

膝痹通络方通过调节MAPK-MEK信号通路延缓对白细胞介素1 β 诱导的关节软骨细胞退变

宋奕¹, 丁道芳^{2,3}, 朱寅¹, 王星华¹

(1. 苏州市中西医结合医院, 江苏苏州 215000; 2. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203; 3. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203)

摘要:【目的】观察膝痹通络方对白细胞介素1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞退变的影响, 并从丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)-MAPK激酶(MEK)信号通路探讨其机制。【方法】提取新生SD大鼠四肢关节软骨细胞, 选择P1代细胞进行实验, 共设5组: 正常对照组, IL-1 β 组, 高、中、低浓度中药组。正常对照组软骨细胞加入正常大鼠血清培养; IL-1 β 组软骨细胞加入正常大鼠血清、20 ng/mL IL-1 β 培养; 高、中、低浓度中药组软骨细胞分别加入对应浓度的膝痹通络方含药血清进行培养, 并加入20 ng/mL IL-1 β 。24 h后倒置显微镜下观察软骨细胞大小、密度、形态, 采用实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测软骨细胞基质金属蛋白酶3(MMP3)、聚蛋白多糖酶4/5(ADAMTS4/5)、蛋白多糖(A-CAN)、性别决定区Y框蛋白(SOX9)等软骨退变相关基因的表达, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测软骨细胞SOX9、基质金属蛋白酶13(MMP13)、磷酸化原癌基因丝氨酸蛋白激酶(P-Raf1)、Raf-1、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶(P-MEK1)、MEK1的蛋白表达。【结果】倒置显微镜下可见, 经IL-1 β 炎症因子诱导后的软骨细胞出现退变形态; qPCR结果显示, 与IL-1 β 组比较, 各浓度中药组MMP3、ADAMTS4/5的mRNA表达水平降低($P < 0.05$), A-CAN的mRNA表达水平升高($P < 0.05$), 高浓度中药组SOX9的mRNA表达水平升高($P < 0.05$); Western Blot结果显示, 与IL-1 β 组比较, 各浓度中药组软骨细胞MMP13蛋白表达, Raf1、MEK1磷酸化水平降低($P < 0.05$), SOX9蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。【结论】膝痹通络方可延缓IL-1 β 诱导的软骨细胞退变, 其机制可能与调节MAPK-MEK信号通路相关蛋白及基因表达有关。

关键词: 膝痹通络方; 膝关节炎; MAPK-MEK信号通路; 白细胞介素1 β ; 软骨细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)01-0135-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.01.025

Xibi Tongluo Recipe Delays IL-1 β -Induced Degeneration of Articular Chondrocytes through Regulating MAPK-MEK Signaling Pathway

SONG Yi¹, DING Dao-Fang^{2,3}, ZHU Yin¹, WANG Xing-Hua¹

(1. Suzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Suzhou 215000 Jiangsu, China; 2. Shi's Traumatology Medicine Center of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Institute of Orthopedics and Traumatology of Shanghai Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of *Xibi Tongluo* Recipe (XTR) on the degeneration of chondrocytes induced by interleukin 1 β (IL-1 β), and to explore its mechanism based on mitogen-activated protein kinase (MAPK) - MAPK kinase (MEK) signaling pathway. **Methods** The articular chondrocytes were isolated from newborn SD rats, and then the cells in first generation were selected and divided into 5 groups, namely normal control group, IL-1 β group, and high-, middle- and low- concentration XTR groups. The chondrocytes in the normal control group were cultured with rat normal serum, those in IL-1 β group were cultured with rat normal serum and 20 ng/mL of IL-1 β , and those in the high-, middle- and low- concentration XTR groups were cultured with high, middle and low concentrations of XTR-containing serum, respectively, and 20 ng/mL of

收稿日期: 2019-12-16

作者简介: 宋奕(1987-), 女, 硕士, 主治医师; E-mail: songyi2006514@163.com

通讯作者: 朱寅(1986-), 硕士, 主治医师; E-mail: 395344510@qq.com。王星华(1972-), 男, 主任医师; E-mail: 594524645@qq.com

基金项目: 苏州市科技局科技示范工程(编号: SS201815); 苏州市科技局指导性项目(编号: SYSD2016051); 江苏省中医药管理局科技项目(编号: YB201834)

IL-1 β . After 24 hours, the size, density and shape of chondrocytes were observed under inverted microscope, the levels of cartilage degeneration-related genes of matrix metalloproteinase 3 (MMP3), A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 4/5 (ADAMTS4/5), Aggrecan (A-CAN) and Sry related HMG box 9 (SOX9) were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and the protein expression levels of SOX9, matrix metalloproteinase 13 (MMP13), phosphorylated rapidly accelerated fibrosarcoma (P-Raf1), Raf-1, phosphorylated mitogen-activated protein kinase 1 (P-MEK1), MEK1 were detected by Western blotting assay. **Results** The changes in degeneration of chondrocytes were observed under inverted microscope. The qPCR results showed that compared with the IL-1 β group, the mRNA expression levels of MMP3 and ADAMTS4/5 were decreased, and A-CAN mRNA expression level was increased in the various concentrations of XTR groups ($P < 0.05$), and SOX9 mRNA expression level was increased in high-concentration XTR group ($P < 0.05$). Western blotting results showed that compared with the IL-1 β group, the protein expression level of MMP13, and phosphorylation levels of Raf1 and MEK1 in chondrocytes were decreased, and SOX9 protein expression level was increased in the various concentrations of XTR group ($P < 0.05$). **Conclusion** XTR has effects on delaying IL-1 β -induced degeneration of chondrocytes, its mechanism being related with regulating expression of relevant proteins and genes in MAPK-MEK signaling pathway.

Keywords: *Xibi Tongluo* Recipe; knee osteoarthritis (KOA); MAPK-MEK signaling pathway; interleukin 1 β (IL-1 β); chondrocytes

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 好发于使用频繁, 且负重大、活动多的关节, 如膝、髋、脊柱、踝等, 其中又以膝关节骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 最为常见。根据最新的流行病学调查数据显示, 我国目前症状性 KOA 的患病率为 8.1%, 这一比例意味着我国目前大约有 1.1 亿 KOA 患者, 而 65 岁以上 KOA 患病率甚至已达到 50%^[1]。KOA 的主要病理改变是软骨的退行性变。正常情况下软骨细胞外基质的合成和降解是一个动态平衡的过程, 而在 KOA 状态, 这一平衡被打破, 最终导致软骨细胞的退变和凋亡, 细胞外基质的松散。有学者研究发现, 关节腔的炎症是导致这一平衡被打破的主要原因之一, 且 KOA 发病过程中的炎症反应及软骨退变都有丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)-MAPK 激酶 (MEK) 信号通路参与。对于 KOA 的治疗, 目前除了健康教育 and 功能锻炼外, 仍以药物治疗为主。膝痹通络方是苏州市中西医结合医院治疗 KOA 的经验方, 临床取得较好疗效, 能显著改善膝关节疼痛及活动度。炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 是 KOA 炎症反应中的关键因子, 本研究通过以其诱导软骨细胞退变模拟 KOA 软骨退变, 观察膝痹通络方含药血清对退变软骨细胞的影响, 并从 MAPK-MEK 信号通路

探讨其作用机制, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 新生 24 h 雌性 SD 大鼠 10 只, 清洁级雌性 3 月龄 SD 大鼠 20 只, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自上海实验动物资源中心, 动物质量合格证号: SCXK(沪 2008-0016)。

1.2 药物、试剂与仪器 膝痹通络方组成中药 (杜仲 10 g, 牛膝 10 g, 黄芪 20 g, 当归 10 g, 川芎 10 g, 白芍 10 g, 独活 10 g, 鸡血藤 30 g, 秦艽 6 g, 木瓜 10 g) 由苏州市中西医结合医院提供, 为江阴江天药业免煎颗粒剂; 胎牛血清、H-DMEM 培养基、胰蛋白酶 (法国 Biowest 公司); IL-1 β (美国 RD 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染料 (美国 Sigma 公司); PCR 试剂盒 (美国 Selleck 公司); 性别决定区 Y 框蛋白 (SOX9) 抗体、基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 抗体、磷酸化原癌基因丝苏氨酸蛋白激酶 (P-Raf1) 抗体、Raf1 抗体、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶 (p-MEK1) 抗体、MEK1 抗体、GAPDH 抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗体 (美国 EarthOx 公司)。离心机 (德国 Sigma 公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); IX41 显微镜 (日

本 Olympus 公司)。

1.3 软骨细胞培养方法及免疫荧光鉴定 采用上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心已成熟的软骨细胞培养方法^[2]。将 10 只新生 24 h 雌性 SD 大鼠脱颈椎处死,取双侧肱骨头处软骨,清除残留组织后剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小骨块,在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内用 1 g/L 的 II 型胶原酶消化 1 h,收集消化后的细胞悬浮液,并重复 3~4 次,悬浮液离心后收集细胞,细胞培养液重悬并接种细胞,隔日换液。取 P1 代细胞进行实验。

细胞鉴定:以 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 10 min 后磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,磷酸盐 Tween20 缓冲液(PBST)通透 20~30 min,体积分数 5% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭浸泡 1 h,加入 II 型胶原抗体(稀释度为 1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再用 PBS 清洗 3 次,加入 FITC 标记的抗小鼠二抗(稀释度 1:200),室温避光孵育 1 h,PBST 清洗 3 次后加入 DAPI 染液(10 μ g/L),5 min 后荧光倒置显微镜下观察细胞并拍照。

1.4 膝痹通络方含药血清制备 膝痹通络方中药颗粒剂混合后用开水冲泡,充分搅拌溶解、冷却,根据人-大鼠体表面积比值折算出大鼠口服剂量为 10.86 g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$,以 5.43、10.86、21.72 g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 的口服剂量分别设为低、中、高浓度组。将 20 只清洁级雌性 3 月龄 SD 大鼠随机分成 4 组,其中正常组 8 只,高、中、低浓度中药组各 4 只,每 200 g 体质量大鼠每日灌胃 2 mL,高、中、低浓度中药组大鼠分别对应灌胃高、中、低浓度膝痹通络方,正常组每日灌胃等体积生理盐水。每日灌服 1 次,连续 3 d。末次灌药 1 h 后腹主动脉取血,取上层血清 56 $^{\circ}$ C 灭活后过滤分装,于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 细胞分组培养 收集生长状态良好的软骨细胞,调整细胞密度为 5 \times 10 5 个/mL,以 5 mL 接种于直径 6 cm 培养皿,将细胞随机分为 5 组,即正常对照组、IL-1 β 组、高浓度中药组、中浓度中药组和低浓度中药组。正常对照组:加入正常大鼠血清培养;IL-1 β 组:加入正常大鼠血清和 20 ng/mL IL-1 β 培养;高、中、低浓度中药组:分别对应加入高、中、低浓度的膝痹通络方含药血清进行培养,并加入 20 ng/mL IL-1 β 。培养 24 h 后,倒置显微镜(100 倍)下观察软骨细胞大小、密度与形态,同时提取细胞 RNA 和蛋白进行定量聚合酶链反应(qPCR)和蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测。

1.6 qPCR 法检测软骨细胞 MMP3、SOX9、A-CAN、ADAMTS4/5 基因的表达 细胞培养 24 h 后,抽提软骨细胞总 RNA 并进行浓度测定,取 2 μ g RNA 逆转录,进行 qPCR 检测。每个样品设 3 个复孔,重复 3 次。以 GAPDH 作为内参基因,采用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达的相对变化,引物序列见表 1。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,初步变性 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s 变性,60 $^{\circ}$ C 30 s 退火,重复 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 30 s 延伸。

表 1 PCR 引物序列

基因名	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
MMP3	F:TCGGTGGCTTCAGTACCTTT	163
	R:CTGGAGAATGTGAGTGGGGT	
SOX9	F:ATCTCAAGGCGCTGCAA	99
	R:CGGTGGACCCTGAGATTG	
A-CAN	F:GCAGGGATAACGGACTGAAG	72
	R:GAGTAAAGTGGTCATAGTTCAGCTTG	
ADAMTS4	F:TCATGAACTGGGCCATGTCT	163
	R:GTCAGTGATGAATCGGGCAC	
ADAMTS5	F:AGCCATCCTGTTCACCAGAG	61
	R:CATTCCCAGGTTGTCACAT	
GAPDH	F:TTCACGGCACAGTCAAGG	114
	R:CTCAGCACCAGCATCACC	

1.7 Western Blot 法检测软骨细胞 SOX9、MMP13、P-Raf1、Raf1、P-MEK1、MEK1 蛋白表达 细胞培养 24 h 后进行细胞裂解提取蛋白,测定浓度,分装,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。蛋白电泳、转膜,温封闭液浸泡 1 h,加入上述一抗孵育过夜,洗膜后,再加入二抗温孵育 1 h,洗膜,化学发光法检测并 X 线胶片曝光显影,应用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

1.8 统计方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异通过单因素方差分析并采用 LSD-*t* 法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的免疫荧光染色鉴定 倒置荧光显微镜下观察到细胞质经 II 型胶原免疫荧光染色后发出鲜亮的红色荧光(见图 1-a),为强阳性表现,证实为软骨细胞,细胞核未着色,表明 II 型胶原

蛋白在细胞核内无表达。几乎所有细胞经 DAPI 染色后细胞核均发出蓝色荧光(见图 1-b)。图 1-c 为图 1-a 和图 1-b 的叠加, 绝大多数细胞表达 II 型胶原蛋白, 证明提取的软骨细胞纯度高。

2.2 各组软骨细胞形态比较 倒置显微镜下可见: 正常对照组软骨细胞呈三角形、多角形, 形态饱满, 融合后呈“铺路石”样; 与正常对照组比较, IL-1 β 组及各浓度中药膝痹通络方组软骨细胞形态明显细长、单薄, 呈长梭形改变, 呈明显的退变形态, 但各浓度中药组软骨细胞退变形态较 IL-1 β 组减轻。见图 2。

2.3 各组软骨细胞 MMP3、SOX9、A-CAN、ADAMTS4、ADAMTS5 基因表达比较 图 3 结果显示: 与正常对照组比较, IL-1 β 组软骨细胞 MMP3、ADAMTS4、ADAMTS5 mRNA 表达水平明

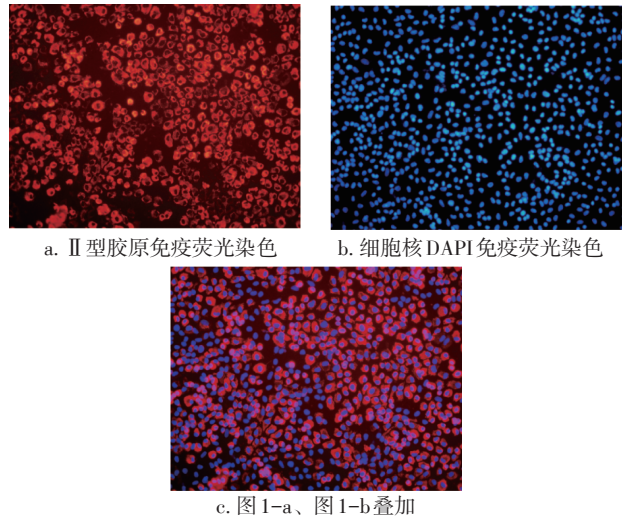


图 1 软骨细胞 II 型胶原的免疫荧光染色

Figure 1 Immunofluorescence staining results for type II collagen in chondrocytes

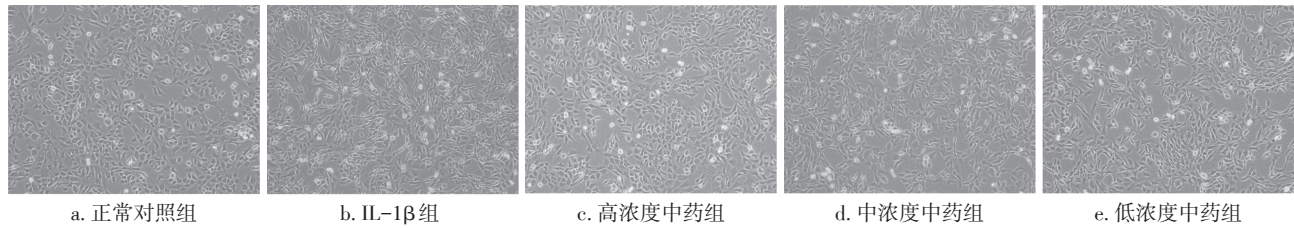
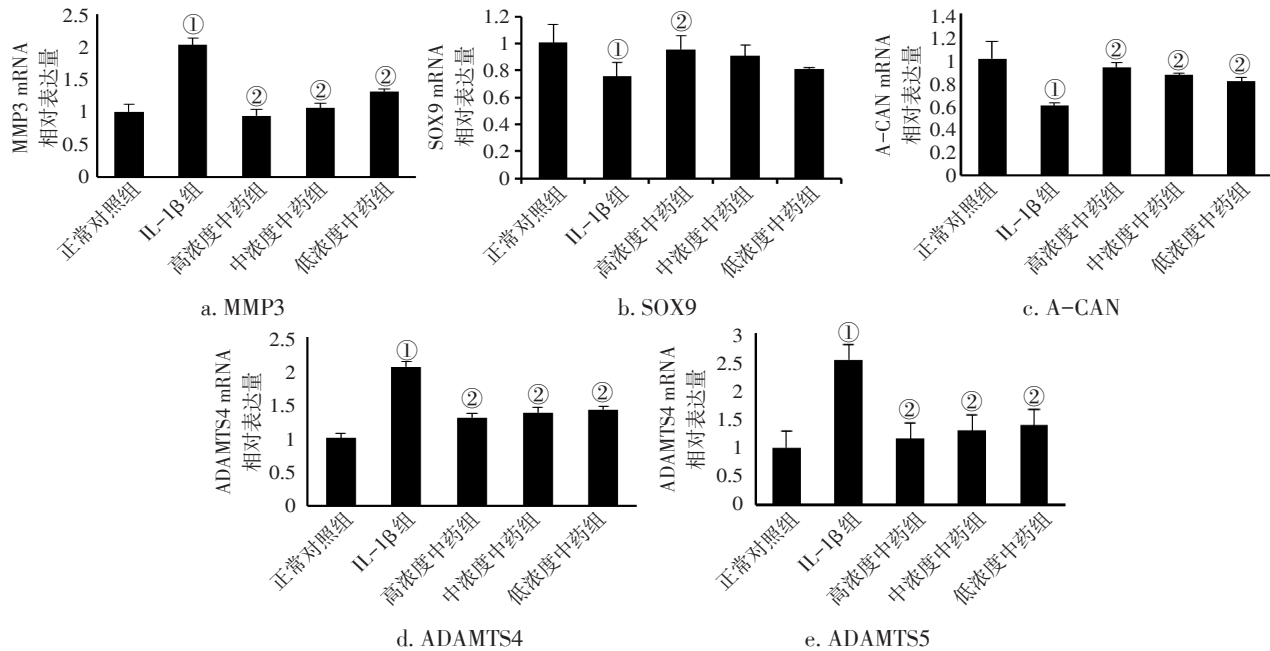


图 2 各组软骨细胞形态比较(x100)

Figure 2 Comparison of the morphological features of chondrocytes in various groups (x100)



①P < 0.05, 与正常对照组比较; ②P < 0.05, 与 IL-1 β 组比较

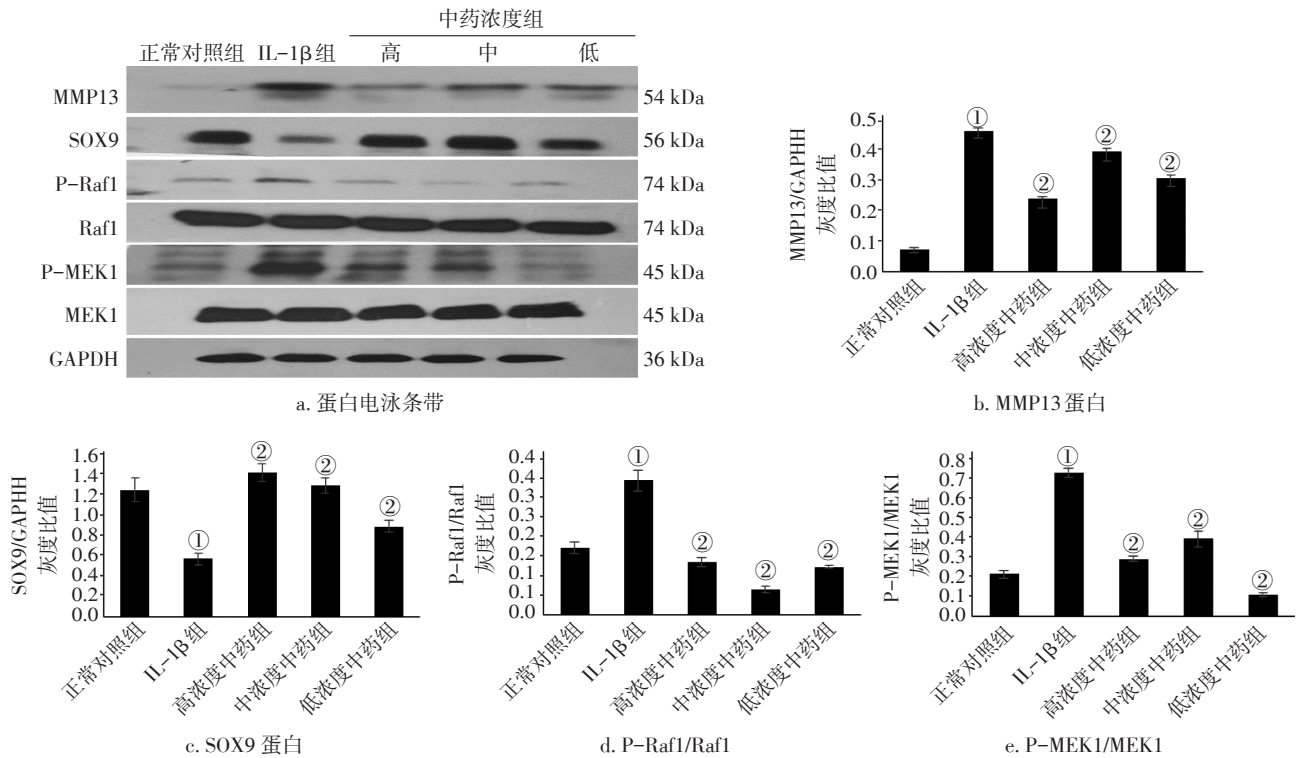
图 3 各组软骨细胞 MMP3、SOX9、A-CAN、ADAMTS4、ADAMTS5 基因表达比较($\bar{x} \pm s$)

Figure 3 Comparison of the expression levels of MMP3, SOX9, A-CAN, ADAMTS4, ADAMTS5 genes in chondrocytes of various groups($\bar{x} \pm s$)

显升高($P < 0.05$), SOX9、A-CAN mRNA 表达水平降低($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组比较, 各浓度中药组软骨细胞 MMP3、ADAMTS4、ADAMTS5 mRNA 表达水平明显降低, SOX9、A-CAN mRNA 表达水平升高, 其中, 高浓度中药组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 各组软骨细胞 MMP13、SOX9、P-Raf1、Raf1、

P-MEK1、MEK1 蛋白表达比较 图4结果显示: 与正常对照组比较, IL-1 β 组软骨细胞 MMP13 蛋白表达, Raf1、MEK1 磷酸化水平明显升高, SOX9 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$)。与 IL-1 β 组比较, 各浓度中药组 MMP13 蛋白表达、Raf1、MEK1 磷酸化水平明显降低, SOX9 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$)。



① $P < 0.05$, 与正常对照组比较; ② $P < 0.05$, 与 IL-1 β 组比较

图4 各组软骨细胞 MMP13、SOX9、P-Raf1、Raf1、P-MEK1、MEK1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

Figure 4 Comparison of the expression levels of MMP13, SOX9, P-RAF1, Raf1, P-Mek1, and MEK1 proteins in chondrocytes of various groups($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

3.1 KOA 的中医学认识 膝关节骨性关节炎(KOA)属于中医学“痹证”范畴, 历代医家对于其论述及治法各有特色。其虽病位在筋骨, 但本在于肾。老龄患者肝肾渐亏, 髓枯血虚, 筋骨失于濡养而不复坚固, 损伤或复感风、寒、湿、热等外邪时疼痛发作, 久病则筋脉挛缩, 无力束骨, 可引起关节不稳及屈伸不利症状。而血瘀则是机体衰退过程中潜在的病理因素, 外伤劳损、气候变化都可致瘀血痹阻, 阻碍筋骨关节的润养, 加重关节的退化^[3]。膝痹通络方是苏州市中西医结合医院骨科治疗 KOA 的经验方, 方中: 杜仲、牛膝补

肝肾、强筋骨; 黄芪补气健脾; 当归、川芎、白芍养血活血; 独活、鸡血藤、秦艽、木瓜祛风除痹, 舒筋通络。全方共奏补益肝肾、活血祛瘀之功。

3.2 KOA 的现代医学认识 现代医学认为, KOA 患者因为年龄增长及膝关节力线的改变, 膝关节长期处于疲劳状态, 关节稳定性下降, 软骨和半月板存在物理性磨损。而近些年来, 关节滑膜的炎症所扮演的角色越来越得到重视, 滑膜炎的进展程度可以直接反映 KOA 的严重程度, 也是 KOA 发生、发展的独立性危险因素^[4-5]。有学者对只有症状而无影像学改变的 KOA 患者进行关节镜

随防,发现约50%的患者关节镜下有局限性滑膜炎表现,且这些患者在1年之后,都出现了局部软骨破坏的表现^[6]。在关节退变的早期即有炎症的参与,并伴随软骨细胞的退变、细胞外基质的破坏。当关节滑膜受到刺激,可诱发滑膜内血管增生扩张、滑膜细胞的活跃增生等一系列反应,并释放大量炎症因子,侵蚀关节内软骨,软骨在化学性侵蚀及物理性摩擦的恶性循环下,进行性磨损、变薄甚至缺如,致关节间隙变窄,软骨下骨质硬化。研究发现,IL-1是关键性炎性因子之一,也是炎症发生的始动因素,可直接调节软骨细胞MMPs的生成,抑制蛋白多糖及Ⅱ型胶原等软骨基质的合成,促进软骨细胞的退变及凋亡,直接导致软骨的化学性损伤,加速骨关节炎的发生^[7]。IL-1又分IL-1 α 和IL-1 β 2种亚型,其中IL-1 β 是主要亚型,随着KOA的病情发展,关节内IL-1 β 可呈持续性增高,基于此,本研究采用IL-1 β 作为软骨细胞退变的诱导因子,模拟KOA患者体内软骨退变模型。

MMPs是一个庞大的蛋白酶超家族,其家族成员能降解几乎所有的细胞外基质,在膝关节,MMPs可因IL-1等炎症因子刺激后,由软骨细胞、滑膜细胞以及中性粒细胞产生,MMPs的过度表达,可加速软骨细胞外基质的降解,导致关节内软骨进行性破坏。在MMPs家族中,以MMP3和MMP13在KOA的参与度最为突出。膝关节软骨细胞外基质中最为主要的成分是Ⅱ型胶原,其次为蛋白多糖,MMP13是所有MMPs家族中降解Ⅱ型胶原蛋白能力最强的,而MMP3对于A-CAN又有较高的裂解活性,随着细胞外基质的降解,软骨的生物学特点发生改变,抗应力能力也大大下降,加速退变,因此,MMP3和MMP13是反映KOA软骨退变程度的重要标志物^[8]。与MMPs等经典蛋白酶相比,聚蛋白多糖酶家族(ADAMTSs)对KOA的影响在近些年才逐渐受到重视,其中ADAMTS4和ADAMTS5是软骨细胞外A-CAN的主要降解酶。研究发现,敲除ADAMTS4和ADAMTS5基因的小鼠在诱导KOA过程中,与正常小鼠相比,仅出现了轻度膝关节退变,特别是敲除ADAMTS5基因后,小鼠软骨缺损程度明显轻于敲除ADAMTS4基因及正常的小鼠^[9-10]。SOX9对软骨细胞及细胞外基质的调节起着至关重要的作用,

被称为软骨的“主调节因子”。SOX9可同时调控Ⅱ型胶原及A-CAN的表达促进软骨细胞外基质的生成与修复,又可抑制ADAMTS4和ADAMTS5等聚蛋白酶以及MMPs在KOA早期的表达,可以说是KOA软骨的保护器^[11-12]。

3.3 MAPK-MEK信号通路在KOA中的作用 IL-1等关节内炎症因子还能诱发软骨细胞中的一系列酶促反应,进一步加速软骨细胞的退变,其中MAPKs信号通路是参与骨关节炎中软骨破坏最重要的通路之一^[13]。MAPK-MEK通路是MAPKs家族中的经典通路,主要由Raf、MEK、ERK三级酶联功能单位构成,当其依次被磷酸化激活后,可诱发下游更为广泛的蛋白表达,在调节细胞生理应答过程中发挥重要作用。在膝关节中,上游的Ras活化可进一步激活Raf蛋白,Raf磷酸化后激活MEK1/MEK2,进而活化ERK1和ERK2,最后下游的转录因子进入软骨细胞核内参与细胞的增殖、分化、钙化等一系列生理病理过程,大大改变软骨细胞的内环境^[14]。当IL-1、TNF- α 等炎症因子与软骨细胞膜上的受体结合或机械应力刺激后,软骨细胞内的MAPKs信号通路被激活,引起MMPs大量表达,导致软骨被快速破坏,此外,该信号通路还广泛参与软骨细胞的凋亡、肥大、钙化等病理过程^[15]。针对MAPK-MEK信号通路的一些治疗,在临床和实验中也证实是有效的。Prasadam等^[16]给KOA大鼠关节腔注射透明质酸及UO126(MAPK-MEK通路抑制剂),结果发现UO126可明显抑制软骨细胞肥大相关蛋白(COL10和RUNX2)及退变相关蛋白(ADAMTS5和MMP13)的表达,延缓软骨细胞的退化,治疗效果优于未治疗组及单用透明质酸组。国内一些学者研究发现,电针、手法松解等中医传统医学也可通过调节该通路,达到改善关节疼痛症状,延缓关节退化,以及减轻关节炎症的目的^[17-18]。

3.4 膝痹通络方治疗KOA的机制探讨 膝痹通络方为我院经验方,临床疗效肯定。本研究从细胞分子生物学角度,对其治疗机制进行了探索。本研究在软骨细胞培养液中加入IL-1 β ,模拟软骨细胞退变,显微镜下直观可见细胞形态明显发生改变,与正常组相比呈扁平、狭长的退化形态。进一步以qPCR和Western Blot法检测相关基因及蛋白表达情况,发现MMPs、ADAMTS等促软骨细胞

退变的蛋白酶水平明显上升, 而抑软骨细胞退变的转录因子 SOX9 及 A-CAN 表达水平明显下降, 与既往研究^[7]结果相符。而加入不同浓度膝痹通络方含药血清组的软骨细胞虽也呈现退化状态, 但整体状态优于 IL-1 β 组。表明膝痹通络方可一定程度抑制 IL-1 β 所致的软骨细胞 MMPs、ADAMTs 的过表达, 亦可缓解 IL-1 β 对 SOX9、A-CAN 的抑制作用。

基于 MAPK-MEK 信号通路在 KOA 发病过程中的重要作用, 本研究进一步观察膝痹通络方含药血清对该信号通路的影响。MAPK-MEK 信号通路的活性主要取决于通路中相关磷酸化蛋白的水平, 而非总蛋白含量。本研究中, 软骨细胞经 IL-1 β 诱导后 Raf1、MEK 磷酸化水平显著增高, 证实了 IL-1 β 可上调 MAPK-MEK 信号通路的活性, 而各浓度中药组软骨细胞 Raf1 和 MEK 磷酸化水平较 IL-1 β 组明显下降, 提示膝痹通络方含药血清可抑制 IL-1 β 所诱导的 MAPK-MEK 信号通路的过度活跃。

综上所述, 膝痹通络方含药血清可抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞的退变, 保护软骨细胞, 其具体机制可能是抑制了 IL-1 β 所致的 MAPK-MEK 信号通路的过度活跃。但本实验仅为体外实验, 软骨细胞在体内和体外的生物学活性可能存在一定差异, 因此需进一步通过动物体内实验验证本方的有效性和安全性, 这也是本课题组下一步的研究计划。

参考文献:

- [1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018年版)[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12): 705-715.
- [2] 丁道芳, 庞坚, 杜国庆, 等. 体外器官培养建立软骨退变模型[J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(15): 1405.
- [3] 高世超. 补肾活血法对人骨关节炎软骨细胞 IL-1 β /MAPK 信号通路的影响[D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [4] FELSON D T, NIU J, NEOGI T, et al. Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3): 458-464.
- [5] WANG X, BLIZZARD L, HALLIDAY A, et al. Association between MRI-detected knee joint regional effusion-synovitis and structural changes in older adults: a cohort study [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(3): 519-525.
- [6] ARYAL X, PCKERING E H, WOODWORTH T G, et al. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13: 361-367.
- [7] T NOVAK, K FITES GILLILAND, X XU, et al. In vivo cellular infiltration and remodeling in a decellularized ovine osteochondral allograft [J]. Tissue Eng Part A, 2016, 22 (21-22): 1274-1285.
- [8] 管剑龙, 施桂英. 基质金属蛋白酶与骨关节炎 [J]. 中华风湿病学杂志, 2000(1): 54-56.
- [9] VERMA P, DALAL K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(12): 3507-3514.
- [10] FURTWANGLER T, CHAN S C, BAHRENBERG G, et al. Assessment of the matrix degenerative effects of MMP-3, ADAMTS-4, and HTRA1, injected into a bovine intervertebral disc organ culture model [J]. Spine, 2013, 38(22): E1377-E1387.
- [11] ZHANG Q, JI Q, WANG X, et al. SOX9 is a regulator of ADAMTSs-induced cartilage degeneration at the early stage of human osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(12): 2259-2268.
- [12] 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.
- [13] 王华敏, 宓轶群, 刚嘉鸿. 信号通路在膝骨关节炎实验研究中的进展 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2): 267-272.
- [14] 龙美兵. 基于 Raf-MEK-ERK 信号通路探讨龟板胶、鹿角胶对体外培养软骨细胞增殖的影响 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- [15] ROSE B J, KOOYMAN D L. A tale of two joints: the role of matrix metalloproteases in cartilage biology [J]. Dis Markers, 2016, 2016: 1-7.
- [16] PRASADAM I, MAO X, SHI W, et al. Combination of MEK-ERK inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(3): 369-380.
- [17] 华植. 经筋松解调控 MAPK 信号通路治疗兔膝骨关节炎的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [18] 付长龙, 陈后煌, 朱定钰, 等. 电针延缓骨关节炎软骨退变: 基于 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号通路的认识 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3790-3795.

【责任编辑: 侯丽颖】