

• 实验研究 •

当归-牛膝药对调控脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1/时钟节律调节蛋白信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡的影响

刘坦¹ 刘德仁¹ 李振琿¹ 吴鹏¹ 茆军^{1△}

[摘要] 目的:探讨当归-牛膝药对调控脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1(Bmal1)/时钟节律调节蛋白(Clock)信号通路对膝骨关节炎(KOA)大鼠软骨细胞凋亡的影响。方法:采用前交叉韧带横断术(ACLT)构建大鼠膝骨关节炎模型,造模成功后的的大鼠随机分为模型组、阳性对照组(塞来昔布 18 mg/kg)、当归-牛膝药对低剂量组(1.08 g/kg)、当归-牛膝药对高剂量组(2.16 g/kg)、当归-牛膝+Bmal1 抑制剂组(当归-牛膝 2.16 g/kg+Bmal1 抑制剂 SR9009 50 mg/kg),每组 7 只;另取 7 只大鼠作为假手术组。假手术组和模型组大鼠灌胃或腹腔注射生理盐水,其余各组大鼠灌胃或腹腔注射相应药物,1 次/d,连续 28 d。末次给药后,观察各组大鼠膝关节软骨组织病理改变并进行 Mankin 评分,检测血清中白细胞介素 1 β (IL-1 β)及 IL-6 的含量,检测软骨细胞凋亡情况,检测软骨组织中 Bmal1 蛋白阳性表达,测定软骨组织中 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved caspase 3)凋亡相关蛋白的表达,软骨组织 Bmal1/Clock 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠软骨表面破损、连续性中断,软骨细胞排列紊乱,软骨基质中蛋白聚糖含量降低;血清中 IL-1 β 、IL-6 含量显著升高;凋亡的软骨细胞显著增多;软骨组织中 Bmal1 蛋白阳性表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax、Cleaved caspase 3 蛋白表达显著升高,Bmal1、Clock 蛋白及 mRNA 显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,当归-牛膝药对低、高剂量组和阳性对照组大鼠软骨组织的病理改变均显著改善,上述指标均显著逆转($P<0.05$);抑制 Bmal1/Clock 信号通路能减轻当归-牛膝药对改善软骨细胞凋亡的作用。结论:当归-牛膝药对可改善膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡,其作用可能与激活 Bmal1/Clock 信号通路有关。

[关键词] 膝骨关节炎;当归-牛膝药对;脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1/时钟节律调节蛋白信号通路;凋亡

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)12-0001-09

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.241201

Effects of Couplet Medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata Modulation of Bmal1/Clock Signaling Pathway on Cartilage Cells Apoptosis in Rats with Knee Osteoarthritis

LIU Tan¹ LIU Deren¹ LI Zhenhui¹ WU Peng¹ MAO Jun^{1△}

¹ Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of couplet medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata modulation of brain and muscle ARNT-like 1 (Bmal1)/clock rhythm regulating protein (Clock) signaling pathway on cartilage cells apoptosis in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** Anterior cruciate ligament transection (ACLT) was used to construct a rat

KOA model, and the rats after successful modeling were randomly divided into model group, positive control group (celecoxib 18 mg/kg), Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata low-dose group (1.08 g/kg), Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata high-dose group (2.16 g/kg), Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata + Bmal1 inhibitor group (Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata

基金项目:国家自然科学基金项目(82205143)

江苏省中医院第三批高峰学术人才项目(y2021rc20)

江苏省中医院优秀青年博士培养专项(2023QB0122)

¹ 南京中医药大学附属医院/江苏省中医院(南京,210029)

[△]通信作者 E-mail:maojun@njucm.edu.cn

2.16 g/kg + Bmal1 inhibitor SR9009 50 mg/kg), with 7 rats in each group; another 7 rats were taken as the sham operation group. The rats in the sham-operation group and model group were injected with saline by gavage or intraperitoneal injection, and the rats in the remaining groups were injected with the corresponding drugs by gavage or intraperitoneal injection once a day for 28 d. After the last administration, the histopathological changes in the cartilage of the knee joints of rats in each group were observed and Mankin score was performed, the levels of interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum were detected, the chondrocyte apoptosis was detected, the positive expression of Bmal1 protein in cartilage tissue was detected, and the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and the expression of cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Cleaved caspase 3) apoptosis-related protein expression, and cartilage tissue Bmal1/Clock signaling pathway-related protein and mRNA expression. **Results:** Compared with the sham operation group, rats in the model group had broken cartilage surfaces, interrupted continuity, disorganized chondrocyte arrangement, and reduced proteoglycan content in cartilage matrix; the serum levels of IL-1 β and IL-6 were significantly elevated; the apoptotic chondrocytes were significantly elevated; the percentage of Bmal1 protein-positive cells in the cartilage tissues was significantly lower, the expression of Bcl-2 protein was significantly lower, and the expressions of Bax, Cleaved caspase 3 protein were significantly elevated, as well as Bmal1, Clock protein and mRNA were significantly elevated ($P < 0.05$). Compared with the model group, the couplet medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata pairs of low- and high-dose groups and the positive control group significantly improved the pathological changes in the cartilage tissue of rats, and all of the above indexes were significantly reversed ($P < 0.05$); the inhibition of the Bmal1/Clock signaling pathway could attenuate the effects of the couplet medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata on the improvement of apoptosis of chondrocytes. **Conclusion:** The couplet medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata ameliorated cartilage cells apoptosis in KOA rats, and its effect may be related to the activation of the Bmal1/Clock signaling pathway.

Keywords: knee osteoarthritis; couplet medicinals of Angelica Sinensis and Achyranthes Bidentata; brain and muscle ARNT-like 1/clock rhythm regulating protein signaling pathway; apoptosis

膝骨关节炎(KOA)是一种常见的慢性、致残性关节疾病^[1],我国症状性膝骨关节炎患病率达 17%^[2]。关节软骨破损通常被视为膝骨关节炎的标志性病理改变^[3]。中药具有多靶点、低毒性的特点,在膝骨关节炎治疗领域有举足轻重的作用。当归-牛膝药对因其补益肝肾、活血化瘀之效,被广泛用于膝骨关节炎的治疗,其具体机制主要集中于抗炎和抗凋亡等方面^[4]。研究表明昼夜节律紊乱会导致膝骨关节炎的发病,脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1(Bmal1)和时钟节律调节蛋白(Clock)是昼夜节律基因的转录激活因子,功能性昼夜节律钟驱动下游细胞凋亡、细胞外基质重塑的基因表达^[5]。本研究观察当归-牛膝药对对大鼠膝骨关节炎模型软骨细胞凋亡的干预作用,并基于 Bmal1/Clock 信号通路探讨其可能机制,可为临床治疗膝骨关节炎提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 42 只,6~8 周龄,体重为 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(京)2021-0011。所有动物均饲养于南京中医药大学实验动物中心,(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为 60% \pm 5%,每 12 h 光照/黑暗循环,自由饮水、饮食,适应性喂养 1 周后进行后续实验。本研

究方案经南京中医药大学动物伦理委员会审核批准,批准号为 202212A017。

1.2 主要药品与试剂

当归、牛膝购自南京中医药大学附属医院中药房,经该院中药师鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关规定;塞来昔布胶囊(国药准字 J20140072)购自辉瑞制药有限公司。SR9009(货号为 HY-16989)购自美国 MedChemexpress 公司;BCA 蛋白检测试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、DEPC 水(批号分别为 P0012、P0013B、P1048、P0015L、R0022)购自上海碧云天生物技术有限公司;4%多聚甲醛(批号为 G1101-500ML)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为 SEKR-0002、SEKR-0005)购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL 试剂盒、抗荧光淬灭封片剂、PBS 缓冲液(批号分别为 P0023、PN0024、PN0031)购自武汉皮诺飞生物科技有限公司;兔源 Bmal1、Clock、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的含半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved caspase 3)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号分别为 DF10308、AF0323、AF0120、AF6139、AF7022、AF7018)购自美国 Affinity Biosciences 公

司;辣根过氧化物酶偶联的亲纯化羊抗兔 IgG(H+L)二抗(批号为 K1223)购自美国 APExBIO 公司;超特敏电化学发光底物(批号为 BL520B)购自合肥白鲨科技有限公司;传统总 RNA 提取试剂、预混液形式的高效第二代定量聚合酶链式反应(qPCR)专用逆转录试剂盒、高灵敏性染料法 qPCR 检测试剂盒(批号分别为 R401-01、R222-01、Q331-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 FR900 型超低温冰箱(美国 Thermo 公司),KK291160 型-20℃冰箱(德国 Siemens 公司),5702 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司),DMI3000B 显微镜(德国 Leica 公司),ELX 800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),Nikon DS-U3 成像系统、NIKON ECLIPSE 正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司),Image Quant LAS4000mini 蛋白免疫印迹图像采集系统(美国 GE 公司),ABI 7500 型实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 药液的制备

称取 24 g 当归和 24 g 牛膝用超纯水浸泡中药饮片 30 min,大火煮沸后转文火再煎煮 30 min,收集药液,剩余药材重复上述步骤再次煎煮。合并两次水煎药液,60℃下浓缩,冷冻干燥,冻干粉置于-20℃冰箱暂存备用。给药前分别用超纯水稀释成浓度 0.27 g/mL(低剂量)和 0.54 g/mL(高剂量)的药液。研究表明塞来昔布具有保护软骨的特性,能延缓骨关节炎的进展^[6]。200 mg 塞来昔布胶囊研磨成粉状后,加入 50 mL 生理盐水配制成 4 mg/mL 混悬液备用。

2.2 分组、造模与给药

将 35 只雄性 SD 大鼠行前交叉韧带横断术(ACLT)构建膝骨关节炎模型^[7],造模 14 d 后,通过前抽屉试验模拟膝关节前向不稳,以评估韧带损伤程度,具体操作包括:使大鼠膝关节被动屈曲 90°,一手固定大鼠大腿,另一手握住大鼠小腿上段做向前拉及后推的动作,若大鼠胫骨结节明显向前移位则为阳性,表明大鼠前交叉韧带已被切断。此评估方法的有效性已在前人研究中得到验证^[8]。造模成功后的大鼠随机分为模型组、阳性对照组、当归-牛膝药对低剂量组、当归-牛膝药对高剂量组和当归-牛膝+Bmal1 抑制剂组,每组 7 只。另取 7 只雄性 SD 大鼠作为假手术组,假手术组仅切开皮肤打开关节腔。依据人与大鼠体表面积折算法计算大鼠的药物临床等效剂量,当归-牛膝药对低剂量组和当归-牛膝药对高剂量组给药剂量分别为 1.08 g/kg 和 2.16 g/kg,阳性对照组给药剂

量为 18 mg/kg。当归-牛膝+Bmal1 抑制剂组在首次灌胃前予 50 mg/kg SR9009(Bmal1 抑制剂)腹腔注射给药,随后予 2.16 g/kg 当归-牛膝灌胃。SR9009 给药剂量和给药方式参考文献^[9]。各给药组大鼠给予相应药物灌胃或腹腔注射,假手术组和模型组大鼠灌胃或腹腔注射等体积生理盐水,灌胃 1 次/d,连续 28 d。

2.3 样本采集和保存

末次给药后,全部大鼠过夜禁食、禁水 12 h 后予 3%戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉采血后经 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清,-80℃冰箱中保存;一部分膝关节软骨组织放入装有 4%多聚甲醛的冻存管中保存,后续用于组织病理切片;另一部分大鼠的膝关节软骨组织放入冻存管中在-80℃冰箱中保存。

2.4 大鼠软骨组织病理形态学观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法和番红固绿染色法进行观察。取固定在 4%多聚甲醛的软骨组织,在 10% EDTA 溶液中脱钙 25 d。石蜡包埋,再制成 5 μm 厚的矢状切片,常规 HE 染色和番红固绿染色,在光镜下观察软骨组织病理形态并摄片,参照 Mankin 评分标准评估软骨组织病理形态学改变^[10]。

2.5 大鼠血清 IL-1β 和 IL-6 含量检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测,取-80℃冰箱冻存的血清样本,以酶标仪于 450 nm 波长处测定 IL-1β 及 IL-6 含量。

2.6 软骨组织中 Bmal1 蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法(IHC)检测。取软骨组织,石蜡切片制备同上,切片脱蜡后,通过降级乙醇水化,再进行抗原修复,洗涤,封闭后与 Bmal1 一抗(稀释比例为 1:100)4℃下孵育过夜。次日加入相应二抗(稀释比例为 1:200)后室温孵育 45 min,DAB 底物用于着色,复染细胞核,脱水封片,光镜下观察并摄片。

2.7 软骨组织 TUNEL 染色

采用 TUNEL 染色法进行检测。取软骨组织,石蜡切片制备同上,切片脱蜡后,通过降级乙醇水化,PBS 清洗后滴加 50 μL Proteinase K 工作液,37℃下孵育 20 min;PBS 清洗 3 min×3 次,滴入 50 μL TUNEL 孵育液,37℃下孵育 2 h;PBS 清洗 5 min×3 次,滴加 50 μL DAPI 染色液,室温避光染色 3 min;PBS 清洗 5 min×3 次,用抗荧光淬灭封片剂封片,正置荧光显微镜下观察并摄片。

2.8 软骨组织 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase 3、Bmal1 及 Clock 蛋白表达检测

采用 Western Blot 法检测。取-80℃冰箱冻存的软骨组织样本,加入液氮研磨成粉,加入含蛋白酶磷

酸酶抑制剂的 RIPA 裂解混合液,裂解 15 min 后,在 4℃ 下经 12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清液;BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液配平后,经 98℃ 变性 5 min;制胶、上样,电泳后转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后 TBST 洗膜 10 min,将膜分别与 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase 3、Bmal1、Clock 一抗(稀释比例均为 1:1 000)在 4℃ 下孵育过夜;用 TBST 洗膜 10 min×3 次,与相应二抗(稀释比例为 1:5 000)在室温下孵育 1 h,再以 TBST 洗膜 10 min×3 次;加入电化学发光底物显色曝光;用 Image J 软件进行分析,各目的蛋白的相对表达水平以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示。

2.9 软骨组织 Bmal1 及 Clock mRNA 表达水平

采用 qPCR 法检测。取 -80℃ 冰箱冻存的大鼠软骨组织,按照传统总 RNA 提取试剂说明书提取软骨组织总 mRNA,测定 OD 值,OD 值为 260/280 nm (1.8~2.0)符合标准,逆转录为 cDNA,严格按照高灵敏性染料法定量 PCR 试剂盒进行扩增,PCR 扩增条件如下:预变性(95℃,30 s)、循环反应(95℃,10 s;60℃,30 s;循环 40 次)与熔解曲线(95℃,15 s;60℃,60 s;95℃,15 s)。以 β -actin 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法来计算 Bmal1 及 Clock mRNA 表达水平。Bmal1 的上、下游引物分别为 5'-AAGATGGGGCTGGACGAAG-3'和 5'-ACCCGTATTTCCCCGTTTCAC-3';Clock 的上、下游引物分别为 5'-GCAGT-

TGATAAAGGCGCTC-3'和 5'-TTGTGGGGAGCAGACAGAG-3'; β -actin 的上、下游引物分别为 5'-CGCGAGTACAACCTTCTTG-3'和 5'-TGACCCATACCCACCATCAC-3'。

2.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.3 软件对数据进行统计分析和绘图。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式呈现,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠软骨组织的病理形态比较

假手术组大鼠软骨表面光滑完整,软骨细胞排列有序,软骨基质中蛋白聚糖含量丰富;与假手术组比较,模型组大鼠出现软骨表面破损、连续性中断和软骨细胞排列紊乱,软骨基质中蛋白聚糖含量稀少;当归-牛膝药对低剂量组关节软骨表面较粗糙、欠连续,软骨细胞排列稍无序,软骨基质中蛋白聚糖含量尚可,较模型组改善;当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组软骨表面较完整,连续性未见明显中断,软骨细胞排列较为有序,软骨基质中蛋白聚糖含量明显增多,较当归-牛膝药对低剂量组大鼠软骨进一步改善,见图 1 和图 2。此外,与假手术组比较,模型组 Mankin 评分显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组 Mankin 评分均显著降低($P < 0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组 Mankin 评分均显著降低($P < 0.05$),见表 1。

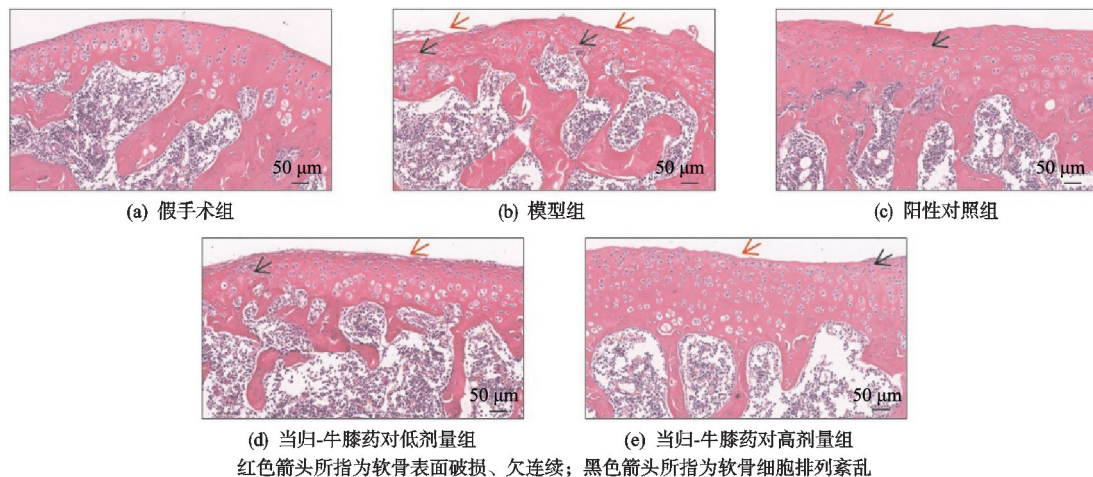


图 1 各组大鼠软骨组织病理形态比较(HE 染色法,×200)

3.2 各组大鼠血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量比较

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量均显著降低($P < 0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量均显著降低($P < 0.05$),见表 2。

3.3 各组大鼠软骨组织 Bmal1 蛋白阳性表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 Bmal1 蛋白阳性表达显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠软骨组织 Bmal1 蛋白阳性表达均显著升高($P < 0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组 Bmal1 蛋白阳性表达均显著升高($P < 0.05$),见图 3 及表 3。

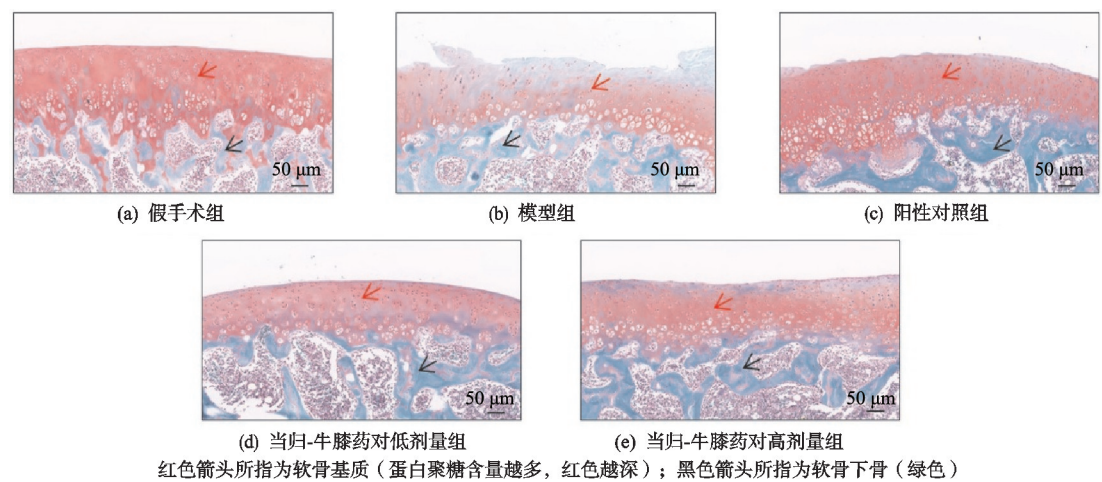


图 2 各组大鼠软骨组织病理形态比较(番红固绿染色法,×200)

表 1 各组大鼠 Mankin 评分($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	Mankin 评分/分
假手术组	1.167 ± 0.764
模型组	$9.333 \pm 1.528^{1)}$
阳性对照组	$3.500 \pm 0.500^{2)3)}$
当归-牛膝药对低剂量组	$6.333 \pm 0.577^{2)}$
当归-牛膝药对高剂量组	$3.167 \pm 0.289^{2)3)}$

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量比较($n=7, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1 β	IL-6
假手术组	66.912 ± 7.796	107.362 ± 10.633
模型组	$173.684 \pm 15.016^{1)}$	$204.210 \pm 15.561^{1)}$
阳性对照组	$114.390 \pm 8.245^{2)3)}$	$139.222 \pm 8.963^{2)3)}$
当归-牛膝药对低剂量组	$146.258 \pm 12.288^{2)}$	$166.170 \pm 11.840^{2)}$
当归-牛膝药对高剂量组	$109.632 \pm 11.125^{2)3)}$	$135.696 \pm 8.412^{2)3)}$

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

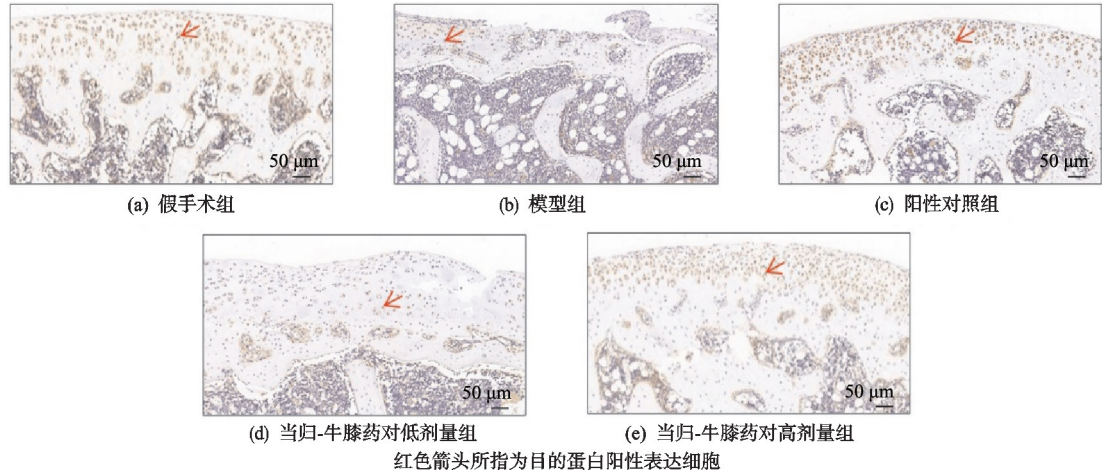


图 3 各组大鼠软骨组织中 Bmal1 蛋白阳性表达显微图(IHC,×200)

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P<0.05$),Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠软骨组织 Bcl-2 蛋白表达均显著升高($P<$

3.4 各组大鼠软骨组织 TUNEL 染色结果比较

与假手术组比较,模型组大鼠凋亡的软骨细胞(即染成绿色的细胞)显著升高;与模型组比较,各给药组大鼠凋亡的软骨细胞显著降低;与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组中凋亡的软骨细胞进一步降低,见图 4。

3.5 各组大鼠软骨组织 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白表达比较

0.05),Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白表达均显著降低($P<0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组 Bcl-2 蛋白表达均显著升高($P<0.05$),Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白表达

表 3 各组大鼠软骨组织中 Bmal1 蛋白阳性表达比较($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	Bmal1
假手术组	21.472 ± 2.809
模型组	$3.965 \pm 1.782^{1)}$
阳性对照组	$15.978 \pm 1.053^{2)3)}$
当归-牛膝药对低剂量组	$9.132 \pm 2.026^{2)}$
当归-牛膝药对高剂量组	$16.755 \pm 1.416^{2)3)}$

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

均显著降低($P<0.05$),见图 5 及表 4。

3.6 各组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock 蛋白表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock 蛋白表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock 蛋白表达均显著升高($P<0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组 Bmal1 及 Clock 蛋白表达均显著升高($P<0.05$),见图 6 及表 5。

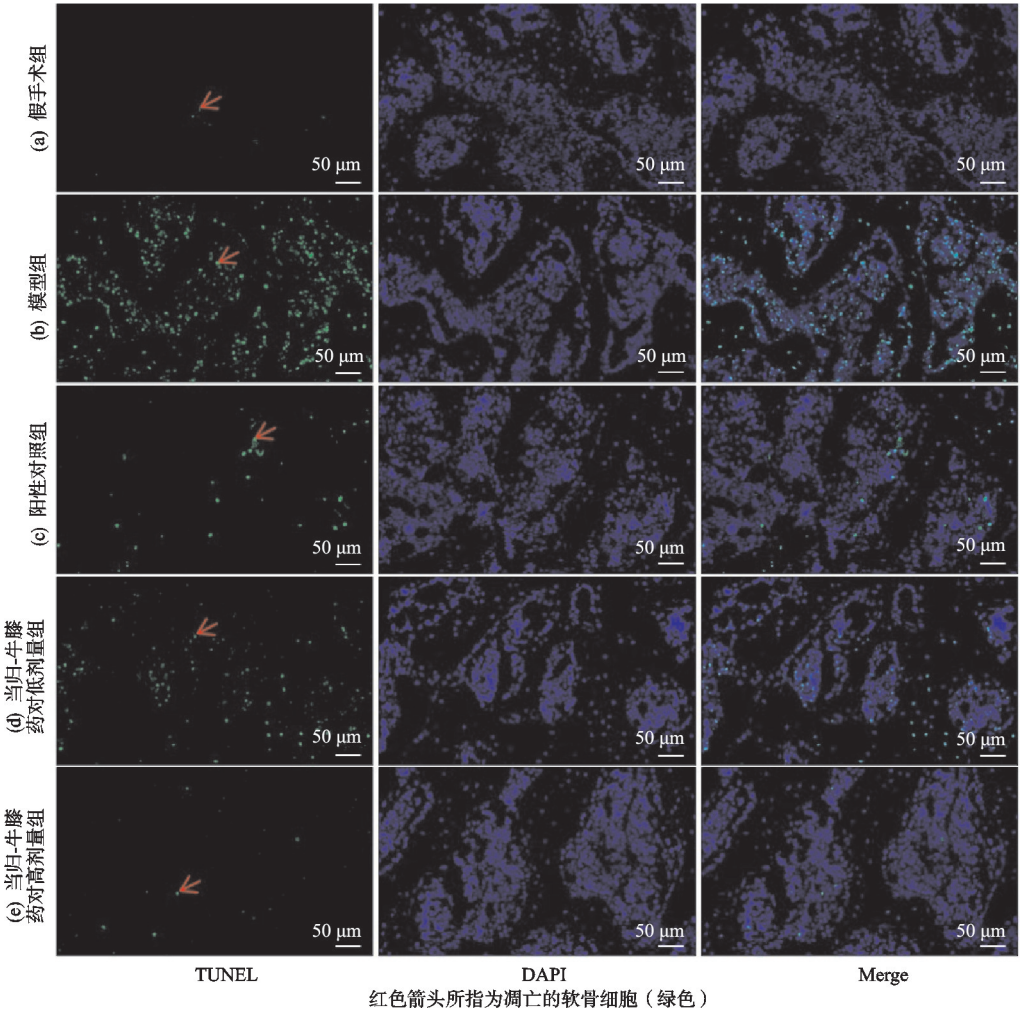


图 4 各组大鼠软骨组织 TUNEL 染色结果图($\times 200$)

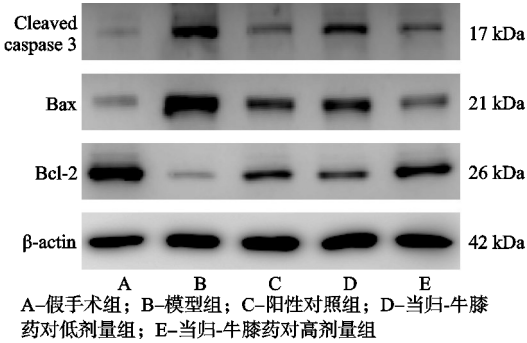


图 5 各组大鼠软骨组织 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白的电泳图

3.7 各组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock mRNA 表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock mRNA 表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock mRNA 表达均显著升高($P<0.05$);与当归-牛膝药对低剂量组比较,当归-牛膝药对高剂量组和阳性对照组 Bmal1 及 Clock mRNA 表达均显著升高($P<0.05$),见表 6。

3.8 抑制 Bmal1 后各组大鼠软骨组织 TUNEL 染色结果比较

与假手术组比较,模型组大鼠凋亡的软骨细胞(即

表 4 各组大鼠软骨组织 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase 3 蛋白表达比较(n=7, $\bar{x}\pm s$)

组别	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Cleaved caspase 3/ β -actin
假手术组	1.062 \pm 0.097	0.298 \pm 0.044	0.135 \pm 0.020
模型组	0.202 \pm 0.023 ¹⁾	1.171 \pm 0.059 ¹⁾	0.898 \pm 0.023 ¹⁾
阳性对照组	0.778 \pm 0.037 ²³⁾	0.560 \pm 0.065 ²³⁾	0.202 \pm 0.018 ²³⁾
当归-牛膝药对低剂量组	0.494 \pm 0.072 ²⁾	0.924 \pm 0.040 ²⁾	0.545 \pm 0.084 ²⁾
当归-牛膝药对高剂量组	0.830 \pm 0.029 ²³⁾	0.491 \pm 0.060 ²³⁾	0.197 \pm 0.027 ²³⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

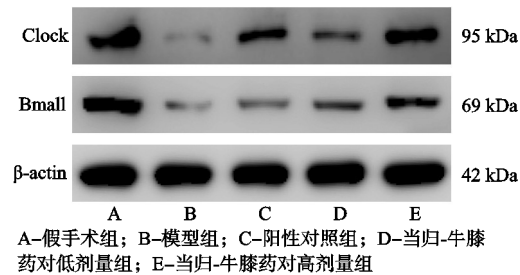


图 6 各组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock 蛋白的电泳图

表 5 各组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock 蛋白表达比较 (n=7, $\bar{x}\pm s$)

组别	Bmal1/ β -actin	Clock/ β -actin
假手术组	0.884 \pm 0.025	0.711 \pm 0.033
模型组	0.097 \pm 0.016 ¹⁾	0.111 \pm 0.024 ¹⁾
阳性对照组	0.384 \pm 0.026 ²³⁾	0.457 \pm 0.030 ²³⁾
当归-牛膝药对低剂量组	0.201 \pm 0.023 ²⁾	0.260 \pm 0.027 ²⁾
当归-牛膝药对高剂量组	0.428 \pm 0.037 ²³⁾	0.493 \pm 0.031 ²³⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠软骨组织 Bmal1 及 Clock mRNA 表达比较 (n=7, $\bar{x}\pm s$)

组别	Bmal1	Clock
假手术组	1	1
模型组	0.248 \pm 0.044 ¹⁾	0.330 \pm 0.076 ¹⁾
阳性对照组	0.639 \pm 0.033 ²³⁾	0.736 \pm 0.141 ²³⁾
当归-牛膝药对低剂量组	0.450 \pm 0.045 ²⁾	0.529 \pm 0.086 ²⁾
当归-牛膝药对高剂量组	0.699 \pm 0.094 ²³⁾	0.766 \pm 0.096 ²³⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与当归-牛膝药对低剂量组比较, $P<0.05$ 。

染成绿色的细胞)显著升高;与模型组比较,当归-牛膝药对高剂量组和当归-牛膝+Bmal1 抑制剂组中大鼠凋亡的软骨细胞显著降低;与当归-牛膝药对高剂量组比较,当归-牛膝+Bmal1 抑制剂组中凋亡的软骨细胞显著升高,见图 7。

4 讨论

膝关节关节炎是一种中老年高发的慢性退行性关节疾病,关节疼痛和功能障碍是困扰膝关节关节炎患者的

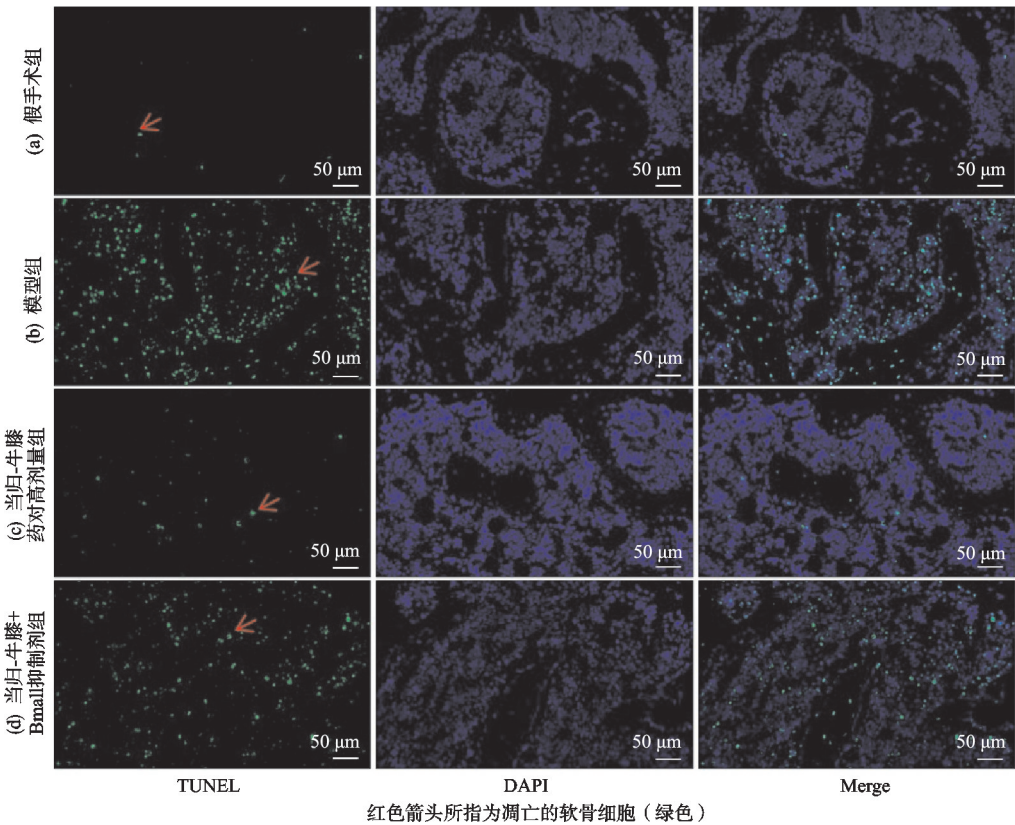


图 7 抑制 Bmal1 后各组大鼠软骨组织 TUNEL 染色结果($\times 200$)

主要症状,严重者甚至导致残疾,关节软骨破损、软骨下骨重塑和滑膜病变是膝骨关节炎的主要特征^[1]。尽管当前对膝骨关节炎的发病机制不完全清楚,但普遍认为关节软骨破损是其最主要的病理改变^[3]。软骨细胞作为关节软骨中的常驻细胞,易受到创伤、衰老和代谢等多种因素的影响,从而导致炎症反应来加剧膝骨关节炎的进展^[11]。

膝骨关节炎属中医“痹证”“骨痹”“筋痹”“骨痿”“筋痿”等范畴,证属本虚标实、本痿标痹^[12]。《素问·痹论》云“风寒湿三气杂至,合而为痹也”,风、寒、湿邪阻滞经络,气血凝滞,导致肢体疼痛麻木;《素问·长刺节论》云“病在骨,骨重不可举,骨髓酸痛,寒气至,名曰骨痹”,病位在骨,证见骨节疼痛、四肢沉重不能抬举。现代医学主要应用西药和手术治疗膝骨关节炎,虽然能一定程度缓解疼痛,但其副作用和局限性也不容忽视,长期使用非甾体抗炎药易导致胃肠道反应或肝、肾功能损伤,膝关节置换术主要用于治疗晚期膝骨关节炎^[13]。近年来,临床中广泛应用中医药治疗膝骨关节炎,并取得不错的疗效^[14]。

当归配伍牛膝为临床上治疗膝骨关节炎的常用药对,并能取得良好的治疗效果^[4]。当归入肝、心、脾经,为“血中之气药”,补血活血,可用于风湿痹痛,跌扑损伤;当归中的阿魏酸、绿原酸能通过抗氧化应激、抗炎作用改善软骨细胞损伤^[15]。牛膝入肝、肾经,补肝肾、强筋骨、逐瘀通经,可用于跌打损伤、腰膝酸痛、痿痹;牛膝中的牛膝皂苷成分具有保护大鼠软骨细胞免受 IL-1 β 诱导的炎症和细胞凋亡作用^[16]。当归配伍牛膝共奏补益肝肾、活血化瘀之效,在膝骨关节炎的治疗中起到标本兼治的作用。本研究采用前交叉韧带横断术构建膝骨关节炎大鼠模型,结果表明模型组大鼠软骨发生显著退变、蛋白聚糖含量降低、Mankin 评分显著升高,予以当归-牛膝药对或塞来昔布治疗后软骨退变明显改善、蛋白聚糖含量升高、Mankin 评分显著升高;且随着当归-牛膝药对给药浓度的升高,大鼠软骨改善也更明显,提示当归-牛膝药对在改善膝骨关节炎大鼠软骨退变方面具有很大的潜力。

软骨细胞凋亡是膝骨关节炎发生发展的重要环节,与关节软骨破损的严重程度密切相关^[17],因此改善软骨细胞凋亡对膝骨关节炎的治疗具有重要意义。Bcl-2 和 Bax 同属 Bcl-2 家族蛋白成员,Bcl-2 家族蛋白是线粒体应激诱导的细胞凋亡过程中重要调节因子^[18]。Bcl-2 是主要的抗凋亡蛋白,维持线粒体外膜完整性;Bax 是主要的促凋亡蛋白,破坏线粒体膜的完整性,促进细胞凋亡因子释放,介导细胞凋亡^[19]。细胞凋亡由半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspases)家族来执行,Caspases 的激活又由 Bcl-2 家族蛋白(包括 Bax

和 Bak)来介导,这些酶通常以非活性酶原的形式存储在细胞质内,通过细胞凋亡过程中被蛋白水解转化成活性酶来发挥细胞凋亡作用^[20]。本实验结果表明,相较于假手术组,膝骨关节炎大鼠软骨中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低,促凋亡蛋白 Bax、Cleaved caspase 3 表达显著升高,经当归-牛膝药对或塞来昔布治疗后上述指标明显改善。

Bmal1 和 Clock 是核心时钟基因的激活因子,在调节昼夜节律、维持细胞和器官的生理功能方面发挥重要作用。研究表明骨关节炎中存在 Bmal1 蛋白和基因表达水平的降低,Bmal1 的缺失会影响软骨细胞的增殖、分化和凋亡^[21],Bmal1/Clock 信号通路在膝骨关节炎软骨细胞凋亡中起到关键作用^[22]。Bmal1 作为昼夜节律系统的重要调节因子,不仅调控膝骨关节炎关节软骨的稳态和完整性,而且还能调节炎症反应^[23],调控线粒体功能^[24]。本研究结果表明,相较于假手术组,模型组大鼠发生软骨表面破损,连续性中断,软骨细胞排列紊乱,软骨组织中 Bmal1、Clock 蛋白和 mRNA 表达均显著降低,血清中 IL-1 β 及 IL-6 含量显著升高,凋亡的软骨细胞显著升高,经当归-牛膝药对或塞来昔布治疗后上述软骨病理改变和指标均明显改善;且抑制 Bmal1/Clock 信号通路后,当归-牛膝药对改善软骨细胞凋亡的作用被减弱,说明当归-牛膝药对在膝骨关节炎大鼠的治疗过程中可以激活 Bmal1/Clock 信号通路,抑制膝关节软骨细胞凋亡,延缓膝骨关节炎进展。

综上所述,当归-牛膝药对可激活 Bmal1/Clock 信号通路,升高 Bcl-2 表达,降低 Bax 及 Cleaved caspase 3 表达,降低 IL-1 β 及 IL-6 含量,从而减轻膝关节软骨细胞凋亡,延缓膝骨关节炎恶性进展。然而本研究也存在一定的局限性,例如样本量少、用药时间短。此外,本研究中当归-牛膝药对高剂量组能取得和塞来昔布相似的治疗效果,可能与中药多成分、多靶点的特点相关。下一步将扩大样本量,延长给药时间,深入探究当归-牛膝药对调控 Bmal1/Clock 信号通路、延缓膝骨关节炎进展的效应机制,更好地指导临床用药。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] YAO Q, WU X, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 56.
- [3] 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.
- [4] 林青, 王南卜, 李小云, 等. 基于网络药理学探讨当归-牛

- 膝防治骨关节炎的作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(9): 3532-3547.
- [5] LU K H, LU P W, LU E W, et al. The potential remedy of melatonin on osteoarthritis[J]. J Pineal Res, 2021, 71(3): e12762.
- [6] CHANG L H, CHEN C H, WU S C, et al. Cyclooxygenase-2 regulates PTHrP transcription in human articular chondrocytes and is involved in the pathophysiology of osteoarthritis in rats[J]. J Orthop Translat, 2021, 30: 16-30.
- [7] 李明超, 张力, 时孝晴, 等. 温经活血外治法通过抑制 NGF/TrKA 信号通路改善膝关节炎外周痛敏的机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(7): 693-701.
- [8] MA T W, WEN Y J, SONG X P, et al. Puerarin inhibits the development of osteoarthritis through antiinflammatory and antimatrix-degrading pathways in osteoarthritis-induced rat model[J]. Phytother Res, 2021, 35(5): 2579-2593.
- [9] CHU S J, LIAO W I, PAO H P, et al. Targeting Rev-Erba to protect against ischemia-reperfusion-induced acute lung injury in rats[J]. Respir Res, 2023, 24(1): 247.
- [10] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3): 523-537.
- [11] WANG B, SHAO Z, GU M, et al. Hydrogen sulfide protects against IL-1 β -induced inflammation and mitochondrial dysfunction-related apoptosis in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(6): 4369-4386.
- [12] 吕世伟, 关雪峰, 杨永菊, 等. 膝骨关节炎之中医病因病机概述[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 85-88.
- [13] 中华中医药学会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南(2023 年版)[J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
- [14] 张久一, 梅其杰, 韦亿丹, 等. 膝骨关节炎的中医非手术治疗方法的研究进展[J]. 慢性病学杂志, 2024, 25(2): 197-200.
- [15] DU K, FANG X, LI Z. Ferulic acid suppresses interleukin-1 β -induced degeneration of chondrocytes isolated from patients with osteoarthritis through the SIRT1/AMPK/PGC-1 α signaling pathway[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(3): 710-720.
- [16] XU X X, ZHANG X H, DIAO Y, et al. Achyranthes bidentate saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis in vitro[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2017, 33(2): 62-68.
- [17] HWANG H S, KIM H A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26035-26054.
- [18] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49-63.
- [19] FLORES-ROMERO H, HOHORST L, JOHN M, et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis[J]. EMBO J, 2022, 41(2): e108690.
- [20] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 567-595.
- [21] MA Z, JIN X, QIAN Z, et al. Deletion of clock gene Bmal1 impaired the chondrocyte function due to disruption of the HIF1 α -VEGF signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2019, 18(13): 1473-1489.
- [22] QIAN Z, GAO X, JIN X, et al. Cartilage-specific deficiency of clock gene Bmal1 accelerated articular cartilage degeneration in osteoarthritis by up-regulation of mTOR C1 signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 115: 109692.
- [23] LIU W W, WEI S Z, HUANG G D, et al. BMAL1 regulation of microglia-mediated neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model[J]. FASEB J, 2020, 34(5): 6570-6581.
- [24] LI E, LI X, HUANG J, et al. BMAL1 regulates mitochondrial fission and mitophagy through mitochondrial protein BNIP3 and is critical in the development of dilated cardiomyopathy[J]. Protein Cell, 2020, 11(9): 661-679.

(收稿日期: 2024-11-01)