

- [15] VILLEGAS L R, KLUCK D, FIELD C, et al. Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 1753-1764.
- [16] CHEN Z, WEN L, MARTIN M, et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of miRNA-92a[J]. *Circulation*, 2015, 131: 805-814.
- [17] 谭炜, 王清海, 靳利利, 等. 气虚痰浊和肝火亢盛型高血压患者脑血管内皮功能对比研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(4): 961-964.

【责任编辑：侯丽颖】

甘草甜素调节骨关节炎大鼠软骨代谢标记物表达及外周血 Th17/Treg 细胞失衡

朱滨¹, 张前燕², 华贤章¹, 骆渊城¹, 敖传西¹, 刘林³

(1. 湖北省恩施土家族苗族自治州民族医院骨伤科, 湖北恩施 445000; 2. 湖北省恩施土家族苗族自治州民族医院急诊科, 湖北恩施 445000; 3. 湖北民族大学附属民大医院骨科, 湖北恩施 445000)

摘要:【目的】探讨甘草甜素对骨关节炎大鼠软骨损伤的治疗作用及机制。【方法】将30只SD大鼠随机分为假手术组(6只)和造模组(24只)。造模组通过切断右侧前交叉韧带构建骨关节炎模型, 假手术组大鼠只剪开皮肤和关节腔。将造模成功的22只大鼠随机分为模型组(6只)、甘草甜素低剂量组(5只)、甘草甜素高剂量组(5只)、来氟米特组(6只)。甘草甜素低、高剂量组分别给予腹腔注射甘草甜素25、50 mg/kg, 来氟米特组给予灌胃来氟米特混悬液1.87 mg/kg, 模型组与假手术组大鼠腹腔注射同等体积的生理盐水, 每天1次, 连续给药3周。给药结束后, 番红O-快绿染色观察大鼠软骨组织病理损伤情况; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测软骨组织中Caspase-3、Caspase-9 mRNA表达情况; 蛋白免疫印迹法检测软骨组织中的Caspase-3、Caspase-9、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan、转化生长因子(TGF)- β 、p-Smad1、Smad1蛋白表达情况; 流式细胞仪检测外周血中辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)水平。【结果】与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织番红O染色重度或完全失染, 软骨组织中Caspase-3、Caspase-9的mRNA表达及蛋白活化水平均显著升高, MMP-1、MMP-13、TGF- β 蛋白表达及Smad1磷酸化水平均显著升高, Collagen II、Aggrecan蛋白表达水平均显著降低, 外周血中Th17细胞水平均显著升高, Treg细胞水平显著降低(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组番红O失染情况得到一定的缓解, 来氟米特组大鼠基本恢复至假手术组情况(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组及来氟米特组大鼠Caspase-3、Caspase-9的mRNA表达与蛋白活化水平显著降低, MMP-1、MMP-13、TGF- β 蛋白表达及Smad1磷酸化水平均显著降低, Collagen II、Aggrecan蛋白表达水平均显著升高, 外周血中Th17细胞水平均显著降低, Treg细胞水平显著升高(均 $P < 0.05$)。【结论】甘草甜素可能通过抑制TGF- β /Smad1信号途径, 抑制软骨降解与细胞凋亡, 纠正Th17/Treg细胞失衡, 降低免疫炎症反应来修复OA大鼠软骨损伤。

关键词: 甘草甜素; 骨关节炎; 软骨损伤; TGF- β /Smad1信号途径; Th17/Treg细胞平衡; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0358-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.02.025

收稿日期: 2019-11-26

作者简介: 朱滨(1979-), 男, 硕士, 主治医师; E-mail: zbjqww123@sina.com

基金项目: 湖北省卫生计生科研项目(编号: 150609204)

Glycyrrhizin Regulating Expression of Cartilage Metabolism Markers and Imbalance of Th17/Treg cells in Peripheral Blood in Osteoarthritis Rats

ZHU Bin¹, ZHANG Qian-Yan², HUA Xian-Zhang¹,
LUO Yuan-Cheng¹, AO Chuan-Xi¹, LIU Lin³

(1. Dept. of Orthopedics and Traumatology, National Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000 Hubei, China; 2. Dept. of Emergency, National Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000 Hubei, China; 3. Dept. of Orthopedics, People's University Hospital Affiliated to Hubei National University, Enshi 445000 Hubei, China)

Abstract: Objective To explore the therapeutic effects of glycyrrhizin on cartilage damage in rat with osteoarthritis (OA) and its mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into sham-operation group (6 rats) and modeling group (24 rats). The rats in the modeling group were induced into OA model by right anterior cruciate ligament transaction (ACLT), and rats in the sham-operation group were only given cutting open skin and articular cavity. And then 22 successful modeling rats were randomly divided into model group (6 rats), low-dose glycyrrhizin group (5 rats), high-dose glycyrrhizin group (5 rats), and leflunomide group (6 rats). The low- and high-dose glycyrrhizin group were given intraperitoneal injection of glycyrrhizin at the dosage of 25, 50 mg/kg, respectively, leflunomide group was given intragastrical administration of leflunomide suspension at the dosage of 1.87 mg/kg, and the sham-operation group and model group were given intraperitoneal injection of the same volume of normal saline, once per day, the treatment lasting 3 weeks. After medication, the cartilage damage situations in rats were observed by safranin oxygen-Brilliant Green staining. The mRNA expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and protein expression levels of Caspase-3, Caspase-9, matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-13, Collagen II, Aggrecan, transforming growth factor (TGF)- β , Smad1 and phosphorylated Smad1 (p-Smad1) in cartilage tissues were detected by Western blotting assay. The percentage of type 17 helper (Th17) cells/regulatory T (Treg) cells in peripheral blood from rats was measured by flow cytometry. **Results** Compared with the sham-operation group, the safranin oxygen staining of cartilage tissues was severe or completely lost in the model group, and mRNA expression and protein activation levels of Caspase-3 and Caspase-9 were increased ($P < 0.05$), levels of protein expression of MMP-1, MMP-13 and TGF- β as well as phosphorylation of Smad1 in cartilage tissues were enhanced, protein expression levels of Collagen II and Aggrecan were decreased, the percentage of Th17 cells in peripheral blood was significantly increased, and the percentage of Treg cells was significantly decreased (all $P < 0.05$). Compared with the model group, the staining loss was alleviated in low- and high-dose glycyrrhizin groups, and was basically recovered in the leflunomide group to the level in the control group, mRNA expression and protein activation levels of Caspase-3 and Caspase-9 were decreased ($P < 0.05$), levels of protein expression of MMP-1, MMP-13 and TGF- β as well as phosphorylation of Smad1 in cartilage tissues were lowered, protein expression levels of Collagen II and Aggrecan were increased, the percentage of Th17 cells in peripheral blood was significantly decreased, and the percentage of Treg cells was significantly increased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Glycyrrhizin has effects on repairing cartilage damage in OA rats by inhibiting TGF- β /Smad1 signaling pathway, suppressing cartilage degradation and cartilage cell apoptosis, redressing Th17/Treg imbalance, contributing to reducing immune inflammatory response.

Keywords: glycyrrhizin; osteoarthritis; cartilage damage; TGF- β /Smad1 signaling pathway; Th17/Treg cell balance; rats

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种老年群体容易罹患的慢性退行性关节疾病,其发病率随着

年龄的增长而升高,其临床病理表现为关节软骨缺损及软骨下骨质增生^[1]。目前,OA的发病机制

尚不完全清楚,但氧化应激、炎症因子、维生素D、肥胖等因素都可能导致OA的发生^[2],其中,炎症因子诱导的软骨细胞外基质(ECM)的过度降解和软骨退化被认为是OA发生的主要原因^[3]。甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根与根茎。味甘,性平,无毒。《本经》记载,甘草可除五脏六腑寒热邪气,坚筋骨,长肌肉,倍气力,金疮痈,解毒,久服轻身延年。《别录》记载,甘草温中下气,止渴,通经脉,利血气。甘草甜素是从甘草中提取的一种主要活性成分,具有高甜度、低热量、安全无毒等优点^[4],还有很好的抗炎^[5]、抗氧化活性^[6]及保护神经功能^[6]的功效。本次研究旨在探讨甘草甜素对OA大鼠模型的治疗作用及机制,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物 SPF级雄性4周龄SD大鼠30只,体质量264~282 g,购自北京阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2014-0009]。所有大鼠均饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[许可证号:SYXK(京)2015-0035],全天自由饮水。

1.2 药物、试剂与仪器 甘草甜素(中国食品药品检定研究院,批号:160904),纯度为99.9%,化学结构式见图1。兔抗Caspase-3、Caspase-9、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan、转化生长因子(TGF)- β 、Smad1、磷酸化Smad1(p-Smad1)、 β -actin多克隆抗体(美国Abcam公司);异硫氰酸荧光素(FITC)标记CD4单克隆抗体(美国BD Pharmingen公司);藻红蛋白标记的白细胞介素17(IL-17)、Foxp3单克隆抗体,别藻蓝蛋白标记的CD25单克隆抗体(美国

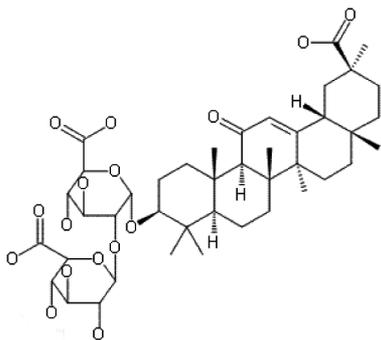


图1 甘草甜素的结构式

Figure 1 Structural formula of glycyrrhizin

eBioscience公司); Fixation/Permeabilisation 试剂盒(美国eBioscience公司);总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);正置荧光显微镜(美国Thermo公司);实时荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司);流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);VU-1206紫外分光光度计(日本Shimodzu公司)。

1.3 分组、动物模型制备^[7]与给药 将30只大鼠随机分为假手术组(6只)和OA造模组(24只)。造模组大鼠腹腔注射100 g/L水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,在手术及周围区域进行备皮,用湿纱布清洗后碘伏消毒,选择靠近右膝关节内侧处将皮肤和关节腔切开,将髌骨后翻,保持膝关节处于最大屈曲状态;暴露关节腔,利用显微器械切断膝前交叉韧带,避免损伤软骨,切断后通过抽屉实验确认前交叉韧带是否被切断。以右肢踝骨处出现歪曲和颤动,表示造模成功。假手术组大鼠只剪开皮肤和关节腔。所有操作完成后用生理盐水冲洗关节,对关节囊和皮肤处进行缝合,碘伏棉球擦洗伤口后贴上敷贴,然后将大鼠放于笼中,使之自由活动,密切关注伤口感染及其他并发症情况。24只大鼠共制备成功22只,将造模成功大鼠随机分为模型组(6只)、甘草甜素低剂量组(5只)、甘草甜素高剂量组(5只)、来氟米特组(6只)。甘草甜素低、高剂量组分别给予腹腔注射25、50 mg/kg甘草甜素,来氟米特组给予灌胃1.87 mg/kg来氟米特混悬液,模型组与假手术组大鼠腹腔注射同等体积的生理盐水。每天1次,连续给药3周。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 番红O染色 将各组大鼠麻醉后置于冰盒上取膝关节内侧胫骨平台后1/2处,用手术刀剪成0.5 cm \times 0.2 cm \times 0.5 cm的小骨块,漂洗后40 g/L多聚甲醛固定24 h。流水冲洗1 h后在100 g/L乙二胺四乙酸钠(EDTA)脱钙液中脱钙2个月,脱钙完成后进行常规标本脱水,浸蜡,石蜡包埋,连续切片5 μ m厚。二甲苯脱蜡后用无水乙醇和95%乙醇分别浸泡3 min,蒸馏水冲洗3 min,苏木精染色5 min,流水冲洗3 min后,快绿染色7 min,0.1%番红O染色8 min,95%乙醇浸洗3 min,无水乙醇浸洗2次(3 min/次),二甲苯透明,中性树胶封

固。显微镜下观察软骨退化情况。

1.4.2 qRT-PCR检测 按照总RNA提取试剂盒说明书上的操作步骤提取各组大鼠软骨组织中的总RNA,应用紫外分光光度计检测其吸光度(OD)值判定RNA的纯度($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为1.8~2.0),并用凝胶电泳检测RNA的完整性。按照反转录试剂盒说明书进行cDNA的合成。反转录体系(10 μL): 2 \times miRNA反应混合液5 μL , 0.1% BSA 1 μL , miRNA PrimeScript[®] RT酶混合物1 μL , 总RNA 0.5 μL , 去RNA酶ddH₂O 2.5 μL 。反应条件设置: 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。PCR体系10 μL : SYBR[®]Prmix Ex Tap II (2 \times)5 μL , 上游引物0.4 μL , 下游引物0.4 μL , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.2 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 3 μL 。PCR反应参数设置: 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸34 s, 40个循环。Caspase-3上游引物序列为5'-CAGACAGTGGAACTGACGAT-3', 下游引物序列为5'-TTTCAGCATGGCGCAAAGTG-3', 扩增片段长度564 bp; Caspase-9上游引物序列为5'-TTTTCTCCCAAAGCCTTCA-3', 下游引物序列为5'-AGTCTGCAGCTCCTCCACAT-3', 扩增片段长度482 bp; 内参基因 β -actin上游引物序列为5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 下游引物序列为5'-GTGCTGGTGAAGCTGTAGC-3', 扩增片段长度210 bp。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.4.3 蛋白免疫印迹法检测 提取各组大鼠软骨组织中的总蛋白,采用Bradford法调整各组蛋白浓度一致。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白并将蛋白转至甲醛预处理过的聚偏氟乙烯(PVDF)膜,密封2 h;分别加入Caspase-3、Caspase-9、MMP-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan、TGF- β 、p-Smad1、Smad1、 β -actin抗体等一抗(1:500稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)避光洗膜40 min,加入HRP标记的二抗(1:500稀释)避光孵育1 h, PBST避光漂洗3次,10 min/次。应用Odyssey红外荧光成像系统扫描PVDF膜,收集影像分析各组条带灰度值。

1.4.4 外周血辅助性T细胞(Th17)、调节性T细胞(Treg)细胞检测 取各组大鼠外周血5 mL,采用Ficoll密度梯度离心法将单个核细胞(PBMC)分离出来,以RPMI-1640培养液调整细胞浓度至

2×10^6 个/mL待用。

Th17细胞检测:将分离好的PBMC加入24孔板上,加入50 $\mu\text{g/L}$ 的佛波酯,1 $\mu\text{mol/L}$ 的离子霉素,750 $\mu\text{g/L}$ 的莫能霉素,混合均匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO₂条件下培养5 h。完成后将24孔板以2 000 r/min离心10 min,弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2次;加入FITC标记的CD4单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育20 min。根据Fixation/Permeabilisation试剂盒的说明书进行透膜/固定30 min。加入藻红蛋白标记的IL-17单克隆抗体,于对照管中加入同型对照抗体,室温避光反应30 min,染色后加入PBS重悬细胞然后上机检测。

Treg细胞检测:将分离好的PBMC加入24孔板上,加入FITC标记的CD4单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育20 min。加入别藻蓝蛋白标记的CD25单克隆抗体,根据Fixation/Permeabilisation试剂盒的说明书进行透膜/固定30 min后进行藻红蛋白标记的Foxp3单克隆抗体胞内染色。对照管中加入同型对照抗体,室温避光反应30 min,染色后加入PBS重悬细胞然后上机检测。

1.5 统计方法 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。若正态分布、方差齐,多组比较采用单因素方差分析,若非正态分布或方差不齐,采用多个样本比较的秩和检验,进一步两两比较采用LSD- t 检验或秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠软骨病理损伤情况比较 图2结果显示:假手术组软骨表面光滑,无裂隙,细胞分布均匀,番红O染色均染,无失染情况;模型组大鼠软骨出现大量的缺损及裂隙,细胞数减少,番红O染色重度或完全失染;甘草甜素低剂量组软骨表面有裂隙生成,深达中间层,软骨细胞增多,同源细胞群增多,番红O染色中重度失染;甘草甜素高剂量组软骨表面裂隙较少,表面平整,番红O染色轻中度失染;来氟米特组软骨表面无明显裂隙,表面平整,番红O染色均匀,无失染情况。

2.2 各组大鼠软骨组织中Caspase-3、Caspase-9表达水平比较 表1、图3结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织中Caspase-3、Caspase-9

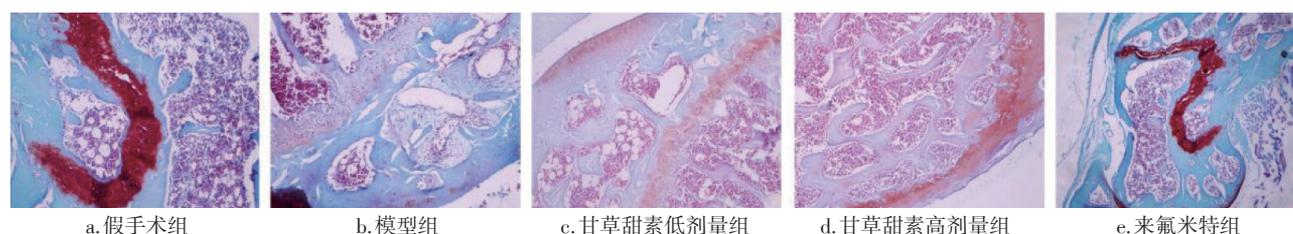


图2 各组大鼠软骨病理损伤情况比较(番红O染色, ×200)

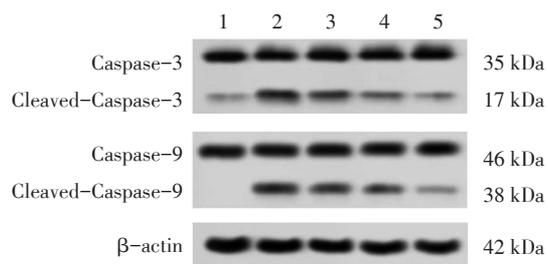
Figure 2 Comparison of the features of rat cartilage pathological damage in various groups (by safranin oxygen staining, ×200)

表1 各组大鼠软骨组织中Caspase-3、Caspase-9表达水平比较

Table 1 Comparison of the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 in rat cartilage tissues in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	mRNA 相对表达水平		蛋白活化水平	
		Caspase-3	Caspase-9	Caspase-3	Caspase-9
假手术组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	6	2.80 ± 0.40 ^①	3.20 ± 0.54 ^①	0.34 ± 0.05 ^①	0.36 ± 0.05 ^①
甘草甜素低剂量组	5	2.10 ± 0.43 ^{①②③}	2.40 ± 0.40 ^{①②③}	0.20 ± 0.06 ^{①②③}	0.17 ± 0.03 ^{①②③}
甘草甜素高剂量组	5	1.50 ± 0.28 ^{①②③④}	1.60 ± 0.45 ^{①②③④}	0.05 ± 0.03 ^{①②③④}	0.06 ± 0.03 ^{①②③④}
来氟米特组	6	1.23 ± 0.30 ^②	1.20 ± 0.30 ^②	0.01 ± 0.01 ^②	0.01 ± 0.01 ^②

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与来氟米特组比较; ④ $P < 0.05$, 与甘草甜素低剂量组比较



1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 甘草甜素低剂量组; 4. 甘草甜素高剂量组; 5. 来氟米特组

图3 各组大鼠软骨组织中Caspase-3、Caspase-9的Western Blot电泳条带

Figure 3 Western blotting strips of Caspase-3 and Caspase-9 in rat cartilage tissues in various groups

表2 各组大鼠软骨组织中软骨代谢相关蛋白MMP-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan表达水平

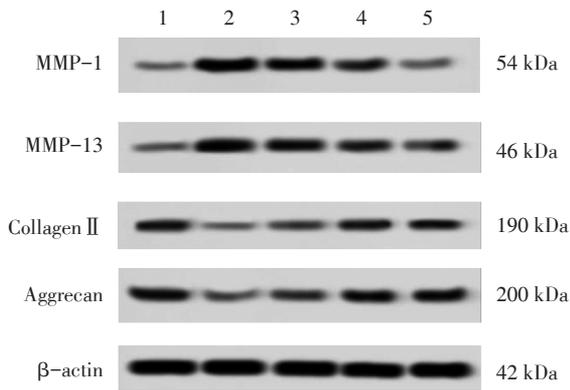
Table 2 Comparison of the expression levels of cartilage metabolism-related protein MMP-1, MMP-13, Collagen II and Aggrecan in rat cartilage tissues in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	MMP-1	MMP-13	Collagen II	Aggrecan
假手术组	6	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.05
模型组	6	0.83 ± 0.09 ^①	0.52 ± 0.06 ^①	0.01 ± 0.00 ^①	0.03 ± 0.01 ^①
甘草甜素低剂量组	5	0.43 ± 0.06 ^{①②③}	0.35 ± 0.07 ^{①②③}	0.05 ± 0.02 ^{①②③}	0.09 ± 0.04 ^{①③}
甘草甜素高剂量组	5	0.14 ± 0.05 ^{①②③④}	0.15 ± 0.05 ^{①②③④}	0.13 ± 0.04 ^{①②③④}	0.12 ± 0.04 ^{①②③④}
来氟米特组	6	0.06 ± 0.04 ^②	0.10 ± 0.04 ^②	0.15 ± 0.04 ^②	0.17 ± 0.06 ^②

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与来氟米特组比较; ④ $P < 0.05$, 与甘草甜素低剂量组比较

mRNA 相对表达和蛋白活化水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组大鼠软骨组织中Caspase-3、Caspase-9 mRNA 相对表达和蛋白活化水平显著降低($P < 0.05$), 且甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠软骨组织中软骨代谢相关蛋白MMP-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan 表达比较 表2、图4结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织中MMP-1、MMP-13蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), Collagen II、Aggrecan蛋



1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 甘草甜素低剂量组; 4. 甘草甜素高剂量组; 5. 来氟米特组

图4 各组大鼠软骨组织中MMP-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan的Western Blot电泳条带

Figure 4 Western blotting strips of MMP-1, MMP-13, Collagen II and Aggrecan in rat cartilage tissues in various groups

白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组大鼠软骨组织中MMP-1、MMP-13蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), Collagen II、Aggrecan蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 且甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠外周血中Th17、Treg细胞水平比较 图5、表3结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠外周血中Th17细胞水平均显著升高, Treg细胞水平显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组大鼠外周血中Th17细胞水平均显著降低, Treg细胞水平显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

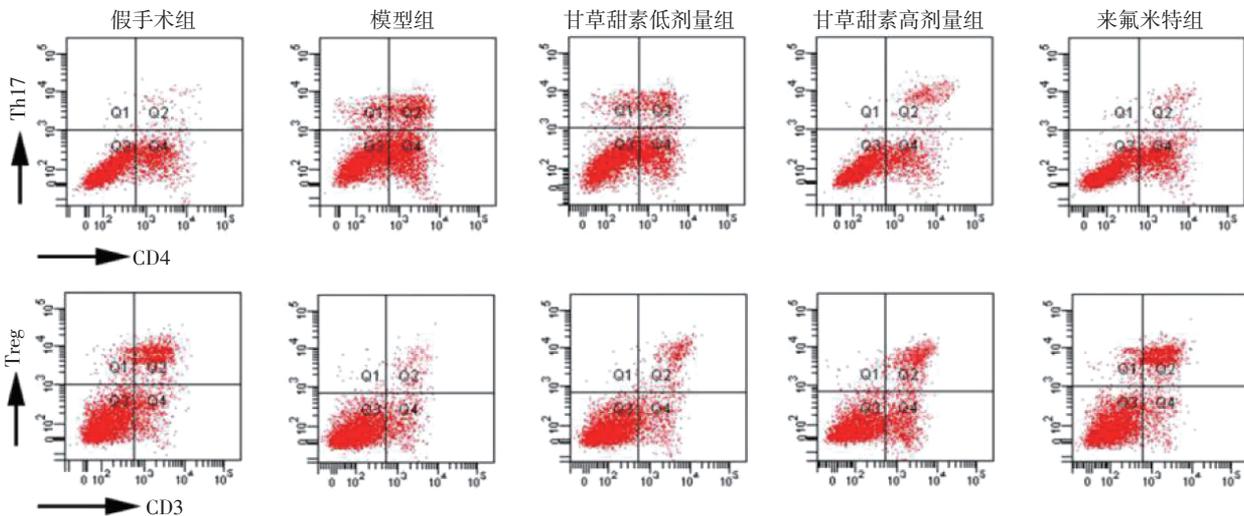


图5 各组大鼠外周血中Th17、Treg细胞分布比较(流式细胞术)

Figure 5 Comparison of the distribution of Th17 and Treg cells in rat peripheral blood in various groups (by flow cytometry)

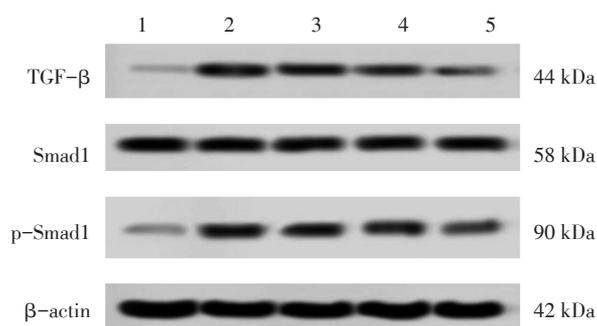
表3 各组大鼠外周血中Th17、Treg细胞水平比较

Table 3 Comparison of the percentage of Th17 and Treg cells in rat peripheral blood in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Th17(%)	Treg(%)
假手术组	6	1.4 ± 0.9	31.0 ± 6.0
模型组	6	37.0 ± 4.9 ^①	2.1 ± 0.6 ^①
甘草甜素低剂量组	5	21.0 ± 3.7 ^{①②③}	5.9 ± 1.6 ^{①②③}
甘草甜素高剂量组	5	9.0 ± 2.8 ^{①②③④}	19.6 ± 3.8 ^{①②③④}
来氟米特组	6	3.4 ± 1.5 ^{①②}	27.0 ± 4.9 ^{①②}

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与来氟米特组比较; ④ $P < 0.05$, 与甘草甜素低剂量组比较

2.5 各组大鼠软骨组织中TGF-β蛋白表达及Smad1活化水平比较 图6、表4结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织中TGF-β蛋白表达水平和Smad1蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组大鼠软骨组织中TGF-β蛋白表达水平和Smad1蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$), 且甘草甜素低、高剂量组和来氟米特组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 甘草甜素低剂量组; 4. 甘草甜素高剂量组; 5. 来氟米特组

图6 各组大鼠软骨组织中TGF-β、Smad1、p-Smad1蛋白的Western Blot电泳条带

Figure 6 Western blotting strips of TGF-β, Smad1 and p-Smad1 proteins in rat cartilage tissues of various groups

表4 各组大鼠软骨组织中TGF-β蛋白表达及Smad2活化水平比较

Table 4 Comparison of levels of TGF-β expression and Smad1 activation in rat cartilage tissues of various groups

组别	鼠数 (只)	TGF-β	
		表达水平	活化水平
假手术组	6	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
模型组	6	0.19 ± 0.03 ^①	0.15 ± 0.03 ^①
甘草甜素低剂量组	5	0.10 ± 0.02 ^{①②③}	0.08 ± 0.03 ^{①②③}
甘草甜素高剂量组	5	0.04 ± 0.02 ^{①②③④}	0.03 ± 0.01 ^{①②③④}
来氟米特组	6	0.01 ± 0.01 ^②	0.01 ± 0.00 ^②

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与来氟米特组比较; ④ $P < 0.05$, 与甘草甜素低剂量组比较

3 讨论

骨关节炎(OA)的发生与软骨细胞凋亡的关系密切。Caspase-3、Caspase-9是Caspases家族诱导细胞凋亡中的效应蛋白,在整个细胞凋亡通路中最终都是由Caspases-3来行使凋亡功能,因此,Caspases-3水平与细胞凋亡关系密切,而Caspases-9则是Caspases家族诱导细胞凋亡中最关键的启动子,在接受细胞凋亡信号及传递信号过程中发挥着重要的作用^[8]。本研究通过切断前交叉韧带构建OA大鼠模型,结果显示,模型大鼠软骨组织受损严重,出现大量番红O失染情况,腹腔注射甘草甜素后能够改善OA大鼠软骨组织损伤,且软骨组织中Caspase-3、Caspase-9 mRNA及蛋白表达水平均显著上调,而用甘草甜素处理后能够

抑制Caspase-3、Caspase-9的表达水平上调,表明甘草甜素可缓解骨关节炎引起的软骨细胞凋亡。该结果与卢伟等^[9]研究结果一致。

目前,研究报道证实,OA的发作可能与关节软骨细胞、细胞外基质(ECM)及软骨下骨降解及合成紊乱有关。关节软骨绝大部分组分为软骨基质,其余为软骨细胞,软骨的生理功能与其组分的形态及代谢稳定关系密切^[10],Collagen II、Aggrecan作为ECM的主要成分,当软骨组织结构遭到损伤时,会引起ECM异常降解,ECM相关组分的合成也随之减少,加重软骨组织的退化,导致OA发生^[11]。MMP-1、MMP-13作为基质金属蛋白酶家族(MMPs)的重要成员可降解ECM中的Collagen II、Aggrecan^[12-13]。本研究结果显示,模型组大鼠软骨组织中Collagen II、Aggrecan表达水平明显降低,MMP-1、MMP-13表达水平显著升高,而用甘草甜素处理后,Collagen II、Aggrecan表达水平升高而MMP-1、MMP-13表达水平降低,表明用甘草甜素处理能够抑制软骨组织ECM异常降解,促进ECM组分的合成,进而缓解OA的关节损伤。秦梦等^[13]研究结果表明,MMP-1、MMP-13表达的下调、Collagen II表达的上调是ECM降解破坏改善的表现,本研究结果与此一致。

软骨组织的炎症反应也是引起或加重OA的重要原因之一,Th17和Treg细胞在介导炎症反应、关节软骨及骨质破坏过程中发挥着重要的作用^[14]。Th17是一类CD4+T淋巴细胞亚群,主要是通过分泌效应因子IL-17促进MMPs蛋白表达来抑制蛋白聚糖及胶原等ECM组成成分的合成,从而加重软骨损伤^[15]。Treg细胞是一类具有免疫抑制活性的T淋巴细胞亚群,IL-10和TGF-β是其主要的效应因子,通过抑制T细胞及抗原细胞信号传递,从而抑制炎性细胞因子的合成及抗体的分泌^[16]。Foxp3是Treg细胞的重要转录因子,其表达量与Treg细胞的免疫抑制活性密切相关^[17],同时在体内能够促进Th2型细胞因子的分泌,抑制CD8+T细胞、NK细胞及CD4+T细胞对特异性抗原的反应,进而调节机体免疫功能^[18]。本研究结果显示,模型组大鼠外周血中Th17细胞水平显著升高,而Treg细胞水平显著降低,表明OA模型大鼠体内存在Th17/Treg细胞比例的失衡,并且向Th17细胞偏移,而甘草甜素干预能够逆转Th17/Treg细胞的失衡使其向

Treg细胞方偏移, 调节CD4+T淋巴细胞紊乱。周明伟等^[19]研究发现, 甘草甜素可以抑制免疫炎症反应, Th17/Treg细胞的失衡, 本研究结果与此一致。

有研究^[20]表明, TGF- β /Smad信号通路参与软骨组织的早期形成, 并能够调控软骨细胞稳态及表型特征, 是治疗OA的一个潜在靶点。TGF- β 在细胞增殖、识别、分化及凋亡过程中都发挥着重要的作用, 能够被蛋白水解酶MMP-2、MMP-9及活性氧簇(ROS)等物质激活启动下游通路^[21]。Smad蛋白作为TGF- β /Smad信号通路的核心作用因子, 在哺乳动物中有8个成员, 可以形成2条不同的信号通路对软骨细胞的终末分化过程起到完全相反的作用, TGF- β /Smad1信号通路则会引起软骨细胞肥大^[22]。本研究结果显示, 模型组大鼠软骨组织中TGF- β 蛋白及Smad1的磷酸化水平显著升高, 而甘草甜素干预能够显著抑制这一过程, 表明甘草甜素可能通过抑制软骨细胞中TGF- β 蛋白合成, 抑制Smad1蛋白磷酸化, 降低下游MMP-13蛋白合成, 使OA样软骨细胞表型受到抑制, 从而减轻OA软骨组织损伤。

综上所述, 甘草甜素能够修复OA软骨组织的损伤, 其机制可能是通过抑制TGF- β /Smad1信号通路, 限制MMP-1、MMP-13蛋白的合成, 进而抑制对骨代谢蛋白Collagen II、Aggrecan的降解作用, 同时抑制软骨细胞凋亡, 减轻OA导致的免疫炎症反应, 恢复Th17/Treg细胞的平衡, 从而发挥促进软骨组织修复及再生的作用。

参考文献:

- [1] MOBASHERI A, RAYMAN M P, GUALILLO O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5): 302-311.
- [2] NIU J, CLANCY M, ALIABADI P, et al. Metabolic syndrome, its components, and knee osteoarthritis: the framingham osteoarthritis study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(6): 1194-1203.
- [3] 蔡静玉, 王康, 徐建华, 等. 微小RNA在骨关节炎炎症代谢机制中的作用[J]. *中华风湿病学杂志*, 2015, 19(12): 845-848.
- [4] YOSHIKAWA M, MATSUI Y, KAWAMOTO H, et al. Effects of glycyrrhizin on immune-mediated cytotoxicity [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12(3): 243-248.
- [5] KIM J K, OH S M, KWON H S, et al. Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1215-1223.
- [6] GONG G, YUAN L, HU L, et al. Glycyrrhizin attenuates rat ischemic spinal cord injury by suppressing inflammatory cytokines and HMGB1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1): 11-18.
- [7] 张可可, 毕意辉, 陈学周, 等. 建立大鼠骨性关节炎模型及补体复合物表达研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(12): 1785-1789, 1790.
- [8] LIU H, ZHOU Y, TANG L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2445-2454.
- [9] 卢伟, 李德芳, 朱斌, 等. Caspase-9抑制剂对SD大鼠椎间盘软骨终板细胞凋亡的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 17-21.
- [10] ATTUR M, BELITSKAYALÉVY I, OH C, et al. Increased interleukin-1 β gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(7): 1908-1917.
- [11] 赵晓, 黄飞麒, 姚乃婕, 等. S100A11-RAGE通过P38MAPK信号转导通路调控小鼠骨关节炎软骨细胞肥大和细胞外基质代谢[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(16): 6-11.
- [12] 黄媛霞, 徐海斌, 郭春. 白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 及基质金属蛋白酶13在骨性关节炎中的表达及相关性[J]. *广东医学*, 2017, 38(15): 2301-2304.
- [13] 秦梦, 王和鸣, 娄玉铃. 骨痹舒含药血清对IL-1 β 作用下关节软骨细胞表达Type-II Collagen、MMP-1、MMP-13的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(6): 1426-1428.
- [14] PARK J S, OH Y, PARK O, et al. PEGylated TRAIL ameliorates experimental inflammatory arthritis by regulation of Th17 cells and regulatory T cells [J]. *J Control Release*, 2017, 267: 163-171.
- [15] KOENDERS M I, MARIJNISSEN R J, DEVESA I, et al. Tumor necrosis factor- interleukin- 17 interplay induces S100A8, interleukin-1 β , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(8): 2329-2339.
- [16] BOZEC A, ZAISS M M. T regulatory cells in bone remodelling [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(3): 121-125.
- [17] 陈硕, 聂汉祥, 刘琳琳. Treg细胞和Th17细胞的研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22(10): 1899-1903.
- [18] FRÉDÉRICVAN G, MICHELLE L T N, MAXWELL R M, et al. A mutation in the transcription factor Foxp3 drives T helper 2 effector function in regulatory T cells [J]. *Immunity*, 2019, 50(2): 362-377.e6.
- [19] 周明伟, 侯洁, 张青玲, 等. 甘草甜素修复小鼠坐骨神经损伤的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(3): 509-512.

- [20] 乔虎军, 王国祥, 郝鑫. 转化生长因子 β /Smad信号通路和骨关节炎研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(2): 63-71.
- [21] ANNES J P, MUNGER J S, RIFKIN D B. Making sense of latent TGF beta activation[J]. J Cell Sci, 2003, 116(2): 217-224.
- [22] GAARENSTROOM T, HILL C S. TGF- β signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 32: 107-118.

【责任编辑：侯丽颖】

葛根素通过抑制 I κ B α /NF- κ B p65 信号轴缓解大鼠非酒精性脂肪肝损伤

胡波¹, 徐颖², 丁辉³, 方学奇⁴, 王天宝⁵

(1. 河南省人民医院医学部, 河南郑州 450000; 2. 解放军联勤保障部队第九八八医院药剂科, 河南郑州 450007; 3. 河南省人民医院消化内科, 河南郑州 450000; 4. 解放军联勤保障部队第九八八医院医务处, 河南郑州 450007; 5. 新乡医学院第一附属医院肝脏中心, 河南卫辉 453100)

摘要:【目的】观察葛根素对大鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)的治疗作用及机制。【方法】将60只大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 葛根素低、中、高剂量组, 多烯磷脂酰胆碱组, 每组10只。除正常对照组外, 其余组别大鼠给予高脂饲料构建NAFLD模型。造模同时, 葛根素低、中、高剂量组分别给予葛根素10、50、100 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 多烯磷脂酰胆碱组给予多烯磷脂酰胆碱50 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 正常对照组和模型对照组给予等容量生理盐水灌胃。连续12周。以苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠肝脏组织病理变化, 全自动生化仪检测血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)水平, 酶联免疫吸附分析(EIISA)检测外周血肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平, 油红O染色法观察肝脏中脂肪沉积情况, 蛋白免疫印迹法检测肝组织Caspase-3、Caspase-9、核因子(NF) κ B抑制剂 α (I κ B α)、NF- κ B p65活化水平。【结果】与正常对照组比较, 模型对照组大鼠肝脏组织可见结构破坏、过多脂肪沉积, 血清ALT、AST、TG、TC、LDL、TNF- α 、IL-6、iNOS含量均显著升高($P < 0.05$), HDL含量显著降低($P < 0.05$), 肝组织Caspase-3、Caspase-9相对表达量, p-I κ B α /I κ B α 、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65比值均显著升高($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 葛根素中、高剂量组和多烯磷脂酰胆碱组可显著改善上述指标水平($P < 0.05$), 且葛根素高剂量组上述指标水平与多烯磷脂酰胆碱组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】葛根素可缓解NAFLD大鼠肝脏损伤, 降低血脂水平, 其机制可能与抑制I κ B α /NF- κ B p65信号轴有关。

关键词: 葛根素; 非酒精性脂肪肝; 肝损伤; I κ B α ; NF- κ B p65; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0366-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.02.026

收稿日期: 2019-10-26

作者简介: 胡波(1979-), 男, 硕士研究生, 副主任医师; E-mail: hubode2019@163.com

通讯作者: 徐颖(1982-), 女, 主管药师; E-mail: 172315852@qq.com