

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001717

新 mTOR 抑制剂洋椿苦素对骨关节炎的保护作用
及机制研究谭家华¹, 付海荣², 秦 伟¹

(重庆三峡医药高等专科学校 1. 公共基础部体育教研室; 2. 基础医学部生理教研室, 重庆 404120)

【摘要】目的:探讨洋椿苦素对骨关节炎的治疗效果及其作用机制。**方法:**使用软骨细胞系 C28/I2 作为体外研究对象, 采用 MTT 法检测洋椿苦素的细胞毒性, 使用 Western blot 和免疫荧光检测洋椿苦素对哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的抑制作用和对自噬的激活效果; 选用 C57BL/6J 小鼠($n=40$)建立右膝关节炎模型, 同只小鼠的左膝作为正常对照, 经腹腔分别给以洋椿苦素($n=20$)和生理盐水($n=20$)治疗后, 利用 Western blot、免疫组化、免疫荧光、番红 O 染色、HE 染色、软骨损伤半定量评分系统及炎症分级系统, 检测洋椿苦素对 mTOR 的抑制效果、自噬的激活情况、对软骨的保护和滑膜炎抑制的效果。**结果:**①洋椿苦素可抑制 C28/I2 细胞 mTOR 的 Ser-2448 磷酸化位点, 同时抑制核糖体 S6 蛋白激酶磷酸化(ribosomal protein S6, rpS6)的 Thr-389 和 Ser-371 位点, 其最佳剂量为 40 $\mu\text{mol/L}$ (Ser-2448: $t=13.42$, $P=0.000$; Thr-389: $t=19.06$, $P=0.000$; Ser-371: $t=9.52$, $P=0.000$), 最佳作用时间为 24 h (Ser-2448: $t=34.82$, $P=0.000$; Thr-389: $t=3.14$, $P=0.007$; Ser-371: $t=19.32$, $P=0.000$); ②洋椿苦素可促进 C28/I2 细胞 LC3II/LC3I 的比值($t=8.15$, $P=0.002$), 并增加自噬小体阳性细胞的数量($t=9.71$, $P=0.000$); ③在骨关节炎中, 洋椿苦素可抑制 mTOR 的磷酸化水平($t=19.03$, $P=0.005$)及 rpS6 表达阳性的细胞数量($t=27.97$, $P=0.000$), 并增加 LC3II/LC3I 表达水平($t=24.65$, $P=0.000$)和 LC3 表达阳性的细胞数量($t=33.89$, $P=0.000$); ④洋椿苦素可降低骨关节炎模型中关节软骨的损伤程度($t=8.32$, $P=0.009$), 增加软骨细胞的密度($F=3.59$, $P=0.013$), 抑制具有 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 5, ADAMTS-5)的表达($F=1.82$, $P=0.002$); ⑤在骨关节炎模型的滑膜组织中, 洋椿苦素可通过对白介素-1 β (Interleukine-1 beta, IL-1 β)的抑制($F=3.20$, $P=0.000$)从而抑制滑膜组织中的炎症反应($F=5.44$, $P=0.029$)。**结论:** 洋椿苦素作为一种潜在的 mTOR 抑制剂, 在小鼠模型中可通过激活自噬降低关节软骨的损伤并保护软骨细胞, 还可通过对 ADAMTS-5 和 IL-1 β 的抑制实现对细胞外基质的保护和炎症的抑制, 但对骨关节炎中软骨的损伤的保护效果及机制还需进一步研究。

【关键词】洋椿苦素; 骨关节炎; 自噬; 炎症**【中图分类号】**R318.17**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-12-19Effect and mechanism of novel mTOR inhibitor cedrelone for
osteoarthritis treatmentTan Jiahua¹, Fu Hairong², Qin Wei¹

(1. Teaching and Research Section of Physical Education, College of Public Basic Courses; 2. Teaching and Research Section of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Three Gorges Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of cedrelone for osteoarthritis treatment. **Methods:** C28/I2 cells were used to establish the cell model. MTT was used to detect the toxicity of cedrelone. Western blot and immunofluorescence were used to detect the effect of cedrelone on mTOR inhibition and autophagy activation. The right knees of C57BL/6J mice ($n=40$) were used to establish the osteoarthritis model, and the left knees of the same mice were used as the control; the mice were given cedrelone ($n=20$) and normal saline ($n=20$) treatment through intraperitoneal injection. The effects of cedrelone on mTOR inhibition and synovial inflammation, activation of autophagy and protection of cartilage were detected through Western blot, safranin O stain, immunohistochemistry, immunofluorescence, semi-quantitative scoring system and inflammation grading system. **Results:** ①For the C28/I2 cell, cedrelone could inhibit the mTOR phosphorylation in the site of Ser-2448, and suppress the phosphorylation of ribosomal protein S6 (rpS6) in the site of Thr-389 and Ser-371.

作者介绍: 谭家华, Email: jhtang1977@sina.com,

研究方向: 运动生理。

通信作者: 付海荣, Email: 1026443774@qq.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180531.0922.006.html>

(2018-05-31)

The optimum dose was 40 $\mu\text{mol/L}$ (Ser-2448: $t=13.42$, $P=0.000$; Thr-389: $t=19.06$, $P=0.000$; Ser-371: $t=9.52$, $P=0.000$), and the best time was 24 h (Ser-2448: $t=34.82$, $P=0.000$; Thr-389: $t=3.14$, $P=0.007$; Ser-371: $t=19.32$, $P=0.000$). ②The value of LC3II/LC3I ($t=8.15$, $P=0.002$) and the number of autophagosome positive cells ($t=9.71$, $P=0.000$) were significantly increased by cedrelone treatment in C28/I2 cells. ③In the osteoarthritis model, cedrelone could inhibit the phosphorylation level of mTOR ($t=19.03$, $P=0.005$) and the number of rpS6 positive cells ($t=27.97$, $P=0.000$), as well as enhance the level of LC3II/LC3I ($t=24.65$, $P=0.000$) and the number of LC3 positive cells ($t=33.89$, $P=0.000$). ④Cedrelone also could reduce the degradation of extracellular matrix through ADAMTS-5 inhibition ($F=1.82$, $P=0.002$), and then reduce the severity of osteoarthritis ($t=8.32$, $P=0.009$), increase the number of chondrocytes ($F=3.59$, $P=0.013$). ⑤In addition, in the synovial tissue, synovial inflammation was suppressed ($F=5.44$, $P=0.029$) by cedrelone through IL-1 β inhibition ($F=3.20$, $P=0.000$). **Conclusion:** Cedrelone acts as a potential mTOR inhibitor, not only reducing the severity of osteoarthritis and protection chondrocytes through autophagy activation, but also inhibiting the degradation of extracellular matrix and synovial inflammation by ADAMTS-5 and IL-1 β inhibition in mice, however, the protective effect and mechanism of cedrelone for cartilage injury in osteoarthritis need to be further studied.

【Key words】cedrelone; osteoarthritis; autophagy; inflammation

骨关节炎是老年化及高负荷运动强度带来的常见关节病理性改变,其典型特征为软骨细胞外基质降解及软骨细胞减少^[1]。在骨关节炎疾病的发展进程中,关节软骨的改变是最为重要的特征,同时与关节接触的相关组织也会出现相应的病理性改变^[2]。目前对于骨关节炎的治疗主要是针对细胞外基质降解酶而寻找相应的酶活性抑制剂,但其效果并不理想而且还会出现不良反应^[3]。因此,通过保护骨关节炎中软骨细胞的生存,改善局部稳态的失衡,进而促发全局基因改变的治疗方案可能具有更佳的治疗效果。

自噬是一种细胞的自我稳态调节机制,在能量和营养供给中充当重要角色,并且在移除死亡细胞器和失活的功能性大分子进而保护细胞存活中起着重要作用^[4]。在细胞及组织中,自噬的降低会导致活性氧的增加、基因的异常表达,进而导致细胞死亡或引起组织的异常性病变^[5]。此外, mTOR 是重要自噬相关蛋白的关键上游分子,同时也是多个自噬上游调控通路的中心调节分子,因此,针对 mTOR 分子进行相应的药物干预被认为是一种潜在的治疗手段^[6]。

洋椿苦素是一种柠檬苦素,具有治疗疲劳、缓解压力、治疗勃起功能障碍及记忆力衰退,同时还具有促进消化及通便的效果^[7]。研究表明,洋椿苦素对于自噬相关分子即蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) 具有抑制作用,而 AKT 又是 mTOR 的下游分子^[8],因此洋椿苦素可能通过对 mTOR 分子的影响对自噬具有促进作用。研究表明,在骨关

节炎中,自噬相关因子的表达显著下降^[9-10]。提示是否可以通过对自噬的激活从而治疗骨关节炎。而现有的自噬激动剂以 mTOR 抑制剂雷帕霉素为代表,但其强烈的免疫抑制作用限制了其在临床上的应用^[11]。因此研究洋椿苦素在骨关节炎中与自噬相关分子 mTOR 的相互作用及对骨关节炎是否起到保护作用具有重要的临床意义。

研究表明,洋椿苦素对组织及细胞具有保护作用^[7],而自噬是细胞及组织的一种保护机制^[4],因此洋椿苦素是否可以诱导自噬? 洋椿苦素是否可对自噬的关键调节分子 mTOR 的表达具有调节作用? 另一方面,洋椿苦素的保护作用是否对炎症性疾病中的炎性因子具有调节作用? 对具体的骨关节炎是否具有保护作用? 具体机制如何? 因此,本研究将对洋椿苦素对骨关节炎疾病进程的影响及相关机制进行深入探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

软骨细胞系 C28/I2 购自中科院上海细胞库;高糖 DMEM/F12、胎牛血清 FBS 以及 Optium 均购自美国 HyClone 公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、青霉素-链霉素混合溶液、RIPA 裂解液(强)、溴酚蓝、BCA 蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒、PVDF 膜(0.2 μm), Western 一抗及二抗稀释液、特超敏 ECL 化学发光试剂盒、苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒、Vectastain ABC-AP 碱性磷酸酶以及封片剂均购自碧云天生物技术公司;脱脂奶粉购自武汉博士德生物工程有限公司;GFP-LC3 质粒购自上海吉凯基因化学技术

有限公司;lipofectamine2000 和 Alexa Fluor 488 荧光二抗购自美国 Invitrogen 公司;p-mTOR (Ser2448)、mTOR、p-rpS6 (Thr-389)、p-rpS6 (Ser-371)、LC3、GAPDH、ADAMTS-5 和 IL-1 β 均购自美国 Santa Cruz 公司;洋椿苦素购自上海陶素生化有限公司;C57BL/6J 小鼠购自我校实验动物中心;DMSO、PBS、水合氯醛、多聚甲醛、柠檬酸钠以及 TBD-2 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;tween20、番红 O 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒性实验 采用噻唑蓝(MTT)法进行细胞药物毒性检测,取处于对数生长的软骨细胞 C28/I2,以 1×10^4 的细胞浓度接种于 96 孔板中。24 h 后加入不同浓度的药物,每个浓度设置 5 个复孔,以 DMSO 为对照,同时设置只加培养基和未接种细胞的培养孔作为空白对照。继续培养 24 h 后,以 0.5 g/L 的浓度加入 MTT 培养液,继续培养 4 h 后,使用酶标仪于波长为 490 nm 处测定各孔的吸光度(absorbance, A)值,并根据公式计算出洋椿苦素的半数细胞毒性常数(CC₅₀)。

1.2.2 蛋白检测 将培养好的细胞刮擦收集,组织则经液氮碾碎后获取,使用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min,在 4 ℃离心机中以 15 000 g/min 的速度离心 12 min,吸取上清,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,并使用 RIPA 和溴酚蓝对样品进行配平处理。使用碧云天的 SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒配制 12%的胶进行蛋白电泳,保证每孔蛋白上样大于 30 μ g,然后使用半干转膜法将蛋白转到 PVDF 膜上,使用 5%的脱脂奶粉(PBST 配制)对 PVDF 膜室温封闭 1 h,对 PVDF 膜进行一抗 4 ℃过夜孵育,PBST 洗 3 次,每次 10 min,然后在 37 ℃条件下进行二抗孵育 1 h,PBST 洗 3 次,每次 10 min,然后使用 ECL 化学发光液发光液进行蛋白显影检测,并使用柯达分子成像软件对灰度值进行定量分析。

1.2.3 GFP-LC3 质粒转染 在 60 mm 的培养皿中进行爬片处理,待软骨细胞系 C28/I2 长到约 80%时,去掉培养基,PBS 洗 3 次,并加入 1 mL 的 Optium 在培养箱中培养 30 min。然后分别在两管中加入 400 μ L Optium,并分别加入 10 μ g GFP-LC3 质粒和 30 μ L lipofectamine2000 并混匀,室温下放置 5 min,然后将两管混合并混匀,室温下放置 20 min,接着将混合液加入培养皿中,放置在培养箱中培养 48 h。去掉染液,换含 10%血清的 DMEM/F12 继续培养,并加入药物处理,24 h 后终止药物处理。使用 4%的多聚甲醛对细胞进行固定 10 min,荧光显微镜下观察 GFP-LC3 荧光小点,1 个细胞中出现多于 5 个小点则记为自噬阳性细胞,观测 200 个细胞,并进行出现大于 5 个 GFP-LC3 荧光小点的细胞的阳性率进行统计分析。

1.2.4 骨关节炎模型的建立 本研究采用经典的 Hulth 法建立骨关节炎模型^[12-13],具体步骤如下:随机选取 6 个月左右大小的 C57BL/6J 小鼠($n=40$)进行骨关节炎模型的建立,使用 4%的水合氯醛将小鼠麻醉后仰卧于手术台上,在小鼠右

后肢膝关节内侧切开暴露膝关节,切断前后交叉韧带及内侧副韧带,并完整切除内侧半月板,同时保留关节的软骨面,术后不固定并允许其自由活动;对左后肢膝不作手术处理作为正常对照。手术完成 1 周后,每天对小鼠均进行驱赶,每天上午、中午及下午共 3 次,每次 30 min,连续驱赶 8 周后,即得到明显的骨关节炎模型。

1.2.5 洋椿苦素治疗 关节炎模型成功建立后,实施 2 组独立的药物治疗实验,每组 20 只小鼠,治疗组给予洋椿苦素治疗,使用生理盐水进行溶解,按剂量/小鼠体质量为 1 mg/kg 的给药量每天进行腹腔注射 1 次,总注射量控制在 0.5 mL 以内,连续注射 10 周。对照组只给予生理盐水进行腹腔注射,注射量为 0.5 mL,连续注射 10 周,然后所有小鼠进行麻醉处死。

1.2.6 免疫组化及免疫荧光 将所有获取的膝关节使用 4%的多聚甲醛固定 24 h,然后使用 TBD-2 进行脱钙处理 48 h,并使用石蜡包埋,以 4 μ m 的厚度切片。将切片置于二甲苯及不同浓度的乙醇进行脱蜡处理,然后在 80~85 ℃且浓度为 10 mmol/L 的柠檬酸钠中进行加热 5 min 实现抗原暴露,室温冷却 20 min,PBS 冲洗,使用 5%的血清封闭 30 min,然后孵育一抗,4 ℃过夜。对于免疫组化,室温孵育二抗 1 h,使用 Vectastain ABC-AP 碱性磷酸酶孵育 30 min,PBS 冲洗,再与碱性磷酸酶底物孵化 20~30 min,镜下观察并照相。对于免疫荧光,室温孵育 Alexa Fluor 488 的荧光二抗 30 min,镜下观察并照相。完成后所有切片均用封片剂进行封片处理,4 ℃保存。

1.2.7 膝关节的组织学分析 使用番红 O 进行染色,采用半定量评分系统对膝关节组织学病理改变进行评分。评分规则如下,0 分为正常组织,0.5 分为蛋白聚糖丢失但表面依然完整,1 分为表面纤维化但软骨完整未被损坏,2 分为软骨表面出现垂直裂缝并且软骨表面薄片有丢失(以丢失的百分比进行统计),3 分为出现垂直裂缝且钙化缺损区域达到 1%~25%,4 分为出现垂直裂缝且钙化缺损区域达到 25%~50%,5 分为出现垂直裂缝且钙化缺损区域达到 50%~70%,6 分为出现垂直裂缝且钙化缺损区域大于 70%。

1.2.8 膝关节的组织的炎症分析 将从实验动物中获取的滑膜采用分级系统对滑液炎症进行检测分析。检测指标分别为滑膜内衬细胞层的增生/扩大程度,原位细胞/滑膜间质细胞的激活以及免疫细胞的浸润,分为未出现(0 级)、轻度(1 级)、中度(2 级)及重度(3 级)。同时利用 HE 染色分析炎症水平。

1.2.9 膝关节的软骨细胞构成 膝关节切片使用苏木精和伊红染色,分别照 3 张图片,显示股骨踝的中心未被半月板和股骨内、外侧髁覆盖,然后对切片中的所有细胞进行计数。对于 ADAMTS-5 阳性细胞计数,统计 ADAMTS-5 阳性的细胞并计算出其占总细胞数的比例,结果表示为 ADAMTS-5

阳性细胞的百分比。

1.3 统计分析

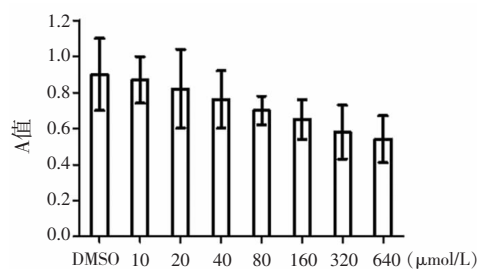
所有数据均使用 SPSS 17.0 进行统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用单因素方差分析确定多组数据之间的差异是否具有统计学意义,且多组均数之间两两比较使用 LSD-*t* 法,同组间不同因素处理则采用配对 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

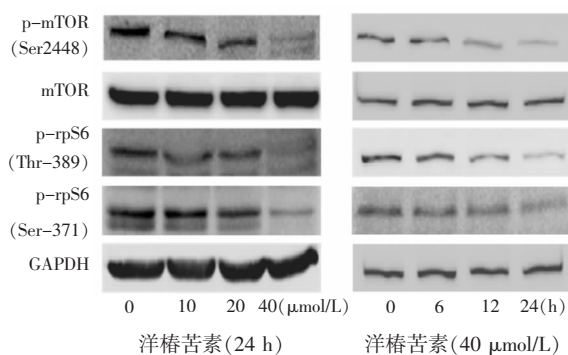
2.1 在软骨细胞中洋椿苦素抑制 mTOR 并激活自噬

为了检测洋椿苦素对软骨细胞的作用,培养软骨细胞 C28/I2,并通过 MTT 实验验证了其细胞的毒性剂量,并计算出洋椿苦素的半数毒性剂量 (CC_{50}) 为 $1\,784\ \mu\text{mol/L}$,大于 $1\,000\ \mu\text{mol/L}$ (图 1A);同时选取雷帕霉素作为阳性对照,使用 MTT 法检测雷帕霉素对 C28/I2 的毒副作用,结果显示其毒副作用远远大于洋椿苦素,且雷帕霉素的半数毒性剂量

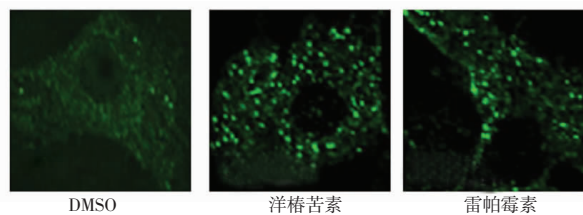
(CC_{50}) 为 $75.93\ \mu\text{mol/L}$ (图 1B)。因此洋椿苦素属于低细胞毒性药物,安全无毒副作用。为了检测洋椿苦素作用位点,给予不同浓度梯度和不同时间梯度的洋椿苦素处理 C28/I2 细胞。结果显示,洋椿苦素可降低 mTOR 在 Ser-2448 位点的磷酸化作用,24 h 内洋椿苦素可完全抑制 mTOR 的活性,其最佳作用浓度为 $40\ \mu\text{mol/L}$;同时洋椿苦素对 mTOR 的底物核糖体 S6 蛋白激酶的磷酸化 (rpS6) 同样具有抑制作用,结果显示洋椿苦素可在 Thr-389 和 Ser-371 位点抑制 rpS6,其最佳时间和剂量同样为 24 h 和 $40\ \mu\text{mol/L}$ (图 1C,表 1)。以雷帕霉素为阳性对照,结果显示,洋椿苦素对 mTOR 磷酸化的抑制效果与雷帕霉素类似 (图 1D,表 2)。通过 Western blot 和 GFP-LC3 荧光质粒检测显示,洋椿苦素可显著激活 C28/I2 的 LC3II/LC3I 水平 (图 1E,表 2) 和自噬小体阳性细胞的数量 (图 1F、G,表 2),激活自噬。同时,与雷帕霉素比较,洋椿苦素对自噬标志物 LC3II/LC3I (图 1E,表 2) 及自噬小体阳性细胞的数量 (图 1F、G,表 2) 的激活效果与雷帕霉素类似。详细结果如图 1 及表 1、表 2 所示。



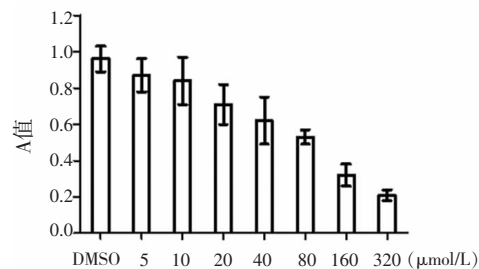
A. MTT 检测不同浓度洋椿苦素对软骨细胞 C28/I2A 的毒副作用



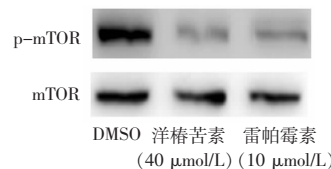
C. 洋椿苦素对 mTOR 和 rpS6 的抑制作用
分别成时间依赖型和剂量依赖型



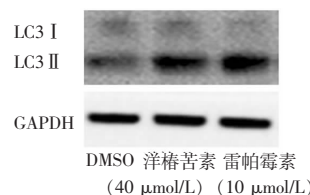
F. 洋椿苦素激活 GFP-LC3 自噬荧光小体



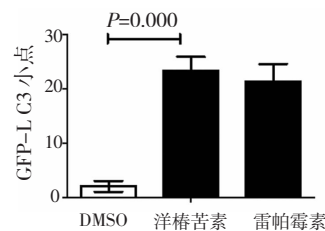
B. MTT 检测不同浓度雷帕霉素对软骨细胞 C28/I2A 的毒副作用



D. 洋椿苦素和雷帕霉素抑制 mTOR 的磷酸化



E. 洋椿苦素激活自噬标志物 LC3II



G. GFP-LC3 自噬小体的细胞阳性率统计结果

图 1 洋椿苦素抑制 C28/I2 细胞中的 mTOR 并激活自噬

2.2 洋椿苦素抑制骨关节炎模型中的 mTOR 并激活自噬

经腹腔给药后,为了确定洋椿苦素对 mTOR 的抑制作用,检测了 mTOR 及 rpS6 在膝关节软骨中的表达情况,结果显示,与注射生理盐水比较,在正常的小鼠膝关节中,洋椿苦素对 mTOR 的磷酸化水平(图 2A,表 3)及 rpS6 阳性细胞数量(图 2C,表 3)并无明显影响,而在骨关节炎的小鼠膝盖中,洋椿苦素可显著抑制 mTOR 的磷酸化水平(图 2B,表 3)及 rpS6 阳性细胞数量(图 2C,表 3)。同时经 Western blot 和 LC3 免疫组化染色显示,洋椿苦素可促进 LC3II/LC3I(图 2D,表 3)和 LC3 阳性细胞(图 2E,表 3)在关节软骨中的水平,表示洋椿苦素可促进关节软骨的自噬。以上结果提示,在膝关节软

骨中,洋椿苦素可通过抑制 mTOR,从而激活自噬的发生。详细结果如图 2 及表 3 所示。

2.3 洋椿苦素降低骨关节炎的损伤程度

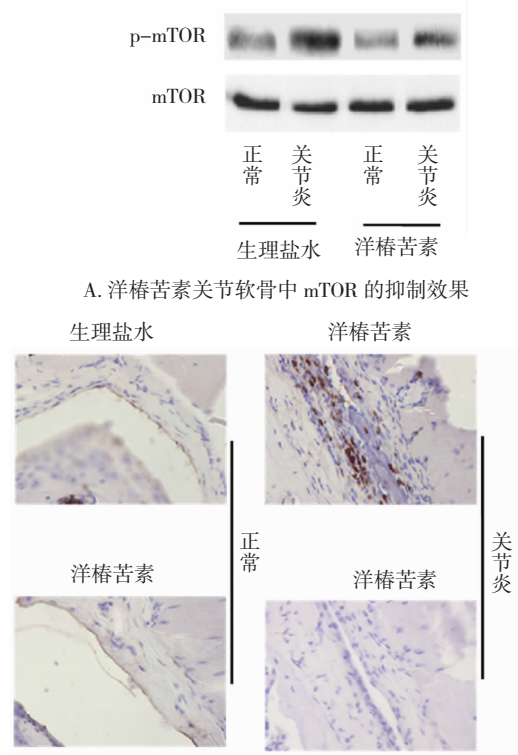
在小鼠骨关节炎模型中,分别经腹腔注射给以洋椿苦素和生理盐水,结果显示,在给以生理盐水后,小鼠的关节出现显著的软骨退化,蛋白聚糖降解,软骨表面薄片有丢失现象出现,同时还出现了纤维化,而在给以洋椿苦素后,这些损伤显著降低(图 3A)。通过软骨半定量评分系统评分显示,与小鼠正常的膝关节比较,在接受生理盐水注射后,骨关节炎中的膝关节的病理性损伤明显上升[(0.28 ± 0.06) vs. (3.69 ± 0.63), $F=110.300$, $P=0.000$];经洋椿苦素治疗后,骨关节炎中

表 1 图 1C 中各指标统计值

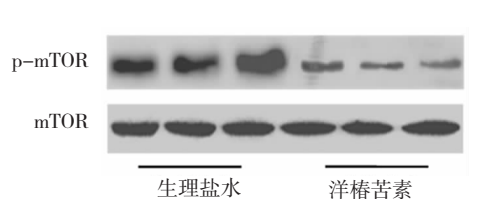
指标	洋椿苦素(40 $\mu\text{mol/L}$)		t 值	P 值	洋椿苦素(24 h)		t 值	P 值
	0 h	24 h			0 $\mu\text{mol/L}$	40 $\mu\text{mol/L}$		
p-mTOR/mTOR	0.96 ± 0.02	0.04 ± 0.00	34.820	0.000	0.52 ± 0.01	0.03 ± 0.00	13.420	0.000
p-rpS6(Thr-389)	1.00 ± 0.02	0.11 ± 0.01	3.140	0.007	1.00 ± 0.01	0.06 ± 0.00	19.060	0.000
p-rpS6(Ser-371)	1.00 ± 0.01	0.26 ± 0.04	19.320	0.000	1.00 ± 0.02	0.13 ± 0.03	9.520	0.000

表 2 图 1D、E、F 中各指标统计值

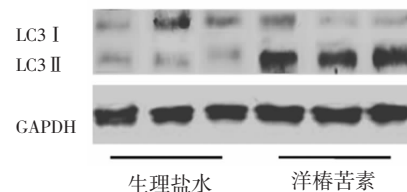
指标	DMSO	洋椿苦素 (40 $\mu\text{mol/L}$)	雷帕霉素 (10 $\mu\text{mol/L}$)	F 值	P 值	洋椿苦素 vs. DMSO		洋椿苦素 vs. 雷帕霉素	
						t_b 值	P 值	t_b 值	P 值
p-mTOR/mTOR	1.75 ± 0.09	0.31 ± 0.06	0.29 ± 0.05	16.32	0.025	9.25	0.001	1.38	0.364
LC3II/LC3I	1.36 ± 0.27	8.33 ± 0.75	10.26 ± 1.28	25.84	0.014	8.15	0.002	1.92	0.097
GFP-LC3阳性细胞数量	2.00 ± 1.00	23.33 ± 2.52	21.33 ± 3.21	19.33	0.016	9.71	0.000	1.15	0.472



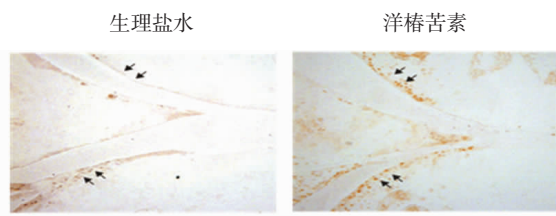
C. 洋椿苦素对 rpS6 的抑制作用



B. 洋椿苦素对骨关节炎中软骨的 mTOR 的抑制效果



D. 骨关节炎中,洋椿苦素对 LC3II 的激活作用



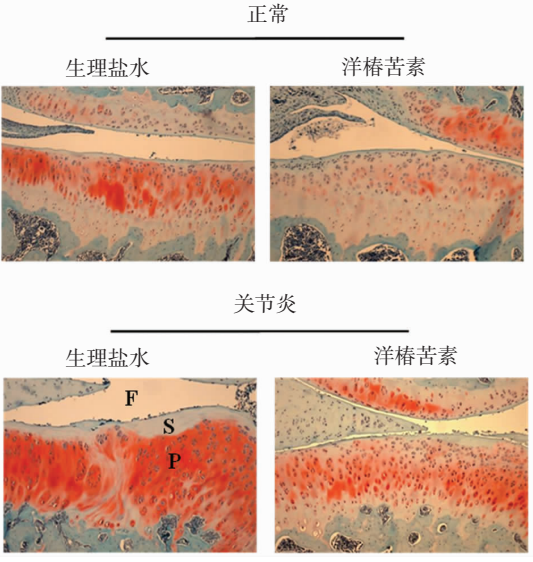
E. 骨关节炎中,洋椿苦素对 LC3 的激活作用

图 2 洋椿苦素抑制骨关节炎中的 mTOR 并激活自噬

表 3 图 2 中各指标统计值

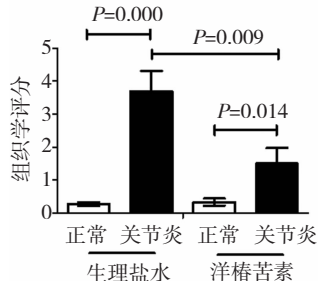
指标	正常小鼠膝关节		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	骨关节炎小鼠膝关节		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	生理盐水 正常 vs. 骨关节炎	
	生理盐水	洋椿苦素			生理盐水	洋椿苦素			<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
p-mTOR/mTOR	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01	12.27	0.081	1.00 ± 0.24	0.16 ± 0.11	19.03	0.005	37.92	0.001
rpS6 阳性细胞数	12.67 ± 1.53	11.33 ± 1.53	2.53	0.344	46.67 ± 3.79	15.67 ± 2.08	27.97	0.000	28.43	0.000
LC3II/LC3I	—	—	—	—	0.40 ± 0.21	10.17 ± 1.55	24.65	0.000	—	—
LC3 阳性细胞数	—	—	—	—	28.33 ± 2.52	74.67 ± 6.67	33.89	0.000	—	—

的膝关节的病理性损伤依然存在上升现象 [(0.34 ± 0.11) vs. (1.51 ± 0.47), $F=18.26$, $P=0.014$];但是,在骨关节炎中,与注射生理盐水比较,洋椿苦素则显著抑制了膝关节的病理性改变[(3.69 ± 0.63) vs. (1.51 ± 0.47), $t=8.32$, $P=0.009$],降低 50%以上(图 3B)。详细结果如图 3 所示。



F: 表面颤动;S: 浅表层细胞丢失;P: 蛋白多糖

A. 经番红 O 染色关节软骨分析洋椿苦素可降低骨关节炎的损伤



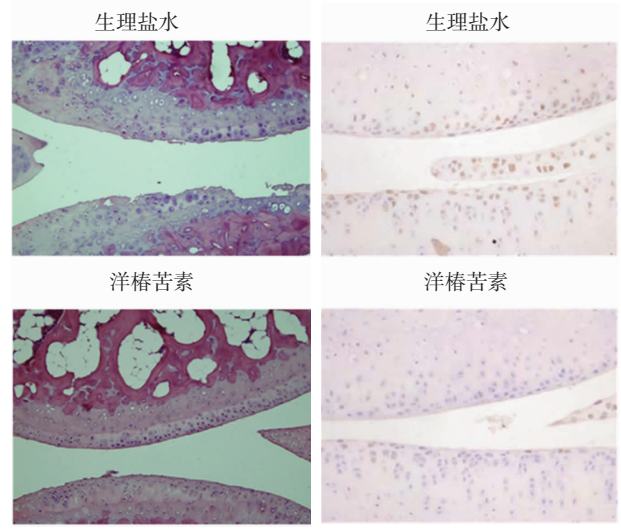
B. 半定量评分系统分析洋椿苦素降低骨关节炎中的病理性改变的统计结果

图 3 洋椿苦素降低骨关节炎的损伤

2.4 洋椿苦素通过降低 ADAMTS-5 的表达保护软骨细胞构成

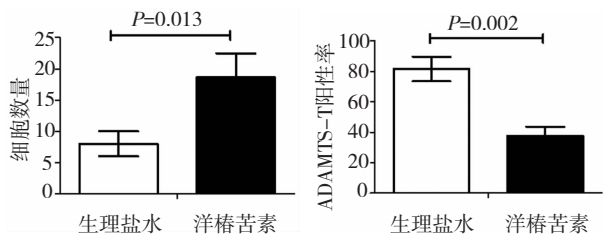
为了研究洋椿苦素对骨关节炎的保护机制,分析了小鼠膝盖中的软骨细胞密度。结果显示,在骨关节炎中,与注射生

理盐水比较,经洋椿苦素治疗后,软骨细胞的细胞数量明显上升[(8 ± 2) vs. (18.67 ± 3.79), $F=3.590$, $P=0.013$],软骨细胞得到了有效的保护(图 4A、B)。在关节软骨中,ADAMTS-5 是一种主要的降解软骨蛋白聚糖的蛋白水解酶,通过免疫组化对 ADAMTS-5 检测,结果显示,在骨关节炎模型中,与注射生理盐水比较,经洋椿苦素治疗后,ADAMTS-5 表达阳性的细胞数量明显降低[(81.67 ± 8.14) vs. (37.67 ± 6.03), $F=1.820$, $P=0.002$],ADAMTS-5 得到了有效的抑制(图 4C、D)。这些结果显示洋椿苦素可通过抑制 ADAMTS-5 的表达从而保护软骨细胞的丢失及细胞外基质的降解,进而保护软骨。详细结果如图 4 所示。



A. 经 HE 染色后分析骨关节炎中不同治疗后的细胞构成

C. 免疫组化分析 ADAMTS-5 在关节软骨中的表达情况



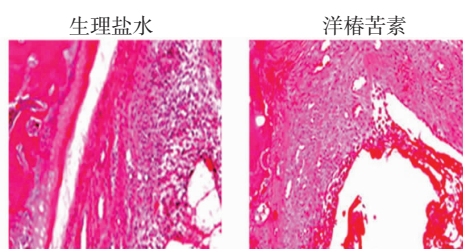
B. 洋椿苦素对骨关节炎中关节软骨细胞构成保护作用的统计结果

D. 定量分析关节软骨中 ADAMTS-5 阳性的细胞比率

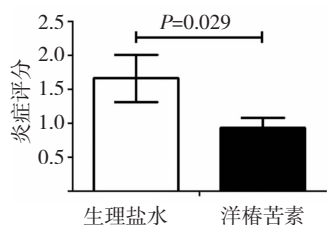
图 4 洋椿苦素降低 ADAMTS-5 表达保护软骨细胞构成

2.5 洋椿苦素抑制骨关节炎中的炎症反应

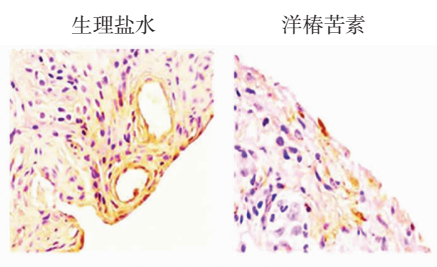
为检验洋椿苦素对骨关节炎中的炎症的影响情况,检测了滑膜组织的病理学改变,同时利用半定量炎症分级系统检测滑膜组织中的炎症反应。结果(图 5)显示,在骨关节炎中,与注射生理盐水比较,经洋椿苦素治疗后,滑膜组织中的炎症水平被显著抑制[(1.66 ± 0.35) vs. (0.93 ± 0.15), $F=5.440$, $P=0.029$]。此外,在骨关节炎中,通过对 IL-1 β 进行免疫组化检测,结果显示,与注射生理盐水比较,经洋椿苦素治疗后,IL-1 β 表达阳性的细胞数量明显降低[(43.67 ± 4.51) vs. (10.67 ± 2.52), $F=3.200$, $P=0.000$],说明滑膜组织中 IL-1 β 被有效抑制。因此,在小鼠骨关节炎中,洋椿苦素不但对关节软骨具有保护作用,同时还可通过抑制 IL-1 β 的表达而降低滑膜组织中的炎症反应。



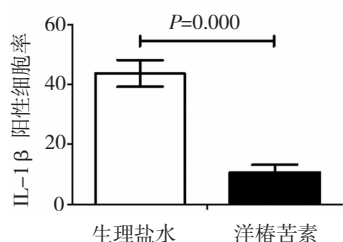
A. 在骨关节炎中,经 HE 染色滑膜组织分析洋椿苦素对骨关节炎中滑膜组织炎症的抑制作用



B. 采用炎症分级评分系统分析洋椿苦素对滑膜组织中的炎症抑制效果的统计分析结果



C. 免疫组化分析 IL-1 β 在滑膜中的表达情况



D. IL-1 β 表达阳性细胞统计结果

图 5 洋椿苦素抑制骨关节炎中的炎症反应

3 讨论

目前对于骨关节炎的发病机制已有一定程度的了解,同时对于骨关节炎的治疗也有大量的候选药物正在进行相关实验^[14]。但是,临床实验显示目前的试验药物都是高特异性的,如针对某种细胞外基质降解酶的活性寻找相应的抑制剂,但这种治疗手段并不能改善整个骨关节炎的疾病过程^[15]。最近研究对于老年化疾病的发病机制提出了新的理念,即细胞内稳态失衡机制,如细胞自噬异常,从而导致全局基因表达的改变,最终引起细胞死亡和细胞外基质的降解,而这两个现象又是骨关节炎的典型病理特征^[16]。前期研究表明,与正常情况比较,在人骨关节炎疾病和动物骨关节炎模型中,均发现自噬明显降低,同时软骨细胞死亡率增加^[17]。这些研究证据提示,在骨关节炎中,是否可通过促进自噬保护软骨组织从而降低骨关节炎的损伤程度?因此,本研究从天然化合物库中筛选出了一种新的 mTOR 抑制剂,即洋椿苦素,其对 mTOR 具有特异性抑制作用,进而激活自噬;另一方面通过下调 ADAMTS-5 和 IL-1 β 的表达,降低细胞外基质的降解及抑制炎症反应。

本研究结果显示,洋椿苦素可通过抑制 mTOR 在 Ser-2448 位点的磷酸化进而抑制 mTOR,同时还可通过抑制 mTOR 的磷酸化底物 rpS6 的 Thr-389 和 Ser-371 位点实现对 mTOR 的抑制效果;另外,洋椿苦素还可激活自噬的发生。在骨关节炎模型中,腹腔给予洋椿苦素不但可以抑制 mTOR 及其磷酸化底物 rpS6 的表达,而且还促进自噬标志蛋白 LC3II 的上调,表明腹腔给予洋椿苦素可以通过抑制关节软骨中 mTOR 的表达,从而激活自噬,保护软骨。骨关节炎模型中,通常以半定量评分系统评估骨关节炎的损伤程度^[18-19],主要指标为软骨损伤的深度和宽度,其可反映软骨细胞的丢失和细胞外基质的降解程度,我们发现腹腔给予洋椿苦素后可明显降低骨关节炎的严重程度,与单独给予生理盐水组比较降低超过 50%。为了更深地探讨洋椿苦素对于骨关节炎保护的潜在机制,本课题组检测了软骨细胞的构成和 ADAMTS-5 的表达水平,ADAMTS-5 是一种主要的软骨蛋白聚糖降解酶^[20]。在膝关节软骨中,经洋椿苦素治疗后,软骨细胞的数量明显多于单独给予生理盐水组,同时 ADAMTS-5 的表达水平也低于单独给予生理盐水组。这些结果表明,洋椿苦素可通过抑制 ADAMTS-5 的表达从而降低软骨的损

伤,保护软骨。由于人骨关节炎疾病和动物骨关节炎模型与滑膜炎反应密切相关^[21],本研究发现,洋椿苦素可明显降低滑膜炎的严重程度,其原因可能是洋椿苦素可明显降低滑膜组织中 IL-1 β 的表达,从而抑制滑膜的炎症反应,保护软骨。

在骨关节炎中,洋椿苦素降低骨关节炎的严重程度,促进自噬,抑制 ADAMTS-5 和 IL-1 β 的表达,抑制滑膜的炎症反应,保护软骨,其原因可能是因为洋椿苦素是一种 mTOR 抑制剂。mTOR 抑制剂不但可以激活自噬,而且还可以直接或间接地影响与 mTOR 相关的其他信号通路,如 PI3K/AKT 通路^[6]。在本研究中发现,在骨关节炎模型中,自噬被抑制,而洋椿苦素可恢复并激活被抑制的自噬,从而抑制软骨细胞的死亡,进而保护软骨细胞的构成。目前 mTOR 抑制剂使用最广泛的是雷帕霉素,但雷帕霉素的强免疫抑制作用限制了其在临床上的应用^[11]。本研究中发现的天然化合物洋椿苦素,不但可以作为一种新型的 mTOR 抑制剂,并且其对全身的免疫抑制要弱于雷帕霉素,同时由于其半衰期要比雷帕霉素短^[22-23],缩短了其暴露的时间,降低了毒副作用,增加了临床使用的可能性。

本研究首次发现天然化合物洋椿苦素可作为一种新型的 mTOR 抑制剂,同时在小鼠模型上验证其对关节炎具有较好的治疗效果。由于本研究使用的都是年轻的动物,为了更进一步验证其效果,还应增加年长的动物和其他动物模型,从而可以更好地模拟人骨关节炎疾病状态。

总的来说,本研究发现洋椿苦素可通过抑制 mTOR 激活自噬,保护骨关节炎中的关节软骨细胞构成,同时还可以通过抑制 ADAMTS-5 的表达保护软骨处的细胞外基质,并且通过抑制 IL-1 β 的表达抑制滑膜的炎症反应。本研究结果给洋椿苦素在骨关节炎临床治疗中的应用提供了很好的前期实验依据,为骨关节炎的治疗提供了新的潜在候选药物,具有重要的临床意义。

参 考 文 献

[1] 向珍蛭,茅建春,曲环汝,等. 浦东上钢社区中老年人群膝骨关节炎危险因素流行病学研究[J]. 上海交通大学学报:医学版,2013,33(3):318-322.
[2] Jiang Y, Tuan RS. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(4):206-212.
[3] Roos EM, Arden NK. Strategies for the prevention of knee osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(2):92-101.
[4] Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and au-

tophagy[J]. FEBS J, 2015, 282(22):4279-4288.
[5] Wang S, Xia P, Rehm M, et al. Autophagy and cell reprogramming[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(9):1699-1713.
[6] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1):25-32.
[7] Gopalakrishnan G, Pradeep Singh ND, Kasinath V, et al. Photooxidation of cedrelone, a tetranortriterpenoid from *Toona ciliata*[J]. Photochem Photobiol, 2000, 72(4):464-466.
[8] Casal CM, Choosang K, Severino VG, et al. Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell line[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2010, 10(10):769-776.
[9] Ji KL, Zhang P, Li XN, et al. Cytotoxic limonoids from *Trichilia americana* leaves[J]. Phytochemistry, 2015, 118:61-67.
[10] Zhang Y, Vasheghani F, Li YH, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(7):1432-1440.
[11] Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects[J]. Cell Metab, 2014, 19(3):373-379.
[12] Zhang M, Mani SB, He Y, et al. Induced superficial chondrocyte death reduces catabolic cartilage damage in murine posttraumatic osteoarthritis[J]. J Clin Invest, 2016, 126(8):2893-2902.
[13] Yahara Y, Takemori H, Okada M, et al. Pterisin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting Sik3[J]. Nat Commun, 2016, 7:10959.
[14] Bijlsma JW, Berenbaum F, Lefeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice[J]. Lancet, 2011, 377(9783):2115-2126.
[15] Hartmann K, Koenen M, Schauer S, et al. Molecular actions of glucocorticoids in cartilage and bone during health, disease, and steroid therapy[J]. Physiol Rev, 2016, 96(2):409-447.
[16] Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(7):412-420.
[17] Huang ZM, Du SH, Huang LG, et al. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(7):1246-1253.
[18] 段鑫, 李奇, 林荔军, 等. 骨关节炎滑膜组织中缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子的表达[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(1):117-120.
[19] 巫桁鏊, 李荣亨, 钟玉. 复元胶囊对兔膝关节滑膜 IL-1 β 、MMP-13 及 iNOS 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(7):1004-1009.
[20] Ji Q, Xu X, Zhang Q, et al. The IL-1 β /AP-1/miR-30a/ADAMTS-5 axis regulates cartilage matrix degradation in human osteoarthritis[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(7):771-785.
[21] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991):376-387.
[22] Ji KL, Zhang P, Li XN, et al. Cytotoxic limonoids from *Trichilia americana* leaves[J]. Phytochemistry, 2015, 118:61-67.
[23] Mudumba S, Bezawada P, Takanaga H, et al. Tolerability and pharmacokinetics of intravitreal sirolimus[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2012, 28(5):507-514.

(责任编辑:张学颖)