

牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用

李淑洁¹, 陈秀娟¹, 任艳红¹, 王伟²

(1. 莱芜市人民医院, 山东 莱芜 271100; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] **目的:**探讨牛膝提取物对碘乙酸钠(MIA)诱导的软骨细胞保护作用。**方法:**通过Ⅱ型胶原酶消化SD大鼠软骨,获得软骨细胞,实验分为5组,分别为正常组,模型组(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MIA),牛膝提取物低剂量组(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MIA),牛膝提取物中剂量组(30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MIA),牛膝提取物高剂量组(100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MIA),造模与给药分别为24 h;MTT法检测各组软骨细胞活力;Hoechst 33258染色法检测各组软骨细胞形态变化;分光光度法检测各组软骨细胞中Caspase-3活性;Western blot分析各组AKT激活状况及下游靶分子Bax,Bcl-2的表达。**结果:**与正常组比较,模型组中软骨细胞活力下降,细胞核发生皱缩或裂解,细胞中Caspase-3活性和Bax表达量上升,Bcl-2表达量下降,AKT磷酸化程度降低,差异均具有显著性意义($P < 0.01$)。与模型组比较,牛膝提取物中、高剂量组可改善软骨细胞活力,恢复软骨细胞形态并抑制Bax表达;牛膝提取物低、中、高剂量组皆能降低大鼠软骨细胞中Caspase-3活性,提高Bcl-2表达,并促进AKT磷酸化,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。**结论:**牛膝提取物具有保护MIA诱导的软骨细胞作用,是通过抑制软骨细胞凋亡实现的,可能与PI3K/AKT信号通路有关。

[关键词] 牛膝提取物; 骨关节炎; 软骨细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0132-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140132

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150610.0953.012.html>

[网络出版时间] 2015-06-10 9:53

Protective Effect of Achyranths Bidentatae Radix Extracts on Monosodium Iodoacetate-induced Chondrocytes Injury LI Shu-jie¹, CHEN Xiu-juan¹, REN Yan-hong¹, WANG Wei² (1. Laiwu City People's Hospital, Laiwu 271100, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Achyranths Bidentatae Radix (AB) extracts on monosodium iodoacetate (MIA) -induced injury in rat chondrocytes. **Method:** Chondrocytes were isolated from the knee joints of Sprague-Dawley rats by using enzymatic digestion. The experiment was divided into 5 groups: the normal group, the model group (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MIA), the low-, medium-and high-dose AB extract groups (10, 30, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The viability of chondrocytes was detected by MTT assay. The morphology change of chondrocytes was detected by Hoechst 33258 method. The activity of Caspase-3 chondrocytes was measured by spectrophotometry. The activation of AKT and down-stream molecules including Bax, Bcl-2 was assayed by Western Blot. **Result:** Compared with the normal group, the viability of chondrocytes declined, chondrocytes nucleus shrivel or cracking occurred, the activity of Caspase-3 and the level of Bax protein raised, the level of Bcl-2 protein and phosphorylation of AKT declined in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the viability and morphology of chondrocytes were restored, the expression of Bax was inhibited in the medium-and high-dose AB extract groups ($P < 0.01$). Moreover, the activity of Caspase-3 was inhibited, the expression of Bcl-2 and the phosphorylation of AKT were promoted in the low-, medium-and high-dose AB extract groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** These results suggested AB extract exerted anti-apoptosis effect on MIA-induced rat chondrocytes, which might be related to PI3K/AKT signal pathway.

[Key words] Achyranths Bidentatae Radix extract; osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis

[收稿日期] 20150130(133)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(Y2006C02)

[第一作者] 李淑洁,主管药师,Tel:13563446497,E-mail:lwlishujie@126.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性退行性骨关节疾病,其中软骨病变是骨关节炎的中心环节^[1-2]。软骨细胞是软骨中唯一细胞结构,一旦软骨细胞死亡,只能缓慢再生甚至无法再生,而软骨细胞的死亡又破坏了胞外基质合成及降解的平衡,从而进一步加剧 OA^[3]。现治疗 OA 药物主要分为快作用缓解药物和慢作用缓解药物,但由于引起胃肠道不良反应及价格昂贵而限制了应用,因此寻找经济、安全、可靠的中药材具有显著意义。

牛膝 *Achyranthes bidentata* 属于苋科多年生草本植物,又称怀牛膝,是我国传统大宗药材之一,主要以干燥根入药。其具有补肝肾、强筋骨、引血下行及逐瘀通经等功效。药理研究表明牛膝具有抗炎镇痛作用^[4];牛膝醇提物可显著减轻佐剂性关节炎肿胀,并抑制关节滑膜增生^[5];牛膝醇提物能改善关节粘连,促进软骨细胞增殖,上调软骨 II 型胶原表达,恢复软骨基质成分,稳定潮线结构,修复软骨损伤^[6]。从而表明牛膝有抗 OA 作用,但其保护软骨细胞作用机制尚不清楚。因此本课题主要探讨牛膝提取物是否可以抑制碘乙酸钠(MIA)诱导的软骨细胞炎症及其可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重(100 ± 20) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2012-0002。室内温度控制在(23 ± 2) °C,大鼠自由饮食和饮水。

1.2 药品和试剂 牛膝饮片(牛膝购于国大药房,产地为河南,批号 20121001),四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Amresco 公司,批号 050M0304),兔抗 Bax 抗体(批号 1063-1),兔抗 AKT 抗体(批号 1080-1),兔抗 p-AKT 抗体(批号 55081,美国 Epitomics 公司),兔抗 Bcl-2 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA0412); β -actin(批号 AA128),Hoechst 33258 试剂盒(批号 C1026),Caspase-3 检测试剂盒(批号 C1116)均购自碧云天生物技术研究所以。

1.3 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),Eclipse TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司),ChemiDoc™ XRS 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 牛膝提取物的提取^[7] 经干燥的牛膝饮片 1 kg,加入 4 倍体积 75% 乙醇,水浴加热,回流提取 3 次,时间分别为 3,2,2 h。合并 3 次提取液,减压浓缩,称重,即得棕黑色牛膝提取物。

2.2 大鼠软骨细胞的制备^[8] 无菌环境下,刮取 SD 大鼠双侧膝关节胫骨坪、髌骨内侧透明软骨,剪碎至 1 mm³ 大小。依次用 0.25% 的胰蛋白酶及 0.2% 的胶原酶消化。得到单细胞悬液,用 DMEM/F-12 培养基重悬细胞(含 20% 小牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素),在 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养,约 5~6 d 细胞开始融合,实验使用第 2~3 代细胞。

2.3 软骨细胞活力检测(MTT 法) 实验分为 5 组,分别为正常组,模型组(4 μ mol·L⁻¹ MIA),牛膝提取物低剂量组(3 mg·L⁻¹ + 4 μ mol·L⁻¹ MIA),牛膝提取物中剂量组(10 mg·L⁻¹ + 4 μ mol·L⁻¹ MIA),牛膝提取物高剂量组(30 mg·L⁻¹ + 4 μ mol·L⁻¹ MIA),将第 2~3 代软骨细胞进行消化,并调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL,接种,于 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。按各组浓度进行造模或给药,继续培养 24 h,每孔加 MTT(5 g·L⁻¹)20 μ L,4 h 后,弃上清,并每孔加入 DMSO 150 μ L,10 min 后,酶标仪 570 nm 处测定吸光度 A。

2.4 细胞 Hoechst 33258 染色分析 将第 2~3 代软骨细胞进行消化,调整细胞密度为 2 × 10⁵ 个细胞/mL,接种,于 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。按各组浓度进行造模或给药,继续培养 48 h。按照细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒说明书的方法进行固定,染色,并荧光显微镜下检测。

2.5 Caspase-3 活性检测 将第 2~3 代软骨细胞进行消化,调整细胞密度为 2 × 10⁵ 个/mL,接种,于 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。按各组浓度进行造模或给药,继续培养 48 h。按 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒进行检测。

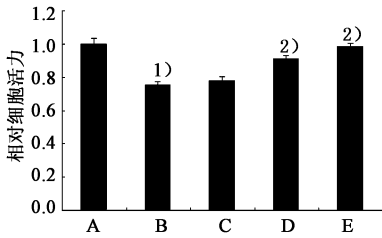
2.6 Western blot 检测 收集处理过的样本,加入裂解液裂解,离心,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样,跑 SDS 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗 4 °C 孵育过夜。次日加二抗孵育后曝光。用 Quantity One 软件对各蛋白条带灰度值进行统计。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 对软骨细胞活力的影响 与正常组比较,模型组中软骨细胞活力显著下降,差异具有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,牛膝提取物中、高剂量组能显著提高软骨细胞活力,差异具有显著性意义

($P < 0.01$)。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 牛膝提取物 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 牛膝提取物 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 牛膝提取物 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2 ~ 5 同); 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图 3 ~ 5 同)

图 1 牛膝提取物对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effects of *Achyranthes bidentata* on MIA-induced chondrocytes viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对 MIA 诱导的软骨细胞形态的影响 正常组中软骨细胞其细胞核染色均匀; 模型组中, 许多细胞核发生皱缩或裂解; 牛膝提取物中、高剂量组能逆转软骨细胞核形态变化。见图 2。

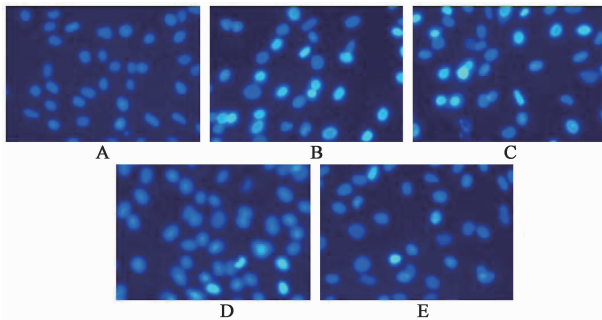


图 2 牛膝提取物对 MIA 诱导的软骨细胞形态的影响 (Hoechst, $\times 100$)
Fig. 2 Effects of *Achyranthes bidentata* on morphology in MIA-treated chondrocytes (Hoechst, $\times 100$)

3.3 对软骨细胞 AKT 蛋白的影响 与正常组比较, 模型组中 AKT 磷酸化程度下降, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牛膝提取物低、中、高剂量组皆能显著提高 AKT 磷酸化程度, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$); 且不管给药造模与否都不影响 AKT 自身的表达。见图 3。

3.4 对软骨细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白的影响 与正常组比较, 模型组中促凋亡蛋白 Bax 含量升高, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 含量下降, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牛膝提取物中、高剂量能显著抑制 Bax 表达, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$); 牛膝低、中、高剂量组能显著提高 Bcl-2 表达量, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$)。见图 4。

3.5 对软骨细胞 Caspase-3 活性的影响 与正常组比较, 模型组中 Caspase-3 活性显著上升, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牛膝提取物

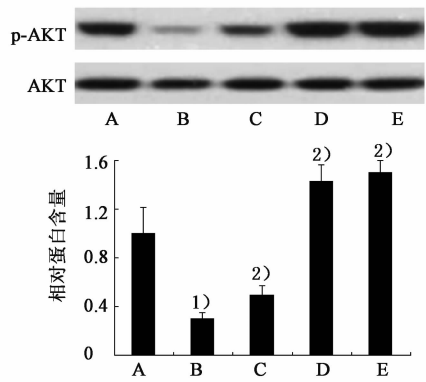


图 3 牛膝提取物对 MIA 诱导的软骨细胞 AKT 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 3 Effects of *Achyranthes bidentata* on expression of AKT in MIA-treated chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

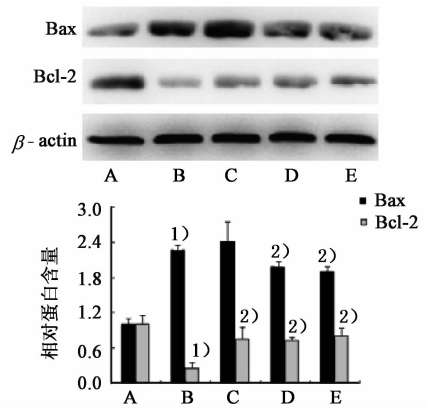


图 4 牛膝提取物对 MIA 诱导的软骨细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 4 Effects of *Achyranthes bidentata* on Bcl-2 and Bax protein in MIA-treated chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

低、中、高剂量组皆显著降低 Caspase-3 活性, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$)。见图 5。

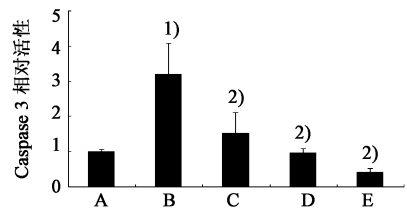


图 5 牛膝提取物对 MIA 诱导的软骨细胞 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 5 Effects of *Achyranthes bidentata* on activity of Caspase-3 in MIA-treated chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

多种因素可引起软骨细胞损伤乃至死亡, 如软骨表面应力异常, 细胞因子 (如 $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ 等) 的作用, NO, 能量代谢抑制剂 (如 MIA) 等。其中, MIA 为糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂, 通过抑制细胞能量代谢而导致细胞因供养不足而死

亡^[9]。体外研究显示, MIA 能造成多种细胞(如神经元细胞, 心肌细胞, 巨噬细胞, Jurkat 细胞等)损伤及死亡^[10]。本实验亦表明 MIA 诱导 24 h 会降低软骨细胞活力, 牛膝提取物低、中、高剂量组一定程度上抑制软骨细胞活力的下降。

越来越多的临床研究和动物实验证实, 在 OA 病变过程中会有大量软骨细胞凋亡^[8,11]。由于软骨中不含吞噬细胞, 没有凋亡小体的清除机制。因此, 如软骨细胞发生凋亡, 则凋亡小体能长期存在于关节软骨中, 导致细胞外基质的降解, 并进一步加剧 OA 的发展。

PI3K/AKT 信号通路可通过 AKT 激酶作用众多靶分子, 例如 Bax, Bcl-2, Caspase-3 等, 调节软骨细胞凋亡活动^[12]。Lee 等^[13]人以鼠软骨细胞为研究对象, 在鼠软骨细胞上转染腺病毒肿瘤坏死因子凋亡相关配体, 经过培养发现, 软骨细胞凋亡显著增加 AKT 磷酸化水平降低, Bcl-2 表达量下降, 而 Bax 表达量上调。本研究结果也显示 MIA 能上调软骨细胞的 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达, 而一定剂量牛膝提取物能依赖性的减弱 MIA 诱导的这种变化。Gomez^[14]在他的研究中发现, 可通过激活小鼠软骨细胞 PI3K/AKT 信号通路, 抑制 Caspase-3 的活化, 最终达到抑制软骨细胞凋亡的目的。活化的 Caspase-3 最终激活脱氧核糖核酸酶, 水解胞核内核酸及细胞骨架, 最终导致细胞凋亡^[15]。本研究发现, 在 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase-3 活性显著提高, 经过给予一定剂量的牛膝提取物可显著降低 Caspase-3 活性。

综上所述, 牛膝提取物具有保护软骨细胞作用, 可抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡, 与下调 Bax 表达, 上调 Bcl-2 表达, 降低 Caspase-3 活性有关, 是通过 PI3K/AKT 信号通路实现的。

[参考文献]

[1] Qin J, Shang L, Ping A S, et al. TNF/TNFR signal transduction pathway-mediated anti-apoptosis and anti-inflammatory effects of sodium ferulate on IL-1beta-induced rat osteoarthritis chondrocytes *in vitro* [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(6):R242-245.

[2] Kontinen Y T, Sillat T, Barreto G, et al. Osteoarthritis as an autoinflammatory disease caused by chondrocyte-mediated inflammatory responses [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(3):613-616.

[3] Tong P, Xu S, Cao G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of

Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1):740-744.

[4] 孙备, 吕凌, 陆忠祥, 等. 三妙丸中牛膝对关节炎大鼠引药作用的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(24):2946-2949.

[5] 周军. 牛膝中化学成分和药理作用研究进展 [J]. *天津药学*, 2009, 21(3):66-67.

[6] 陈光亮, 刘海鹏, 韩茹, 等. 萆薢总皂苷合用牛膝总皂苷降尿酸和抗炎作用的组方合理性研究 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(11):1467-1471.

[7] 张小鸿, 吴杨峥, 徐先祥. 不同显色剂对牛膝总皂苷含量测定的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(21):113-116.

[8] Zhang X, Xu X, Xu T, et al. Beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF-kappaB signaling pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2014, 75(3):195-201.

[9] Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Pinzano A, et al. Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection *in vitro* and during experimental osteoarthritis [J]. *FASEB J*, 2006, 20(1):65-75.

[10] Gutmann B, Hutter-Paier B, Skofitsch G, et al. *In vitro* models of brain ischemia: the peptidergic drug cerebrolysin protects cultured chick cortical neurons from cell death [J]. *Neurotox Res*, 2002, 4(1):59-65.

[11] Aigner T, Kim H A. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(8):1986-1996.

[12] Huang Y, Wu D, Fan W. Protection of ginsenoside Rg1 on chondrocyte from IL-1beta-induced mitochondria-activated apoptosis through PI3K/Akt signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2):249-257.

[13] Lee H S, Lee J H, Kim C E, et al. Anti-neovascular effect of chondrocyte-derived extracellular matrix on corneal alkaline burns in rabbits [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(6):951-961.

[14] Gomez R, Conde J, Scotece M, et al. Endogenous cannabinoid anandamide impairs cell growth and induces apoptosis in chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(9):1137-1146.

[15] Errami Y, Naura A S, Kim H, et al. Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5):3460-3468.

[责任编辑 周冰冰]