

葛根素通过调控炎症因子抑制兔膝关节骨性关节炎的研究

陈兴华,黄珍谷,王棚,刘涛

(重庆市大足区人民医院骨科,重庆 402360)

摘要:目的 研究葛根素对兔膝关节骨性关节炎的抑制作用及机制。**方法** 将40只成年新西兰兔随机分为正常组、模型组、生理盐水组、葛根素组,每组10只,后三组构建兔膝关节骨性关节炎模型。模型构建成功后,生理盐水组和葛根素组分别膝关节内注射生理盐水、葛根素0.5 mL,5周共10次。药物注射完成后,切开膝关节肉眼观察关节面,抽取关节液采用ELISA法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、环氧化酶2(COX2)、前列腺素E2(PGE2)表达水平,Western blot法检测关节软骨组织中基质金属蛋白酶2(MMP-2)、II型胶原蛋白(Collagen II)表达水平。**结果** 葛根素作用后膝关节软骨面病损程度明显减轻。葛根素作用后膝关节液中IL-1 β 、TNF- α 、COX2、PGE2表达水平降低,IL-10表达水平增加,而关节软骨组织中MMP-2表达降低,Collagen II表达增加。**结论** 葛根素可能参与了骨性关节炎中促炎因子与抑炎因子间的平衡,具有一定的抑制细胞外基质中胶原的降解作用,从而有可能减缓骨性关节炎的病程进展。

关键词:葛根素;骨性关节炎;炎症因子;基质金属蛋白酶;II型胶原蛋白

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.009

Puerarin inhibits the progress of osteoarthritis of rabbit knee by balancing inflammation system

CHEN Xinhua, HUANG Zhenggu, WANG Peng, LIU Tao

(Department of Orthopedics, Dazu District People's Hospital, Chongqing 402360, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of puerarin on osteoarthritis of rabbit knee and its mechanism. **Methods** Forty adult new zealand rabbits were randomly divided into normal, model, saline and puerarin group, ten in each group. The rabbits in last three groups were chose to construct knee osteoarthritis model. After success of model construction, the saline and puerarin group were injected with 0.5 mL saline or puerarin into knee joint cavity respectively, twice one week for five weeks. After treatment, changes on knee joint articular surface was observed by naked eye after incision. The expression level of IL-1 β , IL-10, TNF- α , COX2, PGE2 in synovia were detected by ELISA, and the expression level of MMP-2 and Collagen II in articular cartilage tissue were detected by Western blot. **Results** Cartilage lesion were alleviated after treatment with puerarin. The expression of IL-1 β , TNF- α , COX2, PGE2 decreased and

基金项目:重庆市卫生局科研项目(2012-2-356)

通信作者:黄珍谷,男,副主任医师,研究方向:创伤骨科和关节外科,E-mail:1293015523@qq.com

- [11] KIM KW, LIM TH, KIM JG, et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs[J]. Spine, 2003, 28(10):982-990.
- [12] 裴洪, 廖全明. GLUT-1 在人类腰椎间盘中表达及研究意义[J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 1(6):639-643.
- [13] 汤艳, 陈惠德. 退变椎间盘 NF- κ B 与 IL-1、IL-6、TNF- α 表达的相关性研究进展[J]. 安徽医药, 2011, 15(10):1304-1306.
- [14] LEE YA, JI HI, LEE SH, et al. The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints[J]. Exp Mol Med, 2014, 46:e72.
- [15] KIM K, PARK WY, KIM JY, et al. Prognostic Relevance of the Expression of CA IX, GLUT-1, and VEGF in Ovarian Epithelial Cancers[J]. Korean Journal of Pathology, 2012, 46(6):532.
- [16] MORAES TM, ROZZA AL, KUSHIMA H, et al. Healing actions of essential oils from Citrus aurantium and d-limonene in the gastric mucosa: the roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation[J]. J Med Food, 2013, 16(12):1162-1167.
- [17] AHLUWALIA A, TARNAWSKI AS. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(1):90-97.
- [18] SEMENZA GL. O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(3):1173-1177.
- [19] WALSH AJ, LOTZ JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading[J]. J Biomech, 2004, 37(3):329-337.
- [20] PARK JB, PARK IC, PARK SJ, et al. Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):771-779.

(收稿日期:2016-06-21,修回日期:2016-10-21)

IL-10 increased in synovia. MMP-2 expression decreased and Collagen II increased in articular cartilage tissue. **Conclusion** Puerarin by inhibiting degradation of collagen in extracellular matrix, may be involved in the balance between proinflammatory cytokines and anti-inflammatory factors, and prevent the progression of osteoarthritis.

Key words: Puerarin; Osteoarthritis; Inflammatory factor; Matrix metalloproteinases; Collagen II

骨性关节炎(OA)是一种以关节软骨退变、磨损、骨刺形成为主要表现的慢性、进展性关节疾病,已成为老年人群中致残的首要原因^[1-3]。近年来研究表明,与软骨破坏相关的炎性细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的分泌异常,是OA发生发展的中心环节^[4-5]。IL-1 β 、TNF- α 是有效的金属基质蛋白酶(MMPs)诱导剂,能促使MMPs产生,MMPs能溶解软骨细胞外基质而导致OA发展^[6-8]。IL-1 β 可以激活环氧化酶2(COX2)及诱生型一氧化氮合酶,从而导致前列腺素E2(PGE2)和一氧化氮的释放,进而产生强大的促炎作用,引起滑膜炎症和骨吸收,刺激滑膜成纤维细胞增殖,促进滑膜细胞黏附分子的表达,造成关节软骨生存的恶劣微环境^[9]。葛根素是从葛根中提取出来的中药单体成分,它能够阻断炎性信号通路的激活,从而改善炎性反应^[10-11]。本研究将对葛根素在骨关节炎中的作用及其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级40只成年新西兰兔,雌雄各半,体质量(2 ± 0.15) kg,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)20020001。

1.1.2 主要试剂 葛根素每支100 mg,北京四环科宝制药有限公司生产,生产批号13112032。IL-1 β 、白细胞介素-10(IL-10)、TNF- α 和PGE2兔ELISA试剂盒为上海广锐生物科技有限公司生产,COX2兔ELISA试剂盒为南京森贝伽生物科技有限公司生产。蛋白提取试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司生产。鼠抗兔基质金属蛋白酶2(MMP-2)多克隆抗体、鼠抗兔Collagen II多克隆抗体购于美国Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 将40只新西兰兔随机分为正常组、模型组、生理盐水组以及葛根素组,每组10只。

1.2.2 制备骨性关节炎模型 10%水合氯醛($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔内注射麻醉后,严格无菌操作,按照改良Hulth模型法建模,通过胫骨内侧髁为中心长约2 cm的纵行切口,切断膝内侧副韧带及前交叉韧带,切除关节内侧半月板,行膝关节前抽屉试验阳性,术中注意勿损伤关节软骨面,彻底止血及冲

洗,逐层缝合关闭切口^[12-14]。正常组仅行膝关节切开术。术后给予伤口局部涂布安尔碘涂布预防感染。手术7 d后开始驱赶,每日强迫驱赶动物行程约100 m。驱赶动物活动4周后,即得明显的膝关节骨性关节炎模型。造模完成后各组处死1只,并切开关节腔做肉眼观察。

1.2.3 给药方法 建模成功后,各组给药如下:正常组和模型组不给予任何处理;生理盐水组:兔膝关节注射生理盐水0.5 mL;葛根素组:兔膝关节注射葛根素(100 mg溶于0.5 mL生理盐水中)。1周2次,连续注射5周,共10次。

1.2.4 标本观察 观察关节软骨光滑度、色泽、表面是否有糜烂及溃疡、是否有纤维性增生以及边缘是否有骨赘形成等。根据彭氏组织病理学分级方法^[15]:I级关节面光滑,软骨透明,有光泽,无缺损及新生物,滑膜色泽淡红、无水肿充血表现;II级关节软骨表面较光滑,色泽较暗,软骨透明度低,光泽差,未见明显的新生物及骨赘,滑膜轻度肿胀,未见明显充血;III级关节面不光滑,软骨不透明,无光泽,可见明显的缺损及骨赘新生物,滑膜色紫暗、充血水肿明显。

1.2.5 ELISA法 采用ELISA法测定兔膝关节液中IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、COX2以及PGE2水平。用移液管吸出标准品、对照样本以及稀释后的待检测样品各25 μL ,加入孵育液体每孔100 μL 。室温下孵育2 h,洗液洗板6次,吸走液体后,加入抗体复合物每孔200 μL ,室温下继续孵育15 min,每孔中加入停止液50 μL 。在450 nm波长处测定吸光度值,并计算其含量。

1.2.6 Western blot法 将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的兔OA软骨组织提取蛋白,BCA法测定其浓度,按每孔40 μg 上样,然后行SDS-PAGE电泳;电泳结束后按分子量大小切胶,湿法转膜将SDS-PAGE凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上。5%脱脂奶粉(溶于 $1 \times \text{TBST}$)37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上封闭1 h,分别敷育一抗MMP-2(1:500)、II型胶原蛋白(Collagen II)(1:100)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST洗3次,每次洗5 min。然后分别敷育二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h,TBST再洗3次,每次洗5 min。最后敷育ECL发光液,暗室显影。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计数资料以例及率表示,组间比较为整体 + 分割卡方检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较为单方差分析 + HSD-*q* 多重比较,不符合正态分布或者方差不齐时选择秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功肉眼观察 造模完成后,各组分别处死 1 只兔,切开膝关节腔做肉眼观察。我们发现正常组膝关节面光滑,软骨透明,光泽度好,无缺损及骨赘,滑膜色泽淡红、无水肿充血表现。而各造模组(模型组、生理盐水组和葛根素组)的关节软骨色泽暗淡,部分呈现出米黄色,有龟裂或虫蚀样改变,滑膜增厚,关节比正常稍大,关节面破坏以股骨内裸改变较为明显。这一结果说明膝关节骨性关节炎模型造模成功。

2.2 葛根素作用后膝关节面肉眼观察 给药完成后,切开各组关节腔肉眼观察。结果显示:正常组

关节面光滑,软骨透明,有光泽,无缺损及骨赘,滑膜色泽淡红、无水肿充血表现;模型组和生理盐水组关节面都呈现不光滑,软骨透明度低,有不同程度的缺损和骨赘新生物,滑膜不同程度充血水肿;而葛根素组虽仍有关节面不光滑,软骨不透明等,但较生理盐水组和模型组病损程度明显减轻(图 1)。根据彭太平法组织病理学分级,我们对以上肉眼所见进行了分级及统计学分析(表 1)。统计分析

表 1 肉眼观察膝关节面病理改变分级结果/例(%)

组别	兔数 /只	分级			两两比较 显著性
		I	II	III	
N:正常组	9	9(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	
M:模型组	9	0(0.0)	3(33.3)	6(66.7)	a
S:生理盐水组	9	0(0.0)	2(22.2)	7(77.8)	a
P:葛根素组	9	1(11.1)	6(66.7)	2(22.2)	abc
整体分析	χ^2 值	38.352			
	<i>P</i> 值	0.000			

注:两两比较为分割卡方检验,其显著性标记:a、b、c 分别为和 N、M、S 组相比, $P < 0.05$ 。

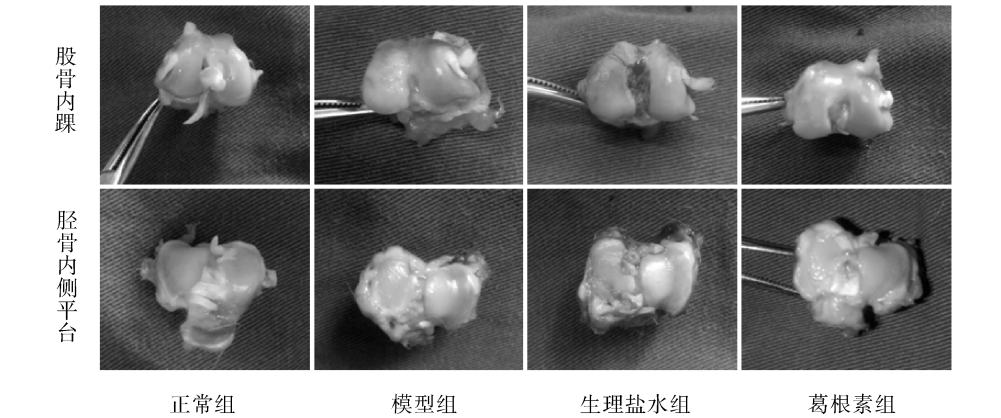
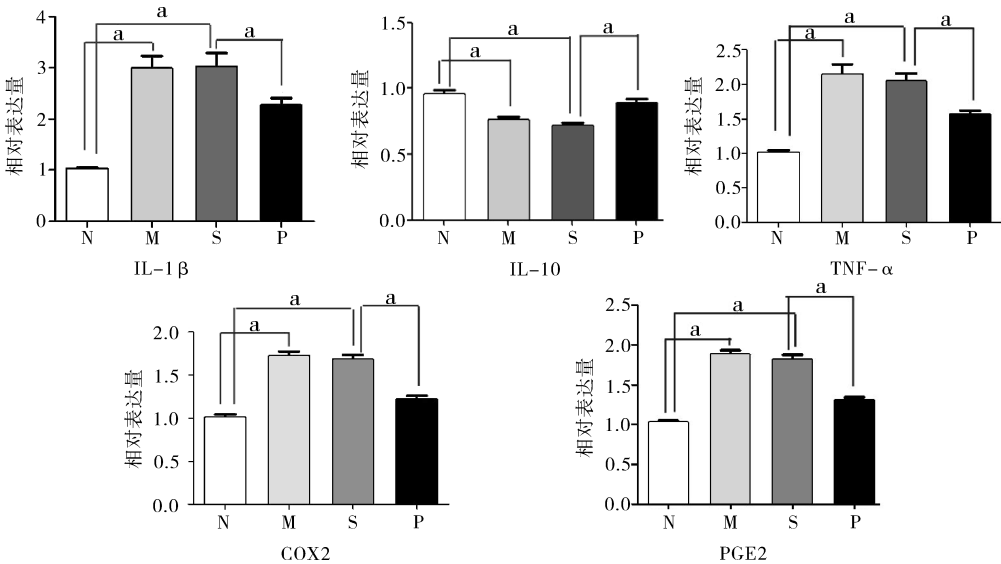


图 1 药物作用后各组膝关节面肉眼观



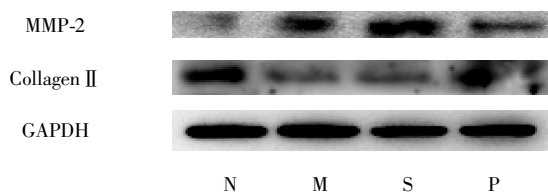
注:N:正常组;M:模型组;S:生理盐水组;P:葛根素组;两组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 2 各组膝关节液中 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、COX2、PGE2 表达情况

显示,模型组与正常组间差异有统计学意义($P < 0.05$),这也再次说明了本实验模型的构建是成功的。其次,分析显示模型组与生理盐水组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明关节腔注射生理盐水对兔膝关节骨性关节炎的病理改变无作用。而值得注意的是,葛根素组与生理盐水组比较,分级为Ⅱ的数量多于生理盐水组,而Ⅲ级少于生理盐水组,差异有统计学意义($P < 0.05$),这一结果提示葛根素可能具有改善兔膝关节骨性关节炎病理改变的作用。

2.3 葛根素对膝关节液中 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、COX2、PGE2 表达的影响 在本实验中,处死各组大白兔的当天,抽取各组大白兔膝关节液,应用 ELISA 法检测各组关节液中 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、COX2、PGE2 蛋白表达情况。结果显示,模型组和生理盐水组中各蛋白(除 IL-10 外)水平高于正常组($P < 0.05$),而 IL-10 表达水平低于正常组($P < 0.05$);模型组与生理盐水组间各蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$);值得注意的是,葛根素组中各蛋白(除 IL-10 外)表达水平均低于生理盐水组($P < 0.05$),而 IL-10 表达水平高于生理盐水组($P < 0.05$)(图2)。

2.4 葛根素对 MMP-2、Collagen II 表达的影响 采用 Western blot 法检测各组软骨组织中 MMP-2、Collagen II 蛋白表达水平。结果显示:模型组和生理盐水组中 MMP-2 表达水平显著高于正常组,而葛根素组 MMP-2 低于生理盐水组和模型组;同样,也发现 Collagen II 表达水平在模型组和生理盐水组中显著低于正常组,而在葛根素组中表达水平又高于模型组和生理盐水组(图3)。



注:N:正常组;M:模型组;S:生理盐水组;P:葛根素组。

图3 各组中 MMP-2、Collagen II 的表达水平

3 讨论

尽管 OA 的发病机制尚不十分清楚,但细胞因子网络在滑膜炎及软骨退变过程中起到了非常重要的作用,且其是使 OA 病变持续存在、迁延进展的关键因素。因此采用多种途径调节体内促炎因子与抑炎因子的平衡(即拮抗或下调促炎因子,补充或上调抑炎因子)已经成为探索 OA 治疗策略的

主要思路之一。

近年来,葛根素的抗炎作用也正逐渐为人们所认知。研究显示,葛根素能够通过阻断炎症通路的激活从而减轻炎症反应^[10-11]。在本实验中,我们发现经葛根素作用后,兔膝关节面较生理盐水组骨关节面更光滑,关节面缺损、骨赘以及滑膜充血水肿情况明显变轻,说明葛根素可一定程度上抑制兔膝关节 OA 的进一步发展,具有一定的治疗作用。

有学者对脑缺血再灌注损伤的大鼠动物模型的研究发现,模型组大鼠的 IL-1 β 水平明显升高,经过葛根素处理之后,葛根素处理组的 IL-1 β 水平比模型组降低^[16]。姜晓晓等^[17]研究表明静脉注射葛根素之后心脏病病人血液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的水平显著降低,IL-10 的表达升高,最终使得病人的炎症反应减轻。而在本实验中,我们发现葛根素作用后,促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、COX2、PGE2 在兔膝关节液中的表达明显减少,而抗炎因子 IL-10 则表达明显增加。这一结果提示葛根素可能参与了 OA 中促炎因子与抑炎因子间的平衡。这也一定程度上解释了葛根素能够减轻兔膝关节 OA 病理变化的原因。

MMPs 作为一种水解蛋白酶可水解细胞外基质,可导致关节软骨的破坏,从而影响关节软骨的功能^[18]。MMP-2 作为 MMPs 中重要的一员,MMP-2 过量分泌可导致关节软骨破坏^[19]。有研究已发现葛根素能够通过下调 MMP-1 在膝关节 OA 模型软骨中的表达,从而减轻软骨基质损害^[20]。在本实验中,我们同样发现葛根素能抑制兔膝关节 OA 软骨组织中 MMP-2 的表达,说明葛根素可能通过某种机制抑制 MMP-2 表达从而减轻软骨的损害。

Collagen II 是正常透明软骨特征性的胶原表型,大约占软骨中胶原成分的 80% ~ 90%,它作为一种间质胶原,构成了网状支架结构的主体,对维持软骨细胞的生物学功能起着极其重要的作用^[21]。有研究发现在骨关节炎中,软骨基质的 Collagen II 的表达量明显下降^[22]。在本实验中,我们同样发现 OA 模型组中 Collagen II 表达较正常组中明显减少,葛根素组中 Collagen II 表达高于生理盐水组和模型组,故推测葛根素可能阻止了 Collagen II 的降解。

本实验不足之处:一是本实验虽然发现葛根素对兔膝骨性关节炎确有积极作用,但未探讨不同浓度梯度对兔膝骨性关节炎的作用;再者,葛根素调节 MMP-2 以及 Collagen II 的表达机制亦未阐

明。这些都是本实验组下一步实验需重点解决的问题。

综上所述,本实验结果显示葛根素减轻了兔膝关节 OA 病理进展,葛根素下调了兔膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、COX2、PGE2 表达,上调了 IL-10 表达,并且抑制了关节软骨软骨中 MMP-2 的表达,同时促进了 Collagen II 的表达。这一结果提示葛根素可能参与了 OA 中促炎因子与抑炎因子间的平衡,具有一定的抑制细胞外基质中胶原的降解作用,从而有可能减缓 OA 的病程进展。

参考文献

[1] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志,2010,14(6):416-419.

[2] BAUGÉ C,GIRARD N,LHUISSIER E,et al. Regulation and Role of TGF β Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints[J]. *Aging & Disease*,2013,5(6):394.

[3] KALÁĚ E,BAHLOUS A,BOUZID K,et al. The role of type II collagen fragments and X-ray progression of knee osteoarthritis[J]. *Ann Biol Clin (Paris)*,2014,72(6):715-721.

[4] SANTANGELO KS,NUOVO GJ,BERTONE AL. In vivo reduction or blockade of interleukin-1 β in primary osteoarthritis influences expression of mediators implicated in pathogenesis[J]. *Osteoarthr Cartil*,2012,20(12):1610-1618.

[5] JIANG ZY, GUO YY, REN HB, et al. Tumor necrosis factor (TNF)- α upregulates progesterone receptor-A by activating the NF- κ B signaling pathway in human decidua after labor onset[J]. *Placenta*,2012,33(1):1-7.

[6] JOOSTEN LA,HELSEN MM,SAXNE T,et al. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation[J]. *J Immunol*,1999,163(9):5049-5055.

[7] VANDEN BERG WB,JOOSTEN LA,KOLLIAS G,et al. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction [J]. *Ann Rheum Dis*,1999,58(Suppl 1):I40-I48.

[8] ZHANG D,ZHOU Y. The protective effects of Donepezil (DP) against cartilage matrix destruction induced by TNF- α [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2014,454(1):115-118.

[9] CHENG AW,STABLER TV,Bolognesi M,et al. Selenomethionine inhibits IL-1 β inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX2) expression in primary human chondro-

cytes[J]. *Osteoarthr Cartil*,2011,19(1):118-125.

[10] YANG X,HU W,ZHANG Q,et al. Puerarin inhibits C-reactive protein expression via suppression of nuclear factor kappaB activation in lipopolysaccharide-induced peripheral blood mononuclear cells of patients with stable angina pectoris[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*,2010,107(2):637-642.

[11] HU W,ZHANG Q,YANG X,et al. Puerarin inhibits adhesion molecule expression in tnf-alpha-stimulated human endothelial cells via modulation of the nuclear factor kappaB pathway[J]. *Pharmacology*,2010,85(1):27-35.

[12] 谢希,高洁生. 骨关节炎动物模型研究进展[J]. 医学综述,2005,11(1):67-69.

[13] JIANG D,ZOU J,HUANG L,et al. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*,2010,11(10):4106-4113.

[14] WANG J,GAO JS,CHEN JW,et al. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit[J]. *Rheumatology International*,2011,32(6):1541-1548.

[15] 彭太平,潘乘龙,汤成华,等. 益肾蠲痹液离子导入治疗骨性关节炎的实验研究[J]. 中医正骨,1998,10(5):7-9.

[16] WAN H,ZHU H,TIAN M,et al. Protective effect of chuanxiong-zine-puerarin in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia[J]. *Nucl Med Commun*,2008,29(12):1113-1122.

[17] 姜晓晓,李勇,吴永宾,等. 葛根素预处理对体外循环围手术期细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(12):1089-1091.

[18] SU J,YU J,REN T,et al. Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis[J]. *Mol Cell Biochem*,2009,330(1/2):141-152.

[19] YUAN PW,YU HC,ZHOU HZ,et al. Preventive administration of juanbi capsules for knee osteoarthritis: effects on serum MMP-2 and MMP-9 levels and cartilage repair[J]. *Chung i tsa chih ying wen pan*,2011,31(4):334-337.

[20] 张汉庆,董晓俊,戴焱,等. 葛根素对兔膝关节骨性关节炎的影响[J]. 中国民族民间医药,2011,20(21):37-38.

[21] HUNZIKER EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects[J]. *Osteoarthr Cartil*,2002,10(6):432-463.

[22] 马春辉,蔡国平,阎作勤,等. II型胶原在骨关节炎软骨细胞中的表达[J]. 复旦学报(医学版),2009,36(6):734-736.

(收稿日期:2016-10-22,修回日期:2016-12-17)