

## • 实验研究 •

## 梓醇对类风湿性关节炎大鼠软骨损伤的影响

尹伟<sup>1</sup> 杨立峰<sup>1</sup> 于洋<sup>1</sup> 宋永财<sup>1</sup> 黄军刚<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探究梓醇(Cat)对类风湿性关节炎(RA)大鼠软骨损伤的影响。方法:注射不完全弗氏佐剂鸡Ⅱ型胶原蛋白以建立类风湿性关节炎大鼠模型,将大鼠随机分为假手术组、模型组、梓醇低剂量(Cat-L)组、梓醇高剂量(Cat-H)组、Cat-H+Dorsomorphin(AMPK抑制剂)组。评估关节炎指数;ELISA法检测血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II水平;HE染色观察软骨组织形态;TUNEL检测大鼠软骨肿胀细胞凋亡;检测软骨组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性;Western Blot检测关节软骨组织Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、AMPK、NLRP3蛋白表达。结果:治疗结束后,与假手术组相比,模型组大鼠软骨组织明显被破坏,伴有软骨脱落;关节炎指数评分,血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II水平,软骨组织细胞凋亡率,丙二醛含量,Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、NLRP3蛋白表达水平显著升高,软骨组织过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性、AMPK蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组相比,梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠软骨组织形态有明显改善,关节炎指数评分、血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II水平,软骨组织细胞凋亡率,丙二醛含量,Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、NLRP3蛋白表达水平显著降低,软骨组织过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性、AMPK蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Dorsomorphin可减弱梓醇对类风湿性关节炎大鼠软骨的保护作用,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:梓醇可能通过调节AMPK/NLRP3信号通路降低类风湿性关节炎大鼠炎症、氧化应激反应和软骨细胞凋亡,减轻软骨损伤。

**[关键词]** 梓醇;类风湿性关节炎;软骨损伤;凋亡

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)11-0005-06

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.241102

## Effect of Catalpol on Cartilage Damage in Rheumatoid Arthritis Rats

YIN Wei<sup>1</sup> YANG Lifeng<sup>1</sup> YU Yang<sup>1</sup> SONG Yongcai<sup>1</sup> HUANG Jungang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>3201 Hospital, Hanzhong 723000, Shaanxi China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of catalpol (Cat) on cartilage damage in rats with rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** Incomplete Freund's adjuvant chicken type II collagen was injected to rats to establish RA model. The rats were randomly separated into sham group, model group, Cat-L low-dose group, Cat-H high-dose group, and Cat-H+Dorsomorphin (AMPK inhibitor) group. The arthritis index was evaluated. ELISA method was applied to detect serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CTX-I, and CTX-II. HE staining was applied to observe the morphology of cartilage tissue. TUNEL was applied to detect apoptosis of rat cartilage swelling cells. The MDA content, SOD and CAT activities of cartilage tissue were detected. Western Blot was applied to detect the expression of Cleaved-caspase-3, MMP-3, MMP-13, AMPK, and NLRP3 proteins in articular cartilage tissue. **Results:** After treatment, compared with the sham group, the cartilage tissue of rats in the model group was greatly damaged, accompanied by cartilage detachment; the arthritis index score, levels of serum IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CTX-I, CTX-II, chondrocyte apoptosis rate, content of MDA, and expression levels of Cleaved-caspase-3, MMP-3, MMP-13, and NLRP3 proteins were greatly increased; the activities of CAT and SOD in cartilage tissue, and the expression level of AMPK protein were greatly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, there was a great improvement in the morphology of cartilage tissue of rats in the Cat-L and Cat-H groups; the arthritis index score, levels of serum IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CTX-I, CTX-II, chondrocyte apoptosis rate, content of

<sup>1</sup> 三二〇一医院(陕西 汉中, 723000)

MDA, and expression levels of Cleaved-caspase-3, MMP-3, MMP-13, and NLRP3 proteins in the Cat-L and Cat-H groups were greatly reduced; the activities of CAT and SOD in cartilage tissue, and the expression level of AMPK protein were in the Cat-L and Cat-H groups greatly increased ( $P < 0.05$ ). Dorsomorphin can weaken the protective effect of Cat on the cartilage of RA rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Cat may reduce inflammation, oxidative stress, and chondrocyte apoptosis in RA rats and alleviate cartilage damage by regulating the AMPK/NLRP3 signaling pathway.

**Keywords:** catalpol; rheumatoid arthritis; cartilage injury; apoptosis

类风湿关节炎(RA)是一种以慢性关节滑膜炎症为主要特征的自身免疫性疾病,患者关节滑膜组织异常增生,侵袭关节软骨,造成关节软骨及骨破坏,最终导致关节功能丧失<sup>[1-2]</sup>。目前临床上主要用甲氨蝶呤和抗炎类药物来控制炎症,抑制骨质破坏和缓解病情,且存在较大的副作用<sup>[3]</sup>。梓醇(Cat)具有保护软骨的作用<sup>[4]</sup>,梓醇可降低软骨细胞损伤,改善类风湿关节炎小鼠 Th17 细胞比例和炎症因子<sup>[5-6]</sup>。本研究通过建立类风湿关节炎大鼠模型探讨梓醇是否可改善类风湿关节炎大鼠软骨损伤,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 180~200 g 的 SD 雄性大鼠 60 只(中山大学),生产许可证号为 SCXK(粤)2024-0072。

### 1.2 实验试剂

梓醇购自上海必宝生物科技有限公司;AMPK 抑制剂 Dorsomorphin 购自美国 MCE 公司;IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II, ELISA、MDA、SOD 和 CAT 试剂盒购自上海甄准生物科技有限公司;HE 染色试剂、TUNEL 试剂盒、BCA 试剂盒购自上海名劲生物科技有限公司;Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、p-AMPK、AMPK、NLRP3、 $\beta$ -actin 一抗及二抗均购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 分组造模与给药** 取 50 只 SD 大鼠进行类风湿性关节炎造模,将 10 mg II 型胶原蛋白与 4  $^{\circ}$ C 的 0.05 mmol/L 乙酸溶液混合定溶为 5 mL,之后再加入 5 mL 不完全弗氏佐剂,得混合乳液。将 0.1 mL 该溶液皮下注射于各组大鼠尾根部处,进行初次免疫,7 d 后进行第二次注射免疫建立类风湿性关节炎模型,造模成功标志为四肢及尾部红肿<sup>[7]</sup>。造模成功 42 只,选取造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组、梓醇低剂量(Cat-L)组、梓醇高剂量(Cat-H)组、Cat-H + Dorsomorphin 组,每组 10 只。另取 10 只作为假手术组,同方式注射生理盐水。

给药处理:梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠分别管饲法给予 15 mg/kg 和 30 mg/kg<sup>[6]</sup> 的梓醇, Cat-H + Dorsomorphin 组管饲法给予 30 mg/kg 的梓醇并静脉注射 0.2 mg/kg 的 Dorsomorphin<sup>[8]</sup>。假手

术组和模型组同方式给予等体积生理盐水,1 d/次,给药 4 周。

**1.3.2 关节炎指数评分** 根据文献<sup>[7]</sup>进行关节炎指数评分:0 分为踝关节、小趾关节无红肿;1 分为小趾关节有轻微红肿;2 分为足趾及小趾关节均有红肿;3 分为足趾全部红肿;4 分为全部足爪红肿甚至变形;四肢评分总和记为总分。

**1.3.3 标本采集** 麻醉大鼠后腹主动脉取血 3 mL 待测,处死大鼠取大鼠踝关节软骨组织待测。

**1.3.4 ELISA 法检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II 水平** 将大鼠新鲜血液于 4  $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,根据酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书要求加入反应试剂,然后加入终止试剂和显色试剂,酶标仪检测吸光度值,根据标线计算 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II 水平。

**1.3.5 HE 染色观察大鼠软骨组织形态** 用 4% 多聚甲醛中固定踝关节软骨组织,脱钙处理,石蜡包埋后切片,脱水脱蜡后进行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察踝关节软骨组织形态。

**1.3.6 TUNEL 染色法检测大鼠软骨组织细胞凋亡** 取固定软骨组织,经脱水、石蜡包埋、切片,根据 TUNEL 试剂盒说明书要求进行染色,细胞凋亡率 = (TUNEL 阳性细胞数/总细胞数)  $\times$  100%。

**1.3.7 检测软骨组织中丙二醛含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性** 定量称取大鼠软骨组织,于 4  $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 10 min,取上清按照试剂盒说明书加入反应试剂盒显色试剂,紫外分光光度计检测吸光度值,计算丙二醛含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性。

**1.3.8 Western Blot 检测软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、AMPK、NLRP3 蛋白表达** 定量称取软骨组织,裂解提取总蛋白并定量检测,热水浴将蛋白变性后进行电泳,转至 PVDF 膜,封闭 2 h,加入 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、p-AMPK、AMPK、NLRP3、 $\beta$ -actin 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,清洗后用二抗孵育 2 h,化学发光(ECL)显色,Image-Pro Plus 软件分析蛋白灰度值。

## 1.4 统计学方法

用 GraphPad Prism 8.0.1 分析数据,计量资料用

$\bar{x}\pm s$  形式表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较用 SNK- $q$  检验; $P<0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 梓醇对各组大鼠关节炎指数评分的影响

造模后,造模大鼠关节炎指数评分比假手术组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),各造模组大鼠关节炎指数评分差异无统计学意义( $P>0.05$ );治疗后,模型组大鼠关节炎指数评分比假手术组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠关节炎指数评分比模型组低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠关节炎指数评分比梓醇高剂量组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

2.2 梓醇对各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II 水平的影响

表 2 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II 水平比较( $n=10,\bar{x}\pm s,\text{pg/mL}$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	CTX-I	CTX-II
假手术组	19.62 $\pm$ 2.45	6.57 $\pm$ 0.86	26.83 $\pm$ 2.74	10.85 $\pm$ 1.62	7.86 $\pm$ 1.13
模型组	63.84 $\pm$ 7.23 <sup>1)</sup>	35.72 $\pm$ 3.94 <sup>1)</sup>	89.36 $\pm$ 9.42 <sup>1)</sup>	29.46 $\pm$ 3.57 <sup>1)</sup>	19.73 $\pm$ 2.26 <sup>1)</sup>
梓醇低剂量组	47.31 $\pm$ 5.18 <sup>2)</sup>	23.48 $\pm$ 2.48 <sup>2)</sup>	67.58 $\pm$ 7.39 <sup>2)</sup>	22.39 $\pm$ 3.18 <sup>2)</sup>	15.42 $\pm$ 1.87 <sup>2)</sup>
梓醇高剂量组	31.53 $\pm$ 3.67 <sup>2)3)</sup>	12.36 $\pm$ 1.51 <sup>2)3)</sup>	43.29 $\pm$ 5.16 <sup>2)3)</sup>	15.12 $\pm$ 1.93 <sup>2)3)</sup>	10.94 $\pm$ 1.48 <sup>2)3)</sup>
Cat-H+Dorsomorphin 组	49.78 $\pm$ 5.84 <sup>4)</sup>	26.92 $\pm$ 3.27 <sup>4)</sup>	71.43 $\pm$ 8.57 <sup>4)</sup>	24.67 $\pm$ 3.25 <sup>4)</sup>	16.58 $\pm$ 1.82 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与梓醇低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与梓醇高剂量组比, $P<0.05$ 。

2.3 梓醇对各组大鼠软骨组织形态的影响

由图 1 可知,假手术组大鼠软骨无明显变性和破坏;模型组大鼠软骨有明显破坏,伴有软骨脱落和大量炎性细胞浸润,滑膜增厚且存在纤维化现象;梓醇低剂

模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CTX-I、CTX-II 水平比假手术组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠血清上述因子水平低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠血清上述因子水平高于梓醇高剂量组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 1 梓醇对各组大鼠关节炎指数评分的影响( $n=10,\bar{x}\pm s,\text{分}$ )

组别	造模后	治疗后
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	15.32 $\pm$ 1.71 <sup>1)</sup>	14.75 $\pm$ 1.46 <sup>1)</sup>
梓醇低剂量组	15.18 $\pm$ 1.62 <sup>1)</sup>	8.94 $\pm$ 0.93 <sup>2)</sup>
梓醇高剂量组	14.93 $\pm$ 1.74 <sup>1)</sup>	4.62 $\pm$ 0.37 <sup>2)3)</sup>
Cat-H+Dorsomorphin 组	15.26 $\pm$ 1.68 <sup>1)</sup>	9.37 $\pm$ 1.14 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与梓醇低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与梓醇高剂量组比, $P<0.05$ 。

量组和梓醇高剂量组大鼠软骨组织形态有明显改善;Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠相比于梓醇高剂量组软骨组织损伤程度明显加重。

2.4 梓醇对各组大鼠软骨组织细胞凋亡的影响

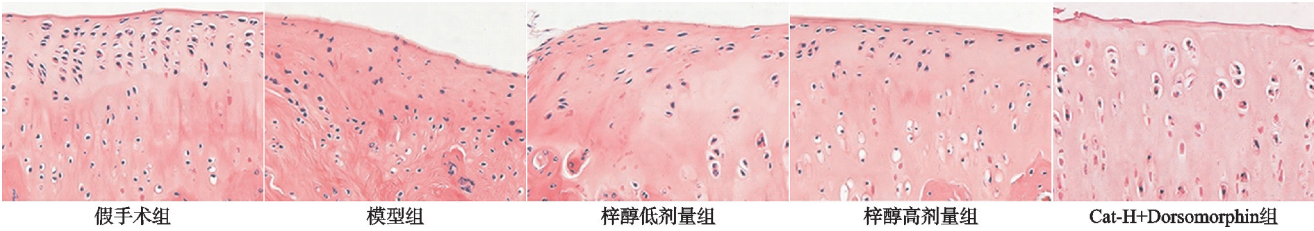


图 1 HE 染色观察大鼠软骨组织形态( $\times 400$ )

模型组大鼠软骨组织细胞凋亡率比假手术组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠软骨组织细胞凋亡率低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠软骨组织细胞凋亡率高于梓醇高剂量组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3 和图 2。

2.5 梓醇对各组大鼠软骨组织丙二醛含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响

模型组大鼠软骨组织丙二醛含量高于假手术组,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性低于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );梓醇低剂量组和梓醇高

剂量组大鼠软骨组织丙二醛含量低于模型组,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠软骨

表 3 梓醇对各组大鼠软骨组织细胞凋亡的影响( $n=10,\bar{x}\pm s$ )

组别	凋亡率/%
假手术组	1.14 $\pm$ 0.13
模型组	21.56 $\pm$ 2.47 <sup>1)</sup>
梓醇低剂量组	15.73 $\pm$ 1.86 <sup>2)</sup>
梓醇高剂量组	7.28 $\pm$ 0.94 <sup>2)3)</sup>
Cat-H+Dorsomorphin 组	17.12 $\pm$ 2.08 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与梓醇低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与梓醇高剂量组比, $P<0.05$ 。



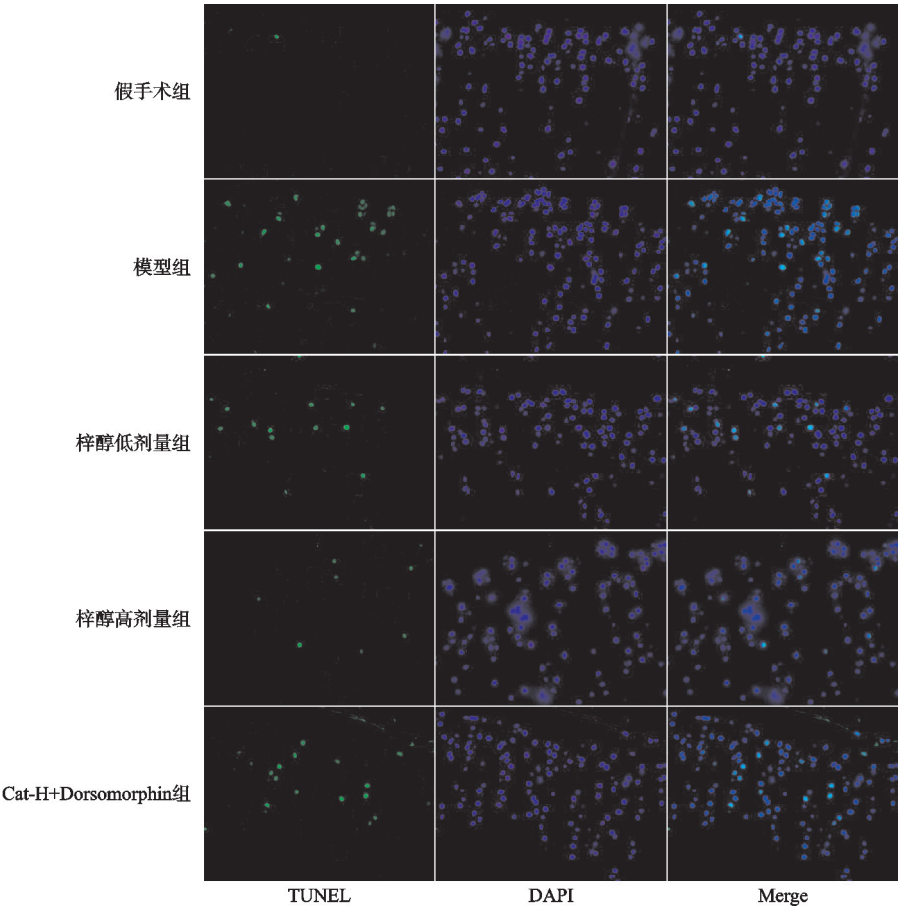


图2 TUNEL染色观察大鼠软骨组织细胞凋亡(×400)

骨组织丙二醛含量高于梓醇高剂量组,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性低于梓醇高剂量组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表4。

2.6 梓醇对各组大鼠软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、AMPK、NLRP3 蛋白表达的影响

表4 梓醇对大鼠软骨组织丙二醛含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	丙二醛/(nmol · mg <sup>-1</sup> )	超氧化物歧化酶/(U · mg <sup>-1</sup> )	过氧化氢酶/(U · mg <sup>-1</sup> )
假手术组	1.53±0.21	74.39±8.57	89.46±11.73
模型组	6.81±0.94 <sup>1)</sup>	15.67±1.86 <sup>1)</sup>	24.92±3.28 <sup>1)</sup>
梓醇低剂量组	4.95±0.63 <sup>2)</sup>	36.58±4.43 <sup>2)</sup>	45.53±5.86 <sup>2)</sup>
梓醇高剂量组	2.68±0.32 <sup>2)3)</sup>	59.82±6.35 <sup>2)3)</sup>	68.74±8.32 <sup>2)3)</sup>
Cat-H+Dorsomorphin组	5.29±0.78 <sup>4)</sup>	32.16±4.72 <sup>4)</sup>	41.37±5.49 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与梓醇低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与梓醇高剂量组比, $P<0.05$ 。

模型组大鼠软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、NLRP3 蛋白表达水平高于假手术组,AMPK 蛋白表达水平低于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );梓醇低剂量组和梓醇高剂量组大鼠软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、NLRP3 蛋白表达水平低于模型组,AMPK 蛋白表达水平高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Cat-H+Dorsomorphin 组大鼠软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、NLRP3 蛋白表达水平高于梓醇高剂量组,AMPK 蛋白表达水平低于梓醇高剂量组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图3和表5。

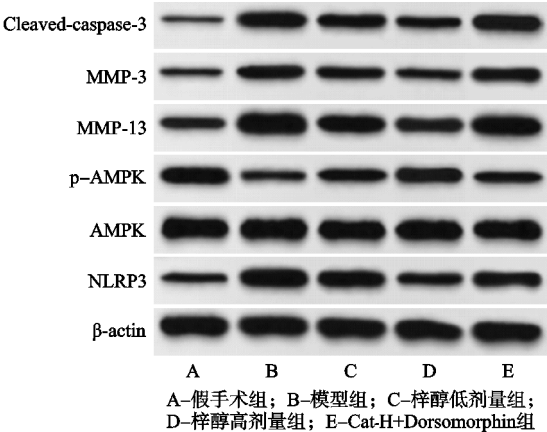


图3 各组大鼠软骨组织 Cleaved-caspase-3、MMP-3、MMP-13、AMPK、NLRP3 蛋白表达

表 5 各组大鼠踝关节软骨组织中相关蛋白表达比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

分组	Cleaved-caspase-3	MMP-3	MMP-13	p-AMPK/AMPK	NLRP3
假手术组	0.26±0.07	0.27±0.02	0.52±0.07	0.93±0.12	0.41±0.05
模型组	0.85±0.10 <sup>1)</sup>	0.74±0.06 <sup>1)</sup>	1.18±0.14 <sup>1)</sup>	0.34±0.05 <sup>1)</sup>	1.06±0.12 <sup>1)</sup>
梓醇低剂量组	0.67±0.07 <sup>2)</sup>	0.56±0.05 <sup>2)</sup>	0.94±0.11 <sup>2)</sup>	0.51±0.07 <sup>2)</sup>	0.84±0.10 <sup>2)</sup>
梓醇高剂量组	0.48±0.06 <sup>2)3)</sup>	0.41±0.03 <sup>2)3)</sup>	0.71±0.09 <sup>2)3)</sup>	0.72±0.09 <sup>2)3)</sup>	0.58±0.07 <sup>2)3)</sup>
Cat-H+Dorsomorphin 组	0.73±0.08 <sup>4)</sup>	0.63±0.05 <sup>4)</sup>	0.98±0.12 <sup>4)</sup>	0.46±0.07 <sup>4)</sup>	0.89±0.11 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与梓醇低剂量组比, $P<0.05$ ;4)与梓醇高剂量组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

类风湿性关节炎是一种慢性全身炎症免疫疾病,主要特征是炎症细胞渗透到滑液中,引起滑膜持续炎症和增生,进而侵蚀关节软骨和关节骨骼,引起关节畸形和关节功能丧失,最终导致患者残疾,严重影响患者生活自理能力<sup>[9]</sup>。类风湿性关节炎多发于中老年人,我国类风湿性关节炎发病率约为 0.42%,患病人数达到 500 万,随着我国老龄化人口的加剧,发病率也呈逐渐升高趋势<sup>[10]</sup>。目前类风湿性关节炎的发病机制尚不清楚,也无治愈类风湿性关节炎的特效药物。中药因其低毒副作用而逐渐成为研究热点,梓醇是一种从中药地黄根中分离出来的活性物质,具有抗炎、抗氧化、降血糖、保护神经的作用<sup>[11]</sup>。Zeng 等<sup>[11]</sup>研究显示梓醇可抑制炎症信号通路,降低 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞炎症因子产生,改善软骨退化。Meng 等<sup>[12]</sup>研究表明梓醇可抑制破骨细胞活性,降低小鼠炎症和骨质流失。推测梓醇具有降低骨关节炎的功效。

类风湿关节炎是一种关节滑膜慢性炎症性疾病,炎症细胞刺激关节软骨与周围组织,多关节软骨组织造成炎性损伤,损害软骨结构和功能。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  是由炎性细胞分泌的炎性因子,是滑膜炎症和软骨损伤的关键致病因子,可造成组织和细胞炎性损伤<sup>[13]</sup>;CTX-I、CTX-II 胶原蛋白是软骨的主要有机成分,也是判断骨关节炎病变的重要指标,软骨降解后,CTX-I、CTX-II 被释放进入血液,其血液中水平可反映软骨降解情况<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,类风湿性关节炎大鼠血清炎症因子、CTX-I、CTX-II 水平显著升高,表明类风湿性关节炎引起大鼠炎症反应和软骨组织降解。梓醇治疗后可显著降低炎症因子水平和 CTX-I、CTX-II 水平,减轻软骨损伤。炎症发生后可引起细胞内环境稳态发生变化,增加氧自由基和活性氧聚集,引起氧化应激损伤<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,梓醇可降低大鼠丙二醛含量,提高抗氧化酶超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性,减轻氧化应激反应。基质金属蛋白酶具有降解软骨基质的功能,MMP-3 可以降解细胞外基底膜成分,破坏骨和关节软骨结构,还可激活 MMP-13 形成级联放大效应,降解关节软骨基质中多糖蛋白和Ⅲ型胶原,促进软骨损伤。MMP-13 是一种

Ⅱ型胶原降解酶,可降解Ⅱ型胶原蛋白,破坏关节软骨结构,促进关节炎发展;类风湿性关节炎可引起软骨组织细胞凋亡,Cleaved-caspase-3 为细胞凋亡蛋白,可激活细胞凋亡级联反应,促进细胞凋亡<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,梓醇可降低类风湿性关节炎大鼠软骨组织中 Cleaved-caspase-3、MMP-3 和 MMP-13 蛋白表达,减轻软骨组织细胞凋亡和损伤。通过 TUNEL 染色进一步证实梓醇可减轻软骨组织细胞凋亡。软骨组织损伤后,软骨组织被破坏,软骨功能丧失,本研究通过 HE 染色发现梓醇治疗后,软骨组织损伤程度显著降低,软骨形态有明显改善,提示梓醇可能降低类风湿性关节炎大鼠炎症、氧化应激反应和软骨细胞凋亡,减轻软骨损伤。

AMPK 是细胞能量平衡的主要传感器,可调节细胞碳水化合物和脂肪代谢,促进三磷酸腺苷(ATP)生成,研究显示激活 AMPK 可减轻内质网应激反应,调节线粒体稳态来抑制 NLRP3 炎症小体激活,减轻炎症因子引起的炎性损伤<sup>[15]</sup>。Guo 等<sup>[16]</sup>研究显示 NLRP3 炎症小体在类风湿性关节炎小鼠体内高表达,靶向抑制 NLRP3 炎症小体可改善类风湿性关节炎。Chen 等<sup>[17]</sup>研究表明 NLRP3 炎症小体可促进类风湿性关节炎及其并发症的发生发展。本研究结果显示,类风湿性关节炎大鼠软骨组织中 AMPK 蛋白低表达,NLRP3 蛋白高表达,梓醇治疗后可显著提高 AMPK 蛋白表达,降低 NLRP3 蛋白表达,激活 AMPK 信号通路。为进一步验证梓醇的作用靶点,本研究在梓醇治疗基础上用 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin 进行干预,结果显示 Dorsomorphin 可部分逆转梓醇对类风湿性关节炎大鼠软骨的保护作用,提示梓醇对类风湿性关节炎大鼠软骨的改善作用可能是通过激活 AMPK 信号通路实现的。

综上所述,梓醇可能通过调节 AMPK/NLRP3 信号通路降低类风湿性关节炎大鼠炎症和软骨细胞凋亡,改善大鼠软骨损伤。类风湿性关节炎发生机制复杂,梓醇在动物体内作用靶点较多,梓醇改善类风湿性关节炎的具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

[1] CAO Y,YANG Y,HU Q,et al. Identification of potential

- drug targets for rheumatoid arthritis from genetic insights: a mendelian randomization study[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 616-628.
- [2] KIM Y, YANG H I, KIM K S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis-interstitial lung disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14509-14521.
- [3] DWIVEDI S D, YADAV K, BHOI A, et al. Targeting pathways and integrated approaches to treat rheumatoid arthritis[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2024, 41(4): 87-102.
- [4] ZHANG M, QIANG Y. Catalpol ameliorates inflammation and oxidative stress via regulating Sirt1 and activating Nrf2/HO-1 signaling against acute kidney injury[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(9): 2182-2191.
- [5] CAI C, SUN P, CHEN Z, et al. Catalpol protects mouse ATDC5 chondrocytes against interleukin-1 $\beta$ -induced catabolism[J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(3): 333-344.
- [6] DI Y, ZHANG M, CHEN Y, et al. Catalpol inhibits tregs-to-Th17 cell transdifferentiation by up-regulating let-7g-5p to reduce STAT3 protein levels[J]. *Yonsei Med J*, 2022, 63(1): 56-65.
- [7] 李光淳, 李高峰, 张兆琦, 等. 枸杞多糖对类风湿关节炎大鼠炎症反应及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(5): 1119-1124.
- [8] 马蒂达, 吴洋, 王显, 等. 桃叶珊瑚苷通过 AMPK/NLRP3 通路对心肌梗死大鼠心功能的影响及机制[J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(7): 773-780.
- [9] YAMADA S, NAGAFUCHI Y, FUJIO K. Pathophysiology and stratification of treatment-resistant rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Med*, 2024, 47(1): 12-23.
- [10] SALEHI S, MAHMOUDINEZHAD DEZFOULI S M, AZADEH H, et al. Immune dysregulation and pathogenic pathways mediated by common infections in rheumatoid arthritis[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2023, 68(3): 325-335.
- [11] ZENG Y F, WANG R, BIAN Y, et al. Catalpol attenuates IL-1 $\beta$  induced matrix catabolism, apoptosis and inflammation in rat chondrocytes and inhibits cartilage degeneration[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(3): 6649-6659.
- [12] MENG J, ZHANG W, WANG C, et al. Catalpol suppresses osteoclastogenesis and attenuates osteoclast-derived bone resorption by modulating PTEN activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 171(3): 113715-113726.
- [13] JIA Y, FENG B, JI X, et al. Complement factor H attenuates TNF- $\alpha$ -induced inflammation by upregulating EIF3C in rheumatoid arthritis[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 846-857.
- [14] 王永涛, 谢一舟, 樊效鸿, 等. 加味当归四逆汤对膝关节关节炎大鼠软骨退变的影响及作用机制研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2022, 30(11): 7-12.
- [15] MA C, WANG X, XU T, et al. Qingkailing injection ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury and modulates the AMPK/NLRP3 inflammasome signalling pathway[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 320-321.
- [16] GUO C, FU R, WANG S, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 194(2): 231-243.
- [17] CHEN P K, TANG K T, CHEN D Y. The NLRP3 inflammasome as a pathogenic player showing therapeutic potential in rheumatoid arthritis and its comorbidities: a narrative review[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1): 626-638.

(收稿日期: 2024-05-12)

(上接第 4 页)

- [16] 任树军, 梁彦林, 王塘琦, 等. 生髓健骨胶囊对酒精性骨质疏松大鼠 Wnt 信号通路的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(3): 579-582.
- [17] 董万涛, 吕泽斌, 宋敏, 等. 从脾肾论治骨质疏松症的神经-内分泌-免疫网络平衡机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11): 1416-1419.
- [18] 张旭桥, 张信成, 仇湘中, 等. 生骨胶囊对骨质疏松大鼠骨组织骨保护素及核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配基表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(8): 21-25.
- [19] 任树军, 刘俊桐, 于长江, 等. 生髓健骨胶囊对酒精性骨质疏松大鼠 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 和空骨陷窝的影响[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(3): 187-191.
- [20] 任树军, 于长江, 梁彦林, 等. 生髓健骨胶囊对酒精性骨质疏松大鼠血清学指标的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2021, 29(7): 21-24.
- [21] 赵金龙, 曾令烽, 梁桂洪, 等. 基于信号通路的中药有效成分治疗骨质疏松机制研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(23): 6087-6088.
- [22] 董群伟, 陈志峰, 孙奋勇. 牛膝脱皮甾酮促进去卵巢大鼠间充质干细胞的增殖[J]. *广东医学*, 2010, 31(1): 61-63.
- [23] 任树军, 高伟, 于长江, 等. 生髓健骨胶囊对酒精性骨质疏松大鼠骨转换影响的研究[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(18): 1361-1366.

(收稿日期: 2024-05-05)