

· 论 著 ·

# 龟甲胶、鹿角胶调控 MKK 基因表达促进豚鼠 OA 软骨细胞增殖的研究

陈炳艺 陈泽华 林嘉辉 王和鸣 李楠\*

福建中医药大学,福州 350122

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0805-04

**摘要:** **目的** 通过观察龟甲胶、鹿角胶含药血清对豚鼠膝关节炎软骨细胞增殖及其丝裂原活化蛋白激酶激酶(MKK)基因表达的影响,探讨龟甲胶、鹿角胶对膝关节炎的治疗机制。**方法** 采用Ⅱ型胶原酶消化法获取3月龄豚鼠膝关节软骨细胞,建立体外培养系,将龟甲胶组、鹿角胶组、盐酸氨基葡萄糖组、对照组4组含药血清分别对其进行干预,采用MTT法检测含药血清干预后软骨细胞增殖情况,荧光定量PCR检测含药血清干预对软骨细胞MKK基因表达的影响。**结果** 5%含药血清干预72h后,软骨细胞的MTT的检测结果为龟甲胶组( $0.315 \pm 0.048$ )、鹿角胶组( $0.236 \pm 0.029$ )、盐酸氨基葡萄糖组( $0.190 \pm 0.022$ )、对照组( $0.146 \pm 0.023$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ );荧光定量PCR检测MKK表达量结果为龟甲胶( $3.287 \pm 0.675$ )、鹿角胶( $2.147 \pm 0.204$ )、盐酸氨基葡萄糖组( $1.137 \pm 0.123$ )及对照组( $0.627 \pm 0.102$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 龟甲胶、鹿角胶对软骨细胞的促增殖作用强于盐酸氨基葡萄糖,这一作用可能与其能有效上调调节软骨细胞MKK的基因表达有关。

**关键词:** 中医中药; 骨关节炎; 软骨细胞; 龟甲胶; 鹿角胶; 丝裂原活化蛋白激酶激酶

## The study of tortoise shell glue and deer horn glue regulation of MAPKK gene expression in the promotion of chondrocyte proliferation in guinea pig with osteoarthritis

CHEN Bingyi, CHEN Zehua, LIN Jiahui, WANG Heming, LI Nan

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Corresponding author: LI Nan, Email: mr.linan@126.com

**Abstract:** **Objective** To explore the mechanism of the treatment of knee osteoarthritis with tortoise shell glue and deer horn glue, by observing the effect of tortoise shell glue and deer horn glue-containing serum on chondrocyte proliferation and mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) expression in guinea pigs with knee osteoarthritis. **Methods** Articular chondrocytes were obtained from 3-month-old guinea pig by type II collagenase digestion to establish culture system in vitro. Chondrocytes was added with 4 kinds of drug-containing serum respectively (tortoise shell glue group, deer horn glue group, glucosamine hydrochloride group, and the control group). Chondrocyte proliferation was detected using MTT method. MAPKK mRNA expression was detected using quantitative PCR. **Results** After addition of 5% drug-containing serum for 72 h, chondrocyte proliferation was  $0.315 \pm 0.048$  in tortoise shell glue group,  $0.236 \pm 0.029$  in deer horn glue group,  $0.190 \pm 0.022$  in glucosamine hydrochloride group, and  $0.146 \pm 0.023$  in the control group, respectively, as tested using MTT method. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). MAPKK gene expression was  $3.287 \pm 0.675$  in tortoise shell glue group,  $2.147 \pm 0.204$  in deer horn glue group,  $1.137 \pm 0.123$  in glucosamine hydrochloride group, and  $0.627 \pm 0.102$  in the control group, respectively, as detected using quantitative PCR. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The effect of tortoise shell glue and deer horn glue on proliferation of chondrocytes is stronger than that of glucosamine hydrochloride. The effect may be related to the up-regulation of MAPKK gene expression in articular cartilage cells.

**Key words:** Traditional Chinese medicine; Osteoarthritis; Chondrocytes; Tortoise shell glue; Deer horn glue; Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK)

基金项目: 福建省卫生厅中医药科研项目(wzgs201301),福建省中青年教师教育科研重点项目(科技A类,JA13153)

\* 通讯作者: 李楠,Email:mr.linan@126.com

骨关节炎 (Osteoarthritis, OA), 是一种严重危害人类健康的慢性进行性骨关节病, 其主要病理改变是关节软骨的退变和继发性骨质增生, 在中老年人中发病率较高, 且有一定的致残率和致畸率<sup>[1]</sup>。目前关于 OA 的发病机制尚不明确, 软骨细胞作为关节软骨中的唯一细胞, 软骨细胞的活性与骨关节炎的发病及病程进展关系密切。前期研究表明龟鹿二仙胶可提高软骨细胞中 II 型胶原和 Bcl-2 基因水平, 降低 Bax 基因和基质金属蛋白酶 3 水平<sup>[2]</sup>, 促进软骨细胞增殖, 抑制软骨细胞凋亡, 对膝骨关节炎有很好的防治作用, 其中龟甲胶、鹿角胶是发挥此作用的主要物质<sup>[3-6]</sup>。本实验采用龟甲胶、鹿角胶及盐酸氨基葡萄糖含药血清对豚鼠骨关节炎软骨细胞体外培养系统进行干预, 观察含药血清干预后软骨细胞增殖及丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MKK) 基因表达的差异, 为进一步阐释龟甲胶、鹿角胶治疗膝骨关节炎的作用机制提供依据。

## 1 实验材料

### 1.1 试剂与仪器

盐酸氨基葡萄糖胶囊 (澳美制药, 批号: 1408181), 龟甲胶 (湖南东健药业有限公司, 批号: 20130303), 鹿角胶 (石家庄华鹏药业有限公司, 批号: 140214), 以上药物均采购自福建中医药大学附属第三人民医院。TransScript® One-Step gDNA、TransStart® TipTop Green qPCR SuperMix (TransGen, 北京), PCR 引物为上海生工合成; PBS 缓冲液、DMEM 低糖培养基、胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); Rabbit Anti-Collagen II、II 型胶原酶、噻唑蓝粉 MTT、二甲基亚砜 DMSO (美国 Sigma 公司); HERACELL 150i CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司)、DMIL LED 倒置显微镜 (德国 LEICA 公司)。

### 1.2 实验动物

含药血清制备选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 (200 ± 10) g, 合格证号: 2007000570197; 软骨细胞取材选用 3 月龄雌性 Hartley 豚鼠 2 只<sup>[7]</sup>, 合格证号: 2007001103456; 以上动物均购于上海斯莱克实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。

## 2 实验方法

### 2.1 分组及含药血清的制备

将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为龟甲胶组 (G

组)、鹿角胶组 (L 组)、盐酸氨基葡萄糖组 (A 组)、对照组 (K 组), 每组 12 只。适应性喂养 7 d 后, 采用成人与动物体表面积换算的药物等效换算公式<sup>[8]</sup>计算大鼠所用生药药物等效剂量, 将药物浓度配成: 龟甲胶、鹿角胶均为 0.1 g/ml, 盐酸氨基葡萄糖 0.03 g/ml, 对照组以适量生理盐水灌胃, 各组以相应药物每日灌胃 1 次, 连续 7 d, 末次给药 2 h 后腹主动脉采血, 室温静置 2 h 后 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过滤分装, -20 °C 保存备用。

### 2.2 软骨细胞体外培养体系的建立

将 2 只 3 月龄雌性豚鼠脱颈处死取膝关节关节软骨, PBS 漂洗 3 遍后将软骨切成约 1 mm<sup>3</sup> 碎块, 用 3 ml 0.2% 的 II 型胶原酶在 37 °C 恒温水浴震荡箱中消化 2 h, 取上层消化液 1500 r/min 离心 5 min 收集细胞, 重复 3 次, 将所得细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 吹打混匀, 将浓度调整为 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml, 接种到 25cm<sup>2</sup> 培养瓶, 置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞铺满瓶底约 80% 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 原代计为 F0 代。用 II 型胶原免疫组化染色和甲苯胺蓝染色对软骨细胞进行鉴定。

### 2.3 MTT 法检测各组含药血清对软骨细胞增殖的影响

细胞计数, 调整 F2 代软骨细胞密度, 接种到 96 孔板, 每孔 2 × 10<sup>3</sup> 个, 各组设高、低 2 组, 每组 6 个复孔, 于细胞培养箱中培养 24 h 后弃培养基, 分别以含 10%、5% 含药血清的 DMEM 100 μl 对各组进行干预, 24、72 h 后弃培养基, 加入 100 μl 0.5 mg/ml 的 MTT 培养箱中孵育 4 h 后弃 MTT, 每孔加入 100 μl DMSO 溶解深褐色结晶物, 在酶联免疫检测仪上测定并记录各孔 OD 值 (波长 490 nm)。

### 2.4 荧光定量 PCR 检测各组含药血清对软骨细胞 MKK 基因表达的影响

2.4.1 选取 F2 代软骨细胞, 将浓度调整为 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种至培养瓶中, 24 h 后弃培养基, 加入各组含 5% 含药血清的 DMEM 培养基, 干预 72 h。

2.4.2 使用 Primer Premier 5 软件设计 MKK 及内参 GAPDH 的上下游引物, 由上海生工生产, 具体见表 1。

2.4.3 采用 Trizol 法提取总 RNA, 应用紫外吸收法测定 RNA 浓度, 按照试剂盒说明书逆转录成 cDNA, 反应步骤为: 42 °C 30 min, 85 °C 5 min。然后以 GAPDH 为内参, 并设 3 个重复管, 进行荧光定量 PCR 检测, PCR 反应体系的反应步骤为: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。mRNA 的相对表达量采用 2<sup>-ΔΔt</sup> 表示。

表 1 引物的序列  
Table 1 The Primer sequences

| Gene  | PrimerProduct                           | Size   |
|-------|-----------------------------------------|--------|
| MKK   | Forward(5'-3'):GCAACTGTGAAAGCACTAAACC   | 225 bp |
|       | Reverse(5'-3'):CATGTATGGCCTACACAGGACCA  |        |
| GAPDH | Forward(5'-3'):ACGGCAAGTTCAACGGCACAG    | 189bp  |
|       | Reverse(5'-3'):GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC |        |

2.5 数据分析

实验数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS18.0 软件进

表 2 不同浓度含药血清干预后 MTT 检测 4 组豚鼠软骨细胞的增殖 OD 值比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of OD values of chondrocyte proliferation among 4 groups with different intervention of drug-containing serum

| 组别  | 24 h                         |                            | 72 h                         |                              |
|-----|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
|     | 5% 含药血清                      | 10% 含药血清                   | 5% 含药血清                      | 10% 含药血清                     |
| G 组 | 0.124 ± 0.004 * <sup>△</sup> | 0.110 ± 0.008 <sup>△</sup> | 0.315 ± 0.048 * <sup>△</sup> | 0.116 ± 0.006 * <sup>△</sup> |
| L 组 | 0.115 ± 0.00 <sup>△</sup>    | 0.109 ± 0.002 <sup>△</sup> | 0.236 ± 0.029 <sup>△</sup>   | 0.105 ± 0.002                |
| A 组 | 0.103 ± 0.004 <sup>△</sup>   | 0.110 ± 0.005 <sup>△</sup> | 0.190 ± 0.022 <sup>△</sup>   | 0.108 ± 0.005 <sup>△</sup>   |
| K 组 | 0.092 ± 0.007                | 0.09 ± 0.005               | 0.146 ± 0.023                | 0.093 ± 0.025                |

注:与鹿角胶组同期比较: \*  $P < 0.05$ ; 与盐酸氨基葡萄糖组同期比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组同期比较: <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ 。

表 3 5% 含药血清干预 72 h 后 4 组豚鼠软骨细胞 MKK mRNA 表达量比较( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of MAPKK mRNA expression in chondrocytes among 4 groups with different intervention of drug-containing serum

| 组别  | MKK mRNA 相对表达量               |
|-----|------------------------------|
| G 组 | 3.287 ± 0.675 * <sup>△</sup> |
| L 组 | 2.147 ± 0.2042 <sup>△</sup>  |
| A 组 | 1.137 ± 0.1233 <sup>△</sup>  |
| K 组 | 0.627 ± 0.102                |

注:与鹿角胶组同期比较: \*  $P < 0.05$ ; 与盐酸氨基葡萄糖组同期比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组同期比较: <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ 。

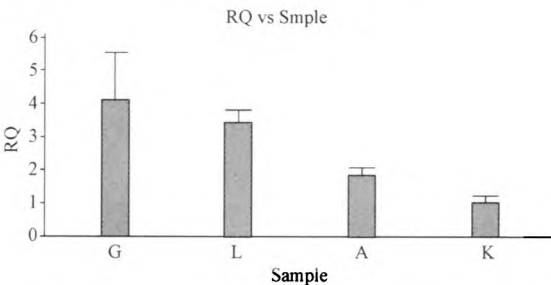


图 1 各组含药血清干预后软骨细胞 MKK mRNA 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of MAPKK mRNA in chondrocytes of 4 groups with different intervention of drug-containing serum

4 讨论

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)级联途径受多种细胞外信号(如生

行统计分析多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),不符合正态分布则采用非参数检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

各组含药血清对豚鼠膝关节软骨细胞增殖、MKK 基因表达的影响分别见表 2、表 3、图 1。

长因子、细胞因子等)的刺激,参与软骨细胞的凋亡、炎症反炎、基质金属蛋白酶的激活,从而影响软骨细胞的活性,是介导骨关节炎软骨最重要的信号转导系统<sup>[9]</sup>。

MAPK 信号转导以 3 级激酶级联的方式进行, MAPKKK 受有丝分裂原刺激磷酸化而激活,在此基础上 MAPKKK 转而磷酸化激活 MAPKK,最后由 MAPKK 磷酸化 MAPK,使其活化进而转入核内,调控特定的基因表达。MAPKs 家族包括:p38 MAPK、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)、c-Jun N-末端激酶(c Jun N terminal kinases, JNK)、ERK3、大 MAPK 通路(BMK1/ ERK5)、ERK27、NLK 和 ERK8 等 8 个亚家族<sup>[10]</sup>,受不同刺激因子作用,从而表现出对软骨细胞的不同影响。MKK 被 Ser/Thr 磷酸化激活后,识别下游 MAPK 分子中“Thr-X-Thr”模序激活 MAPK,从而影响软骨细胞活性。因此 MKK 作为 MAPKKK → MAPKK → MAPK 级联反应中的重要环节,其在骨关节炎软骨退变过程中起着关键作用。

本研究结果显示:5% 含药血清对软骨细胞有明显的促增殖作用,干预 72h 后组间差别较大,其促增殖作用为龟甲胶 > 鹿角胶 > 盐酸氨基葡萄糖 > 对照组( $P < 0.05$ ,如表 2),说明 5% 含药血清为促软骨细胞增殖的最佳浓度,干预 72 h 为最佳检测时间;而 10% 含药血清干预 24 h 和 72h 后相比,软骨细胞增殖不明显,鹿角胶组和盐酸氨基葡萄糖组软骨细

胞甚至有所减少,其原因可能与含药血清浓度过高使软骨细胞大量死亡,导致细胞基数锐减有关,而含药血清干预 72 h 后龟甲胶组细胞数量高于其它组,这一结果可能与龟甲胶对软骨细胞凋亡有较强的抑制作用有关。荧光定量 PCR 结果显示,含药血清干预后软骨细胞中 MKK 的基因表达量为龟甲胶 > 鹿角胶 > 盐酸氨基葡萄糖 > 对照组 ( $P < 0.05$ , 如表 3、图 1) ( $P < 0.05$ ),说明龟甲胶、鹿角胶、盐酸氨基葡萄糖均能促进豚鼠骨关节炎软骨细胞 MKK 的基因表达,从而促进软骨细胞的增殖,而龟甲胶的作用最明显,鹿角胶次之。前期研究发现龟鹿二仙胶可以显著地抑制大鼠软骨细胞 Bax、Caspase-3、p53 的表达,显著促进 Bcl-2 的表达,从而抑制凋亡,同时龟板、鹿角可显著促进软骨细胞 II 型胶原的合成,提高软骨细胞蛋白黏多糖的表达,以促进其增殖,其中龟甲胶和鹿角胶是发挥该作用的主要物质。MAPKs 家族中 JNK、p38 激酶和 ERK 被证实参与了 OA 的发病过程,ERK 主要受生长因子激活,促进 II 型胶原的合成和分泌,同时还参与调控细胞的终末分化,且 ERK1/2 信号通路与肝肾亏虚型膝关节炎密切相关<sup>[11]</sup>;JNK 和 p38 激酶受细胞外的应激、细胞因子和低氧因素刺激而活化,参与调控炎症反应和影响 Bax、Caspase-3 等凋亡因子的表达,三种通路可单独或同时被激活而实现对软骨细胞调节<sup>[12,13]</sup>。MKK 为 MAPKs 的上游激酶,龟甲胶、鹿角胶促进 MKK 基因的表达,则可影响 ERK、JNK 和 p38 等下游激酶的表达水平,从而影响软骨细胞的活性,表现出对软骨细胞增殖的促进作用。然后 MKK 也存在着多种亚型,以实现对下游各种不同激酶的调控,但龟甲胶、鹿角胶具体通过对 MKK 的哪一亚型的调控以实现对软骨细胞的促增殖作用还有待于进一步研究。

以上可以说明:龟甲胶、鹿角胶对软骨细胞增殖的促进作用强于盐酸氨基葡萄糖,这一作用可能与其能有效上调关节软骨细胞 MKK 的基因表达有关。

### 【参 考 文 献】

- [1] 裘法祖. 外科学[M]. 第 4 版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 892-894.  
Qiu FZ. Surgery [M]. fourth edition, Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 892 - 894. (in Chinese)
- [2] 邱慈鑫, 余添赐, 杨树华, 等. 龟鹿二仙胶不同提取部位对豚鼠软骨细胞活性的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(10): 7-11.  
Qiu CX, Yu TC, Yang SH, et al. Effect of guiluerxianjiao different extracts on the activity of cartilage cells in guinea pig. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2014, 26(10): 7-11. (in Chinese)
- [3] 李楠, 杜江, 黄远鹏, 等. 龟鹿二仙胶及其拆方对 SD 大鼠膝骨关节炎的影响. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1677-1680.  
Li N, Du J, Huang YP, et al. Guiluerxianjiao and remove the effects of knee osteoarthritis in SD rats. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 28(6): 1677-1680. (in Chinese)
- [4] 李楠, 雒焕生, 尹玉彪, 等. 龟鹿二仙胶及其拆方含药血清对硝普钠诱导的大鼠软骨细胞 bax、bcl-2 表达的影响. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(1): 1-4.  
Li N, Luo HS, Ying YB, et al. Guiluerxianjiao and remove effect of medicated serum on chondrocyte Bax, expression of Bcl-2 in rats induced by sodium nitroprusside. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2012, 20(1): 1-4. (in Chinese)
- [5] 李楠, 尹玉彪, 雒焕生, 等. 龟鹿二仙胶及其拆方对豚鼠软骨细胞 II 型胶原和蛋白多糖合成的影响. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2524-2526.  
Li N, Ying YB, Luo HS, et al. Guiluerxianjiao and remove effect on cartilage cells of guinea pig collagen and proteoglycan synthesis. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 26(11): 2524-2526. (in Chinese)
- [6] 李楠, 雒焕生, 赵诣, 等. 龟鹿二仙胶汤及其拆方对大鼠软骨细胞凋亡基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(7): 1-3.  
Li N, Luo HS, Zhao Y, et al. Guilu Erxian Decoction and its disassembled effect on the expression of chondrocyte apoptosis gene in rats Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2011, 19(7): 1-3. (in Chinese)
- [7] 梁震, 姜旭, 吴成爱, 等. 雌性豚鼠不同年龄自发骨性关节炎的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(12): 1091-1094.  
Liang Z, Zhang X, Wu CA, et al. Study of spontaneous osteoarthritis in female guinea pigs of different age. Chin J Osteoporos, 2012, 18(12): 1091-1094. (in Chinese)
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.  
Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of pharmacology experiment [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 202-204. (in Chinese)
- [9] 陈泽华, 李楠. ERK1/2 信号通路与骨关节炎软骨细胞活性及其治疗的相关性研究[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(1): 63-65 + 71.  
Chen ZH, Li N. The correlation between ERK1/2 signaling pathway and the pathogenesis and treatment of osteoarthritis. Rheumatism and Arthritis, 2015, 4(1): 63-65 + 71. (in Chinese)
- [10] 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 28(5): 441-444.  
Gao SC, Ying HB, Liu HX, et al. Research progress of MAPK signaling pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2014, 28(5): 441-444. (in Chinese)
- [11] 陈泽华, 林海英, 李楠. 综述细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路及肝肾亏虚型膝关节炎的相关性[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3207-3210.  
Chen ZH, Lin HY, Li N. ERK1/2 signaling pathway correlation with liver and kidney deficiency type of knee osteoarthritis. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2015, 30(9): 3207-3210. (in Chinese)
- [12] Kimura H, Yukitake H, Suzuki H, et al. The chondroprotective agent ITZ-1 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-13 production and suppresses nitric oxide-induced chondrocyte death. J Pharmacol Sci. 2009 Jun; 110(2): 201-11.
- [13] 张林, 陆军, 李永刚. 骨关节炎中介导软骨细胞代谢失衡的相关信号通路研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2013, (4).  
Zhang L, Lu J, Li YG. Research Progress on the signal pathway of metabolic imbalance of cartilage cells in osteoarthritis. Journal of Southeast University (Medical Science Edition) 2013, (4). (in Chinese)

(收稿日期: 2015-10-09)