

续断醇提物对骨关节炎的治疗作用及相关分子机制的研究

周煜虎¹ 段明明^{1△} 曹强¹

[摘要] 目的:探讨续断醇提物(RD)对骨关节炎(OA)的治疗作用及相关信号通路的影响。方法:将 SD 雄性大鼠(220~250 g)48 只随机分为假手术组、模型组、RD-L、RD-M、RD-H 及阳性对照组,采用右膝关节前交叉韧带切断术复制大鼠骨关节炎模型,评估 OA 大鼠的关节炎指数和机械性痛阈值;采用苏木精-伊红和 TUNEL 染色检测 OA 大鼠滑膜组织的病理变化;采用 ELISA 和 RT-PCR 法分别检测 OA 大鼠血清和滑膜组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量和表达水平;采用 Western Blot 法检测 OA 大鼠滑膜组织中 Wnt/ β -catenin 信号分子蛋白的表达水平。结果:续断醇提物能够减小关节炎指数和增加机械性痛阈值,差异有统计学意义($P<0.05$),同时缓解滑膜炎性细胞浸润和滑膜细胞凋亡,除此之外,还能够降低 OA 大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量和下调滑膜组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达水平,也能够下调滑膜组织中 Wnt 和 β -catenin 的蛋白表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:续断醇提物对骨关节炎具有潜在的保护作用,同时抑制滑膜组织 Wnt/ β -catenin 信号通路活化。

[关键词] 续断醇提物;骨关节炎;滑膜炎

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)07-0001-05

Study on the Effects of Dipsacusasperoides Alcohol Extract on the Treatment of Osteoarthritis and Its Related Molecular Mechanism

ZHOU Yuhu¹ DUAN Mingming^{1△} CAO Qiang¹

¹Department of Orthopaedic Trauma, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi China.

Abstract Objective: To explore the effect of dipsacusasperoides alcohol extract (RD) on osteoarthritis(OA) and its role on regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** 48 SD male rats (220-250 g) were randomly divided into sham operation group, model group, RD-L, RD-M, RD-H and positive control group. The rat model of osteoarthritis was reconstructed by right anterior cruciate ligament debridement. The arthritis index and mechanical pain threshold of OA rats were evaluated. The pathological changes of synovial tissue in OA rats were detected by HE and TUNEL staining. The levels and expression levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in serum and synovial tissue of OA rats were detected by ELISA and RT-PCR. The Wnt/ β -catenin signaling molecule protein expression level in synovial tissue of OA rats was detected by Western Blot. **Results:** RD can reduce the arthritis index and increase the mechanical pain threshold and alleviated the occurrence of synovitis and synovial cell apoptosis. It can reduce the levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α in serum and down-regulate the expression levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in synovial tissue of OA rats ($P<0.05$), and also down-regulate protein expression of β -catenin and Wnt1 in synovial tissue ($P<0.05$). **Conclusion:** RD has potential protective effect on osteoarthritis, and this effect may be related to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: dipsacusasperoides alcohol extract; osteoarthritis; synovitis

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨变性、骨质疏松及滑膜炎为特征的慢性退行性疾病,目

前尚无特效药治疗^[1]。Wnt/ β -catenin 是细胞内重要的信号通路,其激活通过引起关节软骨退化参与骨关节炎的发病^[2-5],因此阻断 Wnt/ β -catenin 活化可能是治疗骨关节炎的一种重要策略。研究表明续断(Dipsacusasper Wallex Henry)能够促进骨折的愈合和修复^[6-7]。但是续断醇提物对骨关节炎的作用及相

基金项目:陕西省教育厅科学研究项目(17JK0876)

¹延安大学附属医院创伤骨科(陕西 延安, 716000)

[△]通信作者 E-mail:lstlst99@163.com

关分子机制研究较少,因此本研究探讨续断醇提取物(RD)对骨性关节炎的作用及对滑膜组织 Wnt/ β -catenin 信号活化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 48 只,雄性,体质量 220~250 g,中位数 235.5 g,延安大学医学院动物研究中心提供,实验动物许可证号 SYXK(陕)2016-004。

1.2 实验药物与试剂

1.2.1 试剂 Wnt1(ab15251), β -catenin(ab16051)及 β -Actin(ab179467)抗体购自 Abcam(英国);RIPA 蛋白裂解液(P0013C)、蛋白酶抑制剂(P1008)、磷酸酶抑制剂(P1081)购自碧云天;IL-6(1310602),IL-1 β (1110122),TNF- α (1317202)大鼠 ELISA 试剂盒购自达科为;苏木精-伊红染色液(C0105,碧云天);HRP 标记山羊抗兔 IG(7074)和山羊抗鼠 IG(7076)购自 CST(美国)。

1.2.2 药物制备 称干燥续断 200 g,加入 6 L 乙醇(70%)回流提取,每次 1.5 h,提取 3 次,合并滤液,提取液经薄膜浓缩,喷雾干燥,得提取物 1 g 相当于生药 25 g,实验时用蒸馏水配制成混悬液(0.02,0.04,0.08 g/mL),4℃保存。

1.3 实验仪器 电子自动爪触觉测试仪(瑞沃德);微孔板酶标仪 Varioskan™ LUX(赛默飞,美国);Nano-Drop 2000 Spectrophotometer(赛默飞,美国);StepOnePlus™ Real-Time PCR(赛默飞,美国)。

1.4 方法

1.4.1 骨关节炎(OA)模型 采用右膝关节前交叉韧带切断术建立骨关节炎(OA)大鼠模型,在第 0 天造模,提前禁食 12 h,戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,固定于实验操作台,右膝关节刮毛备皮后用碘伏消毒,在无菌情况下,于膝关节内侧切约 1 cm 纵向切口,打开关节腔,同时切断前交叉韧带、内侧副韧带和内侧半月板,缝合伤口,术后连续肌肉注射 4 d 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,计手术当天为第 0 天。

1.4.2 动物分组 所有动物实验均经过动物伦理委员会批准,将 48 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、续断醇提取物低剂量组(RD-L,10 g/kg)、中剂量组(RD-M,20 g/kg)、高剂量组(RD-H,40 g/kg)及阳性对照组(双氯芬酸钠肠溶片,4 mg/kg),每组 8 只。

1.4.3 动物给药 手术后 2 周(即第 14 天)开始灌胃给药 RDE,1 次/d,模型组和假手术组灌胃给予等体积的 CMCNa(0.5%),连续给药 3 周,在第 35 天行为学检测结束后腹主动脉取血,脱颈椎处死,分离大鼠关节滑膜组织。

1.4.4 关节炎指数检测 最后 1 d 给药后,进行关节炎评分(0~4 级):0 分为无关节炎;1 分为关节轻度发红肿胀;2 分为关节中度发红肿胀;3 分为关节严重发红肿胀;4 分为关节严重发炎,负重困难。

1.4.5 机械性痛阈值检测 采用电子自动爪触觉测试仪测定实验大鼠的机械刺激缩爪阈值 PWT,每周测量 1 次。

1.4.6 ELISA 检测 根据制造商的说明书采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 IL-6,IL-1 β ,TNF- α 的含量。

1.4.7 RT-PCR 检测 分离和收集实验大鼠的膝关节滑膜组织,称取约 30 mg,采用 Trizol 法提取组织总 RNA,根据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,并进行 qRT-PCR 定量分析,计算 IL-6,IL-1 β ,TNF- α ,GAPDH mRNA 的表达水平,RT-PCR 引物序列如下:IL-6-Forward:5'-CACCCTGCCCCGTAGATGAAG-3'。IL-6-Reverse:5'-AGGGTACAGTCGTCGAAGTCT-3'。IL-1 β -Forward:5'-TGAGCCAAGACAGAAAACCCA-3'。IL-1 β -Reverse:5'-GGGACATGAGTAAGGTTCTGTT-3'。TNF- α -Forward:5'-TTGCTCTTATGGATTGTCCCC-3'。TNF- α -Reverse:5'-CATTGATGCAGCACAGTTGTC-3'。GAPDH-Forward:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'。GAPDH-Reverse:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.4.8 组织病理学检测 分离收集实验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 mmol/L,pH=8)脱钙 12 d,隔 3 d 换 1 次液,石蜡包埋,切成 4 μ m 薄片,苏木精-伊红(HE)染色观察。同时,根据制造商的说明书使用原位细胞死亡检测试剂盒进行 TUNEL 测定,以确定滑膜组织中 TUNEL 阳性细胞的密度,凋亡指数(AI)=(TUNEL 阳性细胞数/总细胞数)×100%。

1.4.9 蛋白免疫印迹检测 分离收集实验大鼠的膝关节滑膜组织,称取约 30 mg,加入 1 mL 蛋白裂解液,研磨仪组织匀浆。根据制造商说明书操作提取组织总蛋白,采用 BCA 法蛋白定量,加入 Loading buffer(4×)于 100℃煮沸 5 min,然后采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,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氟乙烯(PVDF)膜(Millipore,美国),用 5% BSA 室温封闭 60 min,TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用一抗(Wnt1 和 β -catenin 及 β -Actin,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 和山羊抗鼠 IG,按 1:10 000 稀释)室温孵育 90 min,TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用 ECL 化学发光法(Millipore,MA)显影检测,用 ImageJ 软件分析灰度值。

1.5 统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 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

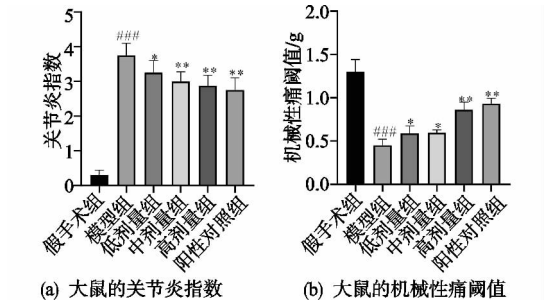
2.1 续断醇提物对 OA 大鼠关节炎指数和机械性痛阈值的影响

关节炎指数结果表明与假手术组相比, 模型组大鼠关节炎指数显著升高, 灌胃给予续断醇提物能够显著降低 OA 大鼠的关节炎指数, 且高剂量和中剂量效果与阳性对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1a。机械性痛阈值结果表明与假手术组相比, 模型组大鼠的机械性痛阈值显著减小, 灌胃给予续断醇提物呈剂量依赖性增加 OA 大鼠的机械性痛阈值 (见图 1b)。上述结果表明续断醇提物能够缓解 OA 大鼠的关节炎症和疼痛。

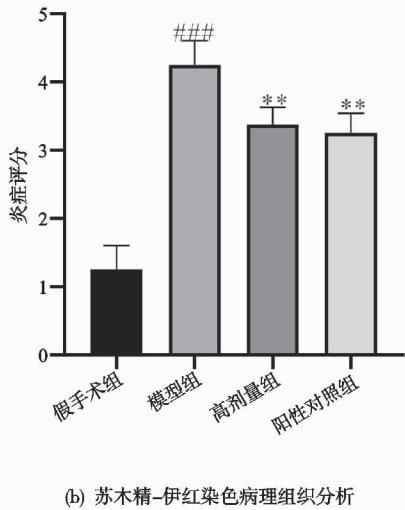
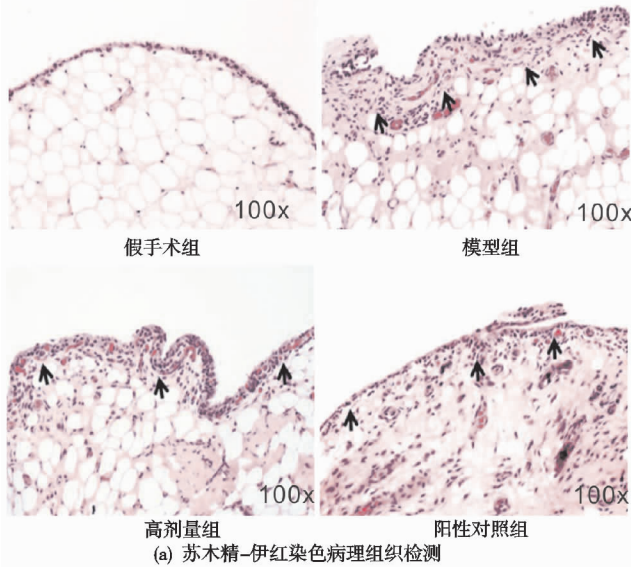
2.2 苏木精-伊红染色病理组织检测

采用 HE 染色检测 OA 大鼠滑膜组织病理变化,

结果表明假手术组大鼠的滑膜组织有一小部分滑膜细胞, 细胞均匀分布, 并排列规则, 无明显的增生、增厚及局部炎性细胞浸润和血管痉挛; 模型组大鼠的膝关节局部炎症反应明显, 存在大量单核细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 滑膜细胞和细胞层数增加, 甚至有的达到 5~6 层或更多, 且排列混乱稀疏, 滑膜组织中存在细胞纤维化和纤维渗出; 与模型组相比, 灌胃给予续断醇提物能够减少炎性细胞浸润, 且滑膜增生显著减少, 滑膜细胞排列规则, 其炎症评分显著降低, 见图 2。



注: 与假手术组比, $^{###}P < 0.001$; 与模型组比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。
图 1 续断醇提物对骨关节炎大鼠关节炎指数和疼痛的影响



注: 与假手术组比, $^{###}P < 0.001$; 与模型组比, $^{**}P < 0.01$ 。

图 2 苏木精-伊红染色病理组织检测及分析

2.3 TUNEL 染色病理组织检测

TUNEL 染色结果表明假手术组大鼠的滑膜细胞核部分为淡蓝色, 为正常细胞, 排列规则; 与假手术组比, 模

型组大鼠的细胞核为深棕色或黄色, 并伴有核萎缩或染色质浓缩, 出现大量的凋亡细胞; 与模型组比, 灌胃给予续断醇提物能够显著降低滑膜细胞凋亡, 见图 3。

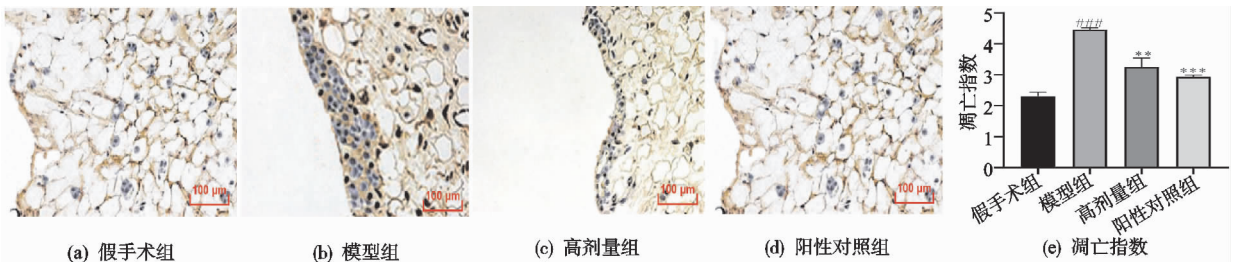


图 3 TUNEL 染色病理组织检测

2.4 续断醇提物对 OA 大鼠血清和滑膜组织中炎症因子表达的影响

采用 ELISA 法检测 OA 大鼠血清 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的水平,结果表明与假手术组相比,模型组大鼠血清中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 含量显著升高,灌胃给予续断醇提物呈剂量依赖性显著减少 OA 大鼠血清中 IL-

1 β , TNF- α 和 IL-6 含量(见图 4a~c)。采用 RT-PCR 法检测 OA 大鼠滑膜组织中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 mRNA 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-1 β , TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达显著升高,灌胃给予 OA 大鼠呈剂量依赖性下调滑膜组织中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达水平(见图 4d~f)。

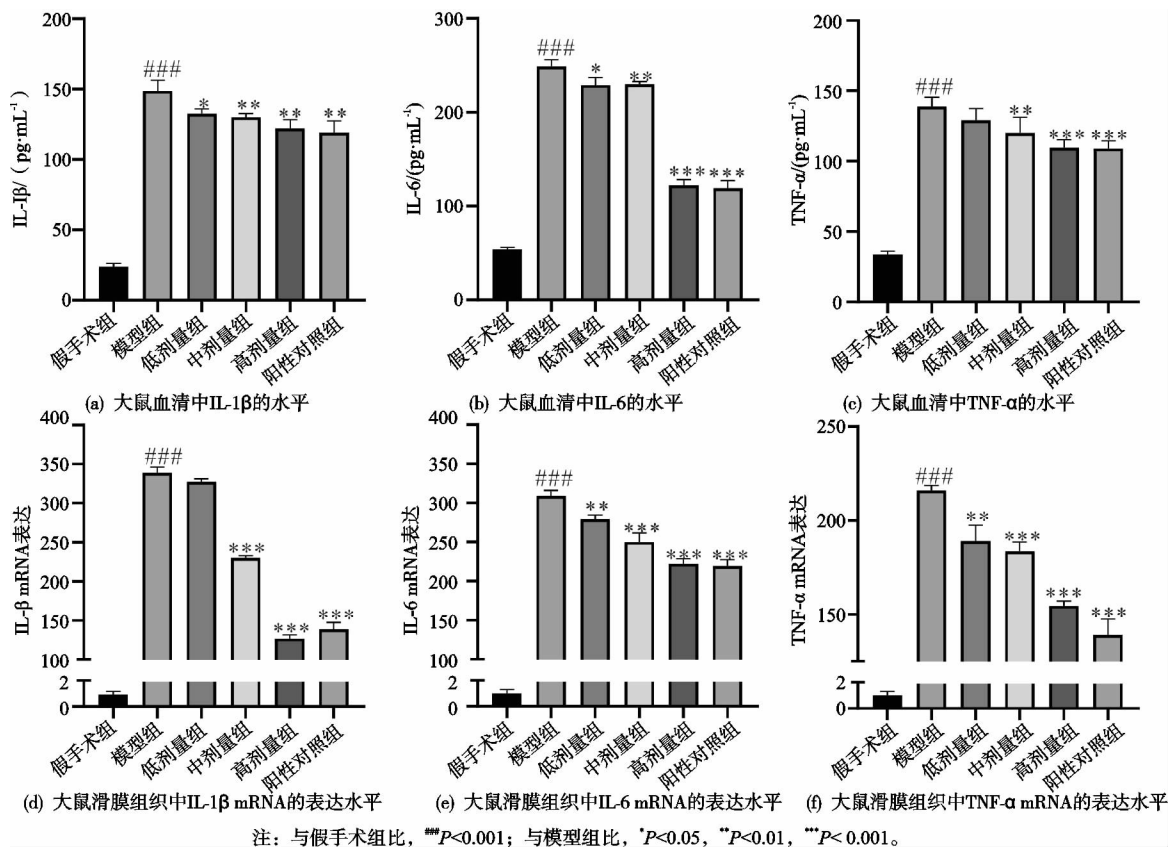


图4 续断醇提物对骨关节炎大鼠血清和滑膜组织中炎症因子表达的影响

2.5 续断醇提物对 OA 大鼠滑膜组织 Wnt/ β -catenin 通路的影响

采用 Western Blot 法检测 OA 大鼠滑膜组织 Wnt/ β -catenin 信号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 Wnt1 和 β -catenin 的蛋白表达水平显著上调,灌胃给予续断醇提物显著下调 OA 大鼠滑膜组织 Wnt1 和 β -catenin 的蛋白水平,见图 5。

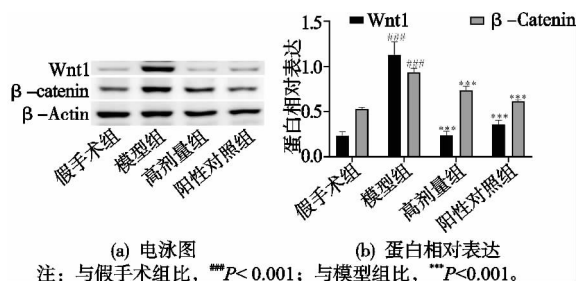


图5 续断醇提物对骨关节炎大鼠滑膜组织 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

3 讨论

骨关节炎是一种老年性疾病,其主要影响膝盖和臀部。临床试验表明中药续断具有消肿止痛、改善关节功能之效,同时有研究表明续断能够明显促进骨折的愈合和修复^[7]。但是续断醇提物对骨关节炎的治疗作用研究较少,因此本研究建立骨关节炎大鼠模型,探讨续断醇提物对骨关节炎的作用及相关分子机制。

骨关节炎是一种慢性退行性骨关节疾病,临床主要表现为慢性关节疼痛、肿胀及活动受限等^[8]。膝关节前交叉韧带术近年来广泛应用于骨关节炎的病理和药物干预研究^[9]。本研究首先建立了骨关节炎大鼠模型,模型组大鼠的关节炎指数显著上升,并且机械性疼痛阈值显著降低,上述结果与已有研究结果一致,表明本研究初步建立了骨关节炎大鼠模型,为后续药物干预研究打下了基础。此外,本研究表明续断醇提物显著降低 OA 大鼠的关节炎指数,且增加 OA 大鼠的机械性痛阈值,这说明续断醇提物对骨关节炎治疗具有潜在的价值。

滑膜炎在炎性关节疾病的病理过程中起着重要作用,与骨关节炎的疼痛及肿胀直接相关^[10]。骨关节炎病理过程中,大量炎性细胞浸润滑膜组织,引起各种促炎因子、趋化因子及蛋白酶的释放,引起骨质的破坏及滑膜细胞凋亡,在众多炎症因子中以 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 尤为关键,因此抑制炎症因子的产生是治疗骨关节炎的一种重要策略^[9,11]。在本研究中,续断醇提物显著降低 OA 大鼠血清中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 含量,同时抑制滑膜组织 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 表达水平,缓解炎性细胞浸润滑膜组织和滑膜细胞凋亡,上述结果表明续断醇提物能够抑制 OA 大鼠的炎症反应。

研究报道 Wnt/ β -catenin 信号通路激活能够刺激软骨细胞,促进多种影响骨关节炎病理发生的因素,同时 Wnt/ β -catenin 信号在 OA 大鼠滑膜组织和细胞中激活,参与骨关节炎的病理变化过程^[12]。有研究报道 β -catenin 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白,其表达在 OA 患者和动物组织中出現上调^[13]。除此之外,文献报道通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活产生抗炎和抗肿瘤作用^[14-16],因此阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路活化可能对骨关节炎的治疗具有重要意义。本研究表明续断醇提物显著降低 Wnt/ β -catenin 信号蛋白分子的表达,阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化。

综上所述,本研究表明续断醇提物能够抑制 OA 大鼠的炎症反应和滑膜细胞凋亡,对骨关节炎治疗具有潜在的价值,其治疗作用可能与阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。但是续断醇提物成分复杂,治疗骨关节炎的具体的活性成分依然不明确,因此在后续研究中需要进一步探索。

参考文献

- [1] 陈明,王丹娜,高福明,等. 曲安奈德、玻璃酸钠联合硫酸氨基葡萄糖治疗膝骨性关节炎疗效评价[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(12):1725-1728.
- [2] 陈明,董启榕,黄群,等. 0.5 Gy X 线照射通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路促进成骨细胞分化[J]. 中华医学杂志,2017,97(23):1820-1825.
- [3] 鲁花,于露,甄欢欢,等. 人参皂苷 Rg1 通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路促进退变人腰椎间盘髓核细胞的生长及胞外基质合成[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(4):705-710.
- [4] FERNÁNDEZ-TORRES J, ZAMUDIO-CUEVAS Y, LÓPEZ-REYES A, et al. Gene-gene interactions of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis

- [J]. Mol Biol Rep,2018,45(5):1089-1098.
- [5] 王婉莹,彩云,孙丽艳. Wnt/ β -catenin 信号通路在骨关节炎和大骨节病发病中的作用及研究进展[J]. 中华地方病学杂志,2018,37(11):933-936.
- [6] 李胜光. 中医治疗膝关节骨性关节炎疗效分析[J]. 中国民族民间医药,2010,19(7):102.
- [7] 王祥杰,潘月兴,杜志仙,等. 壮筋续骨汤对大鼠骨折骨痂中骨形态发生蛋白-7 和神经肽 Y 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(8):214-216.
- [8] 覃香,赵顺吕,傅婷,等. 壮医药线点灸配合针灸治疗膝关节骨性关节炎 60 例[J]. 中国中医骨伤科杂志,2017,25(10):45-47.
- [9] HUANG H, SKELLY J D, AYERS D C, et al. Age-dependent changes in the articular cartilage and subchondral bone of C57BL/6 mice after surgical destabilization of medial meniscus[J]. Sci Rep,2017,7:42294.
- [10] MOBASHERI A, BAY-JENSEN A C, SPIL W E V, et al. Osteoarthritis year in review 2016: biomarkers (biochemical markers) [J]. Osteoarthritis Cartilage,2018,26(3):312-318.
- [11] VAN DALEN S C, BLOM A B, SLÖETJES A W, et al. Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage,2017,25(3):385-396.
- [12] LIETMAN C, WU B, LECHNER S, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis[J]. Jci Insight,2018,3(3):e96308.
- [13] RAN J, MA C, XU K, et al. Schisandrin B ameliorated chondrocytes inflammation and osteoarthritis via suppression of NF- κ B and MAPK signal pathways[J]. Drug Des Devel Ther,2018,12:1195-1204.
- [14] 周伟,吴进,林晓光,等. 活血膏对膝骨性关节炎大鼠关节软骨 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 世界中医药,2018,13(6):1495-1498.
- [15] MIYAMOTO K, OHKAWARA B, ITO M, et al. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling[J]. Plos One,2017,12(9):e0184388.
- [16] DING Q H, YE C Y, CHEN E M, et al. Emodin ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling in-vitro and in-vivo [J]. Int Immunopharmacol,2018,61:222-230.

(收稿日期:2019-11-15)