

右归丸经 IL-6/STAT3 信号通路对膝骨关节炎模型大鼠 软骨组织退变的调控机制

颜春鲁, 安方玉*, 刘永琦, 王继龙, 赵磊, 夏鹏飞, 周婷, 石国秀, 赵文坤, 杨晓蓉
(甘肃中医药大学 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 甘肃省高校中(藏)药
化学与质量研究省级重点实验室, 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 观察右归丸对膝骨关节炎(KOA)模型鼠软骨组织信号转导和转录激活因子 3(STAT3)和白细胞介素-6(IL-6)表达水平的影响。**方法:** 将大鼠随机分为假手术组、模型组、硫酸氨基葡萄糖组、右归丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。采用改良 Hulth 法制备大鼠 KOA 模型, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水灌胃, 右归丸高、中、低剂量组分别给予右归丸 4.8、2.4、1.2 g·kg⁻¹灌胃, 硫酸氨基葡萄糖组给予硫酸氨基葡萄糖 0.17 g·kg⁻¹灌胃, 连续给药 8 周。干预结束 24 h 后股动脉采血处死各组大鼠, 取鼠膝关节软骨, 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察各组软骨的病理改变, 并进行 Mankin 评分; 免疫组化法检测各组关节软骨组织中 STAT3, 超氧化物歧化酶 3(SOD3)和 Wnt 抑制因子 1(WIF1)的表达; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测软骨组织中 IL-6 mRNA 的表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组关节软骨组中 WIF1 蛋白的表达。**结果:** 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织 Mankin 评分明显升高, 软骨组织 STAT3 在蛋白水平上的表达明显增加和 IL-6 mRNA 水平上的表达显著增加, WIF1 在蛋白水平上的表达显著降低($P < 0.01$); 模型组关节软骨边缘严重破坏, 软骨细胞排列紊乱。与模型组比较, 右归丸高剂量干预组大鼠软骨组织 Mankin 评分, STAT3 在蛋白水平上的表达明显降低, 右归丸各干预组 IL-6 mRNA 水平上的表达显著降低, WIF1 在蛋白水平上的表达显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 软骨结构趋于正常, 软骨细胞分布仅偶见不均, 关节软骨表面欠光滑。**结论:** 右归丸能显著改善 KOA 大鼠的关节软骨退变, 抑制 KOA 中软骨组织的炎症反应, 这可能与抑制 STAT3 和 IL-6 的表达有关。

[关键词] 膝骨关节炎; 右归丸; 白细胞介素-6(IL-6)/信号转导和转录激活因子 3(STAT3)信号通路; 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0017-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190820.1052.003.html>

[网络出版时间] 2019-08-20 11:47

Regulatory Mechanism of Youguiwan on Articular Cartilage Degeneration via IL-6/STAT3 Signaling Pathway in Rats with Knee Osteoarthritis

YAN Chun-lu, AN Fang-yu*, LIU Yong-qi, WANG Ji-long, ZHAO Lei, XIA Peng-fei,
ZHOU Ting, SHI Guo-xiu, ZHAO Wen-kun, YANG Xiao-rong

(Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and Study on Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Quality Research for Colleges of Gansu Province, Key Laboratory of Dunhuang Medicine under Ministry of Education, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Youguiwan on the levels of cartilage transducers and

[收稿日期] 20190522(014)

[基金项目] 甘肃省高等学校科研项目(2018A-043); 甘肃省中医药管理局科研项目(GZK-2017-2); 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放基金项目(DHYX17-10); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2018-01); 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室开放基金项目(FZYX17-18-11)

[第一作者] 颜春鲁, 硕士, 副教授, 从事中药抗骨病的分子生物学机制研究, E-mail: yanchl1979@126.com

[通信作者] *安方玉, 硕士, 副教授, 从事中药抗骨病的分子生物学机制研究, E-mail: anfyuwsmh@163.com

activators of transcription 3 (STAT3) and interleukin-6 (IL-6) in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into six groups: sham control group, model group, glucosamine sulfate group and Youguiwan (high, middle and low-dose) groups. The modified Hulth method was used to prepare KOA models for 6 weeks. The sham control group and the model group were treated with normal saline, Youguiwan high, middle, low-dose groups received Youguiwan 4.8, 2.4, 1.2 g·kg⁻¹ by gavage respectively, and the glucosamine sulfate group was treated with glucosamine sulfate 0.17 g·kg⁻¹. The rats were administrated for 8 weeks according to the dose. After intervention, each group was put to death by femoral artery blood collection, and the knee cartilages of the rats were collected. The pathological changes were observed by hematoxylin eosin (HE) staining method, and Mankin score was evaluated. The expressions of STAT3, superoxide dismutase3 (SOD3) and Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) in articular cartilage were detected by immunohistochemistry. The expressions of IL-6 mRNA in articular cartilage were detected by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of WIF1 in articular cartilage was detected by Western blot. **Result:** Compared with the sham control group, the Mankin score was obviously increased in the model group, the protein expression of STAT3 was increased significantly, the mRNA of IL-6 was raised significantly, but the protein expression of WIF1 was decreased significantly ($P < 0.01$), articular cartilage was seriously damaged, and chondrocytes were arranged in disorder. Compared with the model group, the Mankin score was declined obviously in the high-dose Youguiwan group, the protein expression of STAT3 was significantly reduced, the mRNA expression of IL-6 was significantly reduced in Youguiwan treatment group, while the protein expression of WIF1 was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the cartilage structure returned to be normal, the chondrocytes distribution was uneven, and articular cartilage surface was not smooth. **Conclusion:** Youguiwan could significantly improve the articular cartilage degeneration of KOA rats, and inhibit the inflammation of chondrocytes, which may be related to the suppression of STAT3 and IL-6 expression.

[**Key words**] knee osteoarthritis; Youguiwan; interleukin-6 (IL-6) /transducers and activators of transcription 3 (STAT3) signaling pathway; inflammatory cytokines

膝骨关节炎(KOA)是以关节软骨的破坏及滑膜炎症为主要特征的一种关节软骨的退行性疾病,是骨关节炎(OA)中最常见的一种类型。随着老龄化人口的剧增,KOA的发病率逐年升高^[1],有调查发现,我国骨关节炎女性的发病率高于男性,且其患病率随着年龄的增长而增加,40岁以上的患病率10%~17%,60岁以上约50%,75岁以上约80%^[2]。目前治疗KOA的首选药物主要是镇痛药,非甾体抗炎药和皮质类固醇类药物,但治疗缺乏特异性。中医认为,KOA属于“痹证”和“痿证”范畴,肝肾亏虚、长期劳损及外感风寒湿邪是其主要病机。右归丸摘自《景岳全书》,主要由熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药、附子、肉桂、鹿角胶、菟丝子、杜仲、当归组成,方中附子、肉桂、鹿角胶培补肾中元阳,温里祛寒,为君药。熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药滋阴益肾,养肝补脾,填精补髓,取“阴中求阳”之义,为臣药。再用菟丝子、杜仲补肝肾,强腰膝,配以当归养血和血,共补肝肾精血,为佐药。诸药合用,以温肾阳为主而阴阳兼顾,肝脾肾并补,妙在阴中求阳,使

元阳得以归原。具有温补肾阳,填精止遗的功效。有调查发现,KOA的证型有肾虚髓亏型、阳虚寒凝型和瘀血阻滞型等^[3];研究也发现,右归丸对KOA治疗有效^[4]。故本研究拟通过改良Hulth法复制KOA大鼠模型,观察右归丸对KOA模型大鼠的白细胞介素-6(IL-6)/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号通路的干预作用,并探究其与软骨细胞炎症反应调控机制的相关性,旨在为KOA的临床治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,体重(180±20)g,购自我校科研实验动物饲养中心。动物质量许可证号SYXK(甘)2015-0005。本动物实验经甘肃中医药大学动物伦理委员会批准进行,实验动物符合甘肃中医药大学科研实验中心伦理委员会规定(批准号2015-027)。

1.2 药物及试剂 右归丸(仲景宛西制药股份有限公司,批号151108);硫酸氨基葡萄糖片(保节力,新兴同仁药业有限公司,批号160302);青霉素

(华北制药股份有限公司,批号 F6042103);水合氯醛(天津市光复精细化工研究所,批号 20150105);乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,批号 20181020);苏木素、伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 329D0312, G1100);反转录试剂 prime script RT master mix(大连宝生物工程有限公司,批号 AI20775A);荧光定量 SYBR P Remix EX Taq II(美国 Promega 公司,批号 0000304040); β -肌动蛋白(β -actin)和 IL-6 引物序列由日本 Takara 公司设计并合成, β -actin 引物序列上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3',下游 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3',产物长度 150 bp;IL-6 引物序列上游 5'-ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC-3',下游 5'-CCAGGTAGAAACGGAAGTCCAGA-3',产物长度 111 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,兔抗鼠 STAT3 多克隆抗体(美国 Immuno Way 公司,批号分别为 B4501, B51001);兔抗鼠 Wnt 抑制因子 1(WIF1),超氧化物歧化酶 3(SOD3)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 AC01084578, AG11175544)。

1.3 仪器 BioMATE 3S 型蛋白、核酸浓度测定仪(美国 Thermo 公司);BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司);ChemiDoc™ XRS+ 型凝胶成像分析系统,Mini-PROTEAN Tetra 型小型垂直蛋白电泳仪,Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白快速转印仪(美国 Bio-Rad 公司);TGL16M 型台式高速冷冻离心机(凯达集团成员高科技公司);OSE-Y10 型电动组织研磨器(上海 Tiangen 公司);C1000 型 PCR 热循环仪(美国 ABI 公司);LightCycler 96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国罗氏公司)。

2 方法

2.1 给药剂量设置 右归丸人的临床用量为 $27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,按照人与大鼠的体表面积换算法为 $27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \times 0.018 \times 5 \approx 2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,作为中剂量。故而设定右归丸高、中、低剂量分别为 4.8, 2.4, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;硫酸氨基葡萄糖片按照人与大鼠的体表面积换算法为 $1.884 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \times 0.018 \times 5 \approx 0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 动物分组、造模及给药 60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 6 组,分别为假手术组、模型组、硫酸氨基葡萄糖组、右归丸高、中、低剂量组,每组 10 只。参照文献[5-6],模型组及干预组采用改良 Hulth 法复制 KOA 模型。假手术组 SD 大鼠从膝关节内侧只打开关节腔,不破坏韧带和半月板,并保

留关节软骨面。术后连续 3 d 肌肉注射青霉素 $20 \text{ 万 U} \cdot \text{d}^{-1}$,各组大鼠均在相同条件下,自由饮水,摄食。手术造模 6 周后通过苏木素-伊红(HE)染色观察软骨细胞的形态变化以判定模型是否成功,造模成功后给予药物干预,硫酸氨基葡萄糖组灌服硫酸氨基葡萄糖($0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),右归丸高、中、低剂量组分别按 4.8, 2.4, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服相应的药物,干预 8 周。股动脉采血处死各组动物,摘取双侧膝关节,左侧膝关节固定于 4% 多聚甲醛,右侧膝关节于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 指标测定

2.3.1 HE 染色观察骨形态学变化 动物处死后取完整膝关节,对左侧膝关节脱钙处理并脱蜡至水,采用石蜡包埋法制作蜡块,并用切片机制片,切片厚度约 $5 \text{ }\mu\text{m}$,HE 染色,封片、镜检并进行 Mankin 评分,具体评分标准参考文献[7]进行。评分标准为软骨结构如常,软骨细胞数量如常,基质染色正常,潮线比较完整记为 0 分;软骨表面有不规则裂隙,软骨细胞数量弥漫性增多,基质染色减退,出现多重潮线记为 1 分;软骨裂隙深达肌层,软骨细胞成簇生长,基质染色明显减退,软骨下血管浸入肌层记为 2 分;软骨裂隙深达辐射层,软骨细胞数量明显减少,基质染色明显减退记为 3 分;软骨裂隙深达钙化层,基质染色完全消失记为 4 分;软骨层脱落记为 5 分。

2.3.2 Real-time PCR 检测各组大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达 用 RNA 抽提试剂提取软骨组织 RNA,蛋白、核酸浓度测定仪测定 RNA 含量。用 Promega 试剂盒说明书步骤合成 cDNA 第一链,按 Promega 实时荧光定量试剂盒操作说明书进行 PCR 反应,反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min。共 45 个循环。每个样品各重复 3 次,数据经 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理后进行 IL-6 mRNA 相对表达量分析。

2.3.3 免疫组化法观察软骨组织 STAT3, WIF1, SOD3 蛋白表达 4% 多聚甲醛固定膝关节软骨并脱钙,将石蜡切片进行脱蜡、脱水后放入配制好的枸橼酸缓冲液盒中进行微波修复;3% H_2O_2 室温孵育 30 min;5% 山羊血清封闭 30 min;滴加 $50 \text{ }\mu\text{L}$ 的 STAT3, WIF1 和 SOD3 抗体(一抗的稀释浓度分别为 1:100, 1:200, 1:200),同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗设立阴性对照,将切片放入湿盒中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜;滴加山羊抗兔的二抗(1:1000),室温下放置 30 min;滴加 ABC 工作液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 60 min;

DAB 显色;苏木素复染;二甲苯透明,封固。染色以软骨基质表层和中层的软骨细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色,由甘肃中医药大学病理教研室工作人员采用双盲法进行阅片。应用美国 Image-Pro Plus 6.0 全自动图像分析系统对软骨细胞阳性染色的积分吸光度 IA 进行定量分析,以其中一个具有代表意义阳性结果的视野的棕黄色颗粒为标准自动检测所有视野的阳性结果^[5]。

2.3.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定软骨组织 WIF1 蛋白表达 用 RIPA 裂解液提取软骨组织蛋白质,蛋白质含量的测定用 BCA 法,并调整点样的蛋白质质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ } \mu\text{L}$ /每孔,作 SDS-PAGE,转膜,封闭,滴加抗 WIF1 一抗 (1:300) 孵育,滴加山羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 000) 孵育。采用 ECL Plus 超敏发光液染色观察,将溶液 A 和 B 等体积混匀后,按约 $0.125 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$ 膜面积进行染色,室温反应 1 min 后置于 Image Lab 3.0 进行曝光,曝光条件为单个曝光时间 10 s,总曝光时间 60 s。用 Image Lab 软件分析获取各组大鼠的蛋白条带表达灰度值。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 KOA 大鼠膝关节软骨组织形态学的影响

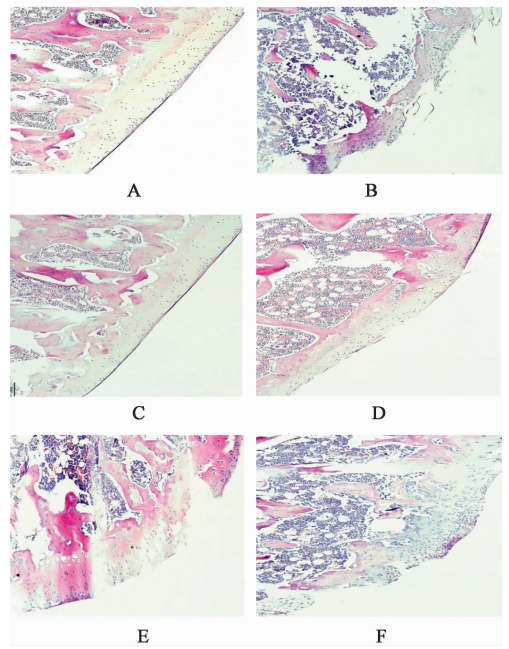
假手术组大鼠关节面及滑膜结构完整,软骨细胞呈水平排列,关节软骨边缘光滑;模型组大鼠关节软骨边缘严重破坏,软骨细胞排列紊乱;右归丸低、中剂量组关节软骨边缘不平整,软骨细胞排列紊乱;右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠软骨结构趋于正常,软骨细胞分布偶见不均,关节软骨表面欠光滑。与假手术组比较,模型组及各干预组大鼠 Mankin 评分均升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠 Mankin 评分均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1 和表 1。

3.2 对 KOA 大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 KOA 大鼠软骨组织 STAT3, WIF1 和 SOD3 蛋白表达的影响

染色以软骨基质表层和中层的软骨细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色。假手术组大鼠关节软骨细胞胞浆 STAT3 呈弱阳性表达, WIF1 均呈阳性表达。模型组大鼠关节软骨细胞胞浆



A. 假手术组; B. 模型组; C. 硫酸氨基葡萄糖组; D. 右归丸高剂量组; E. 右归丸中剂量组; F. 右归丸低剂量组 (图 2~5 同)

图 1 右归丸对 KOA 大鼠软骨组织病理形态学变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Youguiwan on pathomorphological changes in KOA rats (HE, $\times 200$)

表 1 右归丸对 KOA 大鼠 Mankin 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Youguiwan on Mankin score in KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Mankin 评分/分
假手术	-	0.33 ± 0.073
模型	-	$4.92 \pm 0.539^{1)}$
硫酸氨基葡萄糖	0.17	$2.76 \pm 0.317^{1,3)}$
右归丸	4.8	$3.05 \pm 0.253^{1,2)}$
	2.4	$4.14 \pm 0.159^{1)}$
	1.2	$4.38 \pm 0.621^{1)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

STAT3 强阳性表达, WIF1 呈弱阳性表达。右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠关节软骨细胞胞浆 STAT3 弱阳性表达,右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠关节软骨细胞胞浆 WIF1 呈强阳性或阳性表达。与假手术组比较,模型组大鼠关节软骨细胞胞浆 STAT3 蛋白表达 IA 值明显升高, WIF1 蛋白表达 IA 值显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠关节软骨细胞胞浆 STAT3 蛋白表达 IA 值显著降低,而右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠关节软骨细胞

表 2 右归丸对 KOA 大鼠 IL-6 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Youguiwan on IL-6 mRNA expression in KOA rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6
假手术	-	1.00 ± 0.04
模型	-	4.66 ± 0.02 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.17	1.22 ± 0.07 ³⁾
右归丸	4.8	1.15 ± 0.04 ³⁾
	2.4	1.65 ± 0.05 ³⁾
	1.2	2.27 ± 0.09 ³⁾

表 3 右归丸对 KOA 大鼠 STAT3 和 WIF1 蛋白免疫组织化学染色阳性表达 IA 值的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Youguiwan on IA value of STAT3 and WIF1 in KOA rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	STAT3	WIF1
假手术	-	265 197.6 ± 67 848.58	488 925.8 ± 53 270.1
模型	-	611 795.2 ± 89 857.24 ¹⁾	193 296.2 ± 26 184.19 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.17	403 248.4 ± 64 829.35 ³⁾	653 377.2 ± 38 227.37 ³⁾
右归丸	4.8	367 876.0 ± 75 055.55 ³⁾	745 106.8 ± 25 966.5 ³⁾
	2.4	451 112.4 ± 76 153.96	468 892.8 ± 53 270.1 ³⁾
	1.2	527 592.0 ± 88 418.18	364 786.6 ± 60 632.8 ²⁾

胞浆 WIF1 蛋白表达 IA 值均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SOD3 的蛋白表达在假手术组、模型组、右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠关节软骨细胞胞浆均无表达,无统计学意义。见表 3 和图 2~4。

3.4 对 KOA 大鼠软骨组织 WIF1 蛋白表达的影响
与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 WIF1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);与 KOA 模型组比较,右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖干预组 WIF1 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 4 和图 5。

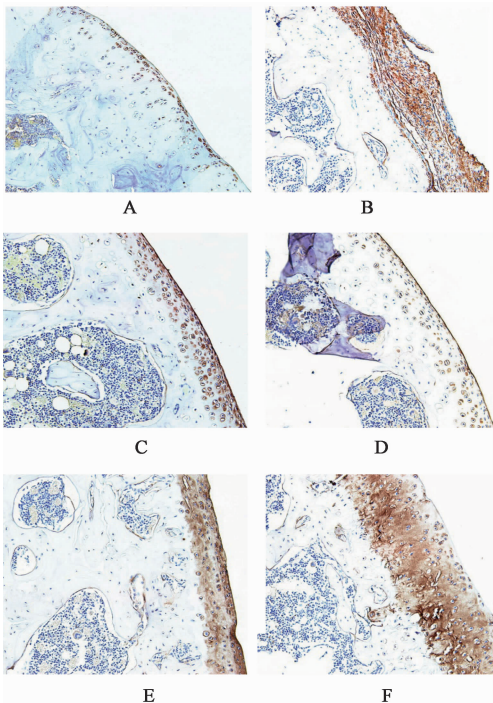


图 2 右归丸对 KOA 大鼠 STAT3 蛋白的阳性细胞表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.2 Effect of Youguiwan on STAT3 protein expression in KOA rats(IHC, ×200)

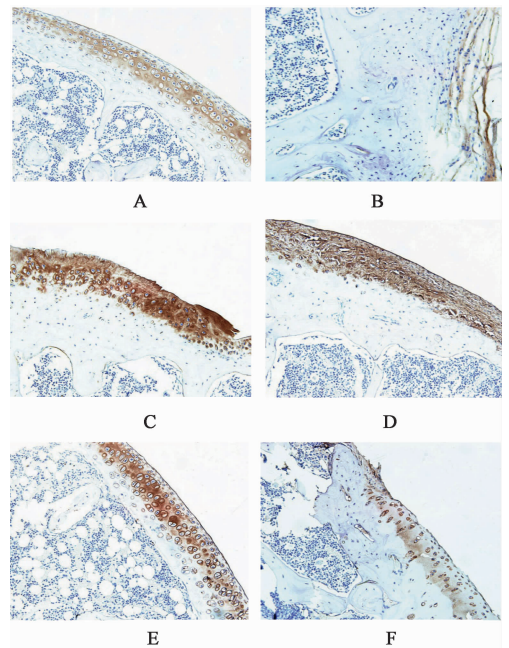


图 3 右归丸对 KOA 大鼠 WIF1 蛋白的阳性细胞表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.3 Effect of Youguiwan on WIF1 protein expression in KOA rats(IHC, ×200)

4 讨论

KOA 属于中医的“痹证”“骨痹”“膝痹”等范畴。中医认为, KOA 的主要病机特点是肝肾亏虚、

气滞血瘀、痰湿凝聚等。因此,在治法中宜采用“补肝肾、强筋骨、活血祛瘀”等中药来治疗 KOA。作为补肾的经典方药右归丸,主要由“熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药、附子、肉桂、鹿角胶、菟丝子、杜仲、

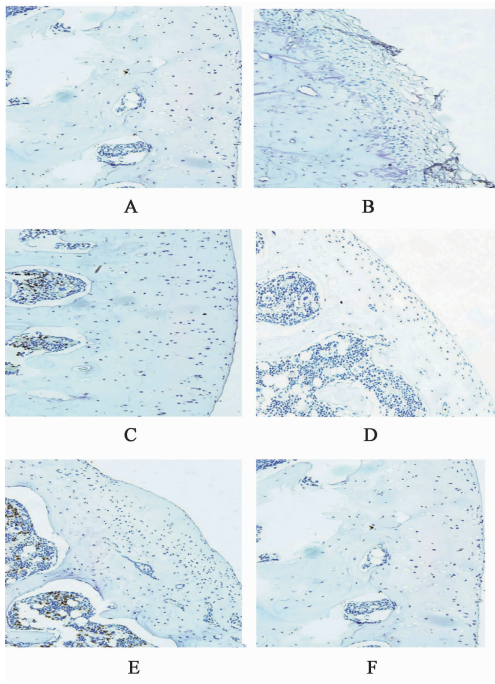


图 4 右归丸对 KOA 模型大鼠 SOD3 蛋白的阳性细胞表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of Youguiwan on SOD3 protein expression in KOA rats (IHC, ×200)

表 4 右归丸对 KOA 大鼠 WIF1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Effect of Youguiwan on grey scale of WIF1 protein expression in KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	WIF1/GAPDH
假手术	-	0.79 ± 0.02
模型	-	0.23 ± 0.03 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.17	0.71 ± 0.01 ³⁾
右归丸	4.8	0.69 ± 0.02 ³⁾
	2.4	0.65 ± 0.03 ³⁾
	1.2	0.57 ± 0.02 ³⁾



图 5 大鼠软骨组织 WIF1 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of WIF1 protein expressions of cartilaginous cell in rats

当归”组成,方中附子、肉桂、鹿角胶培补肾中元阳,温里祛寒,为君药。熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药滋阴益肾,养肝补脾,填精补髓,取“阴中求阳”之义,为臣药。再用菟丝子、杜仲补肝肾,强腰膝,配以当归养血和血,共补肝肾精血,为佐药。诸药合用,以温肾阳为主而阴阳兼顾,肝脾肾并补,妙在阴中求

阳,使元阳得以归原。有研究发现,补肾活血中药可显著改善 KOA 大鼠膝关节肿胀、软骨形态和软骨退变的作用,提示补肾活血中药治疗 KOA 可能具有缓解症状和修复结构的效果^[8]。本实验结果也发现,假手术组大鼠关节面及滑膜结构完整,软骨细胞呈水平排列,关节软骨边缘光滑;模型组大鼠关节软骨边缘严重破坏,软骨细胞排列紊乱;给予右归丸干预后,右归丸低、中剂量组关节软骨边缘不平整,软骨细胞排列紊乱;右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠软骨结构趋于正常,软骨细胞分布仅偶见不均,关节软骨表面欠光滑。说明右归丸治疗 KOA 有效,但具体机制不明。

信号转导与转录激活因子(STAT)家族成员主要包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 和 STAT6 等^[9],STAT 蛋白的结构中有 SH2 结构域,可以与干扰素- γ (IFN- γ), IL-4, IL-6 和 IL-21 等细胞因子发生结合,在 JAK 的催化下使 STAT 发生磷酸化,磷酸化后的 STAT 与细胞核上的 DNA 的特定反应元件发生结合,诱导相应靶基因的表达^[10-11]。在 RA 患者和胶原诱导性关节炎小鼠的研究中发现^[7],核转录因子 Yin Yang1 是过度表达的,阻断核转录因子 Yin Yang1 可抑制 JAK/STAT 信号通路激活^[12]。黄立佳等^[13]的研究结果进一步发现,KOA 模型鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及 IL-1 β 的含量和关节软骨中磷酸化(p)-STAT1 和裂解半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 蛋白表达水平均明显升高,说明 KOA 模型鼠 STAT-1/Caspase-3 信号通路是激活的,给予阿托伐他汀钙治疗后,其可以明显减少 KOA 模型鼠 TNF- α 及 IL-1 β 的分泌来抑制 STAT-1/Caspase-3 信号通路,达到延缓关节退变的目的。另有研究发现^[14-15],促炎因子分泌增加和抗炎因子分泌减少导致了 KOA 关节软骨合成代谢和分解代谢的失衡,是引发 KOA 的根本原因。本研究结果发现,模型组大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达增加,STAT3 的蛋白表达增加,右归丸干预组大鼠软骨组织 IL-6 mRNA 表达降低,STAT3 的蛋白表达降低。说明右归丸对于 KOA 具有保护作用,其机制可能与干扰 IL-6/STAT3 信号通路来延缓 KOA 模型鼠关节软骨退变有关。

WIF1 是一种能抑制 Wnt 信号通路的细胞外蛋白质。WIF1 结构中的 WD 区域是 Wnt 配体的结合区域,二者形成的复合物可以阻断 Wnt 配体蛋白与 Frizzled 受体及辅助受体 LRP5/6 的结合,从而抑制 Wnt 信号向细胞核内的传导,使细胞核内 Wnt 下游

的靶蛋白如基质金属蛋白酶和炎症因子 IL-6 的表达下降,从而抑制炎症反应和细胞增殖,促进细胞凋亡。已有研究发现,WIF1 在骨关节炎中的表达是降低的^[16-17]。本研究结果也发现,KOA 模型鼠软组织中 WIF1 的蛋白表达明显下降,而右归丸干预组大鼠软组织中 WIF1 的蛋白表达明显升高,说明 WIF1 的高表达可以阻断配体蛋白 Wnt 与受体蛋白 Frizzled 的结合,从而促使细胞液中的 β -catenin 不断发生磷酸化,抑制了 β -catenin 的表达,从而使 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化被阻断^[18-19],进一步减少了 KOA 模型鼠 ECM 的降解和延缓了其关节软骨的破坏。

因此,右归丸治疗 KOA 有确切疗效,其可能机制是通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路中 IL-6 和 STAT3 的产生来抑制炎症反应或通过促进 Wnt 信号通路抑制蛋白 WIF1 蛋白的表达来阻断 Wnt 信号通路,从而减少细胞外基质 (ECM) 的降解和延缓关节软骨的破坏,发挥延缓关节软骨组织退变的作用。但是鉴于 KOA 发病机制的复杂性,右归丸是否仅通过 IL-6/STAT3 信号通路或 Wnt 信号通路,或者还有其他信号通路来发挥作用,有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 黄媛媛,徐海斌,郭春. 白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 及基质金属蛋白酶 13 在骨性关节炎中的表达及相关性[J]. 广东医学,2017,38(15): 2301-2304.

[2] 廖德发. 我国骨性关节炎流行病学调查现状[J]. 微创医学,2017,12(4): 521-524.

[3] 葛文杰,蔡建平,张贤,等. 基于辨证分型理论用通络治痹汤加味治疗膝骨关节炎患者的临床疗效及安全性[J]. 广东医学,2018,39(11): 1738-1740,1744.

[4] 吴嵩,廖佑荣,吴和平. 安络痛胶囊联合右归丸治疗阳虚寒凝型膝骨性关节炎疗效观察[J]. 药物流行病学杂志,2016,25(6): 342-346.

[5] 王云峰,白人骁,张扬,等. 改良 Hulth 模型复制膝不同时期骨关节炎的实验研究[J]. 天津医科大学学报,2009,15(3): 400-404.

[6] Rogart J N, Barract H J, Chichester C O. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(6): 539-547.

[7] 陈俊,吴广文,黄云梅,等. 独活寄生汤对膝骨关节炎大鼠软骨形态的影响[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(10): 5-9,30.

[8] 潘建科,杨伟毅,刘军,等. 龙鳖胶囊对膝骨关节炎大鼠软骨和滑膜病理的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2017,37(7): 807-812.

[9] Isomäki P, Junntila I, Vidqvist K L, et al. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis; constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(6): 1103-1113.

[10] Myllymaki H, Ramet M. JAK/STAT pathway in Drosophila immunity [J]. Scand J Immunol, 2014, 79(6): 377-385.

[11] Vainchenker W, Constantinescu S N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies [J]. Oncogene, 2013, 32(21): 2601-2613.

[12] LIN J, HE Y, CHEN J, et al. A critical role of transcription factor YY1 in rheumatoid arthritis by regulation of interleukin-6 [J]. J Autoimmun, 2017, 77(2): 67-75.

[13] 黄立佳,黄杨,孔劲松,等. 阿托伐他汀钙经 STAT1-caspase-3 信号轴抑制膝骨关节炎大鼠关节软骨退变的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2018,23(7): 743-748.

[14] 徐英杰,李晓陵,尹羽薇,等. 针刺飞扬、京骨穴配合中药贴膜剂治疗膝骨性关节炎的疗效及对关节液中白细胞介素-1、-6 水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(18): 4441-4443.

[15] Radojčić M R, Thudium C S, Henriksen K, et al. Biomarker of extracellular matrix remodelling C1M and proinflammatory cytokine IL-6 are related to synovitis and pain in endstage knee osteoarthritis patients [J]. Pain, 2017, 22(3): 1-16.

[16] 李翠蕊,郑喜,李兆福,等. 益气养血方对膝骨关节炎模型大鼠血清 Wnt4 和 WIF1 的影响[J]. 风湿病与关节炎,2017,6(6): 5-10.

[17] GAO S G, ZENG C, LIU J J, et al. Wnt inhibitory factor-1 expression levels in articular cartilage and the disease severity of patients with osteoarthritis of the knee [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(4): 1405-1409.

[18] Amiot A, Mansour H, Baumgaertner I, et al. The detection of the methylated Wif-1 gene is more accurate than a fecal occult blood test for colorectal cancer screening [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e99233.

[19] Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I A, Saadallah-Kallel A, et al. Downregulation of WIF1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma; clinical significance [J]. Tumor Biol, 2014, 35(8): 7975-7982.

[责任编辑 周冰冰]