

基于 Hippo-YAP 信号通路探讨黄芩苷干预 膝关节炎大鼠的疗效和作用机制

郭运岭¹, 李蕊², 傅聪¹, 褚昆³, 李会杰³

(1. 秦皇岛市中医医院, 河北 秦皇岛 066000;

2. 秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066000;

3. 河北医科大学第三医院, 河北 石家庄 050051)

摘要 目的:探讨黄芩苷干预膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠的疗效和作用机制。**方法:**将 50 只大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组, 每组 10 只。将假手术组以外的大鼠采用切断前交叉韧带和切除内侧半月板的方法建立右膝关节 KOA 模型, 假手术组大鼠于右膝关节内侧做一切口后缝合。造模成功后, 低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组大鼠分别按照 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予黄芩苷生理盐水溶液灌胃; 高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠按照 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予黄芩苷生理盐水溶液灌胃, 并按照 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予 XMU-MP-1 溶液腹腔注射; 假手术组和模型组大鼠均给予等量生理盐水灌胃。每天给药 1 次, 连续给药 30 d。分别于给药前、给药 15 d 时、给药 30 d 时测量大鼠双侧膝关节肿胀程度。给药结束后处死大鼠, 取大鼠右侧膝关节软骨组织, 采用苏木精-伊红染色和番红 O-固绿染色观察膝关节软骨组织病理变化, 采用 Mankin 评分标准评价软骨退变情况, 采用 ELISA 试剂盒检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-10、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 表达水平, 采用 Western blotting 检测滑膜组织中切割活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved-cysteine aspartic acid specific protease, Cleaved-Caspase)-3、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白、Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)、Tafazzin(TAZ)蛋白的表达水平。**结果:**①大鼠右膝关节肿胀程度。给药 15 d 时和给药 30 d 时, 高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节肿胀程度均低于模型组、低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节肿胀程度两两比较, 差异均无统计学意义($P=0.063$, $P=0.215$, $P=0.399$; $P=0.052$, $P=0.261$, $P=0.240$)。②大鼠右膝关节软骨组织病理变化。干预结束后, 模型组大鼠右膝关节软骨萎缩、排列混乱; 低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨萎缩、细胞排序情况均较模型组改善, 且高剂量黄芩苷组大鼠的改善情况优于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组。③大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分。干预结束后, 低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分均低于模型组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 高剂量黄芩苷组右膝关节软骨 Mankin 评分低于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$), 低剂量黄芩苷组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分低于高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$)。④大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 表达水平。低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 表达水平均低于模型组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), IL-10 表达水平均高于模型组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 表达水平均低于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), IL-10 表达水平高于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$)。⑤大鼠右膝关节软骨组织细胞凋亡及 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白表达水平。低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 表达水平均低于模型组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), BCL-2、YAP、TAZ 表达水平均高于模型组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 表达水平均低于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$), BCL-2、YAP、TAZ 表达水平均高于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。结论: 黄芩苷干预 KOA 大鼠, 能够缓解膝关节肿胀, 抑制炎症反应和细胞凋亡, 延缓关节软骨退变, 其作用机制可能与激活 Hippo-YAP 信号通路有关。

关键词 骨关节炎; 膝; 黄芩苷; Hippo 信号通路; YAP-信号蛋白; 大鼠; 动物实验

通讯作者: 李蕊 E-mail: 252977988@qq.com

Outcome and mechanism of baicalin against knee osteoarthritis in rats: a Hippo-YAP signaling pathway-based experimental study

GUO Yunling¹, LI Rui², FU Cong¹, CHU Kun³, LI Huijie³

1. Qinhuangdao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qinhuangdao 066000, Hebei, China

2. The First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei, China

3. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of baicalin (BC) on knee osteoarthritis (KOA) in rats, and to explore its mechanism.

Methods: Fifty rats were randomized into sham (SH) group, model group, low-dose BC (L-BC) group, high-dose BC (H-BC) group, and H-BC combined inhibitor group, 10 rats in each group. All rats but the ones in SH group were subjected to anterior cruciate ligament transection (ACLT) and medial meniscectomy on the right knees for inducing KOA; while the ones in SH group underwent surgeries for merely making incision on the medial side of right knee, and the incision was sutured instantly after exposing the articular cavity. After successful modeling, the rats in L-BC group and H-BC group were intragastric administrated with 50 and 100 mg/kg BC physiological saline solution (PSS), respectively; the ones in H-BC combined inhibitor group with 100 mg/kg BC PSS, followed by intraperitoneal injection of 1 mg/kg XMU-MP-1 solution; while the ones in SH group and model group with the same dose of normal saline. All rats in the 5 groups were intervened once a day for consecutive 30 days. Before the drug intervention, on day 15 and 30 after the drug intervention, the degree of swelling in the bilateral knees was measured, respectively. After the end of drug intervention, the rats were sacrificed, and their right knee cartilage tissues were harvested and stained with hematoxylin-eosin (HE) and safranin O-fast green (SO-FG) for observing the histopathological changes; meanwhile, the degree of knee articular cartilage degeneration was evaluated by using Mankin scoring system. Furthermore, the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-10 and matrix metalloproteinase (MMP)-13 in the right knee cartilage tissues were detected by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, and the expression levels of the Cleaved-cysteine aspartic acid specific protease (Cleaved-Caspase)-3, Bcl2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein, Yes-associated protein (YAP) and Tafazzin (TAZ) in the synovial tissues were detected by using Western blotting. **Results:** ① On day 15 and 30 after the drug intervention, the degree of swelling in the right knee was lower in H-BC group compared to model group, L-BC group and H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); further pairwise comparison among model group, L-BC group and H-BC combined inhibitor group showed no statistical significance ($P=0.063$, $P=0.215$, $P=0.399$; $P=0.052$, $P=0.261$, $P=0.240$). ② After the end of drug intervention, the atrophic and disorderly arranged cartilage was observed in the right knee of rats in model group. The cartilage atrophy and cellular arrangement were improved in rats of L-BC group, H-BC group, and H-BC combined inhibitor group compared with that of model group, and the improvement was better in H-BC group in contrast to L-BC group and H-BC combined inhibitor group. ③ After the end of drug intervention, the Mankin score of the right knee cartilage was lower in L-BC group, H-BC group and H-BC combined inhibitor group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), and was lower in L-BC group compared to H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$), and was lowest in H-BC group ($P=0.000$, $P=0.000$). ④ The expression levels of TNF- α , IL-1 β , and MMP-13 in the right knee cartilage tissues were lower in L-BC group, H-BC group and H-BC combined inhibitor group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), and was lower in H-BC group compared to L-BC group and H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); while the expression level of IL-10 was higher in L-BC group, H-BC group and H-BC combined inhibitor group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), and was higher in H-BC group compared to L-BC group and H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$, $P=0.000$). ⑤ The Cleaved-Caspase-3 and Bax were lowly expressed in the right knee cartilage tissues of rats in L-BC group, H-BC group and H-BC combined inhibitor group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), and were lowly expressed in H-BC group compared to L-BC group and H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$); while the BCL-2, YAP and TAZ were highly expressed in L-BC group, H-BC group, and H-BC combined inhibitor group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), and were highly expressed in H-BC group compared to L-BC group and H-BC combined inhibitor group ($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$). **Conclusion:** BC can alleviate knee swelling, inhibit inflammatory response and apoptosis, and delay articular cartilage degeneration in KOA rats. It may work by activating Hippo-YAP signaling pathway.

Keywords osteoarthritis, knee; baicalin; Hippo signaling pathway; YAP-signaling proteins; rats; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种膝关节慢性退行性疾病, 主要表现为膝关节疼痛、肿胀、活动受限, 严重影响中老年人的生活质量^[1]。目前, KOA 的发病机制尚不清楚, 亦缺乏有效的干预方法^[2]。因此, 开发有效干预 KOA 的新药具有重要的临床意义。中药在治疗 KOA 方面疗效显著, 而中药复杂的成分也为 KOA 新药开发提供了研究方向。黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血等功效^[3]。黄芩苷是从黄芩根中提取的重要化学物质, 具有抗炎、抑菌、免疫调控等作用^[4]。相关研究^[5-7]表明, 黄芩苷在 KOA 的干预中表现出修复软骨细胞损伤、抑制炎症反应等作用。但其作用机制尚未明确。Hippo-YAP 信号通路在炎症反应调控、细胞增殖、细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[8]。邓新超等^[9]研究发现, 激活 Hippo-YAP 信号通路能够抑制 KOA 大鼠膝关节软骨组织的炎症反应和细胞凋亡。本研究基于 Hippo-YAP 信号通路探讨了黄芩苷干预 KOA 大鼠的效果与可能的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级 7 周龄 SD 大鼠 50 只, 体质量 180 ~ 200 g, 购自上海砥石生物科技有限公司 [生产许可证号: SCXK(沪) 2021-0003]。实验方案经秦皇岛市中医医院伦理委员会审查通过, 伦理批件号: 2023-032。

1.2 实验试剂

黄芩苷 (美国 Sigma 公司), Hippo-Yes 相关蛋白 (Yes-Associated Protein, YAP) 信号抑制剂-XMU-MP-1 (美国 MCE 公司), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-10、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-13 ELISA 检测试剂盒 (上海酶联免疫生物技术有限公司), 苏木精-伊红染色、番红 O-固绿染色试剂盒 (上海宏英达科技有限公司), 切割活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Cleaved-cysteine aspartic acid specific protease, Cleaved-Caspase)-3、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl2 associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白、YAP、Tafazzin (TAZ) 蛋白、 β -肌动蛋白的抗体 (英国 Abcam 公司)。

1.3 实验仪器

RM2016 石蜡切片机 (德国徕卡), BX53 光学显微镜 (日本 Olympus), Allegra X-22R 离心机 (美国贝

克曼), ELX800 全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek)。

2 方法

2.1 分组方法

将 50 只大鼠称重, 按照体质量由高到低排序, 依次编号 1 ~ 50。从随机数字表中连续抄录 50 个随机数字与大鼠编号依次对应, 将 50 个随机数字从小到大排序 (如两个随机数字相同则按照出现顺序排序), 排序位于 1 ~ 10 的随机数字对应的大鼠纳入假手术组, 排序位于 11 ~ 20 的随机数字对应的大鼠纳入模型组, 排序位于 21 ~ 30 的随机数字对应的大鼠纳入低剂量黄芩苷组, 排序位于 31 ~ 40 的随机数字对应的大鼠纳入高剂量黄芩苷组, 排序位于 41 ~ 50 的随机数字对应的大鼠纳入高剂量黄芩苷联合抑制剂组。

2.2 造模方法

将假手术组以外的大鼠进行 KOA 造模: 采用腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠, 于右膝关节内侧做一切口, 暴露关节腔; 切断前交叉韧带并切除内侧半月板; 缝合切口, 酒精消毒后包扎。假手术组大鼠于右膝关节内侧做一切口, 暴露关节腔后即缝合、消毒、包扎。术后常规注射青霉素预防感染。大鼠出现膝关节肿胀、跛行表示造模成功^[10]。

2.3 干预方法

造模成功后, 低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组大鼠分别按照 50 mg · kg⁻¹、100 mg · kg⁻¹ 的剂量给予黄芩苷生理盐水溶液灌胃^[11]; 高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠按照 100 mg · kg⁻¹ 的剂量给予黄芩苷生理盐水溶液灌胃, 并按照 1 mg · kg⁻¹ 的剂量给予 XMU-MP-1 溶液腹腔注射^[12]; 假手术组和模型组大鼠均给予等量生理盐水灌胃。每天给药 1 次, 连续给药 30 d。

2.4 评价方法

分别于给药前、给药 15 d 时、给药 30 d 时采用游标卡尺测量大鼠双侧膝关节横径, 以双侧膝关节横径差值表示大鼠右膝关节肿胀程度。

给药结束后, 处死大鼠, 取大鼠右侧膝关节软骨, 制备石蜡切片, 分别采用苏木精-伊红染色和番红 O-固绿染色观察膝关节软骨组织病理变化, 并采用 Mankin 评分标准^[13]评价软骨退变情况。

取 1 g 大鼠右侧膝关节软骨组织, 加入 9 mL 生理盐水, 研磨匀浆, 离心后取上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 的含量,

采用 Western blotting 检测 Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2、YAP、TAZ 的表达水平。

2.5 数据统计方法

采用 SPSS26.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。5 组大鼠右膝关节肿胀程度的比较采用重复测量资料的方差分析,软骨退变 Mankin 评分,以及软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13、Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2、YAP、TAZ 表达水平的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 SNK- q 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠右膝关节肿胀程度

时间因素和分组因素存在交互效应。5 组大鼠右膝关节肿胀程度总体比较,差异有统计学意义,即具有分组效应。低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节肿胀程度不同时间点的差异无统计学意义,假手术组、模型组和高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节肿胀程度不同时间点的差异有统计学意义。给药前,模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节肿胀程度均高于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组、模型组大鼠右膝关节肿胀程度两两比较,差异均无统计学意义 ($P=0.698, P=0.851, P=0.739, P=0.858, P=0.950, P=0.903$)。给药 15 d 时和给药 30 d 时,模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节肿胀程度均高于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),模型组、低

剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节肿胀程度两两比较,差异均无统计学意义 ($P=0.063, P=0.215, P=0.399; P=0.052, P=0.261, P=0.240$),高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节肿胀程度低于模型组、低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。见表 1。

3.2 大鼠右膝关节软骨组织病理变化

苏木精-伊红染色结果显示,假手术组大鼠右膝关节软骨结构正常、细胞有序排列;模型组大鼠右膝关节软骨萎缩、细胞排列混乱;低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨萎缩、细胞排序情况均较模型组改善,高剂量黄芩苷组大鼠的改善情况优于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组(图 1)。

番红 O-固绿染色结果显示,假手术组大鼠右膝关节软骨基质呈鲜红色,软骨表面胶原纤维层以及软骨下骨和骨小梁呈绿色;模型组大鼠右膝关节软骨基质红色变浅、范围缩小,绿色范围明显增大;低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组大鼠右膝关节软骨基质与模型组比较,红色变深、范围增大,且高剂量黄芩苷组更加显著;高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨基质与高剂量黄芩苷组比较,红色变浅、范围缩小(图 2)。

3.3 大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分

干预结束后,5 组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分比较,差异有统计学意义。模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分均高于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),低剂量黄芩苷组、

表 1 干预前后 5 组大鼠右膝关节肿胀程度

组别	样本量/ 只	膝关节肿胀程度/ $(\bar{x} \pm s, \text{mm})$				F 值	P 值
		给药前	给药 15 d 时	给药 30 d 时	合计		
假手术组	10	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	23.333	0.000
模型组	10	3.73 \pm 0.34	4.18 \pm 0.37	4.34 \pm 0.53	4.08 \pm 0.48	5.626	0.009
低剂量黄芩苷组	10	3.68 \pm 0.32	3.77 \pm 0.42	3.83 \pm 0.45	3.76 \pm 0.39	0.355	0.704
高剂量黄芩苷组	10	3.74 \pm 0.36	2.82 \pm 0.31	2.14 \pm 0.28	2.90 \pm 0.73	63.611	0.000
高剂量黄芩苷联合抑制剂组	10	3.71 \pm 0.38	3.94 \pm 0.46	4.08 \pm 0.47	3.91 \pm 0.45	1.815	0.182
合计	50	2.97 \pm 1.53	2.95 \pm 1.58	2.89 \pm 1.68	2.94 \pm 1.59	0.809 ¹⁾	0.448 ¹⁾
F 值		279.001	235.644	676.990	127.230 ¹⁾	$F=15.337^{2)},$	
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000 ¹⁾	$P=0.000^{2)}$	

注:1)主效应的 F 值和 P 值;2)交互效应的 F 值和 P 值。

高剂量黄芩苷组、高剂量黄芩苷联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分均低于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), 高剂量黄芩苷组右膝关节软骨 Mankin 评分低于低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷联合抑制剂组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 低剂量黄芩苷组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分低于高剂量黄芩苷联

合抑制剂组 ($P = 0.000$)。见表 2。

3.4 大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 表达水平

干预结束后, 5 组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 表达水平组间比较, 差异均有统计学意义。模型组、低剂量黄芩苷组、高剂量黄

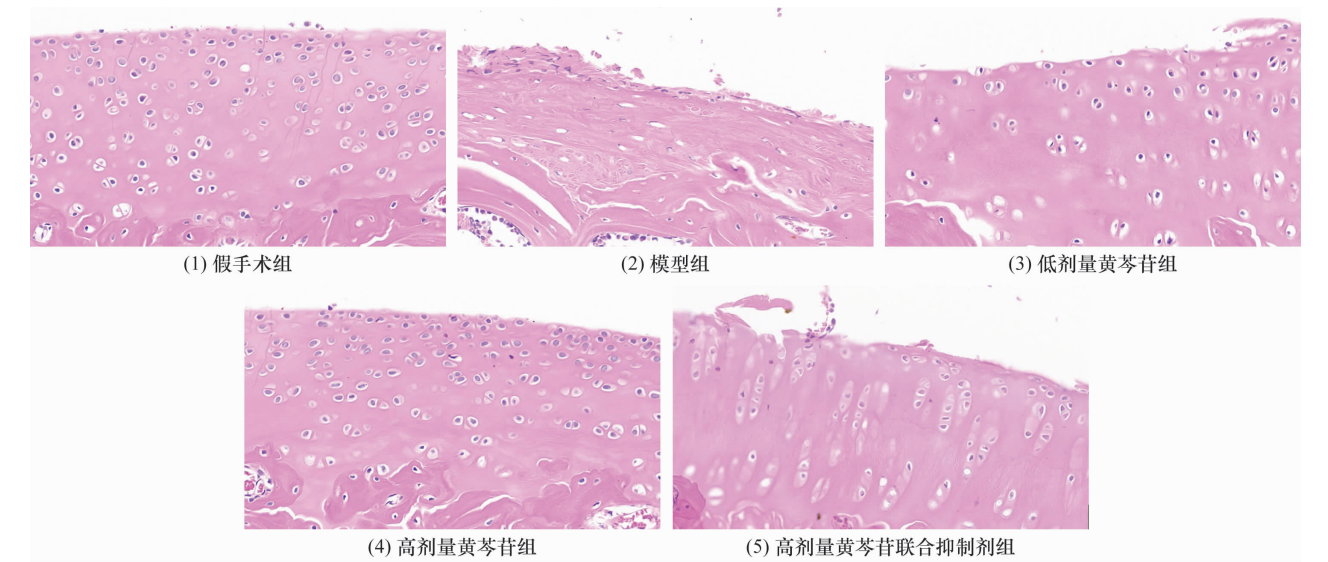


图 1 大鼠右膝关节软骨组织苏木精-伊红染色结果 (×400)

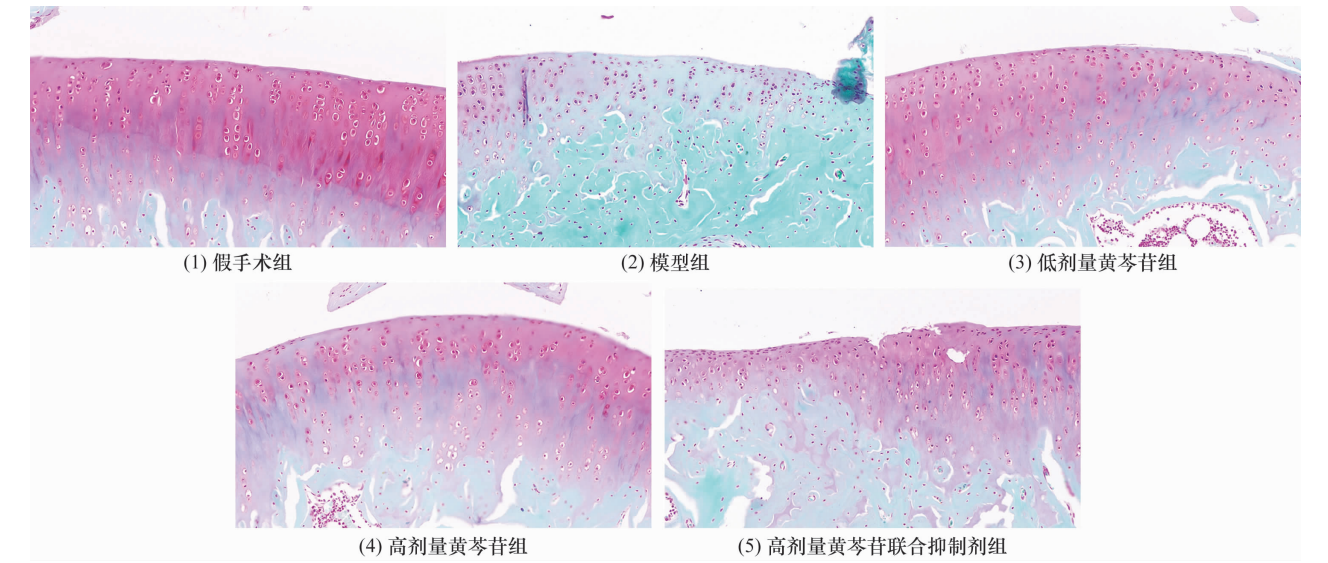


图 2 大鼠右膝关节软骨组织番红 O-固绿染色结果 (×200)

表 2 干预结束后 5 组大鼠右膝关节软骨 Mankin 评分

组别	样本量/只	Mankin 评分/ ($\bar{x} \pm s$, 分)
假手术组	10	0.40 ± 0.08
模型组	10	12.80 ± 2.13
低剂量黄芩苷组	10	8.60 ± 1.47
高剂量黄芩苷组	10	5.30 ± 0.85
高剂量黄芩苷联合抑制剂组	10	9.70 ± 1.72
F 值		107.476
P 值		0.000

芩苈组、高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 表达水平均高于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), IL-10 表达水平均低于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 低剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 表达水平均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), IL-10 表达水平均高于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 低剂量黄芩苈组与高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 的表达水平组间比较, 差异均无统计学意义 ($P=0.267, P=0.318, P=0.164, P=0.122$); 高剂量黄芩苈组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 表达水平均低于低剂量黄芩苈组和高剂量黄芩苈联合抑制剂组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), IL-10 表达水平高于低剂量黄芩苈组和高剂量黄芩苈联合抑制剂组 ($P=0.000, P=0.000$)。见表 3。

3.5 大鼠右膝关节软骨组织细胞凋亡及 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白表达水平

干预结束后, 5 组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2、YAP、TAZ 表达水平组间比较, 差异均有统计学意义。模型组、低剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 表达水平均高于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),

$P=0.000$), Bcl-2、YAP、TAZ 表达水平均低于假手术组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 低剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈组、高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 表达水平均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), BCL-2、YAP、TAZ 表达水平均高于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 低剂量黄芩苈组和高剂量黄芩苈联合抑制剂组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax、BCL-2、YAP、TAZ 表达水平比较, 差异均无统计学意义 ($P=0.187, P=0.317, P=0.222, P=0.104, P=0.328$); 高剂量黄芩苈组大鼠右膝关节软骨组织中 Cleaved-Caspase-3、Bax 表达水平均低于低剂量黄芩苈组和高剂量黄芩苈联合抑制剂组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), BCL-2、YAP、TAZ 表达水平均高于低剂量黄芩苈组和高剂量黄芩苈联合抑制剂组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$)。见表 4 和图 3。

4 讨论

KOA 的发生与膝关节炎症关系密切。TNF- α 和 IL-1 β 是促炎性细胞因子, 能够加剧 KOA 患者的炎症反应和软骨退变; IL-10 是抗炎因子, 具有免疫调节和抗炎的作用, 在抑制 KOA 发展进程中发挥重要作用^[14]。MMP-13 能够降解 II 型胶原, 参与关节软骨的降解^[15]。Cleaved-Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 在调控细胞凋亡过程中发挥重要作用, Cleaved-Caspase-3 和 Bax 高表达能够促进细胞凋亡, Bcl-2 高表达能够抑制细胞凋亡^[16]。本研究结果显示, 黄芩苈能够抑制

表 3 干预结束后 5 组大鼠右膝关节软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 表达水平

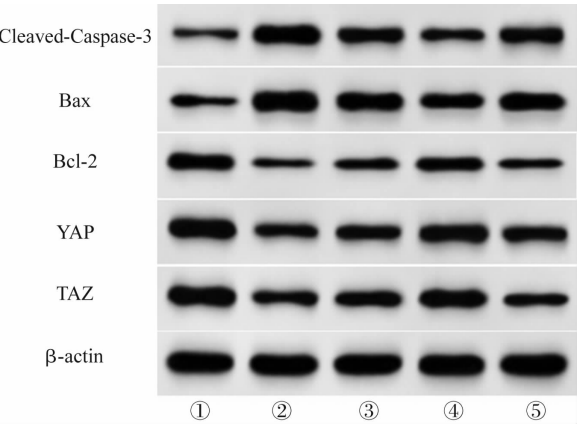
组别	样本量/ 只	TNF- $\alpha^{1)}$ / ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL $^{2)}$ -1 β / ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MMP $^{3)}$ -13/ ($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
假手术组	10	23.71 \pm 2.26	6.57 \pm 1.13	93.86 \pm 11.43	98.64 \pm 10.21
模型组	10	75.64 \pm 5.14	29.72 \pm 3.62	28.47 \pm 3.12	326.72 \pm 24.86
低剂量黄芩苈组	10	54.37 \pm 4.29	20.48 \pm 2.48	51.73 \pm 5.34	235.47 \pm 16.38
高剂量黄芩苈组	10	32.85 \pm 2.61	10.37 \pm 1.36	78.52 \pm 7.48	137.54 \pm 11.76
高剂量黄芩苈联合抑制剂组	10	61.47 \pm 4.87	23.92 \pm 2.54	42.16 \pm 3.94	278.19 \pm 15.43
F 值		278.489	159.190	148.977	333.156
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 肿瘤坏死因子- α ; 2) 白细胞介素; 3) 基质金属蛋白酶。

表 4 干预结束后 5 组大鼠右膝关节软骨组织中细胞凋亡及 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白表达水平

组别	样本量/ 只	Cleaved-Caspase-3 ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Bax ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)	Bcl-2 ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)	YAP ⁴⁾ ($\bar{x} \pm s$)	TAZ ⁵⁾ ($\bar{x} \pm s$)
假手术组	10	0.23 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.74 ± 0.06	1.13 ± 0.12	1.02 ± 0.09
模型组	10	0.87 ± 0.07	1.07 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.41 ± 0.04
低剂量黄芩苷组	10	0.64 ± 0.06	0.72 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.68 ± 0.07	0.62 ± 0.04
高剂量黄芩苷组	10	0.38 ± 0.03	0.57 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.91 ± 0.08	0.84 ± 0.07
高剂量黄芩苷 联合抑制剂组	10	0.68 ± 0.07	0.81 ± 0.07	0.32 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.54 ± 0.05
F 值		219.558	202.104	252.871	112.573	158.503
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)切割活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;2)B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;3)B 淋巴细胞瘤-2;4)Yes 相关蛋白;
5)Tafazzin 蛋白。



Cleaved-Caspase-3 为切割活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,Bax 为 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白,Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2,YAP 为 Yes 相关蛋白,TAZ 为 Tafazzin 蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白,①为假手术组,②为模型组,③为低剂量黄芩苷组,④为高剂量黄芩苷组,⑤为高剂量黄芩苷联合抑制剂组。

图 3 干预结束后 5 组大鼠右膝关节软骨组织中细胞凋亡及 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白表达检测图片

TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13、Cleaved-Caspase-3、Bax 的表达,促进 IL-10、Bcl-2 的表达,提示黄芩苷发挥了抑制软骨组织炎症反应和细胞凋亡的作用。

Hippo-YAP 信号通路参与细胞增殖分化、细胞凋亡等过程。YAP 是 Hippo-YAP 信号通路的主要效应因子,TAZ 是 YAP 的下游信号分子,YAP/TAZ 在炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡、组织再生修复过程中发挥作用^[8]。未磷酸化的 YAP 可由细胞质进入细胞核,并与多种转录因子形成稳定复合物,通过调控靶基因的表达发挥相应的生物学作用^[17]。Deng 等^[18]研究发现,YAP 的激活与维持软骨完整性及抑制炎症反应关系密切,而抑制 YAP 的表达可引起炎症反应和软

骨破坏。Cui 等^[19]研究发现,骨关节炎软骨细胞中 YAP 降低导致合成代谢水平下降,进而加剧软骨退变。Su 等^[20]研究发现,激活 YAP 可抑制骨关节炎患者成纤维细胞样滑膜细胞增殖,抑制 MMP-13 的表达和炎症因子的分泌,进而发挥保护软骨细胞的作用。本研究结果显示,KOA 大鼠膝关节软骨细胞中 Hippo-YAP 信号通路被抑制,而黄芩苷能够提高软骨细胞中 YAP、TAZ 的蛋白表达水平,提示黄芩苷可能通过激活 Hippo-YAP 信号通路发挥抑制软骨组织炎症反应和细胞凋亡的作用。此外,我们设置了高剂量黄芩苷联合抑制剂组,在给予大鼠高剂量黄芩苷灌胃的基础上腹腔注射 Hippo-YAP 信号抑制剂 XMU-MP-1,进而探讨黄芩苷干预 KOA 的作用机制,结果显示 Hippo-YAP 信号抑制剂 XMU-MP-1 能够部分逆转黄芩苷对膝骨关节炎大鼠的保护作用。因此,我们认为激活 Hippo-YAP 信号通路可能是黄芩苷抑制 KOA 大鼠膝关节软骨组织炎症反应和细胞凋亡的重要作用机制之一。但黄芩苷干预 KOA 大鼠可能还存在其他靶点与通路,尚需进一步深入研究。

本研究结果表明,黄芩苷干预 KOA 大鼠,能够缓解膝关节肿胀,抑制炎症反应和细胞凋亡,延缓关节软骨退变,其作用机制可能与激活 Hippo-YAP 信号通路有关。

参考文献

[1] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨,2020,32(10):1-14.
[2] LIEW J W, KING L K, MAHMOUDIAN A, et al. A scoping review of how early-stage knee osteoarthritis has been defined[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2023, 31(9):1234-1241.
[3] KONG N, CHEN X, FENG J, et al. Baicalin induces ferro-

- tosin in bladder cancer cells by downregulating FTH1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (12): 4045 – 4054.
- [4] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (1): 88 – 96.
- [5] XING D, GAO H, LIU Z, et al. Baicalin inhibits inflammatory responses to interleukin-1 β stimulation in human chondrocytes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2017, 37 (9): 398 – 405.
- [6] HE J, HE J. Baicalin mitigated IL-1 β -Induced osteoarthritis chondrocytes damage through activating mitophagy [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 101 (6): 1322 – 1334.
- [7] CHEN X, LIU J, SUN Y, et al. Correlation analysis of differentially expressed long non-coding RNA HOTAIR with PTEN/PI3K/AKT pathway and inflammation in patients with osteoarthritis and the effect of baicalin intervention [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18 (1): 34.
- [8] ZHENG M, LI R G, SONG J, et al. Hippo-YAP signaling maintains sinoatrial node homeostasis [J]. *Circulation*, 2022, 146 (22): 1694 – 1711.
- [9] 邓新超, 钱亮, 邹曼. 藏红花素调节 Hippo-YAP 信号通路抑制膝关节炎大鼠软骨细胞凋亡 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29 (4): 538 – 543.
- [10] 曾智, 李浩, 王晓旭, 等. 罗汉果皂苷 VI 对膝关节炎大鼠模型的治疗作用及其机制探讨 [J]. *免疫学杂志*, 2022, 38 (9): 804 – 809.
- [11] 孙标, 邓翠翠, 王加, 等. 黄芩苷对大鼠类风湿性关节炎软骨损伤的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38 (7): 1440 – 1446.
- [12] HAO X, ZHAO J, JIA L, et al. XMU-MP-1 attenuates osteoarthritis via inhibiting cartilage degradation and chondrocyte apoptosis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 998077.
- [13] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1971, 53 (3): 523 – 537.
- [14] SHEN Y, MALIK S A, AMIR M, et al. Decreased hepatocyte autophagy leads to synergistic IL-1 β and TNF mouse liver injury and inflammation [J]. *Hepatology*, 2020, 72 (2): 595 – 608.
- [15] AMELI F, GHAFOURINA NASSAB F, MASIR N, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) expression in benign and malignant breast lesions [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22 (8): 2603 – 2609.
- [16] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47 (3): 155 – 160.
- [17] YANG S, CHEN L, WANG Z, et al. Neutrophil extracellular traps induce abdominal aortic aneurysm formation by promoting the synthetic and proinflammatory smooth muscle cell phenotype via Hippo-YAP pathway [J]. *Transl Res*, 2023, 255: 85 – 96.
- [18] DENG Y, LU J, LI W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B regulates osteoarthritic cartilage degradation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 4564.
- [19] CUI Y, MIAO M Z, WANG M, et al. Yes-associated protein nuclear translocation promotes anabolic activity in human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31 (8): 1078 – 1090.
- [20] SU S, JIANG W, WANG X, et al. Resolvin D1 inhibits the proliferation of osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes through the Hippo-YAP signaling pathway [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23 (1): 149.

(收稿日期: 2023-12-26 本文编辑: 吕宁)

(上接第 14 页)

- [15] 王一方, 孙实, 赵新杰, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的“桂枝-白芍”药对治疗骨关节炎的潜在作用机制研究 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14 (25): 7 – 12.
- [16] 刘晓峰, 邢士新, 任锡禄, 等. 从肝论治绝经后膝关节炎探析 [J]. *河北中医*, 2020, 42 (6): 945 – 947.
- [17] 刘晓培, 夏婧, 王志红. 肝为“罢极之本”的研究进展 [J]. *四川中医*, 2016, 34 (3): 209 – 212.
- [18] 邢金丽, 张秋云, 王天芳, 等. 肝藏血理论探讨 [J]. *中医药导报*, 2014, 20 (4): 1 – 4.
- [19] 谢有琼, 彭锐, 周晓红. 从肝论治针灸调控 Bmal1 介导 ERK1/2 抑制大鼠 OA 模型炎症的机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33 (8): 2033 – 2037.
- [20] 陆嘉柯, 陈佳俊, 张小宁, 等. 从肝论治膝骨性关节炎研究进展 [J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57 (1): 74 – 75.
- [21] 张喜芬, 梅晓云. 肝脾与运动关系的中医研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2005, 21 (3): 202 – 204.
- [22] 张觉人, 刘静, 丁念. 《灵枢·天年》篇研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2019.
- [23] 廖太阳, 张力, 杨楠, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路研究膝痹宁方对膝关节炎模型大鼠的改善作用机制 [J]. *中国药房*, 2023, 34 (1): 23 – 28.
- [24] MALEMUD C J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 33 – 40.

(收稿日期: 2023-09-03 本文编辑: 李晓乐)