

胞的增殖和凋亡。

MAPKs 是一组信号分子, 包括 p38、MAPK、ERK 和 JNK^[13], 是炎症信号传导中不可或缺的环节, 对 MAPKs 通路的靶向调节可以减轻炎症情况下多种疾病(癌症、自身免疫性疾病和传染病等)的进展^[13]。就机制而言, MAPKs 的激活是信号级联反应的一部分, 该级联反应取决于细胞内上下游分子的磷酸化。一旦在细胞质中激活, MAPKs 就会与锚定蛋白解离, 并迅速易位到细胞核中, 通过参与该细胞事件的蛋白质的磷酸化来调节转录, 通过这种方式, JNK、ERK 和 p38 转录因子被激活, ERK、JNK 和 p38 之间在不同的水平和细胞环境中串扰。p38 直接或通过蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 的活性下调 ERK 信号传导, 而 ERK 对体外和体内 JNK 活化有拮抗作用。PI3K 和 MAPK 的串扰可以在不同的步骤发生。在起始水平, PI3K 诱导的 PIP3 将支架蛋白募集到质膜, 诱导生长因子受体结合蛋白-鸟苷酸交换因子复合体 (Grb2-SOS) 重新定位到膜上, 从而增加肾素-血管紧张素系统 (RAS) 活化, 在中间级联水平上, Akt 能够磷酸化并抑制属于 JNK 的促分裂原活化的蛋白激酶的激酶 (MAPKKK) 上游激活的凋亡信号调节激酶 (ASK1) 和磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (MLK3) 的活性, 最终效果是减少 ASK1 和 MLK3 介导的细胞死亡^[14]。本文结果中, 与对照组相比, 苦参碱组的 p-ERK、p-JNK、p-p38 的相对表达量均减少; 与苦参碱组相比, 苦参碱+shMS4A8 组的 p-ERK、p-JNK、p-p38 的相对表达量均更少。这表明苦参碱和干扰 MS4A8 后可以调节 MAPKs 通路, 产生相应的细胞因子, 从而影响胃癌细胞的生物学功能。

总之, 这些结果表明苦参碱通过 MS4A8 调控 PI3K-Akt-mTOR 和 MAPKs 信号通路来抑制细胞增殖和细胞克隆数形成, 增加细胞凋亡。这一发现为苦参碱抑制胃癌生长提供了新的理解角度, 为苦参碱治疗胃癌术后症状提供了理论基础。PI3K-Akt-mTOR 和 MAPKs 信号通路还参与细胞内质网应激和自噬反应, 苦参碱是否通过参与自噬反应来调控胃癌细胞的凋亡还需要进一步证明。

参考文献

- [1] Ajani J A, D'Amico T A, Bentrem D J, et al. Gastric Cancer, Version 2. 2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20 (2): 167-192.
- [2] Hu H F, Wang Z, Tang W L, et al. Effects of Sophora flavescens aiton and the absorbed bioactive metabolite matrine indi-

vidually and in combination with 5-fluorouracil on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells in nude mice [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1047507.

- [3] 鄢传经, 胡清林, 严海, 等. 共表达网络分析揭示新型生物标志物在胃腺癌患者生存预后中的应用价值 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28 (6): 637-643.
- [4] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Redox Biol, 2019, 23: 101-107.
- [5] Chang Y W, Chen M W, Chiu C F, et al. Arsenic trioxide inhibits CXCR4-mediated metastasis by interfering miR-520h/PP2A/NF-kappaB signaling in cervical cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21 (Suppl 4): s687-s695.
- [6] Li C, Zhang Y, Liu J, et al. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death [J]. Autophagy, 2021, 17 (4): 948-960.
- [7] Bai Y, Meng L, Han L, et al. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508 (4): 997-1003.
- [8] He L, Deng H Y, C Wang X. Decreased expression of MS4A12 inhibits differentiation and predicts early stage survival in colon cancer [J]. Neoplasma, 2017, 64 (1): 65-73.
- [9] Li S, Zhan Y L, Xie Y W, et al. The impact of icarisside II on human prostate cancer cell proliferation, mobility, and autophagy via pi3k-akt-mtor signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 4169-4178.
- [10] Roudsari N M, Lashgari N A, Momtaz S, et al. Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Prostate Cancer Chemoprevention and Intervention [J]. Pharmaceutics, 2021, 13 (8): 3-15.
- [11] Liu S Y, Li X, Lin Z M, et al. SEC-induced activation of ANXA7 GTPase suppresses prostate cancer metastasis [J]. Cancer Lett, 2018, 416: 11-23.
- [12] Peng Y, Wang Y Y, Zhou C, et al. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? [J]. Front Oncol, 2022, 12: 819128.
- [13] Tong W, Chen X, Song X, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4-NF-kappaB/MAPKs/IRF3 [J]. Exp Ther Med, 2020, 19 (3): 1824-1834.
- [14] Osaki L H, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (5): 10143-10161.

• 基础研究 •

白芦藜醇对牙周炎大鼠 OPG/RANKL/RANK 信号通路的影响

福州鼓楼维乐口腔门诊部 (福州 350001) 魏晓波

【摘要】目的 考察白芦藜醇 (Resveratrol, RSV) 对牙周炎大鼠骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) /核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) /核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) (OPG/RANKL/RANK) 信号通路相关蛋白的影响。**方法** 采用不同浓度的 RSV 对牙周炎大鼠进行干预, 采用

RT-PCR 和 Western blot 分别检测牙周组织细胞 OPG、RANKL、IL-1、IL-6、TNF- α 和基质金属蛋白酶 8 (matrix metalloproteinase 8, MMP-8) 的 mRNA 水平和蛋白表达水平。结果 牙周炎模型组大鼠牙周组织中 OPG、RANKL、IL-1、IL-6、TNF- α 和 MMP-8 的 mRNA 表达强度和蛋白水平高于空白对照组 ($P < 0.05$), RSV 低剂量组、RSV 中剂量组、RSV 高剂量组则依次低于牙周炎模型组 ($P < 0.05$)。结论 RSV 可以降低牙周炎大鼠牙周组织中 OPG、RANKL、IL-1、IL-6、TNF- α 和 MMP-8 的 mRNA 和蛋白表达水平, 改善大鼠牙周组织状况。

【关键词】白芦藜醇; 牙周炎; OPG/RANKL/RANK; 信号通路

【中图分类号】R78 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2023)05-0102-04

牙周炎作为一种口腔慢性炎症, 其患病机理至今尚未完全阐明, 有研究表明, 局部和全身性氧化应激增加与牙周组织的炎症反应有关^[1]。近年来科学家们发现 OPG/RANKL/RANK 信号通路是破骨细胞与成骨细胞作用的重要通路, 同时与炎症性细胞因子密切相关^[2-3]。有研究表明白芦藜醇 (Resveratrol, RSV) 作为天然植物抗生素, 可通过影响破骨细胞和成骨细胞来调节骨代谢^[4]。基于此, 本研究采用白芦藜醇作用于牙周炎大鼠模型, 探讨白芦藜醇对牙周炎大鼠牙周组织中 OPG/RANKL/RANK 信号通路关键蛋白的影响, 为治疗牙周炎提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料:

1.1.1 实验动物: SPF 级雄性大鼠 52 只, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自中国科学院动物研究所, 动物许可证号 SCXK (京) 2020-0020; 质量合格证号 11401300053557, 标准实验室饲养。

1.1.2 主要试剂及仪器: 白芦藜醇 (美国 Sigma 公司), 牙龈卟啉单胞菌 (上海联迈生物工程有限公司); BHI 固体培养基 (上海沪峰化工有限公司), 琼脂糖 (美国 Sigma 公司), IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL 和 MMP-8 的 RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械厂), QuantStudio 实时荧光定量 PCR (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪 (北京六一仪器厂), 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 牙周炎 (EP) 大鼠模型的构建: 参考文献 [5], 将 SPF 大鼠进行腹腔麻醉, 随后取浸有牙龈卟啉单胞菌的 4-0 无菌丝线, 固定于大鼠左侧上颌第二磨牙牙颈部。2 周后对大鼠上颌第一磨牙牙周组织进行苏木精-伊红染色以确定建模是否成功。

1.2.2 实验分组: 除了确定建模是否成功的 2 只实验大鼠外, 剩下的 50 只实验大鼠随机分为 5 组, 分别为对照组、EP 组、RSV 低剂量组、RSV 中剂量组及 RSV 高剂量组, 每组 10 只。对照组大鼠不做模型处理, EP 组为模型组, RSV 低剂量组、RSV 中剂量组及 RSV 高剂量组分别为 EP 组处理的基础上每日给大鼠灌胃 5 mg/ (kg \cdot d)、10 mg/ (kg \cdot d)、15 mg/ (kg \cdot d) 的 RSV, 每日 1 次, 对照组及 EP 组为生理盐水灌胃。连续灌胃 1 周。

1.2.3 牙周组织中 OPG/RANKL/RANK 信号通路蛋白的 mRNA 检测: 取左上颌实验处新鲜牙周组织放置于 eppendorf 管中, 液氮骤冷后, -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。取 0.1 g 牙周组织标本, 用异硫氰酸胍裂解牙周组织细胞, 提取细胞总 RNA, 取约 5 μ g RNA 严格按照试剂盒说明书进行逆转

录, 取合成的 cDNA 反应液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。以合成的 cDNA 为模板, 采用 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL 和 MMP-8 引物序列进行 PCR 扩增 (引物序列见表 1), 扩增条件: 阶段 1 96 $^{\circ}$ C 15 s, 阶段 2 55 $^{\circ}$ C 1 min, 阶段 3 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共计 30 个循环。PCR 扩增后行琼脂糖凝胶电泳。

表 1 各种炎症因子引物序列

炎症因子	引物序列
IL-1	上游: 5'-TAACTGACTATGTATGATG-3' 下游: 5'-ACTGATTCTACATCGTAC-3'
IL-6	上游: 5'-CAACCAGAAACCGTCC-3' 下游: 5'-GCAGATCTGTAATAGCGT-3'
TNF- α	上游: 5'-TCCATAAGACGGATACG-3' 下游: 5'-CTCAGCTAGGAACCTCA-3'
OPG	上游: 5'-TCACGCAGGAGTATC-3' 下游: 5'-AGAATGCATCACTCTGG-3'
MMP-8	上游: 5'-TACCTACGGTGGATCCG-3' 下游: 5'-CTGAGCGATCAAACCTCT-3'
RANKL	上游: 5'-ACTAGCATCATCCCAAG-3' 下游: 5'-CCTCAAATGTTGCATCC-3'

1.2.4 牙周组织中 OPG/RANKL/RANK 信号通路蛋白的蛋白检测: 左上颌实验处新鲜牙周组织细胞经过处理后, 加入蛋白裂解液, 裂解 30 min。取裂解后细胞转移到 EP 管中, 超声波震荡仪中处理 2 min。迅速取出后 12 000 r/min 离心 10 min, 用移液枪小心吸取上清液, 重复 2 次。在前述上清液中加入十二烷基磺酸钠 (SDS) 蛋白缓冲液, 置于沸水浴中变形处理 5 min, 置于 -70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存备用。取处理液 5 μ L 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯 (SDS-PAGE) 凝胶电泳, 采用化学发光法曝光后观察结果。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 21.0 对结果进行数据分析, 计量结果以均数 \pm 标准差表示, 多组之间的两两比较采用 LSD- t 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组大鼠牙周组织中 OPG/RANKL/RANK 信号通路的 mRNA 水平比较: 结果见表 2。EP 模型组大鼠牙周组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL、MMP-8 的 mRNA 表达均高于空白对照组 ($P < 0.05$)。与 EP 模型组比较, RSV 低剂量组、RSV 中剂量组、RSV 高剂量组大鼠牙周组织 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL、MMP-8 中的 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$), 且 RSV 低剂量组、RSV 中剂量组、RSV 高剂量组 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL、MMP-8 mRNA 表达水平依次逐渐下降, 且各组之间差异有

统计学意义 ($P < 0.05$)。RSV 中剂量组和 RSV 高剂量组 OPG/RANKL/RANK 信号通路相关蛋白的 mRNA 表达低

于 RSV 低剂量组 ($P < 0.05$)，RSV 中剂量组和 RSV 高剂量组差异无统计学意义。

表 2 不同组大鼠 OPG/RANKL/RANK 信号通路的 mRNA 水平 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1/ (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)	OPG/ (ng/mL)	RANKL/ (pg/mL)	MMP-8/ (ng/mL)
对照组	14.69 \pm 1.93	23.44 \pm 2.52	33.87 \pm 4.91	0.52 \pm 0.17	8.27 \pm 1.72	0.23 \pm 0.11
EP 模型组	18.63 \pm 2.24*	71.36 \pm 0.51*	89.86 \pm 5.16*	1.33 \pm 0.25*	41.95 \pm 2.01*	1.04 \pm 0.23*
RSV 低剂量组	16.49 \pm 2.13*#	46.54 \pm 4.76*#	57.44 \pm 4.32*#	0.91 \pm 0.15*#	25.54 \pm 1.98*#	0.62 \pm 0.22*#
RSV 中剂量组	15.32 \pm 1.99*# Δ	30.63 \pm 3.87*# Δ	40.69 \pm 6.02*# Δ	0.71 \pm 0.33*# Δ	16.54 \pm 1.77*# Δ	0.41 \pm 0.34*# Δ
RSV 高剂量组	15.00 \pm 1.77*# Δ	24.65 \pm 4.17*# Δ	34.89 \pm 4.12*# Δ	0.63 \pm 0.21*# Δ	9.78 \pm 1.89*# Δ	0.32 \pm 0.19*# Δ

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 RSV 模型组比较，# $P < 0.05$ ；与 RSV 低剂量组比较， $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 不同组大鼠牙周组织中 OPG/RANKL/RANK 信号通路相关蛋白的表达比较：结果见表 3。EP 模型组大鼠牙周组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL、MMP-8 的蛋白表达高于空白对照组 ($P < 0.05$)。与 EP 模型组比较，RSV 低、中、高剂量组大鼠牙周组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、RANKL、MMP-8 的蛋白水平均降低 ($P < 0.05$)，且 RSV 低、中、高剂量组 IL-1、IL-6、TNF- α 、OPG、

RANKL、MMP-8 的蛋白水平依次逐渐下降 ($P < 0.05$)，RSV 中、高剂量组所有因子的蛋白水平低于 RSV 低剂量组 ($P < 0.05$)。RSV 中剂量组大鼠牙周组织中 IL-1、TNF- α 、RANKL、MMP-8 的蛋白水平和 RSV 高剂量组之间差异无统计学意义，而 RSV 中剂量组大鼠牙周组织中 IL-6 和 OPG 蛋白水平高于 RSV 高剂量组 ($P < 0.05$)。

表 3 不同组大鼠 OPG/RANKL/RANK 信号通路蛋白的蛋白水平 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1	IL-6	TNF- α	OPG	RANKL	MMP-8
对照组	49.21 \pm 3.24	78.75 \pm 4.26	12.7 \pm 1.92	1.62 \pm 0.42	27.61 \pm 2.81	0.84 \pm 0.11
EP 模型组	62.31 \pm 6.92*	134.45 \pm 15.92*	15.24 \pm 1.85*	6.44 \pm 0.38*	143.39 \pm 3.44*	3.47 \pm 0.38*
RSV 低剂量组	56.11 \pm 4.77*#	109.46 \pm 8.66*#	14.77 \pm 1.66*#	3.32 \pm 0.64*#	52.54 \pm 10.11*#	2.01 \pm 0.22*#
RSV 中剂量组	52.96 \pm 3.69*# Δ	99.79 \pm 9.89*# Δ	14.00 \pm 2.13*# Δ	2.01 \pm 0.45*# Δ	33.89 \pm 6.32*# Δ	1.01 \pm 0.43*# Δ
RSV 高剂量组	50.32 \pm 3.86*# Δ	90.78 \pm 11.65*# Δ	13.54 \pm 1.96*# Δ	1.88 \pm 0.77*# Δ	29.11 \pm 2.28*# Δ	0.89 \pm 0.18*# Δ

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 EP 模型组比较，# $P < 0.05$ ；与 RSV 低剂量组比较， $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

1990—2015 年全球疾病负担研究显示，牙周炎的全球负担增加了 57.3%，在全球疾病负担中排在第 14 位^[6]，因此牙周炎的临床治疗方法也越来越受到人们的重视。目前牙周炎的基础治疗方法主要是依靠机械手段来清除牙齿周围的牙石、菌斑，同时辅以局部或全身用药，但这种常规疗法由于牙周致病菌的频繁定植和口腔耐药菌的出现已不能满足人们的需求^[7]。

RSV 作为一种天然植物抗生素，即使在高浓度下也不会对人体产生有害作用，因此常常被用作膳食补充剂。Dion 等^[8]发现 RSV 对破骨细胞的骨吸收有抑制作用，同时对成骨细胞骨形成有促进作用。OPG/RANKL/RANK 系统是牙周局部骨代谢调节最重要的信号通路之一。成骨细胞分泌的 RANKL 可以和破骨前体细胞膜上的 RANK 直接结合，引起破骨细胞生成，而成骨细胞分泌的 OPG 可同 RANK 竞争性结合 RANKL，阻断成熟破骨细胞生成，从而抑制骨吸收过程^[9]。目前研究认为在牙周炎发病或复发过程中 IL-1、IL-6、TNF- α 等能影响 OPG/RANKL/RANK 信号通路的表达，本研究采用 RSV 对牙周炎大鼠进行干预，考察 RSV 对牙周炎大鼠 OPG/RANKL/RANK 信号通路相关蛋白的影响，结果表明 RSV 可以降低牙周炎大鼠牙周组织中 OPG、

RANKL、IL-1、IL-6、TNF- α 和 MMP-8 的 mRNA 和蛋白表达水平。从结果中我们还可以看出，RSV 浓度越高，则炎症因子的表达也逐渐降低，这为 RSV 的临床用药提供了参考，也为进一步治疗和预防牙周炎等炎症疾病提供了重要的理论指导和实验依据。

参考文献

- [1] Wang Y, Andrukhov O, RauschFan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis [J]. Front physiol, 2017, 8: 910.
- [2] Bishop K A, Coy H M, Nerenz R D, et al. Mouse Rankl expression is regulated in T cells by c-Fos through a cluster of distal regulatory enhancers designated the T cell control region [J]. The Journal of biological chemistry, 2011, 286 (23): 20880-20891.
- [3] 元宇, 郭健民, 邹军. OPG/RANKL/RANK 信号通路在运动与骨免疫学中的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21 (8): 1005-1010.
- [4] 王鹏, 陈慧, 代喆颖. 白芦藜醇对大鼠牙移植后牙周组织愈合及 Sirt1/Nrf2 信号通路的影响 [J]. 河北医学, 2022, 28 (11): 1790-1795.
- [5] 颜明, 林妙阔. 实验性牙周炎大鼠模型的构建及脂氧素 A4 对牙

- 槽骨吸收的影响 [J]. 福建医药杂志, 2018, 40 (3): 142-144.
- [6] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990 - 2015: a systematic analysis for the Globe Burden of Disease Study 2015 [J]. Lancet, 2016, 388 (10053): 1545-1602.
- [7] 黄晓慧, 杨洁, 孙卫斌, 等. 个性化口腔卫生宣教对牙周炎患者非手术治疗菌斑控制的影响 [J]. 临床口腔医学杂志, 2022,

38 (7): 423-426.

- [8] Dion M B, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18 (3): 125-138.
- [9] 陈莉丽, 黄玫, 雷利红. OPG/RANKL/RANK 系统参与牙槽骨吸收及重建过程作用初探 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35 (4): 288-292.

• 基础研究 •

Notch 信号通路对骨性关节炎软骨细胞凋亡的实验研究

福建省福州市第二医院关节一科 (福州 350007) 林飞太 林 煜 卢志明¹ 陈赛楠² 林 钊¹ 冯尔宥¹

【摘要】 目的 探究 Notch 信号通路对 IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡的调控作用。**方法** 采用 C28/I2 软骨细胞系进行培养, 利用 IL-1 β 诱导细胞凋亡, 通过 Ad-NICD 感染实现 NICD 的过表达, 通过 si-NICD 转染实现 NICD 的沉默。采用 Real-time PCR 和 Western blot 技术检测过表达和沉默的效果, 并评估 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 在 MOI=100 的 si-NICD 转染条件下, NICD 的沉默效果最佳; 与 Ad-NC 组相比, Ad-NICD 组的 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达水平上调 ($P<0.05$); 与 siRNA-NC 组相比, siRNA-NICD 组的 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达水平下调 ($P<0.05$)。**结论** 激活 Notch 通路可以抑制 IL-1 β 诱导的 C28/I2 软骨细胞凋亡, 而阻遏 Notch 通路则能促进软骨细胞凋亡。

【关键词】 骨关节炎; 细胞凋亡; Notch 信号通路; NICD

【中图分类号】 R684.3 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)05-0105-04

骨性关节炎 (OA) 是全球范围内常见的退行性关节疾病之一, 其主要特征包括软骨退化、骨赘形成和关节僵硬。在维持关节软骨稳定方面, 软骨细胞扮演着至关重要的角色。在 OA 的病理过程中软骨细胞的炎症反应和异常凋亡在疾病的发展中起着重要的作用, 可能导致基质降解和软骨破坏。因此, 抑制软骨细胞凋亡被认为是治疗 OA 的潜在干预手段^[1]。尽管 OA 的发病机制尚未完全阐明, 但普遍认为关节软骨损伤及 OA 进展与其异常的信号通路转导以及软骨细胞生理功能的改变有关^[2]。Notch 信号通路被认为是缓解 OA 进展的治疗靶点。IL-1 β 是一种常见的炎症介质, 其通过诱导软骨细胞凋亡参与了关节炎的病理过程。然而, 目前对于 Notch 信号通路在 IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡中的作用尚不完全了解^[2-3]。因此, 本文以 C28/I2 软骨细胞系作为研究模型, 并通过 Ad-NICD 的过表达和 si-NICD 的沉默实现 Notch 信号通路的激活和抑制, 以进一步了解 Notch 信号通路对 IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡的调控作用, 为相关疾病的治疗提供理论基础和潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料: 人关节软骨细胞系 C28/I2, 来自 ATCC 细胞库。细胞系在 DMEM/F12 培养基中添加 10% 胎牛血清 (FBS)、1% L-谷氨酸和 1% 青霉素/链霉素进行培养。细胞在 37 °C、5% CO₂ 的湿度控制培养箱中培养。主要试剂与

仪器: lipofectamin 2000 (Invitrogen)、IL-1 β (Sigma)、CCK-8 (MCE)、TRIzol (Invitrogen)、Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR II (AG11711)、RIPA 裂解液 (碧云天)、Protease Inhibitor Cocktail (APExBIO)、SDS-PAGE Loading Buffer (康为世纪)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天)、QuickBlock™ Western 封闭液 (碧云天)、PCNA (D3H8P) XP® Rabbit mAb (CST)、Anti-Aggregan 抗体 (Abcam)、Anti-Collagen II 抗体 (Abcam)、GAPDH Rabbit mAb (ABclonal)、倒置荧光显微镜 (Leica, DMI8)、Real-time PCR (ABI, 7500 Fast)、多色荧光/化学发光成像 (Proteinsimple FluorChem M)。

1.2 方法:

1.2.1 炎症模型的建立: 为模拟 OA 中的炎症损伤, 使用白细胞介素-1 β (IL-1 β) 处理 C28/I2 细胞。IL-1 β 是一种重要的促炎因子, 可诱导细胞炎症反应。C28/I2 细胞分为以下组别进行处理: 1) 对照组: 未经处理的 C28/I2 细胞。2) IL-1 β 处理组: C28/I2 细胞暴露于 IL-1 β (10 ng/mL) 处理液中, 持续处理 24 h。3) 采用 CCK8 法检测骨性关节炎软骨细胞的抑制率, 选择抑制率最低的用于后续实验。细胞抑制率 = (IL-1 β 诱导组吸光度 - 空白组吸光度) / (对照组吸光度 - 空白组吸光度) $\times 100\%$ 。

1.2.2 Notch 信号通路激活和抑制实验设计: 为研究 Notch

基金项目: 福州市科技项目 (2020-WS-118); 福建省创伤骨科急救与康复临床医学研究中心 (2020Y2014)

1 福建医科大学; 2 福建中医药研究院