

独活寄生汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠关节软骨细胞凋亡及 GRP78, CHOP, HIRA 及 ASF1a 表达的影响

孙鹏¹, 李建^{1*}, 樊炜骏¹, 唐宁¹, 沙明波¹, 鲁育¹, 李华南¹, 陈少青²

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193;
2. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古通辽 028000)

[摘要] 目的:观察独活寄生汤含药血清抗膝骨性关节炎(KOA)大鼠关节软骨细胞凋亡、内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78),CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)及衰老蛋白组蛋白调节因子(HIRA),染色质组装和调节复合因子1a(ASF1a)的影响。方法:采用Hulth法建立KOA模型大鼠,模型成功后采用酶原消化法培养正常软骨细胞与KOA软骨细胞;另将40只大鼠分为独活寄生汤低、中、高剂量组(0.85,1.7,3.4 g·kg⁻¹)及阳性药组(硫酸氨基葡萄糖胶囊3 g·kg⁻¹),灌胃14 d后处死取血清;将培养细胞分为空白组、模型组、独活寄生汤含药血清低、中、高剂量组(对应剂量组大鼠血清培养)及阳性药组(阳性药组大鼠血清培养);采用活性检测试剂盒(CCK-8)法检测各组软骨细胞增值率;采用TUNEL法检测各组软骨细胞凋亡情况;蛋白质免疫印迹(Western blot)检测各组软骨细胞中ASF1a,HIRA,GRP78及CHOP蛋白的表达。结果:与空白组软骨细胞比较,模型组细胞增殖抑制率明显升高,与模型组细胞比较,独活寄生汤含药血清低、中、高剂量组及阳性药组软骨细胞增殖抑制率降低($P < 0.05$);与空白组软骨细胞比较,模型组细胞凋亡数量明显增加($P < 0.05$),与模型组软骨细胞比较,独活寄生汤低、中、高剂量组及阳性药组细胞凋亡数量明显降低($P < 0.05$);与空白组软骨细胞比较,模型组细胞中ASF1a,HIRA,GRP78及CHOP蛋白表达明显升高($P < 0.05$),与模型组软骨细胞比较,独活寄生汤低、中、高剂量组及阳性药组细胞中ASF1a,HIRA,GRP78及CHOP蛋白表达降低($P < 0.05$)。结论:独活寄生汤含药血清可通过减少KOA软骨细胞内质网应激相关因子GRP78,CHOP及衰老相关因子ASF1a,HIRA的表达,从而起到抑制KOA软骨细胞衰老、凋亡,促进软骨细胞再生的作用,进而起到治疗KOA的目的。

[关键词] 独活寄生汤;膝骨性关节炎;内质网应激;软骨细胞;凋亡;衰老

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)13-0158-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130158

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.0958.036.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 9:58

Effect of Serum Containing Duhuo Jisheng Tang on Expressions of GRP78, CHOP, HIRA and ASF1a and Apoptosis and in Articular Chondrocytes of Rats with Knee Osteoarthritis

SUN Peng¹, LI Jian^{1*}, FAN Wei-jun¹, TANG Ning¹, SHA Ming-bo¹, LU Yu¹, LI Hua-nan¹, CHEN Shao-qing²

(1. *The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;*
2. *Hospital Affiliated to Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang for rat knee osteoarthritis (KOA) on articular chondrocyte apoptosis, endoplasmic reticulum stress related proteins glucoseregulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhance-binding protein homologous protein (CHOP) and anti-

[收稿日期] 20170119(013)

[基金项目] 内蒙古自然科学基金项目(2016MS08125)

[第一作者] 孙鹏, 硕士, 主治医师, 从事膝骨性关节炎的发病机制与推拿、药物治疗研究, Tel:13821007731, E-mail:ZYsunpeng@126.com

[通讯作者] *李建, 主治医师, 从事脊柱关节及相关组织疾病的预防和治疗研究, Tel:13820118618, E-mail:froncojian@163.com

aging proteins HIRA, ASF1a. **Method:** Hulth method was adopted to establish the rat KOA model. After successful modeling, enzyme digestion method was applied in primary culture of normal chondrocytes and KOA cartilage cells; Forty rats were divided into four groups: low, middle and high-dose groups ($0.85, 1.7, 3.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and positive control group (glucosamine sulfate, $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 14 days of intragastric administration, serum was collected. Cultured cells were divided into control group, model group, Duhuo Jisheng Tang-containing serum groups (high, middle and low-dose groups) and positive control group; cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to test the cell proliferation of each group; TUNEL method was used to measure the cell apoptosis of each group. The expressions of ASF1a, HIRA, GRP78 and CHOP in chondrocytes were detected by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the inhibition rate of cell proliferation was significantly increased in the model group; compared with the model group, the proliferation inhibition rates of chondrocytes in the low, middle, high-dose Duhuo Jisheng Tang groups and the positive control group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the control group, the number of apoptotic cells in the model group was significantly increased; compared with the model group, the apoptotic rates of chondrocytes in the low, middle, high-dose Duhuo Jisheng Tang groups and the positive control group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of ASF1a, HIRA, GRP78 and CHOP in the model group were significantly higher than those in the control group; and compared with the model group, the expressions of ASF1a, HIRA, GRP78 and CHOP in chondrocytes of the low, middle, high-dose Duhuo Jisheng Tang groups and the positive control group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The serum containing Duhuo Jisheng Tang could reduce the expressions of GRP78, CHOP and ASF1a, HIRA in KOA chondrocytes, inhibit the aging and apoptosis of KOA chondrocytes, and promote the regeneration of chondrocytes, so as to treat KOA.

[**Key words**] Duhuo Jisheng Tang; osteoarthritis; endoplasmic reticulum stress; chondrocyte; apoptosis; aging

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 在临床极为常见,世界卫生组织数据显示,超过 60 岁的人群中 KOA 在男性发病率为 9.6%,女性发病率约为 18%^[1]。发生的主要原因为关节软骨变性及其丢失^[2]。中医认为,膝骨关节炎属于“骨痹”、“膝痹”范畴,在现今社会中,中老年人发病率日益增高^[3],独活寄生汤出自《备急千金要方》,由独活、寄生、防风、当归、茯苓、党参、熟地黄、防风、秦艽、白芍、川牛膝、川芎、制川乌、细辛、甘草共 15 味中药组成,是公认治疗“膝痹”的经典方剂^[4],目前已有的文献报道中,主要以探讨独活寄生汤治疗骨关节病的整体临床疗效为主^[5],缺乏该经典方剂对于膝关节各组织或细胞作用的研究。近年来随着医学检测技术的发展,单独对组织、细胞进行研究已比较普遍,林一峰等^[6]发现,衰老相关蛋白在 KOA 大鼠软骨细胞中呈高表达,说明从分子水平说明细胞衰老也是 KOA 的发病机制之一。另有学者证实,内质网应激信号转导通路在 KOA 大鼠软骨细胞凋亡中起到了重要作用^[7]。基于上述科学依据,本研究采用 Hulth 造模法制备 KOA 大鼠模型并分离其软骨细胞,拟用独活寄生汤含药血清体外培养 KOA 软骨细胞,观察独活

寄生汤对 KOA 软骨中内质网应激标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78),CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP),衰老相关蛋白染色质组装和调节复合体因子 1a (ASF1a),组蛋白调节因子 (HIRA) 的影响,以及对 KOA 软骨细胞增殖与凋亡情况,为独活寄生汤治疗 KOA 提供理论与实践依据。

1 材料

1.1 动物及细胞株 雄性 Wistar 大鼠 25 只,体重 (180 ± 5) g,由天津中医药大学医学动物实验中心提供,动物合格证号为 SCXK (津) 2009-0002,大鼠生长条件为 22 ℃,常规饮食,日照时间为每天 12 h,实验室通风较好,湿度为 53%。本研究通过天津中医药大学第一附属医院伦理委员会审查,伦理批件号 TYLL2014 [K] 字 012。KOA 细胞 (经 Hulth 经典造模后,自行分裂获得)。

1.2 药物及试剂 细胞计数试剂盒 (CCK-8,日本 Dojindo 公司,批号 CK04-1000T); anti-GRP78, anti-CHOP, anti- β -肌动蛋白 (β -actin) (欣博盛公司,批号分别为 GTX62592, GTX63049, GTX66983); anti-HIRA 及 anti-ASF1a (美国 Sigma 公司,批号分别为 089K0745, 091K0679); TUNEL 试剂盒 (碧云天公

司,批号 C1168)。

1.3 仪器 WD-9413B 型凝胶成像系统,WD-9405B 型水平摇床(北京六一公司);BX43 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);ChemDoc XRS 型化学发光成像仪(美国 Bio-Red 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 大鼠 25 只分为空白组($n = 10$)和模型组($n = 15$),模型组采用 Hulth 造模法^[8],在无菌情况下于大鼠膝关节内侧纵行切开 2 cm 切口,用无菌眼科剪子剪断内侧副韧带及前后交叉韧带,仅保留关节软骨面,缝合后不固定伤肢,给予腹腔注射青霉素钠(3×10^4 U)预防感染。2 组大鼠均给予正常饮食,自由活动,造模 4 周后,摘取大鼠膝关节软骨组织,用于培养软骨细胞。

2.2 药物制备 独活寄生汤组成:独活 9 g,桑寄生 6 g,当归 6 g,茯苓 6 g,党参 6 g,熟地黄 6 g,防风 6 g,秦艽 6 g,白芍 6 g,川牛膝 6 g,川芎 6 g,制川乌 6 g(先煎),细辛 6 g,甘草 6 g。大鼠给药剂量按照人鼠体表面积比值换算,由天津中医药大学附属医院中药制剂室浓缩煎制成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液,硫酸氨基葡萄糖胶囊制成 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 药液。

2.3 动物分组、给药及取材 另饲养大鼠 40 只,将 40 只大鼠随机分为低、中、高剂量组及阳性药组,每组 10 只,低、中、高剂量组大鼠分别给予独活寄生汤中药 $0.85, 1.7, 3.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃^[5],阳性药组大鼠给予硫酸氨基葡萄糖 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃^[9],1 次/d,连续给药 14 d,末次给药 2 h 后处死大鼠,并在无菌条件下腹主动脉采血 5 mL,静置 2 h 后低温 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 15 min 分离血清,于 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴灭活 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.4 细胞分组及培养方法 将细胞分为 6 组,分别为空白组:未造模的大鼠膝关节软骨细胞进行细胞原代培养获得,加入 20% 胎牛血清培养;模型组:采用模型组 KOA 大鼠膝关节软骨细胞原代培养,加入 20% 胎牛血清培养;低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组 KOA 细胞来源同模型组,分别加入低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组大鼠血清进行培养。

2.5 免疫组化鉴定 将 4% 多聚甲醛滴入装有各组软骨细胞的 12 孔板中,15 min 后除去 4% 多聚甲醛,加入 0.1% Triton $\times 100$ 反应 20 min,以达到孵育目的,再加入 3% H_2O_2 孵育 20 min 后震荡清洗、封闭,将 II 型胶原一抗用 PBS 按 1:200 稀释,滴加至 12 孔板中均匀覆盖细胞,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。二抗 37 $^\circ\text{C}$ 温箱

中孵育 1 h,清洗后将 HRP 标记链霉亲和素稀释 200 倍,均匀覆盖细胞,20 $^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h。将显色试剂 A 与 B 按 1:1 混合后适量加入 12 孔板中,显色 10 min;清除板中蒸馏水后滴入苏木素,染色 10 min 后清洗;滴加 1% 盐酸乙醇中分化 2 s,立即用蒸馏水反蓝 18 min。用 50% 甘油(甘油-蒸馏水 = 1:1)封片镜检。

2.6 CCK-8 法鉴定细胞增殖 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖率,严格按照说明书操作。将各组软骨细胞接种于 96 孔板,密度为 5×10^3 个/孔,分别培养 24,48,72 h,各组各做 6 孔。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 A 。

$$\text{增殖抑制率} = [(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{阴性组}}] \times 100\%$$

2.7 TUNEL 鉴定细胞凋亡 培养 48 h 的各组细胞组织经过 0.1% Triton X-100 透化后,漂洗 3 次,再滴加 3% H_2O_2 200 μL ,漂洗后加入蛋白酶 K 工作液置常温下 20 min;漂洗后加入 TUNEL 反应液(TdT + 荧光素标记的 dUTP)37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中避光孵育 60 min;清洗后加入 DAPI,最后防荧光淬灭封片剂封片。随机移动组织切片,选取细胞分布较均匀的高倍视野计数 1 000 个以上,在相邻的 10 个视野下,红褐色细胞即阳性细胞。凋亡指数(AI)计算。

$$\text{AI} = \text{各视野阳性细胞数} / \text{视野所有细胞总数} \times 100\%$$

2.8 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 GRP78, CHOP, HIRA 及 ASF1a 蛋白的表达 培养 48 h 的加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂 PMSF,提取蛋白质,测定浓度。取样 15 μL 以 10% 的 SDS-PAGE 电泳,常规转膜后脱脂奶粉封闭,加一抗 anti-GRP78 (1:500),anti-CHOP (1:200),anti-HIRA (1:500),anti-ASF1a (1:500) 及 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗脱 5 min \times 3 次,辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 2 h, TBST 洗脱 10 min \times 3 次, ECL 化学发光显像^[10]。

$$\text{目的蛋白的相对表达量} = \text{目的蛋白的灰度值} / \text{内参 } \beta\text{-actin 的灰度值}$$

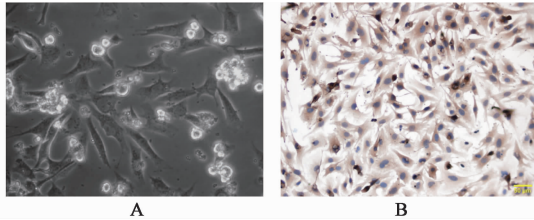
2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验,多组之间两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 造模结果 造模 4 周末, KOA 大鼠膝关节明显肿胀、充血,关节液混浊呈浅黄色、量增多,关节软骨可见明显溃疡面及裂隙,少数可见软骨下骨裸露,滑膜出现明显水肿、充血现象。

3.2 软骨细胞培养及免疫组化鉴定结果 大鼠膝关节软骨组织分离软骨细胞,培养 48 h 后,于光镜下行

形态学鉴定,细胞体积较小,多为三角形或梭型,少数为椭圆形或圆形,符合软骨细胞形态(图 1A)。采用免疫组化对软骨Ⅱ型胶原蛋白进行染色,结果提示所有的细胞Ⅱ型胶原蛋白细胞表达均呈阳性,符合膝关节软骨细胞特征(图 1B)。见图 1。



A. 光镜下原代培养 48 h 后 KOA 大鼠膝关节软骨细胞;B. KOA 细胞软骨细胞胞浆中Ⅱ型胶原蛋白免疫组化

图 1 KOA 软骨细胞光镜下形态及免疫组化鉴定(×200)

Fig.1 Morphology and immunohistochemical identification of KOA chondrocytes under light microscope(×200)

表 1 独活寄生汤含药血清对 KOA 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on KOA cells proliferation($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h	%
空白	-	20.12 ± 3.64	18.74 ± 4.64	18.86 ± 3.53	
模型	-	70.14 ± 6.41 ¹⁾	72.98 ± 8.52 ^{1,5)}	75.42 ± 4.52 ^{1,5)}	
硫酸氨基葡萄糖	3	56.87 ± 7.45 ¹⁾	49.52 ± 6.51 ^{1,5)}	44.11 ± 2.43 ^{1,5)}	
独活寄生汤	3.4	49.64 ± 2.75 ⁴⁾	43.62 ± 5.75 ^{4,5)}	34.11 ± 3.56 ^{4,5)}	
	1.7	59.78 ± 7.88 ³⁾	54.00 ± 7.85 ^{3,5)}	49.84 ± 4.5 ^{3,5)}	
	0.85	68.62 ± 5.68 ²⁾	63.53 ± 4.42 ^{2,5)}	60.64 ± 6.93 ^{2,5)}	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与独活寄生汤 0.85 g·kg⁻¹组比较³⁾ $P < 0.05$;与独活寄生汤 1.7 g·kg⁻¹组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与同组前一时间点比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

组及硫酸氨基葡萄糖组大鼠心室肌凋亡细胞 AI 分别为(39.34 ± 2.56)%,(23.82 ± 2.11)%,(5.43 ± 0.72)%和(8.23 ± 1.41)% ,凋亡细胞量均呈减少趋势($P < 0.05$),且独活寄生汤随着剂量的升高,而凋亡细胞表达减少($P < 0.05$)。见图 2。

3.5 对 KOA 细胞中 ASF1a,HIRA,GRP78 及 CHOP

3.3 对 KOA 细胞增殖抑制率的影响 空白组细胞随培养时间的延长细胞增殖抑制率并无明显变化;模型组细胞随培养时间的延长,增殖抑制率明显升高($P < 0.05$);低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组随着独活寄生汤对软骨细胞的作用时间延长,细胞株增殖抑制率降低($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组细胞在培养 24,48,72 h 增殖抑制率明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,高、中、低剂量组及硫酸氨基葡萄糖组大鼠培养 24,48,72 h 增殖抑制率降低($P < 0.05$),其中,高剂量组细胞增殖抑制率降低最为明显($P < 0.05$)。见表 1。

3.4 对大鼠 KOA 细胞凋亡的影响 空白组仅有少量细胞凋亡 AI(2.78 ± 1.14)% ,与空白组比较,模型组大鼠凋亡 AI 明显(54.53 ± 2.1)% ($P < 0.05$),与模型组比较,独活寄生汤低、中、高剂量

蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组细胞中 ASF1a,HIRA,GRP78 及 CHOP 蛋白均表达升高($P < 0.05$);独活寄生汤低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组细胞中 ASF1a,HIRA,GRP78 及 CHOP 蛋白表达均降低($P < 0.05$),且随独活寄生汤剂量的增加,上述蛋白表达逐步降低($P < 0.05$)。见图 3,表 2。

表 2 独活寄生汤含药血清对 KOA 细胞中 ASF1a,HIRA,GRP78 及 CHOP 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on ASF1a,HIRA,GRP78 and CHOP protein expression in KOA cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ASF1a/ β -actin	HIRA/ β -actin	GRP78/ β -actin	CHOP/ β -actin
空白	-	0.41 ± 0.09	0.16 ± 0.00	0.37 ± 0.03	0.19 ± 0.01
模型	-	1.06 ± 0.08 ¹⁾	0.65 ± 0.04 ¹⁾	0.91 ± 0.11 ¹⁾	0.95 ± 0.07 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	3	0.60 ± 0.07 ¹⁾	0.43 ± 0.01 ¹⁾	0.52 ± 0.04 ¹⁾	0.40 ± 0.05 ¹⁾
独活寄生汤	3.4	0.49 ± 0.02 ⁴⁾	0.22 ± 0.02 ⁴⁾	0.49 ± 0.06 ⁴⁾	0.18 ± 0.01 ⁴⁾
	1.7	0.57 ± 0.05 ³⁾	0.38 ± 0.01 ³⁾	0.63 ± 0.08 ³⁾	0.24 ± 0.00 ³⁾
	0.85	0.74 ± 0.01 ²⁾	0.50 ± 0.01 ²⁾	0.76 ± 0.03 ²⁾	0.41 ± 0.02 ²⁾

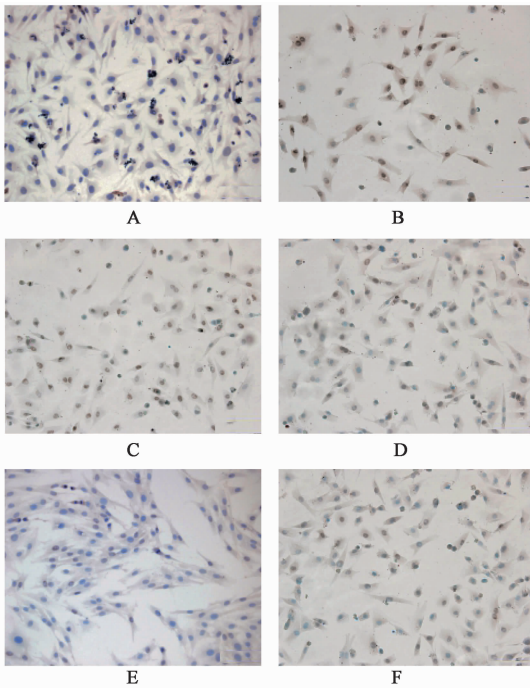


图 2 独活寄生汤含药血清对 KOA 细胞凋亡的影响 (TUNEL, × 200)

Fig. 2 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on KOA cells apoptosis (TUNEL, × 200)



图 3 各组 KOA 细胞中 ASF1a, HIRA, GRP78 及 CHOP 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of ASF1a, HIRA, GRP78 and CHOP protein in KOA cells

4 讨论

随着我国人口结构老龄化严重, KOA 这一老年性疾病已经变成了社会公共健康问题, 是影响中老年人独立生活能力的主要因素之一。郑晓辉等^[11]采用中医生生存质量量表评价 KOA 患者生存质量, 研

究发现 KOA 患者在躯体疼痛, 生命活力, 社会功能、心理健康等多个方面共同影响患者的生存质量。KOA 早期症状可表现为活动时隐痛或不适感, 随着病情的逐渐进展, 活动时疼痛逐渐加重, 疼痛性质也可改变为胀痛, 严重者可并伴有关节肿胀、肌肉萎缩等症状。过去研究认为 KOA 的主要发病机制为软骨的降解及关节边缘骨赘的形成^[12], 而现今通过研究表明软骨细胞的衰老及凋亡与 KOA 的发生及发展关系密切^[13-14]。

有报道称, 独活寄生汤治疗 KOA 有较好的临床效果, 不仅可有效恢复关节功能, 而且在镇痛方面疗效优于布洛芬缓释胶囊^[15]。在临床调查方面, 邝高艳等对 838 例经独活寄生汤治疗的 KOA 患者的疗效及安全性做一荟萃分析, 证实独活寄生汤治疗 KOA 疗效肯定, 且副作用较少^[16]。李军等^[17]研究发现, 独活寄生汤可关节液中白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 的表达降低, 从而减少对关节软骨的破坏, 起到治疗 KOA 的目的。王武炼等^[13]发现独活寄生汤可有效降低 KOA 软骨细胞中线粒体色素 C 漏出, 减少 pro-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-9, pro-Caspase-3 的裂解, 阻断 Caspases 级联反应延续, 从而减少软骨细胞凋亡。而对于独活寄生汤能否抑制 KOA 软骨细胞衰老及内质网所引发的凋亡研究较少。

本研究首先应用 Hulth 造模法制备 KOA 动物模型, 分离并鉴定 KOA 软骨细胞, 采用独活寄生汤含药血清培养 KOA 软骨细胞, 结果发现含药血清培养的 KOA 软骨细胞增殖抑制率明显降低, 说明独活寄生汤可有效, 提高 KOA 软骨细胞的生存率, 且呈药物剂量依赖型。对培养 48 h 的细胞行 TUNEL 检测, 结果显示独活寄生汤可有效减少 KOA 软骨细胞的凋亡率, 推测独活寄生汤可能通过减少细胞凋亡而起到减少细胞增殖抑制率的作用。膝关节构造特殊, 软骨细胞代谢并不依靠血管及神经, 主要滑膜分泌的关节液进行渗透代谢, 而软骨细胞在缺氧、机械性压力等敏感因素刺激时, 易发生内质网应激而引发软骨细胞凋亡^[18]。另一方面, 滑膜细胞受到外来刺激时, 分泌的炎症因子刺激滑膜软骨细胞, 也可介导软骨细胞凋亡^[19]。研究发现, KOA 软骨细胞中 GRP78, CHOP 表达升高, 表明内质网应激所引发的软骨细胞凋亡可能是 KOA 发展的原因之一, 而独活寄生汤含药血清可明显抑制 KOA 软骨细胞内质网应激及内质网应激所引发的细胞凋亡, 与 TUNEL 染

色结果一致,这可能是独活寄生汤治疗 KOA 的机制之一。衰老分子伴侣 ASF1a/HIRA 的高表达,可引发各项衰老指标的出现并且可引发衰老相关异染色体聚集^[13]。本研究发现, KOA 大鼠软骨细胞 ASF1a, HIRA 的表达明显升高,说明过早衰老因素也是 KOA 的发病重要因素。中医理论中肾虚是衰老的基本病机,而补肾方剂独活寄生汤含药血清可显著降低 KOA 软骨细胞中 ASF1a, HIRA 的表达,说明独活寄生汤可延缓衰老,重塑细胞的衰老平衡稳态,这也可能是独活寄生汤可降低 KOA 细胞生长抑制率的原因之一。

综上所述,独活寄生汤可通过降低 KOA 软骨细胞中 ASF1a, HIRA, GRP78 及 CHOP 蛋白的表达,使 KOA 软骨细胞延缓衰老、减少细胞凋亡,从而降低 KOA 软骨细胞的生长抑制率,起到恢复软骨细胞再生,治疗 KOA 的目的。

[参考文献]

[1] Woolf A D, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions[J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(9): 646-656.

[2] 张磊,孙德昱. 双醋瑞因联合独活寄生汤治疗中老年膝骨性关节炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 299-302.

[3] 兰平文,沈彬. TGF- β /BMP 信号通路在骨关节炎软骨细胞退变中的作用机制[J]. 中华关节外科杂志: 电子版, 2015, 9(5): 644-647.

[4] 冯小波,朱思刚. 独活寄生汤对髌骨软化症髌骨软骨及膝关节液中 IL-1、MMP-1、GAG 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 156-160.

[5] 车萍,季旭明,梁粟,等. 独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中 5-HTP、5-HIAA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 170-173.

[6] 林一峰,梁祖建,李彩华. 补肾活血方对膝骨关节炎大鼠关节软骨 HIRA、ASF1a 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(6): 627-630.

[7] 叶锦霞,吴广文,赖瞬森,等. 透骨消痛胶囊对膝骨关节炎大鼠内质网应激影响的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(11): 5-11.

[8] 袁琴,阚卫兵,宋鹏飞,等. 补肾活血方对大鼠膝骨关节炎滑膜细胞 β -catenin、MMP-7 的影响[J]. 中国骨

伤, 2012, 25(9): 761-765.

[9] 杭兴伟,增田泰伸,木村守,等. 硫酸氨基葡萄糖对口服透明质酸缓解小鼠佐剂性关节炎的增效作用[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 189-194.

[10] 王伊林,赵雅君,杨洋,等. 磷酸肌酸钠对慢病毒介导 Calumenin 蛋白沉默阿霉素损伤心肌细胞内质网应激信号通路的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(10): 1119-1122.

[11] 郑晓辉,王建凯,沈泽培,等. 膝关节炎患者中医生存质量量表的建立及应用评价[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(3): 228-231.

[12] Goncalves F B, Rocha F A, Albuquerque R P, et al. Reproducibility assessment of different descriptions of the kellgren and lawrence classification for osteoarthritis of the knee [J]. Rev Bras Ortop, 2016, 510(6): 687-691.

[13] 王武炼,林煜,张怡元,等. 独活寄生汤含药血清对退变软骨细胞细胞色素 C 及 pro-Caspase-9、3 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(33): 5269-5273.

[14] ZHANG R G, Maxim V, YE X F, et al. Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA [J]. Dev Cell, 2005, 8(1): 19-30.

[15] 张欣欣. 独活寄生汤治疗 52 例膝关节炎的临床疗效[J]. 中医临床研究, 2012, 4(9): 65-66.

[16] 邝高艳,严可,柴爽,等. 独活寄生汤加减治疗膝骨关节炎疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 中医药导报, 2016, 22(17): 59-62.

[17] 李军,王朝阳. 独活寄生汤对兔膝骨性关节炎关节液肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 和基质金属蛋白酶-1 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(5): 1002-1003.

[18] Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis [J]. J Cell Biol, 2000, 150(4): 731-740.

[19] 刘振杰,张丹丹,李涛. RNAi 下调 MMP-14 表达对类风湿关节炎滑膜细胞炎症因子分泌的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(15): 2342-2345.

[责任编辑 周冰冰]