

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2024.11.019

论著 · 基础

青藤碱调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的影响

胡宏志, 汪能, 李娟, 李冰, 姚金龙

基金项目: 湖南省自然科学基金省市联合项目(2022JJ50049)

作者单位: 410005 长沙, 湖南中医药大学第二附属医院骨伤四科

通信作者: 李娟, E-mail: 289845646@qq.com



【摘要】目的 探讨青藤碱(SN)调节单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51 样激酶 1(ULK1)信号通路对白介素-1 β (IL-1 β)诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的影响。方法 将关节软骨细胞分为 Control 组(正常培养)、IL-1 β 组(10 μ g/L 的 IL-1 β 诱导 12 h)、L-SN、M-SN、H-SN 组(在 IL-1 β 诱导的基础上添加 25、50、100 μ mol/L 的 SN)、SN+Compound C 组(在 H-SN 组的基础上添加 10 μ mol/L AMPK 抑制剂 Compound C)。MTT 法、透射电子显微镜(TEM)、流式细胞仪分别检测 SN 对各组关节软骨细胞增殖、自噬、凋亡的影响;ELISA 试剂盒检测各组细胞中 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 的表达;蛋白印迹实验(WB)检测各组细胞中 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1 蛋白水平。结果 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞的 A₄₉₀ 值、p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平降低,自噬空泡数、凋亡率、COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、p-mTOR/mTOR 蛋白水平升高($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组 A₄₉₀ 值、自噬空泡数、p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平升高,凋亡率、COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、p-mTOR/mTOR 蛋白水平降低($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN+Compound C 组 A₄₉₀ 值、自噬空泡数、p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平降低,凋亡率、COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、p-mTOR/mTOR 蛋白水平升高($P<0.05$)。结论 SN 可以通过促进 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,其机制可能是通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路实现的。

【关键词】 骨关节炎;青藤碱;单磷酸腺苷活化蛋白激酶;雷帕霉素靶蛋白;UNC-51 样激酶 1;白介素-1 β ;关节软骨细胞;自噬;凋亡

【中图分类号】 R684.3

【文献标识码】 A

Impacts of sinomenine on autophagy and apoptosis in articular chondrocytes induced by IL-1 β by regulating AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway Hu Hongzhi, Wang Neng, Li Juan, Li Bing, Yao Jinlong. Department of Orthopedics and Trauma, Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Hunan Province, Changsha 410005, China

Funding program: Hunan Province Natural Science Foundation Joint Project(2022JJ50049)

Corresponding author: Li Juan, E-mail: 289845646@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the impacts of sinomenine (SN) on interleukin-1 β (IL-1 β) induced autophagy and apoptosis in articular chondrocytes by regulating the adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **Methods** Joint chondrocytes were grouped into control group (normal culture), IL-1 β group (induced with 10 ng/mL IL-1 β for 12 hours), L-SN, M-SN, H-SN groups (adding SNs of 25, 50, and 100 μ M on the basis of IL-1 β induction), and SN+Compound C group (adding 10 μ mol/L AMPK inhibitor Compound C on the basis of the H-SN group). MTT assay, transmission electron microscopy (TEM), and flow cytometry were used to detect the effects of SN on proliferation, autophagy, and apoptosis of articular chondrocytes in each group. ELISA kit was applied to detect the expression of COX-2, TNF- α , MMP-3, and MMP-13 of cells in various groups. Western blotting (WB) was applied to detect the protein expression of p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR, p-ULK1, and ULK1 in the cells of each group. **Results** Compared with the Control group, the A490 values of articular chondrocytes, the expression of p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 proteins in the IL-1 β group were decreased, the autophagy vacuole count, apoptosis rate, the expression of COX-2, TNF- α , MMP-3, MMP-13, and p-mTOR/mTOR proteins were increased ($P<0.05$).

05). Compared with IL-1 β group, the A490 value, number of autophagic vacuoles, the expression of p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 proteins in the L-SN group, M-SN group, and H-SN group were increased, the apoptosis rate, the expression of COX-2, TNF- α , MMP-3, MMP-13, and p-mTOR/mTOR proteins were decreased ($P<0.05$). Compared with H-SN group, the A490 value, number of autophagic vacuoles, the expression of p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 proteins in the SN+Compound C group were decreased, the apoptosis rate, the expression of COX-2, TNF- α , MMP-3, MMP-13, and p-mTOR/mTOR proteins were increased ($P<0.05$). **Conclusion** SN can promote IL-1 β induced autophagy in articular chondrocytes and inhibit cell apoptosis, which may be achieved by activating the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

【Key words】 Joint chondrocytes; Sinomenine; Adenosine monophosphate activated protein kinase; Mammalian target of rapamycin; UNC-51 like kinase 1; Interleukin-1 β ; Articular chondrocyte; Autophagy; Apoptosis

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种高发病率和致残性的退行性关节疾病,其特征是持续的软骨退化、软骨下硬化和滑膜炎,OA 对功能障碍和残疾有显著影响,80% 的患者有行动限制,25% 的患者有主要日常活动困难^[1]。软骨细胞是软骨中唯一的细胞类型,在维持正常的生理功能和软骨形态方面起着重要作用,自噬是一种自我降解过程,是软骨退变和细胞凋亡的重要保护机制^[2]。炎性细胞因子如白介素-1 β (IL-1 β) 可抑制自噬,促进细胞凋亡并导致 OA 患者软骨变性^[3]。目前,OA 的有效治疗仅限于疼痛管理,这些治疗并不能逆转关节软骨功能的丧失^[4]。因此,迫切需要探索 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的分子机制,以寻找新的治疗靶点,开发药物以提高 OA 患者的治疗效能。青藤碱 (sinomenine, SN) 是青藤的主要成分,临床可有效治疗 OA 等疾病,具有毒性较低、不良反应较少的特点^[5]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 是能量代谢、细胞生长和自噬的重要调节因子;雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是一种进化上保守的蛋白激酶,通过磷酸化激活在自噬激活过程中起关键的负调控作用;UNC-51 样激酶 1 (ULK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,对自噬启动起关键作用^[6]。相关研究显示,AMPK 通过直接磷酸化和激活 ULK1 来促进自噬,而 mTOR 通过抑制 ULK1 激活来抑制自噬;炎性因子可降低 AMPK、ULK1 的磷酸化,导致 mTOR 活化抑制减弱,从而阻止自噬,进而导致炎性反应进一步加剧^[7]。然而,目前 SN 调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的影响尚不清晰。本实验对其进行研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 (1) 材料:关节软骨细胞 (上海冠导生物工程有限公司,货号 GD-C60208263);SN (上海岑特生物科技有限公司,货号 QY-EG478);Compound C (北京德航五洲科技有限公司,货号 UE171260);MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,货号 GK3605);Annexin

V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司,货号 HQF02-KVA);环加氧酶 2 (COX-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属蛋白酶 (MMP)-3、MMP-13 ELISA 试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒、ECL 免疫印迹底物试剂盒 (上海康朗生物科技有限公司,货号 KL-E10956、KL-E10134、KL-E2385HU、KL-E11126、KL-D5420、KL-X123);GAPDH、p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1、HRP (英国 Abcam 公司,货号 ab226408、ab92701、ab32382、ab137133、ab2732、ab229909、ab240916、ab97023)。(2) 仪器:透射电子显微镜 (广州东锐科技有限公司,型号 HT7800);流式细胞仪 (广州进科驰安科技有限公司,型号 Apogee A50);酶标仪 (上海臻诺生物科技有限公司,型号 Lab-Cope 220V K3 COPE)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组:将关节软骨细胞分为 Control 组 (正常培养)、IL-1 β 组 (参考文献 [8] 用 10 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β 诱导 12 h)、低、中、高剂量 SN (L-SN、M-SN、H-SN) 组 (参考文献 [9] 在 IL-1 β 诱导的基础上添加 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 SN)、SN+Compound C 组 (参考文献 [10] 在 H-SN 组的基础上添加 10 $\mu\text{mol/L}$ AMPK 抑制剂 Compound C)。每组实验重复 3 次,每次 2 个平行。

1.2.2 MTT 法检测关节软骨细胞增殖:将关节软骨细胞以 6×10^3 /孔的密度置于 6 孔板中,按照 1.2.1 的分组处理后,用 20 ml 0.5% MTT 溶液孵育 4 h 去除上清,加入 DMSO 150 μl ,使结晶物充分溶解,使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A_{490} 值)。

1.2.3 透射电子显微镜检测关节软骨细胞自噬:处理后收获的关节软骨细胞固定在 2.5% 戊二醛磷酸盐缓冲液中,2 h 后用 PBS 冲洗后,样品在 1% 四氧化锇中固定 1 h,用水冲洗,用梯度乙醇脱水,用环氧丙烷置换,在 Epon812 中保存过夜,样品包埋在 Epon812 中,在 60℃ 的烘箱中固化,用 Reichert Ultracut E 切片机获得 50~70 nm 超薄切片。切片用醋酸铀和柠檬酸铅双染色,用透射电子显微镜观察。

1.2.4 流式细胞术检测关节软骨细胞凋亡:对数期的关节软骨细胞接种至 6 孔板,按照 1.2.1 分组进行处理,然后胰酶消化,细胞收集于离心管中。将收集的细胞和培养基混匀,4℃ 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤后用 1×Binding Buffer 重悬调整密度为 5×10^5 个/ml,取 1×10^5 个细胞悬液于流式管中,加入 FITC 和 PI 在室温黑暗条件下孵育 30 min,再次用 PBS 洗涤细胞,并立即使用流式细胞仪检测,计算凋亡率。

1.2.5 ELISA 检测关节软骨细胞中 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 的表达:关节软骨细胞经 1.2.1 分组处理后,收集细胞,按照 ELISA 试剂盒配置反应体系,在 450 nm 处测定吸光度,以不同比例稀释的 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 标准品的吸光度绘制标准曲线,计算关节软骨细胞中 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 的水平。

1.2.6 蛋白印迹实验(WB)检测关节软骨细胞中 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1 蛋白水平:收集关节软骨细胞并于 RIPA 裂解缓冲液中裂解,采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定最终蛋白浓度,蛋白加热变性后,每个样品中 40 μ g 的总蛋白用 12% SDS-PAGE 分离,并转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶在 TBST 中阻断 2 h,然后用一抗 p-AMPK (1 : 1 000)、AMPK (1 : 1 000)、p-mTOR (1 : 1 000)、mTOR (1 : 2 000)、p-ULK1 (1 : 1 000)、ULK1 (1 : 1 000) 在 4℃ 下检测过夜,以 GAPDH (1 : 1 000) 作为内参,用 TBST 洗涤 3 次后,使用相应的酶标二抗 (1 : 2 000) 在室温下孵育 1 h,使用 ECL 免疫印迹底物试剂盒可视化免疫反应条带,在 Image J 软件上进行分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析。不同组别间关节软骨细胞的 A_{490} 值、自噬空泡数、p-ULK1/ULK1 蛋白水平等计量资料,符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组关节软骨细胞增殖比较 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞的 A_{490} 值显著降低 ($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组 A_{490} 值均增高 ($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN + Compound C 组 A_{490} 值降低 ($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组关节软骨细胞自噬比较 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞的自噬空泡数增高 ($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组自噬空泡数增高 ($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN + Compound C 组自噬空泡数降低 ($P<0.05$),见图 1、表 1。

2.3 各组关节软骨细胞凋亡比较 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞的凋亡率增高 ($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组凋亡率降低 ($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN+Compound C 组凋亡率增高 ($P<0.05$),见图 2、表 1。

2.4 各组关节软骨细胞中 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 表达比较 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 表达增高 ($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 表达降低 ($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN + Compound C 组 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 表达增高 ($P<0.05$),见表 2。

2.5 各组关节软骨细胞 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 蛋白水平比较 与 Control 组比较,IL-1 β 组关节软骨细胞中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平降低,p-mTOR/mTOR 水平增高 ($P<0.05$);与 IL-1 β 组比较,L-SN 组、M-SN 组、H-SN 组中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平增高,p-mTOR/mTOR 水平降低 ($P<0.05$);与 H-SN 组比较,SN + Compound C 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白水平降低,p-mTOR/mTOR 水平增高 ($P<0.05$),见图 3、表 3。

表 1 SN 对各组关节软骨细胞增殖、自噬及凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effects of SN on proliferation, autophagy, and apoptosis of articular chondrocytes in various groups

组 别	<i>n</i>	A_{490} 值	自噬空泡数 (个)	凋亡率 (%)
Control 组	6	0.98 $\pm$ 0.14	1.23 $\pm$ 0.39	2.34 $\pm$ 0.73
IL-1 β 组	6	0.33 $\pm$ 0.09 ^a	6.34 $\pm$ 1.25 ^a	44.58 $\pm$ 4.84 ^a
L-SN 组	6	0.52 $\pm$ 0.11 ^b	13.51 $\pm$ 2.42 ^b	30.47 $\pm$ 3.59 ^b
M-SN 组	6	0.71 $\pm$ 0.12 ^{bc}	25.44 $\pm$ 3.46 ^{bc}	21.51 $\pm$ 2.48 ^{bc}
H-SN 组	6	0.93 $\pm$ 0.13 ^{bcd}	37.52 $\pm$ 4.03 ^{bcd}	9.82 $\pm$ 1.32 ^{bcd}
SN+Compound C 组	6	0.48 $\pm$ 0.10 ^c	9.47 $\pm$ 2.34 ^c	39.77 $\pm$ 4.15 ^c
<i>F/P</i> 值		30.068/ <0.001	159.063/ <0.001	161.188/ <0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 IL-1 β 组比较,^b $P<0.05$;与 L-SN 组比较,^c $P<0.05$;与 M-SN 组比较,^d $P<0.05$;与 H-SN 组比较,^e $P<0.05$ 。

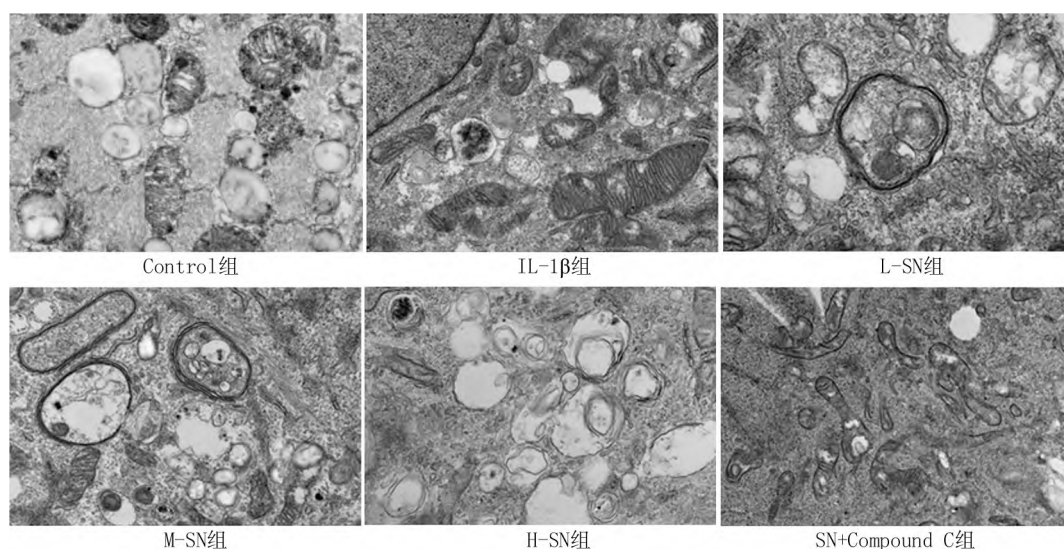


图 1 各组关节软骨细胞自噬情况比较($\times 10\ 000$)

Fig.1 Comparison of autophagy status of joint cartilage cells in various groups ($\times 10000$)

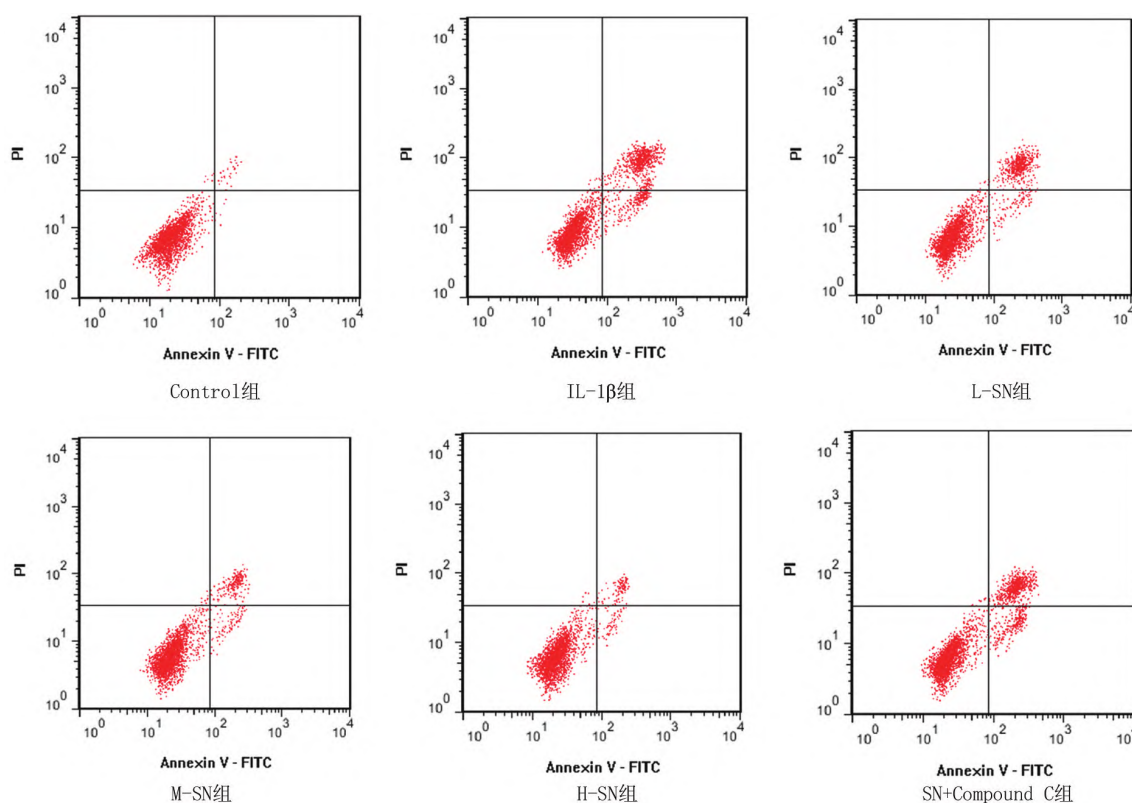


图 2 各组关节软骨细胞凋亡情况比较

Fig.2 Comparison of apoptosis of articular cartilage cells in various groups

3 讨论

OA 是一种异质性疾病,与性别、年龄、肥胖、遗传有关,影响全球约 2.4 亿人,发病率和病死率呈上升的趋势,给社会造成巨大的经济负担^[11]。OA 的主要临

床症状包括慢性疼痛、关节不稳定、僵硬、关节畸形/影像学关节间隙狭窄,常用的治疗方法有低强度有氧运动、减肥、针灸、药物治疗、手术等,然而,大多数治疗只能减轻关节的疼痛和僵硬程度,治疗效果仍然不明

表 2 SN 对各组关节软骨细胞 COX-2、TNF-α、MMP-3、MMP-13 表达的影响 (x̄±s)

Tab.2 Effects of SN on the expression of COX-2, TNF-α, MMP-3, and MMP-13 in joint cartilage cells of various groups

组 别	n	COX-2(μg/L)	TNF-α(μg/L)	MMP-3(ng/L)	MMP-13(ng/L)
Control 组	6	5.34±1.26	28.44±4.28	17.52±5.83	43.69±5.32
IL-1β 组	6	51.42±6.34 ^a	97.58±10.22 ^a	76.54±9.36 ^a	112.57±11.63 ^a
L-SN 组	6	34.51±4.82 ^b	72.21±7.87 ^b	55.48±8.44 ^b	90.46±9.47 ^b
M-SN 组	6	23.26±3.71 ^{bc}	53.26±6.34 ^{bc}	37.81±7.15 ^{bc}	70.52±7.94 ^{bc}
H-SN 组	6	11.74±2.85 ^{bcd}	35.72±5.25 ^{bcd}	20.55±6.42 ^{bcd}	51.43±6.48 ^{bcd}
SN+Compound C 组	6	47.86±5.03 ^e	80.65±8.61 ^e	64.76±9.02 ^e	103.77±10.58 ^e
F/P 值		114.181/<0.001	79.551/<0.001	56.938/<0.001	60.487/<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 IL-1β 组比较,^b*P*<0.05;与 L-SN 组比较,^c*P*<0.05;与 M-SN 组比较,^d*P*<0.05;与 H-SN 组比较,^e*P*<0.05。

表 3 SN 对各组关节软骨细胞中 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 蛋白水平的影响 (x̄±s)

Tab.3 Effects of SN on the protein levels of p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR, and p-ULK1/ULK1 in various groups of articular chondrocytes

组 别	n	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
Control 组	6	1.08±0.12	0.27±0.06	1.32±0.14
IL-1β 组	6	0.32±0.07 ^a	1.14±0.12 ^a	0.52±0.09 ^a
L-SN 组	6	0.56±0.09 ^b	0.87±0.09 ^b	0.77±0.11 ^b
M-SN 组	6	0.79±0.10 ^{bc}	0.56±0.08 ^{bc}	0.96±0.12 ^{bc}
H-SN 组	6	1.03±0.11 ^{bcd}	0.35±0.07 ^{bcd}	1.21±0.13 ^{bcd}
SN+Compound C 组	6	0.47±0.08 ^e	0.96±0.10 ^e	0.64±0.10 ^e
F/P 值		61.552/<0.001	93.673/<0.001	44.828/<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 IL-1β 组比较,^b*P*<0.05;与 L-SN 组比较,^c*P*<0.05;与 M-SN 组比较,^d*P*<0.05;与 H-SN 组比较,^e*P*<0.05。

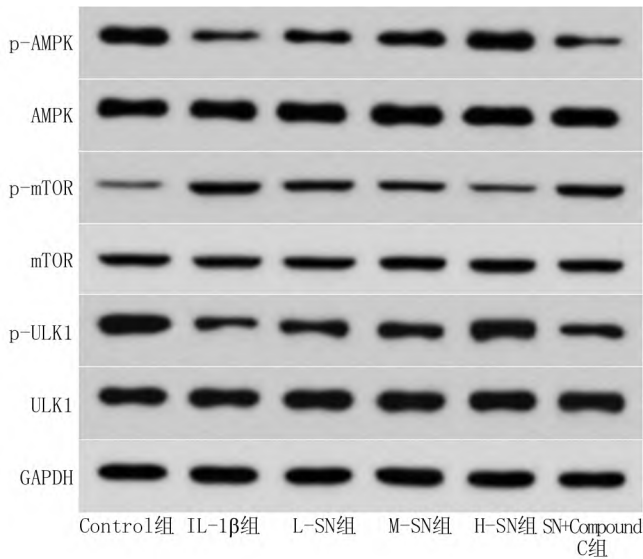


图 3 WB 检测各组关节软骨细胞中 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK12 蛋白水平比较

Fig.3 Comparison of p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR, and p-ULK1/ULK12 protein levels in articular chondrocytes of different groups detected by WB

显^[12]。OA 发病机制主要与炎症反应、自噬、衰老、软骨细胞凋亡、代谢紊乱有关,其中,炎症通路激活、炎症细胞增多、细胞因子等炎症反应危险因素在 OA 发病

和进展的病理生理调控中起着至关重要的作用,此外,炎症反应与软骨细胞代谢紊乱、细胞自噬和凋亡密切相关^[13]。在 OA 的发病和进展中最重要的促炎细胞因子是 IL-1β,其可通过诱导炎症损伤(COX-2、TNF-α),上调基质金属蛋白酶(MMP-3、MMP-13)的表达,导致细胞外基质降解,促进细胞自噬和凋亡^[14]。因此,探讨 IL-1β 诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的作用机制,有助于改善骨性关节炎,然而,针对 OA 的有效治疗及药物作用机制还需要进一步阐明。本研究采用 IL-1β 诱导的关节软骨细胞结果发现,细胞增殖能力下降,自噬增加,COX-2、TNF-α 炎症因子表达增加,MMP-3、MMP-13 基质金属蛋白酶表达增加,提示 IL-1β 通过炎症反应、细胞外基质降解等过程,促进关节软骨细胞的自噬和凋亡,进而导致 OA 疾病的进展。

SN 是从中药中提取的单体生物碱,具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、免疫调节、神经保护、心脏保护等广泛的生物活性作用,可用于治疗风湿性关节炎、OA、肿瘤等疾病,此外还在心脑血管等器官保护中发挥着重要作用^[15]。Lei 等^[16]发现,SN 可显著提高 OA 大鼠模型的体质量,减轻心脏重量,显著降低炎症因子水平,以及缓解氧化应激,是治疗 OA 疾病的有益活性剂。Dong 等^[17]发现,在 OA 小鼠和 IL-1β 刺激的软骨细胞中,SN 治疗下调炎症细胞因子水平和 NLRP3 炎症小体成

分的蛋白表达,上调 miR-223-3p 的表达,进而抑制软骨细胞的凋亡,改善了关节软骨退化,可以作为治疗 OA 的潜在靶点。Wu 等^[18]发现,SN 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 NF- κ B 信号通路,抑制 IL-1 β 诱导的炎症反应和软骨破坏。本研究发现 SN 以浓度依赖的方式,促进 IL-1 β 诱导的细胞增殖和自噬,抑制细胞凋亡,抑制 COX-2、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 蛋白的表达,提示 SN 可能通过抑制炎症反应、细胞外基质降解,促进关节软骨细胞的活性,进而抑制 OA 的发生、发展,SN 可作为 OA 的潜在治疗新药物。

AMPK/mTOR/ULK1 信号通路是一个公认的自噬调节因子,AMPK 可以通过直接激活 ULK1 或抑制 mTOR 间接磷酸化 ULK1 来增强自噬,在多种疾病中发挥重要作用。Zhang 等^[19]发现,连翘苷 A 通过 AMPK/mTOR/ULK1 缓解 LPS 诱导的牛乳腺上皮细胞炎症反应和氧化应激,调控自噬,抑制细胞凋亡。Huang 等^[20]发现,片仔癀在体外通过 AMPK/mTOR/ULK1 通路调节关键自噬蛋白,增强自噬反应,抑制 NLRP3 炎症小体介导的神经炎症反应;在大鼠中,片仔癀可通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 显著降低梗死面积,抑制小胶质细胞激活,改善神经元缺陷,对缺血性脑卒中具有良好的治疗效果。Zhang 等^[21]发现,敲除 BRD4 通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路激活自噬,在细胞水平上可抑制 IL-1 β 诱导的髓核细胞的衰老和凋亡,在体内减弱了椎间盘退行性变。Wang 等^[22]发现,清化浊健脾方可通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路,促进自噬,减少炎症反应,缓解急性痛风性关节炎。本研究发现,IL-1 β 处理导致 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 表达降低, p-mTOR/mTOR 表达升高,而药物 SN 则可以上调 AMPK、ULK1 的磷酸化,抑制 mTOR 的磷酸化,而 AMPK 抑制剂则可以逆转 SN 对关节软骨细胞增殖、自噬、凋亡以及 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白水平的影响,提示 SN 通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路促进 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,进而抑制 OA 的进展。

综上所述,SN 可以通过促进 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,其机制可能是通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路实现的。然而,本研究局限于 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路且未进行体内实验,后续会重新设计实验,深入研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

胡宏志:实验方案实施,论文撰写;汪能、姚金龙:数据统

计,论文修改;李娟:实验设计,数据统计;李冰:实验方案实施,数据整理

参考文献

- [1] Li Z, Cheng J, Liu J. Baicalin protects human OA chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis and ECM degradation by activating autophagy via MiR-766-3p/AIFM1 axis[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14(5): 2645-2655. DOI: 10.2147/DDDT.S255823.
- [2] Lu J, Bian J, Wang Y, et al. Oxymatrine protects articular chondrocytes from IL-1 β -induced damage through autophagy activation via AKT/mTOR signaling pathway inhibition[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 178-189. DOI: 10.1186/s13018-024-04667-2.
- [3] Wan J, Zhu Z, He Z, et al. Stevioside protects primary articular chondrocytes against IL-1 β -induced inflammation and catabolism by targeting integrin[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119(1): 110261-110272. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110261.
- [4] Zhou X, Li J, Zhou Y, et al. Down-regulated ciRS-7/up-regulated miR-7 axis aggravated cartilage degradation and autophagy defection by PI3K/AKT/mTOR activation mediated by IL-17A in osteoarthritis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(20): 20163-20183. DOI: 10.18632/aging.103731.
- [5] Huang Z, Mao X, Chen J, et al. The efficacy and safety of zhengqing fengtongning for knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 1(1): 2768444. DOI: 10.1155/2022/2768444.
- [6] Lin M, Hua R, Ma J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway[J]. Environ Int, 2021, 147(1): 106298. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106298.
- [7] Xiao J, Shen X, Kou R, et al. Kirenol inhibits inflammation challenged by lipopolysaccharide through the AMPK-mTOR-ULK1 autophagy pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116(1): 109734-109744. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.109734.
- [8] 刘元豪,邢忠,许环顺,等. 重楼皂苷 VII 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡和分泌炎症介质的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(3): 330-335. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2023.03.005.
- [9] Qi W, Gu Y, Wang Z, et al. Sinomenine inhibited interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinases levels via SOCS3 up-regulation in SW1553 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(11): 1643-1652. DOI: 10.1248/bpb.b20-00270.
- [10] 段沛言,刘艺,林心怡,等. 细胞外基质硬度通过 AMPK 调控干细胞线粒体的形态异质性[J]. 四川大学学报:医学版, 2024, 55(1): 47-52. DOI: 10.12182/20240160504.
- [11] Lin Z, Miao J, Zhang T, et al. JUNB-FBXO21-ERK axis promotes cartilage degeneration in osteoarthritis by inhibiting autophagy[J]. Aging Cell, 2021, 20(2): 13306-13320. DOI: 10.1111/ace.13306.
- [12] Chen W, Zheng H, Zhang X, et al. Columbianetin alleviates lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation and apoptosis in chondrocyte through activation of autophagy by inhibiting serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) expression[J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 4051-4062. DOI: 10.1080/21655979.2022.2032970.

(下转 1398 页)

- 10.18632/aging.203672.
- [38] Aini S, Bolati S, Ding W, et al. LncRNA SNHG10 suppresses the development of doxorubicin resistance by downregulating miR-302b in triple-negative breast cancer [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 11430-11439. DOI: 10.1080/21655979.2022.2063592.
- [39] Wu JJ, Xu W, Ma LN, et al. Formononetin relieves the facilitating effect of lncRNA AFAP1-AS1-miR-195/miR-545 axis on progression and chemo-resistance of triple-negative breast cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(14): 18191-18222. DOI: 10.18632/aging.203156.
- [40] 于冰, 杨旭, 陈之梦, 等. lncRNA MEG3 调控 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路影响三阴性乳腺癌对紫杉醇的敏感性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(4): 597-602. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.04.002.
- [41] Islam SS, Al-Tweigeri T, Al-Harbi L, et al. Long noncoding RNA DLEU2 and ROR1 pathway induces epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells in breast cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 61. DOI: 10.1038/s41420-024-01829-3.
- [42] Song B, Wei FX, Peng JH, et al. Icariin regulates EMT and stem cell-like character in breast cancer through modulating lncRNA NEAT1/TGF β /SMAD2 signaling pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(2): 399-410. DOI: 10.1248/bpb.b23-00668.
- [43] Ma YX, Zhu YY, Shang L, et al. LncRNA XIST regulates breast cancer stem cells by activating proinflammatory IL-6/STAT3 signaling [J]. *Oncogene*, 2023, 42(18): 1419-1437. DOI: 10.1038/s41388-023-02652-3.
- [44] Zhou CX, Wang DF, Li JC, et al. TGF β 2-AS1 inhibits triple-negative breast cancer progression via interaction with SMARCA4 and regulating its targets TGF β 2 and SOX2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(39): e2117988119. DOI: 10.1073/pnas.2117988119.
- [45] Cruickshank BM, Wasson MD, Brown JM, et al. LncRNA PART1 promotes proliferation and migration, is associated with cancer stem cells, and Alters the miRNA landscape in triple-negative breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(11): 2644. DOI: 10.3390/cancers13112644.
- [46] Hu Y, He YQ, Luo N, et al. A feedback loop between lncRNA MAL-AT1 and DNMT1 promotes triple-negative breast cancer stemness and tumorigenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2023, 24(1): 2235768. DOI: 10.1080/15384047.2023.2235768.
- [47] 徐阳, 潘胜男. lncRNA CASC11 在三阴性乳腺癌中的临床意义及其与 miR-676-3p 调控的关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(4): 465-471. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.017.
- [48] Liu JQ, Yu HS, Cui HY, et al. LncRNA LINC000466 predicts the prognosis and promotes the progression of triple-negative breast cancer via modulating miR-539-5p [J]. *Clin Breast Cancer*, 2022, 22(4): 374-380. DOI: 10.1016/j.clbc.2022.01.011.
- [49] 许春景, 郭旭, 陈杰, 等. 铜死亡相关 lncRNA 预测三阴性乳腺癌患者预后及与肿瘤免疫微环境的关系 [J]. *浙江医学*, 2023, 45(23): 2468-2472, 2508. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2023.45.23.2023-1191.
- [50] 潘帆帆, 郑明华, 邓华红. 三阴性乳腺癌血清外泌体和组织中 lncRNA TINCR 的表达及临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(7): 808-813. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.07.008.
- [51] 曹雷雨, 刘伟, 高艳, 等. 三阴性乳腺癌免疫相关 lncRNA 筛选及预后预测模型构建 [J]. *山东医药*, 2023, 63(15): 28-32. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2023.15.006.

(收稿日期: 2024-06-17)

(上接 1384 页)

- [13] Deng X, Xu H, Pan C, et al. Moderate mechanical strain and exercise reduce inflammation and excessive autophagy in osteoarthritis by downregulating mitofusin 2 [J]. *Life Sci*, 2023, 332(1): 122020-122033. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.122020.
- [14] Tang L, Sim I, Moqbel S, et al. Dapansutrile ameliorated chondrocyte inflammation and osteoarthritis through suppression of MAPK signaling pathway [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41(1): 1-11. DOI: 10.1177/09603271221145401.
- [15] Hou W, Huang L, Huang H, et al. Bioactivities and mechanisms of action of sinomenine and its derivatives: A comprehensive review [J]. *Molecules*, 2024, 29(2): 540-590. DOI: 10.3390/molecules29020540.
- [16] Lei YH, Hu XX, Wen HJ, et al. Bone protective effect of sinomenine against monosodium iodoacetate induced knee and hip injury in rat model: An inflammatory pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2024, 39(1): 390924-390934. DOI: 10.1590/acb390924.
- [17] Dong HC, Li PN, Chen CJ, et al. Sinomenine attenuates cartilage degeneration by regulating miR-223-3p/NLRP3 inflammasome signaling [J]. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1265-1275. DOI: 10.1007/s10753-019-00986-3.
- [18] Wu Y, Lin Z, Yan Z, et al. Sinomenine contributes to the inhibition of the inflammatory response and the improvement of osteoarthritis in mouse-cartilage cells by acting on the Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75(1): 105715. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105715.
- [19] Zhang X, Zhang H, Gao Y, et al. Forsythoside A regulates autophagy and apoptosis through the AMPK/mTOR/ULK1 pathway and alleviates inflammatory damage in MAC-T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118(1): 110053. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110053.
- [20] Huang Z, Zhou X, Zhang X, et al. Pien-Tze-Huang, a Chinese patent formula, attenuates NLRP3 inflammasome-related neuroinflammation by enhancing autophagy via the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141(1): 111814-111824. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111814.
- [21] Zhang GZ, Chen HW, Deng YJ, et al. BRD4 inhibition suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy during intervertebral disc Degeneration: an in vitro and in vivo study [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 1(1): 9181412-9181438. DOI: 10.1155/2022/9181412.
- [22] Wang Y, Xu Y, Tan J, et al. Anti-inflammation is an important way that Qingre-Huazhuo-Jiangsuan recipe treats acute gouty arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1268641-1268666. DOI: 10.3389/fphar.2023.1268641.

(收稿日期: 2024-05-31)