

乌头汤对膝骨关节炎大鼠模型的治疗作用

王莉莎¹, 王上增², 史栋梁¹, 张仲博¹, 任博文¹, 王云飞¹, 郭中华¹, 周晓宁³

(1. 河南省中医院骨病一科, 河南 郑州 450053; 2. 河南省中医院关节科, 河南 郑州 450053;

3. 河南省洛阳正骨医院颈肩腰腿痛四科, 河南 洛阳 450016)

摘要: **目的** 探讨乌头汤基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路对膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 大鼠模型的治疗作用。**方法** 通过向膝关节腔内注射木瓜蛋白酶溶液建立 KOA 大鼠模型; 将造模后的大鼠随机分为 KOA 组、乌头汤组 (4.2 g/kg 乌头汤)、抑制剂组 (30 mg/kg ML385)、乌头汤+抑制剂组 (4.2 g/kg 乌头汤+30 mg/kg ML385), 每组 10 只, 另取 10 只大鼠腔内注射生理盐水作为对照组。采用苏木精-伊红染色法观察软骨组织病理学变化并进行损伤评分; 采用 ELISA 法检测血清中炎症因子 [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)] 及氧化应激 [丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)] 指标; 采用 qRT-PCR 法及 Western blotting 法检测 Nrf2、HO-1 表达。**结果** 与对照组相比, KOA 组软骨表面粗糙不平, 细胞排列紊乱, 层状结构消失, IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量增加, SOD、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 KOA 组相比, 乌头汤组病理损伤得到缓解, IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量降低, SOD、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但抑制剂组病理损伤进一步加剧, IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量增加, SOD、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组病理损伤较为严重, IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量增加, SOD、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组病理损伤稍有改善, IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量降低, SOD、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 乌头汤可通过激活 Nrf2/HO-1 通路对 KOA 大鼠起治疗作用。

关键词: 乌头汤; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路; 膝骨关节炎; 治疗机制

中图分类号: R274

文献标志码: A

Therapeutic effects of aconitum carmichaelii decoction on a rat model of knee osteoarthritis

WANG Lisha¹, WANG Shangzeng², SHI Dongliang¹, ZHANG Zhongbo¹, REN Bowen¹,
WANG Yunfei¹, GUO Zhonghua¹, ZHOU Xiaoning³

(1. Department of Osteopathy, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, Henan, China;

2. Department of Arthrosis, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, Henan, China;

3. Department of Neck, Shoulder, Waist and Leg Pain, Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 450016, Henan, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effects of aconitum carmichaelii decoction based on the nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway on a rat model of knee osteoarthritis (KOA).

Methods KOA rat model was established by injecting papain solution into the knee joint; the rats after modeling were randomly grouped into KOA group, aconitum carmichaelii decoction group (4.2 g/kg aconitum carmichaelii decoction), inhibitor group (30 mg/kg ML385), aconitum carmichaelii decoction+inhibitor group (4.2 g/kg aconitum car-

michaelii decoction+30 mg/kg ML385), with 10 rats in each group, and another 10 rats were injected intracavally with physiological saline as the control group. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the histopathological changes of cartilage in cartilage and to score the damage; serum indicators of inflammatory factor [tumor necrosis factor- α (TNF- α)/interleukin-1 β (IL-1 β)] and oxidative stress [malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD)] were measured by ELISA; Nrf2 and HO-1 expressions were detected by qRT-PCR and Western blotting.

Results Compared with the control group, the cartilage surface of KOA group was rough and uneven, disordered cell arrangement, and disappearance of lamellar structure, increased content of IL-1 β , TNF- α and MDA, and decreased expressions of SOD, Nrf2, and HO-1 mRNA and protein ($P<0.05$); compared with the KOA group, the pathological damage of aconitum carmichaelii decoction group was relieved, with decreased contents of IL-1 β , TNF- α , and MDA, and increased expressions of SOD, Nrf2, and HO-1 mRNA and protein ($P<0.05$); however, the pathological damage in the inhibitor group was further aggravated, with increased content of IL-1 β , TNF- α , and MDA, and decreased expressions of SOD, Nrf2, and HO-1 mRNA and protein ($P<0.05$); compared with the aconitum carmichaelii decoction group, aconitum carmichaelii decoction+inhibitor group had more serious pathological damage, with increased content of IL-1 β , TNF- α , and MDA, and decreased expressions of SOD, Nrf2, and HO-1 mRNA and protein ($P<0.05$); compared with the inhibitor group, the pathological damage in the aconitum carmichaelii decoction+inhibitor group was slightly improved, with decreased content of IL-1 β , TNF- α , and MDA, and increased expressions of SOD, Nrf2, and HO-1 mRNA and protein ($P<0.05$). **Conclusion** Aconitum carmichaelii decoction can treat KOA rats by activating Nrf2/HO-1 pathway.

Key words: Aconitum carmichaelii decoction; Nuclear factor E2 related factor 2/Heme oxygenase-1 pathway; Knee osteoarthritis; Therapeutic mechanism

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是膝关节软骨变性、骨质增生造成的退行性关节疾病,以关节疼痛、肿胀和僵硬为主要特点,影响全球近 2.5 亿人^[1]。目前对早期 KOA 的治疗主要是使用口服非甾体抗炎药和关节内注射透明质酸、类固醇缓解患者疼痛,在 KOA 晚期主要采用关节置换手术^[2-3]。乌头汤是治疗类风湿关节炎的经典中药方剂,具有良好的疗效,已有研究证明,乌头汤可通过多条信号通路,降低炎症因子,起到多途径、多靶点的治疗效果^[3],但其对 KOA 的治疗及机制鲜有报道。KOA 发病的确切机制尚不清楚,但氧化应激及炎症反应等多种因素可导致 KOA 的发生和发展^[4]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)通路与氧化应激及炎症反应密切相关^[5]。有研究表明,Nrf2 激活具有软骨保护作用,可能有助于治疗软骨退化^[6]。本研究旨在探讨乌头汤对 KOA 大鼠模型的治疗作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 周龄雄性 SD 大鼠 56 只,体质量 260~290 g,购自玛斯生物技术(固安)有限公司,生产许可证 SCXK(冀)2021-004。饲养在 SPF 级环境中[河南

省中医院,SYXK(豫)2021-0018],22℃~26℃,昼夜循环 12 h,自由饮水、进食 7 d。所有动物实验方案均经河南省中医院动物保护和和使用委员会批准,并遵循 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

木瓜蛋白酶溶液(货号 G8432,纯度 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝公司;乌头汤药物由河南省中医院药房配制而成;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(货号 RA20035、RA20422)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;Nrf2 抑制剂-ML385(货号 HY-100523)购自美国 Med-ChemExpress 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(货号 A003-1-2、A001-3-2)购自南京建成有限公司;Nrf2、HO-1 一抗(货号 ab62352、ab13248)购自英国 Abcam 公司。酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司;光学显微镜购自日本奥林巴斯有限公司。

1.2 方法

1.2.1 KOA 大鼠模型的制备及干预

随机选取 44 只大鼠(造模组),腹腔注射 1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉大鼠,以仰卧位固定,对膝关节处去毛、消毒,向右侧膝关节腔内注射木瓜蛋白酶溶液(40 g/L,0.2 mL);其他 12 只大鼠进行腔内注射等体积生理盐水(对照组)。两组大鼠

每间隔3 d进行上述操作1次,共3次。2周(包含注射期)后,观察大鼠右侧膝关节炎病变情况,各组随机选取2组进行病理切片检测,以右侧膝关节发生肿胀(皮纹消失)、活动受限(无法自由做出屈伸),以软骨细胞大量缺失,排列紊乱,组织染色不均匀,软骨表层缺损严重为造模成功^[7],其中1只死亡,1只可稍做屈伸活动均排除在外。将造模成功的大鼠随机分为KOA组、乌头汤组、抑制剂组和乌头汤+抑制剂组,每组10只。结合参考文献[6]及前期预实验结果,乌头汤组给予乌头汤(4.2 g/kg)进行灌胃干预,且腹腔注射等量生理盐水;抑制剂组腹腔注射ML385(30 mg/kg)干预^[8],且灌胃等量生理盐水;乌头汤+抑制剂组乌头汤(4.2 g/kg)灌胃干预,同时腹腔注射ML385(30 mg/kg)干预,对照组及KOA组以等量生理盐水灌胃及腹腔注射干预,连续治疗8周,各组每天干预1次。

1.2.2 样本采集

干预结束后,麻醉各组大鼠,对膝关节进行X射线检查,腹部主动脉取血,检测血清中炎症因子及氧化应激水平;分离右侧膝关节及软骨组织,部分置于-80℃备用,部分用4%甲醛溶液固定。

1.2.3 采用苏木精-伊红染色法观察软骨组织病理学变化

用含4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲盐水固定右侧膝关节软骨组织,并在37℃保持24 h,4℃10% EDTA中脱钙,脱钙后的组织在一系列70%~100%乙醇水溶液中脱水,包埋石蜡块中,制备组织切片,采用苏木精-伊红染色5 min,经水洗后,0.5%盐酸乙醇分色,加入伊红复染3 min,在显微镜下观察组织病理学变化,并对组织病理损伤进行Mankin评分^[9]。

1.2.4 采用ELISA法检测血清中炎症因子及氧化应激指标

收集血清样本,按照特定的ELISA试剂盒说明检测IL-1 β 、TNF- α 、MDA、SOD水平。

1.2.5 采用qRT-PCR法检测软骨组织中Nrf2、HO-1 mRNA的表达

用TRIzol提取右侧膝关节软骨组织中的总RNA,并用分光光度计评估。使用Prime Script RT试剂盒进行RNA逆转录。采用qPCR反应在ABI棱镜7300上进行。单个基因的mRNA水平以GAPDH为参照,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因表达水平。上海生物技术服务公司设计合成引物。反应条件:95℃预变性2 min,94℃变性15 s,55℃退火15 s,68℃延伸30 s,共45个循环,最后溶解曲线在65~

95℃制备。Nrf2正向引物为:5'-AAGAATA-AAGTCGCCGCCCA-3';反向引物为:5'-AGATA-CAAGGTGCTGAGCCG-3';HO-1正向引物为:5'-CCTCACAGATGGCGTCACTT-3';反向引物为:5'-TGGGGGCCAGTATTGCATTT-3';GAPDH正向引物为:5'-GTTGTGGCTCTGACATGCT-3',反向引物为:5'-CCCACGGATGCCCTTTAGT-3'。

1.2.6 采用Western blotting法检测Nrf2、HO-1蛋白表达

右侧膝关节组织中加入RIPA裂解物混合,研磨10~15 min,提取关节组织蛋白及核蛋白,蛋白质水平定量用BCA蛋白质测定试剂盒检测,将样品在SDS-PAGE中电泳,并转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭2 h,将Nrf2(稀释度1:3 000)、HO-1(稀释度1:2 000)一抗与膜在4℃过夜,加入二抗2 h。暴露于ECL中使条带可视化,并定量蛋白质条带的总灰度值,以GAPDH为内参。

1.3 统计学处理

采用SPSS 27.0和GraphPad Prism 8.0统计学软件,以Shapiro-Wilk法对计量资料进行正态性检验,均符合正态分布,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对照组和KOA组、乌头汤组和乌头汤+抑制剂组、抑制剂组和乌头汤+抑制剂组比较,采用 t 检验;乌头汤组、抑制剂组、乌头汤+抑制剂组及KOA组组间的多因素分析采用析因设计的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义(双尾)。

2 结果

2.1 乌头汤对各组大鼠影像学改变的影响

对照组大鼠无明显变化,KOA组、抑制剂组膝关节间隙变宽、钙化程度增加,其中抑制剂组较为严重;但经乌头汤干预后,膝关节间隙变窄、钙化程度有所改善;乌头汤+抑制剂组较乌头汤组稍有加重。见图1。

2.2 乌头汤对各组大鼠病理损伤的影响

对照组软骨组织无明显病理学变化,软骨表面光滑,细胞有序排列;KOA组软骨表面粗糙不平,细胞排列紊乱,软骨表层缺损严重,组织染色不均匀;经乌头汤干预后,病理损伤有所改善;但抑制剂组较KOA组细胞数量明显减少,大小不一,染色不均匀;乌头汤+抑制剂组病理损伤较乌头汤组加剧,但不及抑制剂组严重,见图2。与对照组(0.34 \pm 0.04)相比,KOA组Mankin评分(6.88 \pm 0.69)增加($t=29.923$, $P<0.001$);与KOA组相比,乌

头汤组和抑制剂组 Mankin 评分差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 乌头汤+抑制剂组 Mankin 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中, 乌头汤组 Mankin 评分 (3.54 ± 0.36) 降低, 抑制剂组 Mankin 评分 (8.95 ± 0.91) 增加 (乌头汤: $F = 178.094, P < 0.001$; 抑制剂:

$F = 136.421, P < 0.001$; 联合应用: $F = 4.430, P = 0.042$); 与乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组 Mankin 评分 (6.52 ± 0.66) 增加 ($t = 12.535, P < 0.001$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组 Mankin 评分降低 ($t = 6.836, P < 0.001$)。

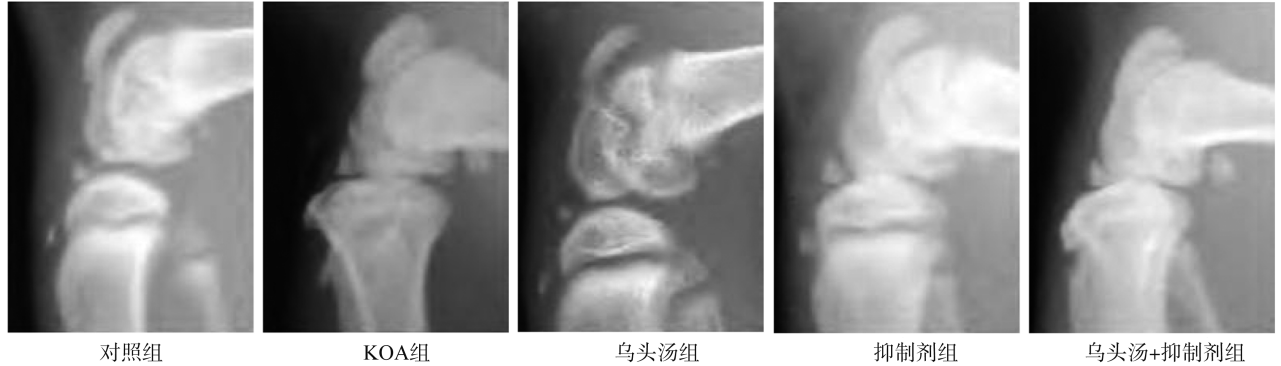


图1 X射线检测结果
Figure 1 X-ray test results

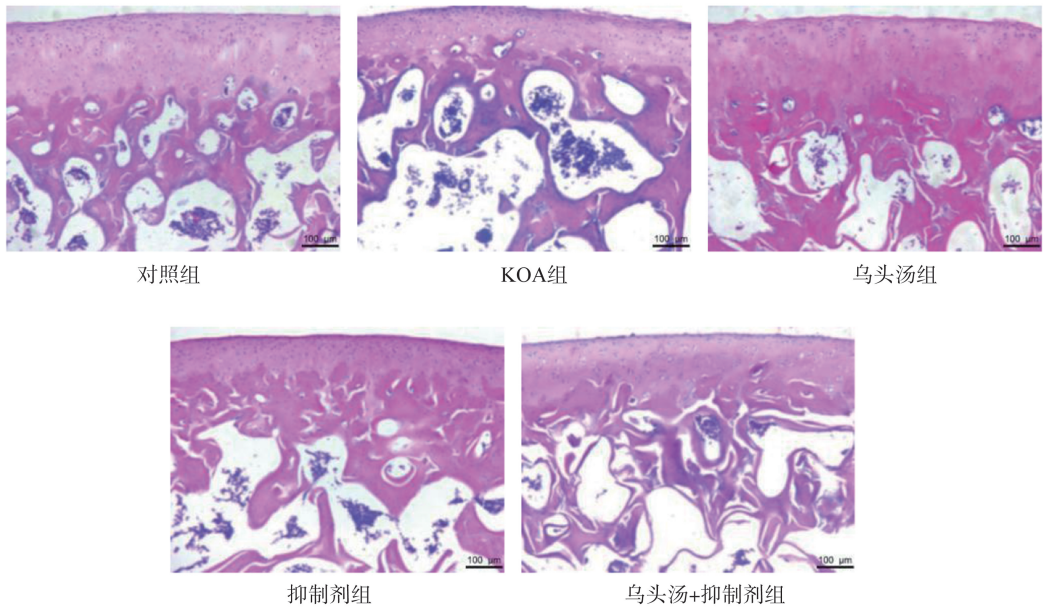


图2 软骨组织病理学变化(苏木精-伊红染色, $\times 100$)
Figure 2 Histopathology changes of cartilage (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

2.3 乌头汤对各组大鼠血清中炎症因子的影响

与对照组相比, KOA 组 IL-1 β 、TNF- α 含量增加 ($t = 13.487, 9.090, P < 0.001$); 与 KOA 组相比, 乌头汤组和抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 含量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 乌头汤+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中, 乌头汤组 IL-1 β 、TNF- α 含量降低, 但抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 含量增加 (乌头汤: $F = 199.153, 122.812, P < 0.001$; 抑制剂: $F = 154.110, 131.246, P < 0.001$; 联合应用: $F = 3.342, 1.321, P > 0.05$); 与

乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 含量增加 ($t = 9.986, 9.058, P < 0.001$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组 IL-1 β 、TNF- α 含量降低 ($t = 9.544, 7.442, P < 0.001$)。见表 1。

2.4 乌头汤对各组大鼠血清中氧化应激指标的影响

与对照组相比, KOA 组 MDA 含量增加, SOD 含量降低 ($t = 14.842, 12.820, P < 0.001$); 与 KOA 组相比, 乌头汤组和抑制剂组 MDA、SOD 含量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 乌头汤+抑制剂组 MDA、

SOD 含量差异无统计学意义($P>0.05$),其中,乌头汤组 MDA 含量降低, SOD 含量增加, 抑制剂组 MDA 含量增加, SOD 含量降低(乌头汤: $F = 174.642, 226.182, P < 0.001$; 抑制剂: $F = 182.656, 205.468, P < 0.001$; 联合应用: $F = 6.514, 22.272, P = 0.015, P < 0.001$); 与乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组 MDA 含量增加, SOD 含量降低($t = 14.470, 11.033, P < 0.001$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组 MDA 含量降低, SOD 含量增加($t = 6.393, 9.772, P < 0.001$)。见表 2。

表 1 各组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 变化/(pg/mL)

Table 1 Changes of IL-1 β and TNF- α in serum of rats in each group/(pg/mL)

组别	IL-1 β	TNF- α
对照组	30.24 \pm 3.11	86.27 \pm 8.74
KOA 组	58.61 \pm 5.88 [*]	132.38 \pm 13.45 [*]
乌头汤组	34.52 \pm 3.46 [#]	88.05 \pm 8.82 [#]
抑制剂组	86.54 \pm 8.72 [#]	188.64 \pm 18.92 [#]
乌头汤+抑制剂组	55.28 \pm 5.59 ^{&Δ}	134.05 \pm 13.42 ^{&Δ}

^{*} $P < 0.05$ vs 对照组; [#] $P < 0.05$ vs KOA 组; [&] $P < 0.05$ vs 乌头汤组; ^Δ $P < 0.05$ vs 抑制剂组。

表 2 各组大鼠血清中 MDA、SOD 水平

Table 2 MDA and SOD levels in serum of rats in each group

组别	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)
对照组	18.42 \pm 1.85	36.51 \pm 3.66
KOA 组	38.51 \pm 3.86 [*]	19.64 \pm 1.98 [*]
乌头汤组	19.05 \pm 1.91 [#]	34.21 \pm 3.43 [#]
抑制剂组	52.04 \pm 5.22 [#]	12.55 \pm 1.27 [#]
乌头汤+抑制剂组	38.88 \pm 3.89 ^{&Δ}	20.16 \pm 2.11 ^{&Δ}

^{*} $P < 0.05$ vs 对照组; [#] $P < 0.05$ vs KOA 组; [&] $P < 0.05$ vs 乌头汤组; ^Δ $P < 0.05$ vs 抑制剂组。

2.5 乌头汤对各组大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 的影响

与对照组相比, KOA 组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达降低($t = 10.575, 12.292, P < 0.001$); 与 KOA 组相比, 乌头汤组和抑制剂组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 乌头汤+抑制剂组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 其中, 乌头汤组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达增加, 抑制剂组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达降低(乌头汤: $F = 277.099, 252.298, P < 0.001$; 抑制剂: $F = 200.556, 179.787, P < 0.001$; 联合应用: $F = 0.556, 3.447, P > 0.05$); 与乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达降低($t = 7.894, 8.974, P < 0.001$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组 Nrf2、HO-1 mRNA 表达增加($t = 16.499, 13.336, P < 0.001$)。见表 3。

表 3 各组大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 水平
Table 3 Nrf2 and HO-1 mRNA levels in cartilage tissue of rats in each group

组别	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA
对照组	0.92 \pm 0.10	1.16 \pm 0.12
KOA 组	0.53 \pm 0.06 [*]	0.62 \pm 0.07 [*]
乌头汤组	0.85 \pm 0.09 [#]	1.05 \pm 0.11 [#]
抑制剂组	0.23 \pm 0.03 [#]	0.34 \pm 0.04 [#]
乌头汤+抑制剂组	0.58 \pm 0.06 ^{&Δ}	0.68 \pm 0.07 ^{&Δ}

^{*} $P < 0.05$ vs 对照组; [#] $P < 0.05$ vs KOA 组; [&] $P < 0.05$ vs 乌头汤组; ^Δ $P < 0.05$ vs 抑制剂组。

2.6 乌头汤对大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1 蛋白以及核蛋白 Nrf2 表达的影响

与对照组相比, KOA 组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达降低($t = 11.118, 11.609, 13.207, P < 0.001$); 与 KOA 组相比, 乌头汤组和抑制剂组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 乌头汤+抑制剂组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 其中, 乌头汤组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达增加, 抑制剂组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达降低(乌头汤: $F = 207.654, 233.021, 254.959, P < 0.001$; 抑制剂: $F = 193.580, 174.298, 203.252, P < 0.001$; 联合应用: $F = 3.951, 1.532, 5.203, P = 0.055, 0.224, 0.029$); 与乌头汤组相比, 乌头汤+抑制剂组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达降低($t = 7.016, 8.489, 9.721, P < 0.001$); 与抑制剂组相比, 乌头汤+抑制剂组组织中 Nrf2、HO-1 以及核蛋白 Nrf2 表达增加($t = 15.556, 13.336, 13.016, P < 0.001$)。见图 3, 表 4。

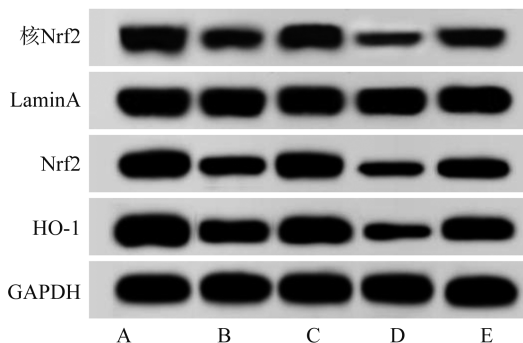


图 3 软骨组织及细胞核中 Nrf2、HO-1 蛋白表达
A: 对照组; B: KOA 组; C: 乌头汤组; D: 抑制剂组; E: 乌头汤+抑制剂组。

Figure 3 Nrf2 and HO-1 protein expressions in cartilage tissue and cell nuclei

A: Control group; B: KOA group; C: Aconitum carmichaelii decoction group; D: Inhibitor group; E: Aconitum carmichaelii decoction + inhibitor group.

表4 大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1 及核蛋白 Nrf2 表达
Table 4 Expression of Nrf2 and HO-1 in cartilage tissue and Nrf2 expression in nuclear protein of rats

组别	Nrf2/ GAPDH	HO-1/ GAPDH	核蛋白 Nrf2/GAPDH
对照组	0.99±0.10	1.12±0.12	0.85±0.09
KOA 组	0.58±0.06 [*]	0.61±0.07 [*]	0.42±0.05 [*]
乌头汤组	0.83±0.09 [#]	1.01±0.11 [#]	0.74±0.08 [#]
抑制剂组	0.26±0.03 [#]	0.32±0.04 [#]	0.21±0.03 [#]
乌头汤+抑制剂组	0.59±0.06 ^{&Δ}	0.66±0.07 ^{&Δ}	0.45±0.05 ^{&Δ}

^{*}P<0.05 vs 对照组; [#]P<0.05 vs KOA 组; [&]P<0.05 vs 乌头汤组; ^ΔP<0.05 vs 抑制剂组。

3 讨论

KOA 是一种慢性低度炎症性疾病,影响全球约 23% 的 40 岁及以上人群,其发病率逐年上升,且患者逐渐年轻化,严重威胁着人类的健康和生活质量^[10-12]。KOA 病因较多,与年龄、肥胖和遗传因素均有关系,由于 KOA 的发病机制和病因尚不明确,临床治疗难以取得满意效果^[13]。因此研究 KOA 的作用机制对于有效药物的临床使用意义重大。

乌头汤是一种传统中药汤剂,含有炙甘草、麻黄、白芍、乌头以及黄芪五种传统药物,由于其优良的疗效和较少的不良反应,对类风湿关节炎的治疗已有两千年的历史^[14]。现代药理研究表明,乌头汤具有抗炎、调节免疫、镇痛、抗血管生成等作用^[15-16]。研究证明,氧化应激不仅与慢性炎症相关,而且在 KOA 的病理生理学中起主要作用,但乌头汤可以通过抑制氧化应激反应缓解 KOA 的发展^[17]。本研究结果发现,KOA 大鼠膝关节发生肿胀、无法自由做出屈伸,IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量较高,SOD 含量下降,病理损伤较为严重,提示氧化应激及炎性反应促进 KOA 的发展过程,其严重程度与 SOD 水平呈负相关,与 MDA 水平呈正相关^[18]。本研究在体内实验中证实乌头汤可以抑制 MDA 含量,使 SOD 含量增加,抑制氧化应激对 KOA 大鼠的损伤。提示乌头汤可改善 KOA 大鼠氧化应激损伤。除此之外,陈俊等^[19]提出乌头汤对降低 KOA 大鼠血清和关节液中炎症因子水平有帮助,进而达到治疗目的。本研究经乌头汤干预后,IL-1 β 、TNF- α 水平下降,减缓 KOA 大鼠病理损伤,提示乌头汤对 KOA 大鼠起明显的治疗作用,与其抗炎及抗氧化均有关系,但其作用机制尚未明确。

Nrf2 是氧化应激的主要传感器,调节细胞氧化还原稳态,HO-1 控制着重要的生物过程,如细胞增

殖、炎症、纤维化和血管生成,Nrf2/HO-1 信号通路作为氧化应激反应中不可或缺的信号通路,参与抗炎、抗氧化、凋亡等过程,与多种疾病的发生发展有关^[20-22]。Cai 等^[23]提出 7,8-二羟基黄酮可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路预防骨关节炎的发生。虾青素可通过 Nrf2 信号维持软骨稳态,抑制骨关节炎小鼠软骨细胞的炎症反应、氧化应激,进而发挥抗关节炎作用^[24]。基于以上研究,推测激活 Nrf2/HO-1 对 KOA 的改善作用具有重要意义。本研究结果发现,KOA 大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达均明显降低,KOA 大鼠病理损伤严重,提示 KOA 的发生可能与 Nrf2/HO-1 信号通路被抑制有关。但经乌头汤干预后,软骨组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达增加,KOA 大鼠的炎症反应及氧化应激被抑制,缓解了 KOA 大鼠发展,推测乌头汤可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路发挥对 KOA 大鼠的治疗作用,与艾司氯胺酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路对骨关节炎大鼠发挥抗炎与软骨保护的结果相吻合^[25]。为进一步验证实验结论,实验引入 Nrf2/HO-1 信号通路抑制剂-ML385 进行反向验证,结果发现,ML385 抑制了 Nrf2/HO-1 信号通路的激活,大鼠病理损伤进一步加重,但乌头汤联合 ML385 治疗后,Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达有所上调,炎症反应及氧化应激水平被抑制,软骨组织病理损伤得到缓解,表明乌头汤对 KOA 大鼠的治疗作用是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路实现。

综上所述,乌头汤可以降低 KOA 大鼠的炎症反应及氧化应激水平,可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关,提示 Nrf2/HO-1 可作为治疗 KOA 的新靶标,但具体机制还在进一步探索之中。

参考文献:

- [1] Li M, Zhang L, Liu Z, et al. Sane powder essential oil nanoemulsion negatively regulates TRPA1 by AMPK/mTOR signaling in synovitis: knee osteoarthritis rat model and fibroblast-like synoviocyte isolates[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 4736670. doi: 10.1155/2021/4736670.
- [2] Guo H, Yin W, Zou Z, et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development: an in vivo and in vitro study [J]. J Adv Res, 2021, 28: 255-267. doi:10.1016/j.jare.2020.06.020.
- [3] 陈俊,林洁,赵忠胜,等.乌头汤对膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J].中国组织工程研究,2019,23(27):4381-4386.

- CHEN Jun, LIN Jie, ZHAO Zhongsheng, et al. Effect of Wutou Decoction on TLR4/NF- κ B signaling pathway in synovial tissue of rat models with knee osteoarthritis[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2019, 23(27): 4381-4386.
- [4] Liu FC, Wang CC, Lu JW, et al. Chondroprotective effects of genistein against osteoarthritis induced joint inflammation[J]. Nutrients, 2019, 11(5): E1180. doi:10.3390/nu11051180.
- [5] 张嘉颖, 宿荣允, 王英惠, 等. ACE2 基因通过调控 Nrf2/HO-1 通路改善肾缺血再灌注损伤[J]. 山东大学学报(医学版), 2023, 61(4): 1-9.
ZHANG Jiaying, SU Rongyun, WANG Yinghui, et al. ACE2 gene protects against renal ischemia-reperfusion injury by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Journal of Shandong University(Health Sciences), 2023, 61(4): 1-9.
- [6] Li X, Lin J, Ding X, et al. The protective effect of synaptic acid in osteoarthritis: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 1940-1950.
- [7] 陈景涛, 陈有, 李玉静, 等. 黄芪多糖抑制 Toll 样受体 4/核因子 κ B p65 通路治疗大鼠膝关节炎[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(31): 5002-5008.
CHEN Jingtao, CHEN You, LI Yujing, et al. Astragalus polysaccharide inhibits Toll-like receptor 4/nuclear factor kappaB p65 pathway in the treatment of knee osteoarthritis in rats [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2023, 27(31): 5002-5008.
- [8] 陈玄, 闫一敏, 魏璐璐. 巴曲酶对缺血性眩晕大鼠及其脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(8): 1549-1555.
CHEN Xuan, YAN Yimin, WEI Lulu. Effect of batroxobin on ischemic vertigo rats and Nrf2/HO-1 signaling pathway in cerebral tissue[J]. Drugs & Clinic, 2021, 36(8): 1549-1555.
- [9] 郭文帆, 杨学钰, 郑雪君, 等. 茶黄素调节 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路对膝关节炎大鼠的治疗作用[J]. 河北医学, 2023, 29(1): 42-49.
GUO Wenfan, YANG Xueyu, ZHENG Xuejun, et al. Therapeutic effect of theaflavins modulation of AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway in rats with knee osteoarthritis[J]. Hebei Medicine, 2023, 29(1): 42-49.
- [10] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [11] Hou PW, Liu SC, Tsay GJ, et al. The traditional Chinese medicine "hu-Qian-wan" attenuates osteoarthritis-induced signs and symptoms in an experimental rat model of knee osteoarthritis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5367494. doi:10.1155/2022/5367494.
- [12] Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? an update[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6405. doi:10.3390/ijms24076405.
- [13] Zhang J, Zhao M, Liu J, et al. Synovitis ointment improved knee osteoarthritis by suppressing SDF-1/CXCR4 signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 7719301. doi: 10.1155/2022/7719301.
- [14] Ba X, Huang Y, Shen P, et al. WTD attenuating rheumatoid arthritis via suppressing angiogenesis and modulating the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 696802. doi:10.3389/fphar.2021.696802.
- [15] Guo Q, Mizuno K, Okuyama K, et al. Antineuropathic pain actions of Wu-tou decoction resulted from the increase of neurotrophic factor and decrease of CCR5 expression in primary rat glial cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109812. doi:10.1016/j.biopha.2020.109812.
- [16] 田秋红, 刘维, 吴沅峰, 等. 基于网络药理学探讨乌头汤治疗类风湿关节炎作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(8): 102-111.
TIAN Qihong, LIU Wei, WU Yuanhao, et al. Study on the mechanism of wutou decoction (乌头汤) in treating rheumatoid arthritis based on network pharmacology [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 23(8): 102-111.
- [17] 陈长兴, 仲卫红, 金灵璐, 等. 乌头汤抑制膝关节炎软骨细胞氧化应激反应的作用研究[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(11): 1-4.
CHEN Changxing, ZHONG Weihong, JIN Linglu, et al. Study on the inhibitory effect of wutou tang on oxidative stress response of chondrocytes in knee osteoarthritis [J]. Rheumatism and Arthritis, 2022, 11(11): 1-4.
- [18] Wang Y, Yan T, Mu X, et al. Effects of moxibustion combined with ultrashort wave on pain and oxidative stress in elderly patients with knee osteoarthritis [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 3921021. doi:10.1155/2022/3921021.
- [19] 陈俊, 叶锦霞, 林洁, 等. 乌头汤对膝关节炎大鼠细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-3 的影响[J]. 福建中医药, 2017, 48(5): 27-29.
CHEN Jun, YE Jinxia, LIN Jie, et al. Effect of Aconitum decoction on cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and MMP-3 in rats with knee osteoarthritis[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 48(5): 27-29.
- [20] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protec-

- tion of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. J Adv Res, 2021, 34: 43-63. doi:10.1016/j.jare.2021.06.023.
- [21] Dang R, Wang M, Li X, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41. doi:10.1186/s12974-022-02400-6.
- [22] Cai XP, Hua SY, Deng JW, et al. Astaxanthin activated the Nrf2/HO-1 pathway to enhance autophagy and inhibit ferroptosis, ameliorating acetaminophen-induced liver injury[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(38): 42887-42903.
- [23] Cai D, Feng W, Liu J, et al. 7,8-Dihydroxyflavone activates Nrf2/HO-1 signaling pathways and protects against osteoarthritis[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(3): 1677-1684.
- [24] Sun K, Luo J, Jing X, et al. Astaxanthin protects against osteoarthritis via Nrf2: a guardian of cartilage homeostasis[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(22): 10513-10531.
- [25] 景建闯, 刘鹏, 安波. 艾司氯胺酮调节 Nrf2/HO-1 信号通路对骨关节炎大鼠镇痛作用的研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2023, 42(1): 9-15.
- JING Jianchuang, LIU Peng, AN Bo. Analgesic effect of esketamine regulating Nrf2/HO-1 signal pathway on rats with osteoarthritis[J]. Journal of Southeast University(Medical Science Edition), 2023, 42(1): 9-15.

(编辑:徐苗蓁)

读者·作者·编者

缩略语使用

凡已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用。例如:DNA、RNA、HbsAg、PCR等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语,以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。例如:流行性脑脊髓膜炎(流脑),阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响可读性。西文缩略语不得拆开转行。

(本刊编辑部)