

## • 实验研究 •

乌头汤对骨关节炎软骨细胞中基质金属蛋白酶 13 和  
肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响机制研究刘李梅<sup>1</sup> 彭伟<sup>1</sup> 吴明权<sup>1</sup> 涂禾<sup>1△</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨乌头汤对骨关节炎(OA)软骨细胞中基质金属蛋白酶 13(MMP-13)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达的影响,以及其对沉默信息转录调控因子 1(Silent Information Regulator 1, SIRT1)/转录因子叉头框蛋白 O1(Forkhead Box Transcription Factor O1, FOXO1)信号的调控机制。**方法:**以脂多糖模拟炎性微环境构建骨关节炎软骨细胞模型;以 SIRT1 信号特异性抑制剂 EX527 做功能挽救实验,细胞实验分为正常对照组、脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组;钙黄绿素-AM (Calcein-AM)/碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色检测各组细胞的生长活性;流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率,免疫荧光检测各组细胞中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的表达;免疫组化检测各组细胞中蛋白聚糖(Aggrekan)和 II 型胶原(Collagen II)的表达;Western Blot 法检测细胞和软骨组织中 SIRT1、乙酰化叉头转录因子 1(Ac-FOXO1)、B 淋巴细胞瘤-2(B Cell Lymphoma-2, Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X Protein, Bax)的表达。**结果:**在骨关节炎细胞模型中,细胞的生长活性明显降低,凋亡率明显升高, TNF- $\alpha$  和 MMP-13 以及 Ac-FOXO1 和 Bax 的表达明显升高, Aggrekan 和 Collagen II、SIRT1 和 Bcl-2 的表达明显降低,乌头汤低、高剂量能明显阻滞这些参数的恶化,发挥保护软骨细胞的作用,而 EX527 可部分逆转乌头汤的保护作用,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**乌头汤能明显下调 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的表达,抑制骨关节炎软骨细胞的凋亡,这可能与激活 SIRT1 信号、抑制 FOXO1 的乙酰化有关。

**[关键词]** 乌头汤;骨关节炎;基质金属蛋白酶 13;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;沉默信息转录调控因子 1/转录因子叉头框蛋白 O1 信号通路

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)02-0012-08

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240203

## Mechanism Study of Wu-tou Decoction on the Expression of Matrix Metalloproteinase-13 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Osteoarthritis Chondrocytes

LIU Limei<sup>1</sup> PENG Wei<sup>1</sup> WU Mingquan<sup>1</sup> TU He<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Sichuan Orthopedics Hospital, Chengdu 610041, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Wu-tou decoction on the expressions of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in osteoarthritis (OA) chondrocytes cell, and its regulatory mechanism on silent information regulator 1 (SIRT1)/forkhead box transcription factor O1 (FOXO1) signaling pathway. **Methods:** Lipopolysaccharide was used to simulate inflammatory microenvironment to construct osteoarthritis chondrocyte model. EX527, SIRT1 signal specific inhibitor, was used to perform functional rescue experiment. Cell experiments were divided into normal control group, lipopolysaccharide group, low dose group of Wu-tou decoction, high dose group of Wu-tou decoction and inhibitor group. Calcein AM/propidium iodide (PI) staining was used to detect the growth activity of cells in each group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. Immunofluorescence was used to detect the expression

of TNF- $\alpha$  and MMP-13. Immunohistochemistry was used to detect the expression of Aggrekan and Collagen II. Western Blot was used to detect the expression of SIRT1, acetylated FOXO1 (Ac-FOXO1), B cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2

基金项目:四川省科技创新苗子工程资助项目(2020099)

<sup>1</sup>四川省骨科医院(成都, 610041)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:297983480@qq.com

associated X protein (Bax) in cells. **Results:** In osteoarthritis cells, the growth activity of cells decreased significantly, the apoptosis rate increased significantly, the expressions of TNF- $\alpha$  and MMP-13, Ac-FOXO1 and Bax were increased significantly, and the expressions of Aggrecan and Collagen II, SIRT1 and Bcl-2 were decreased significantly. Low and high dose of Wu-tou decoction could significantly block the deterioration of these parameters and exert a protective effect of chondrocytes, while EX527 could partially reverse the protective effect of Wu-tou decoction. The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Wu-tou decoction could significantly down-regulate the expression of TNF- $\alpha$  and MMP-13 and inhibit the apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis, which may be related to the activation of SIRT1 signal and inhibition of FOXO1 acetylation.

**Keywords:** Wu-tou decoction; osteoarthritis; matrix metalloproteinase 13; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; silent information regulator 1/forkhead box transcription factor O1 signaling pathway

骨关节炎(OA)软骨细胞中基质金属蛋白酶 13(MMP-13)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达异常升高<sup>[1]</sup>,导致蛋白聚糖(Aggrecan)和Ⅱ型胶原(Collagen II)的降解骤增<sup>[2]</sup>,引发骨关节炎进展。乌头汤由制川乌、黄芪、炙甘草、麻黄、芍药等组成,出自《金匮要略》<sup>[3]</sup>。沉默信息转录调控因子 1(Silent Information Regulator 1, SIRT1)/转录因子叉头框蛋白 O1(Forkhead Box Transcription Factor O1, FOXO1)信号是具有多种生物功能的通路<sup>[4]</sup>。有报道称激活 SIRT1 信号,抑制 FOXO1 乙酰化,降低乙酰化 FOXO1(Ac-FOXO1)的表达,能减轻骨质疏松症中的软骨损伤<sup>[5]</sup>。本研究以脂多糖诱导构建骨关节炎软骨细胞模型,以 SIRT1 抑制剂 EX527 进行功能挽救实验,探讨乌头汤对骨关节炎中 MMP-13 和 TNF- $\alpha$  表达的影响,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细胞

ATDC5 细胞购自上海汇中细胞生物科技有限公司。液氮中取出 ATDC 细胞,常规复苏,接种在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基上,HERA cell 150i 型智控 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 37℃,5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞生长至覆盖瓶底 85%后,0.5%胰酶消化,传代培养。

### 1.2 实验试剂

EX527、脂多糖(美国 Sigma 公司),多聚甲醛(北京索莱宝生物科技有限公司),兔抗大鼠 SIRT1、FOXO1、Ac-FOXO1、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体、Aggrecan、Collagen II、B 淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)单克隆抗体(上海碧云天生物科技有限公司),TNF- $\alpha$  和 MMP-13 检测试剂盒(武汉博士德生物公司),免疫组化试剂盒(上海卧宏生物科技有限公司),免疫荧光、蛋白质免疫印迹(Western Blot)试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司),钙黄绿素-AM(Calcein-AM)/碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)

染色试剂盒(南京建成生物技术有限公司)。

### 1.3 实验仪器

HERA Cell 150i 型智控 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),CM1950 冰冻切片机(德国 Leica 公司),REBEL 2 IN 1 正置/倒置 Hybrid 显微镜(美国 Discover ECHO 公司),ZF-288 全自动凝胶成像系统(上海嘉鹏科技有限公司)

### 1.4 药物

乌头汤由制川乌 6 g、黄芪 9 g、炙甘草 9 g、麻黄 9 g、芍药 9 g 组成,购自我院中药药房。药方中制川乌为先下药,需将单味制川乌药材置于纯净水浸泡 30 min,再行煎煮 1 h,而后将黄芪、炙甘草、麻黄、芍药一并加入,置于加热回流提取装置中 6 h,静置,过滤,收集滤液,制成 10 mg/mL 的母液,药液冷却,低温储存备用。

### 1.5 方法

**1.5.1 骨关节炎细胞的造模以及实验分组**<sup>[6]</sup> 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验,细胞培养基中添加 10 ng/mL 的脂多糖来模拟骨关节炎细胞微环境。

细胞实验分为<sup>[7-11]</sup>:1)对照组细胞,不进行任何干预;2)脂多糖组细胞,细胞培养基中添加 10 ng/mL 的脂多糖;3)乌头汤低剂量组细胞,细胞培养基中添加 10 ng/mL 的脂多糖和 50  $\mu$ L 的乌头汤;4)乌头汤高剂量组细胞,细胞培养基中添加 10 ng/mL 的脂多糖和 150  $\mu$ L 的乌头汤;5)抑制剂组细胞,细胞培养基中添加 10 ng/mL 的脂多糖、150  $\mu$ L 的乌头汤和 2  $\mu$ mol/L 的 EX527。

**1.5.2 Calcein-AM/PI 染色检测**各组细胞的生长活性 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验,细胞分组同上,PBS 充分清洗,按 Calcein-AM/PI 染色试剂盒要求进行操作,荧光显微镜下观察,视野下死细胞呈现红色荧光,活细胞呈现绿色荧光,Image J 软件统计分析各组细胞的存活率。

**1.5.3 流式细胞仪检测**各组细胞的凋亡率 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验,细胞分组同上,置于

37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>下培养 24 h, 胰酶消化, 收集细胞悬液, 离心后弃上清, PBS 冲洗, 膜联蛋白 V (Annexin V) 和碘化丙啶双重染色, 用流式细胞仪检测<sup>[12]</sup>。

**1.5.4 PCR 实验** Trizol 法提取样本中的总 RNA, 分光光度计检测其完整度和测定其纯度, 逆转录试剂盒合成 cDNA, 按试剂盒要求配置反应条件: 1) 预变性: 95 ℃, 3 min。2) 变性: 95 ℃, 12 s。3) 退火: 62 ℃, 40 s, 40 个循环, ABI-7300 实时定量 PCR 仪进行扩增。内参 U6 的引物序列以 2<sup>-△△Ct</sup> 表示目的基因的相对表达量<sup>[13]</sup>, 基因引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	上游引物	下游引物
TNF-α	TCAGCCACCATCACAGAA	CCAGGGCACACCGAGTA
	CAGGGTCCCAAGTCTCCTGG	CTGCTCCCAAGTCTCCTGG
MMP-13	TTGAACCGCAAGAGTCTCCTGG	TGTGGGGAGAAGTCTCCTGG
	CCAACACCGCTAACG	GGTCTTGCCCCACTT
Aggrecan	AAGGAGTGCCTGGACACAAT	GTCGTAATGCTGCTGCCTAT
	CTTCAGTCGGTCTCCGTAAAAC	GTGACTCCACTGATGATTCCG
Collagen II	ATGAAAATGAAGGCTCTCC	GCAGAAGCTCCATACCAGCA

**1.5.5 ELISA 检测** 各组细胞上清液中 TNF-α 和 MMP-13 的含量 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验, 细胞分组同上, 置于 37 ℃, 5%CO<sub>2</sub> 下培养 24 h, 按 ELISA 试剂盒要求检测各组细胞上清液中 TNF-α 和 MMP-13 的含量。

**1.5.6 免疫荧光实验** 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验, 细胞分组同上, 置于 37 ℃, 5%CO<sub>2</sub> 下培养 24 h, PBS 清洗 3 次, 加入适量 4% 多聚甲醛固定 30 min, 在 0.1% TritonX-100 液中通透 30 min, PBS 清洗, 5% 山羊血清中室温下进行封闭, 60 min 后弃掉封闭液, 以 1:500 的稀释比例加入一抗 (TNF-α 和 MMP-13), 置于冰箱中维系 4 ℃ 避光过夜, 次日洗片加入已用 PBS 稀释过的荧光二抗, 常温下避光孵育, 苏木精进行细胞核染色, 50% 甘油封片, 显微镜下观察。

**1.5.7 免疫组化实验** 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验, 细胞分组同上, 置于 37 ℃, 5%CO<sub>2</sub> 下培养 24 h, 收集细胞, 弃掉培养基, 以 PBS 漂洗 3 次, 室温下 4% 多聚甲醛进行固定 30 min, 置于 3% 冰醋酸中 30 min, 以灭活内源性的过氧化物酶, 5% 山羊血清中室温下封闭 30 min, 加入一抗 (Aggrecan 和 Collagen II 的稀释比例均为 1:500), 置于冰箱中维系 4 ℃ 避光

过夜, 根据链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 免疫组织化学试剂盒要求加入二抗, 室温下孵育 30 min, 苏木精复染细胞核后, PBS 清洗, 中性树脂封片, 显微镜下观察, 每张切片随机选取 5 个不同视野, Image J 图像处理软件统计分析阳性细胞比例。

**1.5.8 Western Blot 实验** 取对数生长期的 ATDC 细胞进行实验, 细胞分组同上, 置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 下培养 24 h, 收集各组细胞, 以适量 RIPA 细胞裂解液裂解细胞后, 4 ℃ 下离心, 收集蛋白标本, BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 将样本蛋白变性, 取适量进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳, 湿法转至 PVDF 膜上, 5% 山羊血清封闭, 加入一抗 (兔抗 SIRT1、FOXO1、Ac-FOXO1、Bcl-2、Bax 抗体均为 1:500), 置于冰箱中维系 4 ℃ 避光过夜, 次日加入辣根过氧化物标记的二抗, 室温下进行孵育, PBS 清洗 3 次, 以增强型化学发光 (ECL) 试剂显影 30 min, 以 GAPDH 为参照<sup>[14]</sup>, 分析目标蛋白的灰度值。

1.6 统计学方法

实验所得数据采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 采用 Graphpad8.0 作图, 对于各组样本中的细胞凋亡率及样本中蛋白的表达量等, 符合正态分布的数据采用  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 满足方差齐性则多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验, 若不足方差齐性, 则采用 Tamhane  $T_2$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乌头汤对脂多糖炎性环境中 ATDC 细胞生长活性的影响

Calcein-AM/PI 染色结果显示, 与对照组 ATDC 细胞相比, 脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞的生长活性明显降低; 与脂多糖组 ATDC 细胞相比, 乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞的生长活性明显升高; 与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞相比, 乌头汤高剂量组细胞的生长活性明显升高; 与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞相比, 抑制剂组细胞的生长活性明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2 和图 1。

表 2 各组细胞生长活性与细胞的凋亡率 ( $\bar{x} \pm s, n=8, \%$ )

组别	增殖活性	细胞的凋亡率
对照组	93.49±6.25	5.69±0.85
脂多糖组	15.45±5.31 <sup>1)</sup>	37.27±1.26 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	35.34±4.17 <sup>1)2)</sup>	21.47±0.89 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	75.37±6.38 <sup>1)2)3)</sup>	14.56±0.71 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	58.22±3.39 <sup>1)2)4)</sup>	16.82±0.27 <sup>1)2)4)</sup>

注: 1) 与对照组比,  $P < 0.05$ ; 2) 与脂多糖组比,  $P < 0.05$ ; 3) 与乌头汤低剂量组比,  $P < 0.05$ ; 4) 与乌头汤高剂量组比,  $P < 0.05$ 。

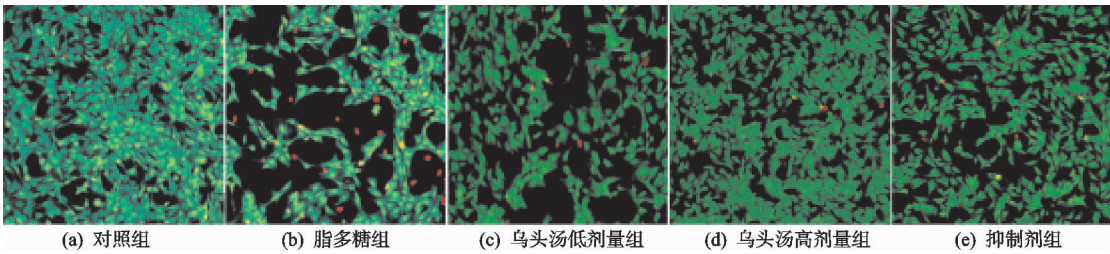


图 1 乌头汤对炎症环境中 ATDC 细胞体外生长的影响(×400)

2.2 乌头汤对脂多糖炎症环境中 ATDC 的细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组 ATDC 细胞比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞的凋亡率明显升高;与脂多糖组 ATDC 细胞

比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞的凋亡率明显降低;与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞的凋亡率明显降低;与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞比,抑制剂组细胞的凋亡率明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2 和表 2。

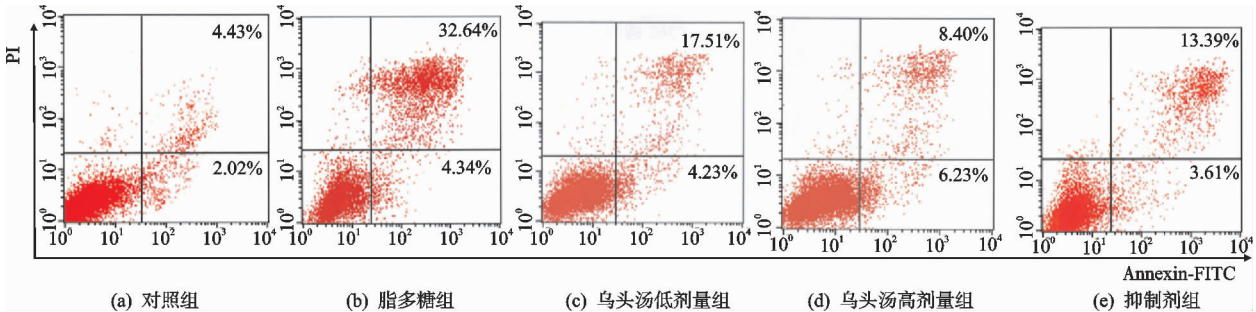


图 2 乌头汤对炎症环境中 ATDC 细胞凋亡的影响

2.3 乌头汤对脂多糖炎症环境中 ATDC 细胞中相关基因表达的影响

PCR 结果显示,与对照组 ATDC 细胞比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 TNF- $\alpha$ 、MMP-13、FOXO1 的 mRNA 表达明显升高,Aggrecan、Collagen II、SIRT1 的 mRNA 表达明显降低;与脂多糖组 ATDC 细胞比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 TNF- $\alpha$ 、MMP-13、FOXO1 的 mRNA 表达明显降低,Aggrecan、Collagen II、SIRT1 的 mRNA 表达明显升高;与乌头汤低剂量

组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞中 TNF- $\alpha$ 、MMP-13、FOXO1 的 mRNA 表达明显降低,Aggrecan、Collagen II、SIRT1 的 mRNA 表达明显升高;与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞比,抑制剂组细胞中 TNF- $\alpha$ 、MMP-13、FOXO1 的 mRNA 表达明显升高,Aggrecan、Collagen II、SIRT1 的 mRNA 表达明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

2.4 乌头汤对脂多糖炎症环境中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 表达的影响

ELISA 试剂盒结果显示,与对照组 ATDC 细胞

表 3 各组细胞中相关基因的表达( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

组别	TNF- $\alpha$	MMP-13	Aggrecan	Collagen II	SIRT1	FOXO1
对照组	1.00 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.08	0.95 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.09
脂多糖组	3.57 $\pm$ 0.78 <sup>1)</sup>	3.36 $\pm$ 0.44 <sup>1)</sup>	0.25 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	0.28 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.15 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>	3.78 $\pm$ 0.85 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	2.21 $\pm$ 0.53 <sup>1)2)</sup>	2.34 $\pm$ 0.32 <sup>1)2)</sup>	0.43 $\pm$ 0.05 <sup>1)2)</sup>	0.39 $\pm$ 0.07 <sup>1)2)</sup>	0.38 $\pm$ 0.06 <sup>1)2)</sup>	2.69 $\pm$ 0.41 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	1.35 $\pm$ 0.17 <sup>1)2)3)</sup>	1.28 $\pm$ 0.11 <sup>1)2)3)</sup>	0.71 $\pm$ 0.06 <sup>2)3)</sup>	0.68 $\pm$ 0.05 <sup>2)3)</sup>	0.83 $\pm$ 0.05 <sup>2)3)</sup>	1.35 $\pm$ 0.17 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	1.82 $\pm$ 0.26 <sup>1)2)4)</sup>	1.96 $\pm$ 0.13 <sup>1)2)4)</sup>	0.52 $\pm$ 0.09 <sup>1)2)4)</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>1)2)4)</sup>	0.61 $\pm$ 0.11 <sup>1)2)4)</sup>	2.07 $\pm$ 0.19 <sup>1)2)4)</sup>

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比, $P<0.05$ ;3)与乌头汤低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与乌头汤高剂量组比, $P<0.05$ 。

比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量明显升高;与脂多糖组 ATDC 细胞比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量明显降低;与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量明显降低;与乌头汤高剂量组细胞比,抑制剂组

细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

细胞免疫荧光结果显示,与对照组 ATDC 细胞比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的荧光强度明显升高;与脂多糖组 ATDC 细胞比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的

表 4 各组细胞上清液中 TNF-α 和 MMP-13 的含量(̄x±s,n=8,pg/mL)

组别	TNF-α	MMP-13
对照组	52.74±3.37	1 158.72±112.08
脂多糖组	276.91±18.29 <sup>1)</sup>	4 587.42±259.61 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	191.58±11.62 <sup>1)2)</sup>	3 325.87±187.56 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	100.83±9.94 <sup>1)2)3)</sup>	1 580.37±157.22 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	145.73±12.56 <sup>1)2)4)</sup>	2 469.15±113.49 <sup>1)2)4)</sup>

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比, $P<0.05$ ;3)与乌头汤低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与乌头汤高剂量组比, $P<0.05$ 。

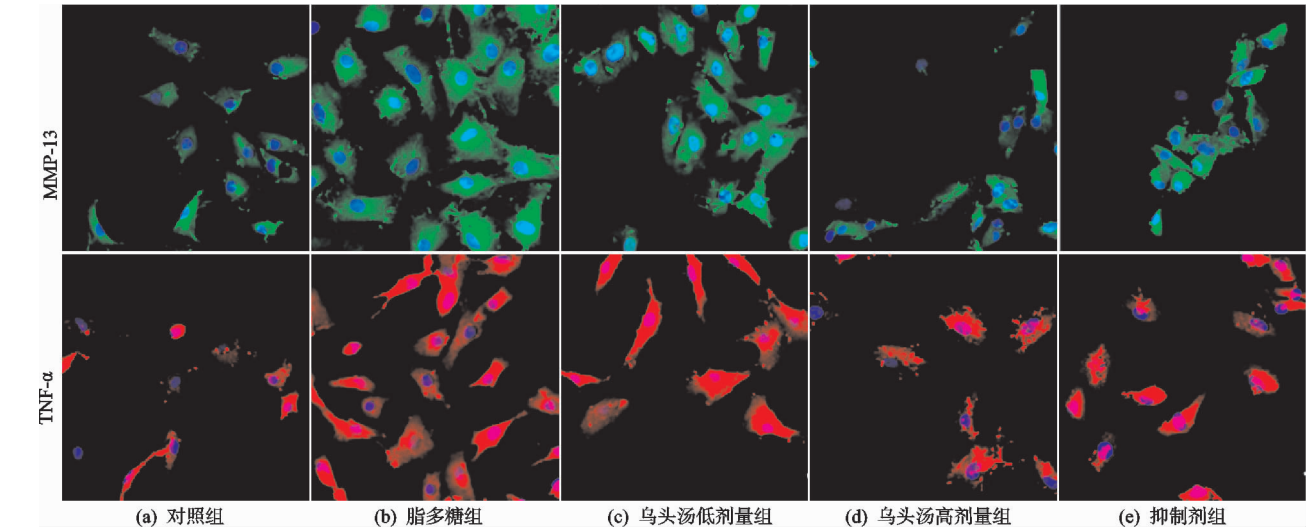


图 3 乌头汤对炎症环境中 ATDC 细胞 TNF-α 和 MMP-13 表达的影响(×400)

表 5 各组细胞中 TNF-α 和 MMP-13 表达的荧光相对强度(̄x±s,n=8)

组别	TNF-α	MMP-13
对照组	0.99±0.06	1.01±0.05
脂多糖组	17.54±1.37 <sup>1)</sup>	13.41±1.43 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	6.49±0.84 <sup>1)2)</sup>	9.22±1.07 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	1.72±0.23 <sup>1)2)3)</sup>	1.83±0.16 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	4.18±0.36 <sup>1)2)4)</sup>	5.64±0.73 <sup>1)2)4)</sup>

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比, $P<0.05$ ;3)与乌头汤低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与乌头汤高剂量组比, $P<0.05$ 。

明显降低;与脂多糖组 ATDC 细胞比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 Aggrecan 和 Collagen II 阳性细胞的比例明显升高;与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞中 Aggrecan 和 Collagen II 阳性细胞的比例明显升高;与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞比,抑制剂组细胞中 Aggrecan 和 Collagen II 阳性细胞的比例明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 6 和图 4。

2.6 乌头汤对脂多糖炎症环境中 ATDC 细胞通路相关蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示,与对照组 ATDC 细胞比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制

荧光强度明显降低;与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞中 TNF-α 和 MMP-13 的荧光强度明显降低;与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞比,抑制剂组细胞中 TNF-α 和 MMP-13 的荧光强度明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3 和表 5。

2.5 乌头汤对脂多糖炎症环境中 ATDC 细胞 Aggrecan 和 Collagen II 表达的影响

细胞免疫组化结果显示,与对照组 ATDC 细胞比,脂多糖组、乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 Aggrecan 和 Collagen II 阳性细胞的比例

表 6 各组细胞中 Aggrecan 和 Collagen II 阳性细胞的比例(̄x±s,n=8,%)

组别	Aggrecan	Collagen II
对照组	93.48±4.53	94.95±3.35
脂多糖组	31.28±6.57 <sup>1)</sup>	27.17±7.71 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	48.91±5.21 <sup>1)2)</sup>	41.22±6.49 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	83.67±4.82 <sup>1)2)3)</sup>	82.76±5.34 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	70.27±2.26 <sup>1)2)4)</sup>	67.64±4.19 <sup>1)2)4)</sup>

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比, $P<0.05$ ;3)与乌头汤低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与乌头汤高剂量组比, $P<0.05$ 。

剂组细胞中 SIRT1、Bcl-2 的表达明显降低,Ac-FOXO1、Bax 的表达明显升高;与脂多糖组 ATDC 细胞比,乌头汤低剂量组、乌头汤高剂量组、抑制剂组细胞中 SIRT1、Bcl-2 的表达明显升高,Ac-FOXO1、Bax 的表达明显降低;与乌头汤低剂量组 ATDC 细胞比,乌头汤高剂量组细胞中 SIRT1、Bcl-2 的表达明显升高,Ac-FOXO1、Bax 的表达明显降低;与乌头汤高剂量组 ATDC 细胞比,抑制剂组细胞中 SIRT1、Bcl-2 的表达明显降低,Ac-FOXO1、Bax 的表达明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );而 FOXO1 在各组细胞中的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 5 和表 7。



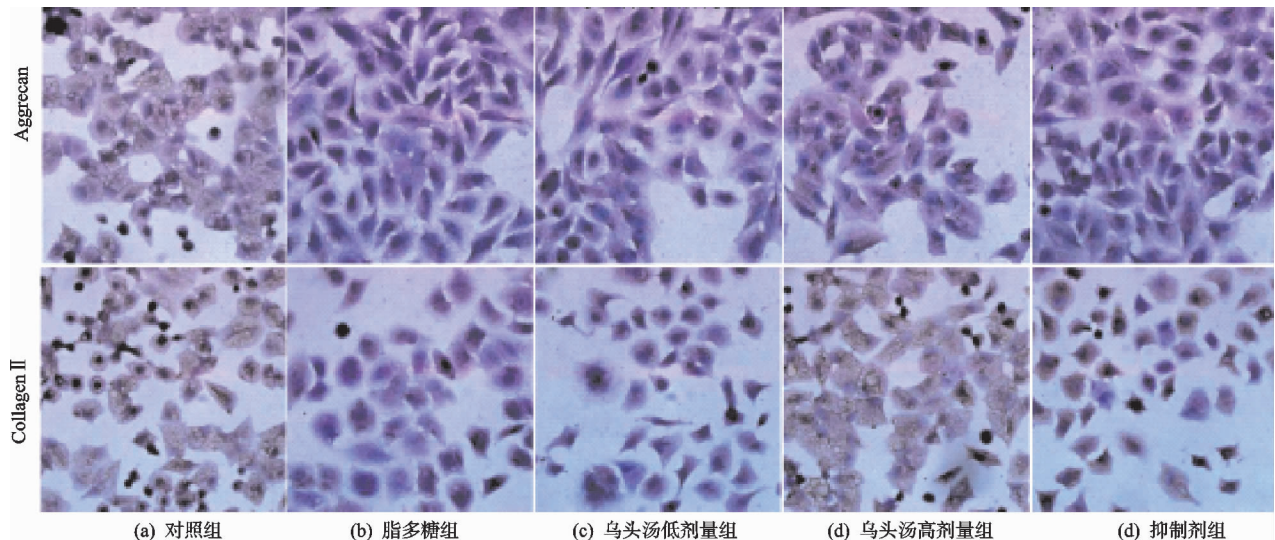


图 4 乌头汤对炎性环境中 ATDC 细胞 Aggrecan 和 Collagen II 表达的影响(×400)

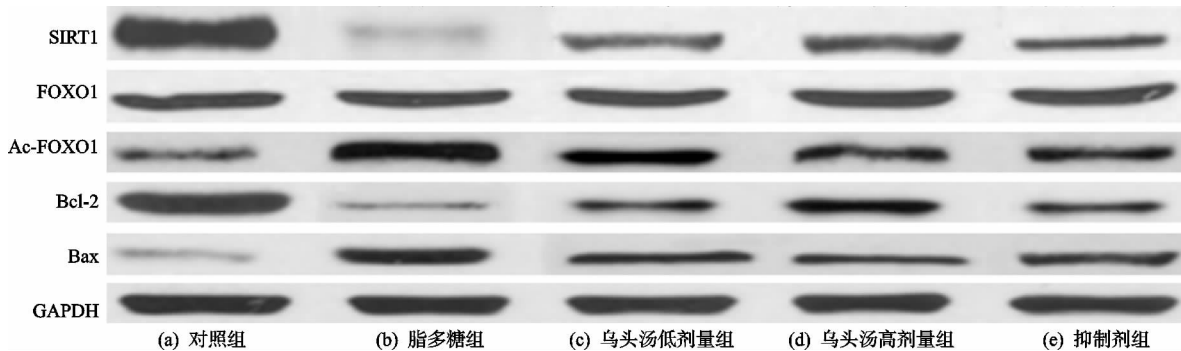


图 5 乌头汤对炎性环境中 ATDC 细胞通路相关蛋白表达的影响

表 7 各组细胞通路相关蛋白的表达( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	SIRT1	FOXO1	Ac-FOXO1	Bcl-2	Bax
对照组	1.02±0.08	1.05±0.07	0.98±0.09	0.98±0.06	1.00±0.05
脂多糖组	0.10±0.05 <sup>1)</sup>	1.08±0.06	2.72±0.25 <sup>1)</sup>	0.15±0.06 <sup>1)</sup>	2.48±0.27 <sup>1)</sup>
乌头汤低剂量组	0.38±0.11 <sup>1)2)</sup>	0.99±0.05	2.17±0.19 <sup>1)2)</sup>	0.42±0.12 <sup>1)2)</sup>	2.25±0.18 <sup>1)2)</sup>
乌头汤高剂量组	0.85±0.06 <sup>1)2)3)</sup>	0.92±0.08	1.43±0.13 <sup>1)2)3)</sup>	0.83±0.07 <sup>1)2)3)</sup>	1.54±0.11 <sup>1)2)3)</sup>
抑制剂组	0.74±0.08 <sup>1)2)4)</sup>	0.97±0.09	1.91±0.15 <sup>1)2)4)</sup>	0.65±0.05 <sup>1)2)4)</sup>	1.83±0.09 <sup>1)2)4)</sup>

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与脂多糖组比, $P<0.05$ ;3)与乌头汤低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与乌头汤高剂量组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

骨关节炎是一种常见的严重影响人类健康的退行性骨骼疾病之一,膝关节是该病的高发、多发部位;肥胖、累积性的微小创伤、环境、高龄、软骨细胞代谢异常等均可导致该病的发生,其中高龄是重要的高危因素,并且随着现代社会老龄化的加剧,该病的发病率急剧上升。该病发病的分子机制尚不完全明确<sup>[15]</sup>,现有的治疗手段只是减少炎症,缓解症状,无法从根本上帮助患者摆脱疾病困扰。因此,深入探讨骨关节炎病变中分子进展机制,寻找灵敏而关键的治疗靶点,在临床上具有重要意义。

中医学认为该病属于“痹证、风寒湿痹”“膝痹证”的范畴,多为肝肾亏虚、气血不足,风寒湿邪侵袭痹阻经络,关节受累,致使痹证日久,邪气久羁,深经入股,

气血不畅,经络难以通达,进而关节活动受阻,多伴有难以避免的疼痛;在“本虚标实”“本痿标痹”等思想的指导下,中医临床医师积累了大量的治疗骨关节炎的经验,形成了从肝论治取穴针灸、消定膏外敷联合“柔筋养精”手法、补肾壮筋汤、附子汤加味方、四妙散等一系列的针灸或方剂,用于骨关节炎的治疗,治疗效果显著,毒副反应少,病情不易反复<sup>[16]</sup>。中医经典名方乌头汤出自《金匱要略》,由制川乌、黄芪、炙甘草、麻黄、芍药等中药组成,其中,制川乌(乌头)味辛、苦,性温,入心、肝、肾、脾经,有疏利迅捷、通达关腠之效;麻黄可宣散风寒,通经活络,利达气机;黄芪益气补血,并可减乌头之心热过盛,辅以芍药、甘草,补血养血,能温阳止痛<sup>[17]</sup>。Cheng 等<sup>[18]</sup>研究显示在类风湿关节炎大鼠模型中,乌头汤能明显抑制实验动物膝关节软骨组织中

的炎症介质的释放,抑制软骨组织中细胞的凋亡,改善实验大鼠的临床症状。本研究结果显示经乌头汤低、高剂量干预后,软骨细胞的生长活性明显升高,细胞凋亡率明显下降,证实乌头汤能明显阻滞骨关节炎的病情进展。

骨关节炎是一种关节软骨受累严重的疾病,Aggrecan和 Collagen II 是软骨细胞外基质的主要成分,在骨关节炎的进展中受炎症介质的影响,主要用于降低软骨的 MMP-13 表达,Aggrecan 和 Collagen II 的表达随之下降,引发软骨细胞以及组织结构的变化。Xia 等<sup>[19]</sup> 研究显示在胶原诱导的骨关节炎大鼠模型中,抑制 MMP-13 的表达能明显升高大鼠膝关节软骨组织中 Aggrecan 和 Collagen II 的表达,缓解实验动物的膝关节功能障碍。已有的研究显示骨关节炎的病情进展是多种基因调控下的多种细胞蛋白因子协同作用的结果<sup>[20]</sup>;作为胞内一种重要去乙酰化酶,SIRT1 信号在氧化与炎症应激反应、生长、物质与能量代谢、衰老与凋亡等病理生理机制中起重要作用<sup>[21]</sup>。Chen 等<sup>[22]</sup> 研究显示在膝骨关节炎小鼠模型中,激活 SIRT1 信号的传导,抑制 FOXO1 的乙酰化,下调 Ac-FOXO1 的表达,能明显降低小鼠膝关节组织的细胞凋亡。本研究结果显示经乌头汤干预后,细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的含量明显下降,软骨细胞中 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的表达明显降低,Aggrecan 和 Collagen II 的表达明显升高,而以 SIRT1 的抑制剂 EX527 做挽救实验结果显示,EX527 能部分逆转乌头汤对软骨细胞的保护作用,证实药物可能通过 SIRT1/FOXO1 来发挥作用。

乌头汤减轻骨关节炎软骨细胞损伤的机制如下:当骨关节炎发生时,软骨细胞处于炎症环境中,炎症介质 TNF- $\alpha$  的表达升高,SIRT1 信号的传导受阻,SIRT1 的表达降低,推动 FOXO1 的乙酰化进程,Ac-FOXO1 的表达升高,MMP-13 的表达增强,该蛋白促进软骨细胞的蛋白多糖(如 Aggrecan)、骨细胞粘连蛋白以及软骨基底膜聚糖等多种蛋白的降解,破坏软骨的正常结构,Collagen II 的表达明显下降,加之软骨细胞所处炎症环境的进展,软骨细胞缺乏正常的生存环境,细胞的活性明显下降,凋亡率明显升高,关节软骨的正常结构随之受损,出现退化性的损伤,促进骨关节炎的进展。而以乌头汤进行干预后,能明显阻滞炎症应激反应的发展,弱化炎症环境的作用,降低相关炎症介质的释放与表达;SIRT1 的表达升高,抑制 FOXO1 的乙酰化,Ac-FOXO1 的表达明显降低,MMP-13 的降解作用受阻,Aggrecan 和 Collagen II 的表达升高,软骨细胞的生长活性升高,凋亡率明显下降,修复受损的病灶组织,病理损伤明显缓解;而以 SIRT1 的抑制

剂 EX527 做挽救实验结果显示,EX527 能部分逆转乌头汤对软骨细胞和软骨组织的保护作用,证实药物可能通过 SIRT1/FOXO1 来发挥作用,见图 6。

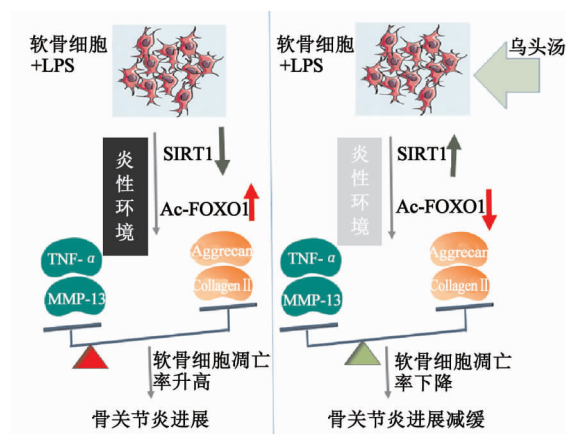


图 6 乌头汤减轻软骨细胞损伤骨关节炎的机制示意图

综上所述,乌头汤能明显下调 TNF- $\alpha$  和 MMP-13 的表达,抑制骨关节炎软骨细胞凋亡,这可能与激活 SIRT1 信号、抑制 FOXO1 的乙酰化有关,但是乌头汤是否还通过其他信号的传导来干预疾病的进展,仍需更为系统的研究。

## 参考文献

- [1] CHEN Y, LIU Y, JIANG K, et al. Linear ubiquitination of LKB1 activates AMPK pathway to inhibit NLRP3 inflammasome response and reduce chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis[J]. J Orthop Translat, 2022, 39(12): 1-11.
- [2] WANG X, ZHAO Y, LI S, et al. Activation of the kynurenine-aryl hydrocarbon receptor axis impairs the chondrogenic and chondroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in osteoarthritis rats[J]. Hum Cell, 2023, 36(1): 163-177.
- [3] CHENG D, ZHANG L, LIANG X. SIRT1 targeted by miR-211-5p regulated proliferation and apoptosis of Dex-treated growth plate chondrocytes via mediating SOX2[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2023, 50(1): 50-58.
- [4] LIN T, ZHANG Z, WU J, et al. A ROS/GAS5/SIRT1 reinforcing feedback promotes oxidative stress-induced adipogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteoporosis[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114(1): 109560-109572.
- [5] HUANG X, CHEN W, GU C, et al. Melatonin suppresses bone marrow adiposity in ovariectomized rats by rescuing the imbalance between osteogenesis and adipogenesis through SIRT1 activation[J]. J Orthop Translat, 2022, 38(10): 84-97.
- [6] JUN Z, XIN M J, YUE L, et al. Jumonji domain containing-3 (JMJD3) inhibition attenuates IL-1 $\beta$ -induced chondrocytes damage in vitro and protects osteoarthritis cartilage in vivo[J]. Inflamm Res, 2020, 69(7): 657-666.

- [7] 陈长兴,仲卫红,金灵璐,等.乌头汤抑制膝关节炎软骨细胞氧化应激反应的作用研究[J].风湿病与关节炎,2022,11(11):1-4.
- [8] KEDZIORA M,BOCCCELLA S,MARABESE I,et al. Inhibition of anandamide breakdown reduces pain and restores LTP and monoamine levels in the rat hippocampus via the CB<sub>1</sub> receptor following osteoarthritis[J]. *Neuropharmacology*,2023,222(1):109304-109314.
- [9] DAGNEAUX L,LIMBERG A K,OWEN A R,et al. Knee immobilization reproduces key arthrofibrotic phenotypes in mice[J]. *Bone Joint Res*,2023,12(1):58-71.
- [10] KAYA S,BAILEY K N,SCHYRMAN C A,et al. Bone-cartilage crosstalk informed by aging mouse bone transcriptomics and human osteoarthritis genome-wide association studies[J]. *Bone Rep*,2022,18(12):101647-101658.
- [11] MA K,SINGH G,WANG J,et al. Targeting vascular endothelial growth factor receptors as a therapeutic strategy for osteoarthritis and associated pain[J]. *Int J Biol Sci*,2023,19(2):675-690.
- [12] FUJIWARA Y,DING C,SANADA Y,et al. miR-23a/b clusters are not essential for the pathogenesis of osteoarthritis in mouse aging and post-traumatic models[J]. *Front Cell Dev Biol*,2023,10(1):1043259-1043272.
- [13] LI G,LIU S,CHEN Y,et al. Teriparatide ameliorates articular cartilage degradation and aberrant subchondral bone remodeling in DMM mice[J]. *J Orthop Translat*,2022,38(12):241-255.
- [14] HE Q,YANG J,PAN Z,et al. Biochanin a protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc-/GPX4 axis[J]. *Biomed Pharmacother*,2023,157(1):113915-113930.
- [15] CHRISTIANSEN B A,CHAN D D,VAN DER MEULEN M C H,et al. Small-animal compression models of osteoarthritis[J]. *Methods Mol Biol*,2023,2598(1):345-356.
- [16] 武永利,李龙,刘君伟,等.温针灸抑制 NLRP3 炎症小体激活改善兔膝关节炎的软骨损伤[J].中国组织工程研究,2023,27(20):3202-3208.
- [17] 赵文婷,朱兴旺,赵晓峰,等.乌头汤及四妙丸对人肿瘤坏死因子- $\alpha$  转基因关节炎小鼠模型的作用研究[J].中华中医药杂志,2021,36(5):2534-2538.
- [18] CHENG X,PI Z,ZHENG Z,et al. Combined 16S rRNA gene sequencing and metabolomics to investigate the protective effects of Wu-tou decoction on rheumatoid arthritis in rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2022,1199(5):123249-123250.
- [19] XIA T,ZHAO R,HE S,et al. Gardenoside ameliorates inflammation and inhibits ECM degradation in IL-1 $\beta$ -treated rat chondrocytes via suppressing NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2023,640(1):164-172.
- [20] SOPHOCLEOUS A,AZFER A,HUESA C,et al. Probiotics inhibit cartilage damage and progression of osteoarthritis in mice[J]. *Calcif Tissue Int*,2023,112(1):66-73.
- [21] TU Q,XU L L,ZHANG H F,et al. Andrographolide improves the dysfunction of endothelial progenitor cells from angiotensin II-induced hypertensive mice through SIRT1 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2023,642:11-20.
- [22] CHEN J,ZHANG J,LI J,et al. 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency accelerates aging-related osteoarthritis via downregulation of SIRT1 in mice[J]. *Int J Biol Sci*,2023,19(2):610-624.

(收稿日期:2023-07-06)

(上接第 11 页)

- [13] LI X,LU Y,WANG Y,et al. Thermo-responsive injectable naringin-loaded hydrogel polymerised sodium alginate/bioglass delivery for articular cartilage[J]. *Drug Deliv*,2021,28(1):1290-1300.
- [14] CHEN L,LIU G,LI W,et al. Synergistic effects of Indian hedgehog and sonic hedgehog on chondrogenesis during cartilage repair[J]. *J Mol Histol*,2021,52(2):407-418.
- [15] FENG M,LIU W,DING J,et al. Sonic hedgehog induces mesenchymal stromal cell senescence-associated secretory phenotype and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage[J]. *Front Cell Dev Biol*,2021,9:716610.
- [16] CHEN S,GU S,XU M,et al. Krüppel-like factor 9 promotes neuroblastoma differentiation via targeting the sonic hedgehog signaling pathway[J]. *Pediatr Blood Cancer*,2020,67(3):e28108.
- [17] BAUSCH D,FRITZ S,BOLM L,et al. Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer[J]. *Angiogenesis*,2020,23(3):479-492.
- [18] CARADU C,GUY A,JAMES C,et al. Endogenous sonic hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice[J]. *Cardiovasc Res*,2018,114(5):759-770.

(收稿日期:2023-08-09)