

独活寄生汤含药血清通过调控 SOX6 对体外软骨细胞表型的影响

吴雪华, 曹岐新, 徐俊涛*, 程昊, 王小军(浙江中医药大学附属湖州中医院, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 研究大鼠独活寄生汤含药血清对体外软骨细胞表型稳定性, SOX6 及培养基中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的影响。方法 取大鼠股骨头软骨帽, 提取软骨细胞, 并在体外单层传代培养。培养体系为含高、中、低浓度的独活寄生汤含药血清及生理盐水血清, 通过免疫组织化学分析软骨细胞表型 II 型胶原的变化及 SOX6 表达分布, 通过 Western blot 及 ELISA 检测 SOX6、Collagen II、Aggrecan 及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的变化。结果 不同浓度的独活寄生汤含药血清均可对体外培养的软骨细胞产生增殖促进作用, 并能增加 II 型胶原稳定其软骨表型; 其中以中浓度最为显著 ($P<0.01$); 与生理盐水血清组相比, 独活寄生汤含药血清可以增加 SOX6 在细胞核的分布, 而且能抑制培养基中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平。结论 独活寄生汤含药血清可以上调体外软骨细胞 SOX6 及抑制炎症因子的表达以稳定软骨细胞的表型。

关键词: 独活寄生汤; 软骨细胞; 转录因子 SOX6

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)08-0935-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.08.008

引用本文: 吴雪华, 曹岐新, 徐俊涛, 等. 独活寄生汤含药血清通过调控 SOX6 对体外软骨细胞表型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(8): 935-939.

Effect of Duhuo Jisheng Decoction on the Phenotype of Chondrocytes *in Vitro* by Regulating SOX6

WU Xuehua, CAO Qixin, XU Juntao*, CHENG Hao, WANG Xiaojun(Huzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to Zhejiang Chinese Medicine University, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of serum containing Duhuo Jisheng decoction on the phenotypic stability of chondrocytes *in vitro*, and on the expression of SOX6, cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **METHODS** Cartilage caps were extracted from the femoral head of rats, and chondrocytes were isolated and cultured *in vitro*. The culture system were serum containing Duhuo Jisheng decoction (different doses of high, medium and low concentrations) and serum containing normal saline as control. The changes of collagen type II and SOX6 expression distribution in chondrocytes were analyzed by immunohistochemistry. The changes of SOX6, Collagen II, Aggrecan, IL-1 beta, IL-6, TNF- α were detected by Western blot and ELISA. **RESULTS** The serum containing Duhuo Jisheng decoction of different doses could promote the proliferation of chondrocytes *in vitro*, and increase the expression of collagen II to stabilize its cartilage phenotype. The medium does showed most significant ($P<0.01$). Compared with the normal control group, the serum containing Duhuo Jisheng decoction could increase the fraction of SOX6 in the nucleus. It also inhibited the expression levels of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the medium. **CONCLUSION** The serum containing Duhuo Jisheng decoction can upregulate the expression of SOX6 and inhibit the expression of inflammatory factors *in vitro*, so as to stabilize the phenotype of chondrocytes.

KEYWORDS: Duhuo Jisheng decoction; chondrocytes; SOX6

体外软骨细胞的成功培养使组织工程联合体外软骨细胞培养以修复关节软骨缺损成为可能, 也为诸如骨关节炎等疾病的研究提供了较好的体外实验模型^[1]。体外培养扩增获得大量表型稳定的软骨细胞是软骨组织工程修复软骨缺损的先决条件^[2]。软骨细胞在体外进行培养的过程中会发生去分化, 但软骨细胞发生去分化的机制一直不清, 这将不利于软骨构建及骨性关节炎发病机制的阐释^[3-4]。

独活寄生汤出自孙思邈的《备急千金要方》,

扶正祛邪、标本兼顾是其主要的特点。研究发现, 其能促进软骨细胞增殖, 抑制软骨细胞凋亡^[5-6], 同时还能延缓软骨退变^[7-8]。该药对体外培养的软骨细胞的作用还未有相关报道。

SOX6 属于一类转录因子超家族, 在包括软骨在内的骨的发育中扮演了重要角色, 如 SOX6 能调控促进软骨细胞分化与形成^[9-10]; 若缺失 SOX6 可造成骨和软骨的不完全发育^[11]; SOX6 在骨性关节炎等疾病中表达下调, 考虑其可能与软骨细胞

基金项目: 湖州市公益性应用研究项目(2016GYB34)

作者简介: 吴雪华, 女, 主治医师 Tel: 13867280636
医师 Tel: 05722770792 E-mail: xujuntao1978@163.com

E-mail: xujuntao1978@163.com

*通信作者: 徐俊涛, 男, 硕士生, 副主任

凋亡相关^[12]；另外 SOX6 能促进骨髓间充质干细胞表达 II 型胶原、Aggrecan 等蛋白并向软骨细胞分化^[13]。

本研究使用不同浓度独活寄生汤含药血清体外培养软骨细胞，通过免疫组织化学分析软骨细胞表型 II 型胶原的变化及 SOX6 表达分布，Western blot 及 ELISA 检测 SOX6、collagen II、Aggrecan 及培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的变化，从维持体外培养软骨细胞表型方面研究独活寄生汤含药血清的功能与作用机制，为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠，SPF 级，♂，2 月龄 40 只、4 周龄 6 只，由浙江中医药大学提供，实验动物许可证号：SYXK(浙)2013-0184。

1.2 试剂

独活寄生汤的药材购于浙江中医药大学附属湖州中医院，处方：独活 9 g、桑寄生 6 g、杜仲 6 g、牛膝 6 g、细辛 3 g、秦艽 6 g、茯苓 6 g、肉桂心 6 g、防风 6 g、川芎 6 g、党参 6 g、甘草 6 g、当归 6 g、芍药 6 g、干地黄 6 g。兔抗大鼠 Collagen II 抗体(美国 Abcam 公司，批号：ab34712)。兔抗大鼠 SOX6 抗体(美国 Abcam 公司，批号：ab30455)。兔抗大鼠 Aggrecan 抗体(美国 Abcam 公司，批号：ab3778)；兔抗大鼠 β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司，批号：20536-1-AP)；兔抗大鼠 Histon H3 抗体(美国 Proteintech 公司，批号：17168-1-AP)；ELISA 试剂盒(碧云天生物科技有限公司)。细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(碧云天生物科技有限公司，批号：P0027)。

1.3 方法

1.3.1 独活寄生汤水提物的制备 按处方剂量称取所需药材，放入圆底烧瓶(5 L)，蒸馏水按 10 倍质量体积比加入瓶中，持续加热回流，提取 3 次，每次 2 h，将提取液过滤后合并，继续加热浓缩至 1 g·mL⁻¹，室温冷却后 4℃放置备用。

1.3.2 独活寄生汤含药血清的制备 将 40 只 2 月龄 SD 大鼠随机分为 4 组，空白组和独活寄生汤低、中、高浓度组，每组 10 只。按照人和动物体质量比，将药物等效剂量换算后，独活寄生汤低、中、高浓度组分别给予 0.85，1.7，3.4 g·kg⁻¹灌胃处理，空白组则给予等量生理盐水灌胃，连续 1 周，在

末次给药后 1 h 经腹主动脉采血，室温下静置 2 h，3 000 r·min⁻¹离心 20 min，离心后血液分层，小心吸取最上层血清，转移至 15 mL 离心管中，-80℃冰箱保存(以上步骤须在无菌条件下进行)。

1.3.3 软骨细胞的分离和培养 取 4 周龄 SD 大鼠双侧膝关节，于超净台用无菌手术刀打开关节腔，刮下股骨与胫骨关节面上的软骨，转移至培养皿中用预冷的 PBS 冲洗 3 次，用手术刀将其切成小块，约 1 mm³，在软骨块上滴加 5 mL 0.2% II 型胶原酶，以酶消化法消化软骨块，并收集软骨细胞，将收集到的软骨细胞重悬于 10%血清培养液中，此时的细胞原代软骨细胞，每 2 d 更换 1 次培养液。

1.3.4 免疫荧光染色 将之前准备好的细胞爬片加入 PBS 洗 3 次后，加入 4%PFA 固定 10 min，PBS 洗去多余的 PFA 后，室温下用 2%BSA 封闭 1 h，而后 4℃孵育一抗过夜。次日，给予 PBS 洗 3 次后避光条件下孵育荧光二抗 30 min。吸去多余二抗后加入 DAPI 孵育 5 min，再用 PBS 清洗 3 次后封片，在共聚焦荧光显微镜下观察并采图。

1.3.5 细胞核质蛋白分离 将细胞用 PBS 洗一遍后刮下，离心并收集细胞，尽可能去除上清，余下的细胞沉淀为实验所需。注意应尽量避免使用胰酶消化细胞，防止目的蛋白被降解。接着按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒里的步骤分离细胞质与核蛋白。

1.3.6 免疫印迹 按蛋白的分子量配制相应浓度的蛋白凝胶。电泳槽中加入电泳缓冲液，在凝胶孔中加入样品，恒压 80 V 电泳 2 h。PVDF 膜用甲醇浸泡后再放入预冷的转膜缓冲液中。转膜夹上从负极到正极按照依次为 3 层滤纸-凝胶-PVDF 膜-3 层滤纸，冰浴环境下，恒流 300 mA 电转 90 min。而后将 PVDF 膜放入含 5%脱脂奶粉的封闭液中 1 h，接着将 PVDF 膜一抗体中 4℃孵育过夜。次日，回收一抗，用 PBST 洗 3 次，二抗室温条件下孵育 1 h。吸出二抗，用 PBST 清洗。将 PVDF 膜放在塑封膜中。配置 ECL 显色液。暗房内显影并定影。

1.3.7 酶联免疫吸附测定(ELISA) ELISA 经过抗体包被，封闭液封闭后，加入用分析缓冲液稀释过的样品和标准品，摇匀后加入显色液，在酶标仪上检测 450 nm 处的 OD 值。根据标准品的结果绘制标准曲线，并通过标准曲线计算各个样本中炎症因子的浓度。

1.3.8 统计学方法 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析与处理, 通过 *T*-test 和方差进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度独活寄生汤含药血清干预对软骨细胞形态变化的影响

不同条件下体外培养软骨细胞 48 h 后, 免疫荧光染色 Collagen II, 观察软骨细胞的表型。可见 4 组细胞均表达 Collagen II, 不过在细胞密度、形态与 Collagen II 荧光强度上有所差异。独活寄生汤含药血清干预后, 细胞密度均高于对照组。对照组细胞呈梭形变化生长, 独活寄生汤含药血清干预的细胞均呈三角形或者多边形。此外, 独活寄生汤含药血清干预的三组细胞 Collagen II 的荧光强度均高于对照组, 其中以中浓度效果最明显, 结果见图 1。

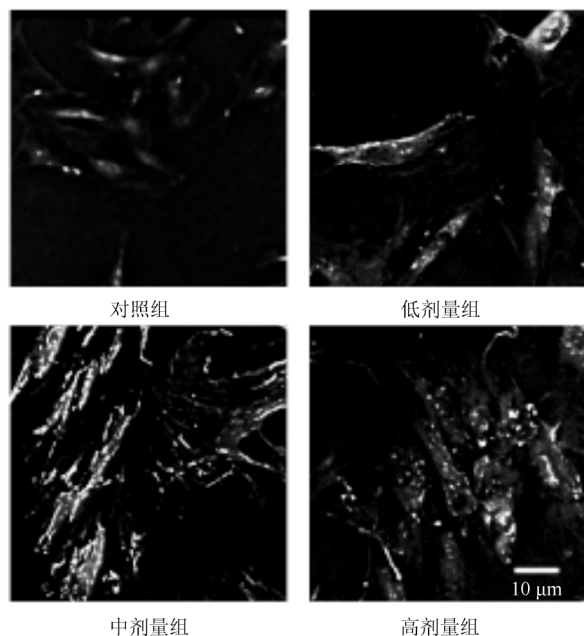


图 1 不同浓度独活寄生汤含药血清干预对软骨细胞形态变化的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of serum containing Duhuo Jisheng decoction on the morphological changes of chondrocytes

2.2 不同浓度独活寄生汤含药血清对软骨细胞 SOX6 分布的影响

不同条件下体外培养软骨细胞 48 h 后, 免疫荧光染色 SOX6, 观察不同浓度独活寄生汤含药血清对软骨细胞 SOX6 表达及分布的影响, 结果见图 2。由图 2 可知, 软骨体外培养的过程中, 软骨细胞都不同程度地表达 SOX6, 而且主要分布在细

胞核中(SOX6 与 Nuclei 共定位)。独活寄生汤含药血清干预后, 软骨细胞核中 SOX6 的荧光强度明显高于对照组, 其中中浓度干预后, SOX6 的荧光强度最高。

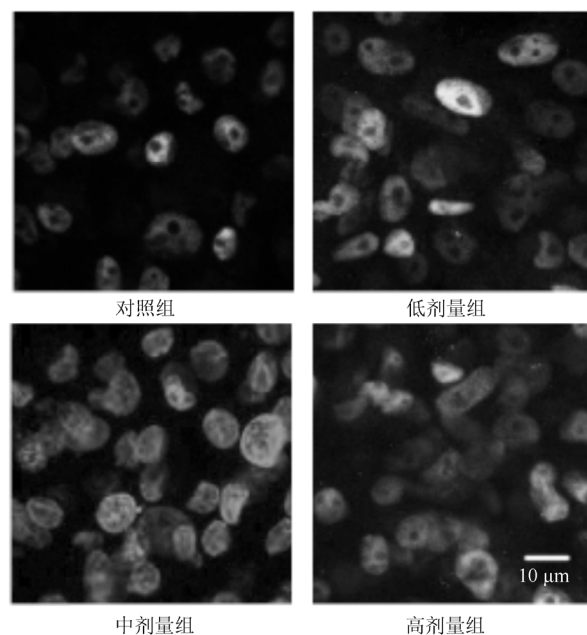


图 2 不同浓度独活寄生汤含药血清对软骨细胞 SOX6 分布的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of serum containing Duhuo Jisheng decoction on the distribution of SOX6

2.3 不同浓度独活寄生汤含药血清对各组细胞细胞核中 SOX6 表达的影响

分离并提取了细胞核蛋白进行分析, 观察不同浓度独活寄生汤含药血清对软骨细胞 SOX6 表达水平的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 在独活寄生汤含药血清干预后, 软骨细胞核中 SOX6 表达水平高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中以中浓度干预后, SOX6 表达改变最明显($P < 0.01$)。

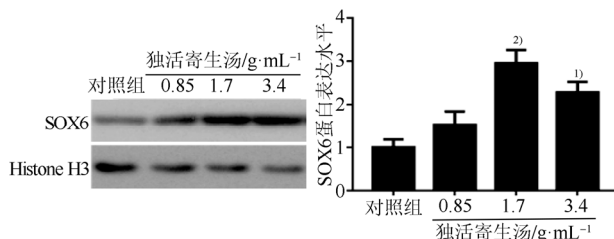


图 3 不同浓度独活寄生汤含药血清对各组细胞细胞核中 SOX6 表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Effect of different concentrations of serum containing Duhuo Jisheng decoction on the expression of SOX6

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.4 不同浓度独活寄生汤含药血清对各组细胞中 Collagen II, Aggreacan 表达的影响

Westen blot 检测不同浓度独活寄生汤含药血清对各组细胞中 Collagen II、Aggreacan 表达的影响, 结果见图 4。可见 Collagen II、Aggreacan 的表达水平在独活寄生汤含药血清处理后均发生上调, 且存在统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中以中浓度组差异最明显($P<0.01$)。

2.5 不同浓度独活寄生汤含药血清对体外软骨细胞培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

ELISA 检测不同浓度独活寄生汤含药血清处理后, 对各组细胞培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响, 结果见表 1。可见 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在培养基中的表达水平在独活寄生汤含药血清处理后均受到了抑制, 且存在统计学差异($P<0.05$), 其中以中浓度组差异最明显($P<0.01$)。

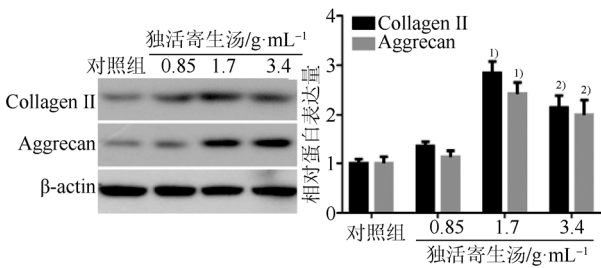


图 4 不同浓度独活寄生汤含药血清对各组细胞中 Collagen II、Aggreacan 表达的影响
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of different concentrations of serum containing Duhuo Jisheng Decoction on the expression of Collagen II and Aggreacan
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$.

表 1 不同浓度独活寄生汤含药血清对体外软骨细胞培养基 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

Tab. 1 Effect of different concentrations of serum containing Duhuo Jisheng decoction on the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the medium

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	35.13 $\pm$ 2.98	35.31 $\pm$ 4.12	26.98 $\pm$ 2.33
低剂量组	33.51 $\pm$ 2.45	27.22 $\pm$ 2.32 ¹⁾	20.22 $\pm$ 2.21 ¹⁾
中剂量组	21.56 $\pm$ 3.54 ²⁾	20.12 $\pm$ 3.11 ²⁾	12.43 $\pm$ 4.22 ²⁾
高剂量组	25.53 $\pm$ 4.34 ¹⁾	23.42 $\pm$ 4.62 ¹⁾	19.98 $\pm$ 3.11 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3 讨论

SOX6 在软骨疾病方面的作用与独活寄生汤类似, 如能调控促进软骨细胞分化与形成; 参与软骨的发育等; 在骨性关节炎等疾病中也表现出

软骨细胞凋亡相关。

本研究通过独活寄生汤含药血清对体外培养的原代软骨细胞培养进行研究。研究发现独活寄生汤含药血清干预后, 软骨细胞的生长密度高于对照组, 且不管在形态还是 Collagen II 的表达上, 独活寄生汤组均要优于对照组, 其中以中浓度效果最佳, 这说明独活寄生汤可以促进体外培养软骨细胞的增殖, 并能够起到维持软骨表型的作用。通过免疫荧光与免疫印迹的方法检测 SOX6 的分布与表达水平发现, SOX6 主要在细胞核中表达, 而且在提取细胞核内蛋白后检测发现, 独活寄生汤组中 SOX6 的表达水平要远高于对照组, 另外与软骨细胞表型相关的 Collagen II、Aggreacan 2 种蛋白, 在独活寄生汤组中均有不同程度的上调, 而且依然是以中浓度的效果最明显。说明独活寄生汤可以促进 SOX6 在软骨细胞核中的表达并上调 Collagen II, Aggreacan 水平以维持软骨细胞的表型。另外, 研究认为在体外软骨细胞培养过程中培养基 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 上调会导致软骨细胞去损伤及分化^[14-15]。因此, 本实验通过 ELISA 检测培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 发现独活寄生汤组中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平均要低于对照组, 而且以中浓度组的水平最低。该结果表明, 独活寄生汤含药血清可以在体外软骨培养过程中抑制培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平。

从实验结果可以看出, 虽然不同浓度的独活寄生汤含药血清均对体外培养的软骨细胞表型有积极的作用, 但均以中浓度的效果最为明显, 在高浓度中, 对软骨细胞型维持的效果反而不如中浓度, 这可能是因为方剂浓缩后药液的黏稠度提高, 导致动物消化道对药液的接受量水平下降或者由于过大的药物剂量而导致不良反应等。因此, 笔者认为, 中浓度独活寄生汤含药血清是维持体外培养软骨细胞表型的最佳浓度。

综上, 独活寄生汤含药血清可以促进 SOX6 在细胞核中的表达并抑制培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平, 从而维持体外培养软骨细胞的表型。

REFERENCES

- [1] LIU X Z, FAN J, LI J, et al. Expression of Dvl2 and β -catenin in natural degeneration process of osteoarthritis articular cartilage [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1355-1358
- [2] MUMME M, BARBERO A, MIOT S, et al. Nasal

- chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 1985-1994.
- [3] 尤奇, 段小军, 杨柳, 等. 临床应用软骨组织工程技术修复关节软骨缺损的进展[J]. *实用骨科杂志*, 2018, 24(1): 52-56.
- [4] ZHANG Z J, QUAN R F, YUE Z S, et al. Advances in seed cells in cartilage tissue engineering [J]. *China Med Her(中国医药导报)*, 2017(23): 36-39.
- [5] 吴广文. 独活寄生汤对骨性关节炎软骨细胞增殖与凋亡影响的实验研究[D]. 福建中医药大学, 2014.
- [6] 刘发元. 独活寄生汤抑制软骨细胞凋亡的机制研究[D]. 福建中医药大学, 2015.
- [7] ZHENG W W, WENG X P, HUANG S X, et al. Effects of Duhuo Jisheng Tang on cartilage degeneration in the process of osteoarthritis and the mechanism of action [J]. *J Tradit Chin Orthopedics Traumatol(中医正骨)*, 2017, 29(7): 5-11.
- [8] ZHENG C S, YE H Z, LI X H, et al. Impact of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤) medicated serum on expression of matrix metalloproteinase an cyclooxygenase 2 in degenerative articular chondrocytes induced by interleukin-1 beta [J]. *J Tradit Chin Orthopedics Traumatol(中医正骨)*, 2015, 27(12): 1-6.
- [9] STUART M P, MATSUI R, SANTOS M, et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 7053465. Doi: 10.1155/2017/7053465.
- [10] LIU C F, LEFEBVRE V. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(17): 8183-8203.
- [11] SUZUKI H, ITO Y, SHINOHARA M, et al. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(28): 7840-7845.
- [12] DUNN S L, SOUL J, ANAND S, et al. Gene expression changes in damaged osteoarthritic cartilage identify a signature of non-chondrogenic and mechanical responses [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(8): 1431-1440.
- [13] LIU J, WANG H W, CHEN Y, et al. Regulatory effect of SOX6 and SOX9 on the growth and differentiation properties into chondrocytes of MPCs in primary OA articular cartilage [J]. *J Regional Anatom Operat Surg(局解手术学杂志)*, 2014(5): 477-481.
- [14] VAN VULPEN L F, SCHUTGENS R E, COELEVELD K, et al. IL-1beta, in contrast to TNFalpha, is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy [J]. *Blood*, 2015, 126(19): 2239-2246.
- [15] YE S Y, ZHU G H, WANG Z, et al. Protective effect of diacerein on interleukin-1 β -induced rat chondrocytes injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(12): 1448-1452.

收稿日期: 2018-07-08
(本文责编: 曹粤锋)