

· 基础研究 ·

少阳膝痹方调节 LXR- α /NF- κ B 信号通路对
膝骨关节炎大鼠的干预作用及机制张轩鸣¹ 郭 杨¹ 潘娅岚^{1, 2} 刘孟敏^{1, 3} 涂鹏程¹ 陆超然^{1, 3} 马 勇^{1, 2, 3}

摘要 目的 观察少阳膝痹方对大鼠膝骨关节炎的干预效应,初步从 LXR- α /NF- κ B 信号通路探讨其可能的作用机制。方法 采用改良 hulth 法建立大鼠双侧膝关节膝骨关节炎模型,随机分为假手术组、模型组、美洛昔康组、低、中、高剂量中药复方组,模型制备成功后灌胃给药,给药 4 周后观察软骨表面大体形态学,HE 染色观察软骨病理变化,ELISA 法检测血清中基质金属蛋白抑制剂-1 (TIMP-1)、前列腺素 2E (PGE2)、基质金属蛋白 13 (MMP13) 指标,Western Blot 检测大鼠膝关节 TNF- α 、调节肝 X 受体 α (LXR- α)、核因子 κ B (NF- κ B) P65、NF- κ B P-P65 蛋白的表达;建立膝关节软骨细胞培养体系,通过 LXR- α 激动剂及抑制剂干预,分为空白对照组、模型组、中药复方组、中药复方+抑制剂组、中药复方+激动剂组,检测 PGE2、MMP13 及 TNF- α 的表达情况。结果 术后 4 周,大体形态学观察显示中药复方各组软骨表面较模型组更完整,HE 染色显示各中药复方组关节软骨略有损伤,潮线略有杂乱,骨皮质略有损伤,较模型组有所改善。与假手术组比较,模型组 MMP13 浓度、PGE2、TNF- α 蛋白表达、P-P65 蛋白表达、P-P65/P65 相对蛋白表达升高 ($P<0.05$),NF- κ B P65 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。与模型组比较,美洛昔康组、各剂量中药复方组 MMP13 浓度、P-P65 蛋白表达、P-P65/P65 蛋白相对表达降低,TIMP-1 浓度、TIMP-1/MMP13 比值、LXR- α 基因及蛋白表达升高 ($P<0.05$);美洛昔康组、低、高剂量中药复方组 PGE2、TNF- α 蛋白降低,中剂量中药复方组 TNF- α 蛋白表达量亦降低 ($P<0.05$)。与空白对照组比较,模型组 MMP13、PGE2 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,中药复方组及中药复方+激动剂组 MMP13、PGE2 蛋白表达量降低 ($P<0.05$),TNF- α 基因表达升高 ($P<0.05$);与中药复方+抑制剂组比较,中药复方组、中药复方+激动剂组 MMP13、PGE2 表达量降低 ($P<0.05$),TNF- α 基因表达降低 ($P<0.05$)。结论 少阳膝痹方可降低血清中的 MMP13、PGE2 改善炎性微环境,减轻软骨退变,降低软骨中炎症因子 TNF- α 表达,这可能与上调 LXR- α 表达、降低 NF- κ B P65、P-P65 有关。

关键词 少阳膝痹方;膝骨关节炎;少阳主骨;肝 X 受体;核因子 κ B;中药复方

Effects of Shaoyang Xibi Decoction on Knee Osteoarthritis in Rats Based on LXR- α /NF- κ B Signaling Pathway ZHANG Xuan-ming¹, GUO Yang¹, PAN Ya-lan^{1, 2}, LIU Meng-min^{1, 3}, TU Peng-cheng¹, LU Chao-ran^{1, 3}, and MA Yong^{1, 2, 3} 1 New Technology Laboratory of Bone Trauma Repair and Reconstruction, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 Chronic Disease Nursing Intervention Laboratory, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210023); 3 College of Traditional Chinese Medicine, College of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210023)

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(No. BK20211300);江苏高校中西医临床医学品牌专业建设工程资助项目(二期)(No. 2020PPZXL261)

作者单位:1.南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室(南京 210023);2.南京中医药大学慢性病中医护理干预实验室(南京 210023);3.南京中医药大学中医学中西医结合医学院(南京 210023)

通讯作者:马 勇, Tel: 025-85811985, E-mail: mayong@njucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20230901.087

ABSTRACT Objective To evaluate the intervention effect of Shaoyang Xibi Decoction (SXD) on rat knee osteoarthritis and to initiate an exploration into its probable mechanism of action through the LXR- α /NF- κ B signaling pathway. **Methods** A rat bilateral knee osteoarthritis model was established by the modified Hulth technique and was subsequently segregated into six groups: sham operation group, model group, meloxicam group, and low, medium, and high dose Chinese medicine compound group. Following the successful preparation of the model, the drug was administered via gavage. After 4 weeks of treatment, the gross morphology of the cartilage surface was examined, while HE staining was employed to observe pathological changes in cartilage. ELISA was used to assay serum matrix metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1), prostaglandin E2 (PGE2), and matrix metalloproteinase 13 (MMP13) levels. Western Blot analysis was utilized to detect rat knee joint TNF- α , liver X receptor α (LXR- α), nuclear factor κ B (NF- κ B) P65, and NF- κ B P-P65 proteins expressions. A knee joint cartilage cell culture system was established and intervened with LXR- α agonist and inhibitor. The cells were divided into blank control group, model group, Chinese medicine compound group, Chinese medicine compound+agonist group and Chinese medicine compound+inhibitor group. The expression of PGE2 and TIMP-1 proteins were measured. **Results** Four weeks after surgery, gross morphology observations indicated that the cartilage surface integrity in the Chinese medicine compound groups was superior to that of the model group. HE staining revealed mild damage in joint cartilage, slightly disordered tide lines, and minor damage to the bone cortex within each Chinese medicine compound group, showing an improvement in comparison to the model group. Compared with the sham operation group, the model group exhibited increased MMP13 concentration, PGE2, TNF- α protein expression, P-P65 protein expression, P-P65/P65 relative protein expression ($P<0.05$), and a decrease in NF- κ B P65 protein expression ($P<0.05$). Compared with the model group, meloxicam and the various doses of Chinese medicine compound groups demonstrated reductions in MMP13 concentration, P-P65 protein expression, P-P65/P65 relative protein expression, and increased in TIMP-1 concentration, TIMP-1/MMP13 ratio, LXR- α gene, and protein expression ($P<0.05$). The meloxicam, low, and high dose Chinese medicine compound groups exhibited decreased PGE2 and TNF- α protein expression ($P<0.05$), while the medium dose group also showed reduced TNF- α protein expression ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the model group had increased MMP13 and PGE2 protein expression ($P<0.05$). Compared with the model group, MMP13 and PGE2 protein expression decreased in the Chinese medicine compound group and Chinese medicine compound+agonist group ($P<0.05$), while TNF- α gene expression increased ($P<0.05$). In comparison to the Chinese medicine compound+inhibitor group, MMP13 and PGE2 expression decreased in the Chinese medicine compound group and Chinese medicine compound+agonist group ($P<0.05$), and TNF- α gene expression decreased ($P<0.05$). **Conclusions** SXD demonstrates potential efficacy in reducing serum MMP13 and PGE2 levels, ameliorating the inflammatory microenvironment, alleviating cartilage degeneration, and decreasing inflammatory factor TNF- α expression in cartilage. These effects may be associated with the upregulation of LXR- α expression and the downregulation of NF- κ B P65 and P-P65.

KEYWORDS Shaoyang Xibi Decoction; knee osteoarthritis; Shaoyang governing bones; liver X receptor; nuclear factor κ B; Chinese herbal compound

膝骨关节炎是一种筋骨共病、痿痹并存的慢性骨关节退行性疾病,严重影响患者的生活质量,对社会经济造成了巨大的负担^[1]。课题组经过多年临床实践,主张辨治膝骨关节炎时需关注“用骨”与“养骨”并重,在肾主骨理论指导下,还应重视少阳主骨理论的应用^[2]。少阳主骨理论强调筋骨与肝的关系,关节运动灵活以筋与骨化生、濡养为基础^[2]。课题组基于此构建了“通利少阳枢机、和衡气血筋骨”的验方一少阳膝痹

方,该方能缓解患膝疼痛僵硬,改善关节疼痛,提高关节功能^[3]。通过文献数据挖掘发现其作用机制可能与调节肝X受体 α (liver X receptor α , LXR- α)、改善炎性微环境有关^[4]。研究表明,LXR- α 是一种配体激活的核受体,能抑制核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)通路,阻断炎性因子释放及炎性微环境的形成^[5]。因此,本研究拟从动物细胞水平进一步验证少阳膝痹方对膝骨关节炎的干预效果,并初步探讨其可

能的作用机制,为少阳主骨理论指导辨治膝关节炎提供一定的科学依据。

材料与方法

1 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重 (210 ± 10) g,购于浙江省杭州医学院,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。SPF 级 SD 大鼠 4 只,全为雌性,体重 (210 ± 10) g,购于杭州医学院,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。该研究相关动物实验已经南京中医药大学实验动物中心批准(No. 202203 A075)。

2 药物与试剂 少阳膝痹方(专利号:ZL201810399052.9)组成:柴胡 10 g、黄芩 8 g、白芍 10 g、党参 10 g、牛膝 9 g、杜仲 9 g,饮片采购自南京中医药大学附属医院药剂科;美洛昔康片(宏强),逗号扬子江药业集团有限公司(批号:20200931,每片 7.5 mg);肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 抗体(博士得生物,中国,批号:PB0270);LXR- α 抗体(安迪生物科技(上海)有限公司,中国,批号:NB400-157 SS);羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,中国,批号:sa00001-2);NF- κ B P65 抗体(美国 Affinity 抗体公司,批号:AF5006);Phospho-NF- κ B 抗体(美国 Affinity 抗体公司,批号:AF2006);基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1, TIMP-1)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、基质金属蛋白 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13) ELISA 试剂盒(南京金益柏生物科技有限公司,批号:JEB-13588、JEB-13519、JEB13530),LG-DMEM 培养基(江苏凯基生物,中国,货号:KGM31600-500),四季青胎牛血清(货号:11011-8611),1 xPBS(江苏凯基生物,中国,货号:KGB5001),GW3965(美国 Sellck 生物科技有限公司,货号:405911-17-3);GSK2033(Medchemexpress 生物科技有限公司,美国,货号:1221277-90-2)。

3 实验仪器 蛋白半干转印仪及电泳仪(美国 Bio-Bad 公司),酶标仪(Infinite F50,南京沃心仪器设备有限公司),凝胶显影系统(Tanon5200,全自动化学发光图像分析系统),小动物麻醉机(吸入式气体麻醉机),RWD510(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),瑞沃德二氧化碳细胞培养箱。

4 动物实验

4.1 分组及膝关节炎大鼠模型制备 将大鼠

按性别分层随机分为假手术组、模型组、美洛昔康组、低剂量中药复方组、中剂量中药复方组、高剂量中药复方组,每组 10 只。除假手术组外均采用异氟烷麻醉法^[6]进行麻醉,采用 Rogart JN 等^[7]的改良 hulth 法进行造模。检验大鼠意识消失后,将大鼠仰卧位放置于鼠板上,常规皮肤消毒,铺无菌洞巾。经膝关节正中切口切开皮肤,逐层分离筋膜和肌腱,暴露完整关节腔。暴露膝关节内部结构,游离前交叉韧带并切断,抽屉试验检测前交叉韧带是否被切断。术后 3 天内肌注青霉素 40 万 U/d 防止感染。术后 1 周起通过大鼠跑台设定速度 18 m/min,电流 0.6 mA 强迫大鼠运动每天 30 min,持续 4 周。其中造模成功 58 只,造模成功率为 96.7%,死亡大鼠 2 只,死亡原因为创口撕裂过量出血。

4.2 干预方法 造模成功后,根据不同动物等效剂量的折算系数表^[8],假手术组、模型组均给生理盐水 $[10 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$;美洛昔康组给美洛昔康水溶液 $[7.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,低剂量中药复方组 $[11 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、中剂量中药复方组 $[22 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、高剂量中药复方组 $[44 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 给予少阳膝痹方水煎剂,分别为成人临床等效剂量 1、2、4 倍,按照成人临床日用剂量及大鼠与成人体重剂量折算系数^[9](6.25)计算出大鼠的日用量为 $11 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,术后 1 周后开始灌胃给药,连续给药 4 周。

4.3 样本收集及处理 大鼠给药四周后,采用异氟烷麻醉,促凝管取腹主动脉动脉血,4℃冰箱冷藏 1 h,高速冷冻离心机 3 500 r/min 离心 10 min,取上层血清,保存于 -80℃超低温冰箱,用于组织外环境 ELISA 检测;取左侧膝关节置于冻存管中,于液氮中短期保存,后转移入 -80℃超低温冰箱用于蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测。右侧膝关节置于 4%多聚甲醛固定 1 周,EDTA 脱钙液脱钙 45 天后用于石蜡切片及 HE 染色。

4.4 检测指标及方法

4.4.1 大鼠膝关节大体形态学观察 给药 4 周后,每组大鼠随机抽取 3 只,解剖膝关节后使用高清照相机对股骨关节面和胫腓骨关节面进行拍照,并对软骨大体情况进行评分评估关节软骨光滑度、色泽、表面是否有糜烂及溃疡等。软骨损伤的大体分级评分系统参照参考文献^[10]。

4.4.2 病理染色检验病理变化程度 给药 4 周后,每组大鼠随机抽取 3 只右侧膝关节,置于 4%多聚甲醛中固定 7 天,EDTA 脱钙液脱钙 45 天,50%、70%、75%、80%、90%无水乙醇梯度脱水、二甲

苯透明、浸蜡、包埋、切片 (0.2 cm)、漂片及烤片后行 HE 染色。采用 Mankin's 评分评估染色结果^[11]。

4.4.3 ELISA 法检测 MMP13、TIMP-1 及 PGE2 每组随机取 5 只大鼠的血清,依次加入 5 个副孔,加入 50 μ L 生物素标记的抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗板后加入底物 A、B 各 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min,迅速加入 50 μ L 终止液,酶标仪在 450 nm 波长处立即测定各孔的 OD 值。

4.4.4 实时定量荧光 qPCR 检测 LXR- α 及 NF- κ B P65 的基因表达 每组随机抽取 3 只大鼠,将取出的左侧膝关节软骨液氮充分研磨后移入 EP 管中,使用诺唯赞 RNA 提取试剂盒提取组织样本总 RNA,诺唯赞 RNA 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,诺唯赞 qPCR 试剂盒行实时荧光定量 qPCR,条件预变形 95 $^{\circ}$ C 30 s,变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,退火延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。GAPDH 为内参基因,得各组样本 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行半定量计算分析。

基因	引物序列 (5'-3')	引物大小 (bp)
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	21
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23
LXR- α	上游 GAGATGTCCTTGTGGCTGG	19
	下游 CCTTTTCCGCTTCTGTGGA	20
NK- κ B P65	上游 CCGAGAAGAACAACCC	20
	下游 ACAAAGCAGCAGGTTACGA	20

4.4.5 Western Blot 检测大鼠膝关节软骨 LXR- α 、TNF- α 、NF- κ B P65、NF- κ B P-P65 蛋白的表达 每组随机抽取 3 只大鼠,将取出的左侧膝关节软骨液氮充分研磨后移入 EP 管中,加入 RIPA 裂解液置于冰上裂解 10 min,12 000 r/m 离心收集总蛋白,经二辛可宁酸 (BCA) 法定量后,取等量蛋白加入上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),先 120 V 恒压电泳 15 min,再 160 V 恒压电泳 25 min,结束电泳后 400 mA 恒流转膜 40 min,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h,滴加电化学发光 (ECL) 液显色,凝胶成像系统成像检测 LXR- α 、TNF- α 等蛋白的表达。利用 Image J 软件测定条带灰度值

5 细胞实验

5.1 大鼠膝关节软骨细胞提取与鉴定 取 4 只大鼠处死取材,在无菌条件下刮取双侧膝股骨髁关节面及胫骨平台关节软骨。用含 3% 双抗的 PBS 缓冲液反复冲洗 3 次,再将软骨剪切成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小的软骨粒,加入 LG-DMEM 配置的 0.2% 的二型

胶原酶中,于细胞培养箱中消化 8 h,终止消化后收集消化液。1 000 r/m 离心 5 min,弃上清,加入含 10% FBS,1% 双抗的 LG-DMEM 全培重悬,接种于 ϕ 100 mm 的培养皿中,放置在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的培养箱中。每隔 2~3 天换液 1 次,定期在倒置显微镜下观察拍照。当细胞铺满皿底 90% 以上时,按照 1:2 的比例传代培养。三代后进行甲苯胺蓝染色法行软骨细胞鉴定^[12]。

5.2 少阳膝痹方含药血清制备及干预时间、浓度筛选 取 12 只大鼠分为中药复方组 (6 只) 和空白组 (6 只),中药复方组按照 11 g/(kg $\cdot$ d) 中药复方灌胃少阳膝痹方,大鼠给药剂量按体表面积换算法^[9],为临床成人用量的 6.25 倍。空白组灌胃等量生理盐水,每日服药 1 次,连续 7 天。各组动物服药前和服药后腹主动脉抽取动脉血 15 mL,静置 3 h,3 500 r/m 10 min 离心分离血清,取上清液,56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min,-20 $^{\circ}$ C 保存,制备少阳膝痹方血清和空白对照血清。

5.3 CCK8 法检测少阳膝痹方对大鼠软骨细胞干预时间、浓度的筛选 重悬软骨细胞,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板内,每孔中含 1×10^3 个细胞,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12 h,加入不同浓度的培养液 100 μ L/孔 (0%,5%,10%,15%,20%,25%,30%),继续培养 24 h 后加入 20 μ L CCK8 溶液,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱 4 h 弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,用酶标仪在波长 450 nm 检测,确定最佳含药血清给药浓度。再以此浓度作为常量,将给药时间分别设为 6、12、24、48 h。重复上述步骤直到确定给药时间。

5.4 细胞分组及造模 待正常细胞传至第四代时,培养皿中加入含 10 ng/mL IL-1 β 的 10% FBS 培养基,放入 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h,造模期间不更换培养基。

对炎症模型软骨细胞分别进行干预如下:模型组:定期更换培养液;中药复方组:予 10% 少阳膝痹方含药血清;中药复方+抑制剂组:中药复方组+LXR- α 抑制剂 GSK2033;中药复方+激动剂组:中药复方组+LXR- α 激动剂 GW3965;另设空白对照组:正常大鼠软骨细胞。按分组干预 72 h。

5.5 细胞蛋白取材 细胞吸去培养基,用预冷的 PBS 清洗 2 次,最后 1 次 PBS 尽量吸弃。加入细胞裂解液,吹打数下,使裂解液与细胞充分接触,冰上孵育 10 min。用细胞刮刀将细胞刮下,移入遇冷的 EP 管中。将 EP 管放在 4 $^{\circ}$ C 摇床上震荡 10 min 后 4 $^{\circ}$ C,

14 000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至新的 EP 管内 (预冷), 蛋白定量。每 40 μ L 样本加入 10 μ L 上样缓冲液, 之后转入 100 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴 15 min。之后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。Western Blot 检测大鼠软骨细胞 MMP13、PGE2 及的表达, 方法见 4.4.5。实时定量荧光 qPCR 检测 LXR- α 基因表达, 方法见 4.4.4。

6 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism9 统计软件进行统计分析。Normality and Lognormality Tests 检测组内数据是否符合正态分布, One-way ANOVA 方差分析评估各组组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠膝关节大体形态学观察结果比较 (图 1)

假手术组关节软骨表面未被破坏, 无损伤, 无骨赘形成, 软骨下骨未暴露; 模型组膝关节软骨表面破坏, 损伤明显, 骨赘形成, 软骨下骨暴露, 较假手术组色泽偏黄, 关节完整度变差, 出现骨赘, 局部软骨糜烂。与模型组比较, 各中药复方组膝关节软骨色泽均较鲜红透亮, 关节较光滑, 无骨赘, 无糜烂及其他损伤。关节软骨宏观评分显示, 与假手术组比较, 模型组评

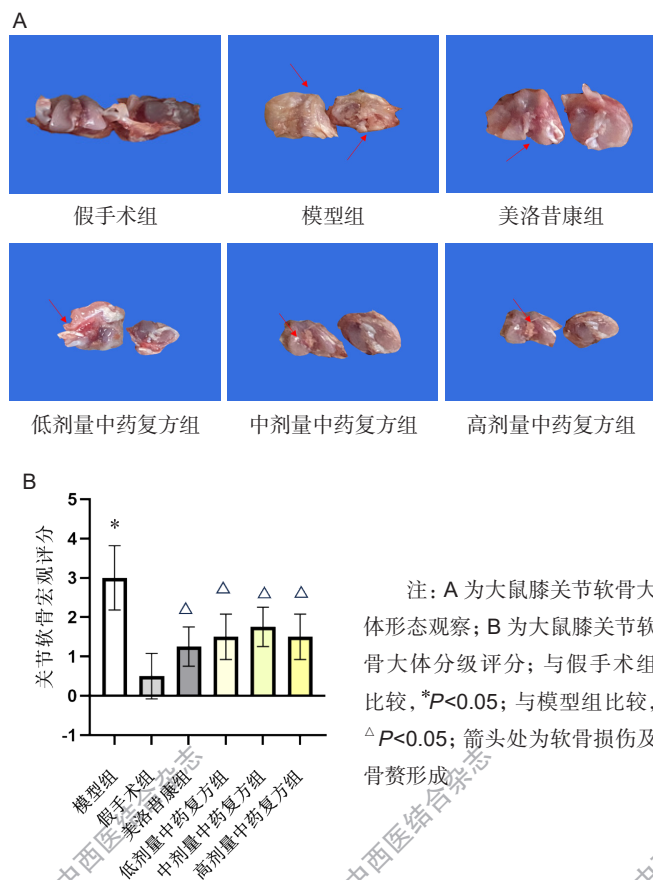


图 1 大鼠膝关节大体形态学观察结果比较

分显著增加, 美洛昔康组及低剂量中药复方组评分较模型组下降 ($P < 0.05$)。

2 各组膝关节软骨组织病理变化结果比较 (图 2)

假手术组可见膝关节软骨表面光滑规整, 未见明显裂隙。细胞排列规整, 未见细胞增加或减少, 基质染色尚显正常, 潮线完整, 各层分解清晰。模型组可见关节软骨表面轻度破坏, 软骨层破坏较严重, 略有裂隙, 偶有部分缺损, 软骨细胞未见增加或减少, 基质染色尚正常, 潮线完整性变差。美洛昔康组及各中药复方组可见关节软骨表面轻度破坏, 软骨层磨损较严重表面略欠光滑, 潮线完整性变差, 细胞略有肥大。与假手术组比较, 模型组 mankin's 评分显著增加, 而各中药复方组评分均较模型组下降 ($P < 0.05$)。

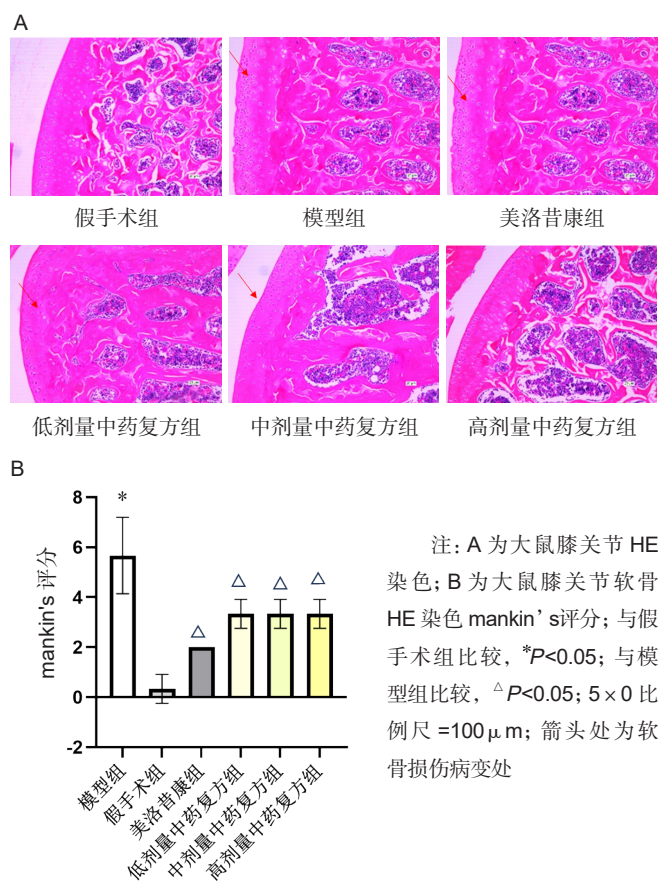
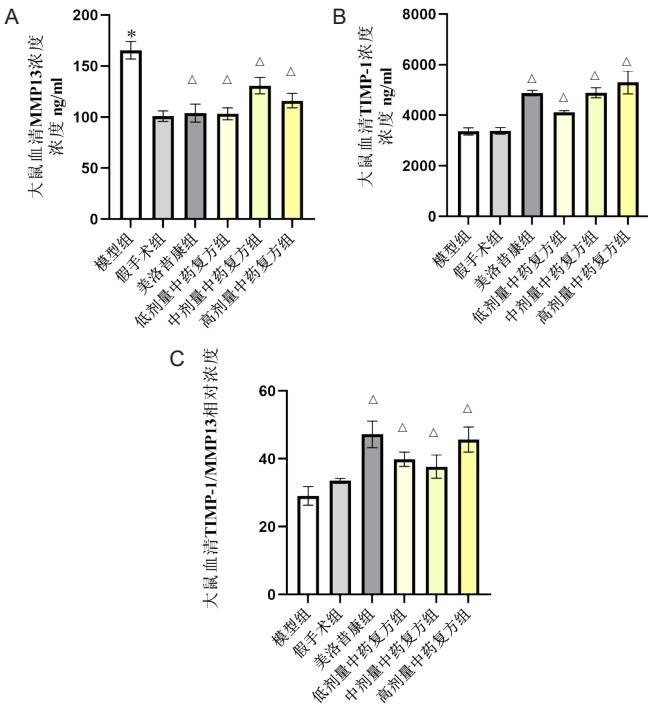


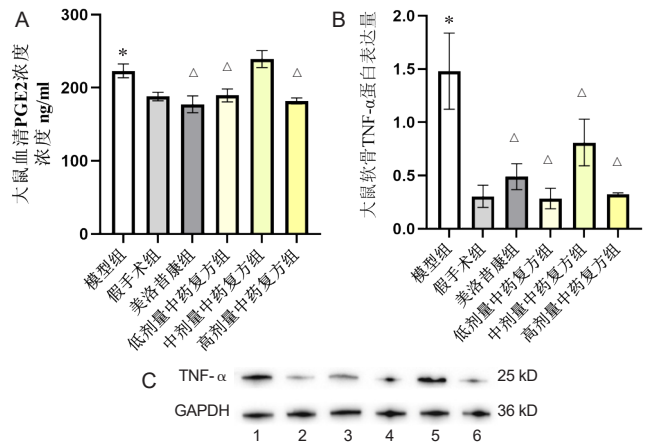
图 2 各组膝关节软骨组织病理变化结果比较

3 各组大鼠 MMP13、TIMP-1 浓度及 TIMP-1/MMP13 比较 (图 3) 与假手术组比较, 模型组 MMP13 浓度升高 ($P < 0.05$), TIMP-1/MMP13 及 TIMP-1 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 美洛昔康组、各剂量中药复方组 MMP13 浓度降低, TIMP-1 浓度及 TIMP-1/MMP13 比值升高 ($P < 0.05$)。与美洛昔康组比较, 低剂量中药复方组 TIMP-1 浓度及 TIMP-1/MMP13 降低, 但差异无统计



注: A 为大鼠血清 MMP13 浓度; B 为大鼠血清 TIMP-1 浓度; C 为大鼠血清 TIMP-1/MMP13 相对浓度; 与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$

图 3 少阳膝痹方对软骨基质蛋白相关基因及蛋白表达的影响



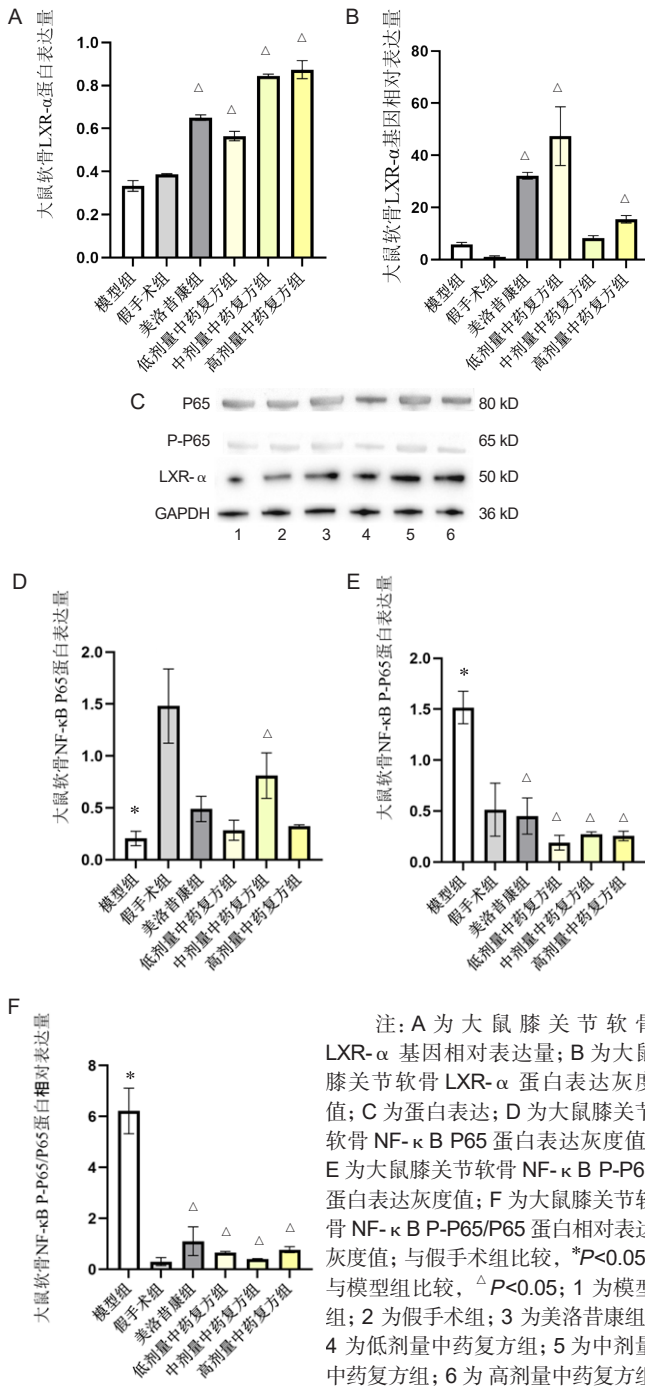
注: A 为大鼠血清 PGE2 浓度; B 为大鼠膝关节软骨 TNF- α 蛋白表达的灰度分析; C 为炎症因子蛋白表达; 与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 1 为模型组; 2 为假手术组; 3 为美洛昔康组; 4 为低剂量中药复方组; 5 为中剂量中药复方组; 6 为高剂量中药复方组

图 4 少阳膝痹方对炎症因子相关蛋白表达的影响

学意义 ($P>0.05$)。

4 各组大鼠 PGE2 及 TNF- α 蛋白表达结果比较(图 4) 与假手术组比较, 模型组炎症因子 PGE2、TNF- α 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 美洛昔康组、低、高剂量中药复方组 PGE2、TNF- α 蛋白降低, 中剂量中药复方组 TNF- α 蛋白表达量亦降低 ($P<0.05$)。

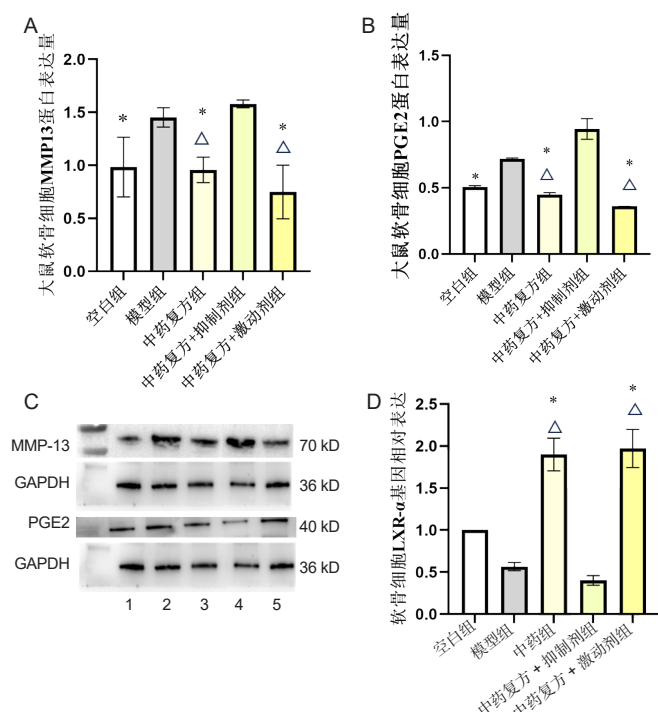
5 各组 LXR- α /NF- κ B 信号通路基因及蛋白



注: A 为大鼠膝关节软骨 LXR- α 基因相对表达量; B 为大鼠膝关节软骨 LXR- α 蛋白表达灰度值; C 为蛋白表达; D 为大鼠膝关节软骨 NF- κ B P65 蛋白表达灰度值; E 为大鼠膝关节软骨 NF- κ B P-P65 蛋白表达灰度值; F 为大鼠膝关节软骨 NF- κ B P-P65/P65 蛋白相对表达灰度值; 与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 1 为模型组; 2 为假手术组; 3 为美洛昔康组; 4 为低剂量中药复方组; 5 为中剂量中药复方组; 6 为高剂量中药复方组

表达结果比较(图 5) 与假手术组比较, 模型组 LXR- α 基因及蛋白表达差异无统计学意义, NF- κ B P65 蛋白表达下降, P-P65 蛋白表达、P-P65/P65 相对蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 美洛昔康组、各中药复方组 LXR- α 基因及蛋白表达量明显升高、P-P65 蛋白表达、P-P65/P65 蛋白相对表达降低 ($P<0.05$)。

6 各组含药血清对大鼠软骨细胞 MMP13、



注: A 为小鼠软骨细胞 MMP13 蛋白表达灰度值; B 为小鼠软骨细胞 PGE2 蛋白表达灰度值; C 为蛋白表达; D 为小鼠软骨细胞 TNF- α 基因相对表达量; 与模型组比较, * $P<0.05$; 与中药复方+抑制剂组比较, $\Delta P<0.05$; 1 为模型组; 2 为空白组; 3 为中药复方组; 4 为中药复方+抑制剂组; 5 为中药复方+激动剂组

图 6 少阳膝痹方含药血清对大鼠软骨细胞炎症因子及软骨基质蛋白相关蛋白表达的影响

PGE2 蛋白表达及 LXR- α 基因表达比较 (图 6) 与空白组比较, 模型组 MMP13、PGE2 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 中药复方组及中药复方+激动剂组 MMP13、PGE2 蛋白表达量降低 ($P<0.05$), LXR- α 基因表达升高 ($P<0.05$); 与中药复方+抑制剂组比较, 中药复方组、中药复方+激动剂组 MMP13、PGE2 表达量降低 ($P<0.05$), LXR- α 基因表达降低 ($P<0.05$)。

讨论

中医学无“膝骨关节炎”这一病名, 根据其病因病机常被归纳为“膝痹”“筋痿”“骨痹”, 是一种筋骨共病、痿痹并存的疾病。膝骨关节炎因气机阻滞, 气血不和, 膝关节不利, 关节活动受限, 不通则痛, 不荣则痛, 最终导致筋痿骨痹的发生^[13]。“少阳主骨”理论从“用骨”角度出发, 是足少阳胆经、手少阳三焦经、胆、三焦、相火等各自功能的综合体现, 是一个多角度的理论。张介宾曰:“少阳为枢, 阳气在表里之间”(《类经卷九第二十九》), 人体活动的“枢机”即为关节, 而膝关节是人体活动中最大的枢机。少阳

经脉循行通过全身大部分筋骨关节, 少阳经气可协调筋骨运动; 少阳为枢, 可循行气血, 协调营卫, 濡润筋骨; 少阳内寄相火, 相火升腾, 才能温煦五脏六腑, 濡养骨和关节^[14]。在长期研究及治疗中, 课题组总结归纳膝骨关节炎发病机制和临床治疗, 发现“少阳主骨”理论与膝骨关节炎发病机制相符合, 少阳主骨理论之“用骨”理论强调了对少阳气机阻滞、膝关节枢机不利的治疗, 注重中医药恢复膝关节功能, 并总结出契合“少阳主骨”理论的少阳膝痹方, 在治疗“筋痹”“骨痿”及胆源性骨病等方面具备一定的优势, 在治疗系骨关节炎方面也具备一定理论基础^[15]。本方该方从《伤寒论》中的小柴胡汤与桂枝汤化裁而来, 小柴胡汤能调解少阳枢转之机, 桂枝汤则可通调营卫气血, 契合“少阳枢机不利”的病机。以柴胡、黄芩为君, 是和解少阳的经典药对; 白芍、党参、牛膝、杜仲为臣, 四药既可补益肝胆之气血, 又可补肝肾强筋骨, 牛膝兼可引药下行, 直达病所。全方共奏“通利少阳枢机、和衡气血筋骨”之功。现代医学认为, 柴胡具备抗炎、抗氧化、保护肝脏功效^[16], 黄芩具备抗炎、抗病毒、抗肿瘤功效^[17], 白芍总苷抗抑郁, 抗炎^[18]; 党参、杜仲抑制炎症因子及 NF- κ B 信号通路表达^[19, 20]; 牛膝可促进软骨保护, 清除氧自由基^[21]。综上所述, 少阳膝痹方充分具备治疗膝骨关节炎的可行性。

现代医学认为, 膝骨关节炎发病与炎症因子息息相关^[22], 病情进展与软骨细胞凋亡^[23]、炎症因子促炎反应^[24]、软骨细胞外基质降解^[25]等密不可分, 基 MMPs 是参与降解软骨细胞外机制的主要酶系^[26], 其中 MMP13 作为基质溶解素可以降解蛋白聚糖^[27, 28]。有研究发现膝骨关节炎的病变程度与 IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子的水平也有直接关联^[29-31]。LXR- α 的抗炎作用主要通过激活 LXR 后抑制 NF- κ B 信号通路进而抑制 TNF- α 、MMP9 等炎症因子的表达及调节炎症微环境实现^[32-35], 提高 LXR- α 活性可抑制 NF- κ B 的转录活性^[36], 进而减少 TNF- α 的表达, 减轻炎症^[37, 38]。在人脐静脉内皮细胞的研究中, LXR 激动剂 GW3965 可以通过抑制 NF- κ B 来实现抑制溶血卵磷脂诱导的 IL-8 表达^[36]。有实验表明, 注射了 LXR 受体激动剂的动物能抑制脂多糖引起的炎症因子在细胞中的表达^[39]。

本实验表明, 与模型组比较, 大体形态观察显示少阳膝痹方可改善软骨缺损, HE 染色示少阳膝痹方各组关节软骨缺损情况较模型组有所改善, 潮线相对完整; 各中药复方组血清中 MMP13 蛋白量相比

模型组有所降低, TIMP-1 蛋白量有所升高, TIMP1/MMP13 比值亦有所提高。这些结果提示, 少阳膝痹方可通过下调炎性微环境中基质金属蛋白的表达, 进而缓解膝骨关节炎结缔组织破坏。模型组炎性因子 TNF- α 、PGE2 的表达量较假手术组有所升高, 而中药复方组与模型组相比有明显下降。该结果表明, 少阳膝痹方可以降低炎性因子表达, 减轻膝骨关节炎病变程度。相比于模型组, 各中药复方组 LXR- α 表达量有明显提高, 可以推测少阳膝痹方存在调控 LXR- α , 抑制膝骨关节炎进行进展的可能。与此同时, 少阳膝痹方各组 P-P65/P65 较模型组表达量有所下降。细胞实验显示, 抑制 LXR- α 受体后 MMP13、PGE2 表达量升高。以上结果显示, 少阳膝痹方可调节 LXR- α 表达, 降低膝骨关节炎炎性指标表达, 一定程度上缓解膝骨关节炎进展。

综上所述, 本实验研究初步发现少阳膝痹方可抑制 MMP13 表达、促进 TIMP1 相对表达以抑制软骨破坏, 降低 TNF- α 、PGE2 表达抑制炎症, 提高 LXR- α 表达、抑制 NF- κ B 信号通路表达介导 LXR- α /NF- κ B 信号通路抑制炎症进展。少阳膝痹方在一定程度上可能具备维持关节软骨基质的合成与降解平衡, 防止软骨基质过度降解及丢失, 改善大鼠膝骨关节炎症状的作用, 而这种作用可能是通过激活 LXR- α 受体实现的。但本实验依然存在以下问题: (1) 少阳膝痹方干预膝骨关节炎的机制可能与抑制 LXR- α /NF- κ B 信号通路有关, 但更具体的效应机制是我们下一步研究的重点。(2) 含药血清成分复杂, 对血清中有效成分的鉴定和明确带来了巨大的困难。(3) 对于中药复方各浓度表型差别, 可能需要进一步实验研究。

利益冲突: 所有作者均未披露相关关系。

参 考 文 献

- [1] Cui A, Li H, Wang D, et al. Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies[J]. *EClinicalMedicine*, 2020, 29-30: 100587.
- [2] 司誉豪, 马勇, 於浩, 等. “少阳主骨”理论体系构建进展——论肝 X 受体 α 为治疗膝骨关节炎的物质基础[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41 (1): 96-100.
- [3] Si Y, Ma Y, Guo Y, et al. Efficacy and safety of Shaoyang Xibi decoction in patients with knee osteoarthritis: a multi-center, single-blind, randomized controlled trial[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38 (5): 733-739.
- [4] 司誉豪, 郭杨, 马勇. 论“少阳主骨”理论研究进展及其与胆源性骨病的关系[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50 (10): 35-38.
- [5] Wang H, Zhu H, Yang X. Dioscin exhibits anti-inflammatory effects in IL-1 β -stimulated human osteoarthritis chondrocytes by activating LXR α [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42 (4): 340-345.
- [6] He E, Xu S, Dai Y, et al. SWCNTs/PEDOT: PSS-modified microelectrode arrays for dual-mode detection of electrophysiological signals and dopamine concentration in the striatum under isoflurane anesthesia[J]. *ACS Sens*, 2021, 6 (9): 3377-3386.
- [7] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, 7 (6): 539-547.
- [8] 王珏. 基于经方剂量折算的有毒中药剂量的探索——四逆汤对大鼠失血性低血压模型量-效-毒关系的初步研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [9] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010, (5): 52-53.
- [10] Li J, Zhang B, Liu WX, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling[J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79 (5): 635-645.
- [11] Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1981, 63 (1): 131-139.
- [12] Chen PJ, Dutra EH, Mehta S, et al. Age-related changes in the cartilage of the temporomandibular joint[J]. *Geroscience*, 2020, 42 (3): 995-1004.
- [13] 卫晓恩. 不忘初心·从本论治——浅谈中西医治疗膝骨关节炎[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41 (7): 778-781.
- [14] 马勇, 司誉豪, 郭杨, 等. 施杞另辟蹊径论治膝骨关节炎——“少阳主骨”辨析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23 (11): 1536-1538.
- [15] 司誉豪, 郭杨, 马勇. 论“少阳主骨”理论研究进展及其与胆源性骨病的关系[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50 (10): 35-38.
- [16] 谢志明, 吴春梅, 陈少元, 等. 柴胡多糖通过抑制氧化应激和炎症反应减轻铅诱导小鼠肝肾损伤的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (9): 2660-2672.
- [17] Lee W, Ku SK, Bae JS. Anti-inflammatory effects of Baicalin, Baicalein, and Wogonin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Inflammation*, 2015, 38 (1): 110-125.
- [18] 彭志婷, 李晨, 周艳丽, 等. 白芍总苷对肝郁脾虚模

- 型大鼠脑-肠轴炎症因子表达的影响[J]. 江西中医药, 2022, 53 (6): 59-62.
- [19] 郭鹏翔, 杨扶德, 王志旺, 等. 党参对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠炎症介质的影响[J]. 世界中医药, 2022, 17 (20): 2847-2850, 2859.
- [20] 鲁海, 谢国平, 刘文刚, 等. 杜仲干预大鼠膝骨性关节炎关节软骨破坏的机理研究[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34 (11): 144-145.
- [21] 柯晖, 黄宗著. 怀牛膝对 OA 模型兔膝关节液中一氧化氮合酶与超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25 (12): 2889-2890.
- [22] 张荣, 张向东, 赵明宇. 膝骨关节炎发病机制及治疗进展[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8 (5): 68-72.
- [23] Ji B, Guo W, Ma H, et al. Isoliquiritigenin suppresses IL-1 β induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- κ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40 (6): 1709-1718.
- [24] Scotece M, Conde J, Abella V, et al. Oleocanthal inhibits catabolic and inflammatory mediators in LPS-activated human primary osteoarthritis (OA) chondrocytes through MAPKs/NF- κ B pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49 (6): 2414-2426.
- [25] Seidl CI, Murphy CL. Dual and opposing regulation of MMP1 and MMP13 by both arms of miR-675 in human articular chondrocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53 (1): 172-185.
- [26] Rahman FU, Ali A, Khan IU, et al. Novel phenylenediamine bridged mixed ligands dimetallic square planner Pt (II) complex inhibits MMPs expression via p53 and caspase-dependent signaling and suppress cancer metastasis and invasion[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 125: 1064-1075.
- [27] Hanna A, Shinde AV, Li R, et al. Collagen denaturation in the infarcted myocardium involves temporally distinct effects of MT1-MMP-dependent proteolysis and mechanical tension[J]. *Matrix Bio*, 2021, 99: 18-42.
- [28] Lee H, Sodek KL, Hwang Q, et al. Phagocytosis of collagen by fibroblasts and invasive cancer cells is mediated by MT1-MMP[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35 (Pt 4): 704-706.
- [29] Huang Z, Shi X, Li X, et al. Network pharmacology approach to uncover the mechanism governing the effect of simiao powder on knee osteoarthritis[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6971503.
- [30] Rhee J, Park SH, Kim SK, et al. Inhibition of BATF/JUN transcriptional activity protects against osteoarthritic cartilage destruction[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76 (2): 427-434.
- [31] Macer-Wright JL, Stanley NR, Portman N, et al. A role for chlorinated nucleosides in the perturbation of macrophage function and promotion of inflammation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32 (6): 1223-1234.
- [32] Lei C, Lin R, Wang J, et al. Amelioration of amyloid β -induced retinal inflammatory responses by a LXR agonist TO901317 is associated with inhibition of the NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome [J]. *Neuroscience*, 2017, 360: 48-60.
- [33] Wang W, Nakashima KI, Hirai T, et al. Anti-inflammatory effects of naturally occurring retinoid X receptor agonists isolated from *Sophora tonkinensis* Gagnep. via retinoid X receptor/liver X receptor heterodimers [J]. *J Nat Med*, 2019, 73 (2): 419-430.
- [34] Suolang PC, Liu BQ, Chen J, et al. Protective effect and mechanism of Qiwei Tiexie capsule on 3 T3-L1 adipocytes cells and rats with nonalcoholic fatty liver disease by regulating LXR α , PPAR γ , and NF- κ B-iNOS-NO signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 236: 316-325.
- [35] Shavva VS, Mogilenko DA, Nekrasova EV, et al. Tumor necrosis factor α stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF- κ B, and nuclear receptors PPAR α and LXRs [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 448 (1-2): 211-223.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Chen T, Zhang X, Zhu G, et al. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF-kB and AP-1 signaling pathway *in vitro* [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (38): e22241.
- [39] Zhang Z, Zhai L, Lu J, et al. Shen-Hong-Tong-Luo formula attenuates macrophage inflammation and lipid accumulation through the activation of the PPAR- γ /LXR- α /ABCA1 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3426925.

(收稿: 2022-10-12 在线: 2023-11-29)

责任编辑: 汤 静