

# 白藜芦醇对软骨细胞去分化现象的作用机制

陈文杰<sup>1,2</sup>, 耿书国<sup>3</sup>, 殷嫦嫦<sup>4</sup>, 李忠友<sup>1,2</sup>, 殷明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南昌大学第二附属医院骨科; <sup>2</sup>南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006;

<sup>3</sup>九江市武宁县人民医院, 九江 332300; <sup>4</sup>九江学院 九江市转化医学重点实验室, 九江 332000

**摘要:** 该实验观察白藜芦醇(Resveratrol, Resv)对兔关节软骨细胞去分化现象的作用并探讨其可能的机制。首先, 在无菌条件下取4周龄兔关节软骨细胞, 行软骨细胞鉴定后将细胞随机分成5组: 空白组、0  $\mu\text{mol/L}$  Resv组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv组、5  $\mu\text{mol/L}$  Resv组和10  $\mu\text{mol/L}$  Resv, 体外单层培养传代至第5代。分别取P1、P3、P5代细胞在倒置相差显微镜下观察细胞形态变化, 倒置相差显微镜下观察到各组P1代软骨细胞形态基本一致, P3、P5代2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv组细胞形态变化不大, 其余各组细胞出现胞体变大, 胞浆变淡, 镜下胞核不明显等衰老的形态变化; Alcian Blue染色检测蛋白聚糖(Aggregan)含量和 $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测衰老软骨细胞, 各组P1代细胞Alcian Blue染色和 $\beta$ -半乳糖苷酶染色无明显差别, P3、P5代2.5  $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组较其他组明显深染, 衰老软骨细胞数明显减少; RT-PCR检测蛋白多糖(Aggregan), 沉默信息调节因子1(SIRT1), 抑癌基因p53、p21以及P16的表达, 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv组的Aggregan和SIRT1基因表达明显上调, P53、P21及P16基因表达显著下调。综上所述: 低浓度白藜芦醇(2.5  $\mu\text{mol/L}$ )可能通过上调SIRT1, 下调P53、P21、P16基因的表达抑制软骨细胞去分化的现象。

**关键词:** 白藜芦醇; 软骨细胞; SIRT1; 衰老; 去分化

中图分类号: R681.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.002

## Possible Mechanism of Resveratrol on Dedifferentiation of Chondrocyte

CHEN Wen-jie<sup>1,2</sup>, GENG Shu-guo<sup>3</sup>, YIN Chang-chang<sup>4</sup>, LI Zhong-you<sup>1,2</sup>, YIN Ming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of orthopedics, The Second Hospital Affiliated of Nanchang University;

<sup>2</sup>Medicine School of Graduate Center, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

<sup>3</sup>Wuning County People's Hospital, Jiujiang 332300, China;

<sup>4</sup>Jiujiang Key Laboratory of Translational Medicine, Jiujiang College, Jiujiang 332000, China

**Abstract:** In this study, the role of resveratrol on dedifferentiation of rat chondrocyte and its possible mechanism were investigated. Cartilage cells was harvested under sterile conditions from normal rabbit's joint of 4-weeks old rabbit and was then identified. The experiment were randomly divided into five groups: control group, 0  $\mu\text{mol/L}$  Resv group, 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group, 5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group and 10  $\mu\text{mol/L}$  group. The rabbit articular chondrocytes were subcultured *in vitro* to the 5th generation (named P1-P5). Inverted microscope was used to observe cell morphology at 1, 3 and 5 generation respectively. The results indicated that the morphology at passage 1 chondrocytes were similar. The morphology of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group at passage 3 and 5 were nearly the same with passage 1, but other groups became enlarged, cytoplasmic stained light and the nucleus were not obvious; Alcian Blue staining was used to observe the changes of Proteoglycans. The results of Alcian Blue staining showed that the poly polysaccharide protein expression of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group were higher than other groups;  $\beta$ -galactosidase staining were used to identify the ageing cells. The results showed that the number of aging cells of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group was lower than other groups. RT-PCR were adopted to detect the RNA expression level of Aggregan gene, SIRT1 gene, p53 gene, p21 gene and P16 gene. RT-PCR analysis showed that SIRT1 gene of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv was significantly upregulated, and P53, P21 and P16 gene was downregulated. In conclusion, this experiment showed that 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv can inhibit the dedifferentiation of chondrocytes via upregulating

expression of SIRT1 gene and downregulating expression of P53, P21 and P16.

**Key words:** resveratrol; chondrocyte; SIRT1; aging; dedifferentiation

收稿日期: 2016-09-21 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(81160226)

\* 通讯作者 Tel: 86-791-8698917; E-mail: yinming0791@aliyun.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的运动系统退行性疾病,其发病机制主要是由于关节软骨细胞的合成代谢能力随着年龄的增加而逐渐下降,不能有效的合成软骨基质<sup>[1]</sup>。软骨细胞常作为软骨组织修复的重要种子细胞,但是体外培养的传代次数有限且易出现去分化现象<sup>[2]</sup>,限制了其在组织工程以及临床的应用。沉默信息调节因子1(SIRT1)相关酶类在调控P53信号通路以及调节细胞应激反应中发挥关键作用,对抑制细胞衰老、延长细胞寿命,抑制凋亡及抗氧化应激均有积极的基因调控作用<sup>[3,4]</sup>。P53作用增强,可诱导细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子(CDKI)P21和P16等转录增强,进而使细胞在G1期出现生长停滞,阻碍细胞进入分裂状态<sup>[3]</sup>。白藜芦醇(Res)是天然的SIRT1激活剂<sup>[5]</sup>,笔者推测软骨细胞去分化过程与软骨细胞老化密切相关,在体外培养的条件下,Resv可使SIRT1表达增加,进而抑制P53信号通路以延缓细胞老化进程,进而抑制软骨细胞去分化现象的产生。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

4周龄日本大耳兔,体重约500g,雌雄不限,由南昌大学实验动物中心提供。白藜芦醇(美国Sigma)、0.2%Ⅱ型胶原酶(solarbio)、0.25%胰蛋白酶(Gibco)、DMEM/F12培养基(Hyclone)、胎牛血清(Gibco)、Alcian Blue(solarbio)、细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天)、HiFi-MMLV cDNA逆转录试剂盒(康为世纪)、引物合成(上海生工生物工程)、GREENspin细胞RNA快速提取试剂盒(庄盟生物)、2×Taq Master Mix(欣百诺)。

### 1.2 实验仪器

倒置相差显微镜(日本NIKON公司);CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国SIM公司);PCR基因扩增仪(西安天隆科技有限公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);恒温振荡器(上海苏坤实业有限公司);CO<sub>2</sub>恒温水浴箱(SIM公司);超速离心机(Sigma公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 软骨细胞的分离培养及鉴定

将实验动物以耳缘静脉注射空气处死后以75%酒精浸泡30min,分离髌关节软骨,将其剪碎至1mm<sup>3</sup>大小,PBS液冲洗3次。加入20mL0.25%胰蛋白酶,37℃消化30min。弃胰蛋白酶,0.2%Ⅱ

型胶原酶消化6h。收集消化所得细胞用DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清,青链霉素各100U/mL)重悬后接种于培养瓶中,置入5%CO<sub>2</sub>,37℃培养箱培养。3d后首次换液,之后隔天换液。待原代细胞铺满瓶底80%时进行细胞形态学观察和Alcian Blue染色进行软骨细胞鉴定。

### 2.2 实验分组

待细胞传至P1代时接种于6孔板,分为空白组,0 $\mu$ mol/L Resv组,2.5 $\mu$ mol/L Resv组,5 $\mu$ mol/L Resv组,10 $\mu$ mol/L Resv组,一直传至P5代。待P1、P3、P5代软骨细胞铺满瓶底80%时倒置相差显微镜观察细胞形态。

### 2.3 蛋白聚糖 Alcian Blue 染色

待P1、P3、P5代细胞铺满80%以上时行Alcian Blue染色:吸出旧培养液,温PBS液漂洗3次,5min/次;4%多聚甲醛室温固定30min,温PBS液漂洗3次;0.1%浓盐酸溶液浸洗5min使pH降至1.0;1%Alcian Blue染色过夜;0.1%浓盐酸漂洗3次,5min/次,镜下观察细胞染色情况。

### 2.4 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

待P1、P3、P5代细胞铺满80%以上时行染色。使用试剂盒中 $\beta$ -半乳糖苷酶的固定液在室温下固定15min。PBS清洗3遍,使用 $\beta$ -半乳糖苷酶染液染色12h。染色后在倒置显微镜下观察细胞染色情况。

### 2.5 RT-PCR 检测软骨细胞各代衰老相关基因的表达水平

分别取P1、3、5代经不同浓度Resv培养7d后的6孔板,按GREENspin细胞RNA快速提取试剂盒说明提取细胞总RNA;按HiFi Script快速去基因组cDNA第一链合成试剂盒说明将RNA逆转录成cDNA,按2×Taq Master Mix说明进行扩增。PCR扩增反应体系:cDNA 1 $\mu$ L、上游和下游引物各1 $\mu$ L、2×Master Mix 12.5 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 9.5 $\mu$ L,总反应体系25 $\mu$ L。扩增后产物用1%琼脂糖凝胶电泳25min左右。SIM凝胶成像系统拍照并分析条带灰度值。内参为GAPDH,目的基因为:SIRT1、Aggrecan、P53、P21、P16。扩增条件如下:94℃预变性4min,然后依次“94℃变性30s、62℃退火30s、72℃延伸45s”循环,共扩增循环32次,72℃检测信号。引物序列和产物大小见表1。

### 2.6 统计学处理

所有试验均重复至少3次,采用SPSS 19.0统

表 1 RT-PCR 引物序列  
Table 1 Sequences of primers

Gene	Primer nucleotide sequence( 5'-3')	Product size(bp)
GAPDH	F-AAGGCCATCACCATCTTCCA R-GGATGCGTTGCTGACAATCT	240
Aggrecan	F-GCTACGGAGACAAGGATGAGTTC R-CGTAAAAGACCTCACCTCCAT	114
SIRT1	F-CCAGATCCTCAAGCCATGT R-TTGGATTCTGCAACCTG	201
P16	F-GCAGAAGGGACTGACAATGG R-AGGATTTGGGAAACAGACGA	125
P21	F-TCTCCAAGAGGAAGCCGTAA R-CACACAAACTGAAGGGCAGA	117
P53	F-CGAGTTGGTCTGACTGTA R-TCTGATGATGGTGAGGATGG	100

计软件进行试验数据分析,数据均以  $x \pm s$  的形式表示。计数资料两样本间率的比较采用  $\chi^2$  检验,检验水平  $\alpha = 0.05$ ,组间比较采用单因素方差分析。

### 3 实验结果

#### 3.1 软骨细胞的鉴定

倒置相差显微镜下观察细胞贴壁前为圆球形,呈悬浮状态;3 d 开始贴壁,呈三角形、椭圆形生长;之后细胞逐渐增殖,6 d 即可铺满瓶底达 80% ~

100%, Alcian Blue 染色将细胞染成浅蓝色,这说明细胞中含有丰富的蛋白多糖,并主要分布在细胞核周围,上述结果证明该细胞为能分泌蛋白多糖的关节软骨细胞,见图 1。

#### 3.2 各代各组软骨细胞形态学及蛋白聚糖含量观察

##### 3.2.1 细胞形态观察

如图 2 所示,P1 代(A1-A5)时,各组细胞形态基本一致;P3 代(B1-B5)时,空白组、0  $\mu\text{mol/L}$  Resv

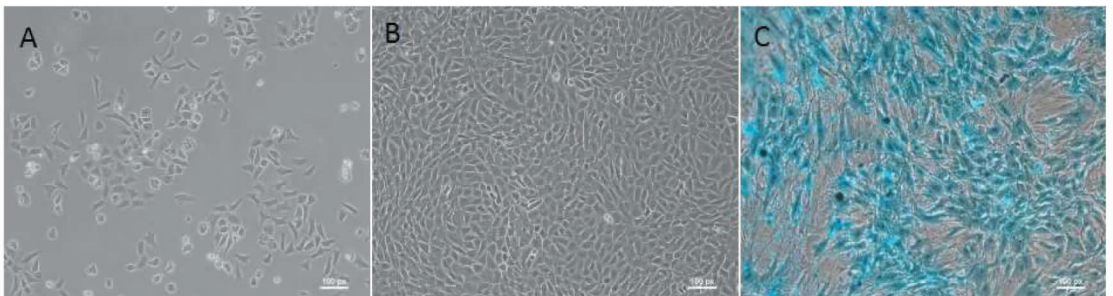


图 1 兔软骨细胞原代培养 3 d(A)、6 d(B) 及原代兔软骨细胞 Alcian Blue 染色 6 d(C) ( $\times 100$ )

Fig. 1 Cellular morphology observation of primary rabbit Chondrocyte cultured for 3 days (A), primary rabbit Chondrocyte cultured for 6 days (B) and Alcian Blue dyeing (C) ( $\times 100$ )

组、10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 细胞形态逐渐变大,胞浆变淡;而 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组软骨细胞形态上较原代相比变化不大,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组软骨细胞在形态上相对于空白组亦呈现出相应变化;P5 代(C1-C5)时,明显观察到空白组、0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组软骨细胞形态明显呈现出胞体变大,胞浆变淡,镜下胞核不明显等衰老形态,而 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组细胞形态依然呈现出原代时的形态。表明 Resv 一定浓度范围可以抑制软骨细胞

衰老去分化,维持软骨细胞形态。

##### 3.2.2 蛋白聚糖含量观察

如图 3 所示,P1 代(A1-A5)软骨细胞 Alcian Blue 染色无明显差别;P3 代(B1-B5),空白组、0  $\mu\text{mol/mL}$  Resv 组、5  $\mu\text{mol/mL}$  Resv 组、10  $\mu\text{mol/mL}$  Resv 组细胞 Alcian Blue 染色开始变淡,表明软骨细胞合成蛋白聚糖开始减少,而 2.5  $\mu\text{mol/mL}$  Resv 组变化不明显;P5 代(C1-C5)各组细胞染色均明显变淡。

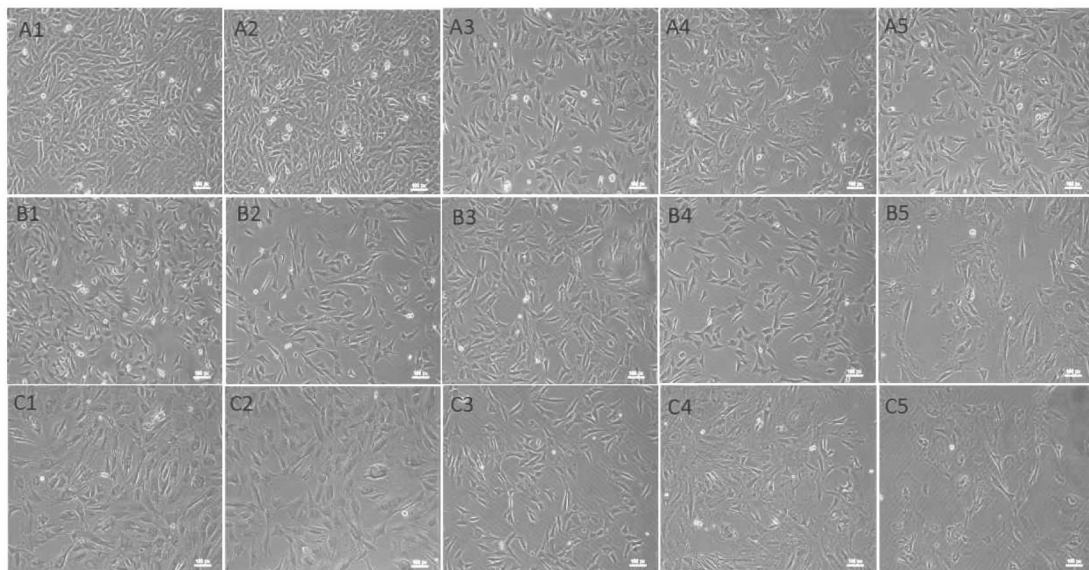


图2 各代各组软骨细胞形态学观察

Fig. 2 cellular morphology observation of rabbit Chondrocyte of each group

注:1,2,3,4,5 分别代表空白组、0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组;A、B、C 分别代表 P1、P3、P5 代 ( $\times 100$ )

Note:1,2,3,4,5 represented control group,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group and 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv group respectively;A,B and C represented P1,P3 and P5 generation ( $\times 100$ )

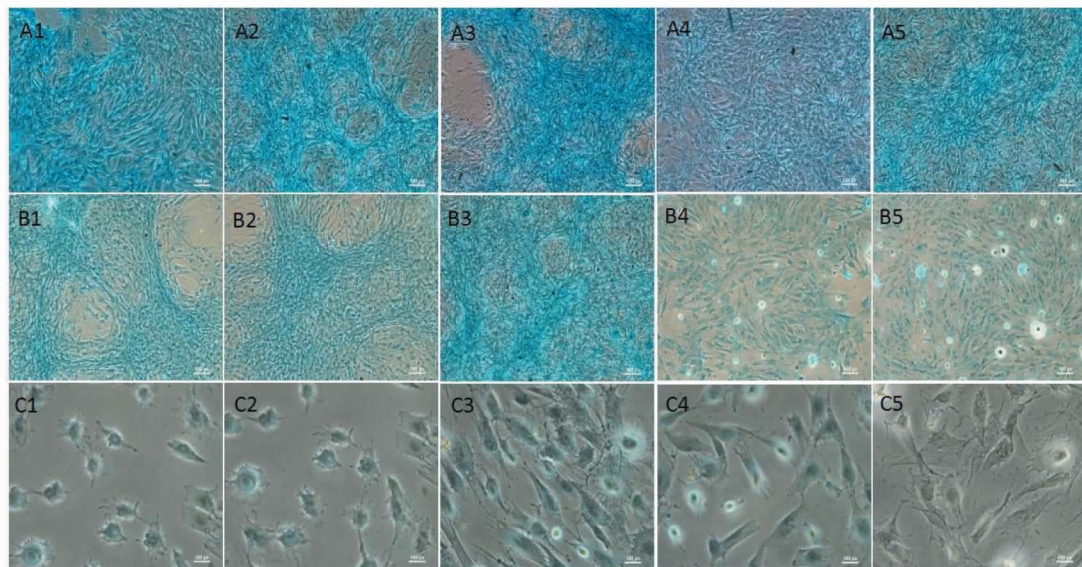


图3 各代各组软骨细胞 Alcian Blue 染色

Fig. 3 Alcian Blue dyeing of rabbit chondrocytes of each group

注:1,2,3,4,5 分别代表空白组、0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组、10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组;A、B、C 分别代表 P1、P3、P5 代 ( $\times 100$ )

Note:1,2,3,4 and 5 represented control group,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group and 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv group respectively;A,B and C represented P1,P3 and P5 generation ( $\times 100$ )

### 3.3 各组各代软骨细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

如图4所示,P1代(A1-A5)各组细胞几乎无蓝

染的衰老细胞,各组无明显差别;P3代(B1-B5),各组开始出现少许蓝染的衰老细胞,以5  $\mu\text{mol/L}$  Resv

组、10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组较多;P5 代(C1-C5),2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组可见少许边缘独立的肥大蓝染衰老细胞,其他各组均有大量蓝染衰老细胞,且蓝染的衰

老细胞体积变大,形态不规则,大多独立生长,细胞与细胞之间失去联系。

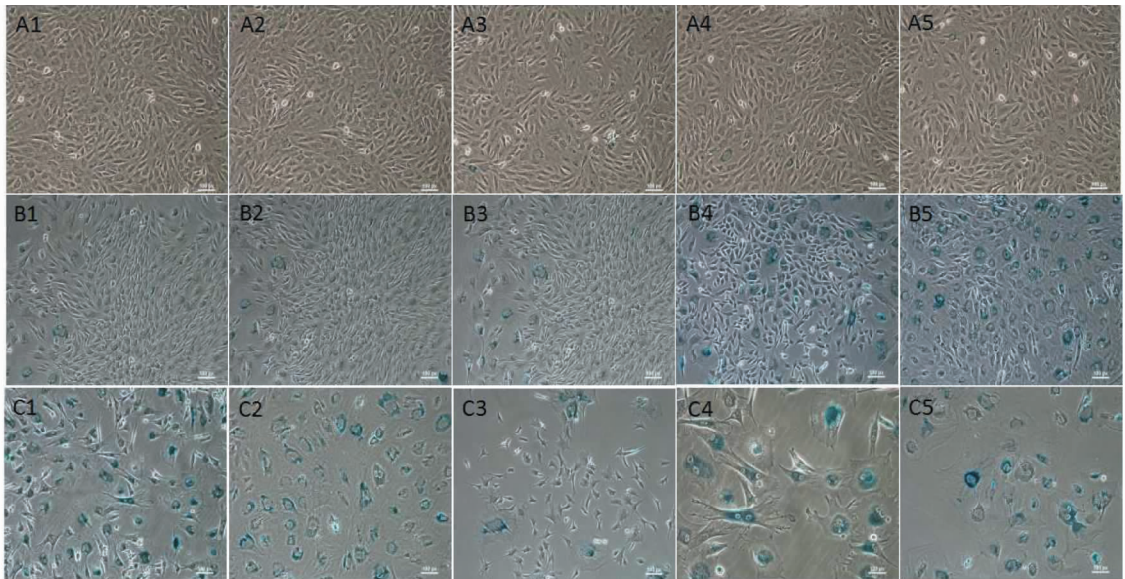


图4 各代各组软骨细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

Fig. 4 Senescence  $\beta$ -Galactosidase staining of rabbit chondrocytes of each group

注:1,2,3,4,5 分别代表空白组,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组;A、B、C 分别代表 P1、P3、P5 代( $\times 100$ )

Note:1,2,3,4 and 5 represented control group,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group and 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv group respectively;A,B and C represented P1,P3 and P5 generation ( $\times 100$ )

### 3.4 RT-PCR 结果

P1 代时,与空白组相比,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组和 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组软骨标记基因蛋白聚糖 Aggrecan 表达增高( $P < 0.05$ ),相反,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组及 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 Aggrecan 基因明显降低( $P < 0.05$ );与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组及 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 Aggrecan 基因均明显降低( $P < 0.05$ ),且随着浓度升高,表达量呈降低趋势。与空白组比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 SIRT1 基因表达明显增高( $P < 0.05$ ),其余各组之间无明显差异( $P > 0.05$ )。P16、P21、P53 基因的表达各组之间无明显差异( $P > 0.05$ ) (见图 5)。

P3 代时,与空白组相比,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 Aggrecan 基因表达无明显差异( $P > 0.05$ ),2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 Aggrecan 基因表达增高( $P < 0.05$ ),5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组及 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 Aggrecan 基因明显降低( $P < 0.05$ );与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,各组 Aggrecan 基因表达则明显下降( $P < 0.05$ )。与空白组比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 SIRT1 基因表达明显

增高( $P < 0.05$ ),10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 SIRT1 基因表达明显降低( $P < 0.05$ );相比于 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,各组 SIRT1 基因表达则明显降低( $P < 0.05$ ),且表现出浓度越高,基因表达越低的趋势。与空白组比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 P16、P21 及 P53 基因表达明显降低( $P < 0.05$ );与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,0  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组,5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组及 10  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 P16、P21 及 P53 基因表达明显增高( $P < 0.05$ ) (见图 6)。

P5 代,与空白组比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组软骨标记基因聚集蛋白聚糖 Aggrecan 基因表达则明显增高( $P < 0.05$ ),其余各组未见明显变化( $P > 0.05$ );与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,其他各组 Aggrecan 基因表达明显降低( $P < 0.05$ )。与空白组相比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 SIRT1 基因表达则明显升高( $P < 0.05$ );与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,其他各组 SIRT1 基因表达均明显降低( $P < 0.05$ ),且表现为浓度越高,表达水平越低。与空白组比,2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组 P16、P21 及 P53 基因表达明显降低( $P < 0.05$ );

而与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比,其他各组 P16、P21

及 P53 基因表达均明显增高( $P < 0.05$ ) (见图 7)。

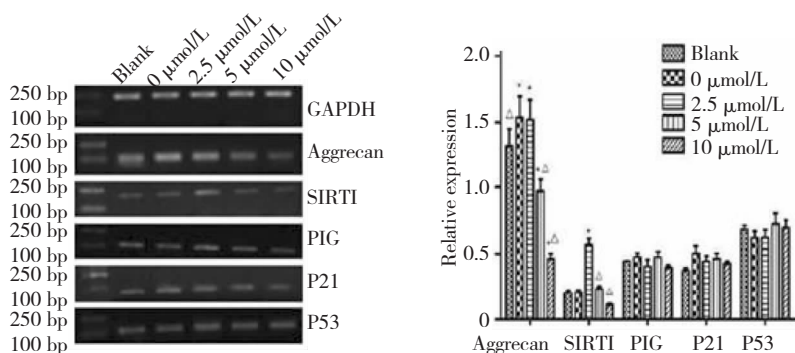


图 5 P1 代经不同浓度 Resv 培养的兔软骨细胞相关基因表达情况

Fig. 5 Related relative gene expression level of rabbit chondrocytes treated with different concentrations of Resv in P1 generation

注:(A)电泳图;(B)RT-PCR 检测 Aggreacan、SIRT1、P16、P21、P53 基因表达水平分析结果。 $* P < 0.05$ ,与空白相比; $\Delta P < 0.05$ ,与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比

Note:(A) electrophoresis;(B) Aggreacan, SIRT1, P16, P21 and P53 gene relative expression analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction.  $* P < 0.05$ , vs blank;  $\Delta P < 0.05$ , vs 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group

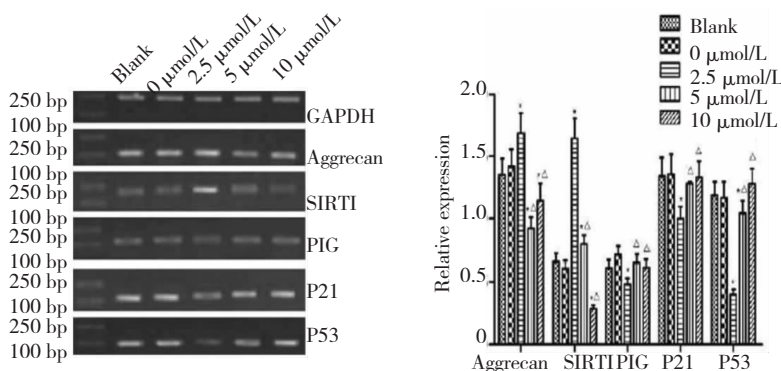


图 6 P3 代经不同浓度 Resv 培养的兔软骨细胞相关基因表达情况

Fig. 6 Related relative gene expression level of rabbit chondrocytes treated with different concentrations of Resv in P3 generation

注:(A)电泳图;(B)RT-PCR 检测 Aggreacan、SIRT1、P16、P21、P53 基因表达水平分析结果。 $* P < 0.05$ ,与空白相比; $\Delta P < 0.05$ ,与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比

Note:(A) electrophoresis;(B) Aggreacan, SIRT1, P16, P21 and P53 gene relative expression analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction.  $* P < 0.05$ , vs blank;  $\Delta P < 0.05$ , vs 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group

## 4 讨论与结论

关节软骨组织工程研究中软骨细胞去分化现象是软骨细胞移植治疗关节软骨疾病的瓶颈,了解去分化机制能促进软骨组织工程研究进一步发展,寻找干预软骨细胞去分化的基因靶点,将会推动软骨组织工程进一步发展。

细胞老化即细胞衰老,是一种细胞失去分裂能力而出现周期阻滞、形态改变的现象。多种信号转导通路,如、沉默信息调节因子 2 同源蛋白(SIRT)、DNA 损伤应答和 P53 等对细胞老化有调节作用<sup>[6]</sup>。

有研究表明在体内缺乏端粒酶的情况下,细胞连续分裂将使端粒不断缩短,而这种端粒的缩短最终将激活衰老应激的分子通路(如 P53 应激通路),导致细胞进入衰老状态,DNA 损伤与 P53 密切相关,DNA 损伤程度大于修复程度,即触发细胞老化及凋亡<sup>[7]</sup>。陆峻泓等<sup>[8]</sup>研究发现,软骨细胞去分化过程伴随凋亡抑制基因及控制细胞分裂的端粒酶表达下降,这提示软骨细胞去分化与软骨细胞老化密切相关。SIRT1 是哺乳动物 Sirt 家族中了解最多的,其调控衰老的机制可归纳为:抑制细胞凋亡,调控新陈代谢(热量消耗、脂肪贮存等),维持氧化应力下线

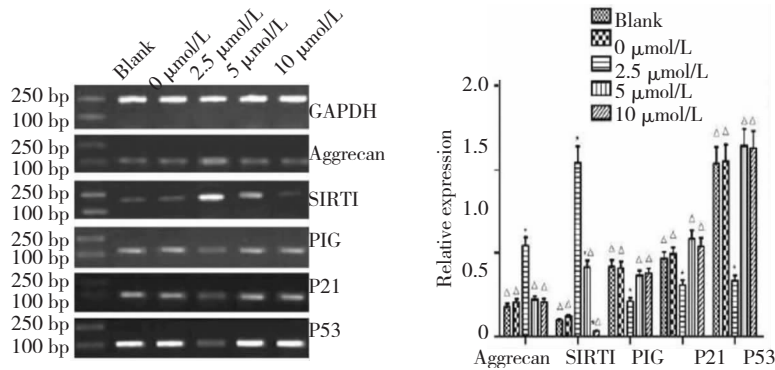


图7 P5代经不同浓度 Resv 培养的兔软骨细胞相关基因表达情况

Fig. 7 Related relative gene expression level of rabbit chondrocytes treated with different concentrations of Resv in P5 generation

注: (A) 电泳图; (B) RT-PCR 检测 Aggrecan, SIRT1, P16, P21, P53 基因表达水平分析结果。\*  $P < 0.05$ , 与空白相比;  $\Delta P < 0.05$ , 与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 组相比

Note: (A) electrophoresis; (B) Aggrecan, SIRT1, P16, P21 and P53 gene relative expression analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction. \*  $P < 0.05$ , vs blank;  $\Delta P < 0.05$ , vs 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv group

粒体的正常功能以及抑制炎症等多个方面<sup>[9]</sup>。研究发现 Resv 能激活 SIRT1 防止骨关节炎的进程。P53 作为抑癌基因是最早发现的 SIRT1 生理性底物,与细胞凋亡及肿瘤的发生有着密不可分的关系,在衰老的过程中 P53 通路亦被活化,SIRT1 能使 P53 蛋白去乙酰化并下调其表达。动物 OA 模型中的研究发现,白藜芦醇可降低软骨细胞凋亡数及 NO 诱导的滑膜炎水平<sup>[10]</sup>。这些研究均显示,SIRT1 的表达、活性与软骨细胞表型和凋亡密切相关。然而,Resv 激活 Sirt1、调控抑癌基因从而抑制软骨细胞去分化的相关报道不多。

白藜芦醇是一种广泛分布于葡萄皮、花生、虎杖等天然植物中的非黄酮类多酚化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗血小板聚集等多种药理活性<sup>[11]</sup>。古丽丽<sup>[12]</sup>等研究表明 Resv 在低浓度(1~10  $\mu\text{mol/L}$ )时对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HUVECs 凋亡具有抑制作用,而在高浓度时不仅没有起到保护作用,反而增强了  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HUVECs 凋亡。Chan 等<sup>[13]</sup>研究发现,Resv 在高浓度(100~200  $\mu\text{mol/L}$ )时,可以进一步提高乙醇诱导的 K562 细胞内活性氧的水平,而低浓度时却无此效应。本实验研究发现 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 具有抑制软骨细胞去分化的作用,以 P5 代细胞效果最显著,能维持软骨细胞的功能,上调软骨特异基因 Aggrecan 及抗衰老基因 SIRT1 的表达,下调抑癌基因 P53、P21、P16 的表达。随着细胞传代数的增加,低浓度白藜芦醇组(2.5  $\mu\text{mol/L}$ )较对照组及高浓度组(5  $\mu\text{mol/L}$  组和 10  $\mu\text{mol/L}$  组)能明显上调 SIRT1 基因;对照组及高浓度组 P53 等衰老基

因表达明显增加,与细胞形态的变化同步,而低浓度组(2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv)可明显下调 P53 等衰老调节基因的表达。这说明,在一定浓度剂量 Resv 作用下能抑制软骨细胞去分化,随着 Resv 浓度的提高,其抑制作用下降。

Aggrecan 广泛存在于胞间和胞外基质中,是一种结构复杂的生物大分子。研究表明体外培养软骨细胞 Aggrecan 光密度比值在第 4 代开始显著减少,与第 4 代软骨细胞回植体内较难形成完整的软骨组织相对应<sup>[14]</sup>。本实验发现 2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Resv 对软骨细胞合成 Aggrecan 的功能有显著促进作用,而升至 5  $\mu\text{mol/L}$  时其促进作用反而下降。2.5  $\mu\text{mol/L}$  Resv 能促进软骨细胞外基质 Aggrecan 蛋白表达,阻抑软骨细胞外基质的降解,抑制软骨细胞的衰老,进而延缓软骨损伤与关节退变程度。

综上所述,低浓度白藜芦醇(2.5  $\mu\text{mol/L}$ )能上调抗衰老基因 SIRT1 和软骨特异基因 Aggrecan 的表达,下调 P53 等衰老调节基因的表达,从而抑制软骨细胞衰老,进而抑制软骨细胞去分化,维持软骨细胞正常功能,为软骨细胞的体外扩增奠定了一定的实验基础。

#### 参考文献

- Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F, et al. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol Series A: Biol Sci Med Sci*, 2004, 59: B324-B336.