

# 独活寄生汤对骨关节炎软骨退变的影响及其作用机制

郑文伟<sup>1</sup>, 翁霞萍<sup>1</sup>, 黄绥心<sup>2</sup>, 郑春松<sup>1</sup>, 叶锦霞<sup>1</sup>, 吴迫乐<sup>2</sup>, 许惠凤<sup>2</sup>, 吴明霞<sup>2</sup>, 李西海<sup>1</sup>, 刘献祥<sup>1</sup>

(1. 福建中医药大学, 福建 福州 350122;

2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

**摘要 目的:**探讨独活寄生汤对骨关节炎软骨退变的影响及其作用机制。**方法:**将 45 只 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、独活寄生汤组, 每组 15 只。模型组、独活寄生汤组采用改良 Hulth 法建立膝关节炎大鼠模型, 空白组不做任何处理。独活寄生汤组给予  $9.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的独活寄生汤水煎浓缩液进行灌胃, 模型组和空白组给予等剂量生理盐水灌胃; 每天灌胃 1 次, 连续灌胃 12 周。末次灌胃后分别取各组大鼠双侧股骨髁, 采用 HE 染色观察关节软骨组织形态, 并采用 Mankin's 关节软骨组织学评分法评价软骨退变程度; 采用 Western blot 法检测软骨中 G 蛋白偶联信号传导系统的关键调控因子的蛋白表达情况。分别从模型组和独活寄生汤组各取 50 mg 关节软骨组织, 采用基因芯片检测软骨基质降解基因表达情况。**结果:**①软骨组织形态。空白组关节软骨结构层次清晰, 潮线完整, 软骨表面较为平滑; 模型组关节软骨结构层次较为紊乱, 未见潮线, 表层软骨膜破损, 膜样结构消失并呈丝绒样; 独活寄生汤组关节软骨结构层次较为清晰, 软骨破坏程度比模型组轻。②软骨退变程度。3 组大鼠关节软骨的 Mankin's 组织学评分比较, 差异有统计学意义 [ $(3.46 \pm 2.04)$  分,  $(12.58 \pm 2.55)$  分,  $(7.75 \pm 1.91)$  分,  $F = 13.114, P = 0.006$ ]; 空白组和独活寄生汤组低于模型组 ( $t = -5.114, P = 0.002; t = 2.709, P = 0.035$ ); 空白组与独活寄生汤组比较, 差异无统计学意义 ( $t = -2.406, P = 0.053$ )。③药物干预后 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达。3 组大鼠 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$ 、 $G\alpha i$  蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义 [ $(1.59 \pm 0.09) \text{ kDa}$ ,  $(1.01 \pm 0.04) \text{ kDa}$ ,  $(1.45 \pm 0.14) \text{ kDa}$ ,  $F = 29.760, P = 0.001$ ;  $(1.03 \pm 0.06) \text{ kDa}$ ,  $(0.53 \pm 0.04) \text{ kDa}$ ,  $(0.75 \pm 0.09) \text{ kDa}$ ,  $F = 14.969, P = 0.027$ ;  $(0.36 \pm 0.02) \text{ kDa}$ ,  $(0.11 \pm 0.01) \text{ kDa}$ ,  $(0.17 \pm 0.02) \text{ kDa}$ ,  $F = 204.105, P = 0.000$ ;  $(0.20 \pm 0.02) \text{ kDa}$ ,  $(0.56 \pm 0.05) \text{ kDa}$ ,  $(0.33 \pm 0.07) \text{ kDa}$ ,  $F = 28.357, P = 0.001$ ]; 空白组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$  表达量均高于模型组 ( $t = 0.407, P = 0.000; t = 0.546, P = 0.012; t = 1.933, P = 0.000$ ),  $G\alpha i$  表达量低于模型组 ( $t = -0.750, P = 0.000$ ); 模型组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$  表达量均低于独活寄生汤组 ( $t = -5.584, P = 0.001; t = -2.431, P = 0.093; t = -4.584, P = 0.004$ ),  $G\alpha i$  表达量高于独活寄生汤组 ( $t = 4.377, P = 0.005$ ); 独活寄生汤组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$  表达量与空白组比较, 组间差异均无统计学意义 ( $t = -1.816, P = 0.119; t = -3.029, P = 0.056$ ); 独活寄生汤组  $G\alpha o$  表达量低于空白组 ( $t = -14.749, P = 0.000$ ),  $G\alpha i$  表达量高于空白组 ( $t = 3.119, P = 0.021$ )。④药物干预后关节软骨基质降解基因的表达。药物干预后, 表达上调 2 倍以上的软骨基质降解基因为基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 8、硒蛋白 P (selenoprotein P, SELP), 表达下调 2 倍以上的软骨基质降解基因为蛋白聚糖酶 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) 1、ADAMTS2、ADAMTS8、钙黏蛋白 3 (cadherin 3, CDH3)、胶原 (collagen, COL) 1A1、COL5A1、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、整合素 (integrin, ITG) b1、ITGb4、MMP12、MMP14。模型组 MMP8、SELP 基因表达量均低于独活寄生汤组 ( $1.00 \pm 0.00, 2.81 \pm 0.60, t = -5.225, P = 0.035; 1.00 \pm 0.00, 2.31 \pm 0.81, t = -2.808, P = 0.107$ ), ADAMTS1、ADAMTS2、ADAMTS8、CDH3、COL1A1、COL5A1、CTGF、ITGb1、ITGb4、MMP12、MMP14 基因表达量均高于独活寄生汤组 ( $1.00 \pm 0.00, 0.21 \pm 0.05, t = 27.366, P = 0.001; 1.00 \pm 0.00, 0.31 \pm 0.16, t = 7.458, P = 0.018; 1.00 \pm 0.00, 0.11 \pm 0.04, t = 38.538, P = 0.001; 1.00 \pm 0.00, 0.30 \pm 0.23, t = 5.271, P = 0.034; 1.00 \pm 0.00, 0.12 \pm 0.09, t = 17.380, P = 0.003; 1.00 \pm 0.00, 0.09 \pm 0.16, t = 10.168, P = 0.010; 1.00 \pm 0.00, 0.21 \pm 0.30, t = 4.605, P = 0.044; 1.00 \pm 0.00, 0.37 \pm 0.20, t = 5.456, P = 0.032; 1.00 \pm 0.00, 0.13 \pm 0.22, t = 6.960, P = 0.020; 1.00 \pm 0.00, 0.05 \pm 0.08, t = 19.388, P = 0.003; 1.00 \pm 0.00, 0.05 \pm 0.10, t = 15.671, P = 0.004$ )。结论: 独活寄生汤可以明显延缓骨关节炎软骨的退变, 其作用机制可能是通过激活 G 蛋白偶联信号传导通路而抑制软骨基质降解, 从而使受损的软骨组织修复, 但其具体作用靶点有待进一步深入研究。

**关键词** 骨关节炎; 独活寄生汤; 软骨退变; G 蛋白偶联信号通路; 动物实验

**Effects of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤) on cartilage degeneration in the process of osteoarthritis and the**

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373818)

通讯作者: 李西海 E-mail: lixihai79dahai@163.com

## mechanism of action

ZHENG Wenwei<sup>1</sup>, WENG Xiaping<sup>1</sup>, HUANG Suixin<sup>2</sup>, ZHENG Chunsong<sup>1</sup>, YE Jinxia<sup>1</sup>, WU Zhuile<sup>2</sup>, XU Huifeng<sup>2</sup>, WU Mingxia<sup>2</sup>, LI Xihai<sup>1</sup>, LIU Xianxiang<sup>1</sup>

1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤, DHJST) on cartilage degeneration in the process of osteoarthritis (OA) and the mechanism of action. **Methods:** Forty - five 8 - week - old male SD rats were randomly divided into blank group, model group and DHJST group, 15 cases in each group. The knee OA models were built by modified Hulth method in rats of model group and DHJST group, while the rats in blank group were not given any surgical intervention. The rats in DHJST group were intragastric administrated with DHJST concentrated solution in dosages of 9.3 g/kg, while the rats in model group and blank group were intragastric administrated with isodose normal saline, once a day for consecutive 12 weeks. The bilateral femoral condyles of rats in each group were fetched out respectively after the last intragastric administration. The articular cartilage tissue forms were observed after HE staining and the degrees of cartilage degeneration were evaluated by using Mankin's articular cartilage histological scores. The protein expression of key regulating factor of G protein coupled signal transduction systems in the cartilage were detected by using Western blot method. The articular cartilage (50 mg) were taken from the rats in model group and DHJST group respectively, and the cartilage matrix degradation gene expression were detected by using gene chips. **Results:** Clear articular cartilage structure, complete tidal line and smooth cartilage surface were found in blank group. Relatively disorderly articular cartilage structure and damaged surface perichondrium were found and tidal line and membrane structure disappeared in model group. Relatively clear articular cartilage structure and slighter cartilage destruction were found in DHJST group. There was statistical difference in Mankin's histological scores of articular cartilage between the 3 groups ( $3.46 \pm 2.04$ ,  $12.58 \pm 2.55$ ,  $7.75 \pm 1.91$  points,  $F = 13.114$ ,  $P = 0.006$ ). The Mankin's histological scores were lower in blank group and DHJST group compared to model group ( $t = -5.114$ ,  $P = 0.002$ ;  $t = 2.709$ ,  $P = 0.035$ ). There was no statistical difference in Mankin's histological scores between blank group and DHJST group ( $t = -2.406$ ,  $P = 0.053$ ). There was statistical difference in the protein expression of key regulating factor  $G\alpha s$ ,  $G\alpha q$ ,  $G\alpha o$  and  $G\alpha i$  of G protein coupled signal transduction systems between the 3 groups ( $1.59 \pm 0.09$ ,  $1.01 \pm 0.04$ ,  $1.45 \pm 0.14$  kDa,  $F = 29.760$ ,  $P = 0.001$ ;  $1.03 \pm 0.06$ ,  $0.53 \pm 0.04$ ,  $0.75 \pm 0.09$  kDa,  $F = 14.969$ ,  $P = 0.027$ ;  $0.36 \pm 0.02$ ,  $0.11 \pm 0.01$ ,  $0.17 \pm 0.02$  kDa,  $F = 204.105$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.20 \pm 0.02$ ,  $0.56 \pm 0.05$ ,  $0.33 \pm 0.07$  kDa,  $F = 28.357$ ,  $P = 0.001$ ). The expressions of  $G\alpha s$ ,  $G\alpha q$  and  $G\alpha o$  were higher and the expressions of  $G\alpha i$  were lower in blank group compared to model group ( $t = 0.407$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 0.546$ ,  $P = 0.012$ ;  $t = 1.933$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = -0.750$ ,  $P = 0.000$ ). The expressions of  $G\alpha s$ ,  $G\alpha q$  and  $G\alpha o$  were lower and the expressions of  $G\alpha i$  were higher in model group compared to DHJST group ( $t = -5.584$ ,  $P = 0.001$ ;  $t = -2.431$ ,  $P = 0.093$ ;  $t = -4.584$ ,  $P = 0.004$ ;  $t = 4.377$ ,  $P = 0.005$ ). There was no statistical difference in the expressions of  $G\alpha s$  and  $G\alpha q$  between blank group and DHJST group ( $t = -1.816$ ,  $P = 0.119$ ;  $t = -3.029$ ,  $P = 0.056$ ). The expressions of  $G\alpha o$  were lower and the expressions of  $G\alpha i$  were higher in DHJST group compared to blank group ( $t = -14.749$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 3.119$ ,  $P = 0.021$ ). After drug intervention, the expression of some cartilage matrix degradation genes, including matrix metalloproteinase (MMP)8 and selenoprotein P (SELP), were up-regulated more than 2 times; while the expression of some cartilage matrix degradation genes, including a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)1, ADAMTS2, ADAMTS8, cadherin 3 (CDH3), collagen (COL)1A1, COL5A1, connective tissue growth factor (CTGF), integrin (ITG)b1, ITGb4, MMP12 and MMP14 were down-regulated more than 2 times. The gene expression levels of MMP8 and SELP were lower in model group compared to DHJST group ( $1.00 \pm 0.00$  vs  $2.81 \pm 0.60$ ,  $t = -5.225$ ,  $P = 0.035$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $2.31 \pm 0.81$ ,  $t = -2.808$ ,  $P = 0.107$ ), while the gene expression levels of ADAMTS1, ADAMTS2, ADAMTS8, CDH3, COL1A1, COL5A1, CTGF, ITGb1, ITGb4, MMP12 and MMP14 were higher in model group compared to DHJST group ( $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.21 \pm 0.05$ ,  $t = 27.366$ ,  $P = 0.001$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.31 \pm 0.16$ ,  $t = 7.458$ ,  $P = 0.018$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.11 \pm 0.04$ ,  $t = 38.538$ ,  $P = 0.001$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.30 \pm 0.23$ ,  $t = 5.271$ ,  $P = 0.034$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.12 \pm 0.09$ ,  $t = 17.380$ ,  $P = 0.003$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.09 \pm 0.16$ ,  $t = 10.168$ ,  $P = 0.010$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.21 \pm 0.30$ ,  $t = 4.605$ ,  $P = 0.044$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.37 \pm 0.20$ ,  $t = 5.456$ ,  $P = 0.032$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.13 \pm 0.22$ ,  $t = 6.960$ ,  $P = 0.020$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.05 \pm 0.08$ ,  $t = 19.388$ ,  $P = 0.003$ ;  $1.00 \pm 0.00$  vs  $0.05 \pm 0.10$ ,  $t = 15.671$ ,  $P = 0.004$ ). **Conclusion:** DHJST can obviously delay cartilage degeneration in the process of OA. The mechanisms of action may be that it can inhibit cartilage matrix degradation through activating G protein coupled signaling path-

way, so it can repair the damaged cartilage tissues. However, its specific action targets need to be further studied.

**Key words** osteoarthritis; Duhuo Jisheng Tang; cartilage degeneration; G protein coupled signaling pathway; animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是在生物学和力学因素共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者降解和合成正常偶联失衡的结果<sup>[1]</sup>。软骨退变是 OA 的主要病理特征,而炎症反应介导的软骨基质降解是导致 OA 软骨退变的重要因素之一<sup>[2]</sup>,目前尚无特效药及方法能阻止该病的进展。独活寄生汤(唐代·孙思邈《备急千金要方》)具有补肝肾、益气血、祛风湿、止痹痛等功效<sup>[3]</sup>,长期被临床应用于治疗 OA,疗效显著,但有关其作用机制目前尚不清楚。G 蛋白偶联信号传导系统是一类重要的细胞跨膜信号传导途径之一,参与 OA 软骨基质降解。本文以 OA 动物模型为研究对象,以 G 蛋白偶联信号传导系统介导软骨基质降解为切入点,采用基因芯片的方法,探讨独活寄生汤延缓骨关节软骨退变的作用机制。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 8 周龄 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 45 只,体质量 180 ~ 220 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,由福建中医药大学实验动物中心提供。实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0001。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 实验药物** 独活寄生汤由独活 9 g,细辛 3 g,桑寄生、牛膝、杜仲、秦艽、防风、肉桂、川芎、当归、芍药、干地黄、人参、茯苓、甘草各 6 g 组成。按上述药物剂量称取药材,置于 3 L 圆底烧瓶中,加入 10 倍药量体积的蒸馏水,加热回流提取 3 次,每次 2 h,过滤合并滤液,滤液浓缩至含生药量  $3.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,4 ℃ 储存备用。

**1.3 实验试剂** Gαs、Gαq、Gαo、Gαi 抗体(美国 Santa Cruz 公司);β-actin 抗体(美国 Abcam 公司);脱脂奶粉、电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒、蛋白上样缓冲液、RIPA 裂解液(强)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司);乙二胺四乙酸二钠(国药集团化学试剂有限公司),HE 染色试剂盒(中国北京索莱宝科技有限公司);TBST 洗涤缓冲液(中国康为世纪有限公司);10% 水合氯醛(中国上海士锋生物科技有限公司);SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase 试剂盒(美国 Life Technologies 公司);RT2 Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Rat Extracellular Matrix & Adhe-

sion Molecule 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)。

**1.4 实验仪器** 光学显微镜(德国 LEICA 公司);ELx-800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与造模** 采用随机数字表将 45 只大鼠随机分为空白组、模型组、独活寄生汤组,每组 15 只。模型组、独活寄生汤组采用改良 Hulth 法建立膝 OA 大鼠模型<sup>[4-6]</sup>:术区常规剪毛、消毒,采用 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉;无菌条件下,取膝关节内侧切口,充分显露膝关节,切断内侧副韧带、前交叉韧带,摘除内侧半月板;术后 3 d 给予 80 万单位青霉素肌肉注射。空白组不做任何处理。

**2.2 药物干预** 大鼠给药剂量按人和动物药物等效剂量换算公式<sup>[7]</sup>计算,计算后独活寄生汤组给予  $9.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的独活寄生汤水煎浓缩液进行灌胃,模型组和空白组给予等剂量生理盐水灌胃。每天灌胃 1 次,连续灌胃 12 周。

**2.3 软骨组织取材与形态观察** 末次灌胃后,采用 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉,分别取各组大鼠双侧约  $0.4 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$  大小的股骨髁,用 4% 多聚甲醛固定、10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙后,常规石蜡包埋、切片,用 HE 染色后,显微镜下观察关节软骨的组织形态学变化;取各组软骨于液氮中保存备用。

**2.4 评价软骨退变程度** 采用 Mankin's 关节软骨组织学评分法<sup>[8]</sup>评价软骨退变程度,包括表层软骨细胞分裂增生(0 ~ 3 分)、细胞排列(0 ~ 3 分)、潮线(0 ~ 3 分)、血管翳样物生成(0 ~ 3 分)、AB-PAS 染色(0 ~ 4 分);最高为 16 分,分数越高提示软骨退变越严重。

**2.5 检测软骨中 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达** 采用 Western blot 法。将各组关节软骨标本在液氮中研磨后,加入蛋白裂解液和苯甲基磺酰氟(100:1)提取总蛋白;根据 BCA 蛋白定量结果,取 50 μg 蛋白,煮沸变性,上样,以 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离;采用湿转将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,转完膜后加入 5% 的脱脂奶粉,室温封闭 2 h;4 ℃ 下一抗孵育(分别孵育 Gαs、Gαq、Gαo、Gαi、β-actin)过夜,用 TBST 洗膜 3

次,每次 10 min;然后室温下二抗孵育 1 h,再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;滴加 200  $\mu$ L 的 ECL 显影液,曝光、显影。应用 Image Lab 图像处理软件分析目的蛋白和内参  $\beta$ -actin 条带灰度值,计算机自动读取并记录每条条带的灰度值。

**2.6 检测软骨基质降解基因的蛋白表达** 采用基因芯片法。分别从模型组和独活寄生汤组各取 50 mg 关节软骨组织,从中提取总 RNA,并用 SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (invitrogen) 将其逆转录为 cDNA,加 20  $\mu$ L 混合液到 RT2 Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Rat Extracellular Matrix & Adhesion Molecules 对应的每个孔中,PCR 反应条件为:95  $^{\circ}$ C 10 min 激活聚合酶,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 退火和延伸 1 min,共 40 个循环。然后收集荧光,通过溶解曲线分析扩增产物的特异性,并采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 2 组基因的表达差异 ( $C_t$  值为每个反应管内的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数)。

**2.7 数据统计学分析** 采用 SPSS19.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,3 组关节软骨 Mankin's 组织学评分、G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子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;独活寄生汤组与模型组的软骨基质降解基因表达量的组间比较采用  $t$  检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 软骨组织形态** 空白组关节软骨分为浅表层、移行层、辐射层、钙化层依稀可见,介于辐射层与钙化层之间的潮线完整,软骨表面较为平滑,浅表层软骨细胞为扁圆形,移行层和辐射层软骨细胞为椭圆形,细胞核呈蓝色,软骨基质浅紫红色[图 1(1)]。模型组关节软骨结构层次较为紊乱,未见潮线,表层软骨膜破损,膜样结构消失并呈丝绒样[图 1(2)];提示软骨受损,证明造模成功。独活寄生汤组关节软骨结构层次较为清晰,软骨破坏程度比模型组轻[图 1(3)]。

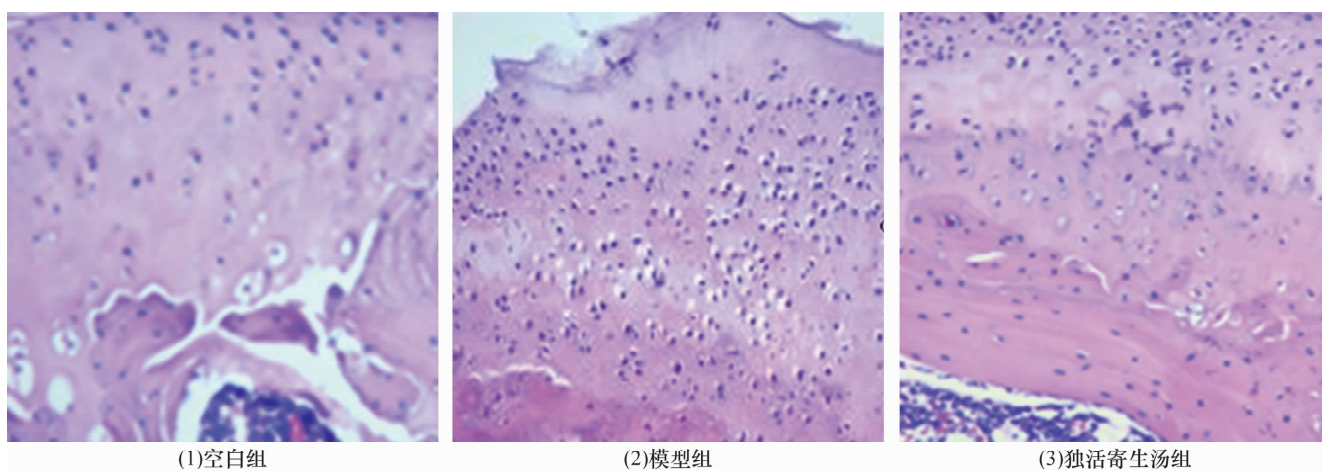


图 1 显微镜下大鼠膝关节软骨组织形态( $\times 200$ )

**3.2 软骨退变程度** 3 组大鼠关节软骨的 Mankin's 组织学评分比较,差异有统计学意义;模型组高于空白组和独活寄生汤组 ( $t = -5.114, P = 0.002; t = 2.709, P = 0.035$ );空白组与独活寄生汤组比较,差异无统计学意义 ( $t = -2.406, P = 0.053$ )。见表 1。

表 1 3 组大鼠关节软骨 Mankin's 组织学评分的比较

组别	Mankin's 评分( $\bar{x} \pm s$ , 分)
空白组	3.46 $\pm$ 2.04
模型组	12.58 $\pm$ 2.55
独活寄生汤组	7.75 $\pm$ 1.91
$F$ 值	13.114
$P$ 值	0.006

**3.3 药物干预后 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达** 3 组大鼠 G 蛋白偶联信号传导系

统关键调控因子  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$ 、 $G\alpha i$  蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义;空白组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$  表达量均高于模型组 ( $t = 0.407, P = 0.000; t = 0.546, P = 0.012; t = 1.933, P = 0.000$ ),  $G\alpha i$  表达量低于模型组 ( $t = -0.750, P = 0.000$ );模型组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha o$  表达量均低于独活寄生汤组 ( $t = -5.584, P = 0.001; t = -2.431, P = 0.093; t = -4.584, P = 0.004$ ),  $G\alpha i$  表达量高于独活寄生汤组 ( $t = 4.377, P = 0.005$ );独活寄生汤组  $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$  表达量与空白组比较,组间差异均无统计学意义 ( $t = -1.816, P = 0.119; t = -3.029, P = 0.056$ );独活寄生汤组  $G\alpha o$  表达量低于空白组 ( $t = -14.749, P = 0.000$ ),  $G\alpha i$  表达量高于空白组 ( $t = 3.119, P = 0.021$ )。见表 2、图 2。



表 2 3 组大鼠 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子蛋白表达量的比较  $\bar{x} \pm s$ , kDa

组别	G $\alpha$ s	G $\alpha$ q	G $\alpha$ o	G $\alpha$ i
空白组	1.59 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02
模型组	1.01 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.05
独活寄生汤组	1.45 $\pm$ 0.14	0.75 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.07
F 值	29.760	14.969	204.105	28.357
P 值	0.001	0.027	0.000	0.001

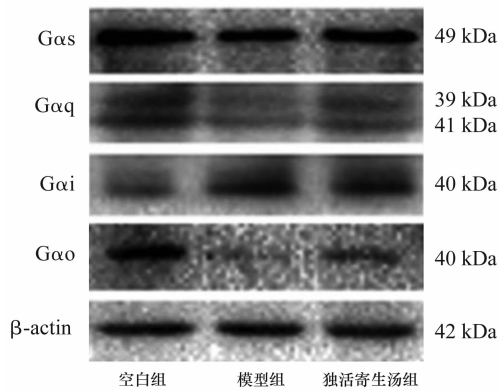


图 2 3 组大鼠 G 蛋白偶联信号传导系统关键调控因子的蛋白表达

**3.4 药物干预后关节软骨基质降解基因的表达** 模型组与独活寄生汤组的扩增曲线显示 2 组样本的扩增效率良好(图 3)。药物干预后,表达上调 2 倍以上的软骨基质降解基因为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 8、硒蛋白 P(selenoprotein P, SELP),表达下调 2 倍以上的软骨基质降解基因为蛋白聚糖酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) 1、ADAMTS2、ADAMTS8、钙黏蛋白 3(cadherin 3, CDH3)、胶原(collagen, COL)1A1、COL5A1、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、整合素(integrin, ITG) b1、ITGb4、MMP12、MMP14。模型组 MMP8、SELP 基因表达量均低于独活寄生汤组, ADAMTS1、ADAMTS2、ADAMTS8、CDH3、COL1A1、COL5A1、CTGF、ITGb1、ITGb4、MMP12、MMP14 基因表达量均高于独活寄生汤组(表 3、表 4)。

#### 4 讨论

OA 是一种慢性、退行性关节疾病,属于中医学“痹证”范畴,主要病理特点为“本虚标实,本痿标痹”,主要病因病机为肝肾亏虚、气血不足、瘀血阻滞,治宜扶正祛邪<sup>[3]</sup>。独活寄生汤具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血的功效,该方在治疗 OA 方面可内外兼顾、标本兼治,而且疗效良好、不良反应小、适合长

期服用<sup>[9-10]</sup>。

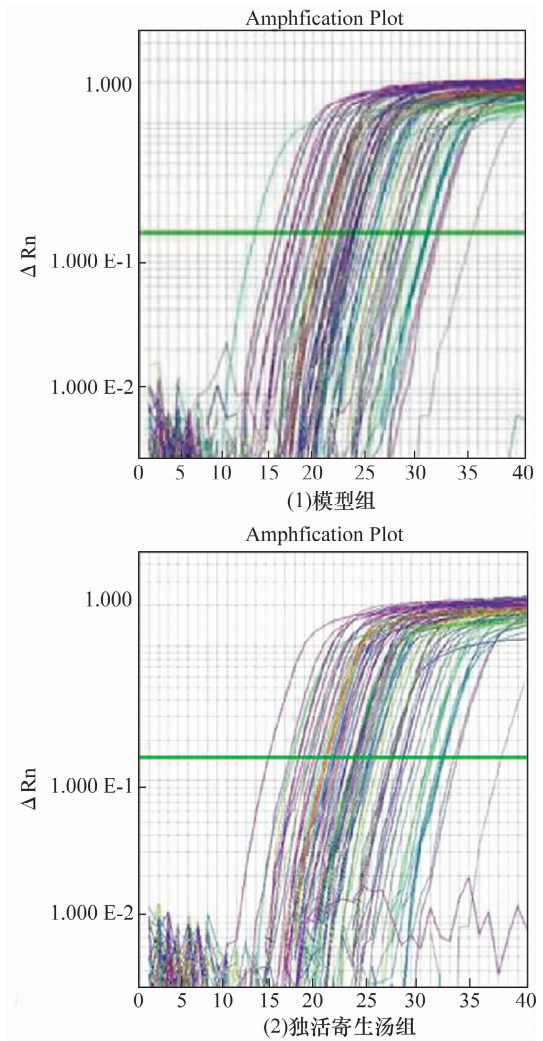


图 3 模型组与独活寄生汤组扩增曲线的变化图

表 3 独活寄生汤组和模型组表达上调的关节软骨基质降解基因表达量的比较  $\bar{x} \pm s$

组别	基质金属蛋白酶 8	硒蛋白 P
模型组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
独活寄生汤组	2.81 $\pm$ 0.60	2.31 $\pm$ 0.81
t 值	-5.225	-2.808
P 值	0.035	0.107

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 2 组基因的表达差异时,以模型组作为参照,将其表达量当作 1,计算出独活寄生汤组的相对表达量;表中数据为校正后的数据,t 值和 P 值是通过原始数据计算出来的值

表 4 独活寄生汤组和模型组表达下调的关节软骨基质降解基因表达量的比较  $\bar{x} \pm s$ 

组别	蛋白聚糖酶 1	蛋白聚糖酶 2	蛋白聚糖酶 8	钙黏蛋白 3	胶原 I 型 A1	胶原 V 型 A1
模型组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
独活寄生汤组	0.21 ± 0.05	0.31 ± 0.16	0.11 ± 0.04	0.30 ± 0.23	0.12 ± 0.09	0.09 ± 0.16
<i>t</i> 值	27.366	7.458	38.538	5.271	17.380	10.168
<i>P</i> 值	0.001	0.018	0.001	0.034	0.003	0.010

组别	结缔组织生长因子	整合素 b1	整合素 b4	基质金属蛋白酶 12	基质金属蛋白酶 14
模型组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
独活寄生汤组	0.21 ± 0.30	0.37 ± 0.20	0.13 ± 0.22	0.05 ± 0.08	0.05 ± 0.10
<i>t</i> 值	4.605	5.456	6.960	19.388	15.671
<i>P</i> 值	0.044	0.032	0.020	0.003	0.004

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 2 组基因的表达差异时,以模型组作为参照,将其表达量当作 1,计算出独活寄生汤组的相对表达量;表中数据为校正后的数据,*t* 值和 *P* 值是通过原始数据计算出来的值

中医认为 OA 病变的根本是肝肾亏虚,而西医认为此病与神经-内分泌-免疫网络功能紊乱密切相关<sup>[11]</sup>。中医肝肾功能集中反映了下丘脑-垂体-靶腺轴(肾上腺、甲状腺、性腺)的功能,而 G 蛋白偶联信号传导系统是下丘脑-垂体-靶腺轴的重要执行者<sup>[12]</sup>。G 蛋白偶联信号传导系统由 G 蛋白偶联受体、G 蛋白和效应器分子组成,是一类重要的细胞跨膜信号传导系统。G 蛋白偶联信号传导系统主要有  $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 、 $G_{\alpha q}$  和  $G_{\alpha o}$  型蛋白组成,不同的 G 蛋白能特异地将受体和与之相适应的效应酶偶联起来,活化相应酶和离子通道,产生重要的第 2 信使,参与软骨退变<sup>[13-14]</sup>。关节软骨由软骨细胞及软骨基质组成,软骨细胞处于胶原和蛋白多糖等所形成的致密基质中,其中胶原以 II 型胶原为主,构成软骨内的纤维网架结构;而蛋白多糖由不同多糖聚合体组成,能够维持着软骨良好弹性与生物力学性能。蛋白多糖的丢失主要发生在 OA 早期,蛋白多糖的持续丢失进一步导致胶原纤维网架的破坏<sup>[15]</sup>。炎症反应介导的软骨基质降解是导致 OA 软骨退变的重要因素之一<sup>[7,16]</sup>。MMPS 及 ADAMTS 家族是降解软骨基质中最为重要两类酶,MMPS 的主要作用底物为软骨胶原,而 ADAMTS 主要作用底物为蛋白多糖<sup>[17-18]</sup>。通过调节 G 蛋白偶联信号传导系统能够降低 OA 软骨细胞白细胞介素-6、MMP-2、MMP-9 表达,抑制 OA 软骨基质的降解<sup>[19]</sup>,抑制 OA 炎症反应<sup>[20-21]</sup>。因此,G 蛋白偶联信号传导系统可能是治疗 OA 的潜在靶点。本研究结果显示,独活寄生汤可以升高  $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 、 $G_{\alpha o}$  蛋白的表达水平,降低  $G_{\alpha i}$  蛋白的表达水平,这说明独活寄生汤可能会通过激活 G 蛋白偶联信号传导通路,延缓 OA 软骨退变。

关节机械力分布失衡或负荷过度易导致软骨磨损及软骨细胞代谢异常,损伤的软骨细胞释放多种降解酶类,引起胶原蛋白网络断裂与蛋白聚糖的降解。软骨基质的降解超过其合成是 OA 的主要病理特点,引起软骨降解的主要原因是蛋白水解酶活性增高,其中 MMPS 与 ADAMTS 是降解软骨聚蛋白多糖和胶原的主要酶类。ITG 作为软骨细胞表面受体,介导软骨细胞与软骨基质之间的黏附与跨膜的信号转导,从而参与软骨退变的调控<sup>[22]</sup>。基因芯片检测结果显示,独活寄生汤通过干预 MMP8、SELP、ADAMTs1、ADAMTS2、ADAMTS8、Cdh3、COL1A1、COL5A1、CTGF、ITGb1、ITGb4、MMP12、MMP14 等 13 个基因表达,参与调节软骨基质的合成与降解偶联失衡,从而有效减缓软骨退变,这提示 MMPS、ADAMTS 与 ITG 可能是独活寄生汤治疗 OA 的调控靶点,其具体机制有待于进一步深入研究。

本研究结果显示,独活寄生汤可以明显减缓 OA 软骨退变,其作用机制可能是通过激活 G 蛋白偶联信号传导通路而抑制软骨基质降解,从而使受损的软骨组织修复,但其具体作用靶点有待进一步深入研究。

## 5 参考文献

- [1] CORR EM, CUNNINGHAM CC, HELBERT L, et al. Osteoarthritis - associated basic calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 23.
- [2] MOUSSA M, LAJEUNESSE D, HILAL G, et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage[J]. Exp Cell Res, 2017, 352(1): 146-156.
- [3] 李西海, 张翼, 叶蕪芝, 等. 独活寄生汤治疗风寒湿痹型

- 膝骨关节炎的机制[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 68-71.
- [4] 林木南, 刘献祥, 王水良, 等. 治疗型关节炎护膝对实验性骨关节炎软骨细胞凋亡基因 Bcl-2 及 p53 的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22(9): 688-691.
- [5] 郑文伟, 马玉环, 陈后煌, 等. 跳骨片抑制大鼠膝骨关节炎 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路介导炎症反应的机制研究[J]. 国际骨科学杂志, 2017, 38(1): 60-64.
- [6] 林木南, 刘献祥, 李西海, 等. 治疗型关节炎护膝对膝骨关节炎兔关节液中转化生长因子  $\beta$  及胰岛素样生长因子的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 11-14.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] MANKIN HJ, JOHNSON ME, LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. J Bone Joint Surg Am, 1981, 63(1): 131-139.
- [9] 李西海, 陈文列, 刘献祥. 补肾柔肝法防治骨性关节炎作用机制探讨[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(2): 66-69.
- [10] 周肃陵, 刘肖瑜, 王正. 独活寄生汤在骨伤科的临床应用[J]. 中医正骨, 2006, 18(12): 67-69.
- [11] 卢跃卿, 任小巧, 邢海燕. 中医肝肾同源与神经内分泌免疫网络关系[J]. 中华实用中西医杂志, 2000, 13(4): 765.
- [12] 王耀光. “肝肾同源”论初探[J]. 中医杂志, 2008, 49(1): 5-7.
- [13] STEFFENS B, SAUTER M. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling[J]. Plant Signal Behav, 2010, 5(4): 375-378.
- [14] TESMER JJ. The quest to understand heterotrimeric G protein signaling[J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17(6): 650-652.
- [15] BASCOUL-COLOMBO C, GARAIOVA I, PLUMMER SF, et al. Glucosamine hydrochloride but not chondroitin sulfate prevents cartilage degradation and inflammation induced by interleukin-1 $\alpha$  in bovine cartilage explants[J]. Cartilage, 2016, 7(1): 70-81.
- [16] 邵翔, 陈后煌, 陈达, 等. 透骨消痛胶囊抑制脂多糖诱导软骨细胞炎症反应的机制研究[J]. 国际骨科学杂志, 2016, 37(6): 406-410.
- [17] WANG CC, GUO L, TIAN FD, et al. Naringenin regulates production of matrix metalloproteinases in the knee-joint and primary cultured articular chondrocytes and alleviates pain in rat osteoarthritis model[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2017, 50(4): e5714.
- [18] ZHANG Y, LIN J, WEI F. The function and roles of ADAMTS-7 in inflammatory diseases[J]. Mediators Inflamm, 2015, (9): 1-11.
- [19] MONFOULET LE, PHILIPPE C, MERCIER S, et al. Deficiency of G-protein coupled receptor 40, a lipid-activated receptor, heightens in vitro- and in vivo-induced murine osteoarthritis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(7): 854-866.
- [20] VARANI K, VINCENZI F, TOSI A, et al. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(1): 101-115.
- [21] BERG V, SVEINBJÖRNSSON B, BENDIKSEN S, et al. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin 21-157[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(6): R228.
- [22] 刘俊才, 陈友霞, 李忠, 等. 整合素  $\alpha 5\beta 1$  在膝骨关节炎不同退变程度关节软骨中的差异性表达[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(8): 1155-1160.

(2017-03-16 收稿 2017-04-27 修回)

(上接第 4 页)

- [23] KAWASAKI Y, ZHANG L, CHENG JK, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. J Neurosci, 2008, 28(20): 5189-5194.
- [24] ORITA S, ISHIKAWA T, MIYAGI M, et al. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 12(1): 134.
- [25] 柯志鹏, 张新庄, 丁玥, 等. 利用网络药理学方法研究芪桂痛风片的药效物质基础与分子作用机制[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2837-2842.
- [26] 乙军, 周业庭, 潘武, 等. 独活挥发油灌胃对兔膝骨关节炎的保护作用及其机制[J]. 临床骨科杂志, 2013, 16(4): 451-454.
- [27] 易增兴. 羌活与独活水煎液的抗炎镇痛作用[J]. 宜春学院学报, 2013, 35(3): 68-70.

(2017-05-12 收稿 2017-06-07 修回)