

模拟微重力环境下威灵仙维持兔膝关节软骨细胞表型的效应与机制

涂鹏程^{1,2ab}, 马勇^{1,2abc}, 郭杨^{1,2ab*}, 潘娅岚^{2ad}, 吴承杰^{1,2ab}, 杨光露^{1,2ab}, 孙杰^{1,2ab}, 王礼宁^{1,2ac}(1.南京中医药大学附属医院骨伤科, 南京 210029; 2.南京中医药大学, a.骨伤修复与重建新技术实验室, b.第一临床医学院, c.中医学学院·中西医结合学院, d.中西医结合护理研究所, 南京 210023)

摘要: 目的 研究模拟微重力培养环境下威灵仙提取物对兔软骨细胞表型维持的作用及机制。方法 利用液动力聚焦细胞培养系统体外模拟微重力培养环境, 同时使用威灵仙提取物进行干预, 将兔膝关节软骨细胞分为空白组(平面培养)、威灵仙组(平面培养+威灵仙提取物)、微重力组(微重力培养)、微重力-威灵仙组(微重力培养+威灵仙提取物)4组, 培养7d; 观察各组软骨细胞形态学变化, CCK-8检测各组细胞增殖活性, 流式细胞技术检测各组软骨细胞凋亡率; RT-qPCR检测成软骨相关 mRNA II型胶原蛋白、蛋白多糖、TGF- β 、SOX9, 以及与软骨去分化相关 mRNA MMP13、I型胶原蛋白; Western blotting检测II型胶原蛋白、蛋白聚糖、TGF- β 及MMP13蛋白表达; 同时对细胞内葡萄糖、ATP、乳酸含量进行检测, 评估各组软骨细胞能量代谢状态。**结果** 形态学观察显示微重力组、微重力-威灵仙组软骨细胞保持良好形态, 空白组、威灵仙组梭形细胞增多。与空白组相比, 模拟微重力培养条件与威灵仙提取物均能提高软骨细胞48, 72h的增殖活性, 降低细胞凋亡率, 上调蛋白聚糖、II型胶原蛋白、TGF- β 的蛋白及mRNA表达, 降低MMP13的蛋白及mRNA表达, 上调SOX9 mRNA表达, 降低I型胶原蛋白 mRNA表达, 上调软骨细胞内葡萄糖、ATP、乳酸含量, 两者结合效果最为显著($P < 0.01$)。**结论** 模拟微重力培养环境与威灵仙提取物均能够促进软骨细胞能量代谢, 保持增殖活性以及软骨细胞表型维持, 而二者联合应用可以发挥协同作用。

关键词: 威灵仙; 模拟微重力; 软骨细胞; 表型维持; 能量代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)01-0012-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.01.003

引用本文: 涂鹏程, 马勇, 郭杨, 等. 模拟微重力环境下威灵仙维持兔膝关节软骨细胞表型的效应与机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(1): 12-19.

Effects of *Clematis Chinensis* Osbeck Mediated by Simulated Microgravity Environment on Chondrocyte Phenotypic Maintenance

TU Pengcheng^{1,2ab}, MA Yong^{1,2abc}, GUO Yang^{1,2ab*}, PAN Yalan^{2ad}, WU Chengjie^{1,2ab}, YANG Guanglu^{1,2ab}, SUN Jie^{1,2ab}, WANG Lining^{1,2ac}(1.Department of Orthopedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2.Nanjing University of Chinese Medicine, a.Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, b.First Clinical Medical College, c.School of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, d.Nursing Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect and mechanism of the extract of *Clematis chinensis* Osbeck(CCO) on the phenotypic maintenance of rabbit chondrocytes in simulated microgravity culture environment. **METHODS** Rotary Cell Culture system(RCC) was used to simulate microgravity environment *in vitro*, and the extract of CCO was used to interfere with chondrocyte. The rabbit knee joint cartilage cells were extracted and divided into 4 groups: blank(two dimensions on plate), CCO(two dimensions on plate, with CCO), microgravity group(cultured in RCC), RCC-CCO(cultured in RCC, with CCO). All were cultured for 7 d. Morphological changes of chondrocytes were observed. Chondrocyte proliferation was detected by CCK8 and apoptotic rate were detected using flow cytometry. The chondrogenic differentiation related mRNA expression of Collagen type II, aggrecan, TGF- β , SOX9 and chondrogenic dedifferentiation related mRNA MMP13, collagen type I were detected. The protein expression of type II collagen, aggrecan, TGF- β and MMP13 were detected by Western blotting. And energy metabolism was assessed by detecting concentration of intracellular glucose, ATP and lactate. **RESULTS** Chondrocytes in RCC group and RCC-CCO group maintained good morphology, while the spindle cells in control group and CCO group increased. Compared with the Control group, both the microgravity conditions and the CCO could increase the proliferation activity of chondrocytes at 48 h and 72 h, reduce the apoptotic rate of chondrocytes. Then, they could up-regulate the protein and mRNA expression of

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673995); 江苏高校优势学科建设工程项目(苏政办发[2018]87号); 江苏省自然科学基金项目(BK20151007); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX17_1308); 教育部国家级大学生创新创业训练计划项目(201810315008)

作者简介: 涂鹏程, 男, 博士生 E-mail: 934926797@qq.com *通信作者: 郭杨, 男, 博士, 副教授 E-mail: drguoyang@njucm.edu.cn

proteoglycan, type II collagen and TGF- β , decrease MMP13 protein and mRNA expression, up-regulate SOX9 mRNA expression, decrease type I collagen mRNA expression, and up-regulate glucose, ATP, and lactic acid content in chondrocytes. Combining of the two was more significant ($P < 0.01$). **CONCLUSION** The simulated microgravity culture environment and the extract of CCO can promote the energy metabolism of chondrocytes, maintain the proliferative activity and the phenotype of chondrocytes, and the combined application of the two can play a synergistic role.

KEYWORDS: *Clematis chinensis* Osbeck; microgravity; chondrocyte; phenotype maintenance; energy metabolism

关节软骨损伤是临床骨科常见疾病, 由于软骨自我修复能力低, 因此一旦损伤难以修复^[1]。软骨组织工程技术是将种子细胞、生长因子和细胞支架相结合, 用于修复关节软骨缺损的一种极具前景的方式^[2]。但种子细胞在体外扩增培养过程中易发生增殖能力低下、基质分泌降低等退行性改变^[3], 影响工程软骨的构建。如何获取表型良好、增殖旺盛的软骨细胞是软骨组织工程所面临的关键问题之一。

课题组前期研究显示, 威灵仙提取物能够发挥类生长因子的作用, 刺激软骨细胞增殖、分化^[4]。但软骨细胞是一种力效应细胞, 体外平面培养会使软骨细胞难以适应体内力学环境的刺激。模拟微重力环境是利用旋转微重力细胞培养系统来悬浮培养细胞, 能够提供剪切力、流体静压力等力学刺激^[5-6]。基于此, 该研究将模拟微重力培养技术应用于组织工程软骨细胞的培养过程, 结合威灵仙提取物的类生长因子作用, 观察微重力培养联合威灵仙提取物对体外兔膝关节软骨细胞表型维持的作用及机制。

1 材料

1.1 动物

4 周龄健康普通级新西兰大白兔 2 只, 体质量为(500±50)g, ♂, 南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供, 本批合格证号为 No.202032387, 动物使用许可证号为 SYXK(苏)2018-0048, 实验动物伦理号为 201910A052。

1.2 试剂

II型胶原酶(中国美仑, 货号: MB2665); 阿利新蓝染液(中国雷根, 货号: DG0042); 胎牛血清、低糖 DMEM 培养基(以色列 BioInd, 货号分别为 04-010-1, 01-051-1ACS); 威灵仙提取物(中国奥晶, 萃取率 30 : 1, 批号: 20180720); 葡萄糖、ATP、乳酸检测试剂盒(中国南京建成, 货号分别为 F006-1-1, A095-1-1, A020-1-2); Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒(美国福麦斯, 货号: FMSAVPE-100); TB Green RT-qPCR Master Mix 试剂盒、逆转录试剂盒(日本 TaKaRa, 货号分

别为 RR420A, RR036Q); 引物合成(上海生工); 小鼠蛋白聚糖抗体(美国 Thermo, 货号: MA3-16888); 小鼠II型胶原抗体(美国 Novus, 货号: NB600-844); 小鼠转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)抗体、基质金属蛋白酶 13(metalloproteinase-13, MMP13)抗体(美国 Abcam, 货号分别为 ab216483, ab231217); 小鼠 GAPDH 抗体(中国 Proteintech, 货号: 60004-1); 兔抗小鼠二抗(美国 Affinity, 货号: S0002)。

1.3 仪器

HERACELL151 型细胞培养箱(美国 Thermo); 3DCB4 型液动力聚焦细胞培养系统(美国 CELLTECH); EnSpire Victor x4 型酶标仪(美国 Millipore); Tanon5200CE 型化学发光成像仪(中国天能); Applied Biosystems 7500 型 PCR 自动化分析仪(美国 ABI); PowerPac™ Basic 电泳仪(美国 BIO-RAD); IX73 型倒置式荧光显微镜(日本 Olympus)。

2 方法

2.1 兔膝关节软骨细胞分离、培养与鉴定

4 周龄兔空气栓塞处死后, 膝关节备皮消毒, 无菌分离膝关节, 刀片削下关节软骨片, 剪碎至 $<1\text{ mm}^3$ 软骨粒, 0.2%II型胶原酶 37 °C 消化 6 h, 100 μm 滤网过滤后离心得软骨细胞, 以低糖 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、1%双抗)重悬, 接种至培养皿培养, 隔 2 d 换液, 长满底面 70%~80% 传代, P3 代细胞用于实验。阿利新蓝染色鉴定: P3 代软骨细胞接种至无菌玻片, 待细胞贴壁后生长至 60% 左右, 经 PBS 漂洗, 4%多聚甲醛固定, 阿利新蓝染液浸染, 洗净残余染液后, 普通倒置显微镜下观察拍照。

2.2 模拟微重力环境下威灵仙提取物干预软骨细胞

P3 代软骨细胞随机分为空白组、威灵仙组、微重力组和微重力-威灵仙组 4 组。空白组: 平面培养, 无任何干预。威灵仙组: 在空白组培养基中加入终浓度 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的威灵仙提取物干预 7 d, 2~3 d 更换培养基, 平面培养传代 1 次。微重力组: 利用液动力聚焦细胞培养系统, 在培养仓模拟微

重力环境培养细胞。微重力-威灵仙组：在微重力组培养基中加入终浓度 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的威灵仙提取物，干预 7 d，2~3 d 更换培养基，平面培养传代 1 次，微重力培养不传代。

2.3 CCK-8 检测软骨细胞的增殖活力

收集各组细胞，使用空白培养基以每孔 4×10^4 个接种至 96 孔板，每组设 5 个复孔， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24, 48, 72 h 后，每孔加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{L}$ ，静置于培养箱内孵育 2 h，酶标仪测定 450 nm 处吸光度值，根据如下公式计算各组软骨细胞相对于空白组的增殖率：细胞增殖百分比 = $[(A-C)/(B-C)] \times 100\%$ 。A 为实验组吸光度值(含培养基、各实验组软骨细胞、CCK8 溶液的吸光度值)；B 为空白组吸光度值(含培养基、空白组软骨细胞、CCK8 溶液的吸光度值)；C 为对照组吸光度值(仅含培养基、CCK8 溶液的吸光度值)。

2.4 各组软骨细胞内葡萄糖、ATP、乳酸含量检测

收集各组培养 7 d 后的软骨细胞， $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，5 min，离心收集细胞沉淀，PBS 离心洗涤 2 遍，最后用 PBS 重悬软骨细胞，调整细胞浓度至 10^6 mL^{-1} ，吹打混匀后，在冰水浴条件下，利用超声粉碎机进行粉碎，400 mA，每次 5 s，间隔 10 s 反复 3~5 次，粉碎之后离心取上清液，按照南京建成生物工程研究所的 ATP 含量测试盒、乳酸测试盒、葡萄糖(Glu)测试盒说明书加入工作液，孵育后利用分光光度计分别检测 636, 530, 505 nm 波长处的吸光度值，设置空白管调零，标准品管对照，并根据以下公式进行计算：含量 = $(\text{OD}_{\text{实验待测管}} - \text{OD}_{\text{空白管}}) / (\text{OD}_{\text{标准品管}} - \text{OD}_{\text{空白管}}) \times \text{标准管浓度}$ 。

2.5 实时定量 PCR 检测 II 型胶原、蛋白聚糖、TGF- β 、SOX9、MMP13、I 型胶原的 mRNA 表达

各组干预 7 d 后的细胞，提取总 RNA，并经反转录制备 cDNA，根据 SYBR Green RT-qPCR 试剂盒配制反应体系，条件为预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s，变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s，退火延伸 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s，40 个循环。以 GAPDH 为内参基因，得到各组样本 C_t 值，根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行半定量计算分析，具体计算公式如下，引物序列见表 1。

$$\Delta C_{t(\text{实验组})} = C_{t(\text{目标基因, 实验组})} - C_{t(\text{GAPDH, 实验组})};$$

$$\Delta C_{t(\text{空白组})} = C_{t(\text{目标基因, 空白组})} - C_{t(\text{GAPDH, 空白组})};$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{实验组})} - \Delta C_{t(\text{空白组})};$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{表达量的比值}。$$

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	引物序列	
GAPDG	上游	GATGCTGGTGCCGAGTAC
	下游	GCTGAGATGATGACCCTTTTGG
II型胶原	上游	CTGGTGGAGCAGCAAGAGC
	下游	CAGGCGCAGGAAGGTCAT
TGF- β	上游	GGTCACCTTCTGCCCGTCT
	下游	TCTCGGTATCCCACGAAAGAAACG
蛋白聚糖	上游	GCTACCACCAGCTACGAAATAG
	下游	CCAGATAGGTCTCCACTGACT
SOX9	上游	ACCCGCACCTGCACAAC
	下游	CAGGCGCAGGAAGGTCAT
MMP13	上游	TCTACACCTACACCGCAAGAGTC
	下游	CGGAGACTGGTAATGGCATCAAGG
I型胶原	上游	AGGGCCAAGACGAAGACATC
	下游	AGATCACGTCATCGACAACA

2.6 Western blotting 检测 II 型胶原、蛋白聚糖、TGF- β 及 MMP13 蛋白表达

取干预 7 d 后的各组细胞，RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，经 BCA 法定量后，取等量蛋白稀释为同体积，加入上样缓冲液，混匀，沸水浴 10 min，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(90 min)，再经电转印(60 min)，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，一抗(1 : 1 000 稀释) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜，二抗(1 : 10 000 稀释)室温孵育 2 h，滴加 ECL 化学发光液，利用凝胶成像系统检测 II 型胶原、蛋白聚糖、TGF- β 及 MMP13 蛋白表达，利用 Image J 软件测定条带灰度值。

2.7 流式细胞术检测各组软骨细胞凋亡率

收集各组软骨细胞，取 1×10^6 个软骨细胞， $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞，加入 $5 \mu\text{L}$ Alexa Fluor 647 和 $10 \mu\text{L}$ $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的碘化丙锭溶液，移液器轻柔吹打均匀，室温避光孵育 15 min，尽快上流式细胞仪进行检测，数据经过 IDEAS 软件分析。

2.8 统计学分析

实验数据中计量资料以 $x \pm s$ 表示，使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，组间差异采用单因素方差分析和 SNK-q 检验分析，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 实验用软骨细胞状态

镜下观察，实验用软骨细胞状态良好，分离培养的兔膝关节软骨细胞贴壁生长，细胞呈多角形，界限清晰，呈现典型铺路石状；阿利新蓝染色阳性，软骨细胞蓝染，细胞外基质及胞质可见深蓝色异染。见图 1。

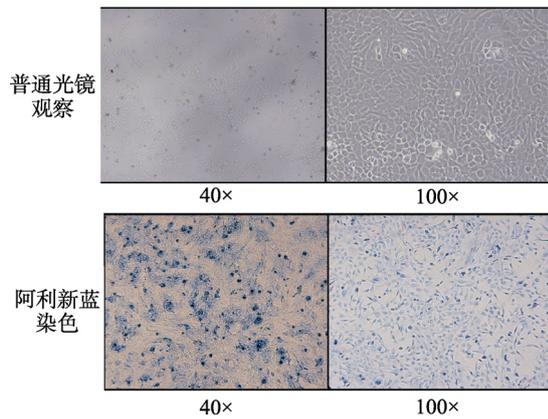


图1 细胞形态图
Fig. 1 Cell morphology

3.2 模拟微重力培养环境促进软骨细胞保持良好形态

培养过程中可见,平面培养细胞在传代后细胞形态欠规则,生长突变大变长,而微重力下细胞呈球形悬浮,细胞相互黏附成团;培养7 d后,平面培养的细胞逐渐由多角形向梭形改变,而微重力培养的细胞重新接种至培养皿后可见形态规则,细胞间界限明显,保持良好的软骨细胞形态。结果见图2。

3.3 模拟微重力联合威灵仙提取物提高软骨细胞增殖活性

与空白组相比,24 h后威灵仙组细胞增殖活性显著增高($P<0.05$),而微重力-威灵仙组细胞增殖活性有下降趋势,微重力组明显降低($P<0.05$),微重力组和微重力-威灵仙组组间无统计学差异;48 h后,威灵仙组、微重力组及微重力-威灵仙组软骨细胞增殖活性均明显高于空白组($P<0.05$),但3组之间并无统计学差异;72 h后,相对空白组,威灵仙组、微重力组及微重力-威灵仙组仍保持较

高的增殖活性($P<0.05$),但3组之间并无统计学差异。CCK-8检测各组软骨细胞增殖活力结果见图3。
3.4 模拟微重力联合威灵仙提取物降低软骨细胞凋亡率

利用 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒在流式细胞仪检测软骨细胞凋亡率,分析结果显示威灵仙提取物及微重力培养均能降低软骨细胞的凋亡率,其中主要以能够降低软骨细胞的晚期凋亡为主,单用微重力培养或威灵仙提取物干预均有效果($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而微重力与威灵仙联合培养后软骨细胞凋亡率降低尤其显著($P<0.01$),与单独使用威灵仙提取物干预相比差异有统计学意义($P<0.05$),与微重力培养组相比差异无统计学意义。结果见图4。

3.5 模拟微重力联合威灵仙提取物促进软骨细胞表型相关分子表达

Western blotting 检测各组软骨细胞表型相关标志蛋白结果显示,与空白组相比,其余3组的II型胶原、蛋白聚糖、TGF- β 表达均有上调,尤其以微重力-威灵仙组最为显著($P<0.01$);而与空白组相比,其余3组 MMP13 表达均显著降低($P<0.01$),微重力-威灵仙组最为显著($P<0.01$)。结果见图5。

与 Western blotting 结果一致,RT-qPCR 的结果显示,威灵仙、微重力均能促进成软骨细胞相关分子II型胶原、蛋白聚糖、SOX9、TGF- β 的表达,抑制软骨细胞退行性改变相关分子 MMP13、I型胶原的分泌,尤其是微重力-威灵仙组二者能够发挥协同作用,调节II型胶原、SOX9、TGF- β 、I型胶原表达的效果更加显著($P<0.01$),与单用威灵仙或微重力相比差异有显著的统计学意义($P<0.01$)。结果见图6。

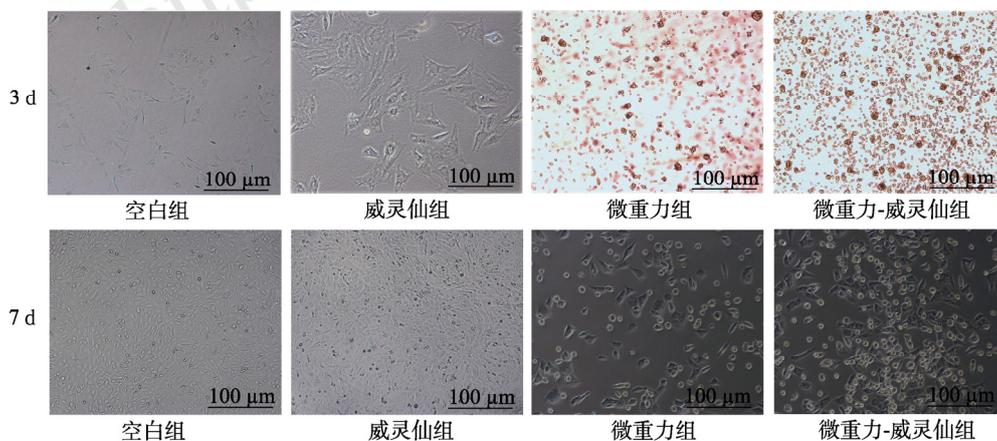


图2 普通光镜观察的各组细胞形态(100x)
Fig. 2 Cell morphology of each group observed by ordinary light microscope(100x)

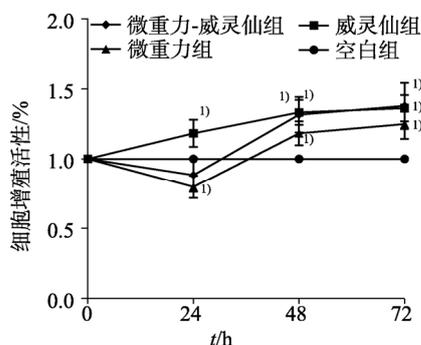


图3 模拟微重力联合威灵仙提取物对软骨细胞增殖活性的影响
与空白组对比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effect of microgravity combined with *Clematis chinensis* Osbeck on proliferative activity of chondrocytes
Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$.

3.6 模拟微重力联合威灵仙提取物能够提高软骨细胞葡萄糖、乳酸、ATP 含量

通过对各组软骨细胞内葡萄糖、乳酸、ATP 含量的检测来了解软骨细胞的能量代谢状态。结果显示, 与空白组相比, 其余 3 组细胞葡萄糖、乳酸含量均明显上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 微重力、微重力-威灵仙组 ATP 含量显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。并且微重力-威灵仙组比其他 2 组 ATP 的升高更加明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 其葡萄糖摄入量的提高与微重力组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 7。

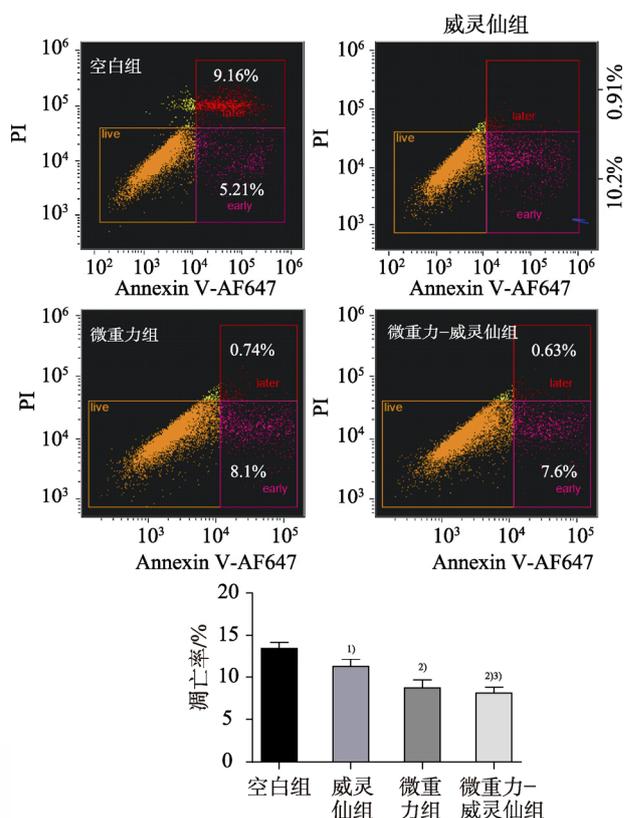


图4 流式细胞技术检测软骨细胞凋亡率的统计结果
与空白组对比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与威灵仙组对比, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Statistical results of chondrocyte apoptosis rate detected by flow cytometry
Compared with the blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with the *Clematis chinensis* Osbeck group, ³⁾ $P < 0.05$.

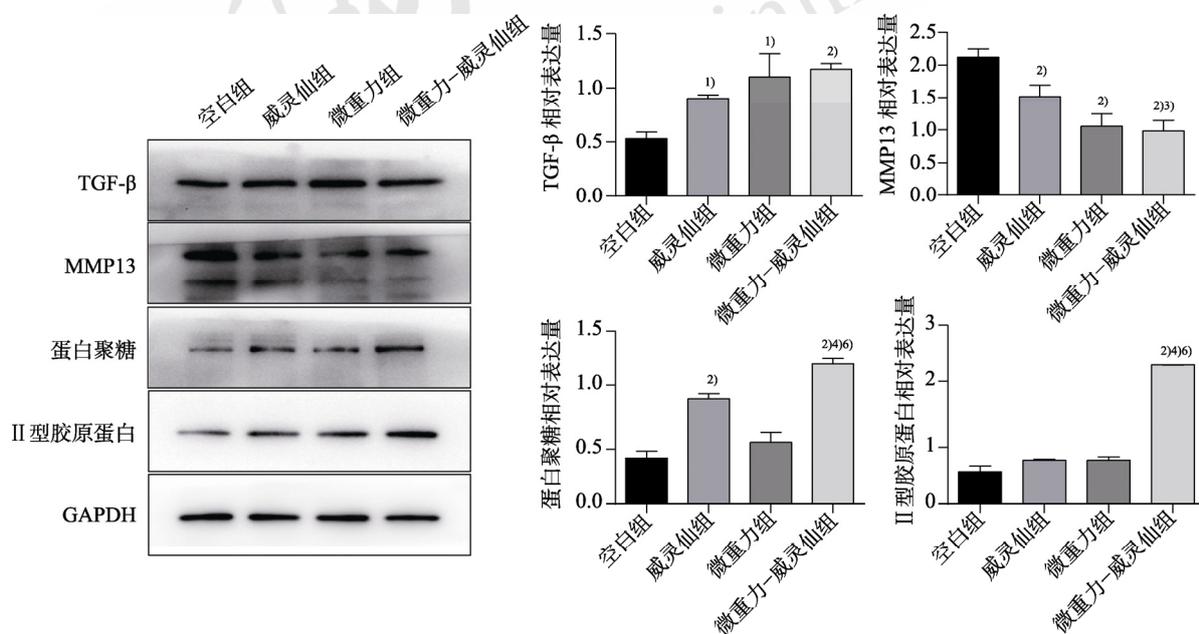


图5 微重力环境结合威灵仙提取物对软骨细胞蛋白表达的影响

与空白组对比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与威灵仙组对比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与微重力组对比, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Effect of microgravity environment combined with extract of *Clematis chinensis* Osbeck on protein expression of chondrocytes
Compared with the blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with the *Clematis chinensis* Osbeck group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; compared with the microgravity group, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$.

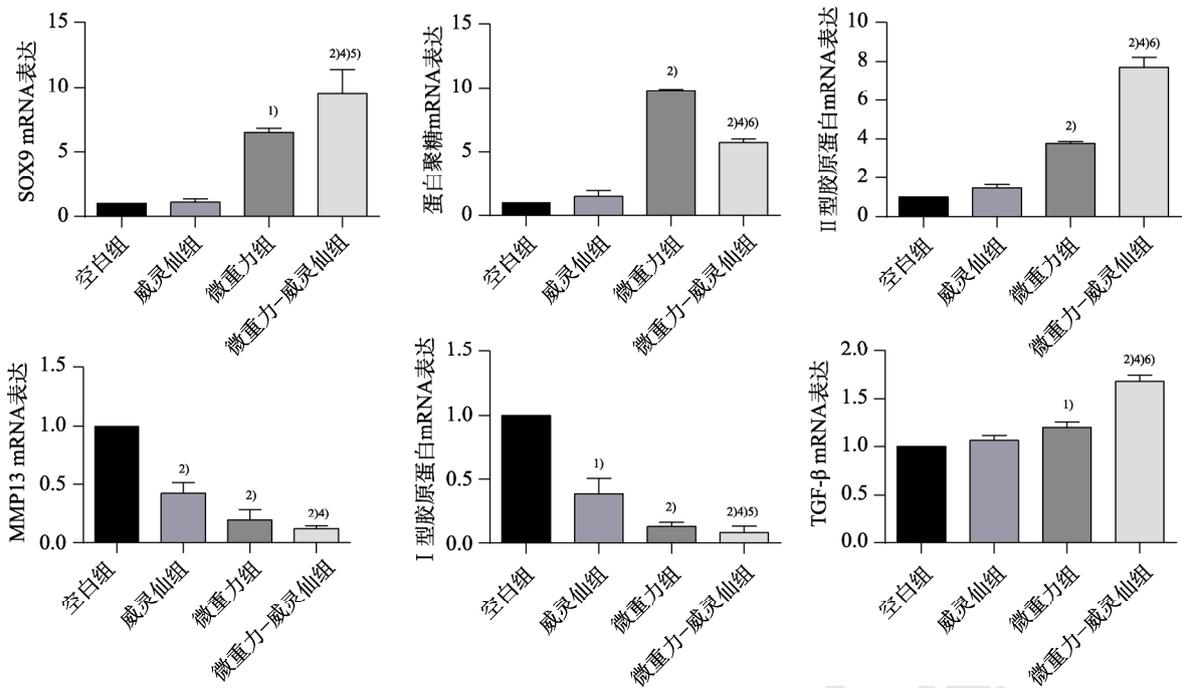


图6 微重力环境结合威灵仙提取物对软骨细胞相关 mRNA 表达的影响

与空白组对比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与威灵仙组对比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与微重力组对比, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Effect of microgravity environment combined with extract of *Clematis chinensis* Osbeck on mRNA expression of chondrocytes Compared with the blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with the *Clematis chinensis* Osbeck group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; compared with the microgravity group, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$.

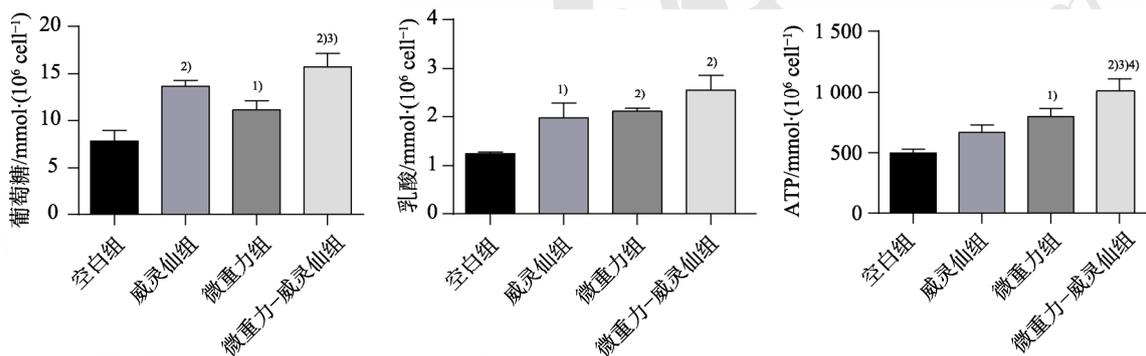


图7 微重力环境结合威灵仙提取物对软骨细胞能量代谢的影响

与空白组对比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与威灵仙组对比, ³⁾ $P < 0.01$; 与微重力组对比, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 7 Effect of microgravity environment combined with extract of *Clematis chinensis* Osbeck on energy metabolism of chondrocytes Compared with the blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with the *Clematis chinensis* Osbeck group, ³⁾ $P < 0.01$; compared with the microgravity group, ⁴⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

关节软骨是一种高度分化的无血管组织, 损伤后难以修复^[1]。软骨组织工程通过体外扩增培养软骨种子细胞, 构建种子细胞-生长因子-细胞支架复合体, 体内移植来修复软骨缺损。研究显示, 离体培养的软骨细胞在传代过程中会逐渐发生退行性改变^[7-8], 表现为梭形变或肥大形变, 软骨细胞外基质大分子(主要是II型胶原蛋白和蛋白聚糖)的合成减少, 转而分泌I型胶原、MMPs 等^[9]。如何获取大量良好分化表型的软骨细胞是软骨组织工程所面临的关键问题。

软骨细胞作为一种力学效应细胞^[10-11]。适宜力学负荷能够促进关节软骨基质代谢平衡、刺激软骨生成、改善软骨的生物力学刚度^[12-14]。长期体外平面培养的软骨细胞可能会失去其力学特性, 在移植入体内后难以适应体内的力学负荷。体外模拟微重力环境能够将本来贴壁生长的软骨细胞悬浮培养, 使其所受重力向量随机分布, 并且提供剪切力、流体静压力等力学刺激^[15-16]; 有研究显示微重力培养环境能够提高间充质干细胞的软骨分化能力^[17-18], 由此可见, 模拟微重力培养环境或可用于体外扩增软骨种子细胞, 在大量

培养软骨种子细胞的同时维持软骨细胞良好表型。威灵仙是重要的祛风胜湿中药，其提取物中含多种皂苷、黄酮类成分，能够发挥类生长因子的作用，刺激软骨细胞增殖，促进关节软骨缺损的修复^[19]。课题组前期研究显示威灵仙提取物(1 g·L⁻¹)能促进兔膝关节软骨细胞增殖，关节腔注射威灵仙联合壳聚糖/β-甘油磷酸二钠凝胶复合软骨细胞移植，比空白凝胶复合软骨细胞移植能更好地修复关节软骨缺损^[20-21]。

基于此，本次实验模拟微重力培养技术应用威灵仙提取物促进组织工程软骨种子细胞培养过程，观察模拟微重力培养联合威灵仙提取物对体外兔膝关节软骨细胞表型维持的作用。结果显示，模拟微重力培养环境联合威灵仙提取物能够维持软骨细胞的多角形，排列规则的形态学特征，减少软骨细胞的梭形变和肥大型变，并且能够显著上调II型胶原蛋白、蛋白聚糖、TGF-β、SOX9等成软骨分子的表达，下调I型胶原蛋白、MMP13等软骨退行性变相关分子的分泌，联合应用的作用效果显著优于单用模拟微重力培养或威灵仙提取物培养。通过对软骨细胞内葡萄糖、乳酸、ATP的检测可以了解到，威灵仙提取物、模拟微重力培养环境均可增加软骨细胞对葡萄糖的摄取，增加软骨细胞ATP的生成量与乳酸水平，二者联合的效果更加显著，与二者单用相比差异均有统计学意义；这一结果说明威灵仙提取物及模拟微重力培养系统能够促进软骨细胞的能量代谢过程，保持软骨细胞高度有序的代谢状态，二者联合有协同作用，这可能是保持软骨细胞增殖状态、维持软骨细胞表型的重要原因之一。

综上，模拟微重力培养环境、威灵仙提取物均能够不同程度的提高软骨细胞的增殖活性，维持软骨细胞表型，延缓软骨细胞的体外扩增过程中出现的退行性改变，提高软骨细胞的能量代谢状态，二者联合应用有显著的协同增效作用，这种培养方式或可在一定程度上改善组织工程软骨构建过程中体外培育的种子细胞发生的退行性改变，也为中药活性成分联合细胞生物力学技术的应用提供了一种可行的思路。

REFERENCES

[1] CHEN D, SHEN J, ZHAO W W, et al. Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism[J]. Bone Res, 2017(5): 16044. Doi: 10.1038/boneres.2016.44.

[2] ASADI N, ALIZADEH E, SALEHI R, et al. Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: A review[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(3): 465-471.

[3] CHEN W S, SHENG P Y, HUANG Z Y, et al. MicroRNA-381 regulates chondrocyte hypertrophy by inhibiting histone deacetylase 4 expression[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1377.

[4] MA Y, ZHANG Y S, CHEN J F, et al. Effect of Weilingxian on proliferation of rabbit knee articular chondrocytes cultured *in vitro* and mRNA expression of transforming growth factor-beta 1[J]. J Clin Rehabil Tiss Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2010, 14(11): 1901-1906.

[5] LEONG W, WANG D A. Cell-laden polymeric microspheres for biomedical applications[J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(11): 653-666.

[6] YU B, YU D, CAO L, et al. Simulated microgravity using a rotary cell culture system promotes chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells *via* the p38 MAPK pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 414(2): 412-418.

[7] ROSENZWEIG D H, CHICATUN F, NAZHAT S N, et al. Cartilaginous constructs using primary chondrocytes from continuous expansion culture seeded in dense collagen gels[J]. Acta Biomater, 2013, 9(12): 9360-9369.

[8] YIN F, CAI J F, ZEN W, et al. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in the TGF-β1-immobilized PLGA-gelatin scaffold[J]. Stem Cell Rev Rep, 2015, 11(3): 453-459.

[9] TANG Q, HAO L, PENG Y, et al. RNAi silencing of IL-1β and TNF-α in the treatment of post-traumatic arthritis in rabbits[J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 86(6): 1466-1470.

[10] WILUSZ R E, SANCHEZ-ADAMS J, GUILAK F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage[J]. Matrix Biol, 2014(39): 25-32.

[11] CORREA D, LIETMAN S A. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017(62): 67-77.

[12] HELMARK I C, MIKKELSEN U R, BØRGLUM J, et al. Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: A randomized controlled trial[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R126.

[13] MUSUMECI G, LORETO C, LEONARDI R, et al. The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(3): 274-284.

[14] MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO F M, et al. Physical activity ameliorates cartilage degeneration in a rat model of aging: A study on lubricin expression[J]. Scand J Med Sci Sports, 2015, 25(2): e222-e230. Doi: 10.1111/sms.12290.

[15] ETHIRAJ P, LINK J R, SINKWAY J M, et al. Microgravity modulation of syncytin-A expression enhance osteoclast formation[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7): 5696-5703.

[16] WU X, LI S H, LOU L M, et al. The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(2): 331-336.

[17] LEI X H, DENG Z L, ZHANG H S, et al. Rotary suspension culture enhances mesendoderm differentiation of embryonic

- stem cells through modulation of wnt/ β -catenin pathway[J]. Stem Cell Rev Rep, 2014, 10(4): 526-538.
- [18] WU X, CAI Z D, LOU L M, et al. The effects of inhibiting hedgehog signaling pathways by using specific antagonist cyclopamine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 5966-5977.
- [19] 周效思, 周凯, 谭安雄, 等. 威灵仙对兔膝关节结构和功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2454-2456.
- [20] MA Y, CHEN J F, ZHANG Y S, et al. Repair of rabbit knee articular cartilage defect by the injectable chitosan/beta-glycerophosphate gel encapsulating allograft chondrocytes and the intervention of Weilingxian[J]. J Clin Rehabil Tiss Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2010, 14(16): 2864-869.
- [21] PAN Y L, MA Y, GUO Y, et al. Effects of *Clematis chinensis* Osbeck mediated by low-intensity pulsed ultrasound on transforming growth factor- β /Smad signaling in rabbit articular chondrocytes[J]. J Med Ultrason, 2019, 46(2): 177-186.
- 收稿日期: 2021-03-17
(本文责编: 蔡珊珊)

本刊 2021 年度特邀审稿专家名单

本刊 2021 年特邀请以下医药专家 218 人(以姓名拼音为序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿, 并提出修改意见, 保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者, 在此表示衷心的感谢!

蔡 圣	蔡 宇	曹 戟	陈碧莲	陈丹菲	陈红梅	陈 珏	陈枢青	陈素红
陈文腾	陈永正	陈云雨	程国华	程洪强	程科军	程汝滨	戴海斌	翟科峰
董晓武	董 宇	董作军	杜晓翔	方 罗	方伟杰	冯 瑛	傅 力	傅旭春
甘礼社	高建青	高丽娟	葛卫红	龚行楚	郭建军	郭建明	郭瑞臣	郭晓迪
郭 勇	韩 旻	韩 钢	韩 奇	何俏军	何 昱	贺争鸣	洪燕君	胡巧红
胡 英	黄永焯	黄 真	贾 飞	简曦昱	江 波	姜赛平	姜昕鹏	蒋 程
蒋剑平	蒋利和	金银秀	居 靖	康 玉	柯越海	李 波	李范珠	李 飞
李功华	李沛波	李清林	李绍平	李文龙	李 新	李新刚	李迎迎	梁 广
梁锦锋	梁文权	刘 滔	刘 斌	刘丙进	刘 睿	柳志强	楼 燕	卢红阳
卢晓阳	陆国红	罗文华	骆 翔	骆松梅	吕圭源	马忠俊	毛根祥	毛培江
苗明三	缪 静	倪韶青	潘 杰	裴宇盛	覃骊兰	秦路平	邱利焱	邱晓燕
仇雅琪	阮 昊	阮叶萍	邵加安	申屠建中	盛 荣	施 菁	史天陆	寿 旦
寿旗扬	帅 棋	宋剑锋	宋沁馨	孙德清	孙世光	孙晓译	谭亲友	汤晓玲
唐 莲	陶巧凤	王长连	王海钠	王 建	王建平	王金朝	王娜妮	王启钦
王 俏	王溶溶	王伟影	王晓颖	王新财	王泽民	王 增	王知坚	王志安
魏 炜	魏晓红	翁勤洁	吴 斌 ¹	吴 斌 ²	吴嘉琪	吴耀东	吴永江	向 铮
谢 诚	谢升谷	谢升阳	辛传伟	幸海燕	熊 山	熊 阳	徐云根	许东航
许明哲	燕 茹	杨 波 ¹	杨 波 ³	杨 峰	杨建宏	杨江丰	杨 科	杨明华
杨伟峰	杨 欣	杨振中	姚建标	叶益萍	应美丹	应晓英	应 雪	应 茵
余露山	俞振伟	袁 弘	原永芳	曾 苏	詹金彪	张 博	张 翀	张得钧
张建康	张建永	张军民	张立将	张水利	张翔南	张信岳	张秀华	张 岩
张 耀	张轶雯	张志清	张尊建	章超凡	赵华军	赵梦丹	赵青威	赵瑞芝
赵维良	赵孝斌	赵永星	郑 斌	郑彩虹	郑高利	郑金琪	郑小玲	周长新
周建良	周 萍	周 权	周越菡	周 展	朱 虹	朱建国	朱 炯	朱全红
朱婉萍	朱余兵							

注: ¹单位为浙江大学; ²单位为上海交通大学医学院附属仁济医院; ³单位为浙江中医药大学。