

马钱子总生物碱修复膝骨关节炎大鼠软骨损伤的效果观察及作用机制研究

王明喜, 张丽霞, 王长平

(安阳市中医院, 河南 安阳 455000)

摘要 目的:探讨马钱子总生物碱修复膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠软骨损伤的效果及作用机制。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、塞来昔布组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组,每组 10 只。模型组、塞来昔布组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组大鼠采用双侧后肢膝关节腔注射木瓜蛋白酶溶液建立 KOA 模型,造模完成 1 周后,从各组中随机选取 1 只大鼠,处死后取膝关节软骨,观察膝关节软骨组织形态,判断造模是否成功。造模成功后,马钱子总生物碱低、中、高剂量组大鼠分别以马钱子总生物碱混悬液进行灌胃,每日剂量分别为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;塞来昔布组大鼠以塞来昔布溶液(塞来昔布胶囊粉剂溶于去离子水中)进行灌胃,每日剂量为 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;正常对照组和模型组大鼠以生理盐水进行灌胃,每日 1 mL。药物干预 6 周后,处死所有大鼠,取大鼠一侧膝关节,观察膝关节软骨组织形态,并采用 Mankin's 评分法评价膝关节软骨损伤程度。根据膝关节软骨损伤程度评价结果,选取马钱子总生物碱低、中、高剂量组中软骨修复效果最佳的一组以及正常对照组、模型组和塞来昔布组进行膝关节软骨损伤相关基因 mRNA 和蛋白的表达分析。分别采用实时定量 PCR 和蛋白印迹法检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) - 9、MMP - 13、白细胞介素(interleukin, IL) - 1β 、糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK) - 3β 和 β -联蛋白(β -catenin)的 mRNA 和蛋白表达水平。结果:①模型鉴定结果。造模完成 1 周后,直视下观察,正常大鼠膝关节软骨呈胶冻样,表面光滑;KOA 模型大鼠膝关节软骨色泽暗淡,表面粗糙。膝关节软骨组织切片显示,正常大鼠膝关节软骨组织结构完整、潮线清晰,软骨细胞均匀分布;KOA 模型大鼠膝关节软骨组织结构模糊,潮线不完整或丢失,软骨细胞聚集,排列紊乱,提示造模成功。②膝关节软骨组织病理学检查结果。药物干预 6 周后,正常对照组大鼠膝关节软骨组织结构完整、潮线清晰,软骨细胞均匀分布;模型组大鼠膝关节软骨结构破坏严重,潮线模糊,软骨细胞聚集;马钱子总生物碱低、中、高剂量组大鼠膝关节软骨结构可辨识,软骨细胞聚集现象较模型组减少,且马钱子总生物碱中剂量组的大鼠软骨改善效果最明显;塞来昔布组大鼠膝关节软骨结构较完整、清晰,软骨细胞聚集现象不明显。③膝关节软骨损伤 Mankin's 评分结果。6 组大鼠膝关节软骨损伤 Mankin's 评分的组间差异有统计学意义[(0.28 ± 0.20)分, (8.97 ± 0.46)分, (7.12 ± 0.23)分, (3.23 ± 0.18)分, (6.21 ± 0.25)分, (0.77 ± 0.17)分, $F=8.025$, $P=0.000$]。正常对照组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组及塞来昔布组的膝关节软骨损伤 Mankin's 评分均低于模型组($LSD-t=54.785$, $P=0.000$; $LSD-t=11.316$, $P=0.000$; $LSD-t=36.747$, $P=0.000$; $LSD-t=16.671$, $P=0.000$; $LSD-t=21.626$, $P=0.000$);马钱子总生物碱低、中、高剂量组的膝关节软骨损伤 Mankin's 评分均高于塞来昔布组($LSD-t=70.210$, $P=0.000$; $LSD-t=31.420$, $P=0.000$; $LSD-t=56.902$, $P=0.000$);马钱子总生物碱中剂量组的膝关节软骨损伤 Mankin's 评分低于马钱子总生物碱低、高剂量组($LSD-t=42.119$, $P=0.000$; $LSD-t=30.590$, $P=0.000$)。④膝关节软骨损伤相关基因 mRNA 和蛋白表达检测结果。正常对照组、模型组、塞来昔布组及马钱子总生物碱中剂量组 4 组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL- 1β 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间差异均有统计学意义(mRNA 相对表达量: 0.312 ± 0.048 , 0.763 ± 0.062 , 0.361 ± 0.037 , 0.379 ± 0.042 , $F=2.851$, $P=0.016$; 0.209 ± 0.051 , 0.517 ± 0.028 , 0.262 ± 0.045 , 0.289 ± 0.044 , $F=3.834$, $P=0.027$; 0.116 ± 0.037 , 0.336 ± 0.024 , 0.147 ± 0.037 , 0.173 ± 0.035 , $F=4.523$, $P=0.033$;蛋白相对表达量: 0.143 ± 0.023 , 0.383 ± 0.055 , 0.162 ± 0.033 , 0.183 ± 0.021 , $F=4.533$, $P=0.021$; 0.267 ± 0.024 , 0.524 ± 0.021 , 0.290 ± 0.002 , 0.302 ± 0.040 , $F=5.124$, $P=0.018$; 0.205 ± 0.041 , 0.451 ± 0.021 , 0.229 ± 0.009 , 0.234 ± 0.010 , $F=4.896$, $P=0.031$)。模型组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL- 1β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于正常对照组(mRNA 相对表达量: $LSD-t=18.189$, $P=0.000$; $LSD-t=16.741$, $P=0.000$; $LSD-t=16.887$, $P=0.000$;蛋白相对表达量: $LSD-t=12.731$, $P=0.000$; $LSD-t=25.484$, $P=0.000$; $LSD-t=16.887$, $P=0.000$)。马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL- 1β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于模型组(mRNA 相对表达量: $LSD-t=16.215$, $P=0.000$; $LSD-t=13.825$, $P=0.000$; $LSD-t=12.146$, $P=0.000$; $LSD-t=10.743$, $P=0.000$; $LSD-t=15.539$, $P=0.000$; $LSD-t=29.503$, $P=0.000$;蛋白相对表达量: $LSD-t=17.607$, $P=0.000$; $LSD-t=15.215$, $P=0.000$; $LSD-t=13.552$, $P=0.000$; $LSD-t=$

10.896, $P=0.000$; $LSD-t=35.078$, $P=0.000$; $LSD-t=30.727$, $P=0.000$)。马钱子总生物碱中剂量组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量与塞来昔布组比较, 组间差异均无统计学意义 (mRNA 相对表达量: $LSD-t=1.107$, $P=0.323$; $LSD-t=1.357$, $P=0.192$; $LSD-t=1.614$, $P=0.124$; 蛋白相对表达量: $LSD-t=1.698$, $P=0.107$; $LSD-t=0.947$, $P=0.356$; $LSD-t=1.175$, $P=0.255$)。⑤ Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达检测结果。正常对照组、模型组、塞来昔布组及马钱子总生物碱中剂量组 4 组大鼠膝关节软骨组织中 GSK-3 β 、 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间差异均有统计学意义 (mRNA 相对表达量: 0.984 ± 0.055 , 0.367 ± 0.072 , 0.721 ± 0.066 , 0.698 ± 0.063 , $F=3.572$, $P=0.037$; 0.187 ± 0.047 , 0.521 ± 0.037 , 0.271 ± 0.038 , 0.301 ± 0.038 , $F=5.368$, $P=0.024$; 蛋白相对表达量: 0.406 ± 0.038 , 0.146 ± 0.036 , 0.357 ± 0.018 , 0.348 ± 0.031 , $F=4.533$, $P=0.021$; 0.184 ± 0.026 , 0.637 ± 0.042 , 0.247 ± 0.025 , 0.264 ± 0.022 , $F=5.124$, $P=0.018$)。模型组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于正常对照组 ($LSD-t=17.657$, $P=0.000$; $LSD-t=29.000$, $P=0.000$); 模型组大鼠膝关节软骨组织中 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于正常对照组 ($LSD-t=21.535$, $P=0.000$; $LSD-t=15.707$, $P=0.000$); 马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于模型组 (mRNA 相对表达量: $LSD-t=13.117$, $P=0.000$; $LSD-t=35.420$, $P=0.000$; 蛋白相对表达量: $LSD-t=14.906$, $P=0.000$; $LSD-t=34.192$, $P=0.000$); 马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于模型组 (mRNA 相对表达量: $LSD-t=10.941$, $P=0.000$; $LSD-t=13.446$, $P=0.000$; 蛋白相对表达量: $LSD-t=11.461$, $P=0.000$; $LSD-t=16.578$, $P=0.000$); 马钱子总生物碱中剂量组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 和 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量与塞来昔布组比较, 组间差异均无统计学意义 (mRNA 相对表达量: $LSD-t=0.591$, $P=0.562$; $LSD-t=0.797$, $P=0.436$; 蛋白相对表达量: $LSD-t=0.243$, $P=0.811$; $LSD-t=1.762$, $P=0.094$)。结论: 马钱子总生物碱能够有效修复 KOA 大鼠膝关节软骨损伤, 其修复效果与剂量有关; 马钱子总生物碱能够抑制大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13、IL-1 β 及 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达, 促进 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白表达, 且与塞来昔布的效果相当; 马钱子总生物碱抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可能是其修复膝关节软骨损伤的作用机制之一。

关键词 骨关节炎; 膝; 马钱子; 生物碱; 软骨损伤; Wnt/ β -catenin 信号通路; 大鼠; 动物实验

An experimental study of the effects and mechanism of action of total alkaloids extracted from nux-vomica for repairing cartilage injury in rats with knee osteoarthritis

WANG Mingxi, ZHANG Lixia, WANG Changping

Anyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anyang 455000, Henan, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of total alkaloids (TA) extracted from nux-vomica for repairing cartilage injury in rats with knee osteoarthritis (KOA) and to explore its mechanism of action. **Methods:** Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, model group, celecoxib group, TA low-dose group, TA middle-dose group and TA high-dose group, 10 cases in each group. The rats in model group, celecoxib group, TA low-dose group, middle-dose group and high-dose group were intervened by knee intra-articular injection of papain solution into bilateral hind limbs for inducing KOA. One week after the modeling, one rat was randomly selected from each group and were sacrificed, and their knee cartilages were harvested for observing the tissue morphology of knee cartilage to confirm whether the models were built successfully. After successful modeling, the rats in TA low-dose group, TA middle-dose group and TA high-dose group were intragastric administrated with nux-vomica TA suspension in daily dosages of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg respectively, the ones in celecoxib group with celecoxib solution (celecoxib capsule powders were dissolved into deionized water) in daily dosage of 24 mg/kg, and the ones in normal control group and model group with normal saline (NS) in daily dosage of 1 mL. After 6-week drug intervention, all rats were sacrificed and their knee joints were harvested for observing knee cartilage tissue morphology, followed by evaluation on the degrees of knee cartilage injury by using Mankin's scoring method. According to the result of evaluation on the degree of knee cartilage injury, the mRNA and protein expressions of genes related to knee cartilage injury were analyzed by using knee cartilage tissues of rats in the group with best repair effects among TA low-dose group, middle-dose group and high-dose group, and the ones of normal control group, model group and celecoxib group. The mRNA and protein expression levels of matrix metalloproteinase (MMP) -9, MMP-13, interleukin (IL) -1 β , glycogen synthase kinase (GSK) -3 β and β -catenin were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western-blot assays respectively. **Results:** One week after modeling, the knee cartilage presented with gelatinous appearance and smooth surface in normal rats, while dull color and rough surface in KOA model rats under direct vision. The knee cartilage tissue sec-

tions revealed that the knee cartilage tissues exhibited as complete structure, clear tidal line and evenly distributed chondrocytes in normal rats, while fuzzy structure, incomplete or missed tidal line as well as clustered and irregularly arranged chondrocytes in KOA model rats, which suggested that the models were successfully built. After 6-week drug intervention, the complete structure, clear tidal line and evenly distributed chondrocytes were found in knee cartilage tissues of rats of normal control group; while severely damaged articular cartilage structure, blurred tidal line as well as clustered chondrocytes were found in rats of model group; and discernible articular cartilage structure, decreased chondrocytes aggregation were found in rats of TA low-dose group, TA middle-dose group and TA high-dose group, and especially in TA middle-dose group; besides, more complete and clear articular cartilage structure and unobvious chondrocytes aggregation were found in rats of celecoxib group. There was statistical difference in Mankin's scores between the 6 groups ($0.28 \pm 0.20, 8.97 \pm 0.46, 7.12 \pm 0.23, 3.23 \pm 0.18, 6.21 \pm 0.25, 0.77 \pm 0.17$ points, $F = 8.025, P = 0.000$). The Mankin's scores were lower in normal control group, TA low-dose, TA middle-dose, TA high-dose group and celecoxib group compared to model group ($LSD - t = 54.785, P = 0.000$; $LSD - t = 11.316, P = 0.000$; $LSD - t = 36.747, P = 0.000$; $LSD - t = 16.671, P = 0.000$; $LSD - t = 21.626, P = 0.000$), and were higher in TA low-dose, middle-dose, high-dose group compared to celecoxib group ($LSD - t = 70.210, P = 0.000$; $LSD - t = 31.420, P = 0.000$; $LSD - t = 56.902, P = 0.000$), and were lower in TA middle-dose group compared to TA low-dose and high-dose group ($LSD - t = 42.119, P = 0.000$; $LSD - t = 30.590, P = 0.000$). There was statistical difference in relative expression levels of mRNA and protein of MMP-9, MMP-13 and IL-1 β in rat knee cartilage tissues between normal control group, model group, celecoxib group and TA middle-dose group (relative expression levels of mRNA: $0.312 \pm 0.048, 0.763 \pm 0.062, 0.361 \pm 0.037, 0.379 \pm 0.042, F = 2.851, P = 0.016$; $0.209 \pm 0.051, 0.517 \pm 0.028, 0.262 \pm 0.045, 0.289 \pm 0.044, F = 3.834, P = 0.027$; $0.116 \pm 0.037, 0.336 \pm 0.024, 0.147 \pm 0.037, 0.173 \pm 0.035, F = 4.523, P = 0.033$; relative expression levels of protein: $0.143 \pm 0.023, 0.383 \pm 0.055, 0.162 \pm 0.033, 0.183 \pm 0.021, F = 4.533, P = 0.021$; $0.267 \pm 0.024, 0.524 \pm 0.021, 0.290 \pm 0.002, 0.302 \pm 0.040, F = 5.124, P = 0.018$; $0.205 \pm 0.041, 0.451 \pm 0.021, 0.229 \pm 0.009, 0.234 \pm 0.010, F = 4.896, P = 0.031$). The relative expression levels of mRNA and protein of MMP-9, MMP-13 and IL-1 β in rat knee cartilage tissues were higher in model group compared to normal control group (relative expression levels of mRNA: $LSD - t = 18.189, P = 0.000$; $LSD - t = 16.741, P = 0.000$; $LSD - t = 16.887, P = 0.000$; relative expression levels of protein: $LSD - t = 12.731, P = 0.000$; $LSD - t = 25.484, P = 0.000$; $LSD - t = 16.887, P = 0.000$), and were lower in TA middle-dose group and celecoxib group compared to model group (relative expression levels of mRNA: $LSD - t = 16.215, P = 0.000$; $LSD - t = 13.825, P = 0.000$; $LSD - t = 12.146, P = 0.000$; $LSD - t = 10.743, P = 0.000$; $LSD - t = 15.539, P = 0.000$; $LSD - t = 29.503, P = 0.000$; relative expression levels of protein: $LSD - t = 17.607, P = 0.000$; $LSD - t = 15.215, P = 0.000$; $LSD - t = 13.552, P = 0.000$; $LSD - t = 10.896, P = 0.000$; $LSD - t = 35.078, P = 0.000$; $LSD - t = 30.727, P = 0.000$), and there was no statistical difference between TA middle-dose group and celecoxib group (relative expression levels of mRNA: $LSD - t = 1.107, P = 0.323$; $LSD - t = 1.357, P = 0.192$; $LSD - t = 1.614, P = 0.124$; relative expression levels of protein: $LSD - t = 1.698, P = 0.107$; $LSD - t = 0.947, P = 0.356$; $LSD - t = 1.175, P = 0.255$). There was statistical difference in relative expression levels of mRNA and protein of GSK-3 β and β -catenin in rat knee cartilage tissues between normal control group, model group, celecoxib group and TA middle-dose group (relative expression levels of mRNA: $0.984 \pm 0.055, 0.367 \pm 0.072, 0.721 \pm 0.066, 0.698 \pm 0.063, F = 3.572, P = 0.037$; $0.187 \pm 0.047, 0.521 \pm 0.037, 0.271 \pm 0.038, 0.301 \pm 0.038, F = 5.368, P = 0.024$; relative expression levels of protein: $0.406 \pm 0.038, 0.146 \pm 0.036, 0.357 \pm 0.018, 0.348 \pm 0.031, F = 4.533, P = 0.021$; $0.184 \pm 0.026, 0.637 \pm 0.042, 0.247 \pm 0.025, 0.264 \pm 0.022, F = 5.124, P = 0.018$). The relative expression levels of mRNA and protein of β -catenin were higher, and the relative expression levels of mRNA and protein of GSK-3 β were lower in model group compared to normal control group ($LSD - t = 17.657, P = 0.000$; $LSD - t = 29.000, P = 0.000$; $LSD - t = 21.535, P = 0.000$; $LSD - t = 15.707, P = 0.000$). The relative expression levels of mRNA and protein of β -catenin were lower, and the relative expression levels of mRNA and protein of GSK-3 β were higher in TA middle-dose group and celecoxib group compared to model group (relative expression levels of mRNA: $LSD - t = 13.117, P = 0.000$; $LSD - t = 35.420, P = 0.000$; $LSD - t = 10.941, P = 0.000$; $LSD - t = 13.446, P = 0.000$; relative expression levels of protein: $LSD - t = 14.906, P = 0.000$; $LSD - t = 34.192, P = 0.000$; $LSD - t = 11.461, P = 0.000$; $LSD - t = 16.578, P = 0.000$). There was no statistical difference in relative expression levels of mRNA and protein of β -catenin and GSK-3 β between TA middle-dose group and celecoxib group (relative expression levels of mRNA: $LSD - t = 0.591, P = 0.562$; $LSD - t = 0.797, P = 0.436$; relative expression levels of protein: $LSD - t = 0.243, P = 0.811$; $LSD - t = 1.762, P = 0.094$). **Conclusion:** The nux-vomica TA can effectively repair knee cartilage injury in KOA rats, and its repair effect is related to dose. The nux-vomica TA can inhibit the mRNA and protein expressions of MMP-9, MMP-13, IL-1 β and β -catenin and promote the mRNA and protein expression of GSK-3 β in knee cartilage tissues,

and its effect is equivalent to celecoxib. The nux-vomica TA can inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which may be one of its mechanisms in repairing knee cartilage injury.

Keywords osteoarthritis, knee; semen strychni; alkaloid; cartilage injury; Wnt/ β -catenin signaling pathway; rats; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以膝关节软骨退变和损伤为主要病理特征的慢性退行性疾病, 临床主要表现为膝关节疼痛、肿胀、功能障碍等^[1-2]。该病好发于老年人, 严重影响患者的生活质量^[3]。修复受损的软骨是治疗 KOA 的主要方法^[4], 临床采用膝关节腔注射透明质酸等药物治疗 KOA, 在一定程度上能够缓解膝部疼痛、改善膝关节活动度, 然而对于软骨损伤修复效果甚微^[5-9]。中药在修复软骨损伤方面表现出一定的优势, 马钱子常用于治疗骨关节炎, 能够促进软骨损伤修复, 临床疗效显著^[10-12]。马钱子的主要有效成分是马钱子总生物碱, 其修复软骨损伤的作用机制尚不明确。为了探讨马钱子总生物碱修复 KOA 软骨损伤的效果及作用机制, 我们建立了大鼠 KOA 模型, 并进行了相关实验研究, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 12 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (220 ± 10) g, 购自广东省科学院健康医学研究所, 实验动物许可证号: SYXK (粤) 2018 - 0183。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验试剂 木瓜蛋白酶 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 苏木精伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色试剂盒、放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 缓冲液、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测试试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 马钱子总生物碱 (丽珠集团利民制药有限公司), 塞来昔布胶囊 (美国辉瑞公司), 戊巴比妥钠 (上海信裕生物科技有限公司), 福尔马林 (济南百博生物技术有限公司), Trizol 试剂、PrimeScript TM RT 试剂盒 (日本 Takara 公司), SYBR - Green 定量 PCR 预混试剂 (北京康润诚业生物科技有限公司), 引物由生工生物工程股份有限公司合成, 兔抗鼠基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) - 9、MMP - 13、白细胞介素 (interleukin, IL) - 1 β 、糖原合成酶激酶 (glycogen synthase kinase, GSK) - 3 β 、 β - 联蛋白

(β - catenin) 和甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (美国 Abcam 公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 二抗 (上海赛信通生物试剂有限公司), UltraSignal 超敏化学发光底物 (北京四正柏生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器 7300 实时定量 PCR (real time quantitative PCR, RT - qPCR) 仪 (美国 ABI), Gel Doc XR⁺ 凝胶成像系统 (美国 Bio - rad), DM4000B 光学显微镜 (LEICA 公司)。

2 方法

2.1 造模及模型鉴定方法 采用随机数字表将 60 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、塞来昔布组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组, 每组 10 只。模型组、塞来昔布组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组, 均于大鼠双侧后肢膝关节腔注射 4% 木瓜蛋白酶溶液 0.2 mL, 每隔 2 d 注射 1 次, 共注射 3 次^[6]。第 3 次注射后, 每天驱使大鼠活动 2 h。于温度 (22 ± 2) °C、湿度 50% ~ 60% 条件下继续正常饲养 1 周后, 从各组中随机选取 1 只大鼠, 处死后取膝关节软骨, 制备石蜡切片, HE 染色后, 于直视和显微镜下观察, 判断造模是否成功。

2.2 干预方法 造模成功后, 开始进行药物干预。马钱子总生物碱低、中、高剂量组大鼠分别以马钱子总生物碱混悬液进行灌胃, 每日剂量分别为 50 mg · kg⁻¹、100 mg · kg⁻¹ 和 150 mg · kg⁻¹; 塞来昔布组大鼠以塞来昔布溶液进行灌胃 (塞来昔布胶囊粉剂溶于去离子水中), 每日剂量为 24 mg · kg⁻¹; 正常对照组和模型组大鼠以生理盐水进行灌胃, 每日 1 mL。所有大鼠均于温度 (22 ± 2) °C、湿度 50% ~ 60% 条件下正常饲养。

2.3 膝关节软骨损伤程度评价方法 药物干预 6 周后, 于大鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉, 采用颈椎脱臼法处死大鼠。每只大鼠取双侧后肢膝关节 (股骨远端 1/4 至胫骨近端 1/4), 左侧膝关节于 -80 °C 储存储备用, 右侧膝关节用于软骨损伤程度评价。将右侧膝关节于 10% 中性福尔马林固定液中固定; 1 周后, 取出膝关节, 用 PBS 冲洗, 放入乙二胺四乙酸粉末中

脱钙。4 周后,使用乙醇进行梯度脱水,采用石蜡包埋,沿矢状面切片,厚度 5 μm 。PBS 冲洗后,加入 HE 染色,封片,于显微镜下进行病理学检查。采用 Mankin's 评分法^[13]评价膝关节软骨损伤程度。

2.4 膝关节软骨损伤及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 表达分析方法 根据膝关节软骨损伤程度评价结果,选取马钱子总生物碱低、中、高剂量组中软骨修复效果最佳的 1 组以及正常对照组、模型组和塞来昔布组进行膝关节软骨损伤相关基因 mRNA 和蛋白的表达分析。从上述 4 组中分别取 5 只大鼠的单侧膝关节,收集软骨组织,采用 Trizol 法分别提取总 RNA。采用 PrimeScript TM RT 试剂盒反转录获得 cDNA。采用 SYBR - Green 定量 PCR 预混试剂进行 RT - qPCR,PCR 扩增引物见表 1,扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算膝关节软骨损伤相关基因 mRNA 的相对表达量。

2.5 膝关节软骨损伤及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因蛋白表达分析方法 从正常对照组、模型组、塞来昔布组及马钱子总生物碱中剂量组中分别取 5 只大鼠的单侧膝关节,收集软骨组织。分别研磨后,采用裂解混悬液(RIPA 缓冲液:PMSF = 1:100)提取总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。调整样品蛋白浓度一致后,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳结束后,将凝胶上的蛋白转至聚偏二氟乙烯膜,加入 3% 的 BSA 溶液于室温下封闭 2 h。采用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入兔抗鼠 MMP - 9、MMP - 13、IL - 1 β 、 β -catenin、GSK - 3 β 和 GAPDH 一抗,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,抗体使用比例均为 1:1000。再用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔

Ig G 二抗于室温下孵育 2 h,抗体使用比例为 1:4000。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 UltraSignal 超敏化学发光底物覆盖膜,室温孵育 1 min,将膜放入凝胶成像仪显影并拍照。采用 Image J 图像处理软件处理图片,并提取蛋白条带的灰度值,并分别以 GAPDH 蛋白为基准进行标准化处理,计算蛋白条带的相对灰度值,分析蛋白表达水平。

2.6 数据统计方法 采用 SPSS24.0 统计软件处理数据。各组大鼠 Mankin's 评分和 MMP - 9、MMP - 13、IL - 1 β 、 β -catenin、GSK - 3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD - t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 模型鉴定结果 造模完成 1 周后,直视下观察,正常大鼠膝关节软骨呈胶冻样,表面光滑;KOA 模型大鼠膝关节软骨色泽暗淡,表面粗糙。膝关节软骨组织切片显示,正常大鼠膝关节软骨组织结构完整、潮线清晰,软骨细胞均匀分布;KOA 模型大鼠膝关节软骨组织结构模糊,潮线不完整或丢失,软骨细胞聚集,排列紊乱,提示造模成功。见图 1。

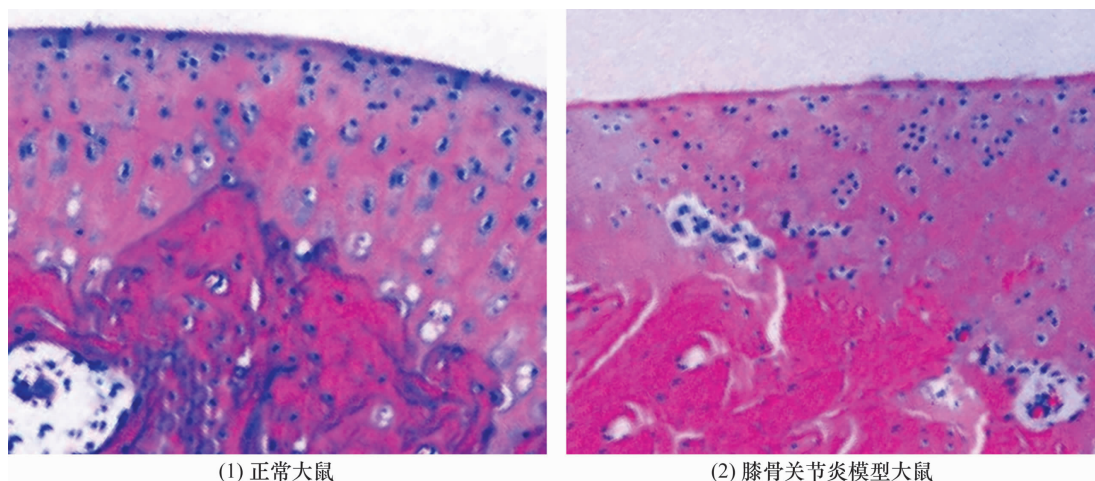
3.2 膝关节软骨组织病理学检查结果 药物干预 6 周后,正常对照组大鼠膝关节软骨组织结构完整、潮线清晰,软骨细胞均匀分布;模型组大鼠膝关节软骨组织结构破坏严重,潮线模糊,软骨细胞聚集;马钱子总生物碱低、中、高剂量组大鼠膝关节软骨组织结构可辨识,软骨细胞聚集现象较模型组减少,且马钱子总生物碱中剂量组的大鼠软骨改善效果最明显;塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织结构较完整、清晰,软骨细胞聚集现象不明显。见图 2。

3.3 膝关节软骨损伤 Mankin's 评分结果 6 组大鼠膝关节软骨损伤 Mankin's 评分的组间差异有统计学

表 1 PCR 扩增引物序列

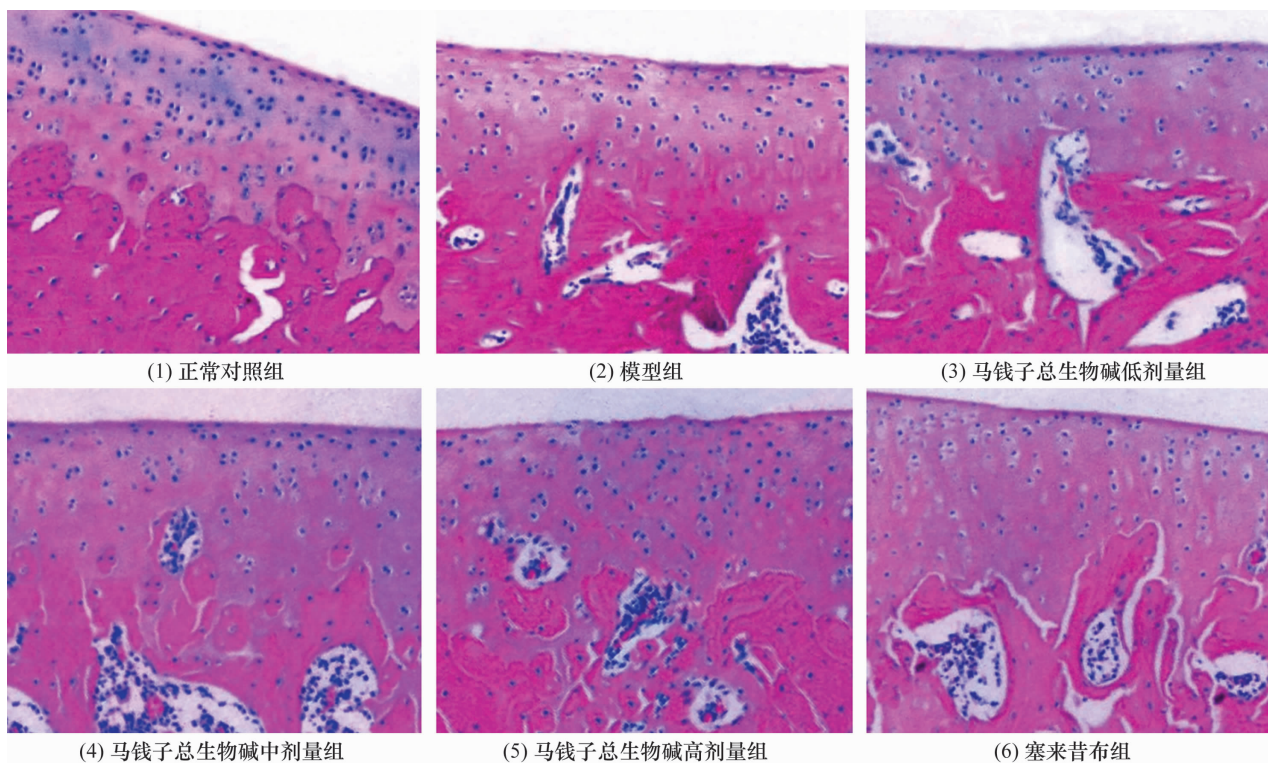
基因	正义链	反义链
MMP ¹⁾ - 9	5' - GTATTATTGACTACAT - 3'	5' - TGTGTTTAGTCCCTAAGTCG - 3'
MMP ¹⁾ - 13	5' - GTCAGGTTTCAGTTGCAT - 3'	5' - GCTAATCCTTAAGTAACTA - 3'
IL ²⁾ - 1 β	5' - GTAATTCCGTTAATTTTC - 3'	5' - CGTGCCTAAGTAACTAATCATGAT - 3'
GSK ³⁾ - 3 β	5' - GCTAATCCTAAGTAACTA - 3'	5' - GTCATTAGTCATTACGTACT - 3'
β -catenin ⁴⁾	5' - TGTAGTCTGATGCTATT - 3'	5' - TGTAGTAGATAGTAGTTATAT - 3'
GAPDH ⁵⁾	5' - GTCAGTCGGGATCGACA - 3'	5' - GTAGGTCACCTACGTTTACT - 3'

1) 基质金属蛋白酶;2) 白细胞介素;3) 糖原合成酶激酶;4) β -联蛋白;5) 甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶。



(1) 正常大鼠

(2) 膝骨关节炎模型大鼠

图 1 造模完成 1 周后大鼠膝关节软骨组织 HE 染色图片 ($\times 200$)

(1) 正常对照组

(2) 模型组

(3) 马钱子总生物碱低剂量组

(4) 马钱子总生物碱中剂量组

(5) 马钱子总生物碱高剂量组

(6) 塞来昔布组

图 2 干预 6 周后 6 组大鼠膝关节软骨组织 HE 染色图片 ($\times 200$)

意义[(0.28 ± 0.20)分, (8.97 ± 0.46)分, (7.12 ± 0.23)分, (3.23 ± 0.18)分, (6.21 ± 0.25)分, (0.77 ± 0.17)分, $F = 8.025$, $P = 0.000$]。正常对照组和马钱子总生物碱低、中、高剂量组及塞来昔布组的大鼠膝关节软骨损伤 Mankin's 评分均低于模型组 ($LSD - t = 54.785$, $P = 0.000$; $LSD - t = 11.316$, $P = 0.000$; $LSD - t = 36.747$, $P = 0.000$; $LSD - t = 16.671$, $P = 0.000$; $LSD - t = 21.626$, $P = 0.000$)。马钱子总生物碱低、中和高剂量组的大鼠膝关节软骨损伤 Mankin's 评分均高于塞来昔布组 ($LSD - t = 70.210$, $P = 0.000$; $LSD - t = 31.420$, $P = 0.000$; $LSD - t = 56.902$,

$P = 0.000$)。马钱子总生物碱中剂量组的大鼠膝关节软骨损伤 Mankin's 评分低于马钱子总生物碱低、高剂量组 ($LSD - t = 42.119$; $P = 0.000$; $LSD - t = 30.590$; $P = 0.000$)。

3.4 软骨损伤相关基因 mRNA 和蛋白表达分析结果
正常对照组、模型组、塞来昔布组及马钱子总生物碱中剂量组 4 组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间差异均有统计学意义。模型组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于正常对照组 (mRNA 相对表达量:

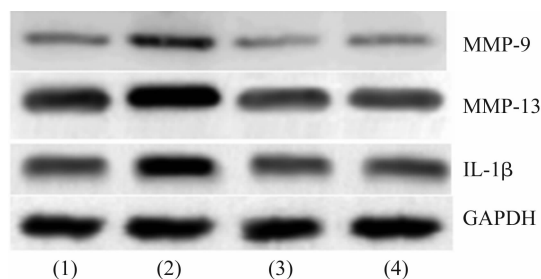
LSD - $t = 18.189, P = 0.000$; LSD - $t = 16.741, P = 0.000$; LSD - $t = 16.887, P = 0.000$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 12.731, P = 0.000$; LSD - $t = 25.484, P = 0.000$; LSD - $t = 16.887, P = 0.000$)。马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于模型组 (mRNA 相对表达量: LSD - $t = 16.215, P = 0.000$; LSD - $t = 13.825, P = 0.000$; LSD - $t = 12.146, P = 0.000$; LSD - $t = 10.743, P = 0.000$; LSD - $t = 15.539, P = 0.000$; LSD - $t = 29.503, P = 0.000$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 17.607, P =$

0.000 ; LSD - $t = 15.215, P = 0.000$; LSD - $t = 13.552, P = 0.000$; LSD - $t = 10.896, P = 0.000$; LSD - $t = 35.078, P = 0.000$; LSD - $t = 30.727, P = 0.000$)。马钱子总生物碱中剂量组大鼠膝关节软骨组织中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量与塞来昔布组比较, 组间差异均无统计学意义 (mRNA 相对表达量: LSD - $t = 1.107, P = 0.323$; LSD - $t = 1.357, P = 0.192$; LSD - $t = 1.614, P = 0.124$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 1.698, P = 0.107$; LSD - $t = 0.947, P = 0.356$; LSD - $t = 1.175, P = 0.255$)。见表 2 和图 3。

表 2 4 组大鼠膝关节软骨组织中软骨损伤相关基因 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/ 只	MMP ¹⁾ -9 ($\bar{x} \pm s$)		MMP ¹⁾ -13 ($\bar{x} \pm s$)		IL ²⁾ -1 β ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常对照组	5	0.312 \pm 0.048	0.143 \pm 0.023	0.209 \pm 0.051	0.267 \pm 0.024	0.116 \pm 0.037	0.205 \pm 0.041
模型组	5	0.763 \pm 0.062	0.383 \pm 0.055	0.517 \pm 0.028	0.524 \pm 0.021	0.336 \pm 0.024	0.451 \pm 0.021
塞来昔布组	5	0.361 \pm 0.037	0.162 \pm 0.033	0.262 \pm 0.045	0.290 \pm 0.002	0.147 \pm 0.037	0.229 \pm 0.009
马钱子总生物碱中剂量组	5	0.379 \pm 0.042	0.183 \pm 0.021	0.289 \pm 0.044	0.302 \pm 0.040	0.173 \pm 0.035	0.234 \pm 0.010
F 值		2.851	4.533	3.834	5.124	4.523	4.896
P 值		0.016	0.021	0.027	0.018	0.033	0.031

1) 基质金属蛋白酶; 2) 白细胞介素。



(1) 正常对照组; (2) 模型组; (3) 塞来昔布组; (4) 马钱子总生物碱中剂量组; MMP: 基质金属蛋白酶; IL: 白细胞介素; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 3 4 组大鼠膝关节软骨组织中软骨损伤相关基因蛋白印迹法检测蛋白表达结果

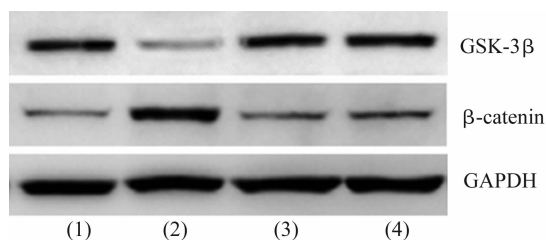
3.5 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达分析结果 正常对照组、模型组、塞来昔布组及马钱子总生物碱中剂量组 4 组大鼠膝关节软骨组织中 GSK-3 β 、 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间差异有统计学意义。模型组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于正常对照组 (LSD - $t = 17.657, P = 0.000$; LSD - $t = 29.000, P = 0.000$)；模型组大鼠膝关节软骨

组织中 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于正常对照组 (LSD - $t = 21.535, P = 0.000$; LSD - $t = 15.707, P = 0.000$)；马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于模型组 (mRNA 相对表达量: LSD - $t = 13.117, P = 0.000$; LSD - $t = 35.420, P = 0.000$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 14.906, P = 0.000$; LSD - $t = 34.192, P = 0.000$)；马钱子总生物碱中剂量组和塞来昔布组大鼠膝关节软骨组织中 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量高于模型组 (mRNA 相对表达量: LSD - $t = 10.941, P = 0.000$; LSD - $t = 13.446, P = 0.000$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 11.461, P = 0.000$; LSD - $t = 16.578, P = 0.000$)；马钱子总生物碱中剂量组大鼠膝关节软骨组织中 β -catenin 和 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量与塞来昔布组比较, 组间差异无统计学意义 (mRNA 相对表达量: LSD - $t = 0.591, P = 0.562$; LSD - $t = 0.797, P = 0.436$; 蛋白相对表达量: LSD - $t = 0.243, P = 0.811$; LSD - $t = 1.762, P = 0.094$)。见表 3 和图 4。

表 3 4 组大鼠膝关节软骨组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/只	GSK ¹⁾ -3 β ($\bar{x} \pm s$)		β -catenin ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常对照组	5	0.984 \pm 0.055	0.406 \pm 0.038	0.187 \pm 0.047	0.184 \pm 0.026
模型组	5	0.367 \pm 0.072	0.146 \pm 0.036	0.521 \pm 0.037	0.637 \pm 0.042
塞来昔布组	5	0.721 \pm 0.066	0.357 \pm 0.018	0.271 \pm 0.038	0.247 \pm 0.025
马钱子总生物碱中剂量组	5	0.698 \pm 0.063	0.348 \pm 0.031	0.301 \pm 0.038	0.264 \pm 0.022
F 值		3.572	4.533	5.368	5.124
P 值		0.037	0.021	0.024	0.018

1) 糖原合成酶激酶; 2) β -联蛋白。



(1) 正常对照组; (2) 模型组; (3) 塞来昔布组; (4) 马钱子总生物碱中剂量组; GSK-3 β : 糖原合成酶激酶; β -catenin: β -联蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 4 4 组大鼠膝关节软骨组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因蛋白印迹法检测蛋白表达结果

4 讨论

研究表明, KOA 膝关节软骨损伤与炎症反应密切相关^[14]。炎症因子 IL-1 β 过量表达会加剧 KOA 的炎症反应和软骨退化^[15]。MMP-9 和 MMP-13 能够降解细胞外基质, 加剧膝关节软骨的破坏, 促进 KOA 的发生和发展^[16-18]。本研究结果显示, 模型组 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达量均高于正常对照组, 而以剂量 100 mg \cdot kg⁻¹ 的马钱子总生物碱进行灌胃治疗后, 这些基因的表达量均低于模型组, 且和塞来昔布组相关基因的 mRNA 和蛋白表达量相当; 提示马钱子总生物碱能够通过抑制 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 的表达修复膝关节软骨损伤, 治疗 KOA。

Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 信号通路中的经典信号通路, 主要参与调节软骨细胞的增殖、分化、凋亡以及软骨基质的分解代谢^[19-20]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中重要的细胞内信号分子, GSK-3 β 能够使 β -catenin 磷酸化, 导致 β -catenin 失去活性, 使 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制; 当 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活时, Wnt 蛋白与跨膜受体 Lrp5/6 结合, 抑制 GSK-3 β 活性, 导致 β -catenin 在细胞核内聚集, 与 T 细胞转录因子或淋巴增强转录

因子结合, 形成转录复合物, 激活软骨细胞中 MMP-9、MMP-13 和 IL-1 β 等基因的表达^[21-25]。本实验结果显示, 与正常对照组比较, 模型组 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高, 而 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活; 与模型组比较, 塞来昔布组和马钱子总生物碱中剂量组中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低, 而 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制。因此, 马钱子总生物碱治疗大鼠 KOA 可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 进而抑制炎症反应, 促进 KOA 大鼠膝关节软骨损伤的修复。

本研究的结果表明, 马钱子总生物碱能够有效修复 KOA 大鼠软骨损伤, 其修复效果与剂量有关; 马钱子总生物碱能够抑制大鼠膝关节软骨组织 MMP-9、MMP-13、IL-1 β 及 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达, 促进 GSK-3 β 的 mRNA 和蛋白表达, 且与塞来昔布的效果相当; 马钱子总生物碱抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可能是其修复膝关节软骨损伤的作用机制之一。

参考文献

- [1] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis pathology, diagnosis, and treatment options [J]. Med Clin North Am, 2020, 104(2): 293-311.
- [2] FANG Q H, ZHOU C, NANDAKUMAR K S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis [J/OL]. Mediators Inflamm, 2020 [2020-10-12]. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/3830212/>.
- [3] REYNARD L N, BARTER M J. Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2020, 28(3): 275-284.
- [4] CHARLIER E, DERoyer C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA) [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 49-65.

(下转第 23 页)