

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520101153319

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

黄连素在体外和体内通过激活 Akt 促进骨
性关节炎软骨细胞存活及基质合成

Akt is required for the promotive effect of berberine on cell
survival and matrix production in osteoarthritic
chondrocytes *in vitro* and *in vivo*

赵洪海

指导教师姓名: 夏春教授

专业名称: 外科学(关节外科)

论文提交日期: 2013年4月

论文答辩时间: 2013年 月

学位授予日期: 2013年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013年4月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学附属中山医院关节外科(夏春教授))课题(组)的研究成果,获得(厦门大学附属中山医院关节外科(夏春教授))课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属中山医院关节外科(夏春教授)课题组)实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的： 软骨细胞的凋亡是骨性关节炎（OA）的重要特征。本文探讨黄连素对 OA 软骨细胞增殖与凋亡的影响，并研究其 OA 软骨细胞保护作用的相关机制。

方法： 1、模拟 OA 状态的大鼠软骨细胞部分：(1)大鼠软骨细胞从出生 24 小时内 SD 大鼠的关节中分离，并用 IL-1 β 处理 2 小时模拟 OA 状态；(2) MTT 方法测定黄连素对大鼠模拟 OA 细胞存活率的影响；(3) Western Blotting 分析方法测定黄连素对大鼠模拟 OA 细胞总 Akt, p-Akt 及下游分子（p-p70S6K、p-S6 等），细胞增殖核抗原（PCNA），蛋白多糖（Aggrecan），II 型胶原（Col II）的作用。2、人 OA 软骨细胞部分：(1)在罹患 OA 并行全膝关节置换术病人术中取关节软骨，分离培养人 OA 软骨细胞；(2)CCK8 方法测定黄连素对人 OA 软骨细胞存活率的影响；DAPI 染色方法观察黄连素对人 OA 软骨细胞凋亡的影响；(3)Western Blotting 分析方法测定黄连素对人 OA 细胞 p-Akt 及下游分子（p-p70S6K、p-S6 等），细胞增殖核抗原（PCNA），蛋白多糖（Aggrecan），II 型胶原（Col II）的作用。3、SD 大鼠 OA 模型：(1)采用前交叉韧带横断术+内侧半月板部分切除术（ACLT+MMx）的方法在 SD 大鼠中诱导 OA 模型；(2) 关节腔内注射不同浓度黄连素，术后 10 周处死大鼠，并对大体标本进行观察比较；(3) 对各处理组切片行 HE 染色及番红-O 固绿联合染色，并用 Mankin 评分系统对各处理组进行评分；(4)采用免疫组化方法比较各组间 II 型胶原、p-Akt 及 p-S6 的表达情况。

结果： 1、体外实验（模拟 OA 状态的大鼠软骨细胞部分）：黄连素可以显著激活 Akt/p70S6/S6 通路，并促进模拟 OA 状态的大鼠关节软骨细胞存活及增加基质合成。2、体外实验（人 OA 软骨细胞部分）：黄连素可以激活 Akt/p70S6/S6 通路，并促进人 OA 软骨细胞存活及增加基质合成；3、体内试验（SD 大鼠 OA 模型）：黄连素可以激活 Akt/p70S6/S6 通路，增加基质产生，增加软骨层厚度，起到显著的软骨细胞保护、延缓 OA 病情进展的作用。

结论： 综合体外与体内实验结果：黄连素可以通过对 Akt/p70S6K/S6 信号通路的激活而促进 OA 软骨细胞增殖、促进细胞外基质表达增加，具有显著的细胞保护作用，延缓 OA 病情的进展。黄连素作为局部注射药物应用于 OA 的预防与治疗

具有一定的应用前景。

关键词：黄连素； OA 软骨细胞； Akt； 细胞存活； 细胞外基质

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Introduction: Chondrocyte apoptosis contributes to the pathogenesis of cartilage degeneration in osteoarthritis (OA). We aim to investigate whether berberine could inhibit cell apoptosis, protect OA chondrocytes from cartilage degeneration, and the link to protein kinase B (Akt) signaling in vivo and in vitro.

Methods: Rat chondrocytes were isolated from rat knee joints and pretreated by interleukin-1 β (IL-1 β). Human OA chondrocytes were derived from patients undergoing total knee replacement surgery. The cell viabilities were detected by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, and the apoptotic cells were observed with DAPI staining. Using western blotting analysis, the expression levels of Akt, phosphorylated-Akt (p-Akt), downstream protein targets of Akt, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), aggrecan and type II collagen (Col II) were detected. Meanwhile, constructing rat OA model with the anterior cruciate ligament transaction combining with resection of part of medial menisci was evaluated by a modified Mankin scoring system. Then, after intra-articular injection with different doses of berberine, the effects of berberine on cartilage degeneration and relevant signalings in rat OA model were observed using morphological technique.

Results: Berberine promoted cell viability and matrix production, inhibited cell apoptosis, and activated Akt in IL-1 β -stimulated rat chondrocytes and human OA chondrocytes. Activated Akt by berberine triggered p70S6K/S6 pathway and promoted the expression levels of PCNA, aggrecan and Col II in IL-1 β -stimulated rat chondrocytes and human OA chondrocytes. Furthermore, berberine repaired cartilage degeneration of OA, following the elevation of the expression levels of type II collagen, aggrecan, p-Akt and p-S6 in rat OA model.

Conclusion: Berberine could protect OA chondrocytes from cartilage damage via activating Akt/p70S6/S6 signaling pathway, promoting cell survival and matrix production in viro and in vitro. The resultant chondroprotective effects indicate that

berberine merits consideration as a therapeutic agent in OA.

Key words: Berberine; OA chondrocytes; Akt; cell survival; Matrix production

厦门大学博硕士学位论文摘要库

中文摘要	I
英文摘要	III
第 1 章 引言	1
1.1 黄连素的抗炎研究	2
1.1.1 黄连素通过抑制炎症因子的产生而发挥抗炎作用	2
1.1.2 黄连素通过不同信号通路抑制炎症反应	3
1.1.3 黄连素通过其他途径参与抗炎反应	5
1.2 PI3K/Akt 通路 与 OA	6
1.2.1 PI3K/Akt 信号通路概述	6
1.2.2 PI3K/Akt 信号通路的激活促进软骨细胞存活或者拮抗细胞凋亡	7
1.3 本课题研究的目标、内容与意义	8
第 2 章 实验材料与方法	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 细胞系、SD 大鼠	10
2.1.2 主要细胞分离与培养试剂	10
2.1.3 工具酶和抗体	10
2.1.4 主要化学试剂和耗材	11
2.1.5 主要仪器	12
2.1.6 主要溶液配制	13
2.2 实验方法	15
2.2.1 大鼠软骨细胞分离与培养	15
2.2.2 人软骨细胞分离与培养	16
2.2.3 细胞爬片	17
2.2.4 甲苯胺蓝染色	18
2.2.5 细胞免疫组化（按试剂盒说明书进行操作）	18
2.2.6 大鼠细胞增殖存活率测定（MTT 法） ^[70]	19
2.2.7 人 OA 软骨细胞增殖存活率测定（CCK8 法）	19

2.2.8 大鼠软骨细胞凋亡的形态学观察(DAPI 染色).....	19
2.2.9 总蛋白浓度测定(BCA 法).....	20
2.2.10 Western Blotting 检测蛋白表达.....	20
2.2.11 SD 大鼠 OA 模型实验.....	21
2.2.12 统计学方法.....	26
第 3 章 结果与分析	27
3.1 体外实验	27
3.1.1 黄连素对大鼠模拟 OA 软骨细胞的作用.....	27
3.1.2 黄连素对人 OA 关节软骨细胞的作用.....	34
3.2 体内试验	38
3.2.1 一般观察.....	38
3.2.2 造模成功.....	38
3.2.3 各组间大体标本形态比较.....	39
3.2.4 HE 染色、番红-O 联合固绿染色和 Mankin 评分.....	41
3.2.5 黄连素可以促进大鼠 OA 模型软骨组织蛋白合成.....	43
3.2.6 黄连素可以促进 p-Akt 和 p-S6 表达.....	44
第 4 章 讨论	46
4.1 黄连素对 OA 软骨细胞有促进增殖或者抗凋亡作用.....	46
4.2 黄连素对 OA 软骨细胞有促基质合成作用.....	47
4.3 黄连素通过对 Akt/p70S6/S6 通路的激活引起细胞增殖, 细胞基质合成增加等一系列保护作用。.....	48
第 5 章 结论	51
参 考 文 献	52
附 录 (综 述)	64
致 谢	74
攻读硕士学位期间发表文章及待发表的文章	75

Table of Contents

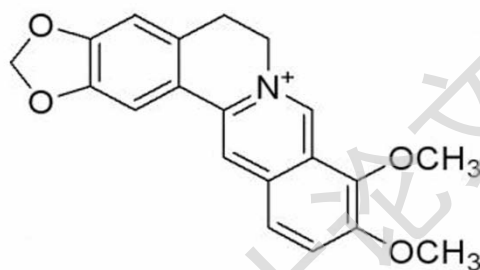
Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Berberine and inflammation.....	2
1.1.1 Berberine inhibits inflammation via the regulation of pro-inflammation cytokines.....	2
1.1.2 Berberine inhibits inflammation via the regulation of various signaling pathways.....	3
1.1.3 Berberine inhibits inflammation in other ways	5
1.2 PI3K/Akt pathway and Osteoarthritis.....	6
1.2.1 PI3K/Akt signaling pathway.....	6
1.2.2 The activation of PI3K/Akt pathway promotes cell survival and prevents chondrocytes from apoptosis.....	7
1.3 Conclucts and Significance.....	8
Chapter 2 Materials and Methods.....	10
2.1 Materials.....	10
2.1.1 Cell lines,SD Rats.....	10
2.1.2 Reagents in cell culture.....	10
2.1.3 Enzyme and antibody.....	10
2.1.4 Reagents and consumptive materials.....	11
2.1.5 Instruments.....	12
2.1.6 Formula of solution.....	13
2.2 Methods.....	15
2.2.1 Culture of Rat chondrocytes.....	15
2.2.2 Culture of human OA chondrocytes.....	16
2.2.3 Slide culture of chondrocytes.....	17
2.2.4 Ammonium methylbenzene blue staining.....	18

2.2.5 Immunohistochemical staining of chondrocytes.....	18
2.2.6 MTT method.....	19
2.2.7 CCK8 method.....	19
2.2.8 DAPI staining.....	19
2.2.9 BCA method.....	20
2.2.10 Western Blotting analysis.....	20
2.2.11 SD Rats OA model.....	21
2.2.12 Statistics.....	26
Chapter 3 Results and analyse.....	27
3.1 In vitro.....	27
3.1.1 The effect of berberine (SD Rat chondrocytes).....	27
3.1.2 The effect of berberine (Human OA chondrocytes).....	34
3.2 In vivo.....	38
3.2.1 Observation of Rats.....	38
3.2.2 The credibility of OA model.....	38
3.2.3 Observation of specimens.....	39
3.2.4 HE staining, Safranin-O-fast green staining and Mankin's score.....	41
3.2.5 Berberine promotes protein synthesis.....	43
3.2.6 Berberine increases the expression of p-Akt and p-S6 in OA model.....	44
Chapter 4 Discussion.....	46
4.1 Berberine promotes OA chondrocytes survival or inhibits cell apoptosis.....	46
4.2 Berberine promotes OA chondrocytes matrix synthesis.....	47
4.3 Berberine promotes OA chondrocytes survival and matrix synthesis via Akt/p70S6/S6 pathway.....	48
Chapter 5 Conclusions.....	51
References.....	52
Review.....	64
Acknowledgments.....	74
Publications and awards.....	75

第1章 引言

黄连素 (berberine), 又称盐酸小檗碱, 主要产于四川, 是黄连、黄柏、三颗针等中草药中的主要成分。黄连中的小檗碱含量很高, 一般在7%以上^[1,2,3,4]。

黄连素的分子式 $[C_{20}H_{18}NO_4]^+Cl^-$, 分子量371.8, 黄色针状结晶, 熔点145℃, 可溶于热水、乙醇, 难溶于乙醚、苯。能与氯仿和丙酮等生成复合物, 其水溶液具有黄绿色荧光。



黄连素的化学结构

中医临床认为黄连无毒, 且具有清热解毒功效, 是很多解毒方剂的重要组成药味。黄连素无味, 对痢疾杆菌、伤寒杆菌、百日咳杆菌、金葡菌、溶血性链球菌等有抑制作用, 是我国应用很久的中药。临床上主要治疗细菌性痢疾、肠炎。近年来, 临床上发现其有许多新用途, 如具有消炎^[5]、抗心律失常^[6]、抗胃溃疡^[7,8]、降低血小板聚集率^[9,10]、降血糖^[11]、降血压^[12]、降血脂^[13]等作用。

炎症是十分常见而又重要的病理过程, 体表的外伤感染和各器官的大部分常见病和多发病都有炎症参与。炎症的发生, 首先是因为有多种损伤因子或致炎因子的存在, 然后由致炎因子引起机体产生和释放各种炎症介质即化学介质, 如 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TGF-\beta$ 、 $IL-8$ 、 $IL-10$ 等^[14]。最终导致包括细胞和组织损伤、血管现象(渗出)、细胞浸润(白细胞游出)和组织增生、修复等炎症的基本病理变化。其中重要的炎性细胞是白细胞; 炎性介质是活性胺类和一些致炎的前列腺素。既往研究表明, 黄连素能通过多种途径对不同的细胞体系发挥显著地的抗炎作用。现分别进行阐述。

1.1 黄连素的抗炎研究

1.1.1 黄连素通过抑制炎症因子的产生而发挥抗炎作用

炎症由多种促炎酶类（如iNOs, COX-2, and PGE2）和细胞因子（如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6）等介导。这些炎症因子在参与炎症发生发展的同时，也可以看作是反映炎症反应程度的指标^[14]。

NO(一氧化氮)在炎症反应当中发挥着重要作用，NO广泛的参与了炎症及自身免疫反应^[15]。诱导型一氧化氮合酶是NO合成的催化酶，因为NO具有广泛和重要的生理和病理学功能，因而近年来诱导型一氧化氮合酶成为抗炎及相关疾病研究的重点。Yiyi Hu^[16]等人发现在小肠内皮细胞当中，黄连素作为主要活性成分之一通过抑制NO的产生而抑制脂多糖(LPS)诱导的炎症反应，对小肠内皮细胞起到保护作用。Jung Chao^[17]发现炎症参与癌症，动脉粥样硬化中的病理过程同诱导型一氧化氮合酶相关。

环氧化酶是一种作用广泛的促炎酶类。环氧化酶(COX)有两种同分异构体，即COX-1和COX-2，是花生四烯酸代谢过程中的限速酶，催化花生四烯酸生成前列腺素E2（PGE2），而后者又可以生成其他前列腺素、前列环素及凝血戊烷。COX-1是COX在体内存在的基本形式，在正常组织及癌组织中表达水平基本相似，参与组织各种代谢，维持自身稳定，如胃肠道细胞保护、血管内平衡和肾功能等，而COX-2在正常组织中极少表达，只有在外界因素的刺激下才会产生；COX-2在前列腺素(PGS)的合成中起关键作用，而PGS在炎症和肿瘤细胞的产生中起重要作用。COX-2可以被多种促炎因子如TNF- α , IL-1, IL-6或LPS等诱导产生^[18,19]。已有多项研究说明可以通过抑制COX-2发挥抗炎作用^[20]。

这些结果与一些关于黄连素的抗炎机制研究的表述不谋而合，这些研究结果表明黄连素可以选择性的抑制COX通路进而减少PGE2等的产生。如Chi-Li Kuo^[21]发现在OC细胞（Oral Cancer cell line）当中，黄连素显著的下调COX-2及PGE2的表达，从而发挥抗炎作用。Jung Chao^[17]亦发现黄连素在多种细胞体系中可以降低COX-2的表达。

炎症是一个多种炎性介质参与的复杂的网络反应。而促炎细胞因子无疑发挥着重要的作用。激活的巨噬细胞可以产生诸如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等细胞因子

[22]。TNF- α 被认为是一个主要的调节者,因为研究发现TNF- α 可以诱导其他炎症因子如IL-6,IL-1 β 等的产生。而IL-1被认为是一种双向作用的炎症因子。IL-1可以通过激活辅助T细胞并促进B细胞成熟而发挥着抗炎作用;另一方面IL-1在炎症疾病中介导炎症发生。IL-6,作为一种促炎细胞因子,可以引起对创伤特别是烧伤的炎症反应^[14]。

Bong-Hyuk Choi^[23]关于3T3-L1细胞的研究发现,黄连素可以显著的降低脂肪合成酶及多种促炎因子如TNF- α , IL-6等的产生。Yiyi Hu^[16]发现在小肠内皮细胞中,黄连素可以通过减少TNF- α , IL-1 α ,ET-1等促炎因子的产生从而在一定程度上减少脂多糖诱导的炎症反应。Sangmin Kim^[24]和Y. B. Shen^[25]也发现黄连素可以减少IL-6的表达从而发挥抗炎作用。

综上所述,在不同的炎症诱导条件下,黄连素可以抑制不同细胞体系中炎症因子的产生。而这些炎症因子的减少一方面指示黄连素有着显著的抗炎作用,另一方面也是其抗炎机制之一。

1.1.2 黄连素通过不同信号通路抑制炎症反应

如前所述,黄连素可以抑制诸如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种炎症因子的产生。另已有多项研究表明黄连素可以激活多条信号通路发挥抗炎作用。同时,我们应该明确的是炎症是一个网状的级联的复杂过程,各环路之间存在着交联,不能简单地把黄连素对信号通路与对上述炎症因子的作用割裂开来。本文下面略做概述,以为更深一步的系统研究提供思路。

1.1.2.1 黄连素通过调控 AMPK 通路发挥抗炎作用

单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK),是一个与3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶和乙酰辅酶A羧化酶活性相关的蛋白激酶。AMPK能感知细胞能量代谢状态的改变,并通过影响细胞物质代谢的多个环节维持细胞能量供求平衡。因而是一种细胞能量调节器,当细胞经历代谢应激反应时,伴随着细胞内AMP水平或AMP与ATP的比例升高,AMPK被AMP激活,其活化的结果导致脂肪酸氧化的增加以产生更多ATP;同时,抑制ATP消耗,综合效应是帮助细胞度过急性损伤,暂时保障细胞的存活。AMPK作为重要的调节器,参与多种病理生理过程,并成为黄连素抑制炎症的潜在靶点^[26,27]。Wenguang Chang^[28]的研究表明在心肌细胞当中,黄连素通过激活p-Akt及p-AMPK通路而

增强胰岛素抵抗。Hyun Woo Jeong^[27]研究表明在巨噬细胞当中, 黄连素通过激活 AMPK 通路而抑制炎症反应。Dah-Yuu Lu^[26]发现在 BV-2 神经胶质细胞中, 黄连素通过激活 AMPK 通路下调 iNOs, COX-2 等的表达而发挥抗炎作用。

1.1.2.2 黄连素通过调控MAPK通路发挥抗炎作用

促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAP激酶, MAPK)链是真核生物信号传递网络中的重要途径之一, 在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用。MAPK链由3类蛋白激酶MAP3K-MAP2K-MAPK组成, 通过依次磷酸化将上游信号传递至下游应答分子。MAPK信号通路包括: MAP激酶(MAPK)、MAPK激酶(MEK、MKK或MAPK 激酶)和MEK激酶(MEKK、MKKK或MAPK激酶激酶)。在哺乳动物机体中, 已经发现五种不同的MAPK信号转导通路。其中ERK1/2信号转导通路调控细胞生长和分化, JNK和p38 MAPK信号转导通路在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用。

MAPK可以被多种炎症因子激活, 包括LPS, IFN, and TNF- α 。而p38 MAPK, ERK1/2, and SAPK/JNK的激活与诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达水平密切相关^[29,30]。Hyun Woo Jeong^[27]等人首先发现了在几种不同的诱导条件下(LPS, H₂O₂等), 黄连素可以显著地降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 的表达水平, 与此同时iNOS, MMP-9, COX-2也有相应程度的降低, 从而认为在该诱导情况下, 黄连素具有显著的抗炎作用。为了阐述黄连素在该条件下发挥作用的机理, Hyun Woo Jeong等着重检验了MAPK相关通路的变化。发现黄连素可以明显地降低p-p38, p-Erk, p-JNK1的表达水平。从而得出结论认为黄连素通过抑制p38 MAPK通路而抗炎。Zhouqing Huang^[31]发现在PMA诱导的巨噬细胞中, 黄连素通过抑制p38 MAPK通路而减少MMP-9的产生。Ai-Wen Feng^[32]研究发现在大鼠小肠粘膜的急性内毒素血症中, 黄连素可以减少COX-2的表达而发挥抗炎作用, 并认为黄连素通过抑制p38 MAPK通路, 进而减少ATFs的表达为可能机制之一。

1.1.2.3 黄连素通过调控NF- κ B通路发挥抗炎作用

NF- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是一种重要的转录因子蛋白, 具有多向性调节作用, 参与调控多种因子的基因表达, 在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用。NF- κ B 由P50/P65 结合形成二聚体。静息状态时, P65与 κ B抑制蛋白(I κ B)结合, 不具有调节基因转录的能力。当细胞受到细胞

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库