

淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子- κ B 通路的影响金剑飞¹ 何维英¹ 周钰龙^{1△}

[摘要] 目的:探讨淫羊藿总黄酮(Epext)对膝关节骨性关节炎的作用及分子机制。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠分为假手术组、模型组、Epext(600,300,150 mg/kg)组及阳性对照组,共 6 组;采用右膝关节前交叉韧带切断术建立大鼠膝关节骨性关节炎模型,测量机械性痛阈值和膝关节直径,第 14 天灌胃给药,连续 4 周,眼球取血,脱颈椎处死,分离膝关节滑膜组织;采用 ELISA 法检测血清中炎症因子的分泌水平;采用 RT-PCR 法和 Western Blot 法分别检测膝关节滑膜组织中炎症因子和 NF- κ B 通路分子的表达水平。结果:术前大鼠的机械性痛阈值和膝关节直径差异均无统计学意义($P>0.05$);术后模型组大鼠的机械性痛阈值显著降低,膝关节直径显著增加,Epext 显著增加 KOA 大鼠的机械性痛阈值和减小膝关节直径;ELISA 和 RT-PCR 结果分别表明 Epext 显著抑制 KOA 大鼠血清和滑膜组织中 IL-6,IL-1 β ,TNF- α 的表达;苏木精-伊红染色结果表明 Epext 显著抑制 KOA 大鼠膝关节滑膜组织的炎性细胞浸润和滑膜增生;Western Blot 结果表明 Epext 显著抑制 KOA 大鼠滑膜组织中 p-I κ B- α /I κ B- α ,p-p65/p65 的表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:Epext 通过抑制 NF- κ B 通路对膝关节骨性关节炎治疗具有潜在价值。

[关键词] 淫羊藿总黄酮;膝关节骨性关节炎;核因子- κ B 信号;炎症

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)03-0005-05

Effect of Total Flavonoids of Epimedium on the Development of Knee Osteoarthritis in Rats by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway

JIN Jianfei¹ HE Weiyang¹ ZHOU Yulong^{1△}

¹Department of Orthopedics, Zhuji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuji 311800, Zhejiang China.

Abstract Objective: To investigate the effect of total flavonoids of Epimedium(Epext)on knee osteoarthritis and related molecular mechanisms. **Methods:** 60 male SD rats were divided into sham operation group, model group, Epext(600,300,150 mg/kg)group and positive control group for a total of 6 groups. Rats from each group were caused knee osteoarthritis (KOA)model with right knee anterior cruciate ligament severance, and the mechanical pain threshold and knee diameter were measured. On the 14th day, the drug was administered intragastrically for 4 weeks. Blood was taken from eyeball, the cervical vertebra was sacrificed, and the knee joint synovium tissue was dissected. The secretion levels of inflammatory factors in rat serum were detected by ELISA. RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression levels of inflammatory factors and NF- κ B pathway in synovium tissue of knee joint. **Results:** There was no significant difference in mechanical pain threshold and knee joint diameter before operation. Compared with the sham operation group, the mechanical pain threshold of the model group was significantly decreased, and the knee joint diameter was significantly increased. Epext significantly increased the mechanical pain threshold and reduced knee diameter in KOA rats. ELISA and RT-PCR results separately showed that Epext significantly inhibited the expression of IL-6, IL-1 and TNF- α in serum and synovium of KOA rats. HE results indicated that Epext can significantly inhibited inflammatory cell infiltration and synovium hyperplasia in the knee joint synovium tissue of KOA rats. The result of Western Blot showed that Epext ignificantly inhibited the expression of p-I κ B- α /I κ B- α and p-p65/p65 in the synovium tissue of KOA rats. **Conclusion:** Epext has potential value

in the treatment of knee osteoarthritis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway.

Keywords: epimedium extract; knee osteoarthritis; NF- κ B signal; inflammation

基金项目:浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C37095)

¹ 浙江诸暨市中医医院骨二科(浙江 诸暨,311800)

[△]通信作者 E-mail: km2001xj@163.com

膝关节骨性关节炎(KOA)是一种以关节软骨变性、骨质疏松及滑膜炎为特征的慢性骨关节病,其表现为关节疼痛、活动受限等^[1-3]。淫羊藿是一种传统中药,其主要用于治疗阳痿早泄、腰酸腿痛、四肢麻木等疾病,且具有广泛的抗炎、抗氧化及抗肿瘤作用^[4-5]。淫羊藿总黄酮(Epext)对于膝关节骨性关节炎的作用及其机制不太清晰,因此本研究探索了淫羊藿总黄酮对 KOA 的作用及相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药

所有动物试验均经过动物伦理委员会的同意和批准,将 60 只雄性 SD 大鼠分为假手术组、模型组、阳性对照组及 Epext 组(Epext 600,300,150 mg/kg),每组 10 例,术后 2 周(即第 14 天)开始灌胃给药 Epext,1 次/d,连续 4 周,假手术组和模型组均灌胃给予等体积的生理盐水,阳性对照组灌胃给予双氯芬酸钠(4 mg/kg)。

1.2 膝关节骨性关节炎模型建立

采用右膝关节前交叉韧带切断术建立大鼠膝关节骨性关节炎模型,造模前 SD 大鼠禁食 12 h,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,取仰卧位固定于操作台,右侧膝关节脱毛备皮后用碘伏消毒,在无菌条件下,于膝关节内侧切约 1 cm 的纵行切口,打开关节腔,切断前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板,逐层缝合伤口,术后连续 4 d 肌肉注射抗生素(氨苄青霉素,4×10⁴ U/d),假手术组在没有其他任何处理的情况下,缝合伤口,记手术当天为第 0 天。

1.3 实验材料

p-IκB-α, IκB-α, p-p65, p65 及 GAPAH 抗体(Ab-cam,英国);蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(碧云天,中国);IL-6, IL-1β, TNF-α 大鼠 ELISA 试剂盒(达科为,中国);双氯芬酸钠(阿拉丁,中国);电子自动爪触觉测试仪(瑞沃德,中国);氨苄青霉素(威士特,加拿大);苏木精-伊红染色液(碧云天,中国);HRP 标记山羊抗兔 IG(CST,美国)。

1.4 药物制备

称取干燥淫羊藿生药 1 kg,加入 1 L 乙醇(50%)加热提取 3 h,使用纱布过滤,再向药渣中加入 1 L 乙醇(50%),加热提取 3 h,使用纱布过滤,合并滤液,浓缩、干燥,加入氢氧化钠(1 mol/L)调 pH 值至 13~14,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,用 HCl 调 pH 值至 1~2,乙酸乙酯-甲醇(8:2)萃取,浓缩,干燥即得淫羊藿总黄酮(Epext,产率 53.3%),4℃保存。

1.5 膝关节肿胀检测

术前和术后采用电子游标卡尺测定各组大鼠的膝关节直径,连续测量 3 次,取其平均值,每周 1 次。

1.6 机械性痛阈检测

手术前和术后采用电子自动爪触觉测试仪测定各组大鼠的机械刺激缩爪阈值(PWT),每周测量 1 次,将刺激针对准足底并逐渐增加刺激力量,大鼠感觉到痛觉后,移开刺激针,设备记录并显示刺激针移开的最大值(即 PWT),隔 5 min 测量 1 次,连续测量 3 次,取其平均值。

1.7 RT-PCR 检测

分离收集各组大鼠的膝关节滑膜组织,称取 30 mg,加入 1 mL TRIzol(诺唯赞,中国)提取总 RNA,用 NanoDrop 2000 Spectrophotometer(赛默飞,美国)检测总 RNA 的纯度和浓度,用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser(宝日医生物技术有限公司,日本)将 RNA(1 μg)逆转录为 cDNA,使用配有 SYBRs Green Master Mix(诺唯赞,中国)的 CFX Connect™ Real-Time 系统(BioRad,美国)进行 qRT-PCR 定量分析,扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 15 s,60℃延伸 30 s,重复 40 个循环,最后根据 2^{-ΔΔCt}法计算 IL-6, IL-1β, TNF-α, GAPDH mRNA 的表达水平,RT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列
IL-6	5'-CACCCTGCCCCGTAGATGAAG-3'
	5'-AGGGTACAGTCGTCGAACTCT-3'
IL-1β	5'-TGAGCCAAGACAGAAAACCCA-3'
	5'-GGGACATGAGTAAGGTTCTCTGTT-3'
TNF-α	5'-TTGCTCTTATGGATTGTCCCC-3'
	5'-CATTGATGCAGCACAGTTGTC-3'
GAPDH	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'
	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

1.8 蛋白印迹免疫分析(Western Blot)

分离收集各组大鼠的膝关节滑膜组织,称取 30 mg,采用 Western Blot 检测滑膜组织中 p-IκB-α, IκB-α, p-p65 及 p65 的蛋白表达水平。根据制造商说明操作提取组织总蛋白,采用 BCA 法(碧云天,中国)对蛋白进行定量,加入 loading buffer(4 倍)于 100℃煮沸 5 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳来达到分离蛋白的目的,电泳条件:80 V,30 min;120 V,60 min。随后采用 100 V,90 min 将电泳分离后的蛋白转移至聚偏佛乙烯(PVDF)膜(Millipore,美国),用 5%脱脂奶粉封闭 60 min, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用一抗(p-IκB-α, IκB-α, p-p65, p65 及 GAPDH,按 1:1 000 稀释)4℃孵育过夜, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用二抗(HRP 标记山羊抗兔 IG,按 1:10 000 稀释)孵育 90 min, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用 ECL 化学发光法(Millipore, MA)显影检测, ImageJ 分析灰度值。

1.9 ELISA 法

采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的分泌水平, 大鼠眼球取血, 用 1.5 mL EP 管收集血液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清, 使用 ELISA 试剂盒根据制造商说明检测大鼠血清中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量。

1.10 苏木精-伊红病理染色

分离收集各组大鼠的膝关节滑膜组织, 置于 10% 福尔马林固定 24 h, 然后用脱钙液 EDTA (0.5 mol/L, pH=8) 脱钙 12 d, 石蜡包埋, 切成 4 μm 薄片, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察滑膜组织的病理变化 (包括炎性细胞浸润和滑膜增生)。

1.11 统计学方法

所有数据均采用 GraphPad Prism 5.0 软件分析, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 用 One-Way ANOVA 进行多组数据的检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠膝关节肿胀和疼痛的影响

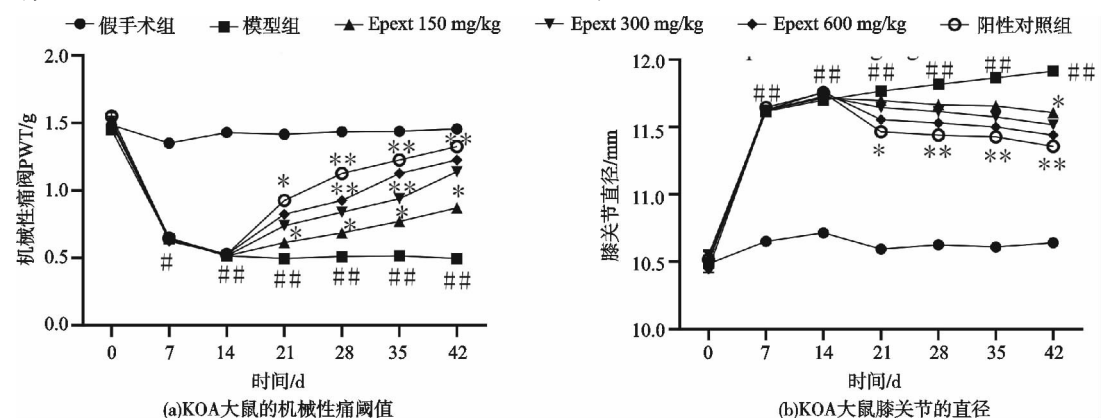


图 1 淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠关节肿胀和疼痛的影响 (与假手术组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.2 淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠血清中炎症因子分泌水平的影响

采用 ELISA 法检测大鼠血清中炎症因子的分泌水平, 结果表明与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量均显著增加; 与模型组相比, 淫羊藿总黄酮各剂量组和阳性对照组大鼠血清中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量均显著降低 (见图 2), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 上述结果表明淫羊藿总黄酮能够显著抑制 KOA 大鼠的炎症反应。

2.3 淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠滑膜组织中炎性细胞浸润和滑膜增生的影响

采用苏木精-伊红染色检测大鼠滑膜组织的炎性细胞浸润和滑膜增生, 结果表明: 与假手术组相比, 模型组大鼠的滑膜组织出现大量的炎性细胞浸润及滑膜增生; 与模型组相比, 淫羊藿总黄酮呈剂量依赖性抑制

机械性痛阈测量结果表明术前各组大鼠的机械性痛阈差异均无统计学意义; 与假手术组相比, 术后第 7 天和第 14 天模型组、Epext 组及阳性对照组大鼠的痛阈均显著下降, 模型组持续至第 42 天; 第 14 天给药, 从第 21 天开始与模型组相比, 淫羊藿总黄酮各剂量组和阳性对照组大鼠的痛阈均显著上升 (见图 1a), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。膝关节肿胀结果表明术前各组大鼠的膝关节直径差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与假手术组相比, 术后第 7 天和第 14 天模型组、Epext 组及阳性对照组大鼠的膝关节直径均显著增加, 模型组持续增加至第 42 天; 与模型组相比, 从第 21 天开始, 淫羊藿总黄酮高剂量组和阳性对照组大鼠的膝关节直径均显著减小, 从第 28 天开始, 中剂量和低剂量组大鼠的膝关节直径也显著减小 (见图 1b), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果表明本研究成功建立了 KOA 大鼠模型, 同时表明淫羊藿总黄酮能够缓解 KOA 大鼠的关节疼痛和肿胀, 对 KOA 大鼠具有一定的治疗效果。

KOA 大鼠滑膜组织中的炎性细胞浸润和滑膜增生 (见图 3), 上述结果表明淫羊藿总黄酮能够缓解 KOA 大鼠滑膜炎的发展过程。

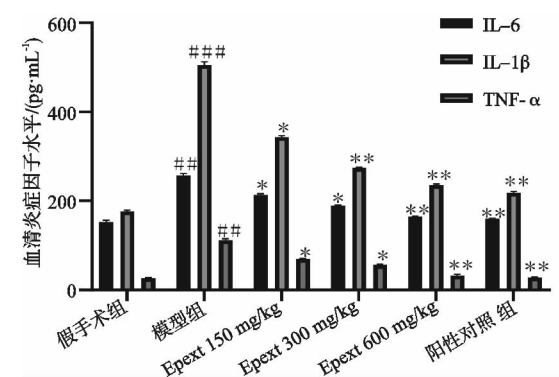


图 2 淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠血清中炎症因子分泌水平的影响 (与假手术组比, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$; 与模型组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

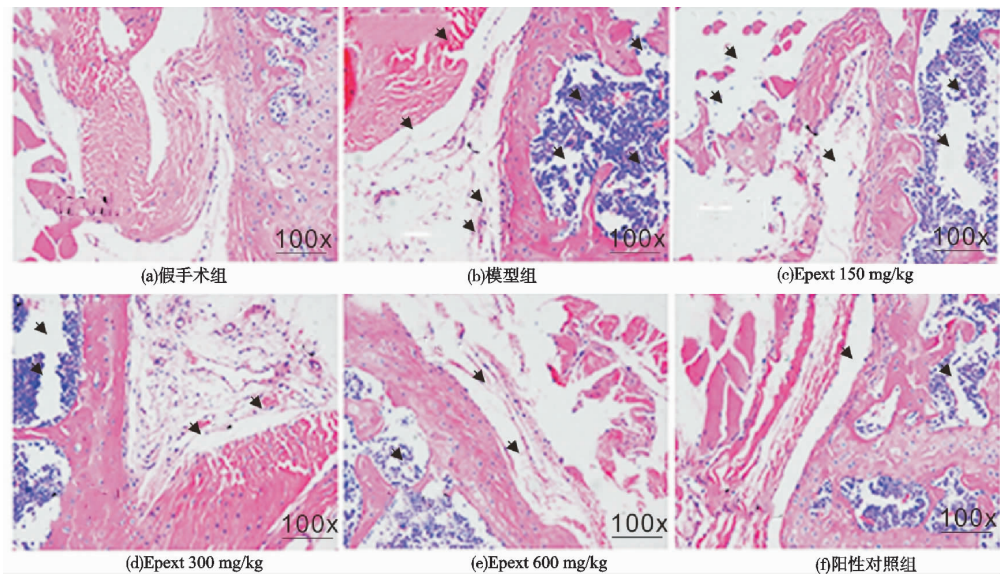


图3 淫羊藿总黄酮对KOA大鼠滑膜组织中炎症细胞浸润和滑膜增生的影响

2.4 淫羊藿总黄酮对KOA大鼠滑膜组织中炎症因子表达的影响

采用RT-PCR法检测大鼠滑膜组织中炎症因子的表达水平,结果表明与假手术组相比,模型组大鼠滑膜组织中IL-6,IL-1 β ,TNF- α mRNA的表达水平均显著上调;与模型组相比,淫羊藿总黄酮各剂量组和阳性对照组大鼠滑膜组织中炎症因子IL-6,IL-1 β ,TNF- α mRNA的表达水平均显著下调,且高剂量组的效果与阳性对照组相当(见图4),差异有统计学意义($P<0.05$),上述结果表明淫羊藿总黄酮能够显著抑制KOA大鼠滑膜组织中的炎症反应。

2.5 淫羊藿总黄酮对KOA大鼠滑膜组织中NF- κ B信号相关分子表达的影响

采用Western Blot法检测大鼠滑膜组织中NF- κ B信号相关分子的蛋白表达水平,结果表明:与假手术组相比,模型组大鼠滑膜组织中p-I κ B- α /I κ B- α ,p-p65/p65的蛋白表达水平均显著上调;与模型组相比,

淫羊藿总黄酮各剂量组和阳性对照组大鼠滑膜组织中p-I κ B- α /I κ B- α ,p-p65/p65的蛋白表达水平均显著下降,且高剂量组的效果与阳性对照组相当(见图5),差异有统计学意义($P<0.05$)上述结果表明淫羊藿总黄酮能够显著抑制KOA大鼠滑膜组织中NF- κ B信号通路的活化。

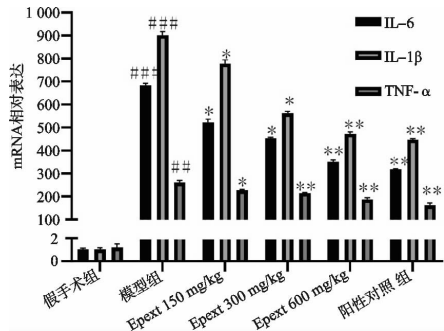
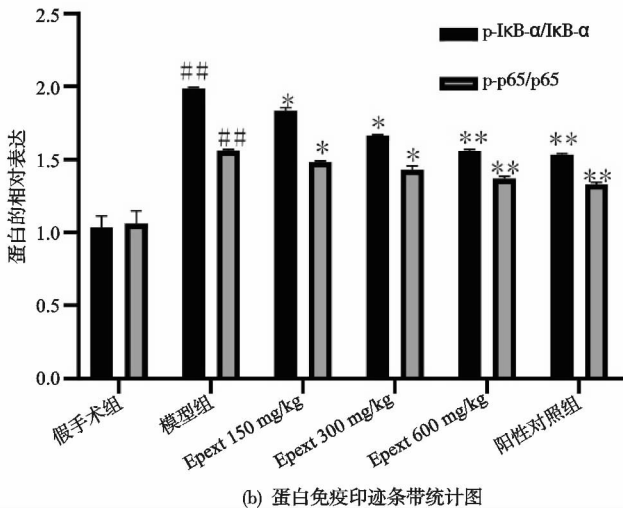
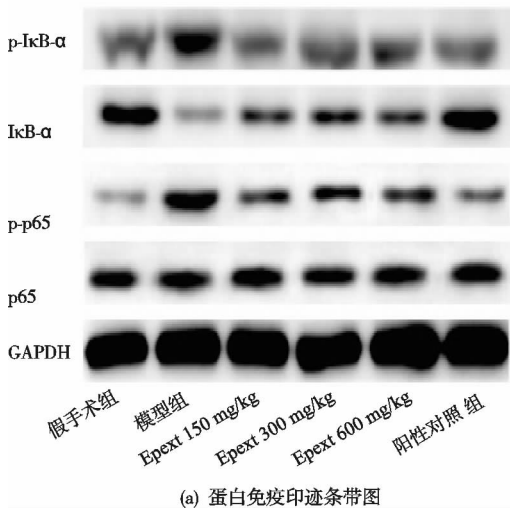


图4 淫羊藿总黄酮对KOA大鼠滑膜组织中炎症因子表达的影响(与假手术组比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$)



(a) 蛋白免疫印迹条带图

(b) 蛋白免疫印迹条带统计图

图5 淫羊藿总黄酮对KOA大鼠滑膜组织中NF- κ B信号相关分子表达的影响(与假手术组比,## $P<0.01$;与模型组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$)

3 讨论

淫羊藿(Epimedium Brevicornu Maxim)作为一种传统中药,其活性成分具有多种药理学活性,包括抗氧化、抗肿瘤及抗炎等,并且对软骨和骨组织中破骨细胞

和成骨细胞具有调节作用^[6]。但是关于淫羊藿总黄酮用于 KOA 的研究较少,因此本研究评价了淫羊藿总黄酮对 KOA 的作用及相关分子机制。实验研究简图见图 6。

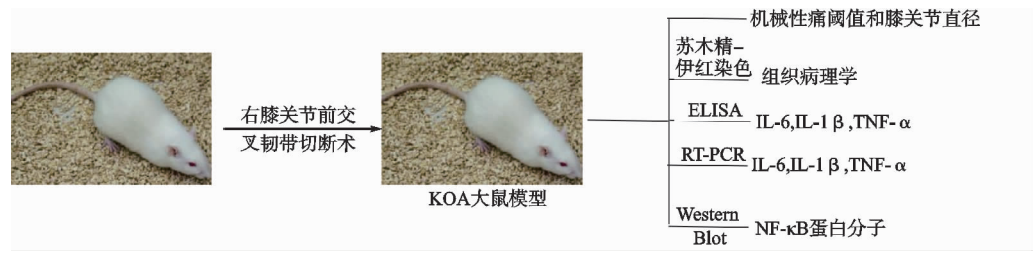


图 6 实验研究简图

KOA 是一种慢性退行性骨关节病,临床以慢性关节疼痛、肿胀及活动受限为主要表现^[7]。生物力学环境是 KOA 的重要诱发因素^[8],因此本实验首先采用膝关节前交叉韧带切断术复制 KOA 大鼠模型,结果表明术后模型组大鼠的膝关节直径显著大于假手术组,同时机械痛阈值小于假手术组,这表明本研究成功建立了 KOA 大鼠模型,为后面的实验干预研究提供了实验基础。淫羊藿总黄酮呈剂量和时间依赖性增加 KOA 大鼠的机械痛阈值,减小膝关节直径,表明 Epext 能够缓解 KOA 大鼠的关节肿胀和疼痛,对 KOA 具有一定的潜在疗效。

研究表明滑膜炎在 KOA 的发生和病理变化过程中起着关键作用,其直接与膝关节疼痛和肿胀相关^[9],因此本研究进一步评价了淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠炎症反应的作用。在 KOA 病理过程中,炎性细胞浸润滑膜组织引起滑膜增生,产生各种炎症因子、趋化因子及蛋白酶,导致骨质破坏^[10-11]。在多种炎症因子中,IL-6,IL-1β,TNF-α 是主要的促炎细胞因子,在 KOA 的病理发展过程中具有重要的调节作用^[12-13]。本研究表明淫羊藿总黄酮能够下调 KOA 大鼠血清中 IL-6,IL-1β,TNF-α 的分泌水平和关节滑膜组织中 IL-6,IL-1β,TNF-α 的表达水平,同时,苏木精-伊红染色结果表明淫羊藿总黄酮能够抑制炎性细胞浸润关节滑膜组织和滑膜增生,上述结果表明淫羊藿总黄酮能够抑制 KOA 大鼠的炎症反应。

核因子 κB(Nuclear factor kappa-B,NF-κB)信号通路在促炎细胞因子表达和炎性细胞浸润过程中具有重要的调节作用^[14-15],因此本研究进一步评价了淫羊藿总黄酮对 KOA 大鼠膝关节滑膜组织中 NF-κB 信号相关分子表达的影响。在正常生理条件下,p65 与 IκB-α 形成聚合物存在于细胞浆中,炎症情况下,IKK 能够诱导 IκB-α 发生磷酸化并降解,引起 p65 转移进入细胞核,与特异的启动子结合促进炎症因子包括 IL-6,IL-1β,TNF-α 的转录^[15-18]。本研究表明淫羊藿总黄酮能够下调 KOA 大鼠膝关节滑膜组织中 p-p65/

p65 与 p-IκB-α/IκB-α 的表达水平,上述结果表明淫羊藿总黄酮可能通过抑制 NF-κB 信号通路活化产生抗炎作用。

综上所述,本研究表明淫羊藿总黄酮灌胃给予 KOA 大鼠,能够通过抑制 NF-κB 信号通路介导的炎症反应来缓解关节肿胀和疼痛。因此,淫羊藿总黄酮对治疗膝关节骨性关节炎具有一定的潜在作用。

参考文献

[1] SIEBERT S,TSOUKAS A,ROBERTSON J,et al. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases[J]. Pharmacol Rev,2015,67(2):280-309.

[2] LOESER R F,GOLDRING S R,SCANZELLO C R,et al. Osteoarthritis;a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum,2014,64(6):1697-1707.

[3] HUNTER D J,LO G H. The Management of osteoarthritis;an overview and call to appropriate conservative treatment[J]. Med Clin North Am,2009,34(3):689-712.

[4] 张晓钢,赵咏芳,郭海玲,等. 淫羊藿治疗骨质疏松症的研究现状[J]. 河北中医,2012,34(10):1579-1581.

[5] 张禄镨,马剑雄,匡明杰,等. 淫羊藿治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志,2017,24(4):445-448.

[6] 刘韶英,吴红金. 淫羊藿苷药理作用的研究进展[J]. 医学综述,2009,10(6):909-912.

[7] KOLHE R,HUNTER M,LIU S,et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis[J]. Sci Rep,2017,7(1):2029-2038.

[8] 孟庆莹,王一洲,赵强. 膝骨性关节炎的生物力学研究进展[J]. 河南中医,2014,34(4):676-678.

[9] MOBASHERI A,BAY-JENSEN A C,SPIL W E V,et al. Osteoarthritis year in review 2016;biomarkers(biochemical markers)[J]. Osteoarthritis Cartilage,2017,25(2):199-208.