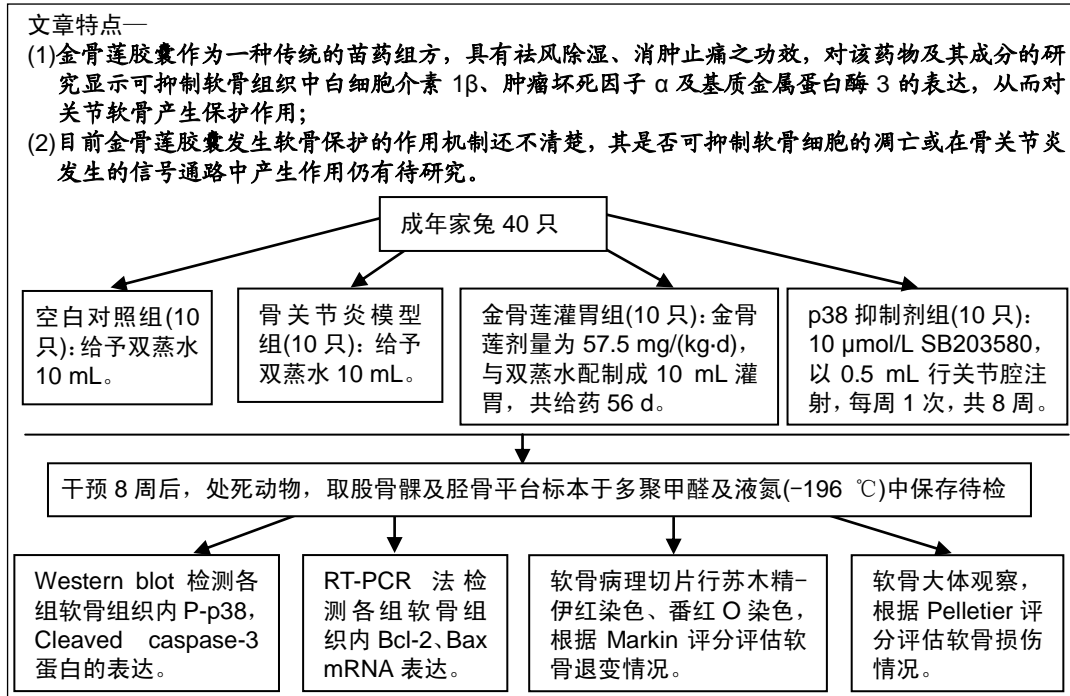


# 金骨莲灌胃对兔骨关节炎模型软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响

彭旭<sup>1</sup>, 杨继滨<sup>2</sup>, 尤奇<sup>2</sup>, 金瑛<sup>2</sup>, 张骏<sup>2</sup>, 葛振<sup>2</sup>, 邹刚<sup>2</sup>, 江孔军<sup>2</sup>, 刘毅<sup>2</sup> (<sup>1</sup>遂宁市中心医院关节外科, 四川省遂宁市 629000; <sup>2</sup>遵义医学院附属医院骨一科, 贵州省遵义市 563000)

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2014 ORCID: 0000-0002-6664-8008(彭旭)

文章快速阅读:



彭旭, 男, 1985 年生, 四川省遂宁市人, 汉族, 硕士, 主要从事关节退变和运动医学的研究。

通讯作者: 刘毅, 教授, 硕士生导师, 遵义医学院附属医院骨一科, 贵州省遵义市 563000

文献标识码:A

来稿日期: 2019-05-07

送审日期: 2019-05-21

采用日期: 2019-06-27

在线日期: 2019-10-27



**文题释义:**

**细胞凋亡:** 为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主有序的死亡。与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一件被动的过程, 而是主动过程, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用, 是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。

**P-p38 蛋白:** 磷酸化 p38 蛋白, 存在于 P38MAPK 信号通路中, 该通路是丝裂原活化蛋白激酶的亚类之一, 该通路中的特异性 p38 蛋白经过磷酸化级联反应直接磷酸化, 从而被激活并具备生物活性, 存在于软骨组织中, 可反映骨关节炎严重程度。

**摘要**

**背景:** 金骨莲胶囊为传统的苗药组方, 其成分主要包含金铁锁、汉桃叶等成分, 既往研究表明该药物具有软骨保护作用, 但对其软骨保护的机制还不清楚。

**目的:** 探讨金骨莲灌胃治疗骨关节炎的可能机制。

**方法:** 从 40 只家兔中随机挑选 10 只作为空白对照组, 余下的 30 只家兔以改良 Hulth 法在兔右侧后膝建立骨关节炎模型, 并随机分为骨关节炎模型组 (10 只)、金骨莲灌胃组 (10 只)、p38 抑制剂组 (10 只)。建模 7 d 后, 金骨莲灌胃组给予金骨莲与双蒸水混合液 10 mL 灌胃 [57.5 mg/(kg·d)]; p38 抑制剂组给予兔右侧后膝关节腔注射 10  $\mu$ mol/L p38 抑制剂 (SB203580) 0.5 mL, 每周 1 次; 空白对照组及骨关节炎模型组仅灌服等量双蒸水, 1 次/d, 干预 8 周后处死动物取右侧后膝关节股骨髁及胫骨平台。采用 Pelletier 评分评估软骨损伤情况; 苏木精-伊红染色、番红 O 染色及 Mankin 评分评估软骨退变情况; Western blot 检测软骨组织中 P-p38 及 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达; 实时荧光定量 PCR 检测各组软骨组织中 Bcl-2、Bax mRNA 表达。

**结果与结论:** ①金骨莲灌胃组 Pelletier 评分及 Mankin 评分较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组明显降低 ( $P < 0.05$ ); ②金骨莲灌胃组软骨组织中 Bax mRNA、Cleaved Caspase-3 蛋白表达较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组明显降低 ( $P < 0.05$ ); ③金骨莲灌胃组 Bcl-2 mRNA 的表达较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组均明显升高 ( $P < 0.05$ ); ④金骨莲灌胃组软骨组织中 P-p38 蛋白表达较骨关节炎模型组与 p38 抑制剂组明显降低 ( $P < 0.05$ ); ⑤结果表明, 金骨莲可抑制骨关节炎模型兔软骨组织中凋亡相关蛋白和 P-p38 蛋白的表达, 从而延缓关节软骨退变。

**关键词:**

骨性关节炎; 软骨损伤; 金骨莲; 细胞凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R459.9; R318; R681

**基金资助:**

贵州省科技厅联合基金 (黔科合 LH 字 [2017] 7015 号), 项目负责人: 邹刚; 贵州省中医药管理局 (QYZZ-2016-029), 项目负责人: 刘毅

Peng Xu, Master, Department of Joint Surgery, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Liu Yi, Professor, Master's supervisor, First Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

## Effect of Psammosilene gavage on the expression of apoptosis-related proteins in chondrocytes of a rabbit osteoarthritis model

Peng Xu<sup>1</sup>, Yang Jibin<sup>2</sup>, You Qi<sup>2</sup>, Jin Ying<sup>2</sup>, Zhang Jun<sup>2</sup>, Ge Zhen<sup>2</sup>, Zou Gang<sup>2</sup>, Jiang Kongjun<sup>2</sup>, Liu Yi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Joint Surgery, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>First Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Psammosilene Capsule is a traditional Miao medicine formula that consists of *Psammosilene tunicoides* and *Schefflera kwangsiensis*. Psammosilene Capsule has been shown to hold protective effect on cartilage, but the underlying mechanism remains unclear.

**OBJECTIVE:** To explore the possible mechanism of Psammosilene gavage in the treatment of osteoarthritis.

**METHODS:** Ten of the 40 rabbits were randomly selected as the blank control group. The remaining 30 rabbits were used to establish the osteoarthritis model in the right hind knee of the rabbit by the modified Hulth method, and then were randomly divided into model ( $n=10$ ), Psammosilene gavage ( $n=10$ ), and p38 inhibitor ( $n=10$ ) groups. At 7 days after modeling, the Psammosilene gavage group was fed with Psammosilene (57.5 mg/kg per day, p38 inhibitor group was injected with p38 inhibitor into the right hind knee joint (SB203580, 10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.5 mL), once weekly. The blank control and model groups were given the same amount of clean water, once daily. After 8 weeks, all animals were sacrificed to remove the right hind knee femoral condyle and tibial plateau. Severity of cartilage injury was evaluated by Pelletier score. Cartilage degeneration was examined by hematoxylin-eosin staining, saffron O staining and Mankin score. The expression levels of P-p38 and Cleaved Caspase-3 protein in cartilage tissue were detected by western blot assay. The expression levels of Bcl-2 and Bax mRNA in cartilage tissues were detected by quantitative real-time PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Compared with the Psammosilene gavage group, the model and p38 inhibitor groups had significantly increased Pelletier and Mankin scores ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with the Psammosilene gavage group, the expression levels of Bax mRNA and Cleaved Caspase-3 protein in the cartilage tissue in the model and p38 inhibitor groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). (3) Compared with the Psammosilene gavage group, the expression level of Bcl-2 mRNA in the cartilage tissue in the model and p38 inhibitor groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). (4) Compared with the Psammosilene gavage group, the expression level of P-p38 protein in the model and p38 inhibitor groups was significantly increased ( $P < 0.05$ ). (5) Our findings suggest that Psammosilene can inhibit the expression of apoptosis-related proteins and P-p38 protein in cartilage tissue, and then delay the degeneration of articular cartilage in the rabbit osteoarthritis model.

**Key words:** osteoarthritis; cartilage injury; Psammosilene; cell apoptosis; mitogen-activated protein kinases

**Funding:** the Combined Project of Science and Technology Department of Guizhou Province, No. [2017]7015 (to ZG); a grant from the Administration of Traditional Chinese Medicine of Guizhou Province, No. QYZZ-2016-029 (to LY)

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是软骨细胞、软骨下骨、软骨基质三者合成与降解偶联失衡, 以及滑膜组织、半月板组织退变、关节囊肥厚等共同作用的结果<sup>[1-4]</sup>, 是目前世界范围内最常见的引起关节疼痛、功能障碍的疾病<sup>[5-6]</sup>。据调查在全球范围内65岁以上的人群中有50%以上受到骨关节炎的影响<sup>[7]</sup>, 临床上治疗该疾病的方法有限<sup>[8-9]</sup>, 因此有必要对骨关节炎的药物研发进行进一步的研究。

关于骨关节炎的发病机制, 目前认为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路在其中扮演着中心调节作用<sup>[10]</sup>, 包括p38、ERK、JNK、ERK5等多个亚家族<sup>[11-12]</sup>, 它能激活多种炎症因子的表达, 导致软骨细胞凋亡, 从而发生骨关节炎, 其中p38信号通路是MAPK家族中的重要组成部分。对于骨关节炎的保守药物治疗, 如非类固醇类抗炎药, 主要用于急性期止痛<sup>[13]</sup>, 氨基葡萄糖和硫酸软骨素可增加软骨基质中蛋白多糖与II型胶原的合成<sup>[14]</sup>, 但长期疗效也不尽人意。骨关节炎发展到终末期需进行关节置换术, 但手术仍存在相关风险及并发症、后期翻修等诸多问题。

祖国医学在骨关节炎治疗中有着深厚的历史底蕴及特有的优势, 其中金骨莲胶囊作为一种传统的苗药组方, 具有祛风除湿、消肿止痛之功效, 对该药物及其成分的研究显示可抑制软骨组织中白细胞介素 $1\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及基质金属蛋白酶3的表达, 从而对关节软骨产生保护作用<sup>[15-16]</sup>。目前金骨莲胶囊发生软骨保护的作用机制还不清楚, 其是否可

抑制软骨细胞的凋亡或在骨关节炎发生的信号通路中产生作用仍有待研究。p38信号通路是MAPK家族中的重要组成部分, 该通路中的p38蛋白被激活后成为磷酸化p38蛋白, 其表达量与骨关节炎的严重程度呈正相关, 但有报道在鼠关节腔进行注射p38抑制剂(SB203580)后, 可抑制骨关节炎模型中基质金属蛋白酶3, 13的表达, 对骨关节炎软骨具有保护作用<sup>[17]</sup>, 说明该抑制剂可负性调控p38通路。该实验除检测软骨组织凋亡相关蛋白以外, 还试图探寻该药物是否在p38通路中发挥作用, 以探讨该药物可能的软骨保护机制。

## 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2017年10月至2018年4月在遵义医学院动物实验中心及细胞工程实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 成年健康家兔40只, 体质量2.1-3.2 kg, 雌雄不限, 由遵义医学院动物中心饲养, 饲养条件为24 h昼夜循环、自由饮水摄食。

1.3.2 实验仪器 SM2000R型病理组织切片机(Leica德国); -80  $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(DW-86L1486, Haier, 中国); 微量紫外可见分光光度计(ND1000, Thermo Scientific, 美国); 实时荧光定量PCR仪(CFX96, BIO-RAD, 美国); 酶标仪(SUNRISE, TEC-CAN, 奥地利); Western blot制胶板(0.75 mm、1 mm, BioRad, 美国); Western blot电泳/转槽(中型, BioRad, 美国); Western blot 荧光感应曝光

机(700/800通道, Odyssey, 美国)。

**1.3.3 实验主要药物及试剂** 金骨莲胶囊(批号: 150707, 规格: 0.25 g×24粒/盒, 贵州益佰制药股份有限公司); p38 抑制剂(SB203580, 10 mmol/L, 1 mL, 美国Medchem Express 公司); Anti-p38 抗体 [M138](Abcam 公司); Anti-p38(phosphor T180+Y182) 抗体 [M139](Abcam 公司); Anti-Caspase-3 抗体 [ab13847](Abcam 公司); HRP 结合亲和山羊抗兔 IgG(H+L)(武汉三鹰); Trizol 提取液(日本 Takara 公司); 扩增试剂盒(美国 BIO-RAD 公司); 反转录试剂盒(日本 Takara 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ II)(日本 TaKaRa 公司)。

**1.4 方法**

**1.4.1 动物分组及造模** 实验前所有动物在动物中心分笼饲养适应1周, 从40只家兔中随机挑选10只作为空白对照组, 余下的30只家兔以改良Hulth法在兔右后膝建立骨关节炎模型<sup>[18-20]</sup>, 并随机分为骨关节炎模型组(10只)、金骨莲灌胃组(10只), p38抑制剂组(10只)。造模前, 先于耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg, 术区备皮, 常规消毒铺巾操作, 选择髌旁内侧长约2 cm切口, 显露关节腔, 切除前交叉韧带及内侧半月板, 行抽屉实验确认前交叉韧带已完全断裂, 生理盐水冲洗创腔, 缝合关闭关节腔及皮肤。术后每只兔每天肌肉注射青霉素钠6×10<sup>4</sup> U/(kg·d), 连续注射7 d, 单笼饲养并每日驱赶1 h。

**组织工程实验动物造模过程的相关问题**

<b>造模目的</b>	建立创伤性膝骨关节炎模型, 以进行药物干预的实验研究
<b>选择动物的基本资料</b>	成年健康家兔 40 只, 体质量 2.1-3.2 kg, 雌雄不限, 由遵义医学院动物中心饲养, 饲养条件为 24 h 昼夜循环、自由饮水摄食
<b>模型与所研究疾病的关系</b>	创伤性骨关节炎模型, 与所研究疾病病理变化一致
<b>动物来源及品系</b>	由重庆腾鑫生物技术有限公司提供, 许可证号: scxk(渝)2017-0010
<b>造模技术描述</b>	麻醉生效后, 术区备皮, 常规消毒铺巾操作, 选择髌骨内缘做一长约 2 cm 手术切口, 逐层切开, 暴露关节腔, 切断前交叉韧带, 并切除内侧半月板, 行抽屉实验确认前交叉韧带已完全断裂, 生理盐水冲洗创腔, 缝合关闭切口
<b>动物数量及分组方法</b>	成年健康家兔共 40 只, 随机分为空白对照组(10 只), 骨关节炎模型组(10 只)、金骨莲灌胃组(10 只), p38 抑制剂组(10 只)
<b>造模成功评价指标</b>	软骨大体观、Pelletier 评分及病理切片 Mankin 评分
<b>造模后取材及观察指标</b>	截取右后侧膝股骨内侧髌及胫骨内侧平台行软骨大体观, 运用 Pelletier 评分评估软骨损伤程度, 行病理切片进行苏木精-伊红染色及番红 O 染色, Mankin 评分。冰上剥离软骨, 留取软骨组织采用实时荧光定量 PCR 法检测 Bcl-2、Bax mRNA 的表达量, Western blot 检测软骨组织中 P-p38 及 Cleaved caspase-3 蛋白的表达
<b>伦理委员会批准</b>	实验方案经遵义医学院动物实验伦理委员会批准

**1.4.2 动物用药及取材** 参考临床常规用量及相关文献, 同时结合《药理实验方法学》中动物药物剂量换算公式得出金骨莲使用剂量为57.5 mg/(kg·d), 与双蒸水配制成10 mL

灌胃; p38抑制剂与PBS配制浓度为10 μmol/L, 以0.5 mL 行家兔右膝关节腔注射, 每周1次; 其余两组以等量双蒸水灌胃。灌胃及关节腔注射均于造模1周、伤口情况稳定后开始, 干预8周后过量麻醉注射处死动物, 取负重区股骨髌及胫骨平台, 标本于多聚甲醛及液氮(-196 °C)中保存待检。

**1.4.3 软骨大体观察** 截取右膝关节股骨髌及胫骨平台观察软骨大体观, 采用Pelletier评分评估软骨损伤情况<sup>[21]</sup>: ①0分: 关节面光整, 色泽如常; ②1分: 关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗; ③2分: 关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨表中层; ④3分: 关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层; ⑤4分: 软骨剥脱, 软骨下骨暴露。评分由3位具有副高级职称以上关节外科医师进行评价, 评分者对分组情况不清楚。

**1.4.4 组织学检查** 采用40 g/L多聚甲醛固定标本3 d, 然后用EDTA脱钙液脱钙2周, 软骨组织切片后, 行苏木精-伊红染色及番红O染色, 显微镜下观察。根据Mankin评分标准评估软骨退变情况<sup>[22]</sup>。

**1.4.5 实时荧光定量PCR法检测Bcl-2、Bax mRNA的表达量** 取出软骨组织, 在冰上剥离软骨, 放于研钵中, 在液氮下研磨成粉末状, 加入预冷的Trizol对本标进行裂解、离心, 吸取上层水相, 加入氯仿震荡后室温下孵育, 再次离心, 吸取上层水相, 加入异丙醇, 再次离心, 提取RNA; 加入DEPC水混合均匀, 使用ND1000微量紫外可见分光光度计检测总RNA浓度及吸光度值, 留取吸光度值为1.8-2.0之间的RNA备用。严格按操作说明配置反转录反应液, 进行反转录反应, 生成cDNA。配置PCR反应体系, 以cDNA为模板行基因扩增, 进行PCR定量。实验数据采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法(Ct为荧光达到阈值时所需PCR的循环数)检测Bcl-2、Bax表达量。引物序列及产物长度见表1。

表 1 引物序列及产物长度

基因	上游引物	下游引物	片段大小(bp)
Bcl-2	GGG ATG CCT TCG	CGA GGG TGA TGC	114
	TGG AAC TGT	AAG CTC CTA T	
Bax	TTT GCT TCA GGG	TGA GAC ACT CGC	116
	TTT CAT CCA	TCA GCT TCT T	
GAPDH	CAC GGC AAA TTC	GGG GGC ATC AGC	50
	CAC GGC ACA GT	AGA AGG AGC AG	

**1.4.6 Western blot检测软骨组织中P-p38及Cleaved caspase-3蛋白的表达** 将提取的软骨组织尽量剪碎, 在匀浆机中充分匀浆, 裂解, 操作均在冰上进行, 然后4 °C 12 000×g离心5 min, 取上清, 分装于0.5 mL离心管中-80 °C保存。严格按BCA蛋白定量试剂盒操作说明测定蛋白浓度, 取适量上清, 加入上样缓冲液, 煮沸10 min, 放于-20 °C保存。按分子量大小配置12%分离胶及浓缩胶; 将各蛋白总样品40 μg加入电泳槽上样孔中, 分别在80 V、120 V进行电泳分离, 至溴酚蓝刚跑出即可关闭电泳仪停止电泳; 取出凝胶, 严格按操作步骤进行冲洗, 转膜, 封闭; 用封闭液稀释一抗, 4 °C孵育过夜; 用封闭液稀释对应的HRP标记的二抗(1:50 000稀释), 37 °C摇床孵育2 h,

TBST充分清洗，转入曝光机曝光。

**1.5 主要观察指标** ①股骨内侧髁及胫骨内侧平台软骨大体观，并行Pelletier评分评估软骨损伤情况；②软骨病理切片行苏木精-伊红染色及番红O染色，进行Mankin评分评估软骨退变情况；③实时荧光定量PCR法检测软骨组织中Bcl-2、Bax mRNA的表达量；④Western blot检测软骨组织中P-p38及Cleaved caspase-3蛋白的表达。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 18.0软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，进行单因素方差分析和组内比较，检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

### 2.1 各组软骨大体观及组织学检查结果

#### 2.1.1 各组软骨大体观 见图1。

**空白对照组:** 兔精神状态良好，食欲正常，活动自如，右侧后膝关节无肿胀、畸形，毛发光亮，体质量无减轻。股骨髁及胫骨平台软骨面色泽正常，表面光整，无骨赘。

**骨关节炎模型组:** 兔精神状态、食欲差，造模后随时间推移活动逐渐受限，右膝关节出现肿胀，跛行，毛发稀疏暗淡，体质量减轻。关节软骨色泽灰暗，表面溃疡形成，可见大量骨赘形成，部分关节面软骨缺失，软骨下骨裸露。

**金骨莲灌胃组:** 兔精神状态较好，食欲较正常，关节活动无明显受限，膝关节无明显肿胀，毛发较光亮，体质量无减轻。关节软骨色泽稍变暗，关节面粗糙，未见骨赘及软骨下骨裸露。

**p38抑制剂组:** 兔精神状态、食欲较差，关节轻度肿胀。关节面粗糙伴糜烂，可见少量骨赘形成，未见明显软骨下骨裸露。

#### 2.1.2 各组软骨组织学检查结果 关节软骨行病理切片苏木精-伊红及番红O染色观察，见图2。

**空白对照组:** 软骨结构完整，软骨细胞排列整齐，在钙化层及辐射层之间可见到完整的细胞潮线。番红O染色观察到细胞基质正常染色。

**骨关节炎模型组:** 软骨变薄，软骨4层结构不完整，结构紊乱，裂隙深，可见放射带，软骨细胞明显减少，潮线破坏。番红O染色观察到细胞基质失染。

**金骨莲灌胃组:** 软骨浅表层不规则，软骨细胞弥漫性增生，细胞潮线可见。番红O染色观察到细胞基质轻度失染。

**p38抑制剂组:** 软骨变薄，软骨细胞局部增生，细胞潮线欠完整，番红O染色观察到细胞基质中度失染。

**2.2 各组软骨 Pelletier 及 Mankin 评分** 骨关节炎模型组 Pelletier 及 Mankin 评分较金骨莲灌胃组及 p38 抑制剂组明显升高( $P < 0.05$ )，金骨莲灌胃组 Pelletier 及 Mankin 评分较 p38 抑制剂组明显降低( $P < 0.05$ )，见表 2，图 3。

### 2.3 金骨莲灌胃对骨关节炎软骨细胞凋亡的影响

**2.3.1 各组软骨组织中 Bcl-2 mRNA 的相对表达量** 药物干预 8 周后，金骨莲灌胃组 Bcl-2 mRNA 的相对表达量较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组均明显升高( $P < 0.05$ )；与骨关节炎模型组相比，p38 抑制剂组 Bcl-2 mRNA 的相对表达

量明显升高( $P < 0.05$ )，见表 3 和图 4。

表 2 各组软骨 Pelletier 及 Mankin 评分 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Pelletier and Mankin scores of the cartilage in each group

组别	Pelletier 评分	Mankin 评分
空白对照组	0.600±0.489	1.000±0.632
骨关节炎模型组	3.833±0.408 <sup>a</sup>	11.830±0.753 <sup>a</sup>
金骨莲灌胃组	1.167±0.408 <sup>ab</sup>	3.830±0.753 <sup>ab</sup>
p38 抑制剂组	2.160±0.632 <sup>abc</sup>	6.500±0.548 <sup>abc</sup>

表注：与空白对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与骨关节炎模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与金骨莲灌胃组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 3 各组软骨组织中 Bcl-2、Bax mRNA 的相对表达量

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Relative expression level of Bcl-2 and Bax mRNA in cartilage tissues of each group

组别	Bax	Bcl-2
空白对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
骨关节炎模型组	4.66±0.22 <sup>a</sup>	0.28±0.05 <sup>a</sup>
金骨莲灌胃组	1.61±0.04 <sup>ab</sup>	0.76±0.02 <sup>ab</sup>
p38 抑制剂组	2.16±0.32 <sup>abc</sup>	0.46±0.02 <sup>abc</sup>

表注：与空白对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与骨关节炎模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与金骨莲灌胃组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.3.2 各组软骨组织中 Bax mRNA 的相对表达量** 药物干预 8 周后，金骨莲灌胃组软骨组织中 Bax mRNA 的相对表达量较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组均明显降低( $P < 0.05$ )；与骨关节炎模型组相比，p38 抑制剂组 Bax mRNA 的相对表达量明显降低( $P < 0.05$ )，见表 3 和图 4。

**2.3.3 各组软骨组织中 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达量** 药物干预 8 周后，金骨莲灌胃组 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达量较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组均明显降低( $P < 0.05$ )；与骨关节炎模型组相比，p38 抑制剂组 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达量明显降低( $P < 0.05$ )，见图 5。

**2.4 各组软骨组织 P-p38 蛋白的表达量** 药物干预 8 周后，金骨莲灌胃组 P-p38 蛋白的表达量较骨关节炎模型组及 p38 抑制剂组均明显降低( $P < 0.05$ )；与骨关节炎模型组相比，p38 抑制剂组 P-p38 蛋白的表达量明显降低( $P < 0.05$ )，见图 6。

## 3 讨论 Discussion

成功建立骨关节炎动物模型是进行药物及相关治疗研究的基础，改良 Hulth 法被证实是非常有效的骨关节炎模型建立方法，MURPHY 等<sup>[23]</sup>将山羊单侧膝关节前交叉韧带及内侧半月板切除行骨关节炎建模，观察到股骨髁及胫骨平台关节软骨面被侵蚀、关节周围骨赘形成等典型骨关节炎表现，ROMAN-BLAS 等<sup>[19]</sup>使用该方法建模后，将软骨标本行病理切片可观察到软骨表面裂隙深及软骨深层、软骨细胞明显减少，基质失染等进行性骨关节炎的表现。HAYAMI 等<sup>[24]</sup>切断动物前交叉韧带及内侧半月板建立骨关节炎模型，造模后 1 周从组织病理学上检测到软骨表面破坏及蛋白多糖的丢失，在第 6 周观察到关节边缘大量骨赘形成的终末期骨关

炎表现。此次实验使用改良Hulth法行造模,从骨关节炎模型组软骨标本大体观及病理切片观察到明显的骨关节炎改变,且Pelletier评分及Mankin评分较空白对照组明显增高,差异有显著性意义,证实骨关节炎模型成功建立,同时证明该造模方法的稳定性及可重复性。

祖国医药在骨关节炎的治疗上已有悠久的历史,并取得良好疗效<sup>[25]</sup>,随着祖国医药在骨关节炎中的治疗作用越来越多的被报道,使其成为目前研究的热点。金骨莲胶囊为传统的苗药组方,其主要成分金铁锁在贵州分布广泛,前期对金骨莲胶囊及其成分进行研究,显示其可抑制兔骨关节炎模型软骨组织中白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等炎性因子的表达,还可抑制基质金属蛋白酶3的表达,增加基质金属蛋白酶抑制剂1的表达,延缓关节软骨退变<sup>[13, 26-27]</sup>,但是该药物延缓关节退变的机制仍不清楚。从引起软骨退变的病理生理方面进行分析,软骨退变的重要因素是软骨细胞凋亡<sup>[28]</sup>,细胞凋亡存在3种途径:内源性途径、外源性途径、内质网途径,但是3种途径最后都会在半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)家族中汇聚<sup>[29]</sup>,当该酶激活后,可启动细胞凋亡程序,在Caspase家族中,活化的Caspase-3(Cleaved Caspase-3)是细胞凋亡的终末剪切酶,Cleaved Caspase-3通过一系列高度调控的级联反应使细胞凋亡,在细胞凋亡过程中起核心作用<sup>[30]</sup>。SHARIF等<sup>[31]</sup>对人髌、膝关节骨关节炎软骨与正常膝关节软骨进行软骨细胞凋亡检测发现,髌、膝关节骨关节炎软骨细胞的凋亡率较正常软骨细胞的凋亡率明显增高,且Cleaved Caspase-3的表达较正常软骨明显增高。陈喜德等<sup>[32]</sup>进行不同病期骨关节炎大鼠软骨组织中Cleaved Caspase-3与软骨细胞凋亡的相关性研究发现,随着骨关节炎的进展,Cleaved Caspase-3的表达逐渐增多,且软骨细胞凋亡亦逐渐增多,说明在骨关节炎中Cleaved Caspase-3的表达与软骨细胞凋亡呈正相关关系。该实验通过检测Cleaved Caspase-3的表达,分析金骨莲灌胃与软骨细胞凋亡的关系,结果显示金骨莲灌胃组Cleaved Caspase-3的表达较空白对照组明显升高,差异有显著性意义,但较骨关节炎模型组明显降低,差异也有显著性意义,说明金骨莲灌胃可以通过抑制Cleaved Caspase-3的表达,使软骨细胞凋亡减少,延缓软骨退变进程。与p38抑制剂组相比,Cleaved Caspase-3的表达明显降低,说明金骨莲灌胃组在抑制Cleaved Caspase-3的表达上优于p38抑制剂组。

软骨细胞的凋亡受p53基因、Bcl-2基因等家族的调控<sup>[33]</sup>,其中Bcl-2基因家族研究最多,在Bcl-2基因家族中,Bcl-2、Bax基因是该家族中与细胞凋亡相关的最重要的2个基因。Bcl-2存在于软骨细胞线粒体外膜上,可阻止线粒体膜的透化,抑制促凋亡因子细胞色素C的释放和caspase自身正反馈激活,进而抑制软骨细胞凋亡<sup>[34]</sup>。Bax基因则能诱导细胞凋亡,研究显示在兔骨关节炎模型软骨组织中检测Bax的表达较正常软骨组明显升高,而Bcl-2的表达是降低的<sup>[35]</sup>。实验使用实时荧光定量PCR法检测各组软骨组织中Bcl-2、Bax mRNA表达,金骨莲灌胃组与空白对照组相比,Bax

mRNA的表达量明显升高,差异有显著性意义,但与骨关节炎模型组及p38抑制剂组相比,Bax mRNA表达明显降低,差异有显著性意义;在Bcl-2 mRNA的表达上,金骨莲灌胃组较空白对照组明显降低,但较骨关节炎模型组及p38抑制剂组明显升高,差异均有显著性意义,说明金骨莲灌胃虽不能完全完全阻断骨关节炎进程,但可通过抑制软骨凋亡相关蛋白的表达有效延缓兔骨关节炎模型软骨退变。

既往的研究结果显示,p38抑制剂SB203580可减轻动物骨关节炎模型软骨退变程度并缓解疼痛<sup>[36]</sup>,可减少由一氧化氮诱导的软骨细胞凋亡<sup>[37]</sup>。实验结果显示p38抑制剂组Bax mRNA及Cleaved Caspase-3蛋白的表达较空白对照组明显升高,但较骨关节炎模型组明显降低,Bcl-2 mRNA的表达较空白对照组明显降低,但较骨关节炎模型组明显增高,从而抑制了软骨细胞的凋亡,和既往的研究结果是相同的。p38抑制剂还可抑制磷酸化p38(P-p38)蛋白的表达<sup>[37]</sup>,P-p38蛋白是p38MAPK信号通路经过磷酸化级联反应直接磷酸化酪氨酸、丝氨酸/苏氨酸残基,激活p38,存在于软骨组织中<sup>[38]</sup>,相关研究显示骨关节炎患者软骨组织中P-p38蛋白的表达较正常组织明显升高<sup>[39]</sup>,且表达量是随着骨关节炎的加重逐渐增加<sup>[40]</sup>。实验使用Western blot法检测各组软骨组织中P-p38蛋白的表达,金骨莲灌胃组P-p38蛋白的表达较骨关节炎模型组明显降低,说明金骨莲灌胃通过抑制软骨组织中P-p38蛋白的表达,延缓了兔骨关节炎模型软骨的退变,金骨莲灌胃组在抑制P-p38蛋白的表达上优于p38抑制剂组,虽然p38抑制剂SB203580是P38MAPK的专一阻断剂,但p38MAPK存在4个亚型:p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$ ,其中p38 $\alpha$ 和p38 $\beta$ 各有2种异构体,抑制剂SB203580对p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 敏感较好,但对p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$ 敏感性较差,相关文献报道在骨关节炎软骨细胞内检测到p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$ 的表达,而未检测到p38 $\beta$ 的表达<sup>[41]</sup>,且MOREL等<sup>[42]</sup>研究发现SB203580并不能阻断上游激酶对p38的激活,而是作用于p38三磷酸腺苷(ATP)活性结合位点,使p38失去酶的活性,因此实验发现p38抑制剂组在延缓兔骨关节炎模型软骨退变方面不及金骨莲灌胃组,考虑与该抑制剂的敏感性及作用机制相关。实验发现金骨莲灌胃抑制了P-p38蛋白的表达,但其是否对p38MAPK通路产生影响,仍需要对该通路上游及下游的相关因子进一步研究才能明确,是后期重点研究的方向。

**作者贡献:** 刘毅教授对实验进行设计,彭旭进行实验实施,杨继滨、尤奇、张骏、葛振、邹刚、江孔军协助完成实验并进行资料收集,金璇进行审校。

**经费支持:** 该文章接受了“贵州省科技厅联合基金(黔科合 LH 字[2017]7015号)”“贵州省中医药管理局(QYZZ-2016-029)”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。

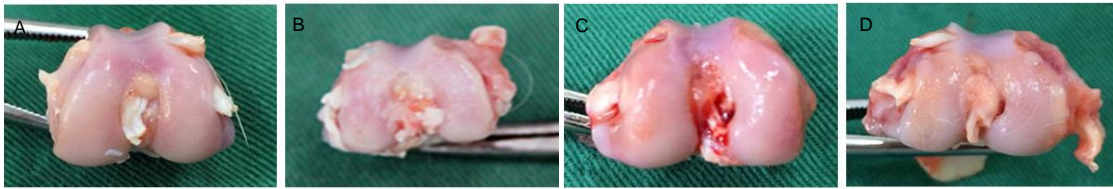
**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经遵义医学院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**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。

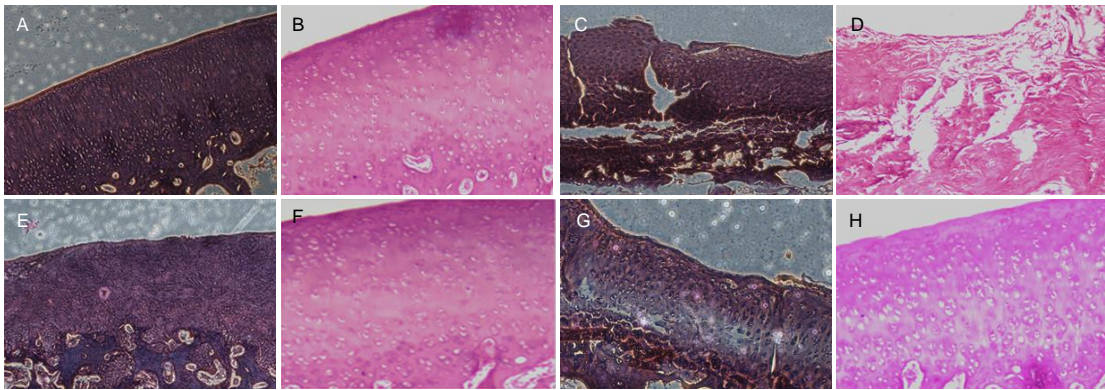
**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。



图注：图中 A 为空白对照组；B 为骨关节炎模型组；C 为金骨莲灌胃组；D 为 p38 抑制剂组

图 1 各组实验兔软骨大体观

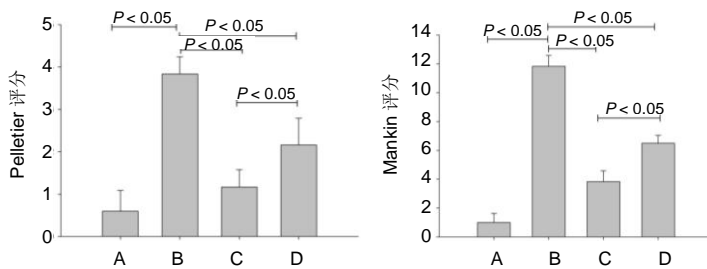
Figure 1 Gross observation of the rabbit cartilage in each group



图注：图中 A, B 为空白对照组苏木精-伊红染色及番红 O 染色；C, D 为骨关节炎模型组苏木精-伊红染色及番红 O 染色；E, F 为金骨莲灌胃组苏木精-伊红染色及番红 O 染色；G, H 为 p38 抑制剂组苏木精-伊红染色及番红 O 染色

图 2 各组实验兔关节软骨苏木精-伊红及番红 O 染色(x200)

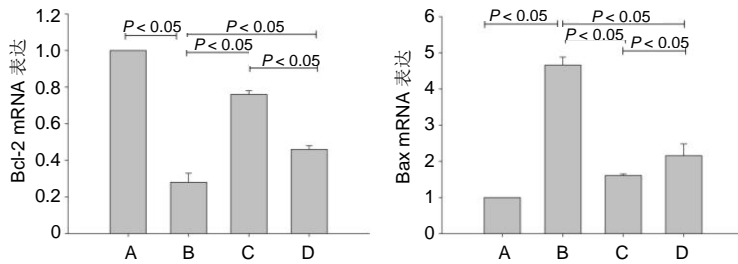
Figure 2 Hematoxylin-eosin staining and safranin O staining of the rabbit cartilage in each group (x200)



图注：A 为空白对照组；B 为骨关节炎模型组；C 为金骨莲灌胃组；D 为 p38 抑制剂组

图 3 各组关节软骨 Pelletier 评分和 Mankin 评分

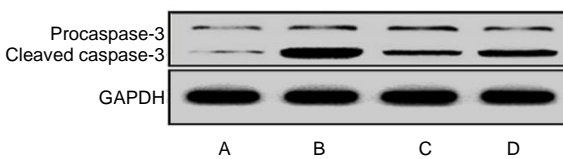
Figure 3 Pelletier and Mankin scores of the articular cartilage in each group



图注：A 为空白对照组；B 为骨关节炎模型组；C 为金骨莲灌胃组；D 为 p38 抑制剂组

图 4 各组软骨组织中 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达量

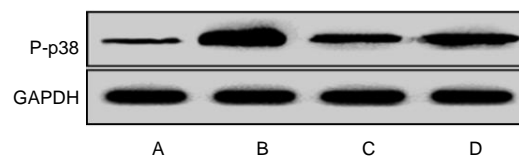
Figure 4 Relative expression level of Bcl-2 and Bax mRNA of cartilage in each group



图注：A 为空白对照组；B 为骨关节炎模型组；C 为金骨莲灌胃组；D 为 p38 抑制剂组

图 5 Western blot 法检测各组软骨组织内 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达

Figure 5 Cleaved Caspase-3 expression in chondrocytes of each group detected by western blot assay



图注：A 为空白对照组；B 为骨关节炎模型组；C 为金骨莲灌胃组；D 为 p38 抑制剂组

图 6 Western blot 法检测各组软骨组织内 P-p38 蛋白的表达

Figure 6 Expression level of P-p38 in chondrocytes of each group detected by western blot assay

生物统计学声明: 文章统计学方法已通过遵义医学院生物统计学专家审核。

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

- MAN GS, MOLOGHIANU G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life*. 2014;7(1):37-41.
- KEEN HI, HENSOR EM, WAKEFIELD RJ, et al. Ultrasound assessment of response to intra-articular therapy in osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(8):1385-1391.
- DIEPPE P. Developments in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(2):245-247.
- ZHANG Y, XU L, NEVITT MC, et al. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):2065-2071.
- NHO SJ, KYMES SM, CALLAGHAN JJ, et al. The burden of hip osteoarthritis in the United States: epidemiologic and economic considerations. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21 Suppl 1:S1-6.
- GROGAN SP, D'LIMA DD. Joint aging and chondrocyte cell death. *Int J Clin Rheumatol*. 2010;5(2):199-214.
- XING D, XU Y, LIU Q, et al. Osteoarthritis and all-cause mortality in worldwide populations: grading the evidence from a meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:24393.
- MCALINDON TE, BANNURU RR, SULLIVAN MC, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(3):363-388.
- ONDRÉSIK M, AZEVEDO MAIA FR, da Silva Morais A, et al. Management of knee osteoarthritis. Current status and future trends. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(4):717-739.
- LOESER RF, ERICKSON EA, LONG DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(5):581-586.
- 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 27(5):441-444.
- NARANTSOGT G, MIN A, NAM YH, et al. Activation of MAPK Is Required for ROS Generation and Exocytosis in HMC-1 Cells Induced by *Trichomonas vaginalis*-Derived Secretory Products. *Korean J Parasitol*. 2015;53(5):597-603.
- 陈蔚东, 蒋青, 陈东阳, 等. p38蛋白激酶抑制剂对大鼠膝骨关节炎的软骨保护作用[J]. 山东医药, 2007, 47(10):21-22
- BIJLSMA JW, BERENBAUM F, LAFEBER FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377(9783):2115-2126.
- HENROTIN Y, MARTY M, MOBASHERI A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis. *Maturitas*. 2014;78(3):184-187.
- 王胜民, 刘毅, 刘波, 等. 金骨莲胶囊对兔膝骨关节炎软骨保护作用的研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(26):3611-3615.
- 王胜民, 刘毅, 熊华章, 等. 金铁锁灌胃对兔膝骨关节炎的治疗作用及其机制探讨[J]. 山东医药, 2017, 57(31):36-40.
- LIN MN, LIU XX, WANG SL, et al. Effect of OA kneepad on apoptosis genes Bcl-2 and p53 expression in articular cartilage cells of experimental knee osteoarthritis. *Zhongguo Gu Shang*. 2009;22(9):688-691.
- ROMAN-BLAS JA, MEDIERO A, TARDÍO L, et al. The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *Eur J Pharmacol*. 2017;794:8-14.
- BELLIDO M, LUGO L, ROMAN-BLAS JA, et al. Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R152.
- PELLETIER JP, JOVANOVIC D, FERNANDES JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*. 1998;41(7):1275-1286.
- CALVO E, PALACIOS I, DELGADO E, et al. Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(11):878-886.
- MURPHY JM, FINK DJ, HUNZIKER EB, et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3464-3474.
- HAYAMI T, PICKARSKI M, ZHUO Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006;38(2):234-243.
- 许怀来, 徐凡平, 黄明华, 等. 中医外治法治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(11):85-88.
- 曾乐, 刘毅, 熊华章, 等. 金骨莲胶囊对兔膝骨关节炎保护作用的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(7):7-11.
- 王胜民, 刘毅, 刘晓丽, 等. 金铁锁对膝骨关节炎兔关节软骨的保护作用及其机制[J]. 山东医药, 2016, 56(16):27-29, 111.
- MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO FM, et al. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20560-20575.
- KARSENTI E, VERNOS I. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 2001;294(5542):543-547.
- SHINOURA N, MURAMATSU Y, YOSHIDA Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U-373MG glioma cells. *Exp Cell Res*. 2000;256(2):423-433.
- SHARIF M, WHITEHOUSE A, SHARMAN P, et al. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):507-515.
- 陈喜德, 魏波, 杨柳菁, 等. 不同病期骨关节炎大鼠关节软骨中 caspase-3 与细胞凋亡的相关性[J]. 广东医学, 2018, 39(2):181-186.
- 马钢, 任明姬. 骨性关节炎软骨细胞凋亡的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(2):196-200.
- 刘恒, 刘超, 曹永平. 软骨细胞线粒体功能异常在关节软骨早期退变中的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(8):652-654.
- KOURTIS A, ADAMOPOULOS PG, PAPALOIS A, et al. Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):243.
- BROWN KK, HEITMEYER SA, HOOKFIN EB, et al. P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J Inflamm (Lond)*. 2008;5:22.
- KÜHN K, SHIKHMAN AR, LOTZ M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. 2003;197(3):379-387.
- HAN J, SUN P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(8):364-371.
- FAN Z, SÖDER S, OEHLER S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol*. 2007;171(3):938-946.
- SHI J, ZHANG C, YI Z, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis. *IUBMB Life*. 2016;68(4):293-302.
- RASHEED Z, AKHTAR N, HAQQI TM. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced activation of MKK-3, p38 $\alpha$ -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):R195.
- MOREL C, IBARZ G, OIRY C, et al. Cross-interactions of two p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase inhibitors and two cholecystokinin (CCK) receptor antagonists with the CCK1 receptor and p38 MAP kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(22):21384-21393.