

益肾蠲痹丸干预相关通路介导细胞焦亡对膝骨性关节炎大鼠的影响

马富海¹ 李廷栋^{2*} 赵庆¹ 唐晓栋¹ 陈国栋¹ 李昭成¹ 白登彦³

1. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050

2. 甘肃省肿瘤医院, 甘肃 兰州 730050

3. 甘肃省第二人民医院, 甘肃 兰州 730030

中图分类号: R684.3;R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2023)08-1114-07

摘要: **目的** 探讨益肾蠲痹丸干预 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 信号通路对膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠的保护作用,并分析其对细胞焦亡相关蛋白的影响。**方法** 随机将 90 只 SPF 级 SD 大鼠分为空白组、模型组、阳性对照组和益肾蠲痹丸低、中、高剂量组,每组 15 只。空白组不做处理,其他组制备 KOA 大鼠模型后进行干预治疗。比较 6 组大鼠干预前后膝关节直径及足趾容积情况;ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-18 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量变化;HE 染色观察关节软骨组织病理学改变情况;TUNEL 法检测细胞凋亡情况;免疫组化法分析 Caspase-1 相关蛋白表达;Western blot 及 qRT-PCR 法检测 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 相关蛋白及 mRNA 表达水平。**结果** KOA 造模后,与空白组比较,模型组大鼠膝关节直径与足趾容积明显增大,血清中 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量明显升高,软骨组织细胞排列紊乱,出现炎性浸润,细胞凋亡程度增高,NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 相关蛋白及 mRNA 表达水平明显升高(P 均 <0.05);与模型组比较,阳性对照组及益肾蠲痹丸治疗组大鼠膝关节直径与足趾容积明显减轻,血清中 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量下降,软骨组织细胞炎性浸润改善,细胞凋亡程度减轻,NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 相关蛋白及 mRNA 表达水平明显下降(P 均 <0.05),其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于益肾蠲痹丸低剂量组($P<0.01$)。**结论** 益肾蠲痹丸能够改善 KOA 大鼠关节软骨组织损伤,降低炎症因子表达和细胞凋亡程度,其机制可能与调控 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 信号通路减轻细胞焦亡有关。

关键词: 膝骨性关节炎;益肾蠲痹丸;细胞焦亡;NLRP3/NF- κ B/Caspase-1;炎症因子

The effect of Yishen Juanbi pill on knee osteoarthritis through intervention of cell pyroptosis mediated by NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 signaling in rats

MA Fuhai¹, LI Tingdong^{2*}, ZHAO Qing¹, TANG Xiaodong¹, CHEN Guodong¹, LI Zhaocheng¹, BAI Dengyan³

1. Gansu Traditional Chinese Medicine Hospital, Lanzhou 730050

2. Gansu Cancer Hospital, Lanzhou 730050

3. The Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730030, China

* Corresponding author: LI Tingdong, Email: dawanyule@foxmail.com

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Yishen Juanbi Pill on knee osteoarthritis (KOA) rats by interfering with NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 signal pathway, and to analyze its effect on pyroptosis related proteins. **Methods** Ninety SPF SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group, and low, middle and high dose of Yishen Juanbi Pill groups, with 15 rats in each group. Rats in the blank group was not treated. Rats in the other groups were intervened after preparing the rat model of knee osteoarthritis. The knee joint diameter and toe volume of 6 groups were compared before and after the intervention. The contents of IL-1 β , IL-18, and VEGF in rat serum were detected with ELISA method. Histopathological changes of articular cartilage were observed with HE staining. TUNEL method was used to detect the apoptosis of articular chondrocytes in each group. The expressions of caspase-1 related proteins were analyzed with immunohistochemistry. The expression levels of NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 related proteins and mRNAs in each group were detected using Western blotting and qRT-PCR. **Results**

基金项目: 甘肃省自然科学基金(21CX1RA176)

* 通信作者: 李廷栋, Email: dawanyule@foxmail.com

After modeling, compared to those in the blank group, the diameter of knee joint and the volume of toe in the model group increased significantly, and the contents of IL-1 β , IL-18 and VEGF in serum increased significantly. The cells in cartilage tissue were in disorder, inflammatory infiltration appeared, and the degree of apoptosis increased. The expression levels of NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 related proteins and mRNAs increased significantly (all $P < 0.05$). Compared to those in the model group, the diameter of knee joint and toe volume of rats in the positive control group and the Yishen Juanbi Pill treatment group reduced significantly, the contents of IL-1 β , IL-18, and VEGF in serum decreased, the inflammatory infiltration of chondrocytes improved, the degree of apoptosis reduced, and the expression levels of NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 related proteins and mRNAs decreased significantly (all $P < 0.05$). Among them, the high dose group of Yishen Juanbi Pill was significantly better than the low dose group ($P < 0.01$).

Conclusion Yishen Juanbi Pill effectively relieves the articular cartilage tissue damage of KOA rats, reduces the expression of inflammatory factors and the degree of cell apoptosis. Its mechanism may be related to the regulation of the NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 signal pathway to reduce pyroptosis.

Key words: knee osteoarthritis; Yishen Juanbi Pill; pyroptosis; NLRP3/NF- κ B/Caspase-1; inflammatory factor

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以膝关节滑膜组织退行性病理改变并伴发炎症因子水平异常增高的临床常见疾患,该病发病率呈逐年上升趋势。研究显示,KOA的发病多与自身免疫性病损、软骨退变等有关,近年研究发现,KOA发病与细胞炎症反应及细胞焦亡等有密切关系,但具体发病机制仍不明确^[1]。相关研究指出,KOA发病时多伴有体内炎症因子异常表达、细胞焦亡等特异性表现^[2-3]。NLRP3/NF- κ B/Caspase-1是机体细胞焦亡的主要信号通路,该通路关键激酶的磷酸化过程会干预细胞的转录、增值、分化、凋亡及炎症反应过程,其中NLRP3是重要的炎症复合体,NF- κ B主要负责调控炎症因子转录过程,NLRP3激活后会活化Caspase-1及NF- κ B通道,诱导IL-1 β 、IL-18等多种促炎因子的释放,刺激软骨细胞和滑膜成纤维细胞降解基质,增加关节炎的氧化应激反应^[4-5]。益肾蠲痹丸在临床上常用于治疗KOA^[6-7],但益肾蠲痹丸能否通过调控细胞焦亡关键信号通路NLRP3/NF- κ B/Caspase-1来治疗KOA未见实验证实。本实验以NLRP3/NF- κ B/Caspase-1信号通路为切入点,通过益肾蠲痹丸干预治疗KOA模型大鼠,为临床治疗KOA提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

益肾蠲痹丸(国药准字:Z10890004,江苏正大清江制药有限公司,规格:8g);塞来昔布(优得宁)(国药准字:H20203097,石药集团);IL-1 β 、IL-18及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)酶联免疫试剂盒(SP11237, SP12251, SP11235,武汉赛培生物科技有限公司);HE染色试剂盒(R23261,上海尚宝生物科技有限公司);TUNEL细

胞焦亡检测试剂盒(P0012s,上海碧云天有限公司);免疫组化试剂盒(KGP4100,上海臻诺生物科技有限公司);NLRP3、NF- κ B、Caspase-1抗体(13123, 11412, 15120,美国Cell Signaling Technology公司);荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯);酶标仪(瑞士TECAN公司);石蜡切片机、包埋机(德国Leica公司);KH22R型高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);DKZ-1恒温震荡水槽(济南爱来宝仪器设备有限公司);FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司);游标卡尺(0.02mm精度,东莞中特精密仪器公司);YLS-7C足趾容积测量仪(天津诺雷信达科技公司)。

1.2 动物分组与造模

SPF级雌性3月龄SD大鼠90只,体质量(250 \pm 20)g,由甘肃中医药大学动物实验中心提供[动物合格证:62001000000630,动物生产许可证号:SCXK(甘)2020-0021]。本研究经甘肃中医药大学伦理委员会审查并通过,实验伦理号:202001170。按随机数字法分为空白组、模型组、阳性对照组、益肾蠲痹丸低、中、高剂量组共6组,每组各15只。实验前后所有大鼠饲养条件一致。适应性喂养1周后开始实验造模,除空白组外,其他5组按照文献[8]采用改良Huith法建立膝骨性关节炎大鼠模型。造模方法:大鼠麻醉后仰卧位固定,右膝关节备皮消毒,暴露关节腔后依次剪断前交叉内侧副韧带,摘除半月板后消毒缝合。6周后进行关节软骨病理切片,如出现软骨表层纤维化糜烂、表面粗糙不平等病理性表现,则证实造模成功。本次实验KOA大鼠模型均造模成功。

1.3 给药

造模成功后进行灌胃治疗,其中5组治疗组按人鼠用药比例换算后药物溶于生理盐水,阳性对照

组大鼠给予塞来昔布 18 mg/kg 干预治疗,益肾蠲痹丸低剂量组大鼠予益肾蠲痹丸 25 mg/kg,中剂量组予 50 mg/kg,高剂量组予 100 mg/kg 灌胃干预,空白组和模型组等剂量生理盐水干预,1次/d,连续干预6周。

1.4 取材

末次干预后,3%的戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠,腹主动脉采血后4 500 r/min 离心 15 min 取上清液冻存待测;取各组大鼠右膝关节软骨组织存于体积分数 10%甲醛溶液中备用。

1.5 实验方法

1.5.1 膝关节直径及足趾容积测定:干预后,游标卡尺测量各组大鼠膝关节直径,足趾容积仪测量各组大鼠足趾容积,各指标分别测量 3 次取均值并记录。

1.5.2 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量测定:取各组上清液,ELISA 试剂盒检测各组血清中 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量水平变化。

1.5.3 HE 染色检测膝关节软骨组织病理学变化:取各组大鼠部分关节软骨组织固定,脱钙后进行水合、透明、石蜡包埋处理后,切片厚度约 5 μ m,在苏木素溶液中染色 5 min,冲洗,盐酸乙醇溶液分化,加入伊红染色 2 min,脱水,二甲苯封片,在光镜下观察组织病理学改变。

1.5.4 流式细胞术检测细胞凋亡:取各组大鼠软骨部分组织细胞,加入 AnnexinV-FITC/PI 进行双标染色,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况,激发波长 488 nm。

1.5.5 TUNEL 染色法检测关节软骨组织细胞 DNA 损伤情况:将关节软骨部分组织乙醇脱水后切片、染色,置于 100%、95%、85%、75%乙醇中逐级脱水后透明,TUNEL 试剂盒中试剂 1 (TdT) 和试剂 2 (dUTP) 按照 1:10 混合后,孵育各组细胞,在光镜下观察采集图像,每张切片截取等大 5 个视野,Image J 软件分析统计阳性细胞,阳性细胞数/总细胞数 \times 100%=阳性细胞率。

1.5.6 免疫组化法分析:将切片置于枸橼酸缓冲液中修复后加入 3%过氧化氢室温孵育 30 min,再加入 5%山羊血清抗原封闭 30 min,免疫组化染色观察骨软骨组织中 Caspase-1 蛋白表达情况。

1.5.7 Western Blot 法分析 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 信号通路相关蛋白的表达:RIPA 裂解缓

冲液提取关节软骨组织中的总蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒测定各组总蛋白质的浓度,蛋白变性后加入到 SDS-PAGE 凝胶中,电泳后在 PDVF 膜上进行转膜,添加一抗(1:1 000)及二抗(1:1 000),添加 ECL 显色剂,Image J 软件分析蛋白表达量。

1.5.8 qRT-PCR 法分析 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 信号通路相关 mRNA 的表达:Trizol 试剂盒提取关节软骨组织中总 RNA,反转录试剂盒合成 cDNA,设计引物后参考 mRNA 模板反转录 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 的扩增,引物序列:NLRP3 上游引物 5'-AGGTATAGTCGCAACTA,下游引物 5'-GTGAGAG AATTGAGTG; NF- κ B 上游引物 5'-CCTGTAA CGCCGAATA,下游引物 5'-CTGATCCGA CATTGTCGC; Caspase-1 上游引物 5'-GGAGAAGT GAAAATTG,下游引物 5'-ATCTCTTGCCTTTGC; β -actin 上游引物 5'-CACAGCCACTGAATTACACC,下游引物 5'-CCTTTGCTGCTTCGCGTTC。扩增条件:提取物 90 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,90 $^{\circ}$ C 30 s,循环 50 次,溶解曲线 60 $^{\circ}$ C ~95 $^{\circ}$ C,每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C, β -actin 作为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析计算 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,计量资料处理以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝关节直径及足趾容积变化

与空白组比较,模型组大鼠膝关节直径明显增长($P<0.05$),足趾容积明显增高($P<0.05$);干预后,与模型组对比,阳性对照组及益肾蠲痹丸干预组膝关节直径明显降低($P<0.05$),足趾容积显著减小($P<0.05$),其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组($P<0.01$)。见表 1。

2.2 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量变化

与空白组比较,模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量明显升高($P<0.05$);干预后,与模型组对比,阳性对照组及益肾蠲痹丸干预组血清 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量明显降低($P<0.05$),其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组($P<0.01$)。见表 2。

表1 各组大鼠膝关节直径及足趾容积变化比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 1 Comparison of knee diameter and toe volume among the groups ($\bar{x}\pm s, n=15$)

分组	膝关节直径/mm		足趾容积/mL	
	干预前	干预后	干预前	干预后
空白组	5.12±0.31	5.26±0.14	1.02±0.14	1.19±0.09
模型组	5.18±0.14	9.35±0.17*	1.03±0.16	1.82±0.13*
阳性对照组	5.08±0.23	6.43±0.21* [△]	0.99±0.17	1.33±0.16* [△]
益肾蠲痹丸低剂量组	5.06±0.22	8.75±0.26* [△]	0.98±0.21	1.77±0.22* [△]
益肾蠲痹丸中剂量组	5.12±0.18	7.96±0.17* [△]	1.01±0.15	1.61±0.19* [△]
益肾蠲痹丸高剂量组	5.11±0.21	6.81±0.22* ^{△▲}	1.02±0.16	1.44±0.21* ^{△▲}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[△] $P<0.05$;与低剂量组相比,[▲] $P<0.01$ 。

表2 各组大鼠 IL-1 β 、IL-18 及 VEGF 含量变化($\bar{x}\pm s, ng/L, n=15$)

Table 2 Changes in the contents of IL-1 β , IL-18, and VEGF in rats ($\bar{x}\pm s, ng/L, n=15$)

分组	IL-1 β	IL-18	VEGF
空白组	20.14±4.63	10.08±1.62	22.36±5.19
模型组	79.77±8.36*	31.15±5.33*	84.12±7.54*
阳性对照组	35.18±6.03* [△]	16.72±4.42* [△]	28.46±6.22* [△]
益肾蠲痹丸低剂量组	60.58±5.19* [△]	25.71±5.01* [△]	63.07±9.18* [△]
益肾蠲痹丸中剂量组	51.76±6.91* [△]	21.88±6.11* [△]	50.53±8.74* [△]
益肾蠲痹丸高剂量组	42.64±5.82* ^{△▲}	19.53±3.14* ^{△▲}	35.75±9.72* ^{△▲}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[△] $P<0.05$;与低剂量组相比,[▲] $P<0.01$ 。

2.3 膝关节 HE 染色变化

染色结果显示,空白组大鼠膝关节软骨细胞组织形态完整,细胞排列有序,细胞核充盈完整;模型组大鼠膝关节软骨组织结构改变,细胞排列紊乱,细胞核破损,出现炎性浸润;干预治疗后,阳性对照组及益肾蠲痹丸低、中、高剂量组大鼠膝关节软骨组织细胞逐渐恢复,细胞排列趋向整齐,炎性浸润逐渐减轻。见图1。

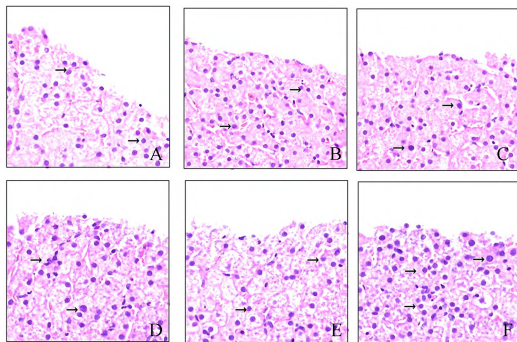


图1 膝关节 HE 染色

A: 空白组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D: 益肾蠲痹丸低剂量组; E: 益肾蠲痹丸中剂量组; F: 益肾蠲痹丸高剂量组。

Fig.1 HE staining of the knee joint

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Yishen Juanbi Pill low-dose group; E: Yishen Juanbi Pill medium-dose group; F: Yishen Juanbi Pill high-dose group.

2.4 骨细胞凋亡情况

空白组、模型组、阳性对照组及益肾蠲痹丸低、中、高剂量组细胞凋亡率分别为(11.77±1.76)%、(47.56±2.82)%、(18.71±3.53)%、(36.56±1.14)%、(29.57±4.08)%、(22.63±3.11)%，与空白组相比,各组造模后骨细胞凋亡率显著增加($P<0.05$);干预治疗后,各治疗组骨细胞凋亡率明显降低,其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组($P<0.01$)。

2.5 骨细胞 DNA 损伤情况

TUNEL 染色提示,绿色荧光代表细胞损伤。与空白组比较,模型组大鼠软骨细胞 TUNEL 染色阳性细胞率明显升高($P<0.05$),提示存在细胞核 DNA 损伤;与模型组比较,干预治疗后,各治疗组骨细胞 TUNEL 染色阳性凋亡率明显降低,其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组($P<0.01$)。见图2、3。

2.6 骨细胞中 Caspase-1 蛋白表达

空白组大鼠关节软骨组织中仅有少量Caspase-1蛋白表达。模型组大鼠软骨组织中 Caspase-1 蛋白出现大量表达。经过干预治疗后,阳性对照组及益肾蠲痹丸低、中、高剂量组大鼠骨组织 Caspase-1 蛋白表达明显降低。见图4。

2.7 关节软骨组织中 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1 蛋白表达

与空白组比较,模型组大鼠关节软骨组织中

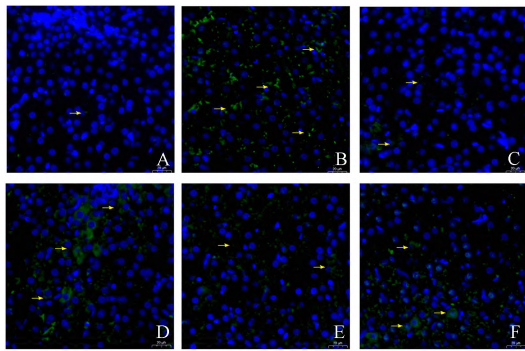


图 2 各组大鼠骨细胞 DNA 损伤情况比较
A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:益肾蠲痹丸低剂量组;E:益肾蠲痹丸中剂量组;F:益肾蠲痹丸高剂量组。

Fig.2 Comparison of DNA damage in rat osteocytes among the groups

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Yishen Juanbi Pill low-dose group; E: Yishen Juanbi Pill medium-dose group; F: Yishen Juanbi Pill high-dose group.

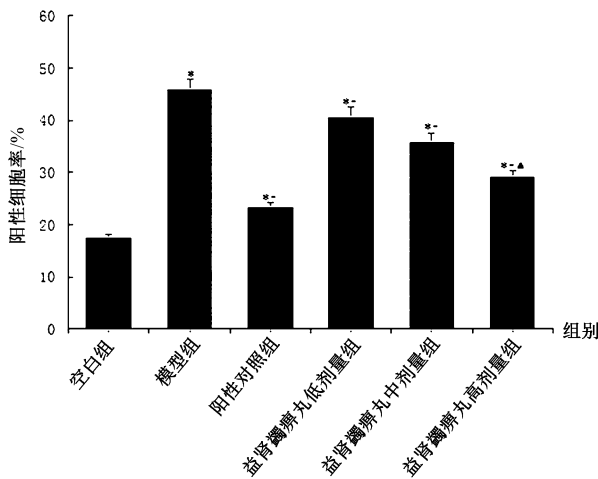


图 3 各组大鼠骨细胞 DNA 损伤情况

Fig.3 Comparison of DNA damage in osteocytes among the groups

注:与空白组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组相比, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠关节软骨组织中 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Comparison of NF- κ Bp65, p38MAPK, and Caspase-1 protein expression in articular cartilage tissues among the groups ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	NF- κ Bp65/ β -actin	p38MAPK/ β -actin	Caspase-1/ β -actin
空白组	0.019 \pm 0.004	0.022 \pm 0.011	0.051 \pm 0.014
模型组	0.204 \pm 0.005*	0.392 \pm 0.017*	0.722 \pm 0.021*
阳性对照组	0.097 \pm 0.003* Δ	0.083 \pm 0.009* Δ	0.101 \pm 0.016* Δ
益肾蠲痹丸低剂量组	0.181 \pm 0.012* Δ	0.311 \pm 0.004* Δ	0.622 \pm 0.014* Δ
益肾蠲痹丸中剂量组	0.153 \pm 0.005* Δ	0.256 \pm 0.012* Δ	0.506 \pm 0.008* Δ
益肾蠲痹丸高剂量组	0.118 \pm 0.007* Δ \blacktriangle	0.129 \pm 0.016* Δ \blacktriangle	0.218 \pm 0.011* Δ \blacktriangle

注:与空白组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组相比, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

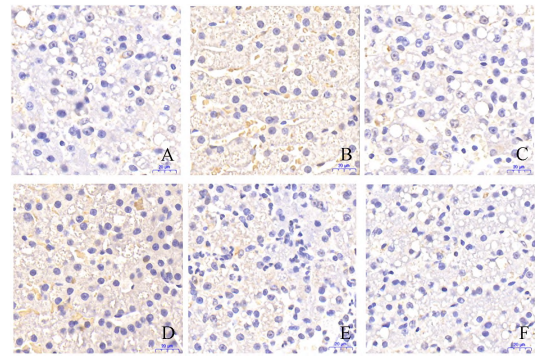


图 4 各组大鼠关节软骨组织 Caspase-1 蛋白表达情况

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:益肾蠲痹丸低剂量组;E:益肾蠲痹丸中剂量组;F:益肾蠲痹丸高剂量组。

Fig.4 Expression of caspase-1 protein in the rat articular cartilage

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Yishen Juanbi Pill low-dose group; E: Yishen Juanbi Pill medium-dose group; F: Yishen Juanbi Pill high-dose group.

NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1 蛋白表达量明显上升 ($P < 0.05$); 干预后, 与模型组比较, 阳性对照组及益肾蠲痹丸低、中、高剂量组大鼠 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1 蛋白表达量明显下降 ($P < 0.05$), 其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 5。

2.8 关节软骨组织中 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1mRNA 表达

与空白组比较, 模型组大鼠关节软骨组织中 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1mRNA 表达量明显上升 ($P < 0.05$); 干预后, 与模型组比较, 阳性对照组及益肾蠲痹丸低、中、高剂量组大鼠 NF- κ Bp65、p38MAPK、Caspase-1mRNA 表达量明显下降 ($P < 0.05$), 其中益肾蠲痹丸高剂量组显著优于低剂量组 ($P < 0.01$)。见表 4。

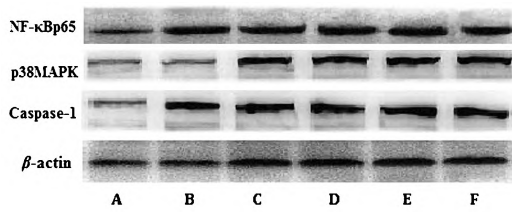


图5 关节软骨组织中 NF-κBp65、p38MAPK、Caspase-1 蛋白表达量

A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:益肾蠲痹丸低剂量组;E:益肾蠲痹丸中剂量组;F:益肾蠲痹丸高剂量组。

Fig. 5 Protein expressions of NF-κBp65, p38MAPK, and Caspase-1 in the articular cartilage A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Yishen Juanbi Pill low-dose group; E: Yishen Juanbi Pill medium-dose group; F: Yishen Juanbi Pill high-dose group.

3 讨论

KOA 最初见于《黄帝内经·素问·脉要精微论·篇十七》：“膝者筋之府，屈伸不能，行则倮附，筋将惫矣”。中医学将其归为“骨痹”“痹症”范畴，认为其病在筋骨。《张氏医通》指出：“膝为筋之府，膝痛无有不因肝肾虚者，虚则风寒湿气袭之。”《类证治裁痹证》及《医林改错》皆有瘀血致痹之说。以上说明 KOA 发病是由于肝肾亏损、气血不足导致气机不畅、邪实入侵，进而瘀血内阻，使筋骨失养，不荣则痛。目前临床无治疗 KOA 的特效药物，因此探究更有效的防治手段成为目前临床工作者的研究热点。益肾蠲痹丸在临床常用于治疗 KOA，该方包含熟地黄、淫羊藿、当归、全蝎等 20 余味药。研究发现，益肾蠲痹丸对于调节骨代谢，抑制炎症因子，减少骨代谢标志物的形成有良好效果^[9]。

表4 各组大鼠关节软骨组织中 NF-κBp65、p38MAPK、Caspase-1mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 4 Comparison of relative mRNA expressions of NF-κBp65, p38MAPK, and Caspase-1 in articular cartilage tissues among the groups ($\bar{x}\pm s, n=15$)

分组	NF-κBp65	p38MAPK	Caspase-1
空白组	0.016±0.007	0.022±0.006	0.018±0.003
模型组	0.923±0.051*	0.864±0.015*	0.905±0.012*
阳性对照组	0.106±0.007*△	0.099±0.012*△	0.121±0.008*△
益肾蠲痹丸低剂量组	0.772±0.015*△	0.757±0.008*△	0.711±0.016*△
益肾蠲痹丸中剂量组	0.521±0.016*△	0.632±0.015*△	0.593±0.015*△
益肾蠲痹丸高剂量组	0.203±0.014*△▲	0.173±0.011*△▲	0.148±0.012*△▲

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,△ $P<0.05$;与低剂量组相比,▲ $P<0.01$ 。

现代医学表明,KOA 发病时常伴有炎症细胞生命周期异常现象,其中淋巴细胞、内皮细胞、单核细胞及成纤维细胞等在免疫应答时会产生过量炎症介质,本研究结果也显示,大鼠在造模后出现明显软骨组织细胞炎性浸润病变,血清中 IL-1β、IL-18、VEGF 等相关炎症因子含量出现明显增加,表明血液中炎症因子含量增高并损伤软骨组织^[10-12]。这与朱玉辉等^[13]研究结果一致。细胞焦亡是巨噬细胞依赖细胞质中特殊的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 Caspase-1 介导的特殊程序性细胞死亡。研究表明,细胞焦亡与 KOA 发病存在密切联系^[2]。当 NLRP3/NF-κB/Caspase-1 信号通路被激活时,NLRP3 与细胞质中的凋亡相关斑点样蛋白氨基酸转运蛋白结合,并与 Caspase-1 形成炎症小体,同时激活 NF-κB 炎症通路,切割非活性前体(pro-IL-1β)及(pro-IL-18),成为活性的 IL-1β 和 IL-18 并引发持续性炎症反应,从而提高机体抵抗内源性和外源性刺激^[14-16]。本研究也发现,大鼠造模后,细胞凋亡

及 DNA 损伤明显增加,NLRP3/NF-κB/Caspase-1 信号通路相关蛋白及 mRNA 的表达均增高,这说明 KOA 发病时,机体中的细胞焦亡通路被激活并发生异常表达,该结果与喻溢楠等^[17]一致。相关研究发现,在 KOA 大鼠中,NLRP3 过表达可诱导 VEGF 表达的增加,而且 VEGF 会正反馈刺激 NLRP3 和 IL-18 含量的增长^[18-19]。本研究也发现,造模后大鼠体内 VEGF 含量伴随 NLRP3/NF-κB/Caspase-1 信号通路的表达明显升高。本研究还发现,KOA 大鼠在经过益肾蠲痹丸干预后,体内细胞凋亡率明显减弱,软骨细胞组织炎性浸润明显好转,IL-1β、IL-18 及 VEGF 含量显著降低,说明益肾蠲痹丸在改善 KOA 导致的膝关节软骨退变及炎性损伤方面有明显效果;而且不同浓度的益肾蠲痹丸干预下,KOA 大鼠体内 NLRP3/NF-κB/Caspase-1 信号通路相关蛋白及基因的表达明显降低,说明益肾蠲痹丸能够下调细胞焦亡关键通路的表达,抑制 NLRP3/NF-κB/Caspase-1 信号通路激活,从而改善 KOA 导致的炎

症反应及组织损伤。

综上所述,益肾蠲痹丸能够有效减轻 KOA 大鼠关节软骨组织病理改变,抑制细胞凋亡和炎症因子过表达,其机制可能与益肾蠲痹丸调控 NLRP3/NF- κ B/Caspase-1 信号通路改善细胞焦亡反应有关。后续课题组将继续深入探究益肾蠲痹丸治疗 KOA 的相关证据,以期指导临床。

【 参 考 文 献 】

- [1] Dragan P, Vilim M, Eduard R, et al. Knee osteoarthritis: A review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. *Genes*, 2020, 11(8):854.
- [2] 周绪昌,曹红,徐玥,等.细胞焦亡在骨关节炎中的作用机制研究进展[J]. *生命科学*, 2022, 34(4):401-408.
- [3] 陈坤浩,孙红,沈汶娟,等.细胞焦亡在关节软骨及椎间盘退变中的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39(6):1210-1215.
- [4] Chen Y, Liu YH, Jiang K, et al. Linear ubiquitination of LKB1 activates AMPK pathway to inhibit NLRP3 inflammasome response and reduce chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2023, 39:1-11.
- [5] Liu JB, Jia SS, Yang Y, et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158:114118.
- [6] 张宜丽.益肾蠲痹汤治疗膝关节骨关节炎(肝肾亏虚型)的临床疗效评价[D].郑州:河南中医药大学,2021.
- [7] 李长红,魏琴,魏思璐,等.体外冲击波联合益肾蠲痹丸治疗膝关节骨关节炎 167 例临床观察[J]. *风湿病与关节炎*, 2018, 7(3):42-45.
- [8] 颜春鲁,李盛华,安方玉,等.右归丸对膝骨性关节炎模型鼠基质金属蛋白酶及炎症因子表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(5):645-650.
- [9] 范卫闯,张文贤,吕立桃,等.益肾蠲痹丸对晚期踝关节炎关节镜下植骨融合术后患者骨代谢标志物水平及近期疗效的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(8):1644-1647.
- [10] Jia C, Li XC, Pan J, et al. Silencing of angiotensin-like protein 4 (Angptl4) decreases inflammation, extracellular matrix degradation, and apoptosis in osteoarthritis via the sirtuin 1/NF- κ B pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022:1135827.
- [11] Kong GG, Wang JY, Li R, et al. Ketogenic diet ameliorates inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2022, 24(1):113.
- [12] Li WX, Qian P, Guo YT, et al. Myrtenal and β -caryophyllene oxide screened from *Liquidambaris Fructus* suppress NLRP3 inflammasome components in rheumatoid arthritis[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1):242.
- [13] 朱玉辉,邹来勇,曹耀兴.强筋健骨胶囊联合双醋瑞因治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(10):2339-2343.
- [14] 智佳佳,杜朝政,王宇泽.骨关节炎形成过程中细胞焦亡的作用与机制[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(32):5204-5209.
- [15] Dong WR, Li H, Li YF, et al. Mechanism of Huanglian Wendan Decoction in improving impaired glucose tolerance based on skeletal muscle NLRP3/caspase-1/IL-1 β , IL-18 pathway[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2021, 46(17):4480-4487.
- [16] 胡笑桑,张增乔,何静,等.炎症小体介导细胞焦亡和自噬的相关研究[J]. *现代免疫学*, 2020, 40(5):412-418.
- [17] 喻溢楠,唐成林,郭啸,等.电针对膝骨关节炎大鼠膝关节滑膜组织细胞焦亡的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(6):471-478.
- [18] 刘杨,吕冰清,吴玉梅,等.木犀草素抑制类风湿关节炎大鼠 NLRP3 炎性小体活化增强关节骨保护作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1):513-516.
- [19] Zou YY, Cui BJ, Liang P, et al. Inhibition of NLRP3 protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by NF- κ B signaling[J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(2):174-181.

(收稿日期:2022-12-29;修回日期:2023-01-06)