

本文引用:谢芳,刘永利,李树冬,戴斌玉,刘涛,陈绍军,邵先舫.活膝汤对膝骨关节炎模型大鼠软骨细胞焦亡的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2023,43(2):225-231.

活膝汤对膝骨关节炎模型大鼠软骨细胞焦亡的作用机制

谢芳¹,刘永利²,李树冬³,戴斌玉³,刘涛³,陈绍军^{3*},邵先舫^{3*}

1.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006;2.海口市中医医院,海南海口 570216;

3.湖南中医药大学附属常德医院,湖南常德 415000

〔摘要〕目的 观察活膝汤对膝骨关节炎模型大鼠膝关节软骨组织形态结构及趋化因子配体2(CC chemokine ligand 2, CCL2)、趋化因子受体2(CC chemokine receptor 2, CCR2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、磷酸化 p65(phosphorylated p65, p-p65)表达水平的影响。方法 32只SPF级大鼠随机分为正常组(9只)与造模组(23只)。造模组采用改良Hulth造模法制备大鼠膝骨关节炎模型。造模后各组随机分别取2只大鼠验证造模效果。造模组剩余的21只大鼠随机分成3组:模型组、活膝汤组(12.81 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、阳性药物组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组7只。正常组与模型组予以等体积蒸馏水灌胃,活膝汤组予以活膝汤灌胃,阳性药物组予以塞来昔布溶液灌胃,每日1次,灌胃4周后留取大鼠膝关节软骨组织标本。HE染色和番红O-固绿染色观察大鼠膝关节软骨细胞病理形态学改变;RT-PCR检测CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达;Western blot检测CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达;免疫荧光双重染色定性检测大鼠软骨细胞焦亡情况。结果 与正常组比较,模型组大鼠软骨退变情况明显加剧,软骨焦亡水平上升,CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达水平明显增高($P<0.01$),CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达水平明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,活膝汤组及阳性药物组大鼠软骨退变情况明显改善,软骨细胞焦亡水平下降。CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达水平明显降低($P<0.01$),CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与活膝汤组对比,阳性药物组Caspase-1 mRNA及蛋白表达水平显著增高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 活膝汤可能通过降低CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65的表达水平,抑制大鼠软骨细胞焦亡,改善大鼠关节软骨的退变情况。

〔关键词〕 活膝汤;膝骨关节炎;软骨;细胞焦亡;趋化因子配体2;趋化因子受体2

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.008

The mechanism of Huoxi Decoction for chondrocyte pyroptosis in rats with knee osteoarthritis

XIE Fang¹, LIU Yongli², LI Shudong³, DAI Binyu³, LIU Tao³, CHEN Shaojun^{3*}, SHAO Xianfang^{3*}

1. The Hospital of Hunan Institute of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Haikou Hospital of Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570216, China; 3. Changde Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Huoxi Decoction on the morphological structure of knee joint cartilage and the expression levels of CC chemokine ligand 2 (CCL2), CC chemokine receptor 2 (CCR2), Caspase-1 and phosphorylated p65

〔收稿日期〕2022-09-01

〔基金项目〕湖南省中医药科研计划重点项目(2021048);湖南省研究生科研创新资助项目(CX20200800);湖南省常德市科技创新发展项目(2020S045);全国第五批名老中医药专家学术继承导师;湖南省名中医邵先舫教授工作室建设项目。

〔第一作者〕谢芳,男,博士,主治医师,从事骨关节的重建与修复研究。

〔通信作者〕* 陈绍军,男,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:chenshaojun0736@163.com;邵先舫,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail:shaoxianfang2021@163.com。

(p-p65) in knee joint osteoarthritis model rats. **Methods** A total of 32 SPF rats were randomly divided into normal group ($n=9$) and model group ($n=23$). The model group of rat knee osteoarthritis was established by the modified Hulth method. After modeling, 2 rats were randomly selected from each group to verify the modeling effects. The remaining 21 rats in model group were randomly divided into three groups: model group, Huoxi Decoction group (1281 mL/kg/d) and positive drug group (20 mg/kg/d), with 7 rats in each group. The normal group and model group were given the same volume of distilled water by gavage once a day, the Huoxi Decoction group was administered the Huoxi Decoction by gavage once a day, the positive drug group received the celecoxib solution by gavage once a day. After 4 weeks of gavage, the cartilage tissue samples of the rat knee joint were taken. HE staining and safranin O-fast green staining were taken to observe the pathological changes of chondrocytes in rat knee joint; the expression of CCL2, CCR2 and Caspase-1 mRNA was detected by RT-PCR; the expression of CCL2, CCR2, Caspase-1 and p-p65 was detected by Western blot; the pyroptosis of rat chondrocytes was detected by Tunel-IF (Caspase-1) fluorescence double staining. **Results** Compared with the normal group, the cartilage degeneration of model group was significantly aggravated, the level of cartilage pyroptosis was raised, the expression levels of CCL2 mRNA, CCR2 mRNA and Caspase-1 mRNA were significantly higher ($P<0.01$), and the expression levels of CCL2, CCR2, Caspase-1 and p-p65 protein were significantly higher ($P<0.01$). Compared with model group, the cartilage degeneration of Huoxi Decoction group and positive drug group was significantly improved, and the level of chondrocyte apoptosis was reduced. The expression levels of CCL2 mRNA, CCR2 mRNA and Caspase-1 mRNA were significantly lower ($P<0.01$), and the expression levels of CCL2, CCR2, Caspase-1 and p-p65 protein were significantly lower ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression levels of Caspase-1 mRNA and protein in positive drug group were significantly higher than those in Huoxi Decoction group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Huoxi Decoction can inhibit the pyroptosis of rat chondrocytes and improve the degeneration of rat articular cartilage by reducing the expression levels of CCL2, CCR2, Caspase-1, and p-p65.

[**Keywords**] Huoxi Decoction; knee osteoarthritis; chondrocyte; pyroptosis; chemokine ligand 2; chemokine receptor 2

膝关节关节炎(knee osteoarthritis, KOA),是以关节软骨退变、滑膜炎性增生、软骨下骨质硬化以及关节周围骨赘形成为主要病理表现的临床常见退变性疾病^[1]。在 KOA 的进展过程中,无菌性炎症既能导致关节的疼痛、肿胀,也是 KOA 持续进展的内在因素。机体无菌性炎症反应过程中由趋化因子配体 2(CC chemokine ligand 2, CCL2)及其受体(CC chemokine receptor 2, CCR2)介导的免疫应答以及核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路介导的促炎信号反应发挥了重要作用,而且 CCL2/CCR2 信号轴及 NF- κ B 信号通路也是目前研究 KOA 发病机制的重要切入点^[2-3]。

细胞焦亡是由半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)介导的与炎症反应高度相关的细胞程序性死亡方式。软骨细胞焦亡是关节软骨退变的重要方式之一,抑制软骨细胞焦亡是保护软骨细胞,防治 KOA 疾病进展的关键所在^[4]。活膝汤是湖南省名中医邵先航教授根据独活寄生汤加减而来,在临床应用中疗效显著^[5],但活膝汤干预 KOA 的分子机制尚未明确。本研究结合目前研究热点及前沿,以软骨细胞焦亡、CCL2/CCR2、NF- κ B 信号通路为立足点探讨活膝汤干预 KOA 的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 选取 8 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体质量 200~220 g)32 只。所有大鼠均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号:SCXK(湘)2019-0004。本实验大鼠在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养,室温 20~25℃,相对湿度 55%±5%,空气流通,普通饲料饲养,自由饮食,灯光明暗循环各 12 h。实验过程中遵循湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会标准,实验已由湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,批准号:ZYFY20210115。

1.1.2 实验药物 活膝汤组方(独活 15 g,桑寄生 15 g,续断 15 g,杜仲 15 g,骨碎补 15 g,川牛膝 15 g,秦艽 10 g,茯苓 10 g,细辛 6 g,甘草 6 g),以上药物均由湖南中医药大学附属常德医院药剂科提供。煎药流程:每剂中药在煎煮前先予以冷水浸泡 30 min,除去药材中的杂质,然后取出放入陶罐中,加入蒸馏水直至水面超过药物 4 cm 左右,首先武火煮至沸腾后改用文火继续慢煎约 30 min,滤出药汁;再次加入蒸馏水直至超过药渣约 2 cm,同法煎

制,将两次的药汁混合后,放入烧杯中加热浓缩至122 mL(即每1 mL药液含1 g原生药材),静置过滤取出药汁,高压灭菌,置4℃冰箱保存。塞来昔布胶囊(200 mg/粒,美国辉瑞制药有限公司,批号:s92534)。

1.1.3 实验试剂 还原型 SDS 上样缓冲液(5)、10% APS、10% SDS、TEMED、PBST 缓冲液、30% Acr/Bic、电泳液缓冲液、转膜缓冲液、丽春红染液(10)、RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、Super ECL Plus 超敏发光液(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号分别为:AWB0055、AWB0093、AWT0047、AWB0068、AWI0130、AWB0020、AWB0083、AWC0114、AWB0225、AWB0136、AWH0650、AWB0005);蛋白酶抑制剂(北京金泰宏达生物科技有限公司,批号:583794);显影液、定影液(上海佳信科技有限公司,批号分别为:BW-61、BW-62);琼脂糖(西班牙 BIONE 公司,批号:111860);上样缓冲液(6)、mRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物有限公司,批号分别为:CW0610、CW2569);EDTA(大连美伦生物技术有限公司,批号:MB2514);Tris(美国 Sigma 公司,批号:V900483);核酸染料(北京普利莱基因技术有限公司,批号:PB11141);CCL-2 抗体、Caspase-1 抗体(美国 Thermo 公司,批号分别为:PA5-34505、PA5-87536);CCR2 抗体、 β -actin 抗体、HRP 山羊抗鼠 IgG、HRP 山羊抗兔 IgG(美国 Proteintech 公司,批号分别为:16153-1-AP、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2);p-p65 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab76302)。

1.1.4 实验仪器 H1650R 型台式冷冻离心机(湖南湘仪有限公司);DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳槽、DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);GL-88B 型旋涡混合器(江苏其林贝尔仪器制造有限公司);JB-13 型磁力搅拌器(上海仪电科学仪器股份有限公司);BioPrep-24 型生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司);ChemiScope 6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪、SPL0960 型荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司);YD-315 型切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);BMJ-A 型包埋机(常州市中威电子仪器有限公司);BA210T 型普通显微镜、BA410T 型荧光显微镜(中国麦克奥迪科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 32 只健康 SD 大鼠,适应性饲养 1 周。先按照随机数字表法随机选取 9 只大鼠作为

正常组,不做任何干预措施;其余的 23 只大鼠为造模组,行手术造模。造模后随机从正常组和造模组分别取 2 只大鼠留取膝关节标本对比验证造模效果。造模成功后再按随机数字表法将剩余的 21 只大鼠随机分成 3 组:模型组、活膝汤组、阳性药物组,每组 7 只。

1.2.2 动物造模 采用改良 Hulth 造模法^[6]制备大鼠 KOA 模型。造模组大鼠予以水合氯醛行静脉麻醉,麻醉后,固定大鼠。取右后膝关节,上端接近髌关节,下端接近踝关节,局部脱毛、备皮、消毒、铺无菌巾。以大鼠膝关节内侧入路显露摘除内侧半月板,剪断前交叉韧带,行前抽屉试验,阳性则表示已剪断前交叉韧带。生理盐水冲洗关节腔后逐层缝合,无菌敷料包扎伤口,不予固定。术中注意勿损伤关节软骨面,彻底止血,严格无菌操作。手术后所有大鼠肌肉注射青霉素 80 000 U/只,连续 3 d。术后每日驱赶大鼠(包括正常组大鼠)进行负重活动,每次 20 min,每日 2 次,连续 4 周。造模后分别从正常组和造模组各取 2 只大鼠,麻醉处死后留取膝关节标本,观察大鼠膝关节造模效果。大鼠膝关节软骨表面形态改变,软骨面粗糙,软骨破坏,关节周围可见骨赘形成表明造模成功^[7]。

1.2.3 给药方法 大鼠造模成功后,每日灌胃 1 次,灌胃剂量根据“人与动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算。正常组与模型组予以 12.81 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 蒸馏水,活膝汤组予以 12.81 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 活膝汤,阳性药物组予以 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 塞来昔布(灌胃时溶解于 12.81 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 的蒸馏水中)。分别于给药后第 4 周,留取大鼠膝关节软骨组织标本,检测相关指标。

1.2.4 大鼠膝关节软骨组织病理形态学观察 切开大鼠右后肢膝关节,肉眼观察比较各组大鼠膝关节软骨退变及滑膜增生情况。取部分软骨组织,将组织浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中,固定 72 h;烤片、脱水后予以 HE 染色,树胶封片后显微镜观察。取部分软骨组织,烤片、脱水后予以番红 O-固绿染色,树胶封片,显微镜观察。

1.2.5 RT-PCR 检测 CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA 表达 应用 Trizol 试剂提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度。按照试剂操作盒说明书进行逆转录反应;以 Actin 为内参进行,反应条件为 95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 60 s,重复 40 个循环。各基因表达水平用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法进行统计。所有引物序列运用 Primer 5 软件设计,由上海生工合成引物,RNA 引物序列见表 1。

表 1 RNA 引物序列

引物	引物序列	扩增产物片段长度/bp
Actin	上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	下游 TACTCTGCTTGCTGATCCAC	
CASP1	上游 CTAGACTACAGATGCCAACCAC	128
	下游 GGCTTCTTATTGGCATGATTCCC	
CCL2	上游 AAACCAGCCAACCTCTCACT	200
	下游 GTAGTTCTCCAGCCGACTC	
CCR2	上游 TGTGAAGCAAATTGGAGCTTGG	184
	下游 GAATGGGAGTGTGAGCAGGAA	

1.2.6 Western blot 检测 CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65 蛋白表达 剪取约 0.025 g 组织样本,加入 300 μ L 的 RIPA 裂解液,裂解后提取蛋白;取 120 μ L 蛋白上清,加入 30 μ L $\times$ 5 loading buffer 混匀,沸水煮 5 min,放入冰盒中速冷备用。电泳(75 V,130 min)、转膜、封闭后用 1 $\times$ PBST 将一抗按照一定比例稀释,将膜与一抗一起孵育,室温放置 90 min;用 1PBST 稀释 HRP 标记的二抗,将稀释后的二抗与膜共同室温孵育 90 min;使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min,用滤纸吸尽液体,用塑封膜包裹杂交膜,在暗盒内与 X 胶片曝光后显影冲洗。

1.2.7 TUNEL-IF 双染检测软骨细胞焦亡情况 60 $^{\circ}$ C 烤片 12 h,切片脱蜡后蒸馏水浸洗,尿素胰酶抗原修复后切片依次置于硼氢化钠溶液、75%乙醇溶液、苏丹黑染液中漂洗,封闭后予以 1 $\times$ Equilibration Buffer 覆盖待检样本区域,室温孵育;加入 50 μ L TdT 孵育缓冲液,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,PBS 冲洗,滴加适当稀释的一抗(Caspase-1),4 $^{\circ}$ C 过夜;滴加 50~100 μ L 抗-兔-IgG 标记荧光抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min;DAPI 工作液 37 $^{\circ}$ C 染核 10 min,甘油封片后荧光显微镜下观察。

1.2.8 数据分析 所有实验数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,并用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学数据处理。各实验组间差异的显著性检验均采用方差分析和重复测量,满足方差齐时采用 LSD 法进行组间差异比较,方差不齐时采用 Tamhane's T2 法进行组间差异比较,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物造模效果验证

造模后分别从正常组和造模组各取 2 只大鼠,麻醉处死后留取膝关节标本,肉眼直视可见正常组大鼠膝关节软骨组织完整,表面光滑,未见明显软骨水肿或剥脱;造模组大鼠膝关节软骨面粗糙,软骨破坏,软骨下骨暴露,关节周围骨赘形成,证明造模成功。详见图 1。

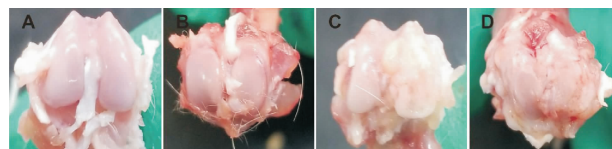


图 1 大鼠 KOA 模型验证

注:A.正常组大鼠膝关节股骨面;B.正常组大鼠膝关节胫骨面;C.造模组大鼠膝关节股骨面;D.造模组大鼠膝关节胫骨面。

2.2 活膝汤对 KOA 大鼠膝关节组织病理学的影响

肉眼直视下可见正常组大鼠膝关节软骨组织完整,软骨面光滑;模型组可见明显的软骨剥脱及软骨下骨硬化;活膝汤组及阳性药物组可见软骨面的退变但无明显软骨剥脱,周围无明显骨赘形成。详见图 2。

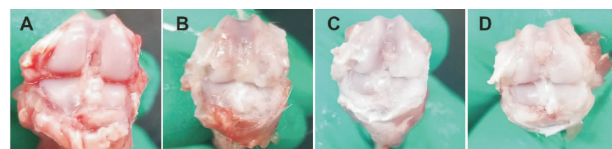
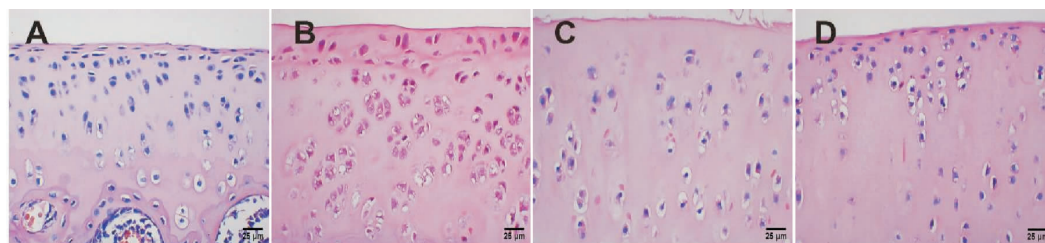


图 2 各组大鼠膝关节大体形态改变

注:A.正常组;B.模型组;C.活膝汤组;D.阳性药物组。

软骨组织 HE 染色显示,正常组大鼠软骨细胞排列整齐,胞外胶原纤维染色情况下呈浅粉色未见明显老化变性;模型组大鼠可见大量软骨细胞坏死,细胞核皱缩消失,炎性细胞浸润明显,胞外胶原纤维染色明显变深,胶原纤维透明变性;活膝汤组及阳性药物组大鼠软骨细胞存在一定程度的细胞坏死情况及炎性细胞浸润,但较模型组明显好转。详见图 3。

图 3 各组大鼠软骨组织 HE 染色($\times 400$)

注:A.正常组;B.模型组;C.活膝汤组;D.阳性药物组。

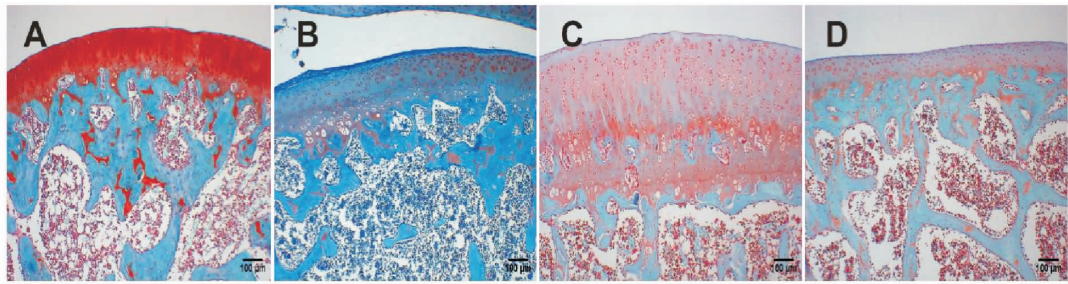


图4 各组大鼠软骨组织番红O-固绿染色(×100)
注:A.正常组;B.模型组;C.活膝汤组;D.阳性药物组。

软骨组织番红O-固绿染色显示,正常组软骨细胞排列整齐,软骨与软骨下骨分界清楚。模型组软骨坏死剥脱严重,软骨下骨增生硬化。活膝汤组及阳性药物组均存在软骨细胞坏死,但未见明显软骨组织剥脱,软骨细胞坏死情况较模型组明显好转。与阳性药物组对比,活膝汤组软骨细胞存活数量明显增加,软骨下骨硬化也有所缓解。详见图4。

2.3 活膝汤对KOA大鼠软骨CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠关节软骨中CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达水平均明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,活膝汤组及阳性药物组CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达水平明显降低($P<0.01$)。与活膝汤组比较,阳性药物组CCL2 mRNA表达水平降低($P<0.05$),CCR2、Caspase-1 mRNA表达水平增高($P<0.05$)。详见表2。

表2 活膝汤对KOA大鼠软骨CCL2、CCR2、Caspase-1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	CCL2	CCR2	Caspase-1
正常组	1.08±0.19	0.99±0.19	1.19±0.31
模型组	14.26±2.05**	6.81±1.07**	7.65±0.83**
活膝汤组	7.70±1.25 [#]	2.91±0.43 [#]	3.28±0.51 [#]
阳性药物组	5.81±1.55 ^{#▲}	4.47±1.20 ^{#▲}	4.59±1.14 ^{#▲}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与活膝汤组比较,▲ $P<0.05$ 。

表3 活膝汤对KOA大鼠软骨CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	CCL2/β-actin	CCR2/β-actin	p-p65/β-actin	Caspase-1/β-actin
正常组	0.08±0.02	0.08±0.03	0.08±0.02	0.13±0.04
模型组	0.36±0.10**	0.54±0.05**	0.48±0.02**	0.81±0.12**
活膝汤组	0.24±0.04 [#]	0.24±0.05 [#]	0.30±0.02 [#]	0.38±0.12 [#]
阳性药物组	0.14±0.05 [#]	0.39±0.07 ^{#▲▲}	0.35±0.02 ^{#▲}	0.64±0.02 ^{#▲▲}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与活膝汤组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

2.4 活膝汤对KOA大鼠软骨CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠关节软骨中CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达水平均明显增高($P<0.01$);与模型组比较,活膝汤组及阳性药物组大鼠关节软骨中CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达水平明显降低($P<0.01, P<0.05$)。与活膝汤组比较,阳性药物组CCL2蛋白表达水平降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);CCR2、Caspase-1、p-p65表达水平增高($P<0.05, P<0.01$)。详见图5、表3。

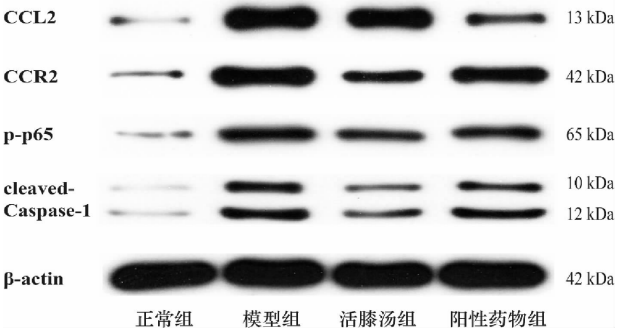


图5 各组CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65蛋白表达电泳

2.5 活膝汤对KOA大鼠软骨细胞焦亡的影响

与正常组对比,模型组大鼠Caspase-1及Tunel荧光明显增多,Caspase-1介导的软骨细胞焦亡水平增高。与模型组对比,活膝汤组及阳性药物组大鼠Caspase-1及Tunel荧光明显减少,Caspase-1介导的软骨细胞焦亡水平降低。详见图6。

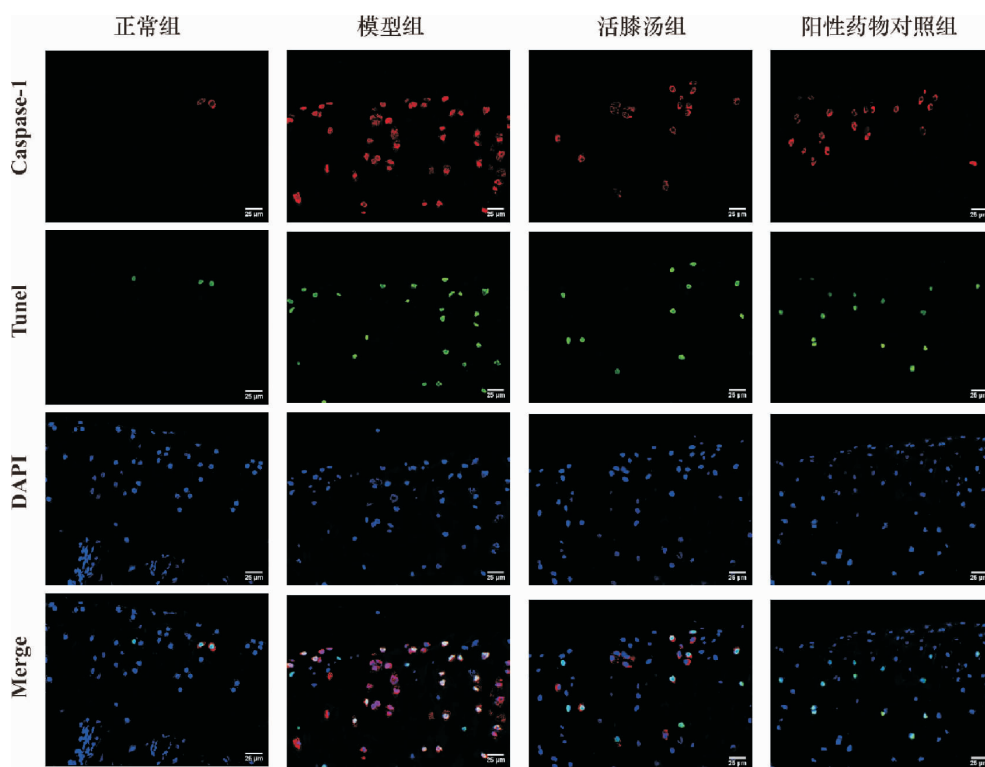


图6 活膝汤对KOA大鼠软骨细胞焦亡的影响($\times 400$)

3 讨论

细胞焦亡是一种由炎性小体介导的炎性程序性细胞死亡方式,可破坏细胞的完整性并导致细胞内容物的释放^[8]。目前研究最为深入的是由Caspase-1介导的经典细胞焦亡途径,当细胞接受外界刺激信号后Caspase-1前体与相关蛋白组装成炎性小体,Caspase-1前体在炎性小体的作用下裂解为Caspase-1,Caspase-1激活后启动下游的一系列机制,最终诱导细胞焦亡^[9]。据报道,在关节炎患者的滑膜积液中发现的炎性小体的表达水平是正常人的5倍^[10]。此外,GEN等^[11]在脂多糖诱导的KOA模型大鼠中发现由Caspase-1介导的软骨细胞焦亡被激活,证明软骨细胞焦亡是KOA进展的重要因素。本研究结果表明,与正常组对比,模型组大鼠膝关节直观可见软骨层明显变薄,软骨剥脱严重;软骨组织病理染色可见模型组细胞坏死,软骨下骨硬化。RT-PCR及Western blot结果显示,模型组软骨组织中Caspase-1表达显著增多;组织荧光双染结果也证明模型组软骨组织中Caspase-1表达及软骨细胞坏死明显增加,这证明Caspase-1介导的细胞焦亡途径参与了软骨退变的过程。

CCL2是CCR2的关键配体,宿主炎症部位释放CCL2进入循环系统,CCL2与白细胞表面的CCR2受体结合,通过CCL2在循环系统中的浓度梯度的变化将免疫细胞迁徙至炎症部分,完成其免疫细胞

迁徙及免疫反应应答的作用^[12]。CCL2/CCR2信号轴主要通过两个途径参与关节软骨的退变过程。一方面,退变关节的慢性炎症释放CCL2,CCL2通过与CCR2结合募集大量免疫细胞吸附于关节软骨上,加重退变部位的炎症反应加速软骨退变^[13]。另一方面,退变部分的炎性滑膜及坏死的软骨细胞释放的CCL2与软骨细胞表面的CCR2受体结合,启动下游应答机制促进软骨的降解^[14]。NF- κ B信号通路是研究KOA病理机制的重要靶点,磷酸化p65(phosphorylated p65,p-p65)蛋白是NF- κ B信号通路激活的标志^[15]。NF- κ B信号通路通过上调胶原蛋白降解酶的表达以及促进软骨细胞肥大等作用机制参与KOA的病理过程^[16]。研究表明,NF- κ B信号通路激活后能上调炎性小体相关蛋白以及细胞焦亡效应底物的表达,从而促进Caspase-1介导的经典细胞焦亡途径^[17-18]。在本研究中与正常组对比,模型组大鼠软骨组织中CCL2、CCR2、p-p65、Caspase-1蛋白表达水平显著增高,提示CCL2/CCR2及NF- κ B信号通路可能通过上调Caspase-1的表达促进软骨细胞焦亡,证明了CCL2/CCR2信号轴及NF- κ B信号通路对大鼠KOA疾病进展的促进作用。

中晚期KOA患者由于病邪入侵经脉,病程迁延反复,疾病由实证转为虚证或虚实夹杂^[19]。活膝汤由独活、桑寄生等九味药组方而成,方中:桑寄生、续断、杜仲、骨碎补均入肝肾经,取其补益肝肾、强筋壮骨之功效,治病之根本,为君药;独活、茯苓祛湿消肿

为臣药;秦艽、细辛散寒止痛为佐药;川牛膝活血通络,引药下行,甘草调和诸药为使药。诸药配伍,标本兼治,共奏补益肝肾、除湿散寒、活血通络之功。现代药理学研究显示,活膝汤组方中的独活^[20]、桑寄生^[21]、秦艽^[22]、细辛^[23]、茯苓^[24]均具有抗炎的效果,其中桑寄生、细辛、秦艽的化学成分镇痛效果优异。本研究结果显示,应用活膝汤干预后大鼠软骨退变情况明显改善,CCL2、CCR2、Caspase-1、p-p65的表达水平显著下降,提示活膝汤通过抑制 CCL2/CCR2 信号轴以及 NF- κ B 信号通路的激活,调控 Caspase-1介导的软骨细胞焦亡,延缓大鼠膝关节软骨的退变。除此之外,与阳性药物对照组比较,活膝汤组 Caspase-1及p-p65的表达水平更低,证明活膝汤对 Caspase-1介导的软骨细胞焦亡及 NF- κ B 信号通路的抑制作用要强于阳性对照药物。在研究结果中,虽然CCL2、CCR2、p-p65的表达变化趋势同步变化,但 CCL2/CCR2 信号轴与 NF- κ B 信号通路在软骨细胞焦亡途经中的相互调控作用仍需进一步的实验证明。

综上所述,活膝汤通过抑制 Caspase-1 介导的软骨细胞焦亡延缓大鼠膝关节软骨的退变,其作用机制可能与活膝汤对 CCL2/CCR2 以及 NF- κ B 信号通路的调控作用有关。本研究结果初步证实了活膝汤对软骨细胞焦亡的抑制作用,为进一步研究活膝汤干预 KOA 的具体分子机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] 何花,董大立.丹紫康膝冲剂通过抑制 IKK/I κ B/NF- κ B 信号通路改善膝骨关节炎大鼠关节软骨、血瘀状态的作用研究[J].中医药导报,2021,27(10):42-48.
- [2] STANKOVIC A, SLAVIC V, STAMENKOVIC B, et al. Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity[J]. Bratislavske Lekarske Listy, 2009, 110(10): 641-646.
- [3] GUAN T, DING L G, LU B Y, et al. Combined administration of curcumin and chondroitin sulfate alleviates cartilage injury and inflammation via NF- κ B pathway in knee osteoarthritis rats[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 882304.
- [4] ZU Y, MU Y, LI Q, et al. Icaritin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2019, 14(1): 307.
- [5] MCERLAIN D D, PITEKKA V, et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: Characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2007, 9(1): R13.
- [6] 戚晴雪,马玉峰,吴忌,等.低频超声促透通络止痛方对大鼠不同程度膝骨关节炎的影响[J].南京中医药大学学报,2014,30(3):244-248.
- [7] AN S B, HU H Y, LI Y S, et al. Pyroptosis plays a role in osteoarthritis[J]. Aging and Disease, 2020, 11(5): 1146-1157.
- [8] ZHANG T, DING S Z, WANG R. Research progress of mitochondrial mechanism in NLRP3 inflammasome activation and exercise regulation of NLRP3 inflammasome[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10866.
- [9] CLAVIJO-CORNEJO D, MARTINEZ-FLORES K, SILVA-LUNA K, et al. The overexpression of NALP3 inflammasome in knee osteoarthritis is associated with synovial membrane prolidase and NADPH oxidase 2[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 1472567.
- [10] LI G, XIU L J, LI X Y, et al. MiR-155 inhibits chondrocyte pyroptosis in knee osteoarthritis by targeting SMAD2 and inhibiting the NLRP3/Caspase-1 pathway[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2022, 17(1): 48.
- [11] ZHU S P, LIU M, BENNETT S, et al. The molecular structure and role of CCL2 (MCP-1) and C-C chemokine receptor CCR2 in skeletal biology and diseases[J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(10): 7211-7222.
- [12] RAGHU H, LEPUS C M, WANG Q, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2017, 76(5): 914-922.
- [13] XU Y K, KE Y, WANG B, et al. The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis[J]. Biological Research, 2015, 48: 64.
- [14] JIMI E, FEI H, NAKATOMI C. NF- κ B signaling regulates physiological and pathological chondrogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6275.
- [15] 郑晓慧,董博,袁普卫,等. NF- κ B 信号通路在骨性关节炎软骨破坏中的研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2021,27(7):540-544.
- [16] GUO H T, CALLAWAY J B, TING J P Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. Nature Medicine, 2015, 21(7): 677-687.
- [17] LIU Z J, GAN L, XU Y T, et al. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue[J]. Journal of Pineal Research, 2017, 63(1): 10.1111/jpi.12414.
- [18] 刘永利,谢芳,戴斌玉,等.邵先舫教授辨证治疗膝骨关节炎临床经验[J].湖南中医药大学学报,2022,42(1):104-108.
- [19] 周璐丽,曾建国.独活化学成分及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2019,21(12):1739-1748.
- [20] 朱开昕,苏本伟,李永华,等.桑寄生药理作用及临床应用研究进展[J].现代医学与健康研究电子杂志,2018,2(12):189-190.
- [21] 聂安政,林志健,王雨,等.秦艽化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(3):597-608.
- [22] 吴昊,温晓茵,颜鹏,等.细辛的化学成分及药理作用研究进[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(4):186-195.
- [23] 崔鹤蓉,王睿林,郭文博,等.茯苓的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].西北药学杂志,2019,34(5):694-700.