

· 基础研究 ·

独活寄生汤治疗大鼠膝骨关节炎的作用机制研究

陈俊¹, 郑若曦², 叶锦霞³, 郑春松², 张婷², 戴雨婷², 洪江从⁴, 李民⁴, 吴广文²

(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建 福州 350122;

2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122;

4. 福建中医药大学附属康复医院, 福建 福州 350003)

摘要 目的:探讨独活寄生汤治疗大鼠膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的作用机制。方法:从 66 只大鼠中随机选取 48 只,采用改良 Hulth 法建立大鼠 KOA 模型,随机选择 3 只正常大鼠和 3 只建模大鼠进行鉴定。证实建模成功后,将剩余的 15 只正常大鼠纳入正常对照组,采用随机数字表将剩余的 45 只 KOA 模型大鼠分为 KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组,每组 15 只。正常对照组、KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠均按每天 10 mL · kg⁻¹ 分别以 0.9% 生理盐水、0.9% 生理盐水、独活寄生汤(浓度为 0.93 g · mL⁻¹)、盐酸氨基葡萄糖溶液(浓度为 0.015 g · mL⁻¹)灌胃,连续干预 12 周。12 周后,切取大鼠双侧胫骨近端和股骨下端的软骨组织。采用实时定量 PCR 检测大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)H19 及聚集蛋白聚糖(Aggrekan) mRNA、Ⅱ型胶原蛋白(Collagen II) mRNA 的表达量,采用蛋白印迹法检测大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan、Collagen II 的蛋白表达量。结果:①大鼠饲养结果。KOA 模型组大鼠因肺栓塞死亡 2 只,独活寄生汤治疗组大鼠因腹泻死亡 1 只,盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠因肺栓塞死亡 1 只。②大鼠胫骨近端软骨组织中 KOA 相关基因的 RNA 表达结果。正常对照组、KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrekan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量比较,组间差异均有统计学意义($F=83.050, P=0.000; F=436.003, P=0.000; F=129.212, P=0.000; F=135.844, P=0.000$)。KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、Aggrekan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量均低于正常对照组(miR-675-3p: $P=0.000; P=0.003; P=0.002$; Aggrekan mRNA: $P=0.000; P=0.000; P=0.000$; Collagen II mRNA: $P=0.000; P=0.000$); KOA 模型组大鼠胫骨近端软骨组织中 lncRNA H19 的表达量低于正常对照组($P=0.002$),独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 lncRNA H19 的表达量与正常对照组比较,差异无统计学意义($P=0.058, P=0.069$);独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、Aggrekan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量均高于 KOA 模型组(miR-675-3p: $P=0.000; P=0.000$; Aggrekan mRNA: $P=0.000; P=0.000$; Collagen II mRNA: $P=0.000; P=0.000$);独活寄生汤治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrekan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量与盐酸氨基葡萄糖治疗组比较,组间差异均无统计学意义($P=0.922; P=0.778; P=0.857; P=0.904$)。③大鼠股骨远端软骨组织中软骨组成相关基因的蛋白表达结果。正常对照组、KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组的大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan 和 Collagen II 的蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义($F=58.118, P=0.002; F=16.625, P=0.001$)。KOA 模型组、独活寄生汤治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan 的蛋白表达量均低于正常对照组($P=0.003; P=0.004$),盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan 的蛋白表达量与正常对照组相比,差异无统计学意义($P=0.078$),KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Collagen II 的蛋白表达量均低于正常对照组($P=0.000; P=0.028; P=0.018$),独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan 和 Collagen II 的蛋白表达量均高于 KOA 模型组(Aggrekan: $P=0.025; P=0.034$; Collagen II: $P=0.003; P=0.004$),独活寄生汤治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Aggrekan 和 Collagen II 的蛋白表达量与盐酸氨基葡萄糖治疗组比较,组间差异均无统计学意义($P=0.999; P=0.775$)。结论:独活寄生汤治疗大鼠 KOA 的作用机制,可能与其能够上调 miR-675-3p、lncRNA H19 的表达进而促进 Aggrekan、Collagen II 的表达有关。

关键词 骨关节炎;膝;软骨组织;独活寄生汤;大鼠, Sprague-Dawley; RNA; RNA, 长链非编码;聚集蛋白聚糖;胶原 II 型;动物实验

基金项目:国家自然科学基金项目(81774345)

通讯作者:吴广文 E-mail: wuguangwenfj@163.com

Study on mechanism of action of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤) in treatment of knee osteoarthritis in rats

CHEN Jun¹, ZHENG Ruoxi², YE Jinxia³, ZHENG Chunsong², ZHANG Ting², DAI Yuting², HONG Jiangcong⁴, LI Min⁴, WU Guangwen²

1. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China
2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China
3. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China
4. Rehabilitation Hospital affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of action (MoA) of Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤, DHJST) in treatment of knee osteoarthritis(KOA) in rats. **Methods:** Among the 66 rats, 48 ones were selected by using random digits table and subjected to surgery for inducing KOA by using modified Hulth method. Three normal rats and 3 model rats were randomly selected for confirming whether the models were built successfully. After successful modeling, the remained 15 normal rats were assigned into the normal control group, and the 45 KOA model rats were randomly divided into KOA model group, DHJST treatment group and glucosamine hydrochloride (GAH) treatment group by using random digits table, 15 cases in each group. The rats in normal control group, KOA model group, DHJST treatment group and GAH treatment group were intragastric administrated with 0.9% normal saline (NS), 0.9% NS, DHJST with concentration of 0.93 g/mL and GAH with concentration of 0.015 g/mL in daily dosage of 10 mL/kg respectively for consecutive 12 weeks. After the end of intervention, the cartilage tissues were harvested from bilateral proximal tibiae and terminal femora of rats in each group. The expression levels of miR-675-3p, long non-coding RNA (lncRNA) H19, Aggrecan mRNA and Collagen II mRNA in cartilage tissues of proximal tibiae were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and the protein expression levels of Aggrecan and Collagen II in cartilage tissues of terminal femora were detected by using Western-blot assays. **Results:** ①Two rats in KOA model group, 1 case in DHJST treatment group and 1 case in GAH treatment group died for pulmonary embolism (PE), diarrhea and PE respectively. ②The results of analysis on RNA expression of KOA-related genes in cartilage tissues of rat proximal tibiae. There was statistical difference in the expression levels of miR-675-3p, lncRNA H19, Aggrecan mRNA and Collagen II mRNA in cartilage tissues of rat proximal tibiae among normal control group, KOA model group, DHJST treatment group and GAH treatment group ($F = 83.050, P = 0.000; F = 436.003, P = 0.000; F = 129.212, P = 0.000; F = 135.844, P = 0.000$). The miR-675-3p, Aggrecan mRNA and Collagen II mRNA were lowly expressed in cartilage tissues of rat proximal tibiae in KOA model group, DHJST treatment group and GAH treatment group compared to normal control group (miR-675-3p: $P = 0.000; P = 0.003; P = 0.002; P = 0.000$; Aggrecan mRNA: $P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000$; Collagen II mRNA: $P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000$). The lncRNA H19 was lowly expressed in cartilage tissues of rat proximal tibiae in KOA model group compared to normal control group ($P = 0.002$) and there was no statistical difference between DHJST treatment group and normal control group as well as between GAH treatment group and normal control group ($P = 0.058; P = 0.069$). The miR-675-3p, lncRNA H19, Aggrecan mRNA and Collagen II mRNA were highly expressed in DHJST treatment group and GAH treatment group compared to KOA model group (miR-675-3p: $P = 0.000; P = 0.000$; lncRNA H19: $P = 0.000; P = 0.000$; Aggrecan mRNA: $P = 0.000; P = 0.000$; Collagen II mRNA: $P = 0.000; P = 0.000$), and there was no statistical difference between DHJST treatment group and GAH treatment group ($P = 0.922; P = 0.778; P = 0.857; P = 0.904$). ③The results of analysis on protein expression of cartilage composition-related genes in cartilage tissues of rat terminal femora. There was statistical difference in protein expression levels of Aggrecan and Collagen II in cartilage tissues of rat terminal femora among normal control group, KOA model group, DHJST treatment group and GAH treatment group ($F = 58.118, P = 0.002; F = 16.625, P = 0.001$). The protein expression level of Aggrecan in cartilage tissues of rat terminal femora was lower in KOA model group and DHJST treatment group compared to normal control group ($P = 0.003; P = 0.004$), and there was no statistical difference between GAH treatment group and normal control group ($P = 0.078$). The protein expression level of Collagen II in cartilage tissues of rat terminal femora was lower in KOA model group, DHJST treatment group and GAH treatment group compared to normal control group ($P = 0.000; P = 0.028; P = 0.018$). The protein expression levels of Aggrecan and Collagen II in cartilage tissues of rat terminal femora were higher in DHJST treatment group and GAH treatment group compared to KOA model group (Aggrecan: $P = 0.025; P = 0.034$; Collagen II: $P = 0.003; P = 0.004$), and there was no statistical difference between DHJST treatment group and GAH treatment group ($P = 0.999; P = 0.775$). **Conclusion:** The MoA of DHJST may be that it works by promoting the expressions of Aggrecan and Collagen II through up-regulating the expressions of miR-675-3p and lncRNA H19 in treatment of KOA in rats.

Keywords osteoarthritis, knee; cartilaginous tissue; Duhuo Jisheng Tang; rats, Sprague – Dawley; RNA; RNA, long noncoding; aggrecans; collagen type II; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是中老年人常见的关节疾病,我国 60 岁以上人群中 KOA 的患病率大于 60%^[1]。KOA 的主要临床表现为膝关节疼痛、肿胀、僵硬、活动受限,严重影响患者生活质量^[2-4]。独活寄生汤出自孙思邈的《备急千金要方》,临床用于 KOA 的防治,疗效显著^[5-8]。我们前期研究^[9]发现独活寄生汤能够延缓 KOA 模型大鼠膝关节软骨退变,但其作用机制尚不明确。相关研究^[10]表明,由于炎症等因素影响,骨关节炎软骨组织中的长链非编码 RNA (long non – coding RNA, lncRNA) 的表达受到干扰,影响软骨细胞外基质蛋白的表达。为了探讨独活寄生汤治疗大鼠 KOA 的作用机制,我们进行了相关动物实验,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 2 月龄 SPF 级 Sprague – Dawley 雄性大鼠 66 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017 – 0005。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 盐酸氨基葡萄糖胶囊(香港澳美制药有限公司),戊巴比妥钠溶液(山东西亚化学工业有限公司),mirVana™ miRNA 提取试剂盒、TRIzol(美国 Invitrogen 公司),Mir – X™ miRNA 逆转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒(日本 Takara 公司),PrimeScript™ RT mRNA 逆转录试剂盒、AceQqPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒(中国 Vazyme 公司),苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司)、抗聚集蛋白聚糖(Aggregan)、II 型胶原蛋白(Collagen II)抗体(美国 Abcam 公司),抗 β – 肌动蛋白(β – actin)抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) G 二抗(美国 CST 公司),SuperLumina HRP 底物 ECL 高敏试剂盒(美国 Abbkine 公司)。

1.3 实验仪器 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Invitrogen 公司),PCR 仪(美国 Bio – rad 公司),7500 Fast 实时定量 PCR (real-time quantitative

PCR, RT – qPCR) 系统(美国 ABI 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),凝胶电泳系统(美国 ThermoFisher 公司),小型槽式转印系统、化学发光成像系统(美国 Bio – rad 公司)。

2 方法

2.1 独活寄生汤制备方法 独活寄生汤药物组成:独活 9 g,桑寄生、牛膝、杜仲、秦艽、防风、肉桂、细辛、当归、川芎、熟地黄、白芍、人参片、茯苓、甘草片各 6 g。将上述药物捣碎,按照固液比 1:10 加入蒸馏水,煎煮 1.5 h,过滤,加入等量冷水再次煎煮;连续煎煮 3 次,将 3 次药液合并后,采用旋转蒸发器浓缩后真空干燥,收集干粉于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;使用时称取干粉加入蒸馏水溶解,配制浓度为 $0.93\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 模型建立与干预方法 将 66 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 48 只大鼠,采用改良 Hulth 法^[9]建立大鼠 KOA 模型,随机选择 3 只正常大鼠和 3 只建模大鼠进行鉴定。证实建模成功后,将剩余的 15 只正常大鼠纳入正常对照组,采用随机数字表将剩余的 45 只 KOA 模型大鼠分为 KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组,每组 15 只。参照“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值”^[11]计算大鼠给药量,正常对照组和 KOA 模型组大鼠按照每天 $10\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以 0.9% 生理盐水灌胃,独活寄生汤治疗组大鼠按照每天 $10\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以独活寄生汤(浓度为 $0.93\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)灌胃,盐酸氨基葡萄糖治疗组按照每天 $10\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以盐酸氨基葡萄糖溶液(浓度为 $0.015\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)灌胃,连续干预 12 周。12 周后,于腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,使用剂量 $2\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。切取双侧胫骨近端和股骨远端的软骨组织,置入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,储存备用。

2.3 大鼠胫骨近端软骨组织中 miR – 675 – 3p 检测方法 取各组大鼠胫骨近端软骨组织,分别加入液氮研磨至细末,称取 25 mg,用 mirVana™ miRNA 提取试剂盒提取总 RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的 RNA,采用 Mir – X™ miRNA 逆转录试剂盒生成 cDNA。采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 RT – qPCR 检测 miR – 675 – 3p 的表达,以 U6 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR – 675 – 3p 的相对表达量。PCR 扩增引物见

表 1。

2.4 大鼠胫骨近端软骨组织中 lncRNA H19 及软骨组成相关基因 mRNA 检测方法 取各组大鼠胫骨近端软骨组织,分别加入液氮研磨至细末,称取 25 mg,采用 TRIzol 法提取总 RNA,取 1 μ g 的总 RNA,采用 PrimeScript™ RT mRNA 逆转录试剂盒生成 cDNA。采用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 检测 lncRNA H19 和 Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 的表达,以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 lncRNA H19 和 Aggrecan、Collagen II mRNA 的相对表达量。PCR 扩增引物见表 1。

2.5 大鼠股骨远端软骨组织中软骨组成相关基因蛋白检测方法 取各组大鼠股骨远端软骨组织,分别加入液氮研磨至细末,称取 20 mg,加入 200 μ L 含 1 mmol \cdot L⁻¹ PMSF 的 RIPA 裂解液,提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液并置于沸水中煮 5 min。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,每孔加入 30 μ g 蛋白。采用湿转法将凝胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,室温封闭 1 h,加入抗 Aggrecan、Collagen II、 β -actin 抗体(抗体稀释比例为 1:1000)孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,采用 SuperLumia HRP 底物 ECL 高敏试剂盒显影,并拍照保存。采用 Image Lab 软件处理图片,提取蛋白条带的灰度值,并以 β -actin 蛋白为基准进行标准化处理,计算蛋白条带的相对灰度值,比较蛋白的相对表达水平。

2.6 数据统计方法 采用 SPSS22.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。4 组大鼠关节软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 和 Aggrecan 蛋白表达量的组间比较均采用 Welch 或 Brown-Forsythe 检验,组间两两比较均采用 Games-howell 检验;4 组大鼠关节软骨组织中

Collagen II 蛋白表达量的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。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠饲养结果 KOA 模型组大鼠因肺栓塞死亡 2 只,独活寄生汤治疗组大鼠因腹泻死亡 1 只,盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠因肺栓塞死亡 1 只。

3.2 大鼠胫骨近端软骨组织中 KOA 相关基因的 RNA 表达结果 正常对照组、KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量比较,组间差异均有统计学意义。KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量均低于正常对照组(miR-675-3p: $P=0.000$; $P=0.003$; $P=0.002$; Aggrecan mRNA: $P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$; Collagen II mRNA: $P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$);KOA 模型组大鼠胫骨近端软骨组织中 lncRNA H19 的表达量低于正常对照组($P=0.002$),独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 lncRNA H19 的表达量与正常对照组比较,差异无统计学意义($P=0.058$, $P=0.069$);独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量均高于 KOA 模型组(miR-675-3p: $P=0.000$; $P=0.000$; lncRNA H19: $P=0.000$; $P=0.000$; Aggrecan mRNA: $P=0.000$; $P=0.000$; Collagen II mRNA: $P=0.000$; $P=0.000$);独活寄生汤治疗组大鼠胫骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19、Aggrecan mRNA、Collagen II mRNA 的表达量与盐酸氨基葡萄糖治疗组比较,组间差异均无统计学意义($P=0.922$; $P=0.778$; $P=0.857$; $P=0.904$)。见表 2。

表 1 PCR 扩增引物序列

基因	正向引物	反向引物
miR-675-3p	5'-GCCTGTATGCCCTAACCCT-3'	
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCG-3'
lncRNA ¹⁾ H19	5'-GCACTCAGAACCACTACACTAC-3'	5'-CTTGGCTCCAGGATGATGTG-3'
Aggrecan ²⁾	5'-GGAGCAGCAGTCACATCT-3'	5'-CATCAGACCAGCGGAAGT-3'
Collagen II ³⁾	5'-AGCAAGGAGAAGAAGCACAT-3'	5'-TGGACACTAGACGGAGGAA-3'
β -actin ⁴⁾	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTATGA-3'	5'-CATCGGAACCGCTCATTGCCGATAG-3'

1) 长链非编码 RNA;2) 聚集蛋白聚糖;3) II 型胶原蛋白;4) β -肌动蛋白。

3.3 大鼠股骨远端软骨组织中软骨组成相关基因的蛋白表达结果 正常对照组、KOA 模型组、独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组的大鼠股骨远端软骨组织中 AggreCan 和 Collagen II 的蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义。KOA 模型组、独活寄生汤治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 AggreCan 的蛋白表达量均低于正常对照组 ($P=0.003$; $P=0.004$), 盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 AggreCan 的蛋白表达量与正常对照组相比, 差异无统计学意义 ($P=0.078$), KOA 模型组、独活寄生汤治疗

组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 Collagen II 的蛋白表达量均低于正常对照组 ($P=0.000$; $P=0.028$; $P=0.018$), 独活寄生汤治疗组、盐酸氨基葡萄糖治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 AggreCan 和 Collagen II 的蛋白表达量均高于 KOA 模型组 (AggreCan: $P=0.025$; $P=0.034$; Collagen II: $P=0.003$; $P=0.004$), 独活寄生汤治疗组大鼠股骨远端软骨组织中 AggreCan 和 Collagen II 的蛋白表达量与盐酸氨基葡萄糖治疗组比较, 组间差异均无统计学意义 ($P=0.999$; $P=0.775$)。见表 3、图 1。

表 2 4 组大鼠股骨近端软骨组织中 miR-675-3p、lncRNA H19 及软骨组成相关基因的 mRNA 相对表达量

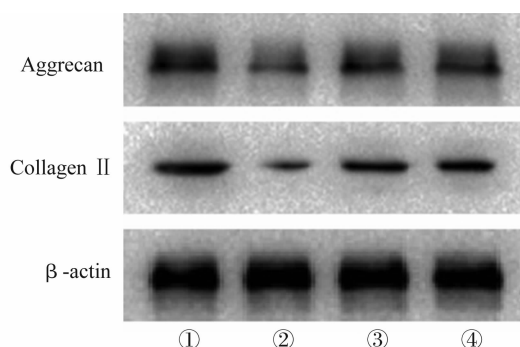
组别	样本量/只	miR-675-3p ($\bar{x} \pm s$)	lncRNA ²⁾ H19 ($\bar{x} \pm s$)	AggreCan ³⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)	Collagen II ⁴⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)
正常对照组	15	1.011 ± 0.005	1.036 ± 0.036	1.009 ± 0.003	1.014 ± 0.015
KOA ¹⁾ 模型组	13	0.451 ± 0.037	0.429 ± 0.010	0.144 ± 0.037	0.128 ± 0.007
独活寄生汤治疗组	14	0.688 ± 0.015	0.715 ± 0.005	0.616 ± 0.132	0.501 ± 0.046
盐酸氨基葡萄糖治疗组	14	0.672 ± 0.016	0.727 ± 0.019	0.569 ± 0.081	0.521 ± 0.034
F 值		83.050	436.003	129.212	135.844
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

1) 膝骨关节炎; 2) 长链非编码 RNA; 3) 聚集蛋白聚糖; 4) II 型胶原蛋白。

表 3 4 组大鼠股骨远端软骨组织中软骨组成相关基因的蛋白相对表达量

组别	样本量/只	AggreCan ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Collagen II ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)
正常对照组	15	0.663 ± 0.014	0.320 ± 0.084
KOA ¹⁾ 模型组	13	0.258 ± 0.040	0.036 ± 0.028
独活寄生汤治疗组	14	0.481 ± 0.003	0.211 ± 0.034
盐酸氨基葡萄糖治疗组	14	0.472 ± 0.070	0.199 ± 0.031
F 值		58.118	16.625
P 值		0.002	0.001

1) 膝骨关节炎; 2) 聚集蛋白聚糖; 3) II 型胶原蛋白。



AggreCan: 聚集蛋白聚糖; Collagen II: II 型胶原蛋白; β -actin: β -肌动蛋白; ①正常对照组; ②膝骨关节炎模型组; ③独活寄生汤治疗组; ④盐酸氨基葡萄糖治疗组。

图 1 4 组大鼠股骨远端软骨组织中软骨组成相关基因蛋白印迹法检测蛋白表达结果

4 讨论

LncRNA 是一类没有编码蛋白质功能的 RNA, 曾被认为是转录过程中产生的“噪音”。随着研究的进一步深入及高通量测序等技术的应用, 多项研究发现 lncRNA 广泛参与基因的转录、翻译及蛋白的相互作用等生物学过程^[12-15]。miRNAs 在人类的体液如血液、尿液、关节液及唾液中能够稳定存在, 且具有良好的组织特异性和时序性, miRNA 在骨关节炎的早期诊断及治疗方面具有较大优势^[16]。研究表明, lncRNA 和 miRNA 在骨关节炎发展进程中发挥重要作用^[17]。Song 等^[18]研究发现, 与正常软骨组织比较, 骨关节炎患者软骨组织中 lncRNA 的表达异常, 而 lncRNA 的表达异常可能导致软骨细胞胞外基质降解。Fu 等^[19]

采用微阵列分析技术分析骨关节炎患者的软骨组织样本,结果显示,与正常软骨组织相比多个 lncRNA 上调或下调,认为 lncRNA 可能是诊断和治疗骨关节炎的潜在生物标志物。

lncRNA H19 是最早发现的 lncRNA 之一,其在转录过程中被加工为 miR-675-3p 和 miR-675-5p;miR-675-5p 在软骨组织中表达量较低,且没有靶目标,逐渐被核酸酶降解;因此,miR-675-3p 是 lncRNA H19 在软骨组织内影响细胞外基质的主要活性形式^[20-21]。Shen 等^[22]研究发现,在骨关节炎患者的软骨组织中,miR-675-3p 的表达量下降,且在体外以白细胞介素-1 干预正常的人软骨细胞后,miR-675-3p 的表达量下降。本研究发现 KOA 模型组大鼠膝关节软骨组织中 miR-675-3p 和 lncRNA H19 的表达量均低于正常对照组,独活寄生汤治疗组大鼠膝关节软骨组织 miR-675-3p 和 lncRNA H19 的表达量均高于 KOA 模型组,表明独活寄生汤能够促进 KOA 模型大鼠膝关节软骨组织 miR-675-3p 和 lncRNA H19 的表达,提示其可能通过上调 miR-675-3p 和 lncRNA H19 的表达发挥治疗 KOA 的作用。

Aggrecan 和 Collagen II 是软骨细胞胞外基质的重要组成部分,其相互交错形成网状结构增强了软骨的机械强度,使得膝关节软骨能够抵抗较强的剪切力^[23]。研究表明,Aggrecan 和 Collagen II 能够被基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族蛋白降解^[24]。MMP-1 和 MMP-13 具有较强的软骨细胞胞外基质降解能力,其中 MMP-13 对 Collagen II 的降解能力是 MMP 家族蛋白中最强的^[25]。Seidl 等^[20]研究发现,通过脂粒 Lip2000 转染人软骨细胞沉默 miR-675-3p 能够上调 MMP-1 和 MMP-13 的表达。Dudek 等^[26]研究发现,在正常人软骨细胞中沉默 lncRNA H19 或 miR-675 均会降低 Collagen II 表达,而过表达 miR-675 会增加 Collagen II 表达。本研究发现 KOA 模型组大鼠膝关节软骨组织中 Aggrecan、Collagen II mRNA 和蛋白的表达量均低于正常对照组,采用独活寄生汤治疗的大鼠膝关节软骨组织中 Aggrecan、Collagen II mRNA 和蛋白的表达高于 KOA 模型组;推测 lncRNA H19 和 miR-675-3p 的表达上调能够促进 Aggrecan 和 Collagen II 表达,但至于独活寄生汤是如何调控 lncRNA H19 和 miR-675-3p,尚需后期进一步深入研究。

本研究结果表明,独活寄生汤治疗大鼠 KOA 的作用机制,可能与其能够上调 miR-675-3p、lncRNA H19 的表达进而促进 Aggrecan、Collagen II 的表达有关。

参考文献

- [1] 敖秀兰,张婷,程维,等. 老年膝关节骨关节炎患者生活质量及影响因素[J]. 中国老年学杂志,2017,37(6): 1522-1524.
- [2] 唐布敏,郑晓燕,万巧琴,等. 膝关节骨性关节炎患者生活质量及干预研究现状[J]. 现代预防医学,2016, 43(1):121-123.
- [3] 曹龙军,章礼勤,周石,等. 膝关节骨性关节炎患者股四头肌动员能力和肌力储备改变的研究[J]. 中国康复医学杂志,2012,27(1):30-34.
- [4] 吕苏梅,张瑞丽. 中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展[J]. 中国老年学杂志,2016,36(16):4133-4135.
- [5] 郑春松,付长龙,叶蕪芝,等. 独活寄生汤在骨伤科的临床应用与实验研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2015, 4(12):62-66.
- [6] 吴广文,褚剑锋,许惠凤,等. 独活寄生汤的药理作用及其在治疗骨性关节炎中的应用[J]. 中医正骨,2012, 24(1):37-39.
- [7] 许丽梅,李慧,许云腾,等. 基于 NF- κ B 信号通路探讨独活寄生汤抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制[J]. 中医正骨,2019,31(7):9-14.
- [8] 郑梓灌,林涛,吴丽芳. 独活寄生汤口服联合二乌红花离子导入治疗膝骨关节炎肾虚髓亏证[J]. 中医正骨, 2019,31(5):38-40.
- [9] 赵思胜,黄云梅,郑若曦,等. 独活寄生汤对改良 Hulth 法造模大鼠膝骨关节炎软骨形态的影响[J]. 福建中医药, 2019,50(5):59-62.
- [10] SONG J, AHN C, CHUN C H, et al. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2014, 32(12): 1628-1635.
- [11] 魏伟,吴希美,李元健. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社,2010:71-72.
- [12] 周绪昌,张苗,邹军,等. 长链非编码 RNA H19 对骨关节炎的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2020, 13(2):184-190.
- [13] BAI Y, DAI X, HARRISON A P, et al. RNA regulatory networks in animals and plants: a long noncoding RNA perspective[J]. Brief Funct Genomics, 2015, 14(2):91-101.
- [14] PEARSON M J, PHILP A M, HEWARD J A, et al. Long in-

- tergenic noncoding RNAs mediate the human chondrocyte inflammatory response and are differentially expressed in osteoarthritis cartilage [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(4):845-856.
- [15] TIAN F, WANG J H, ZHANG Z H, et al. LncRNA SNHG7/miR-34a-5p/SYVN1 axis plays a vital role in proliferation, apoptosis and autophagy in osteoarthritis[J]. Biol Res, 2020, 53(1):9.
- [16] 高宁阳, 丁立, 庞坚, 等. miRNAs 与骨关节炎关系的研究进展[J]. 中医正骨, 2015, 27(12):74-77.
- [17] XIE F, LIU Y L, CHEN X Y, et al. Role of microRNA, lncRNA, and exosomes in the progression of osteoarthritis: a review of recent literature [J]. Orthop Surg, 2020, 12(3):708-716.
- [18] SONG J, KIM D, HAN J, et al. PBMC and exosome-derived Hotaire is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Med, 2015, 15(1):121-126.
- [19] FU M, HUANG G, ZHANG Z, et al. Expression profile of long noncoding RNAs in cartilage from knee osteoarthritis patients[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(3):423-432.
- [20] SEIDL C I, MURPHY C L. Dual and opposing regulation of MMP1 and MMP13 by both arms of miR-675 in human articular chondrocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 53(1):172-185.
- [21] CAI X, CULLEN B R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor[J]. RNA, 2007, 13(3):313-316.
- [22] SHEN X F, CHENG Y, DONG Q R, et al. MicroRNA-675-3p regulates IL-1 β -stimulated human chondrocyte apoptosis and cartilage degradation by targeting GNG5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 527(2):458-465.
- [23] ZHU B, CUI G, ZHANG Q, et al. Desumoylation of aggrecan and collagen II facilitates degradation via aggrecanases in IL-1 β -mediated osteoarthritis [J]. J Pain Res, 2019, 12:2145-2153.
- [24] VARELA-EIRIN M, LOUREIRO J, FONSECA E, et al. Cartilage regeneration and ageing: targeting cellular plasticity in osteoarthritis[J]. Ageing Res Rev, 2018, 42:56-71.
- [25] 范凯健, 吴菁, 李钦, 等. 基质金属蛋白酶 13 在软骨重塑和关节炎中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(5):607-611.
- [26] DUDEK K A, LAFONT J E, MARTINEZ-SANCHEZ A, et al. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes [J]. J Biol Chem, 2010, 285(32):24381-24387.

(收稿日期:2021-02-26 本文编辑:吕宁)

• 简 讯 •

《中医正骨》2022 年广告业务范围及收费标准

■ 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息,如书刊征订、招生启事、会议通知等

刊登位置	印刷规格	版面	每期收费标准(元)	半年收费标准(元)	全年收费标准(元)
封二	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	12 600	75 000	150 000
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	11 000	67 000	134 000
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	14 000	84 000	168 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 800	58 500	117 000
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 400	50 000	100 000
内文插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 400	50 000	100 000
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	4 200	25 000	50 000
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	2 500	15 000	30 000
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	4 200	25 000	50 000
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	2 500	15 000	30 000