

丹酚酸 A 治疗在体腰椎小关节骨性关节炎的实验研究

展嘉文^{1,2} 朱立国^{1,2} 王尚全^{1,2△} 魏戌^{1,2} 刘广伟^{1,2} 王晓博¹
王文轩³ 谢瑞¹ 韩涛¹ 陈明¹ 尹煜辉¹

[摘要] **目的:**观察丹酚酸 A 对持续压力导致的腰椎小关节骨性关节炎的干预作用。**方法:**采用在体加压装置,建立在体免脊柱运动节段压力退变模型。将 24 只新西兰白兔随机分为对照组、模型组与丹酚酸组,其中模型组在 L_{4~5} 节段予以持续 294 kPa 压力,丹酚酸组在持续压力基础上予腹腔注射丹酚酸 A 干预。术后第 28 天各组切取双侧 L_{4~5} 小关节,分离关节软骨进行番红固绿染色,采用流式细胞术测定软骨细胞凋亡情况,分离滑膜组织采用 qPCR 与 Western blot 法检测滑膜组织炎症因子表达情况。**结果:**模型组腰椎小关节软骨表面形态不平整,出现裂隙,丹酚酸组软骨表面相对光滑,但染色欠均匀。模型组软骨细胞显著凋亡,而丹酚酸组则下调了该模型中的凋亡比例,差异有统计学意义($P<0.05$)。相比模型组,丹酚酸干预后的腰椎小关节滑膜组织中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 与蛋白表达水平出现显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**丹酚酸 A 能够缓解持续压力对腰椎小关节软骨造成的损伤程度,抑制软骨细胞凋亡与滑膜组织中炎症因子的表达。

[关键词] 腰椎小关节;骨关节炎;应力退变;丹酚酸 A

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)07-0007-05

Efficacy of Salvianolic Acid A on Lumbar Facet Joint Osteoarthritis in Rabbits in Vivo

ZHAN Jiawen^{1,2} ZHU Ligu^{1,2} WANG Shangquan^{1,2△} WEI Xu^{1,2} LIU Guangwei^{1,2}
WANG Xiaobo¹ WANG Wenxuan³ XIE Rui¹ HAN Tao¹ CHEN Ming¹ YIN Yuhui¹

¹Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

²Key Laboratory of Beijing of Chinese Medical Orthopaedic Technology, Beijing 100102, China;

³Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of salvianolic acid A on lumbar facet joint osteoarthritis caused by constant compression. **Methods:** In-vivo compression device was used to establish the constant compression model of rabbit spinal motion segment. 24 New Zealand white rabbits were randomly divided into controls, the load group, and the salvianolic acid group. The load group was given constant compression of 294 kPa at the lumbar 4/5 segment, and the salvianolic acid group was given an intraperitoneal injection of salvianolic acid A based on constant compression. On the 28th day after the operation, bilateral L₄/L₅ facets were harvested from each group. The articular cartilage was separated and stained with safranin and solid green. The apoptosis of chondrocytes was detected by flow cytometry. The expression of inflammatory factors of IL-1 β , TNF- α , IL-6 in synovial tissue was detected by qPCR and Western Blot. **Results:** The surface of the artic-

ular cartilage of lumbar facet joints was uneven with cracks in the load group. The surface of cartilage was relatively smooth in the salvianolic acid group, but the staining was not uniform. Chondrocytes in the load group were significantly apoptotic, while the salvianolic acid group decreased the proportion of apoptosis in the model ($P<0.05$). Compared with the model group, the mRNA and Western Blot expression levels of inflammatory factors IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in lumbar facet joint synovial tissue were significantly decreased ($P<0.05$) after the salvianolic acid intervention.

基金项目:中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项
(ZZ13-YQ-038)

国家体育总局中医特色技术在体育运动中的应用(HXKT2017001)

¹ 中国中医科学院望京医院(北京,100102)

² 中医正骨技术北京市重点实验室

³ 陕西中医药大学

△通信作者 E-mail:zhanjiawen12@126.com

Conclusion: Salvianolic acid A can alleviate the damage of lumbar facet articular cartilage caused by constant compression, inhibit chondrocyte apoptosis, and the expression of inflammatory factors in synovial tissue.

Keywords: lumbar facet joints; osteoarthritis; compression degeneration; salvianolic acid A

腰椎小关节骨性关节炎(Lumbar Facet Joint Osteoarthritis, LFJOA)是引起下腰痛的常见原因之一^[1]。针对本病的治疗目前多以消炎止痛为主^[2],但对退变小关节组织本身未能起到改善作用,新的生物学治疗目标是在抑制炎症反应的同时阻止或延缓关节退变,从而彻底缓解腰痛等临床症状^[3-4]。

前期笔者通过离体组织研究显示含有丹参水溶性成分的含药血清能够延缓腰椎运动节段组织退变^[5],进一步通过网络药理分析发现丹参水溶性入血成分丹酚酸 A (Salvianolic Acid A, SAA)能够多靶点治疗 LFJOA。最新研究已证实 SAA 能够显著延缓骨关节炎退变进程^[6],而 SAA 是否能在 LFJOA 的治疗中发挥效用需要进一步验证。

据此,本研究将通过已建立的在体加压模型^[7],观察丹酚酸 A 对 LFJOA 的干预作用,为进一步拓展该中药单体制剂的适应证与应用范围提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

4~6 个月龄健康新西兰兔 24 只,雌雄不限,2.5~3.0 kg 左右(中国中医科学院实验动物中心提供),根据随机数表法随机分 3 组,每组 8 只,即对照组、模型组、丹酚酸组。

1.2 模型建立与取材

在 Kroeber 等^[7]的造模方法基础上设计了在体加压装置,利用此装置建立了在体兔脊柱运动节段压力退变模型(见图 1)。建立过程为将实验兔背部备皮麻醉后将其固定于俯卧位,1.5 mm 直径克氏针在冠状面分别经皮横穿 L₄、L₅ 腰椎,在椎旁两侧做直切口显露克氏针,将加压装置通过连接杆套入克氏针,剪断克

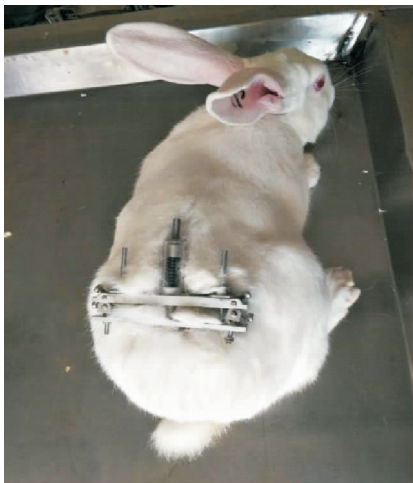


图 1 在体兔脊柱运动节段压力退变模型

氏针过长部分埋于肌肉内,分层缝合手术切口。在体外加压装置上安装弹簧,通过调节弹簧长度设定 294 kPa 压力。对照组:依次切开皮肤、皮下组织、深筋膜后,缝合切口。造模完成后,所有动物均饲养于室温、通风良好的环境中,自由进食、饮水。

丹酚酸组腹腔注射 40 mg/kg 丹酚酸 A(购于上海源叶生物科技有限公司, HPLC \geq 98%, CAS 号为 96574-01-5),之后每 2 d 注射 1 次,对照组与模型组注射等剂量生理盐水。第 28 天各组白兔麻醉处死后在无菌条件下,切取 L_{4~5} 小关节,分离关节软骨及滑膜组织进行指标检测。

1.3 关节软骨组织学变化

常规固定、脱钙、包埋,矢状位切片,采用番红/固绿染色法观察腰椎小关节内软骨组织变化,中性甲醛液固定组织,石蜡切片,常规脱水,封片置于显微镜下观察。

1.4 软骨组织内细胞凋亡情况

采用流式细胞术测定,配制胶原酶溶液,取小关节软骨放入至胶原酶溶液中,锡箔纸避光置于 37℃ 震荡摇床上,转速 300 r/min,40~60 min 可见组织几乎全部消化,离心(1 200 r/min,5 min)除去胶原酶,加入培养液,吹打混匀,筛网过滤,收集滤液,离心去上清,加入红细胞裂解液,冰上孵育,离心,去上清,加入 RPMI 1640 培养液,吹打混匀,离心,去上清液,加入不完全 RPMI 1640 培养液,得到软骨细胞悬液。Annexin V 和 7-AAD 染色取 10 μ L 血球计数板计数,加入 1 \times Binding buffer 重悬,调整细胞密度为 1 \times 10⁶ 个/mL。取 100 μ L 细胞悬液加入至 EP 管中,分别立即加入 Annexin V 和 7-AAD 进行染色,吹打混匀,室温避光孵育,再加入 200 μ L 1 \times Binding buffer,调整待检测细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL,流式细胞仪检测。

1.5 滑膜组织炎症因子基因表达情况

qPCR 法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 表达,收集各组滑膜组织,加入适量 Trizol 裂解液,将样品置于冰上以 30% 振幅超声,工作 3 s 后间歇暂停 2 s,每个样品累积超声约 30 s 左右。随后陆续以氯仿、异丙醇、酒精等试剂对总 RNA 进行提取,并测定 RNA 的浓度;用 RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,然后以 cDNA 第 1 链作为模板行 PCR 扩增。以 QuantiTect™ SYBR Green PCR 试剂盒进行 qPCR 反应,qPCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 20 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min。经 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行数据分析。

1.6 滑膜组织炎症因子蛋白表达情况

Western Blot 法检测法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的蛋白表达,加入适量裂解液,样品置于冰上超声,离心后吸取上层总蛋白溶液。BCA 法测定蛋白浓度,等量分装后上样缓冲液煮沸变性。SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜,5%BSA 封闭 1 h,相应一抗孵育过夜,TBST 洗膜,二抗孵育,TBST 洗膜,ECL 试剂检测蛋白表达,计算机图像分析仪测定灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布且方差齐性的数据采用单因素方

差分析,组间两两比较采用 LSD 检验;方差不齐的则采用其项下的 Dennett's T_3 检验。非正态分布数据采用非参数检验。

2 结果

2.1 组织学观察

番红固绿染色观察到对照组软骨表面光滑,软骨层次清楚,细胞分布较均匀,软骨基质染色全层均匀深染。模型组经加压后软骨表面不平整,出现裂隙,基质染色不均,深层细胞排列紊乱。丹酚酸组软骨表面相对光滑,深层有少量簇聚的软骨细胞,番红 O 染色欠均匀(见图 2)。

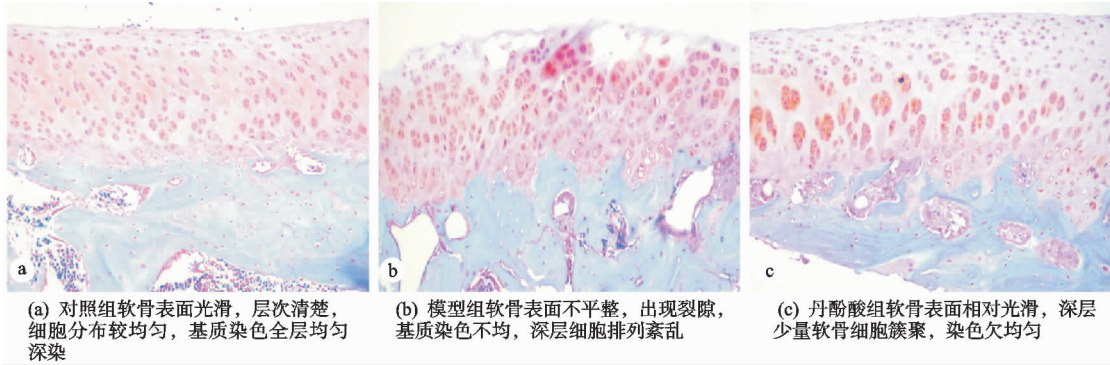


图 2 番红固绿染色检测腰椎小关节软骨的变化($\times 100$)

2.2 流式细胞术检测软骨细胞凋亡

结果表明与对照组比较,模型组细胞发生了显著

的凋亡,而丹酚酸组则明显下调了该模型中的凋亡比例,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3 及表 1。

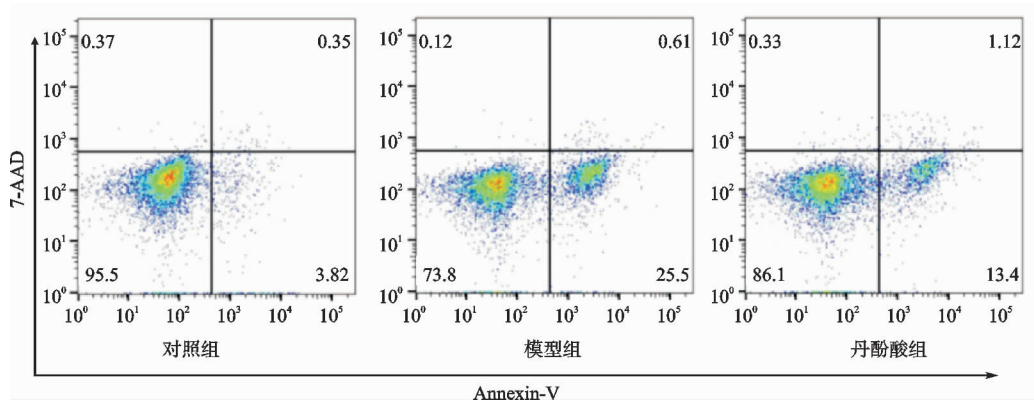


图 3 Annexin V / 7-AAD 双染流式细胞仪检测软骨细胞凋亡

表 1 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡率($\%$, $\bar{x}\pm s$, $n=4$)			
组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	3.63 \pm 1.41	0.41 \pm 0.66	4.04 \pm 1.04
模型组	27.42 \pm 2.27	0.83 \pm 1.02	28.25 \pm 1.65 ¹⁾
丹酚酸组	15.27 \pm 1.17	1.24 \pm 1.89	16.51 \pm 1.53 ¹⁾²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$; 2)与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 滑膜组织炎症因子 qPCR 检测

炎症因子基因表达情况发现,相比模型组,SAA 干预后,腰椎小关节滑膜组织中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 腰椎小关节滑膜组织内炎症因子基因表达($\bar{x}\pm s$, $n=4$)				
炎症因子	模型组	丹酚酸组	t	P
IL-1 β	0.985 \pm 0.094	0.336 \pm 0.051 ¹⁾	4.444	0.004
TNF- α	0.996 \pm 0.102	0.483 \pm 0.105 ²⁾	2.763	0.032
IL-6	0.998 \pm 0.052	0.424 \pm 0.099 ²⁾	3.415	0.025

注:与模型组比较, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$ 。

2.4 滑膜组织炎症因子 Western Blot 检测

炎症因子蛋白表达情况同样发现,经 SAA 干预后,腰椎小关节滑膜组织内炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。

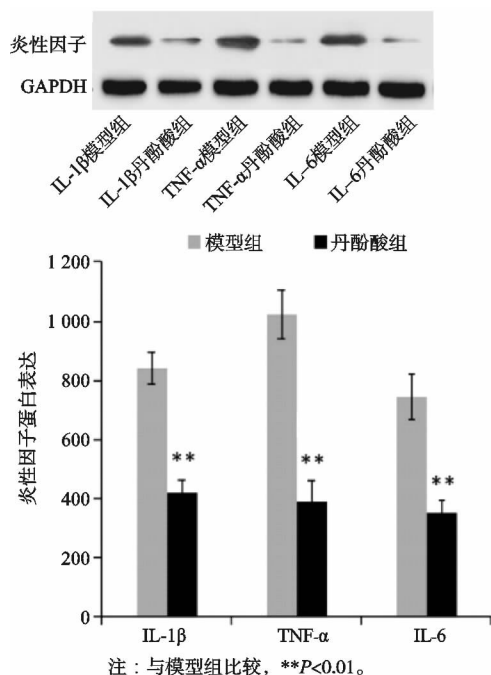


图4 Western Blot 检测腰椎小关节滑膜组织内炎症因子蛋白表达

3 讨论

腰椎小关节由双侧相邻椎体对应关节突组成。关节软骨覆盖其关节表面厚约 0.2 mm，关节囊、韧带等软组织包绕所形成的关节腔内含少量关节液。腰椎小关节属于典型的滑膜关节其退变与骨关节炎(Osteoarthritis, OA)的一般病理表现有相似之处，也以关节软骨的进行性退变、滑膜炎症和软骨及软骨下骨的结构改变为主要特征，可出现关节边缘与软骨下骨反应性增生^[8]。然而，由于生物力学的负重形式不同，小关节又具有自身特点。

腰椎小关节与椎间盘一同形成的三关节复合体结构是腰椎运动节段的重要关节^[9]，腰椎受到外伤或异常应力均可引起小关节的损伤和退行性改变。另一方面，椎间盘退变造成椎间高度逐渐降低，引起运动支点后移至小关节，导致共轭效应，使其所承受的应力明显增大^[10]。目前多数研究认为应力引发小关节内的炎症反应是造成关节退变与产生 LFJOA 的重要发病基础^[11-13]。因此，本研究采用一种应力退变模型研究小关节的软骨病理变化以及滑膜炎性因子表达。

有关 LFJOA 的动物模型多以小关节腔内注射生物制剂建立，如 Yeh 等^[14]在 SD 大鼠小关节内注射胶原酶，Gong 等^[15]采用注射碘乙酸钠造模，Shuang 等^[16]的研究显示注射弗氏完全佐剂可使小关节内炎症因子显著上调，但注射尿酸酶^[17]会严重破坏软骨组织。采用关节腔注射生物制剂能够快速建立类似 OA 的小关节动物模型，但难以观察生物力学与运动力学对小关节的影响。作为三关节复合体结构的一部分，

异常应力与 LFJOA 的发生有很大联系，因此相关应力模型对研究 LFJOA 有着重要作用。张继业等^[18]应用小关节加载拉簧建立了高应力兔 LFJOA 模型。前期本团队设计了一种作用在兔脊柱运动节段上的在体加压装置，该装置设计有螺纹调节部件，可实现对脊柱运动节段轴向应力的个性化加载，并利用自锁特性，实现对加载负荷的稳定维持。前期笔者利用该模型初步观察了持续应力对脊柱运动节段的影响，通过比较显示加压 28 d 后可造成加压节段双侧腰椎小关节明显退变，本研究进一步利用该模型研究中医药对退变小关节的干预作用。

LFJOA 所导致的下腰痛属于祖国医学“痹病”的范畴，目前临床治疗本病的方法以保守治疗为主，包括有口服非甾体抗炎药物、理疗、按摩和针灸等。但对退变小关节组织本身未能起到改善作用，新的生物学治疗目标是在抑制炎症反应的同时阻止或延缓关节退变，促进组织修复，重新建立关节的生物力学性能，从而彻底缓解腰痛等临床症状^[3-4]。祖国医学治疗此类疾病具有丰富的经验，前期笔者临床研究中应用补肾活血方治疗下腰痛类相关疾病取得了较好疗效，可显著缓解患者的疼痛症状。通过离体实验证实本方中的活血药物“丹参”在本方延缓组织退变的过程中发挥了重要作用^[19-20]。《明理论载》言：“一味丹参，功兼四物”，其具有祛瘀止痛、活血通经等功效，是中药学中应用较广、价值较高的药物之一^[21-22]。随着对丹参化学成分及药理作用与临床研究的广泛深入，鉴定出丹参中包括脂溶性以及水溶性成分共约 30 余种^[23]。笔者前期研究结果显示含有丹参水溶性成分的含药血清能够延缓腰椎运动节段组织退变^[5]。

前期通过网络药理学分析显示，丹参中的主要水溶性入血成分丹酚酸 A 能够从多靶点治疗 LFJOA (见图 1)。SAA 属酚酸类化合物，分子量及分子式分别为 94.447 和 $C_{26}H_{22}O_{10}$ 。由于 SAA 显著的抗氧化、抗缺血、抗纤维化等药理活性^[24-27]，多年以来一直是医药研究的热点。最新研究证实 SAA 能够治疗骨关节炎^[6]可通过下调 NF-κB 和 p38/MAPK 信号通路发挥对 OA 软骨细胞的抗炎作用^[28]。据此，笔者通过本研究中的在体实验观察了 SAA 对 LFJOA 的干预作用。

结果表明经 SAA 干预后可显著提高小关节软骨细胞数量，能够缓解持续压力对软骨造成的损伤程度，并且可显著降低滑膜组织中的炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 等的表达。这些结果提示丹酚酸 A 能够起到抑制小关节软骨细胞凋亡与滑膜炎反应的协同干预作用，缓解 LFJOA 的发生发展。相关研究已发现丹酚酸 A 在体内多系统中有显著的抑制细胞

凋亡与炎症作用,例如丹酚酸 A 可通过调节 Bcl-2/Bax 和 Caspase-3 信号通路抑制肝细胞凋亡^[29],还可以通过激活 Nrf2/HO-1 通路减少小肠隐窝上皮细胞凋亡数量^[30],在缺血心肌细胞中 SAA 通过调控 P13K/Akt 信号途径抑制炎症因子的生成^[31],而 SAA 抑制软骨细胞凋亡与滑膜炎症反应的机制需要进一步探索。

下一步将从基因表达、细胞信号传导通路以及蛋白修饰等方面深入探究丹酚酸 A 治疗 LFJOA 的作用机制,为进一步拓展丹参单体制剂的适应证与应用范围提供依据,并为其临床开发与应用奠定基础。

参考文献

- [1] BERESFORD Z M, KENDALL R W, WILLICK S E. Lumbar facet syndromes[J]. Current Sports Medicine Reports, 2010, 9(1): 50-56.
- [2] MOBASHERI A. Intersection of inflammation and herbal medicine in the treatment of osteoarthritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2010, 14(6): 604-616.
- [3] CHOU R, HUFFMAN L H, SOCIETY A P, et al. Non-pharmacologic therapies for acute and chronic low back pain; a review of the evidence for an american pain society/American college of physicians clinical practice guideline[J]. Annals of Internal Medicine, 2007, 147(7): 492-504.
- [4] AITKEN D, JONES G, WINZENBERG T. Clinical overview of osteoarthritis (OA) and the challenges faced for future management [C]//Encyclopedia of Biomedical Gerontology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 420-430.
- [5] 展嘉文, 朱立国, 冯敏山, 等. 丹参注射液含药血清对离体培养兔脊柱运动节段椎间盘的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1834-1837.
- [6] WU Y, WANG Z, LIN Z, et al. Salvianolic acid A has anti-osteoarthritis effect in vitro and in vivo[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 682.
- [7] KROEBER M W, UNGLAUB F, WANG H, et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2002, 27(23): 2684.
- [8] KALICHMAN L, HUNTER D J. Lumbar facet joint osteoarthritis: a review[J]. Seminars in Arthritis & Rheumatism, 2008, 37(2): 69-80.
- [9] ADAMS M A, HUTTON W C. The mechanical function of the lumbar apophyseal joints[J]. Spine, 1983, 8(3): 327-330.
- [10] PARK W M, KIM K, KIM Y H. Effects of degenerated intervertebral discs on intersegmental rotations, intradiscal pressures, and facet joint forces of the whole lumbar spine[J]. Computers in Biology & Medicine, 2013, 43(9):

- 1234-1240.
- [11] NAKAMURA A, RAMPERSAUD Y R, SHARMA A, et al. Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration[J]. JCI Insight, 2016, 1(12): e86820.
- [12] 殷刚, 邱勇. 腰椎小关节骨性关节炎危险因素的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 17(13): 995-997.
- [13] XU D, SUN Y, BAO G, et al. MMP-1 overexpression induced by IL-1 β : possible mechanism for inflammation in degenerative lumbar facet joint[J]. J Orthop Sci, 2013, 18(6): 1012-1019.
- [14] YE H T T, WEH Z H, LEE H S, et al. Intra-articular injection of collagenase induced experimental osteoarthritis of the lumbar facet joint in rats[J]. European Spine Journal, 2008, 17(5): 734-742.
- [15] GONG K, SHAO W, CHEN H, et al. Rat model of lumbar facet joint osteoarthritis associated with facet-mediated mechanical hyperalgesia induced by intra-articular injection of monosodium iodoacetate[J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2011, 110(3): 145-152.
- [16] SHUANG F, ZHU J, SONG K, et al. Establishment of a rat model of adjuvant-induced osteoarthritis of the lumbar facet joint[J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2014, 70(3): 1545-1551.
- [17] SHUANG F, HOU S X, ZHU J L, et al. Establishment of a rat model of lumbar facet joint osteoarthritis using intraarticular injection of urinary plasminogen activator[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9828.
- [18] 张继业, 王吉兴, 张斌, 等. 高应力导致兔腰椎小关节骨性关节炎的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(10): 853-859.
- [19] 朱立国, 展嘉文, 冯敏山, 等. 补肾活血方治疗椎间盘源性腰痛的临床观察[J]. 世界中医药, 2017, 12(3): 554-557.
- [20] 韩涛, 朱立国, 展嘉文, 等. 补肾活血中药治疗下腰痛疗效 Meta 分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 127-130.
- [21] 刘慧, 开金龙. 丹参的现代研究进展[J]. 甘肃中医, 2010, 23(2): 70-72.
- [22] 赵仁霞. 丹参的现代药理研究及临床应用[J]. 中国医药指南, 2011, 9(12): 291-292.
- [23] 曹金仪. 丹参的化学成分及临床用途[J]. 中国医药指南, 2012, 10(29): 53-55.
- [24] FAN H Y, FU F H, YANG M Y, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A[J]. Thrombosis Research, 2010, 126(1): e17-e22.
- [25] LIU C H, HU Y Y, WANG X L, et al. Effectsof salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression[J]. World Journal of Gastroenterology, 2000, 6(3): 361-364.