

积雪草苷对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响及机制研究

丁平¹ 张岱阳^{1△} 李贺伟² 吴燕茹² 张光恒³

[摘要] **目的:**探讨积雪草苷(ASS)对膝骨关节炎(KOA)大鼠软骨损伤和骨保护素(OPG)/核因子 κ B受体活化因子(RANK)/RANK配体(RANKL)信号通路的影响。**方法:**采用前交叉韧带切断术(ACLT)加内侧半月板切除术(MMx)诱导建立膝骨关节炎大鼠模型,建模后分为KOA组、ASS低剂量组(ASS-L组,16 mg/kg)、ASS高剂量组(ASS-H组,32 mg/kg)、ASS+si-NC组(32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-NC载体)、ASS+si-OPG组(32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-OPG载体),另设假手术(Sham)组,每组12只。给予相应的药物干预2周后,通过机械缩爪阈值(PWT)和热缩爪潜伏期(PWL)评估大鼠疼痛行为,酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清炎症细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,苏木精-伊红(HE)和番红O/固绿染色观察关节软骨组织病理学变化,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测软骨组织基质金属蛋白酶(MMP-13)、Ⅱ型胶原蛋白(COL2A1)、聚集蛋白聚糖(Aggrecan)mRNA表达,蛋白质印迹(Western Blot)检测软骨组织OPG、RANK、RANKL蛋白表达。**结果:**与Sham组相比,KOA组大鼠的PWT和PWL值、COL2A1 mRNA、Aggrecan mRNA和OPG蛋白水平显著降低,血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平、软骨组织Mankin评分和OARSI评分、MMP-13 mRNA和RANK、RANKL蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与KOA组相比,ASS-L组和ASS-H组大鼠的PWT和PWL值、COL2A1 mRNA、Aggrecan mRNA和OPG蛋白水平显著升高,血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平、Mankin评分和OARSI评分、MMP-13 mRNA和RANK、RANKL蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);抑制OPG可明显逆转积雪草苷对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的保护作用。**结论:**积雪草苷可减少促炎细胞因子的释放,抑制MMP-13表达和增加Ⅱ型胶原沉积,抑制关节软骨退变,并可能通过调节OPG/RANK/RANKL信号通路,发挥抗膝骨关节炎作用。

[关键词] 积雪草苷;膝骨关节炎;骨保护素;核因子 κ B受体活化因子;核因子 κ B受体活化因子配体

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)09-0007-07

Impacts and Mechanism Study of Asiaticoside on Cartilage Damage and OPG/RANK/RANKL Signaling Pathway in Rats with Knee Osteoarthritis

DING Ping¹ ZHANG Daiyang^{1△} LI Hewei² WU Yanru² ZHANG Guangheng³

¹ Department of Spinal Surgery, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei China;

² Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China;

³ Central Laboratory of Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China.

Abstract Objective: To investigate the impacts of asiaticoside (ASS) on cartilage damage and osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor κ B (RANK)/RANK ligand (RANKL)

signaling pathway in knee osteoarthritis (KOA) rats.

Methods: KOA rat model was established by induction of anterior cruciate ligament amputation (ACLT) and medial meniscectomy (MMx). After modeling, they were grouped into KOA group, ASS low-dose group (ASS-L group, 16 mg/kg), ASS high-dose group (ASS-H group, 32 mg/kg),

基金项目:武汉市卫生健康委员会资助项目(武卫通[2019]87号)

¹ 恩施土家族苗族自治州中心医院脊柱外科(湖北恩施,445000)

² 华中科技大学同济医学院附属梨园医院

³ 华中科技大学同济医学院附属梨园医院中心实验室

△通信作者 E-mail: ei68pz@163.com

ASS+si-NC group (32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-NC carrier) and ASS+si-OPG group (32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-OPG carrier), and another sham operation (Sham) group was set, with 12 animals in each group. After 2 weeks of corresponding drug intervention, the pain behavior of rats was evaluated by mechanical paw withdrawal threshold (PWT) and thermal paw withdrawal latency (PWL). The levels of serum inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The histopathological changes of articular cartilage were observed by hematoxylin-eosin (HE) and safranin O/fast green staining. The mRNA expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), collagen type II (COL2A1) and aggrecan (Aggrecan) in cartilage tissue was measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and the protein expression of OPG, RANK and RANKL in cartilage tissue was measured by Western Blot. **Results:** Compared with the Sham group, the PWT and PWL values, COL2A1 mRNA, Aggrecan mRNA and OPG protein levels were significantly decreased in the KOA group; the serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, cartilage tissue Mankin scores and OARSI scores, MMP-13 mRNA and RANK, RANKL protein levels were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the KOA group, the PWT and PWL values, COL2A1 mRNA, Aggrecan mRNA and OPG protein levels of the ASS-L group and ASS-H group were significantly increased; the serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, Mankin scores and OARSI scores, MMP-13 mRNA and RANK, RANKL protein levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Inhibition of OPG was able to significantly reverse the protective efficacy of ASS on cartilage injury in KOA rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** ASS can reduce the release of pro-inflammatory cytokines, inhibit the expression of MMP-13, increase the deposition of type II collagen and inhibit the degeneration of articular cartilage, which may play an anti-KOA effect by regulating the OPG/RANK/RANKL signaling pathway.

Keywords: asiaticoside; knee osteoarthritis; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor κ B; receptor activator of nuclear factor κ B ligand

膝骨关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 是一种退行性和慢性关节疾病, 主要损害关节软骨, 是导致残疾和疼痛的主要原因^[1]。软骨退化是膝骨关节炎的重要治疗靶点^[2], 骨保护素 (Osteoprotegerin, OPG)/核因子 κ B 受体活化因子 (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, RANK)/RANK 配体 (RANK ligand, RANKL) 通路在骨关节炎软骨代谢中具有重要作用^[3-4]。据报道 OPG/RANK/RANKL 通路的激活可保护膝骨关节炎大鼠软骨下骨的结构完整性, 并改善关节软骨损伤^[5-6]。积雪草苷 (Asiaticoside, ASS) 具有强大的抗炎作用, 在骨关节炎中积雪草苷可抑制 IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡和炎症反应, 保护软骨细胞损伤^[7-9]。此外, 积雪草苷可呈剂量依赖性方式抑制 RANKL 诱导的破骨细胞形成和骨吸收^[10]。然而, 积雪草苷对关节软骨退化的影响及机制尚未见报道。因此, 本研究旨在探讨积雪草苷对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的保护作用及其潜在机制。

1 材料和方法

1.1 动物

从中国科学院上海药物研究所 (生产许可证号为 SCXK(沪)2020-0005) 购入 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 72 只, SPF 级, 体重为 180~220 g。将动物饲养在 21~22 $^{\circ}$ C、湿度 55%~60% 和照明 (12 h 光照/黑暗循环) 的受控房间中, 并获得无菌食物和水。

1.2 主要试剂和仪器

积雪草苷 (纯度 HPLC \geq 98%, SA8540)、苏木精-

伊红 (HE) 染色试剂盒 (G1120)、番红 O/固绿染色试剂盒 (G1371) 购自北京 Solarbio 公司; 含有靶向 OPG 沉默表达的小干扰 RNA (siRNA) 的慢病毒 (LV-si-OPG) 载体及其阴性对照 (LV-si-NC) 载体由上海 GenePharma 公司构建; 大鼠白细胞介素 (Interleukin, IL)-6 (ml102828)、IL-1 β (ml003057)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) (ml002859) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; 兔源一抗 OPG (ab73400) 购自英国 Abcam 公司; 兔源一抗 RANK (PA5-80144)、RANKL (PA5-110268) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。BME-403 Von Frey 纤维丝测痛仪、BME-410C 全自动热痛刺激仪 (中国医学科学院生物医学工程研究所); ABI Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); BX61 电动显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型建立 随机选取 12 只大鼠作为假手术 (Sham) 组, 其余大鼠为造模组。大鼠腹腔注射 5% 戊巴比妥钠麻醉, 右膝关节进行前交叉韧带切断术 (ACLT) 加内侧半月板切除术 (MMx)^[11] 诱导建立膝骨关节炎模型: 右膝关节皮肤脱毛, 用 70% 异丙醇和碘溶液消毒, 在关节囊内侧 (内侧副韧带前) 切开一个切口; 切断前交叉韧带, 完全切除内侧半月板。术后用生理盐水冲洗关节, 缝合皮肤。接下来, 用碘溶液对伤口区域进行消毒, 并肌肉注射氨苄青霉素 (25 mg/(kg \cdot d)) 3 d 以防止感染。麻醉苏醒后, 将所有大鼠放

回笼子。对于假手术的大鼠,在关节囊的内侧切开以暴露前交叉韧带,但既没有进行 ACLT,又没有去除内侧半月板。建模 1 周后观察大鼠行为变化,并随机选择 2 只大鼠进行膝关节 X 线检查,以确定造模是否成功。若大鼠右后肢出现收缩、跛行,且胫骨平台骨面不平整、粗糙,关节间隙变窄等现象,视为造模成功。

1.3.2 分组与干预 将造模大鼠分为 KOA 组、ASS 低剂量组 (ASS-L 组, 16 mg/kg)、ASS 高剂量组 (ASS-H 组, 32 mg/kg)^[12]、ASS+si-NC 组 (32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-NC 载体)、ASS+si-OPG 组 (32 mg/kg ASS+100 ng LV-si-OPG 载体), 每组 12 只。ASS-L 组和 ASS-H 组大鼠分别给予相应剂量的 ASS 灌胃, 1 次/d; ASS+si-NC 组和 ASS+si-OPG 组大鼠每日灌胃给予 ASS 的同时分别通过膝关节腔内注射 LV-si-NC、LV-si-OPG 载体, 每周 1 次; KOA 组与 Sham 组给予等量生理盐水灌胃和注射, 连续给药 2 周。

1.3.3 疼痛行为评估 通过 Von Frey 纤维丝测痛仪和全自动热痛刺激仪测量大鼠的机械缩爪阈值 (Paw Withdrawal Threshold, PWT) 和热缩爪潜伏期 (Paw Withdrawal Latency, PWL), 以评估机械和热异常性疼痛^[13]。在膝骨关节炎模型建立前和模型建立后 1、2 和 3 周测量 PWT 和 PWL。

对于 PWT 测量, 使用 Electric Von Frey 通过 PWT 定量评估关节疼痛的严重程度。将大鼠单独放置在金属笼中, 在测试前 30 min 使大鼠适应环境。大鼠安静后, 将探针垂直施加于右后爪的足底中心, 从 1.0 g 开始, 逐渐增加刺激强度, 大鼠迅速退缩或舔舐爪子表示退缩反应, 每只大鼠测量 3 次, 每次间隔 5 min, 取平均值。

对于 PWL 测量, 将大鼠置于透明玻璃上, 盖上透明盖, 将红外热光源照射于大鼠右后爪表面。PWL 定义为热刺激开始和爪缩回之间的时间间隔。每只大鼠记录 3 次, 两次相邻测量之间间隔 5 min。

1.3.4 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测血清炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 麻醉大鼠, 打开胸腔, 腹主动脉取血, 静置后在 4℃ 下以 1 000g 离心 10 min, 分离血清。使用 ELISA 试剂盒测量 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平。

1.3.5 关节软骨组织病理学检查 在深度麻醉下处死大鼠, 打开关节腔, 剥离右膝关节软骨组织, 一部分组织置于液氮中保存; 另一部分组织在 4% 多聚甲醛中固定 2 d, 然后使用 EDTA 二钠 (12.5%, pH 7.0) 脱钙剂脱钙约 4 周。脱钙后, 将关节软骨组织包埋在石蜡块中, 获得组织冠状切片 (5 μ m 厚)。切片用 HE 和番红 O/固绿染色。使用 Mankin 评分^[14] 和改良的国

际骨关节炎研究协会 (OARSI) 评分^[15] 系统对软骨的退行性变化进行组织学分级, 评估关节软骨损伤的严重程度。

1.3.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测软骨组织基质金属蛋白酶 13 (MMP-13)、II 型胶原蛋白 (COL2A1)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂从组织中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒将 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA。RT-qPCR 使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒在 ABI Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 仪中进行。热循环条件如下: 95℃ 预变性 10 min; 然后在 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法将 mRNA 的表达标准化为 β -actin。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 相关引物序列

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
MMP-13	AGCTCCAAAAGGC-	GTCTTCATCTCCTG-
	TACAACTTAT	GACCATAG
COL2A1	GCCCAACTGGCAAA-	GCAGGGCCAGAAG-
	CAAGGAGAC	TACCCTGATC
Aggrecan	GCCTATCAGGA-	ATGATGGCACTGT-
	CAAGGTCTC	TCTGCAG
β -actin	CGACCACACA-	GCCGATTACAC-
	CAGAGAGAGAT	CGAGTA

1.3.7 蛋白质印迹 (Western Blot) 检测软骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达 使用 RIPA 裂解液对软骨组织进行匀浆, 然后在 4℃ 下以 12 000g 将裂解物离心 15 min 以获得上清液。使用 BCA 法测量蛋白质浓度。蛋白质样品 (60 μ g/泳道) 通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在室温下用新鲜的 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 然后与一抗在 4℃ 下孵育过夜, 一抗如下: OPG (1:500)、RANK (1:500)、RANKL (1:500) 和 β -actin (1:1 000)。次日, 洗去一抗, 随后将膜与相应的二抗一起孵育 2 h。使用增强的化学发光底物试剂盒使条带可视化, 用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析实验数据, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间有差异采用 SNK-*q* 检验进行两两比较。P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠疼痛行为比较

与建模前 (第 0 周) 基线水平相比, 建模后, 除 Sham 组外, 其余各组大鼠的 PWT 和 PWL 值在不同时间点均显著降低, 差异有统计学意义 (P<0.05)。建模后 2~3 周时, 与 Sham 组相比, KOA 组大鼠的

PWT 和 PWL 值显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 KOA 组相比,ASS-L 组和 ASS-H 组大鼠的 PWT 和 PWL 值显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 ASS-H 组相比,ASS+ si-OPG 组大鼠的 PWT 和 PWL 值显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2 及表 3。

表 2 各组大鼠的 PWT 值比较(g, $\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	建模前	建模后 1 周	建模后 2 周	建模后 3 周
Sham 组	23.48±2.79	22.83±2.52	22.65±2.90	23.12±2.64
KOA 组	24.15±2.50	9.47±1.36 ¹⁾	8.49±1.42 ¹⁾	7.56±1.38 ¹⁾
ASS-L 组	22.37±2.86	9.68±1.41 ¹⁾	12.53±1.67 ¹⁾²⁾³⁾	13.04±1.59 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	23.20±2.45	9.55±1.23 ¹⁾	16.08±1.91 ¹⁾²⁾	18.52±2.06 ¹⁾²⁾
ASS+ si-NC 组	22.96±2.38	9.32±1.54 ¹⁾	16.17±1.85 ¹⁾²⁾	18.61±2.13 ¹⁾²⁾
ASS+ si-OPG 组	24.05±2.61	9.60±1.37 ¹⁾	10.34±1.52 ¹⁾³⁾	9.97±1.48 ¹⁾²⁾³⁾
<i>F</i>	0.807	133.276	82.212	113.113
<i>P</i>	0.549	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠的 PWL 值比较(s, $\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	建模前	建模后 1 周	建模后 2 周	建模后 3 周
Sham 组	17.94±2.10	18.02±2.34	16.89±2.25	17.54±2.06
KOA 组	18.10±2.43	7.70±1.25 ¹⁾	7.41±1.13 ¹⁾	6.89±0.84 ¹⁾
ASS-L 组	17.56±2.25	7.56±1.10 ¹⁾	9.92±1.36 ¹⁾²⁾³⁾	10.26±1.37 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	16.98±2.14	7.81±1.32 ¹⁾	13.40±1.85 ¹⁾²⁾	15.15±1.82 ¹⁾²⁾
ASS+ si-NC 组	17.64±2.30	7.67±1.25 ¹⁾	13.56±1.79 ¹⁾²⁾	15.30±1.94 ¹⁾²⁾
ASS+ si-OPG 组	17.85±2.42	7.60±1.41 ¹⁾	8.42±1.50 ¹⁾³⁾	8.75±1.46 ¹⁾³⁾
<i>F</i>	0.361	95.008	55.390	81.379
<i>P</i>	0.874	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平比较

与 Sham 组相比,KOA 组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 KOA 组相比,ASS-L 组和 ASS-H 组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 ASS-H 组相比,ASS+ si-OPG 组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平比较(pg/mL, $\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
Sham 组	8.45±1.20	11.62±1.87	32.56±4.63
KOA 组	36.79±3.55 ¹⁾	26.90±2.54 ¹⁾	61.28±7.12 ¹⁾
ASS-L 组	27.50±3.18 ¹⁾²⁾³⁾	20.35±2.26 ¹⁾²⁾³⁾	52.41±5.60 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	16.42±2.24 ¹⁾²⁾	15.27±1.92 ¹⁾²⁾	40.65±5.27 ¹⁾²⁾
ASS+ si-NC 组	16.87±2.39 ¹⁾²⁾	15.18±1.75 ¹⁾²⁾	40.29±5.81 ¹⁾²⁾
ASS+ si-OPG 组	31.54±3.40 ¹⁾²⁾³⁾	22.62±2.43 ¹⁾²⁾³⁾	57.34±6.36 ¹⁾²⁾
<i>F</i>	178.553	82.939	44.355
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠关节软骨组织病理损伤比较

HE 和番红 O/固绿染色显示,Sham 组关节软骨清晰,表面光滑完整,染色均匀;KOA 组关节软骨表面粗糙、断裂,部分软骨下骨外露,软骨细胞数量减少,番红 O 染色大面积缺失;与 Sham 组相比,KOA 组软骨层染色较浅,较薄,软骨下骨增厚,结构紊乱,形成多个骨赘,Mankin 评分和 OARSI 评分显著升高($P<0.05$);与 KOA 组相比,ASS-L 组和 ASS-H 组软骨破坏明显减轻,软骨细胞排列紊乱缓解、软骨细胞丢失和番红 O 染色缺失减少,Mankin 评分和 OARSI 评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 ASS-H 组相比,ASS+ si-OPG 组软骨破坏加重,Mankin 评分和 OARSI 评分显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1 及表 5。

2.4 各组大鼠软骨组织 MMP-13、COL2A1、Aggrecan mRNA 表达水平比较

与 Sham 组相比,KOA 组大鼠软骨组织 MMP-13 mRNA 水平显著升高,COL2A1 及 Aggrecan ASS-L 组

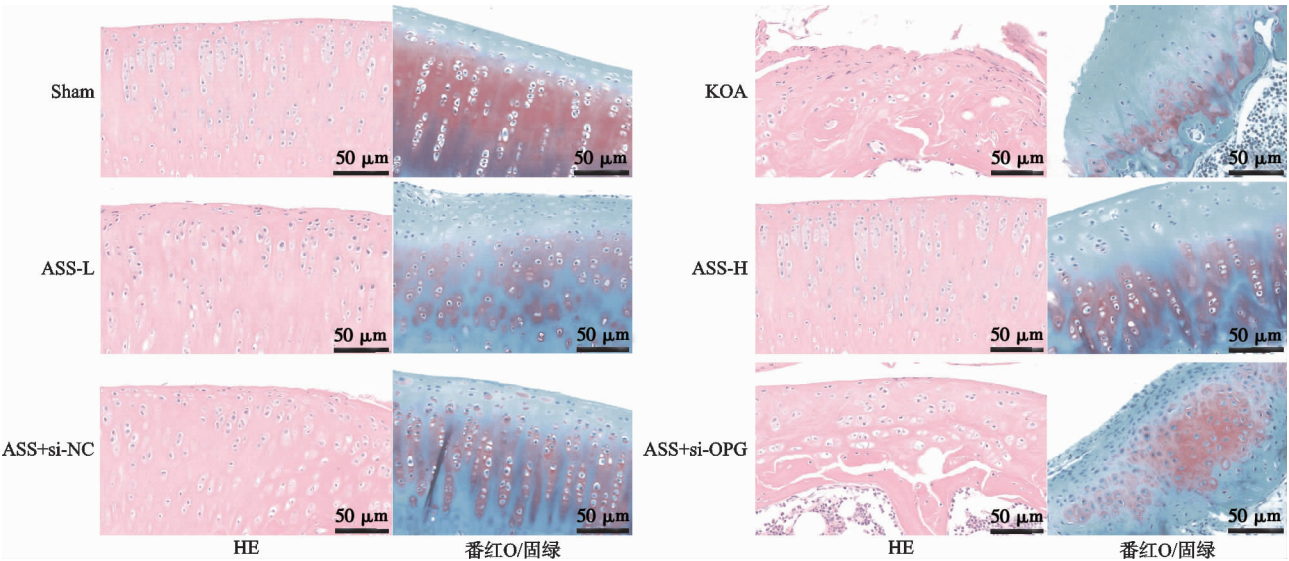


图 1 各组大鼠关节软骨组织病理损伤(HE 和番红 O/固绿染色,×400)

表 5 各组大鼠关节软骨组织 Mankin 评分及 OARSI 评分比较(分, $\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	Mankin 评分	OARSI 评分
Sham 组	0.33±0.05	0.29±0.04
KOA 组	8.37±0.74 ¹⁾	4.18±0.60 ¹⁾
ASS-L 组	6.20±0.51 ¹⁾²⁾³⁾	3.32±0.55 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	4.19±0.46 ¹⁾²⁾	2.74±0.48 ¹⁾²⁾
ASS+si-NC 组	4.15±0.50 ¹⁾²⁾	2.71±0.42 ¹⁾²⁾
ASS+si-OPG 组	7.98±0.63 ¹⁾³⁾	3.85±0.51 ¹⁾³⁾
F	141.840	103.592
P	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

mRNA 水平显著降低($P<0.05$);与 KOA 组相比,和

表 6 各组大鼠软骨组织 MMP-13、COL2A1、Aggrecan mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	MMP-13	COL2A1	Aggrecan
Sham 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
KOA 组	6.48±0.75 ¹⁾	0.32±0.05 ¹⁾	0.25±0.04 ¹⁾
ASS-L 组	5.39±0.62 ¹⁾²⁾³⁾	0.55±0.07 ¹⁾²⁾³⁾	0.42±0.06 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	3.77±0.54 ¹⁾²⁾	0.78±0.08 ¹⁾²⁾	0.64±0.07 ¹⁾²⁾
ASS+si-NC 组	3.72±0.59 ¹⁾²⁾	0.74±0.08 ¹⁾²⁾	0.61±0.08 ¹⁾²⁾
ASS+si-OPG 组	5.96±0.68 ¹⁾³⁾	0.41±0.06 ¹⁾²⁾³⁾	0.30±0.05 ¹⁾³⁾
F	141.669	195.025	289.920
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

RANKL 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 ASS-H 组相比,ASS+si-OPG 组 OPG 蛋白水平显著降低,RANK 及 RANKL 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2 及表 7。

3 讨论

作为膝关节最关键的结构部分,软骨直接影响着关节炎的发展和进展。软骨损伤在膝骨关节炎发生发展过程中起着不可或缺的作用,促进受损软骨的修复仍然是膝骨关节炎治疗的核心^[2]。促炎细胞因子是骨

ASS-H 组 MMP-13 mRNA 水平显著降低,COL2A1 及 Aggrecan mRNA 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 ASS-H 组相比,ASS+si-OPG 组 MMP-13 mRNA 水平显著升高,COL2A1 及 Aggrecan mRNA 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

2.5 各组大鼠软骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白水平比较

与 Sham 组相比,KOA 组大鼠软骨组织 OPG 蛋白水平显著降低,RANK 及 RANKL 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 KOA 组相比,ASS-L 组和 ASS-H 组 OPG 蛋白水平显著升高,RANK 及

关节炎中软骨破坏的关键介质,据报道膝骨关节炎患者血清、软骨或滑液中促炎细胞因子(例如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α)水平高于健康对照组^[16-17]。此外,软骨退化涉及细胞外基质(Extra cellular Matrix,ECM)的降解;骨关节炎软骨中炎症信号会激活降解酶(例如 MMP-13),促使软骨 ECM 降解,最终导致关节软骨退变^[18]。本研究观察到在 ACLT+MMx 术后,膝骨关节炎模型大鼠出现膝关节损伤和局灶性软骨变化,并且血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平和 MMP-13 表达升

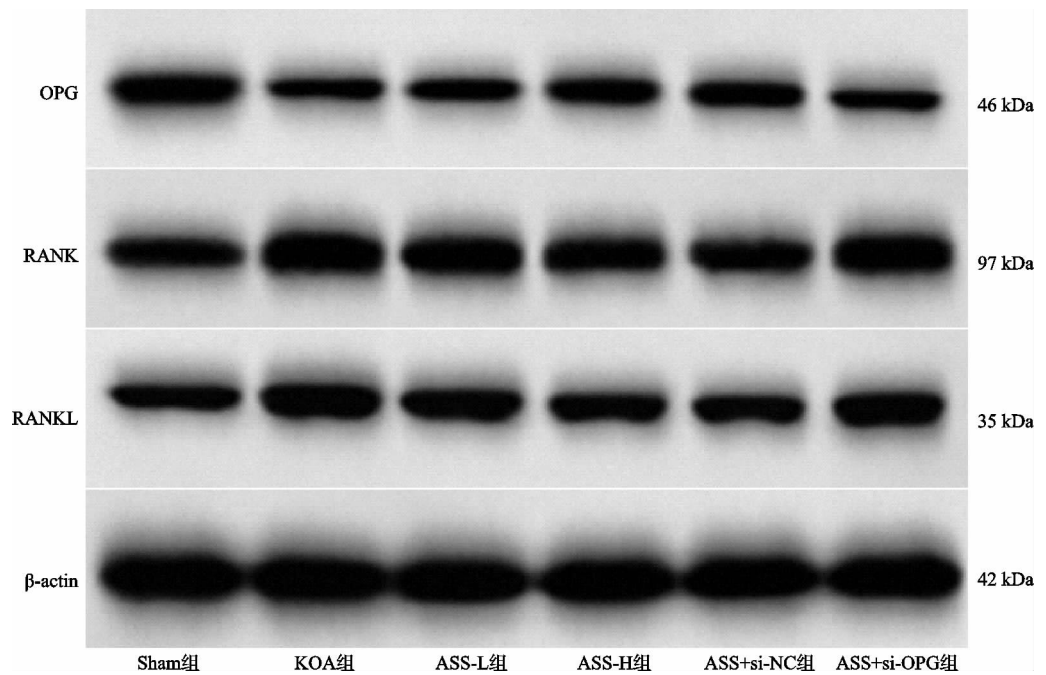


图 2 各组大鼠软骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达

表 7 各组大鼠软骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	OPG	RANK	RANKL
Sham 组	0.61±0.07	0.40±0.06	0.32±0.04
KOA 组	0.34±0.05 ¹⁾	0.89±0.09 ¹⁾	0.65±0.06 ¹⁾
ASS-L 组	0.42±0.06 ¹⁾²⁾³⁾	0.71±0.08 ¹⁾²⁾³⁾	0.53±0.07 ¹⁾²⁾³⁾
ASS-H 组	0.51±0.07 ¹⁾²⁾	0.55±0.07 ¹⁾²⁾	0.41±0.05 ¹⁾²⁾
ASS+si-NC 组	0.53±0.06 ¹⁾²⁾	0.52±0.06 ¹⁾²⁾	0.40±0.04 ¹⁾²⁾
ASS+si-OPG 组	0.37±0.05 ¹⁾³⁾	0.81±0.09 ¹⁾³⁾	0.59±0.07 ¹⁾³⁾
F	35.302	73.093	64.989
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 Sham 组相比, $P<0.05$;2)与 KOA 组相比, $P<0.05$;3)与 ASS-H 组相比, $P<0.05$ 。

高,COL2A1 和 Aggrecan 表达降低,提示炎症信号和 MMP-13 在膝骨关节炎大鼠模型中被激活,促进了软骨 ECM 降解,这可能是导致关节软骨破坏和痛觉敏感的重要因素。因此,抑制促炎细胞因子的释放和 MMP-13 表达,促进软骨中Ⅱ型胶原的积累将缓解膝骨关节炎。

积雪草苷是一种从积雪草中分离出来的生物活性成分,具有许多生物学特性。据报道积雪草苷具有显著的抗炎作用,可降低促炎细胞因子(IL-6、TNF-α 和 IL-1β)水平,修复受损的亚细胞结构,并降低 Caspase-3 表达,参与细胞凋亡^[19]。在胶原诱导型关节炎(CIA)中,积雪草苷可调节 Th17/Treg 平衡,减轻 CIA 小鼠关节破坏程度^[20];体外研究显示积雪草苷可抑制 IL-1β 诱导软骨细胞凋亡和炎症,减轻软骨细胞损伤^[9];此外,有药理研究证实积雪草苷可抑制破骨细胞形成^[10],以上发现表明积雪草苷可治疗骨相关疾病。本研究使用 ACLT+MMx 诱导的大鼠模型来评

估积雪草苷的抗膝骨关节炎作用,结果显示积雪草苷提高了膝骨关节炎大鼠的疼痛阈值,降低了促炎细胞因子的释放,并下调了膝骨关节炎大鼠软骨组织中 MMP-13 表达,上调了 COL2A1 和 Aggrecan 表达,可延缓 ECM 降解。HE 和番红 O/固绿染色结果进一步证实了这一结论,即积雪草苷不仅减少了软骨损伤,而且挽救了关节软骨中的蛋白多糖含量,提示积雪草苷可通过抑制 MMP-13 表达和增加体内Ⅱ型胶原沉积而发挥抗膝骨关节炎作用。

在膝骨关节炎发生发展过程中,关节内持续的异常负荷会引发骨重塑^[21],骨重塑是破坏骨形成和骨吸收之间平衡的结果。在早期膝骨关节炎中,由于软骨下骨中破骨细胞的异常激活,骨重塑主要表现为过度活跃的骨吸收^[22]。OPG/RANK/RANKL 信号通路是调节骨重塑的关键途径^[3-4],这主要是通过调节破骨细胞活性来实现的。RANKL 与 RANK 结合会加速破骨细胞前体分化并促进破骨细胞成熟,而 OPG 可

以通过阻断 RANK 和 RANKL 的结合来抑制破骨细胞活性^[23]。研究证实通过调节 OPG/RANK/RANKL 通路可缓解膝骨关节炎^[5-6]。He 等^[10]的研究报道积雪草苷对 RANKL 诱导的破骨细胞形成和骨吸收具有抑制作用。本研究结果显示积雪草苷可提高膝骨关节炎模型大鼠软骨 OPG 表达,降低 RANK 和 RANKL 表达,提示积雪草苷可使 RANKL 与 RANK 的结合减少,抑制破骨细胞的分化与成熟,从而使骨吸收水平下降。为了进一步证实积雪草苷在大鼠软骨损伤修复中的作用机制,本研究构建了 OPG 沉默载体 LV-si-OPG,并在积雪草苷干预的基础上,将 LV-si-OPG 注射到大鼠体内以降低 OPG 表达,结果显示抑制 OPG 逆转了积雪草苷在膝骨关节炎软骨损伤恢复中的促进作用,证实积雪草苷可能通过 OPG/RANK/RANKL 通路发挥抗膝骨关节炎作用。

综上所述,积雪草苷可减少促炎细胞因子的释放,抑制 MMP-13 表达和增加Ⅱ型胶原沉积,抑制关节软骨退变,并可能通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路,发挥抗膝骨关节炎作用。本研究表明积雪草苷具有治疗膝骨关节炎的潜力,可为膝骨关节炎患者新治疗选择提供参考。为了更好地阐明所涉及的机制,未来需要更多的模型,并结合体外细胞实验进行深入分析。

参考文献

- [1] JANG S, LEE K, JU J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2619-2633.
- [2] IKUTA F, TAKAHASHI K, KIUCHI S, et al. Effects of repeated intra-articular hyaluronic acid on cartilage degeneration evaluated by T1ρ mapping in knee osteoarthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2021, 31(4): 912-918.
- [3] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY E E. Regulatory effects and interactions of the wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4653-4680.
- [4] MORENO-RUBIO J, HERRERO-BEAUMONT G, TARDIO L, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E₂ modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2): 478-488.
- [5] YANG X, HE H, GAO Q, et al. Pulsed electromagnetic field improves subchondral bone microstructure in knee osteoarthritis rats through a wnt/β-catenin signaling-associated mechanism[J]. *Bioelectromagnetics*, 2018, 39(2): 89-97.
- [6] 李斌, 郭姝娜, 张继胜. 补肾活血方对膝骨关节炎大鼠 MMP-3、MMP-13 及 OPG/RANKL 轴的影响[J]. *中医研究*, 2020, 33(3): 73-76.
- [7] FAN L, LI X, LIU T. Asiaticoside inhibits neuronal apoptosis and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(12): 1988-1996.
- [8] MICHAEL S, ZAKARIA N M, ABBAS M A, et al. Immunomodulatory effects of asiaticoside against shigella flexneri-infected macrophages[J]. *Trop Life Sci Res*, 2021, 32(2): 29-44.
- [9] 付涟桥, 郭焱雄, 李坚, 等. 积雪草苷调控 miR-342-5p/AQP3 轴保护 IL-1β 诱导的软骨细胞损伤[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(3): 10-18.
- [10] HE L, HONG G, ZHOU L, et al. Asiaticoside, a component of Centella asiatica attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via NFATc1 and NF-κB signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4267-4276.
- [11] GUO H, YIN W, ZOU Z, et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development; an in vivo and in vitro study[J]. *J Adv Res*, 2020, 28(1): 255-267.
- [12] ZHANG M, LIU S, FANG L, et al. Asiaticoside inhibits renal fibrosis development by regulating the miR-142-5p/ACTN4 axis[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(1): 313-322.
- [13] HE L, HE T, XING J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 276-290.
- [14] WU G, HUANG Y, CHEN W, et al. Tougu Xiaotong capsule exerts a therapeutic effect by improving knee meniscus in the early osteoarthritis rat model[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(6): 3641-3649.
- [15] HSU C C, CHENG J H, WANG C J, et al. Shockwave therapy combined with autologous adipose-derived mesenchymal stem cells is better than with human umbilical cord wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on knee osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1217-1232.
- [16] DU C, SMITH A, AVALOS M, et al. Blueberries improve pain, gait performance, and inflammation in individuals with symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 290-306.
- [17] PARK S, MIN S, PARK S H, et al. Influence of isometric exercise combined with electromyostimulation on inflammatory cytokine levels, muscle strength, and knee joint function in elderly women with early knee osteoarthritis[J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1): 688260-688274.
- [18] CONG S, MENG Y, WANG L, et al. T-614 attenuates knee osteoarthritis via regulating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 403-412.

- 2020,247(1):112261-112271.
 - [4] JU L, HU P, CHEN P, et al. Huoxuezhitong capsule ameliorates MIA-induced osteoarthritis of rats through suppressing PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129(1):110471-110481.
 - [5] SHAN W, GE H, CHEN B, et al. Upregulation of miR-499a-5p decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting PDCD4[J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 9(1):1-12.
 - [6] 林燕云, 游纯秋, 蒋擎, 等. 独活寄生汤抑制白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(7):172-175.
 - [7] ZHANG Y, ZENG Y. Curcumin reduces inflammation in knee osteoarthritis rats through blocking TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway[J]. Drug Dev Res, 2019, 80(3):353-359.
 - [8] ZHAO G, GU W. Effects of miR-146a-5p on chondrocyte interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis involving thioredoxin interacting protein regulation[J]. J Int Med Res, 2020, 48(11):1-10.
 - [9] CUI B, ZHANG S, WANG Y, et al. Farrerol attenuates β -amyloid-induced oxidative stress and inflammation through Nrf2/Keap1 pathway in a microglia cell line[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109(1):112-119.
 - [10] CHEN Z, GAO H, WANG L, et al. Farrerol alleviates high glucose-induced renal mesangial cell injury through the ROS/Nox4/ERK1/2 pathway[J]. Chem Biol Interact, 2020, 316(1):108921-108931.
 - [11] YAN C, ZHANG X, MIAO J, et al. Farrerol directly targets GSK-3 β to activate Nrf2-ARE pathway and protect EA.hy926 cells against oxidative stress-induced injuries[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020(1):1-12.
 - [12] 刘伟军, 黎清波, 蔡磊, 等. 麝香酮通过调控微小 RNA-223 表达减轻白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞损伤[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(9):1744-1747.
 - [13] 郭秀珍, 高斌礼, 郭文, 等. LncRNA FGD5-AS1 靶向 miR-103a-3p 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡的机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(6):832-837.
 - [14] ZHAO L, WANG B, ZHANG W, et al. Effect of miR-499a-5p on damage of cardiomyocyte induced by hypoxia-reoxygenation via downregulating CD38 protein[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2):996-1004.
 - [15] YAN F, CHEN Y, YE X, et al. miR-3113-5p, miR-223-3p, miR-133a-3p, and miR-499a-5p are sensitive biomarkers to diagnose sudden cardiac death[J]. Diagn Pathol, 2021, 16(1):67-77.
 - [16] LIU K, MA L, ZHOU F, et al. Identification of microRNAs related to myocardial ischemic reperfusion injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7):11380-11390.
- (收稿日期:2021-11-11)
-
- (上接第 13 页)
- [19] ZHANG Z, LI X, LI D, et al. Asiaticoside ameliorates β -amyloid-induced learning and memory deficits in rats by inhibiting mitochondrial apoptosis and reducing inflammatory factors[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(2):413-420.
 - [20] 栾慧杰, 何莲花, 何娟, 等. 积雪草苷对 DBA/1 小鼠胶原诱导型关节炎中 Th17/Treg 细胞表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4):76-83.
 - [21] DONELL S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis[J]. EFORT Open Rev, 2019, 4(6):221-229.
 - [22] WANG T, GUO Y, SHI X W, et al. Acupotomy contributes to suppressing subchondral bone resorption in KOA rabbits by regulating the OPG/RANKL signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021(1):8168657-8168673.
 - [23] FU D, QIN K, YANG S, et al. Proper mechanical stress promotes femoral head recovery from steroid-induced osteonecrosis in rats through the OPG/RANK/RANKL system[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2020, 21(1):281-292.
- (收稿日期:2022-03-09)