

· 基础研究 ·

独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响赵文婷^{1,2} 朱兴旺¹ 宣亚男¹ 赵晓峰¹ 肖长虹^{1,2} 陈恩生¹

摘要 目的 观察独活寄生汤 (DHJSD) 对膝骨关节炎 (KOA) 模型大鼠中 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路相关蛋白表达的影响, 探讨 DHJSD 治疗骨关节炎 (OA) 的机制。**方法** 选取 32 只 SD 大鼠, 按随机数字表法分为 DHJS 组、模型 (M) 组、硫酸氨基葡萄糖 (GS) 组和正常 (NC) 组。除 NC 组外, 其余 3 组予双膝关节腔内注射 0.2 mL 4% 木瓜蛋白酶法建立 KOA 模型。造模后 DHJS 组予 DHJSD 灌胃, GS 组予 GS 灌胃, NC、M 组给予等体积纯净水灌胃。连续给药 8 周后进行双膝关节 X 线扫描, 观察大鼠膝关节影像学变化并评分, ELISA 法检测血清基质金属蛋白酶-13 (MMP-13)、白介素-1 β (IL-1 β) 含量, HE 染色、番红 O 固绿染色法观察膝关节软骨病理改变并进行 Mankin 评分, 采用实时聚合酶链式反应 (RT-PCR)、蛋白免疫印迹 (Western Blot) 及免疫组化法检测软骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组比较, M 组大鼠膝关节间隙狭窄, 软骨层损耗, X 线评分、Mankin 评分升高 ($P < 0.05$), DHJS 组和 GC 组上述改变减轻, X 线评分及 Mankin 评分下降 ($P < 0.05$); DHJS 组血清及软骨 MMP-13 含量减少 ($P < 0.05$); 下调软骨 β -catenin、Wnt3a mRNA 水平以及 β -catenin、IL-1 β 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 上调骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。**结论** DHJSD 能通过下调 Wnt3a/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达水平, 抑制 MMP-13 表达、促进 BMP-2 表达, 从而改善大鼠 KOA 的影像学及病理学改变, 发挥软骨保护作用。

关键词 骨关节炎; 独活寄生汤; Wnt/ β -catenin 信号通路; 软骨退变

Effect of Duhuo Jisheng Decoction on Wnt3a/ β -catenin Pathway Related Protein Expression Levels in Knee Osteoarthritis Model Rats ZHAO Wen-ting^{1,2}, ZHU Xing-wang¹, XUAN Ya-nan¹, ZHAO Xiao-feng¹, XIAO Chang-hong^{1,2}, and CHEN En-sheng¹ 1 Department of Rheumatology, Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510315); 2 School of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Duhuo Jisheng Decoction (DHJSD) on the expressions of Wnt/ β -catenin pathway related proteins in knee osteoarthritis (KOA) rat model, and to explore its mechanism for osteoarthritis (OA). **Methods** Totally 32 SD rats were divided into DHJS group, model (M) group, Glucosamine Sulfate (GS) group, and normal control (NC) group according to random number table. Except the NC group, rats in the rest of 3 groups were injected papain (0.2 mL 4%) into bilateral knee joint cavity to establish KOA model. After the KOA modeling rats in DHJS group were intragastrically administered with DHJSD. Rats in GS group were intragastrically administered with GS. Equal volume of purified water was given to rats in NC group and M group by gastrogavage. After 8 weeks continuously administration, the imaging changes of the rats were observed and scored by double knee X-ray scan. Serum levels of matrix metalloprotein (MMP-13) and IL-

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (No. 2020A1515011111); 全国中医临床特色技术传承骨干人才培养项目 [No. 国中医药人教函 (2019) 36 号]; 南方医科大学科研启动计划项目 (No. PY2017N032)

作者单位: 1. 南方医科大学中西医结合医院风湿病科 (广州 510315); 2. 南方医科大学中医药学院 (广州 510515)

通讯作者: 陈恩生, Tel: 020-61650194, E-mail: chenensheng1@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210416. 142

1 β were detected by ELISA. HE staining and safranin O staining were used to observe the pathological changes of articular cartilage of knee and to score by Markin. Real-time PCR, Western Blot, and immunohistochemical method were used to detect mRNA and protein expression levels of related proteins of Wnt/ β -catenin signal pathway in cartilage tissues. **Results** Compared with the NC group, rats in the M group had narrow knee space, cartilage layer loss, and increased X-ray score and Mankin score ($P<0.05$). Compared with the M group, the above changes were relieved, and X-ray score and Mankin score decreased in the DHJS group and GC group ($P<0.05$). Serum and cartilage MMP-13 contents decreased in the DHJS group ($P<0.05$). mRNA levels of β -catenin and Wnt3a in cartilage, and protein expressions of β -catenin and IL-1 β in cartilage were down-regulated ($P<0.05$). mRNA and protein expression levels of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) were also up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** DHJSD inhibited the expression of MMP-13 and promoted the expression of BMP-2 possibly by down-regulating Wnt3a/ β -catenin pathway related protein expression levels, thus improving the imaging and pathological changes of KOA rats, and playing a role of cartilage protection.

KEYWORDS osteoarthritis; Duhuo Jisheng Decoction; Wnt/ β -catenin signal pathway; cartilage degradation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是以关节软骨进行性退变为主、继发关节边缘骨赘和滑膜慢性炎症为特征的关节疾病。研究表明, Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 是 OA 发病机制中的关键信号通路, 该通路异常可导致软骨下骨和软骨的细胞表型和分子功能失衡、细胞外基质合成障碍, 还能影响软骨细胞正常代谢, 在 OA 的发病过程中发挥重要作用^[1]。目前针对 OA 无特效治疗药物, 常用的西药仅能在一定程度上减轻疼痛症状、减轻炎症反应, 却无明显软骨保护作用、不能阻止 OA 的病情进展。

骨关节炎属于中医学“骨痹”的范畴, 中药复方多成分、多通路、多靶点的作用对治疗 OA 具有明显的优势和潜力^[2]。独活寄生汤 (Duhuo Jisheng Decoction, DHJSD) 出自《备急千金要方》, 是临床治疗“骨痹”的经典方剂。但针对该方的研究大多停留在疗效评价上, 对其机制研究较少, 特别是该方是否调控 Wnt/ β -catenin 信号通路知之甚少。本实验通过观察 DHJSD 干预膝骨关节炎 (keen osteoarthritis, KOA) 大鼠模型, 探讨其调控 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥软骨保护作用, 为 DHJSD 防治 OA 提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 32 只, 雌性, 体重 (200 ± 20) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物合格证: SCXK (粤) 2016-0041, 并饲养于南方医科大学实验动物中心 SPF 级动物房。动物喂养条件为: 温度 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 (55 ± 2) %, 每日光照/黑暗各 12 h, 自由进食、饮水, 饲料由南方医科大学实验动物中心生产。适应性喂养 1 周。实验单位使用

许可证: SYXK (粤) 2016-0167。本实验经南方医科大学实验动物伦理委员会批准 (No. L2018172)。

2 药物 DHJSD 由独活 20 g 桑寄生 15 g 牛膝 15 g 杜仲 10 g 党参 10 g 茯苓 10 g 当归 10 g 芍药 10 g 桂枝 5 g 防风 5 g 川芎 5 g 熟地 10 g 细辛 3 g 秦艽 5 g 甘草 5 g 组成, 药材由南方医科大学中西医结合医院中药房提供, 纯净水煎煮 2 次后浓缩为含生药 2 g/mL。硫酸氨基葡萄糖胶囊 (glucosamine sulfate, GS; 每粒 0.25 g, 浙江海正药业股份有限公司, 生产批号: H20041316), 将药片溶于纯净水中制成含药浓度 18 mg/mL 悬液。

3 主要试剂及仪器 基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloprotein, MMP-13)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (SEA099Ra, SEA563Ra) 均购自武汉云克隆公司; 兔抗 β -catenin (ab6671), 兔抗 MMP-13 (ab219620)、兔抗 IL-1 β (ab2105)、兔抗骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2; ab6285)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β ; ab65740), 均购自美国 Abcam 有限公司; Zoletil 50 麻醉剂 (法国 Virbac 公司, 批号: 46C4)。医用诊断 X 射线机 (PLD8600, 珠海普利德医疗设备有限公司), 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

4 方法

4.1 动物分组及造模方法 32 只大鼠采用随机数字法表分为正常 (NC) 组、模型 (M) 组、GS 组、DHJS 组, 每组 8 只。NC 组不做任何处理, M、DHJS、GS 组在 1、4、7 天, Zoletil 50 麻醉剂按

50 mg/kg 肌内注射对大鼠进行麻醉后,参照何强等^[3]方法进行 KOA 造模:屈膝,在双膝关节内侧髌韧带凹陷处,注射 0.2 mL 4% 木瓜蛋白酶到膝关节腔制备 KOA 动物模型。造模成功^[4]后,根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”进行换算^[5]:人给药剂量 (mg/kg) $\times 0.47$ (大鼠体表面积比) / 0.08 (人体表面积比) = 再给药剂量 (mg/kg)。DHJS 组给予 21 g/(kg·d) DHJSD 浓缩液、GS 组给予 0.176 g/(kg·d) GS 混悬液作为阳性对照、NC 组及 M 组予以等体积纯净水灌胃,连续给药 8 周。

4.2 双膝关节 X 线扫描 连续给药 8 周后, Zoletil 50 麻醉剂按 50 mg/kg 肌内注射对大鼠进行麻醉,俯卧位摆放,双下肢外展固定,使用 X 线成像系统进行扫描 (参数设置: 65 kV, 250 mA, 2.87 mA, 9.98 mS)。观察评估关节间隙、关节面平整度、骨赘形成等。并参照 Kellgren-Lawrence 分级标准^[6]进行 X 线评分, 0 分: 正常; 1 分: 关节间隙可疑变窄, 可能有骨赘; 2 分: 有明显骨赘, 关节间隙可疑变窄; 3 分: 中等量骨赘, 关节间隙变窄较明显, 有硬化性改变; 4 分: 大量骨赘, 关节间隙明显变窄, 严重硬化性病变及明显畸形。

4.3 血清 MMP-13、IL-1 β ELISA 检测 腹主动脉采血法, 3 500 r/min 分离血清, 4℃ 冷藏备用。按照 ELISA 试剂盒操作说明操作, 测量 OD₄₅₀ 值, 绘制标准曲线, 计算每个样本的浓度。

4.4 组织学检测 获取左膝关节, 经 4% 多聚甲醛固定 12 h, EDTA 脱钙液 (慢脱) 脱钙处理 8 周后脱水进行石蜡包埋, 切成 5 μ m 切片, 进行 HE 染色和番红 O 固绿染色, 显微镜下观察 HE 和番红 O 固绿染色结果, 根据 Mankin 法^[7]进行评分: 0 分: 软骨结构正常, 软骨细胞数量正常, 基质染色正常, 潮线比较完整; 1 分: 软骨表面有不规则裂隙, 软骨细胞数量弥漫性增多, 基质染色减退。出现多重潮线;

2 分: 软骨裂隙达肌层, 软骨细胞成簇状生长, 基质染色明显减退, 软骨下血管浸入肌层; 3 分: 软骨裂隙深达辐射层, 软骨细胞数量明显减少, 基质染色明显减退; 4 分: 软骨裂隙深达钙化层, 基质染色完全消失; 5 分: 软骨层脱落。评分越高说明软骨破坏越严重。

4.5 免疫组化法检测关节软骨组织 MMP-13、IL-1 β 、BMP-2 表达 获取左膝关节切片, 进行免疫组化: 烤片、脱蜡、抗原修复、过氧化氢封闭内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗 (兔抗鼠) 孵育、二抗 (羊抗兔) 孵育、DAB 显色、苏木素复染、脱水封片, 根据阳性细胞的比率和染色强度进行评分^[8]: 按阳性细胞比例将无、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100% 分别计为 0~4 分, 按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0~3 分, 最后将两部分得分相乘为总评分, 选取 5 个视野, 取均值。

4.6 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测软骨组织中 β -catenin、BMP-2 表达 获取右膝关节软骨, 组织裂解法提蛋白后, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 根据测定结果调整所有蛋白样本为相同浓度后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶 80 V 30 min, 分离胶 100 V 60 min, 恒流转模 350 mA 2h, 5% 的脱脂奶粉封闭 h, 加入预先按照说明书稀释好的一抗 (兔抗鼠), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 室温孵育对应二抗 (羊抗兔) 2 h, 洗膜 3 次, ECL 显色曝光后用 Image J 进行条带分析。内参蛋白为 β -actin。

4.7 实时聚合酶链式反应 (real-time PCR, RT-PCR) 检测 Wnt/ β -catenin 相关基因表达水平 提取大鼠关节软骨总 RNA, 反转录后, 选用 β -actin 作为内参, 检测软骨组织中 Wnt3a、 β -catenin、BMP-2、GSK-3 β mRNA 表达情况。扩增条件为: 95℃ 预变形 3 min, 95℃ 溶解 7 s, 55℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s, 共 45 循环。每个样本做 3 个平行复孔。通过扩增曲线得出 Ct 值。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量

表 1 RT-PCR 引物序列

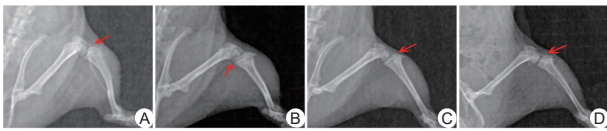
引物名称	引物序列	引物长度 (bp)
GSK-3 β	上游: 5' - CAATCGCACTGTGTAGCCGTCTC-3' 下游: 5' - GGTGTGTCTCGCCCATTTGGTAG-3'	138
BMP-2	上游: 5' - AAGCGTCAAGCCAAACACAAACAG-3' 下游: 5' - CCAGTCATTCCACCCACATCAC-3'	151
Wnt3a	上游: 5' - ACCATGTTCTGGGACCTATTCCA-3' 下游: 5' - GCCTGTAGCATCTCGCTTCCA-3'	180
β -actin	上游: 5' - GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' 下游: 5' - GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	135
β -catenin	上游: 5' - GGAAATCGTGCGTGACATTA-3' 下游: 5' - GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'	109

分析, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{给药组} - \Delta Ct_{对照组}$, NC 组数值设为 1。引物由上海生工公司合成, 引物序列见表 1。

4.8 统计学方法 数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行正态性检验和方差齐性分析, 多组比较采用方差分析, 组间比较采用 *LSD-t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠膝关节 X 线情况比较 (图 1, 表 2) NC 组大鼠关节间隙正常, 关节面清晰、光滑, 无骨赘形成。与 NC 组比较, M 组关节间隙明显变窄, 关节面模糊, 部分有融合及骨赘形成, X 线评分升高 ($P < 0.01$)。与 M 组比较, GS、DHJS 组治疗后, 大鼠关节间隙增宽, 关节面较清晰, 骨赘减少, X 线评



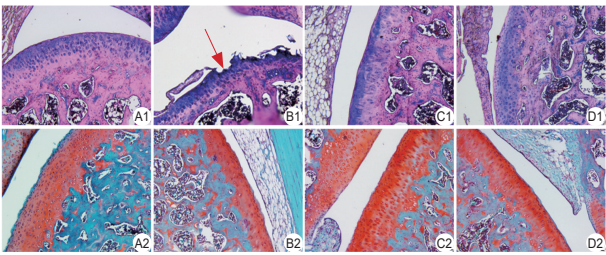
注: A 为 NC 组; B 为 M 组; C 为 GS 组; D 为 DHJS 组; 箭头所指为膝关节

图 1 4 组大鼠膝关节 X 线情况比较

分降低 ($P < 0.05$)。

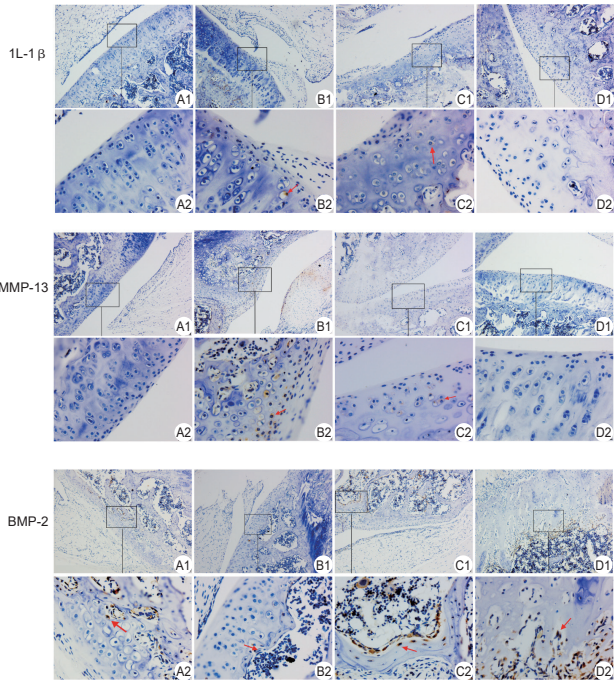
2 各组大鼠血清 MMP-13、IL-1 β 含量比较 (表 2) 与 NC 组比较, M 组大鼠血清 MMP-13 含量升高 ($P < 0.05$), DHJS、GS 组大鼠血清 MMP-13 含量降低 ($P < 0.05$)。4 组大鼠血清 IL-1 β 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组大鼠膝关节组织学结果比较 (图 2, 表 2) NC 组软骨与软骨下骨界限清楚, 潮线清晰, 软骨表面光滑; 与 NC 组比较, M 组软骨表面膜样结构破坏, 软骨层明显变薄, 甚至软骨层出现裂隙样破坏, Mankin 评分升高 ($P < 0.01$)。DHJS、GS 组治疗后可以减缓软骨破坏进程, 软骨层变薄改善, 软骨表面较光滑, Mankin 评分较 M 组降低 ($P < 0.05$)。



注: A1、A2 为 NC 组; B1、B2 为 M 组; C1、C2 为 GS 组; D1、D2 为 DHJS 组; A1~D1 为 HE 染色, A2~D2 为番红 O 固绿染色; 箭头所指为软骨破坏处

图 2 4 组大鼠膝关节组织病理学结果 ($\times 100$)



注: A 为 NC 组; B 为 M 组; C 为 GS 组; D 为 DHJS 组; A1、B1、C1、D1 ($\times 100$); A2、B2、C2、D2 ($\times 400$); 箭头所指为阳性细胞

图 3 4 组大鼠膝关节组织免疫组化结果

4 各组大鼠免疫组化结果比较 (图 3, 表 3) 与 NC 组比较, M 组膝关节软骨细胞的 MMP-13、IL-1 β 表达增加 ($P < 0.01$), BMP-2 表达减少 ($P < 0.05$)。与 M 组比较, GS、DHJS 组治疗后, OA 大鼠软骨细胞 MMP-13 表达减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), BMP-2 表达均增加 ($P < 0.05$)。DHJS 组还可抑制 OA 大鼠

表 2 4 组大鼠血清 MMP-13、IL-1 β 含量、X 线评分及 Mankin 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-13 (ng/mL)	IL-1 β (pg/mL)	X 线评分	Mankin 评分
				(分)	(分)
NC	8	28.46 $\pm$ 5.08	32.7 $\pm$ 0.55	0	0
M	8	53.25 $\pm$ 5.51*	34.05 $\pm$ 1.09	5.15 $\pm$ 1.13**	5.63 $\pm$ 0.92**
GS	8	41.03 $\pm$ 3.74 Δ	33.23 $\pm$ 0.51	2.25 $\pm$ 0.51 Δ	3.00 $\pm$ 1.06 Δ
DHJS	8	39.99 $\pm$ 2.89 Δ	32.69 $\pm$ 0.36	2.34 $\pm$ 0.36 Δ	3.13 $\pm$ 0.64 Δ

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 4 组大鼠膝关节免疫组化评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	MMP-13	BMP-2
NC	8	0.13 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.16	3.75 $\pm$ 0.41
M	8	2.25 $\pm$ 0.31**	4.13 $\pm$ 0.85**	1.38 $\pm$ 0.18*
GS	8	1.75 $\pm$ 0.41	2.00 $\pm$ 0.27 Δ	4.38 $\pm$ 0.50 Δ
DHJS	8	0.75 $\pm$ 0.25 Δ	1.13 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$	5.37 $\pm$ 0.92 Δ

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

软骨细胞 IL-1 β 表达 ($P < 0.05$)。

5 各组大鼠软骨组织 RT-PCR 结果比较 (表 4) 与 NC 组比较, M 组大鼠软骨组织 Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达增加 ($P < 0.01$), GSK-3 β 、BMP-2 mRNA 表达减少 ($P < 0.05$)。与 M 组比较, DHJS 组治疗后软骨组织 Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达下降 ($P < 0.01$), BMP-2、GSK-3 β mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); GS 组 BMP-2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

6 各组大鼠软骨组织 Western Blot 结果比较 (图 4) 与 NC 组比较, M 组大鼠软骨组织 β -catenin 表达增加 ($P < 0.05$), BMP-2 表达减少 ($P < 0.05$); DHJS 组治疗后能减少 β -catenin 表达 ($P < 0.05$), DHJS、GS 组均能促进 BMP-2 表达 ($P < 0.05$)。

讨 论

DHJS 为唐代著名医药学家孙思邈所创,是临床治疗 OA、骨质疏松症等疾病,辨证为肝肾亏虚、风寒湿痹证的常用经方,临床疗效确切^[9]。现代研究表明该方具有减轻关节软骨退行性病变、促进关节软

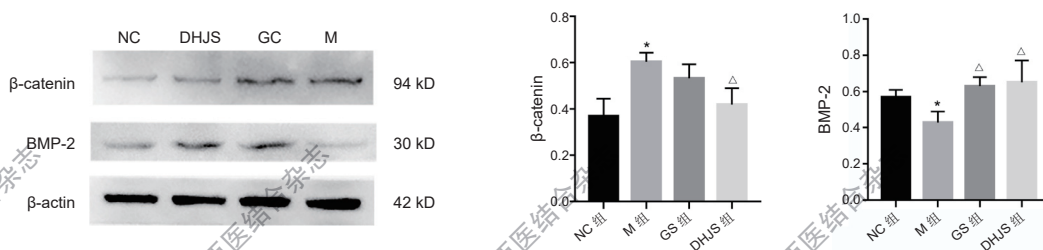
骨再生等作用^[10]。有研究表明, DHJS 可能通过调控 toll 样受体 4 (toll-like receptor, TLR4) / 核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路^[11], 减少 OA 患者关节液中 MMP-1、MMP-13 等分泌^[12], 对软骨基质有保护作用; 还可能通过调节蛋白激酶 R 样内质网激酶 [protein kinase R (PKR) - like endoplasmic reticulum kinase, PERK] / 免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein in ore-B cell, Bip) 通路抑制内质网的应激反应减少关节软骨细胞的凋亡^[13]。Wnt/ β -catenin 作为目前 OA 发病机制中最经典且研究较为透彻的信号通路,其能影响关节软骨基质的形成和分解,在 OA 的发病机制中发挥重要的作用^[14]。但目前关于 DHJS 是否通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路在 OA 中发挥软骨保护的研究仍较少。

Wnt 基因是以果蝇无翅基因 (Wingless) 和小鼠同源原癌基因 (Int-1) 合并命名的。Wnt 信号通路分为“经典”和“非经典”信号通路两种,通过 GSK-3 β 抑制 β -catenin 磷酸化并使其降解的称为经典信号通路 (如 Wnt1、3、8), 即 Wnt/ β -catenin 信号通路,而不影响 β -catenin 水平的就称为非经典信号通路 (如 Wnt 4、5、11)^[15]。Wnt/ β -catenin 通路激活后,使 GSK-3 β 活性被抑制,导致 β -catenin 不能被磷酸化降解,不断累积入核进而激活下游靶基因的表达,例如 MMP-13、IL-1 β 等,从而诱发关节软骨炎症,软骨基质退变,最终形成骨关节炎^[1, 16]。其中 Wnt 3a 是该通路的起始激活分子,在 OA 的发病过程中发挥着重要作用; β -catenin 处于关键位

表 4 4 组大鼠软骨组织 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、BMP-2 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt3a mRNA	β -catenin mRNA	GSK-3 β mRNA	BMP-2 mRNA
NC	4	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.14
M	4	3.26 $\pm$ 1.03**	5.10 $\pm$ 1.26**	0.76 $\pm$ 0.12*	0.56 $\pm$ 0.34*
GS	4	2.85 $\pm$ 0.67	4.13 $\pm$ 0.67	0.96 $\pm$ 0.17	1.15 $\pm$ 0.29 Δ
DHJS	4	1.43 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$	1.78 $\pm$ 0.52 $\Delta\Delta$	1.13 $\pm$ 0.18 Δ	1.23 $\pm$ 0.19 Δ

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$;与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 4 4 组大鼠软骨组织 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、BMP-2 蛋白表达比较

置,是该信号通路激活的标志。MMP-13 是一种主要存在于软骨细胞的酶,不仅能降解软骨中的 II 型胶原,还可以降解蛋白多糖、IV 型和 IX 型胶原、骨胶等^[17]。

本实验结果表明,经木瓜蛋白酶注射后,关节 X 线显示 M 组关节间隙变窄,关节面毛糙,组织病理可见软骨层变薄、软骨表面缺损破坏,表明本实验 OA 造模成功。经 DHJSD、GS 干预后,上述影像学及组织学变化均有改善,提示 DHJSD、GS 能改善 OA 软骨退变,具有治疗 OA 的作用。并且, M 组大鼠软骨中 Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达水平和 β -catenin 蛋白水平、血清和软骨中 MMP-13 含量较 NC 组均有升高,进一步验证了 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活参与了 OA 的发生与发展,并通过促进 MMP-13 的释放,对软骨造成破坏。通过 DHJSD 干预后,大鼠关节软骨中 Wnt3a mRNA 表达及 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达水平下降, GSK-3 β mRNA 表达上升,血清及软骨中 MMP-13 含量降低,同时在影像学、组织学上表现出软骨退变改变较 M 组减轻;而 GS 治疗后血清及软骨中 MMP-13 含量虽亦有下降,但下降程度不及 DHJS 组,且对 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 等信号分子的表达无影响。这就表明 DHJSD 可以通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 MMP-13 的表达,从而减轻软骨层破坏,保护关节软骨、延缓 OA 病程;而 GS 未参与调控该信号通路。

BMP 在软骨细胞生物学中起着重要作用, BMP-2 可以诱导细胞外基质的产生和诱导软骨细胞成熟^[18]。在小鼠膝关节内注射 BMP-2 或使用腺病毒过表达 BMP-2 可使软骨内蛋白多糖的合成增加^[19,20]。本实验发现, DHJS 组较 GS 组软骨 BMP-2 mRNA 及蛋白表达均有升高,揭示 DHJSD、GS 均能通过上调软骨中 BMP-2 含量,促进软骨、软骨下骨生长分化,间接抑制软骨细胞退变,从而达到治疗 OA 的作用。

炎症介质在 OA 发病中也发挥着重要的作用。IL-1 β 是关节炎的主要驱动因子,可促进各种降解酶的合成与分泌,导致软骨的损伤^[21]。本实验结果显示,4 组大鼠血清 IL-1 β 含量未见差异, M 组软骨中 IL-1 β 含量虽有增加,但程度不高,提示 IL-1 β 可能在本模型关节软骨损伤过程中未起到关键作用,这与刘洪彦等^[22]研究结果一致;经 DHJSD 干预后,软骨中 IL-1 β 含量仍有所下降,表明 DHJSD 同样具有抗炎作用。

综上所述,本实验研究揭示 DHJSD 可通过下调

软骨 Wnt/ β -catenin 信号通路,降低软骨中 MMP 的表达,刺激 BMP-2 的分泌,抑制软骨基质的降解,发挥软骨保护作用。这对延缓 OA 软骨退变的进程,对开发中医药防治 OA 具有重要意义。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Zhou Y, Wang T, Hamilton JL, et al. Wnt/ β -catenin signaling in osteoarthritis and in other forms of arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19 (9): 53.
- [2] 张璐瑶,刘维. 中药治疗骨关节炎作用机制的研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26 (12): 1901-1904.
- [3] 何强,尹宏,代凤雷,等. 早期膝骨性关节炎模型大鼠的建立与验证 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23 (27): 4338-4343.
- [4] 吴强,郑倩华,蒋一璐,等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29 (5): 125-130.
- [5] Nianhu L, Lei X, Sheng Y, et al. Effect of Bushen Huoxue Formula on interleukin-1 beta and discoidin domain receptor 2 levels in a rat model of osteoarthritis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 35 (2): 192-196.
- [6] Teeple E, Elsaid KA, Jay GD, et al. Effects of supplemental intra-articular lubricin and hyaluronic acid on the progression of posttraumatic arthritis in the anterior cruciate ligament-deficient rat knee [J]. *Am J Sports Med*, 2011, 39 (1): 164-172.
- [7] Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, et al. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18 (Suppl 3): S24-S34.
- [8] Jurmeister P, Bockmayr M, Treese C, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, nuclear S100A4, MITF and Ki67 for risk stratification of early-stage melanoma-A combined IHC score for melanoma risk stratification [J]. *Deutsche Dermatologische Gesellschaft*, 2019, 17 (8): 800-808.
- [9] 雷露,朱明海. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎随机对照临床文献的 Meta 分析 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5 (1): 25-28.

- [10] 郑文伟, 翁霞萍, 黄绥心, 等. 独活寄生汤对骨关节炎软骨退变的影响及其作用机制 [J]. 中医正骨, 2017, 29 (7): 5-11.
- [11] 吴广文, 邱建清, 刘淑如, 等. 独活寄生汤含药血清对大鼠退变软骨细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15 (11): 28-32.
- [12] 韦祎, 梁薇, 刘胜, 等. 独活寄生汤治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎患者疗效及对血清、关节液中 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35 (3): 171-174.
- [13] 赵林灿, 李薇薇, 吴毅明, 等. 独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 PERK/Bip 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (9): 18-24.
- [14] 唐芳, 马武开, 姚血明. Wnt/ β -catenin 信号通路与骨关节炎 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3 (2): 70-73.
- [15] 赵晋, 闫振宇, 张立智. 骨性关节炎软骨和软骨下骨之间信号通路 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2016, 9 (2): 193-198.
- [16] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. Cell, 2012, 149 (6): 1192-1205.
- [17] Wang M, Sampson ER, Jin H, et al. MMP-13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15 (1): R5.
- [18] Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis [J]. Cells, 2019, 8 (9): 148-150.
- [19] van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, et al. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 1998, 6 (5): 306-317.
- [20] Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Lent PLEM, et al. Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9 (5): R102.
- [21] Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 44: 38-50.
- [22] 刘洪彦, 郑毅. 兔骨关节炎模型中 Wnt/ β -catenin 信号通路研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4 (9): 5-8.

(收稿: 2020-10-13 在线: 2021-05-26)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2020 年 SCI 影响因子为 1.978

2021 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2020 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.978。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2020 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!