

银耳多糖对人软骨细胞的增殖效应和抗炎作用

谭敏颖, 戴川景, 卢学敏, 王毅刚, 关磊, 程勇

Proliferation and Anti-inflammatory Effects of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Human Chondrocytes

TAN Mingying, DAI Chuanjing, LU Xuemin, WANG Yigang, GUAN Lei, and CHENG Yong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060077>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

银耳多糖的降解、磷酸酯化修饰及其抗氧化活性

Degradation, Phosphate Modification of *Tremella fuciformis* Polysaccharide and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(9): 34-37, 43 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.007>

β -桐酸对人绒毛膜上皮癌JEG-3细胞凋亡的影响

Effect of β -Eleostearic Acid on the Apoptosis of Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells

食品工业科技. 2020, 41(22): 310-315 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020010025>

枸杞多糖对LPS诱导BV2小胶质细胞的抗炎活性及NF- κ B信号通路的调控作用

Effects of *Lycium barbarum* Polysaccharides on Anti-inflammatory Activity and NF- κ B Signaling Pathway Induced by LPS in BV2 Microglia

食品工业科技. 2021, 42(3): 304-309, 319 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019120086>

菱角壳分级萃取物对肿瘤细胞增殖及凋亡的影响

Effects of Proliferation and Apoptosis by Water Chestnut Shell Extracts on Tumor Cells

食品工业科技. 2019, 40(9): 295-301 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.051>

金钗石斛脂溶性生物碱提取物诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡

Fat-soluble alkaloids extracted from *Dendrobium Nobile* Lindl induced apoptosis of human colorectal cancer HT-29 cells

食品工业科技. 2017(03): 170-174 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.03.024>

五味子多糖对对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝细胞凋亡的影响

Effect of *Schisandra chinensis* Polysaccharide on Apoptosis of Hepatocytes Induced by Acetaminophen in Mice

食品工业科技. 2019, 40(16): 285-289, 303 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.048>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

谭敏颖, 戴川景, 卢学敏, 等. 银耳多糖对人软骨细胞的增殖效应和抗炎作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 1-8. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060077

TAN Minying, DAI Chuanjing, LU Xuemin, et al. Proliferation and Anti-inflammatory Effects of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Human Chondrocytes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 1-8. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060077

· 特邀主编专栏—食品中天然产物提取分离、结构表征和生物活性 (客座主编: 杨栩、彭鑫) ·

银耳多糖对人软骨细胞的增殖效应 和抗炎作用

谭敏颖^{1,2}, 戴川景¹, 卢学敏¹, 王毅刚¹, 关磊², 程勇^{2,*}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江杭州 310018;

2. 浙江天草生物科技股份有限公司, 浙江湖州 313399)

摘要:目的: 骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) 是一种常见的慢性关节性疾病, 本研究旨在探究银耳多糖对骨关节炎细胞模型人软骨细胞 T/C-28a2 的增殖效应和抗炎作用。方法: 通过 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) 和结晶紫染色实验检测银耳多糖对 T/C-28a2 细胞增殖活力和细胞毒性的影响; 用脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 处理 T/C-28a2 细胞建立骨关节炎模型, 酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测药物处理后细胞白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 的表达; 利用蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测药物处理后相关骨保护因子和炎症因子的表达; 通过 ROS 活性氧释放实验检测药物对细胞的氧化应激水平和抗炎反应。结果: 银耳多糖能够促进人软骨细胞 T/C-28a2 的增殖活力, 且没有明显的细胞毒性; 使用 LPS 刺激软骨细胞模拟骨关节炎的环境, 药物处理后发现银耳多糖和硫酸软骨素处理能减少 IL-6 分泌从而抑制炎症发生; 进一步 Western blot 检测发现银耳多糖刺激后, 相关骨保护因子 (Osteoprotegerin, OPG) 的表达上调, 而促凋亡相关蛋白 Bax、细胞外信号调节激酶 (Extracellular-signal-regulated kinases, ERK-MAPK) 和核内转录因子 κ B (Nuclear factor-kappaB, NF- κ B) 的表达下调。活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 释放实验结果显示, 银耳多糖和硫酸软骨素能够抑制细胞内 ROS 水平, 抑制炎症反应的发生。结论: 银耳多糖具有抑制骨关节炎的效用, 可以在一定程度上保护软骨组织, 抵抗细胞凋亡。本研究初步探讨了银耳多糖的抗炎作用及机制, 为开发银耳多糖作为抗炎药物提供初步的实验依据。

关键词: 银耳多糖, 骨关节炎 (OA), 脂多糖 (LPS), 活性氧 (ROS), 骨保护因子 (OPG), 软骨细胞, 细胞凋亡

中图分类号: R459.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)01-0001-08

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060077



Proliferation and Anti-inflammatory Effects of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Human Chondrocytes

TAN Minying^{1,2}, DAI Chuanjing¹, LU Xuemin¹, WANG Yigang¹, GUAN Lei², CHENG Yong^{2,*}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Tiancao Technology Co., Ltd., Huzhou 313399, China)

Abstract: Objective: Osteoarthritis (OA) is a prevalent chronic joint disease. The purpose of this study was to investigate the proliferative and anti-inflammatory effects of *Tremella fuciformis* polysaccharide on osteoarthritis cell model human chondrocyte T/C-28a2. Methods: Proliferative effect and cytotoxicity of T/C-28a2 cells treated by *Tremella fuciformis* polysaccharide were detected with MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) and crystal violet staining experiment. The bone inflammation model was established by lipopolysaccharide (LPS) treatment in T/C-28a2

收稿日期: 2023-06-09

基金项目: 浙江省领军型创新创业团队项目 (2022R01015); 浙江理工大学教学科研骨干培养计划 (20200511)。

作者简介: 谭敏颖 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: tammy_tan95@163.com。

* 通信作者: 程勇 (1983-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品化学, E-mail: rd@skyherb.cn。

cells. The expression of interleukin-6 (IL-6) in cells after drug treatment was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis. The expression of osteoprotegerin (OPG) and inflammatory factors after drug treatment was detected by Western blot analysis. In addition, reactive oxygen species (ROS) release assay was used to detect the level of oxidative stress and anti-inflammation response to cells. Results: *Tremella fuciformis* polysaccharide could promote proliferation of human chondrocyte T/C-28a2 without obvious cytotoxicity. After LPS was used to treat human chondrocytes to simulate the environment of bone inflammation, it was found that the treatment of *Tremella fuciformis* polysaccharide and chondroitin sulfate could reduce the secretion of IL-6 and inhibit the occurrence of inflammation. Further Western blot analysis showed that after treatment of *Tremella fuciformis* polysaccharide, expression of related osteoprotegerin (OPG) was upregulated, expression of proapoptosis-related protein Bax, extracellular signal-regulated kinase ERK-MAPK and nuclear factor κ B (NF- κ B) was down-regulated. ROS release experiment showed that *Tremella fuciformis* polysaccharide and chondroitin sulfate could inhibit intracellular ROS levels and the occurrence of inflammatory response. Conclusion: *Tremella fuciformis* polysaccharide exhibited the effect of inhibiting osteoarthritis, protecting cartilage tissue and resisting cell apoptosis to a certain extent. In this study, the anti-inflammatory effect of *Tremella fuciformis* polysaccharide and its mechanism were primarily explored, which provided the preliminary experimental basis for the development of *Tremella fuciformis* polysaccharide as an anti-inflammatory drug.

Key words: *Tremella fuciformis* polysaccharide; osteoarthritis (OA); lipopolysaccharide (LPS); reactive oxygen species (ROS); osteoprotegerin (OPG); chondrocytes; apoptosis

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种出现在关节结构中非常普遍的骨组织慢性^[1]和退行性疾病,表现为关节组织的代谢异常,骨关节的磨损、撕裂^[2]和滑膜液炎症因子的增加^[3]。近年来发现髋关节和膝关节 OA 是导致残疾的主要原因,人们普遍认为 OA 会日益增加人们生活的负担,这会导致医疗系统的压力不断增加。在全球范围内影响约 5 亿人口且女性发病率高于男性^[4]。它可以导致关节功能障碍、疼痛、僵硬,限制正常的组织功能,严重降低人们的生活质量^[5]。关节炎的发生是多种潜在因素共同的作用结果^[6],其中人口老龄化^[7-8]、肥胖(BMI ≥ 30 kg/m²)^[8],或者骨组织异常负荷受损^[9]、肌肉无力和关节松弛,频繁下蹲等都可能是骨关节炎发生的重要风险因素。巨噬细胞是维持组织稳态的关键媒介^[10],在 OA 关节中巨噬细胞受到球蛋白诱导后,会产生许多促炎细胞因子和生长因子,如白介素 6(Interleukin-6, IL-6)^[3]、单核化学吸引蛋白。促炎细胞因子会上调细胞外合成基质(Extracellular cartilage matrix, ECM)金属蛋白酶和蛋白聚合酶(MMP-3 和 MMP-13, 以及 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5)来抑制细胞基质合成,从而破坏关节组织^[3]。

目前对于骨关节炎的治疗大致可分为药理学、非药理学和手术干预。骨关节炎临床经济学会(European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, ESCEO)建议使用低剂量、短期的乙酰氨基酚、药用级氨基葡萄糖和硫酸软骨素用于缓解 OA 带来的疼痛^[11]。天然化合物硫酸软骨素和葡萄糖胺已经被多个研究证明具有抑制 OA 的效果^[12-13],并证明它有利于人类关节中蛋白聚糖合成,改善细胞外软骨基质的代谢紊乱^[14]。其他常见的药理学手段包括使用非甾体抗炎药(NSAIDs)、扑热息痛(对乙酰氨基酚)^[15]等,这些药物在治疗 OA 中被频繁使

用,并且其作用效果在临床中得到了验证^[16]。但是非甾体抗炎药具有强烈的毒性,可导致胃出血、肾脏血流减少等风险^[17],而除了非甾体类药物以外,还有内皮质类固醇注射^[16]和关节内透明质酸的方式可以帮助患者减轻疼痛^[18]。有研究表明,随着注射时间的增加,类固醇的效果会减小,而且可能会对软骨产生有害影响。此外,有研究者使用间充质干细胞在动物模型中治疗 OA^[19],但目前还没有在临床进行验证和治疗。目前,对于 OA 的临床治疗面临着艰巨的挑战。

在这些治疗药物中大部分副作用强,服用后会产生产胃出血溃疡等毒副作用。银耳多糖作为一种具有药用价值的食物,副作用小,是一种具有潜力的抗炎药材。银耳是一种真菌,通常被用来入药或者直接食用。其中的有效生物活性成分是银耳多糖,包括甘露糖、葡萄糖、半乳糖、酸性低聚糖和酸性杂多糖等^[20]。研究者对银耳多糖的药用价值在不断挖掘,发现银耳多糖具有免疫调节^[21]、抗氧化、降血糖、降血脂和抗肿瘤的作用,而且具有低副作用。银耳提取物可以抑制 LPS 刺激引起的炎症反应^[22]、双环素硫酸钠引起的结肠炎^[23]、成纤维细胞损伤^[24]等诸多炎症反应,并且可以促进抗炎因子白介素-2(Interleukin-2, IL-2)的增加^[25],说明银耳多糖是一种有效的炎症抑制剂。但是对于在关节炎方面,银耳多糖的药用价值仍不明确。

本研究拟通过银耳多糖处理骨关节炎细胞模型——人软骨细胞 T/C-28a2 后,检测银耳多糖对 T/C-28a2 细胞的增殖效应和细胞毒作用,以及促炎因子 IL-6、相关骨保护因子(Osteoprotegerin, OPG)、促凋亡蛋白 Bax、细胞外信号调节激酶(Extracellular-signal-regulated kinases, ERK-MAPK)和核内转录因子 κ B(Nuclear factor-kappaB, NF- κ B)的表达,进一步检测活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的水平,以探究银耳多糖促进人软骨细胞 T/C-28a2 的增

殖、抑制骨关节炎的形成、保护软骨组织并抵抗细胞凋亡的作用,为开发银耳多糖作为抗炎药物提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒、D-氨基葡萄糖、硫酸软骨素 Sigma 公司; 氨糖软骨素钙片 汤臣倍健; 银耳多糖、硫酸化银耳多糖 分析纯, 杭州天草生物公司; IL-6 ELISA 试剂盒 义翘神州; 胎牛血清 (FBS)、胰酶消化液 (0.25% Trypsin-EDTA (1×))、青-链霉素溶液 Gibco 公司; 人软骨细胞 T/C-28a2 ATCC、DMEM 高糖培养基 Hyclone 公司; 鼠抗体、兔抗体 Santa Cruz 公司; β -actin ERK-MAPK CST 公司; OPG NF- κ B BAX 华安生物公司; 噻唑蓝 (MTT)、结晶紫 麦克林公司。

ELx800 多功能酶标分析仪 美国 Biotek 公司; 4J1093 倒置荧光显微镜 Nikon 公司; Nu425-400c 细胞生物安全柜 Nuair 公司; V6B5R3 流式细胞仪 NovoCyte® Advantec 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将软骨细胞 T/C-28a2 培养于 DMEM 高糖培养基中, 培养基中补充 10% 的胎牛血清 (FBS), 以及培养基总体积 1% 的 10000 units/mL 青霉素和 10000 μ g/mL 的链霉素, 细胞在 5% 的 CO₂, 37 °C 的恒温培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测不同药物对软骨细胞存活率的影响 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 12 h 后每孔加入 100 μ L 浓度为 0、1、10、100 μ g/mL D-氨基葡萄糖, 硫酸软骨素, 银耳多糖, 硫酸化银耳多糖和氨糖软骨素等的完全培养基并单独设置只加磷酸缓冲液的调零组分别刺激细胞。将处理后的细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱里培养。分别在药物刺激 1、3、6 d 后检测细胞存活率。采用 MTT 测定法, 每孔加入 20 μ L 的浓度为 5 mg/mL 的噻唑蓝溶液, 置于 37 °C 培养箱中孵育 4 h, 吸尽上清, 随后加入 150 μ L DMSO (分析纯) 溶解甲臞结晶, 摇床上 600 r/min 振荡 10 min, 在酶标仪中测定 OD₄₉₀ 的数值。再根据以下公式计算细胞存活率, 公式为:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组吸光值} - \text{调零组吸光值}}{\text{对照组吸光值} - \text{调零组吸光值}} \times 100$$

1.2.3 结晶紫染色测定不同药物对软骨细胞增殖的影响 取对数生长期的 T/C-28a2 软骨细胞, 按 1×10^4 个细胞/孔铺于 24 孔板中。细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 加入含不同药物的完全培养基刺激细胞: D-氨基葡萄糖、氨糖软骨素钙片、硫酸软骨素、硫酸化银耳多糖和银耳多糖; 每种药物设置浓度为 1 μ g/mL, 同时设置仅含细胞不加任何药物的阴性对照组, 每个组设 3 个复孔。3 d 后去除原细胞培养基, 后用 PBS 轻

柔地洗 2 次, 每孔加入 200 μ L 配制好的结晶紫溶液, 室温静置 15 min。将孔板浸入蒸馏水多次, 清洗 24 孔板直至水变成无色, 再将 24 孔板倒置于 37 °C 生化培养箱中烘干水分。在光源充足的条件下将 24 孔板置于白色卡纸上拍摄结晶紫染色结果照片。后加入 33% 的乙酸溶液溶解结晶紫, 600 r/min 振荡 10 min 后, 使用酶标仪以 490 nm 波长检测。

1.2.4 酶联免疫吸附法测定不同药物处理软骨细胞后的 IL-6 表达 为了定量检测细胞因子表达水平, 收集不同药物处理的细胞上清, 样品制备方法如下:

无 LPS 刺激细胞上清样品的制备: 取对数生长期的 T/C-28a2 软骨细胞, 5×10^6 个细胞/孔铺于 6 孔板中。将细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱里培养过夜。细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 随后分别在孔内加入使用无血清 DMEM 稀释的 1 μ g/mL D-氨基葡萄糖、1 μ g/mL 氨糖软骨素、1 μ g/mL 硫酸软骨素、1 μ g/mL 硫酸化银耳多糖和 1 μ g/mL 银耳多糖以及正常培养基。48 h 后, 收集含不同药物刺激细胞的上清, 7000 r/min 离心 10 min, 收取细胞上清液并将其分装到 1.5 mL EP 管中, -20 °C 保存备用。

LPS 刺激细胞上清样品的制备: 取对数生长期的 T/C-28a2 软骨细胞, 5×10^6 个细胞/孔铺于 6 孔板中。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 待细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 随后加入不含血清的 DMEM 高糖培养基, 饥饿培养 24 h。除尽无血清培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 分别在孔内加入使用无血清 DMEM 稀释的 1 μ g/mL 的 LPS, 培养 24 h。除去含有 LPS 的培养基, 分别在孔内加入使用无血清 DMEM 稀释的 1 μ g/mL 的 D-氨基葡萄糖、氨糖软骨素、硫酸软骨素、硫酸化银耳多糖和银耳多糖及正常培养基, 培养 48 h。收集含不同药物刺激细胞的上清, 7000 r/min 离心 10 min, 收取细胞上清液并将其分装到 1.5 mL EP 管中, -20 °C 保存备用。

将收集的细胞上清稀释 10 倍并储存于 -80 °C, 使用 ELISA 试剂盒测定 IL-6 (pg/mL) 的浓度。具体为: 将 100 μ L 一抗加入 96 孔板, 4 °C 孵育过夜, 第二天使用 pH7.5 的 1×磷酸缓冲溶液冲洗 3 次, 每孔加入封闭液 350 μ L, 室温孵育 120 min。孵育结束后进行洗板, 分别将 100 μ L 样品加入到相应的反应孔中, 用封板膜封住反应孔并室温孵育 120 min。洗板后每孔加入 250 μ L 二抗孵育 90 min, 用磷酸缓冲溶液冲洗 3 次, 每孔加入 150 μ L 显色液。室温下避光孵育 27 min, 使用酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度, 绘制标准曲线并得到回归方程为 $Y = 0.0108X + 0.0792$, ($R^2 = 0.9989$), 式中: Y 为样品在 450 nm 波长吸光值; X 为样品 IL-6 浓度 (pg/mL)。

1.2.5 Western blot 检测不同药物处理后骨关节炎相关蛋白的表达 取对数生长期的软骨细胞 T/C-

28a2, 以 5×10^6 个细胞/孔铺于 6 孔板中。置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱里培养过夜。细胞贴壁后, 将培养基换成含有 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 D-氨基葡萄糖、氨糖软骨素、硫酸软骨素、硫酸化银耳多糖和银耳多糖的完全培养基以及无药物的完全培养基, 培养 48 h。弃去培养基, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 蛋白质裂解缓冲液($1\times$, 静置 3 min), 用枪头顺时针搅动提取蛋白, 收到的蛋白样品 100°C 金属浴 10 min 使蛋白变性。配 10% 的分离胶, 每孔 $15 \mu\text{L}$ 上样跑 SDS-PAGE 电泳。将电泳凝胶转印至 $0.45 \mu\text{m}$ PVDF 膜, 350mA 2 h。 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 洗脱后孵育一抗 4°C 过夜, 洗脱后孵育二抗 2 h, 清洗之后滴加 ECL 显影液与化学发光成像仪曝光显影, 使用 Image J 对蛋白条带进行定量分析。

1.2.6 流式细胞术检测不同药物对 ROS 释放的影响

取对数生长期的 T/C-28a2 软骨细胞, 按 3×10^6 个细胞/孔铺于 12 孔板中。将细胞置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱里培养过夜。去除细胞上清, 用冰 PBS 冲洗细胞 2 次, 按照活性氧(ROS)检测试剂盒说明, 将试剂盒中 Master Reaction Mix 以每孔 $450 \mu\text{L}$ 加入 12 孔板中, 放置于 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 恒温培养箱中孵育 1 h, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 含有 DMEM 无血清培养基稀释的药物, 使其终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 。设空白对照加入对应量 PBS 处理, $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 孵育 2 h。最后收集细胞进行流式检测。

1.3 数据处理

每组试验重复 3~5 次, 采用 Graphpad Prism 9 软件绘图, 数据以平均值 $\pm$ 标准偏差(Mean $\pm$ SD)表示, 并进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 使用 Waller-duncan(W)进行多重比较分析。 $P>0.05$ 表示无显著性差异, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,

$P<0.01$ 表示有显著性差异, $P<0.001$ 表示极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 银耳多糖促进人软骨细胞 T/C-28a2 的增殖活性

分别用完全培养基稀释的 0(对照组)、1、10、 $100 \mu\text{g/mL}$ D-氨基葡萄糖、氨糖软骨素、硫酸软骨素、硫酸化银耳多糖和银耳多糖刺激 T/C-28a2 细胞, 以及在孔板中只加入磷酸缓冲溶液(调零组), 分别在第 1、3、6 d 通过 MTT 的方式检测药物对细胞增殖的影响。结果如图 1 所示, 加入上述 5 种药物后, 硫酸化银耳多糖对 T/C-28a2 细胞有一定的细胞毒性作用, 当药物浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ 时银耳多糖能刺激 T/C-28a2 细胞增殖。在处理 3 d 后, 银耳多糖和硫酸软骨素对 T/C-28a2 细胞的增殖作用更加明显。药物浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ 与 10、 $100 \mu\text{g/mL}$ 相比, 能明显促进细胞增殖, 因此确定 $1 \mu\text{g/mL}$ 为实验浓度中相对合适作为进一步研究的浓度。

2.2 银耳多糖对人软骨细胞 T/C-28a2 的细胞毒性效应

由于硫酸软骨素对软骨细胞 T/C-28a2 的增殖作用有助于修复软骨损伤。本实验通过结晶紫染色进一步探究 $1 \mu\text{g/mL}$ D-氨基葡萄糖、氨糖软骨素、硫酸软骨素、硫酸化银耳多糖和银耳多糖对软骨细胞的增殖作用, 结果表明 $1 \mu\text{g/mL}$ 银耳多糖、D-氨基葡萄糖、硫酸软骨素、氨糖软骨素均能刺激软骨细胞 T/C-28a2 的增殖(图 2)。其中, 硫酸软骨素($P<0.001$)与银耳多糖($P<0.05$)处理人软骨细胞, 细胞增殖差异性更显著。

2.3 银耳多糖抑制骨关节炎的炎症水平

据报道, 硫酸软骨素(软骨素 4,6-硫酸盐)已经用

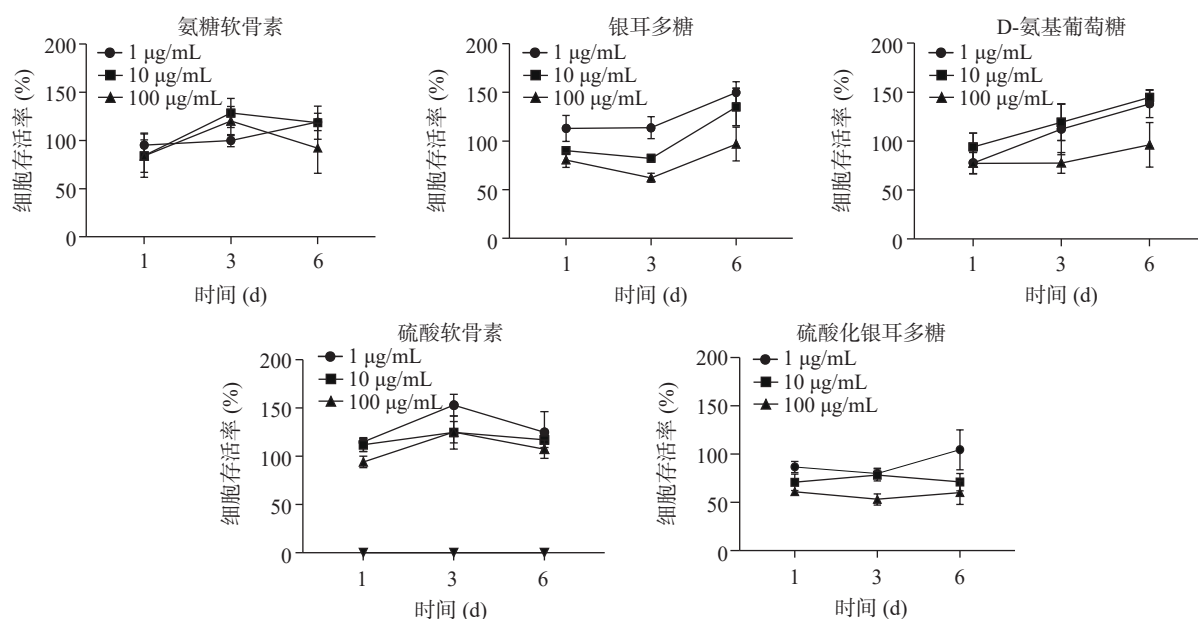


图 1 不同药物在不同浓度作用下对人软骨细胞 T/C-28a2 的增殖活性

Fig.1 Effect of different drugs at different concentrations on human chondrocyte T/C-28a2 cell viability

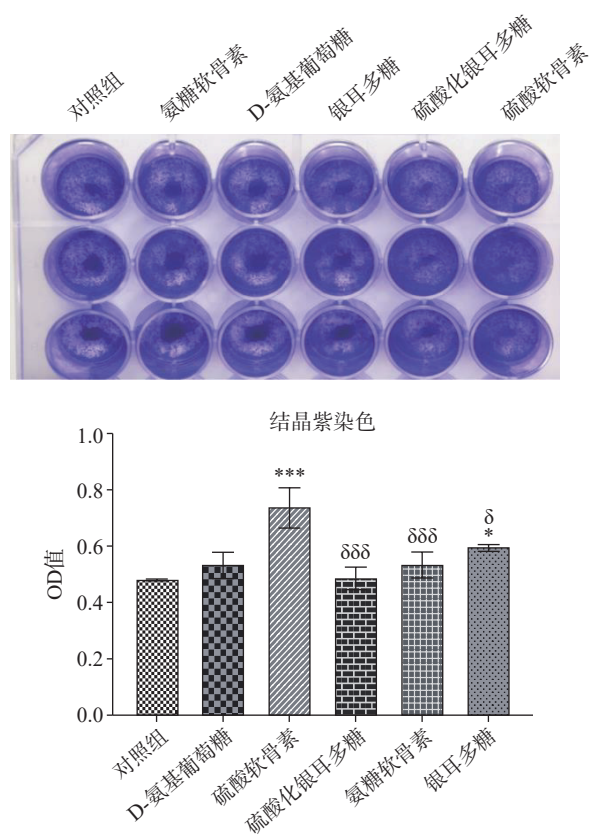


图 2 银耳多糖对人软骨细胞 T/C-28a2 的毒性效应

Fig.2 Toxic effects of *Tremella fuciformis* polysaccharide on T/C-28a2 in human chondrocytes

注: 与对照组比较, $*P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $**P<0.01$ 表示有显著性差异, $***P<0.001$ 表示极显著性差异; 与硫酸软骨素处理组相比, $\delta P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $\delta\delta P<0.01$ 表示有显著性差异, $\delta\delta\delta P<0.001$ 表示极显著性差异。

于治疗人骨关节炎(OA), 并取得了较好的治疗效果^[26-27]。研究显示, 在没有加入脂多糖的情况下, 所有药物的加入均使 IL-6 表达水平与对照组相比差异不显著($P>0.05$) (图 3a), 在 LPS 处理组中, 硫酸化银耳多糖($P<0.01$)、氨基葡萄糖($P<0.001$)与硫酸软骨素处理组之间作用有显著性或极显著差异, 银耳多糖和氨基葡萄糖处理组之间有显著性差异($P<0.01$) (图 3b), 这表明硫酸软骨素的抑制炎症的效果要高于以上几种药物。此外, 银耳多糖和硫酸软骨素处理组之间 IL-6 的表达没有统计学差异, 说明银耳多糖和硫酸软骨素药效相近, 而且银耳多糖相对于其他药物处理方式对于防止炎症反应的发生更有效, 这与已

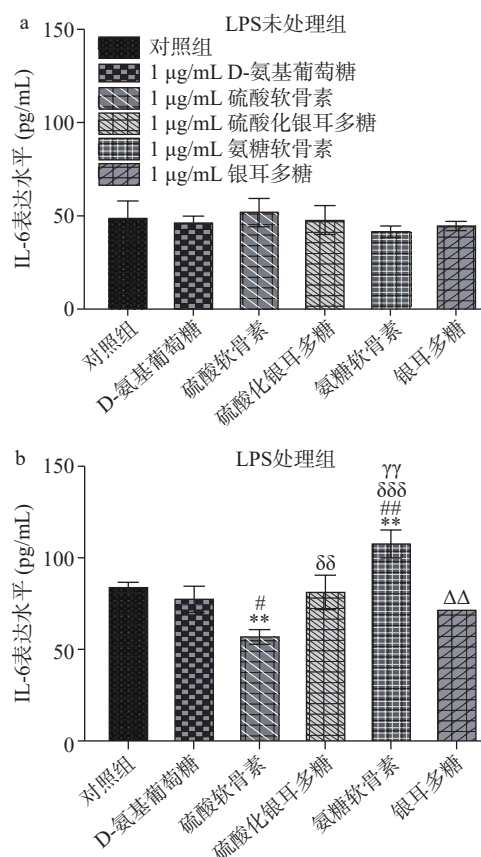


图 3 银耳多糖对炎症标志物 IL-6 含量的影响

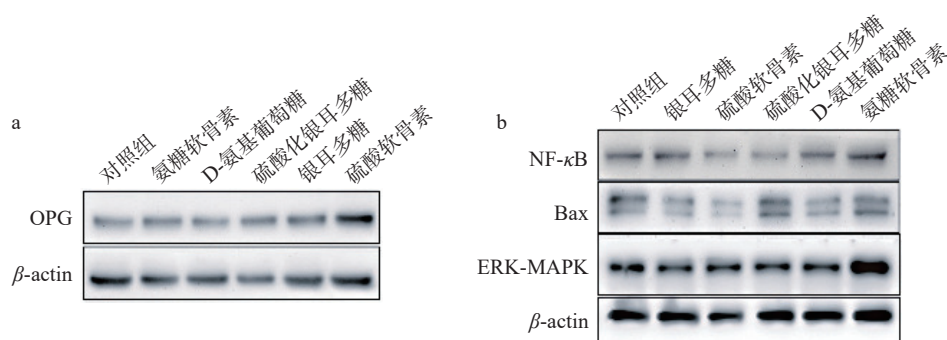
Fig.3 Effect of *Tremella fuciformis* polysaccharide on the content of inflammatory marker IL-6

注: 与对照组比较 $*P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $**P<0.01$ 表示有显著性差异, $***P<0.001$ 表示极显著性差异; 与硫酸软骨素处理组相比, $\delta P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $\delta\delta P<0.01$ 表示有显著性差异, $\delta\delta\delta P<0.001$ 表示极显著性差异; 与 D-氨基葡萄糖处理组相比, $\#P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $\##P<0.01$ 表示有显著性差异, $\###P<0.001$ 表示极显著性差异; 与氨基葡萄糖相比, $\Delta\Delta P<0.01$ 表示有显著性差异; 硫酸化银耳多糖组相比, $\gamma\gamma P<0.05$ 差异有统计学意义, $\gamma\gamma P<0.01$ 表示有显著性差异, 图 4、图 5 同。

有文献综述植源性多糖可以缓解炎症的发生^[28]的结果一致。

2.4 银耳多糖促进骨保护和抑制骨关节炎的机制分析

为进一步研究药物在分子水平上的作用机制、对骨组织的保护作用 and 药物刺激对细胞凋亡的影响, 利用 Western blot 技术检验了相关蛋白的表达水平 (图 4)。结果显示, 银耳多糖和硫酸软骨素处理能增



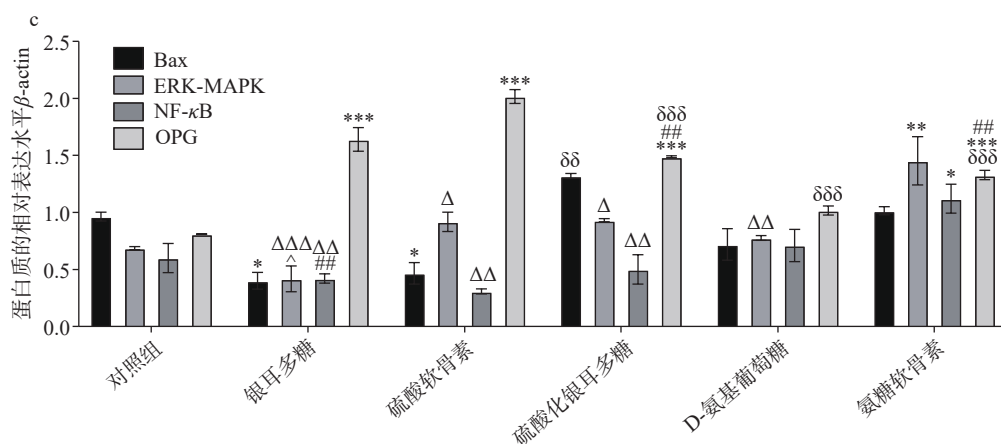


图4 银耳多糖对 OA 相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of *Tremella fuciformis* polysaccharide on expression of OA-related proteins

加骨保护因子 OPG 的表达,表明银耳多糖和硫酸软骨素具有骨组织保护作用。进一步检测了 NF-κB 和凋亡信号 Bax 蛋白的表达量,发现使用银耳多糖和硫酸软骨素处理后它们的表达量相对对照组减少,这说明 OA 发生发展中 NF-κB 信号被抑制,且这两种药物可以有效的抑制细胞凋亡。

2.5 银耳多糖抑制软骨细胞 ROS 活性氧水平

为检测银耳多糖对软骨细胞的氧化损伤和药物安全性,进行了活性氧(ROS)释放实验^[29]。结果表明,与无药物处理的对照组相比,药物处理组细胞的 ROS 相对释放量更少,特别是银耳多糖($P<0.01$)和硫酸软骨素($P<0.001$)处理组(图 5),这说明银耳多糖和硫酸软骨素可以阻碍大量 ROS 产生,这可能进一步阻碍炎症的发展。

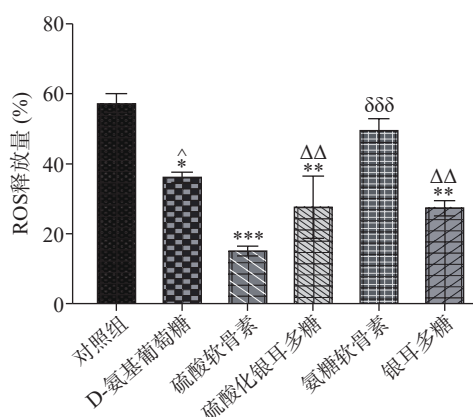


图5 银耳多糖处理人软骨细胞后 ROS 的释放

Fig.5 ROS release from human chondrocytes treated with *Tremella fuciformis* polysaccharide

3 讨论与结论

目前,骨组织在早期骨关节炎中的变化原因尚不完全清楚,当软骨细胞被内源或外源性的因素刺激时,通常会表现为软骨细胞的凋亡^[30-31]、细胞内炎症因子的变化^[32]和 ECM 降解^[33]等。本研究使用银耳多糖刺激软骨细胞发现,银耳多糖促进了软骨细胞的增殖,表现出了对软骨细胞活力的促进作用。此外,研究发现骨关节炎软骨细胞的凋亡与细胞凋亡因子

Bax 上调有关^[31],与本研究发现银耳多糖刺激软骨细胞 Bax 表达下调一致,这表现出了银耳多糖的抗凋亡效应。更进一步地,ERK1/2-MAPK 和 JNK 途径的激活会使细胞外基质(Extracellular cartilage matrix, ECM)的蛋白酶表达上调^[31,34],骨微裂会刺激损伤区域的骨细胞产生 NF-κB 信号^[35]。当 NF-κB 上调时,软骨细胞会无法补偿降解的 ECM,导致细胞基质平衡障碍^[36],细胞炎症和骨组织结构退化^[31,37],从而促进炎症的发生。此外,当受体骨保护素 OPG 失活时会导致骨吸收的发生^[38-39]。本研究发现骨银耳多糖处理软骨细胞后,保护因子 OPG 表达上调,而 NF-κB、ERK1/2-MAPK 表达下调,因此推测银耳多糖对软骨细胞具有保护作用,并对骨关节炎具有抑制作用。

先前研究发现,退化软骨组织或软骨损伤环境中 IL-6 水平增高,在 IL-6/Stat3 模型中,IL-6 主要通过 Stat3 信号诱导软骨细胞分解代谢和软骨细胞凋亡^[40]。本实验通过在软骨细胞中加入 LPS 模拟炎症环境,对比了炎症产生前后加入药物后促炎因子 IL-6 的变化,发现在非炎症环境下药物刺激软骨细胞产生的 IL-6 水平没有显著性差异,而加入 LPS 诱导后,硫酸软骨素和银耳多糖组与对照组相比 IL-6 产生水平显著降低。这表明在没有发生炎症反应时,药物对细胞的作用相差不明显,当炎症发生时,银耳多糖可以通过下调炎症因子表达来发挥抗炎作用,因此推测银耳多糖具有良好的抗炎活性,有效减缓骨关节炎的炎症反应。

在 OA 治疗中,银耳多糖对软骨再生和清除自由基具有重要意义。高水平的 ROS 可能会阻碍炎症中骨软骨组织的自然再生过程^[33]。此外,活性氧(ROS)水平可能导致广泛的氧化应激反应,高水平的 ROS 可以导致细胞损伤^[41]。本研究通过检测不同药物刺激下活性氧的变化,发现银耳多糖的 ROS 释放量显著降低($P<0.05$),说明银耳多糖对软骨细胞清除自由基具有影响,具有高抗氧化性和低细胞损伤的效用,并可能进一步抑制炎症的发生。

综上,本研究探讨了银耳多糖对骨关节炎的潜

在影响,发现银耳多糖具有抑制骨关节炎的效用,可以通过降低 IL-6 产生的水平减少骨关节炎炎症反应,OPG 的增加表明银耳多糖可以在一定程度上保护软骨组织,抵抗细胞凋亡。本研究发现银耳多糖的抗炎作用及机制,为探索银耳多糖作为抗炎药物和 OA 治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] SANCHEZ-LOPEZ E, CORAS R, TORRES A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2022, 18(5): 258–275.
- [2] KRAUS V B, BLANCO F J, ENGLUND M, et al. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(8): 1233–41.
- [3] SOHN D H, SOKOLOVE J, SHARPE O, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14(1): R7.
- [4] YAO Q, WU X, TAO C, et al. Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 56.
- [5] 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.
- [6] UEBELHART D, THONAR E J, ZHANG J, et al. Protective effect of exogenous chondroitin 4, 6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998, 6 Suppl A: 6-13.
- [7] Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 386(9995): 743–800.
- [8] LOSINA E, WEINSTEIN A M, REICHMANN W M, et al. Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2013, 65(5): 703–711.
- [9] BROWN T D, JOHNSTON R C, SALTZMAN C L, et al. Posttraumatic osteoarthritis: A first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease [J]. *Journal of Orthop Trauma*, 2006, 20(10): 739–744.
- [10] VAN DEN BOSCH M H J. Osteoarthritis year in review 2020: Biology [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(2): 143–50.
- [11] 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]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2021, 17(1): 59–66.
- [12] HENROTIN Y, MARTY M, MOBASHERI A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? [J]. *Maturitas*, 2014, 78(3): 184–187.
- [13] WU D, HUANG Y, GU Y, et al. Efficacies of different preparations of glucosamine for the treatment of osteoarthritis: A meta-analysis of randomised, double-blind, placebo-controlled trials [J]. *International Journal of Clinical Practice*, 2013, 67(6): 585–594.
- [14] CLEGG D O, REDA D J, HARRIS C L, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis [J]. *New England Journal of Medicine*, 2006, 354(8): 795–808.
- [15] DA COSTA B R, PEREIRA T V, SAADAT P, et al. Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: Network meta-analysis [J]. *Bmj*, 2021, 375: n2321.
- [16] BANNURU R R, OSANI M C, VAYSBROT E E, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(11): 1578–1589.
- [17] LANZA F L, CHAN F K, QUIGLEY E M. Guidelines for prevention of NSAID-related ulcer complications [J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(3): 728–38.
- [18] PENDLETON A, ARDEN N, DOUGADOS M, et al. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2000, 59(12): 936–944.
- [19] ZHANG S, TEO K Y W, CHUAH S J, et al. MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis [J]. *Biomaterials*, 2019, 200: 35–47.
- [20] YANG D, LIU Y, ZHANG L. *Tremella* polysaccharide: The molecular mechanisms of its drug action [J]. *Progress In Molecular Biology and Translational Science*, 2019, 163: 383–421.
- [21] ZHANG Y, ZHANG M, JIANG Y, et al. Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: A review of 12 years clinical studies in China [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2018, 144(11): 2177–2186.
- [22] LEE J, HA S J, LEE H J, et al. Protective effect of *Tremella fuciformis* Berk extract on LPS-induced acute inflammation via inhibition of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Food Funct*, 2016, 7(7): 3263–3272.
- [23] XU Y, XIE L, ZHANG Z, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharides inhibited colonic inflammation in dextran sulfate sodium-treated mice via Foxp3+T cells, gut microbiota, and bacterial metabolites [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 648162.
- [24] SHEN T, DUAN C, CHEN B, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharide suppresses hydrogen peroxide-triggered injury of human skin fibroblasts via upregulation of SIRT1 [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(2): 1340–1346.
- [25] MA L, LIN Z B. Effect of tremella polysaccharide on IL-2 production by mouse splenocytes [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 1992, 27(1): 1–4.
- [26] BRUYÈRE O, ALTMAN R D, REGINSTER J Y. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys [J]. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2016, 45(4 Suppl): S12–7.
- [27] REGINSTER J Y, VERONESE N. Highly purified chondroitin sulfate: A literature review on clinical efficacy and pharmacoeconomic aspects in osteoarthritis treatment [J]. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2021, 33(1): 37–47.
- [28] KUANG S, LIU L, HU Z, et al. A review focusing on the benefits of plant-derived polysaccharides for osteoarthritis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 228: 582–593.
- [29] AL-AZAB M, QAED E, OUYANG X, et al. TL1A/TNFR2-mediated mitochondrial dysfunction of fibroblast-like synoviocytes increases inflammatory response in patients with rheumatoid arthritis via reactive oxygen species generation [J]. *Febs Journal*, 2020,

287(14): 3088–3104.

[30] KOURTIS A, ADAMOPOULOS P G, PAPALOIS A, et al. Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2018, 6(12): 243.

[31] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2019, 165: 49–65.

[32] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2011, 7(1): 33–42.

[33] DENG C, ZHOU Q, ZHANG M, et al. Bioceramic scaffolds with antioxidative functions for ROS scavenging and osteochondral regeneration[J]. *Advanced Science(Weinh)*, 2022, 9(12): e2105727.

[34] CHEN G, ZHAO H, MA S, et al. Circadian rhythm protein Bmal1 modulates cartilage gene expression in temporomandibular joint osteoarthritis via the MAPK/ERK pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 527744.

[35] LEPETSOS P, PAPAVALASSILOU K A, PAPAVALASSILOU A G. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis[J]. *Free Radical*

Biology and Medicine, 2019, 132: 90–100.

[36] MOBASHERI A, BATT M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 2016, 59(5-6): 333–339.

[37] BUHRMANN C, BROCKMUELLER A, MUELLER A L, et al. Curcumin attenuates environment-derived osteoarthritis by Sox9/NF- κ B signaling axis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7645.

[38] BURR D B, GALLANT M A. Bone remodelling in osteoarthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012, 8(11): 665–673.

[39] MEHANA E E, KHAFAGA A F, EL-BLEHI S S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review[J]. *Life Sciences*, 2019, 234: 116786.

[40] LATOURTE A, CHERIFI C, MAILLET J, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2017, 76(4): 748–755.

[41] VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS K, LORIDAS S, et al. Potential toxicity and safety evaluation of nanomaterials for the respiratory system and lung cancer[J]. *Lung Cancer (Auckl)*, 2013, 4: 71–82.