

白藜芦醇对膝骨关节炎模型大鼠关节液中氧化应激和炎症因子的调控作用

任伟亮, 焦永伟, 张健, 杨立英, 杨琦

<https://doi.org/10.12307/2024.497>

投稿日期: 2023-04-21

采用日期: 2023-09-02

修回日期: 2023-10-19

在线日期: 2023-10-26

中图分类号:

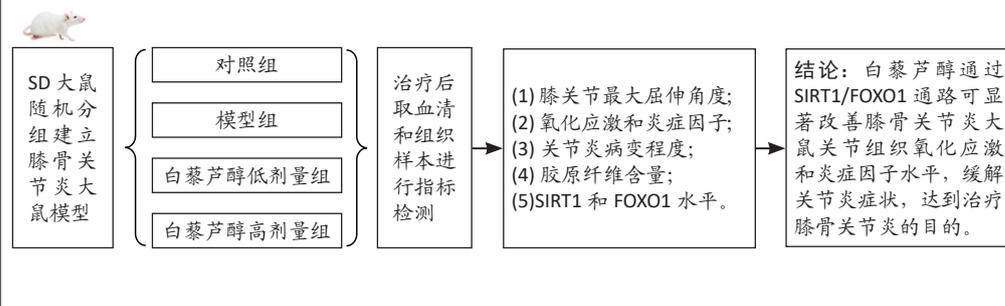
R459.9; R318; R684.3

文章编号:

2095-4344(2024)32-05154-05

文献标识码: B

文章快速阅读: 白藜芦醇通过 SIRT1/FOXO1 通路对大鼠膝骨关节炎的作用机制



文题释义:

沉默信息调节因子1: 简称SIRT1, 是SIRT家族中的一员, 是一个烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖的组蛋白/非组蛋白去乙酰化酶, 其在延长寿命、细胞周期调控、细胞凋亡调节、物质代谢调节和炎症过程中起着重要作用。

氧化应激: 是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用。

摘要

背景: 膝骨关节炎是临床常见退行性关节疾病, 主要表现为慢性炎症和氧化应激反应。白藜芦醇具有抗炎和抗氧化应激的生物作用, 因此可对症进行治疗, 有望为膝骨关节炎治疗提供新的策略。

目的: 探讨白藜芦醇通过沉默信息调节因子 1(silence information regulator 1, SIRT1)/叉头框转录因子O1(forkhead transcription factor O1, FOXO1)通路对大鼠膝骨关节炎的作用机制。

方法: 40只SD大鼠随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组, 每组10只, 除对照组外均建立膝骨关节炎模型, 分别在造模的第1, 4, 7天注射4%木瓜蛋白酶溶液与0.3 mol/L半胱氨酸溶液(1:1混置0.5 h)的混合液20 μL。造模成功后1 d开始给药, 白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组大鼠经关节腔注射白藜芦醇25 mg/kg或100 mg/kg, 对照组和模型组经关节腔注射等体积生理盐水。治疗28 d后, 测定4组大鼠膝关节最大活动度; 应用放射免疫法和ELISA法检测膝关节液中氧化应激指标和炎症因子水平; 番红O-固绿染色分析膝关节中胶原纤维含量; 采用Mankin组织学评分分析关节炎病变程度; 蛋白质免疫印迹法检测膝关节SIRT1和FOXO1水平。

结果与结论: ①与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节最大屈伸角度明显增加, 且高剂量组明显高于低剂量组($P < 0.05$); ②与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节液中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶水平显著增加; 而丙二醛水平显著下降, 且高剂量组明显优于低剂量组($P < 0.05$); ③与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节液炎症因子白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平明显下降, 且高剂量组明显低于低剂量组($P < 0.05$); ④与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节胶原纤维含量增加, 且高剂量组明显高于低剂量组($P < 0.05$); ⑤与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节SIRT1表达水平显著增加, 乙酰化FOXO1水平显著下调, 且高剂量组变化幅度明显优于低剂量组($P < 0.05$); ⑥提示白藜芦醇可显著改善膝骨关节炎大鼠关节液中的氧化应激和炎症因子水平, 缓解关节炎症状, 且呈剂量依赖性, 可能是通过SIRT1/FOXO1通路实现的。

关键词: 膝骨关节炎; 白藜芦醇; SIRT1/FOXO1通路; 炎症水平; 氧化应激

Modulatory effect of resveratrol on oxidative stress and inflammatory factors in the joint fluid of rats with knee osteoarthritis

Ren Weiliang, Jiao Yongwei, Zhang Jian, Yang Liying, Yang Qi

Department of Orthopedics and Traumatology, The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine (Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Ren Weiliang, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics and Traumatology, The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine (Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhang Jian, Associate chief physician, Department of Orthopedics and Traumatology, The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine (Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

河北中医学院第一附属医院(河北省中医院)骨伤三科, 河北省石家庄市 050000

第一作者: 任伟亮, 男, 1982年生, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊柱及四肢骨与关节疾病方面的研究。

通讯作者: 张健, 副主任医师, 河北中医学院第一附属医院(河北省中医院)骨伤三科, 河北省石家庄市 050000

<https://orcid.org/0009-0006-7502-7066> (任伟亮)

基金资助: 2020年度河北省中医药类科研计划项目(2020008), 项目负责人: 任伟亮

引用本文: 任伟亮, 焦永伟, 张健, 杨立英, 杨琦. 白藜芦醇对膝骨关节炎模型大鼠关节液中氧化应激和炎症因子的调控作用 [J].

中国组织工程研究, 2024, 28(32):5154-5158.



Abstract

BACKGROUND: Knee osteoarthritis is a common clinical degenerative joint disease characterized by chronic inflammation and oxidative stress. Resveratrol has anti-inflammatory and anti-oxidative stress biological effects, and therefore it can be used symptomatically and expected to provide a new strategy for the treatment of knee osteoarthritis.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effect and mechanism of resveratrol on knee osteoarthritis in rats through the silence information regulator 1 (SIRT1)/forkhead transcription factor O1 (FOXO1) pathway.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, low-dose resveratrol group, and high-dose resveratrol group, with 10 rats in each group. Knee osteoarthritis models were established in the model group, low-dose resveratrol group, and high-dose resveratrol group. A mixture of 4% papain solution and 0.3 mol/L cysteine solution (1:1 for 0.5 hours; 20 μ L) was injected at 1, 4, and 7 days after modeling. Rats in the low-dose and high-dose resveratrol groups were injected with 25 and 100 mg/kg resveratrol through the articular cavity at 1 day after successful modeling, while those in the control and model groups were injected with equivalent volume of physiological saline through the articular cavity. After 28 days of treatment, the maximum knee joint activity was measured; the levels of oxidative stress indicators and inflammatory factors in the synovial fluid of the knee joint were analyzed by radioimmunoassay and ELISA; the content of collagen fibers in the knee joint was analyzed by safranin O-fast green staining; the degree of arthritic lesions was analyzed using the Mankin histological score; and the levels of SIRT1 and FOXO1 in the knee joint were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the maximum knee flexion and extension angles of rats significantly increased in the low-dose and high-dose resveratrol groups, and were significantly higher in the high-dose group than the low-dose group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the knee joint fluid of rats significantly increased in the low-dose and high-dose resveratrol groups. The level of malondialdehyde significantly decreased in both resveratrol groups, and the level in the high-dose resveratrol group was significantly better than that in the low-dose resveratrol group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the low-dose and high-dose resveratrol groups showed a significant decrease in the levels of interleukin 1 β , interleukin 6 and tumor necrosis factor α in the knee joint fluid of rats, and the levels of these inflammatory factors were significantly lower in the high-dose resveratrol group than the low-dose resveratrol group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the content of collagen fibers in the knee joint was significantly increased in both resveratrol groups, and the high-dose resveratrol group showed a higher content of collagen fibers than the low-dose resveratrol group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression level of SIRT1 in the knee joints of rats significantly increased in both resveratrol groups, while the level of acetylated FOXO1 significantly decreased ($P < 0.05$). The magnitude of changes was significantly better in the high-dose group than the low-dose group. To conclude, resveratrol significantly improves the levels of oxidative stress and inflammatory factors in the joint fluid of rats with knee osteoarthritis and alleviates arthritic symptoms in a dose-dependent manner, possibly through the SIRT1/FOXO1 pathway.

Key words: knee osteoarthritis; resveratrol; SIRT1/FOXO1 signaling pathway; inflammation level; oxidative stress

Funding: 2020 Hebei Province Traditional Chinese Medicine Research Program, No. 2020008 (to RWL)

How to cite this article: REN WL, JIAO YW, ZHANG J, YANG LY, YANG Q. Modulatory effect of resveratrol on oxidative stress and inflammatory factors in the joint fluid of rats with knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(32):5154-5158.

0 引言 Introduction

骨关节炎是临床常见的退行性关节疾病，好发于中老年人，以膝痛为主要症状，病理表现主要以关节内滑膜增生、关节软骨退化和软骨下骨异常重塑等表现为主，给患者工作和生活带来了极大的不便^[1-2]。目前关于骨关节炎发病机制尚不完全清楚。目前大量研究显示，膝关节慢性炎症参与膝关节炎的进展，并造成关节软骨组织活性氧水平异常升高，而抗氧化酶水平显著下降，导致软骨细胞出现氧化应激反应。氧化应激会进一步通过线粒体，激活下游信号通路，促进炎症因子大量释放，推动膝骨关节炎的病理进程^[3-4]。目前膝骨关节炎的治疗无特效药。白藜芦醇是一种天然的抗氧化剂，具有多种生物学功能，包括降低血液黏稠度、抑制血小板凝集和血管舒张、保持血液畅通，预防癌症的发生及发展，拮抗动脉粥样硬化和冠心病、缺血性心脏病、高血脂作用^[5-6]。沉默信息调节因子 1(silence information regulator 1, SIRT1)/叉头框转录因子 O1(forkhead transcription factor O1, FOXO1)通路在机体炎症反应发生、进展过程中起着重要作用^[7-8]。目前研究报道显示 SIRT1/FOXO1 通路参与骨关节炎进展过程^[9]。白藜芦醇是否对膝骨关节炎具有治疗作用目前报道较少，此次研究从 SIRT1/FOXO1 通路探讨了白藜芦醇对大鼠膝骨关节炎的治疗作用，旨在为临床治疗膝骨关节炎提供一定的科学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，多组间数量比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 1-12 月在河北医科大学实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 40 只 8 周龄雌性 SD 大鼠，体质量 (200 \pm 10)g，购自河北医科大学实验动物中心，动物生产许可证号：SCXK(冀)2017-030。按照随机数字表法随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量组和高剂量组，每组 10 只。饲养环境温度 18-25 $^{\circ}$ C，湿度 50%-70%，自由进食饮水。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。

1.3.2 试验药品和试剂 白藜芦醇 (> 99%，货号：SRT501) 购自美国 Selleck 公司；木瓜蛋白酶 (纯度 \geq 98%) 购自北京索莱宝生物有限公司；半胱氨酸 (A600132) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司；戊巴比妥钠 (批准文号：国药准字 H31021724，批号：20150506) 购自上海上药新亚药业有限公司；白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 1 ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司；SIRT1(#8469)、FOXO1(#2880) 和 Tubulin(#5568) 一抗和 HRP 羊抗兔二抗 (#7074) 购自美国 CST 公司，其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 实验方法

1.4.1 膝骨关节炎大鼠模型构建 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组，每组 10 只。除对照组外，其余大鼠注射 1% 戊巴比妥钠麻醉成功后取仰卧位，根据文献报道采用药物注射建立膝骨关节炎大鼠模型^[1]。具体造模操作步骤：对大鼠后置膝关节部位剃毛，碘伏消毒，用 1 mL 注射器于髌骨内侧下方进针，入针时针尖向上中上倾斜穿刺进入关节腔内，分别在造模的第 1, 4, 7 天注射 4% 木瓜蛋白酶溶液与 0.3 mol/L 半胱氨酸溶液 (1 : 1 混置 0.5 h) 的混合液 20 μ L，建模后第 7 天开始驱赶大鼠，2 次/d，30 min/次，连续 15 d，大鼠关节出现肿胀、僵硬、

活动受限和关节畸形等特征，病理切片显示软骨组织明显退化，则表示造模成功。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	探讨白藜芦醇通过 SIRT1/FOXO1 通路对大鼠膝关节炎的治疗作用
选择动物的条件	雌性健康清洁级 SD 大鼠，8 周龄，体质量 (200±10) g
模型与所研究疾病的关系	木瓜蛋白酶溶液与半胱氨酸溶液注射建立关节炎大鼠模型
动物来源及品系	SD 大鼠购自河北医科大学实验动物中心
造模技术描述	消毒后，用 1 mL 注射器于髌骨内侧下方进针，入针时针尖向上倾斜斜刺进入关节腔内，分别在造模的第 1, 4, 7 天注射 4% 木瓜蛋白酶溶液与 0.3 mol/L 半胱氨酸溶液 (1 : 1 混置 0.5 h) 的混合液 20 μL，建模后第 7 天开始驱赶大鼠，2 次/d，30 min/次，连续 15 d
动物数量及分组方法	40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组，每组 10 只
造模成功评价指标	大鼠关节出现肿胀、僵硬、活动受限和关节畸形等特征，病理切片显示软骨组织明显退化
造模后观察指标	氧化应激指标；炎症因子水平；苏木精-伊红染色
造模后动物处理	采用 1% 戊巴比妥钠麻醉取血清或组织进行检测
伦理委员会批准	实验方案经河北中医学院第一附属医院批准

1.4.2 膝关节炎大鼠分组和治疗 造模成功后 1 d 开始给药，白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组大鼠经关节腔注射白藜芦醇 25 mg/kg，100 mg/kg^[6]，每天给药 1 次，给药 28 d。对照组和模型组经关节腔注射等体积生理盐水。治疗结束后测定各组大鼠膝关节最大屈伸角度。

1.4.3 氧化应激指标检测 给药 28 d 注射 1% 戊巴比妥钠 100 μL 麻醉大鼠。取 4 组大鼠关节液，按照试剂盒操作说明书检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)，采用酶标仪检测吸光度值，根据标准曲线计算 SOD、丙二醛和 GSH-Px 水平。

1.4.4 ELISA 检测炎症因子 取 4 组大鼠膝关节液，12 000 r/min 离心分析滑液上清，按照试剂盒说明书。首先稀释标准品，制备标准曲线，设置空白对照组、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上对应的加入标准品和检测样本 50 μL 用封口膜封板后置于 37 °C 孵育 30 min，甩干液体，每孔加 100 μL 洗涤液，洗涤 3 次；再每孔加入酶标试剂 50 μL，空白孔除外，用封口膜封板后置于 37 °C 孵育 30 min，甩干液体，每孔加 100 μL 洗涤液，静置 30 s 后弃洗涤液，连续洗涤 3 次；每孔加入显色剂 A 50 μL，再加入显色剂 B 50 μL，轻轻振荡混匀，37 °C 避光显色 15 min，采用终止液终止至颜色转变为黄色，在 450 nm 波长下检测吸光度值，根据标准曲线计算炎症因子白细胞介素 1β、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 表达水平。

1.4.5 番红 O- 固绿染色分析膝关节中胶原纤维含量 4 组大鼠麻醉处死后，取膝关节滑膜组织，采用体积分数 10% 甲醛固定，石蜡切片脱蜡至水，苏木精复染，自来水冲洗，体积分数 1% 盐酸乙醇分化，自来水冲洗。0.02% 固绿染色 3-

5 min，水洗去多余染液，至软骨呈无色；0.1% 番红染色 1.0-2.0 min，水洗去多余染液；1% 醋酸分化，水洗；体积分数 95% 的无水乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封固。

1.4.6 膝关节 Mankin 组织学评分 于番红 O- 固绿染色下，采用 Mankin 组织学评分分析各组大鼠膝关节炎病变程度，评定标准如下：I 软骨结构：正常 0 分，表面不规则 1 分，血管翳形成和表面不规则 2 分，裂隙进入过渡层 3 分，裂隙进入辐射层 4 分，裂隙进入钙化层 5 分，结构完全破坏 6 分；II 软骨细胞：正常 0 分，弥漫性细胞增加 1 分，局部细胞增加 2 分，细胞数目明显减少 3 分；III 软骨基质染色：正常 0 分，轻度减少 1 分，中度减少 2 分，重度减少 3 分，无着色 4 分；IV 潮线完整性：完整 0 分，被血管破坏 1 分。4 项总和为 Mankin 评分结果，分数越高，软骨退变程度越严重。

1.4.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 SIRT1、FOXO1 表达水平 4 组大鼠麻醉处死后，取膝关节组织，加入组织裂解液，匀浆仪充分匀浆，冰上裂解 30 min 后，12 000 r/min 离心 20 min，收集上清，采用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE，结束后转移至 PVDF 膜上，采用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，再用 Tubulin、SIRT1 和乙酰化 FOXO1 一抗 (1 : 1 000) 孵育过夜，次日 PBST 洗涤 3 次，再用 HRP 标记二抗室温孵育 2 h，PBST 洗涤 3 次后，滴加 ECL 发光液，显影。采用 Image J 软件进行灰度值分析，目的蛋白表达水平采用目的蛋白灰度值和 Tubulin 灰度值之比表示。

1.5 主要观察指标 测定各组大鼠膝关节最大屈伸角度；采用放射免疫法和 ELISA 法检测膝关节液中氧化应激指标和炎症因子水平；番红 O- 固绿染色分析膝关节胶原纤维含量；Mankin 组织学评分分析膝关节炎病变程度；Western blot 检测膝关节 SIRT1 和 FOXO1 表达水平。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较 LSD 法， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法由河北中医学院第一附属医院专业统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 大鼠一般情况 在此次实验中，模型组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组各有 1 只大鼠因麻醉过量恢复较慢，但最终复苏，对照组未见明显异常。用药过程中各组大鼠均未出现不良反应。

2.2 各组大鼠建模情况分析 此次研究共纳入 4 组大鼠，每组 10 只，建模后未见死亡，状态良好，全部进入结果分析。

2.3 各组大鼠膝关节功能分析 与对照组比较，模型组大鼠膝关节 Mankin 评分升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，白藜芦醇低剂量组和高剂量组 Mankin 评分明显下降，且高剂量组明显低于低剂量组 ($P < 0.05$)。与对照组比较，模型组大鼠膝关节最大屈伸角度明显减小 ($P < 0.05$)；与模型组比较，白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节最大屈伸角度明显增大，且高剂量组明显大于低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 | 各组大鼠关节功能评分和最大屈伸角度比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 | Comparison of joint function score and maximum flexion and extension angles of rats among groups

组别	Mankin 评分	最大屈伸角度 (°)
对照组	0	143.98±11.09
模型组	3.40±0.70 ^a	103.18±5.09 ^b
白藜芦醇低剂量组	2.50±0.53 ^b	114.55±10.09 ^b
白藜芦醇高剂量组	1.80±0.63 ^{bc}	128.13±6.17 ^{bc}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与白藜芦醇低剂量组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠膝关节液氧化应激指标分析 与对照组比较, 模型组大鼠膝关节液中 SOD 和 GSH-Px 水平显著下调, 而丙二醛水平显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节液中 SOD 和 GSH-Px 水平显著增加, 而丙二醛水平显著下降, 且白藜芦醇高剂量组明显优于低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 | 各组大鼠氧化应激指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 | Comparison of oxidative stress indicators of rats among groups

组别	丙二醛 (nmol/L)	SOD(U/L)	GSH-Px(nmol/L)
对照组	2.32±0.16	280.88±19.39	15.74±1.49
模型组	4.07±0.77 ^a	111.17±16.34 ^a	5.43±1.26 ^a
白藜芦醇低剂量组	3.37±0.34 ^b	160.73±18.24 ^b	8.83±1.02 ^b
白藜芦醇高剂量组	2.81±0.18 ^{bc}	218.38±17.00 ^{bc}	12.68±1.32 ^{bc}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与白藜芦醇低剂量组比较, ^c $P < 0.05$ 。SOD 为超氧化物歧化酶; GSH-Px 为谷胱甘肽过氧化物酶。

2.5 各组大鼠膝关节液炎症指标分析 与对照组比较, 模型组大鼠膝关节液炎症因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节液炎症因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平明显下降, 且白藜芦醇高剂量组明显低于低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 | 各组大鼠膝关节液炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10, \text{nmol/L}$)

Table 3 | Comparison of inflammation factor levels in the joint fluid of rats among groups

组别	白细胞介素 1 β	白细胞介素 6	肿瘤坏死因子 α
对照组	19.58±2.37	13.30±1.74	13.22±2.03
模型组	93.93±8.19 ^a	60.55±6.97 ^a	77.90±8.59 ^a
白藜芦醇低剂量组	72.87±13.81 ^{ab}	40.64±5.96 ^{ab}	51.64±5.89 ^{ab}
白藜芦醇高剂量组	43.71±7.57 ^{abc}	30.04±7.54 ^{abc}	38.19±5.63 ^{abc}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与白藜芦醇低剂量组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.6 各组大鼠膝关节滑膜组织胶原纤维含量比较 与对照组比较, 模型组大鼠膝关节胶原纤维含量明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节胶原纤维含量增加, 且白藜芦醇高剂量组明显高于低剂量组 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.7 各组大鼠软骨组织 SIRT1 和乙酰化 FOXO1 表达水平比较 与对照组比较, 模型组大鼠膝关节软骨组织 SIRT1 表达水平显著下调, 乙酰化 FOXO1 水平显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇低剂量组和高剂量组大鼠膝关节软骨组织 SIRT1 表达水平显著增加, 乙酰化 FOXO1 水平显著下调, 且白藜芦醇高剂量组变化幅度明显优于低剂量组 ($P < 0.05$)。见图 2。

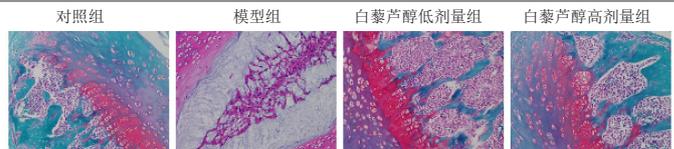
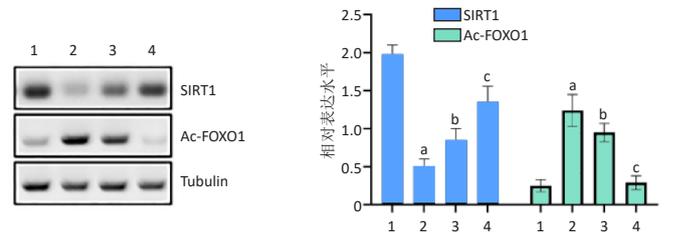


图 1 | 各组大鼠膝关节滑膜组织番红 O-固绿染色比较 ($\times 200$)

Figure 1 | Safranin O-fast green level of synovial tissue of rat knee joints ($\times 200$)



图注: 1-4 分别为对照组、模型组、白藜芦醇低剂量组及白藜芦醇高剂量组。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与白藜芦醇低剂量组比较, ^c $P < 0.05$ 。Ac-FOXO1 为乙酰化 FOXO1。

图 2 | 各组大鼠软骨组织 SIRT1 和乙酰化 FOXO1 表达水平比较

Figure 2 | Comparison of the expression levels of SIRT1 and acetylated FOXO1 in cartilage tissue of rats among groups

3 讨论 Discussion

膝骨关节炎是一种老年人常见的疾病, 因发病率高、病程长、难治愈, 严重影响了患者的生活质量^[7], 如何治疗膝骨关节炎是当前的研究热点。目前临床治疗膝骨关节炎主要以缓解疼痛为主, 主要采用非类固醇药物, 无法有效阻止疾病进展, 且因不良反应较大, 治疗效果不佳。氧化应激和炎症因子释放是膝骨关节炎病程中主要的病理学表现, 以此为靶点筛选阻断疾病进程是膝骨关节炎治疗的新方向^[8-9]。白藜芦醇被归类为植物雌激素, 是一种天然非黄酮类多酚化合物, 研究表明, 白藜芦醇具有抗氧化、抗炎、抗衰老和抗肿瘤等多种生物活性^[10-12]。因此白藜芦醇可能对膝骨关节炎具有改善作用, 基于此, 此次研究通过制备膝骨关节炎大鼠模型, 探讨了白藜芦醇对膝骨关节炎治疗的作用机制。

此次研究采用木瓜蛋白酶溶液与半胱氨酸溶液注射法建立膝骨关节炎模型, 能有效模拟膝骨关节炎临床症状, 且操作方法简单, 是目前研究广泛应用的模型^[13]。结果显示, 建模后模型组大鼠膝关节功能和膝关节活动度明显下降, 表明大鼠关节受损, 出现了典型膝骨关节炎症状。白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 是机体主要的炎症因子, 在膝骨关节炎疾病发生和进展过程中具有重要的调节作用^[14-16]。氧化应激也在膝骨关节炎发生和发展过程中起着重要作用^[17]。丙二醛是细胞膜脂质过氧化的终产物, 其水平是脂质过氧化的重要指标^[18]。SOD 是细胞唯一特异性清除超氧自由基的抗氧化酶, 可以避免自由基对细胞的损伤, 而 GSH-Px 也是一种细胞重要的抗氧化酶, 能够使脂质过氧化物还原为脂肪酸的醇类, 和 SOD 组成细胞清除自由基的主要防线^[19-23]。膝骨关节炎发生后, 大鼠软骨组织液中丙二醛水平明显增加, 而 SOD 和 GSH-Px 水平显著下调, 说明膝骨关节炎氧化应激水平失衡。此次研究采用白藜芦醇治疗后, 膝骨关节炎的炎症

因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平显著下降, 脂质氧化产物丙二醛水平显著下调, 而抗氧化指标 SOD 和 GSH-Px 表达水平则显著上调, 说明白藜芦醇通过抗氧化和抗炎对膝骨关节炎起到保护作用。

蛋白多糖和胶原是关节入软骨组织的主要组成成分, 也是维持关节稳定性和基本功能的主要成分^[24]。但是膝骨关节炎发生过程中, 可见蛋白多糖和胶原水平逐渐性丢失, 导致膝关节功能受损, 进而出现运动功能障碍等^[25]。此次研究通过番红 O- 固绿染色发现膝骨关节炎大鼠胶原纤维含量显著下调, 与文献报道一致。此次研究采用白藜芦醇进行治疗后发现, 胶原纤维含量随着药物处理浓度增加逐渐升高, 说明白藜芦醇能增加关节软骨组织胶原蛋白和蛋白多糖的表达, 起到保护关节的作用。

此次研究进一步探讨白藜芦醇治疗膝骨关节炎的分子机制。SIRT1 具有显著的膝骨关节炎保护效应, 这种生物学作用主要依赖于其脱乙酰化活性^[26]。研究表明, 激活 SIRT1 可抑制炎症、细胞凋亡和氧化应激, 减轻组织损伤^[27]。SIRT1/FOXO1 通路可介导关节炎发生及病情进展^[28], 前期研究显示白藜芦醇的一个主要靶点是 SIRT1, 可以促进 SIRT1 的生物活性。此次研究发现, 膝骨关节炎模型中 SIRT1 表达水平显著下调, 导致其底物分子 FOXO1 乙酰化水平显著增加, 进而促进疾病发展。但是经白藜芦醇治疗后, SIRT1 表达水平显著上调, FOXO1 乙酰化水平显著下降, 并呈剂量效应, 说明白藜芦醇主要通过 SIRT1/FOXO1 通路在膝骨关节炎中发挥作用。

总之, 白藜芦醇可上调 SIRT1 表达, 下调 FOXO1 乙酰化水平, 抑制膝骨关节炎组织炎症因子释放, 维持组织氧化应激平衡, 减轻膝骨关节炎软骨组织的损伤, 改善了膝关节的功能。但此次研究也存在一定局限性, 仅仅在动物水平上分析了白藜芦醇对膝骨关节炎的影响, 后续研究将收集临床样本, 检测膝骨关节炎患者关节液中炎症因子和氧化应激指标的变化, 进一步支撑这一研究结论。

致谢: 诚挚的感谢杜双庆主任、齐立卿主任、王响主治医师、李锡主治医师、颜运涛主治医师以及科室护理团队, 在此次研究中给予的大力帮助和支持!

作者贡献: 任伟亮负责实验设计, 张健负责实验实施, 焦永伟, 杨立英, 杨琦负责指标测定。

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。

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。

版权声明: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] 陈景涛, 陈有, 李玉静, 等. 黄芪多糖抑制 Toll 样受体 4/ 核因子 κ B p65 通路治疗大鼠膝骨关节炎 [J]. 中国组织工程研究, 2023,27(31):5002-5008.
- [2] 章晓云, 曾浩, 孟林. 膝骨关节炎疼痛机制及治疗研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023,29(1):50-58.
- [3] MICHAEL JW, SCHLÜTER-BRUST KU, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107(9):152-162.
- [4] FENG K, CHEN Z, PENGCHENG L, et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):18192-18205.
- [5] ZHUANG Y, WU H, WANG X, et al. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7591840.
- [6] 王瑜, 梁超, 王宝爱, 等. 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路与老年缺血性脑卒中大鼠血清 IL-6、IL-1 β 含量的分子机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023,43(3): 656-660.
- [7] YANG Y, LIU Y, WANG Y, et al. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Front Immunol.* 2022;13:831168.
- [8] 刘丽君, 郑慧军. 白藜芦醇对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和肠道菌群的影响 [J]. 中成药, 2023,45(7):2384-2388.
- [9] ALMEIDA M, PORTER RM. Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone.* 2019;121:284-292.
- [10] SHARMA L. Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med.* 2021;384(1):51-59.
- [11] 崔龙慷, 李学飞, 沈高波, 等. 强骨饮治疗膝骨关节炎临床疗效及对血清炎症因子的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023,29(1):41-45.
- [12] YAMADA EF, BOBINSKI F, MARTINS DF, et al. Photobiomodulation therapy in knee osteoarthritis reduces oxidative stress and inflammatory cytokines in rats. *J Biophotonics.* 2020;13(1):e201900204.
- [13] 孔涛, 马彦博, 杨自军, 等. 白藜芦醇的生物学功能及作用机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022,38(6):592-596.
- [14] ZHOU DD, LUO M, HUANG SY, et al. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:9932218.
- [15] XU D, LI Y, ZHANG B, et al. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats. *Int J Med Sci.* 2016; 13(12):942-954.
- [16] 杜以宽, 曾广龙, 谭志超, 等. 白牡丹止痛喷剂对兔膝骨关节炎软骨组织病理形态及 TNF- α 、IL-6、MDA、SOD 的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12):2036-2043.
- [17] 陈竹青, 张荣国. 重组人促红素 β 注射液对糖尿病腹膜透析患者 SOD、GSH-PX、MDA 及 Hcy 水平的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2017,37(2):136-138.
- [18] KURZ B, JOST B, SCHÜNKE M. Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(2):119-126.
- [19] DU C, SMITH A, AVALOS M, et al. Blueberries Improve Pain, Gait Performance, and Inflammation in Individuals with Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Nutrients.* 2019;11(2):290.
- [20] DAINESE P, WYNGAERT KV, DE MITS S, et al. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022;30(4):516-534.
- [21] ORHAN C, TUZCU M, DURMUS AS, et al. Protective effect of a novel polyherbal formulation on experimentally induced osteoarthritis in a rat model. *Biomed Pharmacother.* 2022;151:113052.
- [22] XU G, HE Z, LIU Y. Alisol A 24-acetate ameliorates osteoarthritis progression by inhibiting reactive oxygen species and inflammatory response through the AMPK/mTOR pathway. *Immun Inflamm Dis.* 2023;11(5):e848.
- [23] 李杨涛, 崔俊成, 李金鑫, 等. 前交叉韧带损伤后炎症因子致膝关节炎后骨关节炎的研究进展 [J]. 中南医学科学杂志, 2023,51(2):174-177,217.
- [24] 欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 等. 改良后 Hult 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝骨关节炎模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022,32(2):29-37.
- [25] 史晓伟, 王东峰, 邓晓丰, 等. 不同针刺方式对早期膝骨关节炎兔模型软骨细胞及 II 型胶原蛋白代谢的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2022,38(1):59-64.
- [26] SINGH V, UBAID S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation.* 2020;43(5):1589-1598.
- [27] YANG Y, LIU Y, WANG Y, et al. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Front Immunol.* 2022;13:831168.
- [28] JIANG S, ZHANG C, LU Y, et al. Mechanical stress-caused chondrocyte dysfunction and cartilage injury can be attenuated by dioscin via activating sirtuin1/forkhead box O1. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(12):e23212.

(责任编辑: LCH, GD, ZN, WL)