

• 论 著 •

连翘苷调节 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路对膝骨性关节炎大鼠软骨损伤的影响^{*}

王海滨,李 平,张志刚,周万森
张家口市第二医院骨科,河北张家口 075000

摘 要:**目的** 探讨连翘苷调节丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核转录因子- κ B(NF- κ B)/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路对膝骨性关节炎大鼠软骨损伤的影响。**方法** 采用经典碘乙酸钠(MIA)法制备膝骨关节炎大鼠模型,随机分为模型组、连翘苷组、C16-PAF(MAPK 激活剂)组、连翘苷+C16-PAF 组,每组 10 只,另选 10 只大鼠作为对照组,以连翘苷和 C16-PAF 分组处理后,检测大鼠关节肿胀度,并以步态评分和爪压评分评测大鼠关节功能;透射电镜检测各组大鼠关节软骨形态;TUNEL 检测各组大鼠关节软骨细胞凋亡;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠血清促炎因子白细胞介素(IL)-18、IL-1 β 、前列腺素 E2(PGE2)水平;免疫印迹检测大鼠关节软骨组织基质降解相关蛋白[基质金属蛋白酶(MMP)3、MMP9]、凋亡蛋白(caspase-3、Bax)和 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠关节软骨超微结构受损,关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9、NLRP3 蛋白表达及 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 升高($P<0.05$)。与模型组相比,连翘苷组大鼠关节软骨超微结构受损减轻,关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9、NLRP3 蛋白表达及 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 降低($P<0.05$);C16-PAF 组大鼠关节软骨超微结构受损加重,关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9、NLRP3 蛋白表达及 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 升高($P<0.05$)。与 C16-PAF 组相比,连翘苷+C16-PAF 组大鼠关节软骨超微结构受损减轻,关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9、NLRP3 蛋白表达及 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 降低($P<0.05$)。**结论** 连翘苷可通过下调 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路而抑制炎症反应,减轻膝骨关节炎大鼠软骨损伤与凋亡,缓解其关节肿胀症状,改善大鼠关节功能。

关键词:连翘苷; MAPK/NF- κ B/NLRP3; 膝骨性关节炎; 软骨损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.15.021 **中图法分类号:**R684.3

文章编号:1673-4130(2023)15-1902-06 **文献标志码:**A

Influence of forsythin on cartilage damage in rats with knee osteoarthritis by regulating MAPK/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway^{*}

WANG Haibin, LI Ping, ZHANG Zhigang, ZHOU Wanmiao

Department of Orthopedics, Zhangjiakou Second Hospital, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Abstract:**Objective** To investigate the influence of forsythin on cartilage damage in knee osteoarthritis rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** Knee osteoarthritis rat models were prepared by the classical sodium iodoacetate (MIA) method and randomly grouped into model group, forsythin group, C16-PAF (MAPK activator) group, and forsythin+C16-PAF group, 10 rats in each group. Another 10 rats were regarded as the control group. After grouping and treating with forsythin and C16-PAF, the degree of joint swelling of rats was detected, the rat joint function was evaluated by gait score and paw pressure score; the morphology of articular cartilage of rats in each group was detected by transmission electron microscope; apoptosis of articular chondrocytes in each group was detected by TUNEL; the levels of serum pro-inflammatory factors interleukin (IL)-18, IL-1 β and prostaglandin E2 (PGE2) in rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the expression of matrix degradation-related proteins [matrix metalloprotein-

^{*} 基金项目:河北省 2020 年度医学科学研究课题计划(20201603)。

作者简介:王海滨,男,主治医师,主要从事关节矫形及四肢创伤方向研究。

ase (MMP) 3, MMP9], apoptosis proteins (caspase-3, Bax) and MAPK/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway-related proteins in rat articular cartilage tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the articular cartilage ultrastructure of the model group was damaged, the joint swelling degree, gait score, paw pressure score, chondrocyte apoptosis rate, serum IL-18, IL-1 β and PGE2 levels, cartilage tissue caspase-3, Bax, MMP3, MMP9, NLRP3 protein expression, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ultrastructure damage of the articular cartilage of the rats in the forsythin group was reduced, the joint swelling degree, gait score, paw pressure score, chondrocyte apoptosis rate, serum IL-18, IL-1 β and PGE2 levels, cartilage tissue caspase-3, Bax, MMP3, MMP9, NLRP3 protein expression, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 decreased ($P < 0.05$); the ultrastructure of articular cartilage in the C16-PAF group was severely damaged, the joint swelling degree, gait score, paw pressure score, chondrocyte apoptosis rate, serum IL-18, IL-1 β and PGE2 levels, cartilage tissue caspase-3, Bax, MMP3, MMP9, NLRP3 protein expression, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 increased ($P < 0.05$). Compared with the C16-PAF group, the ultrastructural damage of the articular cartilage in the forsythin+C16-PAF group was reduced, the joint swelling degree, gait score, paw pressure score, chondrocyte apoptosis rate, serum IL-18, IL-1 β and PGE2 levels, cartilage tissue caspase-3, Bax, MMP3, MMP9, NLRP3 protein expression, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Forsythin can inhibit inflammatory response by down-regulating MAPK/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway, reduce cartilage damage and apoptosis in knee osteoarthritis rats, relieve joint swelling symptoms, and ameliorate joint function in rats.

Key words: forsythin; MAPK/NF- κ B/NLRP3; knee osteoarthritis; cartilage damage

膝骨关节炎是膝关节处发生的一种慢性退行性疾病,其典型特征为关节软骨降解、肌肉萎缩、关节局部炎症、骨赘形成等,会引发患者关节僵硬疼痛、变形失用等关节功能障碍,严重降低了其生活质量,是造成残疾的主要原因之一^[1-2]。膝骨关节炎发病机制复杂,其中促炎细胞因子引发的炎症级联反应及软骨机制降解退化被认为是其主要病理机制,减轻炎症与软骨损伤可明显延缓膝骨关节炎进展^[3-4]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核转录因子- κ B(NF- κ B)作为是重要的炎症相关通路可激活下游核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体信号,诱发炎症反应,抑制 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号激活可减轻镉诱导的肾脏炎症损伤^[5],研究显示,下调 MAPK/NF- κ B 通路可通过抑制破骨细胞激活延缓软骨下骨重塑^[6],还可阻止 NLRP3 炎症体激活,通过抗炎和抗氧化作用显著减轻软骨侵蚀、细胞外基质降解,进而缓解骨关节炎进展^[7],因而 MAPK/NF- κ B/NLRP3 可作为防治膝骨关节炎的重要靶点。连翘苷是传统中药连翘的果实提取物,现代研究表明其具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎的生理作用,可降低 p38 MAPK 磷酸化,抑制牙周炎症及破骨细胞活化,减轻牙周炎大鼠牙周组织损伤^[8],还可抑制 NF- κ B 信号活化,减轻骨关节炎大鼠软组织损伤和基质降解^[9],但连翘苷是否可通过抑制 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号激活而减轻膝骨关节炎大鼠软骨损伤,目前还尚未有明确阐释,本文以连翘苷处理膝骨关节炎大鼠模型,对此课题进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠,体重 200~230 g,雄性,

SPF 级,购于云南生物谷药业股份有限公司,生产许可证号:SYXK(滇)K2018-0009。于维持屏障环境的动物中心饲养房中喂养,饲养房内温度维持 22~25℃,湿度维持 55%~65%,照明维持明暗各 12 h 交替。

1.2 仪器与试剂 C16-PAF(MAPK 激活剂,纯度:99.48%,货号 HY-108635)购自美国 MCE 公司;碘乙酸钠(MIA,纯度:98%,货号 4386-10G)购自美国 Sigma 公司;连翘苷(纯度:HPLC $\geq$ 98%,货号 IP0700)购自北京索莱宝科技有限公司;兔源抗大鼠 Anti-Bax 一抗(货号 PA5-11378)购自美国 Cell Singaling Technology 公司;TUNEL 检测试剂盒(货号 ab206386)、大鼠白细胞介素(IL)-18 酶联免疫吸附试验(ELISA,货号 ab213909)、RIPA 裂解液(货号 ab288006)、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(货号 ab255730)、HRP 偶联山羊抗兔二抗(货号 ab97051)、大鼠前列腺素 E2 (PGE2) ELISA 试剂盒(货号 ab287802)、兔源抗大鼠 Anti-基质金属蛋白酶(MMP)3 一抗(货号 ab52915)、兔源抗大鼠 Anti-NLRP3 一抗(ab232401)、兔源抗大鼠 Anti- β -actin 一抗(货号 ab8227)、兔源抗大鼠 Anti-MMP9 一抗(货号 ab228402)、兔源抗大鼠 Anti-caspase-3 一抗(货号 ab184787)、兔源抗大鼠 Anti-p-NF- κ B p65 一抗(ab239882)、兔源抗大鼠 Anti-NF- κ B p65 一抗(货号 ab16502)、兔源抗大鼠抗大鼠 Anti-p-p38 MAPK 一抗(货号 ab17942)、兔源抗大鼠 Anti-p38 MAPK 一抗(货号 ab181602)购自美国 Abcam 公司。透射电镜(型号 LVEM25)购自美国 Delong Instrument 公司;轮转式石蜡切片机(型号 KD202C)购自上海特惠仪器

设备有限公司;生物显微镜(型号 LW200ET-A)购自上海尖端光电科技有限公司;全波长多功能酶标仪(型号 CLARIOstar Plus)购自德国 BMG Labtech 公司;转移电泳槽(型号 KEEBIO-VE186)、电泳仪(型号 Keebio-miniES)、电泳仪电源(型号 KEEBIO-600N)购自上海金鹏分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 制备膝关节炎大鼠模型及分组处理 采用经典 MIA 法制备膝关节炎大鼠模型,具体方法参照文献[10]:将 MIA 溶解到生理盐水中制备为 20 mg/mL 的溶液,取 SD 大鼠以 6 mL/kg 的剂量腹腔注射质量分数为 1% 的戊巴比妥钠麻醉,将后部右侧膝关节附近剔除鼠毛后消毒,于其关节腔内各注射 MIA 溶液 50 μ L,5 d 后观察到大鼠双侧关节红肿,发生明显炎症,提示造模成功,随机分为模型组、连翘苷组、C16-PAF 组、连翘苷+C16-PAF 组,每组 10 只,另选 10 只大鼠于其双侧关节腔内各注射生理盐水 50 μ L,作为对照组。

将连翘苷和 C16-PAF 溶于生理盐水制为 5 mg/mL 的连翘苷药液和 4 μ mol/L 的 C16-PAF 药液,连翘苷组大鼠腹腔注射 10 mL/kg 的连翘苷药液(剂量达到 50 mg/kg)^[11],同时于其后部右侧关节腔内各注射生理盐水 50 μ L;C16-PAF 组大鼠于其后部右侧关节腔内各注射 4 μ mol/L 的 C16-PAF 药液 50 μ L^[12],同时腹腔注射 10 mL/kg 的生理盐水;连翘苷+C16-PAF 组大鼠腹腔注射 10 mL/kg 的连翘苷药液(剂量达到 50 mg/kg),同时于其后部右侧关节腔内各注射 4 μ mol/L 的 C16-PAF 药液 50 μ L;模型组、对照组大鼠腹腔注射 10 mL/kg 的生理盐水,同时于其后部右侧关节腔内各注射生理盐水 50 μ L,各组大鼠均每天给药处理 1 次,处理 21 d 完成给药。

1.3.2 测量各组大鼠关节肿胀度及关节功能 各组大鼠于建模前使用软尺测量大鼠后部同侧膝关节周径(记为 r1),21 d 给药完成后 24 h,再次测量其后部同侧膝关节周径(记为 r2),关节肿胀度计算公式:关节肿胀度=(r2-r1)/r1 $\times$ 100%。采用步态评分和爪压评分评测大鼠关节功能^[10],观察大鼠自由活动时步态并进行评分:步态正常且双足均匀着地,评 0 分;轻度跛行且患侧下肢略弯曲,评 1 分;中度跛行且患侧下肢刚触及地面,评 2 分;重度跛行且患侧下肢离开地面,评 3 分;大鼠放入透明玻璃室(20 cm $\times$ 25 cm $\times$ 25 cm)内,于其下面斜放成 45°角的镜子来清晰观察大鼠自由活动时后爪下压情况并进行评分:两后爪下压情况正常,评 0 分;患侧后爪下压轻微减轻,即爪子完全在地板上但脚趾不完全张开,评 1 分;患侧后爪下压情况适度减轻,即部分爪子轻触地面且爪子弯曲,评 2 分;患侧后爪下压情况严重降低减轻,即爪子完全抬高,评 3 分。

1.3.3 透射电镜检测各组大鼠关节软骨形态及采集标本 关节功能评测结束后,麻醉大鼠(方法见

1.3.1),采集其腹动脉血离心得到血清,保存在-80℃备用;解剖剥出各组大鼠患侧关节软骨,取下大约 1/3 的组织块,生理盐水冲洗后,2% 的戊二醛固定 24 h 后漂洗、1% 的四氧化锇固定 2 h 后漂洗、(60%、70%、80%、95%、100%)乙醇逐级脱水、醋酸异戊酯浸泡过夜、树脂包埋、固定于超薄切片机上切片,得到厚约 80 nm 的切片,放置在载物台上,经真空喷金后采用扫描电镜观察软骨形态并摄片;剩余关节软骨组织剪下约 0.4 g 存在液氮中备用,剩余的组织生理盐水冲洗、4% 的多聚甲醛固定 24 h、生理盐水漂洗、(60%、70%、80%、95%、100%)乙醇逐级脱水、二甲苯透明、热石蜡包埋、固定于轮转式石蜡切片机上切片,得到厚约 4 μ m 的切片备用。

1.3.4 TUNEL 染色检测各组大鼠关节软骨细胞凋亡 取出 1.3.3 中厚约 4 μ m 的关节软骨组织切片,二甲苯脱蜡、(100%、95%、80%、70%、60%)乙醇逐级水化、蒸馏水洗涤后采用 TUNEL 检测试剂盒进行染色,蒸馏水洗涤后采用生物显微镜观察软骨凋亡情况并摄片,以 Image J 软件定量图片中软骨凋亡细胞数及总细胞数算出软骨细胞凋亡率,计算公式:软骨细胞凋亡率=软骨凋亡细胞数/软骨总细胞数 $\times$ 100%。

1.3.5 ELISA 检测各组大鼠血清 IL-18、IL-1 β 、PGE2 水平 取出 1.3.3 中存于-80℃的各组大鼠血清,冰水浴中解冻后采用 ELISA 试剂盒测定其中 IL-18、IL-1 β 、PGE2 水平,具体操作参照各自说明书指导进行。

1.3.6 检测各组大鼠膝关节软骨组织 SIRT1/HMGB1 信号通路相关蛋白表达 取出 1.3.3 中存于液氮的各组大鼠关节软骨组织,加入 RIPA 裂解液匀浆提取出其中总蛋白,测量浓度后每组取 15 μ g 总蛋白煮沸变性,依次进行电泳、湿转将其分离后转膜,封闭后剪下 NLRP3、 β -actin、caspase-3、Bax、MMP3、MMP9、p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65 蛋白,以相应的兔源一抗和 HRP 偶联山羊抗兔二抗依次孵育、洗涤,显色后摄片,采用 Image-J 分析定量各蛋白相对表达。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS26.0 对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 描述,采用 *t* 检验比较两组间差异;采用单因素方差分析比较多组间差异,进一步两两间比较进行 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 连翘苷对大鼠关节肿胀度和关节功能的影响 与模型组比较,连翘苷组大鼠关节肿胀度、步态评分和爪压评分降低(*P*<0.05),C16-PAF 组大鼠关节肿胀度、步态评分和爪压评分升高(*P*<0.05);与 C16-PAF 组相比,连翘苷+C16-PAF 组大鼠关节肿胀度、步态评分和爪压评分降低(*P*<0.05)。对照组无关节肿胀,步态评分和爪压评分均为 0 分。见表 1。

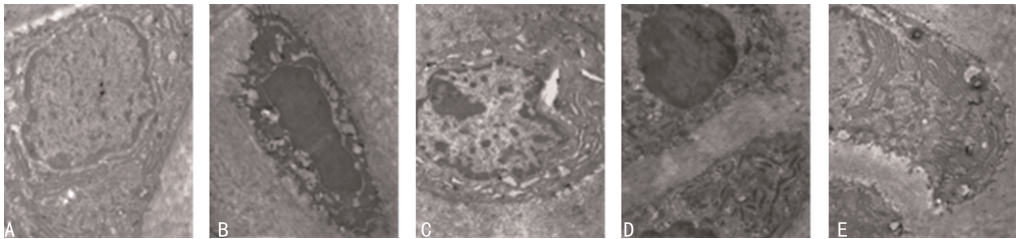
表 1 各组大鼠关节肿胀度、步态评分和爪压评分(̄x±s, n=10)

组别	关节肿胀度(%)	步态评分(分)	爪压评分(分)
模型组	39.04±6.27	1.80±0.40	1.90±0.30
连翘苷组	3.21±1.06*	0.30±0.10*	0.40±0.10*
C16-PAF 组	67.52±11.75*	2.90±0.10*	2.80±0.20*
连翘苷+C16-PAF 组	34.17±5.82 [#]	1.70±0.50 [#]	1.80±0.40 [#]

注：与模型组比较，* P<0.05；与 C16-PAF 组比较，[#] P<0.05。

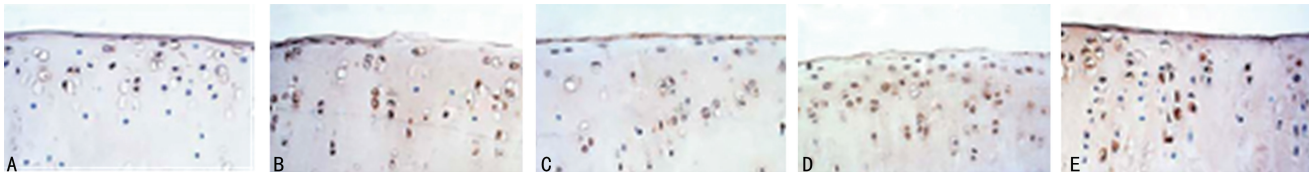
2.2 连翘苷对大鼠关节软骨超微结构形态的影响
对照组大鼠关节软骨软骨细胞形态完好，胞质内含有大量线粒体，粗面内质网丰富且排列整齐。模型组大鼠关节软骨超微结构受损：软骨细胞线粒体肿胀出现空泡，胞质内粗面内质网扩张甚至断裂溶解、排列杂乱、数量减少。与模型组相比，连翘苷组大鼠关节软

骨超微结构形态有所恢复，受损减轻；C16-PAF 组大鼠关节软骨超微结构形态受损症状加重。与 C16-PAF 组相比，连翘苷+C16-PAF 组大鼠关节软骨超微结构形态受损症状减轻。见图 1。
2.3 连翘苷对大鼠关节软骨细胞凋亡的影响
与对照组[(3.02±0.85)%]相比，模型组大鼠关节软骨细胞凋亡率[(34.41±7.73)%]升高(P<0.05)；与模型组相比，连翘苷组大鼠关节软骨细胞凋亡率[(6.07±2.02)%]降低(P<0.05)，C16-PAF 组大鼠关节软骨细胞凋亡率[(61.58±13.41)%]升高(P<0.05)；与 C16-PAF 组相比，连翘苷+C16-PAF 组大鼠关节软骨细胞凋亡率[(30.13±6.79)%]降低(P<0.05)。见图 2。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为连翘苷组，D 为 C16-PAF 组，E 为连翘苷+C16-PAF 组。

图 1 透射电镜检测各组大鼠关节软骨形态(×10 000)



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为连翘苷组，D 为 C16-PAF 组，E 为连翘苷+C16-PAF 组。

图 2 TUNEL 检测各组大鼠关节软骨细胞凋亡(×200)

2.4 连翘苷对大鼠血清促炎因子 IL-18、IL-1β、PGE2 水平的影响
与对照组相比，模型组大鼠血清 IL-18、IL-1β、PGE2 水平升高(P<0.05)；与模型组相比，连翘苷组大鼠血清 IL-18、IL-1β、PGE2 水平降低(P<0.05)，C16-PAF 组大鼠血清 IL-18、IL-1β、PGE2 水平升高(P<0.05)；与 C16-PAF 组相比，连翘苷+C16-PAF 组大鼠血清 IL-18、IL-1β、PGE2 水平降低(P<0.05)。见表 2。

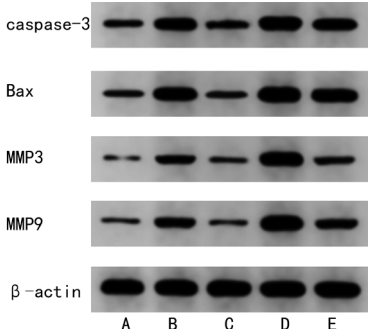
表 2 各组大鼠血清 IL-18、IL-1β、PGE2 水平(̄x±s, ng/L, n=10)

组别	IL-18	IL-1β	PGE2
对照组	325.41±43.12	211.85±32.31	23.96±4.02
模型组	768.74±84.39 ^a	697.65±79.80 ^a	79.30±13.54 ^a
连翘苷组	339.86±45.46 ^b	227.83±40.95 ^b	28.19±5.11 ^b
C16-PAF 组	1 172.53±96.78 ^b	1 061.57±82.67 ^b	136.58±24.27 ^b
连翘苷+C16-PAF 组	743.60±90.72 ^c	659.83±81.48 ^c	69.87±9.40 ^c

注：与对照组比较，^a P<0.05；与模型组比较，^b P<0.05；与 C16-PAF 组比较，^c P<0.05。

2.5 连翘苷对大鼠软骨组织基质降解相关蛋白和凋亡蛋白表达的影响
与对照组相比，模型组大鼠软骨

组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达升高(P<0.05)；与模型组相比，连翘苷组大鼠软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达降低(P<0.05)，C16-PAF 组大鼠软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达升高(P<0.05)；与 C16-PAF 组相比，连翘苷+C16-PAF 组大鼠软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达降低(P<0.05)。见图 3、表 3。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为连翘苷组，D 为 C16-PAF 组，E 为连翘苷+C16-PAF 组。

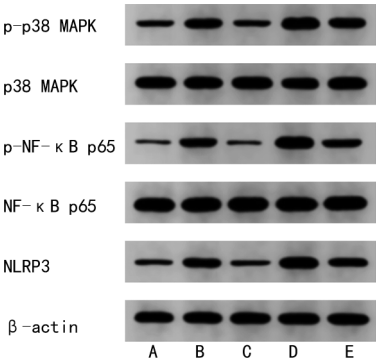
图 3 免疫印迹检测大鼠关节软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达

表 3 各组大鼠软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白相对表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	caspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin	MMP3/ β -actin	MMP9/ β -actin
对照组	0.39 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02
模型组	0.77 $\pm$ 0.09 ^a	0.80 $\pm$ 0.06 ^a	0.52 $\pm$ 0.04 ^a	0.60 $\pm$ 0.07 ^a
连翘苷组	0.42 $\pm$ 0.04 ^b	0.38 $\pm$ 0.03 ^b	0.13 $\pm$ 0.03 ^b	0.17 $\pm$ 0.05 ^b
C16-PAF 组	1.13 $\pm$ 0.11 ^b	1.26 $\pm$ 0.10 ^b	0.95 $\pm$ 0.13 ^b	1.08 $\pm$ 0.14 ^b
连翘苷+C16-PAF 组	0.74 $\pm$ 0.08 ^c	0.76 $\pm$ 0.07 ^c	0.49 $\pm$ 0.05 ^c	0.57 $\pm$ 0.06 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 C16-PAF 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.6 连翘苷对大鼠软骨组织 MAPK/NF- κ B/NLRP3 相关蛋白表达的影响 与对照组相比,模型组大鼠软骨组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组相比,连翘苷组大鼠软骨组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达降低($P<0.05$),C16-PAF 组大鼠软骨组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达升高($P<0.05$);与 C16-PAF 组相比,连翘苷+C16-PAF 组大鼠软骨组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图 4、表 4。



注:A 为对照组,B 为模型组,C 为连翘苷组,D 为 C16-PAF 组,E 为连翘苷+C16-PAF 组。

图 4 免疫印迹检测大鼠关节软骨组织 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路相关蛋白表达

表 4 各组大鼠软骨组 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路相关蛋白相对表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	p-p38 MAPK/ p38 MAPK	p-NF- κ B p65/NF- κ B p65	NLRP3/ β -actin
对照组	0.40 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.04
模型组	0.88 $\pm$ 0.09 ^a	0.54 $\pm$ 0.05 ^a	0.91 $\pm$ 0.11 ^a
连翘苷组	0.45 $\pm$ 0.05 ^b	0.16 $\pm$ 0.04 ^b	0.39 $\pm$ 0.05 ^b
C16-PAF 组	1.29 $\pm$ 0.15 ^b	0.97 $\pm$ 0.10 ^b	1.35 $\pm$ 0.17 ^b
连翘苷+C16-PAF 组	0.84 $\pm$ 0.08 ^c	0.51 $\pm$ 0.06 ^c	0.87 $\pm$ 0.13 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 C16-PAF 组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

膝骨关节炎作为一种中老年人群高发疾病,随着我国老龄化进程的加深,膝骨关节炎已逐渐成为一个

棘手的医疗问题,目前膝骨关节炎的临床治疗选择有限,主要是一些甾体类抗炎药、阿片类镇痛药等,疗效受限或不良反应大是普遍存在的问题,因此寻找开发新型治疗药物是膝骨关节炎临床研究的重要目标^[13-14]。本研究采用经典 MIA 法制备膝骨关节炎大鼠模型,结果显示,造模大鼠血清促炎因子 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平明显升高,触发强烈炎症反应,引发大鼠关节软骨超微结构受损及软骨细胞凋亡,使大鼠关节肿胀度、步态评分和爪压评分明显升高,表明大鼠于关节腔内注射 MIA 后,关节肿胀且功能受损,提示膝骨关节炎模型构建成功。

膝骨关节炎的发生发展与促炎因子密切相关,不同促炎因子之间相互影响,触发并放大炎症反应可加快膝骨关节炎的病情进展,而降低软骨细胞的氧化应激水平、炎症反应和凋亡可有效治疗膝骨关节炎^[15-16]。如今中药在膝骨关节炎的治疗中逐渐受到重视,连翘苷作为提取自传统中药连翘的一种天然抗炎剂,可降低促炎因子表达,有效抑制脂多糖诱导的炎症反应^[17],能通过改善 Th17/Treg 免疫平衡减轻肺炎克雷伯菌感染的小鼠肺炎症状^[18],还可通过抗炎功效缓解骨关节炎大鼠模型软骨组织损伤^[11],本研究以连翘苷处理膝骨关节炎大鼠,发现大鼠关节软骨超微结构受损减轻,关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达降低,表明连翘苷可减少促炎因子合成释放,阻止炎症反应发生,降低凋亡及细胞外基质降解相关蛋白表达,抑制软骨细胞凋亡和结构损伤,改善膝骨关节炎大鼠关节肿胀及功能受损症状,进一步证实了连翘苷对骨关节炎的治疗功效。

MAPK/NF- κ B 信号可通过调控促炎因子的表达介导骨关节炎的发生发展过程,通过使其信号失活从而抑制炎症的进展,并通过降低 MMP3 的表达而减轻软骨细胞外基质的降解,最终缓解骨关节炎小鼠的软骨损伤^[19],阻断 MAPK/NF- κ B 信号从而下调 NLRP3 表达,通过减弱炎症反应而减少软骨侵蚀,抑制痛风性关节炎形成及发展^[20],还可减轻骨关节炎大鼠软骨细胞衰老、软骨基质降解及关节炎症症状^[7],苏娟娟等^[8]研究发现连翘苷可抑制牙周炎大鼠 p38 MAPK 信号活化,进而缓解其牙周组织损伤,因而推测抑制 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号激活可能是连翘

昔治疗膝骨关节炎的药理机制,本研究结果显示,膝骨关节炎大鼠体内 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号处于激活状态,连翘昔可使该信号失活,且以 MAPK 激活剂 C16-PAF 处理膝骨关节炎大鼠,可加重其软骨损伤及关节炎症,表明 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号参与介导膝骨关节炎的发生发展及连翘昔对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的减轻过程;以连翘昔和 C16-PAF 联合处理膝骨关节炎大鼠,相比 C16-PAF 单独处理,可降低 NLRP3 表达及 p38 MAPK、NF- κ B p65 磷酸化水平,减轻大鼠关节软骨超微结构受损,降低其关节肿胀度、步态评分和爪压评分、软骨细胞凋亡率、血清 IL-18、IL-1 β 及 PGE2 水平、软骨组织 caspase-3、Bax、MMP3、MMP9 蛋白表达,表明连翘昔可减弱 C16-PAF 对炎症的促进功能,拮抗其对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡和结构损伤的加重作用,最终逆转 C16-PAF 对膝骨关节炎大鼠关节功能的损害作用,揭示连翘昔减轻膝骨关节炎大鼠软骨损伤是通过抑制 MAPK 信号激活实现的。

总之,本研究证实了连翘昔可降低 NLRP3 表达及 p38 MAPK、NF- κ B p65 磷酸化,减少促炎因子合成释放,抑制炎症反应,减轻膝骨关节炎大鼠关节肿胀、软骨细胞凋亡及基质降解症状,改善大鼠关节功能,抑制 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号激活可能是其药理机制之一,本文为连翘昔应用于膝骨关节炎的临床治疗提供了新的理论依据,有助于其在关节炎治疗中的推广应用。

参考文献

- [1] ZARRINGAM D, SARIS D B F, BEKKERS J E J. The value of SPECT/CT for knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Cartilage*, 2021, 12(4): 431-437.
- [2] ØESTAD B E, JUHL C B, CULVENOR A G, et al. Knee extensor muscle weakness is a risk factor for the development of knee osteoarthritis: an updated systematic review and meta-analysis including 46 819 men and women[J]. *Br J Sports Med*, 2022, 56(6): 349-355.
- [3] XIANG X N, ZHU S Y, HE H C, et al. Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 14-33.
- [4] NAKAHATA A, ITO A, NAKAHARA R, et al. Intra-articular injections of curcumin monoglucuronide TBP1901 suppresses articular cartilage damage and regulates subchondral bone alteration in an osteoarthritis rat model[J]. *Cartilage*, 2021, 13(2 Suppl): 153S-167S.
- [5] LI Z, CHI H, ZHU W, et al. Cadmium induces renal inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through ROS/MAPK/NF- κ B pathway in vitro and in vivo[J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(11): 3497-3513.
- [6] DING D, YAN J, FENG G, et al. Dihydroartemisinin attenuates osteoclast formation and bone resorption via in-

hibiting the NF- κ B, MAPK and NFATc1 signaling pathways and alleviates osteoarthritis[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(1): 4-21.

- [7] LIN C, GE L, TANG L, et al. Nitidine chloride alleviates inflammation and cellular senescence in murine osteoarthritis through scavenging ROS[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(1): 919940.
- [8] 苏娟娟, 朱永翠, 张文玲. 连翘昔对牙周炎大鼠 p38 MAPK/c-Fos 信号通路及破骨细胞活化的影响[J]. *口腔医学研究*, 2021, 37(1): 33-38.
- [9] 胡志源, 曹珊, 陈文明, 等. 连翘昔元通过抑制 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路减轻大鼠骨关节炎软组织损伤和基质降解[J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(2): 115-121.
- [10] 李志娟, 王鑫, 孙敬青, 等. 火针对膝骨关节炎大鼠关节功能及炎性反应的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(3): 220-226.
- [11] 赵增同, 朱旭, 成文浩, 等. 连翘昔对 ACLT 诱导的骨关节炎大鼠模型软组织损伤和 TGF- β 活性的调节作用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(1): 24-29.
- [12] BÖGERSHAUSEN N, TSAI I C, POHL E, et al. RAP1-mediated MEK/ERK pathway defects in Kabuki syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3585-3599.
- [13] THORLUND J B, SIMIC M, PIHL K, et al. Similar effects of exercise therapy, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and opioids for knee osteoarthritis pain: a systematic review with network meta-analysis[J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2022, 52(4): 207-216.
- [14] HIYAMA Y, TAKAHASHI R, TANAKA T, et al. Quantitative ultrasound of the heel in women with knee osteoarthritis[J]. *J Clin Densitom*, 2021, 24(4): 557-562.
- [15] LI Z, CHEN B, DUSP4 alleviates LPS-induced chondrocyte injury in knee osteoarthritis via the MAPK signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1401-1407.
- [16] WANG S, DING P, XIA X, et al. Bugan rongjin decoction alleviates inflammation and oxidative stress to treat the postmenopausal knee osteoarthritis through Wnt signaling pathway[J]. *Biomed Eng Online*, 2021, 20(1): 103-116.
- [17] 杨本军, 武明飞, 徐涛. 连翘昔调控炎症的抑制作用及机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(7): 1093-1097.
- [18] 符顺丹, 符青, 符意雄. 连翘昔对肺炎克雷伯菌感染的肺炎小鼠的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(18): 2463-2467.
- [19] YANG X, ZHOU Y, CHEN Z, et al. Curcumenol mitigates chondrocyte inflammation by inhibiting the NF κ B and MAPK pathways, and ameliorates DMM induced OA in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(4): 192-205.
- [20] JATI G A K, ASSIHHAH N, WATI A A, et al. Immunosuppression by piperine as a regulator of the NLRP3 inflammasome through MAPK/NF- κ B in monosodium urate-induced rat gouty arthritis[J]. *Vet World*, 2022, 15(2): 288-298.