

独活寄生汤对内质网应激下软骨细胞钙稳态和凋亡的影响

林 晴¹,王文义¹,潘丹虹¹,黄艳峰¹,付长龙²,叶锦霞^{1*}

¹福建中医药大学中西医结合研究院,福建 福州 350122;

²福建省中西医结合老年性疾病重点实验室,福建 福州 350122

*通信作者:叶锦霞,E-mail:xiaoyezi1203@126.com

收稿日期:2020-05-25;接受日期:2020-07-20

基金项目:国家自然科学基金项目(81202836);福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2016-ZQN-68)

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.06009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的:观察独活寄生汤在内质网应激(ERS)下对软骨细胞内钙离子(Ca^{2+})平衡及细胞凋亡的影响,初步探讨其防治骨关节炎的作用机制。**方法:**采用4周龄SD大鼠膝关节软骨建立稳定的软骨细胞体外培养体系,用甲苯胺蓝染色法对第3代软骨细胞进行鉴定。用25 $\mu\text{mol/L}$ 的毒胡萝卜素(TG)诱导体外培养的软骨细胞产生ERS,诱导成功后给予独活寄生汤3个不同剂量(100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)孵育24 h。将细胞分为空白组、模型组、独活寄生汤低剂量组、独活寄生汤中剂量组和独活寄生汤高剂量组。分别采用倒置显微镜观察软骨细胞的形态变化;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测各组软骨细胞活性;Hoechst 33342染色观察软骨细胞凋亡情况;双转盘激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度实时动态变化。**结果:**①软骨细胞形态:空白组细胞形态呈单层铺路石状生长,而模型组细胞呈多角形增加,伪足增长,间隙增宽,细胞数量明显减少。独活寄生汤(100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)不同剂量组与模型组比较,细胞数量明显增多,细胞胞质均匀。②各组软骨细胞活性:与空白组相比,模型组的存活率较低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,独活寄生汤各剂量组的吸光度随着浓度的升高而增高,且差异均有统计学意义($P<0.05$)。③软骨细胞凋亡情况:模型组的细胞凋亡数量显著增多,细胞核固缩程度明显,呈高密度的亮蓝色或半月形。独活寄生汤各剂量组细胞凋亡的数量明显减少,只有少量凋亡细胞呈高密度的亮蓝色或半月形,且凋亡数量随独活寄生汤的浓度增高而减少,呈一定的量效关系。④细胞内 Ca^{2+} 浓度变化:空白组细胞的 Ca^{2+} 荧光强度较弱且较均匀,呈稳定状态;与空白组比较,模型组的 Ca^{2+} 释放明显增多,荧光强度增强,荧光波谱显示 Ca^{2+} 火花较频繁,差异具有统计学意义($P<0.05$);独活寄生汤中、高剂量组软骨细胞能较快恢复到钙稳态,且 Ca^{2+} 火花明显减少;独活寄生汤低剂量组虽然仍有部分 Ca^{2+} 火花,但荧光强度明显比模型组弱。**结论:**独活寄生汤对TG诱导的软骨细胞凋亡具有抑制作用,其作用机制可能是通过调节 Ca^{2+} 平衡减轻ERS反应,从而抑制软骨细胞的凋亡。

关键词 独活寄生汤;软骨细胞;内质网应激;凋亡;钙稳态

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种严重影响患者生活质量的慢性、退行性关节疾病。随着我国人口老龄化趋势加重,该病发病率显著增高,预计到2020年将成为第4大致残性疾病^[1]。其发病的中心环节是关节软骨退变和继发性骨质增生,主要表现为关节疼痛、肿胀晨僵、活动不利、甚者关节畸形

等^[2-3]。现代研究发现骨关节炎的发病与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的软骨细胞凋亡有着密切关系^[4]。内质网是 Ca^{2+} 主要储存场所, Ca^{2+} 作为细胞凋亡信号之一,当细胞受到外源性化合物影响时,内质网内的 Ca^{2+} 稳态破坏,代谢紊乱,继而激发ERS出现细胞凋亡^[5]。毒胡萝卜素(Thap-

引用格式:林晴,王文义,潘丹虹,等.独活寄生汤对内质网应激下软骨细胞钙稳态和凋亡的影响[J].康复学报,2020,30(6):468-473.

LIN Q,WANG W Y,PAN D H,et al. Effects of Duohuo Jisheng decoction on calcium homeostasis and apoptosis of chondrocytes under endoplasmic reticulum stress [J]. Rehabilitation Medicine,2020,30(6):468-473.

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.06009

sigargin, TG) 是 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂, 可使未折叠或异常折叠的蛋白在软骨细胞内蓄积或使内质网内 Ca^{2+} 稳定失衡, 常被用来制作软骨细胞 ERS 模型^[6]。前期临床试验及动物实验研究表明, 独活寄生汤通过缓解关节软骨退变对膝骨关节炎有良好疗效^[7-9]。目前对于骨关节炎的治疗手段颇多, 主要以减轻症状, 延缓病程进展为主要目的, 但仍缺乏特效疗法^[10]。本研究通过观察独活寄生汤在 ERS 下对 Ca^{2+} 平衡及软骨细胞凋亡的影响, 以期探讨其防治骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 20 只, 雄性, 4 周龄, 体质量 90~100 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提

供, 动物合格证号: SCXK(沪)2017-0005。本实验的开展已获得福建中医药大学伦理委员会审批(批准文号:[2019]福中医伦理审字第 007 号)。

1.2 实验药物

独活寄生汤购自福建省第三人民医院, 全方由独活 9 g, 桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂、防风、川芎、人参、甘草、当归、芍药、干地黄各 6 g 组成。采用 70% 乙醇回流提取的方法制备, 合并滤液, 浓缩、干燥。将独活寄生汤提取物用含 10% 胎牛血清的培养基配制成 64 mg/mL 溶液, 置于 -20 ℃ 冰箱储存备用。使用前用含 10% 胎牛血清的培养基配成所需浓度, 并用 0.22 μm 的无菌型微孔滤膜过滤。

1.3 主要实验试剂和设备

见表 1。

表 1 主要试剂及设备

Table 1 Main reagents and instruments

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基、双抗、0.25% 胰蛋白酶、PBS	美国 Hyclone 公司
胎牛血清、Ⅱ型胶原酶	美国 Gibco 公司
毒胡萝卜素	美国 Sigma 公司
细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)	美国 MCE 公司
二甲基亚砜	国药集团
超净工作台	苏州安泰空气技术公司
HF212UV 型 CO_2 培养箱	香港力康公司
TDZ4A-WS 低速水平离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
Hoechst 33342、 Ca^{2+} 荧光染料 Fluo3/AM	美国 Invitrogen 公司
全自动生物图像细胞活力分析仪	美国 Beckman Coulter 公司
双转盘活细胞共聚焦实时成像分析系统	美国 PE 公司

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞体外培养体系的建立及鉴定 用 1% 戊巴比妥将 2 只 SD 大鼠麻醉后脱颈处死, 用 75% 酒精浸泡 5 min, 用骨剪截取膝关节, 用 75% 酒精浸泡 10 min 后带入超净工作台操作: 先用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分漂洗, 刮除关节周围附着的组织如肌肉、骨膜、滑膜。用手术刀片削取每个关节表面的软骨, 以不渗血为度。PBS 充分漂洗软骨小块 3 次。用手术刀片切碎至 1 mm 大小, PBS 冲洗 2 次后, 置入含 8 mL 0.2% Ⅱ型胶原酶的玻璃瓶中, 置于 37 ℃, 100 r/min 水浴摇床消化, 每 2 h 吸取 1 次上清液, 120 目尼龙网筛过滤, 所得滤液 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 收集细胞沉淀, 重复 3 次。用含 10% 胎牛血清的细胞培养基(Dulbecco's modified eagle media, DMEM)重悬细胞, 吹打混匀后接种至培养瓶中培养。37 ℃、5% CO_2 培养箱原代培养, 48 h 后倒置显微镜下观察细胞贴壁情况, 以后 2~3 d 更换培养液 1 次, 直到长成细胞单层, 选第 2 代软骨细胞, 0.25% 胰蛋白酶消

化备用。第 3 代软骨细胞采用甲苯胺蓝染色法鉴定并进行后续实验。

1.4.2 CCK-8 法检测软骨细胞的存活率 第 2 代软骨细胞以 1.0×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 24 h 后观察细胞生长, 至 50%~60% 时, 将细胞分为空白组, 模型组, 独活寄生汤低、中、高剂量组, 每组设置 5 个复孔。

1.4.2.1 空白组 孔中加入含 10% 胎牛血清培养基 100 μL 。

1.4.2.2 模型组 孔中加入剂量为 25 $\mu\text{mol/L}$ TG (DMEM 完全培养基配制) 100 μL 作用 4 h^[11]。

1.4.2.3 独活寄生汤低、中、高剂量组 孔中加入剂量为 25 $\mu\text{mol/L}$ TG 的含血清培养基 100 μL 作用 4 h 后, 吸弃培养基换成 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的独活寄生汤(DMEM 完全培养基配制)。作用 24 h 后, 每孔直接加入 CCK-8 溶液 10 μL , 37 ℃、5% CO_2 , 孵育 4 h, 终止培养, 在 450 nm 波长的酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值^[12-13]。

1.4.3 Hoechst 33342 检测软骨细胞凋亡情况 各

组干预后,弃除培养基,用 PBS 洗 1 次,加入 4% 多聚甲醛,固定 15 min。弃除固定液,用 PBS 洗 3 次,每次摇晃 3 min,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 染色液 1 mL,染色 30 min,期间摇晃几次使其染色充分均匀,去染色液,用 PBS 洗 3 次,每次摇晃 3 min,最后加入 200 μL PBS,用共聚焦显微镜观察软骨细胞的凋亡情况。

1.4.4 双转盘激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 浓度实时动态变化 采用 Ca^{2+} 敏感荧光探针 Fluo-3/AM 进行细胞内 Ca^{2+} 荧光标记,配制终浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Fluo-3/AM 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 混合液(DMEM 培养基配制),加于培养的软骨细胞样品上,置于 5% CO_2 孵箱中孵育 30 min。PBS 液漂洗 1 次,双转盘激光共聚焦显微镜进行观察,选择适当的参数对细胞进行动态扫描(Fluo-3/AM:激发波长 488 nm,发射波长 526 nm;Hoechst 33342:激发波长 350 nm,发射波长 460 nm),每组选取 5 个细胞,采用系统自带软件,根据荧光强度变化-时间的曲线图,得出反映细胞内游离 Ca^{2+} 浓度动态变化的曲线。

1.5 统计学方法

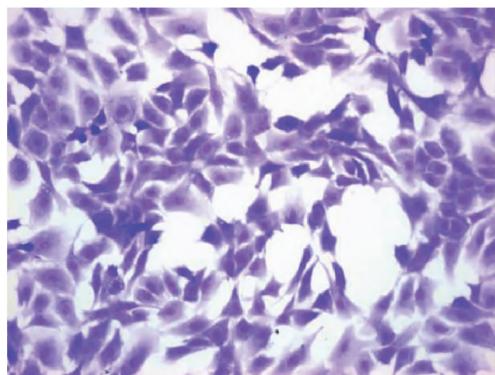
应用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,数据服从正态分布使用单因素方差分析,若方差齐则使用 LSD-*t* 检验,若方差不齐则采用 Gams-Howell 检验;数据不服从正态分布,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 软骨细胞的形态结构及鉴定

2.1.1 甲苯胺蓝染色鉴定 接种后,细胞呈圆形,漂浮于培养液中,24 h 后,大多数软骨细胞开始贴壁,

伸展并形成伪足样突起。培养第 7 天,软骨细胞增殖逐渐融合成单层,呈不规则“铺路石”样。第 2 代、第 3 代软骨细胞形态规则、大小一致,边界清晰。第 4 代开始软骨细胞逐渐呈长梭形,分化为成纤维细胞。选取第 3 代软骨细胞进行甲苯胺蓝染色,可见细胞内蓝紫色异染颗粒,细胞周围可见异染颗粒。见图 1。



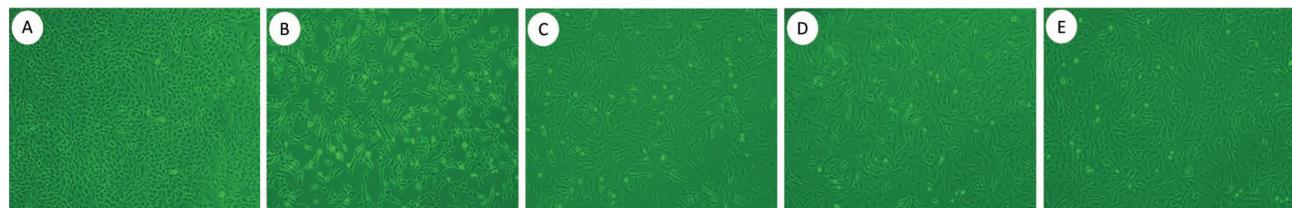
注:细胞内蓝紫色异染颗粒。

Note: Intracellular blue-purple heterochromatic granules.

图 1 甲苯胺蓝染色鉴定($\times 200$)

Figure 1 Identification using toluidine blue staining ($\times 200$)

2.1.2 软骨细胞形态变化 倒置显微镜下观察各组软骨细胞的形态,空白组呈单层铺路石状生长;模型组和独活寄生汤各剂量组细胞形态由铺路石状呈现多角形增加,伪足变长,细胞呈皱缩状态、细胞间隙变大、数量变少,悬浮死细胞增多。独活寄生汤各剂量组与模型组比较,细胞数量明显增多,细胞胞质均匀。见图 2。



注:A 为空白组,B 为模型组,C 为独活寄生汤低剂量组,D 为独活寄生汤中剂量组,E 为独活寄生汤高剂量组。

Note: A is blank group, B is model group, C is low-dose Duhuo Jisheng decoction group, D is medium-dose Duhuo Jisheng decoction group, and E is high-dose Duhuo Jisheng decoction group.

图 2 第 3 代软骨细胞形态($\times 100$)

Figure 2 Morphological observation of the third chondrocytes ($\times 100$)

2.2 CCK-8 法检测独活寄生汤对软骨细胞存活率的影响

与空白组相比,模型组的存活率较低,差异具有统计学意义($P<0.05$),而独活寄生汤各剂量组的存活率均比模型组高,差异具有统计学意义($P<0.05$),其对软骨细胞的保护作用随剂量的升高而增高,具有一定的量效关系($P<0.05$)。见表 2。

2.3 Hoechst 33342 检测软骨细胞凋亡情况

共聚焦显微镜下观察,空白组细胞核出现弥散均匀的低密度亮蓝色荧光,凋亡细胞较少。模型组的凋亡细胞数量显著增多,其细胞核固缩、呈颗粒状荧光,部分呈半月形增加。独活寄生汤各剂量组的细胞凋亡数比模型组明显减少,只有少量凋亡细胞呈高密度的亮蓝色或半月形,且独活寄生汤各组

表 2 5 组软骨细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of the activity of chondrocytes in five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活性(吸光值)
空白组	5	—	3.68±0.05 ¹⁾
模型组	5	25	1.91±0.13
独活寄生汤低剂量组	5	100	2.50±0.06 ¹⁾
独活寄生汤中剂量组	5	200	2.64±0.08 ¹⁾
独活寄生汤高剂量组	5	400	2.76±0.10 ¹⁾

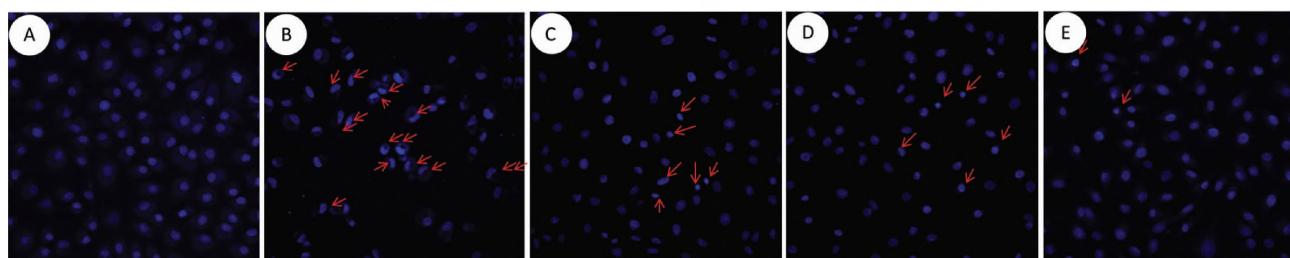
注:与模型组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model group, 1) $P<0.05$.

的细胞凋亡数量伴随剂量增高而减少,呈现一定量效关系($P<0.05$)。见图3、图4。

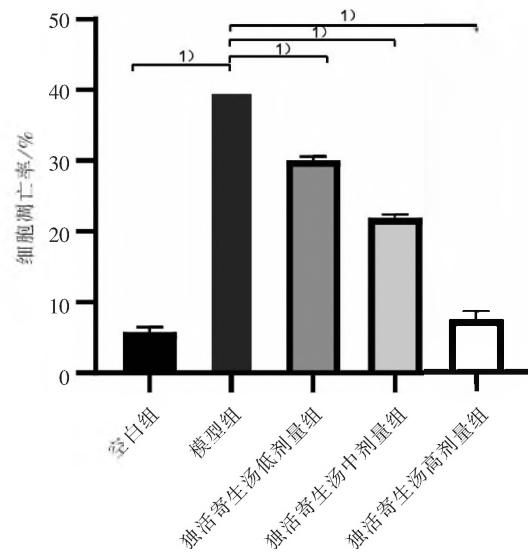
2.4 双转盘激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 浓度实时动态变化

空白组 Ca^{2+} 荧光强度较弱且均一,观察30 min后,仍处于稳定的状态。与空白组比较,模型组中 Ca^{2+} 释放明显增多,荧光强度显著增强,荧光波谱显示 Ca^{2+} 火花较频繁,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,独活寄生汤中、高剂量组(200、400 $\mu\text{g/mL}$)软骨细胞 Ca^{2+} 火花明显减少,且能较快恢复到 Ca^{2+} 稳态,独活寄生汤低剂量组(100 $\mu\text{g/mL}$)虽然仍有部分 Ca^{2+} 火花,但荧光强度明显比模型组



注:A为空白组,B为模型组,C为独活寄生汤低剂量组,D为独活寄生汤中剂量组,E为独活寄生汤高剂量组。

Note: A is blank group, B is model group, C is low-dose Duhuo Jisheng decoction group, D is medium-dose Duhuo Jisheng decoction group, and E is high-dose Duhuo Jisheng decoction group.

图 3 Hoechst 33342 检测软骨细胞凋亡情况 ($\times 400$)Figure 3 Detection of chondrocyte apoptosis by Hoechst 33342 staining ($\times 400$)

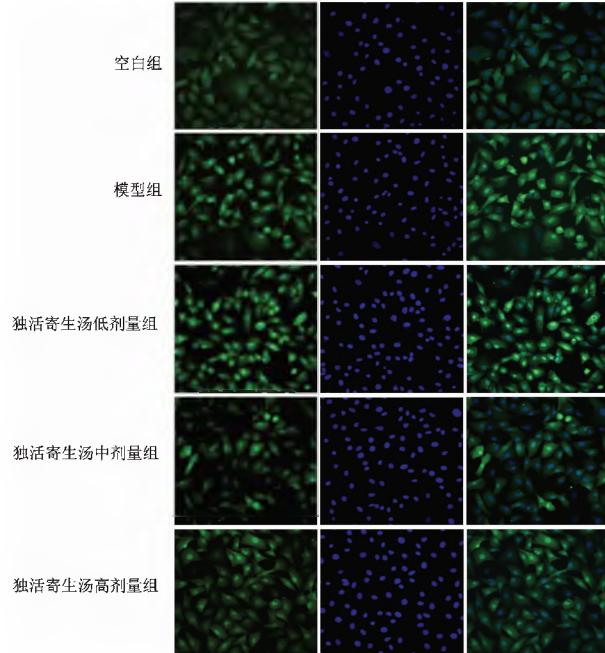
注:与模型组比较,1) $P<0.05$ 。

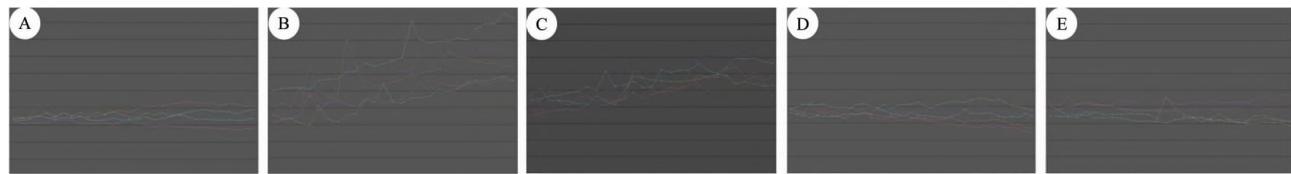
Note: Compared with model group, 1) $P<0.05$

图 4 5 组软骨细胞凋亡率

Figure 4 The apoptosis rate of chondrocytes in five groups

弱,荧光强度-时间的动态变化曲线趋于平缓。见图5、图6。

图 5 双转盘激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度 ($\times 400$)Figure 5 Observation of Ca^{2+} fluorescence intensity in cells by double rotary laser confocal microscope ($\times 400$)



注:A 为空白组,B 为模型组,C 为独活寄生汤低剂量组,D 为独活寄生汤中剂量组,E 为独活寄生汤高剂量组。

Note: A is blank group, B is model group, C is low-dose Duohuo Jisheng decoction group, D is medium-dose Duohuo Jisheng decoction group, and E is high-dose Duohuo Jisheng decoction group.

图 6 5 组 Ca^{2+} 浓度动态变化

Figure 6 Dynamic changes of Ca^{2+} concentration in five groups

3 讨论

3.1 TG 可建立稳定的软骨细胞 ERS 模型

本研究采用机械-0.2% II 型胶原酶消化法获取大量软骨细胞, 甲苯胺蓝染色可见细胞内蓝紫色异染颗粒, 证实本研究建立了稳定的软骨细胞体外培养体系^[11]。课题组前期研究发现, 在 OA 患者的软骨细胞中存在 ERS, 且内质网过载会诱导软骨细胞的凋亡, 导致软骨细胞外基质合成和降解代谢失衡, 从而加速 OA 的病理进程^[12]。

本实验运用 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂 TG 建立软骨细胞 ERS 模型^[13]。ERS 可通过激活未折叠蛋白反应触发细胞凋亡^[14-15]。实验结果表明, 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ TG 作用于软骨细胞 4 h, 显微镜下可观察到软骨细胞变形、间隙变大、数量变少, CCK-8 检测结果显示软骨细胞存活率显著降低, Hoechst 33342 染色可见明显的细胞核固缩、碎裂, 或呈月牙状等细胞凋亡现象, 故 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ TG 干预第 3 代软骨细胞 4 h 即可建立合适而稳定的软骨细胞 ERS 模型。TAKADA 等^[16]研究结果亦证实了 ERS 相关蛋白与 OA 软骨细胞变性及凋亡均呈正相关。

3.2 独活寄生汤可维持软骨细胞内 Ca^{2+} 平衡

过度的 ERS 会刺激 Ca^{2+} 通道活化, Ca^{2+} 作为凋亡过程中重要的信号, 可通过调节 Ca^{2+} 敏感的关键酶诱导细胞凋亡^[17-19]。研究表明, 独活寄生汤含药血清可抑制因 ERS 反应引起的软骨细胞凋亡^[20], 但尚未深入探索其是否通过维持细胞内 Ca^{2+} 平衡而发挥作用。本研究采用双转盘激光共聚焦显微镜实时观察发现, 模型组细胞内 Ca^{2+} 释放增多、火花出现频繁、荧光强度显著增强, 与空白组相比差异具有统计学意义, 可见在 TC 诱导的软骨细胞 ERS 模型中存在 Ca^{2+} 稳态失衡现象。谢文斌^[21]在进行人膝关节 OA 原位软骨细胞自发性 Ca^{2+} 信号特征分析时亦证实了人膝关节原位软骨深层细胞自发性 Ca^{2+} 信号与软骨退变程度呈负相关。当加入独活寄生汤中、高剂量进行干预时, 细胞内 Ca^{2+} 火花释放减少, 荧光强度减弱, 荧光强度-时间的动态变化曲线趋于平缓, 能很快地恢复到钙平衡状态。Hoechst 33342 染色可见独活寄生汤干预时软骨细胞凋亡数量减

少, CCK-8 检测亦提示独活寄生汤组细胞存活率较模型组高。这提示, 独活寄生汤可维持软骨细胞内钙平衡, 减轻 ERS 反应和软骨细胞凋亡。

4 小结

在 OA 的病理过程中, Ca^{2+} 介导的软骨细胞凋亡在骨性关节炎发病中起重要作用。由于关节软骨中 Ca^{2+} 稳态失衡, ERS 持续激活, 进而引起软骨细胞凋亡, 导致软骨合成和降解代谢失衡, 最终造成软骨细胞外基质和关节软骨破坏。本研究证实, 独活寄生汤可通过维持关节软骨内钙平衡, 减轻 ERS, 减少软骨细胞凋亡, 从而对关节软骨产生保护作用, 但是目前独活寄生汤如何通过调控相关蛋白表达以及信号通路维持钙稳态尚未完全阐明, 未来可基于以上研究进一步深入探讨独活寄生汤的作用机制, 为 OA 的早期预防及治疗提供新思路。

参考文献

- [1] BENDABLE A M. Animal models of Osteoarthritis in an area of molecular biology [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(3):648-653.
- [2] 肖阳, 刘娇, 胡坤, 等. 膝骨性关节炎患者伏隔核功能连接特征的 fMRI 研究 [J]. 康复学报, 2020, 30(1):40-45.
- [3] 黄志强, 刘宇, 苏昭元, 等. 阿是穴刺络拔罐联合股四头肌功能锻炼治疗膝骨性关节炎 [J]. 康复学报, 2019, 29 (1):21-26.
- [4] 陈俊, 许惠凤, 郑春松, 等. 独活寄生汤含药血清对退变软骨细胞 PERK/Bip 通路关键调控蛋白的影响 [J]. 福建中医药, 2018, 49(5):28-31.
- [5] 张玉静, 钟才高. 钙离子依赖的内质网应激在细胞凋亡中作用研究进展 [J]. 中国职业医学, 2017, 44(3):365-370.
- [6] YANG L, CARLSON S G, MCBURNEY D, et al. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (35):31156-31165.
- [7] 齐英娜, 郭振江, 李春根, 等. 独活寄生加减方治疗膝骨关节炎的临床疗效评价 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(2):159-162.
- [8] 李慧, 马玉环, 许丽梅, 等. 独活寄生汤拆方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制软骨细胞炎症反应 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(35):5589-5594.
- [9] 刘献祥. 基于陈可冀学术思想之骨性关节炎研究 [J]. 康复学报, 2016, 26(1):2-5.
- [10] 薛浩, 刘岩, 冉博, 等. 膝关节骨性关节炎治疗现状 [J]. 医学

综述,2018,24(2):321–325,330.

- [11] HOSHIBA T, LU H, YAMADA T, et al. Effects of extracellular matrices derived from different cell sources on chondrocyte functions [J]. Biotechnol Prog, 2011, 27(3):788–795.
- [12] 叶锦霞,吴广文,赖舜森,等.透骨消痛胶囊对膝骨关节炎大鼠内质网应激影响的研究[J].风湿病与关节炎,2015,4(11):5–11.
- [13] 叶锦霞,付长龙,林洁,等.透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素诱导的内质网应激(PEKR信号通路)介导的大鼠体外培养关节软骨细胞凋亡的影响[J].中医正骨,2017,29(6):1–7.
- [14] ABDELRAHIM M, NEWMAN K, VANDERLAAG K, et al. 3,3'-Diindolymethane (DIM) and its derivatives induce apoptosis in pancreatic cancer cells through endoplasmic reticulum stress-dependent upregulation of DR5 [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(4):717–728.
- [15] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, et al. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. Curr Mol Med, 2016, 16(6):533–544.
- [16] TAKADA K, HIROSE J, SENBA K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage [J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(4):232–242.
- [17] 李铭,邹颖,郭寒,等.钙离子在内质网应激中的作用[J].动物医学进展,2018,39(9):112–116.
- [18] 赵倩倩,姜颖哲,班博,等.内质网应激相关基因调控骨生长发育的研究进展[J].中华诊断学电子杂志,2018,6(4):286–288.
- [19] 王金发.细胞生物学[M].北京:科学出版社,2003:104–344.
- [20] 陈俊,吴广文,许惠凤,等.独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞蛋白激酶R样内质网激酶/免疫球蛋白结合蛋白信号通路的影响[J].中医正骨,2018,30(8):1–10.
- [21] 谢文斌.人膝关节OA原位软骨细胞自发性钙离子信号特征分析[D].长沙:湖南师范大学,2017:34.

Effects of Duhuo Jisheng Decoction on Calcium Homeostasis and Apoptosis of Chondrocytes under Endoplasmic Reticulum Stress

LIN Qing¹, WANG Wenyi¹, PAN Danhong¹, HUANG Yanfeng¹, FU Changlong², YE Jinxia^{1*}

¹ Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou, Fujian 350122, China

* Correspondence: YE Jinxia, E-mail:xiaoyezi1203@126.com

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Duhuo Jisheng decoction on the balance of calcium homeostasis and apoptosis of chondrocytes under endoplasmic reticulum stress (ERS), and to preliminarily explore its mechanism of preventing and treating osteoarthritis. **Methods:** A steady chondrocyte in vitro culture system was established by using 4-week-old SD rat knee cartilage, and identify the third generation chondrocyte by toluidine blue staining. The 25 μmol/L Thapsigargin (TG) was used to induce chondrocyte in vitro culture to produce endoplasmic reticulum stress (ERS), incubate it in Duhuo Jisheng Decoction (100, 200, 400 μg/mL) for 24 hours after induction. The cells were divided into the blank group, the model group, the low-dose Duhuo Jisheng decoction group, the medium-dose Duhuo Jisheng decoction group, and the high-dose Duhuo Jisheng decoction group. Then morphological changes of chondrocytes were observed respectively by inverted microscope, viability of chondrocyte in each group was examined by CCK-8 method, chondrocyte apoptosis was observed by Hoechst 33342 staining and real-time dynamic changes of intracellular Ca²⁺ concentration was examined by double turntable laser confocal microscope. **Results:** ① The morphology of chondrocytes: the cells in the blank group grew in a single-layer paving stone shape, while the cells in the model group increased in a polygonal shape, the pseudopodia increased, the gaps widened, and the number of cells decreased significantly. Compared with the model group, the number of cells in the three dose groups of Duhuo Jisheng decoction (100, 200, 400 μg/mL) increased significantly and the cytoplasm was uniform. The activity of chondrocytes in each group: compared with the blank group, the survival rate of the model group was lower, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The absorbance of each concentration group of Duhuo Jisheng decoction increased with the increase of concentration, and the difference was statistically significant compared with the model group ($P<0.05$). ③ Apoptosis of chondrocytes: the number of apoptosis in the model group was significantly increased, and the degree of pyknosis of the nucleus was obvious, and some of them were a high density of bright blue or half moon-shaped. The number of apoptotic cells in each dose group of Duhuo Jisheng decoction was significantly reduced, only a few apoptotic cells showed a high density of bright blue or half-moon shape, and the number of apoptosis decreased with the increase of the concentration of Duhuo Jisheng decoction, showing a certain dose-effect relationship. ④ The changes of intracellular calcium ion concentration: the calcium ion fluorescence intensity of the cells in the blank group was weaker and more uniform, maintaining a stable state. The calcium ion release of the model group was significantly increased, and the fluorescence intensity was enhanced. The fluorescence spectrum showed that calcium sparks were more frequent. Compared with the blank group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Chondrocytes in the medium and high-dose Duhuo Jisheng decoction groups could quickly return to calcium homeostasis, and calcium sparks were significantly reduced. Although there were still some calcium sparks in the low-concentration Duhuo Jisheng decoction group, the fluorescence intensity was significantly weaker than the model group. **Conclusion:** Duhuo Jisheng decoction has an inhibitory effect on the apoptosis of chondrocyte induced by TG, the mechanism may be that Duhuo Jisheng decoction can alleviate endoplasmic reticulum stress by regulating calcium balance, thus inhibiting the apoptosis of chondrocyte.

KEY WORDS Duhuo Jisheng decoction; chondrocyte; endoplasmic reticulum stress ; apoptosis; calcium homeostasis

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.06009