

补肾调肝方含药血清对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响<https://doi.org/10.12307/2021.286>范帅¹, 林杰彬¹, 吴春飞¹, 徐兆辉²

投稿日期: 2020-12-03

送审日期: 2020-12-12

采用日期: 2021-01-16

在线日期: 2021-04-02

中图分类号:

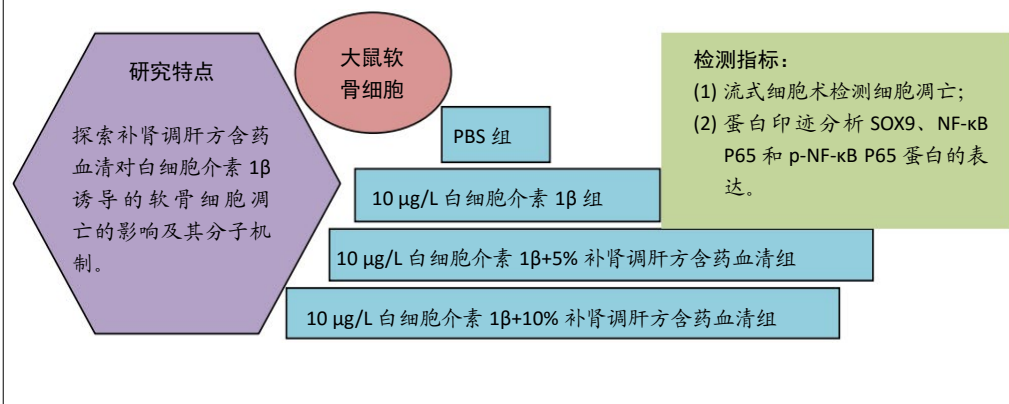
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)35-05594-05

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

SOX9: 是调控软骨分化的主要基因, 在所有分化的软骨细胞和软骨前细胞中均有表达, 其对于建立软骨生长板及促进正常的软骨内成骨都是必需的, SOX9过表达时能抑制软骨细胞的肥大, 负向调节软骨细胞肥大进程。因此, SOX9是参与骨关节炎软骨修复合成的重要介质, 也是经典的软骨修复因子, 在软骨的修复过程中起到重要的调节作用。

白细胞介素1 β : 是一种炎性细胞因子, 其可通过扰乱软骨代谢平衡、抑制软骨细胞增殖、诱导软骨细胞凋亡、促进软骨基质降解, 促进滑膜炎发展, 从而加速骨关节炎进程。

摘要

背景: 前期研究发现, 补肾调肝方能明显改善骨关节炎症状, 临床疗效肯定, 但缺乏相关的实验依据。

目的: 探索补肾调肝方含药血清对白细胞介素1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响及其分子机制。

方法: 取传代培养的第3代大鼠软骨细胞, 随机分为4组: PBS组(对照组)、10 μ g/L 白细胞介素1 β 组、10 μ g/L 白细胞介素1 β +5%补肾调肝方含药血清(5%补肾调肝方含药血清组)及10 μ g/L 白细胞介素1 β +10%补肾调肝方含药血清(10%补肾调肝方含药血清组), 分别处理软骨细胞24 h。采用流式细胞术检测细胞凋亡; 蛋白印迹分析SOX9、NF- κ B P65和p-NF- κ B P65蛋白的表达水平。实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准。

结果与结论: ①与对照组相比, 白细胞介素1 β 可诱导软骨细胞的凋亡($P < 0.05$); ②与白细胞介素1 β 组比, 5%和10%补肾调肝方含药血清组软骨细胞的凋亡率均下降, 且呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$); ③与对照组相比, 白细胞介素1 β 组SOX9的表达明显降低($P < 0.05$), p-P65/P65明显升高($P < 0.05$); 5%和10%补肾调肝方含药血清组SOX9的表达明显高于白细胞介素1 β 组($P < 0.05$), 10%补肾调肝方含药血清组p-P65/P65显著低于白细胞介素1 β 组($P < 0.05$); ④结果说明, 补肾调肝方可能是通过调控SOX9/NF- κ B抑制白细胞介素1 β 的诱导大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡, 起到缓解关节软骨退变的作用。

关键词: 骨关节炎; 补肾调肝方; 关节软骨; SOX9/NF- κ B

缩略语: 核因子 κ B: nuclear factor-kappa B, NF- κ B

Effect of serum containing *Bushen Tiaogan* prescription on interleukin-1 β -induced chondrocyte apoptosisFan Shuai¹, Lin Jiebin¹, Wu Chunfei¹, Xu Zhaohui²

¹The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; ²Shenzhen Luohu District Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Fan Shuai, Master, Attending physician, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Fan Shuai, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

¹广州中医药大学第三附属医院, 广东省广州市 510000; ²深圳市罗湖区中医院, 广东省深圳市 518000

第一作者: 范帅, 男, 1987年生, 河北省人, 汉族, 2017年广州中医药大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事中医药防治骨伤科疾病研究。

通讯作者: 范帅, 硕士, 主治医师, 广州中医药大学第三附属医院, 广东省广州市 510000

<https://orcid.org/0000-0001-9864-6771> (范帅)

基金资助: 广东省自然科学基金项目(2018A0303130103); 广东省中医药局科研项目(20201171), 项目负责人: 范帅; 广州中医药大学第三附属医院创新基金(sy201701), 项目负责人: 范帅

引用本文: 范帅, 林杰彬, 吴春飞, 徐兆辉. 补肾调肝方含药血清对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(35):5594-5598.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that *Bushen Tiaogan* prescription can significantly improve the symptoms of osteoarthritis, with a positive clinical effect, but there is still a lack of relevant experimental evidence.

OBJECTIVE: To explore the effect of serum containing *Bushen Tiaogan* prescription on interleukin (IL)-1 β -induced chondrocyte apoptosis and its molecular mechanism.

METHODS: Passage 3 chondrocytes from rats were randomly divided into four groups: PBS group (control group), 10 μ g/L IL-1 β group, 10 μ g/L IL-1 β +5% *Bushen Tiaogan* prescription group, 10 μ g/L IL-1 β +10% *Bushen Tiaogan* prescription group, in which chondrocytes were treated for 24 hours. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and western blot was used to analyze the expression levels of SOX9, NF- κ B P65 and p-NF- κ B P65 proteins. An approval was obtained from the Animal Experimental Ethics Committee of Guangzhou University of Chinese Medicine.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, IL-1 β induced chondrocyte apoptosis ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, the apoptosis rate of chondrocytes in the 10 μ g/L IL-1 β +5% *Bushen Tiaogan* prescription and 10 μ g/L IL-1 β +10% *Bushen Tiaogan* prescription groups significantly decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of SOX9 in the IL-1 β group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), and the expression of p-P65/P65 was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of SOX9 in the 10 μ g/L IL-1 β +5% *Bushen Tiaogan* prescription and 10 μ g/L IL-1 β +10% *Bushen Tiaogan* prescription groups was significantly higher than that in the IL-1 β group ($P < 0.05$), and the expression of p-P65/P65 in the 10 μ g/L IL-1 β +10% *Bushen Tiaogan* prescription group was significantly lower than that in the IL-1 β group ($P < 0.05$). To conclude, *Bushen Tiaogan* prescription may inhibit IL-1 β -induced apoptosis of rat osteoarticular chondrocytes by regulating SOX9/NF- κ B, and play a role in alleviating articular cartilage degeneration.

Key words: osteoarthritis; *Bushen Tiaogan* prescription; articular cartilage; SOX9/NF- κ B

Funding: Guangdong Provincial Natural Science Foundation Project, No. 2018A0303130103; a grant from Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine, No. 20201171 (to FS); Guangzhou University of Chinese Medicine Innovation Fund, No. sy201701 (to FS)

How to cite this article: FAN S, LIN JB, WU CF, XU ZH. Effect of serum containing *Bushen Tiaogan* prescription on interleukin-1beta-induced chondrocyte apoptosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(35):5594-5598.

0 引言 Introduction

骨关节炎是老年人群中常见的关节退行性疾病，国内流行病学调查显示，中国大于 55 岁的人群中约 60% 的个体有膝骨关节炎的 X 射线片表现，而 65 岁以上老年人群的膝骨关节炎发病率达 85%，临床主要表现为进行性发展的膝关节疼痛、肿胀、僵硬、功能障碍，严重时出现关节畸形，甚至丧失关节功能，严重影响患者正常工作生活，对家庭及社会造成了极大的负担^[1-2]。骨关节炎的主要病理特征为关节软骨损伤、软骨下骨的增生及滑膜的炎症。SOX9 是一种关键的转录因子，在调节软骨的形成中起着至关重要的作用，研究表明，骨关节炎软骨中 SOX9 的 mRNA 和蛋白表达降低，而核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是 SOX9 调控下的炎症因子，其在骨关节炎中被激活进而刺激一系列炎症因子的产生，导致软骨细胞的凋亡^[3-4]。有研究表明，骨关节炎患者关节软骨细胞凋亡率明显高于正常关节，而抑制软骨细胞的凋亡，可以延缓骨关节炎的进程^[5-8]。因此，寻找可抑制软骨细胞凋亡的药物，可能是一种有效治疗骨关节炎的途径。

在临床治疗过程中，作者提出了补肾调肝治疗骨关节炎的新观念，并自拟补肾调肝方，临床疗效满意，但其作用机制尚不清楚^[9]。因此，此次研究拟探讨补肾调肝方通过调节 SOX9/NF- κ B 信号通路对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响，为骨关节炎的治疗提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 含药血清干预体外细胞学实验，多组间均数比较单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD-t 检验。

1.2 时间及地点 于 2020 年 6 至 10 月在广州中医药大学广东省中医药科学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 8 只，3 月龄，体质量 220-280 g，由广州中医药大学动物实验中心提供；使用许可

证号：SYXK(粤)2013-0001。

1.3.2 实验药品及试剂 大鼠白细胞介素 1 β (PeproTech, 400-01B-10, 美国); CCK-8(碧云天, C0038, 上海); DMEM 高糖培养基(C11995500BT)、胎牛血清(10099141)、0.25%胰酶(含 EDTA, 25200072)、0.25%胰酶(不含 EDTA, 15050065)、青霉素/链霉素双抗(15140-122)(均购于美国 Gbico 公司); 蛋白一抗 SOX9(82630S)、Phospho-NF- κ B p65(3033T)、NF- κ B p65(8242S)、 β -actin(3700S)(均购自于美国 CST 公司), Anti-Collagen II antibody(abcam, ab34712, 美国); II 型胶原蛋白酶 DAPI(sigma, C6885, 美国); 1% 甲苯胺蓝染色(索莱宝, G3663, 北京); FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD, 556547, 美国); 补肾调肝方(成分: 柴胡 12 g、郁金 15 g、骨碎补 15 g、龟板 30 g、怀牛膝 15 g、川芎 10 g、白芍 30 g、玫瑰花 12 g、川楝子 12 g、白术 15 g、菊花 15 g、石菖蒲 15 g、甘草 10 g), 共 206 g 生药(由广州中医药大学第三附属医院药剂室提供)。

1.3.3 主要仪器 生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司, 青岛); CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific, 美国); 流式细胞仪(ACEA, Novo Quanteon); 倒置荧光显微镜(Nikon, 日本); 高灵敏度化学发光成像仪(BIO-RAD, 美国); 多功能酶标仪 tecan, 瑞士)。

1.4 实验方法

1.4.1 补肾调肝方含药血清制备 将 2 剂补肾调肝方加入 1 000 mL 水煎煮 1.5 h, 过滤, 药渣加 800 mL 水煎煮 1.5 h, 合并 2 次提取液约 200 mL。根据《药理实验方法学》中介绍的方法, 等效剂量大鼠换算得出 21.45 g/kg(标准体质量), 根据大鼠质量将药液配成不同浓度相同体积灌胃, 并于每天 9: 00 和 15: 00 左右灌胃, 每天灌胃 2 次。共灌胃 7 d。于末次灌胃后 1 h, 水合氯醛麻醉大鼠后, 无菌操作, 腹主动脉采血, 室温静置 2 h, 用离心机 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 在 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中灭活 30 min, 用 0.22 μ m 无

菌滤膜抽滤除菌，分装后放置在 -80°C 保存备用。

1.4.2 大鼠原代软骨细胞提取 无菌条件下取 SD 大鼠正常关节表面软骨组织，采用 0.25% 胰酶，2% II 型胶原蛋白酶分别消化后获得软骨细胞，培养于含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基，48–72 h 后可见细胞贴壁，每 3 d 换培养液。采用甲苯胺蓝染色及 II 型胶原的免疫荧光染色法鉴定大鼠原代软骨细胞。

大鼠软骨细胞的培养及鉴定

细胞来源:	SD 大鼠正常关节表面软骨组织
培养基介绍:	高糖 DMEM 培养基
添加材料:	体积分数 10% 胎牛血清
培养时间:	48–72 h
细胞传代:	每 3 d 换培养液进行传代，取第 1, 2 代细胞观察细胞形态，第 3 代细胞进行细胞活力检测及相关实验
细胞鉴定:	采用甲苯胺蓝染色及 II 型胶原的免疫荧光染色法鉴定大鼠原代软骨细胞
伦理学批准:	实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准

1.4.3 甲苯胺蓝染色 取原代培养细胞，用体积分数 20% 的乙醇溶液稀释甲苯胺蓝染色液至 0.1%。将软骨细胞涂片后，立即放入体积分数 95% 的乙醇中固定，取出放在纸巾上。滴加稀释后的甲苯胺蓝染色液进行滴染，加盖玻片让染料渗透到细胞中。将玻片竖起，稍加压力，使多余染料被纸巾吸去。无需干燥，直接镜检。

1.4.4 免疫荧光染色 按 1×10^4 /孔的细胞数接种于含玻片的 24 孔板中，细胞培养箱中培养 24 h 后；40 g/L 多聚甲醛室温固定细胞 15 min，PBS 洗细胞 3 次，每次 5 min；用 0.2% 的 Triton 打孔 25 min，PBS 洗细胞 3 次，每次 5 min，5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 1 h；PBS 洗细胞 3 次，每次 5 min；加入一抗后 4°C 过夜，次日吸取一抗用 PBS 清洗细胞，加入二抗及 DAPI 室温孵育 1 h，PBS 清洗细胞，封固，避光晾干；荧光倒置显微镜下观察 II 型胶原蛋白表达情况，并拍照、保存。

1.4.5 CCK-8 法 取第 3 代软骨细胞，96 孔板中每孔接种 2 000 个细胞，以不同浓度的含药血清 (0.625%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10%) 分别进行处理 24, 48, 72 h，到特定的时间后，向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，将培养板在细胞培养箱内孵育 2 h，酶标仪测 450 nm 处的吸光度 (测量过程全程避光)。

1.4.6 流式细胞术 - 细胞凋亡检测 取第 3 代软骨细胞，6 孔板中每孔接种 1.8 mL 含 2×10^5 个细胞的细胞悬液，贴壁 48 h 后，①对照组：加入 PBS 200 μL ；②白细胞介素 1 β 组：加入 PBS 200 μL +10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL ；③ 5% 补肾调肝方含药血清组：加入 PBS 100 μL +10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL + 含药血清 100 μL ；④ 10% 补肾调肝方含药血清组：加入 10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL + 含药血清 200 μL 。在 37°C ，体积分数 5% CO_2 培养箱中处理软骨细胞 24 h，收集培养基上清，离心后弃上清；预冷的 PBS 洗 1 遍，用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞后加入预冷的 PBS 吹打，收集细胞，用 3 000 r/min 的转速离心 5 min，弃上清；使用 100 μL 1 \times buffering 重悬细胞，每

管分别加入 5 μL FITC 和 5 μL PI 染料，轻轻混匀，常温下孵育 15 min (避光)。孵育结束后加入 400 μL 1 \times buffering 重悬细胞，转移至流式管，上机流式机检测。

1.4.7 Western blot 检测 SOX9、p-P65、P65 蛋白表达 取第 3 代软骨细胞，6 孔板中每孔接种 1.8 mL 含 2×10^5 个细胞的细胞悬液，贴壁 48 h 后，①对照组：加入 PBS 200 μL ；②白细胞介素 1 β 组：加入 PBS 200 μL +10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL ；③ 5% 补肾调肝方含药血清组：加入 PBS 100 μL +10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL + 含药血清 100 μL ；④ 10% 补肾调肝方含药血清组：加入 10 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 1 β 2 μL + 含药血清 200 μL 。在 37°C ，体积分数 5% CO_2 培养箱中处理软骨细胞 24 h，收集细胞，离心后加入细胞裂解液，提取蛋白质，离心取上清液，蛋白定量后取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，随后将其转移至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭，加入一抗，同时以 β -actin 为内参， 4°C 孵育过夜，TBST 洗涤 PVDF 膜，加入二抗，室温孵育 1 h，ECL 显色，并放入显影仪中显影，拍照保存。

1.5 主要观察指标 ①原代软骨细胞形态与鉴定结果；②软骨细胞活力；③补肾调肝中药含药血清对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响；④补肾调肝中药含药血清对 SOX9/NF- κB 表达的影响。

1.6 统计学分析 用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计。多组间均数比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 大鼠原代软骨细胞形态观察与鉴定 用倒置显微镜和甲苯胺蓝染色及 II 型胶原蛋白免疫荧光染色观察 SD 大鼠软骨细胞分离是否成功。细胞分离后正常贴壁生长，倒置显微镜下观察细胞呈多边形，见图 1A, B。经甲苯胺蓝染色细胞核呈深蓝色，细胞质颜色则较浅，细胞界限清楚，轮廓清晰，呈多边形，见图 1C。分离细胞 II 型胶原免疫荧光染色明显阳性 (图 1D–F)，均符合软骨细胞特征，鉴定分离细胞来源于软骨细胞。

2.2 CCK-8 检测软骨细胞活力 在一定时间内，不同剂量的补肾调肝方含药血清对软骨细胞的活力无显著影响 ($P > 0.05$)，即在实验范围以内的含药血清浓度对软骨细胞无毒性作用，见图 2。

2.3 补肾调肝中药含药血清对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响 与 PBS 组相比，白细胞介素 1 β 可诱导软骨细胞的凋亡 ($P < 0.05$)，与白细胞介素 1 β 组比较，5% 和 10% 补肾调肝中药含药血清组软骨细胞的凋亡率均下降，且呈剂量依赖性，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 补肾调肝中药含药血清对 SOX9/NF- κB 表达的影响 白细胞介素 1 β 组 SOX9 的表达明显低于对照组 ($P < 0.05$)，p-P65/P65 明显高于对照组 ($P < 0.05$)，提示白细胞介素 1 β 可抑制 SOX9/NF κB 通路的表达；5% 和 10% 补肾调肝方含药血清组 SOX9 的表达明显高于白细胞介素 1 β 组 ($P < 0.05$)，10% 补肾调肝方含药血清组 p-P65/P65 显著低于白细胞介素 1 β 组 ($P < 0.05$)，见图 4。

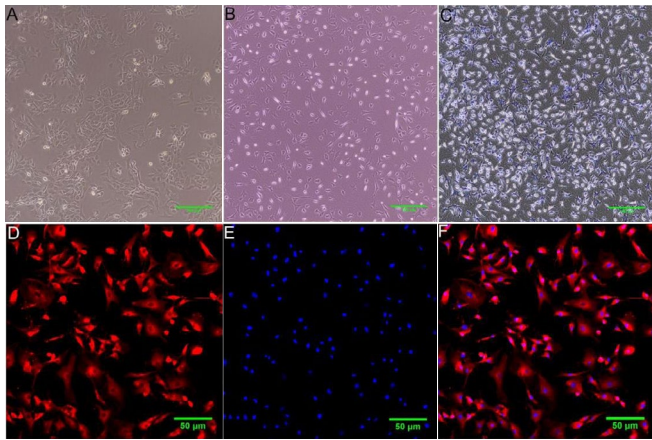
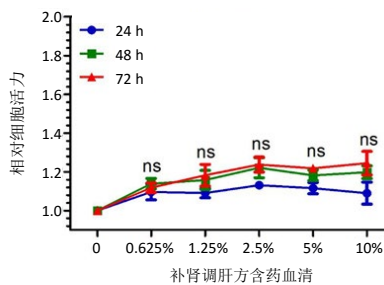


图 1 | 倒置显微镜下观察大鼠原代软骨细胞形态与鉴定

Figure 1 | Morphological observation and identification of rat primary chondrocytes under an inverted microscope



图注: 在一定时间内, 不同剂量的补肝调肝方含药血清对软骨细胞活力的影响差异无统计学意义 ($^{ns}P > 0.05$)

图 2 | 补肝调肝方含药血清对大鼠软骨细胞活力的影响

Figure 2 | The effect of serum containing Bushen Tiaogan prescription on the viability of rat chondrocytes

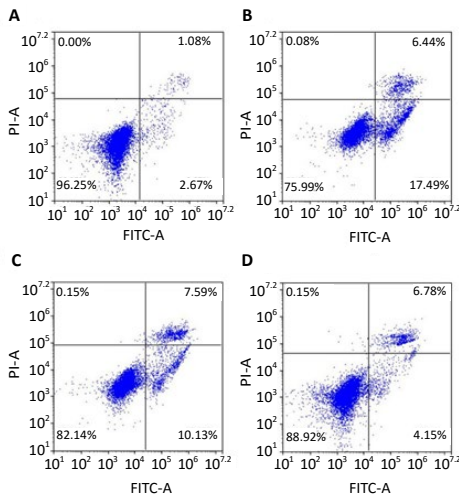
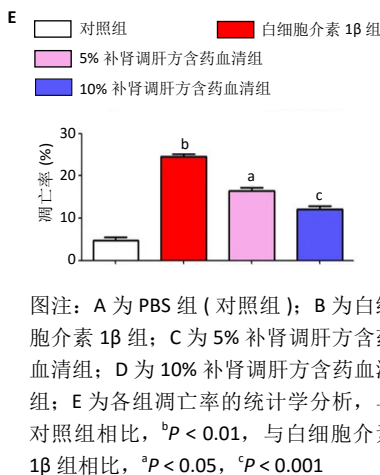


图 3 | 补肝调肝方含药血清对白细胞介素 1β 诱导软骨细胞凋亡的影响

Figure 3 | The effect of serum containing Bushen Tiaogan prescription on the apoptosis of chondrocytes induced by interleukin-1β



图注: $^aP < 0.05$; $^bP < 0.01$

图 4 | 补肝调肝方含药血清对 SOX9/NF-κB 表达的影响

Figure 4 | The effect of serum containing Bushen Tiaogan prescription on the expression of SOX9/NF-κB

3 讨论 Discussion

对于骨关节炎的治疗, 口服非类固醇抗炎药可快速缓解早期的症状, 但这类药物不能明显延缓骨关节炎的发展进程, 且长期服用可能会引起消化道、心血管及肾脏和肝脏损伤等多种不良反应^[10]。因此, 寻找更加可靠的药物替代方案一直是骨关节炎治疗的研究方向^[11]。

祖国医学认为, 骨关节炎属于“骨痹”“痹症”等范畴。《素问·肾气通天论》曰:“肾气乃伤, 高骨乃坏”;《素问·上古天真论》曰:“丈夫……七八肝气衰, 筋不能动, 天癸竭, 精少, 肾脏衰, 形体皆极”, 由此可见, 骨关节炎患者因人体的衰老, 肝肾亏虚, 骨得不到肝肾滋养, 筋骨失养而发病。补肝调肝方中骨碎补、怀牛膝为君药, 以补肝肾、强筋骨; 白芍、柴胡、郁金、玫瑰花、川楝子、川芎、龟板等药物调肝气、养肝阴、补肝血; 白术健脾益气, 石菖蒲豁痰、理气活血; 菊花散风清热、平肝阳; 甘草调和诸药, 使肾虚得以补, 肝郁得以疏, 切中病机、直达病处。

骨关节炎是一种常见的关节慢性退行性病变, 其主要特征是关节软骨的破坏和丢失。骨关节炎的病理变化主要表现为软骨细胞数量的减少、关节软骨变薄及表型的改变, 这些变化与软骨细胞的凋亡息息相关。而软骨细胞凋亡的增加, 能促进软骨基质降解, 减少基质合成, 从而促进骨关节炎的进展^[12]。SOX9 主要在软骨细胞中表达, 能调节软骨细胞的发育、成熟, 是维持软骨细胞表型和软骨稳态的关键转录因子之一, 在软骨细胞成熟分化过程中发挥重要的作用。SOX9 是调控软骨分化的主要基因, 在所有分化的软骨细胞和软骨前细胞中均有表达, 其对于建立软骨生长板及促进正常的软骨内成骨都是必需的, SOX9 过表达时能抑制软骨细胞的肥大, 负向调节软骨细胞肥大进程^[13-15]。因此, SOX9 是参与骨关节炎软骨修复合成的重要递质, 也是经典的软骨修复因子, 在软骨的修复过程中起到重要的调节作用。

白细胞介素 1β 是一种炎性细胞因子, 其可通过扰乱软骨代谢平衡、抑制软骨细胞增殖、诱导软骨细胞凋亡、促

进软骨基质降解,促进滑膜炎发展,从而加速骨关节炎进程^[16-20]。有研究表明,白细胞介素 1 β 可显著下调软骨细胞中 SOX9 的表达^[21]。而 NF- κ B 是 SOX9 的靶基因, NF- κ B 通路在各种细胞进程中起着重要作用,研究证实 NF- κ B 通过抑制软骨基质胶原蛋白和蛋白多糖合成分泌、调节关节软骨损伤等作用广泛参与骨关节炎的病理生理过程,并在衰老和炎症过程中在骨关节炎软骨细胞中被激活^[22-23]。NF- κ B 通路是调控炎症反应的经典通路,能被白细胞介素 1 β 等炎症因子所激活,从而激活炎症级联反应,诱导细胞凋亡^[24-25]。大量文献报道多种植物提取物可降低白细胞介素 1 β 诱导的人软骨细胞 NF- κ B P65 由细胞质向细胞核的转运,抑制 NF- κ B 通路的活化及 NF- κ B P65 磷酸化水平的升高^[26-29]。鲁宏等^[30]研究发现香叶木素可通过抑制 NF- κ B 通路活化缓解白细胞介素 1 β 诱导的新生大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡。

此次研究中,流式细胞术-细胞凋亡检测显示,与对照组相比,白细胞介素 1 β 可诱导软骨细胞的凋亡,与白细胞介素 1 β 组比,5%和 10%补肾调肝方含药血清组软骨细胞的凋亡率均下降,且呈剂量依赖性,说明补肾调肝中药含药血清可抑制白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡。Western blot 结果显示,白细胞介素 1 β 可显著降低 SOX9 的表达,提高 p-P65 的表达。5%和 10%补肾调肝方含药血清组 SOX9 的表达均明显高于白细胞介素 1 β 组,10%补肾调肝方含药血清组 p-P65/P65 显著低于白细胞介素 1 β 组,结果说明补肾调肝中药含药血清可上调白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞 SOX9 表达,抑制 NF- κ B P65 磷酸化水平的升高,即补肾调肝中药含药血清通过 SOX9 抑制 NF- κ B 通路的活化,从而减少软骨细胞的凋亡。

综上所述,补肾调肝方能明显减少白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞凋亡,它可能通过上调参与关节软骨结构和功能的 SOX9 及其靶基因的正向调控,抑制软骨细胞凋亡。但是,补肾调肝方对骨关节炎患者 SOX9 信号通路的调控还有待于进一步研究。

作者贡献: 第一作者负责实验设计和实施,全体作者负责资料收集、数据分析及实施过程中出现问题的探讨及论文的校正。

经费支持: 该文章接受了“广东省自然科学基金(2018A0303130103)”“广东省中医药局科研项目(20201171)”及“广州中医药大学第三附属医院创新基金(sy201701)”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: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经广州中医药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。

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 4.0”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、超级链接该文献,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

- CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(7):1323-1330.
- 陆艳红,石晓兵. 膝骨关节炎国内外流行病学研究现状及进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012,20(6):81-84.
- LEI Z, SHI H, LI W, et al. miR-185 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting of SOX9 and regulation of Wnt signaling. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):1742-1752.
- KANG S, ZHANG J, YUAN Y. Abietic acid attenuates IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2018;64:110-115.
- WANG J, CHEN L, JIN S, et al. Altered expression of microRNA-98 in IL-1 β -induced cartilage degradation and its role in chondrocyte apoptosis. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):3208-3216.
- HUANG Z, ZHOU M, WANG Q, et al. Mechanical and hypoxia stress can cause chondrocytes apoptosis through over-activation of endoplasmic reticulum stress. *Arch Oral Biol.* 2017;84:125-132.
- PAN T, CHEN R, WU D, et al. Alpha-Mangostin suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis in rat chondrocytes by inhibiting the NF- κ B signaling pathway and delays the progression of osteoarthritis in a rat model. *Int Immunopharmacol.* 2017;52:156-162.
- ZHANG W, CHENG P, HU W, et al. Inhibition of microRNA-384-5p alleviates osteoarthritis through its effects on inhibiting apoptosis of cartilage cells via the NF- κ B signaling pathway by targeting SOX9. *Cancer Gene Ther.* 2018;25(11-12):326-338.
- 吴春飞, 易俊, 梁桂洪, 等. 补肾调肝方治疗肝郁肾虚膝骨关节炎的临床研究 [J]. 中医临床研究, 2017,9(36):74-76.
- FELSON DT. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2006;354(23):841-848.
- YANG S, DUBE CE, EATON CB, et al. Longitudinal use of complementary and alternative medicine among older adults with radiographic knee osteoarthritis. *Clin Therapeut.* 2013;35(11):1690-1702.
- 杨建辉, 吕建国, 聂会勇, 等. 白藜芦醇对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及增殖能力的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014,34(21):6151-6153.
- JUNYI L, NING H, NIAN Z, et al. Sox9 Potentiates BMP2-Induced Chondrogenic Differentiation and Inhibits BMP2-Induced Osteogenic Differentiation. *Plos One.* 2014;9(2):e89025.
- SUN Q, WU G, CHEN H, et al. Hyperbaric oxygen protects type II collagen in interleukin-1 β -induced mandibular condylar chondrocyte via inhibiting the JNK/c-Jun signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(36):60312-60323.
- YAO B, WANG Q, LIU CF, et al. The SOX9 upstream region prone to chromosomal aberrations causing campomelic dysplasia contains multiple cartilage enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(11):5394-5408.
- 汤晓晨, 俞峰, 孙书龙, 等. 黄芪甲苷对人膝骨关节炎退变软骨 IL-1 β 表达的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2013,29(1):48-52.
- 姚丽, 赵婧, 周强, 等. 祛痰化痰利湿方对大鼠膝骨关节炎滑膜组织和血清 IL-1 β , MMP-1 及 COMP, CTX-II 的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015,23(11):5-8.
- 贺牡丹, 王小平, 陈同生. 白细胞介素-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011,33(1):49-54.
- GOLDRING MB, OTERO M, PLUMB DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater.* 2011;21(24):202-220.
- 季卫锋, 童培建, 袁小凤, 等. 补肾法与活血法对 SD 大鼠膝骨性关节炎滑膜 IL-1 β 、TNF- α 及软骨 MMP-13、ADAMTS-5 的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012,20(2):1-5.
- ZHENG W, ZHANG H, JIN Y, et al. Butein inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2017;42:1-10.
- LI W, ZHANG L, GUO B, et al. Exosomal FMR1-AS1 facilitates maintaining cancer stem-like cell dynamic equilibrium via TLR7/NF κ B/c-Myc signaling in female esophageal carcinoma. *Mol Cancer.* 2019;18(1):22.
- RAO Z, WANG S, WANG J. Protective effects of psoralidin on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis. *Mol Med Rep.* 2018;17(2):3418-3424.
- 罗珊, 霍永鑫, 刘英, 等. 连翘苷对 IL-1 β 诱导的人关节软骨细胞凋亡及细胞外基质降解的影响 [J]. 免疫学杂志, 2019,35(8):645-652.
- LIU YX, WANG GD, WANG X, et al. Effects of TLR-2/NF- κ B signaling pathway on the occurrence of degenerative knee osteoarthritis: an in vivo and in vitro study. *Oncotarget.* 2017;8(24):38602-38617.
- JEONG JW, LEE HH, LEE KW, et al. Mori folium inhibits interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of nf- κ B and p38 mapk in sw1353 human chondrocytes. *Int J Mol Med.* 2016;37(2):452-460.
- YU G, WAN R, YIN G, et al. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- κ B. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):2133-2142.
- JEONG JW, LEE HH, CHOI EO, et al. Schisandrae fructus inhibits il-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in sw1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and mapk activation. *Drug Dev Res.* 2015;76(8):474-483.
- YANG Y, GONG XB, HUANG LG, et al. Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice. *Oncotarget.* 2017;8(19):30723-30733.
- 鲁宏, 宋俊, 孟京红, 等. 香叶木素通过 NF- κ B 通路缓解 IL-1 β 诱导的新生大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡和免疫反应 [J]. 中国免疫学杂志, 2019,35(3):292-297.

(责任编辑: WZH, ZN, SX)