

# 葛根异黄酮对软骨细胞中 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白表达的影响

郭涛, 袁慕荣, 林彩珍, 李颖, 魏人前, 曹占领

佛山市第二人民医院骨科中心, 广东 佛山 528000

**[摘要]** 目的: 探讨葛根异黄酮对软骨细胞中 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白表达的影响。方法: 采用酶消化原代细胞培养法建立人软骨细胞系, 同时检测软骨细胞增殖情况。取第 3 代对数生长期软骨细胞, 制备成单细胞悬液, 以  $1 \times 10^7$  孔的细胞密度接种于 96 孔板中。将细胞分为 4 组, 分别为对照组、10 ng/mL 组、20 ng/mL 组、40 ng/mL 组, 每组设 4 个复孔。对照组加 DMEM 培养基, 10 ng/mL 组、20 ng/mL 组、40 ng/mL 组分别加入含有 10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 葛根异黄酮的 DMEM 培养基。采用 Western Blotting 法检测各组软骨细胞中 p38、JNK、ERK 信号蛋白的表达情况。结果: 加入葛根异黄酮培养液后, 20 ng/mL 浓度的培养液可促进软骨细胞的增殖, 40 ng/mL 浓度的培养液开始抑制细胞的生长。与对照组比较, 20 ng/mL 组 p38 和 JNK 蛋白的表达显著降低, 40 ng/mL 组 p38 蛋白的表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 葛根异黄酮可以促进软骨细胞的增殖; 通过降低 MAPKs 信号通路中 p38、JNK 蛋白的表达从而发挥抗软骨退变的作用。

**[关键词]** 骨关节炎; 葛根异黄酮; 软骨细胞; 信号蛋白; 细胞实验

**[中图分类号]** R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 09-0005-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.09.002

## Kudzu Root Isoflavones Can Decrease the Expressions of Signal Protein p38 and JNK and ERK

GUO Tao, YUAN Murong, LIN Caizhen, LI Ying, WEI Renqian, CAO Zhanling

**Abstract:** **Objective:** To discuss the effect of kudzu root isoflavones on the expressions of signal protein p38, JNK and ERK in chondrocyte. **Methods:** Used the method of culturing primary cells with enzyme digestion to establish human chondrocyte cell lines, and detected the chondrocyte proliferation. Chondrocyte of the third passage in logarithmic growth phase were made into single cell suspension and were inoculated in 96-well plates with the density of  $1 \times 10^7$  cell/mL. Divided all the cells into four groups, namely the control group, 10 ng/mL group, 20 ng/mL group, and 40 ng/mL group, each group being set with four parallel holes. The control group was added with DMEM culture media, while 10 ng/mL group, 20 ng/mL group and 40 ng/mL group were added with DMEM culture media containing kudzu root isoflavones of 10 ng/mL, 20 ng/mL and 40 ng/mL dosages. Western Blotting method was adopted to determine the expressions of signal protein p38, JNK and ERK in chondrocyte in each group. **Results:** After the addition of kudzu root isoflavones into culture media, the culture media of 20 ng/mL dosage promoted chondrocyte proliferation, while the culture media of 40 ng/mL dosage started to inhibit the chondrocyte proliferation. Comparing with that in the control group, the expressions of protein p38 and JNK were significantly reduced in 20 ng/mL group, and expression of protein p38 was obviously declined in 40 ng/mL group, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Kudzu root isoflavones can promote chondrocyte proliferation. It prevents cartilage degeneration by decreasing the expressions of protein p38 and JNK in MAPKs signal pathway.

**Keywords:** Osteoarthritis; Kudzu root isoflavones; Chondrocyte; Signal protein; Cell experiment

现代医学认为骨关节炎的发病是多种因素作用的结果, 在各种因素作用下, 其最终途径是一系列的细胞因子通过信号传导通路引起关节软骨退行性改变<sup>[1]</sup>。其中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPKs) 途径是细胞应激

和损伤反应的主要信号通路, 该通路信号的改变对关节软骨细胞的增殖与凋亡起到重要的影响<sup>[2]</sup>。本研究观察葛根异黄酮对软骨细胞的调控作用, 探讨葛根异黄酮干预软骨细胞 MAPKs 通路中的 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白的作用机制, 为研究中

**[收稿日期]** 2017-01-12

**[基金项目]** 佛山市卫生局科技项目 (201308023)

**[作者简介]** 郭涛 (1968-), 男, 副主任医师, 主要从事骨科疾病研究。

药单体成分治疗骨关节炎提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 软骨细胞的培养** 软骨细胞培养所需的关节软骨取自本院行膝关节骨关节炎人工膝关节置换术的患者。患者对实验方案知情同意,并得到医院伦理委员会的批准。选取经外科手术切除的关节软骨,在无菌条件下将其剪成 0.5 mm × 0.5 mm 大小碎片, PBS 冲洗 3 次后,置入盛有 10 mL 0.2% II 型胶原酶的消化瓶,放于 37℃ 恒温水浴消化伴振荡,每隔 45 min 取上清,离心沉淀收集细胞,并更换消化液继续消化。所收集细胞重悬于 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清,维生素 C 50 μg/mL 和青、链霉素各 100 U/mL),按一定密度接种于培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,隔天换液。细胞生长至快融合时(约 85%),将第 1 代软骨细胞传代至 6 孔板,每孔接种 1.0 × 10<sup>5</sup> 个细胞,用于后续实验。

**1.2 试剂和仪器** 葛根异黄酮,源自野葛,购自广东省药材公司,提取方法参照文献[3],85% 乙醇冷浸提取,大孔树脂纯化,使用时用 70% 分析纯酒精溶解。DMEM 低糖培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。细胞恒温培养箱(美国 Thermo SCIENTIFIC 公司),洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),冷冻台式离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),光学倒置显微镜(奥林巴斯株式会社),紫外光栅分光光度计(上海第 H 分析仪器厂)。

**1.3 细胞分组及给药** 取第 3 代对数生长期软骨细胞,制备成单细胞悬液,以 1 × 10<sup>7</sup> 孔的细胞密度接种于 96 孔板中,将葛根异黄酮用 70% 分析纯酒精溶解,并用细胞培养基稀释成终浓度分别为 10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL;在细胞接种 24 h 后,加入含上述不同浓度药液的细胞培养基,每个剂量组设 4 个复孔,同时设置不加葛根异黄酮培养的软骨细胞作为对照组。软骨细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度孵育箱内培养。培养 30 min 后换液 1 次。此后每 3 天换液 1 次,方法同第 1 天,在第 7 天时终止培养。

**1.4 细胞的增殖检测** 采用四甲基偶氮唑盐法(MTT 法)测定。培养 5 天后,每孔加 MTT 溶液(5 mg/mL 用 PBS 配制,pH=7.4)20 μL,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min,37℃ 水浴 2 h,选择 450 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

**1.5 蛋白的检测** 采用 Western blotting 法检测各组 ERK、JNK、p38 蛋白的表达情况。首先收集蛋白样品,经过处理完毕的细胞用冷的 PBS 冲洗 2 次,每个孔加入细胞裂解液,充分作用后放置冰上;用小刮匙将裂解物刮下,收集入 EP 管中,为确保每个蛋白样品的上样量一致,最后测定每个蛋白样品的蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳:在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。加入缓冲液,

100℃ 或沸水浴加热,以充分变性蛋白。冷却到室温后,把蛋白样品直接上样 SDS-PAGE 胶加样孔。电泳一般使用低电压恒压电泳。转膜与封闭:选用的是 PVDF 膜,使用 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置,设定转膜时间为 90 min,转膜完毕后,立即把蛋白膜放置到蒸馏水中,漂洗 1~2 min,以洗去膜上的转膜液。一抗及二抗孵育:参考一抗及二抗的试剂说明书,按照适当比例分别用 Western 一抗稀释液稀释一抗;用 Western 二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。最后应用软件对条带进行定量分析。

**1.6 统计学方法** 用 SPSS16.0 统计软件包进行分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,先进行正态性分析,符合要求后各组间差异分别采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 各浓度组软骨细胞增殖比较** 见表 1。加入葛根异黄酮培养液后,20 ng/mL 浓度的培养液可促进软骨细胞的增殖,40 ng/mL 浓度的培养液开始抑制细胞的生长。

表 1 各浓度组软骨细胞增殖比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组 别	24 h	48 h
对照组	0.255 ± 0.047	0.269 ± 0.068
10 ng/mL 组	0.275 ± 0.059	0.282 ± 0.058
20 ng/mL 组	0.316 ± 0.019 <sup>①</sup>	0.369 ± 0.037 <sup>①</sup>
40 ng/mL 组	0.263 ± 0.039	0.266 ± 0.046

与对照组比较,①P < 0.05

**2.2 各浓度组软骨细胞中 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白表达比较** 见表 2。与对照组比较,20 ng/mL 组 p38 和 JNK 蛋白的表达显著降低,40 ng/mL 组 p38 蛋白的表达显著降低,差异均有统计学意义(P < 0.05)。

表 2 各浓度组软骨细胞中 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组 别	p38	JNK	ERK
对照组	0.032 ± 0.007	0.161 ± 0.048	0.360 ± 0.008
10 ng/mL 组	0.035 ± 0.009	0.152 ± 0.078	0.332 ± 0.018
20 ng/mL 组	0.016 ± 0.005 <sup>①</sup>	0.069 ± 0.047 <sup>①</sup>	0.369 ± 0.037
40 ng/mL 组	0.023 ± 0.008 <sup>①</sup>	0.141 ± 0.094	0.331 ± 0.040

与对照组比较,①P < 0.05

## 3 讨论

骨关节炎的病因及发病机制尚不完全清楚,病理学特征是关节软骨损伤,发病中心环节是关节软骨退行性改变<sup>[4]</sup>,目前已经证实关节软骨的退变和骨关节炎的病程中,MAPKs 参与的信号转导通路发挥了重要的作用。MAPKs 级联是细胞内广泛存在的丝/苏氨酸蛋白激酶超家族,是将细胞质的信号传递至细胞核并引起细胞核发生变化的重要物质。目前已鉴定了 4 条 MAPK 通路:①细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular

signal-regulated kinase, ERK1/2)通路; ②c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK), 又称应激活化蛋白激酶通路; ③p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)通路; ④细胞外信号调节激酶 5 (extracellular-regulated kinase 5, ERK5)通路。人们在研究酪氨酸激酶的底物时检测到 ERK1/ERK2 属于丝裂原激活的酪氨酸磷酸化蛋白, 故 MAPK/ERK 通路属于丝裂原激活的 MAPK 通路, 而其他 3 条均属于应激激活 MAPK 通路。

ERK 被认为是一种增殖、转化和分化的 MAPKs<sup>[6]</sup>。在未受刺激的细胞中, ERK1/2、ERK1、ERK2 都位于胞质内, 一旦被激活, ERK1/2 则移位于细胞核, 并通过磷酸化反应调节某些转录因子的活性如核因子 NF- $\kappa$ B 等, 最终调节细胞代谢和功能, 并影响细胞产生特定的生物学效应<sup>[6]</sup>。p38MAPK 是哺乳动物 MAPKs 信号通路中的一条经典途径。Sheth K 等<sup>[7]</sup>认为, 抑制 p38 通路的同时可加强 ERK 的激活, 导致凋亡延迟。JNK 是一种应激激活的蛋白激酶, 在细胞应激反应中起重要作用, 并被多种细胞外应激信号激活。Yang X 等<sup>[8]</sup>认为 MAPKs 信号转导通路参与了软骨细胞表型的表达, 在软骨细胞中, MAPKs 信号通路对转化生长因子- $\beta$  蛋白, 特别是骨形态发生蛋白的反应中发挥关键的作用。Fan Z 等<sup>[9]</sup>研究表明, 骨关节炎患者软骨内磷酸化 p38 含量较正常组织明显升高。因此, 阻断 MAPKs 信号通路的活化是延缓 OA 关节软骨退变的方法之一。

已知骨关节炎的发生和发展与雌激素水平下降有关, Breu A 等<sup>[10]</sup>研究后认为雌激素可以延缓软骨细胞和骨髓间质干细胞的老化。虽然雌激素的效果较好, 但其副作用也大, 因此逐渐被淘汰。为此, 研究者开始寻找雌激素的替代物, 葛根异黄酮是其中的一种, 它属于植物雌激素, 是中药葛根的提取物。本研究采用葛根异黄酮干预软骨细胞中 p38、JNK 和 ERK 信号蛋白, 发现在合适的浓度下, 可以促进软骨细胞的增殖, 而且 p38 蛋白水平在 20 ng/mL 和 40 ng/mL 的浓度下最为明显, JNK 蛋白水平则在 20 ng/mL 的浓度下最为明显, 但 ERK 在各种的浓度下与对照组比较未见明显的差异, 初步表明葛根异黄酮通过降低 p38、JNK 蛋白的表达而发挥抗软骨破坏的作用。

### [参考文献]

- [1] Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced activation of MKK-3, p38 $\alpha$ -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(5): R195.
- [2] Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation--divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(3): 279-288.
- [3] 张梦军, 吴世容, 李志良. 几种提取葛根异黄酮的方法比较及实验优化 [J]. *中成药*, 2005, 27(10): 1133-1135.
- [4] Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2006, 85(11 Suppl): S2-11.
- [5] Julien M, Magne D, Masson M, et al. Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 530-537.
- [6] Priyanka HP, Bala P, Ankisetipalle S, et al. Bacopa monnieri and L-deprenyl differentially enhance the activities of antioxidant enzymes and the expression of tyrosine hydroxylase and nerve growth factor via ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B pathways in the spleen of female wistar rats [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(1): 141-152.
- [7] Sheth K, Friel J, Nolan B, et al. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase increases lipopolysaccharide induced inhibition of apoptosis in neutrophils by activating extracellular signal-regulated kinase [J]. *Surgery*, 2001, 130(2): 242-248.
- [8] Yang X, Chen L, Xu X, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(1): 35-46.
- [9] Fan Z, Söder S, Oehler S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(3): 938-946.
- [10] Breu A, Sprinzing B, Merkl K, et al. Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(10): 1563-1571.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)