

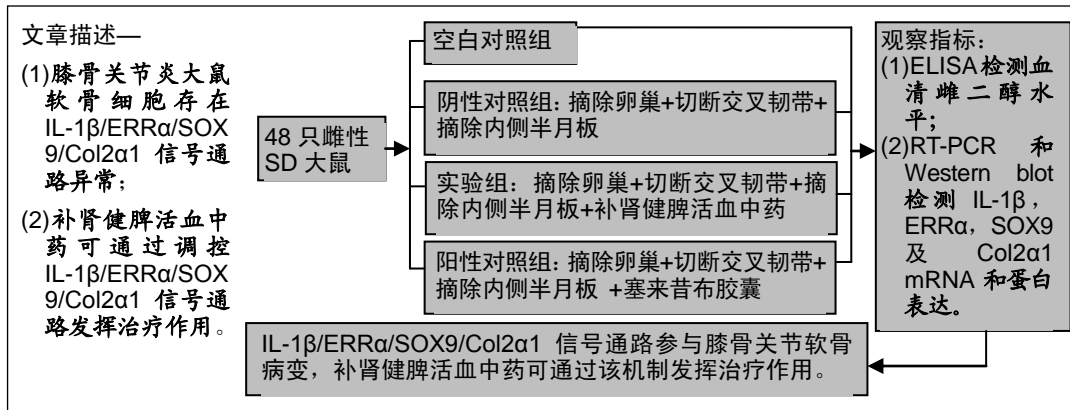
补肾健脾活血中药干预膝骨关节炎模型大鼠软骨细胞 IL-1β/ERRα/SOX9/Col2α1 信号通路的变化

霍少川¹, 王海彬², 唐宏宇², 王粤淇³, 陈群群⁴, 冯梓誉⁵, 李义凯⁵ (1广州中医药大学深圳医院(福田)骨伤科, 广东省深圳市 518000; 2广州中医药大学第一附属医院关节骨科, 广东省广州市 510405; 3广州市正骨医院关节骨科, 广东省广州市 510030; 4广州中医药大学第三附属医院关节骨科, 广东省广州市 510375; 5南方医科大学中医药学院, 广东省广州市 510515)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2881

ORCID: 0000-0002-5449-3942(霍少川)

文章快速阅读:



霍少川, 男, 1985 年生, 汉族, 湖北省人, 2017 年广州中医药大学毕业, 博士, 主治医师。

通讯作者: 李义凯, 男, 汉族, 主任医师, 教授, 南方医科大学中医药学院, 广东省广州市 510515

文献标识码:A

投稿日期: 2019-10-21

送审日期: 2019-10-26

采用日期: 2019-12-19

在线日期: 2020-05-21

文题释义:

膝骨关节炎: 是一种以膝关节软骨退变、破坏和骨质增生为主要特征的慢性关节病, 多患于中老年人群, 主要表现为膝关节疼痛, 上下楼梯时疼痛加重, 休息后缓解, 局部肿胀, 活动受限, 晚期膝关节畸形, 严重影响患者的生活质量。

雌激素: 主要由卵巢分泌, 分泌的雌激素进入血液循环发挥生物学效应, 妇女绝经后卵巢功能衰退, 雌激素分泌减少从而诱发膝骨关节炎。

摘要

背景: 膝骨关节炎是最常见的退行性关节疾病, 其发病率和致残率高, 已严重影响患者的生活质量。研究发现, 补肾健脾活血中药能够改善膝骨关节炎临床症状, 但其具体机制仍未阐明。

目的: 通过膝骨关节炎去势大鼠模型研究补肾健脾活血中药调节 IL-1β/ERRα/SOX9/Col2α1 信号通路治疗大鼠膝骨关节炎的作用机制。

方法: 6 月龄 SD 雌性大鼠, 随机分为空白对照组、模型组、实验组和阳性对照组, 模型组、实验组和阳性对照组摘除卵巢及切除交叉韧带和内侧半月板制作去势大鼠膝骨关节炎模型, 术后 2 周实验组采用补肾健脾活血中药灌胃, 阳性对照组采用塞来昔布胶囊灌胃, 空白对照组和模型组以生理盐水灌胃。连续灌胃 6 周后取血清及膝关节软骨组织, 采用 ELISA 检测血清雌二醇含量, 分别采用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测关节软骨组织中 IL-1β/ERRα/SOX9/Col2α1 信号通路表达水平。

结果与结论: 与空白对照组比较, 模型组白细胞介素 1β 表达量明显升高, 雌二醇、雌激素受体相关受体 α、SRY 相关蛋白 9、II 型胶原的 α1 链表达量明显降低(P < 0.05); 与模型组比较, 实验组白细胞介素 1β 表达量明显降低(P < 0.05), 雌二醇、雌激素受体相关受体 α、SRY 相关蛋白 9、II 型胶原的 α1 链表达量明显升高(P < 0.05); 与阳性对照组比较, 实验组白细胞介素 1β、雌激素受体相关受体 α 及 II 型胶原的 α1 链表达量明显升高(P < 0.05), SRY 相关蛋白 9 表达量明显降低(P < 0.05)。实验结果表明, IL-1β/ERRα/SOX9/Col2α1 信号通路参与膝骨关节炎软骨病变, 补肾健脾活血中药可通过该机制发挥治疗作用。

关键词:

补肾健脾活血中药; 膝骨关节炎; IL-1β/ERRα/SOX9/Col2α1 信号通路; 动物实验; 大鼠

中图分类号: R453; R363; R364

基金资助:

中国博士后科学基金(2018M633088), 项目负责人: 霍少川, 广东省中医药局科研项目(20192054), 项目负责人: 霍少川

缩略语:

白细胞介素 1β: interleukin-1β, IL-1β; 雌激素受体相关受体 α: Estrogen receptor related receptor alpha, ERRα; SRY 相关蛋白 9: SRY-related high mobility group-box gene 9, SOX9; II 型胶原的 α1 链: type II collagen α1, Col2α1



Huo Shaochuan, MD, Attending physician, Department of Orthopedics, Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Yikai, Chief physician, Professor, College of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Treatment of knee osteoarthritis by tonifying kidney and spleen and activating blood circulation herbs via chondrocyte IL-1 β /ERR- α /SOX9/Col2 α 1 signaling pathway in a rat model

Huo Shaochuan¹, Wang Haibin², Tang Hongyu², Wang Yueqi³, Chen Qunqun⁴, Feng Ziyu⁵, Li Yikai⁵ (¹Department of Orthopedics, Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²Department of Joint Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ³Department of Joint Orthopedics, Guangzhou Orthopedic Hospital, Guangzhou 510030, Guangdong Province, China; ⁴Department of Joint Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510375, Guangdong Province, China; ⁵College of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Knee osteoarthritis is the most common degenerative joint disease with high morbidity and disability, which severely threatens the life quality of patients. Chinese herbs that invigorate the kidney and spleen and activate blood circulation can improve the clinical symptoms of knee osteoarthritis, but its specific mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To study the mechanism of invigorating kidney, invigorating spleen and activating blood circulation herbs regulating the IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 signaling pathway in the treatment of knee osteoarthritis in ovariectomized rats.

METHODS: Six-month-old female Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank control group, model group, experimental group and positive control group. The ovariectomy and excision of the cruciate ligament and medial meniscus were performed in the latter three groups to make the rat models of knee osteoarthritis. Two weeks after operation, the rats were treated with invigorating kidney, invigorating spleen and activating blood circulation herbs, celecoxib capsules, or normal saline. Serum estradiol content was detected by ELISA. Expression of IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 signaling pathway in articular cartilage tissues was detected by fluorescence quantitative PCR and western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank control group, the expression of IL-1 β in the model group increased significantly, while the expression of estradiol, ERR α , SOX9 and Col2 α 1 decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of IL-1 β in the experimental group decreased significantly, while the expression of estradiol, ERR α , SOX9 and Col2 α 1 increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the positive control group, the expression of IL-1 β , ERR α , and Col2 α 1 in the experimental group was significantly increased, while the expression of SOX9 decreased significantly ($P < 0.05$). These results indicate that the IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 signaling pathway is involved in knee osteoarthritis-induced cartilage lesion, and Chinese herbs for invigorating kidney and spleen and activating blood circulation play a therapeutic role through this mechanism.

Key words: Chinese herbs for invigorating kidney and spleen and activating blood circulation; knee osteoarthritis; IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 signaling pathway; animal experiment; rat

Funding: China Postdoctoral Science Foundation, No. 2018M633088 (to HSC); Bureau Research Project of Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine, No. 20192054 (to HSC)

0 引言 Introduction

膝骨关节炎是最常见的退行性关节疾病, 其发病率和致残率高, 已经严重影响患者的生活质量^[1]。膝骨关节炎多发生于绝经后妇女, 体内雌激素降低, 软骨代谢活跃, 严重膝骨关节炎的发病率呈指数性增长^[2]。研究发现, 补肾中药能够上调膝关节软骨中雌激素受体的水平, 达到对关节软骨的保护作用^[3]。然而, 补肾健脾活血中药治疗妇女绝经后膝关节软骨退变的机制目前尚不清楚。

因此, 实验构建雌激素低下型膝骨关节炎大鼠模型, 并采用补肾健脾活血中药治疗, 比较模型大鼠软骨组织中软骨细胞IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路变化, 从而探索补肾健脾活血中药治疗雌激素低下型膝骨关节炎的分子机制, 为补肾健脾活血中药在膝骨关节炎中的临床应用提供新的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年10月至2019年10月在广州中医药大学动物实验中心和广州中医药大学岭南医学研究中心中医骨伤科学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 动物实验 健康6月龄雌性SD大鼠48只, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证: SYXK(粤)2013-0001, 体质量400–500 g, 所有动物在(25 \pm 1) °C恒

温、恒湿70%的清洁环境下统一饲养, 每天12 h光明/黑暗, 任意进食标准饲料和蒸馏水。

1.3.2 补肾健脾活血中药 由广州中医药大学附属骨伤科医院提供, 由以下生药组成: 补骨脂15 g、骨碎补15 g、牛膝15 g、黄芪30 g、白芍30 g、白术15 g、桃仁10 g、红花5 g和三七10 g、茯苓15 g、麻黄10 g、防风10 g、细辛5 g、甘草10 g, 灌胃前采用蒸馏水浓缩至1.9 g/mL。塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司, 国药准字J20040072)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组与造模 将48只SD雌性大鼠采用随机数字表法随机分为空白对照组、模型组、实验组和阳性对照组, 每组12只。模型组、实验组和阳性对照组摘除卵巢建立去势膝关节炎模型, 造模后2周, 摘除交叉韧带及内侧半月板制作膝骨关节炎模型^[4]。

1.4.2 药物干预方法 大鼠-人等效给药剂量换算参照《实验动物学》^[5], 实验组以19 g/(kg·d)的剂量给予补肾健脾活血药液灌胃, 阳性对照组以20.6 g/(kg·d)的剂量给予塞来昔布胶囊溶液灌胃, 空白对照组及模型组给予等体积生理盐水灌胃。连续灌药6周麻醉处死大鼠, 抽取血清离心后置于-20 °C保存, 切取膝关节胫骨平台及股骨髁全部软骨组织, 标本冻存于-80 °C冰箱。

1.4.3 ELISA检测血清雌二醇(E2)水平 将血清置于离心机中3 000 r/min离心10 min, 取上清液; 设置标准品孔和待测样本孔, 分别加标准品或待测样本100 μ L, 37 °C温

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	研究补肾健脾活血中药调节 IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 信号通路治疗大鼠膝关节关节炎的作用机制
选择动物的条件:	①SD 大鼠 48 只; ②鼠龄 6 个月; ③体质量 400-500 g; ④雌性
模型与所研究疾病的关系:	采用 SD 大鼠构建雌激素低下型膝关节关节炎模型
动物来源及品系:	SD 大鼠由广州中医药大学动物实验中心提供
造模技术描述:	模型组、实验组和阳性对照组摘除卵巢建立去势膝关节关节炎模型, 造模后 2 周, 摘除交叉韧带及内侧半月板, 建立膝关节关节炎模型
动物数量及分组方法:	48 只大鼠随机分为空白对照组 12 只、模型组 12 只、实验组 12 只和阳性对照组 12 只
造模成功评价指标:	造模关节见软骨颜色白硬, 软骨面光泽度降低, 软骨面有不同程度粗糙、糜烂、溃疡形成, 关节周缘骨刺形成
造模后观察指标:	①ELISA 检测血清雌二醇水平; ②RT-PCR 和 Western blot 检测 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 和蛋白表达
造模后动物处理:	模型大鼠药物灌胃 6 周后, 麻醉下抽取血清离心后进行 ELISA 检测, 切取膝关节胫骨平台及股骨髁全部软骨组织
伦理委员会批准:	实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号: 20181014001)

育 2 h 后弃去液体; 每孔加生物素标记抗体工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后洗板 3 次, 每孔加 200 μ L 洗涤工作液, 浸泡 2 min 后弃去液体; 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后洗板 5 次; 每孔加底物溶液 90 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 30 min 后加终止液 50 μ L 终止反应; 反应终止后在紫外线 450 nm 波长的酶标仪上测量各孔吸光度值。

1.4.4 RT-PCR 检测白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、雌激素受体相关受体 α (Estrogen receptor related receptor alpha, ERR α)、SRY 相关蛋白 9(SRY-related high mobility group-box gene 9, SOX9) 及 II 型胶原的 α 1 链(type II collagen α 1, Col2 α 1) mRNA 表达 取软骨组织约 50 mg 置于匀浆仪, 加入 1 mL Trizol Reagent 进行匀浆; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清至无 RNA 酶的离心管中; 加入 250 μ L 三氯甲烷, 混匀后静置 3 min, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min, 离心 8 min; 转移上清至新离心管, 加入异丙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min, 离心 10 min, 管底的白色沉淀即为 RNA; 吸除液体后加入体积分数 75% 乙醇 1.5 mL 洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min, 离心 5 min; 吸干离心管内液体, 置于超净台风干 3 min, 加入 20 μ L 无 RNA 酶水溶解 RNA, 进行反转录反应, 设计引物见表 1, 进行 RT-PCR 扩增。2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 的相对表达量。

1.4.5 Western blot 检测 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 蛋白表达 用 RIPA 裂解液对研磨后的软骨组织进行充分匀浆后, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白变性制成上样液后, 每组 30 μ L 在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离约

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	上游序列	片段长度(bp)
IL-1 β	上游: 5'-TCT GAC AGG CAA CCA CTT AC-3'	128
	下游: 5'-CAT CCC ATA CAC ACG GAC AA-3'	
ERR α	上游: 5'-GGC CAC TCT CTG TGA TCT TT-3'	114
	下游: 5'-CTC TGC AGT ACT GAC ATC TGG-3'	
SOX9	上游: 5'-CAT CAA GAC GGA GCA ACT GA-3'	98
	下游: 5'-TGT AGT GCG GAA GGT TGA AG-3'	
Col2 α 1	上游: 5'-CAT CGA GTA CCG ATC ACA GAA G-3'	101
	下游: 5'-GCC CTA TGT CCA CAC CAA AT-3'	
GAPDH	上游: 5'-GCA AGG ATA CTG AGA GCA AGA G-3'	98
	下游: 5'-GGA TGG AAT TGT GAG GGA GAT G-3'	

表注: IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; ERR α : 雌激素受体相关受体 α ; SOX9: SRY 相关蛋白 9; Col2 α 1: 2 型胶原的 α 1 链

1.5 h。采用湿转法将蛋白电转移到 VDF 膜上, 用 50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 IL-1 β (1 : 1 000, ab9722, abcam, America)、ERR α (1 : 5 000, ab76228, abcam, America)、SOX9(1 : 1 000, ab185230, abcam, America)、Col2 α 1(1 : 1 000, ab34712, abcam, America), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜后, 使用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次约 10 min。洗膜后加入二抗 Hrp-Goat Anti-Rabbit IgG(1 : 10 000, 111-035-003, Jackson, America), 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 每次约 10 min。使用 ECL 工作液在 X 射线片上显影、定影, 以 β -actin(1 : 1 000, 3 700 S, CST, USA) 为内参, 采用 Image J 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.5 主要观察指标 ①血清雌二醇水平; ②大鼠膝关节软骨组织中 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 和蛋白表达。

1.6 统计学分析 数据的统计与处理采用 SPSS 18.0 软件, 对所得结果进行正态性及方差齐性检验, 计量资料组间比较采用单因素方差分析检验, 有显著性差异时采用 Turkey 检验, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠 48 只, 空白对照组饲养过程中死亡 2 只; 模型组饲养过程中死亡 2 只; 实验组因麻醉过量死亡 1 只、感染死亡 1 只; 阳性对照组因感染死亡 1 只, 饲养过程中死亡 1 只。最终纳入结果为空白对照组 10 只, 模型组 10 只, 实验组 10 只, 阳性对照组 10 只。

2.2 血清雌二醇水平比较 与空白对照组 [(551.8 \pm 80.7) μ g/L] 比较, 模型组血清雌二醇水平 [(143.9 \pm 62.6) μ g/L] 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组血清雌二醇水平 [(275.9 \pm 41.4) μ g/L] 明显升高 ($P < 0.05$); 实验组血清雌二醇水平与阳性对照组比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.3 大鼠膝关节软骨 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 表达比较 与空白对照组比较, 模型组 IL-1 β mRNA 表达量明显升高, ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 表达量

明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组IL-1 β mRNA表达量明显降低($P < 0.05$), ERR α , SOX9及Col2 α 1 mRNA表达量明显升高($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 实验组IL-1 β , ERR α 及Col2 α 1 mRNA表达量明显升高($P < 0.05$), SOX9 mRNA表达量明显降低($P < 0.05$), 见表2。

表2 大鼠膝关节软骨 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 2 The mRNA expression of IL-1 β , ERR α , SOX9 and Col2 α 1 in the articular cartilage of the rat knee

组别	IL-1 β	ERR α	SOX9	Col2 α 1
空白对照组	0.75 \pm 0.07	1.88 \pm 0.08	1.16 \pm 0.04	1.00 \pm 0.08
模型组	4.07 \pm 0.05 ^a	0.46 \pm 0.05 ^a	0.11 \pm 0.02 ^a	0.16 \pm 0.05 ^a
实验组	1.16 \pm 0.04 ^{bc}	1.05 \pm 0.03 ^{bc}	0.54 \pm 0.02 ^{bc}	0.73 \pm 0.02 ^{bc}
阳性对照组	0.88 \pm 0.05	0.68 \pm 0.04	0.63 \pm 0.02	0.62 \pm 0.02

表注: 与空白对照组比, ^a $P < 0.05$; 与模型组比, ^b $P < 0.05$; 与阳性对照组比, ^c $P < 0.05$. IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; ERR α : 雌激素受体相关受体 α ; SOX9: SRY 相关蛋白 9; Col2 α 1: 2型胶原的 α 1 链

2.4 大鼠膝关节软骨IL-1 β , ERR α , SOX9及Col2 α 1蛋白表达比较 与空白对照组比较, 模型组IL-1 β 蛋白表达量明显升高, ERR α , SOX9及Col2 α 1蛋白表达量明显降低, 差异具有显著性意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组IL-1 β 蛋白表达量明显降低, ERR α , SOX9及Col2 α 1蛋白表达量明显升高($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 实验组IL-1 β , ERR α 及Col2 α 1蛋白表达量明显升高, SOX9蛋白表达量明显降低($P < 0.05$), 见图1A-D。

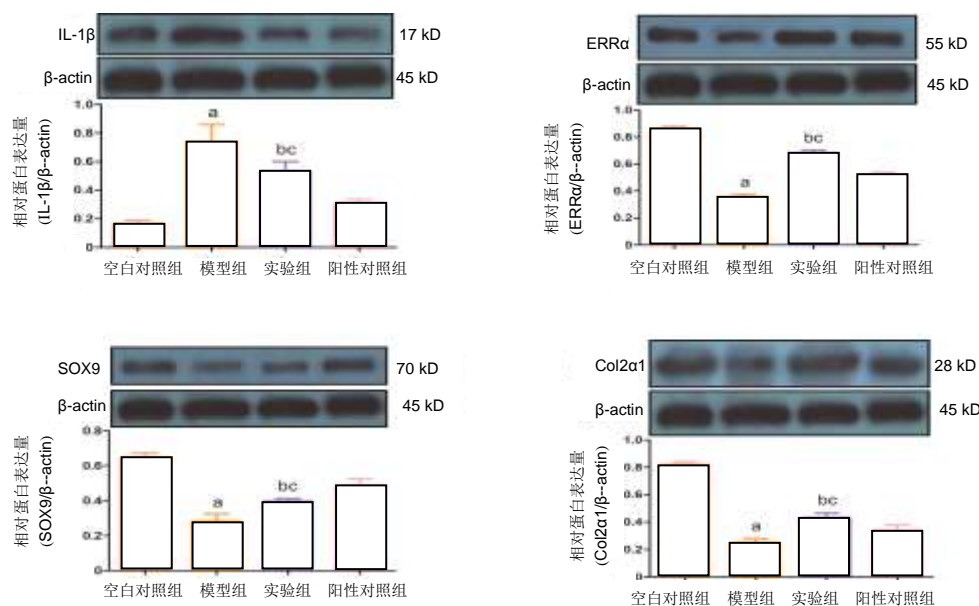
3 讨论 Discussion

膝骨关节炎是一种以膝关节软骨退变、破坏和骨质增生为主要特征的慢性关节病^[6]。绝经后妇女雌激素水平低下, 膝骨关节炎发生率增高, 说明雌激素与膝骨关节炎关系密切。雌激素主要由卵巢分泌, 分泌的雌激素进入血液循环发挥生物学效应, 妇女绝经后卵巢功能衰退, 雌激素

分泌减少从而诱发膝骨关节炎^[7]。血清雌二醇是体内雌激素活性代表物, 具有雌激素类最强的生物活性, 能与组织内特异性受体蛋白在雌激素反应组织中结合形成具有生物活性的复合物, 从而发挥作用^[8]。实验将大鼠卵巢摘除以模拟绝经后妇女雌激素缺乏状态, 大鼠去势2周后建立膝骨关节炎模型, 6周后血清雌二醇含量降低, 补肾健脾活血中药干预后血清雌二醇含量升高, 改变了去势大鼠体内雌激素缺乏状态, 进而保护膝关节软骨退变。

实验采用补肾健脾活血中药以骨碎补、补骨脂、黄芪为君药, 白术、白芍、茯苓为臣药, 桃仁、红花、三七、麻黄、防风、细辛为佐药, 牛膝、甘草为使药。诸药合用体现因病选药、以证配伍, 其中, 骨碎补、补骨脂补脾肾、强筋骨; 桃仁、红花、三七活血化瘀、消肿止痛, 黄芪、白术补气健脾, 白芍柔肝止痛, 牛膝补肝肾、强筋骨、引血下行, 麻黄、防风、细辛发汗解表, 驱邪外出, 甘草调和药性。诸药合用, 具有补肾健脾、活血、驱邪外出之功效。前期研究发现, 该处方能够降低绝经后膝骨关节炎妇女WOMAC及目测类比评分, 提高JOA及Lysholm评分, 临床疗效显著^[4]。马浩哲等^[9]研究补肾活血方对肾虚血瘀证膝骨关节炎患者的疗效及其对血清细胞因子的影响, 结果发现补肾活血方治疗肾虚血瘀证膝骨关节炎患者疗效显著, 可改善患者临床症状及体征, 降低炎症反应因子水平, 与我们前期临床研究相一致。实验进而观察补肾健脾活血中药对去势大鼠膝骨关节炎关节软骨细胞IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路变化的影响, 以探讨补肾健脾活血中药治疗膝骨关节炎的分子生物学机制。

实验结果发现, 去势膝骨关节炎大鼠关节软骨中IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路表达异常, 主要表现为IL-1 β 表达量升高, ERR α , SOX9及Col2 α 1表达量降低。研究发现, 在关节炎软骨细胞中, IL-1 β 能够上调ERR α 表达, SOX9是ERR α 靶基因, ERR α 敲除后Col2 α 1表达受到



图注: 与空白对照组比, ^a $P < 0.05$; 与模型组比, ^b $P < 0.05$; 与阳性对照组比, ^c $P < 0.05$. IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; ERR α : 雌激素受体相关受体 α ; SOX9: SRY 相关蛋白 9; Col2 α 1: 2型胶原的 α 1 链。
图1 各组 IL-1 β , ERR α , SOX9 及 Col2 α 1 蛋白表达水平
Figure 1 The protein expression of IL-1 β , ERR α , SOX9 and Col2 α 1 in each group

抑制,表明膝骨关节炎中存在IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路异常^[10-11]。ERR α 具有维持软骨内稳态的特性,在炎症性小鼠动物模型关节和软骨下骨中表达降低,在增殖的软骨细胞中高表达^[12]。IL-1 β 为促炎性细胞因子,扰乱软骨代谢平衡^[13],抑制软骨细胞增殖^[14],诱导软骨细胞凋亡^[15],促进软骨基质降解^[16],促进滑膜炎发展^[17],加速骨关节炎进程^[18]。SOX9是软骨细胞产生软骨基质所必须的转录因子,可以调节软骨细胞外基质基因的表达^[19]。Col2 α 1基因突变可导致软骨形成不足、骨性关节炎、先天性脊柱骨骺发育不良等疾病^[20-21]。实验采用补肾健脾活血中药干预膝骨关节炎模型大鼠后膝关节软骨细胞IL-1 β 表达量降低,ERR α ,SOX9及Col2 α 1表达量升高,说明补肾健脾活血中药能够通过IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路发挥防治膝骨关节炎的作用。

以上研究表明,补肾健脾活血中药治疗雌激素低下型膝骨关节炎疗效显著,其可能的作用机制是通过调节IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1信号通路发挥治疗作用,这一研究成果将为补肾健脾活血中药在膝骨关节炎中的临床应用提供新的理论依据。然而,实验也有不足之处,如未对大鼠疼痛行为检测及病理组织形态观察,以及未体外验证补肾健脾活血中药对软骨细胞的影响,这些不足尚需要进一步研究。

致谢:感谢广州中医药大学动物实验中心和广州中医药大学岭南医学研究中心中医骨伤科学实验室工作人员提供的帮助。

作者贡献:实验设计为霍少川、王海彬和李义凯;实验实施为冯梓誉及王粤淇;实验评估为唐宏宇及陈群群;资料收集为唐宏宇,王粤淇;霍少川和陈群成文;王海彬及李义凯审核;霍少川及李义凯对文章负责。

经费支持:该文章接受了“中国博士后科学基金(2018M633088),广东省中医药局科研项目(20192054)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道,不存在利益冲突。

机构伦理问题:实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号:20181014001)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明:实验数据经广州中医药大学医学统计学专家审核。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] CHEN D, SHEN J, ZHAO W, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. Bone Res. 2017;5:6044.
- [2] SHARMA AR, JAGGA S, LEE SS, et al. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. Int J Mol Sci. 2013;14(10):19805-19830.
- [3] 黄枫,唐勇,郑晓辉,等.补肾强膝方对绝经后妇女膝骨性关节炎的影响[J].中医正骨,2002,14(4):12-13.
- [4] 霍少川.脏腑辨证指导下绝经后妇女KOA经筋病变的治疗及经筋通方干预机制研究[D].广州:广州中医药大学,2017.
- [5] 汤家铭.实验动物学[M].北京:中国中医药出版社,2016.
- [6] 张晨,马骏,吕雷锋,等.盐酸氨基葡萄糖对膝骨关节炎膝关节软骨下骨I型胶原及骨钙素表达的影响[J].郑州大学学报(医学版),2017,52(1):9-13.
- [7] 王俊玲,黄思敏,梁启瑶,等.雌激素的来源及其在骨代谢中的作用[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(6):729-732.
- [8] 黄捷,薄占东,刘刚,等.早期膝骨关节炎患者血清雌二醇和睾酮水平与病变程度的关系[J].中国组织工程研究,2018,22(36):5760-5765.
- [9] 马浩哲,黄奎.补肾活血方对肾虚血瘀证膝骨性关节炎患者的疗效及其对血清细胞因子的影响[J].世界中医药,2019,14(3):696-699.
- [10] KIM YI, NO LJ, BHANDARI S, et al. Cartilage development requires the function of Estrogen-related receptor alpha that directly regulates sox9 expression in zebrafish. Sci Rep. 2015;5:18011.
- [11] BONNELYE E, REBOUL P, DUVAL N, et al. Estrogen receptor-related receptor alpha regulation by interleukin-1beta in prostaglandin E(2)- and cAMP-dependent pathways in osteoarthritic chondrocytes. Arthritis Rheum. 2011;63(8):2374-2384.
- [12] BONNELYE E, LAURIN N, JURDIC P, et al. Estrogen receptor-related receptor-alpha (ERR-alpha) is dysregulated in inflammatory arthritis. Rheumatol (Oxford). 2008;47(12):1785-1791.
- [13] 汤晓晨,俞峰,孙书龙,等.黄芩甲苷对人膝骨关节炎退变关节软骨IL-1 β 表达的影响[J].南京中医药大学学报,2013,29(1):48-52.
- [14] 姚丽,赵婧,周强,等.祛痰化痰利湿方对大鼠膝骨关节炎滑膜组织和血清IL-1 β ,MMP-1及COMP,CTX-II的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2015,23(11):5-8.
- [15] 贺牡丹,王小平,陈同生.白细胞介素-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理[J].中国细胞生物学学报,2011,33(1):49-54.
- [16] GOLDRING MB, OTERO M, PLUMB DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. Eur Cell Mater. 2011;21:202-220.
- [17] 季卫锋,童培建,袁小凤,等.补肾法与活血法对SD大鼠膝骨性关节炎滑膜IL-1 β ,TNF- α 及软骨MMP-13,ADAMTS-5的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(2):1-5.
- [18] ATTUR M, KRASNOKUTSKY S, STATNIKOV A, et al. Low-grade inflammation in symptomatic knee osteoarthritis: prognostic value of inflammatory plasma lipids and peripheral blood leukocyte biomarkers. Arthritis Rheumatol. 2015;67(11):2905-2915.
- [19] LEFEBVRE V, DE CROMBRUGGHE B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. Matrix Biol. 1998;16(9):529-540.
- [20] 马春辉,蔡国平,阎作勤,等. II型胶原在骨关节炎软骨细胞中的表达[J].复旦学报(医学版),2009,36(6):734-736.
- [21] 崔英霞,夏欣一,杨滨,等.COL2A1基因突变致先天性脊柱骨骺发育不良的软骨组织超微结构观察[J].医学研究生学报,2009,22(4):376-379.