

康复新液对兔 KOA 软骨细胞增殖及 p44/42MAPK 蛋白表达的实验研究*

王 涛¹, 殷 红², 廖江龙¹, 何云鹏¹, 李金磊¹, 艾元亮¹, 许燕飞¹,
刘维统¹, 杨 光¹, 温 辉¹, 杨景帆^{1△}

(1. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650011; 2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 建立体外培养兔 KOA 软骨细胞系, 观察康复新液对兔 KOA 软骨细胞增殖的影响, 并测定康复新液作用下兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达的情况。**方法** 将手术中取得的兔膝关节炎骨片, 使用酶消化法进行培养, 取生长良好的第 3 代兔 KOA 软骨细胞进行实验。将不同浓度的康复新液分别加入第 3 代兔 KOA 软骨细胞中, 用 CCK8 法评价康复新液对兔 KOA 软骨细胞增殖的影响; 用 Western blotting 检测康复新液作用下兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达情况。**结果** 20mol/L、15mol/L、10mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞抑制水平较 DMSO 对照组强, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 5mol/L、10mol/L、20mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达水平较空白对照组强, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 15mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达水平较空白对照组强, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 康复新液可能通过促进兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白的表达进而抑制兔 KOA 软骨细胞的增殖。

关键词: 康复新液; 软骨细胞; p44/42MAPK

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0030-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.007

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)主要病理改变为: 关节软骨的退变、骨质的硬化及增生, 严重影响人们的工作和生活^[1]。祖国医学将 KOA 归属“痹症”范畴^[2], 中医学认为痹症的主要特点是病邪深居隐伏久羁, 宜选用虫类通经活络药物来“松透病根”^[3], 而康复新液是从蜚蠊(俗称蟑螂)提取的一种生物制剂^[4]。笔者采用 CCK8 法观察康复新液对兔 KOA 软骨细胞增殖的影响, 测定康复新液作用下兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达的情况, 初步探讨了康复新液治疗兔 KOA 的作用机制, 对临床应用康复新液治疗相关疾病具有一定的参考价值, 现报告如下。

1 实验材料

1.1 实验试剂与仪器

康复新液(四川好医生攀西药业有限责任公司); PBS (Hyclone: SH30256); 胎牛血清 (gibco: 10099 -

141); DMEM/F12 1:1 培养基 (Hyclone: SH30243); EDTA-胰酶 (Millipore: SM-2003-C); 双抗 (Millipore: TMS-AB2-C); CCK8 试剂盒 (DOJINDO: CK04); 超净工作台 (AIRTECH); CO₂ 培养箱 (Thermo); 倒置显微镜 (Motic); 过滤器 (0.22μm: Millipore) 等。

1.2 实验动物

成年清洁级雄性新西兰兔, 体质量 1.5~2.5kg, 120 只, 购买于四川大学华西医学中心, 饲养于云南中医学院动物房内。术前适应性饲养 1 周。状态良好的动物进入实验阶段。

1.3 实验方法

1.3.1 兔 KOA 软骨细胞的分离与培养

采用空气栓塞法处死新西兰兔后分离兔腿, 浸泡 75%酒精 20min; 保证无菌操作条件下取关节表面软骨, 放入 2%双抗的 PBS 中; 剪成 1mm 左右方块, 加

* 基金项目: 云南科技计划项目-中医联合专项 (11360201500)

收稿日期: 2017-07-28

作者简介: 王涛 (1984-), 男, 云南昆明人, 硕士, 主治医师, 研究方向: 退行性关节病的防治研究。

△通信作者: 杨景帆, E-mail: tianguodeshu-2008@163.com

0.2%的胶原酶,震荡消化2h后收集上清,1000rpm/min离心5min,PBS洗两遍;10%FBS F12培养细胞;细胞长到80%~90%时传代培养。

1.3.2 CCK-8 比色法测定兔 KOA 软骨细胞增殖情况

在前期研究中发现康复新液作用兔 KOA 软骨细胞24h后,各浓度组与空白对照组之间无明显差异,推测可能与康复新液发挥作用较缓慢有关,有待进一步研究;康复新液作用兔 KOA 软骨细胞72h后需要更换培养基;故本次实验取生长状况良好的第3代兔 KOA 软骨细胞,采用CCK-8法检测康复新液加药48h后对兔 KOA 软骨细胞增殖的影响。根据加入康复新液的不同浓度,将KOA软骨细胞分为六组,20mol/L组、15mol/L组、10mol/L组、5mol/L组、DMSO溶剂的对照组、空白对照组。最后以细胞在 $\lambda=450\text{nm}$ 处检测得到的吸光(D)值来显示软骨细胞的增殖水平。

1.3.3 Western blotting 检测相关蛋白

将终浓度为20mol/L、15mol/L、10mol/L、5mol/L、1mol/L的康复新液分别作用于兔 KOA 软骨细胞48h后,用Western blot法检测MAPK信号通路中P44/42蛋白表达情况。具体操作如下:将不同浓度的康复新液,分别加药10 μL 于兔 KOA 软骨细胞6cm培养皿中,作用48h后,提取细胞蛋白,BCA法蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后硝酸纤维素膜(PVDF膜)转印,裁剪出的目的蛋白条带,并全部浸没在封闭液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,漂洗,二抗室温振荡孵育2h;制备化学发光检测底物工作液检测蛋白^[5]。

1.4 统计学方法

采用GraphPad prism统计软件对实验数据分析,所有数据表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔 KOA 软骨细胞的培养情况

通过倒置显微镜观察到:刚分离的原代细胞呈球状漂浮培养液中(图1A);接种24h后部分贴壁;接种36h后基本全部贴壁。在加入不同浓度的康复新液48h后,兔

KOA软骨细胞的形态、密度发生变化。如图1B所示:对照组(0mol/L康复新液)细胞伸展较好,细胞呈多角形排列于皿底、立体感较强。随着药物浓度的增加,各组细胞状态越来越差、数目减少,排列稀疏,且出现少数细胞死亡(图1C、图1D)。

2.2 CCK-8 比色法测定不同浓度康复新液对 KOA 软骨细胞增殖的影响

图2结果显示:20mol/L、15mol/L、10mol/L康复新液组对兔 KOA 软骨细胞抑制水平较DMSO对照组强,差异均有统计学意义($P<0.05$)。空白对照组与DMSO对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示DMSO对软骨细胞增殖没有影响。随着康复新液浓度的升高,OD值呈现下降趋势,说明康复新液对兔 KOA 软骨细胞具有抑制作用,且浓度越高抑制作用越强。

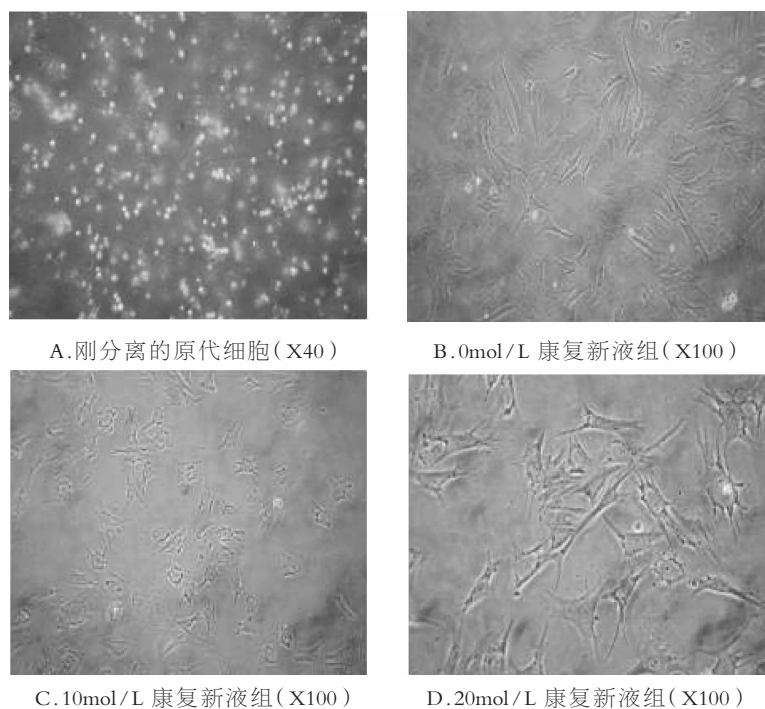


图1 兔 KOA 软骨细胞形态

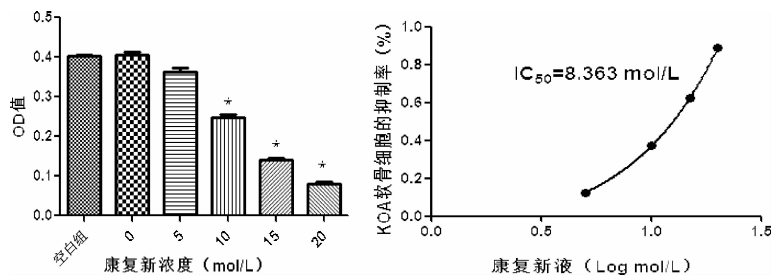
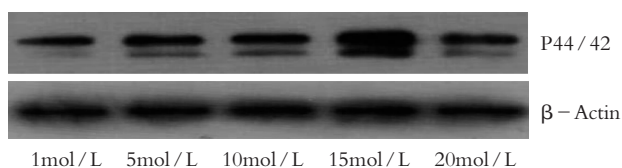


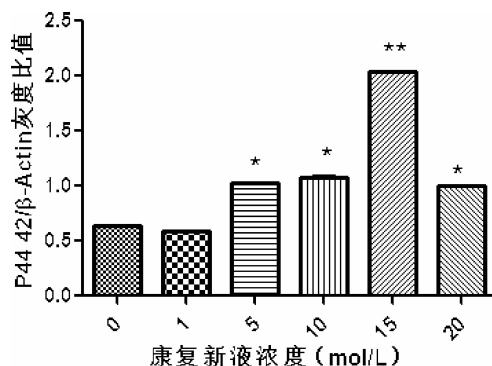
图2 不同浓度康复新对兔 KOA 软骨细胞增殖的影响

2.3 Western blotting 检测兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达情况

图 3 结果显示:5mol/L、10mol/L、20mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42 蛋白表达水平较空白对照组强,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);15mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达水平较空白对照组强,差异有显著统计学意义 ($P<0.01$),提示康复新液能促进兔 KOA 软骨细胞中 p44/42 蛋白表达水平。说明康复新液对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达水平有一定的促进作用,且浓度越高促进作用越强。



注:不同浓度组别兔 KOA 软骨细胞中 p44/42 蛋白表达情况



注:与空白组含康复新液比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 不同浓度康复新对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达的影响

3 讨论

中医将 KOA 归属“痹症”范畴^[2],清初叶天士提出:病邪深居隐伏久羁宜选用虫类通经走络活络的观点^[6],取“取虫蚁迅速飞走诸灵”之义来“松透病根”^[7],并开创了采用虫类药物治痹症之先河。叶氏在《临证指南医案》指出:土鳖、乌梢蛇、蜚蠊(蟑螂)、全蝎等动物药宜治痹症^[8]。现代药理研究证明,康复新液能降低 IL-4、IL-5、TNF- α 表达量^[9];抑制 MMP-3 及 MMP-13 的表达^[10];活跃成纤维母细胞、促进肉芽样组织内的血管新生和伤口愈合、提高免疫功能、抗炎,加快骨修复等作用^[11]。目前关于 KOA 机制的研究主要涉及以下几个方面:滑膜、软骨释放

炎性因子 IL-1、IL-6、TNF- α 等参与炎性反应,介导骨破坏;软骨细胞的过度凋亡是关节软骨退行性改变的病理因素之一^[12];蛋白酶对软骨的直接或间接的降解^[13]。例如 MMP-1、MMP3、MMP-13 对关节软骨细胞外基质的降解作用^[14],诱导骨性关节炎发生。其中,软骨细胞的增殖与凋亡在关节软骨的形成、代谢、修复过程中发挥重要的调控作用^[15]。

根据目前研究得知:软骨细胞的凋亡过程中上游通路主要涉及 MAPK 信号转导通路、PI3K-Akt 通路、JAK/STAT1 通路^[16]。MAPK 信号通路主要包括:ERK、JNK、p38 蛋白激酶通路^[17]。其中,ERK 是丝裂原活化蛋白激酶家族中的一个重要亚型,ERK (P44/42MAPK) 在膝骨关节炎发病过程中持续表达^[18],通过刺激炎性细胞生长所需的生长因子和激素,进而对炎性软骨细胞的增殖、凋亡有重要调节作用^[19]。

本研究发现 10mol/L、15mol/L、20mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞抑制水平较 DMSO 对照组强,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);5mol/L、10mol/L、20mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白表达水平较空白对照组强,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);15mol/L 康复新液组对兔 KOA 软骨细胞中 p44/42 蛋白表达水平较空白对照组强,差异有显著统计学意义 ($P<0.01$)。说明:康复新液能有效抑制兔 KOA 软骨细胞的增殖,且能促进兔 KOA 软骨细胞中 p44/42MAPK 蛋白的表达。结论:康复新液可能通过激活 ERK (P44/42MAPK) 通路来抑制 KOA 软骨细胞的增殖,以达到治疗膝骨关节炎的效果。但本文主要研究的是康复新液对 KOA 软骨细胞的作用,康复新液对正常膝关节软骨细胞是否具有增殖作用还尚未知,需进一步研究。

参考文献:

- [1] 丁呈彪,周云. 膝骨性关节炎患者滑膜炎的发病机制及研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19 (51): 8327-8332.
- [2] 杜以宽,马民,唐勇. 中医对骨性关节炎病因病机的认识 [J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33 (2): 155-156.
- [3] 陈伯健,徐慧聪,张莉,等. 从络病论治骨关节炎 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (7): 1760-1761.
- [4] 吴红梅. 上市品种“康复新液”的药学再评价 [D]. 成都:成都中医药大学, 2013.
- [5] 杜国庆,丁道芳,李玲慧,等. 不同浓度的 Chir99021 对

- 软骨细胞增殖和Ⅱ型胶原表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(2): 1-5.
- [6] 张田仓. “久病入络”学说发展的历史渊源[J]. 中医研究, 2015, 28(2): 3-5.
- [7] 刘维, 王朝旭. 从叶天士“久病入络”思想辨治类风湿关节炎痰瘀痹阻证 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(8): 865-866.
- [8] 王冠华. “久病入络”学说在顽痹证治中的运用[J]. 中医药临床杂志, 2006, 18(6): 592-593.
- [9] 汤雁利, 李罡, 李启艳. 康复新药理作用的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(1): 103-106.
- [10] 黄非. 美洲大蠊提取物药理作用的研究进展[J]. 基层医学论坛, 2017, 21(1): 106-107.
- [11] 罗廷顺, 高孟婷, 马芳芳, 等. 美洲大蠊药理作用及临床应用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5933-5935.
- [12] 李云泽, 赵序利. 骨性关节炎发病机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(10): 728-733.
- [13] 袁普卫, 康武林, 李小群, 等. 骨性关节炎发病机制及相关细胞因子的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(11): 1010-1014.
- [14] 黄淑婷, 徐建华, 丁长海. 炎症细胞因子及力学因素在膝骨关节炎发病机制和关节结构改变中的作用[J]. 安徽医学, 2013, 34(9): 1417-1419.
- [15] 袁普卫, 康武林, 李小群, 等. 骨性关节炎发病机制及相关细胞因子的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(11): 1010-1015.
- [16] 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展 [J]. 中国骨伤, 2014, 27(5): 441-444.
- [17] 马钢, 任明姬. 骨性关节炎软骨细胞凋亡的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(2): 196-197.
- [18] 陈泽华, 李楠. ERK1/2 信号通路与骨关节炎软骨细胞活性及其治疗的相关性研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(1): 63-65.
- [19] Prasad I, van Gennip S, Friis T, et al. ERK1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(5): 1349-1360.

(编辑:徐建平)

Experimental Study of Kangfuxin Liquid on Proliferation and p44/42MAPK Expression of KOA Protein in Rabbit Chondrocytes

WANG Tao¹, YIN Hong², LIAO Jianglong¹, HE Yunpeng¹, LI Jinlei¹, AI Yuanliang¹, XU Yanfei¹,
LIU Weitong¹, YANG Guang¹, WEN Hui¹, YANG Jingfan¹

(1. Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650011, China;

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** The establishment of rabbit cultured KOA cell line in vitro, to observe the effect of Kangfuxin Liquid on the proliferation of rabbit chondrocytes KOA and the effect of Kangfuxin Liquid on the expression of p44/42MAPK protein in rabbit chondrocytes in KOA. **Methods** The rabbit knee osteoarthritis was obtained by enzyme digestion method, and the third generation rabbit knee osteoarthritis cells were studied. The Kangfuxin Liquid in different concentrations were added to the third generation of rabbit knee osteoarthritis cells, evaluation of effects on the proliferation of rabbit KOA chondrocytes by CCK8 method; the expression of p44/42MAPK Western blotting KOA detection of rabbit chondrocytes in the protein. **Results** 20mol/L, 15mol/L, 10mol/L Kangfuxin group on rabbit chondrocyte KOA inhibition level than the DMSO control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); 5mol/L, 10mol/L, 20mol/L Kangfuxin Liquid to p44/42 MAPK KOA of rabbit chondrocytes in protein expression level than the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); 15 mol/L group p44/42 MAPK of Kangfuxin Liquid in cartilage cells of rabbit KOA protein expression levels than the control group, the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** Kangfuxin Liquid may inhibit rabbit KOA cartilage cells promote the expression of p44/42MAPK protein in rabbit KOA in chondrocyte proliferation.

KEY WORDS: Kangfuxin Liquid; chondrocytes; p44/42MAPK