

红姜提取物保护早期膝骨关节炎模型大鼠的关节软骨

https://doi.org/10.12307/2021.218

罗臻^{1,2}, 李宏翔¹, 卢启贵³, 余瑾¹, 余翔², 李飞龙^{1,2}, 柴生颢^{1,2}

投稿日期: 2020-12-11

送审日期: 2020-12-18

采用日期: 2021-01-27

在线日期: 2021-03-31

中图分类号:

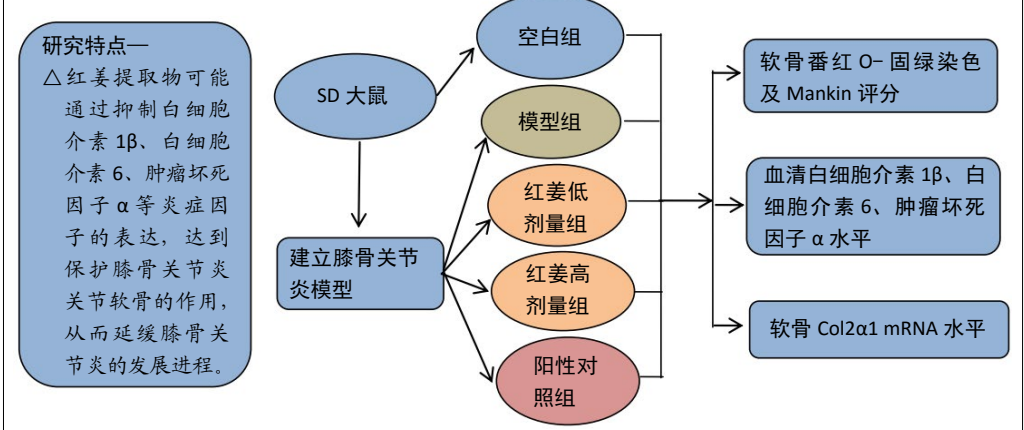
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)32-05155-07

文献标识码: A

文章快速阅读:



研究特点—
△红姜提取物可能通过抑制白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α等炎症因子的表达, 达到保护膝骨关节炎关节软骨的作用, 从而延缓膝骨关节炎的发展进程。

文题释义:

红姜(*Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum*): 是生姜的一种变种, 主要产于印度尼西亚、马来西亚和中国四川等地, 被广泛应用于传统医学。红姜可以显著减轻关节炎疼痛, 在传统医学中常被用作治疗关节炎的经验用药。

Col2α1: 膝骨关节软骨以及软骨与软骨下骨交界处存在的一种II型胶原纤维α1链的基因, 其表达水平的变化在软骨退化中起重要作用。

摘要

背景: 研究报道, 联合使用姜提取物降低血清促炎细胞因子白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α等水平与膝骨关节炎中软骨损伤的减轻有关。

目的: 观察红姜提取物灌胃对早期膝骨关节炎大鼠关节软骨保护情况及血清白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α和软骨Col2α1 mRNA水平表达的影响, 探讨红姜提取物对早期膝骨关节炎大鼠关节软骨保护作用及可能机制。

方法: 将50只SPF级SD大鼠随机分为空白组、模型组、红姜低剂量组、红姜高剂量组、阳性对照组, 每组各10只。除空白组外, 其余40只大鼠膝关注射4%木瓜蛋白酶0.2 mL+0.03 mol/L的L-半胱氨酸混合溶液, 建造膝骨关节炎模型。空白组与模型组常规饲养; 红姜低剂量组、红姜高剂量组、阳性对照组分别予50 mg/kg的红姜提取物水溶液、100 mg/kg红姜提取物水溶液、18 mg/kg的塞来昔布胶囊水溶液灌胃, 所有干预每日1次, 共持续4周。治疗4周后取大鼠膝骨关节软骨进行番红O-固绿染色, 并对关节软骨行Mankin评分, 检测血清中白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α及软骨中Col2α1 mRNA表达水平。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: 20190917002。

结果与结论: ①膝骨关节软骨的病理切片显示, 模型组及各治疗组均有软骨基质流失, 各治疗组Mankin评分均比空白组评分高($P < 0.05$), 比模型组评分低($P < 0.05$), 其中红姜高剂量组与阳性对照组评分差异无显著性意义($P > 0.05$), 均显著低于红姜低剂量组($P < 0.05$); ②血清白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α结果显示, 阳性对照组、红姜高剂量组、红姜低剂量组均比空白组表达上调($P < 0.05$), 均比模型组表达下调($P < 0.05$), 且各治疗组间水平阳性对照组<红姜高剂量组<红姜低剂量组($P < 0.05$); ③软骨中Col2α1 mRNA结果显示, 空白组与红姜高剂量组、阳性对照组的Col2α1 mRNA表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 模型组和红姜低剂量组Col2α1 mRNA表达相较其他3组均显著上调($P < 0.05$); ④结果说明, 红姜提取物可能主要通过抑制白细胞介素1β、白细胞介素6、肿瘤坏死因子α等炎症因子的表达, 达到了保护膝骨关节软骨作用, 从而延缓膝骨关节炎的发展进程; 且相对于低剂量组, 红姜提取物高剂量组的抗炎效果更好。

关键词: 膝骨关节炎; 红姜; 炎症细胞因子; 软骨; 大鼠; 模型; 动物

Protective effect of red ginger extract on articular cartilage of rats with early knee osteoarthritis

Luo Zhen^{1,2}, Li Hongxu², Lu Qigui³, Yu Jin², Yu Xiang², Li Feilong^{1,2}, Chai Shengting^{1,2}

¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, Guangdong Province, China; ²Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; ³Shenzhen Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Hospital of Shenzhen Luohu District, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

¹广州中医药大学, 广东省广州市 510240; ²广州中医药大学第三附属医院骨科, 广东省广州市 510006; ³上海中医药大学深圳医院/深圳市罗湖区中医院, 广东省深圳市 518000

第一作者: 罗臻, 男, 1994年生, 河南省潢川县人, 汉族, 广州中医药大学毕业, 硕士, 主要从事中医药治疗骨伤科疾病研究。

通讯作者: 余瑾, 博士, 教授, 广州中医药大学, 广东省广州市 510240

https://orcid.org/0000-0003-1918-0171 (罗臻)

基金资助: 广东省中医药管理局科研项目(20202085), 项目负责人: 李飞龙; 国家自然科学基金面上项目(81473743), 项目负责人: 余瑾; 深圳市科创委2020年基础研究面上项目(JCYJ20190812170815559), 项目负责人: 卢启贵

引用本文: 罗臻, 李宏翔, 卢启贵, 余瑾, 余翔, 李飞龙, 柴生颢. 红姜提取物保护早期膝骨关节炎模型大鼠的关节软骨[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(32):5155-5161.



Luo Zhen, Master, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, Guangdong Province, China; Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yu Jin, MD, Professor, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have reported that the combined use of ginger extract to reduce the levels of serum pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α , is related to the reduction of cartilage injury in knee osteoarthritis.

OBJECTIVE: To observe the protective effect of red ginger extract on articular cartilage and the expression of serum interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α and cartilage tissue type II collagen α 1 mRNA in rats with early knee osteoarthritis, and to explore the protective effect of red ginger extract on articular cartilage of rats with early knee osteoarthritis and its possible mechanism.

METHODS: Fifty SPF Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group, model group, low-dose red ginger, high-dose red ginger and positive control group ($n=10$ per group). Except for the blank group, the rats in the other four groups were used to prepare knee osteoarthritis models by intraarticular injection of 4% papain 0.2 mL+0.03 mol/L L-cysteine mixed solution. The rats in the blank and model groups were fed routinely, and the low-dose red ginger, high-dose red ginger and positive control groups were given 50 mg/kg red ginger extract aqueous solution, 100 mg/kg red ginger extract aqueous solution and 18 mg/kg celecoxib capsule aqueous solution respectively. All the interventions were conducted once a day, for 4 continuous weeks. Four weeks after treatment, the rats in each group were killed and the knee joints were stained with safranin O-fast green. The articular cartilage was scored by Mankin scoring. The expression levels of interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α in serum and type II collagen α 1 mRNA in cartilage were detected. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Guangzhou University of Chinese Medicine, with an approval No. 20190917002.

RESULTS AND CONCLUSION: The pathological section of knee cartilage showed that there was cartilage matrix loss in the model and each treatment group, and the Mankin score of each treatment group was significantly higher than that of the blank group ($P < 0.05$) and lower than that of the model group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the high-dose group and the positive control group ($P > 0.05$), but the scores of the two groups were lower than that of the low-dose group. The levels of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α were upregulated in the positive control group, high-dose red ginger group and low-dose red ginger group compared with the blank group and down-regulated compared with the model group ($P < 0.05$). Moreover, and the levels of these cytokines were ranked as follows: positive control group $<$ high-dose red ginger group $<$ low-dose red ginger group ($P < 0.05$). The level of type II collagen α 1 mRNA in cartilage showed no significant difference between the blank group and the high-dose red ginger group and the positive control group ($P > 0.05$), whereas the expression of type II collagen α 1 mRNA was significantly increased in the model group and low-dose red ginger group compared with the other three groups ($P < 0.05$). To conclude, red ginger extract may protect the articular cartilage of knee osteoarthritis by inhibiting interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α , thereby delaying the development of knee osteoarthritis. Compared with the low-dose group, high-dose red ginger extract has better anti-inflammatory effect.

Key words: knee osteoarthritis; red ginger; inflammatory cytokine; cartilage; rat; model; animal

Funding: the Research Project of Guangdong Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 20202085 (to LFL); the National Natural Science Foundation of China, No. 81473743 (to YJ); the Basic Research Project of Shenzhen Science and Technology Innovation Commission in 2020, No. JCYJ20190812170815559 (to LQG)

How to cite this article: LUO Z, LI HX, LU QG, YU J, YU X, LI FL, CHAI ST. Protective effect of red ginger extract on articular cartilage of rats with early knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(32):5155-5161.

0 引言 Introduction

膝骨关节炎是一种以关节软骨损伤、关节周围骨赘生成和滑膜炎等为特征的膝关节退行性疾病^[1], 在中医属“骨痹”“膝痹”等范畴, 其在临床上多表现为膝关节疼痛、屈伸活动受限, 甚则时常出现局部肿胀、关节腔积液等。随着病情的进展, 这些症状会增加老年患者步行时跌倒的风险^[2], 甚至会逐步导致患者步行能力的丧失, 给患者带来极大的危害。

当前临床使用较多的用于控制膝骨关节炎炎症和疼痛等症状的药物(如NSAIDs等)多具有胃肠道损害等慢性毒副作用, 因此具有更小不良反应并且可能治疗膝骨关节炎的中草药得到越来越多的关注。姜是中国及印尼传统医药中广泛使用的药食同源的一种药材, 在祛风除痹的治疗作用上具有很大潜力, 口服和涂抹姜的提取物可以减轻膝骨关节炎患者膝关节疼痛^[3-5]。分子生物学研究显示, 生姜中的活性成分可能通过HO-1途径抑制诱导型一氧化氮合酶和环氧化酶2的表达保护软骨并在膝骨关节炎大鼠模型中发挥抗炎止痛的效果^[6]。近年来也有报道联合使用姜提取物降低血清促炎细胞因子白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 等水平与膝骨关节炎中软骨损伤的减轻有关。例如ABDEL-RAHMAN等^[7]发现姜黄和生姜提取物联合治疗可有效缓解膝骨关节炎

大鼠模型的炎症免疫应答, 减轻关节的病理损伤, 并降低血清白细胞介素6, 肿瘤坏死因子 α 和II型胶原C-端肽(CTX-II)的水平, 表现出软骨保护作用。红姜是生姜的一种变种, 主要产于印度尼西亚、马来西亚和中国四川等地, 富含的6-姜酚等成分具有一定的抗炎活性^[8-9], 但是红姜提取物能否很好发挥抗炎特性, 从而保护软骨、延缓早期膝骨关节炎的进展的报道较少。

当前早期膝骨关节炎的动物模型研究中, 选用大鼠在其膝关节腔注射木瓜蛋白酶已成为一种经典的研究方法, 这种方法具有周期短、成功率高的优点^[10]。故此研究通过膝关节腔注射木瓜蛋白酶建立早期膝骨关节炎大鼠模型, 通过不同剂量的红姜提取物灌胃, 观察干预后大鼠的软骨组织病理切片及血清中白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 和软骨中Col2 α 1 mRNA表达的情况, 探讨以姜保护软骨、延缓早期膝骨关节炎进展的可能的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照动物实验, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年6月至9月在广州中医药大学实验动物中心及岭南医学中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 购置并饲养于广州中医药大学实验动物中心的 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 50 只，体质量 180–220 g，动物生产许可证号：SCXK(粤)2018-0034。所有大鼠饲养于 SPF 级标准环境下，自由进食饮水。

1.3.2 实验主要药品及试剂 红姜 (*Zingiber officinale Roscoe var rubrum*) 产自印度尼西亚，由广东中医药博物馆中药标本中心主任冼建春教授鉴定为正品。参照陈婷等^[11]的方法，将 5 kg 干净的红姜切碎后浸于 5 L 的体积分数 95% 乙醇中，振荡、加热、悬蒸，得到红姜提取物；高效液相色谱分析法 (HPLC) 鉴定所得红姜提取物中姜辣素含量为 5.58%，6-姜酚含量为 2.18%。塞来昔布胶囊 (美国辉瑞制药有限公司，国药准字 J20140072)；水合氯醛 (C804539, Macklin)；木瓜蛋白酶 (1364GR005, BioFroxx)；白细胞介素 1 β ELISA 试剂盒、白细胞介素 6 ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子 α ELISA 试剂盒 (均为 R&D system)；反转录试剂盒 (DBI-2220, DBI)；荧光定量 PCR 试剂盒 (AOPR-1200, Genecopies)；无 RNase 水 (V900882, Vetec)。

1.3.3 实验主要设备 多功能酶标仪 (上海现科)；电子分析天平 (梅特勒-托利多)；纯水仪 (重庆艾科浦)；正置显微镜 (Olympus)；CFX96 Optic Module 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad)；RM2245 半自动轮式石蜡切片机 (德国莱卡)；旋转蒸发仪 (广州艾卡)；LC-30AD 高效液相色谱仪 (日本岛津)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模与分组 实验前适应性喂养 7 d，随后从 50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠中随机抽取 10 只作为空白组，其余 40 只大鼠建造膝骨关节炎模型，造模过程无大鼠死亡。

造模方法：麻醉药物选择 10% 的水合氯醛溶液，抓取大鼠以 3 mL/kg 剂量对其腹腔注射。待大鼠充分麻醉后，将大鼠膝关节待注射处毛发剃净，棉签蘸取体积分数 75% 的乙醇消毒，然后屈曲大鼠膝关节至 45° 左右，以髌韧带胫骨附着点外上方约 1 mm 处为进针点，然后抽取 4% 木瓜蛋白酶 0.2 mL+0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸混合溶液，经皮肤刺入有落空感即表明针头到达关节腔内，随即进行注射，注射完毕退出针头后，使用棉签压迫针口以防出血，另一膝关节采用同样方法完成木瓜蛋白酶注射，所有注射完成后给予 20 万 U 青霉素钠肌注以防大鼠感染。每隔 3 d (即第 1, 4, 7 天) 进行 1 次上述造模操作，共 3 次。

红姜提取物的剂量分组及每组所需样本量参考 ILIC 等^[9]的设计分为高、低剂量组用于探讨其抗炎活性，即把所有膝骨关节炎模型大鼠随机分为模型组、红姜高剂量组、红姜低剂量组、阳性对照组，每组 10 只大鼠。造模后所有大鼠跑步 1 周，然后每组随机抽取 1 只大鼠处死，取膝关节做组织切片，显微镜下观察关节软骨表面粗糙，个别可见裂隙，组织结构紊乱，软骨细胞弥漫增多，参照改良版 Mankin 评分标准^[12] (详见表 1)，确定造模成功。其余大鼠

进行实验干预。

实验动物造模过程的相关问题：

造模目的	探讨红姜提取物对早期膝骨关节炎大鼠关节软骨保护作用及可能机制
动物选择	SPF 级健康 SD 雄性大鼠 50 只，体质量 180–220 g
模型与所研究疾病的关系	木瓜蛋白酶注射大鼠膝骨关节炎是现有常用的建造早期膝骨关节炎大鼠模型的方法之一，可以较为稳定的建造出研究所需疾病模型
动物来源及品系	SPF 级 SD 雄性大鼠，购置并饲养于广州中医药大学实验动物中心
造模技术描述	10% 的水合氯醛溶液麻醉大鼠后，使用 0.2 mL 的 4% 木瓜蛋白酶 +0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸混合溶液注射大鼠双膝关节腔，第 1, 4, 7 天分别注射 1 次，完成后跑步 1 周
动物数量及分组方法	50 只 SD 大鼠随机分为 5 组：空白组、模型组、红姜高剂量组、红姜低剂量组和阳性对照组，每组 10 只
造模成功评价指标	造模后每组随机抽取 1 只大鼠处死，取膝关节做组织切片，参照改良版 Mankin 评分标准，确定造模成功
造模后观察指标	①软骨番红固绿染色及 mankin 评分；②血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平；③软骨 Col2a1 mRNA 表达水平
造模后动物处理	麻醉大鼠后进行腹主动脉采血，取下右膝软骨进行荧光定量 PCR 检测，左膝完整胫骨于 40 g/L 多聚甲醛固定后制备石蜡切片行番红固绿染色
动物死亡原因	实验期间未发生动物死亡
伦理委员会批准	广州中医药大学动物实验伦理委员会批准，批准号：20190917002

表 1 | Mankin 评分标准

Table 1 | Mankin scoring criteria

项目	分类	评分	项目	分类	评分
结构	正常	0	番红 O 固绿染色	正常	0
	表面不规则	1		轻度减弱	1
	表面不规则及血管翳	2		中度减弱	2
	裂隙深达软骨移行层	3		重度减弱	3
	裂隙深达软骨放射层	4		未显色	4
	裂隙深达软骨钙化层	5		潮线	完整
结构完全破坏	6	有血管穿越	1		
软骨细胞	正常	0			
	弥漫性细胞数量增多	1			
	增生性细胞簇	2			
	细胞数量减少	3			

1.4.2 干预方法 灌胃用高、低剂量红姜提取物水溶液及塞来昔布胶囊水溶液配置质量浓度分别为 20 g/L, 10 g/L, 4 g/L。确定造模成功当天即开始灌胃干预，临床药物根据《药理实验方法学》中的大鼠与人之间体表面积折算出大鼠的等效剂量^[13]，每周称质量 1 次，灌胃量根据大鼠体质量重新计算。空白组不做任何处理；模型组每天予以体质量相关剂量生理盐水灌胃；红姜高剂量组予 100 mg/kg 即 5 mL/kg 的高剂量红姜提取物水溶液灌胃，红姜低剂量组予 50 mg/kg 即 5 mL/kg 的低剂量红姜提取物水溶液灌胃。阳性对照组大鼠折算后予 18 mg/kg 即 4.5 mL/kg 的塞来昔布胶囊水溶液灌胃 (参考塞来昔布胶囊药品使用说明书，膝骨关节炎早期患者

的成人推荐剂量为 200 mg/d)。所有干预每日 1 次。共持续 4 周。

1.4.3 取材及标本处理 末次干预结束后禁食不禁水 24 h, 使用 10% 水合氯醛溶液麻醉所有大鼠, 对其进行腹主动脉采血。采血完毕后, 使用颈椎脱臼法处死大鼠, 屈曲右膝关节, 使用剪刀剪开膝关节处皮肤, 手术刀沿髌骨内侧从上至下打开关节囊并去除髌骨, 剪刀等小心剥离胫骨平台周围韧带等软组织, 使软骨暴露, 使用骨剪轻轻取下右膝胫骨平台表面软骨置于 2 mL 冻存管中, -80 °C 保存备用; 分离左膝关节软组织并暴露胫骨平台软骨后, 咬骨钳于胫骨约 1/2 处咬断胫骨, 附带关节软骨的胫骨整个置于装有 40 g/L 多聚甲醛的离心管中固定, 以便随后石蜡标本的制作。

1.4.4 番红 O- 固绿染色 40 g/L 多聚甲醛固定的标本脱钙并制备石蜡切片后常规脱蜡至水, 将切片浸没于固绿染色液中 3-5 min, 取出切片弱酸溶液快速洗涤约 15 s 以去除多余染色, 浸于番红染色液中 3-5 min, 体积分数 95% 乙醇和无水乙醇依次快速脱水, 二甲苯透明 5 min 并使用中性树胶封固。

1.4.5 ELISA 法检测血清细胞因子水平 将取材所得实验大鼠的腹主动脉血室温静置 4 h 后离心并取上层血清, 参照 ELISA 试剂盒说明书操作以检测白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 水平。

1.4.6 荧光定量 PCR 检测软骨中 Col2 α 1 mRNA 表达 分别取 50 mg 左右各组大鼠的软骨组织, 使用 Trizol 法提取总 RNA, 洗涤后无 RNase 水溶解 RNA, 根据反转录试剂盒说明书进行反转录操作得到 cDNA, 将上述 cDNA 模板与缓冲液、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶等离心混匀于 EP 管构建反应体系, 于 PCR 仪器上进行扩增。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 Col2 α 1 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 2。

表 2 | PCR 引物序列
Table 2 | PCR primer sequences

基因	引物序列	片段长度 (bp)
Col2 α 1	Forward: 5'-CAT CGA GTA CCG ATC ACA GAA G-3' Reverse: 5'-GCC CTA TGT CCA CAC CAA AT-3'	101
GAPDH	Forward: 5'-GCA AGG ATA CTG AGA GCA AGA G-3' Reverse: 5'-GGA TGG AAT TGT GAG GGA GAT G-3'	98

1.5 主要观察指标 ①大鼠软骨番红固绿染色及 Mankin 评分; ②血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平; ③软骨 Col2 α 1 mRNA 表达水平。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, GraphPad Prism 8 软件进行图表绘制, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (方差齐, 则使用 LSD 法; 方差不齐, 则使用 Dunnett's T3 法), $P < 0.05$ 则认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠 50 只, 分为 5 组, 最终每组 9 只共 45 只大鼠相关数据纳入统计学分析。

2.2 软骨组织学观察 番红 O- 固绿染色切片见图 1。空白组软骨表面光滑无裂隙, 组织结构清晰, 各层软骨细胞排列规律整齐, 细胞形态正常, 软骨基质染色基本均匀; 模型组可见软骨表面撕裂, 组织结构紊乱, 软骨细胞排列紊乱, 形态发生改变, 局部出现成簇现象, 软骨基质染色明显减轻; 红姜低剂量组软骨表面粗糙, 可见轻微撕裂, 表层软骨细胞减少, 表层、辐射层、移行层、软骨基质染色均有不同程度减轻; 红姜高剂量组表面粗糙, 但未见裂隙, 软骨细胞排列稍紊乱, 软骨基质染色较轻, 但流失程度轻于红姜低剂量组和模型组; 阳性对照组软骨表面光滑未见明显裂隙缺损, 组织结构相对完整清晰, 软骨细胞略为增多, 排列较为整齐, 可见移行层软骨基质染色较轻。

相比于空白组, 模型组、红姜低剂量组、红姜高剂量组、阳性对照组的番红 O 染色均较轻, 提示了软骨基质的流失。阳性对照组的软骨基质降解程度低于红姜高剂量组和红姜低剂量组, 而红姜低剂量组与红姜高剂量组相比, 后者的降解程度更低。

2.3 各组大鼠 Mankin 评分比较 见表 3, 图 2。干预 4 周后与空白组相比, 其余各组软骨 Mankin 评分均较高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 各治疗组评分均较低 ($P < 0.05$), 红姜低剂量组评分显著高于其余两组 ($P < 0.05$); 阳性对照组和红姜高剂量组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 3 | 各组大鼠 Mankin 评分
Table 3 | The Mankin scores in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	Mankin 评分
空白组	0.78 \pm 0.44
模型组	6.89 \pm 1.27 ^a
红姜低剂量组	4.89 \pm 0.78 ^{ab}
红姜高剂量组	3.44 \pm 0.72 ^{abc}
阳性对照组	2.89 \pm 0.20 ^{abc}

表注: 与空白组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$; 与红姜低剂量组相比, ^c $P < 0.05$

2.4 各组大鼠血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的表达水平 见表 4, 图 3。与空白组相比, 模型组、红姜低剂量组、红姜高剂量组、阳性对照组的血清白细胞介素 1 β 、血清白细胞介素 6 及血清肿瘤坏死因子 α 表达显著上调 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 各治疗组白细胞介素 1 β 表达显著下调 (均 $P < 0.05$), 且各治疗组白细胞介素 1 β 表达量阳性对照组 < 红姜高剂量组 < 红姜低剂量组, 均差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

表 4 | 各组大鼠血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子 α 表达
Table 4 | Expression of serum interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=9$, ng/L)

指标	空白组	模型组	红姜低剂量组	红姜高剂量组	阳性对照组
白细胞介素 1 β	3.28 \pm 1.14	38.41 \pm 1.38 ^a	31.60 \pm 1.75 ^{abc}	23.66 \pm 1.33 ^{ab}	17.63 \pm 1.51 ^{abc}
白细胞介素 6	8.50 \pm 2.54	65.77 \pm 5.31 ^a	50.20 \pm 7.70 ^{abc}	37.88 \pm 3.76 ^{ab}	19.51 \pm 4.44 ^{abc}
肿瘤坏死因子 α	34.62 \pm 8.72	160.96 \pm 10.51 ^a	143.72 \pm 7.94 ^{abc}	84.84 \pm 7.87 ^{ab}	61.57 \pm 6.07 ^{abc}

表注: 与空白组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$, 与红姜高剂量组相比, ^c $P < 0.05$

2.5 Col2 α 1 mRNA 的表达水平 见表 5, 图 4。空白组与红姜高剂量组、阳性对照组的 Col2 α 1 mRNA 表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 但模型组、红姜低剂量组的 Col2 α 1 mRNA 表达相较这 3 组均显著上调 ($P < 0.05$), 模型组与红姜低剂量组的 Col2 α 1 mRNA 表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 5 | 各组大鼠关节软骨 Col2 α 1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$, 相对表达量)
Table 5 | Expression of type II collagen α 1 mRNA in rat articular cartilage

组别	Col2 α 1 mRNA
空白组	1.01 \pm 0.17
模型组	7.47 \pm 2.88 ^a
红姜低剂量组	6.70 \pm 0.97 ^a
红姜高剂量组	3.09 \pm 1.44 ^b
阳性对照组	3.15 \pm 0.49 ^b

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论 Discussion

膝骨关节炎好发于老年人, 并已成为致使老年人残疾的主要原因之一^[14]。当前, 早期膝骨关节炎的治疗仍以保守疗法为主, 对于关节软骨的保护尤为重要。关节软骨为膝关节提供稳定性和对机械负荷的缓冲力, 软骨损伤是膝骨关节炎发病进展的核心问题^[15]。膝骨关节炎表现出一种全身性、低水平的炎症, 这通常由膝关节滑膜中的免疫细胞异常释放大量白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 等促炎细胞因子开始^[16], 这些促炎细胞因子还在关节软骨基质的退变中起关键作用, 它们进入软骨后会诱导基质金属蛋白酶 13 和聚集酶 (Aggrecanase) 的表达激活, 这两种酶会促进软骨基质降解, 最终导致软骨的损伤^[17]; 同时, 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 也促进了软骨中白细胞介素 6 的表达, 而白细胞介素 6 会协同白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子进一步促进基质金属蛋白酶 13 的表达^[18-19]; 另一方面, 膝骨关节炎关节中高度上调的白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 还参与机体的氧化应激反应, 影响着机体的慢性炎症^[20]。研究表明, 白细胞介素 1 β 可以诱导软骨中的诱导型一氧化氮合酶的产生, 导致一氧化氮等活性氧的含量升高, 进而刺激核因子 κ B 信号转导通路的激活, 反过来又增加了白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的产生, 加重机体炎症^[21-22]。同样, 肿瘤坏死因子 α 也可以通过与其受体结合激活肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 来发挥核因子 κ B 信号转导通路的激活作用。此外, 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 等还能刺激环氧酶 2 来增加前列腺素 E2 的合成, 而前列腺素 E2 是导致机体疼痛的主要炎症递质之一^[23]。因此白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 等炎症因子的变化与膝骨关节炎的进展及疼痛密切相关, 其表达的下调预示着膝骨关节炎中软骨损伤及炎症的减轻^[24-25]。在此次研究中, 早期膝骨关节炎模型大鼠血清中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 均表现为升高, 而使用高和低剂量红姜提取物治疗后, 大鼠血清中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 水平均发生下降,

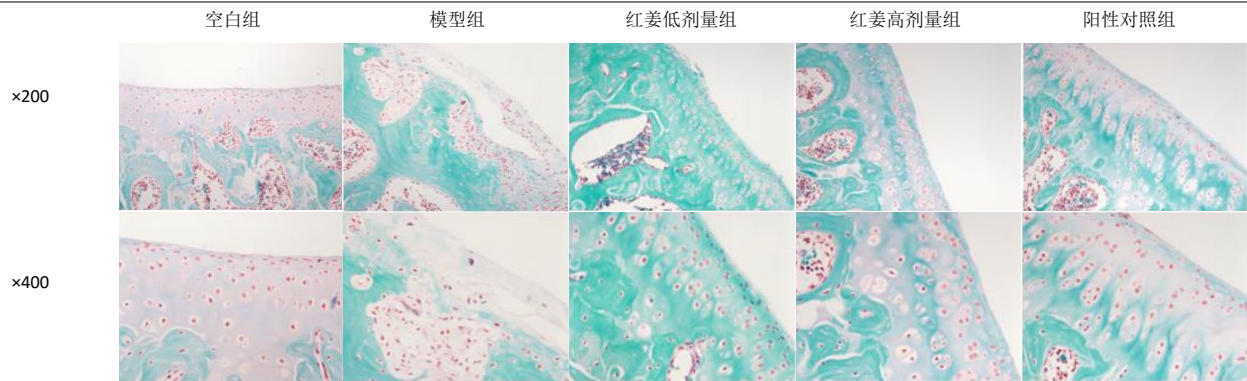
结合病理学切片所示, 说明这两种剂量的红姜提取物均减轻了早期膝骨关节炎大鼠的体内炎症, 达到了保护软骨的效果。

膝骨关节炎于中医属“骨痹”“膝痹”的范畴, 多认为风、寒、湿邪侵袭, 致机体气滞血瘀, 生为痹也^[26]。生姜味辛、性微温, 是中国传统医学中常用的药食两用的药材, 其发散风寒、逐风湿痹, 治疗痹证的历史极为悠久^[27]。研究表明, 生姜具有明显的止痛作用, 对血清炎症和氧化应激的改善具有显著影响^[28-29]。每天服用生姜可以改善中度膝骨关节炎患者的膝关节功能、生活质量及全身炎症水平^[30], 这可能是通过减少肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 等炎症因子, 抑制 INOS2/COX-2 通路的激活, 进而实现了膝骨关节炎患者的膝关节疼痛的减轻^[31]。

红姜 (*Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum*) 是生姜的一种变种, 主要产于印度尼西亚、马来西亚和中国四川等地, 被广泛应用于传统医学。红姜可以显著减轻关节炎疼痛, 在传统医学中常被用作治疗关节炎的经验用药^[32]。HPLC 鉴定此次研究所使用红姜提取物中姜辣素含量达到 5.58%, 6-姜酚含量为 2.18%。据报道, 6-姜酚可以激活 Nrf 2 转录因子, 阻断白细胞介素 1 β 诱导的一氧化氮、前列腺素 E、基质金属蛋白酶 13 和 HNE 的产生, 达到保护软骨和延缓骨关节炎的效果^[33]。此次研究结果表明高和低剂量的红姜提取物均可以在一定程度上减轻早期膝骨关节炎大鼠血清中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等促炎细胞因子的水平, 减轻软骨基质流失, 保护膝关节软骨, 其中高剂量红姜提取物在软骨 Mankin 评分上与塞来昔布相比无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 并且在抗炎及保护软骨的效果上均优于低剂量红姜提取物 ($P < 0.05$)。

同时, 实验还对大鼠软骨中 Col2 α 1 mRNA 的表达进行了研究。Col2 α 1 是膝关节软骨中间接反映软骨修复作用的 II 型胶原的 α 1 链, 其表达水平的变化在软骨退化中起重要作用^[34-35]。研究中模型组的 Col2 α 1 mRNA 表达水平高于空白组, 可能是由于软骨的损伤刺激了机体的代偿作用导致 Col2 α 1 mRNA 的表达增加, 而在各组 Col2 α 1 mRNA 表达程度上, 红姜高剂量组和阳性对照组较空白组的 Col2 α 1 mRNA 表达略微上调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 红姜低剂量组较模型组略微下调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组、红姜低剂量组比空白组、红姜高剂量组和阳性对照组均表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明高剂量下的红姜提取物可能对早期膝骨关节炎大鼠的软骨的保护更强, 不需要机体过多的代偿性修复, 而低剂量下的红姜提取物在此方面并没有表现出较为明显的作用。

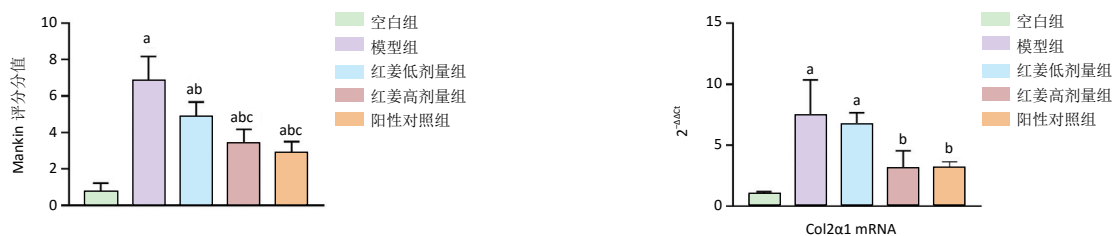
综上所述, 红姜提取物可能主要通过改善血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等促炎因子水平, 减少软骨基质流失, 达到保护软骨、延缓早期膝骨关节炎进展的作用; 且高剂量红姜提取物的抗炎及保护软骨的效果上均优于低剂量红姜提取物。



图注：相比于空白组，模型组、红姜低剂量组、红姜高剂量组、阳性对照组的番红 O 染色均较轻，阳性对照组的软骨基质降解程度低于红姜高剂量组和红姜低剂量组，红姜高剂量组降解程度低于红姜低剂量组

图 1 | 各组大鼠膝关节软骨番红 O- 固绿染色结果

Figure 1 | Safranin O-fast green staining results of rat knee cartilage in each group



图注：与空白组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ；与红姜低剂量组相比，^c $P < 0.05$

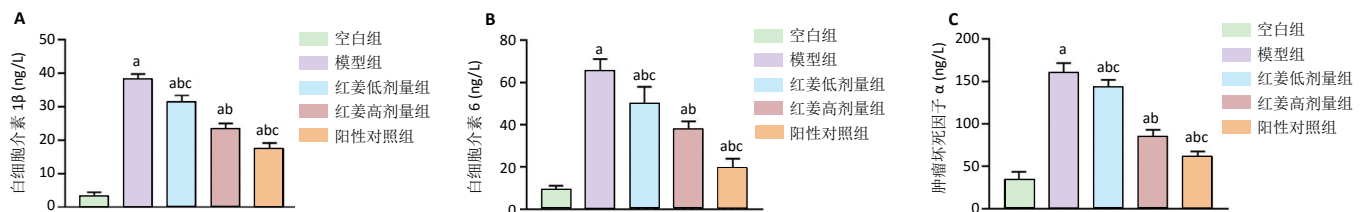
图 2 | 各组大鼠关节软骨组织 Mankin 评分统计分析

Figure 2 | Statistical value of Mankin score of rat cartilage tissue in each group

图注：与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$

图 4 | 各组大鼠关节软骨中 Col2α1 mRNA 的表达水平

Figure 4 | Expression level of type II collagen α1 mRNA in rat articular cartilage



图注：图 A 为白细胞介素 1β 统计值；B 为白细胞介素 6 统计值；C 为肿瘤坏死因子 α 统计值。与空白组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ，与红姜高剂量组相比，^c $P < 0.05$

图 3 | 各组大鼠血清细胞因子表达水平统计图

Figure 3 | Statistical graph of serum cytokine expression levels in each group

此次研究亦存在一定不足之处，在探讨红姜提取物对软骨保护作用时主要通过病理切片观察了软骨的基质流失以及检测了 Col2α1 mRNA 的表达情况，虽然通过血清检测指标结果表明了姜对早期膝骨关节炎大鼠的抗炎活性作用，但具体红姜提取物在软骨代谢中干预作用机制还未行进一步探索。据报道，白细胞介素 1β、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等促炎因子可以通过刺激 MAPK 等信号通路调节机体的细胞凋亡活动^[36]，那么具有抗炎活性的红姜提取物能否通过影响 MAPK 通路抑制调节软骨细胞的凋亡进而从更多方面达到保护软骨的效果？且当前临床常用于膝骨关节炎抗炎止痛的药物（如 NSAIDs 等）多具有胃肠道损害等不良反应，而姜在中国传统中是一种被广泛使用的药食同源的中草药，常用于胃寒呕吐等消化系统不适。相比于 NSAIDs，使用红姜提取物进

行抗炎是否具有更小的胃肠道损害作用？这些都有待进行下一步实验更多的探索验证。

作者贡献：实验设计为余瑾、罗臻，实验实施为罗臻、李宏棚，Mankin 评分由柴生颢、卢启贵、李飞龙完成，资料收集为罗臻、李宏棚、余翔、罗臻、余瑾成文，卢启贵、柴生颢、余瑾审核，罗臻、余瑾对文章负责。

经费支持：该文章接受了“广东省中医药管理局科研项目(20202085)、国家自然科学基金面上项目(81473743)及深圳市科创委 2020 年基础研究面上项目(JCYJ20190812170815559)”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，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：20190917002。实验过程遵循了《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。

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。

统计学声明: 文章统计学方法已经广州中医药大学统计学专家审核。

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] KOLASINSKI SL, NEOGI T, HOCHBERG MC, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(2):220-233.

[2] IJIMA H, SHIMOURA K, AOYAMA T, et al. Low Back Pain as a Risk Factor for Recurrent Falls in People with Knee Osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020;73(3):328-335.

[3] 朱路,王贵林. 生姜油对关节炎小鼠细胞因子和T细胞亚群的影响[J]. 长江大学学报(自科版)医学卷,2009,6(4):97-99+2.

[4] BARTELS EM, FOLMER VN, BLIDDAL H, et al. Efficacy and safety of ginger in osteoarthritis patients: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(1):13-21.

[5] RICKY ANDY SETYAWAN, SRI TASMİNATUN. Efektivitas Krim Ekstrak Zingiber officinale Linn.var.rubrum sebagai Penurun Nyeri Sendi pada Lansia. *Mutiara Medika*. 2013;13(2):105-110.

[6] CHIEN TY, HUANG SK, LEE CJ, et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Zerumbone against Mono-Iodoacetate-Induced Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):249.

[7] ABDEL-RAHMAN RF, ABD-ELSALAM RM, AMER MS, et al. Manjari attenuated pain and joint swelling in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Food Funct*. 2020;11(9):7960-7972.

[8] 林丽莎. 印尼与中国生姜对比研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.

[9] ILIC NM, DEY M, POULEV AA, et al. Anti-inflammatory activity of grains of paradise (*Aframomum melegueta* Schum) extract. *J Agric Food Chem*. 2014;62(43):10452-10457.

[10] 马玉峰,祁印泽,王庆甫,等. 关节内注射药物建立骨性关节炎动物模型研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(1):90-95.

[11] 陈婷,姚玲,柯大智,等. 生姜乙醇提取物改善果糖所致大鼠脂肪肝的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(1):28-33.

[12] KUROKI H, NAKAGAWA Y, MORI K, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(6):492-504.

[13] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.

[14] LITWIC A, EDWARDS MH, DENNISON EM, et al. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull*. 2013;105:185-199.

[15] CAMPO GM, AVENOSO A, CAMPO S, et al. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. *Biochimie*. 2010;92(2):204-215.

[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] WOODSELL-MAY JE. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2020;38(2):253-257.

[18] HASEEB A, ANSARI MY, HAQQI TM. Harpagoside suppresses IL-6 expression in primary human osteoarthritis chondrocytes. *J Orthop Res*. 2017;35(2):311-320.

[19] ROWAN AD, KOSHY PJ, SHINGLETON WD, et al. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum*. 2001;44(7):1620-1632.

[20] ANSARI MY, AHMAD N, HAQQI TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110452.

[21] SINGH R, AHMED S, ISLAM N, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum*. 2002;46(8):2079-2086.

[22] AHMAD N, ANSARI MY, HAQQI TM. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J Cell Physiol*. 2020;235(10):6366-6376.

[23] GOLDRING MB, GOLDRING SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007;213(3):626-634.

[24] SCHULZ JM, BIRMINGHAM TB, ATKINSON HF, et al. Are we missing the target? Are we aiming too low? What are the aerobic exercise prescriptions and their effects on markers of cardiovascular health and systemic inflammation in patients with knee osteoarthritis? A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2020;54(13):771-775.

[25] WEI W, HE S, WANG Z, et al. LINC01534 Promotes the Aberrant Metabolic Dysfunction and Inflammation in IL-1 β -Simulated Osteoarthritic Chondrocytes by Targeting miR-140-5p. *Cartilage*. 2019;16:1947603519888787.

[26] 杨威,石继祥,卢明. 骨性关节炎发病机制的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(8):84-85+87.

[27] 姚血明,宁乔怡,孙运花,等. 姜酚治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2018,40(1):94-96.

[28] JALALI M, MAHMOUDI M, MOOSAVIAN SP, et al. The effects of ginger supplementation on markers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Phytother Res*. 2020;34(8):1723-1733.

[29] RONDANELLI M, FOSSARI F, VECCHIO V, et al. Clinical trials on pain lowering effect of ginger: A narrative review *Phytother Res*. 2020;34(11):2843-2856.

[30] RONDANELLI M, RIVA A, ALLEGRINI P, et al. The Use of a New Food-Grade Lecithin Formulation of Highly Standardized Ginger (*Zingiber officinale*) and *Acmella oleracea* Extracts for the Treatment of Pain and Inflammation in a Group of Subjects with Moderate Knee Osteoarthritis. *J Pain Res*. 2020;13:761-770.

[31] MOZAFFARI-KHOSRAVI H, NADERI Z, DEGHAN A, et al. Effect of Ginger Supplementation on Proinflammatory Cytokines in Older Patients with Osteoarthritis: Outcomes of a Randomized Controlled Clinical Trial. *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2016;35(3):209-218.

[32] ARYANTI PI, HARYANTO J, ULFIANA E. Red Ginger (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) Massage Reduces Stiffness and Functional Disability in Elderly with Osteoarthritis. *Jurnal Ners*. 2018;(13):2.

[33] ABUSARAH J, BENABDOUNE H, SHI Q, et al. Elucidating the Role of Protandim and 6-Gingerol in Protection Against Osteoarthritis. *J Cell Biochem*. 2017;118(5):1003-1013.

[34] 李永津,林涌鹏,侯宇,等. 龙螯胶囊与骨髓间充质干细胞移植对膝骨关节炎大鼠软骨修复作用的比较研究[J]. 广州中医药大学学报,2018,35(1):123-128.

[35] 芦北极,王贵清,刘春磊. 髌关节骨性关节炎软骨组织II型胶原 $\alpha 1$ 链和激活T细胞核因子1的表达水平及意义[J]. 中国老年学杂志,2013,33(3):548-550.

[36] 童洁,廖瑛,陈政宇,等. 骨关节炎软骨细胞自噬及丝裂原活化蛋白激酶信号通路的调控[J]. 中国组织工程研究,2021,25(20):3246-3251.

(责任编辑: WZH, ZN, SX)