

• 实验研究 •

夏枯草黄酮对骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡的影响及作用机制研究

吕先俊¹ 常利民¹ 陈同林¹

[摘要] 目的:探讨夏枯草黄酮对骨关节炎(OA)大鼠软骨细胞凋亡及 Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)通路的影响。方法:通过切断大鼠前交叉副韧带、内侧副韧带,摘除内侧半月板构建 OA 大鼠模型,将造模成功大鼠随机分为 OA 组、夏枯草黄酮低、中、高剂量组和 RhoA 通路抑制剂(Y-27632)组;另取 12 只大鼠仅剪开皮肤暴露关节腔,作为假手术组;假手术组和 OA 组大鼠均给予生理盐水灌胃,夏枯草黄酮低、中、高剂量组分别给予 6.125, 12.250, 24.500 mg/kg 夏枯草黄酮灌胃, Y-27632 组给 5 mg/kg 的 Y-27632 灌胃;1 次/d,连续 8 周。末次给药后 24 h,检测大鼠压痛阈值、热痛阈值,酶联免疫吸附法检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平,苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠关节软骨形态,一步法原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠软骨细胞凋亡,蛋白免疫印迹法检测大鼠软骨组织凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 及 RhoA/ROCK 通路蛋白的表达。结果:假手术组大鼠关节软骨结构清晰,排列规整,表层光滑无缺损,各层细胞分布均匀;OA 组大鼠关节软骨表层粗糙且不完整,纤维化明显,各层细胞排列紊乱;夏枯草黄酮各剂量组、Y-27632 组大鼠表层结构相对正常,但部分区域仍存在细胞紊乱现象;夏枯草黄酮高剂量组与 Y-27632 组两组间大鼠骨关节软骨形态差异不明显。与假手术组比较,OA 组大鼠压痛阈值及热痛阈值显著降低, Mankin's 评分、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平、软骨细胞凋亡数、软骨组织 Caspase-3、RhoA、ROCK 蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组压痛阈值及热痛阈值显著升高, Mankin's 评分、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平、软骨细胞凋亡数、软骨组织 Caspase-3、RhoA、ROCK 蛋白表达显著降低,且呈现夏枯草黄酮剂量依赖性($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:夏枯草黄酮通过抑制 OA 大鼠软骨细胞凋亡改善大鼠关节软骨损伤,可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路有关。

[关键词] 夏枯草黄酮;骨关节炎;大鼠;软骨细胞;凋亡

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)03-0001-06

Study of Efficacy of *Prunella Vulgaris* Flavonoids on Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis Rats and Its Action Mechanism

LYU Xianjun¹ CHANG Limin¹ CHEN Tonglin¹ LIU Baoge²

¹ Department of Trauma Orthopedics, Beijing Chaoyang Emergency Rescue Center, Beijing 100020, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of *Prunella vulgaris* flavonoids on chondrocyte apoptosis and rat's homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) pathway in osteoarthritis (OA) rats. **Methods:** The OA rat model was constructed by cutting off the rat's anterior cruciate collateral ligament and medial collateral ligament and removing the medial meniscus. These model rats were randomly divided into OA group, *Prunella vulgaris* flavonoids low, medium and high dose groups and RhoA pathway inhibitor (Y-27632) group, other 12 rats were cut open only to expose the joint cavity as the sham operation group, rats in sham operation group and OA group were given normal saline by gavage, *Prunella vulgaris* flavonoids low, medium and high dose groups were given 6.125, 12.250 and 24.500 mg/kg *Prunella* flavone by gavage respectively, and Y-27632 group was given 5 mg/kg Y-27632 by

gavage once a day for 8 weeks. The tenderness threshold and heat pain threshold of rats were measured; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β)

基金项目:北京市科学技术委员会科研计划项目
(D191100000417005)

¹ 北京朝阳急诊抢救中心创伤骨科(北京,100020)

in rats, hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the morphology of rat articular cartilage; one-step in situ end labeling (TUNEL) method was used to detect rat chondrocyte apoptosis, Western Blot was used to detect the expression of apoptotic protein Caspase-3 and RhoA/ROCK pathway protein in rat cartilage tissue 24 h after the last administration. **Results:** The articular cartilage structure of rats in the sham operation group was clear and regular, the surface was smooth without defects, and the cells of each layer were evenly distributed. The surface of the articular cartilage of rats in the OA group was rough and incomplete, with obvious fibrosis, and the cell arrangement of each layer was disordered, the surface structure of rats in the *Prunella vulgaris* flavonoids each dose group and Y-27632 group was relatively normal, but there were still cell disorders in some areas, there was no significant difference in the morphology of the bone articular cartilage between the high-dose *Prunella vulgaris* flavonoids group and the Y-27632 group. Compared with the sham operation group, the tenderness threshold and heat pain threshold of rats in the OA group were significantly reduced, and the Mankin's score, serum TNF- α , IL-1 β levels, chondrocyte apoptosis number, cartilage tissue Caspase-3, RhoA and ROCK protein expression were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the OA group, the tenderness threshold and heat pain threshold of rats in the *Prunella vulgaris* flavonoids low, medium, and high dose groups were significantly increased, and the Mankin's score, serum TNF- α , IL-1 β levels, chondrocyte apoptosis number, cartilage tissue Caspase-3, RhoA and ROCK protein expression were significantly reduced, and showed dose-dependent of the *Prunella vulgaris* flavonoids ($P < 0.05$), there was no significant difference in the above indexes between *Prunella vulgaris* flavonoids high dose group and Y-27632 group ($P > 0.05$). **Conclusion:** *Prunella vulgaris* flavonoids can improve rat articular cartilage damage by inhibiting chondrocyte apoptosis in osteoarthritis rats, which may be related to the inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway.

Keywords: *Prunella vulgaris* flavonoids; osteoarthritis; rat; chondrocyte; apoptosis

骨关节炎(OA)是一种以关节软骨变性和关节周围骨质增生为特征的慢性关节病^[1],有研究者认为软骨细胞的凋亡与OA的发生发展有关^[2-3]。夏枯草含有黄酮类成分,具有抗氧化、抗炎等生物学活性^[4-5],但其在OA中的作用和发展机制目前未见研究。Ras同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)信号通路与软骨细胞的凋亡有关^[6]。本研究通过探讨夏枯草黄酮对OA大鼠软骨细胞凋亡及RhoA/ROCK信号通路的影响,以期为OA治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠(7~8 周龄,体重(240±20)g),购自北京唯尚立德生物科技有限公司,生产许可证号为 SCXK(京)2018-0044,动物质量合格证号为 ZS-2020-0617,大鼠饲养于通风良好的实验室普通清洁环境(温度 22~25℃,相对湿度 50%~70%),所有大鼠均可自由获得食物和水,适应性饲养 1 周。本研究经北京朝阳急诊抢救中心伦理委员会批准。

1.1.2 主要药品、试剂及仪器 夏枯草黄酮(原料药,纯度为 99.95%,批号为 C1078-19)购自陕西天瑞生物技术有限公司,将夏枯草黄酮和生理盐水配制成浓度为 6.125,12.250,24.500 mg/kg 的混悬液;RhoA 通路抑制剂(Y-27632)(批号为 S1541)购自美国 Selleck 公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(批号为 SYIN-

02786)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)(批号为 SYIN-02187)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自上海双赢生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号为 C0105M)、一步法原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(批号为 C1086)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(批号为 C95173)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)(批号为 ab184787)、RhoA(批号为 ab189494)、ROCK(批号为 ab210498)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(批号为 ab201796)单克隆抗体、山羊抗兔二抗(批号为 ab150077)购自英国 abcam 公司;电子压痛仪(型号为 YLS-3E)购自天津诺雷信达科技有限公司;足底热测痛仪(型号为 BW-Plantar390)购自美国 IITC 公司;酶标仪(型号为 HBS-1096A)购自深圳市良谊实验室仪器有限公司;荧光显微镜(型号为 DM2500)购自德国 LEICA 公司;凝胶成像系统(型号为 Gel-Doc)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 模型构建 参照文献[7]的方法进行造模,随机选取 60 只大鼠,3%戊巴比妥钠腹部麻醉,仰卧位固定,无菌条件下,眼科剪沿右后膝关节前侧纵向切开皮肤组织,暴露关节腔,切断前交叉副韧带、内侧副韧带,摘除内侧半月板,操作过程中避免软骨损伤。另取 12 只大鼠仅剪开皮肤暴露关节腔,作为假手术组。手术完成后,消毒并对关节囊和皮肤进行缝合,之后放于笼中,自由活动。术后每只大鼠肌内注射 40 万单位青霉

素,1 次/d,连续 3 d,预防关节感染。关节炎指数(Arthritis Index,AI)评分 ≥ 4 分,则视为造模成功^[8],本次实验中所有 OA 模型均构建成功。

1.2.2 分组及给药 造模 1 周后,OA 大鼠随机分为 OA 组、夏枯草黄酮低、中、高剂量组、Y-27632 组,每组 12 只。假手术组和 OA 组大鼠均给予生理盐水灌胃,夏枯草黄酮低、中、高剂量组分别给予 6.125,12.250,24.500 mg/kg 夏枯草黄酮灌胃^[9],Y-27632 组给 5 mg/kg 的 Y-27632 灌胃^[10],各组灌胃体积均是 10 mL/kg,1 次/d,连续 8 周。

1.2.3 大鼠压痛阈值、热痛阈值检测 末次给药后 24 h,大鼠用圆桶固定,电子压痛仪扁型头压向大鼠患侧后足背,大鼠鸣叫或挣扎时的压力值即为压痛阈值。

大鼠置于透明有机玻璃箱内,足底热测痛仪置于大鼠患侧足底中央,打开仪器计时,大鼠鸣叫或抬腿回避时所用时间即为热痛阈值,测定时间不超过 20 s,温度不超过 30 ℃。压痛阈值、热痛阈值每只大鼠均测量 3 次,取平均值。

1.2.4 组织取材及保存 3%戊巴比妥钠腹部麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心,收集上清至新离心管中,−80 ℃保存。颈椎脱臼法处死大鼠,无菌条件下取大鼠右侧膝关节股骨髁关节,固定于 4%多聚甲醛中 24 h,10%乙二胺四乙酸脱钙液脱钙 8 周,脱钙完成后,弃脱钙液,清水漂洗 3 h。切出股骨髁关节软骨,分为两部分,一部分梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡组织包埋;另一部分保存于−80 ℃冰箱,用于后续蛋白免疫印迹实验检测。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平 ELISA 试剂盒对大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平进行检测,实验严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 HE 染色法观察大鼠关节软骨形态变化 全自动切片机对石蜡标本进行 4 μ m 切片,HE 染色试剂盒染色,透明,封片,显微镜下观察大鼠关节软骨形态变化。每张切片随机选取 5 个视野拍照,参照 Mankin's 关节软骨病理评分标准^[11],根据大鼠关节组织病理改变情况对大鼠进行评分,Mankin's 评分越高表示软骨组织病理损伤越严重。

1.2.7 TUNEL 法检测大鼠软骨细胞凋亡情况 全自动切片机对石蜡组织进行 4 μ m 切片,常规脱蜡至水,不含 DNA 酶的蛋白酶 K 工作液处理 15 min,PBS 漂洗,加入 TUNEL 反应液,PBS 配置的 3%过氧化氢溶液中 37 ℃孵育 20 min,PBS 漂洗,加 50 μ L TUNEL 检测液(绿色),DAPI 染核,37 ℃遮光孵育 60 min;PBS 漂洗,抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察,随机选取 5 个视野,计数凋亡细胞,取平均值。

1.2.8 蛋白免疫印迹法检测大鼠软骨组织中 Caspase-3、RhoA、ROCK 蛋白表达 取−80 ℃冰箱中保存的大鼠软骨组织,研磨成粉,装至预冷的 1.5 mL 离心管中,加入蛋白裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃,15 000 r/min 离心 15 min,转移上清液至新离心管中,BCA 蛋白试剂盒检测蛋白浓度。之后进行凝胶电泳,电泳结束后,转膜,封闭,分别加入兔抗鼠 Caspase-3、RhoA、ROCK、GAPDH 一抗稀释液(均是 1:500 稀释),4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜,加入山羊抗兔二抗稀释液(1:1 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗膜。蛋白凝胶成像系统成像,Image Pro Plus6.0 图像软件分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行数据统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠压痛阈值及热痛阈值比较

与假手术组比较,OA 组大鼠压痛阈值、热痛阈值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠压痛阈值、热痛阈值显著升高,随着夏枯草黄酮剂量的增加,压痛阈值、热痛阈值逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠压痛阈值、热痛阈值比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠压痛阈值及热痛阈值比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	压痛阈值/g	热痛阈值/s
假手术组	503.41 \pm 16.87	9.85 \pm 0.74
OA 组	342.26 \pm 21.08 ¹⁾	6.32 \pm 0.68 ¹⁾
夏枯草黄酮低剂量组	395.87 \pm 19.82 ²⁾	7.15 \pm 0.59 ²⁾
夏枯草黄酮中剂量组	458.38 \pm 20.15 ²⁾³⁾	8.24 \pm 0.77 ²⁾³⁾
夏枯草黄酮高剂量组	492.41 \pm 18.66 ²⁾³⁾⁴⁾	9.38 \pm 0.73 ²⁾³⁾⁴⁾
Y-27632 组	488.65 \pm 21.45 ²⁾³⁾⁴⁾	9.15 \pm 0.66 ²⁾³⁾⁴⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$;2)与 OA 组比较, $P < 0.05$;3)与夏枯草黄酮低剂量组比较, $P < 0.05$;4)与夏枯草黄酮中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平比较

与假手术组比较,OA 组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平显著降低,随着夏枯草黄酮剂量的增加,血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表2 各组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	TNF- α /(pg \cdot mL $^{-1}$)	IL-1 β /(pg \cdot mL $^{-1}$)
假手术组	27.23 \pm 4.28	128.54 \pm 31.96
OA 组	98.43 \pm 5.42 ¹⁾	369.72 \pm 37.45 ¹⁾
夏枯草黄酮低剂量组	76.42 \pm 4.99 ²⁾	287.63 \pm 34.42 ²⁾
夏枯草黄酮中剂量组	53.48 \pm 5.17 ²⁾³⁾	209.34 \pm 32.77 ²⁾³⁾
夏枯草黄酮高剂量组	35.92 \pm 4.36 ²⁾³⁾⁴⁾	137.65 \pm 29.46 ²⁾³⁾⁴⁾
Y-27632 组	37.41 \pm 4.87 ²⁾³⁾⁴⁾	140.88 \pm 30.59 ²⁾³⁾⁴⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 OA 组比较, $P < 0.05$; 3)与夏枯草黄酮低剂量组比较, $P < 0.05$; 4)与夏枯草黄酮中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠骨关节软骨形态比较

假手术组大鼠关节软骨结构清晰,排列规整,表层光滑无缺损,各层细胞排列整齐,分布均匀;OA 组大鼠关节软骨表层粗糙且不完整,软骨纤维化明显,细胞排列紊乱;夏枯草黄酮各剂量组、Y-27632 组大鼠表层缺损程度显著轻于 OA 组,表层细胞结构正常,但部分区域仍存在细胞排列紊乱现象,随着夏枯草黄酮浓度的增加,软骨损伤逐渐减轻;夏枯草黄酮高剂量组与 Y-27632 组两组间大鼠骨关节软骨形态差异不明显,见图 1。

与假手术组比较,OA 组大鼠 Mankin's 评分显著升高($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠 Mankin's 评分显著降低,随着夏枯草黄酮剂量的增加,Mankin's 评分逐渐降低($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠 Mankin's 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表3 各组大鼠 Mankin's 评分比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	Mankin's 评分/分
假手术组	0.56 \pm 0.17
OA 组	9.23 \pm 2.15 ¹⁾
夏枯草黄酮低剂量组	7.35 \pm 1.94 ²⁾
夏枯草黄酮中剂量组	5.42 \pm 1.78 ²⁾³⁾
夏枯草黄酮高剂量组	3.11 \pm 1.20 ²⁾³⁾⁴⁾
Y-27632 组	3.25 \pm 1.24 ²⁾³⁾⁴⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 OA 组比较, $P < 0.05$; 3)与夏枯草黄酮低剂量组比较, $P < 0.05$; 4)与夏枯草黄酮中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组织 Caspase-3 蛋白表达比较

与假手术组比较,OA 组大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组织 Caspase-3 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组织 Caspase-3 蛋白表达显著降低,且随着夏枯草黄酮剂量的增加,大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组织 Caspase-3 蛋白表达逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组

织 Caspase-3 蛋白表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4 及图 2—图 3。

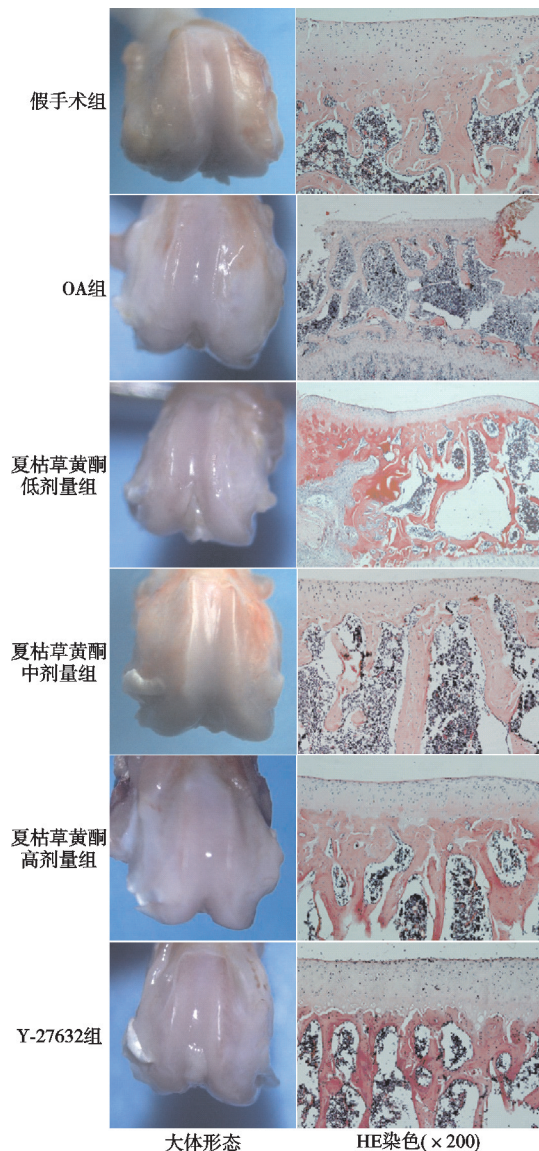


图1 大鼠骨关节软骨形态

表4 各组大鼠软骨细胞凋亡数及软骨组织 Caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	细胞凋亡数/个	Caspase-3/GAPDH
假手术组	12.34 \pm 2.18	0.26 \pm 0.04
OA 组	54.85 \pm 4.72 ¹⁾	0.83 \pm 0.09 ¹⁾
夏枯草黄酮低剂量组	42.76 \pm 3.94 ²⁾	0.69 \pm 0.07 ²⁾
夏枯草黄酮中剂量组	31.52 \pm 3.69 ²⁾³⁾	0.52 \pm 0.04 ²⁾³⁾
夏枯草黄酮高剂量组	15.93 \pm 3.11 ²⁾³⁾⁴⁾	0.33 \pm 0.05 ²⁾³⁾⁴⁾
Y-27632 组	17.86 \pm 3.14 ²⁾³⁾⁴⁾	0.31 \pm 0.04 ²⁾³⁾⁴⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 OA 组比较, $P < 0.05$; 3)与夏枯草黄酮低剂量组比较, $P < 0.05$; 4)与夏枯草黄酮中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠软骨组织 RhoA/ROCK 通路蛋白表达比较

与假手术组比较,OA 组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK 蛋白表达显著降低,且随着夏枯草黄酮剂量的增加,大鼠软骨组织 RhoA、ROCK 蛋白表达逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 5。

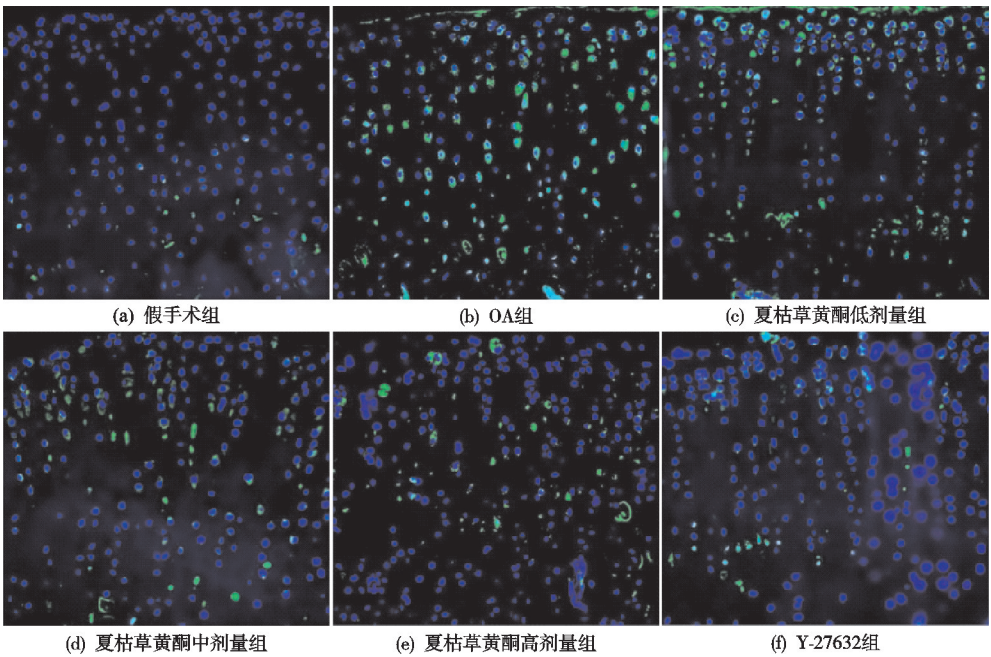
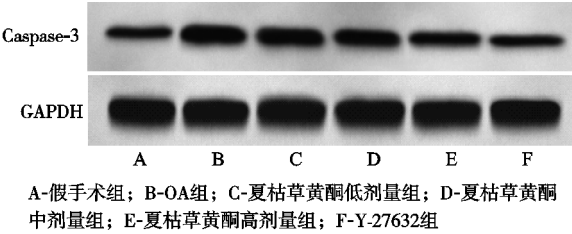


图 2 各组大鼠软骨细胞凋亡情况(TUNEL 染色, ×400)



A-假手术组; B-OA组; C-夏枯草黄酮低剂量组; D-夏枯草黄酮中剂量组; E-夏枯草黄酮高剂量组; F-Y-27632组

图 3 各组大鼠软骨组织 Caspase-3 蛋白表达情况

0.05);与 OA 组比较,夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠软骨组织 RhoA 及 ROCK 蛋白表达显著降低,随着夏枯草黄酮剂量的增加,RhoA 及 ROCK 蛋白表达逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$);夏枯草黄酮高剂量组和 Y-27632 组大鼠软骨组织 RhoA 及 ROCK 蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5 及图 4。

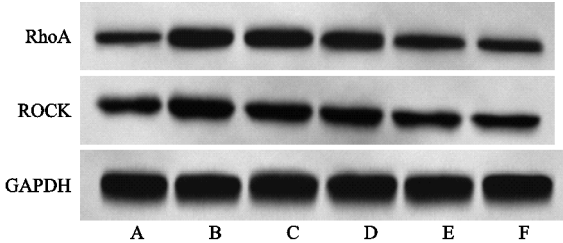
表 5 各组大鼠软骨组织 RhoA 及 ROCK 通路蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	RhoA/GAPDH	ROCK/GAPDH
假手术组	0.31 ± 0.03	0.42 ± 0.05
OA 组	$0.87\pm0.07^{1)}$	$0.95\pm0.09^{1)}$
夏枯草黄酮低剂量组	$0.69\pm0.06^{2)}$	$0.73\pm0.07^{2)}$
夏枯草黄酮中剂量组	$0.45\pm0.04^{2)3)}$	$0.65\pm0.06^{2)3)}$
夏枯草黄酮高剂量组	$0.36\pm0.05^{2)3)4)}$	$0.46\pm0.05^{2)3)4)}$
Y-27632 组	$0.38\pm0.04^{2)3)4)}$	$0.48\pm0.04^{2)3)4)}$

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与 OA 组比较, $P<0.05$;3)与夏枯草黄酮低剂量组比较, $P<0.05$;4)与夏枯草黄酮中剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

OA 是老年人中最常见的慢性关节疾病,主要表现为关节软骨逐渐退化,滑膜发炎疼痛,严重者可能导致患者残疾^[12]。关节软骨是一种高度特化组织,主要由软骨细胞和细胞外基质组成,软骨细胞是形成关节



A-假手术组; B-OA组; C-夏枯草黄酮低剂量组; D-夏枯草黄酮中剂量组; E-夏枯草黄酮高剂量组; F-Y-27632组

图 4 各组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK 蛋白表达情况

软骨的唯一细胞,正常软骨细胞能够分泌细胞外基质,维持软骨组织整体形态,并增加软骨组织韧度,但在炎症条件下,炎症细胞因子和基质降解酶的过度产生,引起细胞外基质的合成和降解失衡,从而引起关节软骨破坏、骨质增生等病理改变^[13]。本研究通过切断大鼠前交叉韧带和内侧副韧带,并摘除内侧半月板构建 OA 大鼠模型,HE 染色结果表明模型组大鼠关节软骨表面粗糙,表层不完整,且出现局部软骨增厚和软骨纤维化,细胞排列混乱,细胞因损伤出现簇集现象,与假手术组大鼠比较,OA 模型大鼠压痛阈值、热痛阈值显著降低,Mankin's 评分显著升高,提示 OA 大鼠模型构建成功。细胞凋亡在维持人体内各组织稳态和调节正常胚胎发育过程中起着关键的作用,研究表明在人 OA 软骨细胞中发现了与 OA 有关的凋亡,而在正常软骨细胞中未发现^[14],软骨细胞凋亡导致细胞外基质降解是 OA 发生和进展的主要原因^[15]。本研究结果表明 OA 组大鼠软骨细胞凋亡数目显著高于假手术组,与 Shao 等^[3]研究结果一致,提示软骨细胞凋亡可能与 OA 的发生有关。OA 是一种由多种因素介导的慢性炎症反应,炎症反应发生在 OA 的整个进展过程

中, TNF- α 及 IL-1 β 是常见的炎症细胞因子, 有研究表明 TNF- α 及 IL-1 β 是诱导软骨细胞凋亡和破坏软骨的关键细胞因子^[16], 本研究结果表明 OA 大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平显著高于假手术组, 提示炎症细胞因子与 OA 的发生有关。

夏枯草属于唇形科多年生草本植物, 是一种常见的中草药, 具有清肝火、明目、消肿、散结等功效^[17]。夏枯草含有三萜类、多糖类、黄酮类、甾体类和有机酸类等多种化合物成分, 具有降血糖、降血压、抗肿瘤、抗炎、退热等多种病理作用^[18]。李坤阳等^[5]研究表明夏枯草黄酮能够减轻牙周炎大鼠炎症程度, 对大鼠牙周炎有很好的治疗效果。本研究发现夏枯草黄酮能够抑制 OA 大鼠软骨组织损伤, 抑制软骨细胞的凋亡和炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 水平, 提高大鼠压痛阈值和热痛阈值, 并降低大鼠 Mankin's 评分, 提示夏枯草黄酮对 OA 治疗具有一定的疗效, 猜测可能与抑制炎症因子和软骨细胞凋亡有关, 具体机制有待进一步研究。

RhoA 是 Rho 家族的一个小 GTPase 单倍, 在人体正常组织、胚胎组织和干细胞在内的所有组织中均有表达, ROCK 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 是 RhoA 的下游效应因子, RhoA 及 ROCK 信号通路与细胞生长、分化和凋亡等多种细胞过程有关, 参与 OA、糖尿病、神经性障碍、癌症等多种疾病的发生^[19]。RhoA 及 ROCK 信号通路能够被 TNF- α 、IL-1 β 、转化生长因子- β (TGF- β) 等炎性介质诱导激活, 诱导 OA 中关节软骨的降解, 参与 OA 的发生发展^[20]。本研究结果表明 OA 组大鼠软骨组织中 RhoA 及 ROCK 蛋白表达显著高于假手术组, 提示 RhoA 及 ROCK 信号通路与 OA 的发生有关。Y-27632 是 RhoA 及 ROCK 信号通路的抑制剂^[10], 本研究中 Y-27632 组大鼠压痛阈值和热痛阈值显著升高, Mankin's 评分显著降低, 且 HE 染色结果表明 Y-27632 能够减轻 OA 大鼠软骨组织损伤程度, 减少大鼠软骨细胞的凋亡, 进一步提示 RhoA 及 ROCK 信号通路参与 OA 的发生, 猜测可能是炎性因子激活 RhoA 及 ROCK 信号通路, 导致软骨细胞的凋亡, 引起 OA。本研究还发现夏枯草黄酮低、中、高剂量组大鼠软骨组织中 RhoA 及 ROCK 蛋白表达显著低于 OA 组, 且 Y-27632 组大鼠软骨病理组织损伤程度、软骨细胞凋亡数及 RhoA、ROCK 蛋白表达与夏枯草黄酮高剂量组无显著差异, 提示夏枯草黄酮可能通过抑制 RhoA 及 ROCK 信号通路, 进而抑制软骨细胞的凋亡, 减轻大鼠软骨损伤, 具体机制有待进一步探讨。

综上所述, 夏枯草黄酮能够抑制 OA 大鼠软骨细胞的凋亡, 减轻大鼠关节软骨损伤, 可能与抑制 RhoA 及 ROCK 信号通路有关。本研究仅通过大鼠实验探讨了夏枯草黄酮在 OA 中的可能机制, 下一步需结合

细胞实验和临床研究, 进一步分析其在 OA 治疗中的效应和可能机制, 为 OA 治疗提供新思路。

参考文献

- [1] 耿宗洁, 冀全博, 王岩. 骨关节炎不同治疗方法的研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2021, 10(8): 636-640.
- [2] CHENG C, TIAN J, ZHANG F, et al. WISP1 protects against chondrocyte senescence and apoptosis by regulating $\alpha\text{v}\beta 3$ and PI3K/Akt pathway in osteoarthritis[J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(4): 629-637.
- [3] SHAO Y, ZHAO C, PAN J, et al. BMP5 silencing inhibits chondrocyte senescence and apoptosis as well as osteoarthritis progression in mice[J]. Aging (Albany N Y), 2021, 13(7): 9646-9664.
- [4] 张金华, 邱俊娜, 王路, 等. 夏枯草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3432-3440.
- [5] 李坤阳, 李玮, 左春然, 等. 夏枯草黄酮抑制大鼠牙周炎低氧诱导因子 1 α 表达的治疗机制[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(2): 151-154.
- [6] ZHANG T, GONG T, XIE J, et al. Softening substrates promote chondrocytes phenotype via RhoA/ROCK pathway[J]. ACS Appl Mater Inter, 2016, 8(35): 22884-22891.
- [7] 金剑飞, 何维英, 周钰龙. 淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子- κB 通路的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(3): 5-9.
- [8] 蔡国伟, 李柏村, 李佳, 等. 温针灸对骨关节炎大鼠软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(10): 1225-1229.
- [9] 田硕, 刘铜华, 孙文, 等. 夏枯草提取物对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠肝糖原代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 101-106.
- [10] 董莉亚, 邱晓晓, 喜乐, 等. Y-27632 预处理对心肌缺血再灌注损伤过程中心肌细胞凋亡的影响研究[J]. 中国心血管病研究, 2020, 18(11): 1019-1025.
- [11] 唐晓栋, 赵庆, 兰晓飞, 等. 稀莶草调控 sirt1/FOXO1 通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(4): 439-444.
- [12] BAO J, CHEN Z, XU L, et al. Rapamycin protects chondrocytes against IL-18-induced apoptosis and ameliorates rat osteoarthritis[J]. Aging (Albany N Y), 2020, 12(6): 5152-5167.
- [13] ZUO R, WANG Y, LI J, et al. Rapamycin induced autophagy inhibits inflammation-mediated endplate degeneration by enhancing Nrf2/Keap1 signaling of cartilage endplate stem cells[J]. Stem Cells, 2019, 37(6): 828-840.
- [14] XUE H, TU Y, MA T, et al. miR-93-5p attenuates IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in osteoarthritis partially by targeting TCF4[J]. Bone, 2019, 123(1): 129-136.

(上接第 6 页)

- [15] HAN H, LIU L. Long noncoding RNA TUG1 regulates degradation of chondrocyte extracellular matrix via miR-320c/MMP-13 axis in osteoarthritis[J]. Open Life Sci, 2021, 16(1): 384-394.
- [16] LIAO C R, WANG S N, ZHU S Y, et al. Advanced oxidation protein products increase TNF- α and IL-1 β expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101306.
- [17] 汪晓河, 马明华, 张婧婷, 等. 中药夏枯草药用概况[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 625-632.
- [18] WANG S J, WANG X H, DAI Y Y, et al. Prunella vulgaris: a comprehensive review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications[J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(3): 359-369.
- [19] 黄勇, 朱伟民, 陆伟, 等. 三磷酸鸟苷酶相关蛋白激酶在骨关节炎的研究进展[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2020, 14(6): 717-721.
- [20] DENG Z, JIA Y, LIU H, et al. RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5324-5331.

(收稿日期: 2021-08-29)