

基于 p53/p21 信号通路探讨益气续骨合剂含药血清对膝骨关节炎大鼠软骨细胞衰老的影响

吴祖贵¹, 朱 月¹, 李 皎¹, 袁 蓉¹, 李俊毅², 李聪聪³, 申 震^{1*}, 郭 英^{1*}
(1. 云南中医药大学第三附属医院/昆明市中医医院, 云南 昆明 650500; 2. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471000; 3. 浙江中医药大学第一附属医院, 浙江 杭州 310000)

摘要: **目的** 研究益气续骨合剂延缓膝骨关节炎 (KOA) 大鼠软骨细胞衰老的作用机制。**方法** SD 大鼠分别灌胃给予生理盐水、益气续骨合剂 (4.05、16.2 g/kg) 和盐酸氨基葡萄糖 (0.3 g/kg), 连续给药 1 周后收集含药血清。将软骨细胞分为正常组、模型组、盐酸氨基葡萄糖组和益气续骨合剂低、高剂量组, 给予含药血清干预。CCK8 法检测软骨细胞增殖率; ELISA 法检测软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平; DCFH-DA 荧光探针检测软骨细胞 ROS 水平; 流式细胞术检测软骨细胞凋亡和细胞周期; SA- β -gal 染色及 γ -H2AX 蛋白免疫荧光染色观察软骨细胞衰老情况; RT-qPCR、Western blot 法检测软骨细胞 p53、p21、CDK4、CyclinD1、Collagen II、ACAN mRNA 及蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 盐酸氨基葡萄糖组和益气续骨合剂各剂量组软骨细胞增殖率升高 ($P<0.01$), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$), ROS 水平及软骨细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), 软骨细胞 G₀/G₁ 期比例降低 ($P<0.01$), S 期、G₂/M 期比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 软骨细胞 SA- β -gal 染色阳性比例及 γ -H2AX 蛋白免疫荧光强度降低 ($P<0.01$), p53、p21 mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), CDK4、CyclinD1、Collagen II、ACAN mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 益气续骨合剂能延缓 KOA 大鼠软骨细胞衰老, 其作用机制可能与调控 p53/p21 信号通路有关。

关键词: 益气续骨合剂; 膝骨关节炎; 细胞衰老; 细胞凋亡; p53/p21 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2025)12-3959-09
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.011

Effects of Yiqi Xugu Heji-medicated serum on chondrocyte senescence in a rat model of knee osteoarthritis via p53/p21 signaling pathway

WU Zu-gui¹, ZHU Yue¹, LI Jiao¹, YUAN Rong¹, LI Jun-yi², LI Cong-cong³, SHEN Zhen^{1*}, GUO Ying^{1*}

(1. The Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Henan Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 471000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the mechanism of Yiqi Xugu Heji in delaying chondrocyte senescence in a rat model of knee osteoarthritis (KOA). **METHODS** SD rats were gavage administered with normal saline, or Yiqi Xugu Heji (4.05 g/kg, 16.2 g/kg), or glucosamine hydrochloride (0.3 g/kg), respectively, followed by the collection of serum containing drugs after one week of consecutive administration for further analysis. Chondrocytes

收稿日期: 2025-01-22
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82360943); 云南省基础研究专项 (202501AU070167); 云南省科技厅项目-中医联合专项 (202101AZ070001-170, 202301AZ070001-094, 202301AZ070001-015); 云南省临床医学中心科研项目 (2024YNLCYXZX0293)
作者简介: 吴祖贵 (1993—), 男, 博士, 博士后, 从事中医药防治骨关节病的临床与基础研究。Tel: (0871) 63808761, E-mail: 929390400@qq.com
* 通信作者: 申 震 (1989—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医药防治骨伤科疾病的临床与基础研究。Tel: (0871) 63808761, E-mail: 863491423@qq.com
郭 英 (1970—), 男, 硕士, 主任医师, 从事中医药防治骨关节病的临床与基础研究。Tel: (0871) 63808761, E-mail: gy1200@139.com

were divided into the normal group, the model group, the glucosamine hydrochloride group and the low-dose and high-dose Yiqi Xugu Heji groups for medicated serum intervention. The chondrocyte proliferation rate was assessed using CCK8 assay. ELISA measured levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in chondrocytes, while ROS levels were quantified using DCFH-DA fluorescent probe. Flow cytometry analyzed apoptosis and cell cycle distribution. Senescence was evaluated *via* SA- β -gal staining and γ -H2AX protein immunofluorescence staining. RT-qPCR and Western blot detected the mRNA and protein expressions of p53, p21, CDK4, CyclinD1, Collagen II and ACAN.

RESULTS Compared to the model group, chondrocytes treated with glucosamine hydrochloride or Yiqi Xugu Heji exhibited enhanced proliferation ($P<0.01$); reduced IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, ROS levels, and apoptosis ($P<0.01$); decreased G₀/G₁ phase cells ($P<0.01$) and increased S and G₂/M phase cells ($P<0.05$, $P<0.01$); lower SA- β -gal positivity and γ -H2AX intensity ($P<0.01$); downregulated p53 and p21 mRNA and protein expressions, and upregulated CDK4, CyclinD1, Collagen II and ACAN mRNA and protein expressions ($P<0.05$, $P<0.01$).

CONCLUSION Yiqi Xugu Heji may delay the chondrocyte senescence in KOA rats, potentially through modulation of the p53/p21 signaling pathway.

KEY WORDS: Yiqi Xugu Heji; knee osteoarthritis; cellular senescence; cell apoptosis; p53/p21 signaling pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是最常见的一种退行性关节疾病, 以疼痛、畸形和关节功能受限为主要表现, 是造成中老年人群残疾的主要原因^[1-2]。我国症状性 KOA 的发病率约为 14.6%, 且女性发病率高于男性^[3-4]。软骨的退行性改变是 KOA 最核心的病理性改变^[5]。软骨细胞是软骨内唯一的功能细胞, 其损伤和衰老是 KOA 病理进程的关键环节^[6-8]。衰老的软骨细胞增殖及自我修复能力下降, 分泌 II 型胶原蛋白 (collagen type II, Collagen II) 及聚集蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN) 的能力也下降, 细胞外基质合成减少, 并且衰老的软骨细胞会进一步分泌衰老相关分泌表型, 导致细胞外基质降解, 进而导致软骨降解^[9-10]。肿瘤蛋白 53 (tumor protein53, p53) /细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21) 是调控细胞衰老的关键通路之一, p53 磷酸化会激活下游靶基因 p21, 参与细胞的增殖、凋亡、衰老等多个生物学调控过程^[11]。因此, 延缓软骨细胞衰老, 抑制软骨细胞凋亡, 减少细胞外基质及关节软骨的降解, 是改善 KOA 的重要途径。

益气续骨合剂是云南中医药大学第三附属医院院内制剂, 在临床运用 60 余年, 该方由骨碎补、续断片、党参片、制何首乌、当归、赤芍、茯苓、白术、法半夏、陈皮、木香、大枣、甘草 13 味药组成, 具有滋补肝肾、益精填髓、补益气血、祛瘀通络之功效, 课题组前期研究表明其在治疗 KOA 方面疗效显著^[12-13], 但是其作用机制尚不明确。

因此, 本研究拟以软骨细胞衰老为切入点, 探讨益气续骨合剂能否通过调控 p53/p21 信号通路延缓软骨细胞衰老, 发挥对软骨细胞的保护作用, 以期为揭示益气续骨合剂防治 KOA 的分子生物学机制及探索其可能的作用靶点提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (220 \pm 20) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2024-0001], 饲养于云南中医药大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (滇) 2022-0004]。实验方案及实验操作通过云南中医药大学实验动物伦理委员会审查 (伦理批号 R-0620245054), 并符合《实验动物管理和使用指南》相关要求。

1.2 药物与试剂 益气续骨合剂 (由骨碎补、续断片、党参片、制何首乌、当归、赤芍、茯苓、白术、法半夏、陈皮、木香、大枣、甘草组成, 250 mL/瓶, 批号 2024102101) 由云南中医药大学第三附属医院制剂中心提供; 盐酸氨基葡萄糖 (国药准字 HC20140008, 澳美制药厂有限公司)。CCK8 试剂盒、ROS 荧光试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C0038、S0033S); TRIZol 试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号 15596026CN); RT-qPCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 货号 AQ211); 流式细胞周期试剂盒、流式细胞凋亡试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司, 货号 CCS012、AP107); SA- β -gal 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号

G1580); 白介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 货号 RA20020、RA20607、RA20035); γ -H2AX、p53、CDK4、CyclinD1、Collagen II 抗体 (杭州华安生物技术股份公司, 货号 SR33-09、ET1602-38、ET1612-23、ET1601-21、PSH06-62); p21、ACAN 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 28248-1-AP、68350-1-IG)。

1.3 仪器 Step One Plus 实时荧光定量基因扩增仪、ECS000282 紫外超微量分光光度计、Varioskan Flash 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5424 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); X51 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Mini Protean3 SDS-PAGE 电泳仪、170-3930 湿法转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5200 化学发光检测系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清及空白血清制备 40 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组、盐酸氨基葡萄糖组和益气续骨合剂低、高剂量组, 每组 10 只。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算, 益气续骨合剂临床等效剂量为 8.1 g/kg, 故设益气续骨合剂低、高剂量为 4.05、16.2 g/kg; 盐酸氨基葡萄糖给药剂量为 0.3 g/kg。各给药组灌胃给药, 正常组灌胃给予 10 mL/kg 生理盐水, 每天 1 次, 连续 1 周, 末次给药 2 h 后, 无菌条件下采集腹主动脉血, 室温静置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清 (空白血清、盐酸氨基葡萄糖含药血清、益气续骨合剂含药血清), 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 分装后于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 KOA 大鼠模型制备及软骨细胞分离 10 只 SD 大鼠随机分为正常组和模型组, 每组 5 只。正常组大鼠不造模, 模型组大鼠采用前交叉韧带离断法 (anterior cruciate ligament transection, ACLT) 建立 KOA 模型^[14], 腹腔注射麻醉后, 右膝关节备皮并消毒, 使用手术尖刀从髌骨内缘逐层划开皮肤及皮下组织, 从内侧胫骨平台与股骨内髁之间的间隙进入膝关节腔, 离断前交叉韧带, 前抽屉试验阳性说明手术成功。造模 4 周后在无菌条件下分离膝关节股骨髁软骨, 并使用 II 型胶原酶提取软骨细胞, 使用 DMEM 培养基培养, 传代至 P3 代软骨细胞后进行实验。

2.3 细胞分组及干预 取 P3 代软骨细胞分为 5 组, 按照文献 [15] 中所述的方法, 分别在不同的分组中加入空白血清及含药血清。空白组: 空白组大鼠的 P3 代软骨细胞, 加入 10% 空白血清; 模型组: 模型组大鼠的 P3 代软骨细胞, 加入 10% 空白血清; 益气续骨合剂低、高剂量组: 模型组大鼠的 P3 代软骨细胞, 加入 10% 益气续骨合剂低、高剂量含药血清; 氨基葡萄糖组: 模型组大鼠的 P3 代软骨细胞, 加入 10% 氨基葡萄糖含药血清。

2.4 指标检测

2.4.1 软骨细胞鉴定 将空白组的 P3 代软骨细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 12 孔板中, 干预结束后在 12 孔板中进行染色, 使用 Collagen II 及 ACAN 免疫荧光染色鉴定软骨细胞。4% 多聚甲醛固定软骨细胞后, 弃去多聚甲醛, 加入 0.1% TritonX-100 反应 20 min, 5% BSA 封闭 1 h, 加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 回收一抗后加二抗孵育 30 min, 干燥后封片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.4.2 CCK8 法检测软骨细胞增殖率 将 P3 代软骨细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中, 按照“2.3”项下分组、干预, 分别培养 24、48 h, 干预结束后在 96 孔板中使用 CCK8 试剂盒检测软骨细胞增殖率, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 计算细胞增殖率, 公式为细胞增殖率 = [(OD_{给药组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组})] $\times 100\%$ 。

2.4.3 ELISA 法检测软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 P3 代软骨细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板, 按照“2.3”项下分组, 干预 48 h 后收集各组细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 设置标准品孔及待测样品孔, 孵育结束后, 在酶标仪 450 nm 波长处测定 OD 值, 根据标准品孔的值建立标准曲线, 计算各组软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.4.4 DCFH-DA 荧光探针检测软骨细胞 ROS 水平 将 P3 代软骨细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 24 孔板中, 按照“2.3”项下分组, 干预 48 h 后按照 DCFH-DA 荧光探针试剂盒说明书在 24 孔板中进行染色, 加入荧光探针孵育 30 min, 加入细胞培养液于荧光显微镜下观察并拍照, 通过 Image J 软件分析平均荧光强度。

2.4.5 流式细胞术检测软骨细胞凋亡和细胞周期 将 P3 代软骨细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 按照“2.3”项下分组, 干预 48 h 后

收集各组细胞，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 试剂，避光孵育 15 min，于流式细胞仪上机检测软骨细胞凋亡情况。收集各组细胞，加入 1 mL DNA Staining solution 和 10 μ L Permeabilization solution 试剂，涡旋振荡混匀后，孵育 30 min 后于流式细胞仪上机检测软骨细胞周期情况。

2.4.6 SA- β -gal 活性检测 P3 代软骨细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，按照“2.3”项下分组，干预 48 h 后在 6 孔板中进行染色，PBS 清洗后用 1 mL β -gal 固定液室温固定 15 min，PBS 清洗后加入按比例配制的 SA- β -gal 染色工作液，室温孵育 24 h（封板膜封住），于光学显微镜下观察并拍照。通过 Image J 软件分析阳性染色区域平均光密度值（average optical density, AOD）。

2.4.7 γ -H2AX 免疫荧光染色 将 P3 代软骨细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 24 孔板中，按照“2.3”项下分组，干预 48 h 后在孔板中进行染色，用 4% 多聚甲醛固定软骨细胞，PBS 清洗后加入 TritonX-100 反应 30 min，5% BSA 封闭 1 h，加入 γ -H2AX 荧光一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBS 清洗后加入荧光二抗避光孵育 2 h，滴加抗荧光淬灭剂（含 DAPI），于荧光显微镜下观察并拍照。通过 Image J 软件分析平均荧光强度。

2.4.8 RT-qPCR 检测软骨细胞 *p53*、*p21*、*CDK4*、*CyclinD1*、*Collagen II*、*ACAN* mRNA 表达 P3 代软骨细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，按照“2.3”项下分组，干预 48 h 后收集各组细胞，使用 TRIzol 法提取总 RNA，按照反转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA，按照 PerfectStart[®] Uni RT-qPCR 试剂盒反应体系，配制反应体系后上机检测。通过 NCBI Genbank 检索基因序列，使用 NCBI Primer BLAST 软件对筛选基因引物片段进行核对，引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成，序列见表 1。以 β -actin 为内参，绘制熔解曲线，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *p53*、*p21*、*CDK4*、*CyclinD1*、*Collagen II*、*ACAN* mRNA 相对表达量。

2.4.9 Western blot 法检测软骨细胞 *p53*、*p21*、*CDK4*、*CyclinD1*、*CollagenII*、*ACAN* 蛋白表达 P3 代软骨细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，按照“2.3”项下分组，干预 48 h 后收集各组细胞，使用 RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，调整各样本浓度一致。蛋白变性后，上样进行凝胶电泳，将蛋白转至 PVDF 膜上，使用封闭液封闭。加入按比例配制的一抗工作液，4 $^{\circ}$ C 孵

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
<i>p53</i>	正向 ACAAGAAGTCACAACACA
	反向 GTCCAGATACTCAGCATA
<i>p21</i>	正向 ATGTCCGATCCTGGTGATGTC
	反向 CGGCTCAACTGCTCACTGTC
<i>CDK4</i>	正向 GACCTGAAGCCAGAGAAC
	反向 TACCAGAGCGTAACAACC
<i>CyclinD1</i>	正向 ATTTC AACCCACCCTCC
	反向 TCCACTTCCCCCTTCTCC
<i>Collagen II</i>	正向 CTCCCAGAACATCACCTACCAC
	反向 CCATCCTTCAGGGAGTGTA
<i>ACAN</i>	正向 GTTGTATTCCACTACCGCCCG
	反向 TCACACTGCTCATAGCCTGCC
<i>β-actin</i>	正向 GCCACTGCCGCATCCTCT
	反向 GTGGAAGAGAGCCTCGGGG

育过夜，洗膜后加入二抗常温孵育 2 h。使用超敏 ECL 发光液浸泡蛋白条带，并在发光成像系统中曝光、显影，通过 Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值，以 β -actin 为内参，计算 *p53*、*p21*、*CDK4*、*CyclinD1*、*Collagen II*、*ACAN* 蛋白相对表达量。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，两两比较采用 LSD 法，若方差不齐，采用 Games-Howell 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨细胞鉴定 以空白组为例，Collagen II 及 ACAN 免疫荧光染色均可见软骨细胞的细胞质呈现出红色的荧光，细胞核可见 DAPI 复染，培养的软骨细胞符合 Collagen II 及 ACAN 免疫荧光染色的特征，表明所提取的细胞为软骨细胞，见图 1。

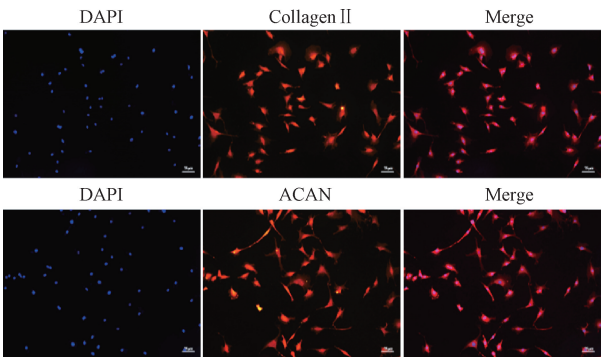


图 1 空白组大鼠软骨细胞 Collagen II、ACAN 免疫荧光染色
Fig.1 Immunofluorescence staining of Collagen II and ACAN in chondrocytes of knee osteoarthritis rats in blank group

3.2 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞增殖率的影响 与正常组比较,模型组大鼠软骨细胞增殖率降低 ($P<0.01$);与模型组比较,益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞增殖率升高 ($P<0.01$),见表 2。

3.3 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞炎性因子水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低

表 3 各组软骨细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	33.69 \pm 2.88	10.20 \pm 2.01	26.15 \pm 3.26
模型组	75.88 \pm 2.72 ^{**}	29.80 \pm 2.42 ^{**}	57.58 \pm 5.60 ^{**}
益气续骨合剂低剂量组	58.45 \pm 3.27 ^{##}	26.19 \pm 1.93 ^{##}	46.02 \pm 3.18 ^{##}
益气续骨合剂高剂量组	52.78 \pm 4.22 ^{##}	24.16 \pm 1.95 ^{##}	40.34 \pm 3.88 ^{##}
盐酸氨基葡萄糖组	50.11 \pm 2.34 ^{##}	23.52 \pm 1.82 ^{##}	38.71 \pm 3.31 ^{##}

注:与正常组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.4 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞 ROS 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠软骨细胞 ROS 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 ROS 水平降低 ($P<0.01$),见图 2、表 4。

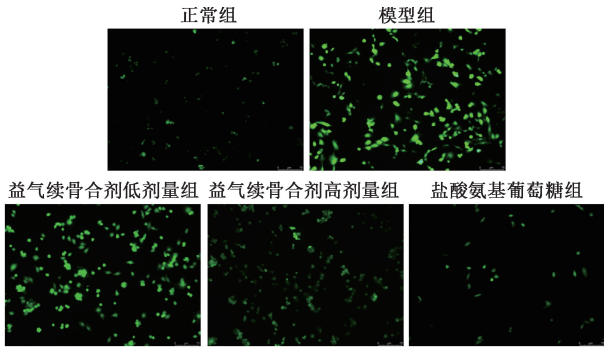


图 2 各组软骨细胞 ROS 荧光染色

Fig. 2 ROS fluorescence staining of chondrocytes in each group

表 4 各组软骨细胞 ROS 荧光相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Comparison of relative expression of ROS fluorescence in chondrocytes of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	ROS 荧光相对表达量
正常组	1.00 \pm 0.10
模型组	3.36 \pm 0.26 ^{**}
益气续骨合剂低剂量组	2.66 \pm 0.15 ^{##}
益气续骨合剂高剂量组	2.16 \pm 0.11 ^{##}
盐酸氨基葡萄糖组	1.87 \pm 0.13 ^{##}

注:与正常组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

表 2 各组软骨细胞增殖率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Comparison of chondrocyte proliferation rate in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	培养 24 h	培养 48 h
正常组	100 \pm 0.01	100 \pm 0.02
模型组	60.66 \pm 1.52 ^{**}	55.33 \pm 2.51 ^{**}
益气续骨合剂低剂量组	67.33 \pm 1.52 ^{##}	75.00 \pm 3.60 ^{##}
益气续骨合剂高剂量组	73.66 \pm 2.08 ^{##}	82.33 \pm 2.51 ^{##}
盐酸氨基葡萄糖组	78.33 \pm 3.05 ^{##}	87.66 \pm 1.52 ^{##}

注:与正常组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

($P<0.01$),见表 3。

3.5 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞凋亡及细胞周期的影响 流式细胞凋亡检测结果显示,与正常组比较,模型组大鼠软骨细胞凋亡率升高 ($P<0.01$);与模型组比较,益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞凋亡率降低 ($P<0.01$),见图 3、表 5。

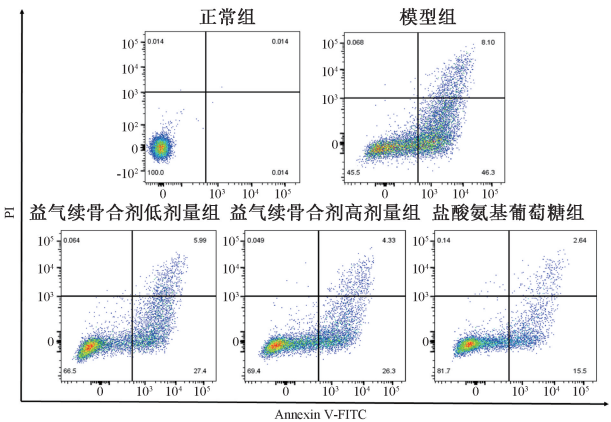


图 3 各组软骨细胞凋亡流式图

Fig. 3 Flow chart of chondrocyte apoptosis in each group

流式细胞周期检测结果显示,与正常组比较,模型组大鼠软骨细胞 G₀/G₁ 期比例升高 ($P<0.01$),S 期、G₂/M 期比例降低 ($P<0.01$);与模型组比较,益气续骨合剂各剂量组及盐酸氨基葡萄糖大鼠软骨细胞 G₀/G₁ 期比例降低 ($P<0.01$),S 期、G₂/M 期比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),说明益气续骨合剂含药血清能够刺激软骨细胞从 G₀/G₁

表 5 各组软骨细胞周期与凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Comparison of chondrocyte cycle and apoptosis rate in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	凋亡率/%
正常组	79.11±0.54	12.88±0.38	8.01±0.26	0.03±0.01
模型组	90.82±0.71**	4.52±0.58**	4.64±0.43**	50.26±6.04**
益气续骨合剂低剂量组	88.66±0.40##	5.73±0.08#	5.60±0.36#	33.72±5.29##
益气续骨合剂高剂量组	85.40±0.25##	6.44±0.66##	8.14±0.88##	27.34±4.28##
盐酸氨基葡萄糖组	85.78±0.60##	6.80±0.44##	7.41±0.93##	20.15±4.13##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

期进入 S 期和 G₂/M 期，减少软骨细胞周期阻滞，见图 4、表 5。

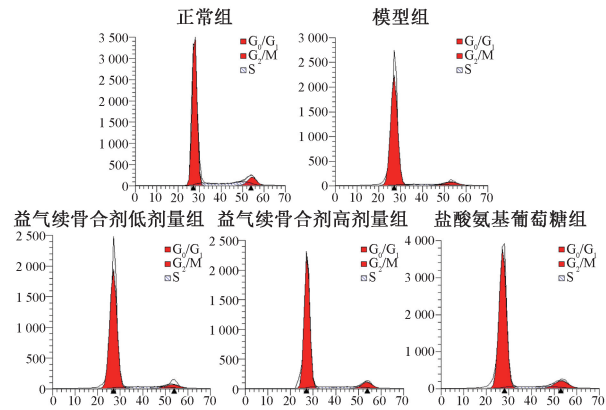


图 4 各组软骨细胞周期流式图

Fig. 4 Flow chart of chondrocytes cycle in each group

3.6 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞 SA-β-gal 活性的影响 与正常组比较，模型组大鼠软骨细胞 SA-β-gal 活性升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 SA-β-gal 活性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 5、表 6。

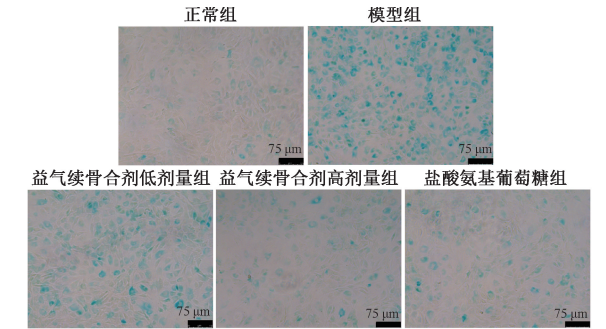


图 5 各组软骨细胞 SA-β-gal 染色

Fig. 5 SA-β-gal staining of chondrocytes in each group

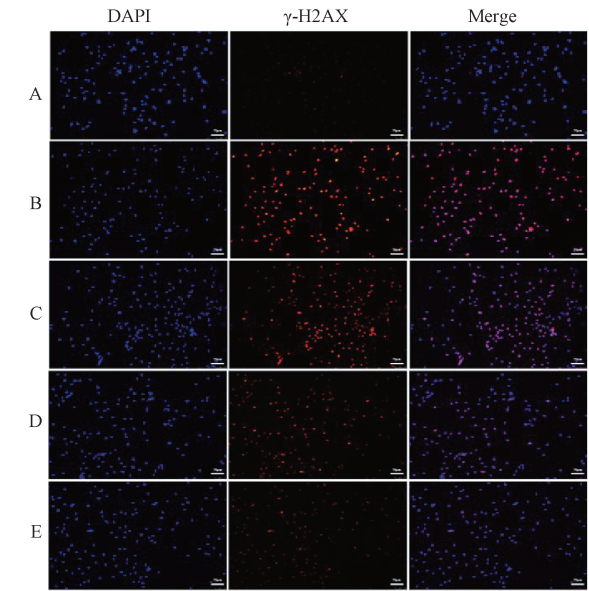
3.7 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞 γ-H2AX 蛋白荧光表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠软骨细胞 γ-H2AX 蛋白荧光表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 γ-H2AX 蛋白荧光表达降低 ($P<0.01$)，见图 6、表 7。

表 6 各组软骨细胞 SA-β-gal 活性比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Comparison of SA-β-gal activity of chondrocytes in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	SA-β-gal 活性(AOD)
正常组	0.11±0.01
模型组	0.19±0.01**
益气续骨合剂低剂量组	0.16±0.02#
益气续骨合剂高剂量组	0.13±0.02##
盐酸氨基葡萄糖组	0.12±0.01##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C~D 为益气续骨合剂低、高剂量组，E 为盐酸氨基葡萄糖组。

图 6 各组软骨细胞 γ-H2AX 免疫荧光染色

Fig. 6 Immunofluorescence staining of γ-H2AX in chondrocytes of each group

3.8 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞衰老相关基因 mRNA 表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠软骨细胞 p53、p21 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，CDK4、CyclinD1、Collagen II、ACAN mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 p53、p21 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，CDK4、

表 7 各组软骨细胞 γ -H2AX 蛋白荧光表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 7 Comparison of γ -H2AX protein fluorescence expression in chondrocytes of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	γ -H2AX 荧光表达相对强度
正常组	1.00±0.01
模型组	4.03±0.24**
益气续骨合剂低剂量组	3.46±0.22##
益气续骨合剂高剂量组	2.65±0.28##
盐酸氨基葡萄糖组	2.27±0.17##

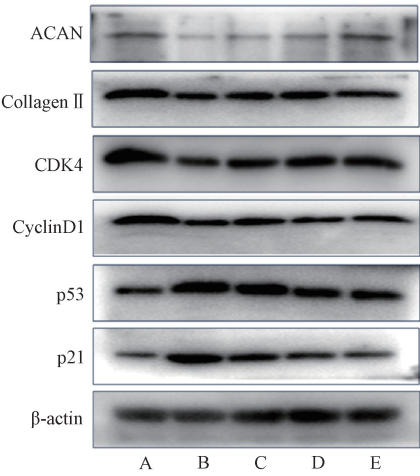
注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

表 8 各组软骨细胞 $p53$ 、 $p21$ 、 $CDK4$ 、 $CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Comparison of mRNA expressions of $p53$, $p21$, $CDK4$, $CyclinD1$, $Collagen\ II$ and $ACAN$ in chondrocytes of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	$p53$	$p21$	$CDK4$	$CyclinD1$	$Collagen\ II$	$ACAN$
正常组	1.00±0.13	1.01±0.17	1.01±0.13	1.00±0.02	1.01±0.04	1.01±0.13
模型组	3.96±0.97**	3.80±0.48**	0.25±0.01**	0.26±0.02**	0.28±0.12**	0.28±0.13**
益气续骨合剂低剂量组	2.72±0.39#	2.84±0.15##	0.57±0.07##	0.53±0.02##	0.56±0.06#	0.49±0.06#
益气续骨合剂高剂量组	2.13±0.82#	2.09±0.16##	0.76±0.11##	0.81±0.07##	0.76±0.17##	0.76±0.09##
盐酸氨基葡萄糖组	2.03±0.24#	1.96±0.25##	0.71±0.07##	0.75±0.09##	0.78±0.04##	0.74±0.02##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C~D 为益气续骨合剂低、高剂量组，E 为盐酸氨基葡萄糖组。

图 7 各组软骨细胞 $p53$ 、 $p21$ 、 $CDK4$ 、 $CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ 蛋白条带图

Fig. 7 Protein bands of $p53$, $p21$, $CDK4$, $CyclinD1$, $Collagen\ II$ and $ACAN$ in chondrocytes of each group

表 9 各组软骨细胞 $p53$ 、 $p21$ 、 $CDK4$ 、 $CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 9 Comparison of protein expressions of $p53$, $p21$, $CDK4$, $CyclinD1$, $Collagen\ II$ and $ACAN$ in chondrocytes of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	$p53$	$p21$	$CDK4$	$CyclinD1$	$Collagen\ II$	$ACAN$
正常组	1.00±0.11	1.00±0.15	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.04	1.00±0.10
模型组	3.06±0.30**	3.01±0.30**	0.35±0.01**	0.36±0.04**	0.35±0.04**	0.36±0.07**
益气续骨合剂低剂量组	2.30±0.14##	2.30±0.02##	0.59±0.05##	0.60±0.09##	0.54±0.07##	0.56±0.08##
益气续骨合剂高剂量组	1.89±0.18##	1.76±0.15##	0.79±0.06##	0.79±0.09##	0.74±0.02##	0.80±0.04##
盐酸氨基葡萄糖组	1.86±0.18##	1.70±0.11##	0.77±0.03##	0.80±0.08##	0.76±0.02##	0.82±0.03##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

$CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 8。

3.9 益气续骨合剂含药血清对软骨细胞衰老相关蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠软骨细胞 $p53$ 、 $p21$ 蛋白表达升高 ($P<0.01$)， $CDK4$ 、 $CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，益气续骨合剂各剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠软骨细胞 $p53$ 、 $p21$ 蛋白表达降低 ($P<0.01$)， $CDK4$ 、 $CyclinD1$ 、 $Collagen\ II$ 、 $ACAN$ 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，见图 7、表 9。

4 讨论

KOA 作为常见的退行性关节疾病，软骨退变是其核心病理改变。KOA 属于中医学“痹症”“骨痹”的范畴，肝肾亏虚、气血不足、筋脉瘀滞是膝痹的基本病机，肝肾亏虚，气血不足为本，筋脉瘀滞为标，邪气侵入肢体关节后，筋骨失养，日久瘀滞于肌肉关节，表现出骨节屈伸不利、变形、疼痛等症状。治疗应以滋补肝肾、补益气血、活血通络、化瘀止痛为主。益气续骨合剂方中骨碎补、制首乌、续断具有补肝肾、强筋骨、益精血之效，三药共为君药；党参、白术、茯苓具有气血双补、健脾益气之效，三药共为臣药；陈皮、木香具有行气止痛之效，半夏具有燥湿化痰行气、消痞散结之效，当归、赤芍、大枣具有补血行血之效，诸药共为佐药；甘草调和诸药。本方兼具滋补肝肾、益精填髓、补益气血、祛瘀通络止痛的功效，在临床上用于治疗 KOA 及骨折等疾病，具有良好疗效，并且前期研究发现其具有减轻软骨损伤及保护软骨的作用^[12,16-17]。

近年来，细胞衰老被认为是推动 KOA 发生发展的重要机制之一^[18]。衰老细胞主要特征包括永久性细胞周期停滞、端粒缩短、线粒体功能障碍和衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype, SASP），这些变化不仅导致软骨细胞的稳态失衡，还通过旁分泌效应影响周围正常细胞，加剧关节内炎症及基质降解^[19]。在 KOA 病变过程中，软骨细胞及滑膜细胞均有衰老表型，这些衰老细胞通过 SASP 分泌大量炎症因子，例如 IL-6、IL-8、TNF- α 、基质金属蛋白酶及 ADAMTS 家族蛋白，加速细胞外基质的降解和胶原纤维断裂，进一步降低软骨修复能力，还可激活炎症信号通路并放大关节炎症反应，形成“衰老—炎症—退变”的恶性循环^[20]。SA- β -gal 染色和 γ -H2AX 免疫荧光染色是衰老表型的重要指标。本实验结果显示，益气续骨合剂含药血清可以降低软骨细胞的 SA- β -gal 染色和 γ -H2AX 免疫荧光染色强度，表明其具有延缓软骨细胞衰老的作用。研究发现，KOA 患者的关节软骨和滑膜中均可检测到 p53 与 p21 的高表达，而 p53/p21 通路的激活是软骨细胞衰老的重要分子机制之一^[21]。通过激活 p53/p21 信号通路，进而抑制周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinases, CDK）活性促使软骨细胞阻滞在 G₁ 期，降低软骨细胞的增殖能力，而过度的周期停滞会降低软骨修复能力并加速关节退变^[22]。p53/p21 介

导的细胞衰老不仅表现出增殖停滞，同时还伴随炎症因子和基质金属蛋白酶的持续分泌，进一步激活核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B）和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK）通路，放大炎症反应和基质降解并导致破坏软骨稳态，例如 p21 过表达的软骨细胞分泌大量 IL-6 和 MMP-13，促进软骨基质胶原降解^[23]。此外，在细胞周期循环中，G₀/G₁ 期为细胞 DNA 合成前期，S 期为 DNA 合成期，G₂/M 期为分裂期，S 期是反应细胞增殖的重要指标^[24-25]。本实验结果显示，益气续骨合剂含药血清可以降低 p53/p21 的表达并调控细胞周期及其相关蛋白的表达，而细胞周期与衰老密切相关，结果表明益气续骨合剂可能通过 p53/p21 信号通路调控细胞周期参与调控细胞衰老。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 是 SASP 的重要因子，并且 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 可以加剧细胞的氧化应激反应，而氧化应激也是导致软骨细胞衰老的重要因素。本实验结果显示，益气续骨合剂含药血清可以降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 ROS 水平，表明降低炎症水平及减轻氧化应激反应可能也是益气续骨合剂调控软骨细胞衰老的作用机制之一。

综上所述，益气续骨合剂含药血清可能通过抑制 p53/p21 通路，抑制 SASP 的分泌，减轻细胞周期阻滞，促进软骨细胞周期的进程，促进软骨细胞增殖及抑制软骨细胞凋亡，维持细胞外基质的合成与分解代谢平衡，在一定程度上延缓软骨细胞衰老。

利益冲突：本文不存在任何利益冲突。

参考文献：

[1] Katz J N, Arant K R, Loeser R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(6): 568-578.

[2] Arden N K, Perry T A, Bannuru R R, *et al.* Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCO and OARSI 2019 guidelines[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(1): 59-66.

[3] Li D, Li S, Chen Q, *et al.* The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in relation to age, sex, area, region, and body mass index in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 304.

[4] 王 斌, 邢 丹, 董圣杰, 等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2018, 18(2): 134-142.

[5] 张洪美. 膝骨关节炎的规范诊治与阶梯治疗[J]. *中国骨伤*,

2019, 32(5): 391-395.

[6] McCulloch K, Litherland G J, Rai T S. Cellular senescence in osteoarthritis pathology[J]. *Aging Cell*, 2017, 16 (2): 210-218.

[7] Du X, Liu Z Y, Tao X X, *et al.* Research progress on the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. *Orthop Surg*, 2023, 15(9): 2213-2224.

[8] Coryell P R, Diekman B O, Loeser R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(1): 47-57.

[9] Vinatier C, Domínguez E, Guicheux J, *et al.* Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 706.

[10] Kozhenyakina E, Zhang M, Ionescu A, *et al.* Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(5): 1261-1273.

[11] Chen Q, Sun X, Luo X, *et al.* PIK3R3 inhibits cell senescence through p53/p21 signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 798.

[12] 周 星, 刘维统, 李金磊, 等. 益气续骨合剂联合微骨折术治疗肝肾不足筋脉瘀滞型膝痹的疗效观察[J]. *云南中医中药杂志*, 2018, 39(12): 29-30.

[13] 周 星. 益气续骨合剂联合 PRP 治疗 Kellgren-Lawrence I~Ⅲ级膝 OA 的临床研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.

[14] 张 立, 王培民. 膝骨关节炎动物模型的选择[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(7): 782-786.

[15] 林陶秀, 张文娟, 张悦健, 等. 最佳中药含药血清浓度的筛选方法研究现状[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 195-202.

[16] 王 琪, 郭 磊, 白 平, 等. 益气续骨合剂加虫类通络方在踝关节骨折术后康复治疗中的应用[J]. *中医正骨*, 2021, 33(7): 17-22.

[17] Wu Z, Xu H, Qiao B, *et al.* Yiqi Xugu HeJi restores cartilage metabolic homeostasis via AKT1-Thr473 activation in osteoarthritis[J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157228.

[18] Yan J, Chen S, Yi Z, *et al.* The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases[J]. *Mol Cells*, 2024, 47(11): 100113.

[19] Jeon O H, Kim C, Laberge R M, *et al.* Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment[J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 775-781.

[20] Han Z, Wang K, Ding S, *et al.* Cross-talk of inflammation and cellular senescence: a new insight into the occurrence and progression of osteoarthritis[J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 69.

[21] Georget M, Defois A, Guiho R, *et al.* Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15 (17): 8576-8593.

[22] Liu Y, Zhang Z, Li T, *et al.* Senescence in osteoarthritis: from mechanism to potential treatment[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 174.

[23] Toh W S, Brittberg M, Farr J, *et al.* Cellular senescence in aging and osteoarthritis[J]. *Acta Orthop*, 2016, 87 (sup363): 6-14.

[24] Wang Z. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3327.

[25] Fischer M, Schade A E, Branigan T B, *et al.* Coordinating gene expression during the cell cycle[J]. *Trends Biochem Sci*, 2022, 47(12): 1009-1022.