补肾壮筋汤含药血清介导的 Sox9 基因高表达对 IL－1β 诱导的大鼠软骨细胞损伤的保护机制研究

吴锋锋　高宏梁　王国荣　李建有　黄　胜　蒋雪生　李雄峰

摘　要　目的　评估补肾壮筋汤(BZD)含药血清介导的 Sox9 基因高表达对 IL－1β 诱导的大鼠软骨细胞损伤的保护作用。**方法**　传代培养的第 2 代大鼠软骨细胞随机分为 3 组,即对照组不予任何干预,模型组给予 IL－1β(10μg/ml)刺激软骨细胞 24h, BZD 组予 IL－1β(10μg/ml)刺激软骨细胞 24h 后,加入 BZD 含药血清(400μg/ml)。BZD 干预 72h 后收集所有软骨细胞进行分析。**结果**　与对照组比较,模型组软骨细胞活性明显下降($P=0.000$),软骨细胞 Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 及胶原蛋白Ⅱ的基因及蛋白水平均明显下降($P=0.000$);与模型组比较,BZD 组增强了软骨细胞活性($P<0.05$),软骨细胞 Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 及胶原蛋白Ⅱ的基因及蛋白水平均明显上升($P<0.05$)。**结论**　BZD 在 IL－1β 诱导的大鼠软骨细胞损伤中可能通过过表达 Sox9 起保护作用。

关键词　补肾壮筋汤　IL－1β　骨关节炎　Sox9　胶原蛋白Ⅱ

中图分类号　R681　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2020.07.021

Protective Mechanism of Bushen Zhuangjin Decoction Containing Serum on IL－1β－Induced Chondrocyte Injury in Rats by Overexpression of Sox9.

Wu Fengfeng, Gao Hongliang, Wang Guorong, et al. Department of Orthopedics and Rehabilitation, Huzhou Central Hospital, Zhejiang 313000, China

Abstract　Objective　Over expression of Sox9 has been shown to promote cartilage repair in early stages of human osteoarthritis. This study aimed to determine whether Bushen Zhuangjin decoction (BZD) protected chondrocytes against IL－1β－induced injury by elevating Sox9 expression. **Methods**　P2 chondrocytes were randomly divided into three groups: a control group, a model group stimulated with IL－1β (10μg/ml) for 24h, and a BZD group stimulated with IL－1β for 24h and then treated with serum containing BZD (400μg/ml) for 72h. Chondrocytes in all groups were collected at the same time (72h after BZD administration in the BZD group) for analysis. **Results**　Compared with the control group, IL－1β treatment significantly reduced cell viability ($P=0.000$). Both mRNA and protein expression levels of SOX9, aggrecan, and collagen Ⅱ were significantly down regulated in the model group compared to those of the control group ($P=0.000$). However, BZD significantly alleviated the inhibitory effect of IL－1β on chondrocyte viability ($P<0.05$). Moreover, in the BZD group, both the mRNA and protein expression levels of SOX9, aggrecan, and collagen Ⅱ were significantly up regulated compared with those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion**　This study demonstrated that BZD could protect chondrocytes against IL－1β－induced injury by elevating Sox9 expression.

Key words　Bushen Zhuangjin decoction (BZD); IL－1β; Osteoarthritis (OA); Sox9; Collagen Ⅱ

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是老年人最常见的关节炎,可引起关节慢性疼痛并可导致残疾。口服非甾体抗炎药可快速缓解早期的症状,但不能明显延缓疾病的进程,且这类药物长期服用有很多不良反应,特别是消化道的不良反应[1]。因此,寻找更加可靠的药物替代方案一直是 OA 治疗的目标[2]。

祖国医学认为,OA 属于"骨痹"、"痹症"等范畴。《素问·上古天真论》曰:"丈夫……七八肝气衰,筋不能动,天癸竭,精少,肾脏衰,形体皆极"。可见其多因肝肾亏虚、筋脉失养而发病。补肾壮筋汤(BZD)出自清代钱秀昌《伤科补要》,其中熟地黄、山茱萸填精益髓、滋补肝肾,续断、杜仲补肝肾、强筋骨,五加皮、茯苓健脾利湿,青皮理气,白芍、当归补血活血,牛膝补肝肾、强筋骨。诸药合用,起到补益肝肾,强筋壮骨的功效,是我国著名的 OA 治疗成方。临床试验显示,BZD 可显著改善 OA 患者的症状和体征[3,4]。

然而,BZD 作用的分子机制仍不清楚,可能是非常复杂和多方面的。Lin 等[5]研究发现,BZD 可增强

基金项目:浙江省中医药管理局科技项目(2016ZA185)

作者单位:313000　湖州市中心医院(浙江大学湖州医院)骨科与康复科

通讯作者:李雄峰,电子信箱: wu.fengfeng@outlook.com

衣霉素（TM）刺激的软骨细胞活力，抑制由内质网应激介导的 TM 诱导的 SD 大鼠软骨细胞凋亡。SRY－box 9（Sox9）基因在软骨发育中起重要作用，是软骨间充质细胞向软骨细胞分化的关键转录因子。此外，它还参与调节软骨细胞分化的各个阶段[6]。先前的研究表明，Sox9 的过表达可促进软骨修复[7]。因此，本研究目的是确定 BZD 是否可通过提高 Sox9 的表达来保护 OA 细胞模型中的软骨细胞，并阐明其潜在的机制。

材料与方法

1. 材料：4 周龄雄性 SD 大鼠 16 只，购自上海斯莱克实验动物有限公司，实验动物许可证号：2017－0008，饲养在浙江中医药大学动物实验中心清洁级（SPF）动物房中，其中 4 只用于制备 BZD 含药血清，12 只用于分离软骨细胞。其他主要材料：DMEM 培养基、澳洲胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司；胶原蛋白Ⅱ多克隆抗体（142kDa，Ab34712）、Sox9 多克隆抗体（70kDa，Ab185966）购自英国 Abcam 公司，稀释度分别为 1∶5000 和 1∶1000；蛋白聚糖 Aggrecan 单抗（250kDa，NB600－504）购自美国 Novus 公司，稀释度为1∶100；RT－PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司。本研究经浙江中医药大学科研伦理学委员会批准，批准文号 2017123。

2. 方法：（1）BZD 含药血清的制备：BZD 是中药饮片，由浙江中医药大学实验室提供，含 10 味中药，包括熟地黄、山茱萸、续断、杜仲、五加皮、白芍、当归、茯苓、青皮、牛膝，其最终浓度为 1g/ml（相当于原料的干重）。BZD（18.5g/kg，相当于成人 1 次的剂量）连续给药 7 天（每天 2 次）。最后 1 次给药 2h 后，处死大鼠（$n=4$），从颈动脉取血。血样在 4℃下凝血 2h，上清液 1500r/min 离心 20min，56℃失活 30min，过滤后－80℃保存。（2）软骨细胞分离和培养：从大鼠膝关节软骨中分离、培养软骨细胞（$n=12$），并按先前已报道的方法进行鉴定[4]。将软骨细胞先用 0.1% 胰蛋白酶预消化 30min，再用 1.5mg/ml 的胶原酶Ⅱ消化 16h，离心后收集细胞。分离的软骨细胞在 10% 胎牛血清的培养基中进行培养和传代，同时加入青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml，放在 37℃含 5% 二氧化碳的孵育器中。（3）实验分组：选取第 2 代（P2）软骨细胞用于实验，因为它们已经被证明是胶原蛋白Ⅱ含量丰富，能表现出典型的软骨细胞形态[3,4]。软骨细胞随机分为 3 组，即对照组，P2 软骨细胞不予任何干预；模型组，IL－1β（10μg/ml）刺激 P2 软骨细胞 24h；BZD 组，IL－1β（10μg/ml）刺激 P2 软骨细胞 24h，然后加入 BZD 含药血清（400μg/ml）。BZD 干预 72h 后收集所有软骨细胞进行分析。（4）软骨细胞活性测定：采用 MTT 比色法检测 BZD 对软骨细胞活性的影响。BZD 给药 72h 后，3 组细胞中各加入 0.5mg/ml MTT 溶液，37℃孵育 4h，弃上清液，将晶体溶解在 100μl 二甲基亚砜（DMSO）溶液中。使用酶标仪（美国 Hercules 公司）在 570nm 处读取吸光度。（5）Sox9、蛋白聚糖 aggrecan、胶原蛋白Ⅱ蛋白水平的测定：采用细胞裂解液（RIPA∶PMSF∶Cocktail ＝100∶1∶2）于冰上裂解细胞，BCA 法检测蛋白浓度。取 150μg 蛋白经 10% SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳后，转移至 PVDF 膜上。采用 5% BSA 室温封闭 40min，蛋白一抗冰上过夜孵育，二抗室温孵育 60min，采用双色红外激光成像系统采集图像。每组重复 3 次。（6）Sox9、蛋白聚糖 aggrecan（Acan）、胶原蛋白Ⅱ（Col2a1）基因水平的测定：采用 Trizol 法提取软骨细胞总 RNA，超微量核酸分析仪检测总 RNA 的浓度与纯度。采用美国 Promega 公司试剂盒进行荧光定量 PCR 检测，按照试剂盒说明书操作。反应步骤：95℃ 5min，95℃ 10s，58℃ 1min，共 30 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示相对表达量。Sox9 引物序列：上游引物 5′－GCGAGCAGCAGCAGCACTC－3′，下游引物5′－TCTGGTGGTCGGTGTAGTCATACTG－3′。Acan 引物序列：上游引物 5′－CCAGTCTACCCAGCACCCTA－3′，下游引物 5′－TCAGGGACTTGGCTGTTTCT－3′。Col2a1 引物序列：上游引物 5′－GGCTCCCAGAACATCACCTA－3′，下游引物 5′－GCCCTCATCTCCACATCATT－3′。内参基因 Gapdh 引物序列：上游引物 5′－GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG－3′，下游引物 5′－ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA－3′。

3. 统计学方法：采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。组间差异采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 分离培养的大鼠软骨细胞的形态及其鉴定：倒置显微镜下观察分离培养的原代软骨细胞，结果显示培养 9～12h 部分细胞贴壁，培养至 24h 绝大部分细胞贴壁，细胞开始伸展，细胞体积较小，呈多角形，均匀散在生长（图 1A）。3 天左右细胞汇合成单层铺满整个培养瓶底部。4 天左右首次传代后增殖速度加快，隔天可再次传代，呈明显的“铺路石”样（图

1B)。传至第 6 代,细胞呈长梭型,开始老化。第 7 代后细胞呈梭状平铺,折光差,部分细胞脱落,生长速度减慢,传代周期延长,软骨细胞表型退化。由于Ⅱ型胶原的合成与分泌是软骨细胞维持其分化表型的特定指标。细胞鉴定结果显示,培养的软骨细胞胞质中Ⅱ型胶原的棕黄色颗粒较多,呈强阳性表达,可见典型的软骨细胞形态(图 1C)。

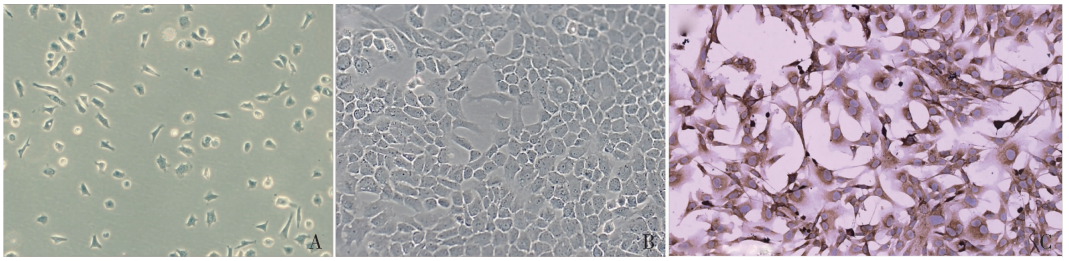

图 1　原代培养的大鼠软骨细胞贴壁后的细胞形态及其鉴定(×200)

A. 贴壁 24h 细胞形态;B. 贴壁 4 天细胞形态;C. 胶原蛋白Ⅱ免疫组化染色

2. IL-1β 诱导的软骨细胞损伤:对照组表现为基本正常的软骨细胞形态(图 2A),模型组出现软骨细胞的肥大和萎缩等软骨细胞损伤的征象(图 2B),BZD 组软骨细胞形态学的损伤较模型组减轻(图 2C)。

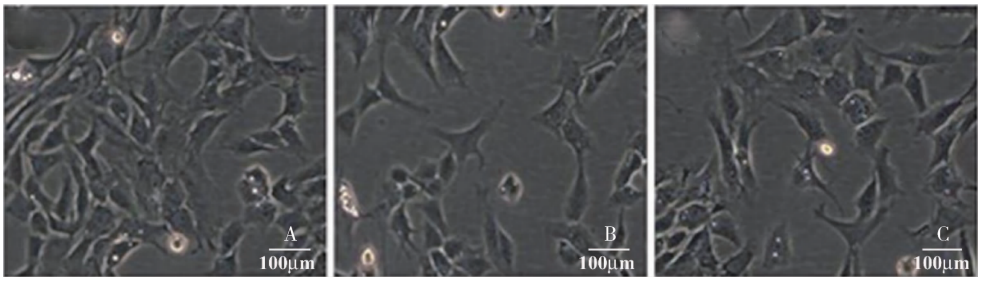

图 2　倒置相差显微镜下软骨细胞形态(×200)

A. 对照组;B. 模型组;C. BZD 组

3. 软骨细胞活性:与对照组比较,模型组中软骨细胞活性显著降低($P=0.000$),BZD 组和模型组比较,软骨细胞活性增强($P<0.05$),详见图 3。

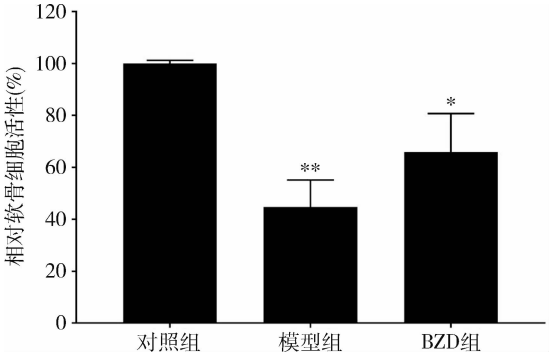

图 3　软骨细胞活性比较

与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

4. Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ的基因和蛋白表达:与对照组比较,模型组 Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ的基因和蛋白表达水平均显著降低($P=0.000$)。在 BZD 组,Sox9、蛋白聚糖和胶原蛋白Ⅱ的基因和蛋白表达水平较模型组均显著升高($P<0.05$,图 4、图 5)。

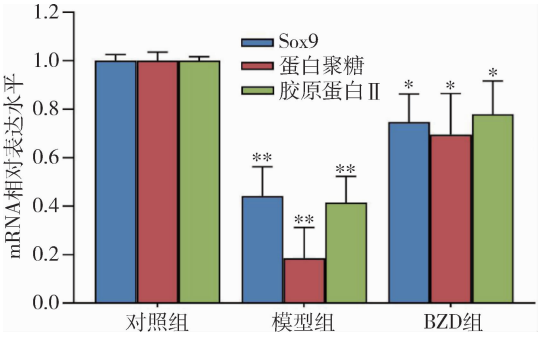

图 4　Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ基因表达水平

与对照组比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$

讨　　论

关节软骨的破坏和丢失是 OA 的一个主要特征。软骨细胞是软骨中唯一的细胞,嵌入在广泛的细胞外

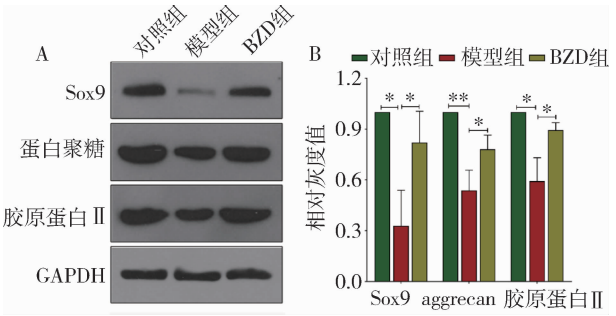

图 5　Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ蛋白表达水平

A. Western blot 法；B. 蛋白表达水平半定量分析；

$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

基质(ECM)中，ECM 主要由胶原和蛋白多糖组成，关节软骨中的胶原主要为Ⅱ型，关节软骨的主要蛋白多糖为 aggrecan[8]。Sox9 是一种转录因子，它对许多软骨细胞 ECM 基因的表达至关重要，并在软骨细胞分化过程中发挥作用[7]。BZD 在中国长期被用于 OA 患者的治疗，临床研究表明，BZD 可改善 OA 患者的症状[3,4]。然而，BZD 在 OA 中的分子机制尚不明确，研究发现 BZD 通过刺激 SD 大鼠的细胞周期进程促进软骨细胞增殖[9]。也有研究表明，补肾壮筋汤可清除氧自由基，促进软骨细胞增殖，抑制软骨细胞凋亡，抑制滑膜炎症，提高软骨细胞抗异常应力水平[10]。

本研究结果显示，BZD 提高了 IL－1β 诱导的软骨细胞 Sox9、蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ的表达，从而促进软骨细胞的活性。Sox9 是一种重要的转录因子，参与多种器官和组织的发育，尤其是软骨形成。值得注意的是，Sox9 可转录激活许多软骨特异性结构成分和调节因子的基因[11]。在正常软骨细胞中，Sox9 调控蛋白聚糖 aggrecan 和胶原蛋白Ⅱ的表达[11]。正常的关节软骨依赖于合成和分解细胞因子之间的平衡。IL－1β 是促炎性细胞因子和分解代谢的关键因子，导致金属基质蛋白酶的产生、减少胶原蛋白Ⅱ和蛋白聚糖 aggrecan 的表达[12]。在最近的研究中，IL－1β 被用来建立 SD 大鼠软骨细胞的细胞 OA 模型。本研究在 IL－1β 的影响下，软骨细胞出现 Sox9、胶原蛋白Ⅱ和 aggrecan 的快速减少。重要的是，BZD 可缓解 IL－1β 的作用，进一步支持 BZD 在 Sox9 的信号通路的作用。

综上所述，本研究结果支持使用 BZD 作为一种有效的药物治疗 OA。它可能通过参与关节软骨结构和功能的 Sox9 及其靶基因的正向调控，刺激细胞增殖。但是，BZD 对动物模型和 OA 患者 Sox9 信号通路的调控还有待于进一步研究。

参考文献

1　Felson DT. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2006, 354(23): 841－848

2　Yang S, Dube CE, Eaton CB, *et al*. Longitudinal use of complementary and alternative medicine among older adults with radiographic knee osteoarthritis[J]. Clin Therapeut, 2013, 35(11): 1690－1702

3　李西海，梁文娜，党传鹏. 补肾壮筋汤抑制炎性细胞因子表达延缓骨关节炎软骨退变的研究[J]. 风湿病与关节炎，2014，3(5)：20－25

4　周国顺，李雄峰，管国华. 补肾壮筋汤含药血清对力学刺激诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2012，32(6)：789－792

5　Lin P, Weng X, Liu F, *et al*. Bushen Zhuangjin decoction inhibits TM－induced chondrocyte apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(6): 1519－1528

6　Li X, Ye H, Yu F, *et al*. Millimeter wave treatment promotes chondrocyte proliferation via G_1/S cell cycle transition[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5): 823－831

7　Dy P, Wang W, Bhattaram P, *et al*. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes[J]. Deve Cell, 2012, 22(3): 597－609

8　Bhosale A, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management[J]. Br Med Bull, 2008, 87(1): 77－95

9　Li X, Chen J, Liang W, *et al*. Bushen Zhuangjin Decoction promotes chondrocyte proliferation by stimulating cell cycle progression[J]. Exp Therapeut Med, 2015, 9(3): 839－844

10　梅阳阳，付长龙. 补肾壮筋汤干预骨关节炎的机制[J]. 中国老年学，2018，38(10)：2557－2560

11　Ohba S, He X, Hojo H, *et al*. Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the Mammalian chondrocyte[J]. Cell Reports, 2015, 12(2): 229－243

12　Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis[J]. Clini Immunol, 2013, 146(3): 185－196

（收稿日期：2020－01－14）
（修回日期：2020－02－23）