮 II A 对软骨细胞 II 型胶原及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。方法:提取新生 SD 大鼠原代软骨细胞,并通过 II 型胶原蛋白免疫荧光进行鉴定,取 P1 代细胞进行实验,共设 5 组,其中 1 组设为空白对照组,另外 4 组分别用 6.25 μ mol/L,12.5 μ mol/L,25 μ mol/L 及 50 μ mol/L 浓度丹参酮 II A 对其进行干预,24 h 后通过蛋白印迹分析法(Western Blot)检测软骨细胞 II 型胶原及 β -catenin 蛋白的表达情况。结果:随着丹参酮 II A 浓度的增加,II 型胶原蛋白表达增加,12.5 μ mol/L,25 μ mol/L 及 50 μ mol/L 丹参酮 II A 组 II 型胶原蛋白量均较对照组增高($P<0.05$),且 II 型胶原蛋白量与丹参酮 II A 浓度呈正相关($r=0.949, P<0.001$),各丹参酮 II A 组 β -catenin 蛋白量均较对照组降低($P<0.05$),且 β -catenin 蛋白量与丹参酮 II A 浓度呈负相关($r=-0.949, P<0.001$)。结论:丹参酮 II A 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进软骨细胞 II 型胶原表达,延缓软骨细胞退变。

[关键词] 丹参酮 II A;软骨细胞;II 型胶原;Wnt/ β -catenin 信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)09-0001-04

Effect of Tanshinone II A on Collagen II and Wnt/ β -catenin Signal Pathway of Rat Chondrocytes

SONG Yi¹ ZHU Yin^{1△} DING Daofang^{2,3}

¹Suzhou Hospital of Integrated Chinese and Western, Suzhou 215000, Jiangsu China;

²Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China;

³Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203.

Abstract Objective: To investigate the effect of Tanshinone II A (TAN II A) on collagen II and Wnt/ β -catenin signal pathway of rat chondrocytes in vitro. **Methods:** SD rat articular chondrocytes were isolated, and immunofluorescence was performed to identify the cells. A total of 5 groups were set up, 1 of which was a blank control group, and the other 4 groups were treated with different concentrations of TAN II A (6.25 μ mol/L, 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L and 50 μ mol/L). The expression of β -catenin and collagen II were examined by Western-Blot after 24 h. **Results:** The groups of 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L, 50 μ mol/L concentration of TAN II A expressed higher collagen II than the control group ($P<0.05$). The expression of collagen II was increased as the concentration of TAN II A had a rising trend ($r=0.949, P<0.001$). All the groups treated with TAN II A expressed lower β -catenin than the control group ($P<0.05$). The expression of β -catenin was decreased as the concentration of TAN II A had a rising trend ($r=-0.949, P<0.001$). **Conclusion:** TAN II A can inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway, promote the expression of type II collagen in chondrocytes, and delay the degeneration of chondrocytes.

Keywords: tanshinone II A; chondrocytes; collagen II; Wnt/ β -catenin signal pathway

基金项目:苏州市科技局指导性项目(SYSD2016051, SYSD2016050)

¹ 苏州市中西医结合医院(江苏 苏州, 215000)

² 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心

³ 上海市中医药研究院骨伤科研究所

△通信作者 E-mail: 395344510@qq.com

骨关节炎又称为退行性关节炎、老年性关节炎,是以关节内无菌性炎症和软骨进行性退变、破坏为主要病理表现的一种疾病。中药丹参是骨关节炎治疗中常用的一味中药,而其具体机理目前尚不明确。国内一些研究者通过体内实验,发现丹参及其有效成分可以降低炎症因子,抑制骨关节炎软骨退变,并促进软骨基

质的合成^[1-4]。丹参酮ⅡA是从丹参中提取出的活性较强、含量较多的一种有效成分,本实验通过体外研究,观察丹参酮ⅡA对大鼠软骨细胞Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ, COL2)及 β -catenin蛋白的影响,从Wnt/ β -catenin信号通路角度探究丹参治疗骨关节炎的机制。

1 材料及方法

1.1 动物

新生SD大鼠购买自上海实验动物资源中心,动物合格证号为SCXK(沪2008-0016)。

1.2 药物及试剂

胎牛血清、H-DMEM培养基、双抗(青链霉素混合液)、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)片剂购买于法国Biowest公司;Ⅱ型胶原酶、Ⅱ型胶原抗体(货号SC-28887)、DAPI染料(货号SC-300415)购自美国Sigma公司; β -catenin抗体(货号9582)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号2118S)、山羊抗兔二抗(货号7074P2)购自美国CST公司;异硫氰酸荧光素(FITC)抗体(货号E031230-01)购自美国EarthOx公司产品;RIPA裂解液、PMSF(苯甲基磺酰氟)购自上海碧云天公司;BCA蛋白定量试剂盒,美国Pierce公司产品;丹参酮ⅡA,中国生物制品检定所产品。

1.3 仪器

CO₂培养箱(英国RS Biotech公司);倒置显微镜、荧光倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);流式细胞仪(美国BECKMAN COULTER公司);SYNERGY2多功能酶标仪(美国基因公司)。

1.4 方法

1.4.1 软骨细胞的培养 新生大鼠颈椎脱臼瞬间死亡法处死,取双侧股骨头处软骨并清除残留组织,收集后剪成1 mm×1 mm×1 mm大小骨块,在37℃细胞培养箱内用0.1%的Ⅱ型胶原酶消化1 h,收集消化后的细胞悬浮液,并重复3~4次,悬浮液离心后收集细胞,细胞培养液重悬并接种细胞,隔日换液。

1.4.2 软骨细胞的免疫荧光鉴定 用4%多聚甲醛固定细胞10 min, PBS缓冲液冲洗2次, PBST通透20~30 min, 5% BSA室温封闭浸泡1 h, 加入Ⅱ型胶原抗体(稀释度为1:200), 4℃孵育过夜, 再用PBS清洗3次, 加入FITC标记的抗小鼠二抗(稀释度1:200), 室温避光孵育1 h, PBST清洗3次后加入DAPI染液(10 μ g/L), 5 min后荧光倒置显微镜下观察细胞并拍照。

1.4.3 Western Blot检测Ⅱ型胶原和 β -catenin蛋白质的表达 软骨细胞常规培养24 h, 共分为5组, 其中1个皿设对照组, 另4个皿依次加入6.25 μ mol/L, 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L及50 μ mol/L浓度丹参酮ⅡA。24 h后裂解细胞, 并等量分装分装蛋白, 混合上样缓冲液, 蛋白高温变性10 min后4℃冷却, -20℃冰箱保存备用。配制体积分数为12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE), 上样电泳, 通过湿转法将蛋白转移至PVDF膜, 10% BSA室温封闭浸泡1 h, 加入Ⅱ型胶原蛋白抗体及 β -catenin抗体孵育过夜, 洗膜后, 再加入二抗继续室温孵育1 h, 再次洗膜, 最后X光胶片曝光显影。

1.5 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS15.0软件进行统计分析, 组间差异采用单因素方差分析中LSD-*t*检验, 相关性分析用Spearman相关系数进行检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的免疫荧光染色

倒置荧光显微镜下观察到细胞质经Ⅱ型胶原免疫荧光染色后发出鲜亮的红色荧光(图1A), 为强阳性表现, 证实为软骨细胞, 细胞核未着色, 表明Ⅱ型胶原蛋白在细胞核内无表达。几乎所有细胞经DAPI染色后细胞核均发出蓝色荧光(图1B)。图1C为图1A和图1B叠加, 几乎所有细胞表达Ⅱ型胶原蛋白, 证明提取的软骨细胞纯度高。

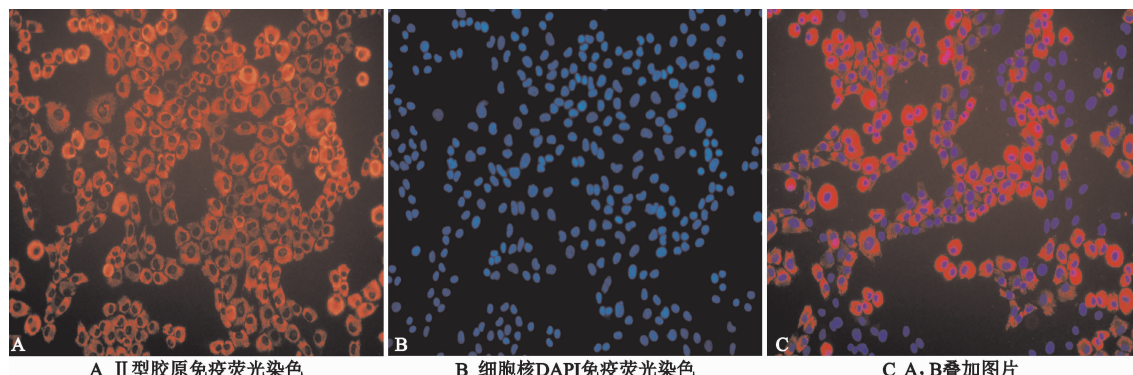


图1 软骨细胞Ⅱ型胶原的免疫荧光染色

2.2 各组细胞Ⅱ型胶原和 β -catenin蛋白质的表达

Western Blot检测结果显示, 加药24 h后, Ⅱ型

胶原蛋白条带随丹参酮ⅡA浓度增加逐渐变宽, 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L及50 μ mol/L浓度丹参酮组

灰度比与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明一定浓度丹参酮ⅡA可以促进Ⅱ型胶原蛋白表达。且通过 spearman 相关性分析,Ⅱ型胶原蛋白浓度与丹参酮ⅡA浓度呈正相关($r = 0.949, P < 0.001$)。 β -catenin 蛋白条带随加药浓度的增加逐渐变窄,且各浓度丹参酮组灰度比与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明丹参酮ⅡA可抑制 β -catenin 蛋白的表达,且 β -catenin 蛋白浓度与丹参酮ⅡA浓度呈负相关($r = -0.949, P < 0.001$),见图2及表1。

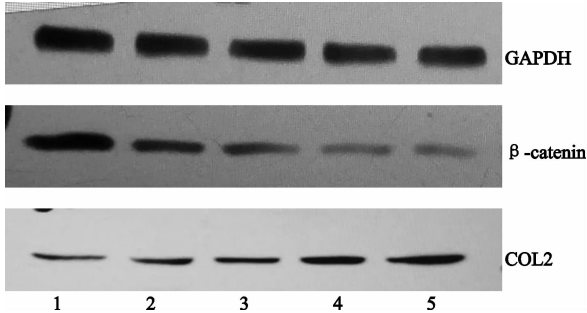


图2 Western Blot 检测 β -catenin 和 COL2 蛋白,1~5 分别代表对照组和 6.25、12.5、25 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的丹参酮ⅡA组

表1 各组 β -catenin 和 COL2 蛋白与 GAPDH 的灰度比($\bar{x} \pm s$)

组别	β -catenin/GAPDH	COL2/GAPDH
空白对照组	0.716 ± 0.055	0.199 ± 0.015
6.25 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮组	$0.400 \pm 0.027^{1)}$	0.226 ± 0.016
12.5 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮组	$0.308 \pm 0.032^{1)}$	$0.241 \pm 0.021^{1)}$
25 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮组	$0.202 \pm 0.043^{1)}$	$0.416 \pm 0.320^{1)}$
50 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮组	$0.187 \pm 0.048^{1)}$	$0.520 \pm 0.131^{1)}$
F	77.237	113.228
P	<0.01	<0.01

注:1)各浓度丹参酮组与对照组相比较,灰度差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨关节炎属于中医“痹证”的范畴,好发人群多为中老年人,为关节筋骨的劳损病变。肝主筋肾主骨,治疗时多从肝肾角度调补,然“痹”者“闭”也,即闭塞不通,不通则痛,故而出现关节疼痛,活动受限,久之甚至导致畸形,严重影响日常生活。血脉通畅,通则不痛,基于此理论,在治疗骨关节炎时除了调补肝肾,还需活血养血^[5]。丹参是临床常用的经典的活血养血中药,所谓“一味丹参,功同四物”,而丹参酮ⅡA是丹参中提取的重要有效成分之一,本试验中丹参酮ⅡA浓度参照相关文献^[6-8],但目前关于丹参酮在体内吸收及代谢的研究多集中于血浆及肝、肾、脑等脏器,尚未见关节滑液中的分布情况,有待进一步药代动力学研究。

Wnt 通路与软骨细胞的代谢关系紧密,不仅影响

软骨细胞的生长、发育,还与软骨细胞的退变、凋亡密切联系,进而影响关节结构与功能^[9]。Wnt/ β -catenin 通路是所有 Wnt 家族中最为经典、研究最为清楚的信号传导通路^[10]。Velasco 等^[11]发现,经典 Wnt 信号通路对关节内软骨的形成及分化具有双向调控作用,既有促进软骨的发生及发展作用,又可促进其退变、凋亡。进行的相关实验研究表明,经典 Wnt 信号通路及软骨细胞对骨关节炎的形成有重要意义。Yuasa 等^[12]发现,在 Wnt/ β -catenin 被激活的兔关节软骨细胞中,MMP3,MMP13 及 ADAMTS-4,ADAMTS-5 等降解酶表达显著增高,另外观察不同年龄豚鼠膝关节内经典 Wnt 通路的表达,在年轻健康的豚鼠膝关节中几乎没有检测到 β -catenin,而在老年膝关节炎的豚鼠中该通路表现的异常活跃,因此认为经典 Wnt 通路在老年性骨关节炎中的病理变化中扮演着相当重要的角色。近年有研究者通过腺病毒转染使滑膜细胞过度表达经典 Wnt 通路中的 Wnt8a,Wnt16a,WISP1 以及非经典 Wnt 通路的 Wnt5a 蛋白,结果 Wnt8a 和 Wnt16a 过表达的滑膜细胞激活了软骨细胞的经典 Wnt 通路,且关节内蛋白酶活性增加,短时间内即出现软骨损伤的病理改变,而非经典 Wnt 通路的 Wnt5a 过表达并没有引起这些变化^[13]。Delgado 等^[14]对骨折及骨关节炎患者的软骨细胞进行体外培养,发现骨折患者软骨细胞中的 β -catenin 蛋白要比骨关节炎患者少,提示骨关节炎患者的软骨受更多的 Wnt 蛋白刺激,进而对软骨细胞的代谢产生影响。王德刚等^[15]将人软骨细胞和 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活的人滑膜细胞进行共培养,观察到滑膜细胞加速了软骨细胞基质的分解,并导致软骨细胞异常代谢。

Ⅱ型胶原是软骨细胞分泌的重要细胞外基质,随着年龄增长,Ⅱ型胶原分泌逐渐减少。本实验将不同浓度的丹参酮ⅡA分别作用于软骨细胞,发现软骨细胞中Ⅱ型胶原蛋白表达增高,且与浓度相关,进一步对 Wnt/ β -catenin 通路的关键蛋白 β -catenin 进行检测,发现其表达明显受到抑制。推测一定浓度的丹参酮ⅡA可以通过下调 β -catenin 信号通路,进而抑制软骨细胞的退变,促进软骨基质Ⅱ型胶原蛋白的表达,保护软骨细胞,但其具体作用此通路的上游靶点尚不清楚,有待继续深入研究。

参考文献

[1] 王善超,孙卫平,王海波,等.复方丹参注射液联合玻璃酸钠关节腔内给药对骨性关节炎患者炎症反应及膝关节功能的影响[J].中国生化药物杂志,2017,37(2):100-102.

[2] 徐西林,张晓峰,吕航,等.丹参注射液对骨性关节炎模型兔膝关节软骨细胞 p-I κ B α 表达影响的实验研究[J].中国中医药科技,2017,24(4):438-440.

[3]

袁长深,梅其杰,段戡,等. 丹参加玻璃酸钠对兔膝关节软骨保护的效应与机制研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10):2452-2453.

[4]

马勇,郭杨,顾一煌,等. 丹参关节腔注射与针刺修复膝关节全层软骨缺损 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7837-7842.

[5]

石印玉,徐荣善,陈友红. 养血软坚方治疗膝骨关节炎的临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1994, 2(4):33-36.

[6]

胡建华. 丹参酮Ⅱ A 磺酸钠诱导乳兔 BMSCs 向软骨细胞分化中的作用及细胞密度对诱导的影响[D]. 南宁:广西医科大学, 2015.

[7]

缪明星,黄莉莉,王欣. 丹参酮Ⅱ A 在 Beagle 犬体内的血药浓度测定及其药动学研究[J]. 中国药房, 2015, 26(19):2632-2635.

[8]

庄园. 丹参酮对膝骨性关节炎模型细胞活性及氧自由基代谢的影响[D]. 广州:暨南大学, 2007.

[9]

Yates KE, Shortkroff S, Reish RG. Wnt influence on chondrocyte differentiation and cartilage function[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(7):446-457.

[10]

Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, et al. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(2):501-512.

[11]

Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(1):109-118.

[12]

Yuasa T, Otani T, Koike T, et al. Wnt/ β -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes; its possible role in joint degeneration[J]. Laboratory Investigation, 2008, 88(3):264-274.

[13]

Martijn H, van den Bosch, Arjen B, et al. Induction of canonical wnt signaling by synovial overexpression of selected wnts leads to protease activity and early osteoarthritis-like cartilage damage[J]. The American Journal of Pathology, 2015, 185(7):1970-1980.

[14]

Delgado C, Arozamena I, Casafont, et al. Wnt activity, osteocytes and sclerostin expression in hip fractures and osteoarthritis[J]. Bone, 2011, 48(S5):138-140.

[15]

王德刚,许传勇,姜玉祥,等. 黄芪甲苷对 Wnt/ β -catenin 信号通路活化的人滑膜及软骨细胞共培养体系相关因子的调控作用[J]. 广东医学, 2017, 38(3):354-357.

(收稿日期:2018-03-04)

广告目录

1. 国药集团精方(安徽)药业股份有限公司	
颈舒颗粒	封二
2. 广东省医药进出口公司珠海公司	
同息通	彩插一
3. 颈复康药业集团有限公司	
腰痛宁胶囊	彩插二
4. 陕西盘龙药业集团股份有限公司	
盘龙七片	封三
5. 贵州益佰制药股份有限公司	
金骨莲胶囊	封四