

右归丸对膝骨关节炎模型鼠软骨组织钙离子调控蛋白表达的影响

安方玉^{1,2,3,4}, 颜春鲁^{1,2,3,4*}, 刘永琦^{1,2,4}, 王继龙^{1,4}, 赵磊^{1,3}, 夏鹏飞^{1,3}, 骆亚莉¹, 石国秀¹, 赵崇博¹, 邓婕¹[1.甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2.甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 兰州 730000; 3.甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; 4.敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000]

摘要: 目的 观察右归丸对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型鼠显微结构和相关蛋白表达的影响, 进一步揭示右归丸防治 KOA 的机制。方法 将大鼠随机分为假手术组、模型组、硫酸氨基葡萄糖组, 右归丸(高、中、低剂量)组, 每组 10 只。采用改良 Hulth 法制备 KOA 大鼠模型 6 周后, 分别予相应药物灌胃 8 周。HE 染色法观察软骨组织的形态学变化, 并进行 Mankin 评分; 应用免疫组化法检测各组大鼠软骨组织热休克蛋白 90 α (heat shock protein 90 α , Hsp90 α)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)、钙调蛋白激酶 II(calmodulin kinase-II, CaMK-II)和肌球蛋白磷酸酶 Rho 相互作用蛋白(myosin phosphatase Rho-interacting protein, Mrip)的表达; 应用 Western blotting 检测各组大鼠软骨组织 Hsp90 α 的表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织 Mankin 评分、Hsp90 α 的蛋白表达显著升高, CaM 和 Mrip 的蛋白表达明显降低($P<0.05$); 模型组大鼠关节软骨边缘严重破坏, 软骨细胞排列紊乱。与模型组相比, 右归丸高剂量组大鼠软骨组织 Mankin 评分、Hsp90 α 的蛋白表达均明显降低, CaM 和 Mrip 的蛋白表达明显升高($P<0.05$), 软骨结构趋于正常, 软骨细胞分布仅偶见不均, 关节软骨表面欠光滑。结论 右归丸通过促进 KOA 模型鼠软骨组织的 Mrip 和 CaM 蛋白表达、抑制其 Hsp90 α 的蛋白表达来调控钙离子代谢, 从而有效保护 KOA 模型鼠关节软骨, 延缓关节软骨退变。

关键词: 右归丸; 膝骨关节炎; 钙离子代谢; 热休克蛋白 90 α

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)13-1550-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.003

引用本文: 安方玉, 颜春鲁, 刘永琦, 等. 右归丸对膝骨关节炎模型鼠软骨组织钙离子调控蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1550-1556.

Effects of Yougui Pill on Calcium Regulatory Protein of Chondrocytes in Rats with Knee Osteoarthritis

AN Fangyu^{1,2,3,4}, YAN Chunlu^{1,2,3,4*}, LIU Yongqi^{1,2,4}, WANG Jilong^{1,4}, ZHAO Lei^{1,3}, XIA Pengfei^{1,3}, LUO Yali¹, SHI Guoxiu¹, ZHAO Chongbo¹, DENG Jie¹ (1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Study on Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Quality Research, Colleges of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 4. Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the microstructure and the expression of related proteins of articular cartilage in the knee osteoarthritis rats, which were treated with Yougui pill, and to further reveal its mechanism. **METHODS** Sixty SD rats were randomly divided into six groups: sham operation group, model group, glucosamine sulfate group, Yougui pill (high-dose, middle-dose and low-dose) group, 10 rats in each group. The modified Hulth method was used to make KOA models for 6 weeks. The rats were gavaged with corresponding drugs for 8 weeks. The morphological change of cartilage was observed by HE staining, it was evaluated by Mankin score. The expression of heat shock protein 90 α (Hsp90 α), calmodulin(CaM), calmodulin kinase-II(CaMK-II), myosin phosphatase Rho-interacting protein(Mrip) was analyzed by immunohistochemistry. The expression of Hsp90 α was checked by Western blotting. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the Mankin score was obviously raised in the model group, the protein expression of Hsp90 α was evidently increased in the model group, the protein expression of CaM and Mrip was evidently decreased in the model group($P<0.05$), articular cartilage was seriously damaged, and chondrocytes were arranged in disorder. Compared with the model group, the Mankin score and the expression of Hsp90 α were declined obviously in the high-dose Yougui pill group, but the protein expression of CaM and Mrip was evidently

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目(2018A-043); 甘肃省中医药管理局科研项目(GZK-2017-2); 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放基金项目(DHYX17-10); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2018-01); 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室开放基金项目(FZYX17-18-11)

作者简介: 安方玉, 女, 硕士, 副教授 Tel: 13893639394 E-mail: anfyuwmh@163.com *通信作者: 颜春鲁, 男, 博士, 副教授 Tel: 13893303982 E-mail: yanchl1979@126.com

increased in the high-dose group($P<0.05$), cartilage structure was tended to be normal, the chondrocytes distribution was uneven, and articular cartilage surface was not smooth. **CONCLUSION** Yougui pill is effective for delaying articular cartilage degeneration. Yougui pill can regulate calcium metabolism by up-regulating the expression of Mprp and CaM and down-regulating the expression of Hsp90 α .

KEYWORDS: Yougui pill; knee osteoarthritis; calcium metabolism; Hsp90 α

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以膝骨关节软骨退化损伤、关节边缘和软骨下骨反应性增生为特征的慢性关节炎疾病^[1],在疾病的活动期成为中老年人群发生疼痛和致残的主要原因。目前治疗 KOA 的首选药物是镇痛药、非甾体抗炎药和皮质类固醇类药物。非甾体抗炎药和皮质类固醇类药物虽然起效快,但是长期服用只能缓解症状、并不能阻止关节软骨破坏的进展,并且不良反应较大,为此,寻找安全、低毒、有效的药物成为防治 KOA 的关注焦点。中医认为, KOA 属于“痹证”和“痿证”,肝肾亏虚、长期劳损及外感风寒湿邪是其主要病机。右归丸具有温补肾阳,填精止遗的功效,针对 KOA 的肝肾亏虚之症,本方对 KOA 可能具有疗效。本实验通过复制膝骨性关节炎实验性动物模型,以中药右归丸灌胃,观察其对模型鼠膝骨性关节炎关节软骨的病理及热休克蛋白 90 α (heat shock protein 90 α , Hsp90 α)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)和钙调蛋白激酶 II (calmodulin kinase- II, CaMK- II)等相关蛋白表达的影响,分析其防治 KOA 的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,♀♂各半,体质量(180 ± 20)g,购自甘肃中医药大学科研实验动物饲养中心。动物使用许可证号:SYXK(甘)2015-0005。

1.2 试剂及仪器

水合氯醛(天津市光复精细化工研究所,批号:20150105); GAPDH 抗体(ImmunoWay, 批号: B4501); Rabbit Anti-Mprp Polyclonal Antibody(批号: A1060937)、Rabbit Anti-Hsp90 α Polyclonal Antibody(批号: AH01119537)、Rabbit Anti-CaM Polyclonal Antibody(批号: AG10183516)、Rabbit Anti-CaMK II Polyclonal Antibody (批号: AC2017586)均购自 Bioss; BioMATE 3S 型蛋白、核酸浓度测定仪(Thermo 公司); BX53 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司); ChemiDoc™ XRS+型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); TGL16M 型台式高速冷冻离心机(凯达集团成员高科技公司);

OSE-Y10 型电动组织研磨器(上海 Tiangen 公司)。

1.3 药物及给药剂量

右归丸(仲景宛西制药股份有限公司,国药准字 Z41022170,批号: 151108)。参考陈奇主编的《中药药理实验方法学》,右归丸人常用剂量是 $27\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,换算成标准体质量大鼠的剂量为 $27\times 0.018=0.486\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,按照大鼠的标准体质量为 200 g ,得出大鼠的剂量为 $0.486\text{ g}/0.2\approx 2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,作为中剂量。则右归丸高、中、低剂量分别为 $4.8, 2.4, 1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 硫酸氨基葡萄糖片(新兴同仁药业有限公司,国药准字 H20041317,批号: 160302); 青霉素(北制药股份有限公司,国药准字 H13020657,批号: F6042103)。

1.4 动物分组、造模及给药

60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 6 组,分别为假手术组,模型组,硫酸氨基葡萄糖组,右归丸高、中、低剂量组,每组 10 只。参照文献[2-3],模型组及干预组采用改良 Hulth 法复制 KOA 模型。假手术组 SD 大鼠从膝关节内侧只打开关节腔,不破坏韧带和半月板,并保留关节软骨面。术后连续 3 d 肌肉注射青霉素 $200\times 10^3\text{ U}\cdot\text{d}^{-1}$,各组大鼠均在相同条件下,自由饮水,摄食。手术造模 6 周后通过 HE 染色观察软骨细胞的形态变化以判定模型是否成功,造模成功后给予药物干预,硫酸氨基葡萄糖组灌服硫酸氨基葡萄糖($0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),右归丸高、中、低剂量组分别按 $4.8, 2.4, 1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服相应的药物,干预 8 周。4%水合氯醛($0.7\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)腹腔注射麻醉动物后股动脉采血,颈椎脱臼处死动物,摘取双侧膝关节,左侧膝关节固定于 4%多聚甲醛,右侧膝关节于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.5 指标测定

1.5.1 HE 染色观察骨形态学变化 动物处死后取完整膝关节,对左侧膝关节脱钙处理并脱蜡至水,采用石蜡包埋法制作蜡块,并用切片机切片,切片厚度约 $5\text{ }\mu\text{m}$,HE 染色,封片、镜检并进行 Mankin 评分,具体评分标准参考文献[4]进行。评分标准:软骨结构如常,软骨细胞数量如常,

基质染色正常,潮线比较完整记为0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,出现多重潮线记为1分;软骨裂隙深达肌层,软骨细胞成簇生长,基质染色明显减退,软骨下血管浸入肌层记为2分;软骨裂隙深达辐射层,软骨细胞数量明显减少,基质染色明显减退记为3分;软骨裂隙深达钙化层,基质染色完全消失记为4分;软骨层脱落记为5分。

1.5.2 免疫组化法观察软骨组织 Hsp90 α 、CaM、CaMK II 和肌球蛋白磷酸酶 Rho 相互作用蛋白(myosin phosphatase Rho-interacting protein, Mprp)的蛋白表达 4%多聚甲醛固定膝关节软骨并脱钙,将石蜡切片进行脱蜡、脱水后放入配制好的枸橼酸缓冲液盒中进行微波修复;3%H₂O₂室温孵育30 min;5%山羊血清封闭30 min;滴加50 μ L的 Hsp90 α 、CaM、CaMK II 和 Mprp Polyclonal Antibody(一抗的稀释浓度分别为1:200,1:200,1:100,1:200),同时用PBS缓冲液代替一抗设立阴性对照,将切片放入湿盒中,4℃过夜;滴加山羊抗兔的二抗,室温下放置30 min;滴加ABC工作液,37℃孵育60 min;DAB显色;苏木精复染;二甲苯透明,封固。染色以软骨基质表层和中层的软骨细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色,由甘肃中医药大学病理教研室老师采用双盲法进行阅片。应用美国Image-Pro Plus 6.0全自动图像分析系统对软骨细胞阳性染色的积分光密度(integral optical density, IOD)进行定量分析,以其中一个具有代表意义阳性结果的视野的棕黄色颗粒为标准自动检测所有视野的阳性结果^[4]。

1.5.3 Western blotting 测定软骨组织 Hsp90 α 的蛋白表达 软骨组织蛋白质的提取用RIPA裂解液,蛋白质含量的测定用BCA法,并调整点样的蛋白质浓度为5 μ g $\cdot$ μ L⁻¹,每孔10 μ L,作SDS-PAGE、转膜、封闭、滴加抗Rabbit Anti-Hsp90 α Polyclonal Antibody一抗孵育,滴加山羊抗兔IgG二抗孵育。采用ECL Plus超敏发光液染色观察,将溶液A和B等体积混匀后,按约0.125 mL $\cdot$ cm⁻²膜面积进行染色,室温反应1 min后置于Image Lab 3.0进行曝光,曝光条件为单个曝光时间10 s,总曝光时间60 s。

1.6 数据分析

采用SPSS 17.0统计软件分析,实验数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-Way-Anova), $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 膝关节软骨组织形态学影响

HE染色结果显示,假手术组大鼠关节面及滑膜结构完整,软骨细胞呈水平排列,关节软骨边缘光滑;模型组大鼠关节软骨边缘严重破坏,软骨细胞排列紊乱;右归丸低、中剂量组关节软骨边缘不平整,软骨细胞排列紊乱;右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠软骨结构趋于正常,软骨细胞分布偶见不均,关节软骨表面欠光滑,结果见图1。Mankin评分结果显示,与假手术组比较,模型组及各干预组大鼠Mankin评分均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组大鼠Mankin评分均显著降低($P < 0.05$),结果见表1。

表1 各组大鼠Mankin评分结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Comparison of Mankin scores in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	Mankin 评分
假手术组	0.33 $\pm$ 0.073
模型组	4.92 $\pm$ 0.539 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖组	2.76 $\pm$ 0.317 ¹⁾²⁾
右归丸高剂量组	3.05 $\pm$ 0.253 ¹⁾²⁾
右归丸中剂量组	4.14 $\pm$ 0.159 ¹⁾
右归丸低剂量组	4.38 $\pm$ 0.621 ¹⁾

注:与假手术组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.2 对软骨组织 Hsp90 α 、CaM、CaMK II 和 Mprp 蛋白表达的影响

染色以软骨基质表层和中层的软骨细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色。假手术组Hsp90 α 呈弱阳性表达,CaM和Mprp呈阳性表达。模型组关节软骨中Hsp90 α 呈强阳性表达,CaM和Mprp呈弱阳性表达。右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组Hsp90 α 呈弱阳性表达,CaM和Mprp呈强阳性表达。结果见图2~5。与假手术组比较,模型组大鼠Hsp90 α 蛋白表达明显升高,CaM和Mprp蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组Hsp90 α 蛋白表达明显降低,CaM和Mprp蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。CaMK II在假手术组、模型组、右归丸各干预组和硫酸氨基葡萄糖组表达无显著性差异。结果见表2。

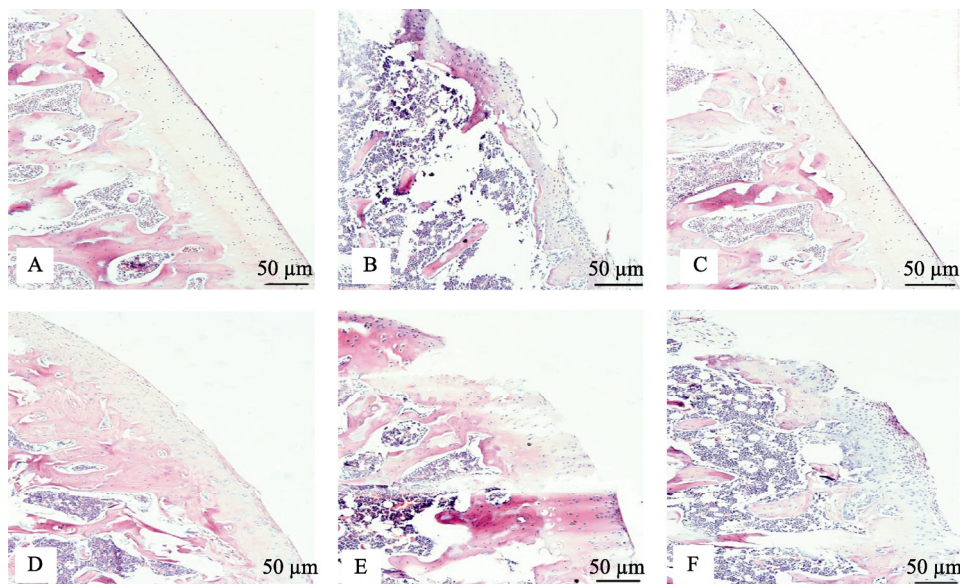


图 1 软骨组织病理形态学变化(HE, 20×)

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 1 Pathomorphological changes of cartilages(HE, 20×)

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E- Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

表 2 各组大鼠 Hsp90α、CaM、CaMK II 和 Mrip 蛋白免疫组织化学染色阳性表达 IOD 值的结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 IOD value comparison of the positive expression of protein immunohistochemical staining of Hsp90α, CaM, CaMK II and Mrip in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Hsp90α	CaM	CaMK II	Mrip
假手术组	56 167.5±4 029.32	25 751.2±2 840.866	1 915.4±161.67	72 148.6±1 806.62
模型组	203 078.5±9 382.59 ¹⁾	16 412.6±3 168.7 ¹⁾	1 597.4±168.31	36 459.6±2 337.06 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖组	71 124.17±2 554.67 ²⁾	23 210.4±2 381.23 ²⁾	1 819.8±101.37	73 043.2±1 526.22 ²⁾
右归丸高剂量组	53 573.67±2 203.48 ²⁾	24 876.2±3 227.34 ²⁾	1 742.2±245.32	70 176.8±1 728.36 ²⁾
右归丸中剂量组	18 972.5±4 068.02	18 693.6±1 042.64	1 611.8±162.90	37 657.6±2 304.87
右归丸低剂量组	193 453.5±1 877.62	19 437.2±3 876.25	1 537.6±106.61	35 292.5±1 765.42

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

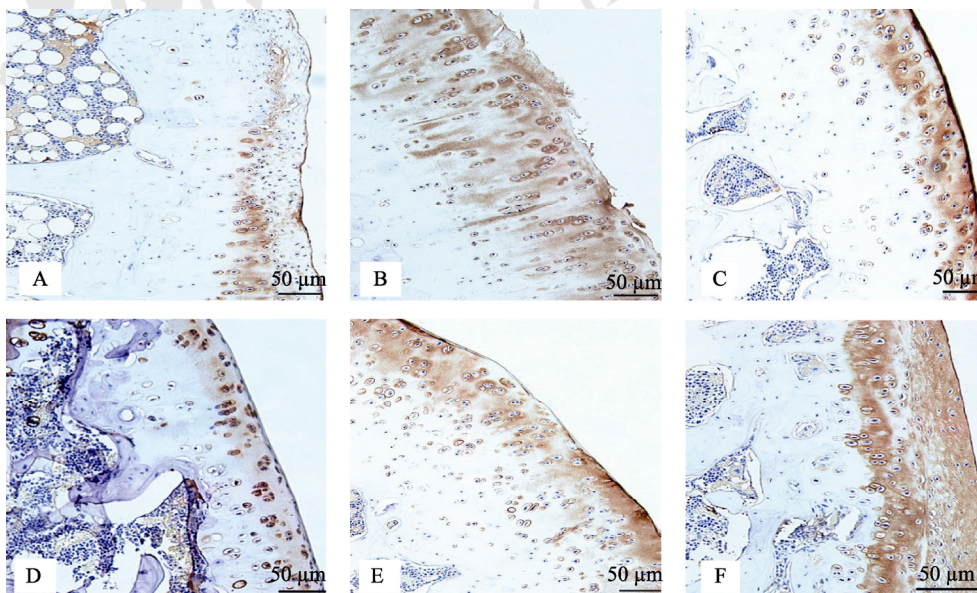


图 2 各组大鼠 Hsp90α 蛋白的阳性细胞表达结果(IHC, 20×)

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 2 Expression of Hsp90α positive cell in each group(IHC, 20×)

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E-Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

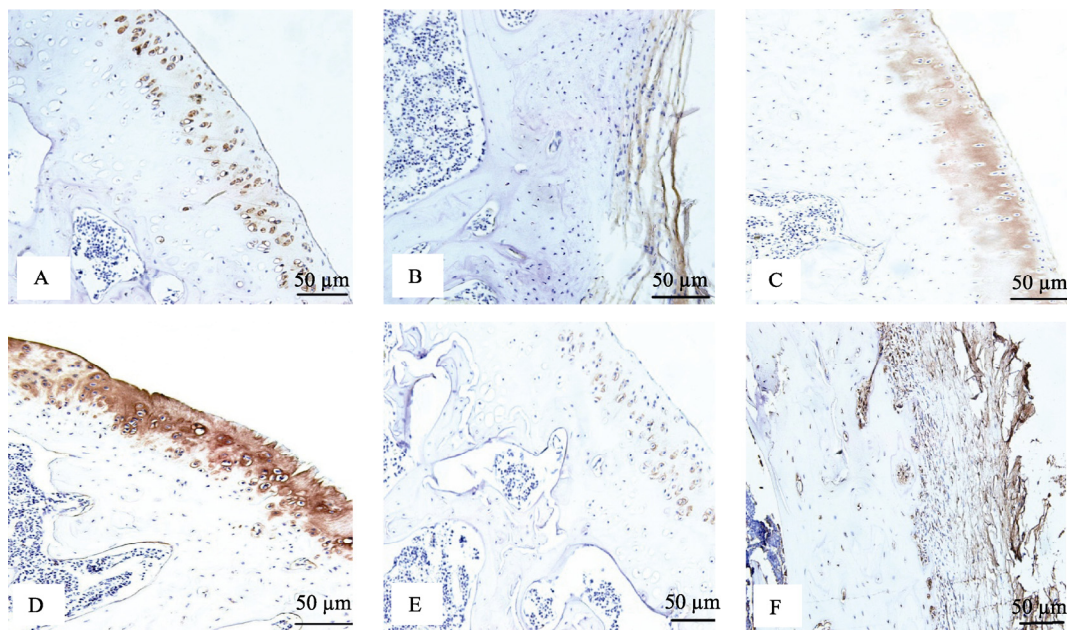


图3 各组大鼠 CaM 蛋白的阳性细胞表达结果(IHC, 20×)

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 3 Expression of CaM positive cell in each group(IHC, 20×)

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E-Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

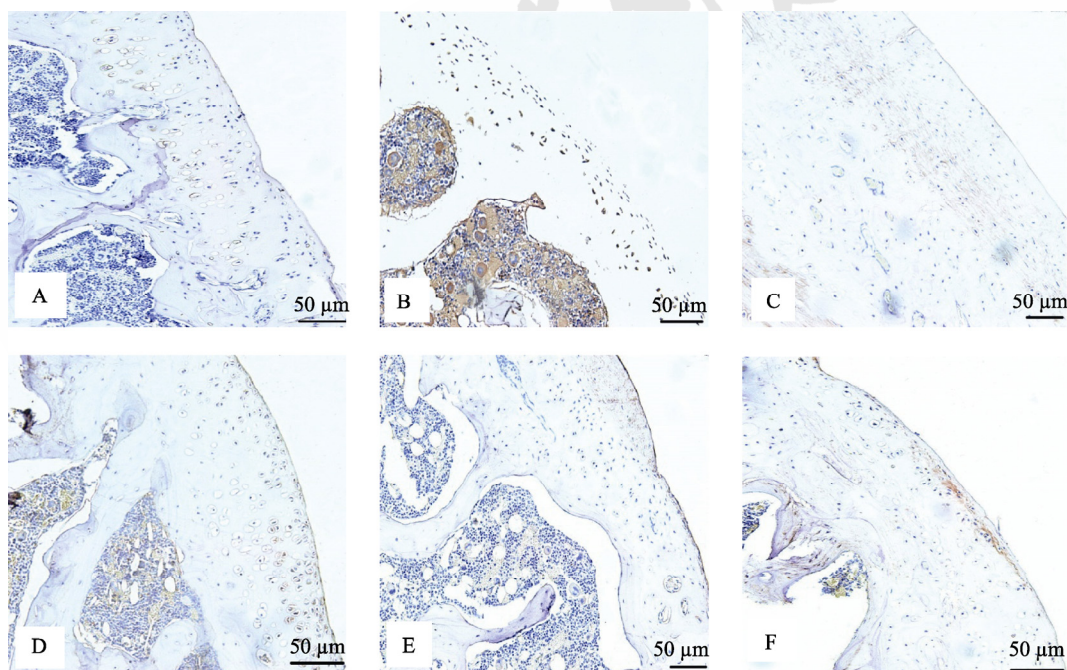


图4 各组大鼠 CaMK II 蛋白的阳性细胞表达结果(IHC, 20×)

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 4 Expression of CaMK II positive cell in each group(IHC, 20×)

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E-Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

2.3 Western blotting 测定右归丸对软骨组织 Hsp90α 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 Hsp90α

的蛋白表达显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 右归丸高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组 Hsp90α 的蛋白表达显著降低($P<0.05$)。见表 3 和图 6。

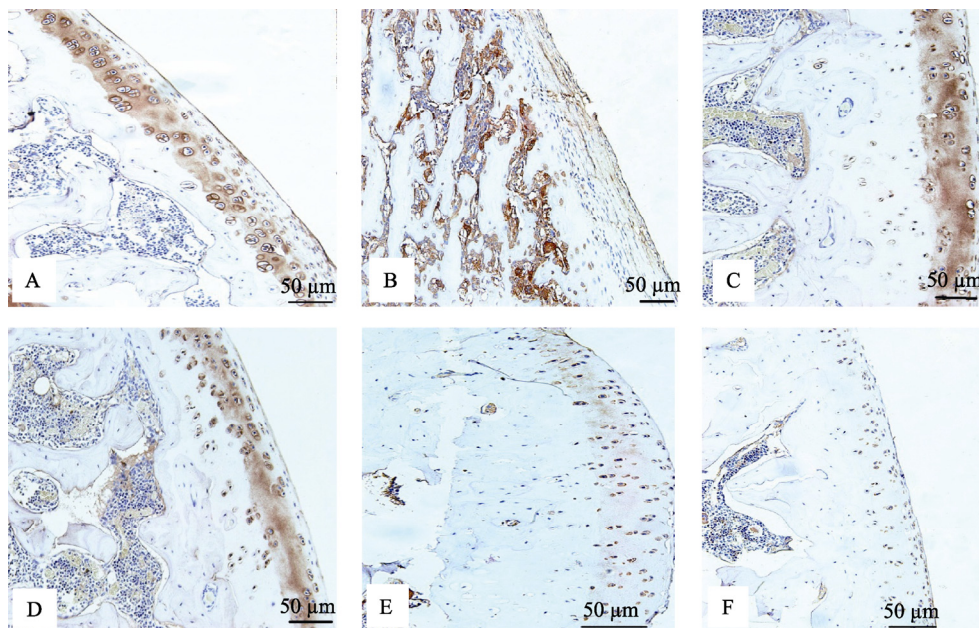


图5 各组大鼠 Mrip 蛋白的阳性细胞表达结果(IHC, 20×)

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 5 Expression of Mrip positive cell in each group(IHC, 20×)

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E-Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

表3 右归丸对 KOA 模型大鼠 Hsp90α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Effect of Yougui pill on the protein expressions of Hsp90α in KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Hsp90α
假手术组	0.48±0.01
模型组	1.01±0.03 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖组	0.58±0.01 ²⁾
右归丸高剂量组	0.63±0.03 ²⁾
右归丸中剂量组	0.92±0.01
右归丸低剂量组	0.75±0.02

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

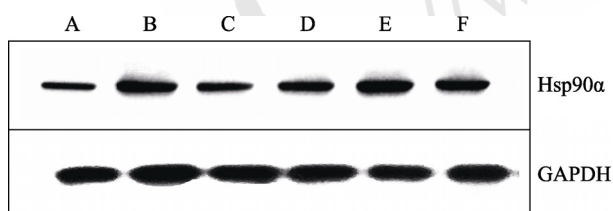


图6 各组大鼠软骨组织 Hsp90α 蛋白的表达

A-假手术组; B-模型组; C-硫酸氨基葡萄糖组; D-右归丸高剂量组; E-右归丸中剂量组; F-右归丸低剂量组。

Fig. 6 Protein expressions of Hsp90α of cartilaginous cell in each group

A-sham operation group; B-model group; C-glucosamine sulfate group; D-Yougui pill high dose group; E-Yougui pill middle dose group; F-Yougui pill low dose group.

3 讨论

KOA 是一种累及膝关节软骨组织、以疼痛和骨关节退变为主要病理特点的慢性进展性疾病。

《内经》中记载,“肾主骨、肝主筋”,依据这一中医理论,认为 KOA 的主要病机特点是“肝肾亏虚为本,气滞、血瘀、痰湿凝聚为标”,中医宜采用“补肝肾、强筋骨、活血、祛瘀、止痛”等中药来治疗 KOA。作为补肾的经典方药右归丸,主要由“熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药、附子、肉桂、鹿角胶、菟丝子、杜仲、当归”组成,方中附子、肉桂、鹿角胶培补肾中元阳,温里祛寒,为君药。熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药滋阴益肾,养肝补脾,填精补髓,取“阴中求阳”之义,为臣药。再用菟丝子、杜仲补肝肾,强腰膝,配以当归养血和血,共补肝肾精血,为佐药。诸药合用,以温肾阳为主而阴阳兼顾,肝脾肾并补,妙在阴中求阳,使元阳得以归原。相关研究发现,补肾活血中药可显著改善 KOA 大鼠膝关节肿胀、软骨形态和软骨退变的作用,提示补肾活血中药治疗 KOA 可能具有缓解症状和修复结构的效果^[5]。

本课题组前期研究发现,右归丸能消除 KOA 大鼠膝关节肿胀,可有效延缓 KOA 大鼠的关节软骨退变,其作用机制可能与降低血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子水平、降低 Wnt 信号通路的 WISP1、Wnt1、β-catenin、LRP5 蛋白表达和升高 DKK1 的蛋白表达有关^[6-7]。本研究通过观察右归丸对 KOA 模型大鼠软骨病理的影响,结果发现右归丸能明显减轻 KOA 模型大鼠软骨结构破坏的范

围和严重程度,明显改善软骨细胞的形态结构并具有延缓关节软骨退变的作用。Mankin 评分进一步说明右归丸可改善 KOA 大鼠的软骨损伤,证实了右归丸改善软骨退变、保护软骨的作用。以右归丸高剂量作用最为明显。

CaM 是普遍存在于真核生物中且高度保守的一类钙离子结合蛋白^[8]。CaM 与 Ca^{2+} 结合后形成 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物可以启动下游钙/CaMK II、蛋白激酶 C(PKC)、丝裂原活化蛋白激酶 1/2(MAPK1/2)、磷酸化酶激酶等多个信号通路。CaMK II 是一种其活性受到机体细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响的多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有调节细胞分化和细胞发育等功能^[9-10]。除此之外,与 CaM 发生结合的靶蛋白有很多,如 CaMK- I、CaMK- II、Hsp70、Hsp90 等,二者结合形成的复合物具有调节细胞增殖、自噬和凋亡等生理功能^[11-13]。Hsp90 是热休克蛋白家族的成员之一,主要有 Hsp90 α 和 Hsp90 β 2 种亚型,Hsp90 可以通过促进其机体关节软骨细胞释放 NO 加重 OA 机体的关节软骨退化^[14-15]。Mrip 是一种能调控细胞内 Ca^{2+} 敏感性的蛋白质。研究发现,激活的 Rho 激酶可以加重各种疾病的炎症反应,如哮喘、类风湿性关节炎、多发性硬化症、动脉粥样硬化症等^[16]。本研究结果发现,KOA 模型鼠软骨组织 Hsp90 α 的蛋白表达是升高的,而 CaM 和 Mrip 的蛋白表达是下降的。推测 KOA 模型鼠机体可能发生了钙稳态失衡。给予右归丸干预后,结果发现 KOA 模型鼠软骨组织 Hsp90 α 的蛋白表达是下降的,而 CaM 和 Mrip 的蛋白表达是升高的。说明右归丸可能是通过调节钙离子代谢来发挥治疗作用。而本研究中,假手术组、模型组和药物干预组的软骨组织中均未发现 CaMK- II 的表达,这可能是与 CaMK- II 主要分布于脑组织和各种肿瘤组织有关^[10,17]。

综上,右归丸可能是通过促进 KOA 模型鼠软骨组织的 Mrip 和 CaM 蛋白表达、抑制其 Hsp90 α 的蛋白表达来调控钙离子代谢,从而实现机体的钙稳态平衡和达到延缓关节软骨退化的目的,发挥治疗作用,进一步为更好地研究 KOA 的分子机制以及右归丸的临床应用提供了参考。

REFERENCES

[1] MENG X Q, LIAO G Q, YOU J Y, et al. Effects of Xibikang preparation of eliminating dampness and phlegm and blood

- stasis on apoptosis regulated genes expression of chondrocytes in patients with knee osteoarthritis [J]. Hebei J Tradit Chin Med(河北中医), 2017, 39(1): 94-98, 103.
- [2] WANG Y F, BAI R X, ZHANG Y, et al. Experimental study on replicating knee osteoarthritis at different stages by modified Hulth's modeling method [J]. J Tianjin Med Univ(天津医科大学学报), 2009, 15(3): 400-404.
- [3] ROGART J N, BARRACH H J, CHICHESTER C O. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartil, 1999, 7(6): 539-547.
- [4] LI D X, XU X, ZHU J, et al. Effect of "Huamoyan Capsule" on histopathology and serum NO, SOD, COMP in rabbits with knee osteoarthritis [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2014, 48(4): 86-90, 101.
- [5] PAN J K, YANG W Y, LIU J, et al. Effect of Longbie capsule on pathologic changes of cartilage and synovium of knee osteoarthritis rats [J]. China Med Abstr(Intern Med), 2017, 37(7): 807-812.
- [6] YAN C L, LI S H, AN F Y, et al. Effect of Yougui pill on serum MMPs and inflammatory factors in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin J Osteoporos(中国骨质疏松杂志), 2018, 24(5): 645-650.
- [7] YAN C L, LI S H, AN F Y, et al. The therapeutic effects of Yougui pill on knee osteoarthritis and the expression of Wnt signal pathway related factors in rats [J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2018, 34(2): 177-181.
- [8] LI Q W, ZHANG H, PANG Y. The structure, properties and cellular biological functions of CaM [J]. J Liaoning Norm Univ (Nat Sci Ed)(辽宁师范大学学报: 自然科学版), 2017, 40(1): 74-82.
- [9] LISMAN J, SCHULMAN H, CLINE H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(3): 175-190.
- [10] 张兴华, 张杰. CaMK II 在前列腺癌发生发展中的作用研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(1): 167-170.
- [11] CHOW F A, MEANS A. The calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascades [J]. New Comprehensive Biochem, 2007, 41(6): 345-364.
- [12] HEINEN R C, DINIZ-MENDES L, SILVA J T, et al. Identification of the divergent calmodulin binding motif in yeast Ssb1/Hsp75 protein and in other HSP70 family members [J]. Revista Brasileira De Pesquisas Med E Biol, 2006, 39(11): 1399-1408.
- [13] WRIGHT L S, FINN K A, SIEGEL F L. Concomitant preparative isolation of calmodulin and heat shock protein (hsp90) from bovine testes [J]. Protein Expr Purif, 1993, 4(5): 417-424.
- [14] SIEBELT M, JAHR H, GROEN H C, et al. Hsp90 inhibition protects against biomechanically induced osteoarthritis in rats [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(8): 2102-2112.
- [15] CALAMIA V, DE ANDRÉS M C, OREIRO N, et al. Hsp90 β inhibition modulates nitric oxide production and nitric oxide-induced apoptosis in human chondrocytes [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011(12): 237.
- [16] LUO W, LIU C T, YANG Q H, et al. New angle of view on the role of rho/rho kinase pathway in human diseases [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(6): 378-395.
- [17] 李海涛, 李玉明. CaMK II 在神经缺血性损伤中的作用[J]. 山东医药, 2013, 53(28): 95-98.

收稿日期: 2019-07-21
(本文责编: 曹粤锋)