

- 基在结核分枝杆菌药敏检测中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17): 3917-3919.
- [10] 初乃惠. 应重视耐药结核病的规范化诊治[J]. 中国临床医生, 2013, 41(3): 1-3.
- [11] 陈丹, 刘光陵, 吴雪琼. 具有抗结核作用中药及其成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 128-131.
- [12] 李思阳, 季兴跃, 李卓荣. 抗结核中药有效成分研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(10): 725-729.
- [13] 郝风芹, 李娜. 洋葱总黄酮对糖尿病大鼠丙二醛与超氧化物歧化酶的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(9): 838-840.
- [14] 李敏, 何阳. 洋葱中黄酮类物质的提取及抗氧化作用研究[J]. 光谱实验室, 2013, 30(6): 2951-2954.
- [15] 邵世峰, 刘雪萍, 孙婉蓉, 等. 黄芩苷对结核分枝杆菌抑菌作用的初步研究[J]. 天津医药, 2012, 40(8): 763-765.
- [16] Gan H, Lee J, Ren F, et al. Mycobacterium tuberculosis bLocks crossLinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence[J]. Nat Immunol, 2008, 9(10): 1189-1197.
- [17] 刘艳华, 王若, 俞珊, 等. 活动性肺结核患者单核来源巨噬细胞极化能力的研究[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(24): 1841-1845.
- [18] 陈吉, 殷玉和, 李玲玲, 等. 合成多肽对结核分枝杆菌的胞内抑制作用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 222-227.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

四妙散调节软骨细胞凋亡与自噬治疗 膝骨关节炎大鼠的实验研究

沈金明, 封蕾, 陈杰, 吴煜, 于建农

浙江中医药大学附属第一医院骨伤科, 浙江 杭州 310018

[摘要] 目的: 通过膝骨关节炎大鼠模型研究四妙散调节软骨细胞凋亡与自噬治疗膝骨关节炎(KOA)大鼠的作用机制。方法: 8周龄SD大鼠27只, 随机分为正常对照组、KOA模型组、四妙散组, KOA模型组和四妙散组采用前交叉韧带切除法制作KOA模型, 手术6周后四妙散组以四妙散药液灌胃, 正常对照组和KOA模型组以生理盐水灌胃。连续灌胃4周后取膝关节软骨组织, 采用Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术测定凋亡细胞所占比例, 采用荧光定量PCR检测关节软骨组织中凋亡和自噬相关基因表达水平。结果: 与正常对照组比较, KOA模型组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著升高, 关节软骨细胞中凋亡相关蛋白Fadd、Casp3的表达显著升高, 自噬相关蛋白LC3的表达显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与KOA模型组比较, 四妙散组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著降低, 关节软骨细胞中凋亡相关蛋白Fadd、Casp3的表达显著降低, 自噬相关蛋白LC3的表达显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 软骨细胞凋亡是KOA发病中的重要因素, 该凋亡可能通过FADD-CASP3途径发挥作用。软骨细胞自噬作用的激活可抑制细胞凋亡, 可能是延缓及控制KOA进展的一个新机制, 四妙散可能通过该机制发挥治疗作用。

[关键词] 四妙散; 膝骨关节炎; 细胞凋亡; FAS相关死亡结构域蛋白(Fadd); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Casp3); 自噬相关基因Beclin 1(Becln 1); 微管相关蛋白1轻链3(LC3); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R684.3; R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 09-0012-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.09.004

[收稿日期] 2017-03-03

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(2017ZQ013); 浙江省医药卫生科技项目(2017KY501); 浙江中医药大学科研基金项目(2015ZY15)

[作者简介] 沈金明(1980-), 男, 主治医师, 研究方向: 骨关节炎的发病机理及诊治。

Simiao Powder Can Regulate Apoptosis and Autophagy in KOA Rats

SHEN Jinming, FENG Lei, CHEN Jie, WU Yu, YU Jiannong

Abstract: **Objective:** To study regulation effect of Simiao powder on apoptosis and autophagy in knee osteoarthritis (KOA) rat models. **Methods:** Selected 27 SD rats of 8 week old, and divided them into normal control group, KOA model group and Simiao powder group randomly. Anterior cruciate ligament (ACL) resectional therapy was applied to the KOA model group and Simiao powder group to establish KOA model. Six weeks after operation, Simiao powder group was given herb liquor of Simiao powder by gavage, while the normal control group and KOA model group were given saline by gavage. Knee joint cartilage tissue was taken after continuous gavage for four weeks. Detected proportion of apoptotic cell with Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry, and detected expression level of apoptosis and autophagy related gene in joint cartilage tissue with fluorescence quantitative PCR. **Results:** Compared with normal control group, apoptosis rate of chondrocytes of KOA model group was increased significantly, and expression of FAS-associated death domain (Fadd) and caspase-3 (Casp3) in joint cartilage tissue was increased significantly, while expression of autophagy associated protein 1 light chain 3 was decreased significantly, differences being significant ($P < 0.05$). Compared with KOA model group, apoptosis rate of chondrocytes in Simiao powder group was decreased significantly, and expression of Fadd and Casp3 in joint cartilage tissue was decreased significantly, while expression of autophagy associated protein 1 light chain 3 was increased significantly, differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Apoptosis of chondrocytes is one of the major causes of KOA, which may work by FADD-CASP3 pathway. Activation of autophagocytosis of chondrocytes may inhibit apoptosis, and it may be a new mechanism that Simiao powder functions for delaying and controlling the progression of KOA.

Keywords: Simiao powder; Knee osteoarthritis (KOA); Apoptosis; FAS-associated death domain (Fadd); Caspase-3 (Casp3); Autophagy related gene beclin 1; Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3); Animal experiment; Rat

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)表现为膝关节的关节软骨变性,骨质增生,是现代社会最常见的退行性关节疾病。随着社会老龄化和肥胖发生率的增加,骨性关节炎发病率逐年上升^[1]。软骨细胞的死亡和细胞外基质的丢失是骨性关节炎(osteoarthritis, OA)关节软骨退变的重要特征。关节软骨细胞合成、分泌细胞外基质,其凋亡在OA发病中起关键作用^[2]。2014年荷兰的大样本研究发现,OA患者血细胞中凋亡信号通路的一系列基因表达增高,包括FAS相关死亡结构域蛋白(FAS-associated death domain, FADD)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3)^[3],再次强调了软骨细胞凋亡在OA发病机制中的重要性。在面对生存环境的压力时,细胞倾向于通过自噬使自身适应环境压力并存活下来,凋亡作用通常受到抑制^[4-5]。研究发现,软骨细胞中的自噬对正常软骨细胞有保护作用,提高软骨细胞自噬水平可缓解骨关节炎病情^[6-7]。四妙散原载于清代张秉成《成方便读》,是治疗膝骨关节炎的经典方剂之一,疗效确切,其作用机理尚不清楚。鉴于凋亡与自噬在KOA发病中的关键作用,四妙散可能通过调节关节软骨细胞的凋亡与自噬过程发挥疗效。本研究拟建立KOA大鼠模型并采用四妙散治疗,比较模型大鼠软骨组织中软骨细胞凋亡水平和凋亡指标的变化,以及软骨组织自噬相关基因的变化,从而探索四妙散治疗KOA的分子机制,为四妙散在KOA中的临床应用提供新的

理论依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 8周龄健康雄性SD大鼠27只,由浙江大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK浙2014-0001,体质量280~300g,在恒温恒湿环境中标准饲料喂养,自由饮水。

1.2 药物与试剂 四妙散组成:苍术、薏苡仁、牛膝各10g,黄柏6g,由浙江中医药大学附属第一医院药房提供,称重加水配制成药液浓度为1g/mL的溶液。Real-time PCR试剂盒(TAKARA公司);Tali® Apoptosis Kit(美国Life technologies公司)。

1.3 实验仪器 紫外可见光自动分光光度仪(美国Beckman公司);ABI7900实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司);流式细胞仪(美国Beckman公司);低温高速离心机(美国Eppendorf公司)。

1.4 造模与分组 27只大鼠随机分为正常对照组、KOA模型组、四妙散组,每组9只。KOA模型组和四妙散组采用前交叉韧带切除法制作KOA模型,具体造模方法参照文献[8],6周后每组取1只病理组织切片确认造模效果,其余每组8只继续喂养。此后每天灌胃1次,四妙散组以10g/(kg·d)的剂量给予四妙散药液3mL灌胃,正常对照组和模型组以等量生理盐水灌胃。连续灌胃4周后处死大鼠,切取膝关节胫骨平

台内侧髌和股骨内侧髌全部软骨组织,标本冻存于 -80°C 冰箱。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 采用膜联蛋白 V 荧光素标记联合 PI 法(Annexin V-FITC/PI)进行凋亡细胞双染,流式细胞仪定量测定细胞凋亡率。取关节软骨组织, PBS 漂洗, 0.25% 胰酶消化 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 100 μL Annexin V-FITC 结合缓冲液, 加入 5 μL Annexin-V-FITC, 混匀后避光孵育, 再次重悬于 100 μL Annexin V-FITC 结合缓冲液, 加入 1 μL PI, 混匀, 采用流式细胞仪定量测定细胞凋亡率。Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

结果判定: 正常活细胞 FITC 及 PI 均低染(FITC-/PI-), 分布在流式细胞分析图的左下区(LL); 早期凋亡细胞 FITC 高染而 PI 低染(FITC+/PI-), 分布在图的右下区(RL); 晚期凋亡细胞 FITC 及 PI 均高染(FITC+/PI+), 分布在图的右上区(RU)。早期凋亡细胞百分数和晚期凋亡细胞百分数之和, 即 RL 和 RU 之和为细胞总凋亡率(%)。

1.6 总 RNA 提取和逆转录 将保存的膝关节软骨组织放入研钵中, 加入少量液氮, 迅速研磨, 加入 1 mL Trizol, 吹打均匀, 转移至 RNase free 离心管中, 室温放置 5 min, 离心 10 min, 吸取上清液, 加入 200 μL 氯仿, 加盖后剧烈震荡 30 s, 室温放置 5 min, 离心 15 min 后混合物分为 3 层, 上层水相转移至新的 RNase free 离心管, 加入 500 μL 异丙醇, 加盖上下颠倒混匀, 室温放置 10 min, 离心 10 min, 弃上清, 加入 75% 乙醇 1 mL, 离心 5 min, 弃上清, 空气中干燥后加入 free 水 20 μL 溶解 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA, OD260/OD280=1.8~2.0, 1% 变性琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 18S 和 28S 两条带, 计算 RNA 浓度。

取 10 μg 总 RNA, 加入 10 \times DNase I Buffer 1 μL , DNase I 0.4 μL , 加 free 水至 10 μL , 室温孵育 30 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 去除基因组 DNA。5 \times PrimeScript Buffer 4 μL , Oligo dT primer 1 μL , Random 6 primers 1 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL , RNase Free 水 12 μL , 加入反应液 1 μL 。反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec。

1.7 荧光定量 PCR 检测 Fadd、Casp3、Becn1、LC3 mRNA 的表达 检测 Fadd、Casp3、自噬相关标志蛋白 Becn1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的 mRNA 表达。PCR 引物序列通过 Primer5 设计, 详见表 1。10 μL PCR 反应体系组成包括: 2 \times SYBR Premix Ex Taq 5 μL , PCR Forward Primer 0.4 μL , PCR Reverse Primer 0.4 μL , ROX II 0.2 μL , cDNA 1 μL , RNase free 水 3 μL 。以灭菌水代替 cDNA 作空白对照。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 sec; 热循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec, 62 $^{\circ}\text{C}$ 34 sec (共 40 个循环)。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因的相对表达量^[9]。

1.8 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 检

验, 有显著性差异时采用 Tukey 两两检验。

表 1 荧光定量 PCR 引物

基因	引物 Forward(5'-3')	引物 Backward(5'-3')	GenBank	产物(bp)
Fadd	CTGGGCAGACACGACCTA	TGGCCTCAGACACCTTCA	NM_152937.2	166
Casp3	GCCGAAACTCTTCATCAT	GGCCTCCACTGGTATCTT	NM_012922.2	112
Becn1	GTCCTGACAGACAAATCTAA	CAATCTTGCCCTTCTCCAC	NM_053739.2	191
LC3	CTTCGCCGACCGCTGTAA	GCGCCGATGATCTTGAC	NM_199500.2	172
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCTGACTCTGCTTGTG	NM_031144.3	150

2 结果

2.1 各组大鼠关节软骨细胞凋亡比较 见表 2。与正常对照组比较, KOA 模型组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 KOA 模型组比较, 四妙散组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠关节软骨细胞凋亡比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	凋亡率
正常对照组	9	17.55 \pm 5.78
KOA 模型组	9	28.28 \pm 6.85 ^①
四妙散组	9	20.38 \pm 4.80 ^②

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 KOA 模型组比较, ② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠凋亡及自噬相关基因表达比较 见表 3。与正常对照组比较, KOA 模型组大鼠关节软骨细胞中凋亡相关蛋白 Fadd、Casp3 的表达显著升高, 自噬相关蛋白 LC3 的表达显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 KOA 模型组比较, 四妙散组大鼠 Fadd、Casp3 的表达显著降低, LC3 的表达显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠凋亡及自噬相关基因表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fadd mRNA	Casp3 mRNA	Becn1 mRNA	LC3 mRNA
正常对照组	9	1.00 \pm 0.25	1.00 \pm 0.28	1.00 \pm 0.41	1.00 \pm 0.31
KOA 模型组	9	1.98 \pm 0.43 ^①	2.34 \pm 0.61 ^①	0.66 \pm 0.35	0.50 \pm 0.09 ^①
四妙散组	9	1.11 \pm 0.19 ^②	1.19 \pm 0.33 ^②	1.04 \pm 0.34	1.08 \pm 0.26 ^②

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 KOA 模型组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

膝骨性关节炎的发病机制相当复杂, 目前具体病因和病理机制尚未明确。关节软骨细胞合成、分泌细胞外基质, 近年来大量证据表明, 软骨细胞的凋亡参与骨关节炎的发生, 凋亡信号通路可引起关节软骨退变, 从而引发关节功能的丧失^[2,10,11]。如肿瘤坏死因子(TNF- α)和促炎细胞因子 IL-1 β 可降低软骨细胞的合成代谢, 调控软骨细胞中 PGE2 和 caspase8 的表达, 诱导软骨细胞凋亡通路激活, 导致 OA 的发生^[12]。本研究证实,

KOA 大鼠关节软骨细胞的凋亡水平较正常组显著增高, 伴随凋亡蛋白 Fadd 和 Casp3 表达显著增高, 提示软骨细胞凋亡是 KOA 发病中的重要因素, 该凋亡可能通过 FADD-CASP3 途径发挥作用。

四妙散组方精巧, 苍术燥湿健脾, 祛风散寒; 黄柏清热燥湿, 补肾壮骨; 牛膝补肝肾强筋骨, 且引药下行; 薏苡仁祛湿热而利筋络。兔膝关节炎模型研究显示, 四妙散可以抑制炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 有效抑制炎症反应^[13]; 加味四妙散可下调 IL-6 的表达, 上调碱性成纤维细胞因子(bFGF)的表达, 从而减轻软骨基质的降解^[14]。

该实验结果发现, KOA 大鼠关节软骨中自噬相关基因 LC3 表达较正常对照组大鼠降低, 四妙散治疗可恢复自噬相关基因表达水平, 从而下调关节软骨细胞凋亡水平。目前研究认为, 细胞自噬不同于细胞的凋亡与坏死, 可抑制受损软骨细胞凋亡, 可能是软骨细胞自我保护的重要机制之一。有研究报道, 在关节炎软骨细胞中, Becn1 和 LC3 的表达较正常软骨细胞表达减少, 其相关凋亡信号因子表达增加^[6]。雷帕霉素可增强关节软骨细胞的自噬活性, 从而阻止小鼠膝关节炎中软骨细胞死亡, 减轻骨关节炎严重程度^[7]。骨关节炎大鼠的研究也提示在 OA 大鼠中自噬通路受到抑制, 可能参与 OA 软骨的病变^[8]。以上研究均提示软骨细胞自噬作用的激活可能抑制细胞凋亡, 可能是延缓及控制 KOA 进展的一个新机制, 四妙散可能通过该机制发挥治疗作用。

[参考文献]

- [1] Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [J]. *Lancet*, 2011, 377(9783): 2115-2126.
- [2] Battistelli M, Salucci S, Olivotto E, et al. Cell death in human articular chondrocyte: a morpho-functional study in micromass model [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(10): 1471-1483.
- [3] Beyer C, Zampetaki A, Lin NY, et al. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(3): e18.
- [4] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-752.
- [5] Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 280-293.
- [6] 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 [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 791-801.
- [7] Carames B, Hasegawa A, Taniguchi N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4): 575-581.
- [8] 王婧, 张忠辉, 孙娇梦, 等. 大鼠骨关节炎三种动物模型的建立及比较 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(3): 456-460.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Takayama K, Kawakami Y, Lee S, et al. Involvement of ERCC1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of apoptosis and cellular senescence [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(10): 1326-1332.
- [11] Wang F, Wu L, Li L, et al. Monotropein exerts protective effects against IL-1 β -induced apoptosis and catabolic responses on osteoarthritis chondrocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 575-580.
- [12] Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(7): 660-669.
- [13] 李慧英, 孟东方, 苏建光. 四妙散干预兔膝关节创伤性滑膜炎白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 水平的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(10): 3043-3045.
- [14] 赵鹏飞, 汪利合, 李慧英, 等. 加味四妙散对兔膝关节炎 il-6 和 bfgf 的影响 [J]. *中医学报*, 2015, 30(8): 1166-1169.
- [15] 阮丽萍, 刘健, 葛瑶, 等. 骨关节炎大鼠软骨 PI3K/Akt-mTOR 及 Beclin-1 自噬通路的表达及相关性分析 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2015, 44(4): 429-433, 439.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)