

- 3095-3098.
- [13] 陈健,张梁坤,谷文超,等.半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J].中国中药杂志, 2021, 46(11):2871-2880.
- [14] CHEN YE, XU SJ, LU YY, et al. Asperuloside suppressing oxidative stress and inflammation in DSS-induced chronic colitis and RAW 264.7 macrophages via Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways[J]. Chem Biol Interact, 2021, 344:109512. DOI:10.1016/j.cbi.2021.109512.
- [15] RANI V, DEEP G, SINGH RK, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies[J]. Life Sci, 2016, 148:183-193.
- [16] 杨战, 杨宝山, 颜炳柱, 等. Keap1-Nrf2-ARE 抗氧化通路与肝脏疾病的研究进展[J]. 肝脏, 2018, 23(3):266-268.
- [17] 秦建梅, 程小丽, 安方玉, 等. 半夏泻心汤合四神丸加减方对溃疡性结肠炎大鼠 NO、NOS 及 TNF- α 的影响[J]. 甘肃中医, 2010, 23(6):29-32.
- [18] 石钺, 王茜, 刘宇, 等. 基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路探讨半夏泻心汤对慢性萎缩性胃炎大鼠的影响及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20):31-37.
- [19] 杜立娟, 孙敏, 王凡, 等. 半夏泻心汤对胰岛 β 细胞凋亡及氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9):4390-4394.
- [20] 李国臣. 半夏泻心汤治疗脓毒症胃肠功能障碍的临床疗效评价及其调控 PI3K/Akt/HO-1 信号通路作用机制的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2022.
- [21] FUJITA H, FUJISHIMA H, TAKAHASHI K, et al. SOD1, but not SOD3, deficiency accelerates diabetic renal injury in C57BL/6-Ins2 (Akita) diabetic mice [J]. Metabolism: Clinical and Experimental, 2012, 61(12):1714-1724.
- [22] CUI WP, BAI Y, MIAO X, et al. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012:821936. DOI:10.1155/2012/821936.
- [23] 全帅, 吕开原, 李新宇, 等. 低聚葡萄糖原花青素对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的影响及作用机制[J]. 中草药, 2020, 51(1):149-156.
- [24] RUIZ S, PERGOLA PE, ZAGER RA, et al. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2013, 83(6):1029-1041.
- [25] MANSOURI A, REINER Ž, RUSCICA M, et al. Antioxidant effects of statins by modulating Nrf2 and Nrf2/HO-1 signaling in different diseases[J]. J Clin Med, 2022, 11(5):1313.
- (收稿日期:2023-09-19,修回日期:2023-11-11)

引用本文: 沈晓娟, 程磊, 刘琳. 苍术素调节腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1 信号通路对白细胞介素-1 β 诱导软骨细胞自噬和凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2024, 28(5):899-903. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.05.011.



◇ 药学研究 ◇

苍术素调节腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1 信号通路对白细胞介素-1 β 诱导软骨细胞自噬和凋亡的影响

沈晓娟, 程磊, 刘琳

作者单位: 上海中医药大学附属龙华医院药学部, 上海 200032

通信作者: 程磊, 女, 主任医师, 研究方向为骨关节炎, Email: chenglei790919@163.com

摘要 **目的** 探讨苍术素(ATR)通过调节腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1 (AMPK/SIRT1) 信号通路对白细胞介素 1 β (IL-1 β) 诱导的乳鼠软骨细胞自噬与凋亡的影响。**方法** 2022 年 1—8 月从乳鼠中分离软骨细胞并鉴定; 使用不同浓度苍术素 (0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μ mol/L) 预处理软骨细胞, 再使用 IL-1 β 诱导软骨细胞培养 24 h, 噻唑蓝 (MTT) 法检测增殖活性, 筛选最佳药物浓度; 将软骨细胞分为对照组、IL-1 β 组 (10 μ g/L IL-1 β)、苍术素组 (10 μ g/L IL-1 β +20 μ mol/L 苍术素)、苍术素+AMPK 抑制剂组 (苍术素+compound C 组, 10 μ g/L IL-1 β +20 μ mol/L 苍术素+50 μ mol/L compound C); 流式细胞术与 TUNEL 法检测软骨细胞凋亡, 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色观察自噬小体; 蛋白质印迹法检测自噬及 AMPK/SIRT1 通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较, IL-1 β 组软骨细胞增殖活性、自噬水平、微管相关蛋白轻链 3 II/I (LC3 II/LC3 I) [(0.47 $\pm$ 0.08) 比 (1.23 $\pm$ 0.14)]、Beclin-1 [(0.67 $\pm$ 0.09) 比 (1.45 $\pm$ 0.19)]、自噬相关基因-5 (Atg5) [(0.35 $\pm$ 0.06) 比 (1.14 $\pm$ 0.13)]、磷酸化 AMPK (p-AMPK) [(0.37 $\pm$ 0.05) 比 (0.91 $\pm$ 0.05)]、SIRT1 [(0.51 $\pm$ 0.06) 比 (1.31 $\pm$ 0.14)]、磷酸化 Unc-51 样自噬激活蛋白酶 (p-ULK1) 蛋白表达 [(0.25 $\pm$ 0.04) 比 (0.85 $\pm$ 0.11)] 降低, 细胞凋亡率 [(28.46 $\pm$ 3.55)% 比 (2.54 $\pm$ 0.82)%] 升高 ($P<0.05$); 与 IL-1 β 组比较, 苍术素组细胞增殖活性、自噬水平、LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5、p-AMPK、SIRT1、p-ULK1 蛋白表达升高, 细胞凋亡率降低 ($P<0.05$); compound C 可逆转苍术素对 IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬激活作用。**结论** 苍术素通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路促进 IL-1 β 诱导的大鼠软骨细胞自噬, 抑制细胞凋亡。

关键词 苍术属; 白细胞介素 1 β ; 软骨细胞; AMPK/SIRT1 信号通路; 自噬

Effect of atractylodin on IL-1 β -induced autophagy and apoptosis of chondrocytes by regulating AMPK/SIRT1 signaling pathway

SHEN Xiaojuan, CHENG Lei, LIU Lin

Author Affiliation: Department of Pharmacy of Longhua Hospital Affiliated to Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract Objective To investigate the impacts of atractylodin (ATR) on interleukin-1 β (IL-1 β) induced autophagy and apoptosis of neonatal rat chondrocytes by regulating AMP-activated protein kinase/silencing Message regulator 1 (AMPK/SIRT1) signaling pathway. **Methods** Chondrocytes were isolated from suckling mice and identified from January to August 2022; different concentrations of atractylodin (0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 μ mol/L) was used to pretreat chondrocytes, and then IL-1 β was used to induce chondrocytes to culture for 24 hours, MTT assay was used to detect the proliferation activity to screen the best drug concentration; chondrocytes were divided into Control group, IL-1 β group (10 μ g/L IL-1 β), ATR group (10 μ g/L IL-1 β +20 μ mol/L ATR), and ATR+AMPK inhibitor group (ATR+compound C group, 10 μ g/L IL-1 β +20 μ mol/L ATR+50 μ mol/L compound C), flow cytometry and TUNEL were used to detect chondrocyte apoptosis, the autophagosomes were observed by MDC staining; Western blotting was used to detect the expression of autophagy and AMPK/SIRT1 pathway related proteins. **Results** Compared with the Control group, the proliferation activity of chondrocytes, autophagy level, protein expression of Microtubule-associated protein light chain 3 II / I (LC3 II / LC3 I) [(0.47 $\pm$ 0.08) vs. (1.23 $\pm$ 0.14)], Beclin-1 [(0.67 $\pm$ 0.09) vs. (1.45 $\pm$ 0.19)], Autophagy-related gene (Atg5) [(0.35 $\pm$ 0.06) vs. (1.14 $\pm$ 0.13)], Phosphorylated AMPK (p-AMPK) [(0.37 $\pm$ 0.05) vs. (0.91 $\pm$ 0.05)], SIRT1 [(0.51 $\pm$ 0.06) vs. (1.31 $\pm$ 0.14)], and Phosphorylated Autophagy Activating Kinase 1 (p-ULK1) [(0.25 $\pm$ 0.04) vs. (0.85 $\pm$ 0.11)] in IL-1 β group decreased, and the apoptosis rate [(28.46 $\pm$ 3.55)% vs. (2.54 $\pm$ 0.82)%] increased (P <0.05); compared with IL-1 β group, the proliferation activity of chondrocytes, autophagy level, protein expression of LC3 II / LC3 I, Beclin-1, Atg5, p-AMPK, SIRT1, and p-ULK1 in ATR group increased, and the apoptosis rate decreased (P <0.05); compound C was able to reverse the activation of IL-1 β -induced chondrocyte autophagy induced by atractylodin. **Conclusion** Atractylodin promotes IL-1 β -induced autophagy of rat chondrocytes and inhibits apoptosis by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway.

Keywords Atractylodes; Interleukin-1 β ; Chondrocytes; AMPK/SIRT1 signal pathway; Autophagy

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性疾病, 主要病理改变表现为软骨退化、骨赘形成、滑膜炎, 随着年龄的增长, 患病率呈升高趋势, 严重影响病人身心健康, OA 的发病机制尚不完全清楚, 软骨细胞凋亡在 OA 的发展中发挥重要作用, 抑制细胞凋亡是治疗 OA 的一个方向^[1-2]。自噬又称 II 型程序性细胞死亡, 研究显示, 自噬参与 OA 的进展, 增强自噬可以抑制软骨细胞凋亡, 延缓骨关节炎的进展^[3]。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种能量传感器, 可激活 Unc-51 样自噬激活蛋白酶 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 正调控自噬, 激活 AMPK 增强自噬, 抑制 OA 软骨细胞凋亡^[4]。沉默信息调节因子 1 (silent message modulator 1, SIRT1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的去乙酰化酶, 磷酸化的 AMPK 可提高细胞内 NAD⁺ 浓度, 激活 SIRT1 的表达, 激活 AMPK/SIRT1 信号通路, 可抑制炎症反应, 改善 OA 症状^[5]。苍术素 (atractylodin, ATR) 是从苍术中提取有效物质, 具有降糖、抗炎、抗氧化及抗肿瘤的作用^[6]。研究显示, 苍术素可抑制白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 诱导的软骨细胞炎症反应^[7], 但其具体作用机制尚不清楚, 本研究 2022 年 1—8 月通过观察苍术素对 IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬及对 AMPK/

SIRT1 信号通路的影响, 探索苍术素对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡与自噬可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 1 周龄 SD 雄性乳鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2021-0011。苍术素 (HPLC $\geq$ 98%) 购自四川成都/思克生物; 重组大鼠 IL-1 β (GS4468) 购自北京百奥莱博科技有限公司; AMPK 抑制剂 compound C (纯度 99.91%) 购自美国 MCE 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (CA1020)、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒 (M1020)、单丹磺酰尸胺 (montane sulfonyl cadaverine, MDC) 试剂盒 (G0170)、TUNEL 凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) (T2130) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; LC3 (AL221)、Beclin-1 (AF5123)、Atg5 (AF2269)、AMPK (AF1627)、p-AMPK (AF2677)、SIRT1 (AF5300) 抗体购自碧云天生物科技有限公司, ULK1 (ab167139)、p-ULK1 (ab203207) 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞的分离与鉴定 1 周龄 SD 乳鼠麻醉后处死, 根据参考文献^[8], 无菌条件下取软骨组织, 采用胰蛋白酶和 II 型胶原酶两步酶消化法提取软骨细胞, 原代细胞培养 3 d 后, 显微镜观察细胞生长情况, 采用甲苯胺蓝染色与 II 型胶原蛋白 (colla-

gen II)免疫荧光染色进行鉴定,鉴定过的细胞传代培养,选取第3代细胞进行后续实验。

1.2.2 苍术素浓度的筛选 第3代软骨细胞融合至80%左右时,按照 4×10^4 个接种于96孔板中,使用不同浓度的苍术素(0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$)处理软骨细胞,同时加入10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β 共同处理24 h后,另设正常培养的细胞为对照组,加入20 μL 的MTT溶液,孵育4 h后,加入DMSO终止反应,检测490 nm处的光密度值(OD值)。

1.2.3 细胞培养及分组 将软骨细胞随机分成4组,分别为对照组、IL-1 β 组、苍术素组(苍术素组)、苍术素+AMPK抑制剂组(苍术素+compound C组),其中IL-1 β 组使用10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β ^[8]诱导24 h,建立细胞模型;苍术素组使用20 $\mu\text{mol/L}$ 的苍术素与10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β 共同处理细胞24 h,苍术素+compound C组在建立细胞模型前,使用50 $\mu\text{mol/L}$ 的compound C^[9]预处理2 h,再使用20 $\mu\text{mol/L}$ 的苍术素与10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β 共同处理细胞24 h,对照组用等量的PBS处理细胞。

1.2.4 细胞凋亡检测 将各组处理的软骨细胞按照 4×10^4 个接种于96孔板中,培养24 h后,使用Annexin V-FITC/PI试剂盒检测细胞凋亡。

另取各组处理的软骨细胞按照 1×10^4 个细胞接种于无菌盖玻片上,培养24 h后,使用预冷的甲醇固定10 min,加入TUNEL反应液,37 $^{\circ}\text{C}$,染色1 h,光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 MDC染色观察自噬小体 收集各组处理的软骨细胞800 $\times g$ 离心5 min,使用Wash buffer将细胞制成 10^9 个/升的细胞悬液,取90 μL 细胞悬液加入10 μL 的MDC染色液,避光染色30 min,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 蛋白质印迹法检测细胞中自噬及AMPK/SIRT1通路相关蛋白表达 使用RIPA裂解液从各组处理的细胞中提取总蛋白,取30 μg 蛋白SDS-PAGE电泳、转膜后封闭,LC3(1:1 000)、Beclin-1(1:1 000)、Atg5(1:1 500)、p-AMPK(1:1 000)、AMPK(1:1 500)、SIRT1(1:1 000)、ULK1(1:1 500)、p-ULK1(1:1 500)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,再加入酶标二抗(1:1 000)室温孵育2 h,ECL试剂显色,以 β -actin为内参,利用Image J软件分析蛋白相对表达。

1.3 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计分析,计量资料符以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分布的正态性和方差齐性分别通过Kolmogorov-Smirnov检验和Levene检验进行分析($P > 0.05$);方差齐($P > 0.05$)时,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD-*t*检验;方差不齐时,组间两两比较采用

Games-Howell检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的分离与鉴定 显微镜下观察显示,分离的原代大鼠软骨细胞培养3 d后,细胞呈椭圆形或梭形,细胞贴壁生长(图1A),甲苯胺蓝染色显示,细胞核被染成深蓝色,核仁呈蓝紫色,细胞质褐红色(图1B),collagen II免疫荧光染色显示,细胞呈绿色(图1C),经DAPI染色细胞核呈蓝色,证明分离的细胞为软骨细胞。

2.2 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖活性的影响 与对照组(1.22 ± 0.11)比较,IL-1 β 组软骨细胞增殖活性(0.60 ± 0.07)显著降低($F = 45.91, P < 0.001$);使用不同浓度苍术素(5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$)预处理软骨细胞后,细胞增殖活性增加(0.63 ± 0.07 、 0.65 ± 0.08 、 0.78 ± 0.08 、 0.95 ± 0.09 、 1.06 ± 0.10),且苍术素浓度在20 $\mu\text{mol/L}$ 以上,可显著促进细胞增殖,因此选择苍术素浓度20 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

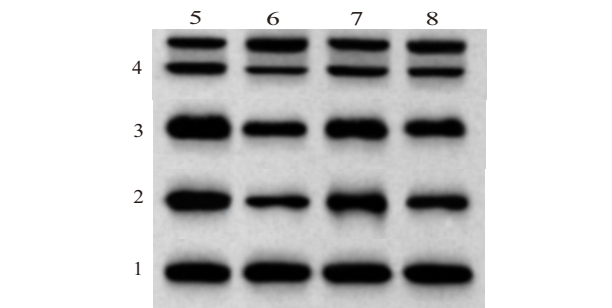
2.3 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响 与对照组(2.54 ± 0.82)%比较,IL-1 β 组软骨细胞凋亡率(28.46 ± 3.55)%显著升高($P < 0.05$);与IL-1 β 组比较,苍术素组软骨细胞凋亡率(14.26 ± 2.45)%显著降低($P < 0.05$);与苍术素组比较,苍术素+compound C组软骨细胞凋亡率(22.36 ± 2.71)%显著升高($P < 0.05$)。

TUNEL染色结果显示,凋亡细胞为绿色,细胞核为蓝色,与对照组比较,IL-1 β 组细胞绿色荧光增多,与IL-1 β 组比较,苍术素组绿色荧光减少;与苍术素组比较,苍术素+compound C组绿色荧光增多,见图2。

2.4 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬的影响 荧光显微镜下观察显示,MDC染色自噬小体呈绿色,与对照组相比,IL-1 β 组软骨细胞绿色荧光强度减弱;与IL-1 β 组相比,苍术素组细胞绿色荧光强度显著增强;与苍术素组比较,苍术素+compound C组细胞绿色荧光强度减弱,见图3。

2.5 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬相关蛋白的影响 与对照组比较,IL-1 β 组软骨细胞LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与IL-1 β 组相比,苍术素组软骨细胞LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与IL-1 β +苍术素组比较,苍术素+compound C组软骨细胞LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图4;表1。

2.6 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞AMPK/SIRT1通路相关蛋白的影响 与对照组相比,IL-1 β 组软骨细胞中p-AMPK、SIRT1、p-ULK1蛋白表达水



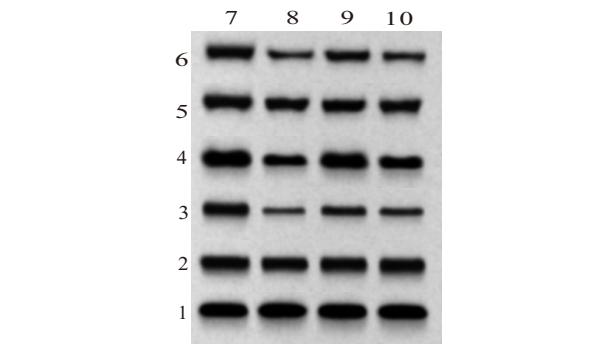
注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—自噬相关基因-5(Atg5);3—Beclin-1;4—微管相关蛋白轻链3 II/I(LC3 II/LC3 I);5—对照组;6—IL-1 β 组;7—苍术素组;8—苍术素+compound C组。

图4 各组软骨细胞LC3、Atg5、Beclin-1蛋白表达情况

表1 苍术素对IL-1 β 诱导的软骨细胞LC3、Beclin-1、Atg5表达的影响/ $\bar{x} \pm s$				
组别	重复次数	LC3 II/LC3 I	Beclin-1	Atg5
对照组	6	1.23 $\pm$ 0.14	1.45 $\pm$ 0.19	1.14 $\pm$ 0.13
IL-1 β 组	6	0.47 $\pm$ 0.08 ^①	0.67 $\pm$ 0.09 ^①	0.35 $\pm$ 0.06 ^①
苍术素组	6	1.05 $\pm$ 0.10 ^②	1.13 $\pm$ 0.12 ^②	0.81 $\pm$ 0.07 ^②
苍术素+compound C组	6	0.72 $\pm$ 0.08 ^③	0.95 $\pm$ 0.10 ^③	0.57 $\pm$ 0.06 ^③
F值		65.00	37.41	94.86
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:LC3为微管相关蛋白轻链3,Atg5为自噬相关基因-5。
①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与IL-1 β 组比较, $P<0.05$ 。③与苍术素组比较, $P<0.05$ 。

平显著降低($P<0.05$);与IL-1 β 组相比,苍术素组软骨细胞中p-AMPK、SIRT1、p-ULK1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与苍术素组比较,苍术素+compound C组细胞p-AMPK、SIRT1、p-ULK1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),各组之间AMPK、ULK1表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图5和表2。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—Unc-51样自噬激活蛋白酶(ULK1);3—p-ULK1;4—沉默信息调节因子1(SIRT1);5—腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK);6—p-AMPK;7—对照组;8—IL-1 β 组;9—苍术素组;10—苍术素+compound C组。

图5 各组软骨细胞SIRT1、ULK1、p-ULK1、AMPK、p-AMPK蛋白表达情况

表2 各组软骨细胞SIRT1、p-ULK1/ULK1、p-AMPK/AMPK蛋白表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-AMPK/AMPK	SIRT1	p-ULK1/ULK1
对照组	6	0.91 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.14	0.85 $\pm$ 0.11
IL-1 β 组	6	0.37 $\pm$ 0.05 ^①	0.51 $\pm$ 0.06 ^①	0.25 $\pm$ 0.04 ^①
苍术素组	6	0.76 $\pm$ 0.10 ^②	1.12 $\pm$ 0.13 ^②	0.67 $\pm$ 0.12 ^②
苍术素+compound C组	6	0.55 $\pm$ 0.06 ^③	0.87 $\pm$ 0.09 ^③	0.41 $\pm$ 0.06 ^③
F值		72.29	59.50	53.98
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,SIRT1为沉默信息调节因子1,ULK1为Unc-51样自噬激活蛋白酶。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与IL-1 β 组比较, $P<0.05$ 。③与苍术素组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

IL-1 β 是一种促炎细胞因子,可通过调节基质金属蛋白酶与炎症因子表达,诱导软骨细胞凋亡,参与OA进展,常作为诱导OA细胞模型的因子^[10]。本研究从乳鼠软骨组织分离软骨细胞,经甲苯胺蓝染色和collagen II免疫荧光染色证明成功分离软骨细胞。使用IL-1 β 处理软骨细胞后,细胞增殖活性降低,凋亡率升高,表明OA细胞模型建模成功。苍术素为苍术提取物,可以调控炎症反应、氧化应激、肿瘤细胞增殖与迁移等,具有多种药理学作用^[11]。研究显示,苍术素抑制核苷酸结合结构域-(nucleotide binding domain, NOD-)样受体蛋白3(like receptor protein 3, NLRP3)炎性体和toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)激活,抑制炎症反应,减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤^[12]。蒲博强等^[13]发现,苍术提取物可通过下调miR-378c表达,抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,促进细胞增殖。本研究使用不同浓度苍术素预处理细胞24h,再使用IL-1 β 处理细胞,结果显示细胞增殖活性增加,且在20 μ mol/L以上时,细胞增殖活性显著增加,选择20 μ mol/L的苍术素进行后续实验,发现20 μ mol/L的苍术素可显著抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。这与既往的研究结果^[13]一致,再次证实苍术素是OA的潜在治疗药物。

自噬是依赖溶酶体途径对细胞器及大分子物质进行降解的过程,具有维持细胞内稳态的作用,参与细胞凋亡过程^[14]。研究显示,自噬参与维持软骨内平衡,参与OA进展,激活自噬可减轻OA严重程度^[15]。LC3、Beclin-1、Atg5是自噬通路相关的调控因子,LC3有LC3-I和LC3-II两种形式,发生自噬时,LC3-I转化为LC3-II,Beclin-1可调控自噬前体的形成,Atg5是自噬活性标志物,与Beclin-1共同

参与正向调控自噬^[16]。苍术素参与自噬调节,如在胆管癌细胞中,苍术素可通过诱导自噬,抑制细胞增殖与迁移^[17]。本研究结果显示,在10 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β 刺激24 h后,软骨细胞中自噬小体水平和LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5蛋白表达水平显著降低,表明IL-1 β 诱导的软骨细胞中自噬被抑制;使用20 $\mu\text{mol/L}$ 的苍术素处理细胞后,IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬小体水平及LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5蛋白表达水平显著升高,提示苍术素可促进IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬,降低IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。

AMPK是细胞ATP水平的代谢传感器,参与调节细胞能量代谢,AMPK激活可使其下游底物磷酸化,ULK1是AMPK通路的下游分子,参与自噬的起始,SIRT1是NAD⁺依赖性组蛋白脱乙酰酶,AMPK可促进NAD⁺的生成,激活SIRT1因子^[18]。研究显示,白果内酯通过激活AMPK/SIRT1/mTOR通路,抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶2(Cyclooxygenase 2, COX-2)和基质金属蛋白酶13(Matrix metalloproteinase 13, MMP-13)的产生^[19]。苍术素也参与AMPK/SIRT1通路的调节,如苍术素通过Sirt1/AMPK轴诱导的自噬调节减轻癌症厌食恶病质综合征^[20]。本研究发现,使用苍术素处理软骨细胞后,p-AMPK、SIRT1、p-ULK1蛋白表达水平显著升高,表明苍术素可能激活SIRT1/AMPK信号通路。本研究进一步使用AMPK抑制剂compound C与苍术素共同处理软骨细胞,结果发现compound C可逆转苍术素对软骨细胞凋亡的抑制作用,提示苍术素可能通过激活AMPK/SIRT1信号通路提高IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬,降低细胞凋亡。

综上所述,苍术素通过激活AMPK/SIRT1信号通路促进IL-1 β 诱导的大鼠软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡。但本研究局限于AMPK/SIRT1信号通路相关的部分蛋白,苍术素的具体作用机制仍须结合动物模型做更深入的研究。

(本文图1~3见插图5-4)

参考文献

- [1] YANG HX, WEN Y, ZHANG M, et al. MTORC1 coordinates the autophagy and apoptosis signaling in articular chondrocytes in osteoarthritic temporomandibular joint[J]. *Autophagy*, 2020, 16(2): 271-288.
- [2] 陈浩凡, 马燕妮, 陈健文, 等. 红花黄色素上调miR-140-5p影响IL-1 β 诱导的骨关节炎软骨细胞自噬、凋亡及炎症因子分泌的机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(24): 3350-3353.
- [3] XU K, HE YZ, MOQBEL SAA, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175:

351-360.

- [4] JIN Z, CHANG B, WEI Y, et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113092. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113092.
- [5] 宋超, 谢育, 王治, 等. 玫瑰树碱对骨关节炎及滑膜组织SIRT1-Nrf2信号活化的作用研究[J]. *实用药物与临床*, 2021, 24(10): 876-880.
- [6] CHEN L, TANG YL, LIU ZH, et al. Atractylodin inhibits fructose-induced human podocyte hypermotility via anti-oxidant to down-regulate TRPC6/p-CaMK4 signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 913: 174616. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174616.
- [7] 邱伟建, 肖鹏, 吴学建. 苍术素抑制白细胞介素-1 β 诱导的人骨关节炎软骨细胞炎症[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(8): 1442-1444.
- [8] 王欢欢, 王青, 唐鹏, 等. 体外冲击波干预骨关节炎大鼠软骨细胞的增殖和自噬[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(2): 252-257.
- [9] 汤建华, 姜爱雯, 冯平, 等. 苹果多酚通过激活AMPK/SIRT1信号通路对LPS诱导的肺上皮细胞自噬反应的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(17): 3102-3106.
- [10] ZHANG JM, HAO XX, CHI RM, et al. Moderate mechanical stress suppresses the IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by regulating mitochondrial dynamics[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(11): 7504-7515.
- [11] QU LH, LIN X, LIU CL, et al. Atractylodin attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting inflammatory response through the MAPK pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 665376. DOI: 10.3389/fphar.2021.665376.
- [12] 昌震, 韩冬, 黄铭. 重组人脑利钠肽治疗急性肺损伤的临床效果及对NLRP3/6、白细胞介素水平的影响[J]. *安徽医药*, 2021, 25(11): 2290-2293.
- [13] 蒲博强, 邢晓伟, 郭祥. 苍术提取物通过调控miR-378c影响IL-1 β 诱导的骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(2): 167-173.
- [14] 芦君. 三七总皂苷对脑梗死大鼠神经细胞Wnt/ β -连环素信号通路的影响[J]. *安徽医药*, 2022, 26(12): 2395-2398, 后插3.
- [15] 范帅, 吴春飞, 梁祖建, 等. 补肾调肝方含药血清促进大鼠软骨细胞自噬治疗关节炎[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(20): 3178-3183.
- [16] AL-BARI MAA. A current view of molecular dissection in autophagy machinery[J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(3): 357-372.
- [17] ACHARYA B, CHAIJAROENKUL W, NA-BANGCHANG K. Atractylodin inhibited the migration and induced autophagy in cholangiocarcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and p38MAPK signalling pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(9): 1191-1200.
- [18] SUN P, NIE M. Effect and mechanism of Angelic Shaoaosan mediated AMPK/SIRT1 positive feedback loop to promote autophagy and regulate the systemic inflammatory response in acute pancreatitis[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2021, 67(2): 101-108.
- [19] MA T, LV L, YU Y, et al. Bilobalide exerts anti-inflammatory effects on chondrocytes through the AMPK/SIRT1/mTOR pathway to Attenuate ACLT-Induced post-traumatic osteoarthritis in rats[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 783506. DOI: 10.3389/fphar.2022.783506.
- [20] YU B, ZHAO Y, TENG S, et al. Atractylodin alleviates cancer anorexia-cachexia syndrome by regulating NPY through hypothalamic Sirt1/AMPK axis-induced autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 625: 154-160.

(收稿日期: 2022-12-08, 修回日期: 2023-01-17)