

独活寄生汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠软骨细胞代谢, BMP-7 及 SIRT1 表达的影响

贾峻¹, 荣兵^{1*}, 李建¹, 孙鹏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对膝骨性关节炎(KOA)大鼠关节软骨细胞代谢、骨形成蛋白-7(BMP-7)及沉默信息调节因子相关酶 1(SIRT1)的影响,为独活寄生汤的临床应用补充理论依据。**方法:**采用 Hult 法建立 KOA 模型大鼠,模型成功后采用酶原消化法培养 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)及硫酸氨基葡萄糖组(硫酸氨基葡萄糖胶囊 0.3 g·kg⁻¹),灌胃 14 d 后处死取血清;将培养细胞分为正常组、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)及硫酸氨基葡萄糖组(硫酸氨基葡萄糖组大鼠血清培养);采用结晶紫法检测各组软骨细胞增殖能力;采用荧光原位末端转移酶标记法(TUNEL)法检测各组软骨细胞凋亡情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组软骨细胞中基质金属蛋白酶-13(MMP-13), MMP-3, II 型胶原蛋白(Col II), 聚集蛋白聚糖(Aggregan), BMP-7 及 SIRT1 mRNA 的表达;蛋白质印迹法(Western blot)检测各组软骨细胞中 MMP-13, MMP-3, Col II, Aggregan, BMP-7 及 SIRT1 的表达。**结果:**①与正常组软骨细胞比较,模型组细胞增殖能力明显降低,与模型组细胞比较,独活寄生汤含药血清低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组软骨细胞增殖能力提高($P < 0.01$);②与正常组软骨细胞比较,模型组细胞凋亡数量明显增加,与模型组软骨细胞比较,独活寄生汤低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组细胞凋亡数量明显降低($P < 0.01$);③与正常组软骨细胞比较,模型组细胞 MMP-13, MMP-3 表达升高, Col II, Aggregan, BMP-7 及 SIRT1 下降($P < 0.01$);与模型组比较,低剂量组细胞中 MMP-13, MMP-3 mRNA 及蛋白表达无明显变化;硫酸氨基葡萄糖组及中、高剂量组细胞中 MMP-13, MMP-3 mRNA 及蛋白表达明显下降,且剂量越高上述蛋白及 mRNA 表达越低;硫酸氨基葡萄糖组及低、中、高剂量组细胞中 Col II, Aggregan, BMP-7 及 SIRT1 表达升高,且随剂量的增高而升高($P < 0.01$)。**结论:**独活寄生汤含药血清可通过增加 KOA 软骨细胞内 BMP-7 及 SIRT1 的表达,增加 KOA 软骨细胞合成代谢、抑制分解代谢,从而起到抑制 KOA 软骨细胞凋亡,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; 细胞代谢; 软骨细胞; 骨形成蛋白-7

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0159-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170159

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170609.1527.022.html>

[网络出版时间] 2017-06-09 15:27

Effect of Serum Containing Duhuo Jisheng Tang on Expression of BMP-7 and SIRT1 and Cells Metabolism in Articular Cartilage of Rats with Knee Osteoarthritis

JIA Jun¹, RONG Bing^{1*}, LI Jian¹, SUN Peng¹, CHEN Shao-qing²

(1. The First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. The Affiliated Hospital of Inner-mongolia National University, Tongliao 028000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on cell metabolism,

[收稿日期] 20170329(021)

[基金项目] 内蒙古自然科学基金项目(2016MS08125)

[第一作者] 贾峻, 主治医师, 从事脊柱疾病及膝骨性关节炎的发病机制与推拿、药物治疗研究, Tel: 13920221699, E-mail: ZYsunpeng@126.com

[通讯作者] * 荣兵, 主治医师, 从事脊柱疾病及膝骨性关节炎的发病机制与针推治疗研究, Tel: 022-27432606, E-mail: wylteam2@163.com

bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) in articular cartilage of rats with knee osteoarthritis (KOA), and complement the theory basis for the clinical application of Duhuo Jisheng Tang. **Method:** Hulth method was adopted to establish the KOA model rats, and after successful modeling, enzyme digestion method was used for primary culture of KOA cartilage cells. Forty rats were divided into Duhuo Jisheng Tang low, middle and high dose groups ($0.85, 1.7, 3.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and glucosamine sulfate group ($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 14 days of intragastric administration, serum was taken. Cultured cells can be divided into normal control group, model group, Duhuo Jisheng Tang drug-containing serum groups (high, middle and low dose groups) and positive control group. Then crystal violet method was used to test the cell proliferation of each group; fluorescent TUNEL method was used to measure the cell apoptosis of each group. The mRNA expression levels of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 and SIRT1 in chondrocytes were detected by Real-time PCR, and the protein expression levels of MMP-13, MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 and SIRT1 were detected by Western blot in each group of cartilage cells. **Result:** ① As compared with the normal control group, the proliferation was significantly decreased in model group. As compared with the model group, the proliferation of chondrocytes was significantly increased in Duhuo Jisheng Tang low, middle, and high dose groups and positive control group ($P < 0.01$). ② As compared with the normal control group, the number of apoptotic cells was significantly increased in model group. As compared with model group, the apoptotic rate of chondrocytes was significantly decreased in Duhuo Jisheng Tang low, middle, high dose groups and positive control group ($P < 0.01$). ③ As compared with the normal control group, the expression levels of MMP-13 and MMP-3 were increased, and the expression levels of Col II, Aggrecan, BMP-7 and SIRT1 were decreased in the model group. As compared with the model group, the expression levels of MMP-13, MMP-3 mRNA and protein in the low dose group had no significant difference; the expression of MMP-13, MMP-3 mRNA and protein were significantly decreased in the positive control group and Duhuo Jisheng Tang middle and high dose groups, and the expression levels were decreased with the dose increasing. The expression levels of Col II, Aggrecan, BMP-7 and SIRT1 in the positive control group and the low, middle and high dose groups were increased, and the levels were increased with the increase of the dose ($P < 0.01$). **Conclusion:** Serum containing Duhuo Jisheng Tang can increase the expression of BMP-7 and SIRT1 KOA in chondrocytes, increase metabolism, and inhibit synthesis of KOA cartilage cells, thus inhibiting the apoptosis of KOA chondrocytes and promoting the regeneration of cartilage cells treat KOA.

[**Key words**] Duhuo Jisheng Tang; knee osteoarthritis (KOA); cell metabolism; cartilage cells; bone morphogenetic protein-7

膝骨关节炎(KOA)已成为困扰老年人的常见病、多发病,其中老年男性发病率为9.6%,女性发病率更是高达18%^[1]。现阶段证实KOA发生的原因有滑膜炎、关节软骨变性及丢失和软骨下病变^[2]。中医认为,KOA属于“骨痹”、“膝痹”范畴^[3],多内因肝肾亏虚,外感寒湿所致,在临床中常采用独活寄生汤进行治疗。独活寄生汤出自《备急千金要方》,由独活、寄生、防风、当归等15味中药组成,是公认治疗“膝痹”的经典方剂^[4],目前对于独活寄生汤的研究大多数仍处于临床疗效及对个别因子的观察^[5],而该方剂对于KOA各组织或细胞的现代药理学作用研究报道较少,需更深层次的发掘。

近年来随着医学检测技术的发展,发现软骨细胞合成代谢不及分解代谢速度是KOA发病机制之一,其分子水平机制与基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13), MMP-3增加,细胞外基质产物如聚集蛋白聚糖(Aggrecan)和II型胶原蛋白(collagen type II, Col II)减少有关^[6]。骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)被认为是将骨间充质干细胞诱导成为软骨细胞的最初信号分子^[7],潘小丽等^[8]发现, BMP-7可通过促进Aggrecan及Col II的合成,达到促进软骨细胞合成代谢的作用。另有学者证实^[9],沉默信息调节因子1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)可延缓衰老,促进细胞分化、代谢及抑制

软骨细胞凋亡。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,采用结晶紫法和荧光原位末端转移酶标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL) 分别观察独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞的增殖、凋亡情况,及检测合成代谢产物 Aggrecan, Col II, 分解代谢产物 MMP-3, MMP-13 及 BMP-7, SIRT1 的变化,也是首次从软骨细胞代谢角度研究独活寄生汤的作用机制,为独活寄生汤治疗 KOA 补充深层次药理作用,为临床应用提供理论依据。

1 材料

KOA 细胞(经 Hulth 经典造模^[10]后,自行分裂获得)。

Anti-MMP-3, anti-MMP-13, anti-Aggrecan, anti- β -actin (欣博盛公司,批号分别为 GTX62629, GTX63628, GTX59357, GTX66983); anti-Col II, anti-BMP-7, anti-SIRT1 (美国 Sigma 公司,批号分别为 GTX63156, 090K0553, 091K0626); TUNEL 试剂盒 (碧云天公司,批号 C1168); 细胞增殖与活性 CCK-8 (日本 Dojindo 公司,批号 CK04-1000T); 硫酸氨基葡萄糖胶囊 (浙江诚意药业,批号 H20060748)。

FTC3000 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (加拿大 Funlyng Biotech 公司); WD-9405B 型水平摇床, WD-9413B 型胶成像系统 (北京六一公司); BX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); ChemDoc XRS 型化学发光成像仪 (美国 Bio Red 公司); EP3302 型转模仪, EPS301 型电泳仪 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 KOA 模型制备 雄性 Wistar 大鼠 25 只,由天津中医药大学医学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(津)2009-0002,体重(180 ± 5)g,常规饮食,自由活动,日照时间为 12 h · d⁻¹,实验室湿度控制在 50% ~ 55%。正常组 ($n = 10$) 不给予处理, KOA 模型组 ($n = 15$) 采用 Hulth 造模法^[10],膝关节经过脱毛处理后,经碘伏消毒,在无菌情况下于大鼠膝关节内侧纵行切开 2 cm 切口,剥离血管肌肉组织,将内侧副韧带、前、后交叉韧带切断,仅保留关节软骨面,然后进行皮肤组织缝合,并给予腹腔注射青霉素钠 (3×10^4 U) 预防感染,28 d 分离各组大鼠膝关节软骨组织,用于培养软骨细胞。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,伦理批号

TYLL2016[K]字 012。

2.2 药物制备 独活寄生汤组成为独活 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煎制成含生药 1 g · mL⁻¹ 药液,硫酸氨基葡萄糖胶囊用 0.9% NaCl 溶液配制成 3 g · L⁻¹ 药液。

2.3 动物分组、给药及取材 另饲养 Wistar 大鼠 40 只按随机数字法分为独活寄生汤灌胃 (*ig*) 低、中、高剂量组 (0.85, 1.7, 3.4 g · kg⁻¹ *ig*, 1 次/d) 及硫酸氨基葡萄糖组 (硫酸氨基葡萄糖 0.3 g · kg⁻¹ *ig*, 1 次/d) ($n = 10$), 连续给药 14 d, 末次给药 2 h 后颈椎脱臼处死大鼠,在无菌条件下腹主动脉采血 3 mL, 2 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后于 -80 °C 冰箱保存。

2.4 细胞分组及培养方法 将细胞分为 6 组,正常组:正常大鼠膝关节软骨细胞 + 20% 胎牛血清培养;模型组:KOA 大鼠膝关节软骨细胞 + 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 结晶紫法检测细胞增殖生长 选取对数期生长软骨细胞,细胞密度为 5×10^5 个/mL,向 6 孔板第 1 孔加入正常组大鼠软骨细胞 2 mL,其余 5 孔分别加入 KOA 大鼠软骨细胞 2 mL,将各孔分别标记为正常组、模型组、低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组;正常组、模型组细胞加入 20% 胎牛血清,低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组细胞加入对应剂量组大鼠血清培养 24 h, PBS 溶液清洗 3 次后加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 溶液再清洗 3 次后加入 5% 结晶紫染色 15 min, PBS 洗净结晶紫染色液,待其干燥后拍照。而后加入 35% 乙酸溶液, 24 °C 下静置 1 h, 充分吸收细胞中结晶紫,并放置于酶标仪中 (550 nm 波长) 检测吸光度 A , A 越小,表明细胞死亡率越高,细胞存活率越低,实验重复 3 次,以增加准确性。

2.6 TUNEL 鉴定细胞凋亡 选取培养 48 h 软骨细胞进行细胞爬片,于 0.1% Triton X-100 透化后再用 10% 甲醛中性溶液在 24 °C 下固定 20 min,经 PBS 溶液漂洗后加入蛋白酶 K 工作液 12 μ L/片,然后将载玻片置于 35 °C 恒温箱中消化 20 min,再次加入缓冲液后,漂洗 3 次后加入 TUNEL 反应液 (TdT + 荧光

素标记的 dUTP)37 °C 恒温箱中避光孵育 1 h; 向反应好的载玻片加入封闭液 30 μL/片, 在 24 °C 下静置 20 min, 清洗后加入 DAPI 30 μL/片置于 35 °C 恒温箱中反应 25 min, 最后放荧光淬灭封片剂封片, 水溶性封片剂封片。在相邻的 10 个视野下, 蓝色荧光为膝关节软骨细胞核, 绿色荧光为凋亡细胞核, 即凋亡细胞。计算凋亡指数。

凋亡指数(AI) = 各视野阳性细胞数/视野所有细胞总数 × 100%

2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测基质金属蛋白酶-13 (MMP-13), MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 的表达 引物信息为 MMP-13: 上游 5'-GTTGATAGACTCCGAGAAATGC-3', 下游 5'-GTTAAGTTGTTTGGGACCATT-3', 146 bp; MMP-3: 上游 5'-TCCCAGACTATAGCAGAAGACT-3', 下游 5'-CCCTCCTAAACTGAAACCA-3', 138 bp; Col II: 上游 5'-CTCCCAGAACATCACCTACCAC-3', 下游 5'-CCATCCTTCAGGGCAGTGTA-3', 178 bp; Aggrecan: 上游 5'-GTTGTATTCCACTACCGCCCG-3', 下游 5'-TCACACTGCTCATAGCCTGCC-3', 131 bp; BMP-7: 上游 5'-AGACGCCAAAGAACCAAGAG-3', 下游 5'-GCTGTGCTCGAAGTAGAGGA-3', 396 bp; SIRT1: 上游 5'-CAAAGGAGCAGATTAGTAGGCG-3', 下游 5'-CTCTGGCATGTCCCCTATCAC-3', 393 bp; GAPDH: 上游 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3', 下游 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3', 143 bp。行 RNA 浓度检测后反转录得到对应的 cDNA, 经由 PCR 仪完成上述过程, 可得 cDNA 20 μL, PCR 反应液按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 配制, PCR 反应条件, 95 °C 预变性 30 s, 维持 2 min, 再降至 60 °C, 维持 30 s; 温度升至 72 °C, 维持 20 s, 维持 4 °C, 循环 40 次。每个样品基因行 6 个复孔平行实验, 实验结果舍去较大误差数值后选取剩余值平均值为实验数据, 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据。

2.8 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 MMP-13, MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 的表达 提取培养 48 h 软骨细胞蛋白并进行测定 (BCA 法), 将各组样本抽取 40 μg 加入 10% 的 SDS-PAGE 电泳中, 转膜后加入到 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h, 再加入 anti-MMP-13, anti-MMP-3, anti-Col II, anti-Aggrecan, anti-BMP-7 及 anti-SIRT1 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 anti-rabbit (1:1 000) 温孵育 2 h, 再次洗膜 3 次后 ECL 化学

发光显像^[11-12]。

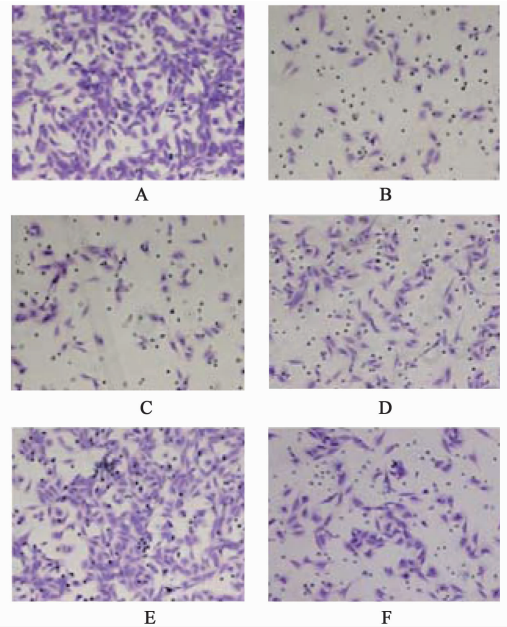
目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白的灰度值/内参 β-actin 的灰度值

2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 仅两组间比较时采用 *t* 检验, 多组之间两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 造模结果 经 Hulth 造模 4 周后, KOA 大鼠出现膝关节明显肿胀、关节液浑浊, 滑膜出现肿胀、充血, 软骨组织出现滑磨损伤, 部分软骨组织丢失、可见软骨下骨。

3.2 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞增殖的影响 与正常组比较, 模型组 *A* 明显降低, 说明细胞增殖能力降低, 有统计学意义 (*P* < 0.01), 低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组 *A* 明显高于模型组, 且剂量越高, *A* 越高, 说明独活寄生汤含药血清提高 KOA 软骨细胞增殖能力呈剂量依赖型 (*P* < 0.01)。见图 1, 2。

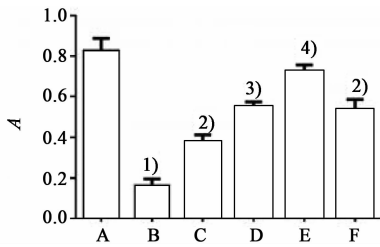


A 正常组; B 模型组; C~E. 独活寄生汤含药血清低、中、高剂量组; F. 硫酸氨基葡萄糖组 (图 2~5 同)

图 1 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞增殖的影响 (结晶紫, ×200)

Fig. 1 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on KOA chondrocytes proliferation (Crystal violet, ×200)

3.3 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞凋亡的影响 正常组细胞凋亡指数积分吸光度 *IA* 为 (2.62 ± 0.38), 模型组为 (34.68 ± 5.57), 明显高于正常组 (*P* < 0.01); 低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与独活寄生汤含药血清低剂量组比较³⁾ $P < 0.01$; 与独活寄生汤含药血清中剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 1 ~ 3 同)

图 2 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞的增殖作用
Fig. 2 Proliferation effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on KOA chondrocytes

细胞凋亡指数分别为 (10.88 ± 2.15) , (5.48 ± 1.42) , (2.08 ± 0.15) 和 (5.34 ± 0.48) , 均明显低于模型组, 且剂量越高、凋亡指数越低 ($P < 0.01$)。见图 3。

3.4 独活寄生汤含药血清对各组细胞中 MMP-13, MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组细胞中 MMP-13 及 MMP-3 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); 低剂量组与模型组比较, MMP-13 及 MMP-3 mRNA 表达无明显变化, 而 Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 硫酸氨基葡萄糖组与模型组比较, MMP-13, MMP-3 mRNA 表达降低, Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA

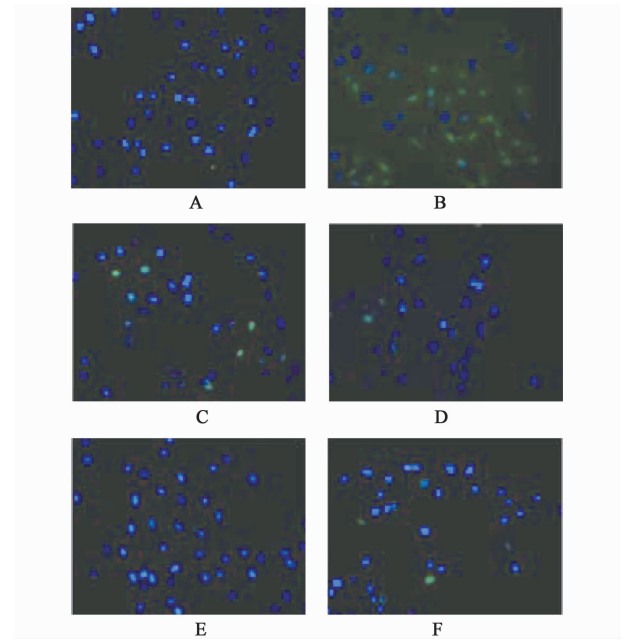


图 3 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on KOA chondrocytes apoptosis (TUNEL, $\times 400$)

表达升高 ($P < 0.01$); 中、高剂量组与低剂量组比较, MMP-13 及 MMP-3 mRNA 表达降低, 且随剂量增加上述 mRNA 表达逐步降低 ($P < 0.01$), Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 表达升高, 且随剂量增加上述 mRNA 逐步升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 MMP-13, MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 及 SIRT1 mRNA 及表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on MMP-13, MMP-3, Col II, Aggrecan, BMP-7 and SIRT1 mRNA expression in KOA chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	MMP-13	MMP-3	Col II	Aggrecan	BMP-7	SIRT1
正常	-	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.06
模型	-	6.26 \pm 0.38 ¹⁾	5.29 \pm 0.36 ¹⁾	0.37 \pm 0.01 ¹⁾	0.44 \pm 0.03 ¹⁾	0.59 \pm 0.04 ¹⁾	0.16 \pm 0.01 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.3	1.26 \pm 0.07 ²⁾	1.86 \pm 0.03 ²⁾	0.93 \pm 0.07 ²⁾	1.54 \pm 0.16 ²⁾	1.22 \pm 0.09 ²⁾	1.79 \pm 0.21 ²⁾
独活寄生汤含药血清	0.85	6.15 \pm 0.44	5.31 \pm 0.27	0.45 \pm 0.03 ²⁾	0.69 \pm 0.18 ²⁾	0.82 \pm 0.07 ²⁾	0.57 \pm 0.05 ²⁾
	1.7	4.68 \pm 0.09 ³⁾	2.63 \pm 0.11 ³⁾	0.84 \pm 0.07 ³⁾	0.78 \pm 0.05 ³⁾	1.01 \pm 0.11 ³⁾	0.91 \pm 0.11 ³⁾
	3.4	1.22 \pm 0.03 ⁴⁾	2.89 \pm 0.16 ⁴⁾	1.12 \pm 0.14 ⁴⁾	2.13 \pm 0.31 ⁴⁾	1.15 \pm 0.02 ⁴⁾	1.82 \pm 0.19 ⁴⁾

3.5 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞 MMP-13, MMP-3, Col II 及 Aggrecan 表达的影响 与正常组比较, 模型组细胞中 MMP-13 及 MMP-3 表达升高 ($P < 0.01$), Col II 及 Aggrecan 表达下降 ($P < 0.01$); 低剂量组与模型组比较, MMP-13 及 MMP-3 表达无明显变化, 而 Col II 及 Aggrecan 表达明显升高 ($P < 0.01$); 硫酸氨基葡萄糖与模型组比较, MMP-13, MMP-3 表达降低, Col II 及 Aggrecan 表达升高 ($P <$

0.01); 中、高剂量组与低剂量组比较, MMP-13 及 MMP-3 mRNA 表达降低, 且随剂量增加上述蛋白表达逐步降低 ($P < 0.01$), Col II 及 Aggrecan 表达升高, 且随剂量增加上述蛋白逐步升高 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 2。

3.6 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 BMP-7 及 SIRT1 的表达 与正常组比较, 模型组细胞中 BMP-7 及 SIRT1 均表达降低 ($P < 0.05$); 低、

表 2 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 MMP-13, MMP-3, Col II 及 Aggrecan 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on MMP-13, MMP-3, Col II and Aggrecan expression in KOA chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	MMP-13/ β -actin	MMP-3/ β -actin	Col II/ β -actin	Aggrecan/ β -actin
正常	-	0.13 \pm 0.01	0.08 \pm 0.00	1.05 \pm 0.04	0.60 \pm 0.05
模型	-	3.23 \pm 0.21 ¹⁾	0.69 \pm 0.36 ¹⁾	0.17 \pm 0.01 ¹⁾	0.24 \pm 0.03 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.3	0.37 \pm 0.07 ²⁾	0.16 \pm 0.03 ²⁾	0.66 \pm 0.07 ²⁾	0.86 \pm 0.11 ²⁾
独活寄生汤含药血清	0.85	3.15 \pm 0.44	0.61 \pm 0.27	0.35 \pm 0.03 ²⁾	0.41 \pm 0.08 ²⁾
	1.7	0.85 \pm 0.09 ³⁾	0.33 \pm 0.03 ³⁾	0.53 \pm 0.07 ³⁾	0.59 \pm 0.05 ³⁾
	3.4	0.22 \pm 0.03 ⁴⁾	0.25 \pm 0.02 ⁴⁾	0.83 \pm 0.09 ⁴⁾	1.13 \pm 0.21 ⁴⁾

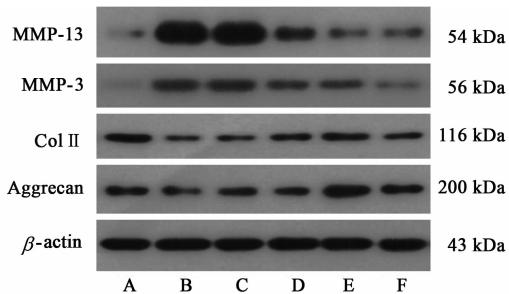


图 4 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 MMP-13, MMP-3, Col II 及 Aggrecan 表达的影响

Fig. 4 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on MMP-13, MMP-3, Col II and Aggrecan expression in KOA chondrocytes

中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖细胞中 BMP-7 及 SIRT1 表达均升高 ($P < 0.05$), 且随独活寄生汤剂量的增加, 上述蛋白表达逐步增加 ($P < 0.05$)。见图 5, 表 3。

表 3 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 BMP-7 及 SIRT1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on BMP-7 and SIRT1 expression in KOA chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	BMP-7/ β -actin	SIRT1/ β -actin
正常	-	0.94 \pm 0.08	1.05 \pm 0.06
模型	-	0.71 \pm 0.09 ¹⁾	0.09 \pm 0.01 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.3	1.26 \pm 0.12 ²⁾	1.94 \pm 0.21 ²⁾
独活寄生汤含药血清	0.85	0.88 \pm 0.07 ²⁾	0.67 \pm 0.05 ²⁾
	1.7	1.15 \pm 0.11 ³⁾	0.86 \pm 0.11 ³⁾
	3.4	1.42 \pm 0.18 ⁴⁾	2.24 \pm 0.25 ⁴⁾

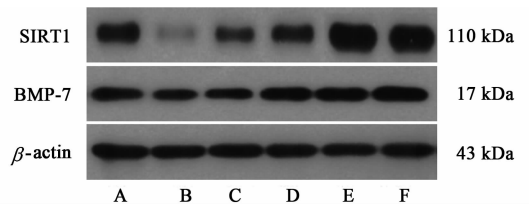


图 5 独活寄生汤含药血清对 KOA 软骨细胞中 BMP-7 及 SIRT1 表达的影响

Fig. 5 Effect of serum containing Duhuo Jisheng Tang on BMP-7 and SIRT1 expression in KOA chondrocytes

4 讨论

我国已逐步进入老龄化社会, KOA 这一老年性疾病已成为影响中老年人独立生活能力的重要因素之一。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, 严重者可并伴有有关节肿胀、

副作用较少。

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 软骨细胞增殖能力明显提高, 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提高细胞增殖能力的作用。为了深入探究独活

肌肉萎缩等症状。目前研究认为软骨细胞代谢紊乱、衰老及凋亡是 KOA 的主要发病机制^[13-14]。独活寄生汤是中医治疗 KOA 的经典方剂之一, 有报道证实, 独活寄生汤可降低关节液中白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6 等炎症因子及金属蛋白酶含量, 又可抑制膝关节软骨细胞多条凋亡通路, 从而延缓、逆转疾病进展^[4, 15]。临床调查方面, 邝高艳等^[16]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

寄生汤含药血清改善 KOA 软骨细胞的增殖能力,本团队继续检测了合成代谢产物(Aggrecan, Col II),分解代谢产物(MMP-3, MMP-13)的蛋白及 mRNA。研究发现, KOA 软骨细胞中 Col II 及 Aggrecan 表达减少, MMP-13, MMP-3 表达增高,说明 KOA 细胞分解代谢速度快于合成代谢,这可能是 KOA 细胞明显凋亡、增殖速度降低的原因。而独活寄生汤含药血清可使 Aggrecan 及 Col II 表达增多, MMP-13, MMP-3 表达呈回落趋势,且药物剂量越大, KOA 软骨细胞代谢改善越明显,与荧光 TUNEL 染色结果一致,这可能是独活寄生汤治疗 KOA 的机制之一。有报道称,衰老软骨细胞中 BMP-7 的基因及蛋白均表达下降^[17],继而导致软骨细胞合成代谢弱于分解代谢能力,导致软骨细胞凋亡增加,从而导致 KOA 的发生及发展。已有证据表明, KOA 软骨细胞中 SIRT1 的表达水平明显减少,影响软骨细胞分化表型和存活能力及软骨基质成分的表达^[18]。本研究发现,经独活寄生汤含药血清治疗后, KOA 大鼠软骨细胞 BMP-7, SIRT1 蛋白及基因表达明显升高,说明独活寄生汤可能通过 BMP-7, SIRT1 的表达,抑制 KOA 软骨细胞分解代谢,促进合成代谢,从而起到降低 KOA 细胞生长抑制率、重塑 KOA 软骨细胞的细胞代谢平衡稳态,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,独活寄生汤含药血清可通过提高 KOA 软骨细胞中 BMP-7 及 SIRT1 的表达,促进 KOA 软骨细胞合成代谢,抑制分解代谢,使 KOA 软骨细胞凋亡数量减少、提高 KOA 软骨细胞的增殖能力,起到促进 KOA 软骨细胞再生的作用。

[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] 王磊,郭恒,段王平,等. 细胞骨架中间纤维破坏对体外软骨细胞代谢功能的影响[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(7): 745-747.

[7] ZHOU J J, YU G R, CAO C F, et al. Bone morphogenetic protein-7 promotes chondrogenesis in human amniotic epithelial cells[J]. Int Orthop, 2011, 35(6): 941-948.

[8] 潘小丽,田梅,杨亦彬. 骨形成蛋白-7 对体外培养大鼠软骨细胞代谢的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(11): 764-768.

[9] HOU X X, Maitland-Toolan K A. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(29): 20015-20026.

[10] 袁琴,阚卫兵,宋鹏飞,等. 补肾活血方对大鼠膝关节滑膜细胞 β -catenin, MMP-7 的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 25(9): 761-765.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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, 51(6): 687-691.

[14] ZHANG R G, Maxim V P, 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] 陈后煌,邵翔,马玉环,等. 独活寄生汤通过 miRNAs 调控炎症性骨关节炎软骨细胞功能改变的机制探讨[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 7(9): 55-59.

[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] 刘泽汉,王立春,张宏颖,等. 关节内注射 BMP-7 影响骨关节炎进展的实验研究[J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 1(5): 489-493.

[18] 刘弼,雷鸣,肖德明. 抗衰老基因 SIRT1 对骨关节炎的防治影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(15): 1402-1404.

[责任编辑 邹晓翠]