

姜黄素对 H₂O₂ 诱导软骨细胞自噬的调控<https://doi.org/10.12307/2022.477>曹舒兴¹, 宋永周¹, 李明¹, 张洪亮¹, 赵立辉², 马维¹

投稿日期: 2021-03-08

送审日期: 2021-03-09

采用日期: 2021-04-28

在线日期: 2021-10-15

中图分类号:

R459.9; R318; R394.2

文章编号:

2095-4344(2022)14-02161-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

△自噬随年龄的增加而减少可能是骨关节炎发生发展的原因之一, 自噬的激活可降低骨关节炎的严重程度。PI3K/AKT/mTOR 信号通路的失活在延缓骨关节炎的进展中发挥了什么作用? 有报道称姜黄素可以有效抑制软骨细胞产生的炎症及分解代谢介质。那么利用姜黄素的生物化学特点及其在关节组织中的生物学作用, 是否有助于开发临床安全及口服治疗关节疾病的药物?

△基于以上考虑, 结合膝骨关节炎小鼠细胞模型, 确定姜黄素对 H₂O₂ 诱导软骨细胞的自噬调控作用及其相关机制。



细胞模型

- (1) 取小鼠软骨细胞体外培养;
- (2) H₂O₂ 处理模拟骨关节炎状态, 分为 3 组: 对照组、模型组和姜黄素组。



姜黄素干预

- (1) 不同浓度姜黄素与软骨细胞培养后收集细胞进行指标检测;
- (2) CCK-8 法检测各组细胞活力; 酶联免疫吸附法检测炎症因子含量; TUNEL 染色及流式检测凋亡状况; Western-blot 法检测凋亡相关蛋白及自噬相关信号通路蛋白水平; 实时荧光定量 PCR 检测软骨基质降解相关基因的表达。



研究结论

姜黄素通过促进自噬降低 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡, 这种作用可能与蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路有关。

文题释义:

姜黄素: 是一种从姜黄中提取的多酚, 作为添加剂广泛用于日常食物中, 它具有抗炎和抗氧化的功能, 有望治疗一系列与慢性炎症相关的疾病, 包括癌症、心血管疾病、代谢综合征、阿尔茨海默病、骨关节炎以及其他常见病和衰老疾病。

自噬: 是一种保守的分解代谢过程, 在人类退行性疾病中起着重要的作用。自噬通过对受损蛋白和功能失调细胞器的降解, 实现能量循环, 以维持某些应激条件下细胞代谢的稳态。

摘要

背景: 姜黄素对骨关节炎具有良好的治疗作用, 但具体机制还不清楚; 研究表明自噬的激活可降低骨关节炎的严重程度。

目的: 探讨姜黄素对 H₂O₂ 诱导软骨细胞自噬的调控作用。

方法: 体外培养 C57 小鼠关节软骨细胞, 分为对照组、模型组以及姜黄素不同剂量组 (10, 20, 40, 80 μmol/L)。模型组给予 H₂O₂ (1 mmol/L) 处理, 模拟骨关节炎体内氧化应激状态; 姜黄素组中不同浓度姜黄素与软骨细胞培养 48 h 后, 加入 H₂O₂, 24 h 后收集细胞进行检测。CCK-8 法检测各组细胞活力; 酶联免疫吸附法检测炎症因子白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平; TUNEL 染色检测凋亡状况; 流式细胞法检测各组细胞凋亡率; Western-blot 法检测凋亡相关蛋白 (活化半胱天冬酶 3、Bax/Bcl-2)、细胞自噬相关蛋白 (Beclin-1、LC3-II/I 蛋白) 及自噬相关信号通路蛋白 (蛋白激酶 B、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白) 的表达情况; 实时荧光定量 PCR 检测软骨基质降解相关基因 (基质金属蛋白酶 13、血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5、II 型胶原蛋白 α1、软骨蛋白聚糖) 的表达水平。

结果与结论: ①与模型组相比, 姜黄素干预后软骨细胞的活力明显升高 ($P < 0.05$); 炎症因子表达明显下降 ($P < 0.05$), 凋亡率明显下降 ($P < 0.05$), 凋亡相关标志物活化半胱天冬酶 3 以及 Bax/Bcl-2 比值显著下降 ($P < 0.05$), 自噬相关标志物 LC3-II/I 和 Beclin-1 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 蛋白激酶 B、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); ②实时荧光定量 PCR 显示, 基质金属蛋白酶 13 和血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 mRNA 表达降低, II 型胶原蛋白 α1 和软骨蛋白聚糖 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); ③提示姜黄素通过促进自噬降低 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡, 这种作用可能与蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路有关。

关键词: 姜黄素; 骨关节炎; 软骨细胞; 自噬; H₂O₂

缩略语: 磷脂酰肌醇 3-激酶: phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K; 蛋白激酶 B: protein kinase B, Akt; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白: the mammalian target of Rapamycin, mTOR

Regulatory role of curcumin in hydrogen peroxide-induced autophagy in chondrocytes

Cao Shuxing¹, Song Yongzhou¹, Li Ming¹, Zhang Hongliang¹, Zhao Lihui², Ma Wei¹

¹Department of Orthopedics, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; ²Department of Radiology, Shenze County Hospital, Shenze 052560, Hebei Province, China

Cao Shuxing, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Corresponding author: Ma Wei, MD, Chief physician, Department of Orthopedics, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Curcumin has a good therapeutic effect on osteoarthritis, but the specific mechanism is still unclear. Activation of autophagy can reduce the severity of osteoarthritis.

¹ 河北医科大学第二医院骨科, 河北省石家庄市 050000; ² 河北省深泽县医院放射科, 河北省深泽县 052560

第一作者: 曹舒兴, 男, 1984 年生, 河北省正定县人, 汉族, 2012 年河北医科大学研究生学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨关节炎、骨质疏松症方面的研究。

通讯作者: 马维, 博士, 主任医师, 河北医科大学第二医院骨科, 河北省石家庄市 050000

<https://orcid.org/0000-0003-3354-1877> (曹舒兴)

基金资助: 河北省卫生计生厅科研基金 (20190068), 项目负责人: 曹舒兴; 河北省财政厅老年病课题 (361004), 项目负责人: 李明

引用本文: 曹舒兴, 宋永周, 李明, 张洪亮, 赵立辉, 马维. 姜黄素对 H₂O₂ 诱导软骨细胞自噬的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(14):2161-2166.



OBJECTIVE: To investigate the regulatory effect of curcumin on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced autophagy in chondrocytes.

METHODS: C57 mouse articular chondrocytes were cultured *in vitro* and randomly divided into control group, model group (treated with H₂O₂) and curcumin low-, medium- and high-dose groups (10, 20, 40, 80 μmol/L). Model group was treated with H₂O₂ (1 mmol/L) to simulate oxidative stress in osteoarthritis. In the different curcumin groups, chondrocytes were treated with different concentrations of curcumin for 48 hours, followed by addition of H₂O₂. Twenty-four hours later, the cells were collected for detection. Cell counting kit-8 assay was used to detect cell viability in each group. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-α levels were detected by ELISA. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. The apoptosis rate of each group was detected by flow cytometry. The expression levels of cleaved caspase-3, Bax/Bcl2, Beclin1, LC3-II/I, protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were detected by western blot. The expression of cartilage matrix degradation related genes, including matrix metalloproteinase 13, ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5, type II collagen α1, and Aggrecan, were detected by qRT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the activity of chondrocytes was significantly increased after curcumin intervention ($P < 0.05$). The expression of inflammatory cytokines was significantly decreased ($P < 0.05$). Apoptosis was significantly decreased ($P < 0.05$). Apoptosis-related markers, cleaved caspase-3 and Bax/Bcl2 ratio, were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of autophagy-related markers, LC3-II/I and Beclin1, was significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of Akt and mTOR were significantly decreased ($P < 0.05$). qRT-PCR showed that the mRNA expressions of matrix metalloproteinase 13 and ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5 were decreased, while the expressions of type II collagen α1 and Aggrecan were increased ($P < 0.05$). It is suggested that curcumin can reduce the H₂O₂-induced apoptosis in chondrocytes by promoting autophagy, and this effect may be related to the Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: curcumin; osteoarthritis; chondrocyte; autophagy; hydrogen peroxide

Funding: the Scientific Research Fund of Hebei Provincial Health Department, No. 20190068 (to CSX); the Subject of Geriatric Diseases of Hebei Provincial Finance Department, No. 361004 (to LM)

How to cite this article: CAO SX, SONG YZ, LI M, ZHANG HL, ZHAO LH, MA W. Regulatory role of curcumin in hydrogen peroxide-induced autophagy in chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(14):2161-2166.

0 引言 Introduction

骨关节炎是造成疼痛和残疾的一种进行性退行性疾病，影响着全世界数百万人，其特征是关节软骨退化、软骨下骨改变以及滑膜炎^[1-4]。尽管骨关节炎的发病率很高，但目前还没有治愈或有效的治疗方法来阻止或逆转疾病的进展。骨关节炎的常规治疗是控制症状(例如疼痛)，主要使用对乙酰氨基酚或非类固醇抗炎药^[5-6]，然而这些药物在长期使用过程中会引起严重的胃肠道和心血管不良事件。因此，人们迫切需要食品或食品衍生产品，即所谓的营养药品，来为骨关节炎提供有效和安全的治疗。

姜黄素是一种从姜黄中提取的多酚，作为添加剂广泛用于日常食物中，如咖喱等^[7]，具有抗炎和抗氧化的功能，是一种很有前途的治疗性食品材料。姜黄素有望治疗一系列与慢性炎症相关的疾病，包括癌症、心血管疾病、代谢综合征、阿尔茨海默病、骨关节炎以及其他常见病和衰老疾病^[8-10]。此外，有报道称姜黄素可以有效抑制软骨细胞产生的炎症及分解代谢介质^[11]。由于骨关节炎和相关滑膜关节的骨关节炎疾病以炎症为特征，那么更好地了解姜黄素的生物化学及其在关节组织中的生物学作用，可能有助于开发临床安全及口服治疗关节疾病的药物。

自噬是一种保守的分解代谢过程，在人类退行性疾病中起着重要的作用。自噬通过对受损蛋白和功能失调细胞器的降解，实现能量循环，以维持某些应激条件下细胞代谢的稳态^[12-13]。已有多项研究报道，自噬可能在软骨细胞或纤维软骨细胞的退行过程中具有保护作用^[14]。自噬随年龄的增加而减少可能是骨关节炎发生发展的原因之一，自噬的激活可降低骨关节炎的严重程度^[15]。有报道称骨关节炎小鼠膝关节衰老与软骨细胞中自噬的失活和凋亡的激活有关^[16]，磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(the mammalian target of Rapamycin, mTOR)信号通路的失活可以缓解这一现象^[17]，因此PI3K/AKT/mTOR信号通路的失活被认为可以延缓骨关节炎的进展。然而，姜黄素对骨关节炎的治疗作用仍不十分清楚，此次实验利用H₂O₂诱导软骨细胞模拟体

内骨关节炎软骨细胞状态，之后采用姜黄素共培养，探究姜黄素对软骨细胞自噬及相关PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞体外培养实验，两组间比较采用t检验，多组比较采用方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年8月至2021年2月在河北医科大学第二医院骨科完成。

1.3 材料 选用体质量20-25 g的雄性2月龄C57小鼠，购自南京模式生物公司，许可证号：SCXK(冀)2018-1-003。

试剂及仪器: 姜黄素(Sigma); 胰蛋白酶、II型胶原酶、胎牛血清、DMEM(Thermofisher); 3-MA(Sigma); NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific); 动物手术器械(RWD)。

1.4 方法

1.4.1 软骨细胞的分离和培养 将C57小鼠的膝关节软骨组织切成小于1 mm的碎片，用0.25 g/L胰蛋白酶消化，然后用2 g/L的胶原酶II孵育8 h，未消化的组织用180 μm细胞过滤器过滤，1 500 r/min离心10 min，锥虫蓝染色，检测细胞活力。在添加体积分数10%胎牛血清(100 U/mL青霉素和0.1 g/L链霉素)的DMEM中培养软骨细胞，细胞培养于37 °C、体积分数5%的CO₂培养箱中。此次实验设立对照组、模型组(1 mmol/L H₂O₂诱导)、姜黄素10, 20, 40, 80 μmol/L组，姜黄素组的处理过程是在H₂O₂处理前48 h进行不同浓度姜黄素预处理，筛选出最适浓度用于后续实验。在自噬检测部分，在姜黄素处理前2 h给予自噬抑制剂3-MA 5 mmol/L进行处理，其余各组不额外添加3-MA，以上各组处理24 h后收集细胞进行测试。

1.4.2 流式细胞检测 将细胞培养于6孔板中，每孔细胞数10⁵个，按上述步骤处理24 h后收集细胞，用200 μL的结合缓冲液(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)重悬。然后加入5 μL Annexin V-FITC, 37 °C暗箱孵育15 min，再加入10 μL PI, 冰上暗箱孵育10 min。采用绿色和红色荧光通道流式细胞术检测annexin-V阳性细胞数量，并计算凋亡细胞百分比。每个独立的实验重复3次。

1.4.3 CCK-8 实验 采用 CCK-8 法测定细胞活力 (Dojindo, Japan)。将细胞种到 96 孔板中, 每孔 7 000 个细胞, 孵育 24 h, 每孔加入 CCK-8 液体, 避光 37 °C 孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 和 630 nm 的双波长下读取吸光度 (A) 值, 以测定细胞活力。每个独立实验重复 3 次。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol 从软骨细胞中提取总 mRNA, RNA 质量和浓度的测定使用 NanoDrop 2000 测量 (Thermo Fisher Scientific)。实时定量 PCR 使用试剂盒 (Takara, 中国大连) 进行, 重复 3 次。根据以下循环条件进行扩增: 95 °C 5 min, 40 个循环, 95 °C 20 s, 退火和延伸 72 °C 20 s。β-actin 为内参基因。每个独立实验重复 3 次。引物序列如下:

II 型胶原蛋白 α1 上游引物: TGC CAG AGT CTC GTT CGT TAT C, 下游引物: GTT CAA GCT GCC CGT CTC CTC ATC;

基质金属蛋白酶 13 上游引物: TCC CTG GAA TTG GCA ACA AAG, 下游引物: GCA TGA CTC TCA CAA TGC GAT TAC;

软骨蛋白聚糖上游引物: TTC CAC CAG TGC GAT GCA G, 下游引物: TGG TGT CCC GGA TTC CGT A;

血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 上游引物: AAG GGC ACA GGC TAC TAT GTG GTC, 下游引物: CAA TAA TGC CGT CAC ATC CAG TTC;

GAPDH 上游引物: GTC TTC ACC ACC ATG GAG AAG, 下游引物: GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC。

1.4.5 Western blot 使用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液从软骨细胞中提取胞浆蛋白, 等量的蛋白质在 SDS-PAGE 凝胶上分离并电泳。蛋白质被转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 4 h。膜与一抗孵育过夜, 用 TBST 洗膜后, 与酶标二抗室温孵育 2 h。最后用 TBST 冲洗膜, 使用 Gel Doc 2000 成像仪检测化学发光信号。所有一抗和二抗均购自 Abcam, 活化半胱天冬酶 3 (Abcam, ab32042, 1 : 1 000), Bax (Abcam, ab32503, 1 : 1 000), Bcl-2 (Abcam, ab32124, 1 : 1 000), Beclin-1 (Abcam, ab210498, 1 : 1 000), LC3- II / I (Abcam, ab192890, 1 : 1 000), Akt (Abcam, ab8805, 1 : 1 000), mTOR (Abcam, ab134903, 1 : 1 000), 二抗 (Abcam, ab64261)。利用 Image J (Fiji) 软件计算半定量蛋白灰度值。

1.4.6 酶联免疫吸附法 细胞按照上述步骤处理 24 h 后, 采集上清, 按照酶联免疫吸附试剂盒说明书的提示按步骤检测白细胞介素 6 (Sigma, RAB0306)、肿瘤坏死因子 α (Sigma, RAB1089) 水平。

1.5 主要观察指标 各组细胞处理 24 h 后, CCK-8 法检测细胞活力, 酶联免疫吸附法检测炎症因子白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的分泌水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, Western-blot 法检测蛋白表达情况, 实时荧光定量 PCR 检测软骨基质降解相关基因的表达水平。

1.6 统计学分析 用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用 *t* 检验分析两组间差异, 多组比较采用方差分析检验, 对于 Western blot 和 TUNEL 染色分析, 采用单

因素方差分析来比较差异, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 姜黄素改善 H₂O₂ 诱导的软骨细胞的细胞活性并抑制其炎症反应 与对照组相比, 模型组软骨细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 经姜黄素 (40 μmol/L 和 80 μmol/L) 处理后, 与模型组相比, 明显提高了细胞存活率 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 | 姜黄素对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞存活率的影响 (x̄±s)
Table 1 | The effect of curcumin on the survival rate of chondrocytes induced by H₂O₂

组别	存活率 (%)
对照组	99.50±5.25
模型组	49.74±5.36 ^a
姜黄素组 10 μmol/L 组	51.23±2.36
姜黄素组 20 μmol/L 组	53.02±2.49
姜黄素组 40 μmol/L 组	75.76±3.24 ^b
姜黄素组 80 μmol/L 组	87.07±2.51 ^c

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

通过酶联免疫吸附实验检测炎症因子白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的分泌水平发现, 姜黄素可明显抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞的炎症反应 ($P < 0.05$), 见图 1A, B。

2.2 姜黄素抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡 采用 TUNEL 染色和流式细胞术检测姜黄素对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡的影响, TUNEL 染色的细胞核含有缺口 DNA, 这是细胞凋亡的早期特征。对照组细胞 TUNEL 染色为阴性, 见图 1C。

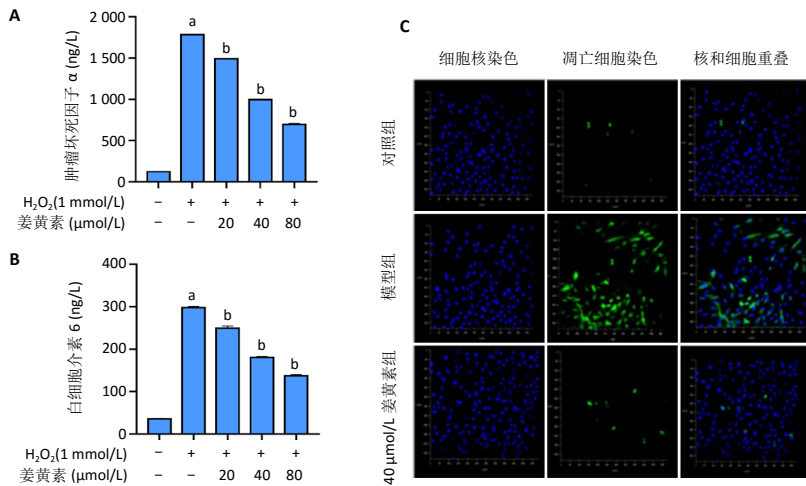
2.3 姜黄素促进 H₂O₂ 诱导的软骨细胞的自噬作用 自噬是正常软骨的另一种保护机制, 为了探讨姜黄素对自噬的影响, 检测了自噬相关指标, 结果表明仅模型组的 LC3- II / I 比值明显低于对照组 ($P < 0.05$); 姜黄素 40 μmol/L 预处理组的软骨细胞 LC3- II / I 显著升高 ($P < 0.05$); 与姜黄素 40 μmol/L 预处理组软骨细胞相比, 自噬抑制剂 3-MA 预处理的软骨细胞 LC3- II / I 比值降低 ($P < 0.05$), 见图 2A, B。此外 3-MA 预处理的细胞存活率明显低于姜黄素处理的细胞 ($P < 0.05$), 见图 2C。

为了进一步研究细胞凋亡与自噬的相互作用, 检测了自噬抑制剂 3-MA 处理后细胞凋亡水平, 结果表明, 模型组软骨细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 姜黄素 40 μmol/L 组的软骨细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。3-MA 预处理后, 与姜黄素 40 μmol/L 组比较凋亡显著增加 ($P < 0.05$), 见图 2D, E。

为了阐述姜黄素的抗凋亡作用, 检测了凋亡相关的标记物, 结果显示, 在模型组中, 姜黄素处理后活化半胱天冬酶 3 和 Bax/Bcl-2 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 而自噬抑制剂 (3-MA) 处理后, 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 见图 2F, G。

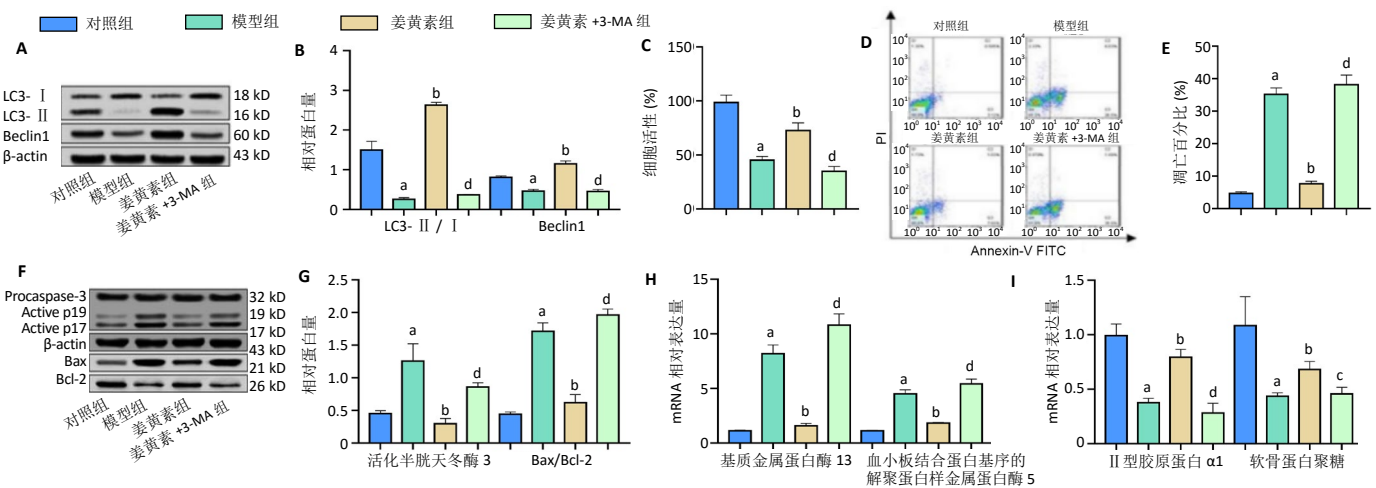
此外, 还通过实时荧光定量 PCR 检测了不同组软骨细胞中软骨基质降解相关基因的 mRNA 水平。结果表明, 姜黄素预处理后基质金属蛋白酶 13 和血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 mRNA 表达降低, II 型胶原蛋白 α1 和软骨蛋白聚糖 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 而自噬抑制剂 (3-MA) 则逆转了这种表达趋势 ($P < 0.05$), 见图 2H, I。

2.4 姜黄素介导的自噬作用与 Akt/mTOR 通路有关 见图 3。



图注：图 A, B 为酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 的表达水平，与对照组相比，^a*P* < 0.05；与模型组相比，^b*P* < 0.05。图 C 为 TUNEL 染色 (×60)，凋亡细胞为绿色，核为蓝色。综合考虑效用及经济因素，下文均选用 40 μmol/L 姜黄素进行后续实验

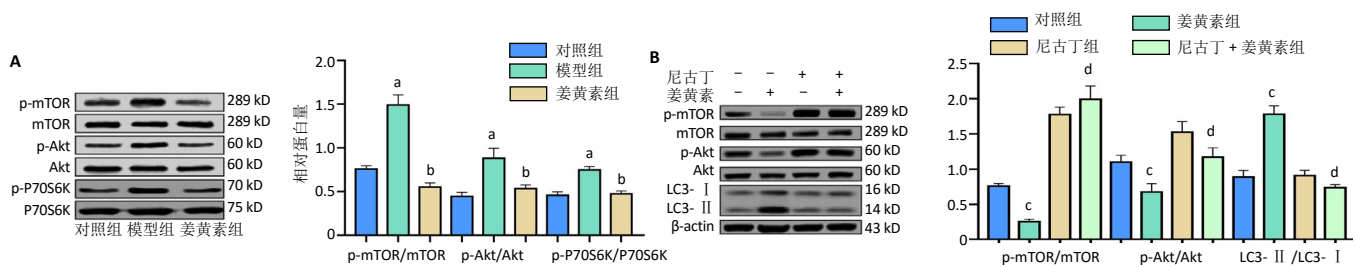
图 1 | Curcumin inhibits the release of inflammatory factors and cell apoptosis
Figure 1 | Curcumin inhibits the release of inflammatory factors and cell apoptosis



图注：各图片中姜黄素组的浓度均为 40 μmol/L。图 A 示 Western blot 检测各组原代软骨细胞自噬相关标志物的相对蛋白表达；B 为 Western blot 蛋白水平半定量灰度值统计图；C 示 CCK-8 法检测不同处理的原代软骨细胞活性；D 示流式细胞术检测各组原代软骨细胞凋亡比例；E 为细胞凋亡比例统计图。F 为 Western blot 检测活化半胱天冬酶 3 和 Bax/Bcl-2 蛋白的相对表达；G 为 Western blot 蛋白水平半定量灰度值统计图；H 为实时荧光定量 PCR 检测基质金属蛋白酶 13、血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 的相对 mRNA 水平；I 为 RT-PCR 检测 II 型胶原蛋白 α1、软骨蛋白聚糖的相对 mRNA 水平。采用单因素方差分析比较各组之间的差异，与对照组相比，^a*P* < 0.01；与模型组比较，^b*P* < 0.01；与姜黄素组相比，^c*P* < 0.05，^d*P* < 0.01

图 2 | 姜黄素促进 H₂O₂ 诱导软骨细胞的自噬作用

Figure 2 | Curcumin H₂O₂ induces autophagy in chondrocytes



图注：各图片中姜黄素组的浓度均为 40 μmol/L。图 A 示 Western blot 分析各组磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt) 和 p-P70S6K 蛋白表达水平，与对照组相比，^a*P* < 0.01；与模型组相比，^b*P* < 0.01；图 B 示通过使用尼古丁激活蛋白激酶 B(Akt)/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路，探讨姜黄素对软骨细胞自噬的调控作用是否依赖 Akt/mTOR 通路。通过单因素方差分析来确定各组之间的差异，与对照组相比，^c*P* < 0.01；与尼古丁组相比，^d*P* < 0.01

图 3 | 姜黄素介导的自噬作用与 Akt/mTOR 通路有关

Figure 3 | Curcumin-mediated autophagy is related to the Akt/mTOR pathway

mTOR、Akt、p-P70s6k 在模型组的表达水平较高, 姜黄素处理后 mTOR、Akt、p-P70s6k 的表达水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3A。Akt 和 mTOR 的磷酸化位点分别为 Ser473 和 Ser2448, 为了确定姜黄素对软骨细胞自噬的调控是否依赖于 Akt/mTOR, 使用尼古丁 (Abcam, N-008, 10^7 mol/L) 去激活 Akt/mTOR 信号通路。用尼古丁在姜黄素治疗前预处理软骨细胞 2 h, Western blot 检测 LC3- II 的表达, 从图中可以看出, 姜黄素对软骨细胞凋亡的调控作用依赖于 Akt/mTOR 信号通路, 见图 3B。

3 讨论 Discussion

骨关节炎是一种常见的以关节功能障碍为主要病因的衰老性骨骼肌疾病, 是全球性致残因素之一^[18]。关节软骨退化性变被认为是骨关节炎的主要诱因, 目前任何药物都无法逆转这种病理状态。据报道, 氧化应激是导致骨关节炎的重要因素之一, 过量的氧化应激可能最终导致软骨细胞死亡^[19]。因此, 此次实验采用 H_2O_2 诱导小鼠膝关节初级软骨细胞来模拟体内骨关节炎环境, 结果发现, 经过 H_2O_2 处理的软骨细胞活性降低, 炎症因子分泌增加, 细胞凋亡增加, 自噬降低。

自噬是一种维持细胞内稳态的生理过程, 在自噬相关基因的调控下由溶酶体对功能失调的细胞器和生物大分子进行降解^[22]。通过对细胞应激的反应, 自噬是细胞凋亡的保护机制。例如, 细胞的基本功能可以由自噬降解的细胞内成分产生的 ATP 来维持, 通过减少不必要或功能失调的成分来保护细胞免受损伤^[13]。因此, 它在预防癌症、神经退化、心肌病、糖尿病、肝病、自身免疫疾病和感染等疾病方面发挥着关键作用。自噬已被证实各种物理事件中发挥重要作用, 据报道, 自噬参与了维持软骨内平衡的功能, 自噬调节因子在骨关节炎动物模型或人关节软骨中下调, 并伴有软骨细胞凋亡增加^[20-21]。在人类自噬基因中, Beclin-1 和 LC3 是自噬通路的主要调控因子和标记物^[22], Beclin-1 可以与 III 型磷脂酰肌醇形成复合物, 使自噬小泡成核; LC3- I 转化为 LC3- II, 在自噬激活过程中黏附在自噬小体的膜上。在此次实验中, 发现姜黄素处理后的软骨细胞凋亡减少, 自噬相关蛋白上调, 猜测自噬可能是姜黄素在 H_2O_2 刺激下诱导软骨细胞的自我保护过程。为了证实这一点, 作者采用了自噬抑制剂 3-MA, 采用姜黄素、 H_2O_2 和 3-MA 共处理软骨细胞后, 细胞凋亡明显增加, 细胞自噬受到抑制; Western blot 分析证实, H_2O_2 刺激下凋亡标志物活化半胱天冬酶 3 表达上调, 姜黄素处理后表达下调; Bcl-2 作为 Bcl 家族成员具有抗凋亡作用, H_2O_2 诱导的软骨细胞中 Bcl-2 的表达降低, 而姜黄素预处理可以逆转 Bcl-2 的表达。上述结果表明姜黄素在 H_2O_2 刺激下通过激活软骨细胞自噬, 抑制软骨细胞凋亡来进行自我保护, 这与 Li 等^[23] 提出的通过激活自噬抑制凋亡来治疗骨关节炎的观点是一致的。

mTOR 是一种重要的自噬调节因子, mTOR 复合物 1

(mTORC1) 由生长因子、能量水平和营养状态介导, 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控自噬过程。据报道, 自噬相关蛋白 13 在营养充足的情况下被 mTOR 复合物 1 高度磷酸化, 高磷酸化的自噬相关蛋白 13 与自噬相关蛋白 1 激酶的亲和力降低, 导致自噬相关蛋白 1 激酶活性下降, 最终抑制自噬过程。相反, 在营养匮乏的情况下, mTOR 复合物 1 的功能被抑制, 自噬相关蛋白 13 被去磷酸化, 自噬相关蛋白 1 激酶与自噬相关蛋白 13 紧密结合, 促进自噬相关蛋白 1 激酶的活性, 最终诱导自噬^[24]。已有文献表明, 雷帕霉素等生物活性成分对骨关节炎的治疗作用与通过调控 Akt/mTOR 信号通路增加自噬有关^[25]。同样, 此次研究表明, 模型组中 Akt/mTOR 通路被激活, 自噬减少, LC3 和 Beclin-1 下调。此外, 此次研究结果进一步验证了姜黄素对自噬的影响, 表现为自噬增加 (LC3 和 Beclin-1), 凋亡减少 (活化半胱天冬酶 3 和 Bax/Bcl-2), 软骨基质降解减少 (基质金属蛋白酶 13、血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5、II 型胶原蛋白 a1 和软骨蛋白聚糖)。这些结果在自噬抑制剂的作用下得到了进一步证实, 3-MA 存在时, 这些标记物的表达水平发生了逆转。

综上所述, 此次研究证实了姜黄素可通过促进自噬降低 H_2O_2 诱导的软骨细胞凋亡, 这种作用可能通过 Akt/mTOR 信号通路实现, 将为姜黄素治疗骨关节炎提供理论支持和治疗靶点。然而, 在此次研究中尚有不足: 第一, AKT/mTOR 通路是否姜黄素的直接下游通路还未阐明, 在今后的研究中将通过各种分子生物学手段干预该通路重要分子靶点, 以明确此问题; 第二, 仍需要进一步动物实验支持此次研究的发现, 因此, 这将是下一步的研究内容。

致谢: 在此文写作过程中, 感谢马维老师、宋永周老师给予的大力的帮助和指导, 感谢动物实验室及生化实验室各位老师的帮助。

作者贡献: 马维负责实验设计, 曹舒兴、宋永周负责实验实施, 李明、张洪亮、赵立辉负责指标测定, 曹舒兴负责文章撰写。

经费支持: 该文章接受了“河北省卫生厅科研基金 (20190068) 及河北省财政厅老年病课题 (361004)”的经费支持。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, 不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经河北医科大学第二医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2020-R199。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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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投稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经由河北医科大学第二医院生物统计学专家审核。

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

- [1] KRAUS VB, KARSDAL MA. Osteoarthritis: current molecular biomarkers and the way forward. *Calcif Tissue Int.* 2020. doi: 10.1007/s00223-020-00701-7.
- [2] PEARSON SH. Proactive wellness care for patients with osteoarthritis. *Nurs Clin North Am.* 2020;55:133-147.
- [3] GUERRERO EM, BULLOCK GS, HELMKAMP JK, et al. The clinical impact of arthroscopic vs. open osteocapsular debridement for primary osteoarthritis of the elbow: a systematic review. *J Shoulder Elbow Surg.* 2020;29:689-698.
- [4] BILLESBERGER LM, FISHER KM, QADRI YJ, et al. Procedural treatments for knee osteoarthritis: a review of current injectable therapies. *Pain Res Manag.* 2020;2020:3873098.
- [5] VINA ER, KWONG CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30:160-167.
- [6] MCALINDON TE, BANNURU RR, SULLIVAN MC, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22:363-388.
- [7] EL KHOURY D, MATAR R, TOUMA T. Curcumin and endometrial carcinoma: an old spice as a novel agent. *Int J Womens Health.* 2019; 11:249-256.
- [8] HAY E, LUCARIELLO A, CONTIERI M, et al. Therapeutic effects of turmeric in several diseases: An overview. *Chem Biol Interact.* 2019; 310:108729.
- [9] HONG L, SUREDA A, DEVKOTA HP, et al. Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. *Biotechnol Adv.* 2020;38:107343.
- [10] SATHISH S, NICOLETTE H, HEIDI A. Therapeutic Potential and Recent Advances of Curcumin in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Molecules.* 2018;23(4):835.
- [11] CLUTTERBUCK AL, ALLAWAY D, HARRIS P, et al. Curcumin reduces prostaglandin E2, matrix metalloproteinase-3 and proteoglycan release in the secretome of interleukin 1beta-treated articular cartilage. *F1000Res.* 2013;2:147.
- [12] VILLAREJO-ZORI B, BOYA P. Autophagy and vision. *Med Sci (Paris).* 2017; 33:297-304.
- [13] ZHANG B, HOU R, ZOU Z, et al. Mechanically induced autophagy is associated with ATP metabolism and cellular viability in osteocytes in vitro. *Redox Biol.* 2018;14:492-498.
- [14] SACITHARAN PK, BOU-GHARIOS G, EDWARDS JR. SIRT1 directly activates autophagy in human chondrocytes. *Cell Death Discov.* 2020; 6:41.
- [15] CASTROGIOVANNI P, RAVALLI S, MUSUMECI G. Apoptosis and Autophagy in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *J Invest Surg.* 2020; 33(9):874-875.
- [16] BARRANCO C. Osteoarthritis: activate autophagy to prevent cartilage degeneration? *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:127.
- [17] HUANG X, NI B, XI Y, et al. Protease-activated receptor 2 (PAR-2) antagonist AZ3451 as a novel therapeutic agent for osteoarthritis. *Aging (Albany NY).* 2019;11:12532-12545.
- [18] HILIGSMANN M, COOPER C, ARDEN N, et al. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43:303-313.
- [19] LEPETSOS P, PAPAVALIOLIOU AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):576-591.
- [20] CARAMES B, TANIGUCHI N, OTSUKI S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:791-801.
- [21] VINATIER C, DOMINGUEZ E, GUICHEUX J, et al. Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis. *Front Physiol.* 2018;9:706.
- [22] AL-BARI M. A current view of molecular dissection in autophagy machinery. *J Physiol Biochem.* 2020;76(3):357-372.
- [23] LI YS, ZHANG FJ, ZENG C, et al. Autophagy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2016;83:143-148.
- [24] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13:132-141.
- [25] CARAMES B, HASEGAWA A, TANIGUCHI N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:575-581.

(责任编辑: GD, ZN, SX)