

温经通络汤对膝骨关节炎模型小鼠 VEGF/VEGFR2/ERK1/2 信号通路的影响

许奇^{1,2}, 钱佳佳^{1,3}, 许炜民^{1,2}, 黄桂成^{1,2*}, 马勇^{1,2}, 郭杨^{1,2}, 韩龙^{1,2}, 王礼宁^{1,2}

(1. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室, 南京 210023; 2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 3. 南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:探讨温经通络汤改善膝骨关节炎(KOA)软骨缺损,延缓关节退变的可能作用机制。方法:采用前交叉韧带切除术(ACLT法)建立KOA模型,实验分为假手术组、模型组、温经通络汤组(高、低剂量)和阳性药组。造模4周后中药组分别予以高、低剂量(80, 20 g·kg⁻¹)的温经通络汤灌胃;阳性药组予以硫酸氨基葡萄糖胶囊(0.29 g·kg⁻¹);假手术组与模型组均予等体积生理盐水灌胃。连续干预4周后苏木素-伊红(HE)染色观察软骨组织形态学变化并进行Mankin's评分;蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测血管内皮生长因子A(VEGFA),血管内皮生长因子受体2(VEGFR2),细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)和血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4(ADAMTS4)蛋白和mRNA的表达。结果:HE染色结果显示与假手术组比较,模型组小鼠Mankin's评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,药物组均能明显改善造模引起的关节软骨面缺损,Mankin's评分均有显著降低($P<0.01$),但各给药组间差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组VEGFA, VEGFR2, ERK1/2和ADAMTS4蛋白和mRNA的表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组可以显著抑制VEGFA和ERK1/2的蛋白表达($P<0.01$),硫酸氨基葡萄糖胶囊组效果要优于温经通络汤低剂量组($P<0.05$),但弱于温经通络汤高剂量组($P<0.01$);硫酸氨基葡萄糖胶囊组可以抑制VEGFR2和ADAMTS4的蛋白表达,作用与温经通络汤低剂量组相当,作用均弱于温经通络汤高剂量组($P<0.05$)。结论:温经通络汤可以改善KOA小鼠关节软骨损伤,其作用机制可能与VEGF/VEGFR2/ERK1/2信号通路有关。

[关键词] 温经通络汤; 膝骨关节炎; 血管生成; 血管内皮生长因子(VEGF); 细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)13-0028-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211203

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210415.1502.003.html>

[网络出版日期] 2021-4-15 16:42

Effect of Wenjing Tongluo Decoction on VEGF/VEGFR2/ERK1/2 Signaling Pathway in Mice with Knee Osteoarthritis

XU Qi^{1,2}, QIAN Jia-jia^{1,3}, XU Wei-min^{1,2}, HUANG Gui-cheng^{1,2*}, MA Yong^{1,2},
GUO Yang^{1,2}, HAN Long^{1,2}, WANG Li-ning^{1,2}

(1. *Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;*
2. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*
3. *School of Acupuncture -Moxibustion and Tuina, School of Regimen and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible mechanism of Wenjing Tongluo decoction (WTD) in

[收稿日期] 20210224(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774341);全国老中医药专家学术经验继承工作资助项目(国中医药人教发[2017]29号);江苏高校自然科学研究面上项目(20KJB360004)

[第一作者] 许奇,在读硕士,从事中医药防治膝骨关节炎工作,E-mail:670370778@qq.com

[通信作者] *黄桂成,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治骨关节炎工作,E-mail:hgc@njucm.edu.cn

alleviating articular cartilage defect in knee osteoarthritis (KOA) and delaying joint degeneration. **Method:** The KOA model was established by anterior cruciate ligament transection (ACLT). Mice were classified into sham-operated group, model group, WTD high-dose and low-dose groups, and positive control group. Four weeks after modeling, WTD groups and the positive control group were given WTD (80, 20 g·kg⁻¹) and glucosamine sulfate capsules (0.29 g·kg⁻¹), respectively, and the sham-operated group and model group received normal saline of the equivalent volume. After continuous intervention for 4 weeks, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of cartilage and Mankin scoring system was employed to score the knee cartilage. Western blot was combined with Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) to detect the protein and mRNA levels of vascular endothelial growth factor α (VEGFA), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS4). **Result:** The Mankin score in the model group increased as compared with that in the sham-operated group ($P<0.01$). Compared with the model group, administration groups demonstrated alleviated articular cartilage defect and low Mankin score ($P<0.01$), but there was no statistical significance in Mankin score between the WTD groups and positive control group. The protein and mRNA levels of VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, and ADAMTS4 in the model group were significantly higher than those in the sham-operated group ($P<0.01$). The protein expression of VEGFA and ERK1/2 was inhibited in each administration group as compared with that in the model group ($P<0.01$), and the inhibition in the positive control group was stronger than that in the WTD low-dose group ($P<0.05$) but weaker than that in the WTD high-dose group ($P<0.01$). Glucosamine Sulfate capsules suppressed the expression of VEGFR2 and ADAMTS4 to the extent the same with low-dose WTD but weaker than the high-dose WTD ($P<0.05$). **Conclusion:** WTD can relieve the articular cartilage injury in KOA mice, and the mechanism may be related to VEGF/VEGFR2/ERK1/2 signaling pathway.

[Key words] Wenjing Tongluo decoction; knee osteoarthritis; angiogenesis; vascular endothelial growth factor (VEGF); extracellular regulatory protein kinase 1/2 (ERK1/2)

近年来,膝关节骨关节炎(KOA)随人口老龄化和肥胖人群的增加发病率逐步上升^[1]。目前对KOA病理机制认识尚未完善,其中由血管内皮生长因子(VEGF)介导的血管生成被认为是骨关节炎(OA)发病机制中的重要因素之一^[2]。有研究表明,VEGF与VEGF受体2(VEGFR2)结合可以激活细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)信号通路^[3],后者通过参与调控血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4(ADAMTS4)的表达,进而引起软骨细胞外基质降解,加速OA发展^[4]。

温经通络汤为南京中医药大学第一附属医院黄桂成教授临床验方,治疗OA的临床疗效确切^[5]。中医将KOA归于“骨痹”“膝痹”的范畴,《黄帝内经·素问·痹论》有云:“风寒湿三气杂至,合而为痹也”。黄教授认为KOA属于本虚标实之证,其辩证论治一直以来都离不开《黄帝内经》中“肾主骨”的理论指导,肾生骨髓,骨骼需藏于骨腔中之髓所濡养,故方用制附子、桂枝温补肾阳,肾气足则筋骨关节可得濡养,阳气盛而寒湿得温自化。因肝主筋,肾主骨,

筋骨协调平衡与关节运动灵活通达密不可分,肝血亏虚则筋骨失养,故以熟地、怀牛膝滋养肝血,以利关节,“是故血和则筋脉流行……关节清利矣”。此外,黄教授在治疗时继承石氏伤科“气血兼顾,调治兼邪”的思想,主张泽泻、薏苡仁祛湿消肿,通利关节;陈皮理气化痰、延胡索行气化瘀止痛;蜈蚣、全蝎透骨搜风,通经活络;甘草调和诸药。诸药合用,共奏祛邪之功。

课题组前期研究已经证实了在骨关节炎发展过程中VEGF的表达随病程发展而逐步增加,并观察到KOA发展过程中确实存在血管侵袭;此外,课题组也初步证实温经通络汤能够降低KOA小鼠血清内VEGF及基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达^[6],但其具体作用机制尚不明确。本实验旨在研究温经通络汤对VEGF/VEGFR2/ERK1/2通路相关指标表达的影响,以期为临床应用温经通络汤防治KOA提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 3月龄SPF级C57BL/6J小鼠50只,雌雄

各半,体质量(20 ± 3) g,由南京市青龙山动物繁殖场提供,合格证号SCXK(鲁)2016-0001。动物购进后饲养于南京中医药大学实验动物中心,适应性饲养1周后进行实验,SPF级条件常规喂养,12 h/12 h光暗交替,恒温恒湿,动物自由摄取饲料和饮用水。本研究项目已由南京中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(批准号201904A009)。

1.2 药物 温经通络汤由川桂枝 8 g,泽泻 10 g,延胡索 15 g,陈皮 10 g,蜈蚣 2 g,全蝎 3 g,制附子 10 g,怀牛膝 10 g,熟地黄 25 g,胆南星 6 g,甘草 10 g,土茯苓 25 g等药物组成,均购于江苏省中医院,经南京中医药大学中药鉴定教研室刘圣金副教授鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》规范。温经通络汤中各药材混合加8倍蒸馏水浸泡30 min加热,制附子先煎30 min,沸腾后继续转微沸煎煮45 min后过滤煎液,再加8倍蒸馏水煎煮同前,滤出煎液。合并2次煎煮液,将其分别浓缩至含生药质量浓度为 $4\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量), $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量)药液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。阳性药组以生理盐水溶解硫酸氨基葡萄糖(浙江海正药业股份有限公司,国药准字H20041316)至 $14.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 试剂 苏木素-伊红(HE)染液(南京建成生物工程研究所,批号D006-1-1);VEGFA抗体,VEGFR2抗体,ERK1/2抗体,ADAMTS4抗体,内参抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国Proteintech公司,批号分别为66828-1-Ig,26415-1-AP,11257-1-AP,11865-1-AP,60004-1-Ig,SA00001-2);HRP标记羊抗小鼠IgG(南京福麦斯生物技术有限公司,批号FMS-MS01);总RNA提取试剂盒,逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为RC101-01,R223-01,Q711-02);非变性组织/细胞裂解液(北京Solarbio公司,批号R0030)。

1.3 仪器 DM1000型生物显微镜(德国Leica公司),mini Trans-blot cell型电转印槽系列(美国Bio-Rad公司),QuantStudio3型Real-time PCR仪(美国ABI公司),5200 CE型全自动化学发光图像分析系统(中国Tanon公司),Mastereycler nexus型PCR仪(德国Eppendorf公司),CE IS09001型恒温培养振荡器(上海智城公司),Nano-300型微量分光光度计(山东莱索科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 50只SPF级C57BL/6J小鼠适

应性饲养1周后,随机分为假手术组(10只)和模型组(45只)。参照文献[7],模型组采用前交叉韧带横切术(ACLT法)建立小鼠KOA模型。假手术组仅切关节囊,暴露关节腔,不切断前交叉韧带。术后各组小鼠均在相同条件下饲养,自由饮水摄食。手术造模4周后随机选择5只模型组小鼠通过HE染色观察关节软骨形态以判定造模是否成功。

2.2 动物分组及给药 造模成功后将模型组余下40只小鼠随机分为4组,分别为模型组、硫酸氨基葡萄糖组、温经通络汤高、低剂量组。根据人与小鼠体表面积换算法确定小鼠给药剂量,前期研究结果表明,温经通络汤给药剂量为 $20, 80\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时对KOA小鼠血清中VEGF表达抑制作用较为明显,因而本次实验沿用上述剂量进行后续干预^[6]。温经通络汤高剂量 $80\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃;温经通络汤低剂量 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃;硫酸氨基葡萄糖 $0.29\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃;模型组和假手术组给予 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的生理盐水灌胃。根据药物浓缩及溶解浓度比例,以上药物灌胃体积均为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 小鼠体质量,连续干预4周。摘眼球采血后脱颈处死各组小鼠,摘取双侧膝关节,左侧膝关节固定于组织固定液中,右侧膝关节冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 HE染色观察软骨组织形态学变化 对小鼠关节软骨进行染色观察,取膝关节放入通用型组织固定液中固定,脱钙液脱钙,二甲苯透明,石蜡包埋后制作厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的切片进行HE染色。光学显微镜下观察关节软骨组织形态的变化,并依据Mankin's法对小鼠软骨组织退变程度进行评分。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测软骨组织中蛋白表达 称取关节软骨组织100 mg,手术剪剪碎,加入蛋白裂解液和PMSF混合液 $500\text{ }\mu\text{L}$,匀浆机匀浆后 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径 5.427 cm),取上清。BCA试剂盒测定各组蛋白浓度,向各组上清中加入1/4体积的 $5\times$ 蛋白上样缓冲液,混匀后 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热10 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。随后进行电泳,湿转,10%奶粉封闭2 h,TBST洗膜后分别加入一抗VEGFA(1:4 000),VEGFR2(1:1 000),ERK1/2(1:1 000),ADAMTS4(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再次清洗后分别加入对应的二抗(1:5 000),室温孵育2 h清洗后ECL上机显影,使用Image J软件对图像进行灰度值分析,以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值表示蛋白相对表达量并进行统计分析。

2.5 Real-time PCR检测软骨组织中相关mRNA表达 取各组等质量关节软骨,使用柱式提取法提取

组织总RNA,微量分光光度计检测RNA浓度及纯度,逆转录体系,PCR扩增体系均按照试剂盒说明书要求设置。PCR反应条件为预变性95℃30s,95℃10s,56℃30s,72℃30s循环反应40次,反应完成后进行扩展曲线和融解曲线的分析。所需引物序列参见表1,以GAPDH为内参校正,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法求得目的基因的相对表达水平,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,实验重复3次。

2.6 统计学分析 采用SPSS 19.0对实验数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用Student-NewmanKeuls(SNK)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

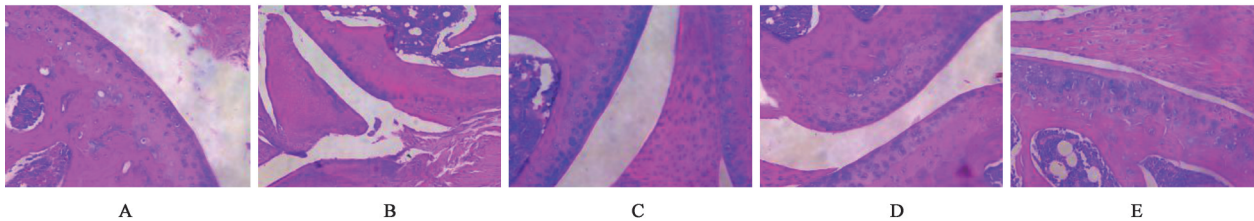
3.1 对KOA小鼠关节软骨病理学观察及Mankin's评分的影响 假手术组小鼠各关节结构完整,软骨边缘光滑无不规则裂隙,软骨细胞分布均匀,排列整齐,无簇集软骨细胞团,潮线完整,基质染色无失染;模型组可见明显的关节面损伤,软骨缺损严重,裂隙深达钙化层甚至软骨层脱落;软骨细胞数量明显减少,基质染色重度减退,潮线不规则或有血管破坏;其余各给药组软骨组织关节软骨表面较模型

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
VEGFA	上游 GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	105
	下游 CTCCGCTCTGAACAAGGCT	
VEGFR2	上游 TTTGGCAAATACAACCCTTCAGA	133
	下游 GCAGAAGATACTGTCCACCACC	
ERK1	上游 TCCGCCATGAGAATGTTATAGGC	248
	下游 GGTGGTGTGATAAGCAGATTGG	
ERK2	上游 GGTTGTTCCCAAATGCTGACT	84
	下游 CAACTTCAATCCTCTTGTGAGGG	
ADAMTS4	上游 ATGGCCTCAATCCATCCCAG	107
	下游 AAGCAGGGTTGGAATCTTTGC	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	123
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

组更为完整,裂隙减小,软骨细胞弥漫性增多,部分存在细胞簇集,潮线较为完整,基质染色轻度减退。与假手术组比较,其他各组小鼠的Mankin's评分均显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的Mankin's评分均显著降低($P < 0.01$);温经通络汤高、低剂量组与硫酸氨基葡萄糖组间差异无统计学意义。见图1,表2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 温经通络汤高剂量组; D. 温经通络汤低剂量组; E. 硫酸氨基葡萄糖组(图2同)

图1 温经通络汤对KOA小鼠膝软骨组织的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Wenjing Tongluo decoction on knee cartilage of KOA mice (HE, ×400)

表2 温经通络汤对KOA小鼠膝关节软骨Mankin's评分的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Wenjing Tongluo decoction on Mankin's score of knee cartilage in KOA mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Mankin's评分/分
假手术		0.40±0.547
模型		4.80±0.447 ²⁾
温经通络汤	80	1.40±0.548 ⁴⁾
	20	2.40±0.548 ⁴⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.29	2.00±0.707 ⁴⁾

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

3.2 对KOA小鼠软骨组织VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组中的VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,温经通络汤高、低剂量组、硫酸氨基葡萄糖组干预后显著降低VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4蛋白表达($P < 0.01$)。其中温经通络汤低剂量组和硫酸氨基葡萄糖组在抑制VEGFR2和ADAMTS4蛋白表达上,二者作用相当;而温经通络汤高剂量组在VEGFA, VEGFR2和ADAMTS4降低作用最明显($P < 0.05, P < 0.01$);温经通络汤高剂量组与硫酸氨基葡萄糖组抑制ERK1/2蛋白作用相似,

均强于温经通络汤低剂量组。见图2,表3。

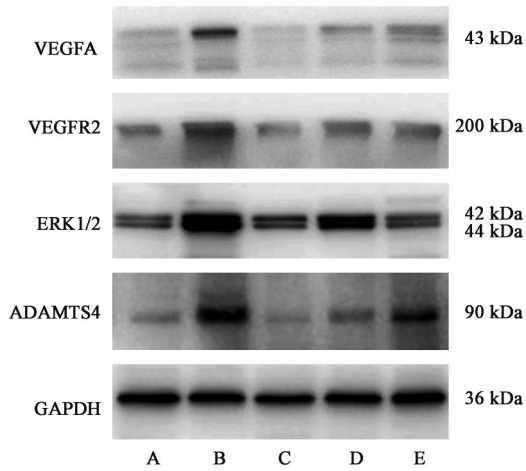


图2 各组小鼠 VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4 蛋白表达电泳

Fig 2 Electrophoresis of VEGFA, VEGFR2, ERK1/2 and ADAMTS4 protein expression in each groups mice

3.3 对 KOA 小鼠软骨组织中 VEGFA, VEGFR2, ERK1, ERK2, ADAMTS4 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组小鼠关节软骨组织内 VEGFA, VEGFR2, ERK1, ERK2, ADAMTS4 mRNA 表达均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,除 ERK1 之外,药物干预后上述指标均有不同程度的下调($P < 0.05, P < 0.01$);温经通络汤低剂量组对 ERK1 的表达差异无统计学意义。温经通络汤高剂量组 VEGFR2 降低作用最明显。见表4。

4 讨论

OA 是以关节软骨的逐渐破坏为主要特征的,而软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型,软骨细胞外基质(ECM)合成与软骨降解之间的不平衡可能是导致 OA 发生的重要因素之一^[8]。ECM 主要由蛋白聚糖和 II 型胶原组成,其中 ADAMTS4 作为主要的蛋白聚糖酶之一,被认为是在 OA 蛋白聚糖降解中起关键作用^[9-10],下调骨关节炎软骨细胞中 ADAMTS4 的表达能够抑制蛋白聚糖的降解^[11]。正常生理条件下,关节软骨内基本无血管生成^[12],缺氧^[13]及机械压力^[14]等多重因素影响导致 KOA 关节软骨内存在血管侵袭现象。诸多学者认为关节内血管生成可能与 KOA 的发生发展密切相关。MAPP 等^[2]指出 OA 中血管生成可以导致滑膜炎、软骨缺损、骨赘形成和疼痛;SU 等^[15]的研究也表明,关节内血管生成可能从改变关节软骨的应力分布和促进软骨下骨神经支配两方面作用导致关节软骨变性和疼痛。VEGF 是调控血管生成的重要因子之一,VEGF 的高表达被认为与 OA 进展息息相关。广泛研究表明,VEGF 在 OA 不同阶段的关节软骨^[16]、软骨下骨^[17]、血清^[18-20]、滑囊及滑膜液^[19-20]中的表达较正常关节均有增加。贝伐单抗作为一种特异的 VEGF 抑制剂,被证实能够减少关节内 VEGF 的表达,从而减轻关节内血管生成、抑制滑膜增生,下调关节内 MMP-1 的表达,对兔原发性膝 OA 有治疗作用^[21]。SONG 等^[22]也证明沙利度胺作

表3 温经通络汤对 KOA 小鼠 VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Wenjing Tongluo decoction on protein expression of VEGFA, VEGFR2, ERK1/2 and ADAMTS4 in KOA mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGFA/GAPDH	VEGFR2/GAPDH	ERK1/2/GAPDH	ADAMTS4/GAPDH
假手术		0.31±0.03	0.30±0.02	0.75±0.06	0.21±0.02
模型		0.72±0.07 ²⁾	0.67±0.07 ²⁾	1.92±0.19 ²⁾	0.54±0.05 ²⁾
温经通络汤	80	0.23±0.02 ^{4,6)}	0.26±0.02 ^{4,5)}	0.97±0.07 ⁴⁾	0.22±0.02 ^{4,5)}
	20	0.37±0.06 ^{4,5)}	0.41±0.07 ⁴⁾	1.47±0.25 ^{4,6)}	0.26±0.04 ⁴⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.29	0.52±0.05 ⁴⁾	0.40±0.04 ⁴⁾	0.67±0.07 ⁴⁾	0.32±0.03 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与硫酸氨基葡萄糖组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

表4 温经通络汤对 KOA 小鼠 VEGFA, VEGFR2, ERK1/2, ADAMTS4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Wenjing Tongluo decoction on mRNA expression of VEGFA, VEGFR2, ERK1/2 and ADAMTS4 in KOA mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGFA	VEGFR2	ERK1	ERK2	ADAMTS4
假手术		0.50±0.00	1.08±0.03	1.00±0.14	1.00±0.06	0.04±0.01
模型		0.91±0.04 ²⁾	2.20±0.14 ²⁾	1.30±0.01 ²⁾	6.21±0.55 ²⁾	1.09±0.25 ²⁾
温经通络汤	80	0.48±0.02 ⁴⁾	1.27±0.19 ^{4,6)}	1.06±0.06 ³⁾	2.84±0.17 ^{4,6)}	0.18±0.02 ⁴⁾
	20	0.78±0.03 ^{4,6)}	1.70±0.25 ⁴⁾	1.20±0.06	2.66±0.21 ^{4,6)}	0.72±0.01 ^{3,6)}
硫酸氨基葡萄糖	0.29	0.44±0.01 ⁴⁾	1.63±0.15 ⁴⁾	1.07±0.00 ³⁾	1.08±0.15 ⁴⁾	0.14±0.05 ⁴⁾

为血管生成抑制剂可以通过抑制 VEGF 表达减轻小鼠早期骨关节炎的发展。这些研究表明靶向抑制 VEGF 可以直接干预骨关节炎的进程。

VEGF 能够与 VEGFR2 结合,通过激活 ERK1/2 信号通路促进内皮细胞的存活、增殖和侵袭^[3];同时,ERK1/2 信号通路的磷酸化有助于诱导 OA 中 ADAMTS 的上调^[4],促使 ECM 降解,破坏关节软骨,促进 OA 进一步发展。此外,ERK1/2 可以直接抑制 II 型胶原的表达,并与白细胞介素-1 β (IL-1 β)协同作用,加速软骨基质降解^[23]。因此,VEGF 介导的血管侵袭可能是导致 OA 软骨降解的始动环节,其可能通过 ERK1/2 信号通路抑制 ADAMTS4 表达,从而抑制蛋白聚糖的降解并促进 II 型胶原的表达,以延缓 OA 进程。

温经通络汤由张仲景所著《伤寒杂病论》中的桂枝附子汤化裁而来,临床疗效确切。平行研究显示,温经通络汤主要组分可以通过多途径抑制血管形成。刘建磊^[24]发现制附子在大鼠佐剂关节炎模型中通过抑制组织中 VEGF、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达,抑制组织中血管生成作用以及血清一氧化氮(NO),IL-1 β 水平。万莉^[25]通过人脐静脉血管内皮细胞模型观察到延胡索生物碱可能通过 VEGF 的差异性表达影响蛋白激酶 B(Akt),有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK),核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路。因此,温经通络汤可能通过抑制血管侵袭发挥治疗作用。

课题组前期研究表明,温经通络汤能够下调造模后干预 2 周组的 KOA 小鼠血清内 VEGF 及 MMP13 的表达^[6],本文在此基础上进一步观察其对 KOA 小鼠模型关节软骨内蛋白及基因表达的药理学效应。通过 HE 染色可以直观显示出温经通络汤能够显著改善小鼠关节软骨结构,减轻软骨缺损;通过 Mankin's 评分可发现,温经通络汤高、低剂量组对 KOA 均有显著的治疗作用,与硫酸氨基葡萄糖组间无统计学差异。Western blot 结果显示,温经通络汤可以显著抑制 VEGFA, VEGFR2, ERK1/2 和 ADAMTS4 的蛋白表达,且对 VEGFA, VEGFR2 和 ERK1/2 的表达呈剂量依赖性,其中温经通络汤高剂量对 VEGFA 和 VEGFR2 的抑制作用强于硫酸氨基葡萄糖组。而 Real-time PCR 也验证了以上实验结果,提示温经通络汤确实能够下调 VEGF 的表达,调控 ERK1/2 信号通路。实验证明了温经通络汤可能通过 VEGF/VEGFR2/ERK1/2 信号通路减少软骨基质降解,减轻软骨缺损,延缓 OA 进程从而发挥治疗

作用。本研究仍存在不足之处,缺少对温经通络汤各主要功效中药的作用进行比较;此外,温经通络汤为复方中药,虽目前证实治疗 OA 疗效确切,但其作用机制可能涉及多方面,后续将继续进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王斌,邢丹,董圣杰,等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志,2018,18(2):134-142.
- [2] MAPP P I, WALSH D A. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol,2012,8(7):390-398.
- [3] TONG Q Y, QING Y, WU Y, et al. Dioscin inhibits colon tumor growth and tumor angiogenesis through regulating VEGFR2 and AKT/MAPK signaling pathways[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2014,281(2):166-173.
- [4] PRASADAM I, CRAWFORD R, XIAO Y. Aggravation of ADAMTS and matrix metalloproteinase production and role of ERK1/2 pathway in the interaction of osteoarthritic subchondral bone osteoblasts and articular cartilage chondrocytes - possible pathogenic role in osteoarthritis [J]. J Rheumatol,2012,39(3):621-634.
- [5] 陈晨,马勇,黄桂成,等. 黄桂成运用温经通络汤治疗膝骨关节炎经验[J]. 中国民间疗法,2019,27(23):8-10.
- [6] 许炜民,钱佳佳,韩龙,等. 温经通络汤对小鼠膝骨关节炎软骨形态改变和 VEGF、MMP-13、HIF-1 α 表达情况的影响[J]. 中医药信息,2020,37(6):6-12.
- [7] XIE J, ZHANG D, LIN Y, et al. Anterior cruciate ligament transection-induced cellular and extracellular events in menisci: implications for osteoarthritis [J]. Am J Sports Med,2018,46(5):1185-1198.
- [8] ZHANG Y, LIN J, ZHOU X, et al. Melatonin prevents osteoarthritis-induced cartilage degradation via targeting MicroRNA-140[J]. Oxid Med Cell Longev,2019,doi:10.1155/2019/9705929.
- [9] VERMA P, DALAL K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis [J]. J Cell Biochem,2011,112(12):3507-3514.
- [10] HASHIMOTO G, AOKI T, NAKAMURA H, et al. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4) [J]. Febs Letters,2001,494(3):192-195.
- [11] YATABE T, MOCHIZUKI S, TAKIZAWA M, et al.

- Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(6):1051-1058.
- [12] HAMILTON J L, NAGAO M, LEVINE B R, et al. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(5):911-924.
- [13] YU Y, MA L, ZHANG H, et al. EPO could be regulated by HIF-1 and promote osteogenesis and accelerate bone repair [J]. *Artif Cells*, 2020, 48(1):206-217.
- [14] PUFE T, LEMKE A, KURZ B, et al. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(1):185-192.
- [15] SU W, LIU G, LIU X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development [J]. *JCI Insight*, 2020, doi:10.1172/jci.insight.135446.
- [16] TSUCHIDA A I, BEEKHUIZEN M, MARIEKE C, et al. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(5):441.
- [17] CORRADO A, NEVE A, CANTATORE F P. Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts [J]. *Clin Exp Med*, 2013, 13(1):81-84.
- [18] BALLARA S C, TAYLOR P C, REUSCH P, et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(9):2055-2064.
- [19] SAETAN N, HONSAWEK S, TANAVALEE A, et al. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2014, 38(5):1099-1104.
- [20] MABEY T, HONSAWEK S, SAETAN N, et al. Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2014, 38(9):1885-1892.
- [21] LI W, LIN J, WANG Z, et al. Bevacizumab tested for treatment of knee osteoarthritis via inhibition of synovial vascular hyperplasia in rabbits [J]. *J Orthop Translat*, 2019, 19:38-46.
- [22] SONG J L, LI D L, FANG H, et al. Intraperitoneal injection of thalidomide alleviates early osteoarthritis development by suppressing vascular endothelial growth factor expression in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1):571-579.
- [23] LÓPEZ-ARMADA M J, CARAMÉS B, LIRES-DEÁN M, et al. Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(7):660-669.
- [24] 刘建磊. 制附子干预大鼠佐剂性关节炎作用研究 [D]. 天津:天津医科大学, 2012.
- [25] 万莉. 延胡索醇提物和延胡索生物碱体内抗血管生成及其对VEGF调控作用的实验研究 [D]. 南京:南京中医药大学, 2012.

[责任编辑 周冰冰]