

盘龙七片调控 SIRT1/NF- κ B 通路 对骨关节炎软骨细胞凋亡的影响

刘 婷,熊轶喆,杜国庆,王 翔

(上海中医药大学附属曙光医院骨伤科,上海 200021)

[摘要]目的 观察盘龙七片对骨关节炎(osteoarthritis, OA)小鼠沉默信息转录调控因子(silent information regulator type 1, SIRT1)/核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路及软骨细胞凋亡的影响。方法 手术切除右膝关节内侧半月板和前交叉韧带复制小鼠 OA 模型。将小鼠分为正常对照组,模型组,阳性对照组,盘龙七片低、中、高剂量组。通过番红 O-快速绿染色观察膝关节结构变化,进行 Mankin 评分评估关节炎严重程度,流式细胞术检测软骨细胞凋亡指数,qRT-PCR 检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达水平,Western blot 法检测软骨细胞 SIRT1、NF- κ B 蛋白表达水平。结果 与正常对照组比较,模型组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率增加,Bax、Caspase-3 mRNA 和 NF- κ B 蛋白表达水平显著增加,Bcl-2 mRNA 和 SIRT1 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组与盘龙七片低、中、高剂量组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率显著降低,Bax、Caspase-3 mRNA 和 NF- κ B 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 mRNA 和 SIRT1 蛋白表达水平显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$),盘龙七片的作用呈明显的剂量依赖性。结论 盘龙七片可抑制 OA 小鼠膝关节软骨细胞凋亡,其作用机制可能与调节 SIRT1/NF- κ B 信号通路相关。

[关键词]盘龙七片;骨关节炎;软骨细胞;SIRT1;NF- κ B;信号通路;凋亡

[中图分类号]R684.3;R285.5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2021.03.019

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是以局部关节疼痛、肿胀、晨僵、畸形为主要临床表现的慢性关节软骨退行性病变,可导致患者活动能力受限,是中老年人的常见病、多发病^[1-2]。研究^[3]表明,盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎疾病临床效果显著,能够缓解患者疼痛肿胀的症状,安全性较高,具有很高的临床应用价值。然而盘龙七片治疗 OA 的具体作用机制尚不清楚。研究^[4-5]表明,软骨细胞过度凋亡是骨性关节炎的主要病理特征,在动物和人的体内、体外研究中软骨细胞凋亡与 OA 严重程度之间有相关性。沉默信息转录调控因子 1(silent information regulator type 1, SIRT1)广泛存在于机体多种细胞之中,参与多种疾病的病理过程,在 OA 的抗炎中起着重要作用^[6]。刘军等^[7]研究表明,薯蓣皂苷元通过激活 SIRT1 通路,进一步减轻软骨细胞炎症反应、线粒体氧化应激损伤和细胞凋亡,从而发挥预防与治疗 OA 的作用。核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路在各种细胞进程中起着重要作用,不仅可以调节炎症作用,还可以调节软骨细胞凋亡^[8]。鲁宏等^[9]研究表明,香叶木素通过抑制 NF- κ B 通路活化缓解白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的新生大鼠

OA 软骨细胞凋亡和免疫反应。为进一步研究其作用机制,本研究从细胞凋亡和 SIRT1/NF- κ B 信号通路的角度探究盘龙七片治疗 OA 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57B/L6 雄性小鼠 60 只(4~6 周龄),购自广州中医药大学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(粤)2019-0047]。

1.2 药物和试剂 盘龙七片(批号 20190401,每片 0.3 g):陕西盘龙药业集团股份有限公司;硫酸氨基葡萄糖胶囊(批号 2392016,每粒 0.25 g):浙江海正药业股份有限公司;生理盐水(国药准字 H13023201):石家庄第四制药厂;DMEM-F12 培养基(11320-033)、胰蛋白酶(25200-056):Thermo Fisher Scientific;胎牛血清(F8245-100):杭州四季青有限公司;辣根过氧化物酶标记二抗山羊抗鼠 IgG(ZB-2305):中杉金桥公司。蛋白提取裂解液(P0013)、BCA 试剂盒(P0010)、Annexin V-FITC 试剂盒(C1063):江苏碧云天生物技术有限公司; β -actin 单克隆抗体(9470)、NF- κ B 单克隆抗体(8242):Cell Signaling Technology;SIRT1 单克隆抗体(ab110304):Abcam 公司。Bax、Bcl-2、Caspase-3、 β -actin 基因序列设计引物:由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2 方法

2.1 动物分组及模型复制 参考文献^[7]的方法,

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研计划项目(201840071)

作者简介:刘婷(1985-),女,硕士,主治医师

手术切除小鼠右膝关节内侧半月板和前交叉韧带,以复制 OA 模型。模型复制成功标准:小鼠出现步态异常和行走缓慢,且小鼠左侧膝关节直径较右侧增加值 ≥ 0.5 mm。模型复制成功后,将小鼠随机分成模型组,盘龙七片低、中、高剂量组,阳性对照组,每组 10 只,并设置正常对照组。盘龙七片低、中、高剂量组小鼠分别按 137、273、546 mg/(kg·d) 给药,阳性对照组小鼠按 228 mg/(kg·d) 给予硫酸氨基葡萄糖,去掉胶囊后溶于生理盐水中灌胃。将盘龙七片研磨成粉末,用生理盐水溶解后灌胃给药,每日给药 1 次,连续 4 周。正常对照组、模型组小鼠给予等容积生理盐水灌胃,连续 4 周。4 周后采用颈椎脱臼法处死各组小鼠,无菌条件下剪取小鼠膝关节组织(股骨髁及胫骨平台软骨),剥离软骨组织,待用。

2.2 软骨组织染色 将分离的软骨组织用 4% 多聚甲醛溶液固定,然后使用番红 O-快速绿染色。参考改良的 Mankin 等^[10]评分方法,从整体结构、细胞结构、番红染色、潮线完整性 4 个方面对小鼠的 OA 进行评分,最低 0 分,最高 14 分,评分越高,表明关

节炎越严重。

2.3 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡 无菌条件下分离小鼠软骨组织,剪碎并加入胰蛋白酶消化后,离心,收集软骨细胞,并进行后续实验。使用 DMEM 培养液制备 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,使用预冷的 PBS 洗涤后,加入 Annexin V-FITC 试剂盒试剂,置于流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.4 qRT-PCR 检测软骨细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达水平 收集各组软骨细胞,使用 RNA 提取试剂盒提取各组软骨细胞总 RNA,再使用反转录试剂盒进行反转录,得到 cDNA,将 cDNA 于 -20 °C 冰箱保存。采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达水平。反应条件:95 °C,120 s;95 °C,30 s;60 °C,75 s;95 °C,30 s;40 个循环。每个样品设置 3 个复孔。反应结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达水平。Bax、Bcl-2、Caspase-3 及内参 β -actin 基因引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
Bax	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
Bcl-2	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
Caspase-3	GGAGTCTGACTGGAAAGCCGAA	CTTCTGGCAAGCCATCTCCTCA
β -actin	AGTGCACGCTGGACATCCG	TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG

2.5 Western blot 法检测软骨细胞 SIRT1、NF- κ B 蛋白表达水平 收集各组软骨细胞,加入含蛋白酶抑制剂裂解液,严格按照试剂盒说明书提取各组总蛋白,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取适量蛋白样品,100 °C 水浴变性 10 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后转至 PVDF 膜上,用 5% BSA 室温封闭 2 h,分别加入 1:2 000 稀释的 SIRT1、NF- κ B 抗体,4 °C 过夜孵育,再加入相应的二抗,室温孵育 2 h,滴加 ECL 显色液,利用凝胶成像仪对 Western blot 印迹条带进行定量分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据。计量资料以“均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。多组均数比较采用单因素方差分析,均数多重比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

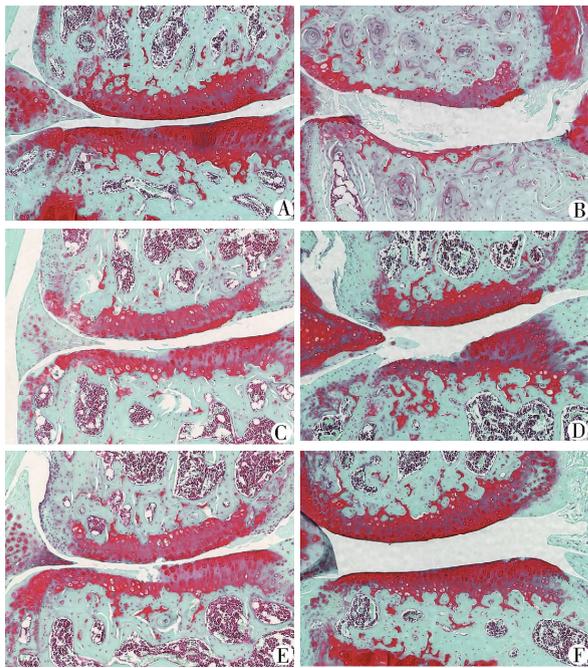
3.1 各组小鼠膝关节软组织的组织形态学变化 番红 O-快速绿染色结果显示:正常对照组小鼠细胞核呈蓝色,关节间隙正常,细胞排列层次分明,关节软骨组织被染成红色,软骨下骨为绿色;模型组小鼠膝关节面不平整,细胞结构层次混乱,关节间隙十分狭

窄;盘龙七片低、中、高剂量组小鼠关节间隙稍狭窄,但仍清晰可见,但有部分破坏,随着浓度升高,关节间隙明显,关节轮廓可见。见图 1。

3.2 各组小鼠的 OA 评分比较 与模型组比较,阳性对照组和盘龙七片低、中、高剂量组小鼠的 OA 评分均显著降低($P < 0.05$),盘龙七片降低 OA 评分的效应呈剂量依赖性。见表 2。

3.3 各组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率比较 与正常对照组比较,模型组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和盘龙七片低、中、高剂量组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);盘龙七片降低软骨细胞凋亡率的效应呈现剂量依赖性($P < 0.05$)。见图 2 和表 3。

3.4 各组小鼠膝关节软骨细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 相对表达水平比较 与正常对照组比较,模型组小鼠膝关节软骨细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平显著增加,Bcl-2 表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和盘龙七片低、中、高剂量组软骨细胞



注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性对照组;D.盘龙七片低剂量组;E.盘龙七片中剂量组;F.盘龙七片高剂量组

图1 各组小鼠膝关节软组织的组织形态学变化

(番红O-快速绿染色,10×20倍)

表2 各组小鼠的OA评分比较(±s)

组别	n	OA评分
正常对照	10	—
模型	10	11.56±1.95
阳性对照	10	6.42±1.05*
盘龙七片低剂量	10	8.33±1.21*
盘龙七片中剂量	10	6.68±1.13*#
盘龙七片高剂量	10	5.45±1.05*#△

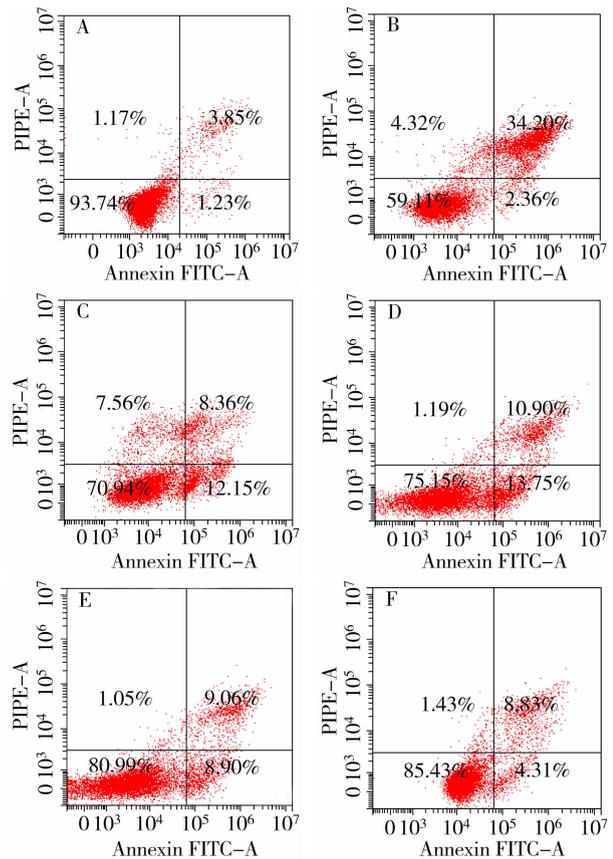
注:与模型组比较,* $P<0.05$;与盘龙七片低剂量组比较,# $P<0.05$;与盘龙七片中剂量组比较,△ $P<0.05$

Bax,Caspase-3 mRNA 表达水平显著降低,Bcl-2 mRNA 表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),盘龙七片的效应呈剂量依赖性。见表4。

3.5 各组小鼠膝关节软骨细胞中 SIRT1、NF-κB 蛋白相对表达水平比较 与正常对照组比较,模型组小鼠软骨细胞 SIRT1 表达水平显著降低,NF-κB 表达水平显著增加,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,阳性对照组与盘龙七片低、中、高剂量组软骨细胞 SIRT1 表达水平显著增加($P<0.05$),NF-κB 表达水平显著降低($P<0.05$),盘龙七片的效应呈剂量依赖性。见图3和表5。

4 讨论

OA 是一种常见的慢性关节疾病,主要表现为膝关节(单侧或双侧)疼痛、酸胀、关节僵硬,严重者站立及行走等活动功能障碍,有着高发病率、高致残率、治疗周期长的特点^[11]。在本研究中,番红O-快



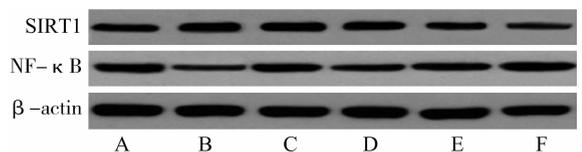
注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性对照组;D.盘龙七片低剂量组;E.盘龙七片中剂量组;F.盘龙七片高剂量组

图2 流式细胞仪检测各组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率

表3 各组小鼠膝关节软骨细胞凋亡率比较(±s)

组别	n	细胞凋亡率/%
正常对照	10	5.24±0.65*
模型	10	37.78±4.56
阳性对照	10	20.53±3.45*
盘龙七片低剂量	10	24.33±3.95*
盘龙七片中剂量	10	18.45±3.69*#
盘龙七片高剂量	10	13.68±2.89*#△

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与盘龙七片低剂量组比较,# $P<0.05$;与盘龙七片中剂量组比较,△ $P<0.05$



注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性对照组;D.盘龙七片低剂量组;E.盘龙七片中剂量组;F.盘龙七片高剂量组

图3 Western blot 法检测各组小鼠膝关节软骨

细胞 SIRT1、NF-κB 蛋白相对表达水平

速绿染色显示正常对照组细胞核呈蓝色,关节间隙正常,细胞排列层次分明,关节软骨组织被染成红色,软骨下骨为绿色,而模型组关节面不平整,细胞结构层次混乱,关节间隙十分狭窄,与谭清梅等^[12]

表4 各组小鼠膝关节软骨细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase-3 mRNA
正常对照	10	0.91±0.21*	1.02±0.23*	0.92±0.25*
模型	10	2.83±0.41	0.52±0.19	3.21±0.47
阳性对照	10	2.23±0.35*	1.68±0.21*	2.34±0.42*
盘龙七片低剂量	10	2.35±0.36*	1.57±0.37*	2.65±0.48*
盘龙七片中剂量	10	1.81±0.32*#	2.03±0.39*#	1.99±0.32*#
盘龙七片高剂量	10	1.40±0.23*#△	2.66±0.45*#△	1.51±0.31*#△

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与盘龙七片低剂量组比较,# $P<0.05$;与盘龙七片中剂量组比较,△ $P<0.05$

表5 各组小鼠膝关节软骨细胞中 SIRT1、NF-κB 蛋白相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SIRT1	NF-κB
正常对照	10	0.99±0.14*	0.52±0.08*
模型	10	0.26±0.09	1.68±0.12
阳性对照	10	0.52±0.10*	1.43±0.13*
盘龙七片低剂量	10	0.45±0.11*	1.39±0.14*
盘龙七片中剂量	10	0.67±0.09*#	1.03±0.12*#
盘龙七片高剂量	10	0.82±0.09*#△	0.78±0.08*#△

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与盘龙七片低剂量组比较,# $P<0.05$;与盘龙七片中剂量组比较,△ $P<0.05$

研究结果类似,提示小鼠 OA 模型复制成功。

OA 属中医学“痹证”“骨痹”范畴^[13]。中医学治疗寒湿痹阻型 OA 的方法较多,但治法几乎以祛风散寒除湿为主。盘龙七片主要包含盘龙七、川乌、草乌、当归、杜仲、丹参等 29 味药材,盘龙七具有补脾健胃、收涩固肠、除湿利水、活血之功,丹参具有扩张血管、加强心肌收缩的功能,方中川乌、草乌、秦艽、伸筋草祛风散寒除湿止痛。诸药共奏活血化瘀、祛风除湿、消肿止痛之功,常与其他药物联合治疗 OA^[14]。研究^[15]表明,盘龙七对寒湿痹阻型 OA 有效。小鼠寒湿痹阻型 OA 模型尚无文献依据,因此,本研究复制小鼠 OA 模型时未考虑中医证型。本研究发现,使用盘龙七片治疗后,OA 小鼠膝关节破坏减轻,关节间隙明显,提示盘龙七片对 OA 具有一定的保护作用。

有研究^[16]表明,软骨细胞凋亡以及软骨下骨异常骨重建与 OA 发病密切相关。何健宜等^[17]研究表明,高脂饮食诱导的 OA 小鼠膝关节软骨凋亡细胞数增多。因此,寻找有效抑制软骨细胞过度凋亡且能促进软骨细胞增殖的药物具有重要意义。本研究结果发现,与正常对照组相比,模型组软骨细胞凋亡率增加,与模型组比较,盘龙七片低、中、高剂量组软骨细胞凋亡率显著降低,并呈剂量依赖性,提示盘龙七片有抑制小鼠软骨细胞凋亡的作用。Bax mRNA 是促凋亡基因,Bcl-2 mRNA 为抗凋亡基因,Caspase-3 是细胞凋亡的重要标志,在细胞凋亡过程中发挥重要作用。本研究发现,盘龙七片呈剂量依赖性地降低小鼠膝关节软骨细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平,升高 Bcl-2 mRNA 表达水平,提

示盘龙七片抑制小鼠软骨细胞凋亡的机制与调节凋亡相关基因的表达水平有关。

SIRT1 广泛存在于机体多种细胞之中,被认为与细胞的基因转录、增殖凋亡等密切相关,在软骨细胞外基质合成及抗炎作用中起着重要作用^[18]。李春亮等^[19]研究表明,SIRT1 在 OA 软骨组织中低水平表达,通过上调 SIRT1 表达水平,可显著抑制软骨细胞凋亡及调控凋亡相关蛋白的表达水平。多种信号转导通路参与 OA 的病理进程,其中 NF-κB 通路通过促炎反应发挥作用已被证实。研究^[20]表明,激活 SIRT1 可抑制 NF-κB 信号途径的氧化应激反应。Zhang 等^[21]研究表明,小檗碱能够通过调节 SIRT1/NF-κB 信号通路,抑制脂多糖诱导的巨噬细胞的炎症反应。Han 等^[22]研究表明,SIRT1 通过抑制 NF-κB 信号通路发挥抗炎作用,而阻止人卵巢颗粒细胞的凋亡。本研究结果发现,盘龙七片呈剂量依赖性地升高 OA 小鼠膝关节软骨细胞 SIRT1 表达水平,降低 NF-κB 表达水平。结果提示盘龙七片可能通过上调 SIRT1 的表达水平,抑制 NF-κB 信号通路,进一步抑制软骨细胞凋亡。

综上所述,盘龙七片可抑制 OA 软骨细胞凋亡,其作用机制可能与 SIRT1/NF-κB 信号通路有关。但本研究局限于 SIRT1/NF-κB 信号通路相关因子表达水平的变化情况,未对通路进行验证,仍需做进一步研究。

参考文献:

- [1] 段超,周细江,陈焱,等.人参皂苷 Rg1 对兔膝骨性关节炎关节软骨细胞凋亡的影响[J].中医学报,2018,33

- (12):2387-2392.
- [2] 吴琪,何敢想,胡燕芬,等.丹皮酚致兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达的时间与剂量效应研究[J].中国药房,2016,27(10):1337-1340.
- [3] 黄建萍.盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝骨性关节炎的临床效果研究[J].双足与保健,2019,222(16):169-170.
- [4] KATSARA O, ATTUR M, RUOFF R, et al. Increased activity of the chondrocyte translational apparatus accompanies osteoarthritic changes in human and rodent knee cartilage[J]. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(3): 586-597.
- [5] HWANG H S, KIM H A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11):26035-26054.
- [6] ZHENG W, FENG Z, YOU S, et al. Fisetin inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 45(1):135-147.
- [7] 刘军,何晓乐,甄平,等. SIRT1 信号通路介导薯蓣皂苷元在骨性关节炎软骨细胞代谢中的作用机制[J].中南大学学报(医学版),2017,42(2):7-13.
- [8] CHELESCHI S, TENTI S, MONDANELLI N, et al. MicroRNA-34a and microRNA-181a mediate visfatin-induced apoptosis and oxidative stress via NF- κ B pathway in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Cells, 2019, 8(8):874-895.
- [9] 鲁宏,宋俊,孟京红,等.香叶木素通过 NF- κ B 通路缓解 IL-1 β 诱导的新生大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡和免疫反应[J].中国免疫学杂志,2019,35(3):292-297.
- [10] PATEL D V, SAWANT M G, KAUR G. Evaluation of anti-osteoarthritic activity of Vigna mungo in papain induced osteoarthritis model[J]. Indian J Pharmacol, 2015, 47(1):59-64.
- [11] 严可,欧梁,邝高艳,等.加味独活寄生汤对兔膝骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(4):1-6.
- [12] 谭清梅,杨诚,廖坚文,等.二甲双胍通过 AMPK 信号通路对小鼠骨关节炎保护作用的研究[J].中国临床解剖学杂志,2017,35(4):413-418.
- [13] 蒲晓东,杨艳梅.膝骨关节炎中医病名再辨识[J].时珍国医国药,2017,28(12):2972-2973.
- [14] 韩艳阳,陈运动,侯立仁.膝关节 O₃ 注射联合盘龙七片治疗膝骨性关节炎的效果[J].河南医学研究,2018,27(24):69-70.
- [15] 周晓莉,乔平平.盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎 32 例[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(12):68-69.
- [16] ZHANG X H, XU X X, XU T. Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF- κ B[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4):283-289.
- [17] 何健宜,姜梦琪,刘旭丹,等.高脂饮食诱导 C57BL/6J 肥胖小鼠骨关节炎模型的建立[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2017,26(5):445-450.
- [18] LIM H D, KIM Y S, KO S H, et al. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of melatonin in hydrogen peroxide-stimulated CHON-001 human chondrocyte cell line and rabbit model of osteoarthritis via the SIRT1 pathway[J]. J Pineal Res, 2012, 53(3):225-237.
- [19] 李春亮,李钊伟,秦凤. Sirt1 调控软骨细胞自噬在骨关节炎中作用及机制[J].重庆医学,2016,45(15):2118-2122.
- [20] XU F, XU J, XIONG X, et al. Salidroside inhibits MAPK, NF- κ B, and STAT3 pathways in psoriasis-associated oxidative stress via SIRT1 activation[J]. Redox Rep, 2019, 24(1):70-74.
- [21] ZHANG H, SHAN Y, WU Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cells[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52(1):93-100.
- [22] HAN Y, LUO H, WANG H, et al. SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF- κ B signaling with anti-inflammatory functions[J]. Apoptosis, 2017, 22(10):1260-1272.

(收稿日期:2020-06-29)

Effect of Panlongqi Tablet on Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis by Regulating the Silent Information Regulator Type 1/Nuclear Factor-kappa B Pathway

LIU Ting, XIONG Yi-zhe, DU Guo-qing, WANG Xiang

(Department of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of Panlongqi Tablet on the silent information regulator type 1 (SIRT1)/nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway and chondrocyte apoptosis in osteoarthritis (OA) mice.

Methods A mouse model of OA was established by surgical resection of the medial meniscus and the anterior

· 方药研究 ·

排脓散汤剂和散剂中有效成分 生物利用度的比较研究

李嘉诚¹, 张孟孟¹, 芮雪琳¹, 杨 晔^{1,2}, 徐 莉¹, 江倩倩¹, 尹登科^{1,2,3}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230012; 3. 现代中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 比较排脓散的汤剂与散剂中有效成分的药物代谢动力学参数, 为排脓散的剂型选择提供依据。

方法 以栀子苷为内标, 采用 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血液中芍药苷、橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷的含量, 用乙酸乙酯法提取后, 制备样品, 然后使用 Thermo Scientific Synchronis C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) 在 35 ℃ 下进行色谱分离, 以水和乙腈为流动相, 流速 0.3 mL/min, 进行负离子模式的多反应监测, 用于测定血浆中标准品和内标。**结果** 4 种有效成分含量在 0.2~500 ng/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 提取回收率、稳定性、精密度均良好且达到测定要求。大鼠经单次给药后, 与汤剂比较, 排脓散散剂可显著增加橙皮苷的生物利用度 ($P < 0.05$), 而不能显著增加新橙皮苷、柚皮苷和芍药苷的生物利用度 ($P > 0.05$)。**结论** 排脓散散剂的生物利用度可能更优于汤剂。

[关键词]排脓散; 生物利用度; 超高效液相-质谱联用技术; 药物代谢动力学; 剂型

[中图分类号]R969.1 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2021.03.020

中药散剂是传统剂型之一, 具有药材用量少、成本低、制备简单等特点。历代医家在使用中药散剂过程中积累了大量经验, 明确指出“宜散不宜汤”的

一些方药, 如玉屏风散、五苓散、逍遥散^[1-3]。排脓散出自《金匱要略》, 由枳实、白芍、桔梗 3 味中药组成, 三者比为 5:5:2, 以散剂形式给药, 主治疗、痢、疔、淋巴结炎和直肠溃疡等炎症疾病^[4], 临床上疗效确切。目前在实验研究中多采用排脓散汤剂 (水提物) 给药形式^[5], 临床多采用散剂的给药形式^[6], 两者的有效成分生物利用度的差异尚不清楚。散剂是原始的剂型, 存在药材不宜辨认、服药口感差、药材粉末表面

基金项目:国家自然科学基金项目 (81874348); 新安医学教育部重点实验室开放课题 (2020xayx11); 安徽中医药大学探索性基金资助项目 (2017HXTS42)

作者简介:李嘉诚 (1997-), 男, 硕士研究生

通信作者:尹登科 (1977-), 男, 教授, yindengke@sina.com

cruciate ligament of the right knee, and the mice were divided into normal control group, model group, positive control group, and low-, middle-, and high-dose Panlongqi Tablet groups. Safranin O-fast green staining was performed to observe the changes of knee joint structure; Mankin score was used to evaluate the severity of arthritis; flow cytometry was used to measure chondrocyte apoptosis index; qRT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, and caspase-3, and Western blot was used to measure the protein expression levels of SIRT1 and NF-κB. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significant increases in the apoptosis rate of knee articular chondrocytes, the mRNA expression levels of Bax and caspase-3, and the protein expression level of NF-κB, as well as significant reductions in the mRNA expression level of Bcl-2 and the protein expression level of SIRT1 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the positive control group and the low-, middle-, and high-dose Panlongqi Tablet groups had significant reductions in the apoptosis rate of knee articular chondrocytes, the mRNA expression levels of Bax and caspase-3, and the protein expression level of NF-κB, as well as significant increases in the mRNA expression level of Bcl-2 and the protein expression level of SIRT1 ($P < 0.05$), and Panlongqi Tablet exerted an effect in a dose-dependent manner. **Conclusion** Panlongqi Tablet can inhibit the apoptosis of knee articular chondrocytes in OA mice, possibly by regulating the SIRT1/NF-κB signaling pathway.

[Key words] Panlongqi Tablet; Osteoarthritis; Chondrocyte; Silent information regulator type 1; Nuclear factor-kappa B; Signaling pathway; Apoptosis