

蒙药蓝刺头治疗膝骨关节炎模型兔的软骨损伤

<https://doi.org/10.12307/2022.529>孔令跃¹, 胡永成¹, 韩长旭²

投稿日期: 2021-05-11

送审日期: 2021-05-13

采用日期: 2021-07-01

在线日期: 2021-11-18

中图分类号:

R459.9; R318; R684.3

文章编号:

2095-4344(2022)17-02649-05

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章亮点—

△蒙药蓝刺头是蒙医治疗骨病的常用药, 然而其能否对骨关节炎起到治疗作用, 其潜在机制仍需探究。
△基于以上考虑, 结合膝骨关节炎动物模型, 确定蒙药蓝刺头是否可以延缓膝骨关节炎的疾病进展, 探究其对II型胶原蛋白及基质金属蛋白酶13表达的影响。

动物模型

建立膝骨关节炎兔模型, 通过组织学评价造模是否成功。

分组:

- (1) 正常对照组;
- (2) 模型对照组;
- (3) 蓝刺头治疗组。

蒙药蓝刺头干预

- (1) 对蓝刺头治疗组予以蒙药蓝刺头干预;
- (2) 苏木精-伊红染色观察软骨组织学变化, RT-PCR及免疫组化法测定各组中II型胶原蛋白及基质金属蛋白酶13的表达。

研究结论

蒙药蓝刺头可以通过促进II型胶原蛋白表达, 抑制基质金属蛋白酶13表达, 对骨关节炎起到积极的防治作用。

文题释义:

骨关节炎: 又称为骨关节病, 退行性关节病和骨质增生, 是一种最常见的关节疾病。该病不仅发生关节软骨损害, 还累及整个关节, 包括软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜和关节周围肌肉, 最终发生关节软骨退变、纤维化、断裂、溃疡及整个关节面的损害。典型的临床表现包括疼痛、僵硬和关节变形。

蒙药蓝刺头: 所含化学成分十分复杂, 主要含有生物碱类、黄酮类、三萜类和有机酸及其酯类等, 具有多种生物活性。始载于蒙医典籍《智慧文鉴》中, 具有“接骨愈伤、壮骨治”的功能, 属于蒙医自采自用药之一。

摘要

背景: 骨关节炎临床上常见, 是导致中老年人慢性残障的最常见原因。蒙药蓝刺头在骨病中有积极的治疗作用, 然而其对骨关节炎的作用与机制尚待研究。

目的: 探究蒙药蓝刺头在膝骨关节炎中的作用以及对II型胶原蛋白和基质金属蛋白酶13表达的影响。

方法: 选取健康中国大耳白兔30只, 随机分组, 正常对照组10只; 膝骨关节炎组20只兔右膝关节用管型石膏固定8周, 制备膝骨关节炎模型, 造模成功后又分为蓝刺头治疗组及模型对照组(n=10)。蓝刺头治疗组兔灌胃20 mL/kg的蒙药蓝刺头溶液, 含药量为3.25 g/L; 正常对照组与模型对照组灌胃生理盐水20 mL/kg。各组均连续灌胃90 d, 之后麻醉处死取膝关节软骨制备切片。苏木精-伊红染色观察软骨组织学变化; RT-PCR测定各组中II型胶原蛋白、基质金属蛋白酶13的mRNA表达, 免疫组化法观察各组中II型胶原蛋白、基质金属蛋白酶13的蛋白表达。

结果与结论: ①通过苏木精-伊红染色观察发现, 蒙药蓝刺头可以改善骨关节炎软骨损伤, 促进软骨细胞及基质增生; ②此外, 蒙药蓝刺头可以促进骨关节炎中II型胶原蛋白的mRNA及蛋白表达, 抑制由骨关节炎引起的基质金属蛋白酶13 mRNA及蛋白高表达; ③提示蒙药蓝刺头可以通过促进II型胶原蛋白表达, 抑制基质金属蛋白酶13表达, 对骨关节炎起到积极的防治作用。

关键词: 骨关节炎; 蒙药; 蓝刺头; II型胶原蛋白; 基质金属蛋白酶13; 民族医学

缩略语: 基质金属蛋白酶13: matrix metalloproteinase 13, MMP-13

Echinops latifolius, a Mongolian medicine, for treating cartilage injury in a rabbit model of knee osteoarthritisKong Lingyue¹, Hu Yongcheng¹, Han Changxu²

¹Department of Bone and Soft Tissue Oncology, the Second Hospital to Tianjin Medical University, Tianjin 300200, China; ²Department of Arthroscopy and Sports Medicine Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Kong Lingyue, MD candidate, Attending physician, Department of Bone and Soft Tissue Oncology, the Second Hospital to Tianjin Medical University, Tianjin 300200, China

Corresponding author: Hu Yongcheng, MD, Chief physician, Department of Bone and Soft Tissue Oncology, the Second Hospital to Tianjin Medical University, Tianjin 300200, China

Co-corresponding author: Han Changxu, MD, Associate chief physician, Department of Arthroscopy and Sports Medicine Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Osteoarthritis is clinically common, which is the most common cause of chronic disability in middle-aged and elderly people. *Echinops latifolius*, as a Mongolian medicine, has positive therapeutic effect in bone diseases. However, its effect and mechanism on osteoarthritis remain to be investigated.

OBJECTIVE: To investigate the effect of *Echinops latifolius* on knee osteoarthritis and on the expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13.

¹天津医科大学天津医院骨与软组织肿瘤科, 天津市 300200; ²内蒙古医科大学第二附属医院关节镜与运动医学外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

第一作者: 孔令跃, 男, 1985年生, 内蒙古自治区赤峰市人, 汉族, 天津医科大学天津医院在读博士, 主治医师, 主要从事骨性关节炎发病机制研究。

通讯作者: 胡永成, 博士, 主任医师, 天津医科大学天津医院骨与软组织肿瘤科, 天津市 300200

通讯作者: 韩长旭, 博士, 副主任医师, 内蒙古医科大学第二附属医院关节镜与运动医学外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

<https://orcid.org/0000-0002-1681-7053> (孔令跃)

引用本文: 孔令跃, 胡永成, 韩长旭. 蒙药蓝刺头治疗膝骨关节炎模型兔的软骨损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(17):

2649-2653.



METHODS: Thirty healthy Chinese white rabbits were selected and randomly divided into a control group ($n=10$) and a knee osteoarthritis group ($n=20$). Rabbits in the knee osteoarthritis group were fixed with cast plaster for 8 weeks to prepare knee osteoarthritis models. After successful modeling, rabbits in the knee osteoarthritis group were subdivided into an *Echinops latifolius* group and a model control group. In the *Echinops latifolius* group, 3.25 g/L *Echinops latifolius* was administered at a dose of 20 mL/kg by gavage. The control and model control groups were intragastrically administered normal saline at a dose of 20 mL/kg. Rabbits in each group were given continuous gastric gavage for 90 days, and then killed under anesthesia. Knee joint cartilage was taken and sliced. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the histological changes of cartilage. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13, and immunohistochemical staining was used to detect the protein expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13.

RESULTS AND CONCLUSION: *Echinops latifolius* could improve osteoarthritis-induced cartilage damage of and promote the proliferation of chondrocytes and matrix. In addition, *Echinops latifolius* could promote the mRNA and protein expression of type II collagen in osteoarthritis, and inhibit the high expression of matrix metalloproteinase 13 at mRNA and protein levels caused by osteoarthritis. To conclude, *Echinops latifolius* can promote the expression of type II collagen and inhibit the expression of matrix metalloproteinase 13, thereby playing a positive role in the prevention and treatment of osteoarthritis.

Key words: osteoarthritis; Mongolian medicine; *Echinops latifolius*; type II collagen; matrix metalloproteinase 13; ethnic medicine

How to cite this article: KONG LY, HU YC, HAN CX. *Echinops latifolius*, a Mongolian medicine, for treating cartilage injury in a rabbit model of knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(17):2649-2653.

0 引言 Introduction

骨关节炎临床上常见，是导致中老年人慢性残障的最常见原因，其特征是关节软骨的变性，从而导致膝关节疼痛、肿胀、僵硬、肌肉萎缩，最终引起功能残疾^[1-3]。骨关节炎的特征是软骨进行性的退化，但也有滑膜炎、骨赘形成和软骨下骨硬化，治疗主要以缓解疼痛症状为基础，但到目前为止，尚无有效药物可以阻止疾病的进展。软骨只含有一种细胞类型，即软骨细胞，包裹在它们合成的富含胶原的细胞外基质中，软骨病损作为骨关节炎最常见的病理现象，是骨关节炎症状的根源和治疗困难的症结所在^[4-5]。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞成分，具有维持细胞外基质成分合成与降解平衡的重要功能，是骨关节炎发病过程中的重要因素，软骨细胞分泌正常软骨结构胶原和糖蛋白，是软骨细胞正常功能的表型特征，对软骨基质保持稳定代谢状态和正常力学特征至关重要^[6]。在骨关节炎病理微环境下，软骨细胞表型特征紊乱，趋向去分化或异常再分化状态^[6-7]。

II型胶原蛋白已被证明为骨关节炎生物标志物的潜在来源^[8]，这是因为II型胶原蛋白是软骨中最丰富的蛋白质成分，对透明软骨具有相对特异性^[8]。此外，II型胶原蛋白网络损伤在骨关节炎的病理中是一个关键事件，部分原因是软骨内的胶原转换速度非常慢^[8]。基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)是靶向软骨降解的主要酶，此外，在结缔组织中MMP-13的表达更为显著^[9]。另外，有研究表明MMP-13可以降解软骨中的II型胶原蛋白，如上文提及，II型胶原蛋白是软骨基质形成的重要组成部分，因此MMP-13在骨关节炎中扮演重要的作用^[10]。有研究发现，抑制MMP-13的表达，促进II型胶原蛋白表达，可以有效延缓骨关节炎的发生发展^[11]。

蒙医蒙药是中国民族医学的重要组成部分，其系统的理论体系、独特的诊疗方法和显著的临床疗效正被越来越多的人所认可。蒙药蓝刺头是菊科多年生本草植物蓝刺头(*Echinops latifolius* Tausch)的干燥复头状花序，蓝刺头所含化学成分十分复杂，主要含有生物碱类、黄酮类、三萜类和有机酸及其酯类等，具有多种生物活性。始载于蒙医医典《智慧文鉴》中，具有“接骨愈伤、壮骨治”的功能，属于蒙医自采自用药之一^[12]。蓝刺头能够促进成骨细胞活性及骨生长因子表达，提高骨形态发生蛋白2、血管内皮生长因子的表达；由于骨膜富含丰富的微血管，并有成骨细胞和未分化的间充质干细胞等参

与膜内成骨和软骨内成骨过程，而蓝刺头可促进血管生成，促进间质干细胞向成骨细胞分化，从而促进骨折愈合^[13]。而针对蒙药蓝刺头在骨关节炎中的作用及机制鲜有研究，蒙药蓝刺头可以调节生物的脂质代谢、营养物质代谢，可以调节生物的激素水平，也可以促进成骨分化，但是在骨关节炎中的潜在机制与作用仍未见报道，有待实验研究证明蒙药蓝刺头是否对骨关节炎起作用。基于此，此次研究拟通过建立动物模型，探究蒙药蓝刺头在骨性关节炎中的影响与作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，组间比较采用 One-way ANOVA 法。

1.2 时间及地点 实验于2020年6月至2021年4月在内蒙古医科大学基础医学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 动物 选取健康中国大耳白兔30只，清洁级，8月龄，雄性，体质量(2 632.5±296.7) g，购自内蒙古医科大学动物实验中心，许可证号：SCXK京2020-0014。

1.3.2 药物 蓝刺头原药购于内蒙古中医医院，制剂由内蒙古医科大学方剂学重点实验室制备。

1.4 方法

1.4.1 分组与造模 选取健康中国大耳白兔30只，按随机数字表法分为2组：正常对照组10只；膝骨关节炎组20只兔右膝关节用管型石膏固定8周，制备膝骨关节炎模型。造模成功后又分为蓝刺头治疗组及模型对照组($n=10$)，蓝刺头治疗组兔灌胃20 mL/kg的蓝刺头溶液，含药量为3.25 g/L；分别予以正常对照组与模型对照组灌胃生理盐水20 mL/kg。各组均连续灌胃90 d，之后以2%的戊巴比妥钠3 mL/kg腹腔注射麻醉处死各组兔，取膝关节软骨制备切片。

1.4.2 软骨苏木精-伊红染色 将取材软骨组织采用正丁醇脱水及脱钙处理后，在恒冷切片机上切15-30 μm的切片，然后贴在附有明胶涂层的载玻片上。通过苏木精-伊红染色法，观察3组模型软骨组织的软骨细胞、基质情况。

1.4.3 免疫组化染色检测II型胶原蛋白、MMP-13的蛋白表达 将取材软骨组织采用正丁醇脱水及脱钙处理后，在恒冷切片机上切15-30 μm的切片，然后贴在附有明胶涂层的载玻片上。将切片用于II型胶原蛋白、MMP-13的免疫组化染色，免疫组化染色的方法采用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法。

组织工程实验动物造模过程的相关问题	
造模目的	研究蒙药蓝刺头对骨性关节炎的作用及分子机制
选择动物的条件	8月龄健康雄性中国大耳白兔
模型与所研究疾病的关系	常规制备膝骨关节炎模型
动物来源及品系	8月龄健康雄性中国大耳白兔，购自内蒙古医科大学动物实验中心
造模技术描述	采用石膏固定制备膝骨关节炎模型，正常对照组不做处理
动物数量及分组方法	30只兔随机分为3组，正常对照组10只，膝骨关节炎组20只制备膝骨关节炎模型；膝骨关节炎组再分为模型对照组及蓝刺头治疗组，每组10只
造模成功评价指标	观察软骨光滑程度，软骨表层不平整即造模成功
造模后观察指标	通过苏木精-伊红染色法，观察各组兔软骨、基质情况；通过RT-PCR检测II型胶原蛋白、MMP-13的mRNA表达，通过免疫组化检测II型胶原蛋白、MMP-13的蛋白表达
造模后动物处理	实验过程中未出现动物死亡
伦理委员会批准	已经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准

1.4.4 RT-PCR 检测 II 型胶原蛋白、MMP-13 的 mRNA 表达 设计目的基因 (II 型胶原蛋白、MMP-13) 和 GAPDH 引物并通过 Blast 程序 (NCBI GenBank) 验证，合成 cDNA 后按照上样量 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 倍比稀释，对比相同反应条件下的目的基因引物和内参基因 GAPDH 的 PCR 扩增效率差异。二者扩增效率差异 < 0.1 时采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，扩增效率差异 > 0.1 时采用双标准曲线法，对比目的基因在各组之间的差异。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
基质金属蛋白酶 13	F CTT CTT CTT GTT GAG CTG GAC TC
	R CTG TGG AGG TCA CTG TAG ACT
II 型胶原蛋白	F CCT GGC AAA GAT GGT GAG ACA G
	R CCT GGT TTT CCA CCT TCA CCT G
GAPDH	F TGA ACG GGA AGC TCA CTG G
	R TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

1.5 主要观察指标 苏木精-伊红染色观察 3 组模型软骨面光滑、光泽程度以及软骨、基质情况；RT-PCR 检测 II 型胶原蛋白、MMP-13 的 mRNA 表达，通过免疫组化法检测 II 型胶原蛋白、MMP-13 的蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 统计软件处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 One-way ANOVA 法，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

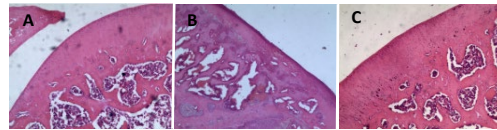
2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共纳入 30 只实验大白兔，随机分为 3 组，无动物缺失。

2.2 软骨苏木精-伊红染色组织学图 课题组成功建立了膝骨关节炎兔模型，详见图 1，可见正常对照组软骨细胞增生明显，基质增多；模型对照组可见软骨表层不平整；而蓝刺头治疗组可见蒙药蓝刺头可改善不平整的软骨表层，促进软骨细胞增生及基质增多。

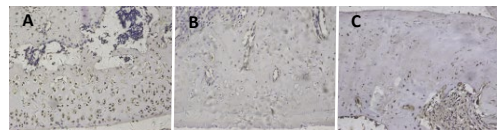
2.3 免疫组化结果 通过对经典因子 II 型胶原蛋白及 MMP-13 进行免疫组化，可见 II 型胶原蛋白在模型对照组较正常对照组

染色较浅，蓝刺头治疗组较模型对照组深染，说明蒙药蓝刺头可有效抑制由关节炎引起的 II 型胶原蛋白低表达，起到促进 II 型胶原蛋白表达的作用。MMP-13 在模型对照组较正常对照组染色较深，蓝刺头治疗组较模型对照组浅染，说明蒙药蓝刺头抑制了由关节炎引起的 MMP-13 高表达，见图 2, 3。



图注：图 A-C 分别为正常对照组、模型对照组及蓝刺头治疗组
图 1 | 软骨苏木精-伊红染色组织学图片 (x40)

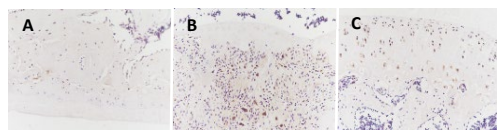
Figure 1 | Histological observation of cartilage using hematoxylin-eosin staining (x40)



图注：图 A-C 分别为正常对照组、模型对照组及蓝刺头治疗组。模型对照组较正常对照组浅染，蓝刺头较模型对照组深染，说明蒙药蓝刺头可有效抑制由关节炎引起的 II 型胶原蛋白低表达，起到促进 II 型胶原蛋白表达的作用

图 2 | 各组兔膝关节软骨 II 型胶原蛋白的免疫组化图片 (x200)

Figure 2 | Immunohistochemical staining of type II collagen in rabbit knee cartilage (x200)

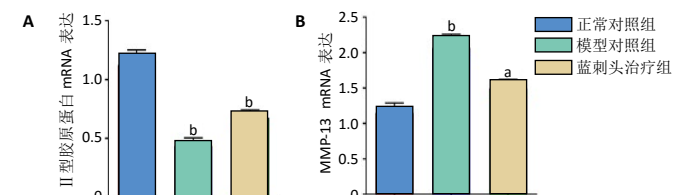


图注：图 A-C 分别为正常对照组、模型对照组及蓝刺头治疗组。模型对照组较正常对照组深染，蓝刺头较模型对照组浅染，说明蒙药蓝刺头抑制了由关节炎引起的基质金属蛋白酶 13 高表达

图 3 | 各组兔膝关节软骨基质金属蛋白酶 13 的免疫组化图片 (x200)

Figure 3 | Immunohistochemical staining of matrix metalloproteinase 13 in rabbit knee cartilage (x200)

2.4 RT-PCR 检测结果 通过 RT-PCR 检测各组中 II 型胶原蛋白与 MMP-13 的 mRNA 表达，结果发现，模型对照组 II 型胶原蛋白 mRNA 表达较正常对照组下调 ($P < 0.05$)，通过蒙药蓝刺头的作用，II 型胶原蛋白 mRNA 表达较模型对照组上调 ($P < 0.05$)。另外模型对照组的 MMP-13 mRNA 表达较正常对照组上调 ($P < 0.05$)，通过蒙药蓝刺头的作用，MMP-13 mRNA 在蓝刺头治疗组中的表达较模型对照组下调 ($P < 0.05$)，见图 4。



图注：图 A 中，模型对照组 II 型胶原蛋白 mRNA 表达较正常对照组下调，通过蒙药蓝刺头作用，II 型胶原蛋白 mRNA 较模型对照组上调；图 B 中，MMP-13 mRNA 表达在模型对照组较正常对照组上调，通过蒙药蓝刺头作用，MMP-13 mRNA 在蓝刺头治疗组中较模型对照组下调。与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$

图 4 | 各组 II 型胶原蛋白与基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) 的 mRNA 表达
Figure 4 | mRNA expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13

3 讨论 Discussion

蒙医蒙药是中国民族医学的重要组成部分，其系统的理论体系、独特的诊疗方法和显著的临床疗效正被越来越多的人所认可。此次研究创新性发现了蒙药蓝刺头对骨性关节炎的治疗作用，发现蒙药蓝刺头可以上调Ⅱ型胶原蛋白的表达水平，并且能够抑制关节炎中 MMP-13 的高表达。研究表明蒙药蓝刺头可以促进间充质干细胞向成骨细胞分化，从而增加骨量，起到治疗骨质疏松的作用。蒙医在治疗前臂骨折、骨不愈合等情况时，惯用内服蓝刺头水煎剂或复方制剂，预后良好。蓝刺头中多种成分具有抗炎作用，同时蓝刺头多糖 B 具有抗氧化性的能力^[14]。蓝刺头多糖具有较强的还原能力，以及清除羟基自由基和 1, 1-二苯基-2-三硝基苯胍有机自由基的能力^[14]。另外蓝刺头能够促进成骨细胞活性及提高骨生长因子，提高骨形态发生蛋白 2、血管内皮生长因子的表达，由于骨髓富含丰富的微血管，并有成骨细胞和未分化的间充质干细胞等参与膜内成骨和软骨内成骨过程，促进成骨，而蓝刺头可促进血管生成及间质干细胞向成骨细胞分化，从而促进骨折愈合^[13]。研究发现蓝刺头具备调节血脂的作用，能改善脂代谢的异常，虽然不能直接调节血脂，但可以通过间接的方式进行血脂调节^[15]。研究表明，蓝刺头可以通过调节干酪氨酸和甘油磷脂代谢有效改善骨质疏松的一般状况^[16]；同时研究表明，蒙药蓝刺头可能具有促进成骨细胞活性及提高骨生长因子表达的作用^[13]。蒙药蓝刺头可通过类雌激素样作用抑制骨吸收，促进骨形成，调节骨吸收与骨形成的耦联，降低骨转换率，减少骨丢失^[17]。另外，有研究表明，蒙药蓝刺头增强了骨髓间充质干细胞的细胞活力和集落形成能力，并提高了雌激素受体 α 、雌激素受体 β 、p-AKT 和 p-ERK 表达水平，因此，蒙药蓝刺头可以减少骨丢失，延缓骨质疏松的发生和发展，增加骨髓间充质干细胞中雌激素受体 α 、雌激素受体 β 、p-AKT 和 p-ERK 的表达水平^[18]。综上所述，蓝刺头具有成骨、促进血管生成及间充质干细胞分化的作用，可为关节炎治疗提供潜在的思路。鲜有研究探讨蒙药蓝刺头与骨性关节炎的关联，蒙药蓝刺头能否调控Ⅱ型胶原蛋白、MMP-13 的表达，也未有研究报道。此次研究通过实验发现，蒙药蓝刺头可能通过促进关节炎中Ⅱ型胶原蛋白的表达，促进细胞基质增生；通过抑制关节炎中 MMP-13 的表达，防止基质降解，从而起到保护软骨的作用。

研究发现，基质金属蛋白水解酶与骨性关节炎息息相关，近期的研究表明骨性关节炎患者关节软骨基质金属蛋白酶 3 和金属蛋白酶组织抑制因子 1 水平与病变严重程度相关，可用作评价膝骨关节炎病程和进展的有效指标^[19]。此次研究将重点放到了 MMP-13 上，MMP-13 是靶向软骨降解的主要酶，骨性关节炎发病的基本原理就是软骨的合成与代谢分解的相互过程，这其中 MMP-13 扮演着重要的角色，因其对软骨的分解代谢轴具有重要的调控作用，通过抑制 MMP-13 的表达可以起到抑制软骨分解代谢轴的作用，对骨性关节炎发生发展的预防有积极作用^[20]。另有研究表明，P38/CREB/MMP-13 轴在骨性关节炎软骨细胞中活跃，可能导致软骨变性，可以开发针对这一途径的有效新疗法^[21-22]。此外，有研究表明抑制

MMP-13 的表达，能够干扰软骨细胞分化的后期阶段，从而实现抑制软骨重塑与降解，起到对骨关节炎的抑制作用^[23]。综上，MMP-13 是软骨病理性破坏的关键酶，此次研究发现蒙药蓝刺头可以抑制 MMP-13 的表达，从而抑制膝关节炎软骨的分解与破坏，实现抑制骨关节炎发生发展的作用。当然，MMP-13 的调控因子包括可以靶向作用的 MicroRNA 以及相应的信号传导通路也是今后要研究的重点方向。软骨细胞外基质主要由Ⅱ型胶原和聚集聚糖组成，由包括 MMPs 在内的蛋白水解酶过表达导致Ⅱ型胶原过度降解软骨细胞是骨关节炎发病机制中的主要进程。骨关节炎的主要危险因素是年龄^[24]，部分原因是晚期糖基化终末产物的积累^[25]。晚期糖基化终末产物具有很强的抗降解能力，也是导致骨关节炎发生的重要因素^[26-28]。研究表明，水杨苷可以促进Ⅱ型胶原蛋白表达，防治软骨损伤，同时可以抑制晚期糖基化终末产物引起的Ⅱ型胶原蛋白表达降低，具体表现为缓解氧化损伤，修复免疫细胞并防止软骨降解，激活核因子 κ B 信号通路^[11]。另有研究证实，Ⅱ型胶原衍生物可以免疫调节 M2 激活的巨噬细胞，使局部骨关节炎微环境向促软骨生成方向改变，并促进炎症条件下的软骨修复，抑制 MMP-13 的表达^[29]。另有关于金丝桃苷的研究发现，金丝桃苷可以通过促进Ⅱ型胶原蛋白，并调节骨关节炎相关通路如 PI3K/AKT/核因子 κ B 及 MAPK 信号通路，改善关节炎的症状^[30]。因此，促进Ⅱ型胶原蛋白表达一直以来是防治骨关节炎的重要思路，通过促进Ⅱ型胶原蛋白表达，可以实现延缓骨关节炎、改善骨关节炎进程的作用。此次研究发现，蒙药蓝刺头可以通过促进Ⅱ型胶原蛋白表达，抑制 MMP-13 表达，从而改善软骨内微环境，促进基质增生，防止软骨基质降解与破坏^[11]。作者未来会将重点着眼于蒙药蓝刺头通过调控信号通路作用于骨性关节炎，而骨性关节炎的发病机制与表皮生长因子受体、Hedgehog、核因子 κ B、Notch、MAPK、Hippo-Yes 相关蛋白通路有关联^[31]。蒙药蓝刺头靶向调控 miRNA 也是研究的重点，通过调控 miRNA 的表达，进一步调控相应的分子与通路，实现对骨关节炎的防治作用将是未来研究的新思路与重点方向。此次研究初步证实了蒙药蓝刺头在骨关节炎中的防治作用，表明了蒙药蓝刺头治疗骨关节炎的积极作用，为蓝刺头治疗骨关节炎领域填补了空白，当然蓝刺头的有效作用部位也是未来研究的新方向。

综上所述，蒙药蓝刺头能够通过有效抑制骨关节炎导致的Ⅱ型胶原蛋白表达降低、MMP-13 表达增加，起到促进Ⅱ型胶原蛋白表达、抑制 MMP-13 表达的作用。此外，蒙药蓝刺头可以促进软骨基质增生，抑制软骨降解与破坏，对骨关节炎的发生发展产生积极的预防与治疗作用，具体的调控通路和机制有待进一步研究。

致谢：感谢内蒙古医科大学提供的场地与设备。

作者贡献：韩长旭、孔令跃、胡永成负责实验设计，孔令跃负责实验实施，胡永成负责指标测定。

经费支持：该文章没有接受任何经费支持。

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: 实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 YKD2020012。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。

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。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经内蒙古医科大学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

- IANNONE F, LAPADULA G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res.* 2003;15(5):364-372.
- MOLLOY MG, MOLLOY CB. Contact sport and osteoarthritis. *Br J Sports Med.* 2011;45(4):275-277.
- CORYELL PR, DIEKMAN BO, LOESER RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2021;17(1):47-57.
- CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol.* 2019;65:49-65.
- MESSINA OD, VIDAL WILMAN M, VIDAL NEIRA LF. Nutrition, osteoarthritis and cartilage metabolism. *Aging Clin Exp Res.* 2019;31(6): 807-813.
- ATTUR MG, PATEL IR, PATEL RN, et al. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998; 110(1):65-72.
- ZHENG L, ZHANG Z, SHENG P, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. *Ageing Res Rev.* 2021;66:101249.
- HENROTIN Y, ADDISON S, KRAUS V, et al. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Current Opinion in Rheumatology.* 2007;19(5):444-450.
- VINCENTI M, BRINCKERHOFF C. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4(3):157-164.
- SHIOMI T, LEMAÎTRE V, D'ARMIENTO J, et al. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int.* 2010;60(7):477-496.
- GAO F, ZHANG S. Salicin inhibits AGE-induced degradation of type II collagen and aggrecan in human SW1353 chondrocytes: therapeutic potential in osteoarthritis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47(1):1043-1049.
- 王宏伟, 杨婷, 董玉. 蓝刺头的研究进展 [J]. *疾病监测与控制杂志*, 2011,5(12):734-735.
- 巴音额古乐, 金鸿宾. 蒙药蓝刺头对骨折愈合过程中 BMP-2 及 VEGF 表达影响 [J]. *中国民族医药杂志*, 2017,6(6):53-55.
- 杨斌, 萨茹丽, 张月梅, 等. 蓝刺头多糖体外抗氧化及抗菌活性的研究 [J]. *华北农学报*, 2016,31(4):233-238.
- 姜梦如, 刘丹丹, 朱浩, 等. 蓝刺头及蓝刺头复方水提物对实验性 II 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(5):15-17.
- WANG J, DONG X, MA F, et al. Metabolomics profiling reveals Echinops latifolius Tausch improves the trabecular micro-architecture of ovariectomized rats mainly via intervening amino acids and glycerophospholipids metabolism. *J Ethnopharmacol.* 2020;260: 113018.
- 刘岩, 鞠亚波, 常虹. 蒙药蓝刺头对去卵巢模鼠骨钙素影响的实验研究 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2014,36(s1):7-11.
- LIU Y, WANG X, CHANG H, et al. Mongolian Medicine echinops prevented postmenopausal osteoporosis and induced ER/AKT/ERK pathway in BMSCs. *Biosci Trends.* 2018;12(3):275-281.
- 郭波, 马旭, 柳柳, 等. 膝关节骨关节炎患者软骨炎症因子表达与病变程度的相关性 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(2):78-83.
- BLOM AB, LENT P, LIBREGTS S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheumatol.* 2010;56(1):147-157.
- JI B, MA Y, WANG H, et al. Activation of the P38/CREB/MMP13 axis is associated with osteoarthritis. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13: 2195-2204.
- ZHANG W, ZHANG C, LUO C, et al. Design, cyclization, and optimization of MMP13-TIMP1 interaction-derived self-inhibitory peptides against chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Int J Biol Macromol.* 2019; 121:921-929.
- ZHANG J, ZHANG W, SHI J, et al. Dlx2 overexpression enhanced accumulation of type II collagen and aggrecan by inhibiting MMP13 expression in mice chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; S0006291X18311215.
- SACITHARAN PK. Ageing and Osteoarthritis. *Subcell Biochem.* 2019;91: 123-159.
- DICKSON BM, ROELOFS AJ, ROCHFORD JJ, et al. The burden of metabolic syndrome on osteoarthritic joints. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):289.
- VERZIJL N, DEGROOT J, ZAKEN CB, et al. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheuma.* 2002;46(1):114-123.
- QU H, LI J, WU L, et al. Trichostatin A increases the TIMP-1/MMP ratio to protect against osteoarthritis in an animal model of the disease. *Mol Med Rep.* 2016;14:2423-2430.
- HAO HQ, ZHANG JF, HE QQ, et al. Cartilage oligomeric matrix protein, C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen, and matrix metalloproteinase-3 as biomarkers for knee and hip osteoarthritis (OA) diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(5):726-736.
- DAI M, SUI B, XUE Y, et al. Cartilage repair in degenerative osteoarthritis mediated by squid type II collagen via immunomodulating activation of M2 macrophages, inhibiting apoptosis and hypertrophy of chondrocytes. *Biomaterials.* 2018;180:91-103.
- SUN K, LUO J, JING X, et al. Hyperoside ameliorates the progression of osteoarthritis: An in vitro and in vivo study. *Phytomedicine.* 2021;80: 153387.
- 廖建钊, 章晓云, 张璇. 骨性关节炎发生发展中的分子信号通路 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(21):3394-3400.

(责任编辑: GD, ZN, SX)