

通络汤对骨性关节炎模型髓样分化因子及相关蛋白的影响研究

陈冬冬¹ 鲁超² 朱添¹ 张高魁¹ 袁雪超¹ 郝阳泉^{2△}

[摘要] 目的:探究通络汤对大鼠膝关节骨性关节炎模型 TOLL 样受体(TLR4)/髓样分化因子 88(MYD88)信号通路相关蛋白表达的影响。方法:将 40 只 SD 成年大鼠,取出 10 只作为正常组,其余 30 只建立 KOA 模型成功后,随机分为模型组、氨基糖组和通络组,每组 10 只。模型组给予纯水,氨基糖组给予盐酸氨基葡萄糖胶囊,通络组给予中药通络汤,连续灌喂 2 个月。2 个月对实验动物进行形态学和组织学观察并测定 TLR4/MYD88 蛋白的表达。结果:模型组较氨基糖组与通络组 TLR4/MYD88 蛋白阳性表达显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$);通络组与氨基糖组相比,通络组 TLR4/MYD88 蛋白表达更低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:通络汤能有效减缓大鼠 KOA 模型软骨退变,抑制滑膜炎。

[关键词] 骨性关节炎;通络汤;受体;髓样分化因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)06-0009-04

Effect of Tongluo Decoction on Myeloid Differentiation Factor and Related Proteins in Osteoarthritis Model

CHEN Dongdong¹ LU Chao² ZHU Tian¹
ZHANG Gaokui¹ YUAN Xuechao¹ HAO Yangquan^{2△}

¹Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi China;

²Honghui Hospital Affiliated to Medical Department in Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, China.

Abstracts Objective: To investigate the effect of Tongluo decoction on the expression of TOLL-like receptor(TLR4)/myeloid differentiation factor 88(MYD88)signaling pathway-related protein in rat knee osteoarthritis model. **Methods:** 40 SD adult rats were taken out as normal group, and the remaining 30 were established with KOA model. After successful, they were randomly divided into model group, amino sugar group and Tongluo group, with 10 rats in each group. The model group was given pure water, the amino sugar group was given glucosamine hydrochloride capsule, and the Tongluo group was given traditional Chinese medicine Tongluo decoction, which was continuously fed for 2 months. After 2 months, the experimental animals were subjected to morphological and histological observation and the expression of TLR4/MYD88 protein was determined. **Results:** The positive expression of TLR4/MYD88 protein in the model group was significantly higher than that in the glycosaminoglycan group and the Tongluo group($P<0.05$). The expression of TLR4/MYD88 protein in the Tongluo group was lower than that in the glycosyl group($P<0.05$). **Conclusion:** Tongluo decoction can effectively alleviate cartilage degeneration in rat KOA model and inhibit synovial inflammation.

Keywords: osteoarthritis; Tongluo decoction; receptor; myeloid differentiation factor

膝骨性关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是一种常见的缓慢发展的退行性骨关节疾病^[1],其主要的

病理特征是关节软骨的退行性病变以及继发性的骨质增生,伴有软骨坏损、软骨下骨重建和骨赘形成。KOA 的发病与软骨组织炎症反应、细胞外基质中蛋白多糖的降解、软骨细胞生成细胞外基质能力的减弱及软骨细胞凋亡密切相关。TLR4 是介导天然免疫和炎症反应的一种主要模式识别受体,MYD88 是 TLR4 信号转导通路中一个关键的衔接蛋白,它能够启动下游炎症因子的转导^[2]。该信号通路能够起到控制缓解

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(2017M613179)

西安市卫健委科学发展项目(J201803048)

¹ 陕西中医药大学(陕西 咸阳,712000)

² 西安交通大学医学院附属红会医院

[△]通信作者 E-mail:haoyq2008@163.com

炎症的发展,控制自身的免疫应答的作用。中医学认为肝肾亏虚、筋骨失养为膝关节骨关节炎发生发展的重要病理基础^[3]。治疗主要采用“善补阳者,阴中求阳”的中医补气血阴阳的立法思想,多采用中药内服兼外用的方法^[4],中药通络方为西安交通大学医学院附属红会医院关节外科郝阳泉教授的经验方,方中诸药可扩张血管、调节微循环、促进局部的组织修复与再生能力,可起到控制与缓解骨性关节炎滑膜炎的作用。因此,本研究旨在观察通络汤对大鼠膝关节骨性关节炎模型 TLR/MYD88 信号通路表达的影响,确定通络汤延缓早期骨性关节炎发生发展的疗效。

1 材料与方法

1.1 动物

40 只 SPF 级成年 SD 大鼠由西安交通大学实验动物中心提供(许可证号 SCXK(陕)2018-003),体重约 250~300 g,雌雄各半,复合饲料喂养^[5]。实验中对动物处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》中所要求的。

1.2 药物与试剂

通络方组成:生黄芪、鸡血藤、路路通、龙血竭、骨碎补各 30 g,土元 20 g,桃仁、三七粉、怀牛膝各 15 g,丹参、桂枝各 10 g(西安交通大学附属红会医院中药房)。煎煮后存于 4℃ 冰箱备用。盐酸氨基葡萄糖(湖北爱普生物工程有限公司);ELISA 试剂盒和 TLR4/MYD88 抗体(西安瀚洋生物技术有限公司)。

1.3 造模与分组

通过 Hulth 方法^[6,7]将 40 只成年 SD 大鼠制备膝骨性关节炎模型,待造模成功后,将模型组随机分为正常组(10 只,作为实验动物生命体征,形态学观察对照),模型组(10 只),氨糖组(10 只),通络组(10 只),中药治疗组灌服通络汤混悬液(西安市红会医院提供) 10 mL/kg,氨糖组给予灌服盐酸氨基葡萄糖水溶液 10 mL/kg^[8],正常组及模型组给予灌服 10 mL/kg 生理盐水,1 d/次,连续 8 周。治疗过程中每周对动物进行称重测量并记录数据,同时观察治疗各组动物精神状态、活动量、皮毛色泽、饮食饮水量、及二便情况并与正常组相对比。

1.4 测量膝关节活动度

待造模成功后,使用量角器测量大鼠膝关节屈伸最大活动度^[9],测量 3 次取其平均值。

1.5 实验方法

1)免疫组化方法^[10]:将软骨标本用 4%的多聚甲醛液固定 48 h 之后,经脱钙、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋;连续切片 5 μm,切片放于防脱载玻片之上,将其经过二甲苯等一系列酒精梯度脱蜡入水后,微波柠檬盐酸缓冲液(pH6.0)抗原修复,在 PBS 浸泡 5 min×3 次;将载片

夹放于配置好的 3% H₂O₂ 水溶液中,通过室温下温育 10 min 使内源性过氧化物酶失活,之后 PBS 浸泡 5 min×3 次;逐滴加入血清封闭溶液,室温封闭 30 min,并滴加 1:300 稀释的抗鼠 TLR4 与 MYD88 抗体,再 4℃ 孵育过夜,PBS 浸洗 5 min×3 次;逐滴加入生物素标记的二抗,在室温下孵育 10 min,并在 PBS 浸洗 5 min×3 次;加入辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温下孵育 10 min,浸入 PBS 中 5 min×3 次,DAB 室温下显色;苏木精复染 1 min,清水冲洗,PBS 反蓝 20 min;脱水透明后封片。染色结果褐色的表示 TLR4 和 MYD88 阳性表达。采用平均吸光度值反映 TLR4 及 MYD88 阳性表达的强度,每例标本的被检区测 3 张切片,图像采集后使用 Image ProPlus 对图像采用积分光密度法进行数据处理分析。2)ELISA 方法^[11]:取出 96 孔板,放置超净工作台上,设置 A 列为标准品孔,B~G 列为样品孔,H 列为空白孔,标准品孔 A1~A6 和 A7~A12 依次各加不同浓度的标准品 50 μL;完成布孔后,从 B~G 列依次加入待测血浆 10 μL、样本稀释液 40 μL,H 列不加,然后依次从 A~G 加入抗体 100 μL,封板膜进行封板,微振荡至混匀,置于 37℃ 温育箱 60 min;取出 96 孔板,快速倒扣,从中甩去液体并将其放在吸水纸上拍干,后用稀释好的洗涤液微振动洗去孔中残留的液体,如此反复 5 次;A~H 列每孔依次加入显色剂 A,B 各 50 μL,微振荡混匀,装入避光袋中,置于 37℃ 温育箱 15 min;A~H 列每孔依次加入 50 μL 终止液,终止显色;在规定的时间内(15 min),将 96 孔板置于酶标记检测仪中,设置 450 nm 波长,测定每孔的 OD 值;将标准品的浓度值作为 X 轴,每个标准品对应的 OD 值为 Y 轴,绘制标准曲线,建立回归方程,并根据标准曲线方程计算各孔实际浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPASS19.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用单因素方差分析(独立样本 *t* 检验),*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝关节活动度检测结果

造模成功后,出现典型的关节肿胀和畸形,活动度较差于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05);处死前氨糖组与通络组相比,两组活动度均优于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05),且通络组活动度优于氨糖组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 膝关节活动组评分($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	造模成功后	处死前
通络组	10	108.1±5.3	137.3±5.8
造模组	10	104.5±5.7	101.8±6.4
氨糖组	10	107.7±4.3	129.4±4.7

2.2 软骨中 TLR4 与 MYD88 蛋白免疫组化结果

与通络组和氨糖组相比,模型组软骨骨质破坏严重,TLR4 与 MYD88 蛋白阳性表达更明显,差异有统计学意义($P<0.05$);通络组与氨糖组比较,通络组软骨破坏控制与缓解相对更好,TLR4 与 MYD88 蛋白表达更低,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组染色结果见图 1-3 及表 2。

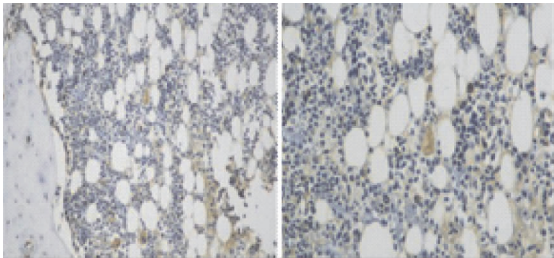


图 1 模型组(200×,400×)

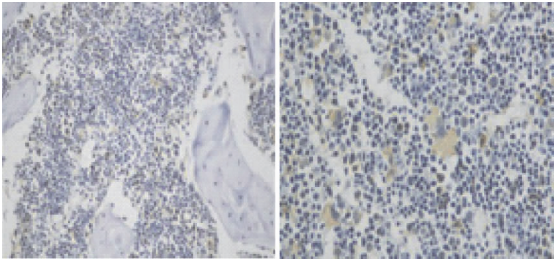


图 2 通络组(200×,400×)

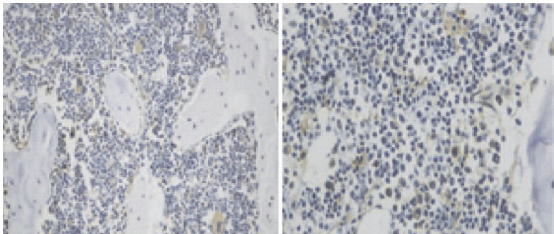


图 3 氨糖组(200×,400×)

表 2 各组免疫组化 TLR4 与 MYD88 含量表达对比(±s)

组别	鼠数/只	MYD88	TLR4
通络组	10	0.255±0.021	0.285±0.037
造模组	10	0.395±0.011	0.385±0.023
氨糖组	10	0.275±0.020	0.292±0.032

2.3 血清中 TLR4 与 MYD88 蛋白 ELISA 检测结果

造模组与氨糖组及通络组相比,TLR4/MYD8 蛋白阳性表达显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$);给予通络汤治疗后,与对照组相比,TLR4/MYD8 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且通络组较氨糖组 TLR4/MYD8 蛋白表达更低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3-4。

表 3 各组血清中 TLR4 蛋白含量(±s,ng/mL)

组别	鼠数/只	造模成功后	灌喂 2 个月后
通络组	10	177.67±25.78	104.33±23.43
造模组	10	179.62±15.19	223.32±27.38
氨糖组	10	180.22±16.91	122.55±14.90

表 4 各组血清中 MYD88 蛋白含量(±s,ng/mL)

组别	鼠数/只	造模成功后	灌胃 2 个月后
通络组	10	109.39±10.42	95.63±11.74
造模组	10	134.99±22.98	182.10±39.93
氨糖组	10	114.30±21.16	129.32±22.92

3 讨论

膝关节骨性关节炎在中医属于“骨痹”范畴,中医学对于 KOA 的认识相对较为透彻,其认为 KOA 的病因病机为“本虚标痹、本虚标实”^[12]。肝肾亏虚,筋骨失养为本;邪气痹阻,经络不畅为标。肝肾亏虚是本病发生的根源,诱发因素为寒湿阻滞,血瘀气滞等病证,寒湿、气虚、血瘀痹阻经络是其发病的重要环节。西医认为膝关节骨性关节炎的病变本质主要是因软骨的退化和软骨下骨的硬化引起^[13],其发病机制与关节软骨的改变密切相关。以往的骨性关节炎动物实验中,随着软骨细胞凋亡加剧,软骨基质中的纤维连接蛋白表达也随之升高,其表达与软骨破坏程度呈正比,通过抑制软骨细胞凋亡,可以减缓骨性关节炎进程并减轻软骨损伤。在以往的实验中发现,KOA 软骨损伤区域 TLR 表达水平升高,提示 TLR 所介导的免疫反应及其下游信号转导通路的参与关节软骨破坏过程。TLR 的亚型分化 R4 是一种重要的信号通路转导蛋白^[14],与 KOA 发病机制密切相关,在膝骨性关节炎软骨的细胞中高度表达,参与软骨破坏的 TLR4 信号通路可分为 MYD88 依赖性和 MYD88 非依赖性信号转导通路,这些通路可引起 NF-κB 活化并激活细胞质区域中炎症反应,导致炎症因子的释放(例如 IL-1 和 TNF)。MYD88 将信号分子 IRAK 聚集成复合物,IRAK-4 在酸化后激活 IRAK-1,然后激活 TRAF-6。由此促使 NF-κB 抑制蛋白激酶泛素化降解^[15],同时也激活转化生长因子活化激酶 TAK-1 和 TAK-1 结合蛋白,使 NF-κB 从 NF-κB 抑制蛋白复合物中活化。NF-κB 最终诱导快速反应基因的转录活性,产生一些效应分子参与防御反应如脂养素(LXs),它是花生四烯酸的重要代谢产物,可调节各种炎症相关基因的表达和各种炎症细胞的功能。它在炎症反应的及时消退和维持机体稳态中有重要作用,表明了 TLR4/MYD88 信号通路的激活既可调节炎症又可调节关节软骨细胞的凋亡^[16]。

本实验研究发现,膝关节骨性关节炎模型(KOA)组大鼠关节软骨组织以及血清中的 TLR4 和 MYD88 蛋白表达明显高于通络组与氨糖组,提示通过调节 TLR4/MYD88 信号通路可以加重膝关节骨性关节炎大鼠关节组织的炎症反应。实验结果显示,随着 TLR4 与 MYD88 蛋白的升高,大鼠关节的活动程度明显降低,而经通络汤以及盐酸氨基葡萄糖治疗后,TLR4 与 MYD88 蛋白下降并且大鼠关节活动程度随之提高,关节炎症症状显著改善,通络汤活动度略优于氨糖组,提示 TLR4/MYD88 信号通路在膝关节骨性关节炎发生与发展中有着重要作用,通络汤与盐酸氨基

葡萄糖都可通过调节 TLR4/MYD88 信号通路发挥治疗作用,然而通络汤的效果更优于盐酸氨基葡萄糖,其作用机制有待进一步研究^[17]。

因此可以得出结论:具有 TLR4/MYD88 信号通路调控作用的药品可作为潜在的阻止骨关节结构损伤和延缓疾病进程的特效药。

参考文献

- [1] DELL'LSOLA A, WIRTH W, STEULTJENS M, et al. Knee extensor muscle weakness and radiographic knee osteoarthritis progression[J]. *Acta Orthopaedica*, 2018, 89(4):406-411.
- [2] QIAN S, HOSOKI K, AGUILERA-AGUIRRE L, et al. Ragweed pollen proteins bind TLR4/MD2, and rapidly recruit MYD88 and TRAF6 to the signaling complex[J]. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2014, 133(2): AB225-AB235.
- [3] 刘志豪,卢敏,肖学锋,等. 长沙市膝关节骨性关节炎中医证型分布调查研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 18(8):39-42.
- [4] 范华雨,张向东. 中药外用治疗膝骨性关节炎机制的研究进展[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(10):87-89.
- [5] 颜春鲁,李盛华,安方玉,等. 右归丸对鼠膝骨性关节炎的治疗作用及 Wnt 信号通路相关因子表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(2):177-181.
- [6] 王婧,张忠辉,孙娇梦,等. 大鼠骨关节炎三种动物模型的建立及比较[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 33(3):456-460.
- [7] WONG K, TRUDEL G, LANEUVILLE O. Intra-articular collagenase injection increases range of motion in a rat knee flexion contracture model[J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2017, 12:15-24.
- [8] 张俐,李芑,陈凯. 去势大鼠劳损性膝骨关节炎新模型的建立[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2014, 22(11):1-3.

- [9] FOX B A, STEPHENS M M. Glucosamine hydrochloride for the treatment of osteoarthritis symptoms[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2(4):599-604.
- [10] 武迪,许琳,赵欢,等. 免疫组化染色中防脱玻片制备方法的优化[J]. *医学信息*, 2013(29):586-588.
- [11] 黄莉敏,张大准,王艳,等. 自制抗人磷脂酶 A2 受体抗体 ELISA 试剂盒的临床应用评价[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(5):743-751.
- [12] 王定,史晓林,李文庆,等. 膝骨性关节炎中医药治疗的研究进展[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2008, 16(4):65-67.
- [13] SCARVELL J M, GALVIN C R, PERRIMAN D M, et al. Kinematics of knees with osteoarthritis show reduced lateral femoral roll-back and maintain an adducted position: a systematic review of research using medical imaging[J]. *Journal of Biomechanics*, 2018, 75:108-122.
- [14] LIN X, XIE J, SUN S, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) stimulates synovial injury of temporomandibular joint in rats through the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:4405-4412.
- [15] LIANG Y, CHEN S, YANG Y, et al. Vasoactive intestinal peptide alleviates osteoarthritis effectively via inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2018, 25(1):25-29.
- [16] 李欣,柴晶美,杨阿龙,等. 上中下通用痛风汤对痛风性关节炎模型 TLR4 信号通路的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2018, 34(1):23-25.
- [17] FERNÁNDEZ-TORRES J, ZAMUDIO-CUEVAS Y, LÓPEZ-REYES A. Gene-gene interactions of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45(5):1089-1098.

(收稿日期:2019-01-07)

(上接第8页)

- [5] IORIO R, HEALY W L. Unicompartamental arthritis of the knee[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A(7):1351-1364.
- [6] JYOTI MEHTA MOT, KP MULGAONKAR MOT. Effect of laterally raised footwear on bilateral medial compartment knee osteoarthritis and its biomechanical analysis-a comparative study[J]. *The Indian Journal of Occupational Therapy*, 2014, 3:51-56.
- [7] FERNANDEZ-SEGUIN L M, DIAZ MANCHA J A, SANCHEZ RODRIGUEZ R, et al. Comparison of plantar pressures and contact area between normal and cavus foot [J]. *Gait Posture*, 2017, 39(2):789-792.
- [8] RESENDE R A, KIRKWOOD R N, FONSECA S T, et al. Ipsilateral and contralateral foot pronation affect lower limb and trunk biomechanics of individuals with knee osteoarthritis during gait[J]. *Clin Biomech*, 2016, 34:30-37.
- [9] POLLO F E, JACKSON R W. Knee bracing for unicompartamental osteoarthritis [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2016, 14(1):5-11.
- [10] RANNOU F, POIRAUDEAU S, BEAUDREUIL J. Role

of bracing in the management of knee osteoarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22(2):218-222.

- [11] DRAGANICH L, REIDER B, RIMINGTON T, et al. The effectiveness of self-adjustable custom and off-the-shelf bracing in the treatment of varus gonarthrosis[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(12):2645-2652.
- [12] 张英泽,李存祥,李冀东,等. 不均匀沉降在膝关节退变及内翻过程中机制的研究[J]. *河北医科大学学报*, 2014, 35(2):218-219.
- [13] 郑占乐,孙英彩,张晓然,等. 膝关节骨性关节炎发病机制的临床影像学研究[J]. *河北医科大学学报*, 2014, 35(5):599-600.
- [14] 秦迪,陈伟,吕红芝,等. 腓骨中上段部分切除治疗膝关节内侧间室骨性关节炎机制研究及治疗效果影响因素分析[J]. *河北医科大学学报*, 2015, 36(6):727-729.
- [15] 刘月驹,秦士吉,李升,等. 膝关节失衡综合征在骨科临床中的应用[J]. *河北医科大学学报*, 2015, 36(5):598-600.

(收稿日期:2019-01-08)