

· 基础研究 ·

基于 LXR α /NF- κ B 信号通路对 A 型滑膜细胞的调控
探讨壮骨健膝方的作用机制陈 鹏^{1, 2, 3} 郭洁梅^{1, 4} 肖 艳¹ 林 震¹ 张英杰¹ 张 鹏¹ 李保林¹ 苏友新^{1, 2}

摘要 目的 观察壮骨健膝方含药血清对脂多糖 (LPS) 诱导的兔 A 型滑膜细胞肝 X 受体 (LXR α) / 核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的影响, 探讨壮骨健膝方治疗膝骨关节炎 (KOA) 滑膜炎的机制。
方法 制备壮骨健膝方含药血清并采用超高效液相色谱质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 进行质量控制 (龙胆苦苷 ≥ 885 ng/mL、阿魏酸 ≥ 185 ng/mL)。将兔 A 型滑膜细胞随机分为空白组和 LPS 组, LPS 组经 LPS 诱导后建立炎症细胞模型, 模型鉴定成功后随机分为模型组、壮骨健膝方组、LXR α 抑制剂组、核受体辅助抑制因子 (N-CoR) 抑制剂组, 分别予以 10% 空白血清、10% 含药血清、10% 含药血清 + LXR α 抑制剂、10% 含药血清 + N-CoR 抑制剂, 空白组予 10% 空白血清干预。干预 24 h 后, 收集各组细胞及上清液, Western Blot、RT-qPCR 检测各组细胞中 LXR α 、N-CoR、P50、P65 蛋白及 mRNA 的表达, ELISA 检测各组上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 及 MMP-13 含量。
结果 与空白组比较, 模型组 P50、P65 蛋白与 mRNA 表达及 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 含量均升高 ($P < 0.01$), LXR α 、N-CoR 蛋白与 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 壮骨健膝方组 P50 和 P65 蛋白与 mRNA 表达及 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 含量均降低 ($P < 0.01$), LXR α 、N-CoR 蛋白与 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); LXR α 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 P50、P65 蛋白与 mRNA 表达及 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 含量均降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与壮骨健膝方组比较, LXR α 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 LXR α 、N-CoR 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$), P50、P65 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 两组 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 含量升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。
结论 壮骨健膝方可通过上调 LXR α 和 N-CoR 蛋白及 mRNA 表达, 下调 P50、P65 蛋白及 mRNA 表达, 从而抑制 LXR α /NF- κ B 信号通路的传导, 减少下游炎症相关指标 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 的分泌, 最终达到控制膝骨关节炎滑膜炎反应的作用。

关键词 壮骨健膝方; A 型滑膜细胞; LXR α /NF- κ B 信号通路; 膝骨关节炎滑膜炎

Mechanism of Zhuanggu Jianxi Decoction on Type A Synoviocytes by Regulation of LXR α /NF- κ B Signaling Pathway CHEN Peng^{1, 2, 3}, GUO Jie-mei^{1, 4}, XIAO Yan¹, LIN Zhen¹, ZHANG Ying-jie¹, ZHANG Peng¹, LI Bao-lin¹, and SU You-xin^{1, 2} 1 School of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 2 College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 3 Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology and Rehabilitation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Fuzhou (350122); 4 Medical School of Fujian Health College, Fuzhou (350101)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of Zhuanggu Jianxi Decoction (ZGJXD) on knee osteoarthritis (KOA) synovitis via liver X receptors (LXR α) /nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway expression in Lipopolysaccharide (LPS) -induced rabbit type A synoviocytes by intervention of ZGJXD drug-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81774347); 福建省自然科学基金项目 (No.2019J01091)

作者单位: 1. 福建中医药大学康复医学院 (福州 350122); 2. 福建中医药大学中医学院 (福州 350122); 3. 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室 (福州 350122); 4. 福建卫生职业技术学院医学院 (福州 350101)

通讯作者: 苏友新, Tel: 0591-22861996, E-mail: suyouxin777@hotmail.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20220429. 076

containing serum. **Methods** The drug-containing serum of ZGJXD was prepared and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used for quality control (gentiopicroside ≥ 885 ng/mL, ferulic acid ≥ 185 ng/mL). The rabbit cells of type A synoviocytes were randomly divided into blank group and LPS group. The LPS group was induced by LPS to establish an inflammatory cell model and then divided randomly into model group, ZGJXD group, LXR α inhibitor group, N-CoR inhibitor group. After being identified, 10% blank serum, 10% drug-containing serum, 10% drug-containing serum+LXR α inhibitor, 10% drug-containing serum+N-CoR inhibitor were given respectively. The blank group was given 10% blank serum. The expression of LXR α , N-CoR, P50, P65 protein and mRNA in cell were detected by Western Blot and RT-qPCR, IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13 content in the supernatant were detected by ELISA after 24 hours intervention. **Results** Compared with blank group, the expression of P50, P65 protein and mRNA, the content of IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13 in the model group increased ($P<0.01$), LXR α , N-CoR protein and mRNA expression decreased ($P<0.01$). Compared with model group, the expression of P50, P65 protein and mRNA and the content of IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13 in ZGJXD group decreased significantly ($P<0.01$), LXR α , N-CoR protein and mRNA expression increased ($P<0.01$); P50 and P65 protein and mRNA expression, the content of IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13 decreased in LXR α inhibitor group and N-CoR inhibitor group ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with ZGJXD group, LXR α and N-CoR protein and mRNA expression decreased ($P<0.01$), P50 and P65 protein and mRNA, the content of IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13 increased in LXR α inhibitor group and N-CoR inhibitor group ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** The possible mechanism of ZGJXD for controlling the inflammation of KOA synovitis is by up-regulating the expression of LXR α , N-CoR protein and mRNA, down-regulating the expression of P50, P65 protein and mRNA to inhibit the conduction of LXRs/NF- κ B signaling pathway and reduce the secretion of IL-1 β , TNF- α , MMP-3 and MMP-13.

KEYWORDS Zhuanggu Jianxi Decoction; type A synoviocytes; LXRs/NF- κ B signaling pathway; knee osteoarthritis synovitis

膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是以关节软骨退化、滑膜炎症及软骨下骨重塑异常为主要病理表现的慢性骨关节疾病, 常见于中老年人, 属中医学痹痿并存之疾病^[1, 2]。研究显示, 约 90% 的症状性 KOA 患者中伴有不同程度的膝关节滑膜炎症, 导致明显的膝关节疼痛、肿胀及僵硬^[3]。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激活通过对 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的调控在 KOA 滑膜炎症的发生、加重及反复中扮演重要角色^[4]。存在于 A 型滑膜细胞胞浆内, 以 LXR α 亚型为主的肝 X 受体 (liver X receptors, LXRs) 被激活后, 可通过募集核受体辅助抑制因子 (nuclear receptor co-repressor, N-CoR), 调控 NF- κ B 通路以抑制炎症的发生^[5, 6]。壮骨健膝方是课题组基于 KOA “痹痿并见” 之特点总结的临床效验方, 可显著改善 KOA 患者膝关节疼痛、肿胀、僵硬、行走无力及运动控制下降等痹证及痿证的系列症状^[7], 基础研究证实该方可保护关节软骨以治 “痿”^[8], 同时抑制滑膜炎症而治 “痹”^[9]。本研究基于 LXRs/NF- κ B 信号通路, 采用 LPS 刺激体外培养的兔 A 型滑膜细胞, 观察壮骨健膝方含药血清对该细胞中 LXR α 、N-CoR、P50、P65 蛋

白与 mRNA 表达及下游效应产物 IL-1 β 、TNF- α 、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3) 等含量的影响, 以进一步阐明该方对 KOA 滑膜炎症的可能作用机制。

材料与方法

1 实验动物及细胞 12 只普通级 3 月龄健康新西兰大白兔, 体质量 (2.0 ± 0.3) kg, 由上海市松江区松联实验动物场提供, 许可证编号: SCXK (沪) 2017-0008。委托福建中医药大学实验动物中心代购并饲养 [许可证号: SYXK (闽) 2019-0007]。兔 A 型滑膜细胞购自上海青旗生物技术有限公司 (货号: BFN2101831)。本研究方案经福建中医药大学实验动物伦理委员会批准 (No. FJTCM IACUC 2019060)。

2 实验药物 壮骨健膝方 (骨碎补: 杜仲: 川牛膝: 生地黄: 独活: 鸡血藤: 秦艽: 徐长卿: 地鳖虫 = 5:3:4:5:2:5:3.3:3.3:2), 均购于福建中医药大学国医堂, 并经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定。按既定工艺^[9]浓缩至含生药 1 g/mL 的药液, 4℃冰箱保存备用。

3 主要试剂及仪器

3.1 实验试剂 DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司, 批号: AE29163339); 胎牛血清 (FBS, 澳洲 ExCell Bio 公司, 批号: 11G362); 乌拉坦 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: Z28N10Y104506); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS 中国 Biosharp 公司, 货号: BS007); 兔 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 和 MMP-13 ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 批号分别为 MM-030501、MM-024001、MM-018701、MM-148601); LXR α 抑制剂 5CPPSS-50 (日本 Wako 公司, 批号: WDM6507); N-CoR 抑制剂 ML-792, (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号: 66065); LXR α 多克隆抗体, P65 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为 BJ01036276, AI07086414); N-CoR 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号: A1819); P50 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 货号: ab194729); 内参 β -actin, HRP 羊抗鼠 IgG, HRP 羊抗兔 IgG, (美国 Proteintech Group 公司, 批号分别为 10004156、20000003、20000199); HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR (+g DNA wiper), ChamQ SYBR qPCR 反应混合物 (南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 7E38119、7E210K8); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型), SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (上海碧云天生物研究所, 批号分别为 080719191115、081519191016); 龙胆苦苷 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: Y29A11Q112202); 阿魏酸 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: G13S11L12423); 甲醇、乙腈、超纯水 (质谱纯, 德国 Merck 公司), 甲酸 (色谱纯, 阿拉丁试剂上海有限公司)。

3.2 实验仪器 DM4000B-LED 型光学显微镜 (德国 LEICA 公司); TDZ4A-WS 型低速离心机 (湖南湘仪仪器有限公司); JS-400A 型恒温金属浴 (德国 Eppendorf 公司); E163302 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳仪, ChemiDocXRS 型化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 64R 型低温高速离心机 (美国 Beckman 公司); 9700 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪, ABI 7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 ABI 公司); WH-1 型微型涡旋混合仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司); Waters ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪、Xevo TQS 三重四级杆、CORTECS C18 色谱柱 (美国

Waters 公司)。

4 造模及干预方法

4.1 壮骨健膝方含药血清的制备及质量控制 空白及含药血清的制备: 本实验使用兔 A 型滑膜细胞做为研究对象, 采用兔含药血清及空白血清进行干预, 可以保证血清与干预细胞的来源在种属上的一致性。将 12 只新西兰大白兔随机分为 2 组, 即空白组、壮骨健膝方组, 每组 6 只。根据前期研究并参照人与动物千克体重换算^[10], 壮骨健膝方组每天给予 4.58 mL/kg 药液灌胃, 空白组采用等体积生理盐水灌胃, 2 次/d, 连续 3 d, 于末次灌胃后 1 h, 用 20% 的乌拉坦 5 mL/kg 行耳缘静脉麻醉后进行腹主动脉采血, 2 500 r/min 离心 30 min, 吸取上层血清, 于 56 °C 灭活 30 min, 采用 0.22 μ m 微孔滤膜无菌过滤后, 置 -20 °C 冰箱保存。

含药血清的质量控制: 采用超高效液相色谱质谱联用技术 (ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 检测含药血清中龙胆苦苷、阿魏酸的含量 (ng/mL) 作为质控标准^[11, 12]。UPLC 条件: Waters CORTECS C18 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.6 μ m); 流动相: 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱; 体积流量 0.25 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μ L。MS 条件: 采用正离子多反应监测 (MRM) 模式; 毛细管电压 3.50 kV; 脱溶剂气流: N₂, 体积流量 800 L/h, 温度 500 °C; 锥孔气氮气, 体积流量 150 L/h; 离子源温度 150 °C, 二级锥孔萃取电压 3.00 V; 碰撞气体: 氩气; 优化后龙胆苦苷质谱参数: 离子对 (379.4 $\rightarrow$ 217.1)、锥孔电压 (30)、碰撞能量 (20); 优化后阿魏酸质谱参数: 离子对 (195.1 $\rightarrow$ 176.9)、锥孔电压 (40)、碰撞能量 (10)。

4.2 细胞培养 将兔 A 型滑膜细胞接种于培养瓶, 于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 用 2 mL PBS 清洗细胞表面, 1 mL 胰酶消化, 选择生长状态良好的细胞进行后续实验。

4.3 兔 A 型滑膜细胞的干预 取生长状态良好的细胞随机分为空白组和 LPS 组。LPS 组给予 1 μ g/mL 的 LPS 混悬液诱导炎症模型, 于 12 h 后检测细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 和 MMP-13 的含量以进行模型鉴定^[13]。鉴定成功后再用随机分为模型组、壮骨健膝方组、LXR α 抑制剂组、N-CoR 抑制剂组。分别用 10% 空白血清、10% 壮骨健膝方含药血清、10% 壮骨健膝方含药血清 + 5 μ g LXR α 抑制剂 5CPPSS-50、10% 壮骨健膝方含药血清 +

5 μg N-CoR 抑制剂 ML-792 的培养液对各组进行干预,空白组同步用 10 % 空白血清干预,经预实验明确最佳干预时间为 24 h。24 h 后 1 300 r/min 离心 5 min,收集各组细胞及其上清液。

5 检测指标及方法

5.1 壮骨健膝方含药血清中龙胆苦苷、阿魏酸含量的测定 精密移取 50 μL 含药血清样品,按照 1:4 的比例加入 200 μL 甲醇乙腈等量混合液沉淀蛋白,再加 250 μL 超纯水稀释,旋涡震荡 3 min 后静置 30 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液后行 UPLC-MS/MS 分析。

5.2 兔 A 型滑膜细胞中 LXR α 、N-CoR、P50、P65 蛋白表达的检测 收集 A 型滑膜细胞,裂解,于冰上静置 20 min,12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清得总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,Western Blot 法检测各蛋白表达。一抗稀释比例: LXR α 1:300, N-CoR 1:500, P50 1:500, P65 1:300, β -actin 1:8 000; 二抗稀释比例: 1:10 000。将 PVDF 膜置于化学发光成像仪上,滴加工作液,室温反应 1 min 后拍照,并记录分析各目的蛋白的相对表达量。

5.3 兔 A 型滑膜细胞中 LXR α 、N-CoR、P50、P65 mRNA 表达的检测 按照 Trizol 法试剂盒说明书上的操作方法进行总 RNA 的提取。加 1 μL RNA 样品进行测量,记录 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,并计算 RNA 浓度。cDNA 合成: RNA 样品于冰面上解冻后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min,离心 1 min。依次向标记好的 EP 管中加入 RNA 溶液,用 ddH₂O 定容至 18 μL ,然后再依次向 EP 管中加入 4 $\times$ g DNA 6 μL ,并用移液枪缓慢吹打混匀后,将 EP 管放入 PCR 仪中,以温度 42 $^{\circ}\text{C}$,时间 2 min 运行。向各管依次加入 6 μL 的 5 $\times$ qRT Super,放入 PCR 仪,以温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、时间 15 min 和温度 85 $^{\circ}\text{C}$ 、时间 2 min 运行。Real-time PCR 反应:从 GeneBank 中查找目的基因 CDS 序列,运用 Primer 5.0 软件设计其引物序列,委托福建尚亚生物工程有限公司进行合成并验证,见表 1。

5.4 兔 A 型滑膜细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 含量的检测 采用 ELISA 检测兔 A 型滑膜细胞细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 含量,具体步骤严格遵照试剂盒说明书。于 450 nm 处检测吸光度 (OD 值),根据说明书绘制标准曲线,由标准曲线公式计算细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 含量。

6 统计学方法 通过 SPSS 26.0 软件和 Graphpad Prism 7.0 软件对实验数据进行分析,计

表 1 LXR α 、N-CoR、P50、P65 及 GAPDH 基因的引物序列

基因	基因引物序列	产物大小 (bp)
LXR α	上游引物 5' -CAGCTCAATGATGCCGAGTT-3'	103
	下游引物 5' -TGTGTTGCAGCCTCTCTACCT-3'	
N-CoR	上游引物 5' -CTCCGTTCTCAGGTCCACAC-3'	130
	下游引物 5' -CATCATGGGTGAGCCTCTGG-3'	
P50	上游引物 5' -AAGGTAGACCACTGAGACAGAAT-3'	183
	下游引物 5' -TGCCTCGGTAGTTGAAGTTG-3'	
P65	上游引物 5' -GGACAGCACCACCTACGATG-3'	192
	下游引物 5' -CTGGATCACTTCAATGGCCTC-3'	
GAPDH	上游引物 5' -GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'	237
	下游引物 5' -CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'	

量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

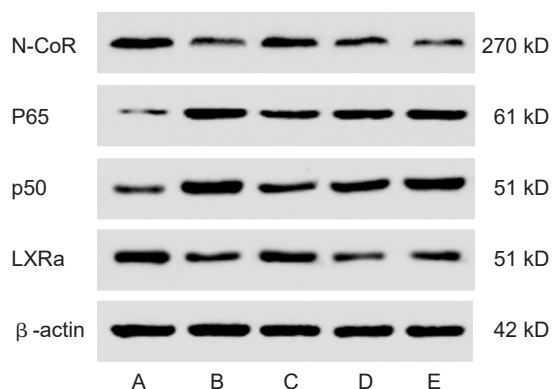
1 壮骨健膝方含药血清中龙胆苦苷、阿魏酸的含量 (表 2) 经检测 3 份壮骨健膝方含药血清样品中龙胆苦苷平均含量为 1 039.51 ng/mL、阿魏酸平均含量为 217.72 ng/mL,符合其在含药血清中的质量控制标准 (龙胆苦苷含量不低于 885 ng/mL,阿魏酸含量不低于 185 ng/mL)。

表 2 壮骨健膝方含药血清中龙胆苦苷、阿魏酸含量 (ng/mL)

化合物	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
龙胆苦苷	1 098.33	1 027.52	992.69	1 039.51 $\pm$ 53.83
阿魏酸	223.22	210.23	219.71	217.72 $\pm$ 6.71

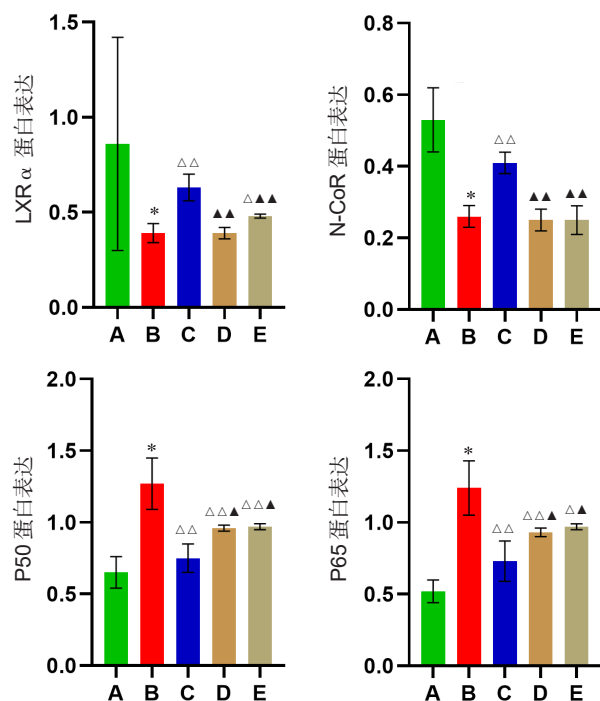
2 各组 LXR α 、N-CoR、P50 及 P65 蛋白表达比较 (图 1、2) 与空白组比较,模型组 A 型滑膜细胞中 LXR α 和 N-CoR 蛋白表达下降, P50 和 P65 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,壮骨健膝方组 LXR α 与 N-CoR 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$), P50 和 P65 蛋白表达均下降 ($P < 0.01$); LXR α 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 P50、P65 蛋白表达下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与壮骨健膝方组比较, LXR α 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组的 LXR α 及 N-CoR 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), P50 及 P65 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。

3 各组 LXR α 、N-CoR、P50 及 P65 mRNA 表达比较 (表 3) 与空白组比较,模型组 A 型滑膜细胞中 LXR α 、N-CoR mRNA 表达下降, P50、P65 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,壮骨健膝方组 LXR α 、N-CoR mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), P50、P65 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); LXR α 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 P50、P65 mRNA 表达下



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为壮骨健膝方组, D 为 LXRα 抑制剂组, E 为 N-CoR 抑制剂组 (图 2~4)

图 1 各组滑膜细胞中 LXRα、N-CoR、P50、P65 蛋白电泳图



注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$; 与壮骨健膝方组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$

图 2 各组滑膜细胞中 LXRα、N-CoR、P50 及 P65

蛋白表达的比较 ($n=3$)

降 ($P<0.01$)。与壮骨健膝方组比较, LXRα 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 LXRα 及 N-CoR 的 mRNA 表

达降低 ($P<0.01$), P50 及 P65 的 mRNA 表达升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

4 各组 A 型滑膜细胞上清液 IL-1β、TNF-α、MMP-3 及 MMP-13 含量比较 (表 4) 各组均检测出 IL-1β、TNF-α、MMP-3 及 MMP-13 分泌。与空白组比较, 模型组干预后 IL-1β、TNF-α、MMP-3 及 MMP-13 含量升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 壮骨健膝方组、LXRα 抑制剂组及 N-CoR 抑制剂组 IL-1β、TNF-α、MMP-3 及 MMP-13 含量降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与壮骨健膝方组比较, LXRα 和 N-CoR 抑制剂组 IL-1β、TNF-α、MMP-3 及 MMP-13 含量升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

讨 论

滑膜炎症是 KOA 的主要病理表现之一, 在 KOA 病程的不同时期都有发生^[14]。其严重程度与 KOA 的病程呈正相关^[15]。KOA 滑膜炎症不仅可加速膝关节的退变, 还可导致明显的膝关节疼痛、肿胀及僵硬, 且反复发作, 迁延不愈。因此, 如何抑制滑膜炎症已成为 KOA 的研究热点之一^[16]。

KOA 滑膜炎症所致膝关节疼痛、肿胀及僵硬等症属中医学痹证范畴, 加之 KOA 患者还具有行走或登梯无力、运动控制下降及膝周肌肉萎缩等痿证表现, 故课题组认为“痹痿并见”是 KOA 的主要特点之一, 治当“痹痿并重”以除痹起痿^[2], 并经多年临床实践总结出治疗 KOA 的效验方—壮骨健膝方。方中独活、鸡血藤、秦艽、徐长卿、地鳖虫等中药可祛风湿、通经络以除痹, 骨碎补、杜仲、生地黄、川牛膝等中药可补肝肾、强筋骨以起痿, 诸药配合, 共奏祛风湿、通经络、补肝肾、强筋骨之功效。现代药理学研究发现^[17], 中药秦艽中有效成分龙胆苦苷具有显著的抗炎、镇痛等作用。Zhang N^[18]等报道其可显著降低人滑膜细胞中 IL-1β、TNF-α 等炎症因子的水平。另有研究发现, 该成分抗炎机制的发挥多与 NF-κB 通路和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路相关^[19]。独活、杜仲及生地黄等所含有有效成分阿魏

表 3 各组滑膜细胞中 LXRα、N-CoR、P50 及 P65 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LXRα	N-CoR	P50	P65
空白	3	1.03 ± 0.02	0.95 ± 0.04	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.05
模型	3	0.61 ± 0.02*	0.57 ± 0.02*	1.66 ± 0.01*	1.53 ± 0.03*
壮骨健膝方	3	0.92 ± 0.00 ^Δ	0.87 ± 0.01 ^Δ	1.17 ± 0.01 ^Δ	1.02 ± 0.01 ^Δ
LXRα 抑制剂	3	0.61 ± 0.01 ^{▲▲}	0.56 ± 0.02 ^{▲▲}	1.29 ± 0.07 ^{Δ▲}	1.29 ± 0.08 ^{Δ▲▲}
N-CoR 抑制剂	3	0.77 ± 0.06 ^{Δ▲▲}	0.56 ± 0.01 ^{▲▲}	1.48 ± 0.10 ^{Δ▲▲}	1.34 ± 0.10 ^{Δ▲▲}

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.01$; 与壮骨健膝方组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$

表 4 各组滑膜细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 及 MMP-13 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (pg/mL)	MMP-3 (μ g/L)	MMP-13 (μ g/L)
空白	3	56.48 $\pm$ 4.04	462.47 $\pm$ 11.42	20.34 $\pm$ 0.76	139.56 $\pm$ 2.11
模型	3	93.86 $\pm$ 2.25*	575.80 $\pm$ 20.70*	38.22 $\pm$ 0.45*	218.14 $\pm$ 4.21*
壮骨健膝方	3	74.23 $\pm$ 0.60 $\Delta\Delta$	510.54 $\pm$ 11.73 $\Delta\Delta$	27.22 $\pm$ 1.11 $\Delta\Delta$	165.52 $\pm$ 4.84 $\Delta\Delta$
LXR α 抑制剂	3	82.89 $\pm$ 2.97 $\Delta\Delta\Delta$	536.56 $\pm$ 14.87 $\Delta\Delta\Delta$	33.26 $\pm$ 2.62 $\Delta\Delta\Delta$	198.29 $\pm$ 8.84 $\Delta\Delta\Delta$
N-CoR 抑制剂	3	84.88 $\pm$ 1.88 $\Delta\Delta\Delta$	541.06 $\pm$ 8.58 $\Delta\Delta$	33.30 $\pm$ 2.44 $\Delta\Delta\Delta$	191.76 $\pm$ 13.05 $\Delta\Delta\Delta$

注：与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与壮骨健膝方组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

酸可通过扩张血管、抑制自由基生成来发挥改善微循环、减轻局部炎症的作用^[20]。何高燕等^[21]研究发现，其可通过抑制 NF- κ B 的激活，从而减少 TNF- α 、IL-1 的进一步表达。临床研究证实，壮骨健膝方能有效降低 KOA 的 Lequesne 评分，且在缓解膝关节肿胀及僵硬等 KOA 滑膜炎方面具有更好的疗效^[7]。课题组进一步研究也发现，壮骨健膝方可显著改善 KOA 滑膜炎模型兔膝关节滑膜组织炎症细胞浸润、血管及纤维组织生成等病理表现，降低组织形态学评分^[9]。但其抑制 KOA 滑膜炎的具体机制尚不明确。

膝关节滑膜组织分为细胞层和血管层，A 型滑膜细胞（又称滑膜巨噬细胞）是细胞层中的主要炎症细胞^[22]。Blom AB 等^[23, 24]发现，无 A 型滑膜细胞的 OA 模型小鼠骨赘形成减少、软骨退化程度明显减轻，且滑膜组织中 MMP-3、TGF- β 含量显著降低，认为该细胞是加速 OA 进展和诱发炎症的关键细胞。Samavedi S 等^[25]观察经 LPS 刺激的该细胞后发现，培养液中 MMP-3 等 MMPs 及 IL-1 β 等炎症因子含量明显增加，Kraus VB 等^[26]发现，这可能与静息态 A 型滑膜细胞向 M1 型分化有关。此外亦有研究发现，A 型滑膜细胞胞浆内的 LXR α 被激活后，可被小泛素化样蛋白修饰体修饰^[5, 6]，同时募集 N-CoR，进而启动“转录抑制”机制^[27, 28]，并通过 N-CoR 干预 NF- κ B 通路中 P50 及 P65 参与的 IL-1 β 、TNF- α 等炎症基因表达，最终抑制炎症的发生发展^[5, 6]。体外研究发现，提高 LXR α （LXR α 主要亚型）活性和释放可有效抑制 NF- κ B 的转录活性，进而减少下游效应产物 IL-6、TNF- α 等表达，最终减少细胞凋亡，缓解炎症，促进滑膜组织的自我修复^[29, 30]。因此，通过激活 A 型滑膜细胞 LXR α 以抑制 NF- κ B 转录活性，减少下游炎症因子及相关 MMPs 的生成，可能是有效控制滑膜炎的关键。

本研究延续前期研究，使用新西兰大白兔含药血清对 LPS 诱导的兔 A 型滑膜细胞炎症模型进行干预，采用抑制剂对照观察的方法分析壮骨健膝方含药血清对 A 型滑膜细胞 LXR α /NF- κ B 通路关键节点相关蛋

白与基因表达及通路下游炎症相关指标含量的影响，结果显示，经 LPS 刺激后兔 A 型滑膜细胞中 LXR α 和 N-CoR 蛋白及 mRNA 表达下调，P50 和 P65 蛋白及 mRNA 表达上调，LXR α /NF- κ B 通路激活，导致下游炎症相关指标 IL-1 β 、TNF- α 及 MMP-3、MMP-13 含量的升高。经壮骨健膝方含药血清干预后 LXR α 和 N-CoR 蛋白及 mRNA 表达升高，P50 和 P65 蛋白及 mRNA 表达下降，提示 LXR α /NF- κ B 通路被抑制，从而减少了下游炎症因子及相关 MMPs 的释放。为了进一步明确该方的作用靶点，分别在含药血清中加入 LXR α 、N-CoR 抑制剂，结果发现，与壮骨健膝方组相较，LXR α 抑制剂组与 N-CoR 抑制剂组 LXR α 和 N-CoR 蛋白及 mRNA 表达降低，P50 和 P65 蛋白及 mRNA 表达升高，说明抑制剂阻断了“转录抑制”机制，增强了 NF- κ B 通路中 P50、P65 的活化，提示 LXR α 可能是壮骨健膝方的作用靶点之一。以上结果说明，壮骨健膝方抑制 KOA 滑膜炎的机制涉及到对 LXR α /NF- κ B 通路关键节点相关蛋白及 mRNA 的调控，具体可能与该方上调 LXR α 表达、募集 N-CoR，进而下调 P50 和 P65 表达，从而抑制 NF- κ B 通路的激活，最终减少下游炎症因子及相关 MMPs 的释放有关。

综上，本研究结果从细胞水平证实，壮骨健膝方可通过调节 LXR α /NF- κ B 信号通路对 KOA 滑膜炎产生明显的抗炎作用。采用含药血清进行体外实验，可反映复方经体内胃肠吸收、生物转化后的综合整体药理效应，减少中药粗制剂对体外实验的干扰。但本文未涉及壮骨健膝方含药血清干预 KOA 滑膜炎反应的时效性与量效性，该方含药血清干预 A 型滑膜细胞的药效物质基础亦未涉及，这些将成为课题组今后研究的重点之一。

利益冲突：无。

参 考 文 献

[1] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J].

- 中医正骨, 2020, 32 (10): 1-14.
- [2] 郭洁梅, 陈鹏, 蔡唐彦, 等. 从“筋骨、痹痿、虚实、动静、刚柔”谈膝关节炎功能障碍的特点 [J]. 康复学报, 2021, 31 (1): 69-72, 82.
- [3] Perry TA, Gait A, O'Neill TW, et al. Measurement of synovial tissue volume in knee osteoarthritis using a semiautomated MRI- based quantitative approach [J]. Magn Reson Med, 2019, 81 (5): 3056-3064.
- [4] Akhtar N, Khan NM, Ashruf OS, et al. Inhibition of cartilage degradation and suppression of PGE2 and MMPs expression by pomegranate fruit extract in a model of posttraumatic osteoarthritis[J]. Nutrition, 2017, 33: 1-13.
- [5] Canavan M, McCarthy C, Larbi NB, et al. Activation of liver X receptor suppresses the production of the IL-12 family of cytokines by blocking nuclear translocation of NF-kappaBp 50[J]. Innate Immun, 2014, 20 (7): 675-687.
- [6] Cheng O, Ostrowski RP, Liu W, et al. Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB[J]. Neuroscience, 2010, 166 (4): 1101-1109.
- [7] 陈宝军, 闫虎, 张庆, 等. 壮骨健膝方治疗肝肾亏虚、风寒湿痹型膝关节炎 76 例临床观察 [J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23 (6): 3-5.
- [8] Yan H, Su YX, Lin XY, et al. Zhuanggu Jianxi Decoction limits interleukin-1beta-induced degeneration chondrocytes via the caveolin-p38 MAPK signal path-way[J]. Chin J Integr Med, 2014, 20 (5): 353-359.
- [9] 毛骁, 肖艳, 郭洁梅, 等. 壮骨健膝方对兔膝关节炎滑膜炎炎症肝 X 受体 / 核因子 κ B 通路的影响 [J/OL]. 世界中医药: 1-10[2021-08-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20210507.1711.010.html>.
- [10] 吴秉纯主编. 医学动物实验基础及基本技术方法 [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2008: 184.
- [11] 谢小倩, 李贺, 王亚乐, 等. 龙胆苦苷对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (6): 58-63.
- [12] 郭钰, 陈珺. 阿魏酸在衰老相关骨代谢疾病治疗中的应用 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12 (4): 395-399.
- [13] 余功旺, 黄文浩, 刘爱梅, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型的建立 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30 (6): 766-770.
- [14] Bruyère O, Cooper C, Pelletier JP, et al. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) [J]. Semin Arthritis Rheu, 2014, 44 (3): 253-263.
- [15] Roemer FW, Guermazi A, Felson DT, et al. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70 (10): 1804-1809.
- [16] Zhang L, Xing R, Huang Z, et al. Inhibition of synovial macrophage pyroptosis alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 2165918.
- [17] 李生浩, 李俊义, 武昆利, 等. 龙胆苦苷的药理作用及分子机制研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41 (1): 158-162.
- [18] Zhang N, Jiang Y, Mu F, et al. Gentiopicroin exerts anti-rheumatic effect in human fibroblast-like synoviocytes via inhibition of p38MAPK/NF-kappaB pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2019, 65 (6): 85-90.
- [19] 毛高慧, 张刘强, 钱菲, 等. 中药中 3 类环烯醚萜苷抗炎活性研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50 (1): 225-233.
- [20] 于大鹏, 孙卫强. 骨碎补及其提取物应用于骨科疾病的药理作用研究概况 [J]. 环球中医药, 2021, 14 (4): 761-766.
- [21] 何高燕, 谢敏, 高艳, 等. NALP3 及 NF- κ B 信号通路在氧化应激反应中的作用及阿魏酸钠的干预效应 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2015, 46 (3): 367-371.
- [22] 叶小康, 白自然, 金敏丽, 等. 滑膜细胞在骨关节炎中的研究进展 [J/OL]. 生物化学与生物物理进展: 1-10[2021-08-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20210425.1012.002.html>.
- [23] Blom AB, Lent PLV, Libregts S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: Involvement of matrix

- metalloproteinase 3[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56 (1): 147-157.
- [24] Blom AB, Lent PLEMV, Holthuysen AEM, et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis[J]. Osteoarthr Cartilage, 2004, 12 (8): 627-635.
- [25] Samavedi S, Diazrodriguez P, Erndtmarino JD, et al. A three-dimensional chondrocyte-macrophage coculture system to probe inflammation in experimental osteoarthritis[J]. Tissue Eng Part A, 2016, 23 (3-4): 101-114.
- [26] Kraus VB, McDaniel G, Huebner JL, et al. Direct *in vivo* evidence of activated macrophages in human osteoarthritis[J]. Osteoarthr Cartilage, 2016, 24 (9): 1613-1621.
- [27] Bi X, Song J, Gao J, et al. Activation of liver X receptor attenuates lysophosphatidylcholine induced IL-8 expression in endothelial cells via the NF- κ B pathway and SUMOylation[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20 (12): 2249-2258.
- [28] Im SS, Osborne TF. Liver X receptors in atherosclerosis and inflammation[J]. Circ Res, 2011, 108 (8): 996-1001.
- [29] Zheng F, Dong X, Meng X. Anti-inflammatory effects of taraxasterol on LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. Inflammation, 2018, 41 (5): 1755-1761.
- [30] 崔毅佳, 王淑梅, 金志国. 甲氨蝶呤通过抑制 TLR2-NF- κ B 信号通路减轻类风湿关节炎大鼠滑膜炎的作用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42 (2): 211-216.

(收稿: 2021-08-26 在线: 2022-06-16)

责任编辑: 汤 静

《中国中西医结合杂志》第九届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 雷 燕

顾 问 王永炎 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之 黄璐琦

曹洪欣 屠呦呦 韩济生

编辑委员

于德泉 王一涛 王卫霞 王 伟 王 阶 王拥军(上海) 王拥军(北京) 王 舒 毛 威
 卞兆祥 方邦江 方敬爱 邓跃毅 叶文才 田金洲 史戟祥 白彦萍 吕志平 朱立国 朱 兵
 朱明军 危北海 刘瓦利 刘龙涛 刘 平 刘 良 刘建平 刘建勋 刘保延 刘鲁明 齐清会
 安冬青 阮新民 孙汉董 孙 燕 阳 晓 花宝金 苏 励 李大金 李军祥 李国栋 李国勤
 李 恩 李焕荣 杨任民 杨宇飞 连 方 吴大嵘 吴万垠 吴正治 吴泰相 吴根诚 吴 烈
 张大钊 张卫东 张允岭 张永贤 张永祥 张荣华 张俊华 张亭栋 张敏州 张敏建 陆付耳
 陈士林 陈士奎 陈小野 陈立典 林志彬 林 谦 林瑞超 郁仁存 果德安 季 光 郑国庆
 赵一鸣 赵伟康 赵芳芳 胡义扬 胡晓梅 胡镜清 段金廛 侯凡凡 饶向荣 洪传岳 夏城东
 栗原博(日本) 徐凤芹 徐 浩 凌昌全 高瑞兰 郭 军 郭 姣 郭 艳 郭赛珊 唐旭东
 黄光英 梅之南 崔 红 麻 柔 梁 春 梁挺雄 梁晓春 梁繁荣 董竞成 董福慧 谢竹藩
 谢明村 谢 恬 蔡定芳 蔡 晶 裴正学 廖福龙 衡先培 魏 玮 Ye-meng CHEN (意大利)
 Yung-chi CHENG (美国) Jia-lang HE (美国) Yong-ming LI (美国) Sheng-xing MA (美国)
 Qun-hao ZHANG (美国) Joseph ZHOU (美国) Mian-sheng ZHU (法国)

以上名单按姓氏笔画为序, 编委工作单位信息在本刊网站首页“下载专区”公布, 网址: <http://www.cjim.cn/zxyjhc/zxyjhc/ch/index.aspx>