

# 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡的抑制及其作用机理

孟祥东<sup>1</sup> 冯宇<sup>1△</sup> 李福龙<sup>1</sup> 郭亚<sup>1</sup>

〔摘要〕 目的:分析中成药盘龙七片对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡的抑制作用,并探讨其作用机理。

方法:采用膝关节穿刺注射胶原酶法制备膝骨关节炎大鼠模型,检测不同剂量盘龙七片处理后大鼠膝关节肿胀及外周血中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平变化情况;同时检测盘龙七片对炎症因子诱导的软骨细胞凋亡及 Bcl-2 和 Caspase-3 表达水平、GSK3 $\beta$  磷酸化水平的影响。结果:高、低剂量盘龙七片均可降低膝骨关节炎大鼠膝关节肿胀程度及炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平。盘龙七片处理后,大鼠膝关节软骨组织中及体外炎症因子诱导的软骨细胞中凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达水平明显增高,Caspase-3 表达量则显著降低,激酶 GSK3 $\beta$  磷酸化水平及细胞凋亡水平明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。以 GSK3 $\beta$  激活剂 LY294002 作用于细胞后,可明显减弱盘龙七片对软骨细胞凋亡的抑制作用。结论:盘龙七片可通过抑制 GSK3 $\beta$  激酶活性,缓解膝关节软骨细胞的凋亡,进而对膝骨关节炎发挥治疗作用。

〔关键词〕 盘龙七片;膝骨关节炎;软骨细胞;细胞凋亡;炎症因子

〔中图分类号〕 R-33 〔文献标志码〕 A 〔文章编号〕 1005-0205(2020)02-0001-04

## Inhibitory Effect of Panlongqi Tablet on Chondrocyte Apoptosis in Rats with Knee Osteoarthritis and Its Mechanism

MENG Xiangdong<sup>1</sup> FENG Yu<sup>1△</sup> LI Fulong<sup>1</sup> GUO Ya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Heze Traditional Chinese Medicine Hospital, Heze 273000, Shandong China.

**Abstract Objective:** To analysis the inhibitory effect of Panlongqi tablet on chondrocyte apoptosis in rats with knee osteoarthritis and its potential mechanism. **Methods:** Model rats of knee osteoarthritis were established by injection of collagenase into knee joint. The swelling of knee joint and the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in peripheral blood of rats were tested after treatment with different doses of Panlongqi tablet. At the same time, the effects of Panlongqi tablet on chondrocyte apoptosis, Bcl-2 and Caspase-3 expression level, GSK3 $\beta$  kinase level induced by inflammatory factors were detected. **Results:** The degree of knee swelling and the levels of inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-6 in rats with knee osteoarthritis were reduced by both high and low dose of Panlongqi tablet. Besides, the expression of Bcl-2 and Caspase-3 in articular cartilage and chondrocytes induced by inflammatory factors in vitro were significantly increased, whereas the levels of Caspase-3 and apoptosis as well as GSK3 $\beta$  kinase were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). After treatment with GSK3 $\beta$  activator LY294002, the inhibitory effect of Panlongqi tablet on chondrocyte apoptosis was significantly weakened. **Conclusion:** Panlongqi tablet plays a role in the treatment of knee osteoarthritis by inhibiting the activity of GSK3 $\beta$  kinase, alleviating the apoptosis of chondrocytes in knee joint.

**Keywords:** Panlongqi tablet; knee osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis; inflammatory factors

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)又称退行性关节炎,是指以滑膜、软骨等关节组织退变、破坏为主要病变特征的慢性疾病,其中关节软骨细胞凋亡及异常炎症反应是导致关节组织发生退行性变化的起始病症之

一<sup>[1,2]</sup>。近年来,医药工作者利用中医药手段治疗骨性关节炎等相关疾病,取得了大量研究成果<sup>[3-5]</sup>。然而,受中药制剂成分复杂性所限,其活性机制尚不明确。

盘龙七片是由著名老中医王家成所献祖传秘方,经科学研制而成的中成药,临床应用表明其对骨关节炎病症具有显著疗效<sup>[6-8]</sup>。本实验以膝骨关节炎大鼠

<sup>1</sup> 山东菏泽市中医医院(山东 菏泽,273000)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:fy654-2@163.com

模型为对象,分析盘龙七片对模型大鼠细胞凋亡及白细胞介素 1(IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )等炎症因子的影响,并以体外培养的软骨细胞为模型,分析盘龙七片对软骨细胞功能的调控机制,为解析中药治疗骨关节炎的药理机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

50 只雄性 SD(Sprague-Dawley)级大鼠(体质量 280~320 g),购买自济南金丰实验动物有限公司。

### 1.2 主要试剂

盘龙七片(陕西盘龙药业集团股份有限公司,国药准字 Z61020050);磷酸化 GSK3 $\beta$ (Tyr216),总 GSK3 $\beta$ , Bcl-2, caspase-3,  $\beta$ -actin 一抗、羊抗鼠二抗(HRP)购买自北京博奥森生物技术有限公司;MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒购买自碧云天生物技术研究;流式细胞仪购买自 Becton-Dickinson 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 大鼠模型制备与处理** 大鼠模型制备参照潘建科等<sup>[9]</sup>方法。大鼠经 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,右侧膝关节碘伏消毒,使用 1 mL 注射器行膝关节穿刺,将 50  $\mu$ L II 型胶原酶溶液注入关节腔内,然后用棉签按压针口,覆盖无菌棉,4 d 后重复上述操作。假手术组注射等体积 0.9%氯化钠溶液。

模型大鼠随机分为模型组、盘龙七片高剂量组(PL-H)和低剂量组(PL-L),每组 8 只,同时将假手术组大鼠设为对照组。盘龙七片按不同剂量(高、低剂量组 0.257 7, 1.288 5 g/kg,分别为临床成人剂量的 2 倍和 10 倍)灌胃给药,2 次/d,连续 4 周。对照组与模型组常规喂养。

**1.3.2 软骨细胞分离与培养** 骨关节软骨细胞的分离培养按照 II 型胶原酶顺序消化联合胰蛋白酶法进行。培养良好的细胞传代至 6 孔板,以 2 ng/L IL-1 $\beta$ , 1 ng/L IL-6 模拟骨关节炎性环境刺激细胞,24 h 后分别加入高、低剂量盘龙七片,再培养 24 h 后,检测细胞

凋亡及相关因子表达情况。

**1.3.3 膝关节肿胀度检测** 使用电子数字显示游标卡尺对各组大鼠膝关节直径分别进行检测,观察记录膝关节肿胀情况。

**1.3.4 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平检测** 分别收集各组大鼠外周血,采用 ELISA 试剂盒法检测大鼠外周血中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平变化。

**1.3.5 RT-PCR 检测** 骨关节软骨组织(或培养的软骨细胞)置于离心管中,按试剂盒说明书提取总 RNA 并反转录成 cDNA,进行实时定量 PCR 检测,反应程序:94  $^{\circ}$ C, 50 s; 54  $^{\circ}$ C, 50 s; 72  $^{\circ}$ C, 50 s; 72  $^{\circ}$ C, 10 min. 30 个循环,以  $\beta$ -actin 为内参,依据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各组 mRNA 的相对表达量。

**1.3.6 Western Blot 检测** 取处理后大鼠膝骨软骨组织或细胞,SDS 裂解法提取总蛋白,煮沸后取 80  $\mu$ g 上样进行 SDS-PAGE 电泳并转膜。经由 3%脱脂奶粉封闭后,一抗(1:2 000 稀释)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加入二抗 HRP 室温孵育 1 h, ECL 显色曝光,灰度分析条带值。

**1.3.7 细胞凋亡检测** 处理后的细胞于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后,调整细胞密度( $1 \times 10^6$  个/mL),加入 Annexin V-FITC(终浓度 0.5  $\mu$ g/mL)和 PI(终浓度 0.6  $\mu$ g/mL)双染色,采用流式细胞仪分析。

### 1.4 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,采用 SPSS12.0 软件进行数据分析( $t$  检验), $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 盘龙七片对骨关节炎模型大鼠的治疗作用

与对照组相比,模型组大鼠膝关节直径明显增加,肿胀加剧,外周血中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著升高;而盘龙七片高、低剂量组大鼠的膝关节直径则显著下降,IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),高、低剂量组间差异明显,高剂量组大鼠恢复效果更明显,见表 1。

表 1 各组大鼠膝关节直径及炎症因子水平平均值的变化( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	膝关节直径/mm	$t$	$P$	IL-1 $\beta$ /(pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )	$t$	$P$	IL-6/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )	$t$	$P$
对照组	11.17 $\pm$ 0.34			183.41 $\pm$ 17.45			149.33 $\pm$ 14.59		
模型组	12.82 $\pm$ 0.11	13.06	<0.01	613.57 $\pm$ 28.83	36.10	<0.01	361.04 $\pm$ 21.30	23.19	<0.01
低剂量组	11.90 $\pm$ 0.41	6.13	<0.01	307.54 $\pm$ 30.11	20.76	<0.01	231.36 $\pm$ 10.65	15.40	<0.01
高剂量组	11.45 $\pm$ 0.20	16.98	<0.01	233.91 $\pm$ 21.15	30.03	<0.01	184.33 $\pm$ 14.50	19.40	<0.01

注:模型组与对照组比较,低、高剂量组与模型组比较。

### 2.2 盘龙七片对模型大鼠骨关节软骨组织凋亡因子表达的影响

与模型组相比,盘龙七片高、低剂量组大鼠软骨组织中 Bcl-2 表达水平明显增高, Caspase-3 表达量则显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

### 2.3 盘龙七片对软骨细胞凋亡的影响

体外条件下检测盘龙七片对炎症因子诱导的软骨细胞凋亡的影响,结果表明盘龙七片可显著减少炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 引起的软骨细胞凋亡,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且不同浓度盘龙七片组间差异明

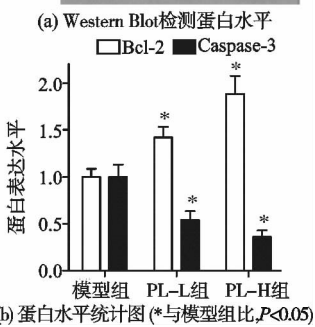
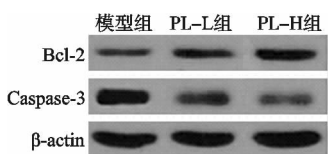
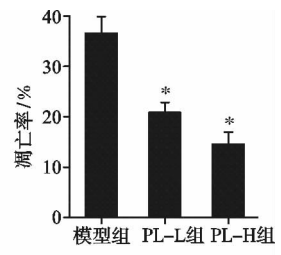
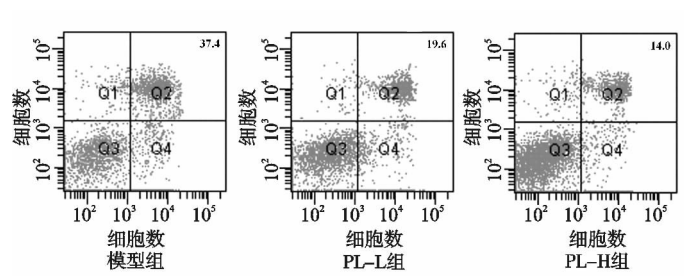
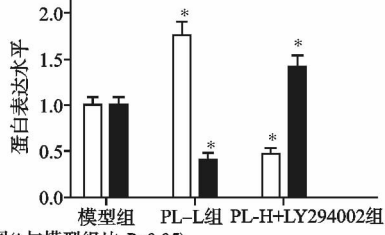
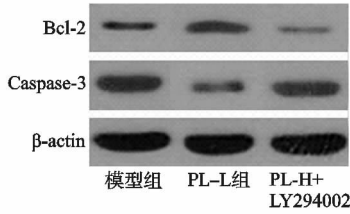


图 1 大鼠骨关节软骨组织凋亡因子表达情况

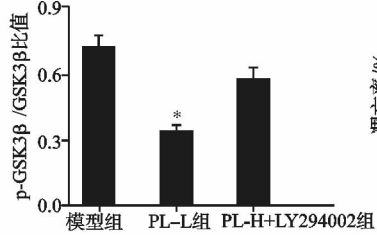
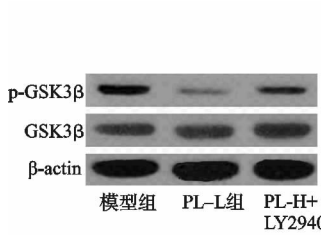


(a) 细胞凋亡及统计图

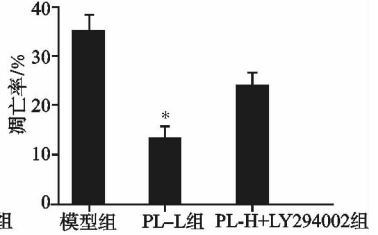


(b) 蛋白表达及统计图(\*与模型组比, $P < 0.05$ )

图 2 盘龙七片对软骨细胞凋亡的影响



(a) 蛋白表达及统计图



(b) 细胞凋亡情况(\*与模型组比, $P < 0.05$ )

图 3 盘龙七片通过调控 GSK3β 活性抑制软骨细胞的凋亡

### 3 讨论

关节软骨细胞合成与分解平衡的破坏是骨性关节炎发生的病理学基础之一,这其中细胞凋亡与局部炎症反应的异常扮演着重要角色,也使得如何缓解关节内局部炎症压力及其诱发的软骨细胞的凋亡等成为治疗该病症的关键<sup>[10,11]</sup>。一直以来,利用中医药的方法治疗骨性关节炎等慢性退行性关节疾病是医药领域研究的热点内容<sup>[12]</sup>。中成药盘龙七片是由著名老中医、中国《中医辞典》编写顾问王家成所献祖传秘方经科学研制而成,主要成分包括盘龙七、当归、壮筋丹、丹参、五加皮等 29 味中草药<sup>[13]</sup>。临床应用表明,盘龙七片

显(见图 2a);以高剂量盘龙七片处理软骨细胞 24 h 后,细胞中 Bcl-2 的表达水平显著增高,Caspase-3 的表达量明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2b。

### 2.4 盘龙七片通过调控 GSK3β 活性抑制软骨细胞的凋亡

以高剂量盘龙七片处理软骨细胞 24 h,检测结果表明:细胞中 GSK3β(Tyr216)激酶磷酸化水平降低,活性下降(见图 3a);而利用 GSK3β 激活剂 LY294002 同时处理后,细胞内 Bcl-2 和 Caspase-3 的表达水平及细胞凋亡水平则不再受盘龙七片作用的影响(见图 2b 和图 3b)。

对包括骨关节炎在内的不同类型的骨科疾病均具有明显的临床疗效<sup>[14-16]</sup>。本研究通过构建膝骨关节炎大鼠模型,证实了盘龙七片能有效缓解骨关节炎模型大鼠膝关节的肿胀症状,并能明显降低模型大鼠外周血中炎症因子 IL-1β 及 IL-6 水平,发挥治疗作用。

软骨细胞异常凋亡是骨性关节炎发生的主要细胞病变过程<sup>[17]</sup>。既往关于盘龙七片治疗骨关节炎的研究主要针对其临床疗效,然而其具体机制未见研究。本实验证实了盘龙七片能调控模型大鼠膝关节软骨组织中凋亡抑制因子 Bcl-2 与凋亡因子 Caspase-3 的表达水平,有效抑制 IL-1β 及 IL-6 等炎症因子诱导的软

骨细胞的凋亡,推测这一抑制作用可能与盘龙七片各配伍药材的主要成分有关。其主药盘龙七为虎耳草科植物秦岭岩白菜的根茎,有效成分包含岩白菜素等活性物质。有研究表明岩白菜素不仅对炎症反应具有明显抑制作用,并且能调控细胞增殖、凋亡等多种信号通路,参与肝癌等肿瘤细胞凋亡活性的调节<sup>[18,19]</sup>。

糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )是一类保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,其 Tyr216 残基磷酸化后活性被激活, Ser9 残基磷酸化后活性则被抑制。GSK-3 $\beta$  活化后可调控下游 Bcl-2, Caspase-3 等凋亡相关蛋白分子的表达过程,进而影响细胞的凋亡<sup>[20,21]</sup>。有研究报道岩白菜素等活性物质对 GSK-3 $\beta$  激酶活性具有调节作用<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,盘龙七片能下调炎症因子诱导的软骨细胞中 GSK3 $\beta$ (Tyr216)激酶磷酸化水平,降低其活性,进而调节凋亡相关因子 Bcl-2 及 Caspase-3 的表达水平,影响软骨细胞的凋亡,这与其对骨关节软骨细胞凋亡及骨性关节炎的抑制作用密切相关。

本文以膝骨关节炎大鼠模型为对象,证实了盘龙七片对于骨性关节炎具有明显治疗作用,这一过程与盘龙七片对炎症因子水平、GSK-3 $\beta$  激酶活性及骨关节软骨细胞凋亡的抑制作用有关。该研究为解析中成药盘龙七片治疗骨关节炎的药理机制提供了依据。

## 参考文献

- [1] GOLDRING M B, GOLDRING S R. Osteoarthritis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, 213(3): 626-634.
- [2] DUBEY N K, MISHRA V K, DUBEY R, et al. Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage; a review[J]. *Stem Cells International*, 2018(1/2): 1-13.
- [3] 孙振新, 杨矛, 朱玲玲, 等. 中医药治疗膝骨关节炎研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(1): 111-114.
- [4] 王爱国, 吕佳康, 谷福顺, 等. 中医中药治疗膝骨关节炎的新药研究及评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(16): 1610-1612.
- [5] 王晓冰. 中医药治疗膝骨关节炎[J]. *实用中医内科杂志*, 2015, 29(7): 167-168.
- [6] 李凌汉, 何虹, 林勇, 等. 盘龙七片对膝骨性关节炎患者疗效与外周血 Th17 细胞及相关细胞因子的关系[J]. *中国医药科学*, 2017, 7(13): 9-12.
- [7] 李军锋, 王晓峰, 卫志刚. 盘龙七片治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(8): 65-67.
- [8] 任婕, 邹季. 盘龙七片治疗神经根型颈椎病的临床观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2009, 17(5): 50-51.
- [9] 潘建科, 谢辉, 刘军, 等. 龙鳌胶囊对膝骨关节炎大鼠体质量及脏器指数的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(8): 3234-3237.
- [10] 陈高扬, 张桂珍, 王庆宇, 等. 成骨细胞与软骨细胞在骨性关节炎中的相互作用综述[J]. *中国体视学与图像分析*, 2017, 22(2): 230-237.
- [11] GOLDRING M B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 43(9): 1916-1926.
- [12] 徐方琼, 于德宁, 石立鹏, 等. 中医药治疗膝骨关节炎研究进展[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(10): 146-149.
- [13] 刘国辉, 肖飞, 夏天, 等. 盘龙七片在早期股骨头缺血性坏死中的应用[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 18(3): 25-26.
- [14] 钱莉, 胡建方. 运动疗法结合盘龙七片治疗膝骨关节炎临床观察[J]. *中国卫生产业*, 2013(16): 34-35.
- [15] 周晓莉, 乔平平. 盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎 32 例[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(12): 72-73.
- [16] 赵浩, 赵福涛. 盘龙七片治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(6): 658-659.
- [17] ZOU L, LIU J, LU H. Influence of protein kinase RIPK4 expression on the apoptosis and proliferation of chondrocytes in osteoarthritis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(2): 3078-3084.
- [18] 夏从龙, 刘光明, 马晓匡. 岩白菜素的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(3): 432-433.
- [19] 陈业文, 张灏, 甘亚平, 等. 岩白菜素对肝癌的抑制作用[J]. *重庆医学*, 2018, 47(26): 7-13.
- [20] GE X H, SHAO L, ZHU G J. Oxymatrine attenuates brain hypoxic-ischemic injury from apoptosis and oxidative stress; role of p-Akt/GSK3 $\beta$ /HO-1/Nrf-2 signaling pathway[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33(6): 1869-1875.
- [21] PAN J J, CHANG Q S, WANG X, et al. Activation of Akt/GSK3 $\beta$  and Akt/Bcl-2 signaling pathways in nickel-transformed BEAS-2B cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2011, 39(5): 1285-1294.

(收稿日期: 2019-08-10)