

补骨颗粒含药血清对软骨细胞凋亡及缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子-A 信号通路的影响

余光书¹ Δ 林焱斌² 王松清¹ 吴春玲¹

[摘要] 目的:观察补骨颗粒含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路的影响,探讨补骨颗粒对软骨细胞凋亡的影响机制。方法:通过体外培养大鼠膝关节软骨细胞,应用 Cell Counting Kit-8 方法检测不同浓度补骨颗粒含药血清对软骨细胞活性的影响。将实验分为正常培养基组及不同浓度补骨颗粒含药血清(浓度为 0%,5%,10%,15%,20%,25%,30%)联合 10 ng/mL IL-1 β 培养组。应用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶染色后经流式细胞仪检测软骨细胞凋亡影响情况,用探针(2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯)测量软骨细胞内活性氧的相对量,应用酶联免疫吸附试验检测软骨细胞 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量,应用逆转录酶定量聚合酶链式反应检测 HIF-1 α 及 VEGF-A 基因表达情况。结果:浓度为 5%,10%,15%补骨颗粒含药血清间的光密度(OD)值差异无统计学意义($P>0.05$),而 15%含药血清干预后软骨细胞的 OD 值比 20%含药血清干预组($P=0.007$)、25%含药血清干预组($P=0.003$)及 30%含药血清干预组($P<0.001$)高,差异有统计学意义。应用 10 ng/mL IL-1 β 干预后软骨细胞凋亡率和活性氧含量明显高于正常培养基组,并且 15%含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的抑制率和软骨细胞中活性氧的含量高于其他浓度含药血清组,差异有统计学意义($P<0.05$)。酶联免疫吸附试验检测结果表明 15%和 20%含药血清组 HIF-1 α 和 VEGF-A 的含量差异无统计学意义($P=0.635$, $P=0.057$);而 15%和 20%含药血清组的 HIF-1 α 和 VEGF-A 含量显著高于正常培养基组,差异有统计学意义($P<0.05$);而显著低于 0%,5%,10%,25%和 30%含药血清组,差异有统计学意义($P<0.01$)。逆转录酶定量聚合酶链式反应检测结果表明 15%含药血清组 HIF-1 α 和 VEGF-A 基因表达量显著低于 0%,5%和 10%含药血清组,差异有统计学意义($P<0.05$);而 15%含药血清组与 20%,25%和 30%含药血清组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:补骨颗粒含药血清可以通过激活 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路而抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,并且含药血清浓度对软骨细胞的活性存在影响。

[关键词] 含药血清;白细胞介素-1 β ;软骨细胞;凋亡;缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子-A 信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)04-0001-08

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230401

Effects of Bugu Granules in Drug-Containing Serum on Chondrocyte Apoptosis and HIF-1 α /VEGF-A Signaling Pathway

YU Guangshu¹ Δ LIN Yanbin² WANG Songqing¹ WU Chunling¹

¹Department of Pains,Fuzhou Second Hospital,Fuzhou 350007,China;

²Department of Orthopaedics,Fuzhou Second Hospital,Fuzhou 350007,China.

Abstract Objective: To observe the effects of Bugu granules in drug-containing serum on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis and the expression of HIF-1 α /VEGF-A signaling pathway-associated proteins,so as to explore the mechanism of action of Bugu granules on chondrocyte apoptosis. **Methods:** The chondrocytes were cultured in vitro,and cell counting Kit-

8 was used to detect the effects of different concentrations of Bugu granule-containing serum on the activity of chondrocytes. Cells were divided to eight groups: a normal medium group and groups with different concentrations of Bugu granule-containing serum (concentrations of 0%,5%,10%,15%,20%,25%,30%) combined with 10 ng/mL IL-1 β cul-

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2020J011191)

¹ 福州市第二医院疼痛科(福州,350007)

² 福州市第二医院骨科

Δ 通信作者 E-mail:18065142418@163.com

ture. The apoptosis of chondrocytes was detected by flow cytometry after annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide staining. The relative amount of reactive oxygen species in chondrocytes was measured with a probe (2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate). The contents of HIF-1 α and VEGF-A in chondrocytes were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of HIF-1 α and VEGF-A genes was detected by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction. **Results:** There were no significant differences in the OD value among the 0%, 5%, 10% and 15% drug-containing serum groups ($P>0.05$), while the OD value of chondrocytes after 15% drug-containing serum intervention was higher than that in the 20%, 25% and 30% drug-containing serum groups ($P=0.007$, $P=0.003$ and $P<0.001$, respectively). The apoptosis rate of chondrocytes and content of reactive oxygen species in chondrocytes after 10 ng/mL IL-1 β intervention was significantly higher than that in the normal medium group ($P<0.001$), and the inhibition rate of IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis and the content of reactive oxygen species in chondrocytes with 15% drug-containing serum was higher than those with the other concentrations of drug-containing serum ($P<0.05$). It was found that there were no significant differences in the contents of HIF-1 α and VEGF-A between the 15% and 20% drug-containing serum groups ($P=0.635$ and $P=0.057$, respectively). The contents of HIF-1 α and VEGF-A in the 15% and the 20% drug-containing serum groups were significantly higher than those in the normal medium group ($P<0.05$), while they were significantly lower than those in the 0%, 5%, 10%, 25% and 30% drug-containing serum groups ($P<0.05$). It was found that the HIF-1 α and VEGF-A gene expression in 15% drug-containing serum group was significantly lower than those of the 0%, 5% and 10% drug-containing serum groups ($P<0.05$), while there was no significant difference between the 15% drug-containing serum group and the 20%, 25% and 30% drug-containing serum groups ($P>0.05$).

Conclusion: Bugu granules inhibit IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by activating the HIF-1 α /VEGF-A signaling pathway, and the concentration of drug-containing serum has effect on the activity of chondrocytes.

Keywords: drug-containing serum; interleukin-1 β (IL-1 β); chondrocytes; apoptosis; HIF-1 α /VEGF-A signaling pathway

膝骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是力学因素和生物学因素作用下导致软骨细胞、细胞外基质及软骨下骨三者降解和合成失衡的结果,其中软骨细胞凋亡被认为是关节软骨退行性改变的病理因素之一,是关节炎发病机制中的重要环节。有研究表明炎症细胞因子如白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)所诱导的软骨细胞大量凋亡与关节炎的发生密切相关^[1-2],并且缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子-A(Hypoxia Inducible Factor-1 α /Vascular Endothelial Growth Factor-A, HIF-1 α /VEGF-A)信号通路对软骨细胞的氧化特性及软骨细胞的稳态起到重要的作用,通过负调控 HIF-1 α /VEGF-A 通路会对 IL-1 β 诱导的软骨细胞变性起保护作用^[3-4]。笔者基于早期研究发现补骨颗粒对膝骨关节炎具有良好的疗效,并且补骨颗粒能够抑制软骨细胞凋亡^[5-6]。本研究进一步分析补骨颗粒含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路的影响,以期对补骨颗粒防治膝骨关节炎提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

清洁级 SD 大鼠 20 只由中南大学湘雅二医院提供(许可证号为 SCXK(湘)2019-0004),用于制备含药血清;大鼠关节软骨细胞由武汉普诺赛生命科技有限公司提供(货号 CP-R092);CCK8 试剂盒由日本同

仁公司提供(日本九州岛上熊本市,货号为 NU679),凋亡试剂盒(APC)由江苏凯基生物科技股份有限公司提供(货号为 KGA1030);HIF-1 α 试剂盒(货号为 MM-0390R1)和 VEGF 试剂盒(货号为 MM-0807R1)由上海酶联生物科技有限公司提供;mRNA 逆转录试剂盒(货号为 CW2569)和 miRNA 逆转录试剂盒(货号为 CW2141)由北京康为世纪有限公司提供。其他试剂:IL-1 β 溶液(proteintech,美国芝加哥,货号为 HZ1164),DMEM 培养基(Sigma,美国密苏里州,货号为 D5796),胰酶消化液(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWC0232),胎牛血清(Gibco,美国纽约州,货号为 10099141),双抗(青链霉素)(上海碧云天生物科技有限公司,货号为 SV30010),PBS(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWC0409),琼脂糖(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWR0002),DNA 凝胶加样缓冲液(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWR0103),Trizol(Thermo,美国马萨诸塞州,货号为 15596026),UltraSYBR Mixture(北京康为世纪有限公司,货号为 CW2601),DM2000 Plus DNA Marker(北京康为世纪有限公司,货号为 CW0632),核酸染料(北京普利莱有限公司,货号为 PB11141),Tris-乙酸电泳缓冲液(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWR0124),DEPC 处理水(abiowell,美国康涅狄格州,货号为 AWR0062)。

1.2 实验药物

补骨颗粒中药组成:骨碎补 20 g,鹿衔草 12 g,淫羊藿 12 g,潞党参 15 g,茯苓 20 g,三七 3 g,川牛膝 9 g,当归 9 g,川芎 6 g,女贞子 15 g,枸杞 9 g,生地 15 g,甘草 3 g。补骨颗粒剂由厦门大学附属福州第二医院药剂科负责加工制备,每克颗粒药含原生药 9.8 g,使用时用生理盐水加热溶解,制成 1 g/mL 的水溶液。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清制备及其对软骨细胞活性影响的检测 将 20 只清洁级 SD 大鼠(雄性和雌性各 10 只,体重为 140~180 g)随机分为空白血清组和补骨颗粒含药血清组,每组 10 只。适应性喂养 7 d,然后依据临床常用量按实验动物与人体表面积折算的等效剂量比值换算^[7],补骨颗粒含药血清组喂服补骨颗粒(6.16 g/kg),空白血清组予生理盐水 2 mL/kg 灌胃,1 次/d,连续 14 d,于最后 1 次灌胃后 1 h 腹主动脉无菌取血,常温下静置 60 min,713g 离心 10 min 后取同组血清混合,再离心 1 次,56 ℃灭活 30 min,过滤除菌,-20 ℃保存备用。

取对数生长的软骨细胞 3 000 个细胞铺板在 96 孔板里面(每孔 100 μ L),待细胞贴壁后加入不含小牛血清的单纯 DMEM 培养基,饥饿 24 h,使细胞同步化于 G0 或 G1 期。然后分为七组:0%补骨颗粒含药血清组,5%补骨颗粒含药血清组,10%补骨颗粒含药血清组,15%补骨颗粒含药血清组,20%补骨颗粒含药血清组,25%补骨颗粒含药血清组,30%补骨颗粒含药血清组。将软骨细胞培养 24 h(各组均设 3 个复孔)后按照每孔加入 100 μ L 含有 Cell Counting Kit-8 的培养基,于 37 ℃,5%CO₂继续孵育 4 h,然后于 Bio-Tek 酶标仪分析 450 nm 处光密度(OD)值。

1.3.2 软骨细胞培养及分组 将大鼠膝关节软骨细胞培养于含 10%FBS+1%双抗的 DMEM 中,37 ℃,5%CO₂,饱和湿度培养箱中培养。然后取对数生长的 3 000 个细胞铺板在 96 孔板里面(每孔 100 μ L),待细胞贴壁后加入不含小牛血清的单纯 DMEM 培养基,饥饿 24 h,使细胞同步化于 G0 或 G1 期。然后分为八组:正常培养基组,0%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,5%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,10%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,15%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,20%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,25%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组,30%补骨颗粒含药血清+10 ng/mL IL-1 β 培养组。

1.3.3 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡率 取上述分组的软骨细胞培养 24 h(各组均设 3 个复孔),然后用

不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化收集软骨细胞。用 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 713g 离心 5 min,收集约 3.2×10^5 个细胞,加入 500 μ L 的 Binding buffer 悬浮细胞,然后加入 5 μ L Annexin V-APC 混匀后加入 5 μ L Propidium Iodide,混匀,室温、避光反应 10 min,用流式细胞仪观察检测软骨细胞凋亡。采用 BD FACSVerse™流式细胞仪(BD Biosciences,美国)在 488 nm 处分析细胞凋亡,采用 CellQuest™软件(BD Biosciences)分析数据。

1.3.4 流式细胞仪检测软骨细胞活性氧 取上述分组的软骨细胞培养 24 h(各组均设 3 个复孔),然后去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的 DCFH-DA(按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μ mol/L)。于 37 ℃细胞培养箱内孵育 20 min,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。然后用不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化收集软骨细胞,用流式细胞仪观察检测软骨细胞中活性氧的相对强度(激发光波长设置为 488 nm,发射光波长设置为 525 nm)。

1.3.5 酶联免疫吸附试验检测软骨细胞 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量 收集上述分组培养的细胞,使用足够的冷 PBS(pH 7.2~7.4)洗涤,然后将清洗过的细胞转移到合适的离心管中,加入一定量的 $1 \times$ PBS(pH 7.2~7.4)。使用超声破碎破坏细胞膜后,于 2~8 ℃713g 离心 10 min 后保留上清液。然后将 50 mL 不同浓度的标准品或稀释 5 倍的蛋白质样品加入每个标准品或样品孔中。接着加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记抗体,用密封板密封孔,37 ℃孵育 60 min。弃液后用吸水纸拍干,每孔加入洗涤液 350 μ L,浸泡 1 min,洗板。重复 5 次后,每孔加入 50 μ L 底物 A 和 B,37 ℃避光孵育 15 min。然后在每个孔中加入 50 μ L 终止溶液,并根据制造商关于 HIF-1 α 及 VEGF 酶联免疫吸附试验的说明书,在 450 nm 处依次测量每个孔的光密度值,每组样品平行重复 5 次。以标准品的浓度为横坐标,对应的光密度值为纵坐标,绘制标准品的线性回归曲线,根据曲线方程计算各样品的浓度值。

1.3.6 逆转录酶定量聚合酶链式反应检测 HIF-1 α 及 VEGF-A 基因表达 收集上述八组培养的细胞,用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc)提取总 RNA。然后加入 20~30 μ L 无菌无酶水溶解沉淀,用紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处分别测定浓度和纯度。在 NCBI 中搜索目标基因序列(见表 1),并使用 Primer5 软件设计引物。然后使用 50 pg 至 5 μ g RNA 进行逆转录 PCR(RT-qPCR),并根据 PrimeScript™ RT 试剂盒的说明书使用 gDNA Eraser 进行 mRNA 扩增。SYBR Premix Ex Taq™用

于 RT-qPCR, 程序如下: 40 个循环, 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s。用无药物血清处理的细胞作阴性对照, 每个处理组的分析一式六份进行, 于 450 nm 波长依序测量各孔的光密度。在获得扩增曲线和 Ct 值后, 通过插值到适当的标准曲线来量化每个目标基因的初始模板量。R-GAPDH 作为参考基因, 并且所有样品都使用该参考基因进行了 RNA 校正。阴性对照组的 mRNA 表达量设为 1, 其他组的相对量根据校正值计算, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算最终表达倍数变化。

表 1 HIF-1 α 和 VEGF 的引物信息

名称	引物序列	片段长度/bp
R-GAPDH	上游引物 ACAGCAACAGGGTG- GTGGAC	252
	下游引物 TTTGAGGGTGCAGC- GAACTT	
R-HIF-1 α	上游引物 ACGATTGTGAAGTT- AATGCTCCC	172
	下游引物 AACCAACAGAAACG- AAACCCC	
R-VEGF	上游引物 CCTCGTCCTCTCCCT- ACCCCACT	163
	下游引物 TCCTGCCCCATTGC- TCTGTACCTT	

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件分析实验数据, 当数据呈正态分布时, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 形式。单因素方差分析用于多组之间的两两比较 (F 检验), 方差齐时使用 LSD 方法, 方差不齐时使用 Tamhane's T_2 检验。若数据不符合正态分布 (U 检验), 则使用秩和检验。使用 Kruskal-Wallis 方法进行多组之间的比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞活性比较

通过比较软骨细胞在 450 nm 处光密度值, 发现不同浓度补骨颗粒含药血清对软骨细胞的光密度值存在明显的差别 ($F = 7.941, P = 0.001$)。多重比较发现 0% 含药血清组、5% 含药血清组、10% 含药血清组、15% 含药血清组间的光密度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 15% 含药血清干预后软骨细胞的活性比 20% 含药血清干预组 ($P = 0.007$)、25% 含药血清干预组 ($P = 0.003$) 及 30% 含药血清干预组 ($P < 0.001$) 高; 20% 含药血清及 25% 含药血清干预后软骨细胞的光密度值比 30% 含药血清干预组高 ($P = 0.018, P = 0.044$), 见图 1。

2.2 软骨细胞凋亡率的对比

用流式细胞仪进行细胞凋亡测定, 通过 Annexin

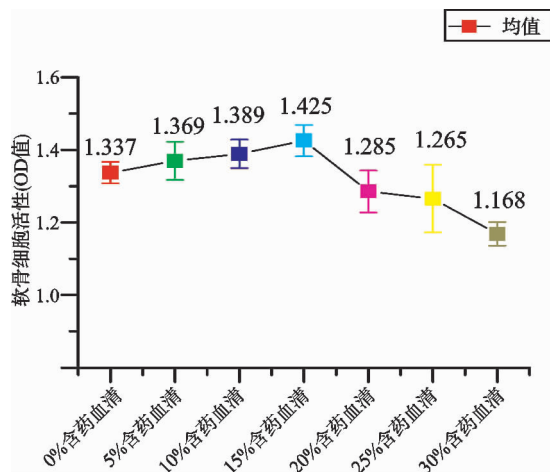


图 1 不同浓度含药血清对软骨细胞活性影响的比较

V-APC/PI 双染色流式细胞仪分析发现 8 组间软骨细胞的凋亡率存在明显的差别, 差异有统计学意义 ($U = 22.450, P = 0.002$)。多重比较发现 10 ng/mL IL-1 β 干预后软骨细胞的凋亡率明显高于正常培养基组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 并且 15% 补骨颗粒含药血清对 10 ng/mL IL-1 β 诱导的软骨细胞的凋亡抑制率比其他浓度含药血清组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 2。

2.3 软骨细胞内活性氧含量的对比

使用流式细胞仪进行软骨细胞内活性氧含量进行测定, 通过比较发现 8 组间软骨细胞的活性氧含量存在明显的差别, 差异有统计学意义 ($F = 139.945, P < 0.001$)。多重比较发现 10 ng/mL IL-1 β 干预后软骨细胞的活性氧含量明显高于正常培养基组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。当补骨颗粒含药血清浓度低于 15% 时, 随着含药血清浓度的增加活性氧含量明显降低; 而当补骨颗粒含药血清浓度高于 15% 时, 随着含药血清浓度的增加活性氧含量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 3。

2.4 软骨细胞内 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量比较

通过酶联免疫吸附试验检测后对比, 发现不同组软骨细胞内 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量差异有统计学意义 ($F = 2959.954, P < 0.001; F = 14714.434, P < 0.001$), 多重比较发现 15% 含药血清组与 20% 含药血清组的 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量差异无统计学意义 ($P = 0.635$)。15% 含药血清组与 20% 含药血清组 HIF-1 α 及 VEGF-A 含量明显高于正常培养基组, 而 15% 含药血清组与 20% 含药血清组明显低于 0% 含药血清组、5% 含药血清组、10% 含药血清组、25% 含药血清组及 30% 含药血清组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

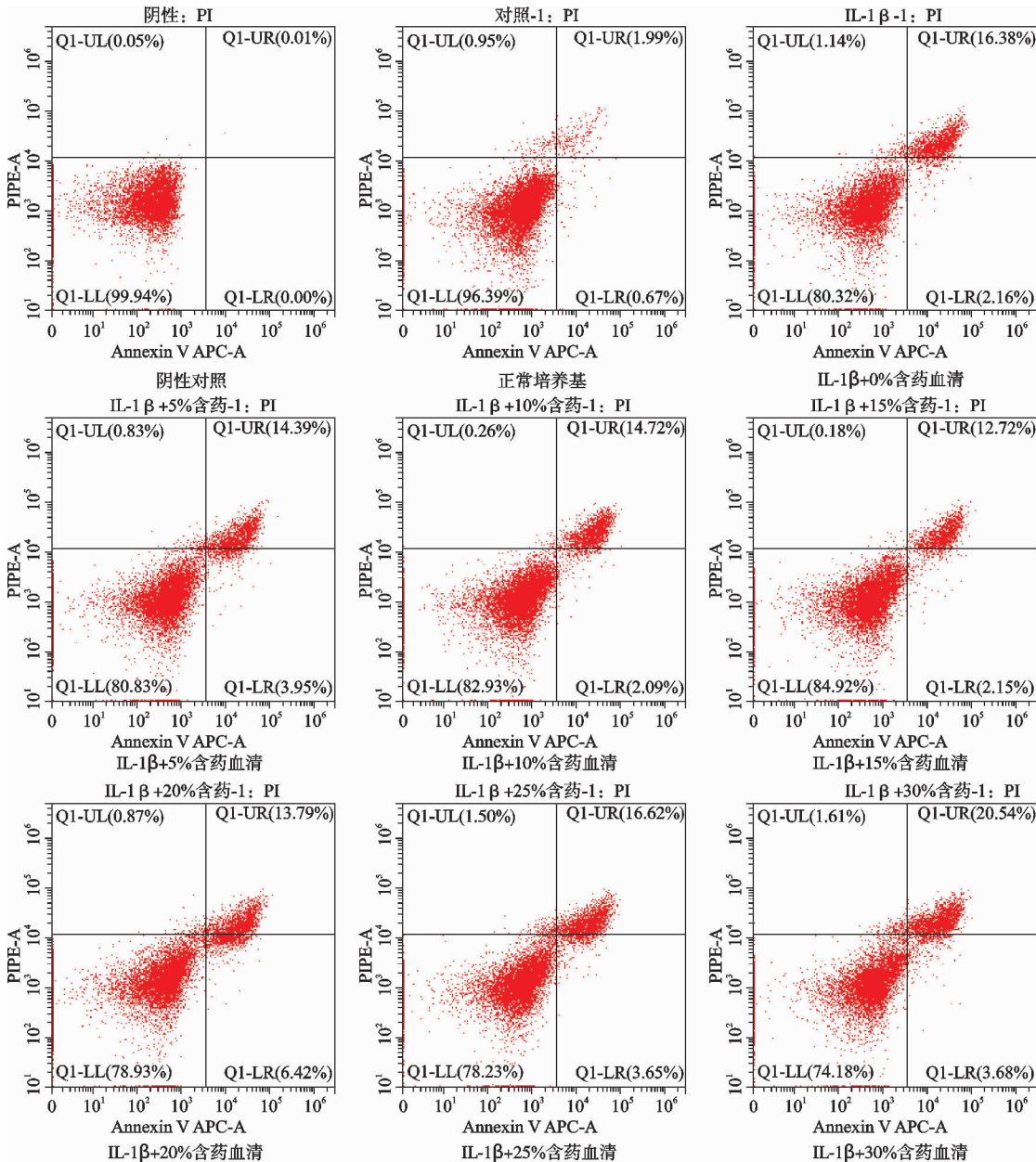


图 2 不同浓度含药血清对 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡的影响

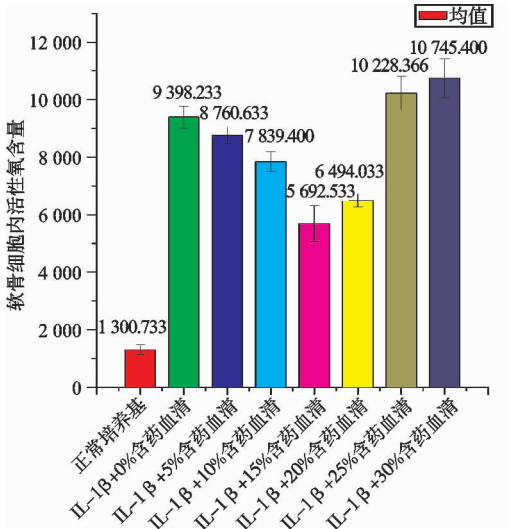


图 3 不同浓度含药血清对 IL-1β 诱导的软骨细胞活性氧的影响比较

2.5 软骨细胞内 HIF-1α 及 VEGF-A 基因表达量比较

通过逆转录酶定量聚合酶链式反应检测后对比,发现不同组软骨细胞内 HIF-1α 基因表达量存在明显差别,差异有统计学意义($F=18.357, P<0.001$)。多重比较发现 15% 含药血清组与正常培养基组差异无统计学意义($P=0.057$), 15% 含药血清组明显低于 0% 含药血清组($P<0.001$)、5% 含药血清组($P<0.001$)及 10% 含药血清组($P<0.001$), 差异有统计学意义; 15% 含药血清组与 20% 含药血清组($P=0.743$)、25% 含药血清组($P=0.341$)及 30% 含药血清组($P=0.461$)差异无统计学意义。5% 含药血清组与 10% 含药血清组差异无统计学意义($P=0.364$); 20% 含药血清组与 25% 含药血清组($P=0.530$)及 30% 含

药

表 2 不同浓度含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 HIF-1 α 和 VEGF-A 表达影响的比较($\bar{x}\pm s$)

项目	正常培养基	IL-1 β +0% 含药血清	IL-1 β +5% 含药血清	IL-1 β +10% 含药血清	IL-1 β +15% 含药血清
HIF-1 α 含量	94.303 \pm 0.781	384.958 \pm 2.625	283.409 \pm 5.457	220.336 \pm 4.386	137.837 \pm 3.006
VEGF 含量	444.746 \pm 2.859	1 721.094 \pm 5.874	1 158.494 \pm 15.460	899.140 \pm 5.436	679.426 \pm 5.284
项目	IL-1 β +20% 含药血清	IL-1 β +25% 含药血清	IL-1 β +30% 含药血清	F	P
HIF-1 α 含量	136.656 \pm 4.995	156.275 \pm 2.778	183.548 \pm 4.797	2 959.954	<0.001
VEGF 含量	670.303 \pm 6.395	702.087 \pm 4.898	799.299 \pm 4.682	14 714.434	<0.001

血清组($P=0.681$)差异无统计学意义;25%含药血清组与30%含药血清组差异无统计学意义($P=0.828$),见图4。

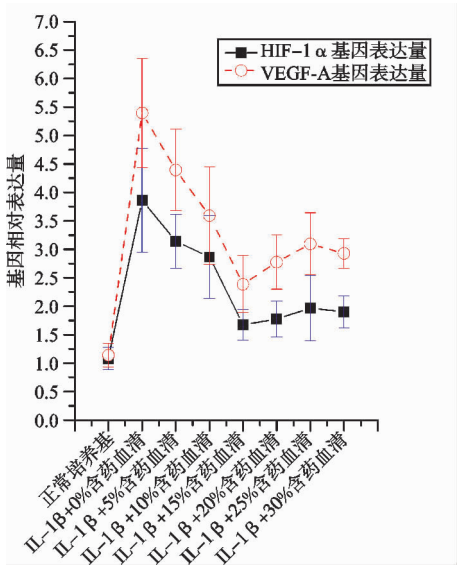


图 4 不同浓度含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞 HIF-1 α 和 VEGF-A 基因表达的影响比较

另外,通过逆转录酶定量聚合酶链式反应检测后对比发现,不同组软骨细胞内 VEGF-A 基因表达量存在明显差别,差异有统计学意义($F=26.088, P<0.001$)。多重比较发现 15%含药血清组明显高于正常培养基组,差异有统计学意义($P=0.001$);15%含药血清组明显低于 0%含药血清组($P<0.001$)、5%含药血清组($P<0.001$)及 10%含药血清组($P=0.002$),差异有统计学意义;15%含药血清组与 20%含药血清组($P=0.281$)、25%含药血清组($P=0.053$)及 30%含药血清组($P=0.136$)差异无统计学意义;20%含药血清组与 25%含药血清组($P=0.371$)及 30%含药血清组($P=0.669$)差异无统计学意义;25%含药血清组与 30%含药血清组差异无统计学意义($P=0.638$),见图4。

3 讨论

膝关节关节炎是一种常见的退行性骨关节疾病,其发生发展与炎症反应和软骨细胞凋亡密切相关,并且 IL-1 β 所参与的炎症反应是诱发软骨细胞凋亡的重要

因素^[8]。体外实验研究表明高水平的 IL-1 β 能够通过信号通路将软骨细胞所在的环境信息输送到细胞内,通过干扰软骨细胞的正常代谢活动、破坏线粒体功能从而诱导软骨细胞产生活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),最终经过细胞凋亡途径诱导软骨细胞凋亡^[9-11],而通过抑制活性氧的产生可以抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡^[12-13]。因此,通过研究影响活性氧产生的上游通路对于进一步研究 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡具有重要意义。有研究表明给予抗氧化剂可以减少活性氧的产生,并且可以抑制 IL-1 β 和 VEGF-A 表达而改善关节炎症状^[14]。同时还有研究表明 HIF-1 α /VEGF-A 通路对 IL-1 β 诱导的软骨细胞中活性氧含量具有重要影响^[4,15]。因此,笔者在既往研究发现补骨颗粒含药血清能够抑制软骨细胞凋亡的基础上^[5],进一步研究补骨颗粒含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路的影响,以期进一步明确补骨颗粒对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响机制。

氧化应激反应是在机体遭受异常的刺激后,产生过多的活性氧以及活性氧自由基,超出氧化物的清除能力后导致活性氧簇在细胞内蓄积,进而引起细胞损伤的一种病理反应^[16]。研究表明氧化应激反应在 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡过程中发挥着重要作用,软骨细胞持续在 IL-1 β 环境下会加重氧化应激反应的发生;另外氧化应激反应产生的过多的活性氧自由基又会反过来导致活性氧在细胞内聚集,促进软骨细胞的氧化应激反应^[17-18],因此通过药物等干预手段抑制活性氧在软骨细胞内聚集便成为抑制软骨细胞凋亡的重要方法。笔者研究也发现补骨颗粒含药血清能够抑制 IL-1 β 诱导的活性氧产生,并且通过 HIF-1 α /VEGF-A 通路起到抑制软骨细胞凋亡的作用,这对进一步认识 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡机制具有重要意义。

HIF-1 α 是调节氧稳态平衡的主要调节因子,在机体的生理和病理过程中起着非常关键的作用。在炎症反应和缺氧环境中,炎症相关因子都能促进 HIF-1 α 的增加,进而使 HIF-1 α 发挥炎症级联放大作用。研究表明软骨细胞暴露于 IL-1 β 环境下将诱导软骨细胞

的渗透压改变和代谢活性增强,从而使得软骨细胞处于一个相对低氧的微环境,而这又会刺激 HIF-1 α 表达的增加^[13]。同时,HIF-1 α 感受缺氧、炎症因子等信号后,自身被迅速激活,进入细胞核内后与 VEGF-A 等转录因子协同作用,组织靶基因 DNA 结合并诱导基因转录,并调控相关基因的表达以维持细胞的氧稳态及能量代谢平衡。有研究表明 HIF-1 α 能够通过调控 VEGF-A 表达而参与调控能量代谢、细胞增殖、细胞凋亡和炎症免疫反应^[19],因此,抑制 HIF-1 α 的活性是预防软骨细胞凋亡的新靶点。补骨颗粒含药血清可以通过抑制 IL-1 β 诱导的 HIF-1 α /VEGF-A 基因表达而抑制活性氧产生,所以笔者认为补骨颗粒含药血清能够通过 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。

补骨颗粒由骨碎补、鹿衔草、淫羊藿、党参、茯苓、三七、川牛膝、当归、川芎、女贞子、枸杞、生地、甘草组成。现代药理学研究表明骨碎补、鹿衔草、淫羊藿等药物提取的有效成份可以抑制炎症反应且可以调控 NF- κ B 和 PI3K/AKT 等相关通路对软骨细胞保护作用^[20-22]。党参、茯苓等补气健脾中药可以提高抗氧化酶的活性,增强细胞抗氧化能力^[23-26]。三七、当归、牛膝等活血药物可以通过调控氧化应激反应及相关信号通路而控制细胞的凋亡^[27-31]。因此,由骨碎补、鹿衔草、淫羊藿、党参、茯苓、三七、当归、牛膝等药物组成的补骨颗粒具有抑制软骨细胞凋亡的功效。研究发现补骨颗粒能够抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,笔者认为通过改变软骨细胞所在的微环境或者通过补骨颗粒影响 HIF-1 α /VEGF-A 表达而改变软骨细胞内的氧化应激反应环境,能够调控软骨细胞的凋亡。

由于中药复方成分复杂,对体外软骨细胞的培养条件造成影响,用未经体内加工的中药粗提物直接作用于体外软骨细胞,可能出现假阳性或假阴性结果,因而其实验结论科学性较差。近年来,通过给实验动物喂服中药,再抽取血液经离心后获得血清,并应用于体外培养软骨细胞体系,克服了中药粗提物的缺点,其实实验结果与在体实验有较好的一致性,能更好地反映中药复方的配伍原则和药物的量效关系,因而得到广泛认可。然而不同浓度的含药血清对软骨细胞的影响是多样的,高浓度血清在起效的同时可能会对细胞产生毒性作用,低浓度血清可能由于药效物质浓度较低,达不到起效浓度,从而出现假阴性结果^[8]。因此,在开展含药血清干预软骨细胞的相关研究时,有必要对效应浓度进行探索。本研究也发现补骨颗粒含药血清浓度超过 15% 将会对软骨细胞的活性产生影响,因此使用补骨颗粒含药血清干预软骨细胞时需要考虑浓度不能过高,过高浓度的补骨颗粒含药血清将会对软骨细胞

产生毒性作用。另外,本研究通过不同浓度的含药血清干预 IL-1 β 环境下的软骨细胞后,发现 15% 补骨颗粒含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞的凋亡抑制率比其他浓度含药血清组好,同时随着补骨颗粒含药血清浓度的进一步增加,软骨细胞的凋亡率也在明显增加。进一步研究发现,15% 补骨颗粒含药血清干预 IL-1 β 环境下的软骨细胞后,活性氧、HIF-1 α 、VEGF-A 的表达量也处于相对较低的水平。因此,笔者认为 15% 补骨颗粒含药血清对 IL-1 β 诱导的软骨细胞的凋亡抑制率较高,并且 15% 补骨颗粒含药血清更能通过 HIF-1 α /VEGF-A 信号通路影响 IL-1 β 诱导的软骨细胞的凋亡。该实验结论也为补骨颗粒预防和治疗关节炎中软骨细胞凋亡研究的进一步开展奠定了基础。

参考文献

- [1] WANG B, SHAO Z X, GU M B, et al. Hydrogen sulfide protects against IL-1 β -induced inflammation and mitochondrial dysfunction-related apoptosis in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(6): 4369-4386.
- [2] ZHANG X H, YAO J, WU Z Y, et al. Chondroprotective and antiarthritic effects of Daphnetin used in vitro and in vivo osteoarthritis models[J]. Life Sci, 2020, 240: 116857.
- [3] 余光书, 林焱斌, 王松清, 等. 血管内皮生长因子介导的血管生成对膝骨性关节炎影响的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(11): 85-88.
- [4] ZHU W J, CHANG B Y, WANG X F, et al. FBW7 regulates HIF-1 α /VEGF pathway in the IL-1 β induced chondrocytes degeneration[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 5914-5924.
- [5] YU G S, LIN Y B, XU H B, et al. Effect of Bugu Granules in a drug-containing serum on chondrocyte apoptosis and the Trx2 signaling pathway[J]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2020, 79(3): 304-311.
- [6] 余光书, 乐立盛, 卓杰, 等. 补骨颗粒治疗骨关节炎慢性疼痛的机制研究[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(3): 33-38.
- [7] 黄长恩. 医学科研思路方法与程序[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 162.
- [8] 何晓娟, 林平冬, 马玉环, 等. 独活寄生汤含药血清抑制白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制研究[J]. 中医正骨, 2017, 29(8): 1-7.
- [9] LU J, PENG Y, ZOU J P, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is a regulator of autophagy in osteoarthritic chondrocytes[J]. Cartilage, 2021, 13(2): 1030-1040.
- [10] LOU Y T, LIANG J X, YANG C W, et al. Eupatilin protects chondrocytes from apoptosis via activating sestrin2-dependent autophagy[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105748.
- [11] LU Z H, LIU Q, LIU L, et al. A novel synthesized sulfonamido-based gallate-jeztc blocks cartilage degradation on rabbit

- model of osteoarthritis; an in vitro and in vivo study[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6):2304-2319.
- [12] YANG H P, HUANG J, MAO Y F, et al. Vitexin alleviates interleukin-1 β -induced inflammatory responses in chondrocytes from osteoarthritis patients; involvement of HIF-1 α pathway[J]. *Scand J Immunol*, 2019, 90(2): e12773.
- [13] MURATA M, YUDOH K, NAKAMURA H, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(7):1544-1554.
- [14] KUO W S, WENG C T, CHEN J H, et al. Amelioration of experimentally induced arthritis by reducing reactive oxygen species production through the intra-articular injection of water-soluble fullerene[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 9(6):909.
- [15] ZUPAN J, VRTANIK P, ANDREJ C, et al. VEGF-A is associated with early degenerative changes in cartilage and subchondral bone[J]. *Growth Factors*, 2018, 36(5):263-273.
- [16] XIE C L, LI J L, XUE E X, et al. Vitexin alleviates ER-stress-activated apoptosis and the related inflammation in chondrocytes and inhibits the degeneration of cartilage in rats[J]. *Food Funct*, 2018, 9(11):5740-5749.
- [17] YAN J Y, ZHANG Y C, SHENG G H, et al. Selonsertib alleviates the progression of rat osteoarthritis; an in vitro and in vivo study[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:687033.
- [18] ZHOU D L, ZHANG S Q, HU L, et al. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase by paeoniflorin attenuates neuroinflammation and ameliorates neuropathic pain[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):83.
- [19] YUDOH K, NAKAMURA H, MASUKO-HONGO K, et al. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in articular chondrocytes; involvement of HIF-1 α in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4):R904-R914.
- [20] CHEN G Y, CHEN J Q, LIU X Y, et al. Total flavonoids of rhizoma drynariae restore the MMP/TIMP balance in models of osteoarthritis by inhibiting the activation of the NF- κ B and PI3K/AKT pathways[J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2021:6634837.
- [21] MI B B, WANG J Q, LIU Y, et al. Icariin activates autophagy via down-regulation of the NF- κ B signaling-mediated apoptosis in chondrocytes[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:605.
- [22] TANG Y H, LI Y F, XIN D W, et al. Icariin alleviates osteoarthritis by regulating autophagy of chondrocytes by mediating PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):2984-2999.
- [23] YANG S J, SUN J Q, GU D X, et al. Antioxidant activities of sulfated Codonopsis polysaccharides in acute oxidative stress[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(12):e13974.
- [24] QIN T, REN Z, LIU X P, et al. Study of the selenizing codonopsis pilosula polysaccharides protects RAW264. 7 cells from hydrogen peroxide-induced injury[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125:534-543.
- [25] FANG C L, PAUL C R, DAY C H, et al. Poria cocos (Fuling) targets TGF β /Smad7 associated collagen accumulation and enhances Nrf2-antioxidant mechanism to exert anti-skin aging effects in human dermal fibroblasts[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(5):729-736.
- [26] ZHAO J M, NIU X Y, YU J J, et al. Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80:106173.
- [27] ZHANG Y B, CAI W S, HAN G T, et al. Panax notoginseng saponins prevent senescence and inhibit apoptosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway in osteoarthritic chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(4):1225-1236.
- [28] XU C, NI S, ZHUANG C, et al. Polysaccharide from Angelica sinensis attenuates SNP-induced apoptosis in osteoarthritis chondrocytes by inducing autophagy via the ERK1/2 pathway[J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1):47.
- [29] ZHUANG C, WANG Y J, ZHANG Y K, et al. Oxidative stress in osteoarthritis and antioxidant effect of polysaccharide from angelica sinensis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115:281-286.
- [30] XU X X, ZHANG X H, DIAO Y, et al. Achyranthes bidentata saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis in vitro[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(2):62-68.
- [31] MA D J, LI Y, XIAO W, et al. Achyranthes bidentata extract protects chondrocytes functions through suppressing glycolysis and apoptosis via MAPK/AKT signaling axis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(1):142-152.

(收稿日期:2022-10-07)