

塞来昔布抑制凝血酶诱导的大鼠软骨细胞退变

朱志恒^{1, 2}, 丁佳滢^{1, 2}, 葛杨硕^{1, 2}, 黄春萌^{1, 2}, 沈军³, 王学宗⁴, 郑昱新⁴, 丁道芳^{1, 2}

<https://doi.org/10.12307/2024.834>

投稿日期: 2023-12-03

采用日期: 2024-01-16

修回日期: 2024-02-08

在线日期: 2024-02-26

中图分类号:

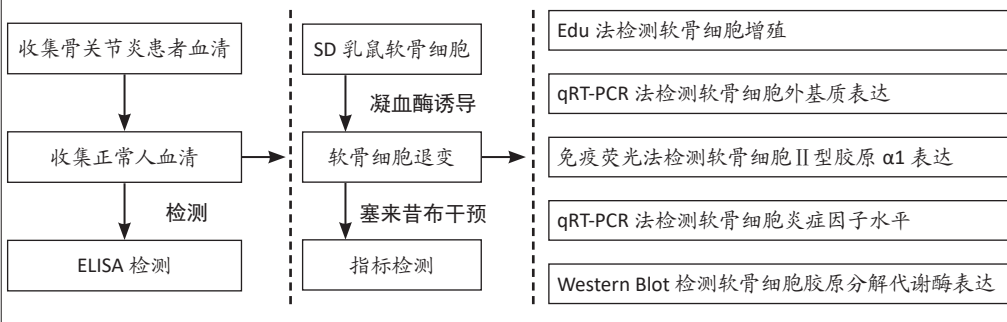
R459.9; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2024)34-05446-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 塞来昔布对凝血酶诱导大鼠软骨细胞生长、形态和细胞外基质合成的影响



文题释义:

骨关节炎: 是一种由多因素导致的常见慢性退行性关节疾病, 软骨退变和软骨下骨硬化等是其主要病理特点。骨关节炎严重危害了中老年人群的身心健康, 降低了生活质量。

凝血酶: 是一种丝氨酸蛋白酶, 在体内作为凝血的主要因子参与血栓形成的病理过程, 可直接或间接影响炎症类疾病的发生发展。

摘要

背景: 骨关节炎患者血清中凝血酶含量显著高于正常人, 且凝血酶可以诱导大鼠软骨细胞退变, 提示抑制凝血酶功能可能成为治疗骨关节炎的一种方法。塞来昔布为临床治疗骨关节炎的常见药物, 是否可以抑制凝血酶的促炎作用而改善大鼠软骨细胞退变尚未可知。

目的: 探讨塞来昔布对凝血酶诱导软骨细胞退变的影响。

方法: 使用ELISA试剂盒检测骨关节炎患者与正常人血清中凝血酶含量。体外提取、培养SD乳鼠关节软骨细胞, 使用第一代细胞进行实验, 将软骨细胞分对照组、凝血酶组和塞来昔布组。显微镜下观察3组细胞形态, 并使用Edu试剂盒检测细胞增殖情况; qRT-PCR检测软骨细胞外基质成分(聚集蛋白聚糖、弹性蛋白、软骨寡聚基质蛋白)、炎症因子(白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α)、炎症趋化因子(单核细胞趋化蛋白2、单核细胞趋化蛋白7、粒细胞趋化蛋白6)的表达; 免疫荧光法检测II型胶原 $\alpha 1$ 的表达; Western Blot检测分解代谢基因如基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13和环氧化酶2等蛋白的表达。

结果与结论: ①与正常人相比, 骨关节炎患者血清中凝血酶含量显著增高; ②塞来昔布可明显抑制凝血酶诱导的软骨细胞纤维样形态改变; ③与凝血酶组相比, 塞来昔布抑制了软骨细胞的增殖; ④凝血酶组II型胶原 $\alpha 1$ 等软骨细胞外基质基因表达的下调被塞来昔布抑制($P < 0.05$); ⑤凝血酶可促进软骨细胞炎症因子(白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α)、炎症趋化因子(单核细胞趋化蛋白2、单核细胞趋化蛋白7、粒细胞趋化蛋白6)以及分解代谢基因(基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13和环氧化酶2)的表达, 在塞来昔布干预下, 上述基因的表达下调($P < 0.05$); ⑥结果提示, 塞来昔布可以抑制凝血酶的促炎作用, 从而改善大鼠软骨细胞退变。

关键词: 软骨细胞; 凝血酶; 塞来昔布; 细胞增殖; 细胞退变

Celecoxib inhibits thrombin-induced chondrocyte degeneration in rats

Zhu Zhiheng^{1, 2}, Ding Jiaying^{1, 2}, Ge Yangshuo^{1, 2}, Huang Chunmeng^{1, 2}, Shen Jun³, Wang Xuezhong⁴, Zheng Yuxin⁴, Ding Daofang^{1, 2}

¹School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ²Institute of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ³Shang Guanghua Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052, China; ⁴Shi's Medical Center for Injuries, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Zhu Zhiheng, Master, Primary therapist, School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; Institute of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: Ding Daofang, PhD, Researcher, School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; Institute of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

¹上海中医药大学康复医学院, 上海市 201203; ²上海中医药大学康复医学研究所, 上海市 201203; ³上海中医药大学附属光华医院, 上海市 200052; ⁴上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海市 201203

第一作者: 朱志恒, 男, 1998年生, 河南省郑州市人, 汉族, 2024年上海中医药大学毕业, 硕士, 初级治疗师, 主要从事肌骨类疾病康复及机制研究。

通讯作者: 丁道芳, 博士, 研究员, 上海中医药大学康复医学院, 上海市 201203; 上海中医药大学康复医学研究所, 上海市 201203

<https://orcid.org/0000-0001-6883-1642> (朱志恒)

基金资助: 国家自然科学基金项目(82174406), 项目负责人: 王学宗; 国家自然科学基金项目(81902306), 项目负责人: 丁道芳; 上海中医药大学科技发展项目(23KFL023), 项目负责人: 丁道芳

引用本文: 朱志恒, 丁佳滢, 葛杨硕, 黄春萌, 沈军, 王学宗, 郑昱新, 丁道芳. 塞来昔布抑制凝血酶诱导的大鼠软骨细胞退变[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(34):5446-5451.



Abstract

BACKGROUND: The content of serum thrombin in patients with osteoarthritis is significantly higher than that in normal individuals, and thrombin can induce inflammatory degeneration of rat chondrocytes, suggesting that inhibiting the function of thrombin may become a method for treating osteoarthritis. Celecoxib is a common therapeutic drug for the clinical treatment of osteoarthritis. It is not yet known whether it improves chondrocyte degeneration by inhibiting the activity of thrombin.

OBJECTIVE: To investigate the effect of celecoxib on thrombin-induced degeneration of rat chondrocytes.

METHODS: Thrombin levels in the serum of osteoarthritis patients and normal individuals were detected by an ELISA kit. Primary chondrocytes of neonatal Sprague-Dawley rats were isolated, and all experiments were performed with cells from passage one. Chondrocytes were randomly divided into three groups: control group, thrombin group, and celecoxib group. The cell morphology of the three groups was observed under an inverted microscope, and an Edu kit was used to detect the cell proliferation. qRT-PCR was used to detect the expression of extracellular matrix components (aggrecan, elastin, cartilage oligomeric matrix proteins), inflammatory factors (interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α), and chemokines (monocyte chemoattractant protein 2, monocyte chemoattractant protein 7, granulocyte chemoattractant protein 6). The expression of type II collagen $\alpha 1$ was detected by immunofluorescence. Western blot method was used to detect the expression of catabolic metabolism genes, such as matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase 13, and cyclooxygenase 2.

RESULTS AND CONCLUSION: Patients with osteoarthritis had higher levels of thrombin in the serum compared with normal individuals. Under the microscope, celecoxib was found to significantly inhibit fibroid changes in chondrocytes. Compared with the thrombin group, celecoxib inhibited the proliferation of chondrocytes. The downregulation of extracellular matrix gene expression, such as type II collagen $\alpha 1$, in the thrombin group was inhibited by celecoxib ($P < 0.05$). Thrombin promoted the expression of inflammatory factors (interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α), chemokines (monocyte chemoattractant protein 2, monocyte chemoattractant protein 7, granulocyte chemoattractant protein 6), as well as catabolic genes (matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase 13, and cyclooxygenase 2), and under the intervention of celecoxib, the expression of these genes could be downregulated ($P < 0.05$). Overall, these findings indicate that celecoxib inhibits the pro-inflammatory effects of thrombin and thereby ameliorates chondrocyte degeneration in rats.

Key words: chondrocyte; thrombin; celecoxib; cell proliferation; cell degeneration

Funding: National Natural Science Foundation of China, Nos. 82174406 (to WXZ) and 81902306 (to DDF); Science and Technology Development Project of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, No. 23KFL023 (to DDF)

How to cite this article: ZHU ZH, DING JY, GE YS, HUANG CM, SHEN J, WANG XZ, ZHENG YX, DING DF. Celecoxib inhibits thrombin-induced chondrocyte degeneration in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(34):5446-5451.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种以软骨纤维化、关节间隙狭窄和骨质增生等病理改变为特征的慢性退行性疾病^[1],在全球范围内受此影响的患者约有5亿^[2],随着人口老龄化进展,骨关节炎的发病率也快速增加^[3]。骨关节炎多见于中老年人群,主要表现为膝关节肿胀、疼痛、晨僵、活动不便等,不同程度影响患者生活质量^[4]。目前骨关节炎临床治疗包括非类固醇抗炎药、关节腔注射、软骨保护剂和关节置换术等,但由于骨关节炎发病机制不明确,治疗靶点不清晰,暂无有效的治疗方法,因此研究骨关节炎发病机制尤为重要^[5-8]。

研究表明凝血酶在动脉粥样硬化等疾病中促进白细胞介素1、白细胞介素6等炎症因子的表达,发挥炎症因子的作用^[9-12]。课题组前期发现骨关节炎患者血清中凝血酶含量显著高于正常人;进一步研究发现,凝血酶明显刺激软骨细胞增殖,促进软骨细胞形态纤维样改变,上调炎症因子、化学趋化因子和基质金属蛋白酶等表达,促进胶原分解;以上研究结果提示凝血酶为软骨细胞退变过程中的关键炎症因子。塞来昔布是临床上常见的非类固醇药物,通过抗炎和镇痛途径缓解临床症状^[13-14]。因此,此次研究探讨塞来昔布是否可以抑制凝血酶的促炎作用而改善大鼠软骨细胞的炎性退变,为临床治疗骨关节炎提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,若计量资料服从正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,组内差异采用LSD-*t*检验。若资料不符合正态分布,采用Kruskal-Wallis检验。

1.2 时间及地点 实验于2023年6-9月在上海中医药大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雌性SPF级SD大鼠(新生24h),购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[合格证号:SCXK(沪)

2018-0006]。此次实验所用实验动物和实验设计均得到上海中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号:PZSHUTCM200710008)。

1.3.2 实验仪器 CO₂培养箱、QuantStudio3荧光定量PCR仪(Thermo);超净工作台(力康生物医疗科技有限公司);显微镜照相系统(Olympus);电泳仪、电泳槽、转膜仪、凝胶成像系统(Bio-Rad);酶标仪(BioTek);摇床(梅特仪器公司);离心机(美瑞克公司)。

1.3.3 化学品和试剂 DMEM培养基和胎牛血清(Biosera公司,10270-106);II型胶原酶(Sigma公司,C6885);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Pierce公司,No.23227);Evo M-MLV反转录预混型试剂盒和SYBR® Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(含ROX)(艾科瑞生物公司,AG11706,AG11718);青霉素-链霉素试液、凝血酶、BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒、RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)、 β -actin、基质金属蛋白酶9(碧云天公司,C0222,ST1699,C0075,R0027,AF0003,AF5234);环氧化酶2(Bimake公司,A5523);兔二抗、鼠二抗(CST公司,7074P2,7076P2);II型胶原 $\alpha 1$ 和基质金属蛋白酶13(Santa公司,sc-28887,sc-30073);塞来昔布(Selleck公司,S1261);凝血酶ELISA试剂盒(Abcam公司,ab270210);异氟烷(瑞沃德公司,R510-22-10)。

1.4 实验方法

1.4.1 ELISA法测定血清凝血酶浓度 正常人及关节炎患者血液样本均来自2022年1-9月在上海中医药大学附属曙光医院进行健康体检及骨关节炎治疗的患者。骨关节炎参照膝关节关节炎的放射学诊断标准,源自2021年中华医学会骨科学分会制定的《中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)》中的膝关节关节炎诊断部分。收集受试者肘正中静脉血清,放于-80℃保存,用于后续检测。此次实验设计均经

过上海中医药大学附属曙光医院伦理委员会伦理审查(批准号: 2021-1013-88-01)。使用 ELISA 试剂盒检测正常人和骨关节炎患者血清凝血酶含量。配置 Sample Diluent NS+1×Enhancer、Wash Buffer PT 以及标准品。96 孔板中每孔加入 10 μL 血清和 90 μL Sample Diluent NS+1×Enhancer, 置于摇床, 200 r/min, 室温摇匀 1 min, 重复 4 次此步骤, 即将样本稀释 100 000 倍。SimpleStep 预涂的 96 孔板每孔加入稀释后的血清 50 μL 和 50 μL 抗体。用膜封住孔板, 400 r/min, 室温孵育 1 h。每孔加入 Wash Buffer PT 洗 3 次, 洗涤液在孔内至少停留 10 s, 每次洗完倒扣弃掉洗涤液, 重复 3 次。每孔加入 TMB 显色液, 300 r/min, 室温避光孵育 10 min。每孔加入终止液, 400 r/min, 孵育 1 min, 颜色从蓝色变为黄色。将酶标仪设置至 450 nm 波长处, 放入检测吸光度值。

1.4.2 软骨细胞的分离和培养 过量异氟烷气体麻醉处死新生 24 h 的幼鼠, 置于体积分数 75% 乙醇中浸泡消毒 10 min, PBS 清洗 3 次。在无菌条件下解剖出关节软骨, 剥离其他软组织后, PBS 漂洗 3 次, 将其切成 1 mm³ 大小的碎片, 加入 0.5% II 型胶原酶, 37 °C 恒温摇床 (转速 150 r/min) 消化约 60 min; 取上清液, 2 000 r/min 离心 5 min, 倒去上清液, 沉淀用 PBS 洗涤 3 次, 用含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基重悬细胞, 接种于 10 cm 培养皿中 (1×10¹⁰ L⁻¹), 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。剩余的软骨组织继续加入胶原酶重复上述过程。

大鼠软骨细胞的培养及鉴定:

细胞来源	大鼠股骨远端和胫骨平台处软骨组织
原代培养方法	酶消化法
基础培养基	DMEM 培养基
添加材料	添加体积分数 10% 的无菌胎牛血清、1% 的青霉素-链霉素溶液
原代培养时间	原代细胞培养 2 d 开始换液, 之后每 2 d 换液 1 次, 培养 3 d 左右开始传代
细胞传代	细胞融合至 80%-90% 用胰酶消化传至下 1 代, 按 1 : 3 比例传代, 两三天传 1 代, 共传 2 代
细胞鉴定	采用 II 型胶原 α1 免疫荧光染色进行软骨细胞的鉴定
伦理学批准	实验经过上海中医药大学实验动物福利伦理委员会 (PZSHUTCM200710008) 和上海中医药大学附属曙光医院伦理委员会 (2021-1013-88-01) 审查批准

1.4.3 软骨细胞分组及处理 取第 1 代软骨细胞接种到 6 孔板中 (6×10⁵ 个 / 孔) 进行干预, 将细胞分为对照组、凝血酶组和塞来昔布组。对照组加入培养基 (体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素试液的 DMEM 培养基), 凝血酶组在对照组培养基的基础上加入 20 U/mL 凝血酶, 塞来昔布组在凝血酶组培养基的基础上加入 10 μmol/L 塞来昔布。24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞的形态并拍照。

1.4.4 Edu 法检测软骨细胞增殖 将软骨细胞接种到 6 孔板中 (6×10⁵ 个 / 孔), 分组培养至正常状态, 加入 Edu 工作液, 继续孵育 2 h。去除培养液, 使用 PBS 清洗 3 次。加入固定液, 室温固定 15 min。去除固定液, 洗涤液清洗 3 次。加入通透

液, 室温孵育 15 min。洗涤液清洗 3 次, 加入 Click 反应液, 室温避光孵育 30 min。洗涤液清洗 3 次, DAPI 试剂标记细胞核, 避光 10 min。洗涤液清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察拍照。

1.4.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 软骨细胞分组培养 24 h 后, RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒 (离心柱式) 抽提细胞内 RNA。采用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒合成 cDNA, 按照 SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含 ROX) 配制 20 μL 反应体系, 包括 2×SYBR® Green Pro Taq HS Premix(ROS plus)10 μL, 10 μmol/L 浓度的前后引物各 2 μL, DNA 模板小于 100 ng, ddH₂O 补足体积至 20 μL。以 β-actin 为内参进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 法表示各目的基因的相对表达量。各基因的引物序列见表 1。

表 1 | qRT-PCR 引物名称及序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR

基因名称	mRNA 序列 (5'-3')
β-actin-F	AGA TCA AGA TCA TTG CTC CTC CTG
β-actin-R	GGG TGT AAA ACG CAG CTC AG
软骨寡聚基质蛋白 -F	CCA TGA TGG CAA GGG TGA TG
软骨寡聚基质蛋白 -R	GGG CAC ACA TCG ATC TTG TC
弹性蛋白 -F	GTG TCG GTC TTC CAG GTG TA
弹性蛋白 -R	CTT TGG CGC TTT GAT GGG AT
聚集蛋白聚糖 -F	GCA GGG ATA ACG GAC TGA AG
聚集蛋白聚糖 -R	GAG TAA AGT GGT CAT AGT TCA GCT TG
单核细胞趋化蛋白 2-F	GCT GCT ACT CAT TCA CTG GC
单核细胞趋化蛋白 2-R	GGT GCT GAA GTC CTT AGG GT
单核细胞趋化蛋白 7-F	GCT TCT GTG TGT GCT GCT C
单核细胞趋化蛋白 7-R	TAA CAG CTT CCC AGG GAC AC
粒细胞趋化蛋白 6-F	TTC TGC TGC TGT TCA CAC TG
粒细胞趋化蛋白 6-R	TAT CAA CGG AGC TTG TGG GT
肿瘤坏死因子 α-F	CGT CGT AGC AAA CCA CCA AG
肿瘤坏死因子 α-R	GAG GCT GAC TTT CTC CTG GT
白细胞介素 1-F	GCC CAT CCT CTG TGA CTC AT
白细胞介素 1-R	AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG
白细胞介素 6-F	CCA CTG CCT TCC CTA CTT CA
白细胞介素 6-R	TTC TGA CAG TGC ATC ATC GC

表注: F 为正向, R 为反向。

1.4.6 Western Blot 检测蛋白表达 软骨细胞分组培养 48 h 后, RIPA 液裂解细胞并且进行超声破碎, 提取细胞蛋白。BCA 法测定细胞总蛋白浓度, 将蛋白样本与上样缓冲液混合, 100 °C 煮沸 10 min。制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 将蛋白样品加入上样孔中, 在 SDS-PAGE 中电泳分离 110 min, 再将蛋白电转至 PVDF 膜, 使用快速封闭液室温封闭 30 min 后, 4 °C 条件下过夜孵育一抗 (β-actin、环氧化酶 2、基质金属蛋白酶 9、基质金属蛋白酶 13, 稀释比例分别为 1 : 1 000-1 : 2 000)。TBST 洗涤 3 次, 室温孵育二抗 60 min (稀释比例为 1 : 5 000), 再用 TBST 洗涤 3 次, 使用 ECL 试剂盒进行显影并拍照。

1.4.7 免疫荧光检测 II 型胶原 α1 表达 将软骨细胞接种到 6 孔板中 (4×10⁵ 个 / 孔), 分组培养 24 h 后, 细胞约铺满每孔的 80%, 将培养基弃去, 用 PBS 清洗 3 次。加入免疫染色固定液固定 10 min, 免疫染色洗涤液清洗 3 次。使用免疫染色封闭液室温封闭 60 min。加入一抗 (II 型胶原 α1, 稀释比例为 1 : 200), 4 °C 孵育过夜。免疫染色洗涤液清洗 3 次, 加

入荧光二抗 (稀释比例为 1 : 700), 避光室温孵育 60 min。然后加入 DAPI 试剂标记细胞核, 避光 10 min。免疫染色洗涤液清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察拍照。

1.5 主要观察指标 ①软骨细胞增殖能力; ②软骨细胞形态改变; ③软骨细胞外基质的表达; ④软骨细胞内炎症因子和趋化因子水平; ⑤软骨细胞分解代谢基因的表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 25.0 进行统计学分析, 通过 GraphPad Prism 9 进行实验结果图像化展示。若计量资料服从正态分布, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内差异采用 LSD-*t* 检验。若资料不符合正态分布, 采用 Kruskal-Wallis 检验。实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。该文章的统计学方法已经上海中医药大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 正常人和骨关节炎患者血清凝血酶含量 正常人和骨关节炎患者性别和年龄等一般资料比较, 差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。ELISA 结果显示, 8 例正常人的血清凝血酶含量为 (34.90 ± 11.69) mg/L, 48 例骨关节炎患者血清凝血酶含量为 (447.58 ± 60.98) mg/L, 骨关节炎患者血清凝血酶含量显著高于正常人 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 正常人和骨关节炎患者一般资料及血清凝血酶水平比较

Table 2 | Comparison of general information and serum thrombin levels between healthy people and osteoarthritis patients

组别	<i>n</i>	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	男 / 女 (<i>n</i>)	凝血酶 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)
正常人	8	60.13 $\pm$ 4.65	4/4	34.90 $\pm$ 11.69
骨关节炎患者	48	60.33 $\pm$ 1.66	23/25	447.58 $\pm$ 60.98
<i>P</i> 值		> 0.05	> 0.05	< 0.000 1

2.2 软骨细胞形态 凝血酶组大鼠软骨细胞较对照组发生明显的形态学改变, 向纤维样细胞转变, 多为长梭形; 塞来昔布逆转了凝血酶诱导的软骨细胞形态改变, 见图 1。

2.3 软骨细胞增殖 Edu 标记软骨细胞两小时后, 检测 Edu 阳性细胞, 结果表明对照组 Edu 阳性细胞比例为 37%, 凝血酶组 Edu 阳性细胞比例为 50%, 塞来昔布组 Edu 阳性细胞比例为 23%, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 软骨细胞外基质中 II 型胶原 $\alpha 1$ 、聚集蛋白聚糖、弹性蛋白、软骨寡聚基质蛋白基因的表达 qRT-PCR 结果表明, 凝血酶下调软骨细胞中聚集蛋白聚糖、弹性蛋白、软骨寡聚基质蛋白基因 mRNA 的表达 (图 3A), 塞来昔布可显著抑制凝血酶的作用, 即上调这些基因的 mRNA 水平, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。细胞免疫荧光结果进一步表明, 塞来昔布干预可上调 II 型胶原 $\alpha 1$ 的表达 (图 3B), 抑制了凝血酶对软骨基质的降解作用。

2.5 软骨细胞中炎症因子和趋化因子的表达 qRT-PCR 检测结果表明, 凝血酶诱导软骨细胞中炎症因子 (白细胞介素 1、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α) 和趋化因子 (单核细胞趋化蛋白 2、单核细胞趋化蛋白 7、粒细胞趋化蛋白 6) 的 mRNA

表达水平上升, 塞来昔布可明显抑制上述炎症因子和趋化因子的表达, 组间表达差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.6 软骨细胞分解代谢基因的表达 Western Blot 检测软骨细胞中基质金属蛋白酶 13、基质金属蛋白酶 9 和环氧化酶 2 等蛋白的表达。结果表明, 相对于凝血酶组, 塞来昔布组基质金属蛋白酶 13、基质金属蛋白酶 9 和环氧化酶 2 的蛋白表达下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论 Discussion

软骨细胞是软骨组织中的唯一细胞, 负责合成和分泌软骨细胞外基质成分。骨关节炎发生时炎症因子大量表达, 导致软骨细胞外基质合成与基质降解动态失衡, 造成软骨细胞纤维化^[15]。近年来研究发现, 体内异常的凝血酶水平在阿尔茨海默症和动脉粥样硬化等疾病中可以刺激白细胞介素 1、白细胞介素 6 和单核细胞趋化蛋白 1 等因子的产生, 促进疾病的进展^[16-20]。作者发现骨关节炎患者血清中凝血酶含量高于正常人, 因此在体外进一步观察凝血酶是否影响软骨细胞增殖、形态改变、细胞外基质相关基因和炎性基因的表达。塞来昔布是临床常见抗炎药, 此次研究将观察塞来昔布是否通过调控凝血酶的作用而发挥抗炎功能。

当炎症反应发生时, 软骨细胞发生增殖和向纤维样细胞形态改变^[21]。作者发现凝血酶明显促进软骨细胞增殖, 且软骨细胞向纤维样细胞形态改变, 凝血酶此效应与白细胞介素 1 等炎症因子刺激后软骨细胞发生的改变相似^[22]。

软骨细胞外基质主要由 II 型胶原和蛋白聚糖构成, 二者分布于软骨组织并形成立体结构, 对细胞起到良好的保护作用^[23]。炎症条件促进软骨细胞外基质合成减少。此次研究中发现, 凝血酶下调了软骨细胞外基质中 II 型胶原 $\alpha 1$ 、聚集蛋白聚糖、弹性蛋白和软骨寡聚基质蛋白基因的表达。

在骨关节炎发生发展过程中, 炎症因子和趋化因子同样发挥了重要作用。白细胞介素 1 不仅可以刺激软骨细胞合成基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 9 和基质金属蛋白酶 13 等基质金属蛋白酶, 促进基质的降解; 还可以介导一氧化氮和白细胞介素 6 等基因的表达, 抑制蛋白多糖的合成和胶原的产生, 放大促炎作用^[24-27]。肿瘤坏死因子 α 具有破坏蛋白聚糖分解代谢平衡的作用, 其在细胞中的表达量与骨关节炎严重程度呈正相关。单核细胞趋化蛋白 1 和粒细胞趋化蛋白 2 可以诱导炎症因子的表达, 激活单核细胞和巨噬细胞向炎症部位的趋化作用, 参与炎症反应^[28-29]。此外, 环氧化酶 2 释放的前列腺素会促进基质金属蛋白酶表达, 加剧软骨损伤^[30-31]。此次实验结果显示, 凝血酶上调了软骨细胞中白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 和单核细胞趋化蛋白 3 等炎症因子以及基质金属蛋白酶 9、基质金属蛋白酶 13 和环氧化酶 2 等细胞外基质分解代谢基因表达。其中白细胞介素 1、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等在既往研究中已被证明是骨关节炎炎症反应中关键的炎症因子, 此次研究发现凝血酶显著促进上述因子的表达^[32-33]。

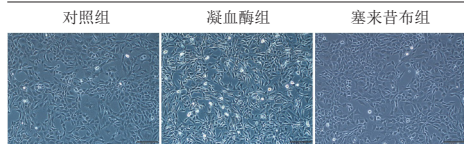
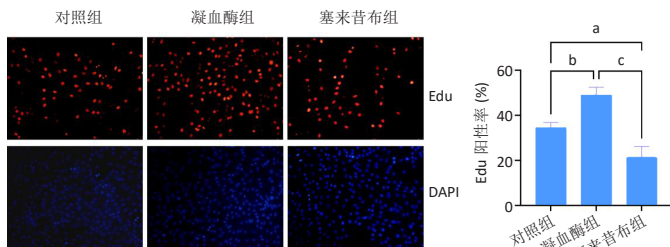


图 1 | 塞来昔布逆转凝血酶诱导的软骨细胞纤维样形态转变

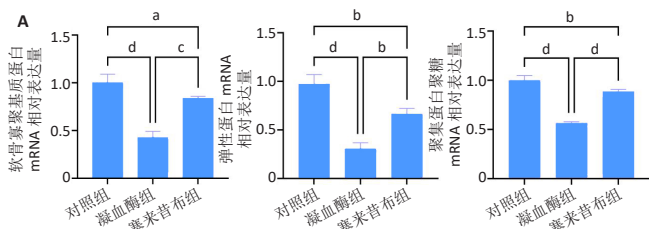
Figure 1 | Celecoxib reverses thrombin-induced fibroid transformation of chondrocytes



图注: ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$, ^c $P < 0.0001$ 。

图 2 | Edu 染色结果 (×100) 以及 Edu 阳性率

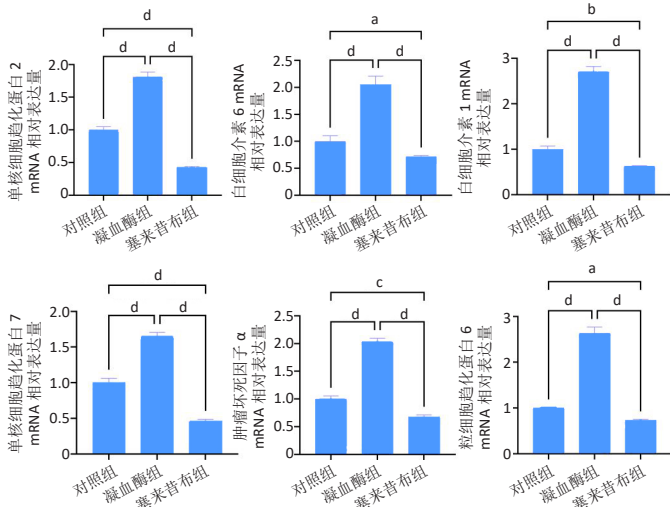
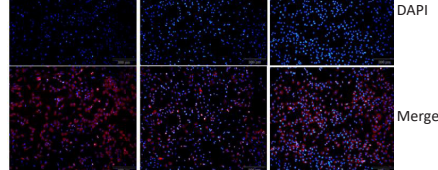
Figure 2 | The results of Edu staining (×100) and Edu positive rate



图注: 图 A 中, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.0001$ 。

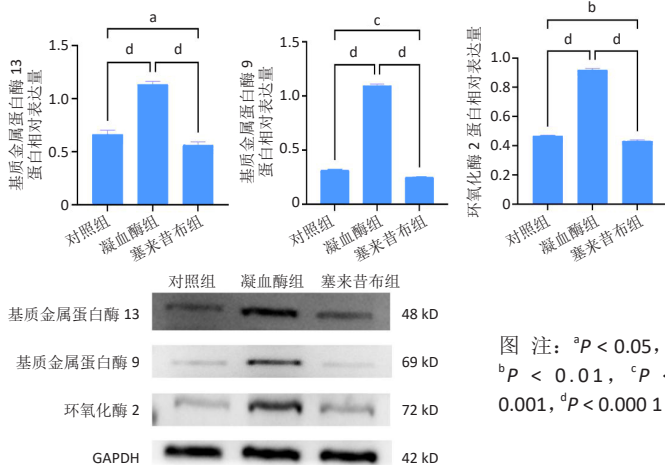
图 3 | 塞来昔布抑制凝血酶对软骨细胞基质的降解作用

Figure 3 | Celecoxib inhibits the degradation of chondrocyte matrix induced by thrombin



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.0001$ 。

图 4 | 塞来昔布抑制凝血酶诱导软骨细胞中炎症因子和趋化因子的表达
Figure 4 | Celecoxib inhibits the expression of inflammatory factors and chemokines in thrombin-induced chondrocytes



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.0001$ 。

图 5 | 塞来昔布抑制凝血酶诱导软骨细胞分解代谢基因的蛋白表达

Figure 5 | Celecoxib inhibits the expression of catabolic genes in thrombin-induced chondrocytes

综上所述,提示凝血酶在软骨细胞退变的发生发展过程中起着决定性的作用。既往文献显示塞来昔布通过显著降低骨关节炎患者体外软骨细胞和白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞中环氧化酶 2、前列腺素 E2、白细胞介素 6、基质金属蛋白酶等基因的表达,抑制细胞炎症反应^[34-35]。进一步机制研究发现,塞来昔布同样可明显抑制凝血酶的促软骨细胞增殖作用以及逆转纤维样形态改变,上调软骨细胞外基质基因的表达,下调炎症因子、趋化因子和分解代谢基因的表达。

此次实验分析了塞来昔布是否可以通过抑制凝血酶的促炎效应而发挥抗炎作用的机制,结果证实凝血酶的促炎作用体现在以下几个方面如促软骨细胞增殖、促分解代谢酶表达、促炎症因子表达和降解细胞外基质基因的表达,而塞来昔布在以上几个方面均发挥调控作用,提示塞来昔布可以抑制凝血酶的促炎作用,发挥抗炎作用。临床上患者长期服用塞来昔布可能增加消化不良、胃肠胀气和心肌梗死等疾病发生的风险。而凝血酶在骨关节炎患者血清中显著增加,同时在此次实验中证明是软骨炎症的关键性因子,因此凝血酶作为药物靶点筛选抗炎药成为一种可能。此研究的意义在于为骨关节炎治疗提供药物靶点,筛选出新药,从而治疗骨关节炎。

致谢:感谢上海中医药大学康复研究所,上海中医药大学附属曙光医院对此次实验的支持。

作者贡献:丁道芳、郑显新负责实验设计,朱志恒、丁佳滢、葛杨硕、黄春萌负责实验实施,沈军负责实验评估,王学宗负责资料收集。

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。

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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] MANDL LA. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(3):359-364.
- [2] YAO Q, WU X, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8(1):56.
- [3] MAEHARA M, TOYODA E, TAKAHASHI T, et al. Potential of Exosomes for Diagnosis and Treatment of Joint Disease: Towards a Point-of-Care Therapy for Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2666.
- [4] SHARMA L. Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med*. 2021;384(1): 51-59.
- [5] KOHLI P, STEG PG, CANNON CP, et al. NSAID use and association with cardiovascular outcomes in outpatients with stable atherothrombotic disease. *Am J Med*. 2014;127(1):53-60.
- [6] SCHJERNING OLSEN AM, GISLASON GH, MCGETTIGAN P, et al. Association of NSAID use with risk of bleeding and cardiovascular events in patients receiving antithrombotic therapy after myocardial infarction. *JAMA*. 2015;313(8):805-814.
- [7] ZHANG X, SHI Y, ZHANG Z, et al. Intra-articular delivery of tetramethylpyrazine microspheres with enhanced articular cavity retention for treating osteoarthritis. *Asian J Pharm Sci*. 2018;13(3): 229-238.
- [8] LIDDLE A D, JUDGE A, PANDIT H, et al. Adverse outcomes after total and unicompartmental knee replacement in 101,330 matched patients: a study of data from the National Joint Registry for England and Wales. *Lancet*. 2014;384(9952):1437-1445.
- [9] YANG Y, ZHANG M, KANG X, et al. Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice. *Behav Brain Funct*. 2015;11(1):30.
- [10] YE X, ZUO D, YU L, et al. ROS/TXNIP pathway contributes to thrombin induced NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis in microglia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485(2):499-505.
- [11] SCHAFFNER A, RHYN P, SCHOEDON G, et al. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1): 202-209.
- [12] SOKOLOVA E, GRISHINA Z, BÜHLING F, et al. Protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts mediates a negative feedback downregulation via prostaglandin E2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(5):L793-L802.
- [13] PULJAK L, MARIN A, VRDOLJAK D, et al. Celecoxib for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;5(5):Cd009865.
- [14] KRASSELT M, BAERWALD C. Celecoxib for the treatment of musculoskeletal arthritis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(14): 1689-1702.
- [15] RIM YA, NAM Y, JU JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2358.
- [16] VERSTEEG HH, HEEMSKERK JW, LEVI M, et al. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-358.
- [17] ROCHA AL, BIGHETTI-TREVISAN RL, DUFFLES LF, et al. Inhibitory effects of dabigatran etexilate, a direct thrombin inhibitor, on osteoclasts and osteoblasts. *Thromb Res*. 2020;186:45-53.
- [18] JABERI N, SOLEIMANI A, PASHIRZAD M, et al. Role of thrombin in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Cell Biochem Suppl*. 2019;120(4): 4757-4765.
- [19] BROWN C, BRANDT W, WANG TF, et al. Incidence of recurrent venous thromboembolism and bleeding complications in patients with cancer and isolated distal deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2023;228:81-84.
- [20] PRAKASH S, VERGHESE S, ROXBY D, et al. Changes in fibrinolysis and severity of organ failure in sepsis: a prospective observational study using point-of-care test--ROTEM. *J Crit Care*. 2015;30(2):264-270.
- [21] KUBO N, AWADA T, HIROSE N, et al. Longitudinal effects of estrogen on mandibular growth and changes in cartilage during the growth period in rats. *Dev Biol*. 2022;492:126-132.
- [22] NI Z, KUANG L, CHEN H, et al. The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocytes enhanced mature IL-1 β production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):522.
- [23] SALINAS D, MUMEY BM, JUNE RK. Physiological dynamic compression regulates central energy metabolism in primary human chondrocytes. *Biomech Model Mechanobiol*. 2019;18(1):69-77.
- [24] HOSSEINZADEH A, KAMRAVA SK, JOGHATAEI MT, et al. Apoptosis signaling pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin. *J Pineal Res*. 2016;61(4):411-425.
- [25] NA HS, PARK JS, CHO KH, et al. Interleukin-1-Interleukin-17 Signaling Axis Induces Cartilage Destruction and Promotes Experimental Osteoarthritis. *Front Immunol*. 2020;11:730.
- [26] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;44:38-50.
- [27] HU Q, ECKER M. Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1742.
- [28] LI L, JIANG BE. Serum and synovial fluid chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1 concentrations correlate with symptomatic severity in patients with knee osteoarthritis. *Ann Clin Biochem*. 2015; 52(Pt 2):276-282.
- [29] GOODE AP, SCHWARTZ TA, KRAUS VB, et al. Inflammatory, Structural, and Pain Biochemical Biomarkers May Reflect Radiographic Disc Space Narrowing: The Johnston County Osteoarthritis Project. *J Orthop Res*. 2020;38(5):1027-1037.
- [30] SHEN J, ABU-AMER Y, O'KEEFE RJ, et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2017;58(1):49-63.
- [31] JIANG W, JIN Y, ZHANG S, et al. PGE2 activates EP4 in subchondral bone osteoclasts to regulate osteoarthritis. *Bone Res*. 2022;10(1):27.
- [32] WIEGERTJES R, VAN DE LOO FAJ, BLANEY DAVIDSON EN. A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 59(10):2681-2694.
- [33] VERRICO CD, WESSON S, KONDURI V, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain*. 2020;161(9):2191-2202.
- [34] CHELESCHI S, TENTI S, GIANNOTTI S, et al. A Combination of Celecoxib and Glucosamine Sulfate Has Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effects: Results from an In Vitro Study on Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8980.
- [35] HAARTMANS MJJ, TIMUR UT, EMANUEL KS, et al. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effect of Celecoxib on Cartilage Ex Vivo and in a Rat Osteoarthritis Model. *Cartilage*. 2022; 13(3):19476035221115541.

(责任编辑: GD, ZN, WL, YJ)