

丹参多糖对碘乙酸钠所致大鼠膝骨性关节炎的治疗作用及机制研究

张 扬, 张 宁, 玄锋学, 王 博, 于海涛, 郭梓恒, 李高峰*

吉林省人民医院创伤骨病二科, 长春 130021

摘 要: 探讨丹参多糖对碘乙酸钠所致大鼠膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的治疗作用及潜在机制。采用膝关节腔内注射碘乙酸钠法建立大鼠 KOA 模型, 分为模型组、丹参多糖低、高剂量组 (40、80 mg/kg) 及塞来昔布组 (20 mg/kg), 另选取 12 只大鼠作为假手术组, 持续干预 4 周后检测相关指标变化情况。结果发现, 与模型组比较, 丹参多糖低、高剂量组大鼠爪压评分及步态评分明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 机械性缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 及热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 明显增加 ($P<0.01$), 关节软骨组织病理形态减轻, Markin 评分明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 血清软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP)、血清 I 型胶原 C 末端肽 (C-terminal peptide of type I collagen, CTX-1) 含量及关节软骨组织半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-lymphoblastoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) mRNA 表达明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 骨钙素 (osteocalcin, OCN) 含量及关节软骨组织 Bcl-2 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 关节滑液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 含量及关节软骨组织磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 p38 (phosphorylated mitogen-activated protein kinase p38, p-p38 MAPK)、磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-NF- κ B p65) 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。研究结果表明, 丹参多糖对碘乙酸钠所致大鼠 KOA 具有治疗作用, 其机制与改善骨代谢、抗凋亡及抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应有关。

关键词: 丹参多糖; 骨代谢; 凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶/核因子- κ B 信号通路; 膝骨性关节炎

中图分类号: R932 文献标识码: A

Therapeutic effect and mechanism of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced knee osteoarthritis rats

ZHANG Yang, ZHANG Ning, XUAN Feng-xue, WANG Bo, YU Hai-tao, GUO

Zi-heng, LI Gao-feng*

The Second Department of Traumatic Bone Disease, Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130021, China

Abstract: This study aimed to investigate the therapeutic effect and potential mechanism of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide (SMP) on sodium iodoacetate-induced knee osteoarthritis (KOA) rats. The rat model of KOA was induced by injecting sodium iodoacetate into the knee joint. The rats were divided into a model group, low-dose and high-dose SMP groups (40 and 80 mg/kg), and a celecoxib group (20 mg/kg). Additionally, another 12 rats were selected as the sham operation group. Changes in relevant indexes were assessed after four weeks of continuous intervention. The results indicated that compared to the model group, rats in both low-dose and

high-dose SMP groups exhibited a significant decrease in paw pressure score and gait score ($P<0.05$, $P<0.01$). Additionally, mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were significantly increased ($P<0.01$). The study also found that the pathological morphology of articular cartilage improved, as evidenced by a significant decrease in the Markin score ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and C-terminal peptide of type I collagen (CTX-I) in serum, as well as mRNA expressions of Caspase-3 and B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax) in articular cartilage were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). On the other hand, osteocalcin (OCN) content in serum and Bcl-2 mRNA expression in articular cartilage were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, the study observed a significant decrease in the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 in synovial fluid, along with reduced expressions of phosphorylated mitogen-activated protein kinase p38 (p-p38 MAPK) and phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65) in articular cartilage ($P<0.05$, $P<0.01$). These results indicated that SMP had a therapeutic effect on sodium iodoacetate-induced KOA in rats. This effect was achieved through the improvement of bone metabolism, anti-apoptotic properties, and the inhibition of inflammation *via* the MAPK/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide; bone metabolism; apoptosis; mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B signaling pathway; knee osteoarthritis

膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 常见于中老年人群, 作为一种慢性退行性关节病变, 其中老年人群中的发病比例高达 22.9%, 且随着我国老龄化进程的加剧, 使 KOA 发病率呈逐年上升趋势^[1]。关节局部炎症、骨赘形成、肌肉萎缩、关节软骨降解是 KOA 的典型特征, 继而导致关节变形、功能障碍及关节僵硬疼痛, 对患者生活质量造成严重影响, 是引起残疾的重要原因^[2]。非甾体类抗炎药、阿片类镇痛药在临床上常用于 KOA 的治疗, 但存在疗效受限、不良反应大等诸多问题, 故探寻及开发新型治疗药物迫在眉睫。

KOA 的发病机制复杂, 骨代谢平衡失调、软骨组织细胞凋亡及炎症反应等均参与了 KOA 的发病及进展^[3]。研究发现^[4], 骨代谢平衡失调可增加关节软骨受应力、使软骨的损伤及退变程度加速, 从而促进 KOA 的发生、发展, 改善骨代谢已成为治疗 KOA 的潜在靶标。软骨细胞是维持软骨基质稳态的关键介质, 作为软骨的常驻细胞, 其功能损伤和凋亡会造成软骨稳态的破坏, 使 KOA 的进程加快^[5]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路介导的炎症反应, 能够升高肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及 IL-6 等炎症因子含量, 促进软骨降解、退化及 KOA 进展, 而抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应是改善关节功能、缓解关节疼痛的有效手段^[6]。

中药治疗 KOA 的经验由来已久, 疗效显著, 不良反应低, 已成为近年来 KOA 治疗的研究热点^[7]。丹参又名赤参, 为传统中药, 始载于《神农本草经》, 主要产于河北、山东、四川等地, 为唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎, 具有凉血消痈、清心除烦、通经止痛、活血化瘀之功效。丹参的主要化学成分为丹酚酸类化合物、丹参酮类化合物及多糖类化合物。研究发现^[8], 丹酚酸 B 可通过调控低氧诱导因子-1/血管内皮生长因子通路, 减轻 KOA 模型大鼠的软骨组织损伤, 缓解骨关节炎。丹参酮IIA 也能够通过抑制 Toll 样受体 4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达, 使炎症因子释放减少, 进而发挥改善 KOA

大鼠膝关节功能的作用^[9]。但迄今为止，丹参中的多糖类成分是否具有治疗 KOA 作用未见报道。

因此，本研究采用膝关节腔内注射碘乙酸钠法建立大鼠 KOA 模型，给予丹参多糖(*Salvia miltiorrhiza* polysaccharide, SMP) 干预后，通过检测关节功能、疼痛行为、关节软骨组织病理形态等评价其对 KOA 的治疗作用；同时探讨丹参多糖对骨代谢、关节软骨细胞凋亡、炎症因子及 MAPK/NF- κ B 信号通路的影响，阐明治疗作用的潜在分子机制，旨在为丹参多糖用于临床治疗 KOA 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 动物

雄性 SD 大鼠 60 只，SPF 级，体质量 200~220 g，购于吉林乾和模式生物科技公司，许可证：SCXK（吉）2019-0001。大鼠购买后饲养于吉林大学药学院动物房[SYXK（吉）2022-0017]，自由进食饮水，自然昼夜节律，湿度（50±5）%，温度（21±2）℃。本研究经吉林省人民医院伦理委员会审查通过（JLSRMY2022100301），相关操作符合动物福利要求。

1.1.2 主要试剂

丹参多糖（批号 20220908，含量 80%，甘肃益生祥生物技术有限公司）；碘乙酸钠（批号 305-53-3，含量 99%，武汉克米克生物技术有限公司）；塞来昔布（批号 BCP02156，含量 95%，上海瀚香生物技术有限公司）；苏木素伊红（hematoxylin eosin, HE）染色液（批号 DH0006，安徽雷根生物技术有限公司）；TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒（批号 15596026CN、K1691、11732088，美国 Thermo Scientific 公司）；软骨寡聚基质蛋白（cartilage oligomeric matrix protein, COMP）（批号 H211）、I 型胶原 C 末端肽（C-terminal peptide of type I collagen, CTX-I）（批号 H287）及骨钙素（osteocalcin, OCN）（批号 H152）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；TNF- α （批号 SP12250）、IL-1 β （批号 SP12225）及 IL-6（批号 SP12234）检测试剂盒（武汉赛培生物科技公司）；p38 MAPK（批号 14064-1-AP）、磷酸化 p38 MAPK（phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK）（批号 28796-1-AP）、NF- κ B p65（批号 10745-1-AP）及磷酸化 NF- κ B p65（phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65）（批号 82335-1-AP）多克隆抗体（武汉三鹰生物技术公司）； β -激动蛋白（ β -actin）（批号 30102ES40）多克隆抗体及 IgG（批号 34856ES60）二抗（上海翌圣生物科技公司）。

1.1.3 主要仪器

ZL-024C 型足底机械刺痛仪、ZL-021 型小动物冷热板测痛仪（安徽耀坤生物技术有限公司）；MF53-N 型显微镜（广州明美科技有限公司）；ELB700 型酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；CFX 型实时定量 PCR 仪及 Trans-Blot 型蛋白电泳系统（美国 Bio-Rad 公司）；ZF-288 型凝胶成像系统（上海金鹏分析仪器有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、建模及药物干预

SD 大鼠适应环境 1 周后，腹腔注射 1%戊巴比妥钠溶液（6 mL/kg）使其麻醉，将右侧膝关节附近鼠毛剔除干净后用 75%乙醇进行常规消毒，于关节腔内注射 50 μ L 碘乙酸钠溶液（30 mg/mL）。注射碘乙酸钠溶液 7 d 后，右侧膝关节出现明显红肿，提示 KOA 模型建立成功。KOA 大鼠分为模型组、丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组，12 只/组；另选取 12 只大鼠作为假手术组，于右侧膝关节腔内注射 50 μ L 生理盐水。丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠分别灌胃给予 40、80 mg/kg 的丹参多糖及 20 mg/kg 的塞来昔布，假手术组及模型组灌胃给予等体积的蒸馏水，每天干预 1 次，持续干预 4 周。

1.2.2 关节功能检测

干预结束后，通过爪压评分及步态评分评价各组大鼠关节功能。在透明玻璃室内利用斜放成 45°角的镜子观察大鼠自由活动后爪下压情况并评分，其中两后爪下压情况正常记为 0 分；脚趾不完全张开、但爪子完全在地板上，即右侧后爪下压轻微减轻记为 1 分；爪子弯曲、部分爪子轻触地面，即右侧后爪下压情况适度减轻记为 2 分；爪子完全抬高，即右侧后爪下压情况严重减轻记为 3 分。自由活动时观察大鼠步态并评分，其中双足均匀着地、步态正常记为 0 分；下肢略弯曲、轻度跛行记为 1 分；右侧下肢刚触及地面、中度跛行记为 2 分；右侧下肢离开地面、重度跛行记为 3 分。

1.2.3 疼痛行为检测

通过检测机械性缩足反射阈值（mechanical withdrawal threshold, MWT）及热缩足反射潜伏期（thermal withdrawal latency, TWL）评价各组大鼠疼痛行为，其中应用足底机械刺痛仪检测 MWT，小动物冷热板测痛仪检测 TWL。

1.2.4 血清及组织标本取材

关节功能及疼痛行为检测完成后，将大鼠麻醉，腹主动脉取血，离心分离血清。在右侧股四头肌的最高点剪一缺口，暴露关节腔，注射液吸取适量生理盐水，反复冲洗关节腔获得膝关节滑液。随后，仔细剥离膝关节软骨组织。

1.2.5 关节软骨组织病理形态检测

用 4%多聚甲醛溶液将软骨组织固定 24 h，经乙二胺四乙酸脱钙、石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡及乙醇梯度脱水等步骤，得到厚约 4 μ m 的软骨组织切片。行常规 HE 染色，显微镜下观察膝关节软骨组织病理形态并进行 Mankin 评分。

1.2.6 血清骨代谢指标检测

取冻存的各组大鼠血清，采用酶联免疫吸附法（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测 COMP、CTX-I 及 OCN 等血清骨代谢指标，操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.7 关节软骨组织凋亡相关基因表达检测

取 50 mg 膝关节软骨组织，加入 TRIzol 试剂 0.5 mL，低温研磨至匀浆提取总 RNA，逆转录合成 cDNA，按照实时定量 PCR 试剂盒说明书配制扩增体系。扩增条件为：94 $^{\circ}$ C, 5 min,

循环 1 次；94 °C、30 s，58 °C、30 s，72 °C、50 s，循环 35 次；72 °C，10 min，循环 1 次。采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算目的基因的相对表达，B 淋巴细胞瘤-2 (B-lymphoblastoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 及 β -actin 等凋亡相关基因引物由吉林省库美生物公司提供，具体信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	引物序列	产物长度
Gene	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
Bcl-2	F: TGA CT TCTCTCGTCGCTACCGT	112
	R: CCTGAAGAGTTCCTCCACCACC	
Caspase-3	F: GGAGCTTGGAACGCGAAGAA	195
	R: ACACAAGCCCATTTTCAGGGT	
Bax	F: GCGAATTGGCGATGAACTGG	168
	R: ATGGTTCTGATCAGCTCGGG	
β -actin	F: TCCTGACCCTGAAGTACCCCATTTG	146
	R: GTTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATC	

1.2.8 关节滑液中炎症因子含量检测

取冻存的各组大鼠膝关节滑液，按照试剂盒说明书的操作指南通过 ELISA 法分别检测 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子含量。

1.2.9 关节软骨组织 MAPK/NF- κ B 信号通路蛋白表达检测

取 50 mg 膝关节软骨组织，加入 RIPA 裂解液 500 μ L，低温研磨至匀浆，离心、吸取上清液并测总蛋白含量。配制 10%聚丙烯酰胺凝胶，各凝胶孔等量蛋白上样，电泳结束后用转膜仪将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜，5%牛奶封闭 2 h。TBST 洗膜 3 次，分别加入 p38 MAPK (1 : 1 000)、p-p38 MAPK (1 : 500)、NF- κ B p65 (1 : 1 000)、p-NF- κ B p65 (1 : 500) 及 β -actin (1 : 1 000) 多克隆抗体。4 °C 孵育过夜将上述一抗回收，TBST 再次洗膜 3 次。加入 IgG 二抗，于室温下孵育 1 h。滴加显影液，成像后拍照。

1.3 统计学分析

通过 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。One-way ANOVA 用于多组间均数比较，组间均数两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 时表明差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节功能的影响

KOA 大鼠爪压评分及步态评分同假手术组比较明显增加 (*P*<0.01)；丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠爪压评分及步态评分明显低于模型组 (*P*<0.05, *P*<0.01)；丹参多糖低、高剂量组大鼠爪压评分及步态评分明显高于塞来昔布组 (*P*<0.01)，结果见图 1。上述

结果说明，丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠的关节功能损伤具有改善作用。

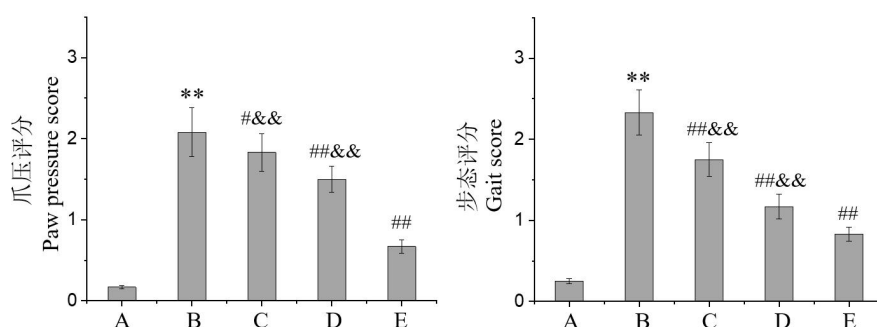


图 1 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠爪压评分及步态评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 1 Effects of SMP on paw pressure score and gait score of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 丹参多糖低剂量组；D. 丹参多糖高剂量组；E. 塞来昔布组。与假手术组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与塞来昔布组比较，& $P<0.05$ ，&& $P<0.01$ ；下同。

Notes: A. Sham operation group; B. Model group; C. Low-dose SMP group; D. High-dose SMP group; E.

Celecoxib group. Compared with the sham operation group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with the model group,

$P<0.05$, ## $P<0.01$; Compared with the celecoxib group, & $P<0.05$, && $P<0.01$, the same below.

2.2 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠痛觉行为的影响

KOA 大鼠 MWT 及 TML 同假手术组比较明显降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠 MWT 及 TML 明显增加 ($P<0.01$)；与塞来昔布组比较，丹参多糖低剂量组大鼠 MWT 及低、高剂量组大鼠 TML 明显降低 ($P<0.01$)，而丹参多糖高剂量组 MWT 无明显变化 ($P>0.05$)，结果见图 2。上述结果提示，丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠的痛觉具有缓解作用。

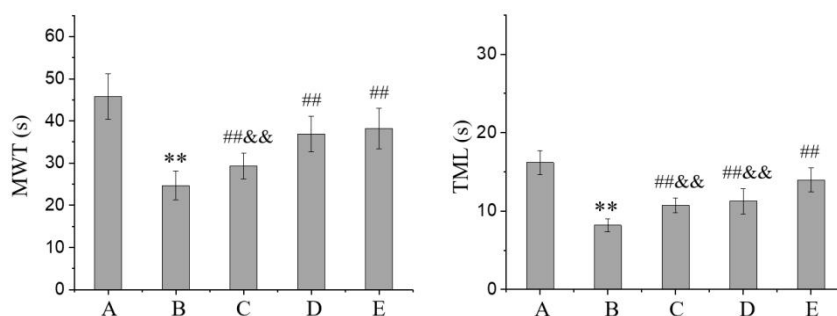


图 2 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠 MWT 及 TML 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 2 Effects of SMP on MWT and TML of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

2.3 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织病理形态的影响

丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠膝关节软骨组织病理形态的影响，如图 3 所示。假手术组大鼠软骨潮线清晰、表面光滑，软骨细胞排列整齐；模型组软骨潮线模糊不清、表面粗糙，软骨细胞排列紊乱，软骨结构破坏明显；丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠潮线较完整，细胞排列较紧密，软骨结构损伤有不同程度的减轻，其中丹参多糖高剂量组及塞来昔布组效果最为明显。Markin 评分结果显示，KOA 大鼠 Markin 评分同假手术组比较明显增加 ($P<0.01$)；丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠 Markin 评分较模型组明显降低

($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与塞来昔布组比较, 丹参多糖低剂量组大鼠 Markin 评分明显增加 ($P < 0.05$), 而丹参多糖高剂量组 Markin 评分无明显变化 ($P > 0.05$)。

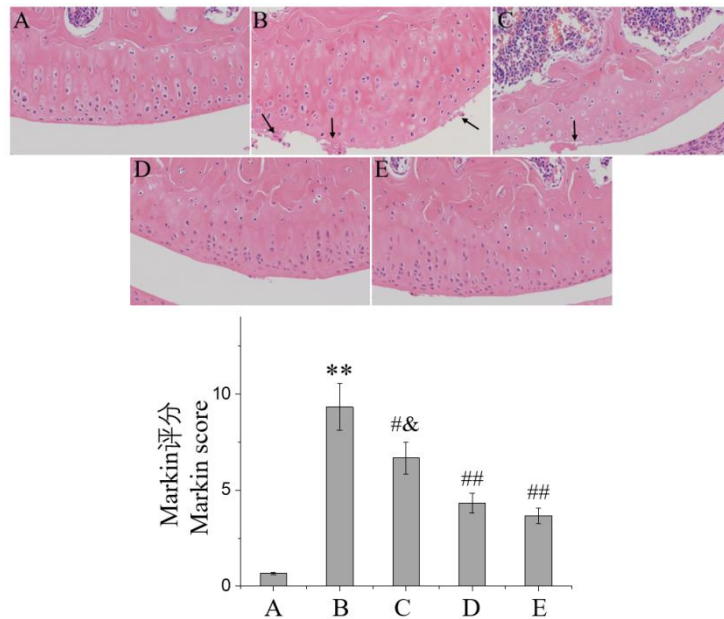


图3 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织病理形态的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effects of SMP on pathological morphology of knee articular cartilage of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠血清骨代谢指标的影响

丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠血清骨代谢指标 COMP、CTX-I 及 OCN 含量的影响, 如图 4 所示。与假手术组比较, KOA 大鼠血清 COMP 及 CTX-I 含量明显增加 ($P < 0.01$), OCN 含量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠血清 COMP 及 CTX-I 含量明显降低 ($P < 0.01$), OCN 含量明显增加 ($P < 0.01$); 与塞来昔布组比较, 丹参多糖低、高剂量组大鼠血清 COMP 及 CTX-I 含量明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 OCN 含量仅丹参多糖低剂量组出现明显差异 ($P < 0.01$)。

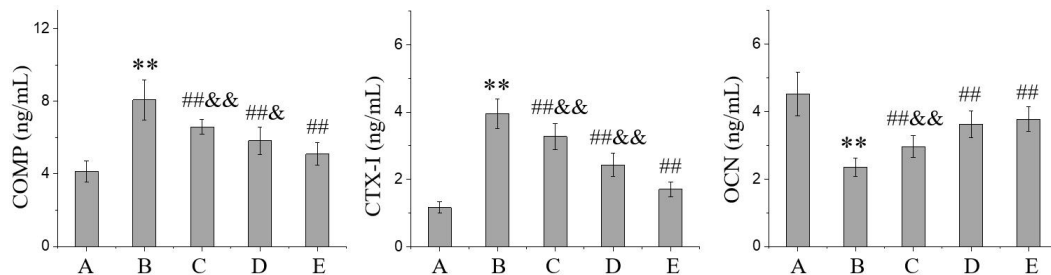


图4 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠血清 COMP、CTX-I 及 OCN 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Fig. 4 Effects of SMP on serum contents of COMP, CTX-I and OCN of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

2.5 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织凋亡相关基因表达的影响

丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织凋亡相关基因 Bcl-2、Caspase-3 及 Bax mRNA 表达的影响, 如图 5 所示。与假手术组比较, KOA 大鼠关节软骨组织 Bcl-2 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$), Caspase-3 及 Bax mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,

丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠 Bcl-2 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Caspase-3 及 Bax mRNA 表达明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与塞来昔布组比较, 丹参多糖低、高剂量组 Bcl-2 mRNA 表达明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), Caspase-3 及 Bax mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

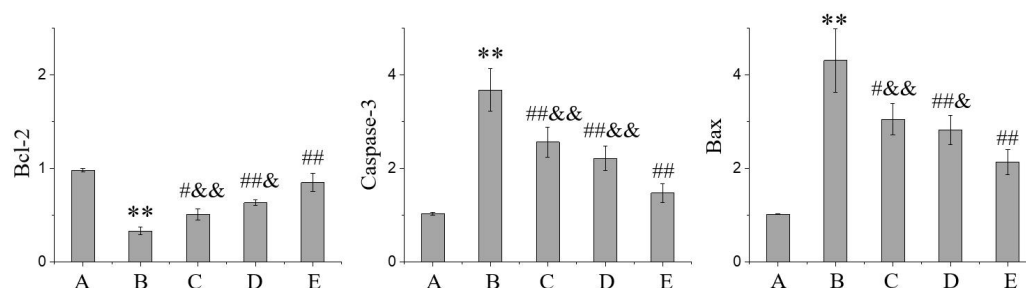


图 5 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织 Bcl-2、Caspase-3 及 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of SMP on mRNA expressions of Bcl-2, Caspase-3 and Bax in knee articular cartilage of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.6 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节滑液中炎症因子含量的影响

KOA 大鼠关节滑液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子含量同假手术组比较明显增加 ($P<0.01$); 丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠关节滑液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量明显低于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$); 丹参多糖低、高剂量组大鼠关节滑液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量明显高于塞来昔布组 ($P<0.05$, $P<0.01$), 结果见图 6。

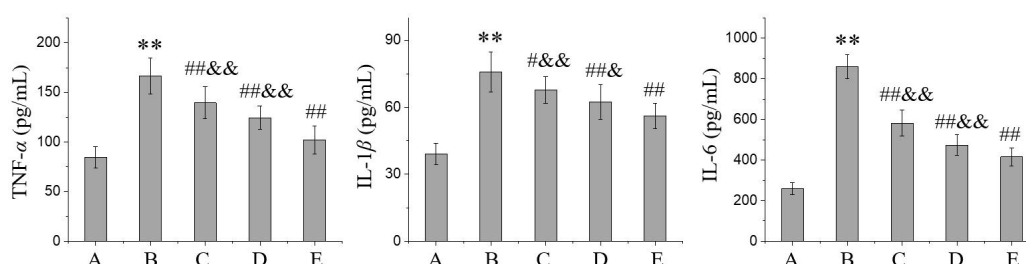


图 6 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节滑液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Fig. 6 Effects of SMP on contents of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in synovial fluid of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

2.7 丹参多糖对碘乙酸钠所致 KOA 大鼠关节软骨组织 MAPK/NF- κ B 信号的影响

与假手术组比较, KOA 大鼠关节软骨组织 p-p38 MAPK 及 p-NF- κ B p65 蛋白达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丹参多糖低、高剂量组及塞来昔布组大鼠关节软骨组织 p-p38 MAPK 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与塞来昔布组比较, 丹参多糖低、高剂量组大鼠关节软骨组织 p-p38 MAPK 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$), 结果见图 7。

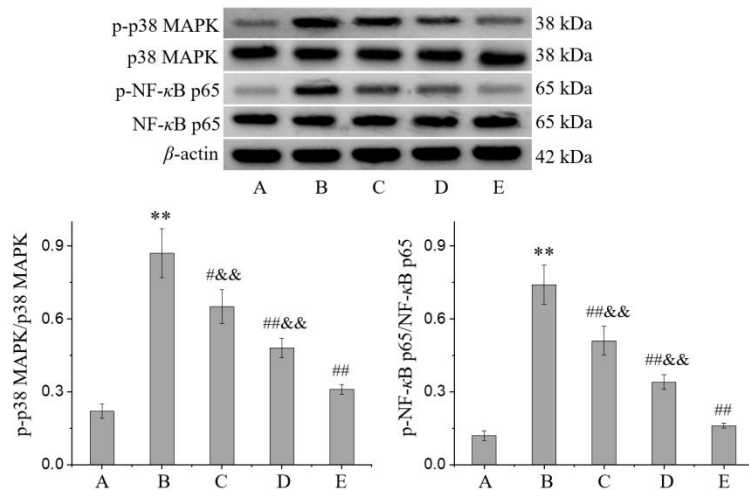


图7 丹参多糖对碘乙酸钠所致KOA大鼠膝关节软骨组织p-p38 MAPK及p-NF-κB p65蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effects of SMP on expressions of p-p38 MAPK and p-NF-κB p65 in knee articular cartilage of sodium iodoacetate-induced KOA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

丹参多糖是中药丹参的主要功效成分之一，现代药理学研究表明丹参多糖具有广泛的药理作用，如改善胰岛素抵抗、抑制氧化应激、抗癌、提高免疫力及减轻肝肾损伤等^[10]，然而丹参多糖对KOA是否具有治疗作用并不清楚。碘乙酸钠是甘油醛-3-磷酸脱氢酶的抑制剂，膝关节腔内注射碘乙酸钠能引起软骨的降解、丢失及软骨基质的退行性改变，与人KOA的病理变化类似，且操作简单、对动物创伤性小，是KOA的经典造模方法。塞来昔布为非甾体抗炎药，该药能通过抑制环氧合酶2的合成发挥镇痛和抗炎作用，且具有抑制软骨细胞凋亡活性，为临床治疗KOA的常用药，在本研究中被选为阳性对照药物^[11]。碘乙酸钠所致KOA大鼠经丹参多糖及塞来昔布干预后，爪压评分及步态评分下降，MWT及TML增加，Markin评分降低，提示丹参多糖可以减轻关节功能损伤、缓解疼痛、改善软骨组织病理形态，证实其对大鼠KOA具有治疗作用。

骨代谢平衡失调可引起软骨结构改变，是KOA发病中的重要环节，故调节骨代谢平衡已成为治疗KOA的有效策略^[12]。COMP、CTX-I及OCN含量变化可有效反映机体骨代谢水平，是临床上检测骨代谢失衡的常用指标。研究发现^[13, 14]，丹参中的丹酚酸类化合物丹酚酸B及丹参酮类化合物丹参酮IIA均具有调节骨代谢水平的活性。本研究结果同样发现，丹参多糖能够降低碘乙酸钠所致KOA大鼠血清COMP及CTX-I含量，增加OCN含量，表明丹参多糖也具有改善KOA大鼠骨代谢作用。

软骨细胞凋亡与KOA严重程度密切相关，在软骨破坏过程中起着主导作用，抑制软骨细胞凋亡是治疗KOA的关键。Bcl-2、Caspase-3及Bax均参与了软骨细胞的凋亡过程，其中Bcl-2为抗凋亡蛋白，Caspase-3及Bax具有促凋亡作用。本研究结果发现，丹参多糖低、高剂量组大鼠关节软骨组织Bcl-2 mRNA表达升高，Caspase-3及Bax mRNA表达下降，提示丹参多糖具有抗碘乙酸钠所致KOA大鼠关节软骨细胞凋亡作用。丹参多糖抗凋亡活性多

见报道,在脂多糖诱导的心肌细胞凋亡中,丹参多糖能够抑制 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达,促进自噬效应蛋白 1、成微管相关蛋白轻链 3-II 表达,从而减少心肌细胞凋亡的发生^[15]。在小鼠免疫性肝损伤模型中,丹参多糖可以通过增加 Bcl-2 表达、降低 Bax、凋亡相关因子配体和 Caspase-3 表达,进而发挥抗肝细胞凋亡作用^[16]。

KOA 的病变机制目前尚未明确,但炎症反应假说得到了众多学者的认可,炎症因子对 KOA 病变全程均有影响,其中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 发挥着至关重要的作用^[17]。TNF- α 是加重炎症反应的关键要素,又能诱导 IL-1 β 产生;IL-1 β 是导致损伤的重要原因,也能增加 TNF- α 的活性,二者在破坏膝关节软骨和促进软骨吸收方面具有协同作用^[18]。IL-6 主要参与成纤维细胞的激活、增殖及破骨细胞分化等过程,能够通过多种信号通路促进破骨细胞分化或抑制成骨细胞生成,最终导致 KOA^[19]。研究发现^[20],KOA 患者血清 TNF- α 、超敏 C 反应蛋白、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子含量升高,而降低相关炎症因子含量有助于提高临床疗效,并促进患者膝关节功能恢复。Zhang 等^[21]证实丹参多糖能抑制丙二醛、活性氧及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达,通过抗氧化应激及抗炎作用减轻黄曲霉毒素 B1 诱导的肝脏损伤。Han 等^[22]探讨了丹参多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的保护作用,发现保护机制与抑制 TNF- α 、IL-6、诱导型 NO 合成酶、环氧化酶-2 等炎症因子的转录与表达有关。本研究结果发现,在碘乙酸钠所致 KOA 大鼠模型中,丹参多糖能明显降低关节滑液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量,具有抑制炎症反应作用,与上述研究结论相符。MAPK/NF- κ B 信号通路可通过影响炎症因子的表达介导 KOA 的发生、发展过程,阻断该通路可抑制炎症反应,降低关节软骨侵蚀,缓解 KOA 症状^[23]。在金黄色葡萄球菌诱导的大鼠乳腺炎模型中,丹参多糖能抑制 MAPK 和 NF- κ B 蛋白磷酸化水平,减少乳腺组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的基因转录和蛋白表达,减弱炎症反应^[24]。本研究结果同样发现,在碘乙酸钠所致 KOA 大鼠模型中,丹参多糖低、高剂量组关节软骨组织 p-p38 MAPK 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达降低,进一步表明丹参多糖能够抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应。

综上所述,本研究结果发现丹参多糖对碘乙酸钠所致大鼠 KOA 具有治疗作用,并证实改善骨代谢、抗凋亡及抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应是丹参多糖治疗 KOA 的潜在机制。

参考文献

- 1 Tore NG,Oskay D,Haznedaroglu S.The quality of physiotherapy and rehabilitation program and the effect of telerehabilitation on patients with knee osteoarthritis[J].Clin Rheumatol,2023,42:903-915.
- 2 Bandak E,Christensen R,Overgaard A,et al.Exercise and education versus saline injections for knee osteoarthritis: a randomised controlled equivalence trial[J].Ann Rheum Dis,2022,81:537-543.
- 3 Zhang XY,Zeng H,Meng L.Research progress on pain mechanism and treatment of knee osteoarthritis[J].Chin J Pain Med(中国疼痛医学杂志),2023,29:50-58.
- 4 Hu N,Zhang J,Wang J,et al.Biomarkers of joint metabolism and bone mineral density are associated with early knee osteoarthritis in premenopausal females[J].Clin Rheumatol,2022,41:819-829.
- 5 Sezgin M,Barlas İÖ,Yıldır S,et al.Apoptosis-related Fas and FasL gene polymorphisms' associations with

- knee osteoarthritis[J].Rheumatol Int,2013,33:2039-2043.
- 6 Wang HB,Li P,Zhang ZG,et al.Influence of forsythin on cartilage damage in rats with knee osteoarthritis by regulating MAPK/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J].Int J Lab Med(国际检验医学杂志),2023,44:1902-1907.
 - 7 Xiang T,Jia YW,Guo N,et al.Helicid reduces pain of knee osteoarthritis in rats by inhibiting TrkA-TRPV1 signaling pathway[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1659-1666.
 - 8 Qian LG,Sun B,Yu B,et al.Salvianolic acid B alleviates cartilage tissue damage in rat models with osteoarthritis[J].Basic Clin Med(基础医学与临床),2023,43:159-164.
 - 9 Zhang JF,Xu ZL,Wu M,et al.Tanshinone IIA alleviates cartilage degeneration and local inflammation in rats with knee osteoarthritis by inhibiting pathway[J].Chin Pharm J(中国药理学杂志),2021,56:1918-1926.
 - 10 Luo L,Xue J,Shao Z,et al.Recent developments in *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides: isolation, purification, structural characteristics and biological activities[J].Front Pharmacol,2023,14:1139201.
 - 11 Hu B. Effects of celecoxib combined with platelet-rich plasma on cartilage tissues morphology in knee osteoarthritis rats[J].Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2020,36:2017-2020.
 - 12 Zhang Y,Zhang B,Li W,et al.Effects of joint irrigation combined with ozone injection on bone metabolism, inflammatory factors, and joint function in knee osteoarthritis[J].Am J Transl Res,2023,15:213-222.
 - 13 Zhang C,Zhou YF,Lu T,et al.Action mechanism of tanshinone IIA on regulating bone metabolism in osteoarthritis mice[J].Northwest Pharm J(西北药理学杂志),2024,39:74-80.
 - 14 Wang LL,Ma RF,Liu HX,et al.Salvianolic acid B regulates bone metabolism through Nox4 pathway in HFD mice[J].Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2018,34:77-81.
 - 15 Zhang JC,Lin SQ,Hu PF,et al.*Salviae miltiorrhizae* polysaccharide promotes autophagy and inhibits lipopolysaccharide induced cardiomyocyte apoptosis[J].Zhejiang J Integr Tradit Chin and West Med(浙江中西医结合杂志),2020,30:281-285.
 - 16 Wang X,Qin JJ,Wei YY,et al.Effects of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on apoptosis factors in the liver tissue of immunological liver injury mice[J].Chin J Vet Sci(中国兽医学报),2019,39:2047-2054.
 - 17 Dainese P,Wyngaert KV,Mits S,et al.Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review[J].Osteoarthritis Cartilage,2022,30:516-534.
 - 18 Yuan PW,Liu DY,Chu XD,et al.Effects of preventive administration of juanbi capsules on TNF-alpha, IL-1 and IL-6 contents of joint fluid in the rabbit with knee osteoarthritis[J].J Tradit Chin Med,2010,30:254-258.
 - 19 Hu PP,Huang F.Yunnan Baiyao ameliorates MIA-induced knee osteoarthritis pain in rats through anti-inflammatory effect[J].Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学),2019,24:254-259.
 - 20 Ma YY,Li N,Yang ZM.Clinical effect of Muguashenjin pill on elderly patients with knee osteoarthritis and its influence on levels of inflammatory factors and cartilage metabolic factors[J].Hubei J Tradit Chin Med(湖北中医杂志),2022,44:13-16.
 - 21 Zhang L,Liu Y,Zhang Q,et al.*Salvia miltiorrhiza* polysaccharide mitigates AFB1-induced liver injury in rabbits[J].Ecotoxicol Environ Saf,2024,276:116344.
 - 22 Han C,Yang J,Song P,et al.Effects of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced inflammatory factor release in RAW264.7 cells[J].J Interferon Cytokine Res,2018,38:29-37.
 - 23 Li H,You Y,Jiang B,et al.Wang-Bi tablet ameliorates DMM-induced knee osteoarthritis through suppressing the activation of p38-MAPK and NF-kappaB signaling pathways in mice[J].Evid Based Complement Alternat Med,2021,2021:3930826.
 - 24 Zhang D,Jin G,Liu W,et al.*Salvia miltiorrhiza* polysaccharides ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in rats by inhibiting activation of the NF-kappaB and MAPK signaling pathways[J].BMC Vet Res,2022,18:201.

收稿日期: 2024-05-31 接受日期:
基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202201ZYS228)
*通信作者 E-mail: ligaofeng8866@126.com; Tel: 15843092801