

杜晨飞,韩磊,范围,等.熟地黄多糖调控 lncRNA MEG3 对碘乙酸钠致骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用[J].中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 92-99, 122.

Du CF, Han L, Fan W, et al. Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced chondrocyte damage in osteoarthritis regulated by lncRNA MEG3 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 92-99, 122.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.012

熟地黄多糖调控 lncRNA MEG3 对碘乙酸钠致骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用

杜晨飞¹,韩磊²,范围³,李红旗⁴,郑福增^{1*}

(1.河南省中医院关节科,郑州 450053;2.河南中医药大学骨伤学院,郑州 450046;3.河南省中医院风湿病科,郑州 450053;4.河南省中医院创伤外科,郑州 450053)

【摘要】 目的 探讨熟地黄多糖(RGP)调控长链非编码 RNA(lncRNA)母系表达基因 3(MEG3)对碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎(OA)软骨细胞凋亡的影响。**方法** 培养大鼠软骨细胞,不同浓度 MIA(0、1、2、4、8 μmol/L)诱导建立软骨细胞损伤模型,并给予不同浓度 RGP(50、100、200、400、800 mg/mL)处理筛选合适的实验浓度。实验分为正常组、MIA 组、RGP 组、RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组,Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测细胞活力;Hoechst 33258 染色及流式细胞术检测细胞凋亡情况;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测细胞中 MEG3、金属蛋白酶 13(MMP-13)、Ⅱ型胶原 α1(COL2A1)和蛋白聚糖(ACAN)mRNA 水平;蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、p-PI3K、丝/苏氨酸激酶(AKT)、p-AKT、BAX、BCL-2、caspase3 蛋白表达水平。**结果** MIA 以剂量依赖性方式降低软骨细胞活力,诱导细胞凋亡,并降低 MEG3 和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平,升高 MMP-13 mRNA 水平($P<0.05$)。100、200、400、800 mg/mL RGP 可升高软骨细胞活力及 MEG3 水平($P<0.05$)。与正常组相比,MIA 组细胞活力、MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平降低,细胞凋亡率、MMP-13 mRNA 和 BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组细胞活力、MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平升高,细胞凋亡率、MMP-13 mRNA 和 BAX、caspase3 蛋白水平降低($P<0.05$);敲低 MEG3 可减弱 RGP 对 MIA 诱导的软骨细胞损伤的保护作用。**结论** RGP 可促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制细胞凋亡,减轻 MIA 诱导的软骨细胞损伤,其作用机制可能与上调 MEG3 表达,诱导 PI3K/AKT 通路活化有关。

【关键词】 熟地黄多糖;长链非编码 RNA;母系表达基因 3;骨关节炎;软骨细胞;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0092-08

Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced chondrocyte damage in osteoarthritis regulated by lncRNA MEG3

DU Chenfei¹, HAN Lei², FAN Wei³, LI Hongqi⁴, ZHENG Fuzeng^{1*}

(1. Department of Arthritis, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China.
2. College of Orthopedics, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.
3. Department of Rheumatology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053.
4. Department of Trauma Surgery, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053)

【基金项目】河南中医药大学科研苗圃工程项目(MP2020-13)。

【作者简介】杜晨飞(1990—),男,硕士,主治医师,研究方向:中医骨伤。E-mail:dchenfei@163.com

【通信作者】郑福增(1962—),男,主任中医师,博士生导师,研究方向:中医药防治风湿病。E-mail:zhengfuzengyx@126.com

[Abstract] Objective To explore the effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide (RGP) on apoptosis of osteoarthritis (OA) chondrocytes induced by sodium iodoacetate (MIA) via the regulation of long-chain non-coding RNA (lncRNA) maternal expression gene 3 (MEG3). **Methods** Rat chondrocytes were cultured with MIA 0, 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ to induce chondrocyte injury, and were then treated with RGP 50, 100, 200, 400, and 800 mg/mL , respectively, to detect the appropriate experimental concentration. Rats were divided into a normal group, MIA group, RGP group, RGP+control (NC) small interfering RNA (siRNA) group, and RGP+si-MEG3 group. Cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and flow cytometry. mRNA levels of *MEG3*, metalloproteinase 13 (*MMP-13*), type II collagen- $\alpha 1$ (*COL2A1*), and proteoglycan (*ACAN*) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction. Protein levels of PI3K, phospho (p) PI3K, serine/threonine kinase (AKT), p-AKT, BAX, BCL-2, and caspase3 were detected by Western blot. **Results** MIA decreased chondrocyte viability and induced apoptosis in a dose-dependent manner, decreased *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA levels, and increased *MMP-13* mRNA levels ($P<0.05$). RGP 100, 200, 400, and 800 mg/mL increased chondrocyte viability and *MEG3* levels ($P<0.05$). Cell viability, *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA, and p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and BCL-2 protein levels were decreased in the MIA group compared with the control group, while the apoptosis rate, *MMP-13* mRNA, and BAX and caspase3 protein levels were increased ($P<0.05$). Cell viability, *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA, and p-PI3K/PI3K, P-AKT/AKT, and BCL-2 protein levels were increased in the RGP group compared with the MIA group, while the apoptosis rate, *MMP-13* mRNA, and BAX and caspase3 protein levels were decreased ($P<0.05$). Knockdown of *MEG3* weakened the protective effect of RGP on MIA-induced chondrocyte injury. **Conclusions** RGP can promote the synthesis of chondrocyte extracellular matrix and inhibit cell apoptosis and MIA-induced chondrocyte damage, possibly acting via a mechanism related to the up-regulation of *MEG3* expression and induction of PI3K/AKT pathway activation.

[Keywords] *Rehmannia glutinosa* polysaccharide; long non-coding RNA; maternally expressed gene 3; osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

软骨病变作为骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 发生的重要一环,作为软骨唯一细胞的软骨细胞一旦凋亡严重或死亡,则将致细胞再生缓慢,或无法再生,加剧 OA^[1-2],因此,对软骨细胞的保护是防治 OA 的重要途径。目前,OA 的治疗,尤其是非甾体抗炎药的治疗效果不佳,并且与胃肠道出血和心血管损伤等不良反应有关^[3]。因此,包括中药在内的天然产物及其活性成分在缓解软骨细胞损伤中备受关注。

中医治疗 OA 有着悠久的历史。熟地黄是一种在治疗 OA 的中药方剂 (如右归丸^[4]) 中被广泛使用的传统中药,具有温补肾阳、填精益髓的功效。其中熟地黄多糖 (*Rehmannia glutinosa* polysaccharide, RGP) 是其主要成分之一,不仅具有造血、抗氧化、提高机体免疫力作用,还具有抑制软骨细胞凋亡的作用,对于改善 OA 有一定意义^[5]。然而,关于 RGP 保护软骨细胞损伤的机制研究鲜有报道。研究显示,磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/丝/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 通路可能是 RGP 改善 OA 的作用靶点^[6]。PI3K/AKT 通路对于软骨细

胞生长、抗软骨细胞凋亡以及基质重塑均具有重要调控作用^[7]。

已有研究发现长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 在 OA 中低表达,影响细胞增殖和凋亡,为 OA 的重要分子靶标^[8]。此外, lncRNA MEG3 被报道可通过激活 PI3K/AKT 通路增强癫痫大鼠海马神经元细胞活力并抑制细胞凋亡^[9]。表明 lncRNA MEG3 可调控 PI3K/AKT 通路的活化。基于以上研究,笔者推测 RGP 调控 PI3K/AKT 通路影响 OA 进展的分子机制可能与 lncRNA MEG3 有关。因此,本研究采用碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导软骨细胞建立 OA 细胞模型^[10],通过使用 RT-qPCR、CCK-8 法、Hoechst 33258 染色、流式细胞术及蛋白免疫印迹 (Western blot) 探究 RGP 对软骨细胞损伤的影响,并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5 只健康 SD 大鼠购自北京维通利华 [SCXK

(京)2021-0011], SPF 级, 雄性, 6 周龄, 体重 200~220 g。在温度 (24±1) °C 及湿度 (50±5) % 条件下饲养, 定期通风环境, 自由饮水摄食, 昼夜交替各 12 h, 暂养 7 d, 饲养于河南省中医院[SYXK(豫)2021-0018]。本实验经河南省中医院动物伦理委员会批准(PZ-HNSZYY-2021-050), 符合实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

RGP(陕西慈缘生物技术有限公司, 纯度>90%); MIA(美国 Sigma 公司, 货号: 57858-5G-F); 细胞凋亡试剂盒(Hoechst 染色, 上海索莱宝生物科技有限公司, 货号: G3680); 引物购自上海生工生物工程有限公司; si-NC、si-MEG3 由广州锐博生物有限公司合成; 一抗 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2、caspase3 及抗 II 型胶原蛋白的兔多克隆抗体(英国 abcam 公司, 货号分别为: ab154598、ab131067、ab38449、ab8805、ab32503、ab32370、ab179517 及 ab34712)。DMi1 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司, 型号: StepOne TM); 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司, 型号: CytoFLEX); 蛋白凝胶成像仪(美国赛默飞世尔公司, 型号: E-Gel Imager)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备大鼠软骨细胞

大鼠软骨细胞提取方法参考文献^[11]提取, 无菌操作, 将大鼠双侧膝关节胫骨坪及髌骨内侧透明软骨刮取, 用手术剪将软骨剪碎(1 mm³), 消化后得单细胞悬液, 用含 20% 胎牛血清和 100 U/mL 青链霉素的 DMEM/F-12 培养液重悬, 培养细胞传至第 2~3 代, 再进行后续实验。

1.3.2 软骨细胞的鉴定

在倒置相差显微镜下观察不同培养日和不同世代的软骨细胞形态并捕获图像。应用 II 型胶原免疫组织化学鉴定第 2 代软骨细胞: 将第 2 代软骨细胞(调整细胞悬液浓度为 5×10⁴/mL) 植入 6 孔板中的无菌圆形盖玻片上。将 6 孔板(2 mL 培养基/孔)中的软骨细胞培养 48 h, 4% 多聚甲醛室温固定 10~20 min, PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min, 然后随机分为两组: 阳性组和阴性组; 阳性组用 100 μL 抗 II 型胶原蛋白的兔多克隆抗体(稀释度 1:200)处理, 阴性组用 100 μL PBS 处理。两组均在 4 °C 下孵育过夜。孵育后, 在 37 °C 下, 用二抗(稀释度 1:200)处理 1 h; 使用 DAB 试剂盒显色, 细胞核用苏木精染色

1 min。脱水、透明并封片, 在光学显微镜下观察并比较两组细胞的染色情况。

1.3.3 MIA 诱导建立软骨细胞损伤模型

取第 2 代软骨细胞, 制备浓度为 3×10⁵/mL 的细胞悬液, 并以每孔 100 μL 的体积接种在 96 孔板中。细胞贴壁后, 用含不同浓度 MIA(0、1、2、4、8 μmol/L)的培养基处理 24 h。然后加入 CCK-8 溶液(10 μL)孵育 2 h, 酶标仪检测各孔光密度(optical density, OD)值, 均在 450 nm 处, 细胞相对活力为实验组与正常组 OD 值之比。

1.3.4 分组及转染

实验分为正常组、MIA 组、50 mg/mL RGP 组、100 mg/mL RGP 组、200 mg/mL RGP 组、400 mg/mL RGP 组、800 mg/mL RGP 组。软骨细胞置于 96 孔板中, 正常组含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液正常培养, 其余各组添加终浓度为 4 μmol/L MIA 处理 24 h^[10], 50 mg/mL RGP 组、100 mg/mL RGP 组、200 mg/mL RGP 组、400 mg/mL RGP 组、800 mg/mL RGP 组分别另添加对应浓度 RGP, 培养 24 h。选择 200 mg/mL RGP 组进行后续分组: 正常组、MIA 组、RGP 组(200 mg/mL RGP)、RGP+si-NC 组(200 mg/mL RGP+si-NC)、RGP+si-MEG3(200 mg/mL RGP+si-MEG3)组, RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组添加 200 mg/mL RGP 基础上用 Lipofectamine 2000 分别转染 si-NC、si-MEG3。培养 24 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3.5 CCK-8 检测 RGP 对细胞活力的影响

将经过处理的各组软骨细胞接种在 96 孔板中, 步骤同 1.3.3 细胞相对活力检测方法。

1.3.6 Hoechst 33258 染色

正常组、MIA 组、RGP 组、RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组细胞置于 6 孔板中处理 24 h, 参考细胞凋亡试剂盒(Hoechst 染色)说明书方法, 细胞爬片, 经固定、Hoechst 染色液染色, 0.9% NaCl 洗片, 添加一滴抗淬灭封片剂封片, 荧光显微镜在激发波长 350 nm、发射波长 460 nm 下观察, 细胞核呈蓝色, 每张随机观察 3 个视野。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况

软骨细胞置于 6 孔板中处理 24 h, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每孔 1×10⁵ 个细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化、磷酸缓冲液清洗后离心 5 min, 1000 r/min, 收集细胞加入 Binding Buffer 悬浮细胞(500 μL), 后依次加入 Annexin V-

FITC 5 μL、PI 5 μL 混匀,反应 5~15 min(室温避光),并在 1 h 内检测细胞凋亡(流式细胞仪)。

1.3.8 RT-qPCR 检测细胞中 *MEG3*、金属蛋白酶 13 (*MMP-13*)、Ⅱ型胶原 α1 (*COL2A1*) 和蛋白聚糖 (*ACAN*) mRNA 水平

收集经过处理的各组软骨细胞,添加 TRIzol 试剂,提取总 RNA 后合成 cDNA,在 RT-qPCR 仪上进行扩增。20 μL 上样体系:2×Mix 10 μL、ddH₂O 8.0 μL、50 ng/μL cDNA 1 μL、上/下游引物(均为 10 μmol/L)各 0.5 μL。设置反应条件为:95℃、60 s,95℃、35 s,61℃、40 s,40 个循环。*MEG3*、*MMP-13*、*COL2A1* 和 *ACAN* mRNA 表达水平进行定量分析,2^{-ΔΔCt} 法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Genes	序列 Primer sequences
<i>MEG3</i>	F:5'-TTGCAACCCTCCTGGAATAG-3'
	R:5'-AGTCTTGGGTCCAGCATGTC-3'
<i>ACAN</i>	F:5'-GCAGACCAGGAGGATGTGAGG-3'
	R:5'-GTTGACAACTCCTGCTCCTCG-3'
<i>COL2A1</i>	F:5'-GCTCCCAGAACATCACCTACCA-3'
	R:5'-ACCTGCTATTGCCCTCTGCC-3'
<i>MMP-13</i>	F:5'-ATTAAGGAGCATGGCGACTTCT-3'
	R:5'-CCCAGGAGGAAAAGCATGAG-3'
<i>β-actin</i>	F:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
	R:5'-GTCATCCATGGCGAACTGGT-3'

1.3.9 Western blot 检测细胞中蛋白表达水平

软骨细胞置于 6 孔板中处理 24 h,磷酸缓冲液清洗细胞,冰上裂解 10 min 后离心 20 min,12 000 r/min,上清为总蛋白。蛋白浓度采用 BCA 检测,每孔上样 20 μg,凝胶电泳分离蛋白、PVDF 膜转膜,脱脂奶粉(5%)孵育 2 h,温度室温,分别加入一抗 PI3K(1:1000)、p-PI3K(1:1000)、AKT(1:500)、p-AKT(1:500)、BAX(1:1000)、BCL-2(1:1000)、caspase3(1:1000)、β-actin(1:2000),孵育过夜(4℃);加入对应二抗(1:2000)孵育 1 h(室温)。ECL 显影并用蛋白凝胶成像仪拍照分析。

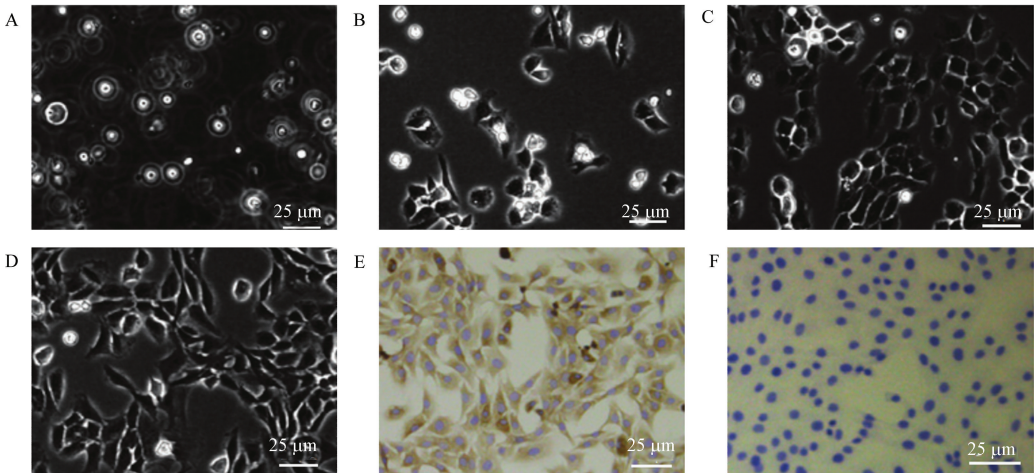
1.4 统计学方法

数据分析应用 SPSS 24,计量数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间单因素方差分析,组间两两比较 *SNK-q* 检验。*P*<0.05,则为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鉴定大鼠软骨细胞

倒置相差显微镜下观察到,培养 0 d 的大鼠关节软骨细胞呈球形,均匀悬浮在培养基中(图 1A)。培养 2 d 后,大部分细胞贴附在培养瓶上,形状不规则(图 1B)。第 1 代和第 2 代软骨细胞在培养 2 d 后形态呈圆形或椭圆形变化(图 1C、1D)。倒置相



注:A,培养 0 d 的软骨细胞;B,培养 2 d 的软骨细胞;C,软骨细胞在 1 次传代后培养 2 d;D,软骨细胞在 2 次传代后培养 2 d。E、F,通过Ⅱ型胶原免疫组织化学鉴定软骨细胞,阳性第 2 代软骨细胞的细胞质被染成棕色,阴性对照细胞未染色。

图 1 大鼠软骨细胞的鉴定

Note. A, Chondrocytes cultured for 0 d. B, Chondrocytes cultured for 2 d. C, Chondrocytes were cultured for 2 d after one passage. D, Chondrocytes were cultured for 2 d after two passages. E/F, Chondrocytes were identified by type II collagen immunohistochemistry, cytoplasm of positive 2nd generation chondrocytes was stained brown, negative control cells were not stained.

Figure 1 Identification of rat chondrocytes

差显微镜下,阳性组软骨细胞胞质呈棕褐色(图 1E),而阴性组软骨细胞的细胞质未染色(图 1F)。由于第 2 代关节软骨细胞表现出典型的软骨细胞形态和丰富的 II 型胶原蛋白,因此用于后续实验。

2.2 MIA 诱导的软骨细胞损伤模型的鉴定

与 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比,2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组软骨细胞活力、MEG3 和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,凋亡率、MMP-13 mRNA 水平升高 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性(图 2,表 2)。其中,4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 对软骨细胞活力的抑制作用接近半数抑制浓度,因此选择 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 进行后续实验。

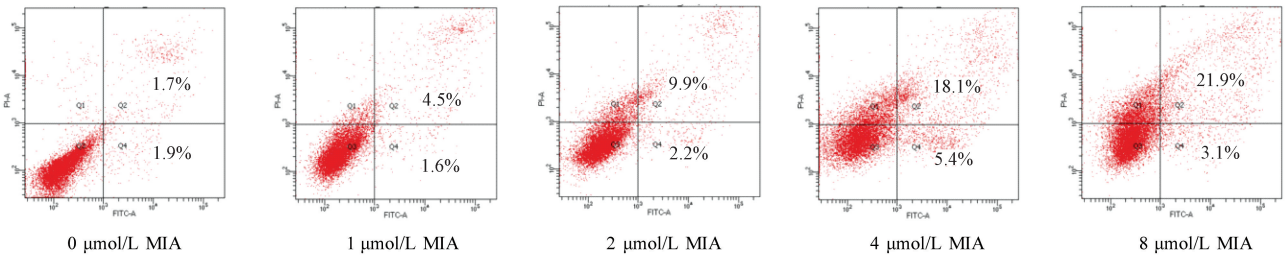


图 2 软骨细胞凋亡情况(流式细胞术)

Figure 2 Apoptosis of chondrocytes(flow cytometry)

表 2 不同浓度 MIA 作用下软骨细胞活力、细胞凋亡率及 mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)						
Table 2 Comparison of chondrocyte viability, apoptosis rate and mRNA levels under different concentrations of MIA						
MIA ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活力 Cell viability	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate	MEG3	MMP-13 mRNA	COL2A1 mRNA	ACAN mRNA
0	1.00±0.08	3.58±0.51	1.01±0.10	0.99±0.11	1.00±0.09	1.02±0.12
1	0.90±0.09 *	6.12±0.67 *	0.90±0.08 *	1.24±0.13 *	0.85±0.08 *	0.79±0.09 *
2	0.72±0.07 *#	12.30±0.89 *#	0.52±0.07 *	1.59±0.16 *	0.67±0.07 *	0.55±0.07 *
4	0.54±0.06 *#△	22.79±1.14 *#△	0.37±0.05 *#	1.82±0.18 *#	0.42±0.05 *#	0.31±0.04 *#
8	0.36±0.05 *#△▲	25.08±1.26 *#△▲	0.21±0.04 *#△▲	2.03±0.19 *#△▲	0.30±0.04 *#△▲	0.20±0.03 *#△▲

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, * $P<0.05$;与 1 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, # $P<0.05$;与 2 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, △ $P<0.05$;与 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, ▲ $P<0.05$ 。
Note. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, * $P<0.05$. Compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, # $P<0.05$. Compared with 2 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, △ $P<0.05$. Compared with 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, ▲ $P<0.05$.

表 3 不同浓度 RGP 作用下细胞活力及 MEG3 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)		
Table 3 Comparison of cell viability and MEG3 level under different concentrations of RGP		
组别 Group	细胞活力 Cell viability	MEG3
正常 Normal	1.01±0.09	0.99±0.11
MIA	0.57±0.06 *	0.35±0.04 *
50 mg/mL RGP	0.69±0.07 *	0.46±0.05 *
100 mg/mL RGP	0.80±0.06 *#	0.58±0.06 *#
200 mg/mL RGP	0.91±0.06 *#△▲	0.76±0.08 *#△▲
400 mg/mL RGP	0.88±0.08 *#△▲	0.79±0.06 *#△▲
800 mg/mL RGP	0.87±0.07 *#△▲	0.82±0.05 *#△▲

注:与正常组相比, * $P<0.05$;与 MIA 组相比, # $P<0.05$;与 50 mg/mL RGP 组相比, △ $P<0.05$;与 100 mg/mL RGP 组相比, ▲ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with MIA group, # $P<0.05$. Compared with 50 mg/mL RGP group, △ $P<0.05$. Compared with 100 mg/mL RGP group, ▲ $P<0.05$.

0.05);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞活力升高($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP + si-MEG3 组细胞相对活力降低($P<0.05$)。见表 4。

2.5 RGP 对软骨细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示,正常组细胞核染色均匀;MIA 组许多细胞出现细胞核皱缩或裂解现象;RGP 组和 RGP+si-NC 组可部分逆转 MIA 导致的细胞核皱缩或裂解现象;RGP+si-MEG3 组细胞核状态介于 MIA 组和 RGP 组之间。见图 3。流式细胞术检测结果显示,与正常组相比,MIA 组细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞凋亡率降低($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP+si-MEG3 组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。见图 4,表 4。

2.6 RGP 对软骨细胞中 MEG3、MMP-13、COL2A1 和 ACAN mRNA 水平的影响

与正常组相比,MIA 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,MMP-13 mRNA 水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平升高,MMP-13 mRNA 水平降低($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP+si-MEG3 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,MMP-13 mRNA 水平升高($P<0.05$)。见图 5。

2.7 RGP 对软骨细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2 和 caspase3 蛋白水平的影响

与正常组相比,MIA 组细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平降低($P<0.05$),BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞中上述蛋白指标明显改善,呈相反趋势($P<0.05$);RGP + si-MEG3 组逆转 RGP 组、RGP + si-NC 组蛋白水平($P<0.05$)。见图 6。

表 4 5 组细胞相对活力及细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 4 Comparison of cell relative vitality and apoptosis rate in 5 groups

组别 Group	细胞活力 Cell viability	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate
正常 Normal	1.00±0.12	3.15±0.31
MIA	0.55±0.07 [*]	34.15±6.15 [*]
RGP	0.87±0.09 ^{*#}	10.36±2.15 ^{*#}
RGP+si-NC	0.85±0.08 ^{*#}	10.42±2.09 ^{*#}
RGP+si-MEG3	0.66±0.07 ^{*#△▲}	23.47±3.20 ^{*#△▲}

注:与正常组相比,^{*} $P<0.05$;与 MIA 组相比,[#] $P<0.05$;与 RGP 组相比,[△] $P<0.05$;与 RGP+si-NC 组相比,[▲] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, ^{*} $P<0.05$. Compared with MIA group, [#] $P<0.05$. Compared with RGP group, [△] $P<0.05$. Compared with RGP+si-NC group, [▲] $P<0.05$.

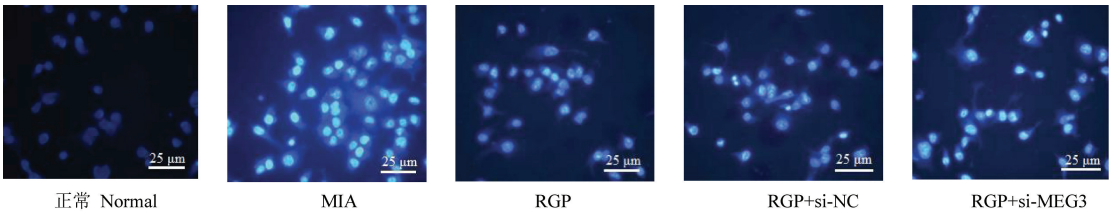


图 3 5 组细胞凋亡情况(Hoechst 33258 染色)

Figure 3 Cell morphology of 5 groups (Hoechst 33258 staining)

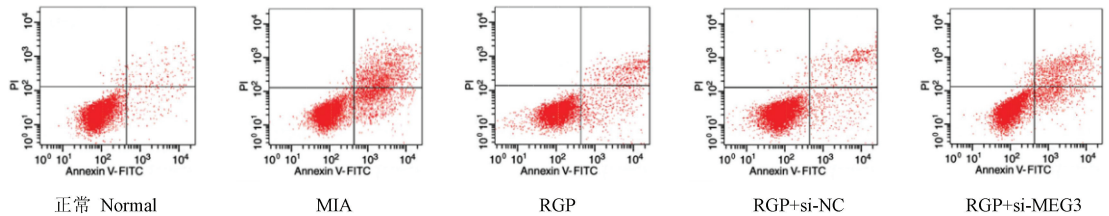
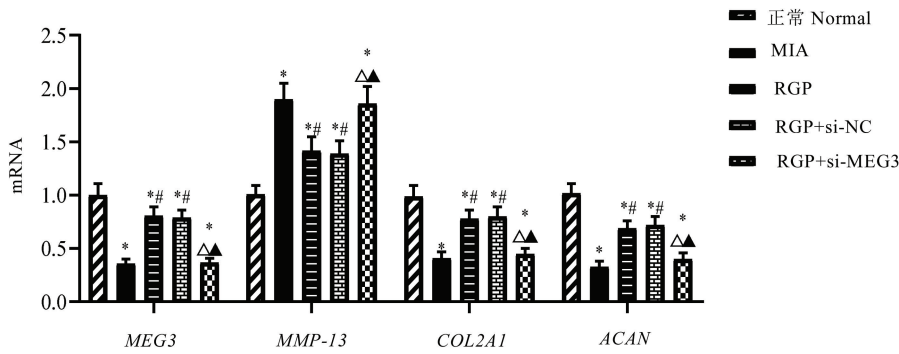


图 4 5 组细胞凋亡水平

Figure 4 Apoptosis level of 5 groups

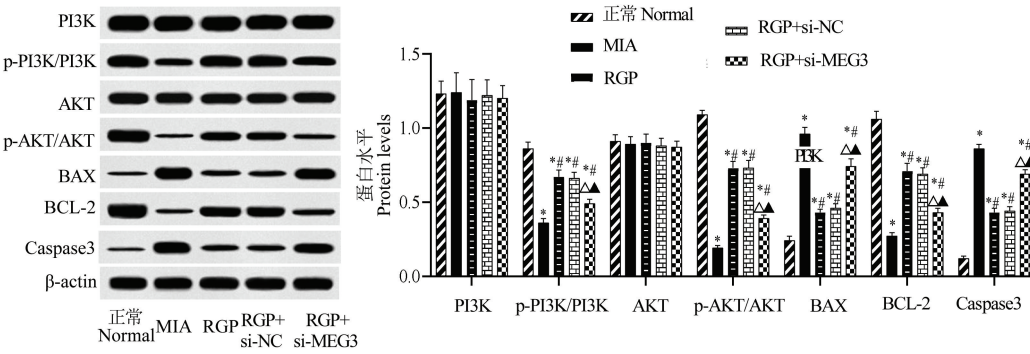


注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与 MIA 组相比, # $P < 0.05$;与 RGP 组相比, $\Delta P < 0.05$;与 RGP+si-NC 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 5 5 组细胞中 MEG3 水平及 MMP-13、COL2A1、ACAN mRNA 水平比较

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with MIA group, # $P < 0.05$. Compared with RGP group, $\Delta P < 0.05$. Compared with RGP+si-NC group, $\blacktriangle P < 0.05$.

Figure 5 Comparison of MEG3 level and MMP-13, COL2A1 and ACAN mRNA levels in 5 groups of cells



注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与 MIA 组相比, # $P < 0.05$;与 RGP 组相比, $\Delta P < 0.05$;与 RGP+si-NC 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 6 5 组细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2 和 caspase3 蛋白表达情况

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with MIA group, # $P < 0.05$. Compared with RGP group, $\Delta P < 0.05$. Compared with RGP+si-NC group, $\blacktriangle P < 0.05$.

Figure 6 Expression of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, BAX, BCL-2 and caspase3 proteins in 5 groups of cells

3 讨论

在正常情况下,关节软骨细胞凋亡与增殖处于动态平衡,但病理情况下,软骨细胞凋亡占主导,可引发 OA。OA 会导致关节疼痛、肿胀、僵硬,出现明显活动障碍,极大影响患者生活和工作质量。细胞因子 (IL-1 β 、TNF- α)、NO、能量代谢抑制剂 (如 MIA) 等均可导致软骨细胞损伤或死亡;MIA 能通过抑制细胞能量代谢导致软骨细胞因供养不足而死亡;这些改变与人类 OA 的病理特征相似。体外研究证实,MIA 可促使软骨细胞凋亡和软骨基质降解^[12-13]。本研究发现,给予不同浓度 MIA 诱导后,软骨细胞相对活力逐渐下降,细胞增殖受到抑制,且 ACAN 和 COL2A1 的表达水平降低,MMP-13 表达水平升高,呈剂量依赖性。软骨细胞通过协调产生和降解细胞外基质 (ECM) 来维持关节软骨,II 型

胶原蛋白 (由 COL2A1 基因编码) 和 ACAN 是关节软骨 ECM 的主要成分^[14]。MMPs 是一类参与 OA 进展的蛋白水解酶,可促进胶原蛋白 II 等软骨基质成分的降解,其中 MMP-13 在 OA 进展中起主要作用,其过度表达可破坏 ECM 合成和降解之间的平衡^[15]。以上研究表明,MIA 可成功诱导建立软骨细胞损伤模型;其中,4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 对软骨细胞活力的抑制作用接近半数抑制浓度,因此选择 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 进行后续实验。给予 RGP 处理后,随着其浓度升高,细胞相对活力逐渐升高,提示 RGP 可以提高软骨细胞活力,促进软骨细胞再生。

近年来许多基因药理学研究表明一些特异性非编码 RNA (lncRNA/miRNA/circRNA) 表达的改变可影响机体对药物的反应,产生药物治疗效果的差异。MEG3 作为肿瘤抑制因子参与各种癌症发生,且可抑制软骨细胞凋亡^[16]。研究显示,MEG3 在

OA 患者软骨组织中呈低表达,可通过靶向核苷酸寡聚化域样受体 5 调控类风湿性关节炎^[17],并可通过调控血管生成参与 OA 的发生发展过程^[18]。也有学者探究 MEG3 调控 OA 的机制发现,MEG3 能够促进 OA 软骨细胞增殖、抑制细胞凋亡和 ECM 降解,从而实现对疾病的缓解^[19]。在本研究中,给予不同浓度 MIA 诱导后,软骨细胞中 MEG3 表达以浓度依赖性的方式降低,添加 RGP 后 MEG3 水平升高,提示 RGP 可能通过 MEG3 影响软骨细胞增殖、凋亡、ECM 降解过程。

PI3K 具有脂类和蛋白的激酶活性,而且其代谢产物可激活 AKT 上丝/苏氨酸磷酸化位点,从而调节细胞增殖和凋亡相关基因表达^[20]。软骨细胞的增殖或凋亡可受多通路调控,如 PI3K/AKT 通路持续激活可下调 BAX、caspase3,上调 BCL-2 的表达,抑制细胞凋亡^[21]。据报道,MEG3 通过调控 PI3K/AKT 通路影响海马神经元凋亡过程^[9]。林健静等^[22]研究显示,白藜芦醇可通过激活 PI3K/Akt 通路,促进软骨细胞 ECM 合成,对关节软骨发挥保护作用。在本研究中,OA 模型细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平明显下降,而 BAX、caspase3 蛋白水平则呈上升趋势,提示 MIA 诱导的软骨细胞凋亡中 PI3K/AKT 通路被抑制。添加 RGP 后,软骨细胞凋亡状况明显改善,细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平升高, BAX、caspase3 蛋白水平降低,且 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平升高, MMP-13 mRNA 水平降低,表明 RGP 可上调 MEG3 表达,促进 PI3K/Akt 通路活化,进而促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

为了验证 RGP 是否通过 MEG3 激活 PI3K/Akt 通路对软骨细胞发挥保护作用,本研究在给予 RGP 处理的基础上,采用小分子干扰技术敲低 MEG3 表达,结果发现,敲低 MEG3 后软骨细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低, BAX、caspase3 蛋白水平和 MMP-13 mRNA 水平升高,细胞凋亡加剧, RGP 对软骨细胞损伤的保护作用被明显减弱;提示 RGP 可能通过上调 MEG3 表达,诱导 PI3K/AKT 通路活化,减轻 MIA 诱导的软骨损伤。

综上所述,RGP 可促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制细胞凋亡,减轻 MIA 诱导的软骨细胞损伤,其作用机制可能与上调 MEG3 表达,进而诱导 PI3K/

AKT 通路激活有关。本研究为 RGP 治疗 OA 提供一定理论依据。RGP 作为熟地黄主要成分,有必要深入了解其功效,使其发挥最大药理活性。本文仅从体外细胞水平进行了初步研究,在未来的研究中将结合体内研究进一步验证 RGP 的作用机制。

参考文献:

- [1] Ba C, Ni X, Yu J, et al. Ubiquitin conjugating enzyme E2 M promotes apoptosis in osteoarthritis chondrocytes via Wnt/ β -catenin signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(4): 970-976.
- [2] Duan ZX, Tu C, Liu Q, et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates calcification of osteoarthritis chondrocytes by promoting autophagy [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(5/6): 3333-3344.
- [3] Arora V, Singh G, O-Sullivan I, et al. Gut-microbiota modulation: the impact of the gut-microbiota on osteoarthritis [J]. Gene, 2021, 785: 145619.
- [4] 张宇,任艳玲,郑曲,等. 右归丸对肾阳虚型老年膝骨性关节炎近远期疗效影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 195-198.
- [5] 张明焕,毛文,刘雷,等. 熟地黄多糖对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子的影响及其机制 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1491-1494.
- [6] 风雯晴,刘凯洋,张嘉宁,等. 基于网络药理学和分子对接的熟地黄治疗骨关节炎的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5336-5343.
- [7] Ren F, Chen X, Bai SC, et al. Silent information regulator 2 related enzyme 1 regulates autophagy and apoptosis of osteochondrocytes through mTOR/PI3K/AKT signaling [J]. J Biomater Tissue Eng, 2020, 10(9): 1344-1350.
- [8] 赵铁男,袁志,毕龙,等. LncRNA MEG3 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(24): 4617-4623.
- [9] Zhang H, Tao J, Zhang S, et al. LncRNA MEG3 reduces hippocampal neuron apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway in a rat model of temporal lobe epilepsy [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 2519-2528.
- [10] 董宝铁,李泓,高伟,等. miR-1286a 对 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和氧化应激的影响 [J]. 现代医学, 2020, 48(6): 723-727.
- [11] Zhang X, Xu X, Xu T, et al. β -ecdysterone suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201.
- [12] 李淑洁,陈秀娟,任艳玲,等. 牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 132-135.