

· 论著 ·

补骨颗粒含药血清对大鼠软骨细胞凋亡及 Trx2 信号通路的影响

余光书¹ 林焱斌^{1*} 熊国胜¹ 李杰辉² 张寿雄² 王海洋³

1. 厦门大学附属福州第二医院骨科, 福建 福州 350007

2. 福建中医药大学研究生院, 福建 福州 350122

3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102

中图分类号: R289.5; R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 06-0753-05

摘要: **目的** 观察补骨颗粒含药血清对体外培养的大鼠膝关节软骨细胞凋亡及对 Trx2、ASK1 及 Caspase3 表达的影响, 从而探讨补骨颗粒预防骨性关节炎发生发展的作用机制。 **方法** 采用两步酶消化法分离培养大鼠软骨细胞, 并进行传代培养。应用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色后经流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡情况。同时, 通过电泳分离蛋白并通过蛋白质印迹分析 Trx2、ASK1 及 Caspase3 的表达情况。 **结果** 软骨细胞培养 15 d 左右铺满 80%~90% 的培养皿, 大部分细胞呈梭形。流式细胞检测结果显示空白血清组的细胞凋亡率为 22.80%, 明显高于含药血清组 ($P<0.05$), 而 20% 含药血清组 (15.91%) 与 30% 含药血清组 (17.93%) 的细胞凋亡率又明显低于 10% 含药血清组 (21.58%), 各组间比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。蛋白质印迹分析结果显示含药血清组 Trx2 的表达量都明显增多, 以 10% 含药血清组的表达量最多; 空白组与 10% 含药血清组的 ASK1 与 Caspase3 的表达量比 20% 与 30% 含药血清组多。 **结论** 补骨颗粒可以通过激活 Trx2 信号通路而抑制软骨细胞的凋亡, 从而起到预防骨性关节炎发生发展的作用。

关键词: 补骨颗粒; 含药血清; 软骨细胞; 细胞凋亡; Trx2 信号通路; 大鼠

Effects of Bugu Granule drug-containing serum on rat chondrocyte apoptosis and Trx2 signaling pathway

YU Guangshu¹, LIN Yanbin^{1*}, XIONG Guosheng¹, LI Jiehui², ZHANG Shouxiong², WANG Haiyang³

1. Department of Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007

2. Graduate School, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122

3. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, China

* Corresponding author: LIN Yanbin, Email: 812953900@qq.com

Abstract: **Objective** To observe the effects of Bugu Granule drug-containing serum on apoptosis of rat knee articular chondrocytes cultured in vitro, and the expression of Trx2, ASK1 and Caspase 3. Furthermore, the mechanism of Bugu Granule in preventing the development of osteoarthritis was discussed. **Methods** Rat chondrocytes were isolated and cultured by two-step enzymatic digestion, and subcultured afterwards. Apoptosis of chondrocytes was detected by flow cytometry after annexin V-FITC/PI staining. At the same time, proteins were separated by electrophoresis and the expression of Trx2, ASK1 and Caspase3 was analyzed by Western blot. **Results** The culture dishes were 80%-90% covered with chondrocytes that were cultured for about 15 days, and most of chondrocytes were fusiform. Flow cytometry result showed that the apoptosis rate of the blank serogroup (22.80%) was higher than drug-containing serum group ($P<0.05$). However, the apoptosis rate of 20% drug-containing serum group (15.91%) and 30% drug-containing serum group (17.93%) was significantly lower than the 10% drug-containing serum group (21.58%), and there were statistically significant differences between the groups ($P<0.05$). Western blot analysis showed that the expression level of Trx2 in the drug-containing serum group increased significantly, which was expressed most in the 10% drug-containing serum group. The expression levels of ASK1 and Caspase3 in the blank group and the 10% drug-containing serum

基金项目: 福州市科技计划项目 (2017-S-130-5); 福建省自然科学基金项目 (2016J01597)

* 通信作者: 林焱斌, Email: 812953900@qq.com

group were higher than those in the 20% and 30% drug-containing serum groups. **Conclusion** Trx2 signaling pathway could be activated by Bugu Granule, and chondrocyte apoptosis could be inhibited, which plays a role in preventing the development of osteoarthritis.

Key words: Bugu granule; drug-containing serum; chondrocytes; apoptosis; Trx2 signaling pathway; rat

骨性关节炎是一种以关节软骨退行性变为主要病理特征的慢性骨关节疾病,其发生发展是多种原因导致成骨细胞与破骨细胞失衡所引起,但发病机制还不甚清楚^[1-2]。目前,大多数研究表明软骨细胞的凋亡在骨性关节炎的发生发展过程中起着重要作用,阻止或延缓软骨细胞发生凋亡是防治骨性关节炎的一条有效途径^[3-4]。软骨细胞的凋亡主要有外源性通路和内源性通路,其中线粒体介导的内源性凋亡通路越来越受到关注,而凋亡蛋白酶激活因子引起半胱天冬酶瀑布式活化和细胞凋亡是目前研究的热点^[5]。笔者在既往临床观察发现补肾活血中药能够有效预防膝骨性关节炎的基础上,拟从体外细胞实验研究补肾活血中药对细胞凋亡的影响,及其对 Trx2 信号通路的调控作用,以期为进一步研究骨性关节炎的防治机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

成年清洁型 SD 大鼠,体重在(180±20) g,雌雄各半,由福建医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK 2016-0002)。胶原酶 II(编号:C8150)、Trx2(编号:YT4752)、ASK1(编号:YT0370)、Caspase3(编号:YC006)由北京市普京康利科技有限公司提供,DMEM 培养基(编号:180-500)、0.25%胰蛋白酶(编号:TE2004Y)、胎牛血清(编号:TBD11HT)由北京孚博生物科技有限公司提供,PBS 缓冲液(编号 GT0060)由晶泰公司提供,凋亡试剂盒(编号 KGA107)由南京凯基公司提供,中药颗粒由厦门大学附属福州第二医院药剂科提供。

1.2 实验步骤

1.2.1 含药血清的制备:成年 SD 大鼠 10 只,雌雄各半,体重在(180±20) g。随机分为空白血清组和含药血清组,每组 5 只。依据临床常用量按实验动物与人体表面积折算的等效剂量比值换算,将补肾颗粒用生理盐水加热溶解,制成 1 g/mL 的水溶液。空白血清组予生理盐水 2 mL/kg 灌胃,含药血清组予 3.08 g/kg 灌胃,每日 1 次,连续 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 2 000 r/min,离心 15 min 后分离血

清,于 56 ℃ 恒温水浴灭活 30 min,-80 ℃ 冰箱保存。

1.2.2 软骨细胞的分离与传代:将大鼠浸泡于 75% 的乙醇中消毒 3 min,取出处死后在无菌条件下解剖出关节软骨,去尽其他组织后放入有双抗的 PBS 液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)漂洗 4~6 次,然后将其放入消毒的青霉素小瓶并加入 1.5 mg/mL II 型胶原酶溶液,在胶原酶小瓶中剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的碎片,封口于 37 ℃ 水浴锅内消化 30 min,期间不时用手摇瓶,弃去上悬酶液,用 DMEM 漂洗 1~2 次,吸尽上清后再加入 10 倍体积的 0.2% II 型胶原酶,37 ℃ 水浴锅内消化 30 min 后收集上悬液,如此反复 3 次,集中所有上悬液,1 000 r/min 离心 5 min,倒去上清液,沉淀用 PBS 液洗涤 3 次,用 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液混悬细胞,剩余软骨片及絮状胶样物弃去。将分离好的软骨细胞接种于 25 cm² 的培养皿中,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后观察细胞贴壁情况,以后每 3 d 更换 1 次培养液。待生长细胞铺满培养皿 70%~80% 时,通过用 0.25% 胰蛋白酶在 37 ℃ 温育 1 min 将细胞从培养瓶中分离。加入完全培养基,通过 3 000 r/min 离心 5 min 收获细胞,并重悬于培养基中以除去胰蛋白酶。将细胞接种在大培养皿中,4~5 d 后获得原代细胞。在随后的传代中每 2 d 更换培养基,经历 2~5 次传代的细胞用于实验。

1.2.3 流式细胞术分析细胞凋亡:取第 3 代软骨细胞以 1×10⁵/cm² 接种于培养板中,培养 72 h 细胞贴壁后“饥饿”培养 24 h 使细胞同步化。细胞随机分组后,于 A 组加入空白血清、B 组加入 10% 含药血清、C 组加入 20% 含药血清、D 组加入 30% 含药血清,继续培养 96 h 后收集细胞悬浮液,以 PBS 洗涤细胞 2 次后使用胰蛋白酶消化并收集于离心管。在 4 ℃ 条件下以 1 000 r/min 离心 5 min 两次,然后转移到专用管,按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明进行操作,采用 BD FACScalibur 流式细胞仪定量细胞凋亡,CellQuest Pro 软件用于分析细胞凋亡情况。

1.2.4 电泳和蛋白质印迹分析:将收集到的细胞通过无菌 PBS 清洗两次后再加入适量 PBS,用无菌刮刀收集细胞于 1.5 mL EP 管中,在冰上用含有 1

mmol/L 蛋白酶抑制剂苯基甲磺酰氟 (PMSF) 的 RIPA 缓冲液裂解 30 min。在 4 ℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用于蛋白浓度测定 (BCA 法)。蛋白浓度测定后根据标准曲线计算出各个样品的蛋白含量, 再加入适量 5×蛋白上样缓冲液, 调整各个样品的最终浓度一致后将蛋白样品煮沸 5 min, 以 12 000 r/min 离心 1 min 后取出上清液放入 EP 管中, 按照 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配制 4% PAGE 凝胶, 上样后先用电压 80 V, 约 30 min, 待蛋白电泳至浓缩胶与分离胶交界处时改用电压 120 V, 约 60 min。将蛋白转移至 NC 膜上, 再将 NC 膜放入现配的 5% 的脱脂奶粉溶液 (2 g 脱脂奶粉溶于 40 mL 1×TBST 中) 中室温摇床封闭 2 h。洗膜后加入按稀释液 1:1000 的一抗中, 4 ℃ 孵育过夜。洗膜后放入按稀释液 1:3000 的二抗中, 水平摇动, 室温孵育 2 h。取出 NC 膜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。洗膜后使用 ECL 发光试剂化学显色后曝光并显影, 使用 Image J 图象分析系统测定条带灰度值,

Actin 作为内参, 取其余组与其比值进行计算。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件分析。各组间的细胞凋亡率比较采用非参数检验方法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 采用胶原酶消化法对软骨细胞进行分离并进行原代软骨细胞传代

从 SD 大鼠膝关节软骨组织中分离软骨细胞, 并使用光学显微镜观察培养物。从培养过程中发现原代的软骨细胞增殖速度缓慢, 从第 10 天开始软骨细胞的增殖速度才有所加快, 约在第 15 天软骨细胞才铺满 80%~90% 的培养皿。在原代软骨细胞贴壁传代后软骨细胞贴壁和增殖的速率有所加快, 传代至第 2、3 代时细胞增殖速度最快, 第 4 代后则呈“去分化”现象, 同时还发现在培养过程中梭形状细胞在逐渐增加。见图 1。

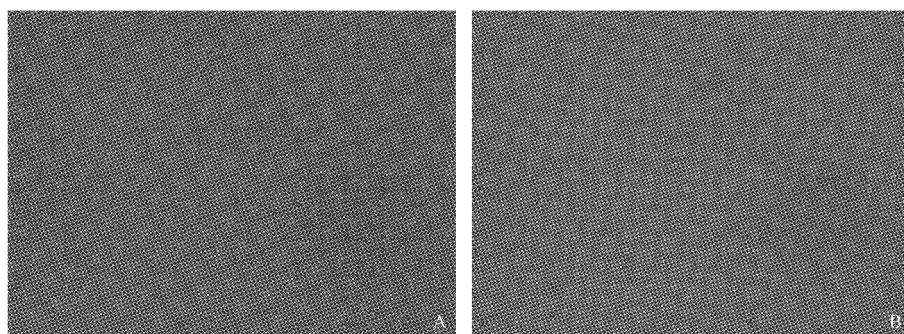


图 1 细胞多为梭形, 少数为星形、椭圆形, 符合软骨细胞形态 A: 细胞未铺满; B: 细胞铺满后。

Fig.1 Most of the cells are fusiform, and a few are star-shaped and elliptical, which conform to the morphology of chondrocytes. A: Not covered by cells; B: Covered by cells.

2.2 使用凋亡检测试剂盒检测 4 组软骨细胞的凋亡, 通过流式细胞术检测第 5 天各组的凋亡能力

检测结果显示, 空白血清组的细胞凋亡率为 22.80%, 明显高于含药血清组 ($P < 0.05$), 而 20% 含药血清组 (15.91%) 与 30% 含药血清组 (17.93%) 的细胞凋亡率又明显低于 10% 含药血清组 (21.58%), 各组间的比较具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Western 印迹法检测不同剂量补骨颗粒含药血清对软骨细胞 Trx2 信号通路的影响

通过条带分析可以观察到含药血清组 Trx2 的表达量都明显增多, 以 10% 含药血清组的表达量最多; 空白组与 10% 含药血清组的 ASK1 与 Caspase3 的表达量比 20% 与 30% 含药血清组多。见图 3。通

过与 Actin 内参蛋白比值的统计, 可以得到如表 1 所示的值。

表 1 与 Actin 内参蛋白的比值

Table 1 Ratio to Actin of internal reference protein

类别	空白血清组	10% 含药血清	20% 含药血清	30% 含药血清
TRX2	0.38	0.55	0.43	0.42
ASK1	0.25	0.29	0.21	0.23
Caspase3	0.98	0.94	0.67	0.72

3 讨论

膝关节软骨组织内并无血管、神经及淋巴液等供应, 因此不能通过自我更新补偿丢失的细胞, 而是

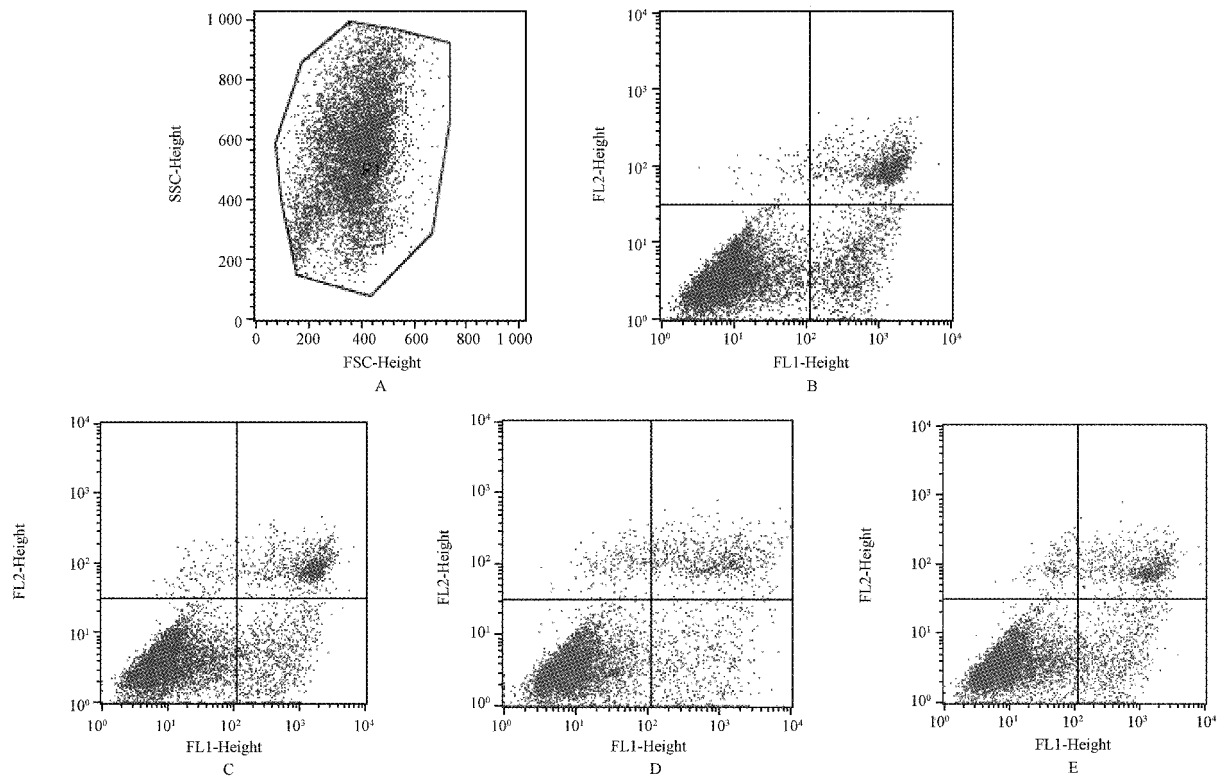


图2 细胞凋亡散点图 A:圈定细胞;B:空白血清组;C:10%含药血清组;D:20%含药血清组;E:30%含药血清组。

Fig.2 Apoptosis scatter plot. A: Delineate cells; B: Blank serum group; C: 10% drug-containing serum group; D: 20% drug-containing serum group; E: 30% drug-containing serum group.

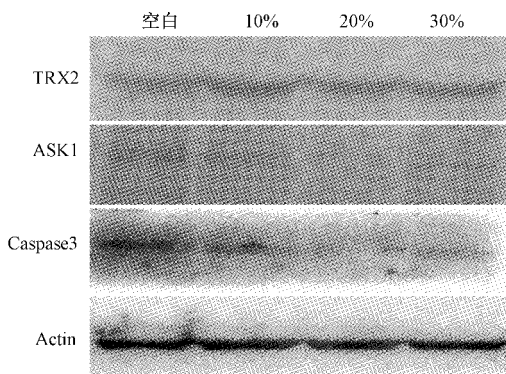


图3 Western 印迹图

Fig.3 Western blot

通过增殖来维持成骨与破骨的平衡状态,但是软骨细胞的增殖分化速度较慢。笔者在培养过程中发现10 d左右才开始逐渐聚集形成软骨细胞团集落,而在培养的15 d左右才铺满80%~90%的培养皿。因此,研究如何预防软骨细胞的凋亡具有重要的意义。而软骨细胞的凋亡由多个基因参与调控,其中线粒体介导的凋亡通路主要是通过呼吸电子漏途径,引起线粒体跨膜电位降低,导致凋亡蛋白酶激活因子释放到胞浆,随之引起半胱天冬酶瀑布式活化和细

胞凋亡^[6]。其中硫氧还蛋白2(Trx2)是特异位于线粒体的小分子蛋白,它在抗氧化应激、阻止线粒体介导的细胞凋亡等方面发挥着不可忽略的作用^[7-8]。

补骨颗粒由骨碎补、鹿衔草、淫羊藿、党参、茯苓、三七、川牛膝、当归、川芎、女贞子、枸杞及生地等药物组成。现代药理学研究表明,骨碎补、淫羊藿、鹿衔草等补益肝肾中药可以促进成骨细胞的增殖,抑制破骨细胞的吸收,从而达到预防退行性改变的作用^[9-10]。党参、茯苓等补气健脾中药可以提高抗氧化酶的活性,抑制脂质过氧化物的产生,增强运动能力^[11]。三七、当归等活血药物可以通过调控线粒体信号通路而控制细胞的凋亡^[12-13]。由上述可知,补骨颗粒通过“补肾健脾,活血化瘀”的方法可以起到促进细胞增殖与抑制细胞凋亡的功效。本课题研究过程也证实了补骨颗粒可以抑制软骨细胞凋亡的作用。

硫氧还蛋白2(Trx2)是特异位于线粒体的小分子蛋白,可以与凋亡信号调节激酶-1(ASK1)结合并抑制ASK1的活性,从而抑制凋亡前因子Caspase3所诱导的细胞凋亡^[14-15]。本实验结果也表明补骨颗粒可以促进Trx2的表达,但是浓度较低时不利于Trx2/ASK1复合物的形成。因此,10%含药血清

组的 Trx2 与 ASK1 都明显高于 20% 与 30% 含药血清组,而 ASK1 可以激活 Caspase 3 的表达及其活性,所以空白血清组与 10% 含药血清组的 Caspase 3 表达量明显多于 20% 与 30% 含药血清组。笔者从流式细胞分析技术中也发现了空白血清组与 10% 含药血清组的细胞凋亡率高于 20% 与 30% 含药血清组。因此,笔者认为补骨颗粒含药血清可以通过调控 Trx2-ASK1-caspase 3 信号途径以控制软骨细胞的凋亡,但是含药血清需要达到一定合适的浓度,否则不利于 Trx 2/ASK 1 复合物的形成。

【参 考 文 献】

- [1] Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Lories RJ, et al. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(2): 336-348.
- [2] Yeh CC, Su YH, Lin YJ, et al. Evaluation of the protective effects of curcuminoid (curcumin and bisdemethoxycurcumin)-loaded liposomes against bone turnover in a cell-based model of osteoarthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 2285-300.
- [3] Wang GL, Wu YB, Liu JT, et al. Upregulation of miR-98 inhibits apoptosis in cartilage cells in osteoarthritis [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(11): 645-653.
- [4] Weng T, Xie Y, Yi L, et al. Loss of Vhl in cartilage accelerated the progression of age-associated and surgically induced murine osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22 (8): 1197-1205.
- [5] Yang Q, Guo S, Wang S, et al. Advanced glycation end products-induced chondrocyte apoptosis through mitochondrial dysfunction in cultured rabbit chondrocyte [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015, 29(1): 54-61.
- [6] Liu F, Liu G, Liang W, et al. Duhuo Jisheng decoction treatment inhibits the sodium nitroprussiate induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondrial dependent signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1573-1580.
- [7] Sun N, Hao JR, Li XY, et al. GluR6-FasL-Trx2 mediates denitrosylation and activation of procaspase-3 in cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e771.
- [8] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Analysis of mitochondrial dysfunction during cell death [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1264(1): 385-393.
- [9] 郭色波, 土丽丽, 马如风, 等. 女贞子水提液对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的影响研究 [J]. *中草药*, 2016, 47 (7): 1155-1163.
- [10] 李梅, 康学艺, 年宏蕾, 等. 淫羊藿-女贞子抗维甲酸致大鼠骨质疏松症的作用机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12): 81-86.
- [11] Zheng YS, Wu ZS, Ni HB, et al. Codonopsis pilosula polysaccharide attenuates cecal ligation and puncture sepsis via circuiting regulatory T cells in mice [J]. *Shock*, 2014, 41(3): 250-255.
- [12] 王晓燕, 李冠武, 常时新. 三七总皂苷通过血管生成改善绝经后骨质疏松机制探析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(8): 964-969.
- [13] 吴晓莉, 刘娜, 马夫天, 等. 三七皂苷 R1 通过线粒体相关通路促进白血病细胞株 HL-60 凋亡 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(1): 24-30.
- [14] Yan J, Xu J, Fei Y, et al. TrxR2 deficiencies promote chondrogenic differentiation and induce apoptosis of chondrocytes through mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 344(1): 67-75.
- [15] Chong CR, Chan WP, Nguyen TH, et al. Thioredoxin-interacting protein: pathophysiology and emerging pharmacotherapeutics in cardiovascular disease and diabetes [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2014, 28(4): 347-360.

(收稿日期: 2018-07-16; 修回日期: 2018-08-04)