

## 基于 p38 MAPK 信号通路探讨苍膝通痹胶囊对 KOA 大鼠 关节软骨的保护作用

谢文鹏<sup>1</sup>, 杨灵森<sup>1</sup>, 马亮<sup>1</sup>, 王象鹏<sup>2</sup>, 宋绪钰<sup>2</sup>, 毕荣修<sup>1,2</sup>

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学, 济南 250014)

**[摘要]** 目的: 观察苍膝通痹胶囊治疗膝骨关节炎(KOA)模型大鼠的疗效及相关作用机制。方法: 将60只4周龄SPF级健康雄性SD大鼠, 随机分为空白组, 模型组, 二甲亚砜(DMSO)组, 苍膝通痹胶囊组, SB203580组以及苍膝通痹胶囊联合SB203580组, 每组10只。除正常组外, 其余各组采用改良Hulth法建立KOA模型, 造模成功后, 苍膝通痹胶囊组每日给予0.25 g·kg<sup>-1</sup>苍膝通痹胶囊溶液灌胃, SB203580组每日给予0.015 g·kg<sup>-1</sup>的SB203580溶液灌胃, 苍膝通痹胶囊联合SB203580组每日给予含0.015 g·kg<sup>-1</sup> SB203580及0.25 g·kg<sup>-1</sup>苍膝通痹胶囊的混合溶液灌胃, DMSO组给予1% DMSO溶液灌胃, 模型组和空白组给予生理盐水灌胃, 用药干预4周后处死、取材。苏木素-伊红(HE)染色观察软骨组织形态学改变, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测外周血清中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达水平, 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测软骨组织中p38 MAPK信号通路中相关因子p38, p-p38, 基质金属蛋白酶-13(MMP-13), II型胶原蛋白(Collagen II)mRNA及蛋白的表达水平, 免疫组化法检测p-p38的定位表达。结果: 与正常组比较, 模型组关节软骨中p38, p-p38, MMP-13表达水平显著上调( $P < 0.01$ ), Collagen II表达水平显著下调( $P < 0.01$ ), 血清IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 表达水平显著上调( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 苍膝通痹胶囊组, SB203580组以及苍膝通痹胶囊联合SB203580组关节软骨中p38, p-p38, MMP-13表达水平显著下调( $P < 0.01$ ), Collagen II表达水平显著上调( $P < 0.01$ ), 血清IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 表达水平显著下调( $P < 0.01$ )。结论: 苍膝通痹胶囊可有效保护KOA大鼠软骨组织, 其机制可能与靶向阻断p38 MAPK信号通路有关。

**[关键词]** p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK); 膝骨关节炎; 苍膝通痹胶囊; 炎症反应; 关节软骨

**[中图分类号]** R2-0; R289; R285.5; R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0070-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201837

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200713.1655.004.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-13 17:22

### Protective Effect of Cangxi Tongbi Capsule on Articular Cartilage of KOA Rats Based on p38 MAPK Signaling Pathway

XIE Wen-peng<sup>1</sup>, YANG Ling-sen<sup>1</sup>, MA Liang<sup>1</sup>, WANG Xiang-peng<sup>2</sup>, SONG Xu-yu<sup>2</sup>, BI Rong-xiu<sup>1,2</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China*; 2. *Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the therapeutic effect and mechanism of Cangxi Tongbi capsule on knee osteoarthritis (KOA) model rats. **Method:** Sixty 4-week-old SPF healthy male SD rats were randomly divided into blank group, model group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, Cangxi Tongbi capsule group, SB203580 group and Cangxi Tongbi capsule combined with SB203580 group. In addition to the normal group, the modified Hulth method was used to establish the koa model. After the model was established successfully, the Cangxi Tongbi capsule group was given 0.25 g·kg<sup>-1</sup> Cangxi Tongbi capsule solution by gavage every day, the SB203580 group was given 0.015 g·kg<sup>-1</sup> SB203580 solution by gavage, the Cangxi Tongbi capsule combined

**[收稿日期]** 20200109(018)

**[基金项目]** 济南市科学技术局临床医学科技创新计划项目(201805044); 山东省中医药科技发展计划项目(2017-064)

**[第一作者]** 谢文鹏, 博士, 主治医师, 从事骨与关节损伤的临床与基础研究, E-mail: xiewenpeng0925@163.com

**[通信作者]** \* 毕荣修, 博士, 教授, 从事骨与关节损伤的临床与基础研究, E-mail: birongxiu@163.com

with SB203580 group was given a mixed solution containing  $0.015 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  SB203580 and  $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cangxi Tongbi capsule by gavage, the DMSO group was given 1% DMSO solution by gavage, the model group and blank group were given normal saline by gavage. The stomach was killed and the material was taken after 4 weeks of drug intervention. The expression levels of interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of peripheral blood were detected by ELISA. p38, p-p38, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), Collagen II mRNA and protein in p38 MAPK signal pathway were detected by Real-time fluorescence quantification PCR (Real-time PCR) and Western blot, and the localization expression of p-p38 was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with normal group, the expression levels of p38, p-p38, MMP-13 in articular cartilage of the model group were up-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression levels of Collagen II was down-regulated ( $P < 0.01$ ). The contents of IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the expression levels of p38, p-p38, MMP-13 in articular cartilage of the Cangxi Tongbi capsule group, SB203580 group and Cangxi Tongbi capsule combined with SB203580 group were down-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression levels of Collagen II was up-regulated ( $P < 0.01$ ). The contents of IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Cangxi Tongbi capsule can effectively protect the cartilage of KOA rats, and its mechanism may be related to the targeted blocking of p38 MAPK signal pathway.

**[Key words]** p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK); knee osteoarthritis (KOA); Cangxi Tongbi capsule; inflammatory response; articular cartilage

膝骨关节炎(KOA)是以膝关节软骨进行性退变、破坏,软骨下骨硬化,骨赘形成并伴有关节间隙变窄为最根本病理改变的关节类疾病<sup>[1]</sup>。根据最新流行病学资料及2018年版《骨关节炎诊疗指南》显示<sup>[2-3]</sup>,我国症状性KOA的发病率大约为8.1%,且随着人口老龄化的加重,该病发病率也逐年升高。预计到2020年该病将成为第四大致残性疾病,到2030年在欧洲及美国将有1/5的人口患有KOA<sup>[4-5]</sup>。同时由于该病目前尚无根治性的治疗措施,保守治疗只能暂时缓解患者的症状,且容易反复发作,已经成为一项严重的社会问题。

2018年版《骨关节炎诊疗指南》首次增加了应用中成药治疗KOA的策略,认为中成药可通过多种途径有效缓解患者的症状。但是KOA发病机制复杂、中药方剂的作用机制不明确、缺乏针对性强的靶向治疗方药,这些问题困扰着中医临床疗效提高,也制约着该病研究的进一步深入。在中医整体观念和辨证论治思想指导下,创制的自制剂苍膝通痹胶囊(原名关节止痛胶囊,鲁药制字Z20130043)在治疗KOA,特别是在保护关节软骨方面,取得了较好的临床疗效。前期研究表明,苍膝通痹胶囊可以降低KOA大白兔关节液中一氧化氮(NO),白细胞介素(IL)-1,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )以及基质金属蛋白酶(MMPs)的活性,通过多种通路发挥抗炎作用以保护关节软骨<sup>[6]</sup>。本研究建立KOA大鼠

模型,观察苍膝通痹胶囊对KOA大鼠关节软骨p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)通路相关因子表达的影响,探讨其保护KOA大鼠关节软骨的分子机制,为中医药靶向治疗KOA提供理论和实验支持。

## 1 材料

**1.1 动物** 本研究采用60只4周龄SPF级健康雄性SD大鼠为研究对象,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)20140007,体质量( $215 \pm 19$ )g。饲养于山东省疾病预防控制中心动物实验研究中心屏障系统内,每笼5只,湿度为60%~70%,温度保持在( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,光照条件为每12h明暗交替,通风15次/h,食用北京华阜康生物科技股份有限公司提供的全营养大小鼠维持颗粒饲料,自由饮水。本实验动物经山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会审批(批号AWE-2019-044)。

**1.2 药物与试剂** 苍膝通痹胶囊(山东中医药大学附属医院,批号鲁药制字Z20130043);水合氯醛(天津市大茂化学试剂厂,批号302-17-0);IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为70-EK101B2, 70-EK1822);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号1213C0218);SB203580(上海皓元生物医药科技有限公司,批号HY-10256);PCR逆转录试剂盒(德国Roche公司,批号04379012001);trizol(美国Invitrogen公司,批号15596026);辣根过氧化

物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZB-2301);MMP-13抗体,p38抗体,Collagen II抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab51072,ab47363,ab34712);p-p38抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,批号AF4001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为C0105,P0010S)。

**1.3 仪器** ME235P型电子分析天平(德国Sartorius公司),Cascada I型超纯水系统(美国PALL公司),RM2235型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),70KV牙科X射线射线机(青岛雅康医疗设备有限公司),ES-58牙科X射线胶片(广西巨星医疗器械有限公司),ST8型低速自动平衡离心机(美国Thermo Scientific公司),5424R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),Axio Vert.A1 45倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司),LightCycler 480 II实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(德国Roche公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠分组、建模及给药** 60只大鼠随机分为空白组,模型组,DMSO组,苍膝通痹胶囊组,SB203580组以及苍膝通痹胶囊联合SB203580组,每组10只。空白组不作处理,其他各组采用Hulth法<sup>[7-10]</sup>建立KOA大鼠模型。造模方法:10%水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠,消毒、铺单后无菌条件下切断内侧副韧带及前交叉韧带,取出内侧半月板,皮内缝合,术后连续3 d腹腔注射8万U·mL<sup>-1</sup>的青霉素1 mL预防感染,每日1次,术后5 d开始每天驱赶大鼠奔跑30 min,其余时间任其笼内自由活动,连续驱赶4周。拍摄膝关节正侧位X射线片,可见胫骨平台及股骨髁部关节表面粗糙样改变、不光滑,关节周围骨质紊乱,关节间隙轻微改变,断线处轻度钙化,表示造模成功<sup>[11]</sup>。造模成功后按照实验分组设计进行灌胃,根据人与大鼠体表面积计算公式<sup>[12]</sup>,计算得出大鼠给药剂量为0.25 g·kg<sup>-1</sup>。苍膝通痹胶囊组大鼠给予35 g·L<sup>-1</sup>的苍膝通痹胶囊溶液灌胃,SB203580组给予2 g·L<sup>-1</sup><sup>[13-15]</sup>的SB203580溶液灌胃,苍膝通痹胶囊联合SB203580组每日给予含2 g·L<sup>-1</sup> SB203580及35 g·L<sup>-1</sup>苍膝通痹胶囊的混合溶液灌胃,DMSO组给予1%的DMSO溶液灌胃,模型组和空白组大鼠,给予生理盐水灌胃,每日1次,每次3 mL,干预4周后取材。

**2.2 取材** 腹主动脉取血法收集大鼠外周血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径10 cm)得到上清

液血清,用以检测外周血中炎症因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的表达水平。处死大鼠后迅速暴露膝关节,取下关节软骨组织,一部分置于做好标记的标本袋后立即置于-80℃冰箱中冻存,用于Real-time PCR及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测;另一部分置于4%多聚甲醛溶液中固定,用于HE染色及免疫组化检测。

**2.3 HE染色观察关节软骨形态学改变** 将固定好的标本依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,石蜡切片制作成功后依次进行脱蜡、苏木素染色、伊红染色、脱水封片,显微镜下观察,采集分析图像<sup>[16]</sup>。根据改良Mankins评分标准<sup>[17]</sup>评估软骨退变情况,从软骨结构、软骨细胞、潮线3方面评分,软骨结构:0分,软骨结构正常;1分,表面不规则;2分,表面不规则及血管翳;3分,裂隙深达软骨移行层;4分,裂隙深达软骨放射层;5分,裂隙深达软骨钙化层;6分,结构完全破坏;软骨细胞:0分,正常;1分,弥漫性细胞数量增多;2分,增生性细胞簇;3分,细胞数量减少;潮线:0分,完整;1分,有血管穿越。

**2.4 免疫组化检测p-p38的定位表达** 将固定好的标本依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,石蜡切片制作成功后依次进行脱蜡,随即置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,放入3%过氧化氢溶液室温避光孵育25 min,切片甩干滴加3%BSA室温封闭30 min,加一抗(1:100),4℃过夜,加二抗(1:1万)室温孵育50 min,DAB显色,苏木素复染,脱水封片,显微镜下观察,采集分析图像<sup>[16]</sup>。

**2.5 ELISA检测IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的表达** 取各组大鼠外周血上清液,300×g离心10 min,取上清液进行ELISA检测,按照说明书配置标准品和检测溶液,并按照操作步骤操作,加入终止液后使用酶标仪测定450 nm波长下的吸光度A。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测p38,p-p38,MMP-13,Collagen II蛋白的表达** 取组织块剪碎,加入10倍体积的蛋白裂解液提取总蛋白,测定蛋白浓度。将蛋白溶液按照4:1加入5×蛋白上样缓冲液,100℃水浴锅加热3 min,冷却后制作上样液。加样后进行SDS-PAGE电泳,转膜至PCDF膜,脱脂奶粉溶液中室温摇床封闭1 h后加入p38,p-p38,MMP-13,Collagen II, $\beta$ -actin一抗(1:1 000,1:1 000,1:1 000,1:5 000,1:1 000),4℃过夜,次日,PBS洗涤3次,每次5 min,加入二抗(1:1万)室温孵育1 h后,进行显影曝光,用Image J软件分析各

蛋白灰度值。

**2.7 Real-time PCR 检测 p38, MMP-13, Collagen II mRNA 的表达** 取组织块剪碎, trizol 法提取 RNA, 使用 Nanodrop 2000 检测各组 RNA 浓度。按照 Roche 反转录试剂盒使用说明将 mRNA 反转录得 cDNA, 使用 LightCycler 480 II 型 Real-time PCR 仪进行扩增和检测。使用 20 μL 反应体系, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 45 个循环; 溶解曲线 95 °C 5 s, 65 °C 1 min; 冷却。实验数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法表示。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

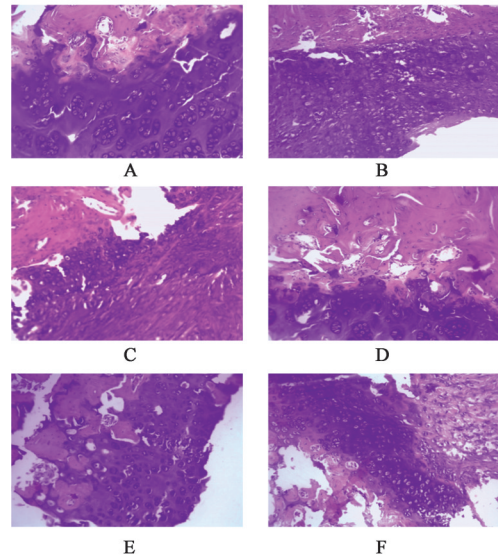
引物	序列	长度/bp
MMP-13	上游 TCCATCCCGAGACCTCATGT	148
	下游 CTCAAAGTGAACCGCAGCAC	
Collagen II	上游 TCCTCCGTCTACTGTCCACTGA	218
	下游 GATGGTCTTGCCCCACTTACC	
p38	上游 CGGTGTGTGCTGCTTTTGAT	100
	下游 CTGTAGGTCCTTTTGCGTG	
β-actin	上游 TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG	240
	下游 GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG	

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 统计软件分析, 所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。正态分布检验其正态性, 符合正态分布的多组间数据资料, 采用单因素方差分析进行组间比较, 方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Games-Howell 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠关节软骨组织形态学的影响** 空白组大鼠关节软骨组织中细胞核染成深蓝色, 软骨细胞排列均匀, 结构清晰, 关节面光滑, 层次分明; 模型组与 DMSO 组软骨组织中细胞排列紊乱, 结构不清晰, 排列不规则, 层次不清晰, 细胞数量明显减少, 潮线模糊, 有血管穿越; 用药干预后, 各给药组的软骨病理学表现均有显著改善, 细胞数量增多, 排列规则, 潮线模糊, 有少量或基本无血管穿越。见图 1。与空白组比较, 模型组改良 Mankins 评分显著升高 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 各给药组改良 Mankins 评分均显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.2 对 p38 MAPK 信号通路中 p-p38 表达的影响** 与空白组比较, 模型组 p-p38 的表达水平显著升



A. 空白组; B. 模型组; C. DMSO 组; D. 苍膝通痹胶囊组; E. SB203580 组; F. 苍膝通痹胶囊联合 SB203580 组(图 2~3 同)

图 1 苍膝通痹胶囊对大鼠关节软骨组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Cangxi Tongbi capsule on histomorphology of articular cartilage in rats(HE, ×200)

表 2 苍膝通痹胶囊对大鼠关节软骨组织 Mankins 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of Cangxi Tongbi capsule on Mankins scale of articular cartilage in rats( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Mankins 评分/分
空白	-	0.30±0.48
模型	-	9.20±1.03 <sup>1)</sup>
DMSO	-	9.20±1.03 <sup>1)</sup>
苍膝通痹胶囊	0.25	6.90±0.73 <sup>2,3)</sup>
SB203580	0.015	5.80±1.03 <sup>2,3)</sup>
苍膝通痹胶囊联合 SB203580	0.25+0.015	4.40±1.17 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与苍膝通痹胶囊联合 SB203580 组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

高; 与模型组比较, 苍膝通痹胶囊组, SB203580 组以及苍膝通痹胶囊联合 SB203580 组均可有效降低退变软骨组织中 p-p38 的表达, 说明苍膝通痹胶囊和 SB203580 均具有改变软骨组织 p38 MAPK 信号通路中相关蛋白表达水平的作用。见图 2。

**3.3 对 p38 MAPK 信号通路中相关基因表达水平的影响** 与空白组比较, 模型组 Collagen II mRNA 的表达水平显著降低, MMP-13, p38 mRNA 的表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 苍膝通痹胶囊组, SB203580 组以及苍膝通痹胶囊联合 SB203580 组 MMP-13, p38 mRNA 的表达显著降低, Collagen II mRNA 的表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

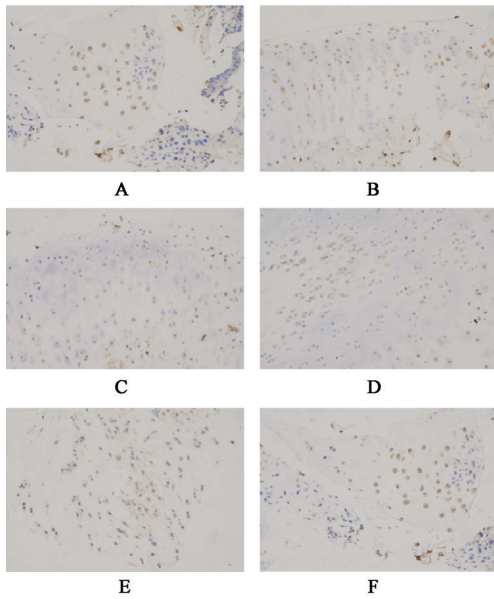


图2 苍膝通痹胶囊对大鼠关节软骨组织中p-p38表达水平的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Cangxi Tongbi capsule on expression of p-p38 in articular cartilage of rats(IHC, ×200)

表3 苍膝通痹胶囊对p38, MMP-13, Collagen II mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Cangxi Tongbi capsule on the expression levels of p38, MMP-13, Collagen II mRNA( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-13	Collagen II	p38
空白	-	0.983±0.035	0.957±0.049	0.997±0.021
模型	-	4.077±0.112 <sup>1)</sup>	0.407±0.015 <sup>1)</sup>	2.593±0.040 <sup>1)</sup>
DMSO	-	4.013±0.015	0.413±0.035	2.600±0.053
苍膝通痹胶囊	0.25	2.980±0.020 <sup>2,3)</sup>	0.553±0.032 <sup>2,3)</sup>	2.083±0.035 <sup>2,3)</sup>
SB203580	0.015	2.020±0.072 <sup>2,3)</sup>	0.713±0.020 <sup>2,3)</sup>	1.697±0.131 <sup>2,3)</sup>
苍膝通痹胶囊联合SB203580	0.25+0.015	1.470±0.070 <sup>2)</sup>	0.840±0.020 <sup>2)</sup>	1.273±0.070 <sup>2)</sup>

表4 苍膝通痹胶囊对炎症因子IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of Cangxi Tongbi capsule on expression level of inflammatory factors IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ( $\bar{x} \pm s, n=5$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
空白	-	46.07±0.31	28.35±0.38
模型	-	79.50±1.76 <sup>1)</sup>	47.41±0.32 <sup>1)</sup>
DMSO	-	78.92±1.33	46.78±1.28
苍膝通痹胶囊	0.25	66.42±0.18 <sup>2,3)</sup>	38.46±0.34 <sup>2,3)</sup>
SB203580	0.015	57.58±1.61 <sup>2,3)</sup>	33.11±1.49 <sup>2,3)</sup>
苍膝通痹胶囊联合SB203580	0.25+0.015	49.93±0.57 <sup>2)</sup>	29.94±0.74 <sup>2)</sup>

因素共同作用所导致的一种慢性退行性关节类疾病<sup>[18]</sup>,根据流行病学调查研究显示,KOA在60岁以上的中国人中发病率高达42.8%,男性患病风险为

3.4 对p38 MAPK信号通路上游炎症因子表达水平的影响 与空白组比较,模型组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 的表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,苍膝通痹胶囊组, SB203580组,苍膝通痹胶囊联合SB203580组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 的表达水平显著降低( $P<0.01$ );与苍膝通痹胶囊联合SB203580组比较,苍膝通痹胶囊组, SB203580组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 的表达水平显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表4。

3.5 对p38 MAPK信号通路中相关蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组Collagen II的表达水平显著降低, MMP-13, p38, p-p38的表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,苍膝通痹胶囊组, SB203580组以及苍膝通痹胶囊联合SB203580组MMP-13, p38, p-p38表达显著降低,同时Collagen II的表达显著升高( $P<0.01$ )。见图3,表5。

#### 4 讨论

KOA是临床上常见的由于力学因素和生物学

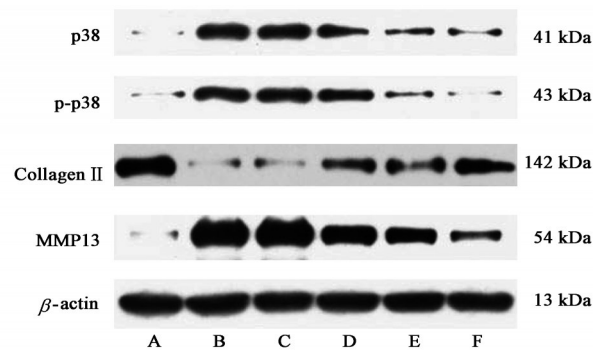


图3 各组p38, p-p38, MMP-13和Collagen II蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression levels of p38, p-p38, MMP-13 and Collagen II in each group

40%,女性为47%<sup>[19]</sup>。我国目前约有1.5亿OA患者<sup>[20]</sup>,而有将近2/3的OA患者为KOA患者。目前临床上还没有根治性的手段来解决这一难题,主要

表5 苍膝通痹胶囊对 p38, p-p38, MMP-13, Collagen II 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Cangxi Tongbi capsule on expression levels of p38, p-p38, MMP-13, Collagen II ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-13/ $\beta$ -actin	Collagen II/ $\beta$ -actin	p38/ $\beta$ -actin	p-p38/ $\beta$ -actin
空白	-	0.07±0.01	0.92±0.08	0.07±0.02	0.04±0.02
模型	-	1.27±0.11 <sup>1)</sup>	0.09±0.02 <sup>1)</sup>	0.70±0.14 <sup>1)</sup>	0.69±0.11 <sup>1)</sup>
DMSO	-	1.27±0.12	0.12±0.04	0.68±0.14	0.68±0.09
苍膝通痹胶囊	0.25	0.93±0.24 <sup>2,3)</sup>	0.45±0.10 <sup>2,3)</sup>	0.56±0.07 <sup>2,3)</sup>	0.45±0.06 <sup>2,3)</sup>
SB203580	0.015	0.69±0.13 <sup>2,3)</sup>	0.57±0.03 <sup>2,3)</sup>	0.38±0.06 <sup>2,3)</sup>	0.23±0.03 <sup>2,3)</sup>
苍膝通痹胶囊联合 SB203580	0.25+0.015	0.34±0.06 <sup>2)</sup>	0.63±0.04 <sup>2)</sup>	0.21±0.03 <sup>2)</sup>	0.18±0.03 <sup>2)</sup>

还是缓解疼痛、肿胀等症状,来适当提高患者的生活质量<sup>[21]</sup>。具有五千多年历史的中医骨伤科学,通过总结大量的临床经验提出了筋骨并重、从筋治骨的理念,即适度的调整软组织(包括经络、经筋、肌肉)功能可以间接的起到小幅度调整局部生物力学功能、改善生物学环境、矫正肢体力线的作用,从而达到治疗骨病的目的。而作为一种关节疾病,在西医考虑内分泌、代谢、炎症反应、免疫反应、生物力学因素等微观因素的同时,也不能忽略中医骨伤所重视的风、寒、湿等宏观的外界环境因素,在整体观念和辨证论治理论指导下治疗 KOA 时,还应重视微观、宏观并重,这也是一直所倡导的中西医结合治疗 KOA 的精髓,并在此基础上创立了苍膝通痹胶囊。

苍膝通痹胶囊由独活、威灵仙、苍术、萆薢、鸡血藤、桑寄生、川牛膝等药物组成,以独活为君药,祛风湿、止痹痛,尤善治疗下肢痹痛;威灵仙宣通十二经为臣药,祛风通络,加强止痛之功效;苍术、萆薢健脾、燥湿、祛浊,鸡血藤活血养血、疏筋活络,祛除膝关节内的瘀血、湿浊;桑寄生、川牛膝、骨碎补、川断补肝肾、强筋骨,意欲扶正,俱为佐、使之药。诸药合用,祛邪与扶正兼顾,共奏补肾助阳、祛湿活血、通络止痛之功,以治疗风寒湿外袭、肝脾肾亏虚之痹证。现代中药药理学研究表明苍膝通痹胶囊的组方成分均对 KOA 有很好的治疗作用。大剂量独活可以减轻胶原诱导性关节炎炎症,降低血清血管内皮生长因子(VEGF),MMP-3 水平,有效治疗 KOA<sup>[22]</sup>。桑寄生水煎液及其提取物桑寄生总黄酮能明显改善佐剂型关节炎模型大鼠肿胀状况,且能降低大鼠血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量<sup>[23]</sup>。牛膝中的提取物甾酮类化合物可以抑制软骨基质葡糖氨基聚糖的降解,并能促进人骨髓间充质干细胞分化成软骨细胞<sup>[24]</sup>。齐墩果酸型三萜皂苷,能抑制骨吸收,进而抑制破骨细胞形成,抑制软骨下骨转换,从而有效治疗 KOA<sup>[25]</sup>。苍术挥发油<sup>[26]</sup>、鸡血藤总黄酮<sup>[27]</sup>、威

灵仙总皂苷<sup>[28]</sup>具有抗炎镇痛、提高机体免疫力,促进血液循环等作用。萆薢总皂苷<sup>[29]</sup>可以抑制过 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NALP3)炎性体装配和激活,进而抑制炎性细胞因子的表达来有效治疗关节炎。根据组方成分的现代药理作用,综合国内外最新研究发现苍膝通痹胶囊治疗 KOA 的作用机制有改善软骨细胞功能、促进软骨修复,促进软骨基质的合成,抑制软骨基质的分解,抑制滑膜炎性改变,缓解疼痛与肿胀、改善膝关节功能等几个方面。

近年来,越来越多的研究将信号通路引入到 KOA 的研究中,以期更好的揭示 KOA 的病理机制,寻求 KOA 的特异性分子靶点,其中研究表较多的就是炎性信号通路中的 p38 MAPK 信号通路<sup>[30]</sup>。本研究结果显示,苍膝通痹胶囊干预 KOA 大鼠模型 1 个月后,关节软骨及周围滑膜组织炎症反应明显减轻;关节软骨组织中 p38 MAPK 蛋白及磷酸化水平降低,p38, p-p38 表达量下降,Collagen II 表达上升,MMP-13 表达水平下降,外周血上清液中炎性因子(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )的表达水平显著降低、这与 p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB203580 的作用机制类似,但作用效果要明显低于 SB203580,说明苍膝通痹胶囊确实可以起到 p38 MAPK 信号通路阻断剂的作用,通过阻断 p38 MAPK 信号通路来抑制炎性因子和 MMP 的表达,同时提高 Collagen II 的表达来加速退变软骨细胞的修复,保护关节软骨。但苍膝通痹胶囊干预后相关因子的表达水平明显低于 SB203580 的干预效果,而苍膝通痹胶囊与 SB203580 联合干预的作用效果又比单纯 SB203580 的干预效果好,说明苍膝通痹胶囊虽然可以阻断 p38 MAPK 信号通路,进而抑制炎症反应,加快退变软骨组织修复,但是不能完全阻断 p38 MAPK 信号通路,同时也表明苍膝通痹胶囊保护关节软骨的作用机制不具有特异性,还需要进一步探索。

[参考文献]

- [1] SHARMA A R, JAGGA S, LEE S S, et al. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10):19805-19830.
- [2] 王弘德,李升,陈伟,等.《骨关节炎诊疗指南(2018年版)》膝关节骨关节炎部分的更新与解读[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(9):993-995, 1000.
- [3] 邢丹,林剑浩.《骨关节炎诊疗指南(2018年版)》更新解读及方法学评价[J]. *中华关节外科杂志:电子版*, 2019, 13(4):391-395.
- [4] MUSUNECI G, SZYCHLINSKA M A, MOBASHERI A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes[J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(1):1-12.
- [5] DEVEZA L A, NELSON A E, LOESER R F. Phenotypes of osteoarthritis: current state and future implications[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 120(5):64-72.
- [6] 毕荣修. 关节止痛胶囊干预实验性膝骨性关节炎的作用机理及临床研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2010.
- [7] 王欢,王庆甫,史榕苻,等. MyD88依赖途径在膝骨关节炎进程中的基因表达相关性研究[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(10):933-936.
- [8] WANG J, WANG X, CAO Y, et al. Therapeutic potential of hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for the delivery of curcuminoid in knee osteoarthritis and an *in vitro* evaluation in chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5):2604-2614.
- [9] 杨博文. 骨痹止痛液对大鼠膝骨性关节炎软骨中 TGF- $\beta$ 1 和 Cbfa1 表达影响的实验研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学, 2018.
- [10] 刘强,洪加源,郭林新,等. 尼莫地平治疗早期膝骨性关节炎的实验研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2018, 33(4):371-373.
- [11] 何小华,郑晓霞,黄艳妮,等. 兔膝骨性关节炎模型建立的现状[J]. *医学综述*, 2020, 26(3):525-529.
- [12] 徐宝林. 补肾活血胶囊对激素干预大鼠 BMSCs 增殖及分化的影响[D]. 济南:山东中医药大学, 2017.
- [13] LIN Y, ZHANG J C, YAO C Y, et al. Critical role of astrocytic interleukin-17 A in post-stroke survival and neuronal differentiation of neural precursor cells in adult mice[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6):e2273.
- [14] YANG Z, WANG J, YU C, et al. Inhibition of p38 MAPK signaling regulates the expression of EAAT2 in the brains of epileptic rats[J]. *Front Neurol*, 2018, 9:925.
- [15] BADGER A M, BRADBEER J N, VOTTA B, et al. Pharmacological profile of SB203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 279(3):1453-1461.
- [16] 孙亮亮,章煌杰,鲁琛,等. 补肾活血中药“杜仲-当归”治疗骨性关节炎的作用及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11):2639-2644.
- [17] 彭旭,杨继滨,尤奇,等. 金骨莲灌胃对兔骨关节炎模型软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(8):1188-1194.
- [18] TURHAN Y, ARICAN M, KARADUMAN Z O, et al. Chondroprotective effect of Nigella sativa oil in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in rabbits[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2019, 19(3):362-369.
- [19] GIWNEWER U, RUBIN G, ORBACH H, et al. Treatment for osteoarthritis of the knee[J]. *Harefuah*, 2016, 155(7):403-406.
- [20] 朱立帆,周建新,曾金才,等. S100钙结合蛋白B在骨性关节炎软骨损伤修复中的作用及机制研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(11):1429-1434.
- [21] BENNER R W, SHELBOURNE K D, BAUMAN S N, et al. Knee osteoarthritis: alternative range of motion treatment[J]. *Orthop Clin North Am*, 2019, 50(4):425-432.
- [22] XU Y, DAI G J, LIU Q, et al. Effect of Ermiao recipe with medicinal guide *Angelicae Pubescentis Radix* on promoting the homing of bone marrow stem cells to treat cartilage damage in osteoarthritis rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(8):600-609.
- [23] 李玲玲,管俊,冯静,等. 基于“病证-效应-生物样本分析”方法的桑寄生总黄酮祛风湿功效物质及归经研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5):2203-2208.
- [24] WU J, LI J, LI W, et al. *Achyranthis bidentatae radix* enhanced articular distribution and anti-inflammatory effect of berberine in Sanmiao Wan using an acute gouty arthritis rat model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221:100-108.
- [25] 黄丽婵,杨世奎,刘发元,等. 川牛膝、怀牛膝治疗骨性关节炎的药效物质基础探讨[J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(11):52-54.
- [26] 李宇馨,李瑞海. 苍术挥发油抗炎活性研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(2):71-72.
- [27] 何玉琴. 中药鸡血藤研究现状[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2017, 5(29):170.
- [28] 邓龙飞,汪永忠,韩燕全,等. 威灵仙总皂苷抑制佐剂性关节炎大鼠 JAK2/STAT3 信号通路[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(2):153-158.
- [29] 王璐. 萆薢总皂苷对大鼠急性痛性关节炎的防治作用及对 NALP3 炎性体信号通路的影响[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2017.
- [30] JI B, MA Y, WANG H, et al. Activation of the P38/CREB/MMP-13 axis is associated with osteoarthritis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:2195-2204.

[责任编辑 孙丛丛]