

本文引用:邓庆,贺飞,胡清桥,余黄合,黄娟. 桑枝调控 HIF-1 α /VEGF/MMPs 信号通路改善佐剂性关节炎大鼠骨破坏的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(7): 1096-1104.

桑枝调控 HIF-1 α /VEGF/MMPs 信号通路改善 佐剂性关节炎大鼠骨破坏的研究

邓庆¹,贺飞¹,胡清桥¹,余黄合^{2*},黄娟^{1*}

(1.湖南中医药大学医学院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学药学院,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 基于 HIF-1 α /VEGF/MMPs 信号通路探讨桑枝对佐剂性关节炎(adjvant-induced arthritis, AIA)大鼠骨破坏的治疗作用及机制。**方法** 将 30 只大鼠随机分成 5 组:正常组、模型组、阳性药(雷公藤多苷片 10 mg/kg)组、桑枝水提物低剂量(3 g/kg)组、桑枝水提物高剂量(9 g/kg)组,每组 6 只。采用完全弗氏佐剂诱导 AIA 大鼠模型。造模后第 1 天开始灌胃给药,正常组、模型组给予 10 mL/kg 生理盐水,其余组给予相应药物,每天 1 次,连续 30 d。给药前及给药后每 3 天进行称量、足趾肿胀度测定、关节炎指数计算;治疗结束后采用 CT 观察足骨破坏情况,HE 染色法观察踝关节病理变化,免疫组化法检测踝关节滑膜组织低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)蛋白表达,Western blot 检测踝关节滑膜组织 HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9 蛋白表达水平。**结果** 与正常组相比,模型组体质量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),足趾肿胀度、关节炎指数、骨破坏评分、组织学评分和 HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9 蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,阳性药组、桑枝水提物低剂量组、桑枝水提物高剂量组体质量均显著升高($P<0.01$),足趾肿胀度、关节炎指数、骨破坏评分、组织学评分和 VEGF、MMP-3、MMP-9 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$)。与阳性药组相比,桑枝水提物高剂量组足趾肿胀度、关节炎指数($P<0.01$),骨破坏评分、组织学评分和 HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与桑枝水提物低剂量组相比,桑枝水提物高剂量组足趾肿胀度、关节炎指数、骨破坏评分、组织学评分和 HIF-1 α 、VEGF、VEGF、MMP-9 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 桑枝可能通过调控 HIF-1 α /VEGF/MMPs 信号通路,抑制血管新生、血管翳形成及细胞外基质的降解,从而发挥对 AIA 大鼠骨破坏的保护作用。

[关键词] 佐剂性关节炎;桑枝;骨破坏;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶;低氧诱导因子-1 α

[中图分类号] R259;R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.008

Study of Ramulus Mori on bone destruction in adjuvant-induced arthritis rats by regulating HIF-1 α /VEGF/MMPs signaling pathway

DENG Qing¹, HE Fei¹, HU Qingqiao¹, YU Huanghe^{2*}, HUANG Juan^{1*}

(1. College of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of Ramulus Mori on bone destruction in adjuvant-induced arthritis (AIA) rats based on HIF-1 α /VEGF/MMPs signaling pathway. **Methods** Thirty rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, positive drug (10 mg/kg tripterygium wilfordii polyglycoside tablet) group, low-dose of Ramulus Mori water extract (3 g/kg) group and high-dose of Ramulus Mori water extract (9 g/kg) group, with six rats in each group. AIA rat model was

[收稿日期] 2022-03-15

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(18C0375);湖南省大学生创新训练项目(20212457);湖南中医药大学大学生创新训练项目(2020106);湖南中医药大学校级科研基金项目(2020XJJJ022)。

[第一作者] 邓庆,男,研究方向:中医药防治类风湿关节炎。

[通信作者] *余黄合,男,博士,讲师,E-mail:yuhuanghe@126.com;黄娟,女,硕士,讲师,E-mail:674630362@qq.com。

induced by complete Freund's adjuvant. Intra-gastric administration was started on the first day after modeling. The normal group and the model group were administrated with 10 mL/kg normal saline, while the other groups were given the corresponding medicine once per day for 30 d. The body weight, degree of toe swelling and arthritis index were measured each three days after modeling. The CT was used to evaluate the bone destruction of rat paws. The pathomorphological changes of the ankle joint in rats were observed by HE staining. The expression levels of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rat synovial tissue were detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the protein expression levels of HIF-1 α , VEGF, MMP-3 and MMP-9 in synovial tissue of knee joint. **Results** Compared with the normal group, the body weight of model group was significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), the degree of toe swelling, arthritis index, bone destruction score, histological score and the expression levels of HIF-1 α , VEGF, MMP-3 and MMP-9 were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the body weight of the positive drug group, the low-dose of Ramulus Mori water extract group and the high-dose of Ramulus Mori water extract group were significantly increased ($P<0.01$), and the degree of toe swelling, arthritis index, bone destruction score, histological score and the expression levels of VEGF, MMP-3 and MMP-9 were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the positive drug group, the degree of toe swelling, arthritis index ($P<0.01$), bone destruction score, histological score and the expression levels of HIF-1 α , VEGF, MMP-3 and MMP-9 were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in high-dose of Ramulus Mori water extract group. Compared with the low-dose of Ramulus Mori water extract group, the degree of toe swelling, arthritis index, bone destruction score, histological score and the expression levels of HIF-1 α , VEGF and MMP-9 were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in high-dose of Ramulus Mori water extract group. **Conclusion** Ramulus Mori may inhibit angiogenesis, pannus formation and extracellular matrix degradation by regulating HIF-1 α /VEGF/MMPs signaling pathway, thus playing a protective role in bone destruction in AIA rats.

[**Keywords**] adjuvant-induced arthritis; Ramulus Mori; bone destruction; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase; hypoxia inducible factor-1 α

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜组织慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病^[1],其基本病理改变为慢性关节滑膜炎、血管翳新生,最终导致关节软骨和骨破坏,引起关节畸形和功能丧失,使肢体残疾,严重影响患者生活质量^[2]。

RA的发病机制复杂,研究发现,HIF-1 α /VEGF/MMPs信号通路在RA骨破坏进程中有着重要作用^[3]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)属于核因子,其在缺氧状态下,表达量显著增多,并发生核转位,与HIF-1 β 聚合后形成的聚合物,可继续与下游因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的缺氧反应元件结合,上调VEGF表达^[4]。VEGF是一种强有力的促血管生成因子,能促进滑膜血管新生、血管翳形成,还能影响基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达^[5-6]。MMPs在软骨及骨骼发生损伤的过程中起关键作用,它可分解软骨和骨中的胶原、蛋白多糖及降解细胞外基质,刺激血管翳侵袭软骨,造成韧带、软骨和骨质的损伤。此外,它还能调控滑膜细胞诱导血管新生^[7]。因此,抑制HIF-1 α /VEGF/

MMPs信号通路可抑制血管新生,减轻骨损伤,进而延缓RA疾病进程。

目前,在临床上缺乏治疗RA的理想方法,中医古籍中记载桑枝具有“祛风湿,利关节”的功效,现代研究中发现,桑枝具有较高的镇痛和抗炎活性及降血脂、降血糖的作用,常用于治疗RA^[8],同时桑枝水提物可促进免疫器官发育,增强细胞免疫和体液免疫^[9]。本研究拟从HIF-1 α /VEGF/MMPs信号通路方面探讨桑枝对佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)大鼠骨破坏的治疗作用及机制,为研究RA治疗药物提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠30只,体质量240~260 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004,动物合格证号为430727211101621523。饲养于湖南中医药大学实验动物中心,湿度45%~65%,室温25℃,自由饮水、摄食,适宜性喂养7 d后开始实验。

1.2 药物

桑枝饮片(批号:2101080022)、雷公藤多苷片

(批号:Z43020138)均购自湖南中医药大学第一附属医院。桑枝饮片以4倍量水回流提取2次,每次1 h;桑枝水提物低剂量、高剂量分别浓缩干燥至3、9 g/mL。雷公藤多苷片取50 mg,精密称量,置于研钵中研磨粉碎,加至500 mL温水中,充分溶解,得1 mg/mL悬浊液。

1.3 试剂

完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA, 美国 Chondrex 公司,批号:210309);苏木素染色液(批号:WH1144)、伊红染色液(批号:WH2144)、枸橼酸盐缓冲液(批号:WH2007)均购自上海威奥生物科技有限公司;4%多聚甲醛溶液(北京白鲨易生物科技有限公司;批号:BL539A);0.9%氯化钠溶液(湖南科伦制药有限公司,批号:2104211);兔二步法免疫组化试剂盒(批号:PV-9000)、DAB 试剂盒(批号:ZLI-9018)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PBST 缓冲液(批号:AWI0130)、RIPA 裂解液(批号:AWB0136)均购自长沙艾碧维生物科技有限公司;HIF-1 α 多克隆抗体(批号:ab72777)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)多克隆抗体(批号:ab38898)均购自英国 Abcam 公司;VEGF 多克隆抗体(批号:13687-1-AP)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)多克隆抗体(批号:66338-1-Ig)、 β -actin 多克隆抗体(批号:66009-1-Ig)均购自美国 Proteintech 公司。

1.4 仪器

高分辨率小动物微型 CT(美国 PerkinElmer-Caliper LS 公司,型号:Quantum FX Demo);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100);转膜仪(型号:DYZC-40D)、恒温箱(型号:DYY-6C)均购自北京六一生物科技有限公司;台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

雄性 SD 大鼠 30 只,采用随机数表法分为正常组、模型组、阳性药组、桑枝水提物低剂量组、桑枝水提物高剂量组,每组 6 只。参考文献[10]构建 AIA 大鼠模型,除正常组外,于其右后足跖底部常规皮肤消

毒,取 100 μ L 浓度为 10 g/L 的 CFA 注射建立模型。注射 CFA 后,大鼠右后足红肿、局部皮肤温度升高、活动障碍,提示建模成功。自建模后 1 d 起,正常组、模型组灌服 10 mL/kg 0.9%氯化钠溶液,阳性药组灌服 10 mg/kg 雷公藤多苷片悬浊液,桑枝水提物低剂量组、桑枝水提物高剂量组分别灌服 3、9 g/kg 桑枝水提物,每天 1 次,连续 30 d。

2.2 动物体质量及足趾肿胀度测定

造模前(第 0 天)以及造模后每 3 天称量,并利用大鼠足跖容积测量装置^[11]精准测量大鼠右后足足跖容积并进行关节炎指数计算,测量 3 次取平均值,求出足趾肿胀度,足趾肿胀度=(致炎后足容积-致炎前足容积)/致炎前足容积 \times 100%。关节炎指数评分标准^[12]:0 分为未见红肿;1 分为小趾关节见红肿;2 分为小趾关节和足趾均肿胀;3 分为踝关节以下足趾肿胀;4 分为包括踝关节在内全部足趾肿胀,且负重困难。

2.3 大鼠足骨放射学观察与骨破坏评分

使用小动物 CT 观察大鼠右后足并评价其骨质破坏的严重程度。骨破坏评分标准^[13]:0 分为正常;1 分为轻度改变;2 分为中度程度改变;3 分为重度改变;4 分为极重度改变。

2.4 大鼠踝关节病理学检查与组织学评分

大鼠处死后,取右踝关节,用 10%中性甲醛固定,5%硝酸脱钙,直至关节软化,不同浓度乙醇梯度脱水,用石蜡包埋、切片,HE 染色,中性树胶封片,在光学显微镜下检查是否有炎细胞浸润、滑膜细胞异常增殖、关节间隙变窄和骨侵蚀等现象并评分、采集图像。组织学评分标准^[14]:0 分为正常关节,无炎性细胞浸润,无血管翳形成,无骨破坏;1 分为炎性细胞浸润或轻微水肿,少量血管翳形成,骨轻度破坏;2 分为炎性细胞中等浸润,大量血管翳形成,骨中度破坏;3 分为炎性细胞严重浸润,关节腔狭窄;4 分为血管翳形成,骨重度破坏。

2.5 大鼠踝关节免疫组化检查

切片置于 60 $^{\circ}$ C 温箱烤片 12 h,再转至二甲苯中 20 min,进行 3 次脱蜡,不同浓度乙醇梯度脱水后,将切片浸入枸橼酸盐缓冲液,微波炉加热至沸腾后断电,进行热修复抗原。加入 1%高碘酸以灭活内源性酶。滴加 1:200 的一抗于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜,继

续滴加 50~100 μL 二抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。DAB 染色,苏木素复染,不同浓度乙醇梯度脱水后,置于二甲苯中,中性树脂封片。每张切片随机观察 5 个视野并采集图像,再输入计算机图像分析系统进行图像分析,得出阳性细胞的平均光密度,并计算均值。

2.6 Western blot 检测大鼠关节滑膜 HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9 蛋白的表达

分离取出大鼠右后肢膝关节滑膜,用预冷的 PBS 洗涤 1 次后,加入 RIPA 裂解液,以 4 $^{\circ}\text{C}$,离心半径 7 cm,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,制备 10%分离胶、4.8%浓缩胶,取待测蛋白样本 20 μL 进行凝胶电泳,转膜、封闭,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日室温放置 30 min 后,加入兔抗大鼠 HIF-1 α 一抗(1:500)、兔抗大鼠 VEGF 一抗(1:500)、小鼠抗大鼠 MMP-3 一抗(1:5000)、兔抗大鼠 MMP-9 一抗(1:1000)和小鼠抗大鼠 β -actin 一抗(1:5000)孵育 90 min,使用 PBST 洗 3 次,分别加入山羊抗小鼠二抗(1:5000)和山羊抗兔二抗(1:6000)孵育 90 min,结束后使用 PBST 洗 3 次,使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min,用滤纸吸尽液体,塑封膜将膜包裹杂交膜,放入凝胶成像系统中成像。将曝光后的底片用 Quantity One 专业灰度分析软件进行分析。

2.7 统计学分析

所有数据均使用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析。计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,满足正态性和方差齐性后,采用单因素方差分析进行多组间比较,两组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桑枝水提物对 AIA 大鼠体质量变化的影响

从第 6 天起,模型组体质量均显著低于正常组

($P<0.05$, $P<0.01$)。从第 21 天起,阳性药组、桑枝水提物低剂量组体质量均显著高于模型组($P<0.01$)。从第 18 天起,桑枝水提物高剂量组体质量均显著高于模型组($P<0.01$)。第 30 天,桑枝水提物高剂量组体质量显著低于桑枝水提物低剂量组($P<0.05$)。详见表 1。

3.2 桑枝水提物对 AIA 大鼠足趾肿胀度的影响

从第 3 天起,模型组足趾肿胀度及关节炎指数均显著高于正常组($P<0.01$)。从第 6 天起,阳性药组、桑枝水提物低剂量组足趾肿胀度均显著低于模型组($P<0.01$)。第 6 天、第 15~30 天,桑枝水提物高剂量组足趾肿胀度均显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。从第 6 天起,桑枝水提物高剂量组足趾肿胀度均显著高于阳性药组($P<0.01$)。第 6~9 天、第 15~30 天,桑枝水提物高剂量组足趾肿胀度显著高于桑枝水提物低剂量组($P<0.01$)。第 12~30 天的阳性药组、第 15~30 天的桑枝水提物低剂量组、第 21~27 天的桑枝水提物高剂量组关节炎指数均显著低于模型组($P<0.01$)。第 12~24 天,桑枝水提物高剂量组关节炎指数均显著高于阳性药组($P<0.01$)。第 15~24 天,桑枝水提物高剂量组关节炎指数均显著高于桑枝水提物低剂量组($P<0.01$)。详见表 2-3。

3.3 桑枝水提物对 AIA 大鼠足关节骨破坏的影响

模型组关节肿胀明显、关节僵硬强直、功能障碍、活动明显受限,各足趾关节及踝关节处明显有骨质侵袭、骨破坏严重、关节间隙狭窄明显、关节变形、关节结构破坏严重。桑枝水提物低剂量组和高剂量组骨质侵袭、关节间隙狭窄均有所改善。模型组骨破坏评分显著高于正常组($P<0.01$)。阳性药组、桑枝水提物低剂量组、桑枝水提物高剂量组骨破坏评分均显著低于模型组($P<0.01$)。桑枝水提物高剂量组骨破坏评分均显著高于阳性药组、桑枝水提物低剂量组($P<0.05$)。详见图 1-2。

表 1 各组大鼠体质量比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$,g)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 21 天	第 24 天	第 27 天	第 30 天
正常组	242.20 \pm 2.86	264.80 \pm 6.34	289.50 \pm 6.90	314.30 \pm 8.78	348.50 \pm 7.50	370.50 \pm 9.23	390.20 \pm 110.89	415.50 \pm 13.26	426.30 \pm 10.41	443.20 \pm 11.69	455.50 \pm 10.71
模型组	248.70 \pm 7.84	257.50 \pm 6.83	270.70 \pm 7.47 [▲]	283.00 \pm 7.35 ^{▲▲}	288.80 \pm 9.24 ^{▲▲}	287.80 \pm 13.70 ^{▲▲}	289.20 \pm 117.06 ^{▲▲}	293.00 \pm 16.98 ^{▲▲}	299.70 \pm 17.35 ^{▲▲}	310.20 \pm 13.32 ^{▲▲}	322.80 \pm 12.25 ^{▲▲}
阳性药组	245.20 \pm 7.08	248.80 \pm 11.70	261.50 \pm 14.72	270.20 \pm 20.96	290.20 \pm 23.61	296.80 \pm 17.70	304.20 \pm 118.78	319.20 \pm 14.66 ^{**}	333.20 \pm 9.50 ^{**}	353.20 \pm 6.31 ^{**}	367.80 \pm 5.98 ^{**}
桑枝水提物低剂量组	238.30 \pm 3.50	248.30 \pm 13.65	258.00 \pm 7.62	274.20 \pm 9.07	291.50 \pm 5.99	298.80 \pm 9.37	306.50 \pm 14.23	323.30 \pm 4.23 ^{**}	337.20 \pm 5.81 ^{**}	354.20 \pm 5.42 ^{**}	370.80 \pm 7.08 ^{**}
桑枝水提物高剂量组	246.80 \pm 7.36	254.80 \pm 6.01	269.70 \pm 5.96	283.70 \pm 8.87	298.70 \pm 10.98	305.70 \pm 11.04	310.70 \pm 111.40 ^{**}	317.80 \pm 11.70 ^{**}	325.20 \pm 11.89 ^{**}	337.30 \pm 16.03 ^{**}	351.00 \pm 13.30 ^{**&}

注:与正常组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与桑枝水提物低剂量组比较,& $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠足趾肿胀度比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 21 天	第 24 天	第 27 天	第 30 天
正常组	0.00±0.00	0.02±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.13±0.02	0.15±0.02	0.16±0.01	0.18±0.01	0.20±0.02
模型组	0.00±0.00	1.38±0.07 ^{▲▲}	1.88±0.08 ^{▲▲}	1.50±0.06 ^{▲▲}	1.61±0.05 ^{▲▲}	1.76±0.03 ^{▲▲}	1.88±0.04 ^{▲▲}	2.07±0.05 ^{▲▲}	2.01±0.04 ^{▲▲}	1.86±0.06 ^{▲▲}	1.66±0.06 ^{▲▲}
阳性药组	0.00±0.00	1.45±0.04	1.51±0.05 ^{**}	1.34±0.04 ^{**}	1.40±0.09 ^{**}	1.45±0.09 ^{**}	1.37±0.09 ^{**}	1.30±0.07 ^{**}	1.23±0.09 ^{**}	1.14±0.08 ^{**}	1.05±0.05 ^{**}
桑枝水提物低剂量组	0.00±0.00	1.42±0.06	1.47±0.10 ^{**}	1.38±0.11 ^{**}	1.44±0.11 ^{**}	1.45±0.09 ^{**}	1.38±0.07 ^{**}	1.32±0.06 ^{**}	1.24±0.07 ^{**}	1.14±0.07 ^{**}	1.00±0.08 ^{**}
桑枝水提物高剂量组	0.00±0.00	1.46±0.06	1.78±0.08 ^{**#}	1.50±0.07 ^{**#}	1.53±0.05 [#]	1.61±0.05 ^{**#}	1.67±0.06 ^{**#}	1.59±0.06 ^{**#}	1.42±0.05 ^{**#}	1.35±0.08 ^{**#}	1.30±0.07 ^{**#}

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性药组比较,# $P<0.01$;与桑枝水提物低剂量组比较,§ $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠足趾关节炎指数比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 21 天	第 24 天	第 27 天	第 30 天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	0.00±0.00	3.33±0.82 ^{▲▲}	4.00±0.00 ^{▲▲}	3.67±0.52 ^{▲▲}	3.17±0.41 ^{▲▲}	3.67±0.52 ^{▲▲}	3.83±0.41 ^{▲▲}	3.83±0.41 ^{▲▲}	3.33±0.52 ^{▲▲}	2.67±0.52 ^{▲▲}	2.33±0.52 ^{▲▲}
阳性药组	0.00±0.00	3.33±0.52	3.67±0.52	3.17±0.75	2.17±0.41 ^{**}	2.50±0.55 ^{**}	2.00±0.63 ^{**}	1.67±0.52 ^{**}	1.17±0.41 ^{**}	1.17±0.41 ^{**}	1.17±0.41 ^{**}
桑枝水提物低剂量组	0.00±0.00	3.33±0.52	3.67±0.52	3.17±0.75	2.50±0.55	2.17±0.41 ^{**}	1.83±0.41 ^{**}	1.83±0.41 ^{**}	1.50±0.55 ^{**}	1.33±0.52 ^{**}	1.33±0.52 ^{**}
桑枝水提物高剂量组	0.00±0.00	3.33±0.52	3.67±0.52	3.33±0.52	3.17±0.41 [#]	3.50±0.55 ^{**#}	3.50±0.55 ^{**#}	2.83±0.41 ^{**#}	2.50±0.55 ^{**#}	1.83±0.41 ^{**}	1.83±0.41 ^{**}

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与阳性药组比较,# $P<0.01$;与桑枝水提物低剂量组比较,§ $P<0.01$ 。

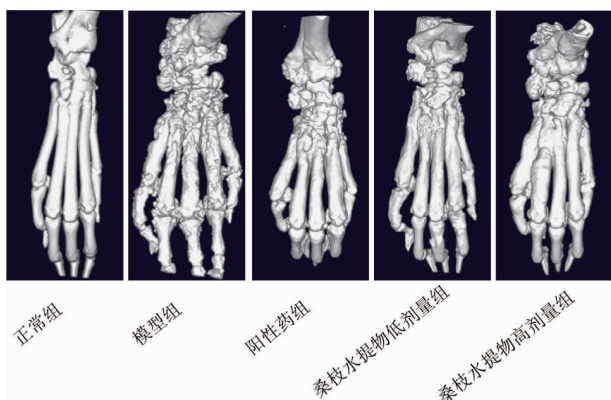


图 1 各组大鼠足骨 CT 图片

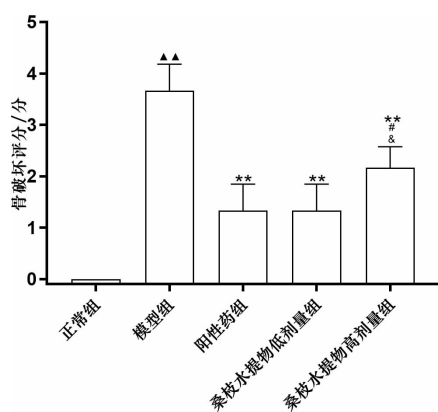


图 2 各组大鼠足骨骨破坏评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与阳性药组比较,# $P<0.05$;与桑枝水提物低剂量组比较,§ $P<0.05$ 。

3.4 桑枝水提物对 AIA 大鼠踝关节组织病理学改变的影响

模型组大量炎症细胞浸润,滑膜重度增生,突入关节腔内,关节间隙明显变窄,广泛的血管翳形成,骨质侵袭严重。阳性药组与桑枝水提物低剂量组关

节腔内少量炎症细胞浸润,少量滑膜增生;桑枝水提物高剂量组炎症细胞浸润中等量,滑膜中度增生,突入关节腔,关节间隙变窄。模型组组织学评分显著高于正常组 ($P<0.01$)。阳性药组、桑枝水提物低剂量组、桑枝水提物高剂量组组织学评分均显著低于模型组 ($P<0.01$)。桑枝水提物高剂量组组织学评分显著高于阳性药组、桑枝水提物低剂量组 ($P<0.05, P<0.01$)。详见图 3-4。

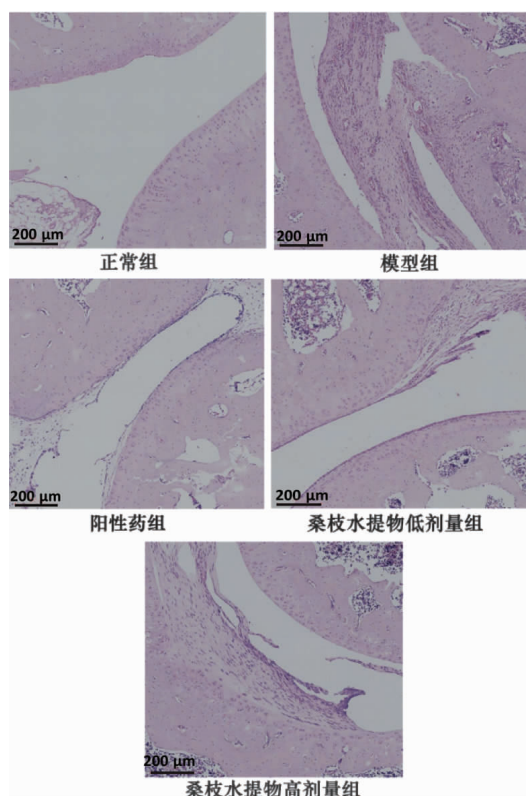


图 3 各组大鼠踝关节组织 HE 染色结果

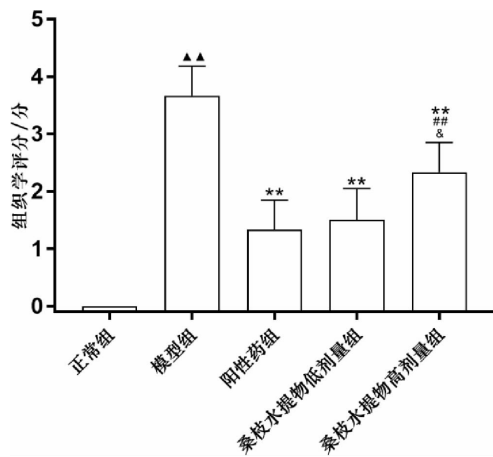


图4 各组大鼠踝关节组织学评分比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注:比正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与阳性药组比较,## $P<0.01$;与桑枝水提取物低剂量组比较,§ $P<0.05$ 。

3.5 免疫组化观察桑枝水提取物对AIA大鼠关节滑膜组织中HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白的影响

HIF-1 α 定位于滑膜细胞胞浆和胞核,VEGF、MMP-3、MMP-9均定位于滑膜细胞胞浆。正常组滑膜组织中可见极少量和少量棕黄色颗粒。模型组可见大量细密的棕黄色颗粒物集聚。阳性药组、桑枝水提取物低剂量组棕黄色颗粒均显著减少,桑枝水提取物高剂量组棕黄色颗粒小幅度减少。模型组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著高于正常组($P<0.01$)。阳性药组、桑枝水提取物低剂量组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著低于模型组($P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著高于阳性药组($P<0.05$, $P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组HIF-1 α 、VEGF、MMP-9蛋白表达水平均显著高于桑枝水提取物低剂量组($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图5。

3.6 Western blot检测桑枝水提取物对AIA大鼠关节滑膜组织中HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白的影响

模型组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著高于正常组($P<0.01$)。阳性药组、桑枝水提取物低剂量组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著低于模型组($P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组VEGF、MMP-3蛋白表达水平均显著

低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著高于阳性药组($P<0.01$)。桑枝水提取物高剂量组VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达水平均显著高于桑枝水提取物低剂量组($P<0.01$)。详见图6。

4 讨论

目前,RA的治疗以药物治疗为主,包括以缓解症状为主的非甾体类抗炎药、以甲氨蝶呤为首的改善病情的抗风湿药、生物制剂、糖皮质激素等,RA是慢性免疫性疾病,上述药物长期使用都会导致明显的不良反应^[15],寻找安全有效的治疗药物是当前亟待解决的问题。桑枝属于“舒筋活络类”中药,研究发现,桑枝作为配伍药对或配伍药组,在临床上治疗RA出现的频率在177味中药中排列第2,说明桑枝在RA的治疗上起着重要作用^[16]。现代药理学研究发现,桑枝乙醇提取物具有显著的抗炎效果,能抑制诱生型一氧化氮合酶、环氧合酶-2、炎性介质白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6等的产生^[17],为其抗RA作用提供了重要的实验依据。基于对各RA动物模型比较^[18],佐剂诱导型AIA模型发病等各方面表现与人RA类似,且建模成功率高,故本研究选择建立此模型对桑枝治疗RA的机制进行初步探讨。

RA被称为“不死不治之癌”,其发病过程中成纤维样滑膜细胞侵略性的生长特性类似于肿瘤样增生^[19]。这种生长方式会消耗大量的能量并且需要大量的氧气供应,以满足细胞新陈代谢的需要。若关节腔内的氧气被消耗,形成慢性缺氧环境,HIF-1 α 表达量增多,它会从细胞质转移至细胞核,诱导VEGF的表达,干扰HIF-1 α 的表达,能显著降低VEGF蛋白表达水平^[20-21]。目前,已知VEGF是HIF信号通路诱导的主要血管生成因子,可促进血管新生,参与血管翳形成,加重关节骨破坏,且VEGF在一定程度上能反映RA的疾病活动度^[22-23]。MMPs可通过分解内皮细胞的细胞外基质,刺激血管内皮细胞游走、转移,促进血管新生,也能参与血管翳形成,还可直接降解骨和软骨,导致RA骨破坏。其中MMP-3是导致骨破坏最重要的蛋白水解酶,可通过其表达情况预测骨破坏的严重程度,对RA的治疗和预后具有指

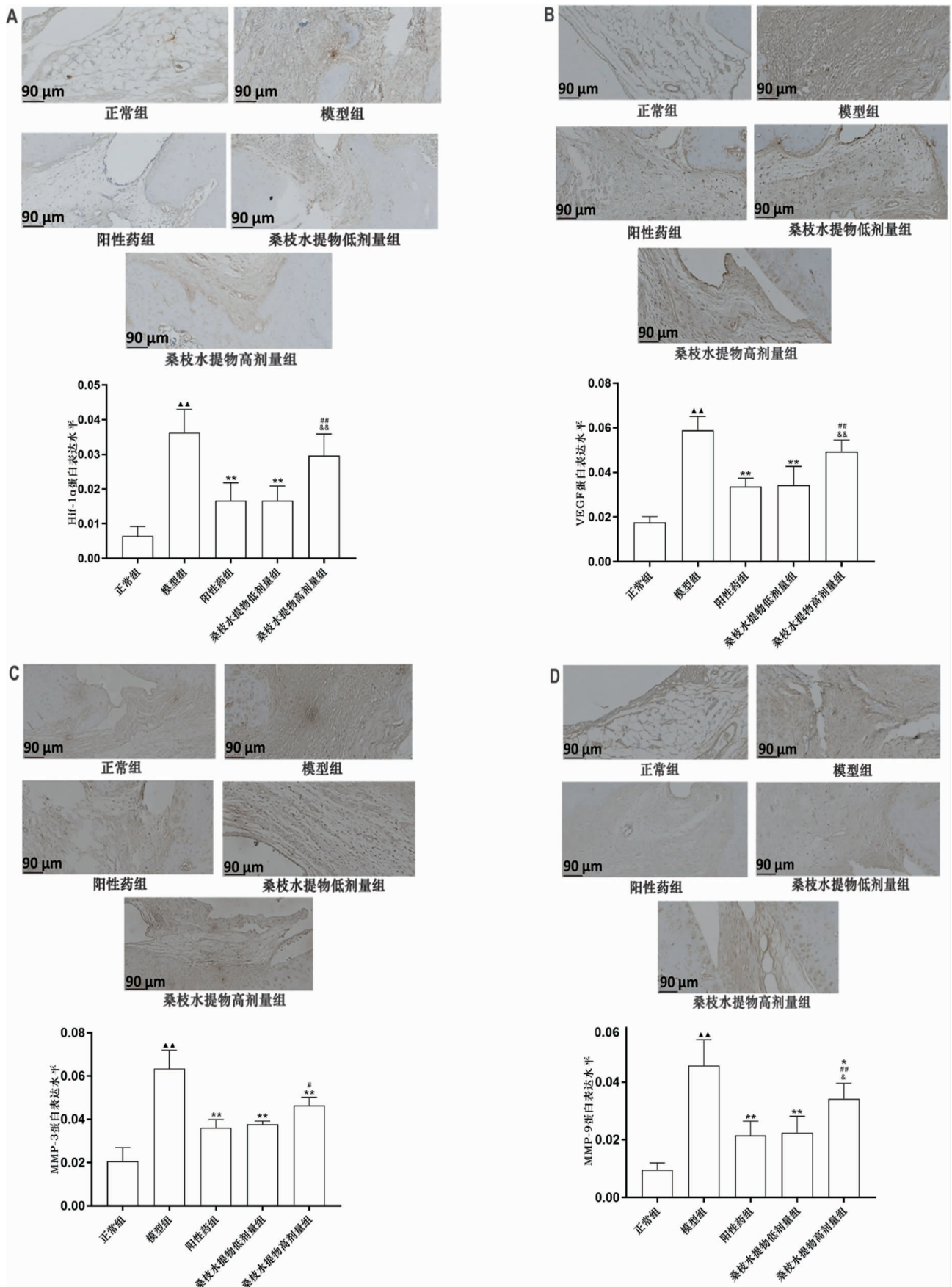


图5 桑枝水提取物对AIA大鼠踝关节滑膜HIF-1 α (A)、VEGF(B)、MMP-3(C)、MMP-9(D)蛋白表达的影响(免疫组化, $\bar{x} \pm s, n=6$)
注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性药组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与桑枝水提取物低剂量组比较,§ $P<0.05$,^{§§} $P<0.01$ 。

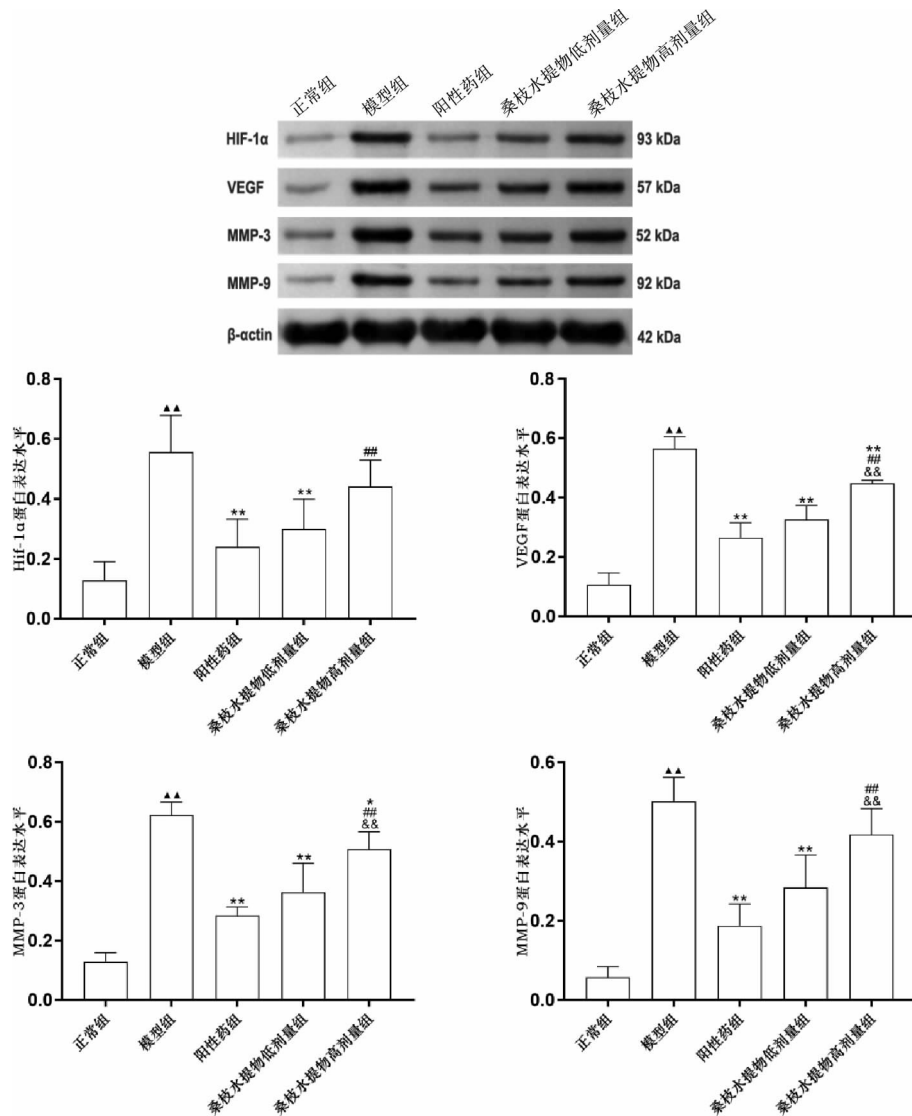


图6 桑枝水提物对AIA大鼠膝关节滑膜HIF-1 α 、VEGF、MMP-3、MMP-9蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性药组比较,# $P<0.01$;与桑枝水提物低剂量组比较,## $P<0.01$ 。

示作用^[24]。研究表明,在RA患者的关节液中,MMP-9的表达水平与VEGF的表达水平密切相关,且VEGF能激活VEGF受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2),磷酸化热休克蛋白90(heat shock proteins 90, Hsp90)亚型Y300,后者再与内皮型一氧化氮合酶结合,使血管内皮细胞释放一氧化氮增多,进而促进MMPs表达^[25-26],加重骨破坏。这表明VEGF能对MMPs的表达起到调控作用。网络药理学研究发现,桑枝-桂枝药对可能通过抑制HIF-1信号通路表达来治疗RA,并且MMPs为此药对的靶点基因^[8]。

本实验研究发现,桑枝水提物增加了AIA大鼠体质量,减轻了骨破坏,并改善了四肢活动能力以提

升关节炎大鼠生活质量。此外,低剂量的桑枝水提物还能显著抑制大鼠足趾炎症反应及新生血管形成。免疫组化和Western blot显示给予桑枝水提物治疗后大鼠滑膜组织中HIF-1 α 表达量明显降低,对下游靶基因VEGF的激活效应减弱,使VEGF表达量降低,抑制血管新生;VEGF通过激活VEGFR2,磷酸化Hsp90亚型Y300,最终导致血管内皮细胞释放一氧化氮,促进MMPs表达。因此,降低VEGF的表达能引起MMP-3、MMP-9表达抑制,从而减轻关节炎大鼠的骨破坏。本实验结果显示,桑枝水提物高剂量组药效弱于桑枝水提物低剂量组,这可能是由于桑枝水提物高剂量组药物浓度偏大,含糖类物质较多,较黏稠,影响动物进食及基础代谢从而减弱了药效,

因此,桑枝水提物低剂量组的治疗效果优于桑枝水提物高剂量组。

综上所述,桑枝水提物能有效减轻 AIA 大鼠骨破坏,其机制可能与抑制 HIF-1 α /VEGF/MMPs 信号通路的表达相关。

参考文献

- [1] 余明芳,陈白露,何欣玲,等.时辰艾灸干预类风湿性关节炎模型大鼠核心钟基因 Clock、Bmal1 表达与细胞焦亡的关系[J].中国组织工程研究,2022,26(35):5700-5706.
- [2] 王涛,李志军.类风湿性关节炎的诊断与治疗[J].中华全科医学,2020,18(2):170-171.
- [3] 伍沙沙,王延,徐婷,等.成纤维样滑膜细胞在类风湿性关节炎发病机制中的作用[J].风湿病与关节炎,2022,11(2):43-47.
- [4] 甘珮荣,刘超,吴虹,等.HIF-VEGF-Ang-2 信号转导介导的滑膜血管新生在类风湿性关节炎中的作用[J].药学报,2021,56(5):1246-1252.
- [5] 王丽敏,于静,张林,等.小柴胡汤对 CFA 关节炎大鼠踝关节组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2020,35(4):1736-1739.
- [6] 王超,丰育功.HIF-1 α 及其下游基因 VEGF-A 和 MMP-9 在血管源性脑水肿中的作用机制[J].中国临床神经外科杂志,2021,26(9):732-734.
- [7] 霍新慧,王延蛟,李盼,等.刺山柑果风湿止痛贴对类风湿性关节炎大鼠滑膜组织 MMP-9 表达的影响[J].上海中医药杂志,2020,54(1):80-83.
- [8] 曹晔文,肖瑶,许涛,等.基于网络药理学的“桑枝-桂枝”药对治疗类风湿性关节炎的作用机制研究[J].海南医学院学报,2021,27(8):592-602.
- [9] 洪德志,陈亚洁,蒋学,等.桑枝水提物对正常小鼠免疫功能的影响[J].蚕桑通报,2012,43(3):22-25.
- [10] 刘琪,张巧琳,陈晓芸,等.性别差异对大鼠佐剂性关节炎模型的影响[J].中国药理学通报,2020,36(9):1328-1332.
- [11] 杨鹤松,韩生玉,高巍,等.大鼠足跖肿胀容积测量装置及其检测精确度控制[J].承德医学院学报,2002,19(2):132-133.
- [12] 李树岗,贾超,宋远瑛. IL-37b 作用于树突状细胞 CD39/ATP 轴抑制类风湿性关节炎大鼠炎症反应的作用及机制[J].免疫学杂志,2022,38(1):51-58.
- [13] NAJM A, MASSON F M, PREUSS P, et al. microRNA-17-5p reduces inflammation and bone erosions in mice with collagen-induced arthritis and directly targets the JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Arthritis and Rheumatology, 2020, 72(12): 2030-2039.
- [14] 张妍,王健英,陈晓云,等.基于 NF- κ B 通路探讨杜仲皮、叶醇提取物对胶原诱导型关节炎大鼠炎症性骨破坏的影响[J].中草药,2021,52(6):1645-1653.
- [15] GORANTLA S, BATRA U, et al. Emerging trends in micro-needle-based drug delivery strategies for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2022, 19(4): 395-407.
- [16] 于洋洋,许玉波.中药治疗类风湿性关节炎的用药规律初探[J].中国医药指南,2018,16(10):194-196.
- [17] 章丹丹,凌霜,张洪平,等.桑枝总黄酮体外抗炎活性及机制研究[J].时珍国医国药,2010,21(11):2787-2790.
- [18] 李利青,张逢,彭馥芝,等.类风湿性关节炎实验性动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2021,37(11):1492-1497.
- [19] MASOUMI M, BASHIRI H, KHORRAMDELAZAD H, et al. Destructive roles of fibroblast-like synoviocytes in chronic inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis[J]. Inflammation, 2021, 44(2): 466-479.
- [20] 王静静,李俊.艾灸联合乌头汤治疗风寒湿阻型类风湿性关节炎临床疗效观察及机制探讨[J].湖北中医杂志,2022,44(2):8-11.
- [21] HU Y P, ZHANG T T, CHEN J Q, et al. Downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α by RNA interference alleviates the development of collagen-induced arthritis in rats[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2020, 19: 1330-1342.
- [22] 钱凯,曾丽盈,郑雪霞,等.基于 VEGF 通路探讨断藤益母汤抑制胶原诱导型关节炎小鼠血管翳形成的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(20):63-71.
- [23] 龚雪,汪元.类风湿性关节炎患者血管内皮生长因子的变化及其相关性分析[J].风湿病与关节炎,2021,10(1):12-14,36.
- [24] 王鑫. MMP-3 对类风湿性关节炎患者的诊断效能及疾病活动度的评估[D].沈阳:中国医科大学,2021.
- [25] BAGGIO C, BOSCARO C, OLIVIERO F, et al. Gender differences and pharmacological regulation of angiogenesis induced by synovial fluids in inflammatory arthritis [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2022, 152: 113181.
- [26] CHODOBSKI A, ZINK B J, SZMYDYNGER-CHODOBSKA J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury[J]. Translational Stroke Research, 2011, 2(4): 492-516.

(本文编辑 黎志清)