

基于PI3K/AKT/mTOR通路探讨艾司氯胺酮 对IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响

辛学东¹ 白宇光¹ 牛亚清² 解雅英^{1*}

(¹内蒙古医科大学附属医院麻醉科, 呼和浩特 010050; ²内蒙古医科大学附属医院骨科, 呼和浩特 010050)

摘要 该研究旨在探索艾司氯胺酮调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路对IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响。首先将人软骨细胞分成Control组、IL-1 β 组(10 μ g/L IL-1 β)、IL-1 β +esketamine组(10 μ g/L IL-1 β 和100 μ mol/L艾司氯胺酮)、IL-1 β +esketamine+LY294002组(10 μ g/L IL-1 β +100 μ mol/L艾司氯胺酮+25 μ mol/L LY294002)。各组细胞增殖情况使用CCK-8法和EdU染色法测定; 各组细胞凋亡情况使用流式细胞仪和TUNEL染色测定; 各组细胞活性氧(ROS)水平使用DCFH-DA法测定; 各组细胞TNF- α 、IL-6、PGE2含量使用ELISA法检测; NO含量使用格力斯反应检测; 各组细胞凋亡及PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达情况使用Western blot法测定。结果发现, 与Control组比, IL-1 β 组细胞存活率、EdU阳性细胞率减少, Bcl-2蛋白表达量、磷酸化(p)-PI3K、p-AKT、p-mTOR水平降低, 而细胞凋亡率, TUNEL阳性率, ROS、TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平及Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白表达量增加($P<0.05$); 与IL-1 β 组比, IL-1 β +esketamine组细胞存活率、EdU阳性细胞率以及Bcl-2、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平升高, 细胞凋亡率, TUNEL阳性率, ROS、TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平以及Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白表达水平降低($P<0.05$); 使用PI3K通路抑制剂处理可逆转艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的改善作用($P<0.05$)。总之, 艾司氯胺酮可能通过激活PI3K/AKT/mTOR通路抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。

关键词 艾司氯胺酮; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 软骨细胞; 凋亡

Exploring the Effect of Esketamine on IL-1 β -Induced Chondrocyte Apoptosis Based on PI3K/AKT/mTOR Pathway

XIN Xuedong¹, BAI Yuguang¹, NIU Yaqing², XIE Yaying^{1*}

(¹Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China;

²Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

Abstract This study aimed to explore the effect of esketamine on IL-1 β (interleukin-1 β)-induced chondrocyte apoptosis by regulating the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B)/mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway. Human chondrocytes were divided into four groups: the Control group, the IL-1 β group (10 μ g/L IL-1 β), the IL-1 β +esketamine group (10 μ g/L IL-1 β combined with 100 μ mol/L esketamine), and the IL-1 β +esketamine+LY294002 group (10 μ g/L IL-1 β , 100 μ mol/L esketamine, and 25 μ mol/L LY294002).

收稿日期: 2025-09-03

接受日期: 2025-11-14

内蒙古医科大学青年项目(批准号: YKD2023QN012)资助的课题

*通信作者。Tel: 15804712756, E-mail: ymeh45@163.com

Received: September 3, 2025

Accepted: November 14, 2025

This work was supported by Youth Program of Inner Mongolia Medical University (Grant No. YKD2023QN012)

*Corresponding author. Tel: +86-15804712756, E-mail: ymeh45@163.com

Cell proliferation was detected by the CCK-8 assay and EdU staining; cell apoptosis was measured by flow cytometry and TUNEL staining; intracellular ROS (reactive oxygen species) levels were determined by the DCFH-DA method; the contents of TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6), and PGE2 (prostaglandin E2) in the cells were detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); NO (nitric oxide) content was measured by the Griess reaction; the expression levels of apoptosis-related proteins and PI3K/AKT/mTOR pathway-related proteins were determined by Western blot assay. Compared with the Control group, the IL-1 β group showed significant decreases in cell viability, EdU-positive cell rate, Bcl-2 protein expression, and the p-PI3K (phosphorylation levels of PI3K), p-AKT (phosphorylation levels of AKT) and p-mTOR (phosphorylation levels of mTOR), while cell apoptosis rate, TUNEL-positive rate, the levels of ROS, TNF- α , IL-6, NO and PGE2, as well as the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 proteins were significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, the IL-1 β +esketamine group exhibited notable increases in cell viability, EdU-positive cell rate, Bcl-2 protein expression, and the phosphorylation levels of PI3K, AKT and mTOR, whereas cell apoptosis rate, TUNEL-positive rate, the levels of ROS, TNF- α , IL-6, NO and PGE2, and the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 proteins were markedly decreased (all $P < 0.05$). Treatment with the PI3K pathway inhibitor reversed the ameliorative effect of esketamine on IL-1 β -induced chondrocyte injury ($P < 0.05$). In summary, esketamine may inhibit IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords esketamine; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; mammalian target of rapamycin; chondrocytes; apoptosis

骨关节炎(osteoarthritis, OA)属于一种长期慢性疾病,其特征是关节软骨出现恶化,使骨骼产生摩擦,从而发生僵硬、疼痛及运动障碍^[1]。近期研究表明,在全球范围内,骨关节炎发病率达到16%,且女性发病率高于男性,而且随着生活方法的改变、肥胖率的增加以及年龄的增长,其发病率呈现不断上升的趋势^[2]。目前,骨关节炎的治疗方案包括手术治疗和非手术治疗,比如关节腔内注射、药物治疗和物理治疗,但是,其对关节结构的破坏仍旧无法逆转^[3]。因此,研究可有效缓解疼痛、延缓病情发展的治疗方法具有重要意义。艾司氯胺酮(esketamine)是氯胺酮的右旋异构体,可作为麻醉剂使用,其催眠和镇痛效果是氯胺酮的两倍,且产生不良反应的概率较低^[4]。景建闯等^[5]对骨关节炎大鼠模型进行相关研究,结果发现,艾司氯胺酮可抑制骨关节炎大鼠炎症反应,具有镇痛效果。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是一条重要的信号通路,可参与各种细胞外基质分子和细胞因子的转导,并对提高细胞活力、抑制衰老和死亡等具有重要作用,该通路异常与肿瘤、糖尿

病、精神分裂症等疾病的发生有一定关系^[6]。研究发现,PI3K/AKT/mTOR通路参与到骨关节炎的发生发展过程中,其可在一定程度上介导软骨细胞的炎症反应、增殖、凋亡等细胞过程^[7]。然而,艾司氯胺酮是否可通过调控PI3K/AKT/mTOR通路对骨关节炎软骨细胞凋亡产生影响尚不可知,因此,本研究以IL-1 β 诱导软骨细胞模拟骨关节炎体外模型对此进行探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人软骨细胞购自合肥万物生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 艾司氯胺酮购自江苏恒瑞医药股份有限公司; LY294002(PI3K通路抑制剂)购自美国MedChemExpress公司; CCK-8试剂盒、EdU细胞增殖试剂盒、Annexin V-FITC/PI试剂盒购自上海尚宝生物科技有限公司; DCFH-DA试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; TNF- α 、IL-6、PGE2 ELISA试剂盒购自上海联祖生物科技有限公司; NO检测试剂盒购自亚科因生物技术有限公司; Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9、

PI3K、磷酸化(p)-PI3K、p-AKT、AKT、mTOR、p-mTOR、GAPDH抗体、羊抗鼠IgG二抗购自英国Abcam公司; CME-M500型荧光显微镜购自中科微能(北京)科技有限公司; 流式细胞仪购自上海木森生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 艾司氯胺酮浓度筛选 使用不同浓度(与0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)艾司氯胺酮处理人软骨细胞, 24 h后加入10 μL 的CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育4 h后, 使用酶标仪测定其在450 nm处的吸光度(D)值, 并计算细胞活力。接着, 用6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮处理IL-1 β 刺激的人软骨细胞, 未处理的细胞作为对照组(Control组), 仅用10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β ^[8]处理的细胞作为IL-1 β 组, 不同浓度药物处理的细胞作为艾司氯胺酮组(esketamine组); 24 h后加入10 μL 的CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育4 h后, 使用酶标仪测定其在450 nm处的 D 值, 并计算细胞活力。

1.2.2 细胞培养及分组处理 使用完全培养基对软骨细胞进行培养, 并使用胰蛋白酶进行消化、传代。将软骨细胞分为对照组(Control组)、IL-1 β 组、IL-1 β +艾司氯胺酮组(IL-1 β +esketamine组)、IL-1 β +艾司氯胺酮+LY294002组(IL-1 β +esketamine+LY294002组), 其中, 除Control组, 其余组细胞均加入10 $\mu\text{g/L}$ 的IL-1 β 进行24 h培养(于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中), 然后, IL-1 β +esketamine组细胞加入100 $\mu\text{mol/L}$ 的艾司氯胺酮^[9], IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞加入100 $\mu\text{mol/L}$ 的艾司氯胺酮和25 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002^[10], Control组细胞进行常规培养, 各组细胞均再次培养(于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中)24 h。

1.2.3 各组细胞增殖情况检测 取各组细胞(按照1.2.2给药方式进行干预)进行培养, 24 h后加入10 μL 的CCK-8溶液, 孵育4 h后, 使用酶标仪测定其在450 nm处的 D 值, 并计算细胞活力。另取各组培养24 h后的细胞加入EdU溶液(10 $\mu\text{mol/L}$)进行培养(37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h), 结束后对各组细胞进行清洗, 然后加入4%多聚甲醛室温固定15 min, Triton X-100室温通透15 min, 再次清洗细胞, 加入Hoechst 33342溶液进行孵育(室温、避光、10 min), 最后置于荧光显微镜下观察, 分析阳性细胞率。

1.2.4 各组细胞凋亡情况检测 流式细胞术: 收集各组细胞进行清洗, 并将其密度调整为 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 然

后取细胞进行离心处理(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min、5 min), 并收集细胞沉淀, 加入缓冲液使细胞重悬, 接着分别加入Annexin V-FITC(10 μL 、避光、时间10 min)和PI(5 μL 、避光、时间5 min)进行孵育, 结束后使用流式细胞仪对各组细胞凋亡率进行检测。

TUNEL染色: 各组细胞用多聚甲醛固定30 min后, 用蛋白酶K工作液于37 $^{\circ}\text{C}$ 处理20 min, 进行抗原修复。随后, 滴加平衡缓冲液充分浸透样本, 室温孵育30 min。吸弃多余液体后, 依次加入TdT酶反应混合液(含荧光标记dUTP)和DAPI工作液进行末端标记和核染色。最后, 样本于避光条件下采用荧光显微镜(激发波长488 nm/发射波长530 nm)观察并记录细胞凋亡情况, 以TUNEL阳性信号与DAPI核染色的共定位(绿色与蓝色荧光重叠)作为细胞凋亡判定标准。

1.2.5 各组细胞活性氧含量检测 收集各组细胞, 加入1 mL DCFH-DA荧光探针(浓度10 $\mu\text{mol/L}$), 孵育30 min后使用不含FBS的培养基洗去未进入细胞的DCFH-DA, 之后使用荧光显微镜观察, 并分析其荧光强度。

1.2.6 各组细胞TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平检测 收集各组细胞, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min、10 min)后弃上清, 使用TNF- α 、IL-6、PGE2 ELISA试剂盒并按照试剂盒操作说明书检测细胞中TNF- α 、IL-6、PGE2水平(酶标仪, 检测波长为450 nm), 并使用格里斯反应定量NO浓度。

1.2.7 各组细胞凋亡及PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达情况 收集各组细胞, 加入RIPA裂解液进行裂解, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min、15 min)收集上清即为蛋白质。对蛋白浓度进行检测后, 进行热变性, 并取部分蛋白样品进行电泳, 结束后进行转膜, 使用脱脂牛奶(5%)封闭膜1.5 h后, 加入Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Cleaved caspase-3(1:500)、Cleaved caspase-9(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:500)、p-AKT(1:500)、AKT(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、p-mTOR(1:500)以及GAPDH(1:1 000)一抗稀释液, 孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$)后, 加入二抗(1:10 000)孵育(室温、1 h), 之后加入ECL显色, ImageJ软件分析各种条带灰度值。

1.3 统计学处理

用SPSS 25.0软件对本次实验所收集到的数据进行差异显著性分析, 其中, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式

表示。经Shapiro-Wilk检验和Levene检验分析,数据若符合正态分布和方差齐性,多组数据采用单因素方差分析法进行分析,多组中两两组间数据采用SNK-*q*法进行分析;若不符合,使用Kruskal-Wallis检验进行多组间比较,组内两两比较使用Dunn's检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 艾司氯胺酮浓度筛选结果

与0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮处理人软骨细胞后,细胞存活率没有明显差异($P>0.05$),而200 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮干预则能降低人软骨细胞存活率($P<0.05$)。见表1。接着,用6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮处理IL-1 β 刺激的人软骨细胞,结果显示,6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮对细胞存活率没有明显影响($P>0.05$),而

50、100 $\mu\text{mol/L}$ 艾司氯胺酮干预则能提高IL-1 β 刺激的人软骨细胞存活率($P<0.05$),且艾司氯胺酮浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时的促进作用更显著(表2)。基于上述结果,后续使用100 $\mu\text{mol/L}$ 作为艾司氯胺酮的工作浓度。

2.2 艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的影响

IL-1 β 组细胞存活率、EdU阳性细胞率均较Control组低,而且差异显著($P<0.05$);与IL-1 β 组相比,IL-1 β +esketamine组细胞存活率和EdU阳性细胞率增加($P<0.05$);IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞存活率、EdU阳性细胞率较IL-1 β +esketamine组均下降,且差异显著($P<0.05$)。见图1和表3。

2.3 艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响

与Control组相比较,IL-1 β 组细胞凋亡率,

表1 各组软骨细胞存活率比较

Table 1 Comparison of chondrocyte viability among different groups

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/% Cell viability /%
0	100.00 $\pm$ 0.15
6.25	99.32 $\pm$ 7.68
12.5	98.14 $\pm$ 8.97
25	96.75 $\pm$ 8.36
50	93.51 $\pm$ 9.02
100	91.05 $\pm$ 8.67
200	85.11 $\pm$ 8.79*
<i>F</i>	2.718
<i>P</i>	0.028

* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

表2 各组软骨细胞存活率比较

Table 2 Comparison of chondrocyte viability among different groups

分组 Group	艾司氯胺酮浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Esketamine concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/% Cell viability /%
Control	-	100.00 $\pm$ 0.21
IL-1 β	-	50.78 $\pm$ 5.16*
Esketamine	6.25	52.13 $\pm$ 5.35
	12.5	54.07 $\pm$ 5.41
	25	56.89 $\pm$ 5.73
	50	61.23 $\pm$ 6.25 [#]
	100	83.74 $\pm$ 8.43 [#]
<i>F</i>	-	65.883
<i>P</i>	-	<0.001

* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与IL-1 β 组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the IL-1 β group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

TUNEL阳性率, Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白表达量增加, Bcl-2蛋白表达量减少, 差异显著 ($P<0.05$); IL-1 β +esketamine组细胞凋亡率、TUNEL阳性率, Bax、Cleaved caspase-3及Cleaved caspase-9蛋白表达量较IL-1 β 组下降, Bcl-2蛋白表达量较IL-1 β 组上升 ($P<0.05$); 与IL-1 β +esketamine组相比较, IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞凋亡率, TUNEL阳性率及Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白表达量均增加, 而Bcl-2蛋白表达量减少, 且差异显著 ($P<0.05$)。见图2~图4和表4。

2.4 艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞ROS水平的影响

与Control组相比, IL-1 β 组细胞ROS荧光强度高 ($P<0.05$); 与IL-1 β 组相比较, IL-1 β +esketamine组细

胞ROS荧光强度降低 ($P<0.05$); 与IL-1 β +esketamine组比较, IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞ROS荧光强度提升 ($P<0.05$)。见图5和表5。

2.5 艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平的影响

与Control组相比较, IL-1 β 组细胞TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平升高 ($P<0.05$); IL-1 β +esketamine组与IL-1 β 组相比较, TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平降低 ($P<0.05$); IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平较IL-1 β +esketamine组升高 ($P<0.05$)。见表6。

2.6 艾司氯胺酮对IL-1 β 诱导的软骨细胞PI3K/AKT/mTOR通路蛋白表达的影响

IL-1 β 组细胞 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白

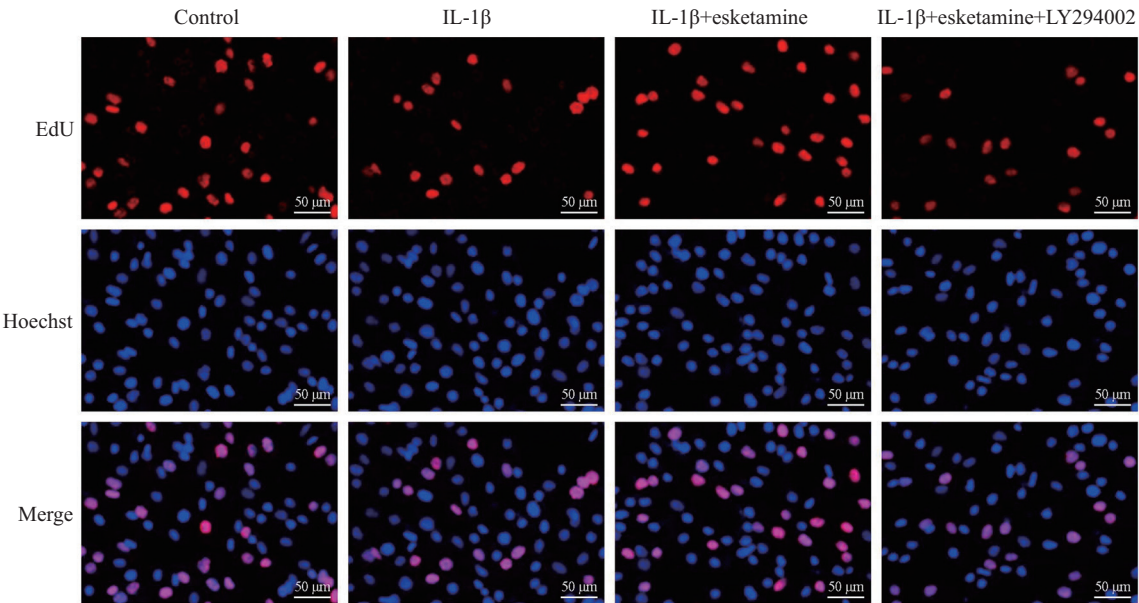


图1 各组软骨细胞EdU染色结果
Fig.1 EdU staining results of chondrocytes in different groups

表3 各组软骨细胞存活率比较
Table 3 Comparison of chondrocyte viability among different groups

分组 Group	细胞存活率/% Cell viability /%	EdU阳性细胞率/% EdU-positive cell ratio /%
Control	100.00±0.25	39.58±2.16
IL-1 β	51.63±5.94*	20.13±1.45*
IL-1 β +esketamine	84.81±8.27 [#]	37.74±2.06 [#]
IL-1 β +esketamine+LY294002	56.49±6.43 ^{&}	23.19±1.24 ^{&}
F	88.088	188.297
P	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与IL-1 β 组比较; [&] $P<0.05$, 与IL-1 β +esketamine组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the IL-1 β group; [&] $P<0.05$ compared with the IL-1 β +esketamine group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

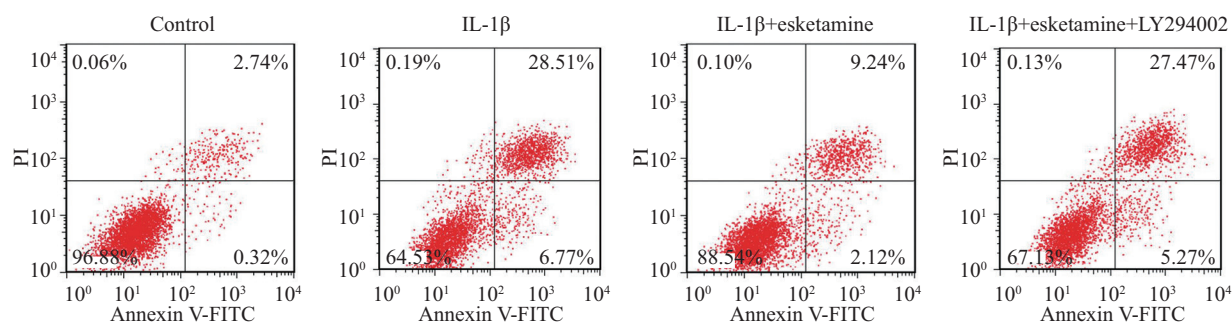


图2 各组软骨细胞凋亡情况的流式细胞仪检测结果

Fig.2 Flow cytometry results of chondrocyte apoptosis in different groups

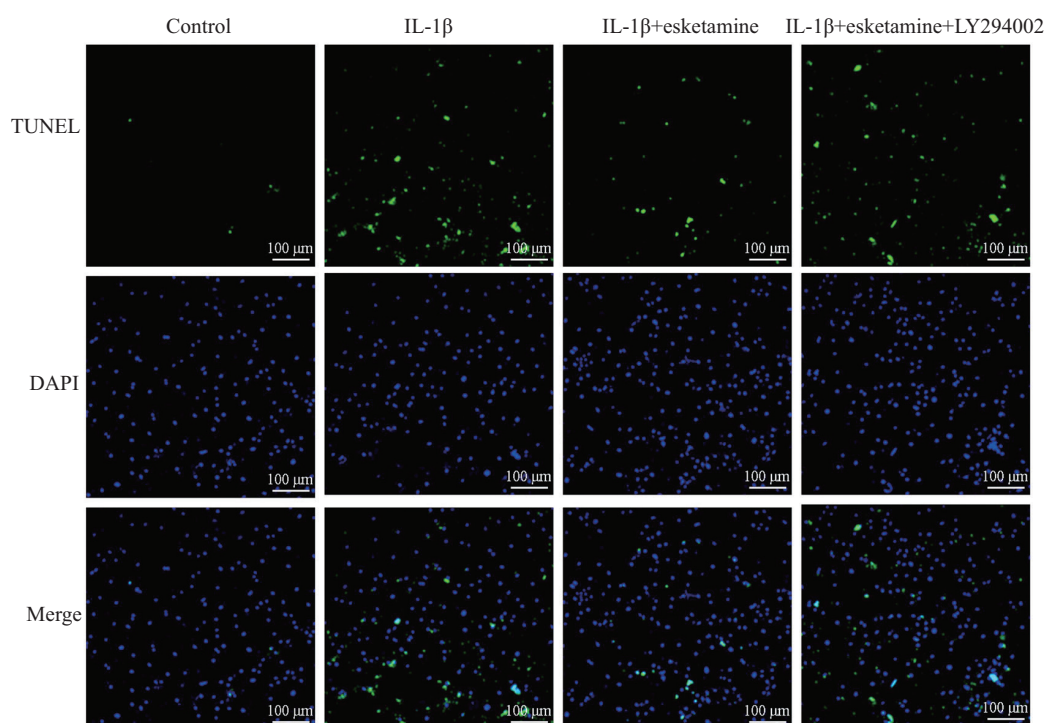


图3 各组软骨细胞凋亡情况的TUNEL检测结果

Fig.3 TUNEL staining results of chondrocyte apoptosis in different groups

表达水平较Control组降低,且差异显著($P<0.05$);与IL-1 β 组相比较,IL-1 β +esketamine组p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平升高($P<0.05$);与IL-1 β +esketamine组比较,IL-1 β +esketamine+LY294002组细胞p-PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达水平下降,差异显著($P<0.05$)。见图6和表7。

3 讨论

骨关节炎是一种发生于关节软骨的退行性炎症疾病,可增加肥胖、糖尿病、骨折等发生风险,其中性别、年龄、肥胖、关节损伤、体力劳动及营养障碍等是导致该疾病发生的危险因素^[11]。骨关节炎

主要特征是疼痛以及关节僵硬和肿胀,严重时可导致骨赘、滑膜炎形成等,并诱发炎症反应^[12]。而且,随着人口老龄化的进展,其发病率不断增加,对患者的生活质量产生显著影响,然而,其发病原因尚不明确,可能与遗传变异、机械损伤、炎症及代谢紊乱等有关^[13]。因此,研究该病发生的分子机制及治疗该疾病的药物具有重要临床意义。IL-1 β 作为一种炎症因子,临床研究中经常用来诱导骨关节炎软骨细胞凋亡^[14],且能刺激多种炎症介质的产生和分泌,例如NO、PGE2、TNF- α 、IL-6,这些介质会导致软骨细胞功能障碍^[15]。因此,本研究利用IL-1 β 干预人软骨细胞以模拟体外骨关节炎,结果发现,

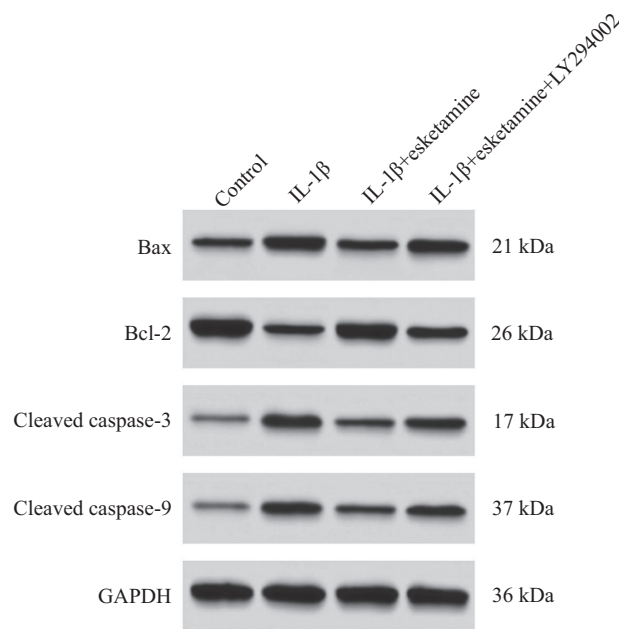


图4 各组软骨细胞Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白表达条带

Fig.4 Protein expression bands of Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 in chondrocytes from different groups

表4 各组软骨细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达量比较

Table 4 Comparison of apoptosis rate and apoptosis-related protein expression in chondrocytes among different groups						
分组 Group	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%	TUNEL阳性率 /% TUNEL posi- tive rate /%	Bcl-2相关X蛋 白 Bax	B细胞淋巴瘤 2蛋白 Bcl-2	活化的半胱 天冬酶-3 Cleaved cas- pase-3	活化的半胱天 冬酶-9 Cleaved cas- pase-9
Control	3.06±0.28	3.19±0.32	0.35±0.03	1.14±0.10	0.11±0.02	0.10±0.02
IL-1 β	35.28±3.74*	37.21±3.82*	0.87±0.08*	0.46±0.05*	0.53±0.05*	0.45±0.05*
IL-1 β +esketamine	11.36±1.23 [#]	13.58±1.51 [#]	0.40±0.05 [#]	1.03±0.11 [#]	0.25±0.03 [#]	0.27±0.04 [#]
IL-1 β +esketamine+LY294002	32.74±3.82 ^{&}	34.56±3.58 ^{&}	0.83±0.08 ^{&}	0.51±0.05 ^{&}	0.48±0.05 ^{&}	0.42±0.03 ^{&}
F	200.432	218.517	112.432	108.428	148.149	114.667
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与IL-1 β 组比较; [&] $P<0.05$, 与IL-1 β +esketamine组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the IL-1 β group; [&] $P<0.05$ compared with the IL-1 β +esketamine group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

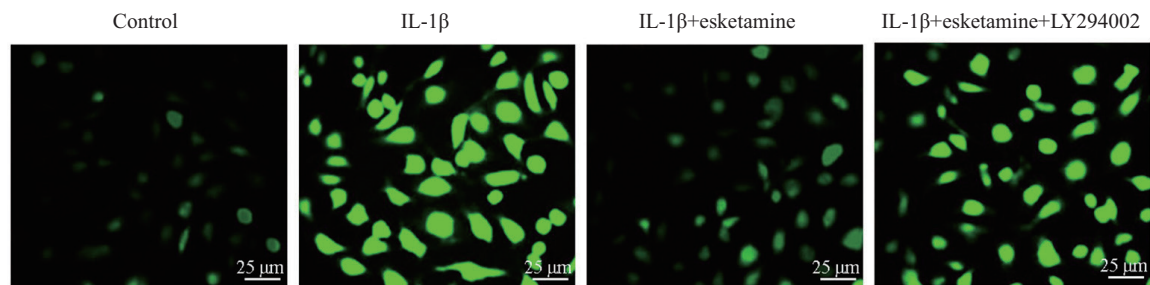


图5 各组软骨细胞ROS含量的DCFH-DA检测结果

Fig.5 DCFH-DA detection results of ROS content in chondrocytes from different groups

IL-1 β 组细胞存活率和EdU阳性细胞率较Control组明显降低,细胞凋亡率、TUNEL阳性率及抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平下降,而促凋亡蛋白Bax、Cleaved

caspase-3、Cleaved caspase-9表达水平升高,此外,ROS、TNF- α 、IL-6、NO、PGE2水平均升高,提示IL-1 β 诱导人软骨细胞出现炎症和氧化应激损伤。

表5 各组软骨细胞ROS含量比较

Table 5 Comparison of ROS content in chondrocytes among different groups

分组 Group	ROS荧光强度(空白组) ROS fluorescence intensity (blank group)
Control	1.02±0.09
IL-1β	6.36±0.84*
IL-1β+esketamine	1.58±0.12 [#]
IL-1β+esketamine+LY294002	5.94±0.67 ^{&}
<i>F</i>	161.546
<i>P</i>	<0.001

**P*<0.05, 与Control组比较; [#]*P*<0.05, 与IL-1β组比较; [&]*P*<0.05, 与IL-1β+esketamine组比较。 $\bar{x}\pm s$, *n*=6。

**P*<0.05 compared with the Control group; [#]*P*<0.05 compared with the IL-1β group; [&]*P*<0.05 compared with the IL-1β+esketamine group. $\bar{x}\pm s$, *n*=6.

表6 各组软骨细胞TNF-α、IL-6、NO、PGE2水平比较

Table 6 Comparison of TNF-α, IL-6, NO and PGE2 levels in chondrocytes among different groups

分组 Group	肿瘤坏死因子-α /pg·mL ⁻¹ TNF-α /pg·mL ⁻¹	白细胞介素-6 / pg·mL ⁻¹ IL-6 /pg·mL ⁻¹	一氧化氮/μmol·L ⁻¹ NO /μmol·L ⁻¹	前列腺素E2/pg·mL ⁻¹ PGE2 /pg·mL ⁻¹
Control	59.36±6.72	86.73±9.04	27.42±2.85	88.24±9.12
IL-1β	221.54±30.16*	316.85±34.49*	97.26±11.74*	352.49±36.25*
IL-1β+esketamine	98.61±10.53 [#]	174.34±19.61 [#]	48.51±4.47 [#]	159.23±16.48 [#]
IL-1β+esketamine+LY294002	201.84±22.67 ^{&}	279.62±30.96 ^{&}	90.38±9.24 ^{&}	311.52±32.43 ^{&}
<i>F</i>	94.075	99.922	107.146	137.430
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与Control组比较; [#]*P*<0.05, 与IL-1β组比较; [&]*P*<0.05, 与IL-1β+esketamine组比较。 $\bar{x}\pm s$, *n*=6。

**P*<0.05 compared with the Control group; [#]*P*<0.05 compared with the IL-1β group; [&]*P*<0.05 compared with the IL-1β+esketamine group. $\bar{x}\pm s$, *n*=6.

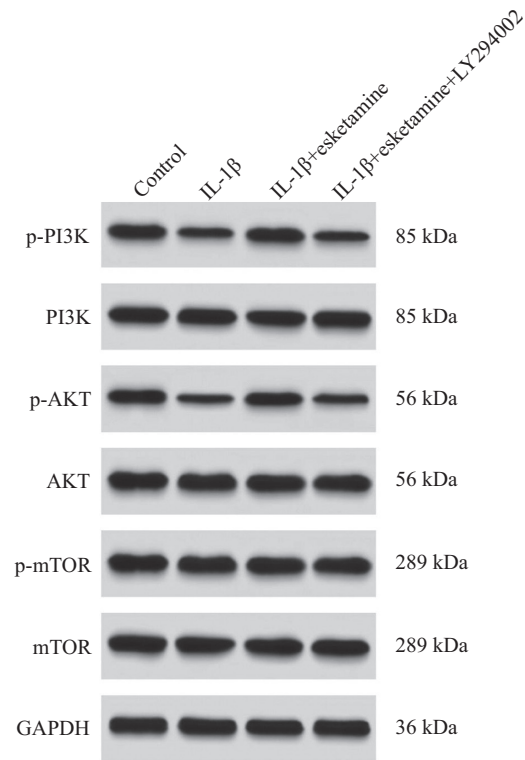


图6 各组软骨细胞PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达条带

Fig.6 Protein expression bands of PI3K/AKT/mTOR pathway-related proteins in chondrocytes from different groups

表7 各组软骨细胞p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达量比较

Table 7 Comparison of p-PI3K, p-AKT and p-mTOR protein expression in chondrocytes among different groups

分组 Group	磷酸化的磷脂酰肌醇3-激酶 p-PI3K	磷酸化的蛋白激酶B p-AKT	磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 p-mTOR
Control	0.97±0.11	0.89±0.07	0.92±0.09
IL-1β	0.44±0.05*	0.37±0.04*	0.33±0.03*
IL-1β+esketamine	0.91±0.09 [#]	0.83±0.08 [#]	0.85±0.09 [#]
IL-1β+esketamine+LY294002	0.48±0.05 ^{&}	0.41±0.04 ^{&}	0.38±0.04 ^{&}
F	73.968	123.310	121.754
P	<0.001	<0.001	<0.001

*P<0.05, 与Control组比较; [#]P<0.05, 与IL-1β组比较; [&]P<0.05, 与IL-1β+esketamine组比较。x̄±s, n=6。

*P<0.05 compared with the Control group; [#]P<0.05 compared with the IL-1β group; [&]P<0.05 compared with the IL-1β+esketamine group. x̄±s, n=6.

艾司氯胺酮是一种新型D-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂,与氯胺酮相比,具有更好的亲和力,已在多个国家得到广泛应用;其作为氯胺酮的右旋异构体,已被证明可提高麻醉药及镇痛药的效果,且已被广泛用于治疗抑郁症和手术患者手术期镇痛^[16]。动物实验表明,艾司氯胺酮可减少促炎细胞因子的释放,提供一种抗伤害性感受,从而缓解疼痛^[17]。体外实验研究发现,艾司氯胺酮可通过抑制铁死亡减轻LPS诱导小鼠肺泡上皮细胞炎症反应^[18]。本研究发现,使用艾司氯胺酮干预IL-1β诱导的软骨细胞后,软骨细胞增殖能力增强,细胞凋亡明显减少,炎症因子(TNF-α和IL-6)水平,NO、PGE2水平及ROS活性明显降低,提示艾司氯胺酮可减少软骨细胞内促炎因子的释放,并抑制细胞凋亡。

PI3K/AKT/mTOR通路是一条可调控多种细胞功能的重要细胞信号通路,比如可参与调控细胞生长、分化、增殖和营养摄取等^[19]。其中,PI3K是脂质激酶家族中的一员,AKT是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,也是PI3K/AKT/mTOR通路中的关键调节因子,mTOR也同样属于丝氨酸/苏氨酸激酶,其可激活AKT,而活化后的AKT也可以直接或间接激活其底物mTOR^[20]。已有研究发现,激活PI3K/AKT/mTOR通路可减轻软骨细胞损伤及炎症反应,并降低软骨细胞凋亡^[21]。YAN等^[22]研究也发现,激活PI3K/AKT/mTOR通路可减轻IL-1β诱导的软骨细胞凋亡。本研究也同样发现,IL-1β处理软骨细胞后,p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达量降低,而在使用艾司氯胺酮处理IL-1β诱导的软骨细胞后,PI3K、AKT、mTOR蛋白的磷酸化水平均升高,提示PI3K/AKT/mTOR通路可能在艾司氯胺酮改善IL-1β诱导的软骨细胞损伤中发挥作用。为验证该猜想,本研究进一步使用PI3K通路抑制剂干预艾

司氯胺酮处理后的软骨细胞,结果发现,PI3K通路抑制剂减弱了艾司氯胺酮对IL-1β诱导的软骨细胞损伤的抑制作用,进一步证实了PI3K/AKT/mTOR通路在该过程中存在调控作用。

综上所述,艾司氯胺酮可抑制IL-1β诱导的软骨细胞炎症反应,并减少细胞凋亡,其作用机制可能与激活PI3K/AKT/mTOR通路有关,可为临床开发治疗骨关节炎的药物提供一定参考依据。然而,本研究未对艾司氯胺酮作用的量效关系进行研究,后续将对此部分进行研究以确定艾司氯胺酮的有效剂量范围,为临床合理用药提供理论参考;另外,机制验证不够充分,未来计划结合基因沉默(如siRNA)或通路激动剂实验,以多角度验证PI3K/AKT/mTOR通路的调控作用,从而完善机制层面的探讨;最后,本研究未进行动物实验,后续需优化实验设计进一步深入研究艾司氯胺酮对骨关节炎发挥保护作用的具体机制。

参考文献 (References)

[1] WALUYO Y, ARTIKA S R, INSANI NANDA WAHYUNI, et al. Efficacy of prolotherapy for osteoarthritis: a systematic review [J]. J Rehabil Med, 2023, 55(1): 1-13.

[2] MOLNAR V, MATIŠIĆ V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9208-31.

[3] CHEN L, YE L, LIU H, et al. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020(1): 1-12.

[4] SHOU H Y, HAN Y Q, YU J, et al. Efficacy and safety of esketamine for supplemental analgesia during elective cesarean delivery: a randomized clinical trial [J]. JAMA Netw Open, 2023, 6(4): e239321-45.

[5] 景建闯, 刘鹏, 安波. 艾司氯胺酮调节Nrf2/HO-1信号通路对骨关节炎大鼠镇痛作用的研究[J]. 东南大学学报: 医学版(JING J C, LIU P, AN B. Analgesic effect of esketamine on osteoarthritis).

- tis rats by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. J South-east Univ, Med Sci Ed, 2023, 42(1): 9-15.
- [6] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. Cell Biosci, 2020, 10(1): 54-66.
- [7] SUN K, LUO J, GUO J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(4): 400-9.
- [8] 汪博, 张明焕. CIRC_0044235靶向miR-574-5p减轻IL-1 β 诱导的人软骨细胞损伤[J]. 基础医学与临床(WANG B, ZHANG M H. CIRC_0044235 alleviates IL-1 β -induced human chondrocyte injury by targeting miR-574-5p [J]. Basic Clin Med), 2023, 43(3): 419-26.
- [9] 崔莽莽, 郭晓霞, 卢蒙恩, 等. 艾司氯胺酮对小鼠体外成骨细胞的影响[J]. 山西医科大学学报(CUI Q Q, GUO X X, LU M E, et al. Effect of esketamine on mouse osteoblasts *in vitro* [J]. J Shanxi Med Univ), 2023, 54(3): 358-63.
- [10] 罗鹏, 吴钊, 陈佳伟, 等. 牡荆素调控PI3K/Akt通路对IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡的影响[J]. 解剖学研究(LUO P, WU F, CHEN J W, et al. Effect of vitexin on IL-1 β -induced apoptosis of articular chondrocytes by regulating PI3K/Akt pathway [J]. Anat Res), 2024, 46(5): 451-5, 68.
- [11] COLLETTI A, CICERO A G. Nutraceutical approach to chronic osteoarthritis: from molecular research to clinical evidence [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12920-42.
- [12] RIM Y A, NAM Y, JU J H. The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2358-73.
- [13] JIANG Z, CAI X, YAO X, et al. The causal effect of cytokine cycling levels on osteoarthritis: a bidirectional mendelian randomized study [J]. Front Immunol, 2024, 14(1): 1-10.
- [14] LIU L, ZHANG W, LIU T, et al. The physiological metabolite α -ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress [J]. Redox Biol, 2023, 62(1): 102663-78.
- [15] GUO X, FENG X, YANG Y, et al. Spermidine attenuates chondrocyte inflammation and cellular pyroptosis through the AhR/NF- κ B axis and the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway [J]. Front Immunol, 2024, 15: 146-58.
- [16] CHEN Y, GUO Y, WU H, et al. Perioperative adjunctive esketamine for postpartum depression among women undergoing elective cesarean delivery: a randomized clinical trial [J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(3): e240953-67.
- [17] DUAN C, ZHU Y, ZHANG Z, et al. Esketamine inhibits the c-Jun N-terminal kinase pathway in the spinal dorsal horn to relieve bone cancer pain in rats [J]. Mol Pain, 2024, 20(1): 25-37.
- [18] SHI J, SONG S, WANG Y, et al. Esketamine alleviates ferroptosis-mediated acute lung injury by modulating the HIF-1 α /HO-1 pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142(Pt A): 16-24.
- [19] BASILE M S, CAVALLI E, MCCUBREY J, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential pharmacological target in COVID-19 [J]. Drug Discov Today, 2022, 27(3): 848-56.
- [20] LUO Q, DU R, LIU W, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: role in esophageal squamous cell carcinoma, regulatory mechanisms and opportunities for targeted therapy [J]. Front Oncol, 2022, 12(1): 79-86.
- [21] WANG Z, XU H, WANG Z, et al. Traditional chinese manual therapy (tuina) improves knee osteoarthritis by regulating chondrocyte autophagy and apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway: an *in vivo* rat experiment and machine learning study [J]. J Inflamm Res, 2024, 17(1): 6501-19.
- [22] YAN S, JIANG C, LI H, et al. FAM3A protects chondrocytes against interleukin-1 β -induced apoptosis through regulating PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(1): 209-14.