“杜仲-当归”介导 Wnt/β-catenin 信号转导调控 MMP-13 表达防治关节炎的作用机制研究

陈强，索岩，林楠*(浙江省人民医院，杭州医学院附属人民医院，杭州 310014)

摘要：目的 研究“杜仲-当归”介导 Wnt/β-catenin 信号转导调控 MMP13 表达防治骨性关节炎(osteoarthritis，OA)的作用机制。**方法** 取 SD 大鼠，随机分为 Sham 组、OA 组、OA+补肾组(杜仲 40 mg·kg^{-1})、OA+活血组(当归 40 mg·kg^{-1})、OA+补肾活血组(杜仲-当归药液 40 mg·kg^{-1})、OA+阳性药物组(西乐葆 10 mg·kg^{-1}+奥泰灵 1.2 mg·kg^{-1})共 6 组。OA 模型制备成功后，各组大鼠给予对应药物治疗，连续给药 8 周。番红 O 染色检测软骨组织变化，免疫组织化学检测软骨组织中 MMP-13 表达，ELISA 检测大鼠血清 IL-6、IL-8 含量，Western blotting 检测软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、β-catenin 蛋白表达。分离正常 SD 大鼠软骨细胞，IL-1β(10 ng·mL^{-1})干预诱导体外 OA 炎症模型并进行药物干预。番红 O 染色检测软骨细胞表型变化，ELISA 检测软骨细胞 IL-6、IL-8 含量，免疫荧光染色检测软骨细胞 β-catenin 表达，qRT-PCR 检测软骨细胞中 IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的 mRNA 表达，Western blotting 检测软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、β-catenin 蛋白表达。**结果** 药物处理对 OA 导致的软骨组织损伤有不同程度的修复作用；杜仲-当归可下调血清中 IL-6、IL-8 水平，下调软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、β-catenin 的蛋白表达。与 IL-1β组相比，杜仲-当归可提高软骨细胞存活率，改善细胞形态，下调软骨细胞 IL-6、IL-8 水平，降低软骨细胞中β-catenin 荧光强度，并下调软骨细胞中 IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9、MMP-13 的 mRNA 表达和 MMP-3、MMP-9、MMP-13、β-catenin 的蛋白表达。**结论** 体内、体外试验表明补肾活血中药“杜仲-当归”可以通过促进软骨细胞增殖、调控炎症因子水平、改善软骨基质降解、改善软骨病理损伤起到对 OA 的防治作用，且作用机制可能与介导 Wnt/β-catenin 信号转导调控 MMP-13 表达有关。

关键词：骨性关节炎；软骨细胞；杜仲-当归；基质金属蛋白酶；Wnt/β-catenin 信号

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)07-0775-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.002

引用本文：陈强，索岩，林楠. “杜仲-当归”介导 Wnt/β-catenin 信号转导调控 MMP-13 表达防治关节炎的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 775-783.

“Eucommia Ulmoides-Angelica Sinensis” Ameliorate Osteoarthritis Through the Regulation of MMP-13 Via Wnt/β-catenin Signaling

CHEN Qiang, SUO Yan, LIN Nan*(*Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the mechanism of “*Eucommia ulmoides*(EU)-*Angelica sinensis*(AS)” mediated Wnt/β-catenin signal in regulating the expression of MMP13 in the prevention and treatment of osteoarthritis(OA). **METHODS** SD rats were randomly divided into six groups: sham group, OA group, OA+kidney tonifying group(EU 40 mg·kg^{-1}), OA+blood activating group(AS 40 mg·kg^{-1}), OA+kidney tonifying and blood activating group(EU-AS solution 40 mg·kg^{-1}), OA+positive conrol group(celebrex 10 mg·kg^{-1}+otailn 1.2 mg·kg^{-1}), after inducing of OA model, rats in each group were administrated for 8 weeks. Safranin O(SO) staining was then used to evaluate the injury of cartilage, expression of MMP-13 in cartilage was detected by immunohistochemical levels of IL-6 and IL-8 in rats serum were detected by ELISA, the expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin in cartilage was analyzed by Western blotting. The chondrocyte isolated from normal SD rats were incubated with IL-1β(10 ng·mL^{-1}) to induce inflammation model of OA. SO staining was used to detect the phenotype of chondrocytes, levels of IL-6 and IL-8 in chondrocytes were detected by ELISA, β-catenin expression in chondrocytes was detected by using immunofluorescence staining, mRNA expression of IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in chondrocytes was analyzed by qRT-PCR, protein expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin in chondrocytes was analyzed by Western blotting. **RESULTS** There were different degrees of repair of cartilage injury in the administration groups, the levels of IL-6 and IL-8 in serum, the expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin in cartilage tissues were also down-regulated. Compared with IL-1β group, EU-AS could improve chondrocyte cell survival rate, improve cell morphology, reduce the levels of IL-6 and IL-8 in chondrocytes, reduce the fluorescence intensity of β-catenin in chondrocytes, down regulate the mRNA expression of IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in chondrocytes and the protein expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin. **CONCLUSION** EU-AS, a traditional Chinese medicine for invigorating the kidney and promoting blood circulation, can ameliorate OA by promoting the chondrocyte proliferation, regulating the level of inflammatory

基金项目：浙江省医药卫生科技项目(2019KY025)；浙江省中医药科技管理一般项目(2019ZA008)

作者简介：陈强，男，硕士，副主任医师　Tel: 13588760185　E-mail: chenqiang888@hotmail.com　***通信作者：**林楠，女，硕士，主治医师　Tel: 18758082720　E-mail: linnan_010@163.com

factors, inhibiting cartilage matrix degradation and cartilage pathological damage, and the mechanism may be related to the regulation of MMP-13 expression by Wnt/β-catenin signal transduction.
KEYWORDS: osteoarthritis; chondrocyte; *Eucommia ulmoides-Angelica sinensis*; matrix metallo proteinase; Wnt/β-catenin signaling

骨性关节炎(osteoarthritis，OA)是一种以关节软骨的退行性病变和继发性骨质增生为主要病变的慢性关节疾病，为骨科常见多发病，其患病率随着年龄增大而增加，且往往病人就诊时已发展为中、晚期，严重影响其正常工作及生活[1-2]。骨性关节炎的发病机制较为复杂，目前较为主流的是基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinase，MMP)降解学说。研究表明在 OA 的病理过程中，关节滑膜细胞及软骨细胞分泌过量的 MMP，打破了金属蛋白酶及其抑制剂的平衡，且在炎性因子的共同作用下，关节软骨抗应力降低，软骨细胞发生凋亡，细胞外基质成分游离出软骨，最终造成软骨破坏[3-5]。研究证实，Wnt/β-catenin 信号通路与 MMP 表达、细胞基质合成、骨细胞的分化、增殖及凋亡过程密切相关，而这些过程在 OA 起病和进展过程中发挥着重要作用[6]。

中医认为骨性关节炎属于“骨痹”范畴，《内经·素问》曰：“肾主骨，生髓”。因此中医学认为肾虚是 OA 发病的根本，气血瘀滞是发病的关键，属“本虚标实”，故多采用补肾活血中药，以补肝肾、强筋骨、补益气血以治其本，祛风散寒胜湿、活血通络止痛以治其标。杜仲补肾壮阳而治肾虚之根本，其入肝肾强筋骨、祛风除湿可用于风湿痹痛、筋骨不利及肢体麻木，临床常与当归同用，当归活血化瘀、祛风止痛并治血瘀之标实，临床上常用其祛风通络止痛之功效来治风湿痹痛之症，故杜仲-当归合用可达标本兼治。因此，本研究选择以补肾活血药对“杜仲-当归”为代表，建立体内、体外 OA 模型，研究其对 OA 防治作用，以探讨补肾活血中药对 OA 的作用机制。

1　材料与方法

1.1　动物

取健康♂SPF 级 SD 大鼠 32 只，(200±20)g，由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供，动物生产许可证号：SCXK(沪)2018-0006。饲养条件：恒温，温度(22±2)℃，湿度 50%~60%，12 h 光照/黑暗的环境明暗交替，换风次数每小时 15~20 次。由浙江中医药大学动物实验研究中心饲养，动物使用许可证号：SYXK(浙)2018-0012。

1.2　试剂与仪器

CCK-8 试剂盒(MCE，货号：HY-K0301)；DMEM 培养基(Hyclone，货号：SH30243.01)；IL-6、IL-8 ELISA 试剂盒、IL-1β(酶免，货号：MM-0190R1，MM-0175R1，MM-0040M1)；番红 O 染液(武汉谷歌生物，货号：G1031)；Anti-MMP3、Anti-MMP9 、Anti-MMP13 、Anti-β-catenin 、Anti-GAPDH、山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 488)抗体(Abcam，货号：ab53015，ab38898，ab39012，ab16051，ab8245，150077)；RIPA 裂解液(碧云天，货号：P0013D)；BCA 蛋白定量试剂盒(Solarbio，货号：pc0020)。CMaxPlus 酶标仪(美国 Molecular Devices)；AE2000 光学显微镜(中国 Motic)；Micro17R 倒置荧光显微镜、BB150 细胞培养箱均购自美国 Thermo Fisher Scientific；RM2235 石蜡切片机(德国 Leica)；EPS300 电泳仪、VE 180C 电泳槽均购自上海天能。

1.3　OA 动物模型制备与药物干预

20 只 SD 大鼠通过膝关节内侧半月板切除手术诱导 OA[7]。戊巴比妥钠(40 mg·kg^{-1})麻醉大鼠，用内侧鞍旁入路打开膝关节。然后，在未造成软骨和韧带损伤的前提下仔细切除内侧半月板。Sham 组打开膝关节后不进行内侧半月板切除。每组 5 只大鼠每日分别给予相应的药物干预，连续 8 周，每日 1 次。OA+补肾组、OA+活血组、OA+补肾活血组、OA+阳性药物组分别给予杜仲 40 mg·kg^{-1}，当归 40 mg·kg^{-1}，杜仲-当归药液 40 mg·kg^{-1}，西乐葆 10 mg·kg^{-1}+奥泰灵 1.2 mg·kg^{-1} 联合用药；Sham 组和 OA 组给予等量的蒸馏水。治疗 8 周后处死大鼠，腹腔取血，3 000 r·min^{-1} 离心取上清后得到血清样本。取软骨组织，4%多聚甲醛溶液固定大鼠软骨组织。

1.4　番红 O 染色检测软骨组织的病理改变

取大鼠软骨组织，5%硝酸甲醛溶液脱钙，脱水机梯度脱水后石蜡包埋切片。软骨组织切片行番红 O 染色，光学显微镜下拍照成像观察软骨组织病理改变。

1.5　大鼠软骨组织免疫组织化学染色

软骨组织切片用 3% H_2O_2 孵育 10 min 以消除

内源性过氧化物酶活性。随后 PBS 冲洗后滴加封闭液(5%BSA)，在湿盒中室温 30 min。用滤纸擦去封闭液后滴加适宜浓度的 MMP-13 一抗(1∶50)，置湿盒中 4 ℃孵育过夜，PBS 冲洗后滴加生物素化二抗工作液，室温置湿盒中孵育 20 min，PBS 冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，室温置湿盒中孵育 20 min，PBS 冲洗 3 次。DAB 显色剂显色，自来水充分冲洗。再进行苏木素复染，脱水，透明，中性树胶封片。切片在 100 倍和 400 倍显微镜下随机选取大鼠软骨组织不重复 6 个视野。

1.6 大鼠血清、软骨细胞中 IL-6、IL-8 含量的测定

参照 ELISA 相关试剂盒说明书检测各组大鼠血清、软骨细胞中 IL-6 与 IL-8 的含量。

1.7 Western blotting 测定大鼠软骨组织或软骨细胞中蛋白

取大鼠软骨组织或软骨细胞，RIPA 裂解液裂解后提取总蛋白，BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。随后，取适量蛋白样品，上 10%SDS-PAGE 浓缩胶电泳，恒压 80 V 电泳 2 h。随后转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭反应后，加入对应一抗(GAPDH，1∶5 000；Anti-MMP3，1∶5 000；Anti-MMP9，1∶1 000；Anti-MMP13，1∶3 000；Anti-β-catenin，0.25 μg·mL^{-1})于 4 ℃孵育过夜，次日加入对应二抗于室温下反应 2 h。ECL 发光显色蛋白条带，Image J 软件对蛋白相对表达进行分析。GAPDH 为内参。

1.8 大鼠软骨细胞分离与药物干预

取 2 只 SD 大鼠，脱颈处死，喷洒 75%酒精后移入超净台，提前备好含有 1%双抗的无菌 PBS。大鼠在无菌条件下切取双侧髋、膝关节后，剪碎至 1 mm^3 大小，PBS 再次漂洗，除去上清液后将软骨组织移入另一培养皿，加入胶原酶II (0.3 U·mL^{-1})，37 ℃消化 4 h。消化后将细胞悬液以 100 μm 细胞筛网过滤，1 000 r·min^{-1} 离心 5 min，弃上清液，分离的软骨细胞在低糖 DMEM 中接种和生长，辅以 10%FBS、100 U·mL^{-1} 青霉素和 100 mg·mL^{-1} 链霉素，37 ℃，5%CO_2。软骨细胞接种于 96 孔板中，与 IL-1β(10 ng·mL^{-1})孵育 24 h 诱导 OA 模型。按以下分组给药，IL-1β+补肾组(杜仲 0.1 mg·mL^{-1})，IL-1β+活血组(当归 0.1 mg·mL^{-1})，IL-1β+补肾活血组(杜仲-当归 0.1 mg·mL^{-1})，IL-1β+阳性药物组(西乐葆 25 μg·mL^{-1} 和奥泰灵 3 μg·mL^{-1} 混合液药液)软骨细胞分别加入杜仲、当归、杜仲-当归、西乐葆和奥泰灵混合液药液进行干预，IL-1β组给予等体积生理盐水；取正常软骨细胞为 Con 组，给予等体积生理盐水，干预时间为 24 h。

1.9 CCK-8 试验检测软骨细胞活性

取对数生长期的大鼠软骨悬液接种于六孔板内，将培养板放在培养箱内预培养 24 h；然后 IL-1β及药物干预 24 h 后，将六孔板中细胞消化离心后，PBS 清洗 1 次，离心后用培养基重悬，加入到 96 孔板中，培养 24 h 后，向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，在培养箱内孵育 24 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A)值，计算细胞存活率，细胞存活率=($A_{\text{实验组}}-A_{\text{空白调零}}$)/($A_{\text{对照组}}-A_{\text{空白调零}}$)×100%。每组细胞平行测定 3 个复孔。

1.10 番红 O 染色检测软骨细胞表型的变化

用不同药物处理 12 孔板中的软骨细胞 24 h 后。细胞用 4%多聚甲醛溶液固定 20 min，然后用 0.1%番红溶液染色 5 min。细胞用 PBS 洗涤 3 次后，在光学显微镜下成像拍照。

1.11 免疫荧光染色

软骨细胞传代至载玻片，加入 PBS 洗 3 次后，加入 4%多聚甲醛固定 10 min，PBS 洗去多余的多聚甲醛后，室温下用 2%BSA 封闭 1 h，而后 4 ℃下加入一抗(β-catenin，1∶500)孵育过夜。次日，给予 PBS 洗 3 次后避光条件下孵育荧光 DAPI 二抗 30 min。吸去多余二抗后加入 DAPI 孵育 5 min，再用 PBS 清洗 3 次后封片，在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.12 qRT-PCR 试验

根据操作说明书用 Trizol 裂解提取软骨细胞总 RNA，随后配制反应体系进行逆转录反应。反应条件：42 ℃，15 min；85 ℃，5 min。再配制反应体系进行实时荧光定量 PCR 反应。反应条件：95 ℃，10 min 变性；95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；40 次循环。qRT-PCR 所用引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	上游引物	下游引物
RAT IL-6	5’-TAGTCCTTCCTACCCCAACTTCC-3’	5’-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3’
RAT IL-8	5’-GCAGAGGGTTGTGGAGAAGT-3’	5’-CTGGTCATGAGTACAACAAACTCAC-3’
RAT MMP-3	5’-GCAGTTGAAGAACATGGAGACTT-3’	5’-TGAGCAGCAACCAGGAATAGG-3’
RAT MMP-9	5’-GTGCCCTGGAACTCACACAAC-3’	5’-CCAGAAGTATTTGTCATGGCAGAA-3’
RAT MMP-13	5’-CCATCCCGAGACCTCATGTT-3’	5’-ATCATAACTCCACACGTGGTTCC-3’
RAT GAPDH	5’-TCACCACCATGGAGAAGGC-3’	5’-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3’

1.13 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。组间两两比较，方差齐性者采用两独立样本 t 检验，方差不齐者采用 Kruskal-Wallis H 检验。

2 结果

2.1 杜仲、当归对 OA 大鼠软骨组织恢复的影响

大鼠软骨组织番红 O 染色切片可看出，Sham 组大鼠软骨组织形态正常，排列紧密，软骨层厚度适宜，无软骨脱失现象，骨小梁结构与形态紧密正常。OA 组大鼠软骨组织破坏严重，出现大面积脱落，关节软骨坏死，半月板广泛脱失，软骨下骨硬化，结构紊乱；与 OA 组相比，各给药组大鼠软骨组织有不同程度的修复，脱落情况有所好转。结果见图 1。

2.2 杜仲、当归对 OA 大鼠软骨组织中 MMP-13 表达的影响

免疫组化结果表明，各组大鼠软骨组织均有 MMP-13 的阳性表达。但与 Sham 组相比，OA 组大鼠软骨组织 MMP-13 阳性表达明显升高。与模型组相比，OA+补肾组、OA+活血组、OA+补肾活血组与 OA+阳性药物组 MMP-13 阳性表达明显降低。结果见图 2。

2.3 OA 大鼠血清中 IL-6 与 IL-8 的含量变化

与 Sham 组比较，OA 组大鼠血清中 IL-6 与 IL-8 水平含量极显著上升($P<0.01$)，与 OA 组相比，给药组大鼠血清中 IL-6 与 IL-8 水平含量有下降趋势，其中 OA+补肾组 IL-8 水平仅有下降趋势而无显著性差异，OA+活血组、OA+补肾活血组与 OA+阳性药物组大鼠血清中 IL-6 与 IL-8 水平含量显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果见图 3。

2.4 杜仲、当归对大鼠软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、β-catenin 蛋白表达的影响

与 Sham 组比较，OA 组大鼠软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 β-catenin 的蛋白表达极显著升高($P<0.01$)；与 OA 组相比，OA+补肾组、OA+活血组、OA+补肾活血组和 OA+阳性药物组大鼠软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 β-catenin 的蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 4。

2.5 杜仲、当归对 OA 大鼠软骨细胞增殖的影响

与 Con 组比较，IL-1β 组大鼠软骨细胞存活率极显著下降($P<0.01$)，与 IL-1β 组相比，IL-1β+补肾组、IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组与 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞存活率极显著上升($P<0.01$)。结果见图 5。

2.6 杜仲、当归对 OA 大鼠软骨细胞表型变化的影响

与 Con 组比较，IL-1β 组大鼠软骨细胞番红 O 染色明显变浅，且细胞形态部分发生变形；与 IL-1β 组相比，IL-1β+补肾组、IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组和 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞番红 O 染色颜色有所加深，细胞形态有所改善。结果见图 6。

2.7 OA 大鼠软骨细胞中 IL-6 与 IL-8 的含量变化

与 Con 组比较，IL-1β 组大鼠软骨细胞中 IL-6 与 IL-8 水平含量极显著上升($P<0.01$)；与 IL-1β 组相比，给药组大鼠软骨细胞中 IL-6 与 IL-8 水

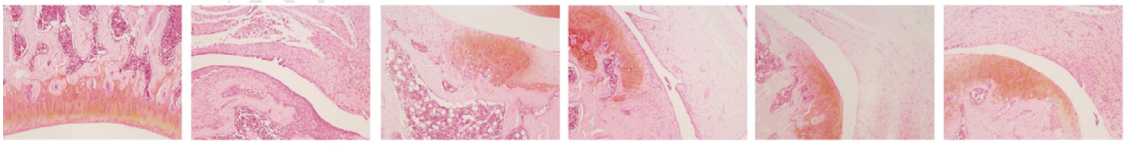


图 1 杜仲、当归对大鼠软骨组织恢复的影响(SO 染色，100×)

Fig. 1 Effect of *Eucommia ulmoides-Angelica sinensis* on cartilage recovery in rats(SO staining, 100×)

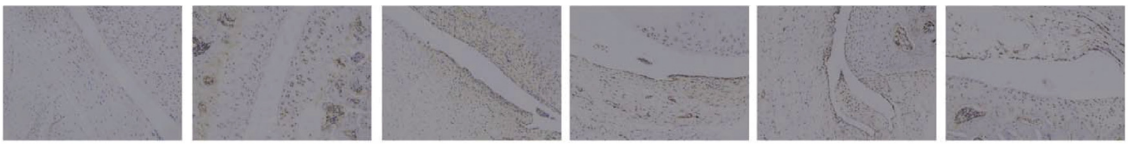


图 2 杜仲、当归对大鼠软骨组织中 MMP-13 表达的影响(ICH，100×)

Fig. 2 Effect of *Eucommia ulmoides-Angelica sinensis* on MMP-13 expression in rats' cartilage(ICH, 100×)

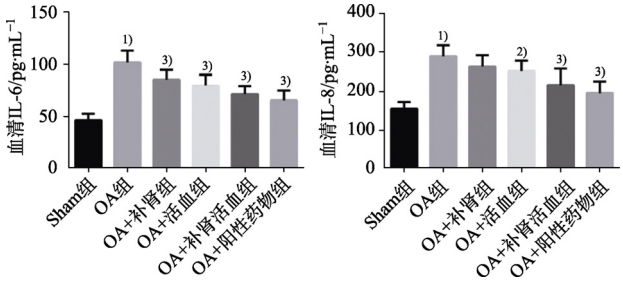


图 3 OA 大鼠血清中 IL-6、IL-8 含量变化情况($\bar{x}\pm s$, n=8)

与 Sham 组比较，[1)]P<0.01；与 OA 组比较，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 3 Changes in content of serum IL-6, IL-8 in OA rats ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Compared with the Sham group, [1)]P<0.01; compared with the OA group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

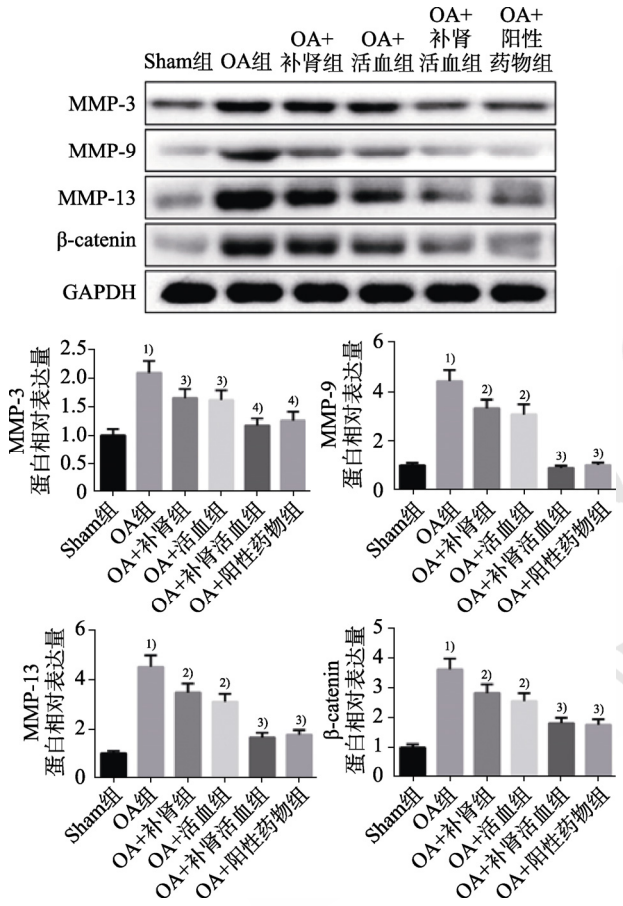


图 4 OA 大鼠软骨组织中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 β-catenin 的蛋白表达($\bar{x}\pm s$, n=3)

与 Sham 组比较，[1)]P<0.01；与 OA 组比较，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 4 MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin protein expression in OA rats' cartilage($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the Sham group, [1)]P<0.01; compared with the OA group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

平含量有下降趋势，其中 IL-1β+补肾组仅有下降趋势而无显著性，IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组与 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞中 IL-6 与 IL-8 水平含量显著下降(P<0.01 或 P<0.05)。结果见图 7。

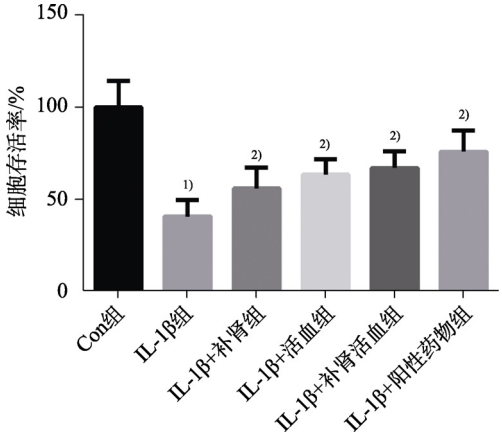


图 5 杜仲、当归对 OA 大鼠软骨细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

与 Con 组比较，[1)]P<0.01；与 IL-1β 组相比，[2)]P<0.01。

Fig. 5 Effect of *Eucommia ulmoides-Angelica sinensis* on OA rats' chondrocytes proliferation($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the Con group, [1)]P<0.01; compared with the IL-1β group, [2)]P<0.01.

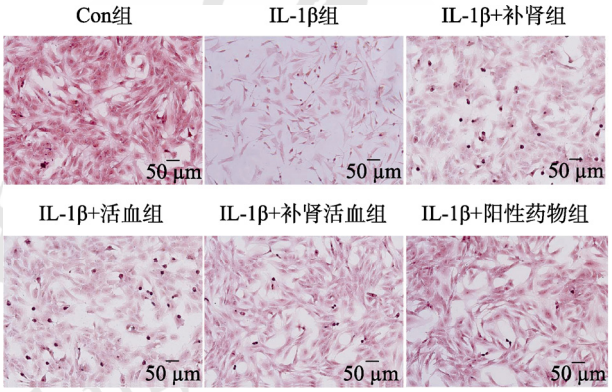


图 6 番红 O 染色检测软骨细胞的表型变化(200×)

Fig. 6 Phenotypic changes of chondrocytes detected by Safranin O staining(200×)

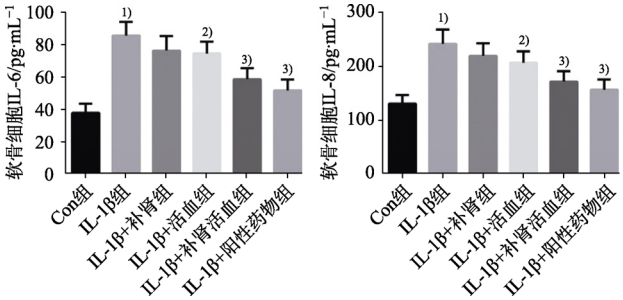


图 7 OA 大鼠软骨细胞中 IL-6、IL-8 的含量变化($\bar{x}\pm s$, n=8)

与 Con 组比较，[1)]P<0.01；与 IL-1β 组相比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 7 Changes in content of IL-6, IL-8 in OA rats' chondrocytes($\bar{x}\pm s$, n=8)

Compared with the Con group, [1)]P<0.01; compared with the IL-1β group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

2.8 OA 大鼠软骨细胞中 IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的 mRNA 表达

与 Con 组相比，IL-1β 组大鼠软骨细胞中 IL-6、

IL-8、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 mRNA 表达水平显著升高(P<0.01)。与 IL-1β 组相比，IL-1β+补肾组、IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组与 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞中 IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9 mRNA 表达水平显著降低(P<0.05 或 P<0.01)；IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组与 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞中 MMP-13 表达水平显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 8。

2.9 OA 大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 的蛋白表达

与 Con 组比较，IL-1β 组大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的蛋白表达极显著升高(P<0.01)；与 IL-1β 组相比，IL-1β+补肾组、IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组和 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的蛋白表达显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 9。

2.10 OA 大鼠软骨细胞中 β-catenin 的表达

与 Con 组比较，IL-1β 组大鼠软骨细胞中 β-catenin 的蛋白表达极显著升高(P<0.01)；与 IL-1β 组相比，IL-1β+补肾组、IL-1β+活血组、IL-1β+补肾活血组和 IL-1β+阳性药物组大鼠软骨细胞中 β-catenin 的蛋白表达显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 9~10。

3 讨论

OA 是老年人群中最常见的关节疾病，常导致慢性疼痛和关节残疾。OA 的治疗主要包括健康教育、药物治疗、手术治疗等。西医治疗主要是采用药物进行镇痛消肿及改善功能，但常用的消炎镇痛药-非甾体抗炎药存在消化性溃疡、心血管危害等问题；其次，外科手术治疗主要是对晚期 OA 患者施行关节置换术，但手术伴有并发症，风险较大，成本高，且每隔 10~15 年需进行返修，给患者及家庭造成较高经济负担[8-9]。中国目前已进入老龄化社会，OA 的发病率逐年递增，因此研究有效防治 OA 的治疗手段和药物是当前迫切需要解决的问题。

补肾活血中药治疗 OA 的疗效在长期临床实践中得到了充分的肯定，近年来补肾活血中药防治 OA 的研究也日益深入。梁桂洪等[10]对补肾活

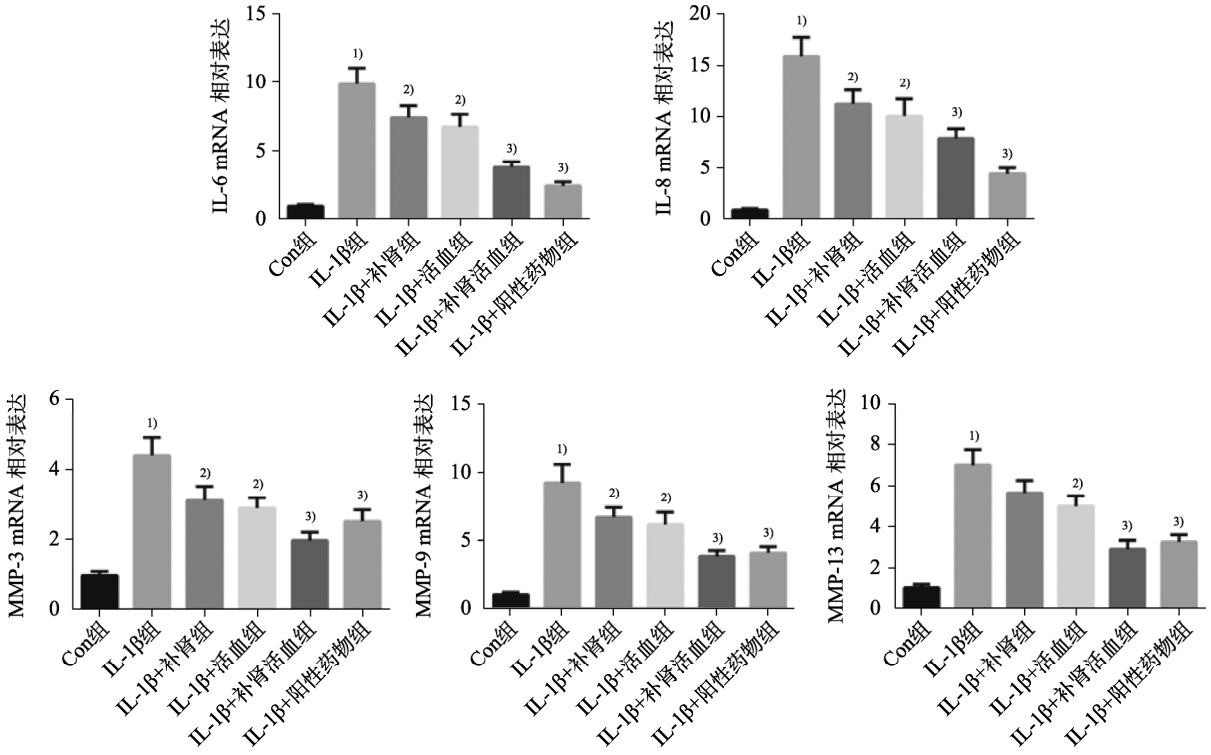


图 8 OA 大鼠软骨细胞中 IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$，n=3)
与 Con 组比较，[1)]P<0.01；与 IL-1β 组相比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 8 mRNA expression of IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in chondrocytes of OA rats($\bar{x}\pm s$, n=3)
Compared with the Con group, [1)]P<0.01; compared with the IL-1β group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

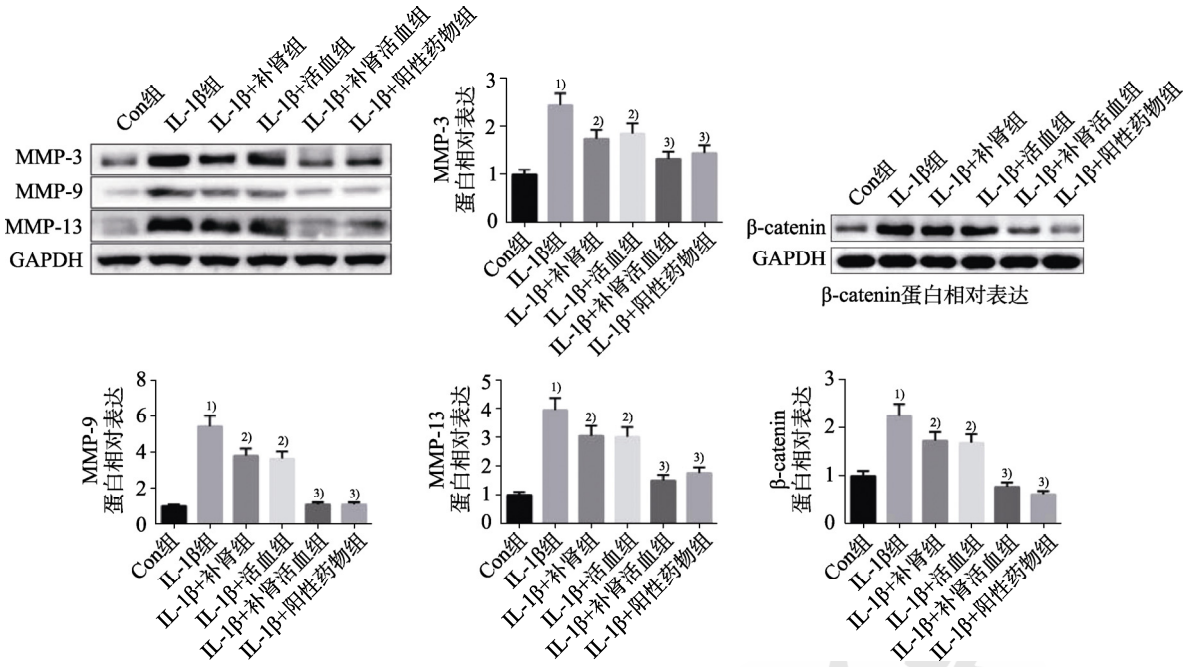


图 9 IL-1β 诱导的大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 β-catenin 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$，n=3)

与 Con 组比较，[1)]P<0.01；与 IL-1β 组相比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 9 Protein expression levels of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and β-catenin in rats' chondrocytes induced by IL-1β($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the Con group, [1)]P<0.01; compared with the IL-1β group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

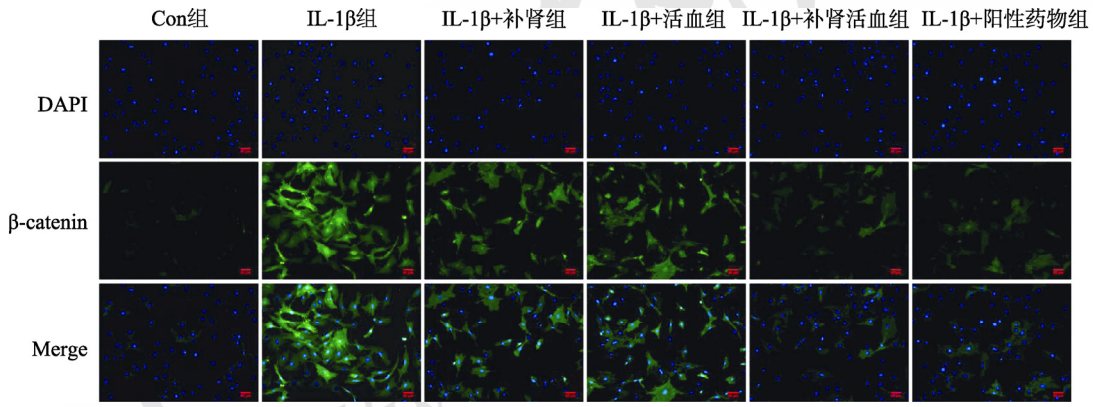


图 10 免疫荧光检测 OA 大鼠软骨细胞中 β-catenin 表达情况(200×)

Fig. 10 Immunofluorescence staining of β-catenin expression in OA rats' chondrocytes(200×)

血中药治疗膝骨性关节炎的疗效与安全性 meta 分析结果显示，补肾活血中药治疗膝骨性关节炎的疗效和止痛效果均优于塞来昔布，而在改善患者的膝关节功能和安全性方面与塞来昔布相当。补肾活血方治疗膝骨关节炎的临床疗效研究显示，补肾活血方的治疗有效率与对照组塞来昔布无显著差异，且患者不良反应发生率明显低于对照组[11]。补肾活血中药治疗 OA 的作用机制可能与抑制炎症因子生成、抑制软骨基质降解、抑制软骨细胞凋亡、促进软骨细胞增殖等有关[12]。本研究中，OA 模型大鼠及软骨细胞给予补肾药杜仲、活血药当归和补肾活血中药“杜仲-当归”干预治疗后，结果显示大鼠软骨细胞存活率显著提高，表明补肾活血中药具有促软骨细胞增殖作用；炎症因子 IL-6、IL-8 的表达水平显著降低，表明补肾活血中药能够抑制 OA 中的炎症因子生成；MMP-3、MMP-9、MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低，表明补肾活血中药能够对软骨基质降解起到改善作用。因此，本研究结果显示补肾活血中药“杜仲-当归”对 OA 的治疗效果可能与促进软骨细胞增殖、调控炎症因子水平、改善软骨基质降解并改善病理损伤有关。

在很大程度上，OA 中关节组织的病理损伤是由于 MMPs 升高对软骨细胞的降解所致。在 OA

软骨中，一般可观察到 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13 等 MMPs 水平的明显升高[13]。MMP13 是作用于软骨降解中的主要酶，与 MMPs 家族中其他成员相比，MMP-13 更限制性地表达于结缔组织，它不仅作用于 II 型胶原降解，同时也作用于软骨中蛋白聚糖、IV、IX 型胶原、骨粘连蛋白及基底膜蛋白聚糖的降解[14]。临床研究证明[15]，关节软骨被破坏的患者高水平表达 MMP-13，说明增高的 MMP-13 可能与软骨退变相关。研究还表明[16]，MMP-13 过表达转基因小鼠可发生自发性关节软骨破坏的表型。本研究体外 qRT-PCR、Western blotting 结果显示，在 IL-1β 干预的大鼠软骨细胞中，MMP-3、MMP-9、MMP-13 的 mRNA 及蛋白表达水平显著高于正常软骨细胞。番红 O 染色结果也显示，IL-1β 干预的软骨番红 O 染色明显变浅，且细胞表型发生变化，表明 IL-1β 干预可以造成软骨细胞损伤和基质降解。体内 OA 模型大鼠试验 Western blotting 及免疫组化结果显示，与 Sham 组大鼠相比，OA 组大鼠 MMP-3、MMP-9、MMP-13 的蛋白表达水平显著升高，MMP-13 在 OA 大鼠软骨组织中的阳性表达显著高于 Sham 组大鼠。大鼠软骨组织番红 O 染色结果也显示，OA 组大鼠软骨组织损伤严重，出现大面积脱落，关节软骨坏死，半月板广泛脱失，软骨下骨硬化，结构紊乱。基于 MMPs 尤其是 MMP-13 在 OA 中的重要作用，以 MMPs 抑制剂为治疗药物的研发为 OA 治疗提供了一种新的策略，然而，现有的 MMP-13 抑制剂早期临床试验的结果仍是不容乐观的。

本研究中，实验结果还显示 β-catenin 在 OA 中呈激活状态，Western blotting 及免疫荧光检测均显示，OA 软骨细胞和软骨组织中 β-catenin 的表达水平显著高于正常软骨细胞或组织。Wnt 信号通路包括经典的 Wnt/β-catenin 信号途径和非经典的 Wnt 信号途径，研究证实 Wnt/β-catenin 信号通路在骨细胞的分化、增殖及凋亡过程中发挥着重要的作用[6]。而遗传基因、临床发病及动物模型证据均指向 β-catenin 的过度表达可激活该信号途径，并上调 MMP-13 的表达，促进了基质降解和 OA 的发病及进展[17]。本研究中，OA 模型大鼠和 IL-1β 处理的软骨细胞均能检测到激活表达的 β-catenin 以及上调的 MMP-3、MMP-9、MMP-13，结果与以往报道相一致。此外，更为重要的是，给予补肾活血中药“杜仲-当归”干预治疗后，激活的 β-catenin 处于抑制状态，同时 MMPs 的表达水平也显著降低，表明“杜仲-当归”可通过介导 Wnt/β-catenin 信号通路及 β-catenin 的表达来影响 MMPs 的表达，从而改善 OA 损伤。

综上所述，本研究通过体内、体外 OA 模型试验，表明补肾活血中药“杜仲-当归”可以通过促进软骨细胞增殖、调控炎症因子水平、改善软骨基质降解、改善软骨病理损伤起到对 OA 的防治作用，且作用机制可能与介导 Wnt/β-catenin 信号转导调控 MMP-13 表达有关。

REFERENCES

[1] WANG C W, YU L Y, YAN L, et al. Study on the effect of *Agkistrodon aqueous* extract on pain model of osteoarthritis in rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(3): 292-296.

[2] SARZI-PUTTINI P, CIMMINO M A, SCARPA R, et al. Osteoarthritis: An overview of the disease and its treatment strategies[J]. Semin Arthritis Rheum, 2005, 35(1 Suppl 1): 1-10.

[3] 李萍, 马燕红. 基质金属蛋白酶在骨关节炎中的作用[J]. 中国康复, 2013, 28(3): 218-222.

[4] STONE A V, LOESER R F, VANDERMAN K S, et al. Pro-inflammatory stimulation of meniscus cells increases production of matrix metalloproteinases and additional catabolic factors involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(2): 264-274.

[5] LI H, WANG D, YUAN Y, et al. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 248.

[6] OLKKU A, MAHONEN A. Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells[J]. Bone, 2009, 44(4): 555-565.

[7] RAN J S, MA C Y, XU K, et al. Schisandrin B ameliorated chondrocytes inflammation and osteoarthritis via suppression of NF-κB and MAPK signal pathways[J]. Drug Des Devel Ther, 2018(12): 1195-1204.

[8] MCHUGH J. New OA management guidelines[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(3): 127. Doi: 10.1038/S41584-020-0378-4.

[9] RANNOU F, PELLETIER J P, MARTEL-PELLETIER J. Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys[J]. Semin Arthritis Rheum, 2016, 45(4 suppl): S18-S21.

[10] LIANG G H, LIANG Z J, LIN Y, et al. Efficacy and safety of Bushen Huoxue herb versus celecoxib in the treatment of knee osteoarthritis: A meta-analysis[J]. Chin Pharm(中国药房), 2016, 27(27): 3810-3814.

[11] ZHENG T, XU Z G, XU Z Y, et al. Clinical effect of Bushen Huoxue prescription on knee osteoarthritis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2019, 37(6): 1506-

1509.
[12] 郝胜坤, 纪斌, 石继祥, 等. 补肾活血中药治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 中医正骨, 2017, 29(4): 31-33.
[13] ZENG G Q, CHEN A B, LI W, et al. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 14811-14822.
[14] 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[J]. Pathol Int, 2010, 60(7): 477-496.
[15] ROACH H I, YAMADA N, CHEUNG K S, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(10): 3110-3124.
[16] NEUHOLD L A, KILLAR L, ZHAO W, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3(MMP-13) induces osteoarthritis in mice[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 35-44.
[17] ZHU M, TANG D, WU Q, et al. Activation of β-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult β-catenin conditional activation mice[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(1): 12-21.

收稿日期：2020-06-19
(本文责编：沈倩)

http://www.chinjmap.com