

● 实验研究 ●

引用:陈浩雄,霍少川,马笃军,徐启良,黄学成,林新珍,徐宁达.牛膝总皂苷体外干预人膝骨关节炎软骨细胞Ⅱ型胶原表达及最佳浓度的实验研究[J].湖南中医杂志,2021,37(7):141-144.

牛膝总皂苷体外干预人膝骨关节炎软骨细胞Ⅱ型胶原表达及最佳浓度的实验研究

陈浩雄¹,霍少川¹,马笃军²,徐启良¹,黄学成¹,林新珍¹,徐宁达¹

[1. 广州中医药大学深圳医院(福田),广东 深圳,518034;

2. 深圳市中医院,广东 深圳,518033]

[摘要] 目的:观察牛膝总皂苷(TSA)体外干预人膝骨关节炎软骨细胞增殖及Ⅱ型胶原(CollagenⅡ)表达水平及最佳浓度。方法:将人膝骨关节炎软骨细胞进行分离、培养、鉴定,并将其分为6组,分别为0、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/ml组。制备TSA存储液及6组不同TSA浓度DMEM/F12(D/F12)培养基,分别用6组培养基对P3代软骨细胞培养并进行细胞形态学观察;采用CCK-8法检测软骨细胞P1、P2、P3传代增殖情况,观察其生长曲线;采用Western-blot法检测P3代软骨细胞CollagenⅡ蛋白表达、RT-PCR法检测CollagenⅡ mRNA表达。结果:软骨细胞体外分离并培养成功,经甲苯胺蓝染色鉴定细胞为软骨细胞来源;CCK-8法绘制的生长曲线符合Logistic生长曲线规律,P3代软骨细胞增殖速度高于P1、P2代;Western-Blot法检测结果显示,CollagenⅡ蛋白表达量浓度为0.5 mg/ml时达最高,RT-PCR法检测结果显示,各组浓度AST能促进软骨组织Ⅱ型胶原mRNA表达上调,以0.5 mg/ml组最明显($P<0.05$)。结论:TSA能体外有效促进软骨细胞增殖和Ⅱ型胶原mRNA表达上调,以0.5 mg/ml浓度最明显,具有促进软骨修复的作用,具体作用机制有待进一步研究。

[关键词] 膝骨关节炎;软骨细胞;牛膝总皂苷;体外干预;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.07.050

In vitro intervention and optimal concentration of total saponins from *Achyranthis Bidentatae* Radix on the expression of type II collagen in chondrocytes of human knee osteoarthritis

CHEN Haoxiong¹, HUO Shaochuan¹, MA Dujun², XU Qiliang¹, HUANG Xuecheng¹,
LIN Xinzheng¹, XU Ningda¹

[1. Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, Guangdong, China;

2. Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong, China]

[Abstract] Objective: To investigate the in vitro intervention and optimal concentration of total saponins from *Achyranthis Bidentatae* Radix (TSA) on the expression of type II collagen (Collagen II) in chondrocytes of human knee osteoarthritis. Methods: Chondrocytes of human knee osteoarthritis were isolated, cultured, identified, and then divided into 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, and 1 mg/ml groups. TSA stock solution and DMEM/F12 medium with the above six concentrations of TSA were prepared for the culture of P3 chondrocytes, and cell morphology was observed; CCK-8 assay was used to observe the passage and proliferation of P1, P2, and P3 chondrocytes and their growth curves; Western blot was used to measure the protein expression of collagen II in P3 chondrocytes, and RT-PCR was used to measure the mRNA expression of collagen II. Results: Chondrocytes were successfully isolated and cultured in vitro, and the origin of cells was identified as chondrocytes by toluidine blue staining. The growth curve plotted based on CCK-8 assay was consistent with the logistic growth curve, and P3 chondrocytes had a higher pro-

基金项目:广东省中医药管理局项目(20191295)

第一作者:陈浩雄,男,副主任医师,研究方向:骨关节疾病的中西医结合治疗

liferation rate than P1 and P2 chondrocytes. Western blot showed the highest protein expression of collagen II at the concentration of 0.5 mg/ml, and RT-PCR showed that TSA at each concentration promoted the upregulation of the mRNA expression of collagen II, with the most significant effect at the concentration of 0.5 mg/ml ($P < 0.05$). Conclusion: TSA in vitro can effectively promote the proliferation of chondrocytes and the upregulation of the mRNA expression of collagen II, with the most significant effect at the concentration of 0.5 mg/ml, and it can also promote cartilage repair. Further studies are needed to clarify its mechanism of action.

[**Keywords**] knee osteoarthritis; chondrocyte; total saponins from *Achyranthis Bidentatae Radix*; in vitro intervention; experimental study

膝关节炎性关节病(knee osteoarthritis, KOA)是骨科临床常见的退行性疾病,病理改变以关节软骨退变、损伤为特征,是一种进展性疾病。关节软骨主要由软骨细胞及细胞外基质组成,生物学或力学因素可打破软骨细胞合成和调亡的平衡,破坏软骨细胞及其基质,最终导致关节炎发生^[1]。软骨细胞的增殖、修复是KOA治疗的根本,也是治疗的难点。研究发现中药有一定修复软骨的作用,牛膝总皂苷含药血清体外能促进软骨细胞增殖、II型胶原表达^[2]。我们前期研究发现,牛膝能促进实验兔骨关节炎模型骨髓间充质干细胞软骨分化,促进关节软骨修复^[3]。但国内尚无牛膝总皂苷体外干预膝关节软骨细胞的相关文献发表,本实验拟通过牛膝总皂苷(TSA)体外干预膝关节软骨细胞,观察牛膝总皂苷不同浓度对软骨细胞增值及Collagen II表达的影响,现报告如下。

1 实验材料

1.1 软骨细胞来源 KOA软骨细胞取自3例晚期KOA行膝关节置换患者,3例均为女性。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 药物及试剂 牛膝总皂苷(TSA,深圳市中医院药剂科提供);DMEM:F-12(1:1)培养基(D/F12);胎牛血清(Gibco);0.25%胰酶(Gibco);磷酸缓冲盐溶液(PBS);II型胶原酶;甲苯胺蓝(均为Servicebio公司);多聚甲醛(Biosharp公司);细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物);CCK-8试剂(东仁化学)。

1.3 主要仪器 Annexin-V/PI(Sigma公司);倒置相差显微镜(Olympus公司);CO₂培养箱(Thermo Fisher公司);流式细胞仪(BD)多功能酶标仪。

2 实验方法

2.1 实验分组 将KOA软骨细胞分为6组,分别为0 mg/ml组(空白组)、0.01 mg/ml组、0.05 mg/ml组、0.1 mg/ml组、0.5 mg/ml组、1 mg/ml组。取第3代软骨细胞,细胞密度约80%时,胰酶消化,10%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞,然后以 2×10^4 /ml的密度分别接种于6孔板和96孔板中。细胞贴壁24 h后,弃掉旧培养基,采用DMEM培养基培养,取10 mg牛膝总皂苷加入1 ml D/F12完全培养基溶解,过滤除菌后于-20℃保存。各组分别加入含0、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/ml牛膝总皂苷的DMEM培

养基,每组各设置3个复孔,放置培养箱继续培养。

2.2 人软骨细胞原代培养 将获取的软骨组织先用PBS(含双抗)漂洗3次,用显微手术剪将附着软骨块的软组织剪除,剪碎软骨块面积约1 mm³。用D/F12完全培养基(含10% FBS、及1%双抗)培养人KOA软骨细胞,培养箱温度条件为37℃、CO₂浓度为5%。每天用倒置显微镜观察细胞1次,每2~3 d换液1次。培养瓶中的细胞生长到80%左右时,消化收集细胞,转移至无菌离心管中,转速为1000 r/min,离心4 min,弃上清液,以1:3比例转移培养。

2.3 药物制备及给药方法 1) 10 mg/ml牛膝总皂苷储存液:称取10 mg TSA,加入1 ml D/F12完全培养基溶解,过滤除菌后于-20℃保存。2) 配制含不同TSA浓度D/F12培养基。1 mg/ml TSA:取一无菌EP管,加入0.9 ml D/F12完全培养基,再加入0.1 ml含10 mg/ml TSA储存液,混匀,即可;按相同方法比例,再分别制备0.5 mg/ml TSA > 0.1 mg/ml TSA、0.05 mg/ml TSA、0.01 mg/ml TSA。弃培养孔内旧培养基,加入0.1 ml含不同浓度TSA的D/F12培养基,并设置空白对照组(0 mg/ml TSA组)。

2.4 观察指标

2.4.1 细胞形态学观察及甲苯胺蓝染色 待细胞铺生长至50%~70%融合后,弃孔内培养基,并用PBS缓冲液(0.01 M, pH=7.4)冲洗2次;4%多聚甲醛4℃固定15 min后用PBS缓冲液冲2次;滴加甲苯胺蓝染液染色2~5 min后冲洗;0.1%冰醋酸分析化,冲洗终止反应,并晾干;滴加二甲苯透明10 min,中性树胶封片;显微镜下观察,并拍照。

2.4.2 CCK-8法检测细胞增殖能力 收集对数生长期人KOA软骨细胞,计数,用D/F12完全培养基使软骨细胞悬浮,调整细胞浓度 1×10^5 cells/ml,于96孔板中接种,各孔加0.1 ml细胞悬液,在37℃、5% CO₂条件下孵育过夜。用0.5 mg/ml TSA干预,待细胞生长密度达70%~80%时消化传代,以倒置相差显微镜观察体外培养软骨细胞形态,利用CCK-8法检测软骨细胞P1、P2、P3代增殖情况,酶联免疫检测仪在450 nm双波长处测得相应OD值,绘制细胞生长曲线。

2.4.3 Western blot法检测Collagen II蛋白表达 消化收集细胞,预冷PBS洗涤细胞沉淀3次,弃液,加入适量RIPA裂解液(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂),冰浴30 min,

反复吹打,确保细胞完全裂解;4℃,12000 r/min 离心 5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。BCA 法蛋白定量并调平,PVDF 膜转印,5% TBST 脱脂奶粉室温封闭 1 h,稀释一抗(TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶);稀释二抗,室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次。化学发光显色,将胶片进行扫描存档,Image J 软件处理系统分析目标带的光密度值。

2.4.4 RT-PCR 检测 Collagen II mRNA 表达 软骨细胞总 RNA 的提取:取状态良好的 3 代软骨细胞,常规消化离心接种于 6 孔板后,分别加入 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/ml 终质量浓度的牛膝总皂苷培养基,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d 后,参考文献[4]中的方法,采用 Trizol 法提取各组软骨细胞总 RNA 再用随机引物,逆转录酶转录为 cDNA,以此 cDNA 为第 1 链为模板,采用三步法进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。采用 Primer 3.0 设计 Real Time PCR 引物,引物序列经 NCBI nBlast 比对无非特异性扩增,用于 RT-PCR 实验。II 型胶原引物序列(5' - 3') Forward: CAGGATGGGCAGAGGTATA-ATG; Reverse: GAGGCAGTCTTTCACGTCTT; GAPDH Forward: CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG; Reverse: CTACATG-GCAACTGTGAGGAG。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,诱导各组之间各时间点差异用单因素方差分析。对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,组间比较用 *t* 检验,不满足方差分析时用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 细胞形态学及甲苯胺蓝染色结果 软骨组织消化分离后,镜下可见呈圆形、悬浮的软骨细胞。24~48 h 后细胞贴壁,细胞形态多为圆形、椭圆形及短梭形。人 KOA 软骨细胞贴壁生长,呈多边形,经甲苯胺蓝染色鉴定细胞呈蓝色,符合软骨细胞特征。(见图 1)

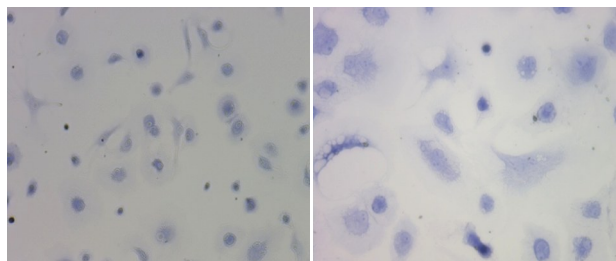


图1 软骨细胞形态及甲苯胺蓝染色
(左图 20×;右图 40×)

3.2 细胞增殖结果 选择 CCK-8 法观察 P1、P2、P3 传代细胞生长曲线,绘制的生长曲线符合 Logistic 生长曲线规律。传代第 1~2 天为生长潜伏期,第 3~6 天为对数增殖期,对数增殖期结束后进入平台期和下降期。P1~P3 代细胞增殖能力基本相同。(见图 2)

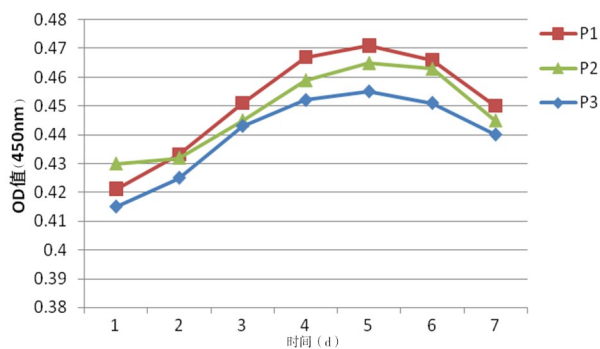


图2 软骨细胞培养 P1、P2、P3 传代细胞生长曲线

3.3 Collagen II 蛋白表达水平 牛膝总皂苷各组与空白组相比, Collagen II 蛋白表达量呈剂量依赖性上调($P < 0.05$),浓度为 0.5 mg/ml 时达最高($P < 0.01$),浓度为 1 mg/ml 时 Collagen II 蛋白表达量下调($P < 0.01$)。0.01 mg/ml 组 II 型胶原表达量与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

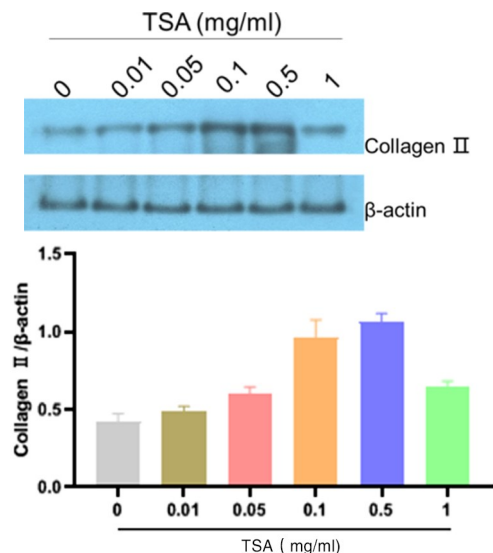


图3 不同浓度 TSA Collagen II 蛋白表达水平

3.4 Collagen II mRNA 水平 扩增结果分析牛膝总皂苷各组与空白组相比, Collagen II mRNA 表达量呈剂量依赖性上调($P < 0.05$),浓度为 0.5 mg/ml 时达最高($P < 0.01$),浓度为 1 mg/ml 时 Collagen II mRNA 表达量下调($P < 0.01$)。(见图 4)

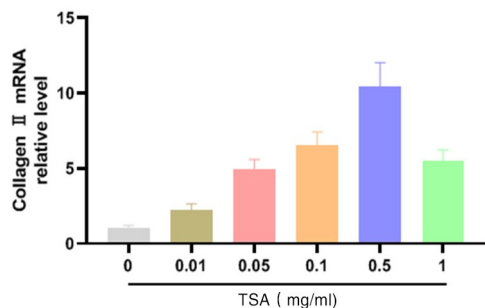


图4 不同浓度 TSA Collagen II mRNA 水平

4 讨 论

KOA 是一种关节软骨变性、皱裂、溃疡、脱落为病理特征的进展性疾病。软骨退变是骨关节炎的主要病因,因为软骨细胞是一种高度分化细胞,软骨退变或损伤后,会出现缓慢的增殖、修复过程,目前药物治疗主要是抑制炎症的进展以减轻对软骨的损伤,属于对症治疗,因此软骨组织修复越来越成为研究的方向与热点。

KOA 属于中医学“骨痹”范畴。牛膝,形似牛的膝骨,古人云:“其茎有节,似牛膝,故以为名”,其功效以补肝肾、强筋骨、活血通经、引血下行为主,为中医治疗痹证的常用药。《本草经》中记载牛膝“主寒湿痿痹,四肢拘挛,膝痛不可屈伸”,是治疗膝痹的有效药物。

近几年来在细胞分子层面研究牛膝对关节软骨修复以及抑制炎症因子表达的实验研究已有很多。如高坤等^[5]发现对患有 KOA 的新西兰兔进行 TSA 灌胃,其滑膜液中白细胞介素(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、趋化因子 CCL3、CXCL8(IL-8)、CXCL9 表达降低。孙雪莲等^[6]、余圆等^[7]发现 TSA 灌胃后,KOA 兔关节黏连度改善,关节液中 TNF- α 、IL-1 β 水平降低。有研究认为多种炎症因子能通过基质金属蛋白酶(MMPs)降解 II 型胶原蛋白等多种细胞外基质成分,是促进软骨降解的“共同通路”^[8-9]。TSA 治疗 KOA 的机制之一可能是通过抑制促炎因子表达,从而抑制软骨基质降解、软骨细胞凋亡、关节结构重构等 KOA 的病理生理过程。有研究表明牛膝总皂苷含药血清具有促进软骨细胞增殖和抗软骨细胞凋亡的作用。皂苷类通过降低 Wnt 通路 β -catenin 蛋白的磷酸化来下调 β -catenin mRNA 的表达和抑制 Wnt 信号通路,下调 TGF- β 1 表达发挥抑制系膜细胞增殖^[10],以及通过抑制 AMPK 通路 NF- κ B 向细胞核转移,导致细胞核内 NF- κ B 的表达水平降低而抑制炎症因子 IL-6 的分泌^[11]。

课题组前期研究证实牛膝等补肾活血中药可通过对 NF- κ B 信号通路靶效应抑制细胞因子 IL-1 β 治疗膝骨关节炎^[12]。本实验用不同质量浓度牛膝总皂苷对体外培养的人膝关节软骨细胞的增殖及凋亡影响,结果显示牛膝能促进软骨细胞增殖。用 CCK-8 法检测了牛膝总皂苷对软骨细胞增殖水平的影响,结果显示,0.05、0.1、0.5、1.0 mg/ml 浓度牛膝总皂苷能够明显促进软骨细胞增殖,组间比较,无明显差异($P>0.05$),但最佳浓度为 0.5 mg/ml 组,且增殖高峰出现在牛膝总皂苷干预后的第 3 天。Western blot 检测 Collagen II 蛋白表达及 RT-PCR 检测 Collagen II mRNA 水平均显示牛膝总皂苷能提高 Collagen II 蛋白表达,随着浓度增高,表达增高,0.5 mg/ml 时最明显,随着浓度增加,表达水平下降。以上研究结果初步表明高浓度反而会表达水平下降,可能与高浓度牛膝总皂苷的激发受体量远

高于外界所提供营养的量,增殖速度与牛膝浓度增加不匹配有关。也可能与牛膝总皂苷结合的受体有限,已达饱和状态,或者是高浓度牛膝总皂苷改变了软骨细胞的最佳生存环境。这些因素都可能影响牛膝总皂苷对软骨细胞增殖的作用。

本次实验创新之处在于运用牛膝总皂苷体外干预人 KOA 软骨细胞,避免了口服药的毒副作用。在目前倾向于体外用药、局部用药的大环境下,为关节腔注射治疗骨关节炎的可能性及进一步研究提供了实验依据。但是由于中药本身的成分比较复杂,具体作用机制尚不明确,应用于临床上还需要更进一步的实验研究。

参考文献

- [1] 马勇,张允申,陈金飞,等. 威灵仙干预体外培养兔膝关节软骨细胞增殖及转化生长因子 β 1 mRNA 基因的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(11):1901-1906.
- [2] 肖伟,马笃军,彭力平,等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎软骨细胞体外增殖及糖胺聚糖的干预作用[J]. 中国医药导报,2017,14(5):20-24.
- [3] 陈浩雄,彭力平,徐宁达,等. CCK-8 法检测牛膝醇提物诱导兔骨髓间充质干细胞最佳检测条件的实验研究[J]. 中国伤残医学,2015,14(25):31-33.
- [4] 徐扬,桂鉴超,高峰,等. 威灵仙提取物干预膝骨关节炎软骨细胞的生长活力[J]. 中国组织工程研究,2013,17(2):241-246.
- [5] 高坤,张勇,陈天宇,等. 牛膝总皂苷干预兔膝骨关节炎滑膜液来源细胞因子的表达[J]. 中国组织工程研究,2019,23(33):5317-5321.
- [6] 孙雪莲,刘渊,周红海. 牛膝总皂苷对兔膝骨关节炎软骨组织形态变化及关节液中 IL-1 β 、TGF- β 1 含量的影响[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(3):14-19.
- [7] 余圆,彭力平,马笃军,等. 牛膝总皂苷对实验兔膝骨关节炎滑膜组织的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2017,25(6):1-5.
- [8] WOJDASIEWICZ P, PONIATOWSKI LA, SZUKIEWICZ D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014(2):561459.
- [9] GLYN JONES S, PALMER AJR, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. The Lancet, 2015, 386(9991):376-387.
- [10] 孙雪艳,杨丽平,占永立,等. 薯蓣皂苷抑制脂多糖刺激的大鼠系膜细胞增殖及对 Wnt 通路的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(3):871-874.
- [11] 何标,廉果. 槲皮黄酮对 AMPK/NF- κ B 信号通路介导 IL-6 表达的影响[J]. 广东药学报,2016,32(5):634-638.
- [12] 陈浩雄,何斌斌,徐宁达,等. 补肾活血方治疗膝骨关节炎对 NF- κ B 信号通路靶效应的临床研究[J]. 光明中医,2018,33(24):3653-3656.

(收稿日期:2021-01-23)