

淫羊藿苷对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤的保护作用及其机制

孟如丹¹, 胡张捷², 毛强³ (1. 杭州市富阳中医骨伤医院, 杭州 311400; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 探究淫羊藿苷(icariin, ICA)对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤的保护作用及相关机制。方法 分离 SD 新生大鼠软骨细胞, 随机分为对照组、H₂O₂ 模型组、ICA 低剂量组、ICA 中剂量组、ICA 高剂量组; 采用 CCK8 法检测各组细胞增殖能力的变化; 采用 ELISA 试剂盒检测各组细胞中活性氧(reactive oxygen, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)以及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的表达情况; 流式细胞术检测各组细胞周期情况, 并计算增殖指数(proliferation index, PI); Hoechst 染色观察各组细胞核凋亡情况; 分别采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blotting 检测凋亡相关因子及 Nrf2/HO-1 通路的表达情况。**结果** 与对照组相比, H₂O₂ 模型组细胞增殖能力降低, ROS、MDA 含量升高, SOD、CAT 及 GSH-Px 含量下降, 细胞凋亡情况加重; 经 ICA 干预后, 软骨细胞的增殖能力上升, ROS、MDA 含量下降, SOD、CAT 及 GSH-Px 含量增加, 并且 ICA 能够有效抑制软骨细胞凋亡, 上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达。**结论** ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤具有保护作用, 能够抑制软骨细胞凋亡, 其机制跟 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

关键词: 淫羊藿苷; 氧化损伤; 凋亡; Nrf2/HO-1 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3115-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.011

引用本文: 孟如丹, 胡张捷, 毛强. 淫羊藿苷对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3115-3121.

Protective Effect of Icariin on H₂O₂-induced Chondrocyte Oxidative Damage and Its Mechanism

MENG Rudan¹, HU Zhangjie², MAO Qiang³ (1. Hangzhou Fuyang Traditional Chinese Medicine Bone Injury Hospital, Hangzhou 311400, China; 2. Department of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the protective effect of icariin(ICA) on H₂O₂-induced chondrocyte oxidative damage and its related mechanism. **METHODS** SD neonatal rat chondrocytes were isolated and randomly divided into control group, H₂O₂ model group, ICA low dose group, ICA medium dose group and ICA high dose group. CCK8 assay was used to detect the change of cell proliferation ability in each group. The expression of reactive oxygen(ROS), superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), catalase(CAT) and glutathione peroxidase(GSH-Px) in each group were detected by ELISA kit. Cell cycle of each group was detected by flow cytometry and proliferation index(PI) was calculated. Hoechst staining was used to observe the cell apoptosis in each group. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of apoptosis related factors and Nrf2/HO-1 pathway. **RESULTS** Compared with the control group, the proliferation ability of cells in the H₂O₂ model group was decreased, ROS and MDA contents were increased, SOD, CAT and GSH-Px contents were decreased, and cell apoptosis was increased. After ICA intervention, the proliferation ability of chondrocytes increased, ROS and MDA contents decreased, SOD, CAT and GSH-Px contents increased, and ICA could effectively inhibit chondrocyte apoptosis and up-regulate the expression of Nrf2 and HO-1 proteins. **CONCLUSION** ICA has a protective effect on H₂O₂-induced oxidative damage of chondrocytes and can inhibit chondrocyte apoptosis, and the mechanism is related to Nrf2/HO-1 pathway.

KEYWORDS: icariin; oxidative damage; apoptosis; Nrf2/HO-1 pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是目前临床上常见的慢性退行性关节病变, 以软骨关节破坏变性、骨质增生为主要特征^[1]。OA 多发于中老年人, 临床症状主要有关节疼痛, 肌肉沉重无力, 行走劳累加重等, 属于中医“骨痹、膝痹”范畴^[2]。氧化应激在人体中发挥着重要的生物学效应, 其造成

的氧化损伤能够通过生物膜功能或重要酶活性的降低, 进而导致不同程度的机体损伤^[3]。研究表明, OA 的发生与发展与氧化应激密切相关^[4]。淫羊藿苷(icariin, ICA)是从小檗科淫羊藿属植物淫羊藿的茎叶中提取的黄酮类物质, 具有改善心脑血管功能、调节内分泌、抗凋亡、抗炎及抗氧化等药

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603639)

作者简介: 孟如丹, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: 13675884866

E-mail: mrd1987@163.com

理作用^[5-6]。然而,关于 ICA 对软骨细胞氧化损伤的保护作用及相关的机制少有研究,因此,本研究通过从 SD 新生大鼠分离和培养软骨细胞,利用 H₂O₂ 诱导软骨细胞产生氧化应激,从改善增殖异常及抗凋亡的角度,探讨 ICA 对软骨细胞氧化损伤的保护作用,并进一步阐明其相关的分子机制。

1 仪器与材料

1.1 动物

SPF 级新生 24 h ♂ SD 大鼠 10 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0018;饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心屏障系统内,饲养条件室温(23±2)℃,相对湿度 60%~70%,本研究涉及的动物操作均符合浙江中医药大学动物中心管理规定和相关伦理学要求。

1.2 药物与试剂

ICA(南京泽朗医药科技有限公司,批号:20190407;纯度≥98%);DMEM/F12 细胞培养液(美国 Gibco 公司,批号:C2027010);CCK8 试剂盒(上海碧云天公司,批号:P0016);活性氧(reactive oxygen, ROS)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号分别为 20190507, 20190304, 20190612, 20190512, 20190324;H₂O₂、Hoechst 33258 染料(美国 Sigma 公司,批号:M1113, M1023);反转录试剂盒 Prime Script RT Reagent Kit 和 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 均购自日本 Takara 公司,批号分别为 WK190215, WK190219;抗体(Bax、Bcl-2、caspase-3、Nrf2、HO-1、GAPDH)均购自美国 CST 公司,货号分别为 5203, 15071, 9662, 12721, 86806, 5174。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州净化设备有限公司);Guava easyCyte 流式细胞仪(美国 Minipore 公司);7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);3300 Mini 化学发光成像系统(中国 CLInX 公司)。

2 方法

2.1 软骨细胞的培养与分组

将 SD 新生大鼠采用颈椎脱臼处死,刮取胫骨平台的关节软骨,用 PBS 洗涤 3 次后,用手术刀切成大约 1 mm³ 的块状,另加入 4 mL 0.2%的 II

型胶原酶。于 37 ℃培养箱进行消化,每 2 h 收集 1 次上清液,离心后除去上清液,加 DMEM/F12 完全培养基,重悬,接种在培养皿内,培养箱孵育 3 d 后换液,后每隔 2 d 换 1 次液,当细胞长至>95%时,用 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代。取第 3 代细胞进行试验,将细胞随机分成 5 组:对照组、H₂O₂ 模型组(0.1 mmol·L⁻¹ H₂O₂)、ICA 低剂量组(1×10⁻⁸ mol·L⁻¹ ICA)、ICA 中剂量组(1×10⁻⁷ mol·L⁻¹ ICA)、ICA 高剂量组(1×10⁻⁶ mol·L⁻¹ ICA)。

2.2 CCK8 法检测各组软骨细胞增殖活性

收集对数期的各组软骨细胞,以每孔 2 000 个细胞的密度接种于 96 孔板,置 37 ℃含有 5% CO₂ 的培养箱中孵育过夜。待细胞贴壁后吸去培养液,对照组和 H₂O₂ 模型组使用正常培养液,而 ICA 各剂量组分别加入不同浓度的 ICA 培养液培养。48 h 后吸去培养液,除对照组外均用 0.1 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 进行处理,24 h 后,采用 CCK8 试剂检测不同浓度淫羊藿苷处理 H₂O₂ 介导的软骨细胞活性。

2.3 ELISA 试剂盒检测各组软骨细胞 ROS、MDA、SOD、CAT、GSH-Px 的含量

将各组软骨细胞按照每孔 2 000 个细胞的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后轻吸去培养液,对照组和模型组使用正常培养液,而各剂量组分别加入不同浓度的 ICA 培养液培养,48 h 后吸去培养液,除对照组外均用 0.1 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 进行处理,24 h 后吸去细胞上清液,ELISA 法检测各组细胞上清液中 ROS 含量。PBS 洗 2 次,胰蛋白酶消化,4 ℃、1 000 r·min⁻¹ 离心,4 ℃超声波细胞粉碎机上破碎细胞,取裂解液 4 ℃、1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清用于 ELISA 检测 MDA、SOD、CAT、GSH-Px 的含量。

2.4 流式细胞术检测各组软骨细胞周期情况

取对数生长期的软骨细胞,按照细胞传代的方法,以细胞密度为每孔 3×10⁵ 个铺于 6 孔板中。待细胞贴壁 24 h 后,换为新鲜的完全培养基,按分组情况加入相应浓度的 ICA。药物作用 24 h 后,从培养箱中取出,吸取上清液,用 PBS 洗涤 2 次,各组待测细胞用胰酶消化,收集细胞,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,后弃上清,用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,离心去上清。70%预冷乙醇固定,4 ℃过夜。离心,弃去乙醇上清,加入预冷的 PBS 洗涤,离心弃上清。1 mL 冷 PBS 重悬细胞, RNase

(10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入碘化丙啶染料染色 5 min 后进行检测。计算增殖指数(proliferation index, PI)=(S+G₂/M)/(G₀/G₁+S+G₂/M)。

2.5 Hoechst 染色检测各组细胞核凋亡情况

各组细胞于 6 孔板内培养至贴壁, 按分组情况加入相应浓度的 ICA 药物, 药物作用 48 h 后吸去培养液, 除对照组外均用 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 进行处理, 24 h 后, PBS 洗 2 遍, Carnoy 固定液固定; PBS 洗涤 5 min, 室温下用 Hoechst 33342 工作液染色 15 min; PBS 洗涤 3 次后, 采用荧光显微镜拍照观察细胞核情况, 手动计数, 计算细胞凋亡率, 凋亡率=(凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

2.6 qRT-PCR 检测相关 mRNA 表达情况

取对数期的各组细胞以每孔 6×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 按分组情况加入相应浓度的 ICA 药物, 药物作用 24 h 后, 吸去培养基, PBS 洗 2 遍后, 采用 Trizol 试剂提取各组软骨细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒 Prime Script RT Reagent Kit 和 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR Kit 试剂盒说明书要求进行逆转录和 qRT-PCR。以 GAPDH 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各个基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

Tab. 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
BAX	CCCAGAGGTCTTTT CCGAG	CCAGCCATGATGGTTC TGAT
BCL-2	GGTGGGGTCATGTGT GTGG	CGGTTTCAGGTACTCAGT CATCC
CASPASE-3	CATGGAAGCGAATCA ATGGACT	CTGTACCAGACCGAGAT GTCA
NRF2	TCAGCGACGGAAGA GTATGA	CCACTGGTTTCTGACTG GATGT
HO-1	AAGACTGCGTTCCTG CTCAAC	AAAGCCCTACAGCAACT GTCG
GAPDH	GCGGGAGCGGATCCT AATA	TGGTGCATCCATGGGCT AC

2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达情况

取对数期的各组细胞以每孔 6×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 按分组情况加入相应浓度的药物, 药物作用 24 h 后, 吸去培养基, PBS 洗 2 遍后加入 RIPA 裂解液, 于冰上裂解 30 min, 提取各组细胞蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白浓度, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转印, 5%脱脂奶粉封闭。按照抗体说明书要求的比例, 用 5%脱脂奶粉稀释抗体, 加入相应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, 第 2 天加入相应二抗, 室温孵育 2 h 后 TBST 洗膜 3 次。ECL 浸泡后采用荧

光成像系统对图像进行扫描和分析, 检测各组细胞中 Bax、Bcl-2、caspase-3、Nrf2、HO-1 蛋白的表达变化。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 不同组间两两比较采用单因素方差分析; 组间两两比较, 采用两独立样本 t 检验, 当 $P<0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 ICA 对 H_2O_2 诱导的软骨细胞活性的影响

采用 CCK8 法检测各组软骨细胞增殖活性情况, 结果显示, 与对照组相比, H_2O_2 模型组的软骨细胞活性显著下降($P<0.05$); 与 H_2O_2 模型组相比, ICA 低剂量组软骨细胞活性无显著性差异, ICA 中、高剂量组软骨细胞活性明显增加($P<0.05$)。表明 ICA 能够有效改善 H_2O_2 作用下软骨细胞活性降低, 见图 1。

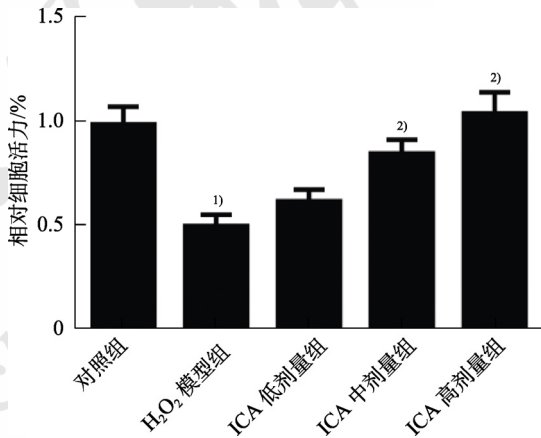


图 1 ICA 对 H_2O_2 诱导的软骨细胞活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$) 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 H_2O_2 模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effect of ICA on H_2O_2 -induced chondrocytes activity($\bar{x}\pm s, n=3$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with H_2O_2 model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.2 ICA 对 H_2O_2 诱导的软骨细胞氧化损伤相关因子的影响

各组软骨细胞中氧化损伤相关因子的表达情况结果显示, 与对照组相比, H_2O_2 模型组软骨细胞中 ROS 和 MDA 的表达量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), SOD、CAT 以及 GSH-Px 的表达量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 而与 H_2O_2 模型组相比, ICA 低剂量组各因子表达量无显著性差异, ICA 中、高剂量组 ROS 和 MDA 表达量显著降低($P<0.05$), SOD、CAT 以及 GSH-Px 表达量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤相关因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Effect of ICA on H₂O₂-induced oxidative damage related factors in chondrocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	ROS/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{prot}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}^{-1}$
对照组	0.12±0.01	8.32±1.24	34.08±5.33	24.54±3.08	267.25±11.64
H ₂ O ₂ 模型组	0.28±0.02 ¹⁾	23.40±0.57 ²⁾	16.96±1.22 ¹⁾	6.74±6.74 ²⁾	152.77±17.37 ¹⁾
ICA 低剂量组	0.21±0.01	18.37±0.63	19.47±0.12	10.57±3.31	185.86±6.88
ICA 中剂量组	0.18±0.01 ³⁾	17.12±1.29 ³⁾	24.92±0.64 ³⁾	12.51±1.66 ³⁾	205.50±12.42 ³⁾
ICA 高剂量组	0.13±0.01 ³⁾	14.95±0.35 ³⁾	27.46±2.70 ³⁾	18.72±0.23 ⁴⁾	219.56±3.08 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与 H₂O₂ 模型组比较, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with H₂O₂ model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

3.3 ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞周期和增殖指数的影响

各组软骨细胞周期分布情况显示, H₂O₂ 模型组较对照组 G₀/G₁ 期和 S 期细胞增加, G₂/M 期细胞减少; 与 H₂O₂ 模型组相比, ICA 加药组 G₀/G₁ 期和 S 期细胞逐渐减少, G₂/M 期细胞逐渐增加, 结果见图 2。由表 3 可知, 对照组软骨细胞增殖能力较强, PI 值高达 0.34, 与对照组相比, H₂O₂ 模型组 PI 值显著减小, G₀/G₁ 期细胞数量显著增多, S 期和 G₂/M 期细胞数量显著减少(P<0.05 或 P<0.01); 与 H₂O₂ 模型组相比, ICA 中、高剂量组 PI 值显著增高(P<0.05 或 P<0.01), G₀/G₁ 期细胞数量显著降低, S 期和 G₂/M 期细胞数量逐渐增多(P<0.05 或 P<0.01), 细胞增殖能力逐渐恢复。

3.4 ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞核凋亡的影响

Hoechst 33342 染料能够穿透细胞膜, 嵌入细胞核 DNA, 正常情况下细胞核呈蓝色, 细胞核发生凋亡时, 膜通透性增强, 染色体 DNA 结构发生改变, Hoechst 33342 进入量变大, 此时细胞核

表 3 ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞周期及增殖指数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 3 Effects of ICA on H₂O₂-induced chondrocyte cycle and proliferation index($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
对照组	66.23±3.95	25.05±2.79	8.72±1.19	0.34±0.04
H ₂ O ₂ 模型组	79.81±3.08 ²⁾	15.61±2.60 ¹⁾	4.57±0.49 ²⁾	0.20±0.03 ²⁾
ICA 低剂量组	73.87±3.35	21.10±2.48	5.03±0.89	0.26±0.03
ICA 中剂量组	70.97±3.09 ¹⁾	21.78±2.62 ³⁾	7.25±0.61 ³⁾	0.29±0.03 ³⁾
ICA 高剂量组	67.91±3.09 ²⁾	24.50±2.14 ³⁾	7.61±0.57 ⁴⁾	0.32±0.01 ⁴⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与 H₂O₂ 模型组比较, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with H₂O₂ model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

呈现亮蓝色, 结果见图 3。由图 3 可知, 对照组软骨细胞核着色均匀, 结构完整, 无明显核凋亡特征; 而 H₂O₂ 模型组中大量细胞核出现皱缩、碎裂, 染色程度明显增强, 表明出现大量的细胞核凋亡, IAC 各个剂量组中随着药物浓度的增大, 细胞核凋亡数量逐渐减少。与对照组相比, H₂O₂ 模型组细胞凋亡率显著升高(P<0.01); 与 H₂O₂ 模型组相比, IAC 低、中、高剂量组凋亡率均显著降低(P<0.05 或 P<0.01), 结果见表 4。

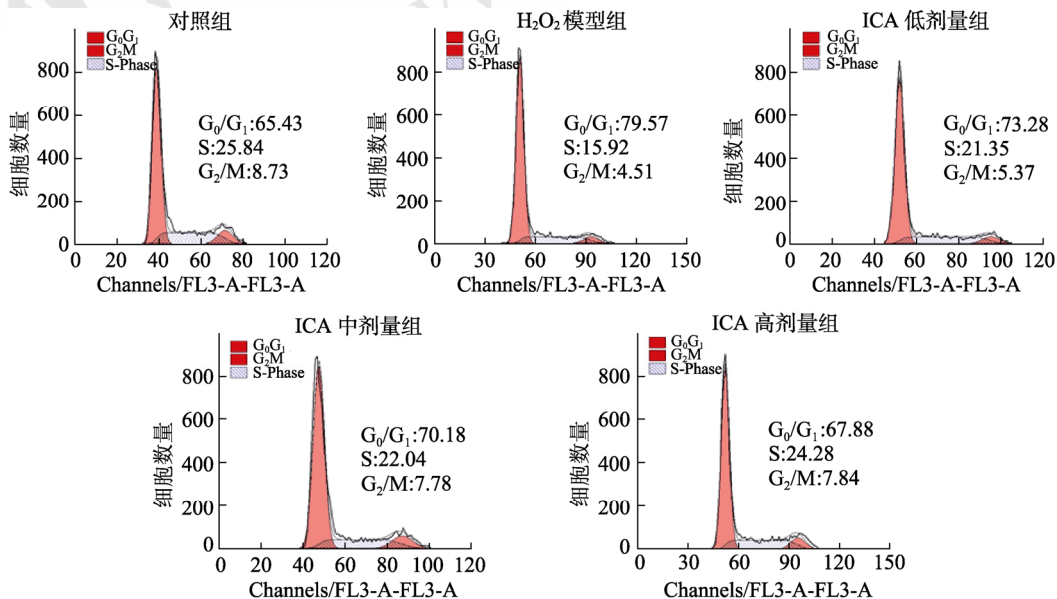


图 2 各组软骨细胞周期分布情况

Fig. 2 Distribution of chondrocyte cycle in each group

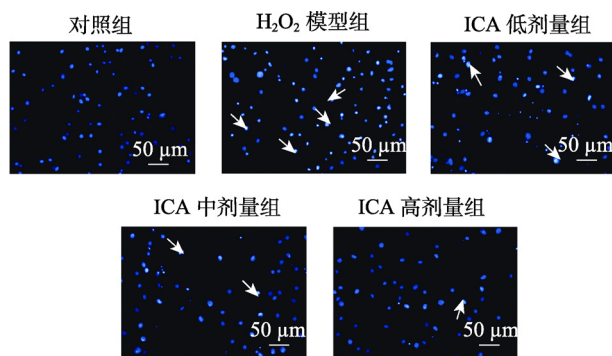


图3 ICA对H₂O₂诱导的软骨细胞核凋亡的影响(200×)
箭头表示发生凋亡的细胞。

Fig. 3 Effect of ICA on H₂O₂-induced apoptosis of chondrocytes nucleus(200×)
Arrows indicate apoptotic cells.

表4 各组细胞凋亡率情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 4 Apoptosis rate of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	凋亡率/%
对照组	2.1±0.1
H ₂ O ₂ 模型组	56.4±4.8 ¹⁾
ICA 低剂量组	33.2±3.9 ²⁾
ICA 中剂量组	25.4±3.6 ²⁾
ICA 高剂量组	18.8±2.0 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 H₂O₂ 模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with H₂O₂ model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.5 ICA对凋亡及Nrf2/HO-1通路相关mRNA表达影响

采用qRT-PCR检测不同浓度ICA对凋亡及Nrf2/HO-1通路相关mRNA表达的影响,结果见表5。与对照组相比,H₂O₂模型组软骨细胞中Bax和caspase-3 mRNA表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Bcl-2、Nrf2以及HO-1 mRNA表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与H₂O₂模型组相比,ICA低、中、高剂量组Bax和caspase-3 mRNA表达明显降低,Bcl-2、Nrf2以及HO-1 mRNA表达明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表5 ICA对凋亡及Nrf2/HO-1通路相关mRNA表达影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 5 Effect of ICA on the expression of apoptosis and Nrf2/HO-1 pathway related mRNA($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	Bax	Bcl-2	caspase-3	Nrf2	HO-1
对照组	1.04±0.06	1.08±0.12	0.96±0.17	1.08±0.24	1.30±0.10
H ₂ O ₂ 模型组	1.85±0.12 ¹⁾	0.48±0.06 ¹⁾	5.96±0.24 ²⁾	0.26±0.08 ²⁾	0.37±0.13 ¹⁾
ICA 低剂量组	1.25±0.03 ³⁾	0.94±0.06 ³⁾	1.53±0.49 ⁴⁾	1.13±0.27 ⁴⁾	0.88±0.12 ³⁾
ICA 中剂量组	1.07±0.11 ³⁾	1.17±0.27 ³⁾	1.22±0.21 ⁴⁾	1.56±0.27 ⁴⁾	1.19±0.20 ³⁾
ICA 高剂量组	1.09±0.23 ³⁾	1.12±0.12 ⁴⁾	1.11±0.15 ⁴⁾	1.90±0.05 ⁴⁾	1.45±0.28 ⁴⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 H₂O₂ 模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with H₂O₂ model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

3.6 ICA对凋亡及Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达影响

Western blotting检测各组软骨细胞中凋亡及Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达情况,结果见图4。与对照组相比,H₂O₂模型组中Bax和caspase-3蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),Bcl-2、Nrf2以及HO-1蛋白表达显著降低($P<0.01$);与H₂O₂模型组相比,ICA低、中、高剂量组Bax和caspase-3蛋白表达显著降低,Bcl-2、Nrf2以及HO-1蛋白表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

4 讨论

OA发病机制复杂,其中氧化应激及氧自由基作为重要的发病机制,越来越受到研究者的关注^[7-10]。氧化应激主要是由于ROS的产生和抗氧化酶降解ROS的能力失衡所导致的,ROS在正常关节软骨细胞中低表达,主要由NADPH氧化酶产生,作为细胞内信号传导机制的参与者,有助于维持软骨稳态,能够调节软骨细胞凋亡、细胞外基质的合成和分解以及细胞因子产生,另外,OA患者中的抗氧化酶如SOD、CAT、GPX和PON1等表达量减少^[11],表明氧化应激在OA的发生发展中具有重要的作用。有文献报道称,ICA能够有效提升哮喘大鼠抗氧化能力,并有效减轻哮喘大鼠氧化应激^[12],通过抗氧化的方式达到防治哮喘的目的,表明ICA对氧化应激具有调控作用。ROS的主要成分是H₂O₂,其具有稳定、可自由弥散以及不带电荷等特点,能够自由地穿透细胞膜,与铁离子反应产生羟自由基,进而引起一系列损伤。因此,H₂O₂常被用来诱导细胞氧化应激模型^[13]。在本研究中,笔者通过H₂O₂诱导软骨细胞产生氧化应激,研究ICA对软骨细胞氧化损伤的保护作用,并进一步阐明相关的作用机制。首先通过CCK8法研究ICA对H₂O₂诱导的软骨细胞增殖能力的影响,结果表明,H₂O₂诱导的软骨细胞

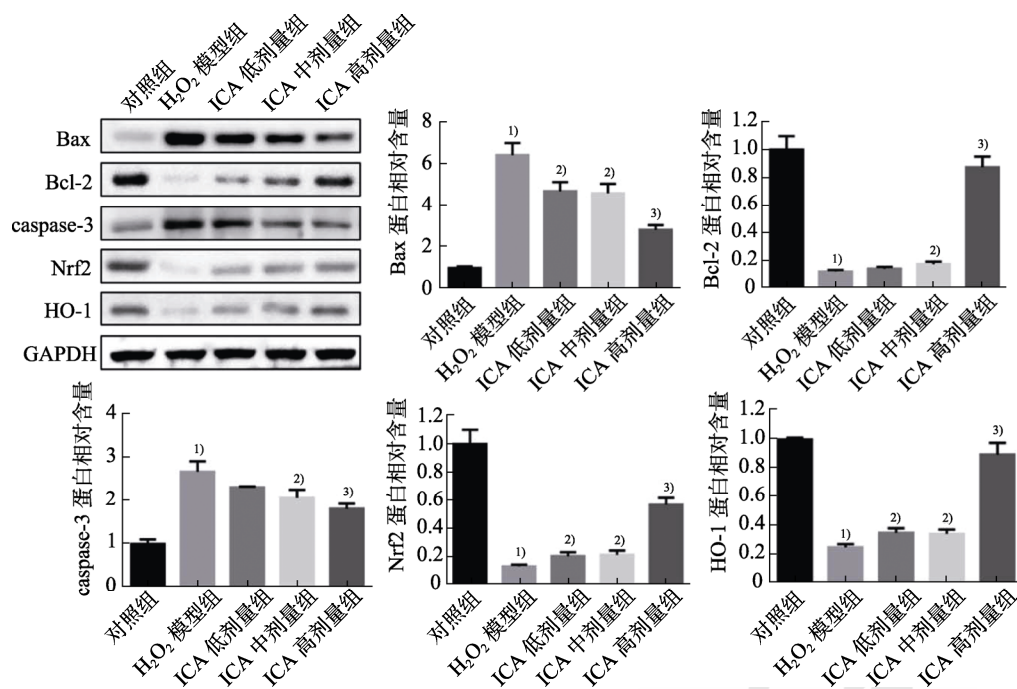


图4 ICA对凋亡及Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与H₂O₂模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of ICA on apoptosis and the expression of Nrf2/HO-1 pathway related proteins($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with H₂O₂ model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

增殖能力明显降低,而经过不同浓度的ICA干预后,软骨细胞的增殖能力逐渐恢复,并表现出剂量依赖性。MDA是不饱和脂肪酸氧化的终产物,其含量的高低能够反映机体内脂质过氧化水平。因此,测定MDA水平能够间接反映细胞受氧化损伤程度,可作为氧化应激的指标^[14]。另外,SOD、CAT、GSH-Px是体内有效的自由基清除剂,它们的催化活性对维持氧化平衡系统非常重要,同样也作为氧化应激的常用指标^[15-16]。本研究采用ELISA试剂盒对各组软骨细胞的这些指标进行测定,结果表明,H₂O₂诱导的软骨细胞中ROS和MDA的表达量显著升高,SOD、CAT以及GSH-Px的表达量显著降低,而ICA中、高剂量组ROS和MDA表达量显著降低,SOD、CAT以及GSH-Px表达量显著升高。上述结果初步证明ICA对H₂O₂诱导的软骨细胞氧化损伤具有一定的保护作用。

OA软骨细胞数量的减少、软骨厚度变薄及表型的改变与软骨细胞的凋亡息息相关^[17-18]。软骨细胞的凋亡增加,能够促进软骨基质的降解,减少基质合成,Bax和Bcl-2是与细胞凋亡有密切关系的2个基因,通过抑制凋亡执行因子caspase-3而起到抑制软骨细胞凋亡的作用^[19-20]。有研究证实,ICA能够下调抗凋亡基因Bcl-2和上调促凋亡

基因Bax的表达,从而促进哮喘小鼠肺内嗜酸性粒细胞凋亡^[21]。本研究首先采用Hoechst 33342染料检测ICA对H₂O₂诱导的软骨细胞核凋亡的影响,结果显示,H₂O₂诱导的软骨细胞中大量细胞核出现皱缩、碎裂,染色程度明显增强,表明出现大量的细胞核凋亡。而ICA各个剂量组中的细胞核数量随着药物浓度的增大而逐渐减少,表明ICA能够改善H₂O₂诱导的细胞核凋亡。qRT-PCR结果表明,H₂O₂模型组较对照组Bax和caspase-3 mRNA表达水平显著升高,Bcl-2 mRNA表达显著降低,而经ICA干预后Bax和caspase-3 mRNA表达明显降低,Bcl-2 mRNA表达明显升高。另外,Western blotting试验结果表明各组细胞中Bax、Bcl-2和caspase-3蛋白表达也有与mRNA相同的趋势。充分表明ICA对H₂O₂诱导的软骨细胞凋亡具有一定的改善作用。

Nrf2是一种核转录因子,在细胞抗氧化应激反应中起着重要作用,Nrf2位于细胞质中与Kelch样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)处于结合态,当细胞产生氧化应激损伤时,Nrf2与Keap1解离,然后转移入核,进而与抗氧化反应元件结合,启动下游HO-1的表达^[22]。Nrf2/HO-1被认为是细胞内最重要的抗氧化应激机制之一,受到越来越多的

关注。已有文献表明, ICA 能活化 Nrf2, 同时可提升其下游因子 HO-1 蛋白的表达, 以此抑制促炎因子转录, 并可提升细胞抵御氧化应激的作用。本研究探讨了 Nrf2/HO-1 信号通路在 ICA 保护 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤中的作用, qRT-PCR 试验和 Western blotting 试验结果表明, H₂O₂ 诱导的软骨细胞中 Nrf2 和 HO-1 表达明显下调, ICA 干预后 Nrf2 和 HO-1 表达量显著回升。表明 ICA 对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤的保护作用与 Nrf2/HO-1 信号通路密切相关。

综上所述, 淫羊藿苷对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞氧化损伤具有一定的保护作用, 能够抑制软骨细胞凋亡, 其机制跟 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

REFERENCES

- [1] GAO L X, MA L Y, PENG C X, et al. Major advances in clinical research of rheumatic diseases of 2018[J]. Clin Focus(临床荟萃), 2019, 34(1): 23-32.
- [2] DENG C C, JU Z B. The progress of effective components in traditional Chinese medicine treatment research of osteoarthritis[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医药大学学报), 2012, 24(2): 97-100.
- [3] SHINTO S, MATSUOKA Y, YAMATO M, et al. Antioxidant nitroxides protect hepatic cells from oxidative stress-induced cell death[J]. J Clin Biochem Nutr, 2018, 62(2): 132-138.
- [4] HAN G T, LI H H, CAI W S, et al. Advances in oxidative stress signaling pathways in osteoarthritis[J]. China Med Her(中国医药导报), 2020, 17(9): 29-32.
- [5] LI F, CAI R, LIU B, et al. Icaritin ameliorates learning and memory deficits of vascular dementia rats via BDNF pathway in hippocampus[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(8): 489-493.
- [6] HE LIJUN, JIANG J J, CHEN H, et al. A review on pharmacological effects and clinical application of Herba Epimedii[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2020, 12(2): 17-20.
- [7] HUANG C B, WU Z B, JIANG Q, et al. Effect of Qufeng Zhitong capsule on score of pain and knee function in patients with knee osteoarthritis[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(23): 2860-2864.
- [8] CAO Y, LI X P. Research progress of oxidative stress in osteoarthritis[J]. Med Recap(医学综述), 2021, 27(19): 3779-3784.
- [9] REN W L, JIAO Y W, ZHANG J, et al. Effects of total flavonoids of Astragalus on oxidative stress and secretion of inflammatory factors in chondrocytes of osteoarthritis[J]. J Zhengzhou Univ: Med Sci(郑州大学学报: 医学版), 2019, 54(4): 603-606.
- [10] 张晒. 白藜芦醇抗软骨细胞氧化应激作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [11] XU Y, FAN K J, WANG T Y. Research progress on the pathogenesis and drug treatment of osteoarthritis[J]. Pract Pharm Clin Remedies(实用药物与临床), 2018, 21(12): 1424-1429.
- [12] LIU J Q, MA Y, WANG X H. Effect of icariin on oxidative stress and Nrf2 and HO-1 expression in lung tissue of chronic asthma rats[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2019, 37(12): 2823-2826.
- [13] SHIM J H, KIM K H, CHO Y S, et al. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene[J]. Amino Acids, 2008, 34(1): 135-141.
- [14] 魏艳红. 冬眠不同时期达乌尔黄鼠不同组织氧化应激水平和抗氧化防御机制的比较研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [15] SONG Y Z, TONG J H, MA W, et al. Protective effects of curcumin on oxidative stress injury of chondrocytes of rats *in vitro*[J]. Hebei Med J(河北医药), 2016, 38(23): 3525-3528.
- [16] ZHAO X, LI G J, HU Y Y, et al. Improvement effects and mechanism research of polyphenol extracts from Kudingcha on carbon tetrachloride induced hepatic damage in mice[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2018, 39(4): 289-295.
- [17] YUAN W, BIAN Y Y, ZHU H J, et al. Curcumin inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of rat chondrocytes via mitochondria-dependent pathway[J]. Chin J Gen Pract(中华全科医学), 2019, 17(4): 528-532.
- [18] 曾丽. 淫羊藿苷抑制骨关节炎基质金属蛋白酶的机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [19] JIN L F, HAN Y. Experiment research on effect of drynaria on rabbit knee osteoarthritis chondrocyte apoptosis[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2013, 15(11): 42-46.
- [20] JIN L F. Experiment study on influence of Rhizoma Drynariae on cartilage cell apoptosis of rats with osteoarthritis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(7): 1699-1703.
- [21] DU W J, DONG J C, CAI C, et al. Effects of icariin on Bcl-2 and Bax protein expressions and eosinophils apoptosis in bronchial asthmatic mice[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2011, 31(9): 1248-1253.
- [22] HU L F, WANG Y, REN R J, et al. Anti-oxidative stress actions and regulation mechanisms of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2016, 43(1): 146-152, 166.

收稿日期: 2020-11-17
(本文责编: 李艳芳)