

· 基础研究 ·

二氢杨梅素通过 ROS/p38-MAPK 信号通路对 H₂O₂ 诱导骨关节炎软骨细胞增生、凋亡的影响

程瑛, 陈慧娟, 杨婷

(武汉市中医医院骨伤科, 湖北 武汉 430000)

【摘要】 目的: 分析二氢杨梅素通过活性氧(reactive oxygen, ROS)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)通路对过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)诱导的骨关节炎软骨细胞增生、凋亡的影响。**方法:** 取 5 只 C57BL/6J 小鼠, 麻醉后颈椎脱臼法处死, 提取并培养软骨细胞, 传代后培养细胞, 将对数生长期软骨细胞分为对照组、H₂O₂ 组 (0.8 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂)、二氢杨梅素低浓度组 (0.8 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂+20 μmol·L⁻¹ 二氢杨梅素)、二氢杨梅素高浓度组 (0.8 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂+80 μmol·L⁻¹ 二氢杨梅素)、ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)组 (0.8 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂+5 mmol·L⁻¹ NAC), 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法测定软骨细胞活性; Hoechst 33342 法测定软骨细胞凋亡率; 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (2, 7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针测定软骨细胞内 ROS 水平; qRT-PCR 法测定 II 型胶原 α1 (type II collagen α1, Col2α1) mRNA 水平; Western blot 法测定 Col2α1、p-p38-MAPK/p38-MAPK、B 细胞淋巴瘤基因-2 (B cell lymphoma gene-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达。**结果:** 软骨细胞呈漩涡状纤维团, COL2α 表达阳性; 与对照组相比, H₂O₂ 组软骨细胞活力、凋亡率、ROS 荧光强度、p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达升高, Col2α1 mRNA 水平、Col2α1、Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 H₂O₂ 组相比, 二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组、NAC 组软骨细胞活力、凋亡率、ROS 荧光强度、p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达降低, Col2α1 mRNA 水平、Col2α1、Bcl-2 蛋白表达升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论:** 二氢杨梅素可能通过抑制 ROS/p38-MAPK 通路抑制软骨细胞凋亡、炎症反应、氧化应激, 二氢杨梅素可能是治疗骨关节炎的潜在药物。

【关键词】 二氢杨梅素; 骨关节炎; 软骨细胞增生; 凋亡; ROS/p38-MAPK 信号通路

中图分类号: R285.5

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20230237

Influences of dihydromyricetin on proliferation and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis induced by H₂O₂ through ROS/p38-MAPK signal pathway

CHENG Ying, CHEN Hui-juan, YANG Ting (Department of Orthopaedics and Traumatology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, Hubei, China)

ABSTRACT Objective To analyze the influences of dihydromyricetin on the proliferation and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) through reactive oxygen species (ROS)/p38 mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) pathway. **Methods** Five C57BL/6J mice were euthanized by cervical dislocation after anesthesia. Chondrocytes were extracted and cultured. After passage, the chondrocytes were divided into control group, H₂O₂ group (0.8 μmol·L⁻¹ H₂O₂), dihydromyricetin low concentration group (0.8 μmol·L⁻¹ H₂O₂+20 μmol·L⁻¹ dihydromyricetin), dihydromyricetin high concentration group (0.8 μmol·L⁻¹ H₂O₂+80 μmol·L⁻¹ dihydromyricetin), and ROS inhibitor N-acetylcysteine (NAC) group (0.8 μmol·L⁻¹ H₂O₂+5 mmol·L⁻¹ NAC). The activity of chondrocytes was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The apoptosis rate of chondrocytes was measured by Hoechst 33342 method. The level of ROS in chondrocytes was measured by 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe. The level of Type II collagen α1 (Col2α1) mRNA was measured by qRT-PCR. And the expression of Col2α1, p-p38-MAPK/p38-MAPK, B cell lymphoma gene-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) proteins was detected by Western blot. **Results** The chondrocytes showed swirling fibrous mass, and the expression of COL2α was positive. Compared with the control group, the chondrocyte viability, apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, p-p38-MAPK/p38-MAPK, and the expression of Bax protein in H₂O₂ group increased, the level of Col2α1 mRNA, and the expression of Col2α1 and Bcl-2 proteins decreased ($P<0.05$). Compared with H₂O₂ group, the chondrocyte viability, apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, p-p38-MAPK/p38-MAPK, and the expression of Bax pro-

tein in dihydromyricetin low concentration group, dihydromyricetin high concentration group, and NAC group decreased, the level of Col2 α 1 mRNA, and the expression of Col2 α 1 and Bcl-2 proteins increased ($P<0.05$). **Conclusion** Dihydromyricetin may inhibit chondrocyte apoptosis, inflammatory reaction and oxidative stress by inhibiting ROS/p38-MAPK pathway. Dihydromyricetin may be a potential drug for treating osteoarthritis.

KEYWORDS Dihydromyricetin; Osteoarthritis; Chondrocyte proliferation; Apoptosis; ROS/p38-MAPK signal pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种退行性关节病,常见表现为关节疼痛、僵硬,甚至致残^[1-2]。软骨细胞的丢失会导致软骨退化、滑膜炎以及软骨下囊肿的形成^[3]。因此抑制软骨细胞凋亡可能是治疗 OA 必不可少的步骤。活性氧(reactive oxygen, ROS)是 OA 发展的重要因素,高水平的 ROS 会引发过氧化、DNA 损伤,加速软骨细胞丢失与组织损伤^[4],抑制相关通路的激活可能为治疗 OA 的可行性方案,ROS 通路是经典的氧化应激通路,在 OA 中有广泛研究^[5],ROS 可调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK),而 p38-MAPK 通路参与细胞凋亡、炎症等一系列如 OA 发病相关机制^[6-7]。因此,本研究从 ROS/p38-MAPK 通路角度入手分析 OA 的治疗有效药物以及机制。二氢杨梅素是黄酮类物质,具有清除自由基、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、护肝等功效^[8]。周湘华等^[9]研究显示,二氢杨梅素可抑制成骨细胞凋亡。相关文献表明,二氢杨梅素可通过维持 SIRT3 介导的线粒体稳态来逆转软骨细胞变性,从而影响 OA 进展^[10];杨梅素(与二氢杨梅素结构相似)可通过阻碍软骨细胞凋亡改善 OA 进展^[11]。另外,在阿霉素诱导的心脏损伤小鼠和 AC16 细胞中,二氢杨梅素可抑制 p38-MAPK 活化和细胞内 ROS 的发生^[12]。故本研究推测二氢杨梅素可能通过调控 ROS/p38-MAPK 通路影响 OA 发展。本研究将探讨二氢杨梅素对 OA 软骨细胞凋亡的影响及其与 ROS/p38-MAPK 通路的调控关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

二氢杨梅素、ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)购自上海源叶生物技术有限公司,噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂、Hoechst 33342 试剂购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗 II 型胶原 α 1(type II collagen α 1, Col2 α 1)、磷酸化 p38-MAPK (phosphorylated p38-MAPK, p-p38-MAPK)、p38-MAPK、B 细胞淋巴瘤基因-2(B cell lymphoma gene -2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗、羊抗兔二抗购自美国 abcam 公司。SpectraMax

i3x 酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司;GFM-550 荧光显微镜购自上海光密仪器有限公司。

1.2 动物

SPF 级别 C57BL/6J 小鼠,3 周龄,购于广东莱迪生物医药研究院有限公司,生产许可:SYXK(粤)2022-0096。在室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60%条件下饲养,12 h 光照、12 h 黑暗环境,小鼠自由饮食与喝水。

1.3 实验方法

1.3.1 原代细胞培养 取 5 只 C57BL/6J 小鼠,麻醉后颈椎脱臼法处死,取小鼠双侧股骨头与膝关节,去除软骨周围肌肉、血管,修剪为 0.5 mm^3 小块,胰蛋白酶消化 15 min, PBS 冲洗,加入 II 型胶原酶(0.02%),消化 4 h, RPMI-1640 培养基终止消化。离心去上清($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min),在 25 cm^2 培养瓶内接种(每毫升 3×10^5 个),培养箱内培养,每 3 d 更换培养基,细胞密度为 80%时传代。取生长良好的初代软骨细胞进行甲苯胺蓝染色,免疫组化法检测 COL II 表达,鉴定软骨细胞。

1.3.2 分组 取对数生长期软骨细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10^4 个,将细胞分为对照组、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)组^[13]、二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组^[14]、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)组^[15]。除对照组外,均采用 $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 处理软骨细胞,对照组采用普通培养基培养。二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组分别在培养基内加入终浓度为 20 、 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二氢杨梅素, NAC 组在培养基内加入终浓度为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 MTT 法测定软骨细胞的活力 收集各组细胞继续培养,培养 48 h 后每孔加入 $20\text{ }\mu\text{l}$ 的 MTT 试剂,继续培养 4 h,吸出培养基,每孔加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ 二甲基亚砜溶液,振荡溶解, 490 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞活力,细胞活力(%)=A 实验组/A 对照组,每组设置 6 个复孔。

1.4.2 Hoechst 33342 测定软骨细胞的凋亡 将各组软骨细胞接种于 24 孔板,去培养基, PBS 清洗,加入 Hoechst 33342 试剂,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 10 min, PBS 清洗 3 次,荧光显微镜下观察,计算细胞凋亡率。

1.4.3 二律二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针测定软骨细胞 ROS 水平 将各组软骨细胞接种于 24 孔板,培养一定时间后,PBS 清洗,加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 染液于 37°C 培养箱内孵育 20 min,PBS 清洗,荧光显微镜下观察,计算 ROS 荧光强度。

1.4.4 qRT-PCR 测定软骨特异性基因的表达 提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,进行扩增,测定程序为 94°C 预处理 3 min, 94°C 20 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 72°C 5 min。Col2 α 1 (内参 GAPDH) 水平以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法确定。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列
Col2 α 1	F:5' - GTCCTACAATGTCAGGGCCA - 3'
	R:5' - ACCCCTCTCTCCCTTGTAC - 3'
GAPDH	F:5' - AATCCCATCACCATCTTCCAG - 3'
	R:5' - CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC - 3'

1.4.5 免疫印迹法检测软骨细胞蛋白表达 提取各组软骨细胞总蛋白,测定蛋白浓度,加入蛋白质上样缓冲液水浴使之变性,上样 30 μg 蛋白,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将等量蛋白转移至 PVDF 膜,封闭 2 h,加入 Col2 α 1 (1:1 000)、p-p38-MAPK (1:1 000)、p38-MAPK (1:1 000)、Bax (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、GAPDH (1:5 000),孵育过夜,清洗后加入二抗 (1:5 000),室温孵育 2 h,清洗后 ECL 显色,用 Image J 软件进行灰度分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。细胞活力、凋亡率、ROS 荧光强度、Col2 α 1 mRNA、Col2 α 1 蛋白、p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白均属于定量资料,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞鉴定

软骨细胞呈旋涡状纤维团,Col2 α 1 表达阳性,见图 1。

2.2 各组软骨细胞活力情况

与对照组相比, H_2O_2 组软骨细胞活力降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 H_2O_2 组相比,二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度

组、NAC 组软骨细胞活力升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组软骨细胞活力比较

Tab.2 Comparison of chondrocyte activity in each group

组别	孔数	细胞活力 ($\bar{x}\pm s$)/%
对照组	6	100.00 $\pm$ 0.00
H_2O_2 组	6	43.61 $\pm$ 6.23 ^a
二氢杨梅素低浓度组	6	59.76 $\pm$ 8.52 ^b
二氢杨梅素高浓度组	6	72.18 $\pm$ 10.27 ^b
NAC 组	6	68.71 $\pm$ 9.75 ^b
F 值		40.900
P 值		<0.05

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 H_2O_2 组相比,^b $P<0.05$ 。下同。NAC 组,N-乙酰半胱氨酸组,下同。

2.3 各组软骨细胞凋亡情况

与对照组相比, H_2O_2 组软骨细胞凋亡率升高差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 H_2O_2 组相比,二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组、NAC 组软骨细胞凋亡率降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3、图 2。

表 3 各组软骨细胞凋亡率比较

Tab.3 Comparison of apoptosis rates of chondrocytes in each group

组别	孔数	细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$)/%
对照组	6	5.28 $\pm$ 0.76
H_2O_2 组	6	29.77 $\pm$ 4.25 ^a
二氢杨梅素低浓度组	6	21.30 $\pm$ 3.04 ^b
二氢杨梅素高浓度组	6	14.59 $\pm$ 2.06 ^b
NAC 组	6	15.32 $\pm$ 2.13 ^b
F 值		66.942
P 值		<0.05

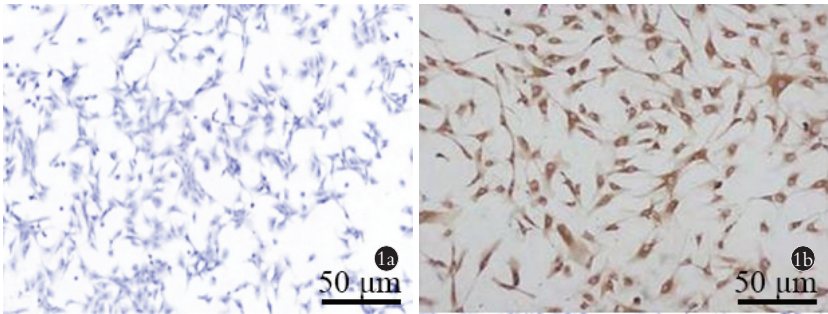


图 1 软骨细胞鉴定($\times 200$) 1a. 软骨细胞甲苯胺蓝染色 1b. 软骨细胞 COL2 α 1 蛋白表达
Fig.1 Identification of chondrocytes ($\times 200$) 1a. Chondrocyte toluidine blue staining 1b. COL 2 α 1 protein expression in chondrocytes

2.4 各组软骨细胞内 ROS 水平比较

与对照组相比, H_2O_2 组软骨细胞 ROS 荧光强度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组、NAC 组 ROS 荧光强度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4、图 3。

2.5 各组软骨细胞软骨特异性基因水平比较

与对照组相比, H_2O_2 组 Col2 α 1 mRNA 水平、Col2 α 1 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组、NAC 组 Col2 α 1 mRNA 水平、Col2 α 1 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5、图 4。

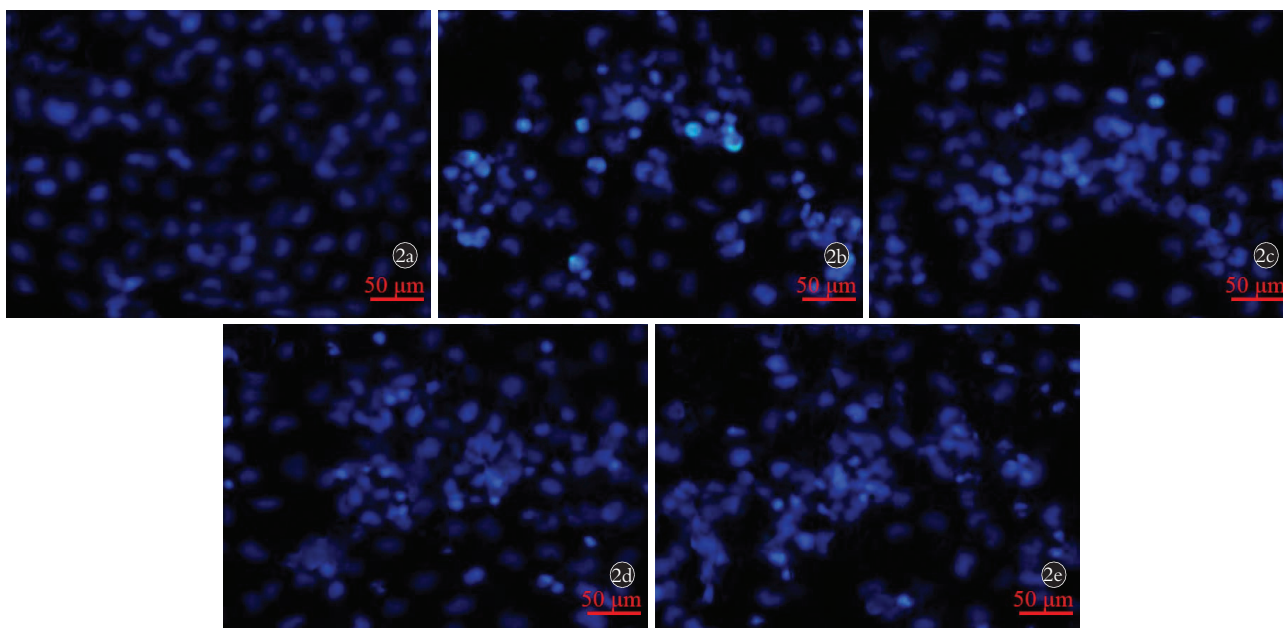


图 2 各组软骨细胞凋亡 Hoechst 图($\times 200$) 2a. 对照组 2b. H_2O_2 组 2c. 二氢杨梅素低浓度组 2d. 二氢杨梅素高浓度组 2e. NAC 组

Fig.2 Hoechst diagram of apoptosis of chondrocytes in each group ($\times 200$) 2a. Control group 2b. H_2O_2 group 2c. Dihydromyricetin low concentration group 2d. Dihydromyricetin high concentration group 2e. NAC group

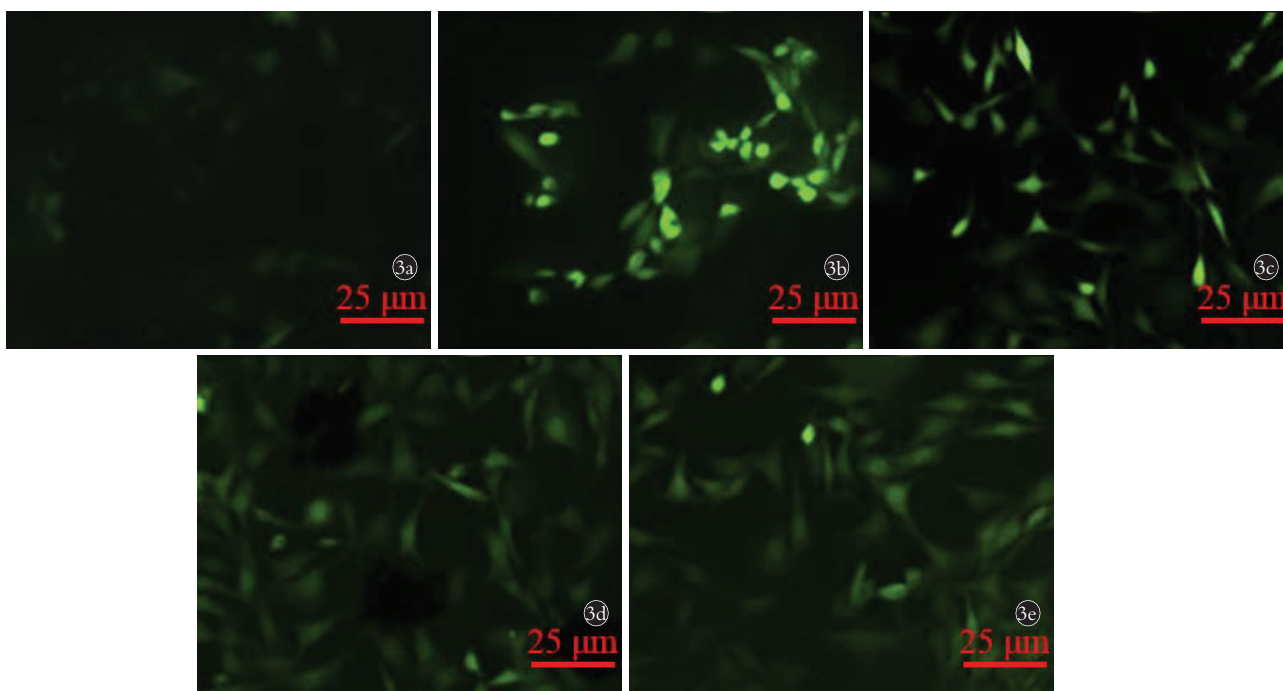


图 3 各组软骨细胞 ROS 荧光图($\times 400$) 3a. 对照组 3b. H_2O_2 组 3c. 二氢杨梅素低浓度组 3d. 二氢杨梅素高浓度组 3e. NAC 组

Fig.3 ROS fluorescence of chondrocytes in each group ($\times 400$) 3a. Control group 3b. H_2O_2 group 3c. Dihydromyricetin low concentration group 3d. Dihydromyricetin high concentration group 3e. NAC group

表 4 各组软骨细胞 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

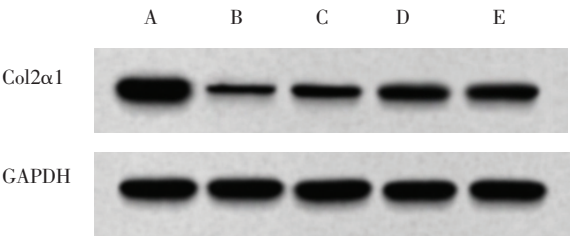
Tab.4 Comparison of ROS levels in chondrocytes among each groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	荧光强度/a.u.
对照组	3.26±0.48
H ₂ O ₂ 组	70.56±10.08 ^a
二氢杨梅素低浓度组	51.37±7.33 ^b
二氢杨梅素高浓度组	34.94±4.92 ^b
NAC 组	37.81±5.41 ^b
<i>F</i> 值	81.756
<i>P</i> 值	<0.05

表 5 各组软骨细胞 Col2α1 表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Col2α1 expression in chondrocytes of each groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA	蛋白
对照组	1.01±0.14	1.42±0.20
H ₂ O ₂ 组	0.23±0.03 ^a	0.35±0.05 ^a
二氢杨梅素低浓度组	0.52±0.07 ^b	0.55±0.07 ^b
二氢杨梅素高浓度组	0.79±0.11 ^b	0.76±0.10 ^b
NAC 组	0.80±0.11 ^b	0.78±0.11 ^b
<i>F</i> 值	54.889	69.872
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05



注:A,对照组;B,H₂O₂组;C,二氢杨梅素低浓度组;D,二氢杨梅素高浓度组;E,NAC组。下同。

图 4 各组软骨细胞 Col2α1 蛋白表达 Western blot 图

Fig.4 Western blot of Col2α1 protein expression in chondrocytes of each group

2.6 各组软骨细胞凋亡和 p38-MAPK 通路蛋白表达情况

与对照组相比,H₂O₂组软骨细胞 p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与 H₂O₂组相比,二氢杨梅素低浓度组、二氢杨梅素高浓度组、NAC 组 p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 6、图 5。

3 讨论

3.1 二氢杨梅素抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡、炎症反应、氧化应激

本研究成功从小鼠体内分离并培养软骨细胞,

表 6 各组软骨细胞凋亡和 p38-MAPK 通路蛋白表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.6 Apoptosis and p38-MAPK pathway protein expression of chondrocytes in each groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	p-p38-MAPK/ p38-MAPK	Bax	Bcl-2
对照组	0.15±0.01	0.35±0.03	0.95±0.09
H ₂ O ₂ 组	0.79±0.08 ^a	1.24±0.09 ^a	0.20±0.02 ^a
二氢杨梅素低浓度组	0.61±0.06 ^b	0.97±0.09 ^b	0.38±0.04 ^b
二氢杨梅素高浓度组	0.53±0.05 ^b	0.71±0.07 ^b	0.57±0.05 ^b
NAC 组	0.52±0.05 ^b	0.69±0.06 ^b	0.59±0.06 ^b
<i>F</i> 值	108.278	130.336	144.759
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

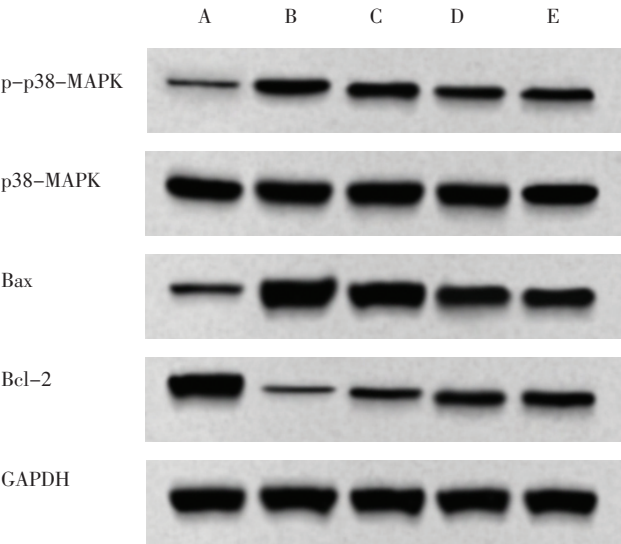


图 5 各组软骨细胞 p38-MAPK 通路蛋白表达 Western blot 图

Fig.5 Western blot of p38-MAPK pathway protein expression in chondrocytes of each group

呈旋涡状纤维团,COL2α1 表达阳性,COL2α1 可作为软骨细胞鉴定的标志^[16]。H₂O₂ 是膜脂氧化的有效介质。H₂O₂ 对线粒体膜完整性的破坏导致半胱天冬酶的释放,而半胱天冬酶在细胞凋亡中起重要作用。因此,H₂O₂ 经常被用作氧化应激的诱导剂,以研究细胞抗氧化剂在改善细胞损伤中的作用^[17]。通过 0.8 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 诱导软骨细胞,模拟 KOA 软骨损伤,此时软骨细胞增殖活性显著降低,凋亡率显著升高,炎症因子水平也随之升高,软骨丢失是 OA 的关键病理,在 OA 发生发展中占据关键地位。二氢杨梅素属于黄酮类化合物,研究显示,二氢杨梅素对急性痛风性关节炎大鼠具有治疗作用,可抑制大鼠血清白细胞介素-1β (Interleukin-1β,IL-1β)、白细胞介素 (Interleukin-8,IL-8)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α,TNF-α) 水平^[18];周湘华等^[9]研究显

示,二氢杨梅素可抑制地塞米松诱导的成骨细胞凋亡;二氢杨梅素具有抑制氧化应激损伤的功效^[19]。炎症反应、氧化应激损伤均在 OA 进展中发挥作用,ROS 直接或间接破坏软骨细胞以及细胞外基质,影响软骨细胞合成,同时,分泌促炎因子,进一步加重软骨组织损伤^[20]。本研究中经二氢杨梅素处理的模型细胞,软骨细胞活力升高,凋亡率降低,ROS 荧光强度降低,提示二氢杨梅素可保护软骨细胞免受氧化应激以及炎症损伤,发挥对软骨细胞的保护作用。本研究证明二氢杨梅素可能作为 OA 的治疗药物之一,当然还有待进行体内实验验证。Col2 α 1 是软骨特异性基因,本研究中 H₂O₂ 诱导的软骨细胞 Col2 α 1 mRNA 水平与 Col2 α 1 蛋白表达降低,表明受刺激的软骨细胞正在经历退化过程,合成代谢活性减弱。然而用二氢杨梅素处理的软骨细胞通过逆转 H₂O₂ 诱导的 Col2 α 1 mRNA 水平与 Col2 α 1 蛋白表达的下调显示出保护作用,这可能提示二氢杨梅素对软骨细胞细胞外基质的产生有有益的作用。

3.2 二氢杨梅素通过抑制 ROS/p38-MAPK 通路抑制 H₂O₂ 诱导的软骨细胞凋亡、炎性反应、氧化应激

ROS 过量产生会引发氧化应激,随后可通过激活 MAPK 激酶或抑制 MAPK 磷酸酶等多种途径导致 p38-MAPK 持续活化,p38-MAPK 存在于人体多种组织,激活 p38 可阻断 Col2 α 1 表达,使软骨支撑力下降^[21]。p38 不仅可被 IL-1 β 刺激产生,还可促进软骨中 IL-18、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的合成,增加炎症介质的表达,如 IL-1 β 、TNF α ^[22];p38-MAPK 可调控凋亡通路,促进 Bax 蛋白表达,抑制 Bcl-2 蛋白表达,促进细胞凋亡^[23]。地塞米松通过 ROS/p38-MAPK 通路诱导软骨细胞凋亡^[24]。以上研究均显示 ROS/p38-MAPK 通道可能参与软骨细胞炎症、凋亡进程。本研究中 H₂O₂ 诱导的软骨细胞 p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低,表明 p38-MAPK 通路在 OA 软骨细胞中处于激活状态;经二氢杨梅素处理后,p-p38-MAPK/p38-MAPK、Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,结合二氢杨梅素可降低软骨细胞 ROS 荧光强度,提示二氢杨梅素可能通过抑制 ROS/p38-MAPK 通路抑制软骨细胞凋亡、炎性反应、氧化应激。ROS 抑制剂可发挥与二氢杨梅素相同的作用,结果进一步提示二氢杨梅素可能通过抑制 ROS/p38-MAPK 通路抑制软骨细胞凋亡、炎性反应、氧化应激。

综上所述,二氢杨梅素可能通过抑制 ROS/p38-MAPK 通路抑制软骨细胞凋亡、炎性反应、氧化应激,二氢杨梅素可能是治疗 OA 的潜在药物,但有待体内验证。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] KUMAR H, PAL C P, SHARMA Y K, et al. Epidemiology of knee osteoarthritis using Kellgren and Lawrence scale in Indian population[J]. J Clin Orthop Trauma, 2020, 11(Suppl 1): S125-S129.
- [2] SZILAGYI I A, WAARSING J H, SCHIPHOF D, et al. Towards sex-specific osteoarthritis risk models: evaluation of risk factors for knee osteoarthritis in males and females[J]. Rheumatology, 2022, 61(2): 648-657.
- [3] 张涛, 严隽陶, 叶斌. 基于 microRNA 探讨中医药在骨关节炎软骨细胞衰老中的调控作用[J]. 中医学报, 2022, 37(1): 88-93. ZHANG T, YAN J T, YE B. Exploring the regulatory effect of Chinese medicine on chondrocyte aging in osteoarthritis based on microRNA[J]. Acta Chin Med, 2022, 37(1): 88-93. Chinese.
- [4] 刘超, 夏长所, 李晓飞, 等. 活性氧激活内质网诱导软骨细胞凋亡的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(4): 591-595. LIU C, XIA C S, LI X F, et al. Stretch induced apoptosis of chondrocytes via the pathway of reactive oxygen species activated endoplasmic reticulum stress[J]. Chin J Clin Electron Ed, 2017, 11(4): 591-595. Chinese.
- [5] SHIN H J, PARK H, SHIN N, et al. p47phox siRNA-loaded PLGA nanoparticles suppress ROS/oxidative stress-induced chondrocyte damage in osteoarthritis[J]. Polymers, 2020, 12(2): 443.
- [6] LIU P F, GAO Q S, GUAN L, et al. Atorvastatin attenuates isoflurane-induced activation of ROS-p38MAPK/ATF2 pathway, neuronal degeneration, and cognitive impairment of the aged mice[J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 620946.
- [7] WU C R, YANG Q Y, CHEN Q W, et al. Ghrelin attenuate cerebral microvascular leakage by regulating inflammation and apoptosis potentially via a p38 MAPK-JNK dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 552: 37-43.
- [8] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 603-609. HOU X L, WANG W Q, SHI C Y, et al. Research progress in pharmacological effects of dihydromyricetin[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(4): 603-609. Chinese.
- [9] 周湘华, 周寿红, 赵其辉. 二氢杨梅素通过 TFEB-自噬途径抑制地塞米松诱导的成骨细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1111-1117. ZHOU X H, ZHOU S H, ZHAO Q H. Dihydromyricetin inhibits apoptosis induced by dexamethasone through TFEB autophagy pathway in osteoblast cells line MC3T3-E1 cells[J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(8): 1111-1117. Chinese.
- [10] WANG J L, WANG K, HUANG C A, et al. SIRT3 activation by dihydromyricetin suppresses chondrocytes degeneration via maintaining mitochondrial homeostasis[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(13): 1873-1882.
- [11] 杨鑫, 李源力, 蒋萍, 等. 杨梅素通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对骨性关节炎发展的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(1): 48-57. YANG X, LI Y L, JIANG P, et al. Effect of myricetin on the development of osteoarthritis through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. J Jinan Univ Nat Sci Med Ed, 2020, 41(1): 48-57. Chinese.

- [12] LI X Q, WANG X, WANG B Y, et al. Dihydromyricetin protects against Doxorubicin-induced cardiotoxicity through activation of AMPK/mTOR pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154027.
- [13] 杨波, 龙慧, 王郑钢, 等. 白藜芦醇激活 Nrf-2 信号抑制 H₂O₂ 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(19): 2359–2366.
YANG B, LONG H, WANG Z G, et al. Resveratrol activates nrf-2 signal to inhibit apoptosis, oxidative damage and inflammatory response of osteoarthritis chondrocyte induced by H₂O₂[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(19): 2359–2366. Chinese.
- [14] 王蕊, 张鹏祥, 李飞星, 等. 二氢杨梅素通过促进 AMPK 活化抑制低氧诱导的 H2c9 心肌细胞凋亡[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(6): 512–517.
WANG R, ZHANG P X, LI F X, et al. Dihydromyricetin inhibits hypoxia-induced apoptosis of H2c9 cells through activating AMPK[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2020, 51(6): 512–517. Chinese.
- [15] 黄文舟, 王丽丽, 殷嫦嫦, 等. 晚期糖基化终末产物通过氧化应激诱导大鼠软骨细胞损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(11): 2036–2042.
HUANG W Z, WANG L L, YIN C C, et al. Advanced glycation end products induce rat chondrocyte injury by modulating oxidative stress[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2016, 32(11): 2036–2042. Chinese.
- [16] 王浩, 陈群超, 殷丽丽. 自噬在骨关节炎软骨细胞退变中表达的研究[J]. *风湿病与关节炎*, 2021, 10(4): 1–4, 31.
WANG H, CHEN Q C, YIN L L. Study on the expression of autophagy in osteoarthritis chondrocyte degeneration[J]. *Rheum Arthritis*, 2021, 10(4): 1–4, 31. Chinese.
- [17] YOUNG I C, CHUANG S T, HSU C H, et al. Protective effects of aucubin on osteoarthritic chondrocyte model induced by hydrogen peroxide and mechanical stimulus[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 91.
- [18] 卢忠英, 郁建平, 陈仕学, 等. 藤茶提取物中二氢杨梅素对大鼠急性痛风性关节炎模型的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2015, 32(4): 396–399.
LU Z Y, YU J P, CHEN S X, et al. Effect of dihydromyricetin from cany tea on acute gouty arthritis model rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2015, 32(4): 396–399. Chinese.
- [19] 李娜, 曹翔. 二氢杨梅素减轻氧糖剥夺/再灌注所致的神经元氧化应激损伤及机制[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37(10): 868–871.
LI N, CAO X. Ampelopsin alleviated oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced oxidative stress in neurons[J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2020, 37(10): 868–871. Chinese.
- [20] WEGNER A M, HAUDENSCHILD D R. NADPH oxidases in bone and cartilage homeostasis and disease: a promising therapeutic target[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(10): 2104–2112.
- [21] 云昕荷. 干扰型表达载体 rAd-Col2α1-shRNA-ADAM8/EGFR 转染大鼠关节炎模型的实验研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
YUN X Y. The experimental study of interference expression vector ShRNA-ADAM8/EGFR transfection the animal model of rat arthritis[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2019. Chinese.
- [22] KROEGER K M, SULLIVAN B M, LOCKSLEY R M. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38α-dependent pathway[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(4): 769–778.
- [23] WANG Y Z, HAN Y T, WANG Y H, et al. Expression of p38MAPK and its regulation of apoptosis under high temperature stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, 122: 288–297.
- [24] HUANG Y, CAI G Q, PENG J P, et al. Glucocorticoids induce apoptosis and matrix metalloproteinase-13 expression in chondrocytes through the NOX4/ROS/p38 MAPK pathway[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 181: 52–62.

(收稿日期: 2023-09-18 本文编辑: 朱嘉)