

壮骨健膝方含药血清中药物成分骨碎补 柚皮苷对 IL-1 β 诱导兔退变软骨细胞 “caveolin-p38MAPK”信号通路的影响

苏友新 闫 虎 陈宝军 张 庆 王艺茹 卢美丽 王雯婷 何 湏 盛 录

摘要 **目的** 观察壮骨健膝方含药血清中药物成分骨碎补柚皮苷(简称柚皮苷)对 IL-1 β 诱导退变软骨细胞中“caveolin-p38MAPK”通路相关信号因子小窝蛋白-1(caveolin-1)、磷酸化 p38(p-p38)、磷酸化核转录因子-2(p-ATF-2)、IL-1 β 及 TNF- α 等的影响,进一步探讨该方保护关节软骨的机制。**方法** (1)通过高效液相-飞行时间质谱联用(HPLC-TOF/MS)技术分析并获得壮骨健膝方含药血清中的原组方药物成分柚皮苷;(2)取 4 周龄新西兰兔双侧膝关节软骨,建立兔关节软骨细胞体外培养体系,取第二代软骨细胞用于后续实验。MTT 法检测柚皮苷对软骨细胞增殖的影响;免疫组化方法检测柚皮苷对 IL-1 β 诱导后的软骨细胞中 II 型胶原表达的影响;Western blot 法检测柚皮苷对 IL-1 β 诱导后软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 与 p-ATF-2 蛋白表达的影响;RT-PCR 检测柚皮苷对 IL-1 β 诱导后软骨细胞中 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达的影响。**结果** (1)柚皮苷标准品溶液及壮骨健膝方含药血清离子流图中柚皮苷的出峰时间均为 23.5 min,分子量均在 581.0 ~ 581.5 m/z 之间;(2)柚皮苷能促进软骨细胞的增殖,抑制 IL-1 β 对软骨细胞 II 型胶原表达的影响;(3)与模型组比较,柚皮苷能降低 IL-1 β 诱导后软骨细胞中 caveolin-1、p-p38、p-ATF-2 等蛋白及 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达($P < 0.05$),并接近正常组水平。**结论** 壮骨健膝方含药血清中原组方药物成分柚皮苷不仅能够促进软骨细胞的增殖,还可保护软骨细胞的功能,其机制可能与柚皮苷降低诱导退变软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 与 p-ATF-2 的表达,抑制“caveolin-p38MAPK”通路的活动,进而减少通路下游 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达有关。

关键词 骨关节炎;含药血清;软骨细胞;壮骨健膝方;骨碎补柚皮苷

Effect of Naringin of *Drynaria Rhizome*, a Chinese Medical Component of Zhuanggu Jianxi Recipe Containing Serum on Caveolin-p38MAPK Signal Pathway in IL-1 β Induced Rabbit Degenerated Chondrocytes SU You-xin, YAN Hu, CHEN Bao-jun, ZAHNG Qing, WANG Yi-ru, LU Mei-li, WANG Wen-ting, HE Zhen, and SHENG Lu Research Center for Chinese Medical Rehabilitation, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of naringin of *Drynaria Rhizome*, a Chinese medical component of Zhuanggu Jianxi Recipe (ZJR) containing serum on caveolin-p38MAPK signal factors (such as caveolin-1, p-p38, p-ATF-2, IL-1 β , and TNF- α) in IL-1 β induced rabbit degenerated chondrocytes, and further to explore its mechanism for protecting articular cartilages. **Methods** Naringin of *Drynaria Rhizome* was obtained and analyzed by HPLC-TOF/MS. Four weeks old New Zealand rabbits were killed and their bilateral knee joints were isolated aseptically. CDs were isolated and then cultured *in vitro*. The second generation of CDs were used for later experiment. The effect of naringin on CDs proliferation was detected by MTT assay. The effect of naringin on the expression of IL-1 β -induced collagen II in CDs was detected by immunohistochemical method. The effect of naringin on caveolin-1, p-p38, and p-ATF-2

基金资助:国家自然科学基金资助项目(No.81072828)

作者单位:福建中医药大学中医康复研究中心(福州 350122)

通讯作者:苏友新, Tel:13305021666, E-mail:suyouxin777@hotmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.12.1492

protein in IL-1 β -induced CDs was detected by Western blot. The effect of naringin on mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in IL-1 β -induced CDs was detected by RT-PCR. Results The appearance time of naringin in flow graphs of naringin standard solution and ZJR containing serum was 23.5 min, and the molecular weight ranged between 581.0 and 581.5 m/z. Naringin could promote the proliferation of CDs, and inhibit the effect of IL-1 β on collagen II in CDs. Compared with the model group, naringin could reduce the expression of caveolin-1, p-p38, p-ATF-2, IL-1 β , and TNF- α in IL-1 β induced CDs ($P < 0.05$), which was approximate to the level of the normal group. Conclusions Naringin could not only promote the proliferation of CDs, but also protect IL-1 β -induced CDs. Its mechanism might be associated with decreasing the expression of caveolin-1, p-p38, and p-ATF-2 proteins, inhibiting caveolin-p38MAPK signal pathway, and further reducing mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in the downstream of caveolin-p38MAPK signal pathway.

KEYWORDS osteoarthritis; drug containing serum; chondrocyte; Zhuanggu Jianxi Recipe; naringin of *Drynaria Rhizome*

课题组前期研究已证实壮骨健膝方含药血清具有保护软骨细胞而抑制 IL-1 β 的诱导退变作用,并明确其机制可能与其降低软骨细胞中小窝蛋白-1(caveolin-1)、磷酸化 p38(p-p38)、活化转录因子 2(p-ATF-2)等蛋白表达,抑制“caveolin-p38MAPK”通路的活动,从而减少其下游白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 的表达有关^[1]。但壮骨健膝方含药血清中具体起作用的成分尚不明确。本实验采用经高效液相-飞行时间质谱联用(HPLC-TOF/MS)技术鉴定明确的含药血清中壮骨健膝方君药骨碎补有效成分骨碎补柚皮苷(简称柚皮苷)对 IL-1 β 诱导退变的软骨细胞进行干预,通过观察其对细胞功能及其“caveolin-p38MAPK”通路相关信号分子的影响,进一步明确壮骨健膝方保护关节软骨的部分物质基础。

材料与方法

1 动物 3 月龄新西兰大白兔 24 只,体重 1.80~2.40 kg(实验动物质量合格证编号:2007001101471)及 4 周龄新西兰大白兔 10 只,体重 0.40~0.44 kg(实验动物质量合格证编号:2007001101932),均为雄性,购自上海市松江区松联实验动物场,由福建中医药大学动物实验中心提供。实验动物许可证号码:SCXK(沪)2011-0011。实验对兔子的处理方法符合《关于善待实验动物的指导性意见》^[2]。

2 药物 壮骨健膝方:由骨碎补 9 g 杜仲 9 g 桑寄生 15 g 独活 9 g 虻虫 5 g 生地黄 15 g 秦艽 9 g 鹿衔草 10 g 肿节风 15 g 川牛膝 10 g 等组成,药物均购于福建中医药大学国医堂,委托福建中医药大学药学院按既定的工艺加工成每毫升含生药

1 g 的药液,于 4℃ 保存备用。骨碎补柚皮苷标准品(20 mg)购于福建省药品检验所。

3 仪器与试剂 质谱仪(德国 Bruker 公司,型号:Micro TOF-Q II);液相色谱仪(美国戴安公司,型号:Ulti Mate 3000 标准型);色谱柱(日本岛津 GL 公司,型号:Wonda Sil C18 5 μ m,4.6 $\times$ 150 mm);IL-1 β (美国 R&D Systems 公司,货号 7604-RB-010,10 μ g/瓶);p-ATF-2(美国 R&D Systems 公司,货号 PPS064,100 μ L/瓶); β -actin(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号 sc-130657,100 μ g/瓶)。

4 材料处理

4.1 壮骨健膝方含药血清的制备及处理 普通级健康 3 月龄新西兰大白兔 24 只,按 2:1 的比例随机分为空白血清组与含药血清组,按人与动物千克体重折算的等效剂量^[3]换算,空白血清组以生理盐水灌胃[2.9 mL/(kg·次)],含药血清组以壮骨健膝方药液灌胃[2.9 mL/(kg·次)],1 mL 壮骨健膝方药液含生药 1 g,上、下午各 1 次,均连续灌胃 7 天,于末次灌胃 3 h 后腹主动脉采血,静置于 4℃ 冰箱 4 h 后 2 500 r/min 离心 30 min,分离血清,同组血清混合,56℃ 水浴灭活 30 min,0.22 μ m 滤器过滤,分装,-20℃ 保存备用。以生理盐水灌胃所得的血清为空白血清;以壮骨健膝方药液灌胃所得的血清为含药血清。取含药血清 6.4 mL,按 1:4 的比例加入 1.6 mL 的甲醇,4℃,12 000 r/min 离心 25 min 后取上清,37℃ 水浴氮气吹干,用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液复溶,超声,涡旋混匀 2 min,取上清液,以微孔滤膜(0.20 μ m)滤过,备用。

4.2 标准品溶液的制备 取壮骨健膝方中君药

骨碎补作为检测目标,根据《中国药典》(2010 版)^[4]精密称取其主要药物成分柚皮苷 20 mg,溶于甲醇溶液中,超声处理 30 min,定容至终浓度 20 $\mu\text{g/mL}$,精密取上述溶液 1 mL,即为柚皮苷标准品溶液。

4.3 软骨细胞分离与培养 取 4 周龄新西兰兔双侧膝关节软骨,剪碎成 1 mm^3 小块,以 0.2% II 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床中震荡消化,期间每隔 0.5 h 用移液枪轻轻吹打含有软骨碎粒的 II 型胶原酶 1~2 min,分别于 120、180、240 min 时收集消化上清液并加入新的 0.2% II 型胶原酶。将每次收集的消化上清液移至 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min 使细胞沉淀,弃上清,加入低糖 DMEM 5 mL (含 10% FBS) 培养液,轻轻吹打使细胞重新悬浮后,进行细胞计数,以 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于底面积为 25 cm^2 的培养瓶中,将培养瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱培养,每 24 h 换培养液^[5]。

5 IL-1 β 诱导软骨细胞退变 根据前期实验结果,采用 10 ng/mL IL-1 β 诱导第二代正常软骨细胞 48 h,经形态学观察、甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化染色鉴定可使软骨细胞产生退变^[6]。正常软骨细胞贴壁后,细胞均匀散在生长,呈梭型,生长速度快(图 1A),IL-1 β 诱导后,细胞形态发生变化,呈长梭型或不规则形态,生长速度减慢,传代时间延长(图 1B)。



注:A 为正常软骨细胞;B 为退变软骨细胞

图 1 IL-1 β 诱导软骨细胞产生退变 ($\times 200$)

6 壮骨健膝方含药血清中柚皮苷检测 分别取制备好的柚皮苷标准品溶液及壮骨健膝方含药血清各 1 mL,进行 HPLC-TOF/MS 检测分析。HPLC-TOF/MS 测定条件为:色谱柱:Wonda Sil C18 ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, 5 μm);流速:0.4 mL/min;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液;梯度洗脱程序如下:0~5 min(A:B 为 95:5),5.1~45 min(A:B 为 60:40),45.1~55 min(A:B 为 90:10),55.1~60 min(A:B 为 95:5),每次进样量为 10 μL 。质谱条件为毛细管电压 3 200 V,离子源温度为 180 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气流量 3 L/min,负离子模式检

测,检测范围:100~1 000 m/z 。根据获得的总离子流图,以出峰时间及分子量大小,使用 Bruker Daltonics 公司数据分析 3.4 软件,对壮骨健膝方含药血清中是否含有柚皮苷成分进行分析。

7 柚皮苷对关节软骨细胞增殖及 II 型胶原表达的影响

7.1 MTT 法检测柚皮苷对关节软骨细胞增殖的影响 用含体积分数 5、10 及 20 mg/L 柚皮苷的 10% 空白血清 DMEM 分别干预第二代软骨细胞,MTT 法观察柚皮苷对软骨细胞增殖的影响。

7.2 免疫组织化学染色检测柚皮苷对 IL-1 β 诱导退变软骨细胞中 II 型胶原表达的影响 将第二代兔软骨细胞接种到含细胞爬片的 6 孔板中,每孔约 5×10^3 个细胞,分为模型 A 组及模型 B 组,分别用体积分数为 10% 的空白血清加 10 ng/mL IL-1 β 加 5 mg/L 柚皮苷、10% 空白血清加 10 ng/mL IL-1 β 的 DMEM 培养液培养,48 h 后取出细胞爬片,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 2 min $\times$ 3 次,加 0.1% triton-PBS,室温放置 20 min,然后用 30% 的 H_2O_2 室温孵育 10 min,PBS 清洗 2 min $\times$ 3 次,滴加封闭血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h 后甩掉多余液体,不洗,滴加适当比例的一抗工作液(1:300),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。第二天用 PBS 轻轻漂洗盖玻片 5 min $\times$ 3 次,加第二抗体,室温孵育 30 min,加 SABC 工作液,室温孵育 20 min,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,加 2 滴新鲜配置的 DAB 工作液,室温下静置 5 min 后,镜下观察,待细胞出现黄褐色改变后,水洗,晾干,封片并拍照。

8 柚皮苷对软骨细胞中 p-ATF-2、p-p38、caveolin-1 表达及 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响

8.1 分组及干预 取第二代软骨细胞,经 IL-1 β 诱导退变后分为模型组和柚皮苷组,分别用体积分数为 10% 的兔空白血清、10% 兔空白血清加 5 mg/L 柚皮苷的 DMEM 培养液培养。未经 IL-1 β 诱导退变的为正常组,同步用含体积分数为 10% 的空白血清 DMEM 培养液培养,48 h 后检测相关指标。

8.2 Western blot 检测柚皮苷对兔软骨细胞中 p-ATF-2、p-p38 及 caveolin-1 表达的影响 各组干预 48 h 后,弃培养液,收集软骨细胞并提取软骨细胞的总蛋白,Western blot 法检测各组软骨细胞中 p-ATF-2、p-p38 及 caveolin-1 等蛋白的表达。BIO-RAD image lab version 3.0 软件分析条带,计算各组目的蛋白与相应 β -actin 蛋白条带的光密度比值。

8.3 RT-PCR 检测柚皮苷对软骨细胞中 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达的影响 各组干预 48 h 后,弃培养液,收集软骨细胞,Trizol 法提取总 RNA,超微量核酸蛋白测定仪检测提取的总 RNA 符合纯度和浓度后,取 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板行 Real time RT-PCR 扩增(见表 1),共 35 个循环。用 GEL DOC2000 凝胶成像系统 Quantity One 465 软件分析图像,计算各目的基因 mRNA 与 GAPDH 条带的光密度比值。

表 1 各目的基因的引物

基因名称	引物序列 5'-3'	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
IL-1 β	上游:5'-CTGTCCTGCGTGATGAAAGA-3'	344	58.0
	下游:5'-CAGTGGGGTGTCAACAATCTG-3'		
TNF- α	上游:5'-CTCCTACCCGAACAAGGTCA-3'	446	60.0
	下游:5'-TGAGTCCTGGAAGCCTCAGT-3'		
GAPDH	上游:5'-TTCAACAGTGCCACCCACTCTCTA-3'	278	60.0
	下游:5'-TGGAAACTGTGAAGAGGGGCAGATT-3'		

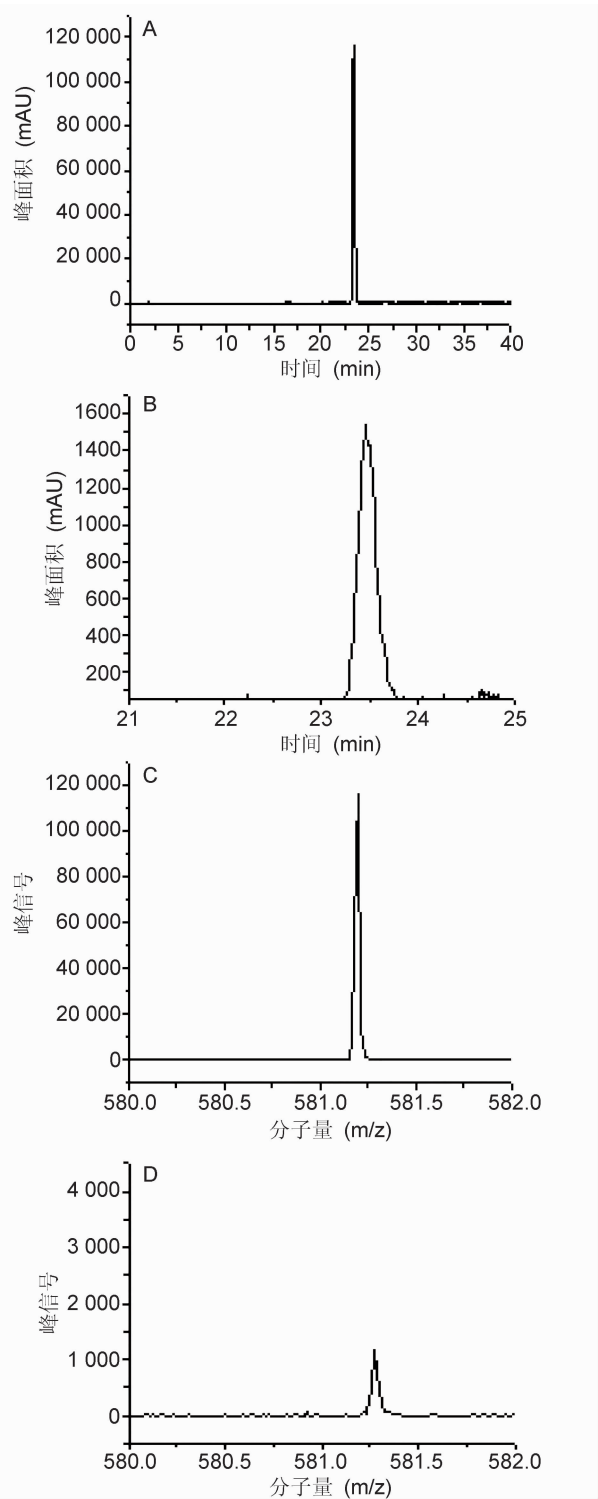
9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包进行分析,计量实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 壮骨健膝方含药血清中已知原组方药物成分的鉴定结果(图 2) 经过 HPLC-TOF/MS 方法获得标准品溶液及壮骨健膝方含药血清的离子流图并对其进行分析比较,各离子流图中柚皮苷的出峰时间均为 23.5 min,标准品中柚皮苷的分子量为 581.1864 m/z,壮骨健膝方含药血清中柚皮苷的分子量为 581.2011 m/z(见图 2)。

2 柚皮苷对第二代兔关节软骨细胞增殖的影响(图 3) 用含体积分数为 5、10、20 mg/L 柚皮苷的 10%空白血清 DMEM 培养液分别干预软骨细胞,MTT 法观测结果显示,与 10、20 mg/L 柚皮苷比较,体积分数为 5 mg/L 柚皮苷对软骨细胞增殖作用最好($P < 0.05$)。

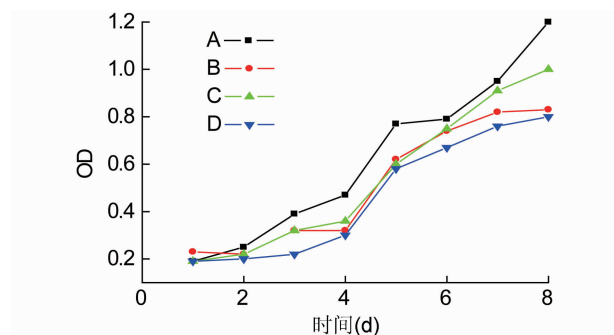
3 5 mg/L 柚皮苷对 IL-1 β 诱导后的第二代软骨细胞中 II 型胶原表达的影响(图 4) II 型胶原免疫组织化学染色显示模型 A 组及模型 B 组第二代软骨细胞胞浆均被染成棕黄色,其中可见黄褐色颗粒,细胞外也可见到棕黄色染色。与模型 B 组比较,模型 A 组第二代软骨细胞不仅数量增多,而且经 II 型胶原免疫组化染色后其阳性表达颜色变深。



注:A:标准品溶液中柚皮苷出峰时间;B:壮骨健膝方含药血清中柚皮苷的出峰时间;C:标准品溶液中柚皮苷的分子量;D:壮骨健膝方含药血清中柚皮苷的分子量

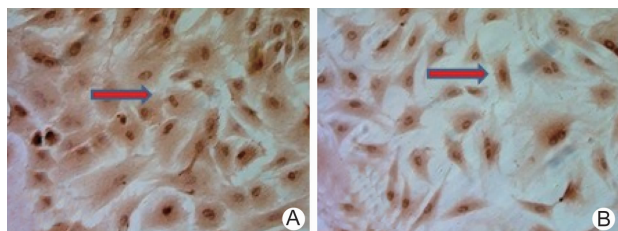
图 2 标准品溶液及壮骨健膝方含药血清中柚皮苷液相色谱图及离子流图

4 5 mg/L 柚皮苷对 IL-1 β 诱导退变软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 及 p-ATF-2 表达的影响(图 5)



注:A 为 5 mg/L 柚皮苷;B 为 10 mg/L 柚皮苷;
C 为 20 mg/L 柚皮苷;D 为 10% 空白血清

图 3 不同浓度柚皮苷对细胞增殖影响的比较



注:A 为模型 A 组;B 为模型 B 组

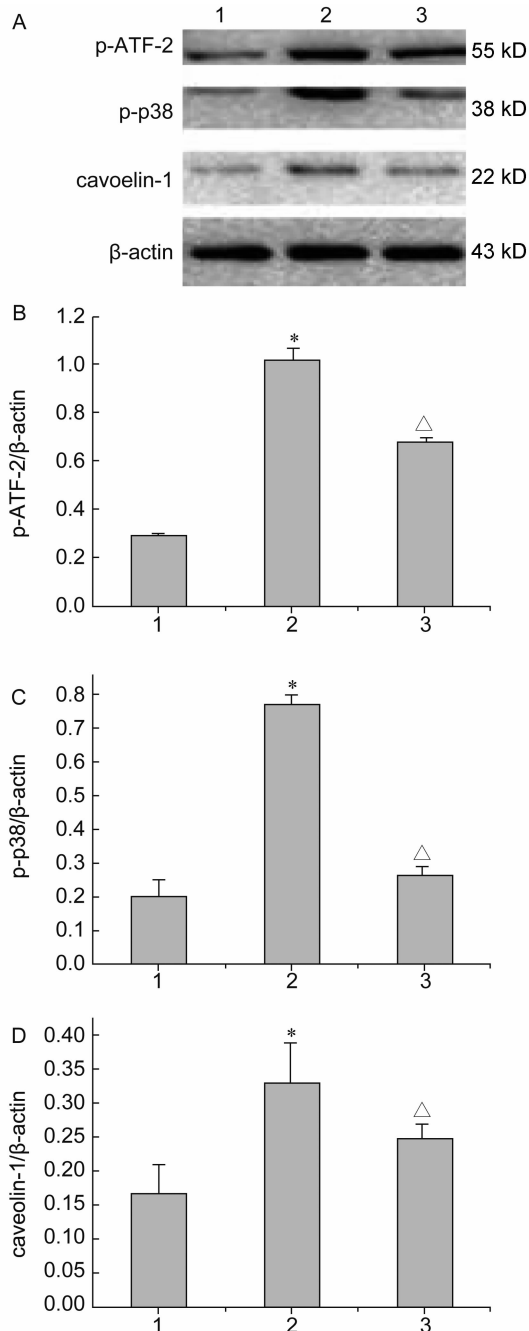
图 4 两组细胞 II 型胶原免疫组化
染色结果比较 (×200)

Western blot 结果显示各组均可见 caveolin-1、p-p38 及 p-ATF-2 蛋白的表达。与正常组比较,模型组中各目的蛋白的表达均明显增高($P < 0.05$),与模型组比较,柚皮苷能不同程度降低其表达($P < 0.05$)。

5 5 mg/L 柚皮苷对 IL-1 β 诱导退变软骨细胞中 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响(图 6) RT-PCR 检测结果显示,各组均可见 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达。与正常组比较,模型组中 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达明显增高($P < 0.05$);与模型组比较,柚皮苷均能不同程度地降低其表达($P < 0.05$)。

讨 论

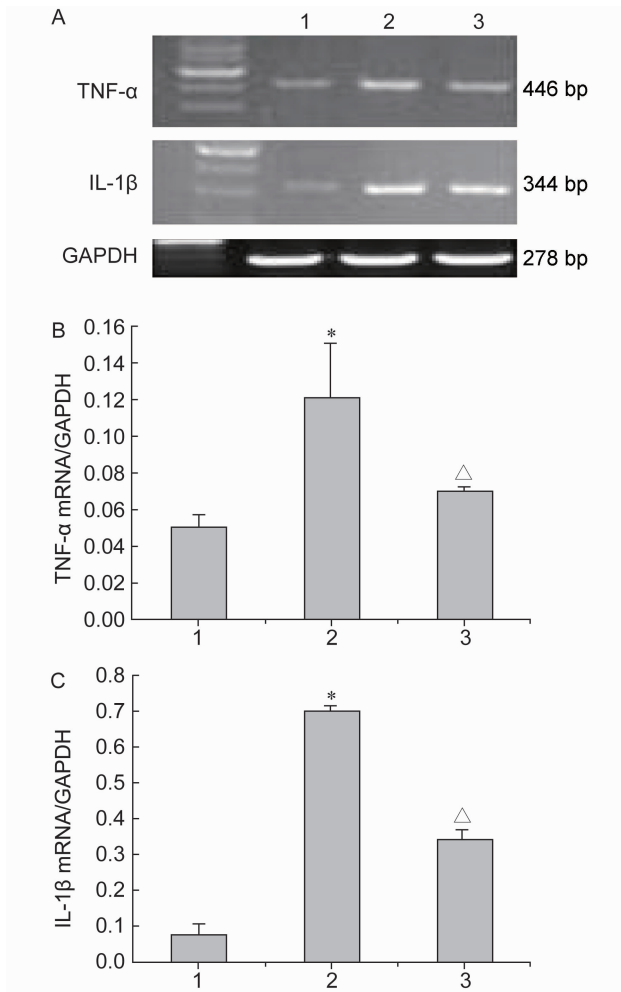
关节软骨的退变与破坏是骨关节炎(osteoarthritis, OA)最主要的病理环节。软骨细胞是关节软骨组织的唯一细胞,在维持关节软骨形态与功能中起重要作用,软骨细胞的退化必然会诱发或加重关节软骨的损伤与破坏,故保护软骨细胞是防治关节软骨退变的关键。近年来研究已证实 p38MAPK 通路是软骨细胞退化及关节软骨破坏过程中主要的信号传导途径之一^[7]。第一,软骨细胞退变中 IL-1 β 、TNF- α 的过表达伴有 p38MAPK 信号通路的激活^[8];第二, p38MAPK 信号通路激活后参与 MMPs 的过表达,进而加剧了软



注:A 为各组软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 及 p-ATF-2 的电泳条带图;B、C、D 分别为 p-ATF-2、p-p38 及 caveolin-1 与 β -actin 电泳条带的光密度比值柱状图;与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;1 为正常组;2 为模型组;3 为柚皮苷组(下同)

图 5 各组软骨细胞中 caveolin-1、p-p38 及 p-ATF-2 表达比较

骨细胞的退变,如 Hoberg M 等^[9] 研究结果表明 OA 患者关节液中 MMP-3 过表达,应用 p38MAPK 信号通路阻滞剂后可以显著降低 MMP-3 的表达;第三, p38MAPK 信号通路激活后参与了 NO 途径和 Fas 途径介导的关节软骨细胞凋亡^[10]。那么,在软骨退变过



注:A 为各组软骨细胞中 IL-1β 及 TNF-α mRNA 表达的电泳条带图, B、C 分别为 TNF-α 及 IL-1β mRNA 与 GAPDH 电泳条带的光密度比值柱状图;与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图6 各组软骨细胞中 IL-1β 及 TNF-α mRNA 表达比较

程中 p38MAPK 信号通路是如何被激活的呢? 最近研究证实软骨细胞的小窝蛋白 caveolin-1 对软骨细胞内 p38MAPK 信号通路的激活具有重要作用,是 p38MAPK 上游的关键信号分子。Dai SM 等^[11]在 OA 患者关节软骨和由 IL-1β 及 H₂O₂ 诱导引起的大鼠退变软骨细胞中发现 caveolin-1 在 24 h 内呈高表达,后者又诱导 p38MAPK 信号通路的激活,进一步加剧了软骨细胞的早衰与退变。以上研究表明在 OA 关节软骨细胞退变的过程中, caveolin-p38MAPK 信号通路的激活具有重要作用。p38MAPK 通路的激活过程为外源性刺激如 IL-1β 等激活该通路上游信号分子 caveolin-1 表达,进而引起 p38 蛋白的磷酸化,最终使 caveolin-p38MAPK 通路激活,促进其下游 TNF-α、IL-1β 等的表达,诱发并加重软骨细胞的损伤与退化。因此,对该信号通路在软骨细胞退变过程的

研究,对于进一步阐明 OA 的发病机制与防治具有重要意义。

壮骨健膝方有十多年临床治疗膝 OA 的应用经验,主要针对膝 OA“肝肾亏虚、风寒湿痹阻”的共性病机,具有补益肝肾、蠲痹止痛之功效,疗效确切^[12,13]。课题组前期研究已证实壮骨健膝方能改善膝 OA 患者的症状,并有降低膝 OA 模型兔关节液中相关炎症因子表达水平及保护关节软骨的效应^[14,15],也在体外实验证实该方含药血清能够抑制软骨细胞“caveolin-p38MAPK”通路中 caveolin-1、p-p38 及 p-ATF-2 蛋白的表达,减少其下游 IL-1β 及 TNF-α mRNA 的表达从而达到保护关节软骨的效果^[1]。但对于该方保护关节软骨细胞的物质基础尚不明确。近年来中药复方血清药理学研究已经明确,在含药血清中起药理作用的物质主要为原组方药物成分或其代谢产物^[16],根据中药复方中已知的原组方药物成分来比对研究含药血清中的药效物质及其功效已成为中药复方血清药理学一个重要研究分支^[17]。高效液相-飞行时间质谱联用(HPLC-TOF/MS)技术^[18,19]不仅具有检测灵敏度高、测定化合物离子范围宽的优点,而且还可以提供高精度的分子量信息,因此被广泛应用于中药复方含药血清中原组方药物成分的鉴别中^[20,21]。由于壮骨健膝方由众多药物组成,本实验首先对壮骨健膝方的君药骨碎补进行研究。应用 HPLC-TOF/MS 技术对标准品溶液及壮骨健膝方含药血清进行比对分析,结果表明君药骨碎补主要成分柚皮苷为壮骨健膝方含药血清中存在的原组方药物成分,该成分代谢进入血液后可能会以原形的形式发挥作用,因此本课题对柚皮苷进行进一步研究。

本研究中经 IL-1β 诱导退变的软骨细胞中 caveolin-1、p-p38、p-ATF-2 等蛋白及 IL-1β、TNF-α mRNA 的表达明显增高,提示采用 IL-1β 对软骨细胞诱导干预后的软骨细胞中存在“caveolin-p38MAPK”通路的激活。柚皮苷能够促进软骨细胞的增殖,并能有效阻断 IL-1β 对软骨细胞 II 型胶原表达的抑制,从而达到保护关节软骨细胞的效应;同时柚皮苷能不同程度的降低 IL-1β 诱导退变的软骨细胞中 caveolin-1、p-p38、p-ATF-2 等蛋白及 IL-1β、TNF-α mRNA 的表达,提示柚皮苷保护 IL-1β 诱导退变软骨细胞的机制可能与抑制 IL-1β 诱导后软骨细胞中“caveolin-p38MAPK”通路的激活有关。根据《中国药典》(2010 版),柚皮苷为壮骨健膝方君药骨碎补的主要药物成分。在其代谢研究中,谢雁鸣等^[22]研究发现骨碎补柚皮苷于大鼠胃肠道积累较多,以药物原

形的形式在血中保持时间较久,有较长的作用时间。李运涛等^[23]研究表明骨碎补柚皮苷可促进软骨细胞的增殖,显著提高 SOD 的活性,降低 NOS 的活性,从而保护软骨细胞免受肿瘤坏死因子等细胞因子的损伤。结合这些文献,提示柚皮苷可能是壮骨健膝方保护关节软骨的有效物质之一。

因实验条件限制,本实验只探讨了壮骨健膝方含药血清中柚皮苷保护 IL-1 β 诱导退变关节软骨的效应及机制,通过本实验建立的研究方法,后期还将借助“caveolin-p38MAPK”通路继续开展壮骨健膝方含药血清中其他原组方药物成分的研究。

参 考 文 献

- [1] Yan H, Su YX, Lin XY, et al. Zhuanggu Jianxi Decoction limits interleukin-1 β induced degeneration chondrocytes via the 'caveolin-p38MAPK' signal pathway [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20 (5): 353 - 359.
- [2] 吴秉纯.医学动物实验基础及基本技术方法[M].哈尔滨:黑龙江人民出版社, 2008: 184.
- [3] 吴迫乐,李西海,吴广文,等.透骨消痛胶囊含药血清对软骨细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(2): 343 - 346.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010 版)[M].北京:中国医药科技出版社, 2010: 174.
- [5] 闫虎,苏友新,林学义,等.II 型胶原酶消化法培养兔关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8647 - 8653.
- [6] 闫虎,苏友新,林学义.II-1 β 诱导新西兰大白兔膝关节退变软骨细胞的体外培养及鉴定[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(1): 81 - 86.
- [7] 秦泗通,蒋青,黄际河,等.p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对大鼠骨性关节炎的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(11): 776 - 781.
- [8] Huh JE, Seo BK, Baek YH, et al. Standardized butanol fraction of WIN-34B suppresses cartilage destruction via inhibited production of matrix metalloproteinase and inflammatory mediator in osteoarthritis human cartilage explants culture and chondrocytes [J]. BMC Complement Alternat Med, 2012, 15(12): 256.
- [9] Hoberg M, Rudert M, Pap T, et al. Attachment to laminin-III facilitates transforming growth factor beta-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in synovial fibroblasts [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(4): 446 - 451.
- [10] Mandal C, Dutta A, Mallick A, et al. Withaferin A induces apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in leukemic cells of lymphoid and myeloid origin through mitochondrial death cascade [J]. Apoptosis, 2008, 13(12): 1450 - 1464.
- [11] Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, et al. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin-1: possible involvement of caveolin-1 induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(3): 818 - 831.
- [12] 田佳,王文雅,张柳.参与骨关节炎的 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(28): 5243 - 5248.
- [13] 陈宝军,闫虎,张庆,等.壮骨健膝方治疗肝肾亏虚、风寒湿痹型膝骨关节炎 76 例临床观察[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(6): 3 - 5.
- [14] 苏友新,陈顺有,林清坚,等.壮骨健膝方对膝骨性关节炎患者滑液细胞因子、NO 的影响[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(2): 38 - 40.
- [15] 苏友新,岳瑞卿,郑良朴,等.壮骨健膝方对兔膝骨性关节炎模型关节液 NO、PGE-2 的影响[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(5): 50 - 52.
- [16] 王喜军.中药及中药复方的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术 - 中药现代化, 2002, 4(2): 1 - 4.
- [17] 刘东锋,张莉,陈婷.四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11 (2): 36 - 38.
- [18] 陈伟成,顾大伟,张海,等.HPLC-TOF/MS 法对白花蛇舌草药材及其注射剂中化学成分的快速分离与鉴别[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(3): 292 - 296.
- [19] 杨翠翠,李林.中药有效成分药物代谢动力学研究方法[J]. 中华中医药学刊, 2011, 20(9): 2006 - 2008.
- [20] 陈永康,赵志刚,孙丽娟.液相色谱 - 飞行时间质谱法快速鉴定紫苏叶中的化学成分[J]. 医药导报, 2013, 32 (3): 371 - 374.
- [21] 王本伟,赵亮,张海,等.加速溶剂萃取-HPLC-TOF/MS 法同时测定重楼中 6 种甾体皂苷类成分[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(5): 549 - 552.
- [22] 谢雁鸣,邓文龙,洪净.骨碎补中柚皮苷大鼠体内药 - 时过程研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(5): 351 - 352.
- [23] 李运涛,程科,胡得志,等.柚皮苷对经 TNF- α 诱导体外培养兔关节软骨细胞增殖及 SOD-NOS 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5): 175 - 177.

(收稿:2013-07-24 修回:2014-09-22)