

本文引用: 杨 军, 彭力田, 毛 滔, 彭 文. 基于 JNK 通路探讨补肾活血方对大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(9): 1575-1582.

## 基于 JNK 通路探讨补肾活血方对大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡的影响

杨 军, 彭力田, 毛 滔, 彭 文\*

湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

**[摘要]** **目的** 探讨补肾活血方(Bushen Huoxue Formula, BSHXF)通过 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路对大鼠骨关节炎(Osteoarthritis, OA)软骨细胞凋亡的影响。**方法** 采用白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导体外分离培养的大鼠软骨细胞构建体外 OA 模型,并使用不同浓度的 BSHXF 干预处理。使用 MTT 法测定细胞活力;CCK-8 法检测细胞增殖能力;流式细胞术评估细胞凋亡情况;Western blot 检测凋亡相关蛋白裂解的胱天蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)水平和 JNK、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)蛋白水平。试剂盒检测细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)水平;ELISA 法检测细胞上清液中促炎因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)含量。**结果** (1)与对照组相比,模型组软骨细胞活力显著降低,细胞凋亡率显著升高( $P<0.01$ );模型组 Cleaved Caspase-3、Bax、p-JNK 蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组相比,BSHXF 治疗组软骨细胞活力升高( $P<0.05$ ),凋亡率显著降低( $P<0.01$ );BSHXF 治疗组 Cleaved Caspase-3、Bax、p-JNK 蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),Bcl-2 蛋白表达水平升高( $P<0.01$ )。(2)与对照组相比,模型组细胞中 ROS 和 MDA 的相对含量显著升高( $P<0.01$ ),GSH 的相对含量显著降低( $P<0.01$ );模型组细胞中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组相比,BSHXF 治疗组细胞中 ROS 和 MDA 的相对含量显著降低( $P<0.01$ ),GSH 的相对含量显著升高( $P<0.01$ );BSHXF 治疗组细胞中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量均显著降低( $P<0.01$ )。(3)与溶剂对照组相比,激活剂对照组的 p-JNK、Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白水平显著上调( $P<0.05$ ),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),细胞增殖能力下降( $P<0.05$ ),细胞凋亡率显著增加( $P<0.01$ );BSHXF 治疗组和溶剂对照组两组间细胞增殖、凋亡率和凋亡相关蛋白表达(Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2)情况差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。(4)与溶剂对照组相比,激活剂对照组的 ROS 和 MDA 水平显著升高( $P<0.01$ ),而 GSH 水平显著降低( $P<0.01$ ),TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量升高( $P<0.05$ );BSHXF 治疗组和溶剂对照组两组间 ROS 相对含量、MDA、GSH 水平差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** BSHXF 通过抑制 JNK 信号通路激活抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞凋亡,改善氧化应激和炎症反应。

**[关键词]** 骨关节炎;补肾活血方;JNK 信号通路;软骨细胞凋亡;氧化应激;炎症反应

**[中图分类号]**R274.9

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.09.004

## Effects of Bushen Huoxue Formula on chondrocyte apoptosis in rats with osteoarthritis based on JNK pathway

YANG Jun, PENG Litian, MAO Tao, PENG Wen\*

The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

**[收稿日期]**2024-01-14

**[基金项目]**湖南省中医药科研计划项目(E2022114)。

**[通信作者]**\* 彭 文,男,副主任医师,E-mail:1965067@qq.com。

**[Abstract] Objective** To investigate the effects of Bushen Huoxue Formula (BSHXF) on chondrocyte apoptosis in rats with osteoarthritis (OA) through the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway. **Methods** An in vitro OA model was constructed using interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) to induce apoptosis in rat chondrocytes cultured ex vivo. Different concentrations of BSHXF were used for intervention. Cell viability was determined using MTT assay; CCK-8 assay was used to examine cell proliferation ability; flow cytometry was employed to assess cell apoptosis; Western blot was used to check the levels of apoptosis-related proteins, including cleaved cysteine protease-3 (Cleaved Caspase-3), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax), as well as the levels of JNK and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) proteins. The reagent kit was used to measure the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in cells; ELISA was used to check the content of pro-inflammatory factor of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-6 in the cell supernatant. **Results** (1) Compared with the control group, the model group showed a significant decrease in chondrocyte viability and a significant increase in cell apoptosis rate ( $P<0.01$ ); the protein expression levels of Cleaved Caspase-3, Bax, and p-JNK in the model group significantly increased ( $P<0.01$ ), while the expression of Bcl-2 significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the BSHXF treatment group showed an increase in chondrocyte viability ( $P<0.05$ ) and a significant decrease in apoptosis rate ( $P<0.01$ ); the protein expression levels of Cleaved Caspase-3, Bax, and p-JNK were significantly reduced ( $P<0.01$ ) and the protein expression level of Bcl-2 increased ( $P<0.01$ ) in the BSHXF treatment group. (2) Compared with the control group, the relative content of ROS and MDA in the model group cells significantly increased ( $P<0.01$ ), while the relative content of GSH significantly decreased ( $P<0.01$ ); the content of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the model group cells significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the BSHXF treatment group showed a significant decrease in the relative content of ROS and MDA ( $P<0.01$ ) and a significant increase in the relative content of GSH ( $P<0.01$ ); the content of TNF- $\alpha$  and IL-6 in cells treated with BSHXF was significantly reduced ( $P<0.01$ ). (3) Compared with the solvent control group, the activator control group showed a significant upregulation of p-JNK, Cleaved Caspase-3, and Bax protein levels ( $P<0.05$ ), a significant reduction in Bcl-2 protein expression ( $P<0.01$ ), a decrease in cell proliferation ability ( $P<0.05$ ), and a significant increase in cell apoptosis rate ( $P<0.01$ ); there were no significant differences in cell proliferation, apoptosis rate, and expressions of apoptosis-related proteins (Cleaved Caspase-3, Bax, and Bcl-2) between the BSHXF treatment group and the solvent control group ( $P>0.05$ ). (4) Compared with the solvent control group, the activator control group exhibited a significant increase in ROS and MDA levels ( $P<0.01$ ) and a significant decrease in GSH level ( $P<0.01$ ), with increased content of TNF- $\alpha$  and IL-6 ( $P<0.05$ ); there were no significant differences in the relative content of ROS and the levels of MDA and GSH between the BSHXF treatment group and the solvent control group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** BSHXF inhibits IL-1 $\beta$ -induced apoptosis in OA chondrocytes by suppressing the activation of JNK signaling pathway, thereby relieving oxidative stress and inflammatory responses.

**[Keywords]** osteoarthritis; Bushen Huoxue Formula; JNK signaling pathway; chondrocyte apoptosis; oxidative stress; inflammatory response

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨细胞外基质降解、关节软骨退行性破坏、骨赘形成和关节疼痛为主要特征的慢性关节疾病,严重影响患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。该病主要发生在膝关节、髌关节、脊柱和远侧指间关节等承受较大负重的关节,常见于中老年人群<sup>[3]</sup>。尽管对OA的治疗已有一定进展,但有效延缓或逆转其病程仍是当前临床研究的重点<sup>[4-5]</sup>。补肾活血方(Bushen Huoxue Formula,BSHXF)是一种传统中药复方,由多种中草药组成,具有补肝肾、强筋骨、活血止痛等功效,历史上用于治疗肾虚血瘀导致的病症,包括中医学中的“膝痛”“骨痹”<sup>[6]</sup>。然而,BSHXF对OA的具体作用机制尚待明确。已有研

究表明,c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在细胞应答,特别是炎症和细胞凋亡过程中扮演重要角色<sup>[7]</sup>。JNK 激活导致炎症细胞因子释放增多,加剧关节炎症和软骨破坏<sup>[8]</sup>。同时,氧化应激激活 JNK 通路,进一步促进炎症介质的产生,损害关节软骨细胞<sup>[9]</sup>。此外,JNK 通路的激活促进细胞凋亡信号,导致关节软骨细胞过度凋亡,是 OA 进展的一个重要机制<sup>[10-11]</sup>。因此,针对这些相关信号通路的药理学调节可能是治疗 OA 的一个潜在策略。本研究旨在探索 BSHXF 对 OA 的治疗作用及其潜在的分子机制,为 OA 治疗提供新策略和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级雄性Wistar 3天龄大鼠40只,体质量( $10\pm 3$ )g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物资格证书编号:SCXK(京)2021-0011;室温 24~26℃,湿度65%~70%,光照时间12 h/d,提供水和营养均衡的饮食。实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理批准号:LL2022111702。

### 1.2 主要试剂及仪器

二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号:ST038)、CCK-8试剂盒(批号:C0037)、细胞凋亡试剂盒(批号:C1052)、放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)裂解液(批号:P0013B)、脱脂奶粉(批号:P0216)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P0010)、GSH检测试剂盒(批号:S0053)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号:S0033S)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号:S0131S)、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(批号:PT516)、IL-6 ELISA试剂盒(批号:PI328)均购自北京碧云天生物技术有限公司;II型胶原酶(批号:C8150)购自北京索莱宝科技有限公司;凋亡相关蛋白裂解的胱天蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)(批号:ab214430)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)(批号:ab196495)、Bcl-2相关X蛋白质(Bcl-2-associated X protein, Bax)(批号:ab182733)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(批号:ab181602)、Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(批号:ab6721)、MTT(批号:ab211091)、重组大鼠白细胞介素-1 $\beta$ 蛋白因子(批号:ab281807)、茴香霉素(批号:ab120495)均购自英国Abcam公司;c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和磷酸化JNK(phosphorylation-JNK, p-JNK)抗体(批号:#9252)购自美国Cell Signaling Technology公司;TRIzol试剂盒(批号:A33254)、逆转录试剂盒(批号:4366597)、荧光定量试剂盒(批号:4349180)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

LSM710型激光共聚焦显微镜(美国卡尔蔡司光学仪器有限公司);Bio-Rad 680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);MoFloAstrios EQ型流式细胞仪(美

国Beckman Coulter公司)。

### 1.3 细胞培养

使用新生鼠(3日龄),以戊巴比妥钠(1%溶液,  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )进行腹腔麻醉,经颈椎脱臼处死后,浸入75%乙醇消毒5 min。取胸廓组织,切碎后在0.2%II型胶原酶溶液中37℃消化1.5 h。离心( $1\ 000\text{ r}/\text{min}$ , 10 min, 37℃)后,再加入0.05%II型胶原酶于37℃消化3 h。再次离心( $1\ 000\text{ r}/\text{min}$ , 10 min, 37℃),用PBS洗涤大鼠软骨细胞沉淀,并在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养<sup>[12]</sup>。

### 1.4 实验分组与处理

取传至第2代的大鼠软骨细胞,以每孔 $2\times 10^5$ 个的密度接种在24孔板中,每孔1 mL。培养24 h后随机分为对照组:细胞在10%胎牛血清DMEM中正常培养;模型组(OA组):使用 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的IL-1 $\beta$ 处理正常软骨细胞24 h,建立OA模型;治疗组(OA+BSHXF组):使用 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的IL-1 $\beta$ 处理细胞24 h后,加入不同剂量( $50$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的BSHXF处理24 h;溶剂对照组(OA+BSHXF+DMSO组);OA+BSHXF+Anisomycin组(激活剂对照组):使用 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的IL-1 $\beta$ 处理细胞24 h后,加入 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的BSHXF和 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的JNK信号通路激活剂Anisomycin处理24 h<sup>[13]</sup>。每组细胞均在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养48 h。

### 1.5 MTT法检测各组细胞活力

使用MTT法测定各组细胞的活力<sup>[14]</sup>。将细胞以每孔 $3\times 10^3$ 个的密度接种在96孔板中,每孔添加100  $\mu\text{L}$ 培养基。细胞培养24 h后,按照“1.3”分组处理细胞。处理24 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$ 的MTT溶液( $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下继续孵育4 h。然后弃去上清液,并加入DMSO溶解结晶物。使用酶标仪在490 nm波长下测定吸光度,以反映细胞活力。实验重复3次。根据MTT实验结果,选择表现出最高细胞活力的BSHXF浓度用于后续实验。

### 1.6 CCK-8法检测各组大鼠软骨细胞增殖情况

取传至第2代的大鼠软骨细胞,将细胞以 $1\times 10^3$ 个/孔的密度接种在96孔板中,每孔100  $\mu\text{L}$ 。细胞贴壁生长24 h后,按照“1.3”中方法分组处理48 h,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu\text{L}$ ,37℃孵育2 h,使用酶标仪在490 nm波长下测定吸光度,计算细胞活力。

### 1.7 试剂盒检测各组氧化应激指标水平

采用试剂盒检测细胞活性氧(reactive oxygen

species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)的表达水平。实验独立重复3次,所有操作及各试剂的配制均严格按照说明书进行。

### 1.8 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

取传至第2代的大鼠软骨细胞,以每孔 $2 \times 10^5$ 个的密度接种在24孔板中,每孔1 mL。培养24 h后,按照“1.3项”中方法分组处理48 h,收集各组细胞沉淀,以PBS洗涤后计数;每组取 $2 \times 10^5$ 个细胞,采用ANNEXIN V-FITC/PI凋亡检测试剂盒进行ANNEXIN V-FITC/PI双染,然后采用流式细胞分析仪检测各组细胞凋亡率<sup>[12]</sup>。

### 1.9 ELISA试剂盒检测各组炎症因子水平

收集各组干预后的细胞培养液,离心(3 000 r/min, 20 min, 4 °C)后收集上清液,按照ELISA试剂盒说明检测细胞上清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达水平,酶标仪检测450 nm时的吸光值,进行后续统计分析<sup>[16]</sup>。

### 1.10 Western blot检测各组细胞蛋白表达水平

取出“1.6项”中存于-80 °C的大鼠软骨细胞样品液,于冰水浴中解冻。随后将样品进行煮沸变性处理。每组取30  $\mu$ g总蛋白的样品,进行SDS-PAGE电泳。电泳完成后,样品通过湿转移法转移到膜上。使用5%脱脂奶粉对膜进行1.5 h的封闭处理。加入一抗,包括Cleaved Caspase-3(稀释比1:5 000)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000)、JNK和p-JNK(1:1 000),并在4 °C下过夜孵育。次日,使用TBST洗涤膜以去除未结合的一抗。加入二抗:Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(1:2 000),在室温下孵育1.5 h。再次洗涤膜后,使用ECL显色剂进行显色,并在化学发光成像系统下进行蛋白条带检测。整个实验过程重复3次<sup>[12]</sup>。

### 1.11 统计学分析

所有数据均采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多个样本均采用单因素方差分析,组间数据比较用 $t$ 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BSHXF对各组OA软骨细胞凋亡的影响

50、100、150、200、250  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>的BSHXF对正常软骨细胞活力无影响( $P > 0.05$ ,图1A),各浓度的

BSHXF均可提高IL-1 $\beta$ 诱导的OA软骨细胞活力,且呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$ ,图1A)。200  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>组细胞活力最高,250  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>组细胞活力有所下降( $P > 0.05$ ,图1A)。可能是由于过高浓度的BSHXF产生了轻微的细胞毒性。因而选择200  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>的BSHXF进行后续实验。CCK-8和流式细胞术结果显示,与空白组相比,模型组软骨细胞活力显著降低、细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.01$ ,图1B—C)。与模型组相比,治疗组软骨细胞活力升高、凋亡率显著降低(均 $P < 0.01$ ,图1B—C)。与空白组相比,OA组Cleaved Caspase-3、Bax的表达显著升高,Bcl-2的表达显著降低(均 $P < 0.01$ ,图1D);与模型组相比,治疗组处理显著降低了Cleaved Caspase-3、Bax的表达,并增加了Bcl-2的表达(均 $P < 0.01$ ,图1D)。这表明BSHXF抑制IL-1 $\beta$ 诱导的OA软骨细胞凋亡。

### 2.2 BSHXF对各组OA软骨细胞氧化应激指标及炎症因子水平的影响

与空白组相比,模型组细胞中ROS和MDA的相对含量显著升高( $P < 0.01$ ),GSH的相对含量显著降低( $P < 0.01$ ,图2A);相较于模型组,治疗组细胞中ROS和MDA的相对含量显著降低( $P < 0.01$ ),GSH的相对含量显著升高( $P < 0.01$ ,图2A)。ELISA结果显示,与空白组相比,模型组细胞中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量均显著升高(均 $P < 0.01$ ,图2B);相较于模型组,治疗组细胞中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量均显著降低(均 $P < 0.01$ ,图2B)。这表明,BSHXF能改善IL-1 $\beta$ 诱导的OA软骨细胞氧化应激和炎症反应。

### 2.3 BSHXF对各组OA软骨细胞JNK、p-JNK蛋白表达水平的影响

Western blot结果显示,3组细胞间JNK蛋白水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而与空白组相比,模型组细胞中p-JNK蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ );相较于模型组,治疗组细胞中p-JNK蛋白表达显著下调( $P < 0.01$ )。这表明BSHXF抑制JNK信号通路激活。详见图3。

### 2.4 JNK信号通路激活后BSHXF对各组OA软骨细胞凋亡蛋白的影响

在IL-1 $\beta$ 诱导细胞中同时加入BSHXF和JNK信号通路激活剂Anisomycin处理24 h。Western blot结果显示,与溶剂对照组相比,激活剂对照组的p-JNK蛋白水平显著上调( $P < 0.05$ ,图4A),这表

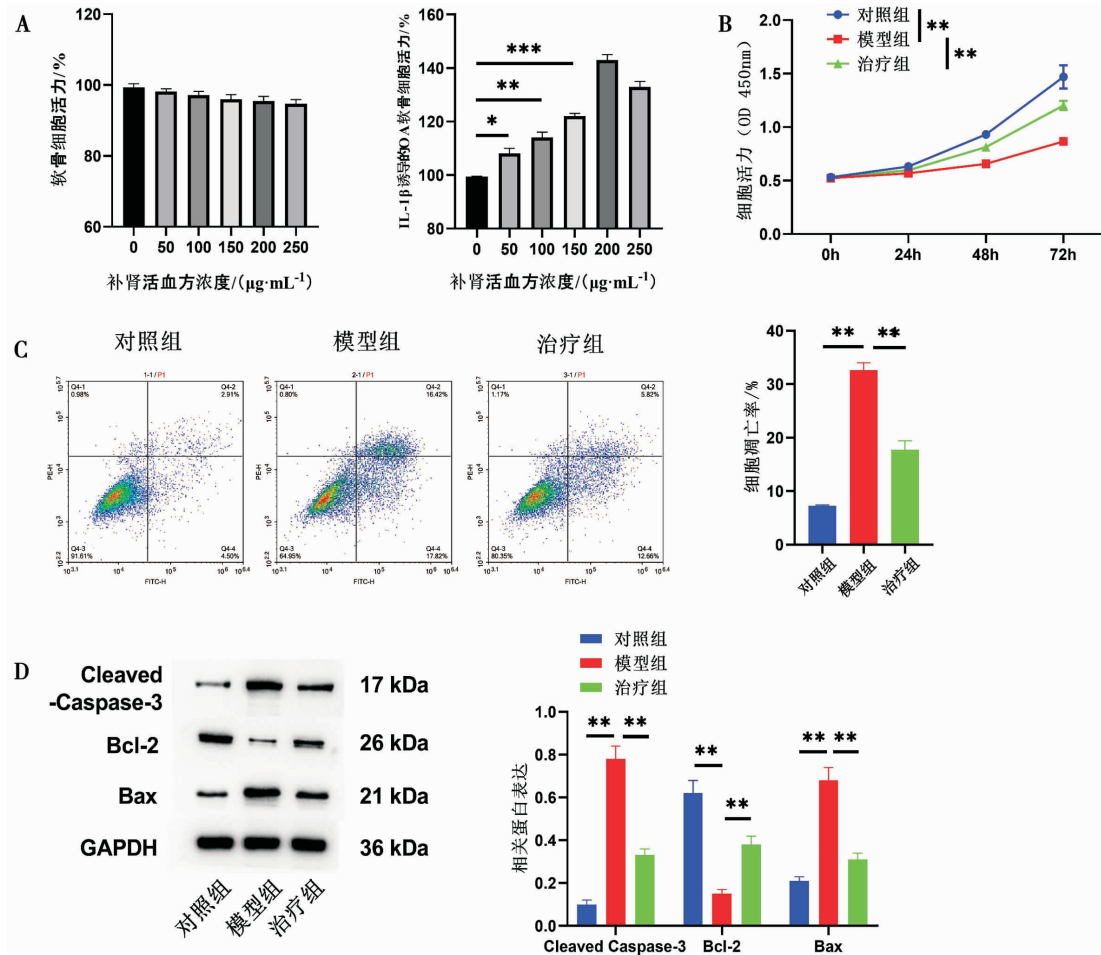


图 1 BSHXF 对各组 OA 软骨细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of BSHXF on apoptosis of OA chondrocytes in different groups

注:A.MTT 检测正常软骨细胞和 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞的活力;B.CCK-8 检测细胞增殖;C.流式细胞术检测细胞凋亡;D.Western blot 检测 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

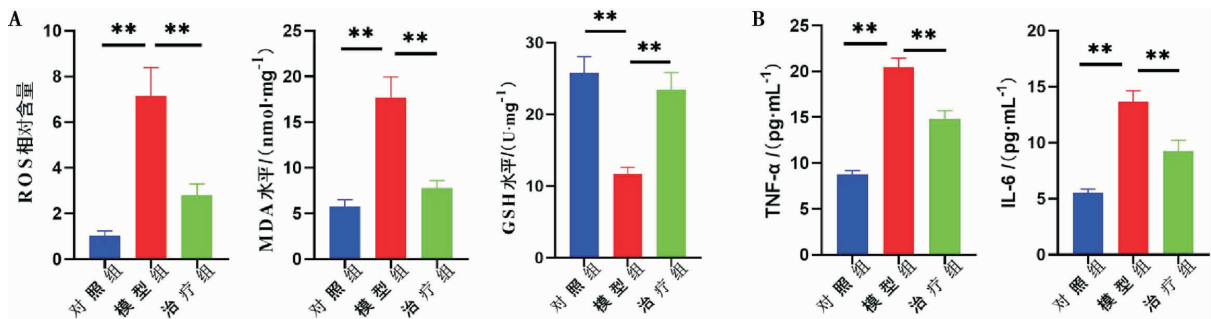


图 2 BSHXF 对各组 OA 软骨细胞中 ROS、MDA、GSH、TNF- $\alpha$  及 IL-6 水平的影响

Fig.2 Effects of BSHXF on the levels of ROS, MDA, GSH, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in OA chondrocytes in different groups

注:A.试剂盒检测软骨细胞的 ROS 和 MDA、GSH 的表达水平;B.试剂盒检测软骨细胞上清液中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达水平。\*\* $P<0.01$ 。

明成功激活了 JNK 信号通路。随后,通过 CCK-8、流式细胞术和 Western bolt 检测细胞增殖、凋亡率和凋亡相关蛋白表达情况。结果显示,OA+BSHXF 和 OA+BSHXF+DMSO 两组间细胞增殖、凋亡率和凋亡相关蛋白表达(Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2)情况差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,图 4B-D)。而与溶剂

对照组相比,激活剂对对照组细胞增殖能力显著下降(均  $P<0.05$ ,图 4B),细胞凋亡率显著增加( $P<0.01$ ,图 4C),Cleaved Caspase-3、Bax 水平显著升高,Bcl-2 水平显著降低(均  $P<0.01$ ,图 4D)。这表明激活 JNK 信号通路部分逆转 BSHXF 对 IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞凋亡的抑制作用。

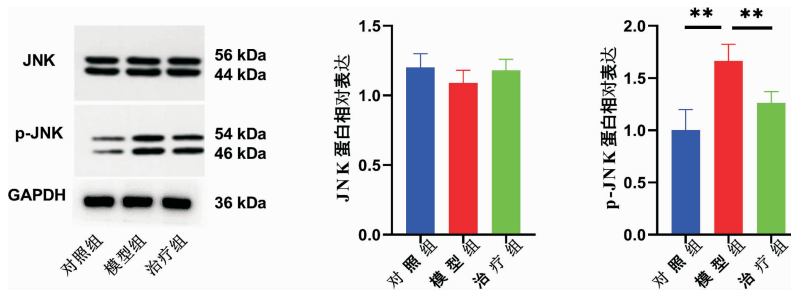


图 3 BSHXF 对各组 OA 软骨细胞 JNK、p-JNK 蛋白表达水平的影响

Fig.3 Effects of BSHXF on the expression levels of JNK and p-JNK proteins in OA chondrocytes on different groups  
注: \*\* $P < 0.01$ .

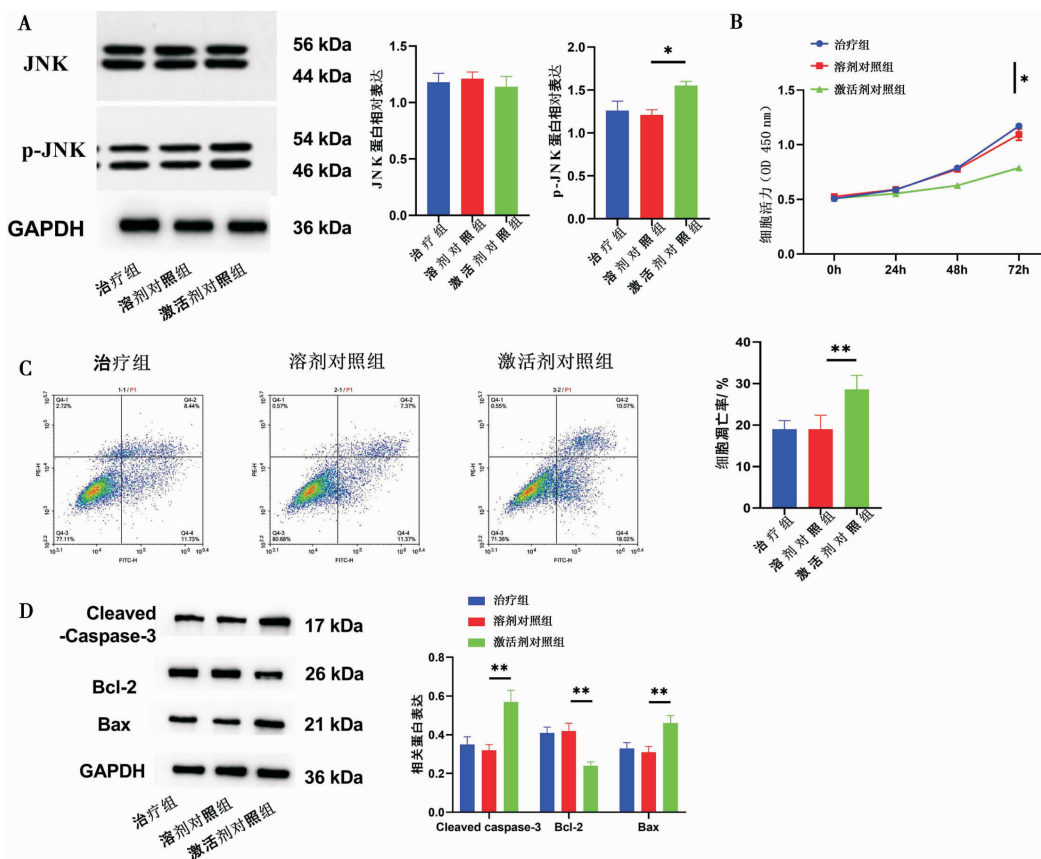


图 4 BSHXF 通过激活 JNK 信号通路对各组 OA 软骨细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of BSHXF on apoptosis of OA chondrocytes in different groups through the JNK signaling pathway

注:A.Western bolt 检测 JNK、p-JNK 蛋白表达;B.CCK-8 检测细胞增殖;C.流式细胞术检测细胞凋亡;D.Western bolt 检测 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.5 激活 JNK 信号通路后 BSHXF 对各组 OA 软骨细胞氧化应激和炎症反应的影响

OA+BSHXF 和 OA+BSHXF+DMSO 两组间 ROS 相对含量、MDA、GSH 水平差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ , 图 5A-B)。而与溶剂对照组相比,激活剂对照组的 ROS 和 MDA 水平显著升高,而 GSH 水平显著降低,TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量显著升高(均  $P < 0.05$ , 图 5A-B)。这表明激活 JNK 信号通路部分逆转 BSHXF 对

IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞氧化应激和炎症反应的改善作用。

### 3 讨论

BSHXF 是一种源自传统中医理论的中药复方,传统上用于治疗多种疾病。根据传统中医理论,它可能对 OA 等疾病具有治疗潜力<sup>[1-5]</sup>。在 OA 的病理机制中,细胞凋亡起着关键作用<sup>[17]</sup>。Caspase-3 作为细胞

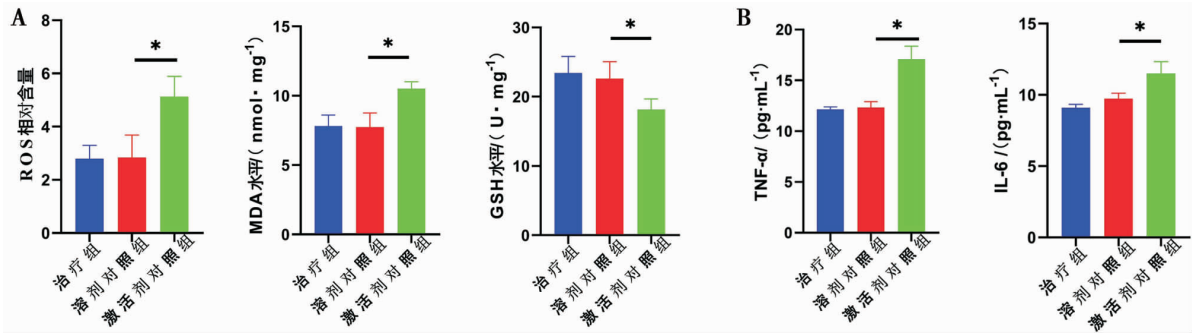


图5 激活 JNK 信号通路后 BSHXF 对各组 OA 软骨细胞氧化应激和炎症反应的影响

Fig.5 Effects of BSHXF on oxidative stress and inflammatory responses of OA chondrocytes in different groups after activating JNK signaling pathway

注:A.试剂盒检测软骨细胞的 ROS 和 MDA、GSH 的表达水平;B.试剂盒检测软骨细胞上清液中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达水平。\* $P < 0.05$ 。

凋亡过程中的主要执行酶,通常以非活化的前体形式存在。细胞在接收到凋亡信号后,会将Caspase-3裂解成活化形式,进而触发细胞死亡。Cleaved Caspase-3 的表达增加通常与 OA 中软骨细胞的损伤和凋亡相关<sup>[18]</sup>。细胞凋亡的另一关键调节因素是 Bcl-2 和 Bax 蛋白。其中,Bcl-2 通过阻止细胞色素 C 的释放和 Caspase 的激活来防止细胞凋亡,而 Bax 通过促进细胞色素 C 释放和 Caspase 酶激活推动细胞凋亡。在 OA 中,上调 Bcl-2 或下调 Bax 的表达可能有助于保护软骨细胞,减少软骨细胞的凋亡,延缓疾病的发展<sup>[19-20]</sup>。JNK 在调节细胞应激反应,尤其是细胞凋亡和炎症反应中起关键作用<sup>[21]</sup>。研究表明,抑制 JNK 信号通路的激活有助于减少软骨细胞凋亡和炎症,减缓 OA 的进展<sup>[22-23]</sup>。本研究重点关注了 BSHXF 对 IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞凋亡、氧化应激和炎症反应的调节作用,以及这些作用是否通过 JNK 信号通路实现,为 OA 治疗提供新的策略。

本研究结果表明,BSHXF 对正常软骨细胞无明显毒害作用,且可显著提高 IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞活力。特别是在 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,细胞活力达到最高。然而,250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的 BSHXF 导致细胞活力降低,这可能是由于较高浓度的 BSHXF 产生轻微的细胞毒性,也可能是由于中药复方通常包含多种成分,这些成分可能在较高浓度下相互作用产生未预期的效果<sup>[24]</sup>。进一步研究结果显示,BSHXF 显著提高了 OA 软骨细胞的活力,同时降低了凋亡率和 Cleaved Caspase-3、Bax 的表达,增加了 Bcl-2 的表达。提示 BSHXF 通过调节凋亡相关蛋白的表达来抑制细胞凋亡,从而促进软骨细胞的存活和增

殖,这与他人研究结果相似。在氧化应激和炎症反应方面,研究发现 BSHXF 显著降低了模型组细胞中的 ROS 和 MDA 水平,同时提高了 GSH 水平,这与王柯等<sup>[25]</sup>的研究结果相似。此外,BSHXF 还显著降低了促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量,这表明 BSHXF 可能通过降低氧化应激和抑制炎症因子的释放来改善 OA 症状,这与陈宇等<sup>[26]</sup>的研究结果相似。研究表明,BSHXF 能显著抑制 p-JNK 的表达。当使用 Anisomycin 时,部分逆转 BSHXF 对细胞增殖、凋亡、氧化应激和炎症反应的影响,从而进一步证实了 JNK 信号通路在 BSHXF 改善 OA 软骨细胞凋亡、氧化应激和炎症反应的重要作用。

尽管本研究突出了 BSHXF 在抑制 OA 软骨细胞凋亡、氧化应激和炎症反应中的潜在作用,但研究存在一些局限性。首先,研究基于体外实验,其结果可能无法完全代表体内情况。此外,研究中未能完全揭示 BSHXF 的全部作用机制。同时,BSHXF 为复方中药,具有多靶点、多途径等特性。未来研究需进一步探索 BSHXF 的分子靶点和作用机制,并通过动物模型来进一步验证本文的研究结果。综上所述,BSHXF 通过抑制 JNK 信号通路的激活进而抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 OA 软骨细胞凋亡,改善氧化应激和炎症反应,为治疗 OA 提供了新的理论基础。

## 参考文献

- [1] 刘骁东,陈 贝,杨 杰. 膝关节镜清理术后辅助关节腔内注射 PRP 治疗对 OA 患者 Lysholm 膝关节评分、VAS 评分及并发症的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15(3): 463-467.
- [2] 陈 凡,周富丽,陈 勇,等. 姜黄素可能通过上调 Prdx6 蛋白

- 表达抑制软骨细胞铁死亡[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(12): 2106–2112.
- [3] 郑守超, 石 晶, 王 峰, 等. 关节镜下半月板成形术治疗膝关节半月板损伤患者的效果观察及对 Lysholm 评分、关节生理功能的影响[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(3): 82–86.
- [4] GRÄSSEL S, MUSCHTER D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis[J]. *F1000Research*, 2020, 9: F1000 Faculty Rev–325.
- [5] MAQBOOL M, FEKADU G, JIANG X C, et al. An up to date on clinical prospects and management of osteoarthritis[J]. *Annals of Medicine and Surgery* (2012), 2021, 72: 103077.
- [6] 陈浩明, 叶阮柱, 李富东, 等. 补肾活血法联合温针灸治疗膝骨关节炎的临床疗效观察[J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(22): 45–47.
- [7] CHEN J, YE C, WAN C, et al. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in infectious diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9640.
- [8] LAI B, WU C H, LAI J H. Activation of c-Jun N-terminal kinase, a potential therapeutic target in autoimmune arthritis[J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2466.
- [9] ZHANG Y B, ZHOU S Q, CAI W S, et al. Hypoxia/reoxygenation activates the JNK pathway and accelerates synovial senescence[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(1): 265–276.
- [10] HWANG H S, KIM H A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 26035–26054.
- [11] LIU L, ZHANG W Y, LIU T H, et al. The physiological metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress[J]. *Redox Biology*, 2023, 62: 102663.
- [12] 陈 晨, 郑润泉, 张贵春. 大黄素对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡和氧化应激的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(28): 4528–4534.
- [13] ZHOU Y, MING J H, LI Y M, et al. Ligustilide attenuates nitric oxide-induced apoptosis in rat chondrocytes and cartilage degradation via inhibiting JNK and p38 MAPK pathways[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23 (5): 3357–3368.
- [14] 胡 志, 付 桥, 张 炜, 等. 自噬调控对小鼠精原细胞缺氧/复氧损伤的影响研究[J]. 重庆医学, 2023, 52(23): 3527–3532.
- [15] 贺自克, 王上增. 杜仲水提物上调 Nur77 表达促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(15): 2371–2378.
- [16] 许 奇, 张洪榕, 许炜民, 等. 基于 HMGB1/NF- $\kappa$ B 通路探讨温经通络汤对 IL-1 $\beta$  诱导小鼠原代软骨细胞炎症的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(11): 1095–1101.
- [17] XIAO S Q, CHENG M, WANG L, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *International Orthopaedics*, 2023, 47(8): 1895–1919.
- [18] SHARIF M, WHITEHOUSE A, SHARMAN P, et al. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50(2): 507–515.
- [19] KARALIOTAS G I, MAVRIDIS K, SCORILAS A, et al. Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(3): 4514–4521.
- [20] XIONG W, ZHAO J Z, MA X W, et al. Mechanisms and molecular targets of BuShenHuoXue formula for osteoarthritis[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(5): 4703–4713.
- [21] DHANASEKARAN D N, REDDY E P. JNK signaling in apoptosis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245–6251.
- [22] MIN R W M, AUNG F W M, LIU B, et al. Mechanism and therapeutic targets of c-Jun-N-terminal kinases activation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(8): 2035.
- [23] SAHANA T G, CHASE K J, LIU F L, et al. C-Jun N-terminal kinase promotes stress granule assembly and neurodegeneration in C9orf72-mediated ALS and FTD[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2023, 43(17): 3186–3197.
- [24] LI Y B, DENG X Y, XIONG H L, et al. Deciphering the toxicity-effect relationship and action patterns of traditional Chinese medicines from a smart data perspective: A comprehensive review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1278014.
- [25] 王 柯, 叶寒露. 大黄素对膝骨关节炎大鼠软骨细胞铁死亡的影响及机制研究[J]. 天津医药, 2023, 51(10): 1090–1097.
- [26] 陈 宇, 黄亚丽, 金雪芬. 补肾活血方联合双氯芬酸钠治疗膝骨关节炎伴关节积液临床研究[J]. 新中医, 2022, 54(12): 127–131.

(本文编辑 苏 维)