

柚皮苷调控 NF- κ B 信号通路缓解软骨细胞炎症损伤的作用机制研究

张若熙 田锋祥 周玲玲

(南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210023)

摘要 目的:观察柚皮苷对软骨细胞炎症损伤的影响,探索柚皮苷通过干预核因子(NF)- κ B信号通路缓解软骨细胞炎症损伤的作用机制。方法:体外培养人软骨细胞,加入细胞培养板,分为正常组、模型组和柚皮苷低、中、高剂量组,除正常组外,其余各组细胞均使用脂多糖(LPS)诱导细胞损伤,柚皮苷各剂量组分别给予不同浓度的柚皮苷(2.5、5、10 μ mol/L)进行干预。使用cck-8 (cell counting kit-8)法检测各组细胞活力,酶联免疫吸附测定法(ELISA法)检测各组细胞上清中炎症介质白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、一氧化氮(NO)、前列腺素E₂(PGE₂)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot法)检测细胞内环氧酶(COX)-2、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、I κ B α 、p-I κ B α 、p65、p-p65蛋白的表达。结果:模型组软骨细胞活力较正常组明显降低($P<0.01$),柚皮苷中、高剂量组软骨细胞活力明显高于模型组($P<0.01$)。模型组软骨细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂等炎症介质含量均明显高于正常组($P<0.01$),柚皮苷各剂量组软骨细胞上述指标较模型组有不同程度的降低,以柚皮苷中、高剂量组降低更为明显($P<0.05$, $P<0.01$)。模型组软骨细胞COX-2、iNOS蛋白表达明显高于正常组($P<0.01$, $P<0.05$),p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65比值明显高于正常组($P<0.05$, $P<0.01$);柚皮苷中、高剂量组软骨细胞上述指标水平或比值均显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。柚皮苷各剂量对上述指标的改善作用均表现出一定的剂量依赖性。结论:柚皮苷可以缓解软骨细胞炎症损伤,其机制可能与调控NF- κ B通路有关。

关键词 柚皮苷;软骨细胞;炎症介质;细胞因子;NF- κ B信号通路

骨关节炎(OA)是临床常见病,其病理特征包括关节软骨的结构破坏和弹性逐渐丧失、软骨下骨增厚、骨赘形成^[1],严重影响了患者的生活质量。核因子(NF)- κ B是OA炎症的主要调节因子,可被白细胞介素(IL)-1 β 、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 异常激活从而诱导促炎介质例如一氧化氮(NO)、前列腺素E₂(PGE₂)的产生,促进软骨基质降解和进行性破坏以及炎症性疼痛^[2]。

中药骨碎补具有活血、补肾强骨、续伤止痛功效,可用于治疗骨痿、骨痹等关节屈伸不利或伴关节疼痛的疾病,疗效显著^[3]。骨碎补的主要活性成分可促进骨组织修复、改善骨代谢,可通过阻断NF- κ B信号通路,抑制炎症因子及基质金属蛋白酶的表达延缓椎间盘退变过程^[4]。柚皮苷是中药骨碎补的代表性成分,其在结肠炎、肝炎、肺炎等多种炎症疾病中发挥对正常组织的保护作用并可抑制软骨细胞炎症反应及骨关节炎进展^[5-7],其对骨质疏松症等骨科疾病的治疗作用已得到证实并多有研究,但能否用于治疗OA目前鲜有报道。本研究采用LPS诱导软骨细胞的炎症反应,建立软骨细胞炎症模型,观察柚皮苷对细胞损伤的保护作用,并从炎症蛋白表达和炎症因子释

放的角度探索柚皮苷的抗炎作用及其可能的机制。

1 实验材料

1.1 实验细胞 正常人关节软骨细胞系C28/I2购自上海哈灵生物技术有限公司,细胞培养采用含1%青霉素链霉素双抗、10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,于37℃、5% CO₂进行培养传代。

1.2 主要试剂 柚皮苷(货号: B21594,上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$),高糖DMEM培养基(货号: 8122011,南京迈博生物科技有限公司),胎牛血清(货号: 40130ES76,上海翌圣生物科技有限公司),青霉素-链霉素、胰蛋白酶(货号: C100C5、C100C1,苏州新赛美生物科技有限公司),LPS(货号: L2880, Sigma公司),cck-8 (cell counting kit-8)试剂盒(货号: K1018, APEXbio公司),TNF- α 、IL-6、PGE₂ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号: ml077385、ml058097、ml057929,上海酶联生物科技有限公司),NO ELISA试剂盒(货号: S0021S,上海碧云天生物技术有限公司),I κ B α 、p-I κ B α 、p-p65抗体(货号: T55026、TP56280、TP56372,上海Abmart医药科技有限公司),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧酶(COX)-2、p65、 β -actin抗体(货号: 18985-1、

12375-1、P1045、ZB-2301, 武汉三鹰生物技术有限公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(货号: ZB-2301, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州净化设备有限公司), 低温超高速离心机(美国Thermo Scientific公司), Infinite M200型全自动酶标仪(瑞士TECAN公司), 垂直电泳系统、转膜印迹系统、全自动化学发光凝胶成像仪(美国BIO-RAD公司), 超低温冰箱(美国Thermo Scientific公司)。

2 实验方法

2.1 细胞分组、造模与给药 前期研究发现, 柚皮苷浓度在20 $\mu\text{mol/L}$ 时对正常软骨细胞活力产生明显影响, 使细胞活力显著降低, 表现出较强的细胞毒性; 在2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对正常细胞活力影响不明显。鉴于上述结果, 本实验选取2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 作为柚皮苷干预细胞的低、中、高剂量。

将软骨细胞分为正常组、模型组和柚皮苷低、中、高剂量组, 将各组细胞加入细胞培养板, 待细胞贴壁后, 除正常组外, 其余各组细胞加入10 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 柚皮苷低、中、高剂量组同时分别加入2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷, 作用24 h。

2.2 cck-8法检测细胞活力 细胞加入96孔细胞培养板(5×10^3 个/孔), 按2.1项下方法分组、造模与给药, 每组设4个复孔, 药物作用24h后每孔加入10 μL cck-8试剂, 2 h后于450 nm处检测吸光度, 计算细胞活力。

2.3 ELISA法检测细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE2水平 细胞加入96孔细胞培养板(5×10^3 个/孔), 按2.1项下方法分组、造模与给药, 药物作用24 h后收集上清液, 300 $\times g$ 离心5 min, 吸取上清液200 μL , 参照相应ELISA试剂盒说明书, 分别检测各组细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE2水平。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot法)检测细胞NF- κ B通路关键蛋白表达

细胞加入6孔细胞培养板(2×10^5 个/孔), 按2.1项下方法分组、造模与给药, 药物作用24 h后提取细胞总蛋白。采用BCA法进行蛋白定量, 以 β -actin为内参, 加样, PAGE凝胶电泳, PVDF膜转印, 5%BSA封闭2 h, TBST清洗3次; 分别加入1:1000稀释的炎症蛋白(iNOS、COX-2)一抗、NF- κ B通路蛋白(p-I κ B α 、I κ B α 、p-p65、p65)一抗和1:10 000稀释的 β -actin抗体, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日取出复温, TBST清洗3次, 加入山羊抗兔二抗, 室温摇床孵育1 h, TBST清洗3次, ECL化学发光。使用Image Lab软件分析各条带

灰度值, 用 β -actin均一化处理, 计算蛋白相对表达量。p-I κ B α /I κ B α 和p-p65/p65可反映蛋白磷酸化活化的情况, 本研究对磷酸化蛋白和总蛋白进行均一化处理后再做其比值, 以明确NF- κ B通路蛋白活化的情况。

2.5 统计学方法 实验数据采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析, 本研究所有数据均符合正态分布, 以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t -test, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组软骨细胞活力比较 模型组软骨细胞活力较正常组明显降低($P < 0.01$), 柚皮苷中、高剂量组软骨细胞活力明显高于模型组($P < 0.01$), 柚皮苷高剂量组软骨细胞活力明显高于中、低剂量组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见表1。

表1 各组软骨细胞活力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞活力
正常组	4	1.01 $\pm$ 0.01
模型组	4	0.60 $\pm$ 0.04 $^{\Delta\Delta}$
柚皮苷低剂量组	4	0.64 $\pm$ 0.03
柚皮苷中剂量组	4	0.72 $\pm$ 0.03 $^{**\#}$
柚皮苷高剂量组	4	0.77 $\pm$ 0.02 $^{***\#\Delta}$

注: 与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$; 与柚皮苷低剂量组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与柚皮苷中剂量组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

3.2 各组软骨细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE2水平比较 模型组软骨细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE2水平显著高于正常组($P < 0.01$), 提示LPS可以诱导软骨细胞炎症反应。柚皮苷各剂量组软骨细胞上清中上述指标水平均较模型组有不同程度的降低, 且表现出一定的剂量依赖性。详见表2。

表2 各组软骨细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO和PGE2水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-6/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	NO/(pmol/mL)	PGE2/(pg/mL)
正常组	3	31.70 $\pm$ 1.60	33.48 $\pm$ 1.22	35.66 $\pm$ 2.43	43.38 $\pm$ 4.13
模型组	3	156.97 $\pm$ 5.08 $^{\Delta\Delta}$	158.27 $\pm$ 13.79 $^{\Delta\Delta}$	153.82 $\pm$ 10.71 $^{\Delta\Delta}$	577.41 $\pm$ 36.11 $^{\Delta\Delta}$
柚皮苷低剂量组	3	133.62 $\pm$ 5.77 *	143.22 $\pm$ 4.75	126.41 $\pm$ 7.80 **	443.19 $\pm$ 9.80 *
柚皮苷中剂量组	3	117.14 $\pm$ 2.26 $^{**\#}$	130.85 $\pm$ 3.15 $^{*\#}$	108.74 $\pm$ 6.41 **	320.79 $\pm$ 8.24 $^{**\#}$
柚皮苷高剂量组	3	74.18 $\pm$ 6.22 $^{***\#\Delta}$	81.18 $\pm$ 12.42 $^{***\#\Delta}$	82.56 $\pm$ 4.42 $^{***\Delta}$	199.98 $\pm$ 23.72 $^{***\Delta}$

注: 与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与柚皮苷低剂量组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与柚皮苷中剂量组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

3.3 各组软骨细胞中炎症相关COX-2、iNOS蛋白表达比较 模型组软骨细胞中COX-2、iNOS蛋白表达明显高于正常组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 柚皮苷中、高剂量组软骨细胞中上述蛋白表达明显低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$), 柚皮苷各剂量对上述蛋白表达的抑制作用表现出一定的剂量依赖性。详见表3、图1。

表3 各组软骨细胞COX-2、iNOS蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	COX-2	iNOS
正常组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	3	1.71 ± 0.09 ^{△△}	1.90 ± 0.37 [△]
柚皮苷低剂量组	3	1.65 ± 0.15	1.29 ± 0.11
柚皮苷中剂量组	3	1.19 ± 0.05 ^{***}	1.13 ± 0.07 [*]
柚皮苷高剂量组	3	0.91 ± 0.17 ^{***▲}	0.98 ± 0.07 ^{**}

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$;与柚皮苷低剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$;与柚皮苷中剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

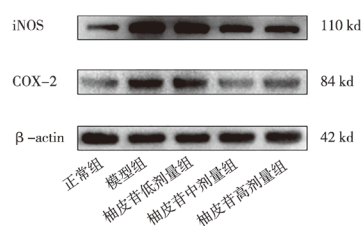


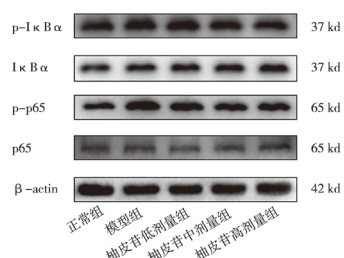
图1 各组软骨细胞中COX-2、iNOS蛋白电泳图

3.4 各组软骨细胞中NF- κ B通路蛋白表达比较 模型组软骨细胞p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65比值明显高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$),柚皮苷中、高剂量组软骨细胞上述比值均明显低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),柚皮苷各剂量对于上述指标的改善作用表现出一定的剂量依赖性。详见表4、图2。

表4 各组软骨细胞p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	p-I κ B α /I κ B α	p-p65/p65
正常组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	3	2.13 ± 0.60 [△]	1.49 ± 0.07 ^{△△}
柚皮苷低剂量组	3	1.14 ± 0.25	1.22 ± 0.20
柚皮苷中剂量组	3	0.99 ± 0.28 [*]	0.97 ± 0.22 [*]
柚皮苷高剂量组	3	0.88 ± 0.23 [*]	0.90 ± 0.16 ^{**}

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图2 各组软骨细胞p-I κ B α 、I κ B α 、p-p65、p65蛋白电泳图

4 讨论

OA是一种常见的关节病,其特征是关节软骨的变性和炎症。软骨细胞中NF- κ B的异常激活介导了OA炎症的发生和发展并且与软骨分化和软骨破坏有关^[8]。NF- κ B是一种与炎症因子产生、细胞增殖、细胞外基质交联和细胞凋亡密切相关的转录因子,

参与多种炎症的信号转导,在细胞中最常见的作用形式为NF- κ B p65及NF- κ B p50^[9]。正常情况下,p65与其抑制蛋白I κ B α 结合,使NF- κ B通路失活,当受到炎症信号刺激后,处于细胞质中的I κ B α 降解,促使p65易位入核并磷酸化^[10-11],磷酸化的p65可促进大量炎症因子如iNOS、COX-2的表达,已被证明是导致OA发生和进展的重要因素^[12-13]。

LPS作为炎症刺激因子,能够有效激活NF- κ B信号通路^[14-15],因此本研究选取LPS作为炎症诱导因子来构建C28/I2软骨细胞炎症模型。本研究结果证实了LPS可引起软骨细胞活力下降,软骨细胞中iNOS和COX-2等炎症相关蛋白表达增加,细胞上清中IL-6、TNF- α 、NO、PGE2等炎症介质水平升高,同时可使NF- κ B通路的信号蛋白表达增多,提示经LPS诱导细胞损伤时该NF- κ B信号通路活化。

本研究结果表明,中药骨碎补代表性成分柚皮苷在安全浓度范围内可显著逆转LPS诱导的软骨细胞活力下降,抑制其IL-6、TNF- α 、NO、PGE2等炎症介质的释放,下调软骨细胞iNOS和COX-2的表达,说明其可抑制软骨细胞炎症反应,且其抑制作用具有一定的剂量依赖性。由于NF- κ B在软骨细胞炎症改变中的重要作用,我们进一步观察了柚皮苷对于NF- κ B通路蛋白表达的影响,以p-I κ B α /I κ B α 和p-p65/p65反映蛋白磷酸化活化的程度,结果表明:在安全浓度范围内的柚皮苷可剂量依赖性地影响NF- κ B信号通路中关键蛋白的磷酸化活化,这可能是其发挥抗炎效应的重要机制。

本研究初步探索了柚皮苷缓解软骨细胞炎症反应的作用及其机制,这对于提高中药的科技内涵、指导临床合理用药具有重要意义,同时亦有利于发现新的组分中药,推进中药现代化进程。今后拟进一步研究柚皮苷作用于NF- κ B信号通路的具体环节和机制,以期OA的治疗提供新靶点、新策略。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393: 1745.
- [2] RIGOGLOU S, PAPAVALASSILIOU A G. The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(11): 2580.
- [3] 邓强, 乔小万, 李中锋, 等. 骨碎补活性成分治疗骨骼系统疾病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(7): 1.
- [4] 李冬霞, 陈颖颖, 罗静, 等. 骨碎补总黄酮干预骨关节炎机制的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(3): 66.
- [5] MOHANTY S, KONKIMALLA V B, PAL A, et al. Naringin as a sustained delivery nanoparticles ameliorates the anti-inflammatory activity in a Freund's complete adjuvant-induced arthritis model[J]. ACS Omega, 2021, 6(43): 28630.

逍遥散及其类方治疗慢性疲劳综合征研究进展

徐秋露 韩秀珍 李 悦 商洪涛
(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

摘 要 随着社会发展、生活节奏的加快,慢性疲劳综合征(CFS)发病率呈逐年上升趋势,已成为世界范围内公共卫生领域的热点和难点问题。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,具有疏肝解郁、健脾养血之功效。临床及实验研究证实,逍遥散及其类方不仅能缓解CFS患者疲劳状态,还可以改善患者负面情绪、提高睡眠质量,且不良反应较少,其作用机制与调控神经递质含量及下丘脑-垂体-肾上腺轴、抑制炎症因子、抗氧化应激及调节肠道菌群有关。虽然逍遥散及其类方治疗CFS机制研究已取得一定进展,但其抗氧化应激、调节肠道菌群等机制研究尚不完善,未来可从以上方面进行研究,为治疗CFS和开发新药提供更广阔的思路和方法。

关键词 慢性疲劳综合征;逍遥散;药理机制;综述

基金项目 中华中医药学会团队标准立项(20220318-BZ-CACM)

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是指疲劳感持续或反复出现6个月以上,休息后不能缓解为主要表现的慢性疾病,伴或不伴有头痛、肌痛等躯体症状,可出现抑郁、焦虑、失眠等症状^[1-2]。最新数据显示,全球CFS患病率为1%,好发于儿童及成人,其中女性患病率高于男性^[3]。我国CFS发病率呈逐

年上升趋势,集中于30~40岁人群^[4]。目前西医治疗CFS多采用心理干预和认知治疗,主要运用抗病毒、抗抑郁、免疫抑制、镇痛、改善睡眠等手段以减轻症状,但不良反应较多,患者依从性差,疗效欠佳。

根据CFS临床表现可将其归属于中医学“虚劳”“郁证”等范畴,其病因多与先天禀赋不足、后天

- [6] PENGNET S, SUMARITHUM P, PHONGNU N, et al. Naringin attenuates fructose-induced NAFLD progression in rats through reducing endogenous triglyceride synthesis and activating the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13 : 1049818. doi : 10.3389/fphar.2022.1049818.
- [7] 胡静, 刘想忠, 石正帅, 等. 柚皮苷对白介素-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症反应的调节作用[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (12) : 38.
- [8] CHOI M C, JO J, PARK J, et al. NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction[J]. Cells, 2019, 8 (7) : 734.
- [9] XU Z X, KE T, ZHANG Y F, et al. Danshensu inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in chondrocytes and osteoarthritis possibly via suppressing NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Med, 2021, 27 (1) : 80.
- [10] JIMI E, FEI H, NAKATOMI C. NF- κ B signaling regulates physiological and pathological chondrogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (24) : 6275.
- [11] LEPETSOS P, PAPAVALASSILOU K A, PAPAVALASSILOU A G. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 132 : 90.
- [12] DE ANDRÉS M C, IMAGAWA K, HASHIMOTO K,

et al. Loss of methylation in CpG sites in the NF- κ B enhancer elements of inducible nitric oxide synthase is responsible for gene induction in human articular chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65 (3) : 732.

- [13] ULIVI V, GIANNONI P, GENTILI C, et al. p38/NF- κ B-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes[J]. J Cell Biochem, 2008, 104 (4) : 1393.
- [14] ROBINSON W H, LEPUS C M, WANG Q, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (10) : 580.
- [15] HUANG Z Y, KRAUS V B. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (2) : 123.

第一作者: 张若熙(2000—), 女, 本科在读, 中医学专业。

通讯作者: 周玲玲, 中药学博士, 教授, 博士研究生导师。zhoulingling@njucm.edu.cn

收稿日期: 2023-02-08

编辑: 吴 宁