

本文引用: 曹寅生, 易强, 邝高艳, 危建文, 金久楚, 罗振华. 基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝关节炎模型软骨退变的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 240-248.

# 基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝关节炎模型软骨退变的作用机制

曹寅生<sup>1</sup>, 易强<sup>2</sup>, 邝高艳<sup>1</sup>, 危建文<sup>2</sup>, 金久楚<sup>2</sup>, 罗振华<sup>1\*</sup>

1.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

**[摘要]** **目的** 观察追风透骨胶囊对兔膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型关节软骨退变的干预作用,并基于Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)/髓细胞分化初级反应蛋白88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/核因子 $\kappa$ -B(nuclear factor  $\kappa$ -B, NF- $\kappa$ B)信号通路探讨追风透骨胶囊的可能作用机制。**方法** 从50只6月龄雄性新西兰兔中随机选取10只作为正常组,其余40只为KOA造模组,用改良Videman造模法制备兔KOA模型。模型验证后,从正常组中随机选取6只作为空白组(A组),KOA造模组抽取30只随机分为模型组(B组)、硫酸氨基葡萄糖组(C组)、追风透骨胶囊低剂量组(D组)、追风透骨胶囊中剂量组(E组)、追风透骨胶囊高剂量组(F组),每组6只。A、B组予蒸馏水灌胃,C、D、E、F组予相应药物灌胃,疗程均为6周。给药结束后,取造模侧膝关节软骨,予大体及HE染色观察,并用Pelletier评分及Mankin评分评估;以Western blot、RT-PCR法检测软骨中TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B蛋白及其mRNA的表达;免疫组化法检测白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的含量。**结果** 与A组比较,B组膝关节软骨破坏明显,Pelletier评分及Mankin评分均升高( $P<0.01$ ),软骨中TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B蛋白及其mRNA表达水平均上调( $P<0.01$ ),IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均升高( $P<0.01$ )。与B组比较,C、D、E、F组的软骨损伤程度轻,软骨Mankin评分均降低( $P<0.01$ ),软骨中TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA表达水平均下调( $P<0.01$ ),IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均降低( $P<0.01$ ),此外,F组软骨Pelletier评分较B组降低明显( $P<0.05$ )。**结论** 追风透骨胶囊能延缓改良Videman造模法诱导的兔KOA模型关节软骨退变,其作用机制可能与下调软骨中TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA的表达,抑制TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路的活化,降低IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 在软骨中的含量,从而减轻炎症反应相关。

**[关键词]** 膝关节炎;追风透骨胶囊;Toll样受体4;髓细胞分化初级反应蛋白88;核因子 $\kappa$ -B;白细胞介素-1 $\beta$ ;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- $\alpha$

[中图分类号]R274.9

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.010

## The mechanism of Zhuifeng Tougu Capsule for slowing down cartilage degeneration in rabbit model with knee osteoarthritis based on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway

CAO Yinsheng<sup>1</sup>, YI Qiang<sup>2</sup>, KUANG Gaoyan<sup>1</sup>, WEI Jianwen<sup>2</sup>, JIN Jiuchu<sup>2</sup>, LUO Zhenhua<sup>1\*</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the intervention effects of Zhuifeng Tougu Capsule on articular cartilage degeneration in rabbit model with knee osteoarthritis (KOA), and to explore the possible mechanism of Zhuifeng Tougu Capsule based on Toll like receptor 4 (TLR4)/Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)/nuclear factor  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **Methods** From 50 6-month-old male New Zealand rabbits, we randomly selected 10 rabbits as normal group, and the other 40 as KOA model group. The rabbit KOA model was prepared by the modified Videman modeling. After model verification, 6 rabbits

[收稿日期]2022-03-27

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2020JJ5422)。

[第一作者]曹寅生,男,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:骨关节疾病的中医药防治。

[通信作者]\*罗振华,男,博士研究生,副主任医师,E-mail:376028394@qq.com。

from the normal group were randomly selected as the blank group (Group A), and 30 rabbits from the KOA model group were randomly divided into model group (Group B), glucosamine sulfate group (Group C), low-dose Zhuifeng Tougu Capsule group (Group D), medium-dose Zhuifeng Tougu Capsule group (Group E), and high-dose Zhuifeng Tougu Capsule group (Group F), with 6 rabbits in each group. Group A and Group B were given intragastric gavage of distilled water, and Groups C, D, E and F were given intragastric gavage of the corresponding drugs. All the above courses of treatment were 6 weeks. After administration, the cartilage of the knee joint in the model was taken for gross observation and HE staining observation, and was evaluated with Pelletier score and Mankin score; TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B protein and its mRNA expression in cartilage were detected by Western blot and RT-PCR; the content of its interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with Group A, in Group B, the cartilage of knee joint was damaged significantly, Pelletier score and Mankin score both increased ( $P<0.01$ ), TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B protein and the expression levels of mRNA in cartilage were up-regulated ( $P<0.01$ ), and the content of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  increased ( $P<0.01$ ). Compared with Group B, in Groups C, D, E and F, the degree of cartilage injury was mild, Mankin score of cartilage decreased ( $P<0.01$ ), TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B protein and the expression levels of mRNA in cartilage were down-regulated ( $P<0.01$ ), and the content of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  decreased ( $P<0.01$ ). Besides, the Pelletier score of cartilage in Group F was significantly lower than that in Group B ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Zhuifeng Tougu Capsule can delay the degeneration of articular cartilage in rabbit KOA model induced by the modified Videman modeling. Its mechanism may be related to the down-regulation of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B protein and mRNA expression in cartilage, inhibiting activation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway, and reducing the content of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in cartilage, thereby alleviating inflammatory reaction.

[**Keywords**] knee osteoarthritis; Zhuifeng Tougu Capsule; Toll like receptor 4; myeloid differentiation primary response protein 88; nuclear factor kappa-B; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; tumor necrosis factor- $\alpha$

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨逐渐破坏为重要特征的退行性关节疾病<sup>[1]</sup>,在成年人中其发病率随年龄的增长而上升,是老年人重要的致残因素之一,目前其发病机制尚未充分研究<sup>[2]</sup>。一直以来,无完全治愈骨关节炎疾病的特效药物,可用的治疗方法主要集中在缓解症状和延缓疾病进展上<sup>[3]</sup>,不同药物治疗 KOA 的作用机制也有待研究。中医药治疗因其独特的作用机制,在防治骨关节疾病中有着特殊的优势。追风透骨胶囊是由经典名方小活络丹、苓桂术甘汤、九味羌活汤化裁而来,具有祛风除湿、通经活络、散寒止痛之功效,对治疗 KOA 具有明显疗效。临床研究表明,单独使用与追风透骨胶囊相同药物组成的追风透骨丸治疗 KOA,可显著缓解膝关节疼痛并改善其功能<sup>[4]</sup>,其改进剂型追风透骨胶囊在临床上联合玻璃酸钠治疗 KOA,同样可有效缓解患者早中期 KOA 疼痛症状并改善膝关节功能<sup>[5]</sup>。

骨关节炎患者软骨组织中 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)/髓细胞分化初级反应蛋白 88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/核因子 kappa-B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路呈持续活化状态,骨关节炎的发生、进展可能与之相关<sup>[6]</sup>。追风透骨胶囊治疗 KOA

的作用机制可能与 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路相关,与白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )促炎细胞因子的分泌相关。本研究拟通过动物实验,阐明追风透骨胶囊治疗 KOA 动物模型、缓解 KOA 进展的作用机制,为中医药防治 KOA 提供有效的动物实验理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康雄性 6 月龄新西兰大白兔 50 只,清洁级,体质量(2500 $\pm$ 500) g,动物购买及饲养均于湖南中医药大学动物实验中心完成[动物许可证号:SCXK(湘)2020-0005;单位许可证号:SYXK(湘)2019-0009]。本实验经湖南中医药大学伦理委员会批准(伦理审查号:LLBH-202007070001)。

### 1.2 主要药物与试剂

追风透骨胶囊(天地横一制药股份有限公司,规格:0.26 g/粒,批号:200505);硫酸氨基葡萄糖胶囊(浙江海正药业股份有限公司,规格:0.314 g/粒,批号:71812133);miRNA 逆转录试剂盒(康为世纪有限公司,批号:CW2141);SuperECLPlus 超敏发光液(美

国 Advansta 公司,批号:K-12045-D50);兔 NF- $\kappa$ B 抗体、TLR4 抗体、MyD88 抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 10745-1-AP、19811-1-AP、23230-1-AP);二步法试剂盒、DAB 试剂盒(中杉金桥有限公司,批号分别为 600D54、600W23);兔 IL-6 抗体、IL-1 $\beta$  抗体、TNF- $\alpha$  抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-6312R、bs-0812R、bs-7320R)。

### 1.3 主要仪器

台式冷冻离心机(湖南湘仪有限公司,型号:H1650R);荧光定量 RCP 仪、荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司,型号分别为 PIKOREAL96、SPL0960);电泳仪、水平琼脂糖电泳槽(北京六一有限公司,型号分别为 DYY-2C、DYCP-31DN);摇床(型号:TS-1)旋涡混合器(型号:GL-88B)均购自江苏其林贝尔有限公司;磁力搅拌器(中国雷磁有限公司,型号:JB-13);-80℃冰箱(中国美菱有限公司,型号:DW-HW438)。

## 2 方法

### 2.1 造模

参考改良 Videman 造模法<sup>[7-8]</sup>造模。(1)用卷尺测量兔左侧踝关节上约 1 cm 小腿的周长记录为下周长,测量腹股沟下约 0.5 cm 左侧大腿根部的周长,记录为上周长,用直尺测量兔左下肢完全伸直状态下大腿内侧中线上踝关节上约 1 cm 至大腿根部下约 0.5 cm 的直线长度,记录为纵轴长。剪取长度保证足够包裹兔左下肢 1 周的高分子绷带,离体制作成管型,管型高分子绷带的一端内表面周长为下周长加 3~4 cm,另一端内表面周长为上周长加 0.5 cm,管型的长度为纵轴长。先用剪刀修剪管型高分子绷带两端尖锐部分并使之整齐圆润,然后以数层透明胶带包裹其上下两端及外表面。在离管型高分子绷带上端约 0.5 mm 处,用老虎钳把 1 mm 的铁丝穿过管型,打结后拧成一个直径约为 8 mm 的金属环,检测其牢固程度,将宽 10 cm、长 30 cm 的弹性绷带穿过金属环。在助手的帮助下使兔左下肢处于完全伸直状态,然后缓慢地将其左下肢自上而下插入管型高分子绷带中,把弹性绷带打结,使之环绕大腿根部前方的躯干 1 周,调整悬吊式外固定支具,使之固定兔左膝关节于伸直位而不脱落。(2)将兔放回笼中观察 1 h,如兔左下肢因造模支具过度压迫导

致血运障碍,则立即剪断弹性绷带,取下管型高分子绷带,待后左下肢血运正常后重新调整造模;若血运良好,则先在管型高分子绷带外表面及上下缘缠绕包裹细铁丝网,再用数层透明胶带覆盖,防止管型高分子绷带被啃咬破坏。每天观察造模支具佩戴情况,连续观察 6 周。造模期内,如发现造模支具脱落或模型兔造模侧下肢出现损伤,予以重新固定。模型验证:造模 6 周后,从正常组和 KOA 造模组中按随机数字表法各选取 3 只兔行 KOA 模型验证,验证方法包括观察对比两组兔造模侧膝关节的功能活动,以及膝关节软骨大体观察及 HE 染色观察对比。若造模组较正常组膝关节活动功能障碍,关节软骨破坏明显,Peletier 评分及 Mankin 评分明显升高,则造模成功。验证成功后,完成药物干预阶段的随机分组,第 2 天以灌胃的方式开始给药。

### 2.2 分组及给药

适应性喂养 2 周后,从 50 只新西兰兔随机选取 10 只作为正常组,其余 40 只为 KOA 造模组。造模观察 6 周后,从 KOA 造模组和正常组中各随机选取 3 只兔行 KOA 模型验证,KOA 模型验证成功后重新随机分组,从剩余的正常组中随机选取 6 只作为空白组(A 组),将剩余的 KOA 造模组抽取 30 只随机分为模型组(B 组)、硫酸氨基葡萄糖组(C 组)、追风透骨胶囊低剂量组(D 组)、追风透骨胶囊中剂量组(E 组)、追风透骨胶囊高剂量组(F 组),每组 6 只。重新分组后开始给药,E 组:根据追风透骨胶囊成人每次用量为 1.04 g,2 次/d,则 60 kg 成人每千克每次用药量为 17 mg,参照剂量-体表面积换算方法<sup>[9]</sup>计算兔给药量。得出兔每次的给药量为 56 mg/kg,药物和蒸馏水混合后充分搅拌均匀,配制成混悬液,灌胃量为 10 mL/kg,2 次/d。D 组:给药量为 28 mg/kg,灌胃量为 10 mL/kg,2 次/d。F 组:给药量为 112 mg/kg,灌胃量为 10 mL/kg,2 次/d。C 组:硫酸氨基葡萄糖给药量为 50 mg/kg,灌胃量为 10 mL/kg,2 次/d。A、B 组:予蒸馏水灌胃,灌胃量为 10 mL/kg,2 次/d。

### 2.3 观察指标及检测

外科无菌操作暴露兔造模侧膝关节软骨面,在完成对关节软骨的大体观察及 Peletier 评分<sup>[10]</sup>后,在冰盒上取下股骨远端及胫骨平台的膝关节软骨组织,部分置于冻存管中-80℃冻存,用于提取研究相关的蛋白及 mRNA,检测软骨中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6

的含量,部分用于 HE 染色观察及 Mankin 评分<sup>[11]</sup>。

### 2.3.1 造模侧膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分

药物干预 6 周后,空气栓塞处死实验兔,解剖每只兔造模侧膝关节,对关节软骨行大体观察并拍取照片,采用 Pelletier 评分<sup>[10]</sup>评估软骨损伤情况。0 分:关节面光整,色泽如常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:软骨剥脱,软骨下骨暴露。软骨损伤程度与分数呈正相关。

### 2.3.2 膝关节软骨 HE 染色观察及 Mankin 评分

对大体观察及 Pelletier 评分完成后的软骨标本进行处理,切取适量关节软骨,予固定、脱钙、石蜡包埋处理。将石蜡包埋的软骨组织切成 5  $\mu\text{m}$  厚的切片,用二甲苯脱蜡,依次用不同浓度梯度的乙醇浸泡后蒸馏水洗净。详细染色操作顺序如下:蒸馏水冲洗 3 min,苏木精染色 5 min,蒸馏水洗 5 s,浸入 1% 盐酸-乙醇 5 s,流水冲洗 10 min,1% 伊红染色 2 min,蒸馏水洗净 5 s。切片进行常规处理(脱水和透明),在显微镜下观察切片,倍数为 10 $\times$ 10,参照改良 Mankin 评分<sup>[11]</sup>。(1)软骨结构:光滑如常为 0 分;表面出现不规则裂隙为 1 分;裂隙深达移行层为 2 分;裂隙深达辐射层为 3 分;裂隙深达钙化层为 4 分。(2)软骨细胞:数量如常为 0 分;数量弥散性增多为 1 分;出现大量簇集样细胞团块为 2 分;数量明显减少为 3 分。(3)基质染色:正常为 0 分;染色轻度减退为 1 分;染色中度减退为 2 分;染色重度减退为 3 分。(4)潮线完整性:完整为 0 分;多重潮线为 1 分;软骨下血管侵入潮线为 2 分。对软骨病理学改变进行评估,软骨病理改变程度与分数呈正相关。随后采集图片资料。

### 2.3.3 RT-PCR 法检测软骨中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达水平

取各组冻存的膝骨关节炎软骨组织,采用 RT-PCR 法进行检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达。加入 Trizol 试剂进行裂解,提

取总 RNA。再逆转录为 cDNA,然后进行 PCR 反应。PCR 反应体系为:cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,PrimerR(10  $\mu\text{mol}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,PrimerF(10  $\mu\text{mol}$ )1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu\text{L}$ ,2XSYB-GREENPCRMasterMix 15  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,循环 40 次。反应结束后采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算各基因相对表达量。引物序列见表 1。

### 2.3.4 Western blot 法检测软骨中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达

取各组冻存的 KOA 软骨组织,采用 Western blot 法检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达。经剪碎、RIPA 裂解液裂解,以 12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 6 cm)。收集上清液,即为总蛋白液。采用 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白经变性后进行 SDS-PAGE,转膜,转膜完毕后置入 PBST 中洗净。将膜浸入脱脂奶粉封闭液,室温放置 60 min,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,次日室温放置 30 min。一抗孵育:5%脱脂奶粉稀释一抗,与膜在 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜孵育。孵育完成后洗膜 3 次,每次 10 min。二抗孵育:5%脱脂奶粉稀释二抗,与膜室温下孵育 90 min。孵育完成后洗膜 3 次,每次 10 min。显色与曝光:将膜置入 ECL 化学发光液,孵育完成后用纸滤干,用化学发光成像仪拍照。

### 2.3.5 免疫组化检测软骨中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量

取各组冻存的膝骨关节炎软骨组织,采用免疫组化法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量。予固定、脱钙、石蜡包埋处理,再切片,并用二甲苯脱蜡,不同浓度梯度的乙醇浸泡后蒸馏水洗净,进行抗原修复,再将切片浸入 3%过氧化氢溶液 5 min 来阻断内源性过氧化物酶,然后用缓冲液封闭。加一抗:将 200  $\mu\text{L}$  兔一抗滴加到切片上,并在室温下孵育 80 min。加二抗:滴加 80  $\mu\text{L}$  兔二抗,100  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。DAB 显色:滴加适量 DAB 显色剂,待反应完成后自来水洗涤。复染:将切片置入苏木素 4 min,流水冲洗,PBS 返蓝。脱水封片,显微镜下采集数据及图片。

表 1 兔引物序列

基因	正向引物	反向引物	长度/bp
TLR4	AGAAATCTGGGAGCCCTGTG	GCTATGGCTGCCTAAATGCTC	151
MYD88	CCCTTTGTCTCTCGACTCTTGG	TACGAGAACAGCCACTGCC	185
NF- $\kappa$ B	ATGCCAATGCCCTCTCGACT	CGTGACTCCAGCAGATCCCT	164

## 2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件行数据分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若同时满足正态性和方差齐性,多组数据比较采用单因素方差分析,多组间两两比较用 LSD 法;若不满足正态性和方差齐性,采用非参数检验, *Kruskal-Wallis* 法。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分结果

A 组:关节软骨颜色、光泽、厚度正常,软骨完整无损伤。B 组:关节软骨颜色灰白,无光泽,厚度明显变薄,表面凹凸不平,关节面承重区域软骨有明显破坏,甚至向下凹陷形成溃疡直至软骨深层,骨赘形成。C 组:关节软骨呈淡灰白色,光泽稍差,厚度稍变薄,关节软骨面部分区域表层软骨见少许破坏。D 组:关节软骨颜色发黄,光泽较差,厚度较薄,表面凹凸不平,关节面承重区域软骨有明显破坏,甚至向下凹陷形成溃疡直至软骨中层,有少量骨赘形成。E 组:关节软骨呈淡灰白色,光泽稍差,厚度稍变薄,关节软骨面部分区域粗糙。F 组:关节软骨呈淡灰白色,光泽稍差,厚度稍变薄,关节软骨面部分区域粗糙。详见图 1。

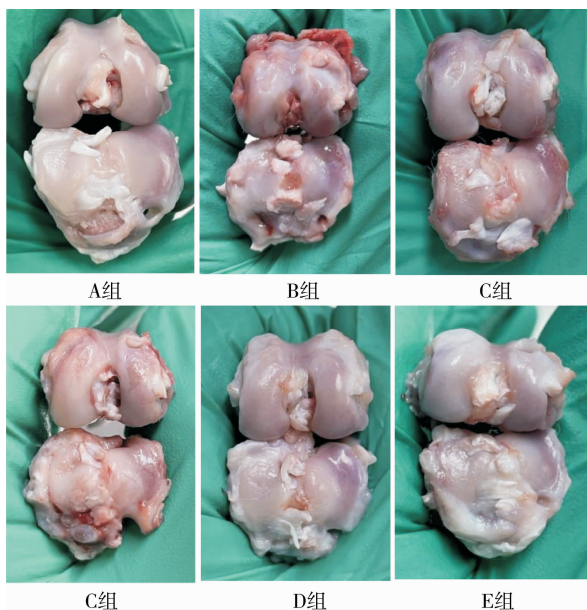


图 1 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨大体观察结果

给药 6 周后,与 A 组比较,B 组 Pelletier 评分增高( $P<0.01$ );与 B 组比较,F 组 Pelletier 评分降低( $P<$

$0.05$ ),C、D、E 组 Pelletier 评分较 B 组均有不同程度的降低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 2。

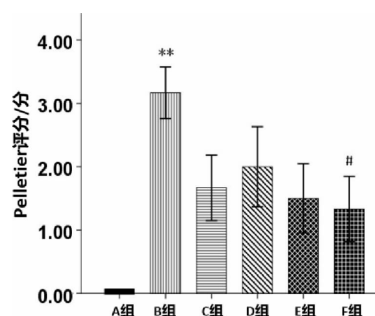


图 2 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨 Pelletier 评分结果

注:与 A 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,# $P<0.05$ 。

### 3.2 膝关节软骨 HE 染色镜下观察结果

A 组:软骨 HE 染色正常,无病理学改变。B 组:软骨显著变薄,表层软骨区域性缺失,软骨细胞数量显著减少并排列紊乱,可见血管入侵软骨基层,软骨下骨质硬化。C 组:软骨变薄,表层软骨有小的缺损,软骨细胞数量稍减少,部分软骨细胞呈簇聚状排列。D 组:软骨变薄,表层软骨部分区域破损,软骨细胞数量减少,部分软骨细胞呈簇聚排列。E 组:软骨变薄,表层软骨有小的缺损,软骨细胞数量稍减少,排列大致正常。F 组:软骨变薄,表层软骨有小的缺损,软骨细胞数量稍减少,排列大致正常。详见图 3。

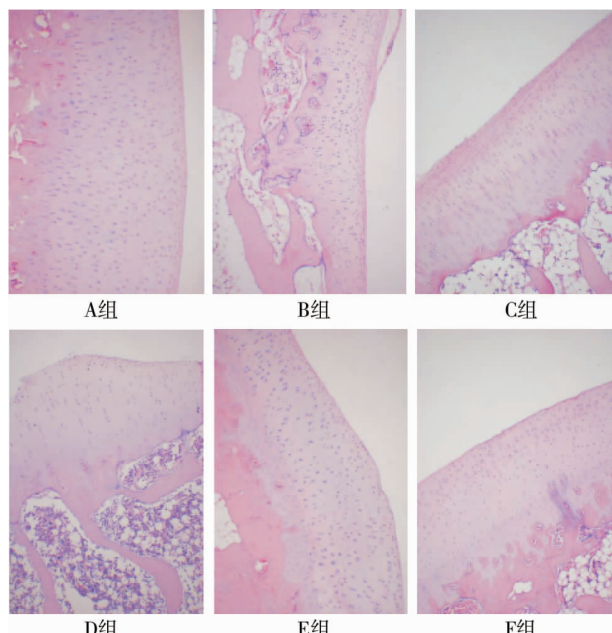


图 3 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨 HE 染色结果( $\times 100$ )

### 3.3 膝关节软骨 Mankin 评分结果

给药 6 周后,与 A 组比较,B 组 Mankin 评分增高( $P<0.01$ );与 B 组比较,C、D、E、F 组 Mankin 评分均降低( $P<0.01$ )。与 C 组比较,E、F 组软骨 Mankin 评分稍低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 4。

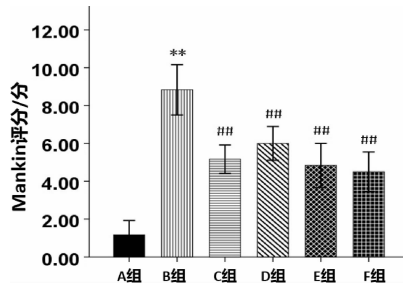


图 4 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨大体观察的 Mankin 评分结果

注:与 A 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,### $P<0.01$ 。

### 3.4 膝关节软骨中 TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 的表达

给药 6 周后,与 A 组比较,B 组软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 表达水平均上调( $P<0.01$ )。与 B 组比较,C、D、E、F 组软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 表达水平均下调( $P<0.01$ )。详见图 5。

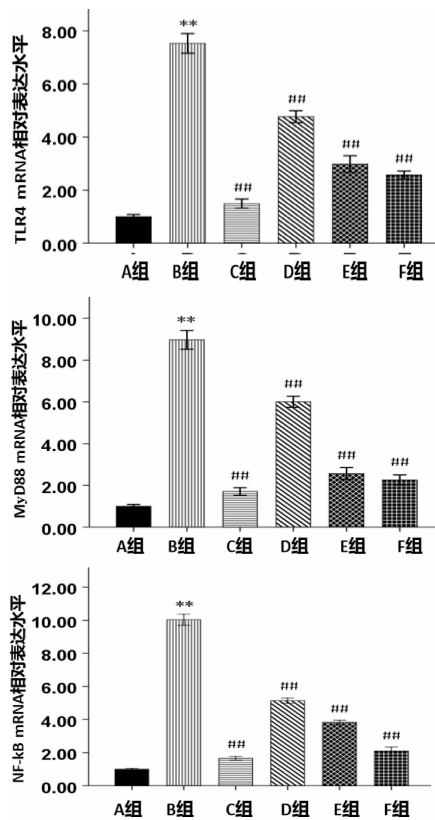


图 5 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中

TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 的表达结果

注:与 A 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,### $P<0.01$ 。

### 3.5 膝关节软骨中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白的表达

给药 6 周后,与 A 组比较,B 组软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达水平均上调( $P<0.01$ );与 B 组比较,C、D、E、F 组软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达水平均下调( $P<0.01$ )。详见图 6。

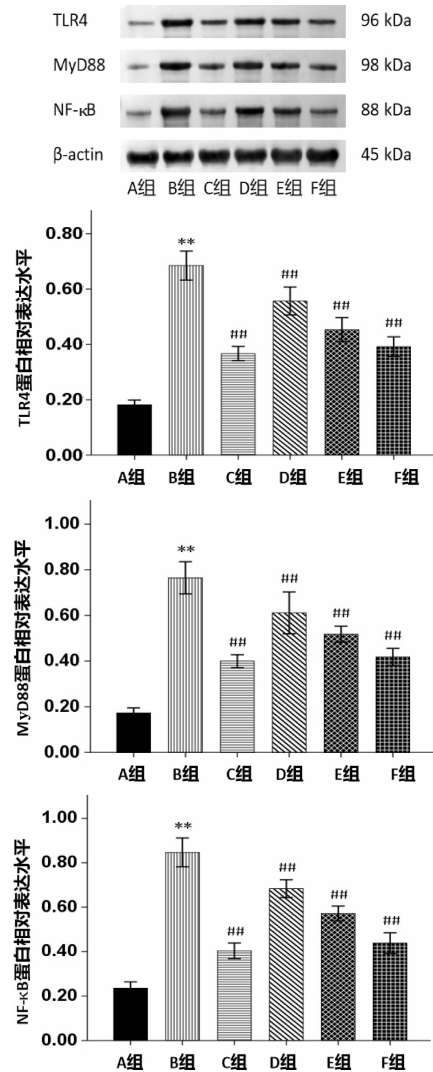


图 6 给药 6 周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中

TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白的表达结果

注:与 A 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,### $P<0.01$ 。

### 3.6 膝关节软骨中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量

给药 6 周后,与 A 组比较,B 组的软骨细胞和软骨基质的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 染色结果均呈深黄棕色,累积光密度(IOD)值均升高,提示 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量均增高( $P<0.01$ )。与 B 组比较,C、D、E、F 组的软骨细胞和软骨基质的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 染色结果均呈淡黄色,IOD 值均降低,提示 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量均降低( $P<0.01$ )。详见图 7~10。

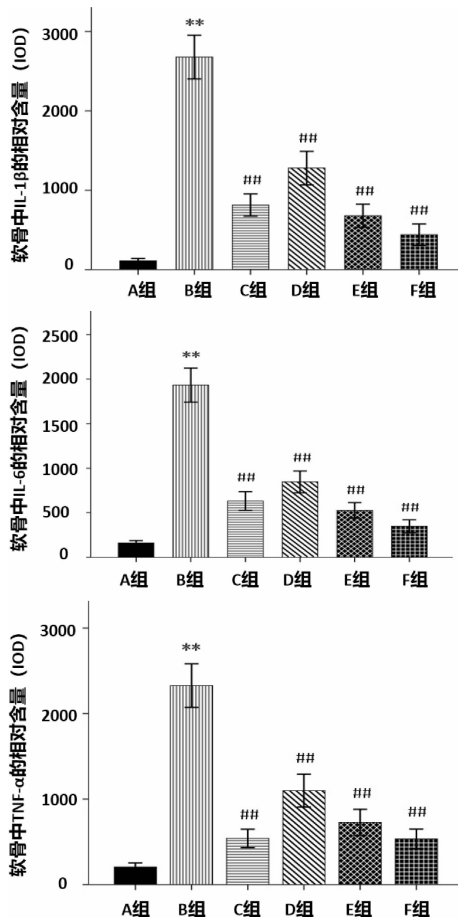


图7 给药6周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中免疫组化IOD值表示的IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 相对含量  
注:与A组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与B组比较,## $P < 0.01$ 。

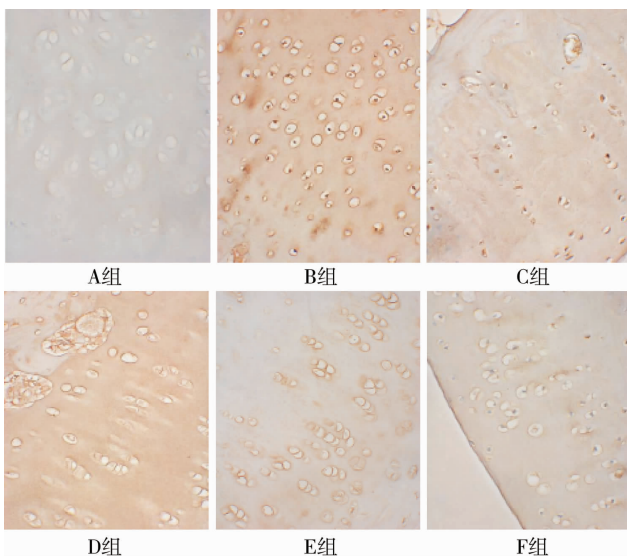


图8 给药6周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 免疫组化染色结果( $\times 400$ )

#### 4 讨论

KOA 是一种以关节疼痛、关节僵硬、关节肿胀、骨摩擦和关节无力为主要表现的退行性关节疾病<sup>[12]</sup>, 中老年人群患病率高。KOA 属于中医学“痹病”的范

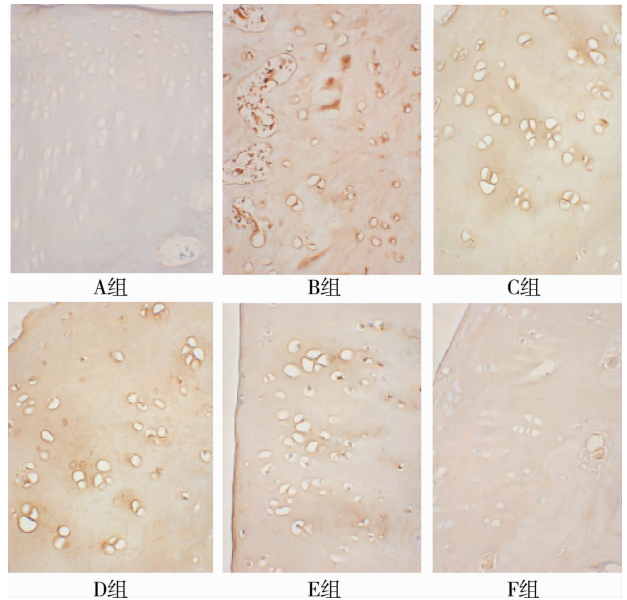


图9 给药6周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中IL-6免疫组化染色结果( $\times 400$ )

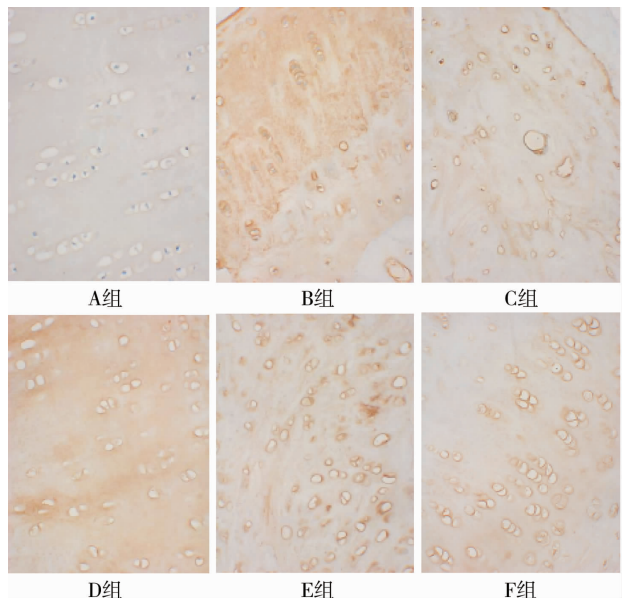


图10 给药6周后各组兔造模侧膝关节软骨组织中TNF- $\alpha$ 免疫组化染色结果( $\times 400$ )

畴,其中外感风寒湿邪致气血运行不畅,经脉痹阻,是此病重要的中医病机之一<sup>[13]</sup>。追风透骨胶囊是追风透骨丸的改进剂型,具有通筋络、祛风寒、除湿邪、散寒邪、止痹痛的功效。其中,君药为川乌,药理学研究表明,川乌中的某些成分对单碘乙酸盐诱导的大鼠骨关节模型的关节软骨具有保护作用,其可预防关节软骨变性而降低 Mankin 评分,亦可促进软骨细胞增殖并抑制软骨细胞凋亡<sup>[14]</sup>。有研究表明,乌头提取液能抑制兔 KOA 模型的关节软骨细胞外基质的异常降解,起到减缓软骨退变的作用<sup>[15]</sup>。研究发现,其臣药之一赤芍所含的芍药苷可减少大鼠类风湿

关节炎模型关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的分泌,减缓类风湿关节炎疾病的进展<sup>[16]</sup>。

TLR4 是一种广泛存在于动物细胞膜表面的跨膜蛋白,属于 10 种 Toll 样受体中的一种<sup>[17]</sup>,可以诱导各种炎症因子的产生,参与介导炎症介质的释放<sup>[18]</sup>。MyD88 是动物细胞质中的一种可溶性衔接蛋白,接收来自 Toll 样受体(包括 TLR4)发出免疫信号,进行翻译整合后再向下游信号通路传导,是重要的免疫信号转导枢纽之一<sup>[19]</sup>。NF- $\kappa$ B 是动物细胞质中的一种二聚体蛋白,能被 TLR4/MyD88 信号通路传导的免疫信号激活,激活的 NF- $\kappa$ B 将通过核孔转移至细胞核内,通过调控相关基因的转录和表达参与免疫炎症反应<sup>[20]</sup>。因此,TLR4 表达的增加可能通过 MyD88 激活 NF- $\kappa$ B 信号转导,引发包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 在内的促炎性细胞因子的转录和合成,而 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号转导通路持续被激活将导致过度的免疫炎症反应并最终造成组织损伤<sup>[21]</sup>。

近年来,Toll 样受体介导的软骨细胞的先天免疫反应已被证实是促进 KOA 的关键环节<sup>[22]</sup>。研究发现,凋亡的软骨细胞 TLR4 表达较正常软骨细胞明显增高,高表达的 TLR4 会进一步激活其下游的 MyD88 及 NF- $\kappa$ B 信号转导通路,诱导软骨细胞产生大量 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子,而过量的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  是骨关节炎疾病中诱导关节软骨细胞凋亡的主要因素之一<sup>[23]</sup>,抑制软骨细胞 TLR4 及其下游信号通路的活化,减少相关炎症因子的大量释放能有效抑制软骨细胞的凋亡,从而抑制 KOA 发展<sup>[24]</sup>。因此,TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号转导通路是研究 KOA 发病机制非常重要的环节。

本研究结果显示,与空白组比较,模型组膝关节软骨破坏明显,Pelletier 评分及 Mankin 评分均升高( $P<0.01$ );软骨中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白表达水平均上调( $P<0.01$ ),软骨中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均升高( $P<0.01$ )。上述结果说明,KOA 模型兔患侧膝关节软骨中 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号转导通路处于活化状态,并介导产生大量炎症因子,促进软骨细胞凋亡,从而促进 KOA 的进展。与模型组比较,追风透骨胶囊低、中、高剂量组及硫酸氨基葡萄糖组的软骨损伤程度轻,Mankin 评分均降低( $P<$

0.01),软骨中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白表达水平均下调( $P<0.01$ ),软骨中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均降低( $P<0.01$ ),此外,追风透骨胶囊高剂量组软骨 Pelletier 评分降低明显( $P<0.05$ )。结果说明,追风透骨胶囊及硫酸氨基葡萄糖能有效抑制关节软骨中 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,减少炎症因子产生,从而延缓 KOA 的进展。

本研究将 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路相关指标作为检测对象,结果显示追风透骨胶囊可抑制该信号转导通路,但无法排除追风透骨胶囊是否可通过其他信号通路及途径来延缓 KOA 的进展。相关研究表明,肠道中的某些革兰氏阴性菌大量繁殖后产生大量脂多糖,破坏肠道黏膜屏障的完整性,过量脂多糖经肠道吸收进入体内后会通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 或 TLR4/MyD88 非依赖/NF- $\kappa$ B 信号转导通路激活免疫炎症反应,导致组织损伤<sup>[25]</sup>。所以,追风透骨胶囊对肠道菌群的调节,以及对肠壁黏膜屏障的作用和对 TLR4 与脂多糖结合的干预有待进一步研究证实。

## 参考文献

- [1] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [2] BALBALOGLU O, SABAH OZCAN S, KORKMAZ M, et al. Promoter polymorphism (T-1486C) of TLR-9 gene is associated with knee osteoarthritis in a Turkish population[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2017, 35(11): 2484-2489.
- [3] PAS H I, WINTERS M, HAISMA H J, et al. Stem cell injections in knee osteoarthritis: A systematic review of the literature[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2017, 51(15): 1125-1133.
- [4] 张之澧,沈杰,刘克地.追风透骨丸治疗骨关节炎的疗效观察[J]. *中成药*,2000,22(10):708-709.
- [5] 周燕萍,杨晓荣,谭航剑.追风透骨胶囊联合玻璃酸钠治疗膝骨关节炎 58 例[J]. *中国药业*,2015,24(14):107-109.
- [6] MILLER R E, SCANZELLO C R, MALFAIT A M. An emerging role for Toll-like receptors at the neuroimmune interface in osteoarthritis[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2019, 41(5): 583-594.
- [7] VIDEMAN T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: Compari-



- son of different periods of repeated immobilization[J]. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1982, 53(3): 339-347.
- [8] 易强,谢利民,邝高艳,等.悬吊式外固定支具有限制动建立的兔膝关节关节炎模型[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(2):236-242.
- [9] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用药量换算[J].*畜牧兽医科技信息*,2010(5):52-53.
- [10] PELLETIER J P, JOVANOVIĆ D, FERNANDES J C, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 1998, 41(7): 1275-1286.
- [11] VAN DER SLUIJS J A, GEESINK R G, VAN DER LINDEN A J, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 1992, 10(1): 58-61.
- [12] HUSKISSON E C. Modern management of mild-to-moderate joint pain due to osteoarthritis: A holistic approach[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2010, 38(4): 1175-1212.
- [13] 高翔,吴骏,莫文,等.施杞治疗膝关节关节炎经验[J].*中华中医药杂志*,2011,26(10):2294-2296.
- [14] TONG P J, XU S B, CAO G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(1): 740-744.
- [15] 王浩,李义,安玉芳.乌头注射液对膝关节模型兔关节软骨细胞 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的影响[J].*中国中医药科技*, 2018,25(3):341-343.
- [16] ZHAI W J, MA Z H, WANG W J, et al. Paeoniflorin inhibits Rho kinase activation in joint synovial tissues of rats with collagen-induced rheumatoid arthritis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 255-259.
- [17] PANARO M A, CORRADO A, BENAMEUR T, et al. The emerging role of curcumin in the modulation of TLR-4 signaling pathway: Focus on neuroprotective and anti-rheumatic properties[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2299.
- [18] YU L, WANG L T, CHEN S W. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010, 14(11): 2592-2603.
- [19] COMPAGNO M, LIM W K, GRUNN A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- $\kappa$ B in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Nature*, 2009, 459(7247): 717-721.
- [20] 杨志峰,蔡在龙,毛积芳. NF- $\kappa$ B 的结构功能及其与疾病的关系[J].*生命的化学*,2004,24(4):347-349.
- [21] LUCAS K, MAES M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: Possible treatments targeting the TLR4 pathway[J]. *Molecular Neurobiology*, 2013, 48(1): 190-204.
- [22] 陈金伟,吕杰,俞银贤,等.膝关节关节炎中天然免疫和 TLR/NF- $\kappa$ B 信号通路的研究进展[J].*中华临床医师杂志(电子版)*,2013,7(24):11602-11606.
- [23] WOJDASIEWICZ P, PONIATOWSKI Ł A, SZUKIEWICZ D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Mediators of Inflammation*, 2014, 2014: 561459.
- [24] LIANG S, LV Z T, ZHANG J M, et al. Necrostatin-1 attenuates trauma-induced mouse osteoarthritis and IL-1 $\beta$  induced apoptosis via HMGB1/TLR4/SDF-1 in primary mouse chondrocytes[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1378.
- [25] CLEMENTE J C, MANASSON J, SCHER J U. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease[J]. *BMJ*, 2018, 360: j5145.

(本文编辑 匡静之)