

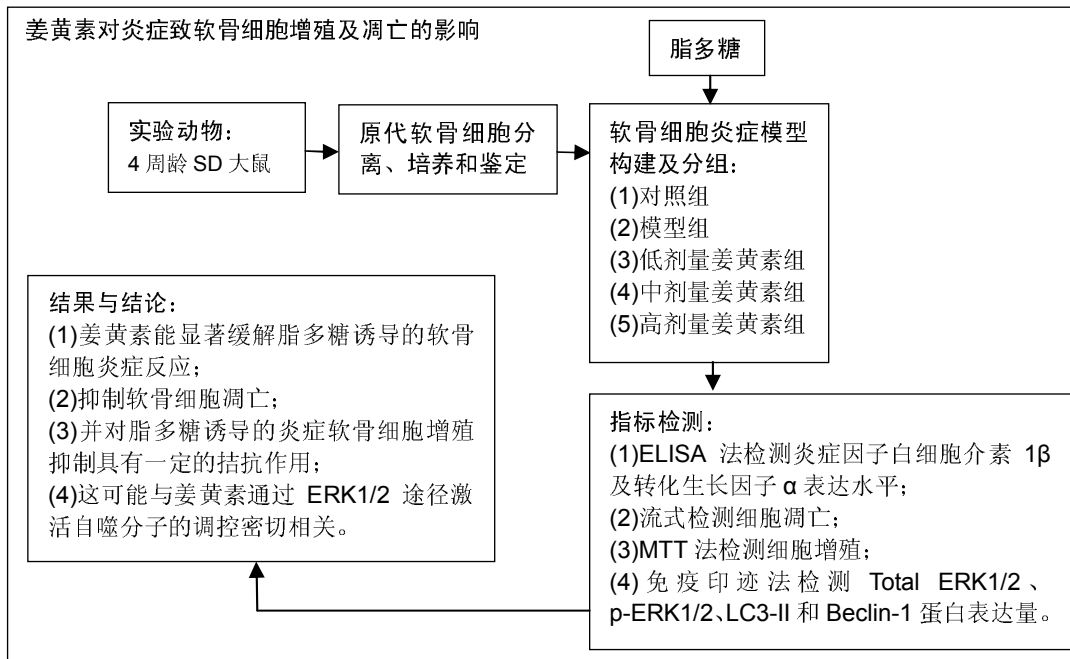
姜黄素对脂多糖诱导炎症致软骨细胞凋亡及增殖能力的影响

李亚楠, 倪娟, 方禹舜, 李涛, 谈鸿飞, 张青松(华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 湖北省武汉市 430030)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0539

ORCID: 0000-0002-4583-6958(李亚楠)

文章快速阅读:



李亚楠, 男, 1989 年生, 河南省驻马店市人, 汉族, 2014 年华中科技大学同济医学院毕业, 博士, 医师, 主要从事关节退行性疾病、软骨及韧带损伤研究。

通讯作者: 张青松, 硕士生导师, 副主任医师, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 湖北省武汉市 430030

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-05-20



文题释义:

姜黄素: 是一种从姜科植物姜黄等的根茎中提取得到的黄色色素, 为酸性多酚类物质, 主链为不饱和脂族及芳香族基团。现代研究发现姜黄素可以抑制炎症反应、抗氧化、抗炎风湿、降脂、抗动脉粥样硬化、抗衰老消除自由基及抑制肿瘤生长的作用。

软骨细胞: 软骨组织由软骨细胞和细胞外基质构成, 软骨细胞是软骨组织中唯一的细胞成分, 是关节软骨破坏过程中的靶细胞, 因此研究靶细胞的变化是探索关节软骨病变和治疗的重要方法。软骨细胞炎症模型是指采用脂多糖体外刺激培养的软骨细胞诱发炎症反应, 是研究骨关节炎良好的体外模型。

摘要

背景: 在骨关节炎的相关研究中, 姜黄素被证实具有抗炎抗氧化及抗凋亡的作用, 但相关机制的研究还不够深入。

目的: 探讨姜黄素对脂多糖诱导的软骨细胞凋亡、增殖的影响, 以及潜在的作用机制, 为治疗骨关节炎疾病提供新思路。

方法: 取 4 周龄 SD 大鼠, 进行软骨细胞的体外分离培养, 甲苯胺蓝染色进行细胞鉴定。采用脂多糖诱导法建立体外软骨细胞炎症模型。将软骨细胞分为 5 组: 对照组(普通培养基); 模型组(含 5 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖培养基); 低剂量姜黄素组(含 5 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖+5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养基); 中剂量姜黄素组(含 5 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养基); 高剂量姜黄素组(含 5 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖+20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养基)。培养 24 h 后, ELISA 法检测各组细胞上清液中白细胞介素 1 β 和转化生长因子 α 的水平; 流式细胞仪检测细胞凋亡状况; MTT 法进行细胞增殖检测; Western blot 法检测自噬相关蛋白及 ERK1/2 的表达变化。

结果与结论: ①经脂多糖诱导处理的软骨细胞上清液中白细胞介素 1 β 和转化生长因子 α 的水平均显著高于对照组($P < 0.01$), 各姜黄素组细胞上清液中白细胞介素 1 β 和转化生长因子 α 的水平较模型组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性; ②经 24 h 培养后, 模型组细胞凋亡率显著高于对照组($P < 0.01$), 与模型组相比, 各姜黄素处理的细胞凋亡率有所降低, 且 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理的细胞凋亡率降低最为显著($P < 0.01$); ③MTT 法检测结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞增殖能力显著降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 经不同浓度的姜黄素处理细胞后, 细胞的增殖能力得以恢复, 且 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理的细胞恢复效果最好; ④Western blot 法检测结果显示, 与模型组相比, 各姜黄素组细胞自噬能力明显增强, 自噬标志物 LC3-II 及相关蛋白 Beclin-1 表达量均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 p-ERK1/2 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$); ⑤结果提示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素能显著缓解脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应, 抑制软骨细胞凋亡, 并对脂多糖诱导的炎症软骨细胞增殖抑制具有一定的拮抗作用, 这可能与姜黄素通过 ERK1/2 途径激活的自噬分子调控紧密相关。

Li Ya-nan, MD, Physician, Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Corresponding author: Zhang Qing-song, Master's supervisor, Associate chief physician, Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

关键词:

姜黄素; 脂多糖; 软骨细胞; 自噬; 细胞外信号调节激酶 1/2; 炎症因子; 骨关节炎; 细胞凋亡; 细胞增殖

主题词:

骨关节炎; 姜黄素; 细胞增殖; 细胞凋亡; 组织工程

基金资助:

武汉市卫生计生委科研项目(WZ18E07)

Effects of curcumin on apoptosis and proliferation of inflammatory chondrocytes induced by lipopolysaccharide

Li Ya-nan, Ni Juan, Fang Yu-shun, Li Tao, Tan Hong-fei, Zhang Qing-song (Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Curcumin has been shown to play antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic roles in osteoarthritis, but the underlying mechanisms remain unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of curcumin on apoptosis and proliferation of chondrocytes induced by lipopolysaccharide, and to explore the potential mechanisms, so as to provide new ideas for the treatment of osteoarthritis.

METHODS: Chondrocytes were isolated from the 4-week-old Sprague-Dawley rats, cultured, and identified by toluidine blue staining. The chondrocyte inflammation model *in vitro* was established by lipopolysaccharide induction. The cells were divided into five groups: control group (common medium); model group (medium with 5 $\mu\text{g/L}$ lipopolysaccharide); low-dose group (medium with 5 $\mu\text{g/L}$ lipopolysaccharide + 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin); medium-dose group (medium with 5 $\mu\text{g/L}$ lipopolysaccharide + 10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin); high-dose group (medium with 5 $\mu\text{g/L}$ lipopolysaccharide + 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin). After 24 hours, the expression levels of interleukin 1 β and transforming growth factor α in the cellular supernatant were detected by ELISA method. The apoptotic cells were detected by flow cytometry. Cell proliferation was tested by MTT assay. The expression levels of autophagy-related proteins and extracellular regulated protein kinases 1/2 were determined by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The levels of interleukin 1 β and transforming growth factor α in the supernatant of chondrocytes induced by lipopolysaccharide were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). The levels of interleukin 1 β and transforming growth factor α in the supernatant treated with curcumin were lower than those in the model group, which was on a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After 24 hours of treatment, apoptotic rate of cells in the model group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cell apoptotic rate in each curcumin group was decreased, especially the high-dose group ($P < 0.01$). MTT assay showed that the cell proliferation ability in the model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cell proliferation ability in each curcumin group was restored, and the effect was the best in the high-dose group. The results of western blot showed that the autophagic ability and the levels of autophagy marker (LC3-II) and autophagy related protein (Beclin-1) were significantly increased in each curcumin group compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression level of p-ERK1/2 protein was significantly increased ($P < 0.05$). Our findings suggest that 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin cannot only inhibit apoptosis and relieve inflammatory of chondrocytes induced by lipopolysaccharide, but also has a certain antagonistic effect on lipopolysaccharide-induced inhibition of inflammatory chondrocyte proliferation, which may be *via* regulating the ERK1/2 pathway-activated autophagy.

Subject headings: Osteoarthritis; Curcumin; Cell Proliferation; Apoptosis; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Research Program of Health and Family Planning Commission of Wuhan Municipality, No. WZ18E07

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种导致全球数百万患者疼痛甚至残疾的渐进性、退行性疾病, 临床上的主要病理特征为关节软骨的退化、软骨下骨的改变以及滑膜炎等^[1-3]。软骨细胞作为软骨中唯一存在的细胞类型, 其分散于细胞外基质中, 具有维持软骨结构完整性以及软骨负重功能等作用^[4]。目前, 对于骨关节炎的致病机制至今尚无定论, 主要机制有: 由细胞因子、炎症递质、免疫因素、蛋白酶、生物学因素等多种致病因素共同参与导致的细胞外基质代谢失衡、软骨细胞凋亡、自身免疫反应等, 其中软骨细胞凋亡被认为在骨关节炎的发生发展过程中发挥着重要作用^[5-7]。目前, 临床上关于骨关节炎的治疗方法主要有非药物治疗、药物治疗和手术治疗, 其中, 药物治疗是最常用和最基础的治疗方法, 而对乙酰氨基酚和非类固醇抗炎药是临床上的常用药, 但长期使用会引起肾脏和消化系统损害, 甚至还有破坏软骨的不良反^[8]。

姜黄素是一种在姜黄中提取的多酚物质, 已经被长

时间用于食品安全生产上, 且姜黄素被证明与传统的非类固醇类抗炎药具有相似的药物活性^[9-10]。姜黄素在一系列的慢性炎症相关的疾病中发挥着极好的疗效, 例如, 姜黄素对糖尿病肾病大鼠肾脏炎症损伤具有一定的保护作用^[11]。在大鼠缺血性脑损伤炎症反应模型中, 姜黄素可以通过减轻炎症反应和血脑屏障来起到脑保护的效果^[12]。同样, 在脓毒症急性肺损伤大鼠模型中, 姜黄素再次被证明能通过调控NF- κ B相关信号通路降低炎症反应^[13]。而在骨关节炎的相关研究中, 姜黄素被证实具有抗炎抗氧化及抗凋亡的作用^[14]。但姜黄素抗炎相关机制的研究还不够深入。

因此, 当前研究通过构建脂多糖诱导的炎症软骨细胞模型, 观察在姜黄素的作用下, 炎症软骨细胞炎症因子、凋亡及增殖能力的变化情况, 并通过检测自噬相关蛋白的表达变化, 探究姜黄素介导的炎症软骨细胞的凋亡、增殖能力改变与自噬之间的关系及潜在机制。旨在为骨关节炎的治疗提供新的、可靠的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验和分组对照细胞实验。

1.2 时间及地点 于2015年11月至2017年9月在华中科技大学同济医学院附属普爱医院完成。

1.3 材料

实验动物: 清洁级, 4周龄SD雌性大鼠3只, 体质量(200±20) g, 购自湖北省疾病预防控制中心, 批号: 42000600016206, 合格证号: 2015-0018。实验动物处理严格遵循中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

实验主要试剂和仪器: 姜黄素(产品编号: C1386)、脂多糖(产品编号: L2630)(Sigma); DMEM细胞培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、胰蛋白酶以及II型胶原蛋白酶(Invitrogen); 甲苯胺蓝染色液(细胞专用)(北京索莱宝生物科技有限公司); 全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒、高灵敏ECL化学发光试剂盒(南京建成生物技术有限公司); Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、大鼠白细胞介素1 β 、转化生长因子- α 因子ELISA检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗鼠一抗ERK1/2(1 : 800)、p-ERK1/2(1 : 1 000)、LC3B(1 : 1 000)、Beclin 1(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 1 000)以及山羊抗兔二抗IgG(1 : 5 000)(Abcam); 其它试剂均由上海国药试剂分析纯配制。3111型CO₂培养箱(Thermo, 美国); 倒置显微镜(奥林巴斯, 美国); 全自动化学发光分析仪(Tanon-5200, 天能, 上海); 凝胶处理分析系统(ABI, 美国); 流式细胞分析仪FACSCalibur(B&D, 美国); 低温冷冻离心机(Eppendorf, 德国)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠软骨细胞的原代分离及培养 SD大鼠脱臼致死, 无菌条件下取大鼠膝关节处软骨; 用PBS冲洗3次; 将软骨剪碎至1 mm³大小的碎块, 加入体积分数0.2%的II型胶原酶, 置振荡器上, 震荡消化1 h, 然后再加入体积分数0.25%胰蛋白酶作用30 min后, 终止消化; 收集上清液, 用200目筛网过滤收集滤液; 1 500 r/min离心10 min, 弃上清, 加入DMEM培养基(含体积分数10%胎牛血清, 青霉素100 U/mL, 链霉素100 mg/L)重悬细胞, 离心收集沉淀细胞, 再将所收集的细胞重悬于DMEM培养液中, 37 °C培养箱进行培养; 隔2 d换一次培养基; 每日在倒置显微镜下观察细胞生长状态, 当软骨细胞生长铺满瓶底达到80%左右时, 离心收集细胞, 用新的DMEM培养基轻轻重悬细胞使其分布均匀; 调整细胞浓度达1.0×10⁸ L⁻¹, 接种于培养瓶中进行传代培养, 密切观察细胞生长状态, 选取状态良好的传代细胞进行后续实验。

1.4.2 甲苯胺蓝染色进行软骨细胞鉴定 软骨细胞会分泌一种蛋白聚糖的基质成分, 是软骨细胞的主要功能指标。而甲苯胺蓝能使分泌的蛋白聚糖颗粒着蓝紫色, 使细胞呈蓝色。因此甲苯胺蓝染色可作为软骨细胞功能鉴定的方式^[15]。具体步骤: 软骨细胞在置有载玻片的培养基中生长48 h, 制作细胞爬片; PBS冲洗; 40 g/L甲醛固定30 min;

用体积分数1%甲苯胺蓝染色30 min, 迅速用无水乙醇漂洗1次, 空气干燥, 显微镜下观察。

1.4.3 脂多糖诱导软骨细胞炎症模型构建及姜黄素干预分组 实验过程中脂多糖的最佳干预时间和浓度均是参照国内外文献及结合作者所在实验室所培养细胞的具体情况, 进行前期条件摸索所得^[16-18]。依照前期对实验条件的摸索, 取生长状态良好的第3代大鼠软骨细胞消化制备细胞悬液, 以1×10⁸ L⁻¹的细胞浓度接种于24孔板内, 每孔加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基2 mL, 每组设3个复孔。细胞分5组: 对照组(普通培养基); 模型组(含5 μ g/L脂多糖培养基); 姜黄素低剂量组(含5 μ g/L脂多糖+5 μ mol/L姜黄素培养基); 姜黄素中剂量组(含5 μ g/L脂多糖+10 μ mol/L姜黄素培养基); 姜黄素高剂量组(含5 μ g/L脂多糖+20 μ mol/L姜黄素培养基)。

1.4.4 ELISA法检测细胞上清液中白细胞介素1 β 、转化生长因子 α 表达水平 各组细胞培养24 h后, 离心取上清液, 按照ELISA检测试剂盒操作分别检测各组细胞上清液中白细胞介素1 β 、转化生长因子 α 的表达水平, 并做比较分析。

1.4.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组细胞培养24 h后, 按照Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒的操作说明检测细胞凋亡情况。具体如下: 收集各组细胞, 用PBS洗涤细胞两次, 离心收集细胞个数为5.0×10⁵; 加入500 μ L的1×Binding buffer悬浮细胞; 加入1 μ L的Annexin V-FITC和5 μ L的PI混合均匀; 避光反应5 min; 上机检测, 记录细胞凋亡情况。

1.4.6 MTT法检测细胞增殖能力 各组细胞培养24 h后, 按照MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒的操作说明检测细胞增殖能力。具体如下: 收集各组细胞, 用PBS洗涤细胞两次, 离心收集细胞个数为5.0×10⁵; 加入含体积分数0.5% MTT的DMEM培养基500 μ L继续培养4 h; 终止培养, 小心吸弃培养液; 每孔再加入100 μ L DMSO, 置摇床低速震荡10 min, 至结晶物充分溶解; 在酶标仪上检测各孔的吸光密度值; 记录、分析。吸光密度值越大, 代表活细胞数目越多, 增殖能力越强。

1.4.7 Western blot法检测相关蛋白表达情况 采用全蛋白提取试剂盒对各组细胞分别进行蛋白提取; 后用BCA蛋白浓度检测试剂盒对所提蛋白进行浓度检测; 取20 μ g蛋白和4 μ L 2×SDS上样缓冲液混合均匀, 100 °C变性10 min; 上样, SDS-PAGE凝胶电泳分离后转至PVDF膜上; 用体积分数5%脱脂牛奶封闭1 h; PBS洗膜; PBS洗膜后加入兔抗鼠一抗(Total ERK1/2, 1 : 800; p-ERK1/2, 1 : 1 000; LC3, 1 : 1 000; Beclin 1, 1 : 1 000; GAPDH, 1 : 1 000)在4 °C下, 孵育过夜; PBS洗膜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔IgG(1 : 5 000)室温孵育0.5 h; PBS洗膜; 用ECL化学发光进行显色。以GAPDH为内参蛋白, 后采用Quantity One图像分析软件进行半定量分析。

1.5 主要观察指标 ①软骨细胞形态学观察; ②各组细胞上清液中白细胞介素1 β 、转化生长因子 α 表达水平; ③各组细胞凋亡情况; ④各组细胞增殖能力; ⑤各组细胞相关蛋

白表达量。

1.6 统计学分析 所有数据均采用SPSS 19.0统计软件进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示, 多组间数据比较选择单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 软骨细胞生长状态观察 软骨细胞经原代及传代培养结果显示(图1), 原代培养1 d, 细胞呈小球形, 悬浮于培养液中; 培养3 d, 软骨细胞多成三角形, 且逐渐开始贴壁生长; 培养5 d, 细胞贴壁明显, 密度加大, 细胞大小较为均一, 结构清晰; 传代后第1代培养3 d, 细胞出现融合, 细胞成簇生长; 第2代培养3 d, 细胞增殖较快, 细胞呈星形或多边形, 胞核清晰; 第3代培养3 d, 细胞多呈梭形, 逐渐融合成单层, 呈“铺路石状”生长, 状态较好, 取用于后续实验研究。

2.2 软骨细胞鉴定 选取生长状态良好的第3代软骨细胞进行甲苯胺蓝染色, 结果显示(图2), 低倍镜下可见软骨细胞贴壁生长, 且如“铺路石”样分布, 染色后细胞胞浆呈现浅蓝色, 胞核深蓝色圆球状; 高倍镜下可见软骨细胞形态不一, 重叠生长, 透光度良好, 细胞核着色较深, 呈规则圆球状。

2.3 各组细胞上清中白细胞介素1 β 、转化生长因子 α 表达水平 各组细胞检测结果显示(表1), 经脂多糖诱导处理的软骨细胞上清液中白细胞介素1 β 和转化生长因子 α 的表达量均显著高于未经脂多糖处理的对照组($P < 0.01$), 经姜黄素处理后二者表达量较模型组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。

表1 各组白细胞介素1 β 及转化生长因子 α 表达水平 ($\bar{x}\pm s$, ng/L)
Table 1 Expression levels of interleukin 1 β and transforming growth factor α in each group

组别	白细胞介素1 β	转化生长因子 α
对照组	3.56 \pm 0.34	2.59 \pm 0.46
模型组	14.36 \pm 1.25 ^b	28.69 \pm 2.97 ^b
低剂量姜黄素组	11.38 \pm 1.12 ^{bc}	13.56 \pm 1.56 ^{bd}
中剂量姜黄素组	8.94 \pm 0.76 ^{bc}	7.44 \pm 0.84 ^{bde}
高剂量姜黄素组	4.26 \pm 0.51 ^{df}	3.88 \pm 0.42 ^{def}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与低剂量姜黄素组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。

2.4 各组细胞凋亡情况 流式凋亡检测结果显示(图3), 模型组细胞凋亡率显著高于对照组($P < 0.01$), 与模型组相比, 经不同浓度的姜黄素处理的细胞凋亡率均有所降低($P < 0.05$; $P < 0.01$), 且高剂量姜黄素处理细胞的细胞凋亡率降低最为显著($P < 0.01$)。

2.5 各组细胞增殖能力 MTT法检测结果显示(图4), 与对照组相比, 模型组细胞增殖能力极显著降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 经不同浓度的姜黄素处理细胞后, 细胞的增殖能力均有所加强($P < 0.05$; $P < 0.01$), 且高剂量姜黄素处理的细胞增殖能力恢复效果最好($P < 0.01$)。

2.6 各组细胞相关蛋白表达量 Western blot检测结果显

示(图5), 与对照组相比, 模型组细胞自噬能力减弱, 自噬相关蛋白LC3-II、Beclin-1以及p-ERK1/2蛋白表达量均明显减少($P < 0.01$); 而与模型组相比, 不同浓度的姜黄素处理组细胞自噬能力明显增强, 自噬相关蛋白LC3-II、Beclin-1以及p-ERK1/2蛋白表达量均有不同程度升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

姜黄素作为从姜黄中提取的主要活性物质, 其药理学作用主要有抗炎、抗氧化、降压、抑菌及抑癌等^[19-20]。其中, 姜黄素在炎症反应中起到强大的调节作用, 例如, 在关节炎软骨细胞的研究中发现, 姜黄素通过抑制核因子 κ B的表达, 激活JAK/STAT信号通路及抑制炎症及代谢相关递质的活性来发挥对关节炎软骨组织的保护作用^[21]。在对兔正常软骨细胞的研究中, 马勇等^[22]发现浓度为10 μ mol/L的姜黄素通过激活Wnt/ β catenin信号通路对正常软骨细胞具有一定的促增殖作用, 且作用24 h比12 h的效果更好。陈琼等^[23]还发现40 μ mol/L姜黄素虽抑制软骨细胞的细胞增殖, 但同时抑制软骨细胞释放基质金属蛋白酶13和白细胞介素6, 减轻炎症反应, 保护软骨细胞, 延缓软骨退变。张锐等^[14]通过综述相关文献总结出, 姜黄素可通过抑制氧化作用酶, 清除自由基, 完成抗氧化作用, 还通过抑制基质金属蛋白酶的对软骨基质的消耗, 增加II型胶原的产生; 抑制胞浆型磷脂酶A2, 环氧合酶2, 脂氧合酶5; 抑制白细胞介素1 β 导致的线粒体肿胀和凋亡, 从而发挥抗炎、抗凋亡作用, 进一步抑制骨关节炎的发生发展。而当前研究结果显示, 20 μ mol/L姜黄素在抑制炎症软骨细胞的炎症反应效果更好, 且在抗凋亡、促细胞增殖进而有助于软骨组织再生等方面作用明显。

研究显示, 适当的活化自噬对维持正常软骨细胞的新陈代谢发挥着重要作用^[24]。在人类的自噬基因中, LC-3和Beclin-1被认为是自噬途径主要的调控因子和标志物。王浩等^[25]通过免疫组织化学检测发现, 随着骨关节炎退变程度加重, 软骨组织中自噬相关蛋白(LC-3和Beclin-1)阳性表达率逐渐降低, 且使用雷帕霉素处理不同损伤程度的软骨细胞发现, 其可以上调自噬相关因子的表达, 其中正常及中期骨关节炎软骨细胞对雷帕霉素诱导的自噬活动具有良好的反应性, 而晚期骨关节炎软骨细胞对雷帕霉素刺激反应较差, 暗示自噬活性与骨关节炎的发生发展关系密切。研究者Cheng等^[26]采用自噬激动剂Torin 1作用炎症软骨细胞及组织的实验证明, 其通过激活自噬而抑制软骨细胞及组织的退行性病变, 而自噬抑制剂的使用则促进了退行性病变的发生, 暗示缺乏自噬与骨关节炎的发生相关, 自噬活性调节是治疗骨关节炎的重要疗法。李春亮等^[27]通过MDC法检测发现, 骨关节炎软骨细胞的自噬水平显著低于正常软骨细胞, 且白藜芦醇能靶向促进沉默信息调控因子的表细胞自噬活性, 缓解细胞炎症损伤, 促进细胞增殖能力, 抑制细胞凋亡。

而对于激活机体自噬的机制, 赵雅宁等^[28]发现, 在大鼠蛛网膜下腔出血后, 神经细胞自噬能力的增强与海马区ERK1/2信号通路的激活相关, p-ERK1/2蛋白的表达量上

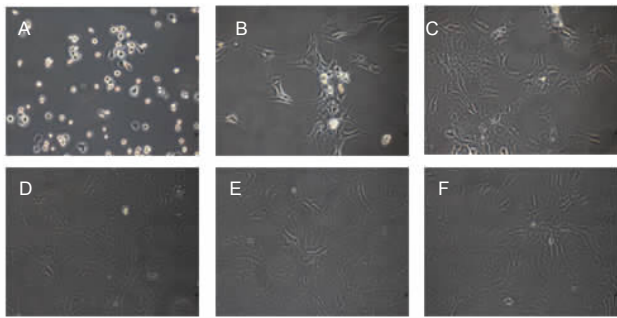


图1 软骨细胞生长状态观察(×200)

Figure 1 Chondrocyte growth observation (×200)

图注: 图A-F依次观察原代1 d, 原代3 d, 原代5 d, 传代后1代3 d, 传代后2代3 d以及传代后3代3 d的细胞形态, 200倍视野下观察结果。

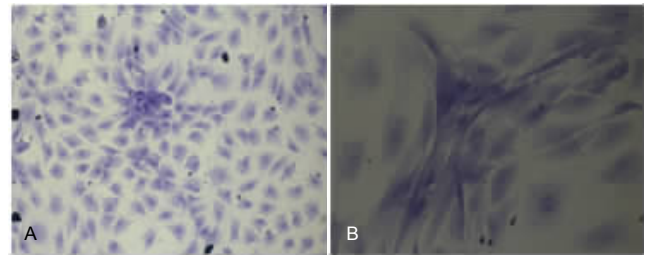


图2 软骨细胞甲苯胺蓝染色

Figure 2 Toluidine blue staining of chondrocytes

图注: 图中A为200倍视野下细胞染色观察结果; B为400倍视野下细胞染色观察结果。

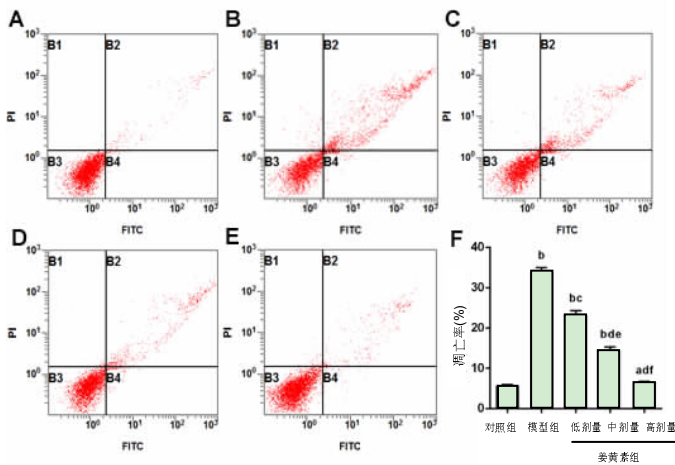


图3 各组细胞凋亡检测结果

Figure 3 Cell apoptosis in each group

图注: 图中A为对照组; B为模型组; C为低剂量姜黄素组; D为中剂量姜黄素组; E为高剂量姜黄素组。与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与低剂量姜黄素组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。

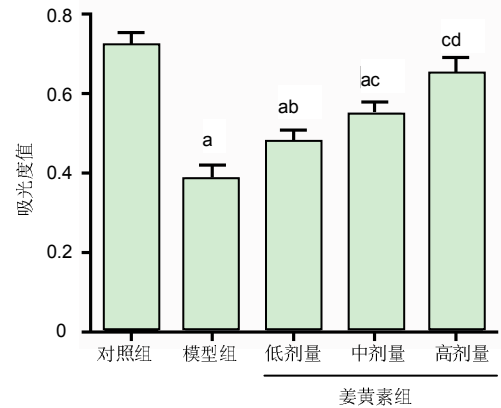


图4 各组细胞增殖能力检测结果

Figure 4 Cell proliferation in each group

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与低剂量姜黄素组比较, ^d $P < 0.01$ 。

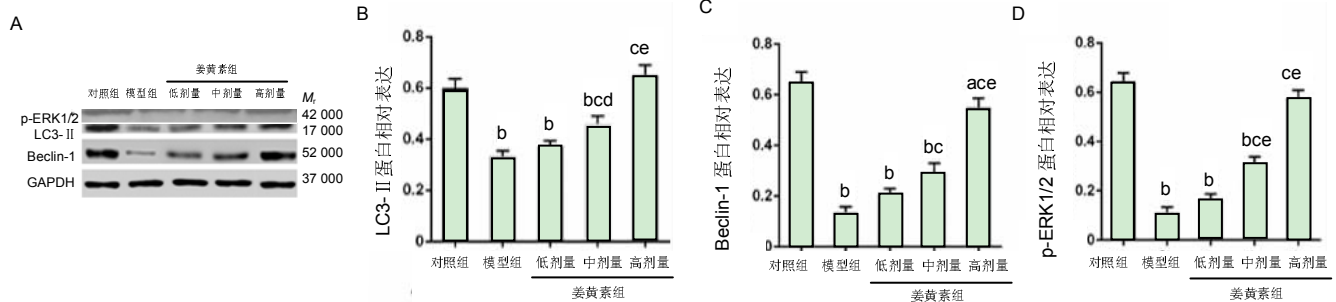


图5 各组细胞自噬相关蛋白表达量

Figure 5 Expression levels of autophagy-related proteins in each group

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.01$; 与低剂量姜黄素组比较, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$ 。

升, 进而促进Beclin-1和LC3-II的表达介导神经细胞丢失。毕亚光等^[29]在心肌细胞的研究中同样发现, ERK1/2信号途径促进了高糖后低糖过程中H9c2心肌细胞的自噬活性。另外, 在一些癌症细胞, 例如, 神经胶质瘤细胞以及肝癌细胞来提升骨关节炎软骨细胞的自噬水平, 并抑制细胞凋亡。而当前研究结果显示, 姜黄素可能通过激活骨关节炎软骨细胞的研究中也发现, 促进癌细胞的自噬能力是通过激活ERK1/2信号通路来实现的^[30-31]。而当前研究发现, 通过姜黄素的处理, 脂多糖诱导的炎症细胞组细胞的p-ERK1/2蛋白及自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II的表达均上升, 提示姜黄素可能通过靶向作用于ERK1/2信号通路来激活炎症软骨细胞自噬能力, 进而促进软骨细胞修复、再生。

综上所述, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素对于缓解脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应效果显著, 且对细胞的凋亡抑制及增殖能力促进可能是通过增强细胞自噬活性来实现的, 这可能与姜黄素激活ERK1/2信号通路直接相关, 这将为姜黄素治疗骨关节炎提供科学的理论基础。但姜黄素是否通过直接靶向作用于ERK1/2以及在动物模型中是否具有同样治疗效果还有待后期进一步深入研究验证。

作者贡献: 李亚楠负责实验设计与实施, 数据分析, 论文撰写; 倪娟, 方禹舜参与实验研究过程的实施; 李涛, 谈鸿飞负责论文的数据收集及起草工作; 张青松负责论文最终版本的确定。

经费支持: 该文章接受了“武汉市卫生计生委科研计划资助项目(WZ18E07)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了姜黄素, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

伦理问题: 实验方案经华中科技大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-387.

[2] Lane NE, Shidara K, Wise BL. Osteoarthritis year in review 2016: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(2):209.

[3] Vilá S. Inflammation in Osteoarthritis. *P R Health Sci J*. 2017;36(3):123-129.

[4] Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2015;33(6):638-645.

[5] Vinatier C, Merceron C, Guicheux J. Osteoarthritis: from pathogenic mechanisms and recent clinical developments to novel prospective therapeutic options. *Drug Discov Today*. 2016; 21(12):1932-1937.

[6] Punzi L, Galozzi P, Luisetto R, et al. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *Rmd Open*. 2016;2(2):e000279.

[7] 袁普卫, 杨威, 康武林, 等. 骨性关节炎发病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(7):902-906.

[8] Rubio-Terres C, Rubio-Rodriguez D. Economic evaluation of chondroitin sulfate and non-steroidal antiinflammatory drugs for the treatment of osteoarthritis. *Value Health*. 2015;18(7):A640.

[9] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curcumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.

[10] Jaggi, Sushil, Gupta K, et al. Synthesis and pharmacological activity evaluation of Curcumin derivatives. *Chin Chem Lett*. 2016;27(7):1067-1072.

[11] 田华, 张松峰, 尤丽菊, 等. 姜黄素对糖尿病肾病大鼠肾脏炎症损伤的保护作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(11):1166-1168.

[12] 雷军荣, 秦军, 张晶, 等. 姜黄素对大鼠缺血性脑损伤炎症反应和血脑屏障通透性的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1):120-123.

[13] 肖雪飞, 杨明施, 孙圣华. 姜黄素对腺毒症急性肺损伤的炎症反应及NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(30):19-22.

[14] 张锐, 刘世清. 姜黄素保护关节软骨抑制骨关节炎的作用和机制[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2):277-282.

[15] 高改霞, 王小春, 李凯, 等. 大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(24):4385-4389.

[16] Zhang LB, Man ZT, Li W, et al. Calcitonin protects chondrocytes from lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammatory response through MAPK/Wnt/NF- κ B pathways. *Mol Immunol*. 2017;87:249-257.

[17] Zhao C, Wang Y, Jin H, et al. Knockdown of microRNA-203 alleviates LPS-induced injury by targeting MCL-1 in C28I2 chondrocytes. *Exp Cell Res*. 2017;359(1):171-178.

[18] 袁昊, 曾晖, 肖德明, 等. 白藜芦醇通过NF- κ B信号通路抑制软骨细胞炎症因子的表达[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2016, 9(1):75-79.

[19] 方春风, 狄明桃, 吴洋. 中药干预骨关节炎软骨细胞凋亡研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015, (8):1919-1921.

[20] 毕文杰, 穆小静, 崔丽皮艳·阿布力米特, 等. 姜黄素新型靶向制剂研究进展[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 323-329.

[21] 李旭升, 陈慧, 甄平, 等. JAK2/STAT3信号通路介导姜黄素在骨性关节炎软骨细胞代谢中的影响[J]. 中国骨伤, 2016, 29(12):1104-1109.

[22] 马勇, 王礼宁, 郭杨, 等. 姜黄素通过调节Wnt/ β -catenin信号通路促进软骨细胞增殖的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(1):90-95.

[23] 陈琼, 赵明才, 陈悦, 等. 姜黄素对骨关节炎软骨细胞增殖及分泌MMP-13, IL-6的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(5):459-461.

[24] Figueroa PLD, Lotz M, Blanco FJ, et al. Autophagy activation protects from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2015;67(4):966-976.

[25] 王浩, 曹飞, 斯海波, 等. 雷帕霉素调控自噬在骨关节炎软骨细胞退变中的机制研究[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2017, 10(3):248-253.

[26] Cheng NT, Guo A, Meng H. The protective role of autophagy in experimental osteoarthritis, and the therapeutic effects of Torin 1 on osteoarthritis by activating autophagy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):150.

[27] 李春亮, 李钊伟, 秦凤. Sirt1调控软骨细胞自噬在骨关节炎中作用及机制[J]. 重庆医学, 2016, 45(15):2118-2122.

[28] 赵雅宁, 孙竹梅, 刘俊杰, 等. 大鼠蛛网膜下腔出血后细胞外调节蛋白激酶1/2激活介导海马区神经细胞自噬[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(2):110-115.

[29] 毕亚光, 王光宇, 刘向东, 等. 高糖后低糖过程通过ERK1/2信号途径增强H9c2心肌细胞自噬的功能[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(3):65-69.

[30] Yeh PS, Wang W, Chang YA, et al. Honokiol induces autophagy of neuroblastoma cells through activating the PI3K/Akt/mTOR and endoplasmic reticular stress/ERK1/2 signaling pathways and suppressing cell migration. *Cancer Lett*. 2016;370(1):66-77.

[31] Huang Q, Liu X, Cao C, et al. Apelin-13 induces autophagy in hepatoma HepG2 cells through ERK1/2 signaling pathway-dependent upregulation of Beclin1. *Oncol Lett*. 2016;11(2):1051-1056.