基于TLR4/MyD88/NF-κB信号通路研究十一方药酒对兔膝骨关节炎的保护作用

张文涛[1*]，周玲梅[2]，黄宏海[2]，鲍慧慧[2]，毛德文[3]，田　慧[2#]，刘舒凌[1]（1.广西中医药大学教学实验实训中心，南宁 530200；2.广西中医药大学药学院，南宁　530200；3.广西中医药大学第一附属医院肝病科，南宁　530023）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）18-2224-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.18.10

摘　要　目的　研究十一方药酒（以下简称“SYF”）对木瓜蛋白酶诱导的兔膝骨关节炎（KOA）的保护作用及机制。**方法**　将35只兔随机分为空白组、模型组、阳性组（双氯芬酸二乙胺乳胶剂200 mg/kg）、SYF高剂量组（386 mg/kg）、SYF低剂量组（97 mg/kg），每组7只（均为雄性4只、雌性3只）。除空白组外，其余各组兔于第1、4、7天从右后肢膝关节腔注入木瓜蛋白酶混合液（含2%木瓜蛋白酶与0.03 mol/L L-半胱氨酸）0.5 mL复制KOA模型，空白组注射等体积生理盐水。从第15天开始于各组兔右后肢膝关节涂抹药物，每天给药2次，连续20 d，同时在第0、8、14、35天，用游标卡尺测量兔右后肢膝关节直径计算其肿胀度。实验结束后，采用酶联免疫吸附测定法检测滑膜组织白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、前列腺素E_2（PGE_2）的水平；制作滑膜组织苏木精-伊红（HE）染色切片，观测病理学形态变化；采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测滑膜组织Toll样受体4（TLR4）/髓样分化因子88（MyD88）/细胞核因子（NF-κB）信号通路中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平；采用Western blot法检测滑膜组织TLR4、MyD88、NF-κB p65、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）蛋白相对表达水平。**结果**　与空白组比较，模型组兔膝关节肿胀度升高，滑膜组织病理性损伤严重，滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平均显著升高（$P<0.05$），TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA和TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组兔右后肢膝关节肿胀度与滑膜组织病理损伤程度均有显著改善，滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平均显著降低（$P<0.05$），TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平和TLR4、MyD88（SYF低剂量组除外）、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。**结论**　SYF对木瓜蛋白酶诱导的兔KOA有保护作用，其作用机制与降低炎症因子IL-1β、TNF-α、PGE_2水平及下调TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关。

关键词　十一方药酒；膝骨关节炎；炎症因子；TLR4/MyD88/NF-κB信号通路

Study on protective effects of Shiyifang medicinal wine on knee osteoarthritis in rabbits based on TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway

ZHANG Wentao[1], ZHOU Lingmei[2], HUANG Honghai[2], BAO Huihui[2], MAO Dewen[3], TIAN Hui[2], LIU Shuling[1]（1. Teaching Experiment Training Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. Dept. of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of Shiyifang medicinal wine (SYF) on knee osteoarthritis (KOA) of rabbit induced by papain. **METHODS** Thirty-five rabbits were randomly divided into blank group, model group, positive group (Diclofenac diethylamine emulsion 200 mg/kg), SYF high-dose group (386 mg/kg) and SYF low-dose group (97 mg/kg), with 7 rabbits in each group (all had 4 males and 3 females). Except for the blank group, the other groups' rabbits were injected 0.5 mL papain mixture (containing 2% papain and 0.03 mol/L L-cysteine) into the right knee cavity on day 1, 4 and 7, to replicate KOA model. Blank group was given constant volume of normal saline. From the 15th day, drugs were applied to right hind knee joints of rabbits in each group, twice a day for 20 days. At the same time, the diameter of right knee joints of rabbits was measured by vernier calipers at day 0, 8, 14 and 35 to calculate swelling degree. After the experiment, the levels of IL-1β, TNF-α and PGE_2 in synovial tissue were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to prepare the sections of synovial tissue, and the pathological changes were observed. The relative mRNA expressions of TLR4, MyD88 and NF-κB p65 in the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction. The relative protein expressions of TLR4, MyD88, NF-κB p65 and p-NF-κB p65 were detect by Western blot. **RESULTS** Compared with blank group, the degree of knee swelling could be increased in model group, the pathological damage of synovial tissue was more serious, and the levels of IL-1β, TNF-α and PGE_2 were increased significantly in synovial tissue ($P<0.05$). The

Δ**基金项目** 广西创新驱动发展专项资金项目（No.桂科AA17202-036）；广西壮族自治区中医药管理局中药壮瑶药医院制剂质量提升项目（No.GZZJ202001）

＊**第一作者** 实验师，硕士。研究方向：中药药效学。E-mail：215079602@qq.com

\# **通信作者** 教授，博士。研究方向：中药品种鉴定与质量评价。电话：0771-4953513。E-mail：377244732@qq.com

relative expression levels of TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNAs and TLR4, MyD88, p-NF-κB p65 proteins were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, swelling degree of right hind knee and the pathological injury degree of synovial tissue were significantly improved in each treatment group, while the levels of IL-1β, TNF-α and PGE_2 in synovial tissue were significantly decreased ($P<0.05$). The relative mRNA expressions of TLR4, MyD88 and NF-κB p65 and relative protein expressions of TLR4, MyD88 (except for SYF low-dose group) and p-NF-κB p65 were all significantly decreased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** SYF shows protective effect on KOA induced by papain, the mechanism of which is associated with decreasing the levels of IL-1β, TNF-α and PGE_2 and down-regulating TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS Shiyifang medicinal wine; knee osteoarthritis; inflammatory factor; TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway

膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)亦称膝关节退行性骨关节病,可引起关节疼痛、僵硬、红肿、功能障碍等[1]。随着我国人口老龄化,KOA的发生率与日俱增,不仅给患者造成机体功能障碍及生理性疼痛,同时还导致其心理负担与经济压力。西医对于KOA的治疗以手术[2]和非甾体类抗炎药[3]为主。中医将KOA纳入“骨痹”“膝痹”范畴,辨证分析其病因为肝肾亏虚、气血不足、筋骨失养、风寒湿邪乘虚内侵[4]。中药及其复方制剂在中医理论指导下,无论是外用还是内服,对KOA的治疗都有独特的优势。十一方药酒(以下简称“SYF”)作为广西中医药大学第一附属医院特色院内制剂,由乳香、没药、红花、自然铜(锻)、续断、龙血竭、三七等中药组成,具有舒筋活络、消肿散瘀、接骨止痛的功效,临床上对于软组织及骨关节炎相关疾病的治疗均表现出显著效果[5-8]。SYF的传统制备方法主要为冷浸法,此法对药材的提取时间及有效成分提取有一定的局限性。本课题组前期采用正交实验法优选渗漉工艺后制备获得SYF[9]。为进一步确定优化工艺制备的SYF治疗KOA的作用,本实验以木瓜蛋白酶诱导的KOA兔为模型,观察SYF对其保护作用,并揭示SYF作用机制与Toll样受体4(toll-like receptor 4,TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88,MyD88)/细胞核因子(nuclear factor κB,NF-κB)信号通路的相关性,旨在为SYF临床使用提供药理学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有SQP型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],TGL-20M型高速低温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),PH-030A型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),Infinite M200pro型连续波长酶标仪(瑞士Tecan公司),DMIRB型倒置显微镜(德国Leica公司),Shandon Histocentre 3型组织包埋机(美国Thermo Fisher Scientific公司),PowerPac型通用电泳仪(美国Bio-Rad公司),UVP Chem Studio 815型多功能分子成像仪(德国Analytik Jena公司),LightCycler96型实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,Q-PCR)仪(美国Roche公司)等。

1.2 主要药品与试剂

SFY(批号20200302,生药量193 mg/mL)由本课题组经正交实验法优选渗漉工艺制备[9]。木瓜蛋白酶(批号1014k025)购于北京索莱宝科技有限公司;L-半胱氨酸(批号BCCC0025)购于美国Sigma公司;双氯芬酸二乙胺乳胶剂[国药准字H19990291,批号4B5U,规格20 g∶0.2 g(以$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$计)]购于北京诺华制药有限公司;白细胞介素1β(interleukin-1β,IL-1β)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、前列腺素E_2(prostaglandin E_2,PGE_2)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(批号均为202108)均购于江苏酶免实业有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、DNA上样缓冲液、超敏化学发光试剂盒(批号分别为120320210705、121520210524、111919200716)均购于上海碧云天生物技术有限公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)二抗、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(批号分别为10013030、20000216、20000217)均购于美国Proteintech公司;兔抗TLR4多克隆抗体、兔抗MyD88单克隆抗体、兔抗NF-κB p65单克隆抗体、兔抗磷酸化NF-κB p65[anti-phospho NF-κB p65(S536),p-NF-κB p65]单克隆抗体(批号分别为GR3407535-1、GR3356289-13、GR325776-6、GR3381591-6)均购于英国Abcam公司;RNA提取试剂盒(批号0000484334)购于上海普洛麦格生物产品有限公司;RevertAid第一链cDNA合成试剂盒(批号01127783)购于美国Thermo Fisher Scientific公司;PowerUP SYBR Green Master Mix试剂盒(批号01090300)购于美国Applied Biosystems公司;β-actin、TLR4、MyD88、NF-κB p65基因引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计、合成;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水。

1.3 动物

本实验所用动物为CV级新西兰兔,体质量2.0~2.5 kg,雌雄兼用,购自广西广得生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(桂)2017-0001。动物购入后先在广西中医药大学动物实验中心SPF级动物房适应性饲养3 d,再进行正式实验。本动物实验方案经广西中医药大学伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利

和伦理原则，符合国家实验动物福利伦理的相关规定，审查证书编号为DW20191008-50。

2 方法

2.1 分组与造模

本实验造模方法参考文献[10]，取健康的新西兰兔35只，适应性喂养3 d，随机分成空白组、模型组、阳性组（双氯芬酸二乙胺乳胶剂200 mg/kg）、SYF高剂量组（386 mg/kg）、SYF低剂量组（97 mg/kg），各组7只（均为雄性4只、雌性3只），阳性组给药剂量参考临床使用剂量，SYF高剂量组、SYF低剂量组给药剂量参考预实验结果。实验前先将兔的右后肢膝关节部位毛发剔除。实验第1天，将兔仰卧位固定于兔台上，右后肢膝关节微屈，露出皮肤并进行消毒，用1 mL注射器由髌骨外侧下方斜上刺入关节腔，以进针顺畅、出现落空感、推液无阻力为要点，注射木瓜蛋白酶混合液（含2%木瓜蛋白酶与0.03 mol/L L-半胱氨酸）0.5 mL，空白组兔注射等体积生理盐水，注射完后伸屈膝关节20次，以便木瓜蛋白酶混合液更均匀分布于关节腔内，并于第4、7天重复注射。每天驱赶兔自由活动20 min，第14天后兔右后肢膝关节出现肿胀，并有屈伸功能障碍，即KOA模型建立成功。

2.2 给药与取材

第15天开始，在各组兔的右后肢膝关节处涂抹给药，空白组用棉签擦拭生理盐水，模型组用棉签擦拭空白基质白酒，阳性组按200 mg/kg给药剂量用棉签将双氯芬酸二乙胺乳胶剂涂抹于兔右后肢膝关节处，SYF高、低剂量组分别按2.0 、0.5 mL/kg给药剂量吸取SYF并均匀涂抹于兔右后肢膝关节处，再用棉签涂抹1～2 min，促进药物吸收。每天给药2次，连续给药20 d。实验过程中观察各组兔的精神状态、进食量、摄水量及右后肢膝关节肿胀情况等变化。末次给药后第2天上午向各组兔腹腔注射20%乌拉坦（注射量为4.5 mL/kg）进行麻醉，剪开右后肢膝关节，剪取部分滑膜组织，置于－80 ℃冰箱低温保存，用于炎症因子水平、相关基因及蛋白的测定；另取部分滑膜组织用10%多聚甲醛溶液固定，制作苏木精-伊红（HE）染色切片。

2.3 兔右后肢膝关节肿胀情况及关节腔病理观察

分别在实验第0、8、14、35天，用游标卡尺测量兔左右后肢膝关节直径，计算右后肢膝关节肿胀度：肿胀度（cm）＝右后肢膝关节直径－左后肢膝关节直径。实验结束后，肉眼观察右后肢膝关节腔的关节液、脂肪垫、关节软骨、滑膜等组织的病理损伤情况。

2.4 滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平的检测

采用ELISA法进行检测。称取“2.2”项下滑膜组织0.2 g，用剪刀剪碎，加入生理盐水1.8 mL，用玻璃匀浆器在冰水浴中低温匀浆，将制备好的匀浆液以3 000 r/min离心10 min，收集上清液。严格按照ELISA试剂盒说明书测定IL-1β、TNF-α、PGE_2水平。

2.5 滑膜组织病理学观察

采用HE染色法进行检测。取“2.2”项下10%多聚甲醛溶液固定好的滑膜组织，依次用50%、70%、80%、95%乙醇以及无水乙醇脱水，二甲苯透明后浸蜡数小时，常规石蜡包埋，切片，经HE染色后，用倒置显微镜对滑膜组织病理情况进行观察并拍照。

2.6 滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平的检测

采用Q-PCR法进行检测。随机称取“2.2”项下各组中3只兔的滑膜组织0.02 g，加入RNA裂解液300 μL，在冰浴环境中充分匀浆裂解，所得裂解液按总RNA提取试剂盒说明书中操作方法进一步提取RNA；测定RNA浓度后，反转录为cDNA，质量浓度为10 ng/μL，按PowerUP SYBR Green Master Mix试剂盒说明书中操作方法制备反应体系，每组均设3个复孔，在Q-PCR仪中进行反应。反应条件为：50 ℃尿嘧啶-DNA糖基化酶激活2 min；95 ℃预变性2 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火15 s，72 ℃延伸1 min，40个循环。Q-PCR结果以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目标mRNA的相对表达水平。各基因引物信息见表1。

表1 *TLR4*等基因引物信息

基因名称	正向引物（5'→3'）	反向引物（5'→3'）	产物长度/bp
TLR4	GGGTGAAAGCGTCTATGATG	ATGATGTTGGCAGCGATG	162
MyD88	GAAGAAAGCGAGAAGCC	CGGTCAGACACGCACAG	221
NF-κB p65	CCGCTGCCCTTCACCTA	TTCTTCCGCCGTTTGCT	137
β-actin	GCCCCCCTGAACCCCAA	GCAGCGCGTAGCCCTCG	193

2.7 滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。随机称取“2.2”项下各组中3只兔的滑膜组织0.02 g，加入含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液0.5 mL，用玻璃匀浆器在冰水浴中充分匀浆裂解；裂解液用离心机在4 ℃、12 000 r/min条件下离心10 min，上清液用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度；调整浓度后与蛋白上样缓冲液（5×）混匀，使蛋白终质量浓度为1 mg/mL，加热使蛋白变性。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，每孔蛋白上样体积为20 μL，浓缩胶电压为80 V，分离胶电压为110 V；电泳结束后湿转法转膜，转膜电压为100 V，持续1 h；转膜结束后取出聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜用封闭液（含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液）室温封闭2 h，TBST缓冲液清洗3次，每次5 min。将PVDF膜分别加入GAPDH、TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65一抗（稀释比例分别为1∶20 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶3 000、1∶1 000），4 ℃孵育过夜；取出PVDF膜用TBST缓冲液洗涤3次后，加入相应二抗（稀释比例为1∶6 000），室温孵育1 h后，取出PVDF膜用TBST缓冲液洗涤3次。加入超敏化学发光试剂，用多功能分子成像仪扫描成像，利用Image J v1.8.0软件对图片条带进行灰度分析，以目的蛋白与内参蛋白GAPDH灰度值之比作为蛋白的相对表达水平。实验重复3次。

2.8 统计学分析

实验结果以SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较用LSD-t检验（方差齐）或Dunnett's t检验（方差不齐）。检验水准$\alpha=0.05$。

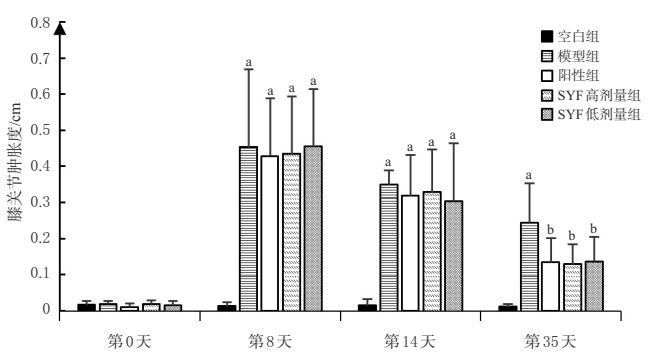
3 结果

3.1 一般行为学观察结果

空白组兔在饲养过程中，精神状态良好，进食及饮水量正常，行动自如，无异常状态；模型组兔在造模后，精神渐显萎靡，进食及饮水量均减少，不喜活动，活动量明显减少；阳性组和SYF高、低剂量组兔较模型组兔的精神状态、进食及饮水量均有改善。

3.2 兔右后肢膝关节肿胀情况及关节腔病理观察结果

除空白组外，其余各组兔在造模1周后，关节肿胀明显，伴有屈伸功能障碍，在行走过程中有意识避免患肢用力支撑，可见跛行。第8天和第14天，与空白组比较，模型组、阳性组和SYF高、低剂量组兔右后肢膝关节肿胀度均显著升高（$P<0.05$）。第35天，与模型组比较，阳性组和SYF高、低剂量组兔右后肢膝关节肿胀度均显著降低（$P<0.05$），屈伸及行走等活动状态得到改善。兔右后肢膝关节肿胀度测定结果见图1。



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图1 各组兔右后肢膝关节肿胀度的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

由右后肢膝关节腔解剖图（图2）可见，空白组兔右后肢膝关节液透明，滑膜正常，无水肿及糜烂，关节软骨光滑无损伤，脂肪垫完整无损伤。模型组兔关节液增多且黄浊，部分脂肪垫糜烂伴黄色脓状，滑膜前段水肿充血带有炎性损伤，软骨表面光泽暗淡，有溃疡面裂隙，出现磨损与降解。阳性组和SYF高、低剂量组兔右后肢膝关节的相应部位较模型组均有不同程度改善。

3.3 滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平的检测结果

与空白组比较，模型组兔滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性组和SYF高、低剂量组兔滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

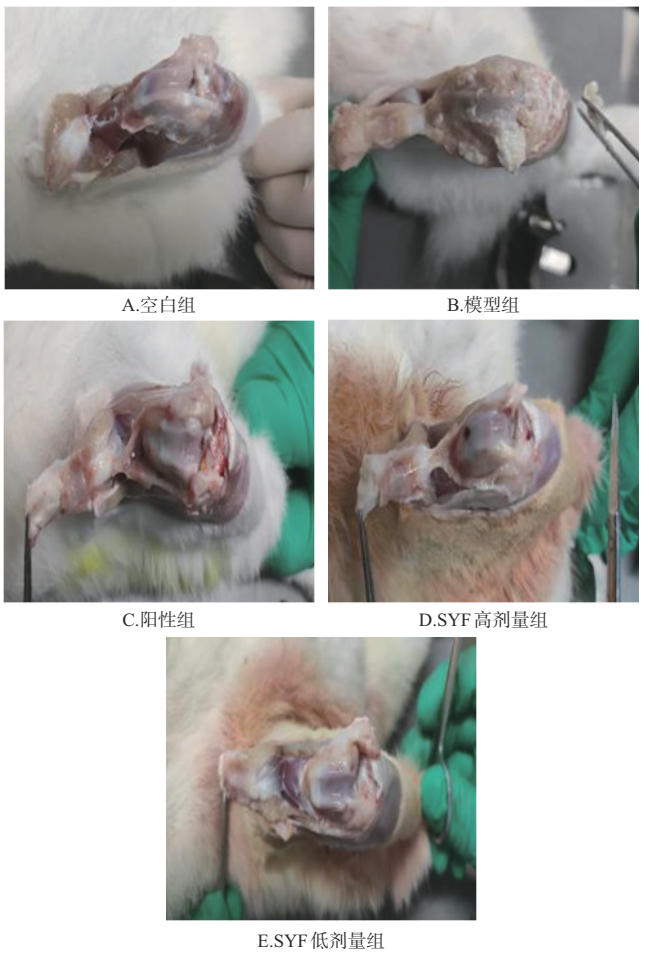


图2 各组兔右后肢膝关节腔解剖图

表2 各组兔滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

组别	IL-1β/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	PGE_2/(pg/mL)
空白组	16.60±3.67	62.13±9.53	149.49±20.87
模型组	24.33±3.13[a]	82.46±10.35[a]	193.04±25.83[a]
阳性组	18.15±2.85[b]	68.12±9.10[b]	156.39±30.03[b]
SYF高剂量组	19.14±2.11[b]	70.32±9.26[b]	157.85±29.25[b]
SYF低剂量组	19.33±2.74[b]	71.02±9.09[b]	164.74±21.74[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.4 滑膜组织病理学观察结果

HE染色结果显示，空白组兔滑膜细胞呈单层鳞状分布，排列有序，无组织增生及炎症细胞浸润；与空白组比较，模型组兔滑膜细胞排列紊乱，组织明显增厚，全层均有大量炎症细胞分布，且有血肿与血管生成；与模型组比较，阳性组和SYF高、低剂量组兔滑膜细胞排列较为疏松，组织增生程度减轻，炎症细胞减少。结果见图3。

3.5 滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平的检测结果

与空白组比较，模型组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性组和SYF高、低剂量组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4。

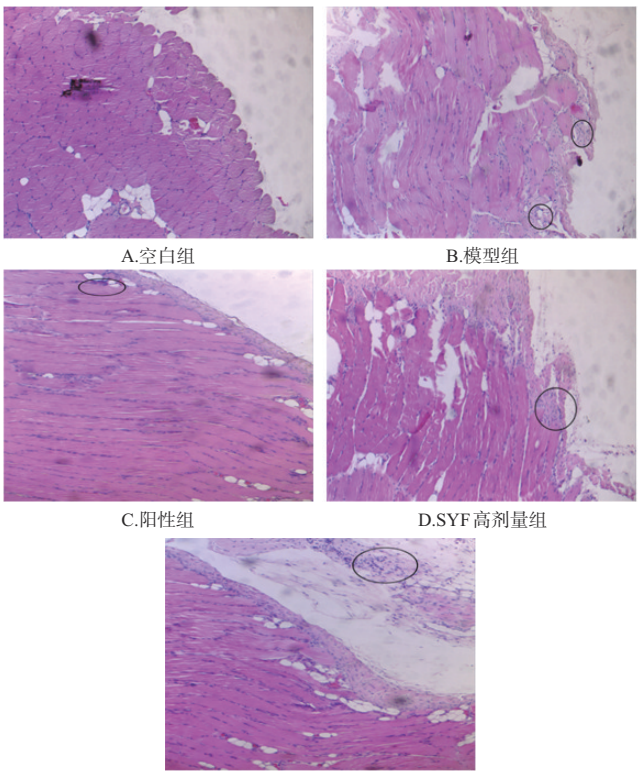
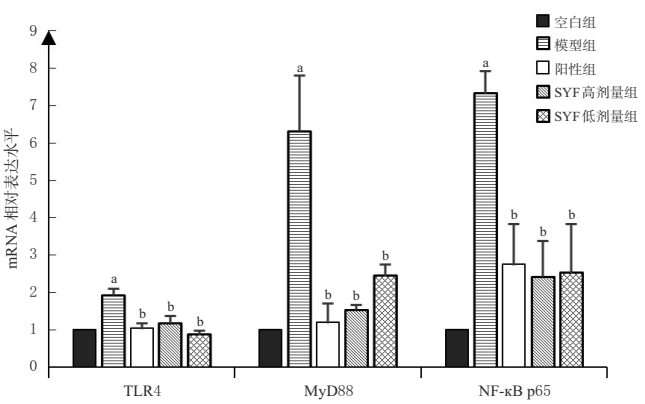


图3　各组兔滑膜组织HE染色图（×200）



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图4　各组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.6　滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平的检测结果

与空白组比较，模型组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性组和SYF高剂量组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平及SYF低剂量组兔滑膜组织中TLR4、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图5、图6。

4　讨论

KOA动物模型的常用造模方法有手术法[11]、关节制动法[12-13]、关节腔药物注射法[14-15]等。本实验通过多次向兔右后肢膝关节腔注射0.5 mL木瓜蛋白酶混合液（含

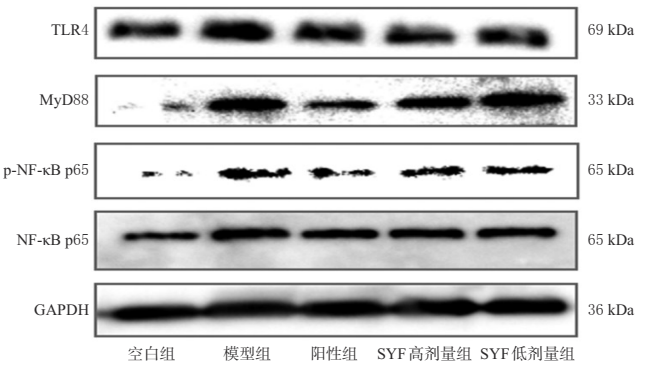
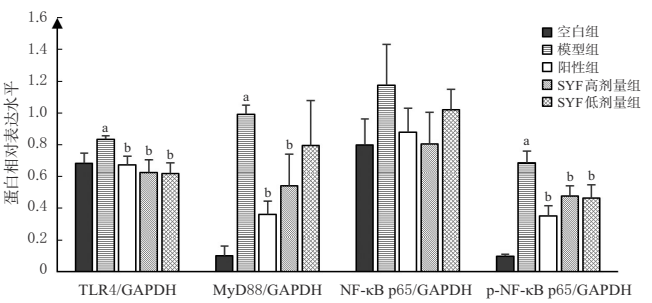


图5　各组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白表达电泳图



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图6　各组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2%木瓜蛋白酶与0.03 mol/L L-半胱氨酸）复制KOA模型。木瓜蛋白酶是一类蛋白水解酶，可分解软骨基质中的蛋白多糖，导致关节软骨缺乏弹性和抗压性；关节软骨在缺乏基质的保护后，易退变降解，降解后产生的软骨碎屑刺激滑膜而发生炎症反应[16]。此方法造模时间较快，剂量容易控制，不易损伤关节腔内稳定结构，操作简便且不易感染，能够较好模拟膝关节部位局部炎症、滑膜组织破坏等一系列的病理变化。本实验结果表明，兔右后肢膝关节注射木瓜蛋白酶混合液后，模型组兔右后肢膝关节均出现红肿，伴有关节活动功能障碍，右后肢膝关节脂肪垫糜烂，关节液黄浊，滑膜前段水肿充血带有炎性损伤；病理切片结果显示，滑膜细胞排列紊乱，组织明显增厚，全层均有大量炎症细胞分布，而阳性组和SYF高、低剂量组中相应症状均有显著缓解。

KOA是关节软骨组织发生退行性病变，继而导致软骨下骨硬化，关节周缘骨质增生、骨赘形成[17]。膝关节滑膜炎症与KOA的发生发展密不可分——KOA发展过程中，关节软骨降解物质可随关节液进入滑膜部位，刺激滑膜产生免疫应答反应，滑膜组织中巨噬样滑膜细胞会分泌TNF-α、IL-1β等多种炎症因子，其中IL-1β可介导前列腺素生成，诱导基质金属蛋白酶合成，促进软骨凋亡[18]；TNF-α同样可促进前列腺素生成，并可通过抑制糖蛋白聚糖合成、产生胶原酶以及刺激成骨细胞、破骨细胞作用等方式破坏软骨组织生成[19]。因此，滑膜炎症

反应的程度可以作为膝关节结构功能改变和病变预后的一项关键指标[20]。本实验结果发现，与空白组比较，模型组兔滑膜组织中IL-1β、TNF-α、PGE_2水平均显著升高；与模型组比较，SYF高、低剂量组兔上述炎症因子水平均显著降低。

TLR4/MyD88/NF-κB信号通路是研究KOA机制的通路之一[21]。TLR是一类天然免疫受体，类似的同源性受体在哺乳动物体内也被发现，所以人们把它们统一归类为TLR家族。在单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞等表面，TLR4受体被广泛发现，它可以对相关的病原进行识别、结合、转导，从而释放炎症介质，在天然免疫防御中起到重要作用[22]。MyD88作为TLR4的下行信号因子，不仅可以调控下行的炎症因子（如IL-6），还可以产生α型干扰素和β型干扰素[23—25]，当炎症因子进入细胞内，TLR4介导MyD88下行表达，进而磷酸化NF-κB因子，进一步激活炎症因子的释放，参与炎症反应。本实验发现，与模型组比较，SYF高、低剂量组兔滑膜组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA相对表达水平均显著降低，TLR4、MyD88（SYF低剂量组除外）、p-NF-κB p65蛋白相对表达水平均显著降低。

综上所述，SYF对木瓜蛋白酶诱导的兔KOA有保护作用，其作用机制与降低炎症因子IL-1β、TNF-α、PGE_2水平及下调TLR4/MyD88/NF-κB信号通路有关。

参考文献

[1] 邱贵兴. 骨关节炎诊治指南：2007年版[J]. 中华骨科杂志，2007，27(10)：793-796.

[2] 杨辉. 两种不同手术方式治疗对老年膝关节骨性关节炎患者功能恢复及血清IL-1 IL-17 ESR水平的影响[J]. 河北医学，2021，27(12)：2061-2065.

[3] 刘朝晖，马剑雄，张顺，等. 膝骨关节炎的现状及治疗方法的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志，2020，13(8)：688-693.

[4] 郭跃，杨青梅，鲁超，等. 膝骨性关节炎的中医证候特点研究[J]. 中医临床研究，2015，7(4)：1-4.

[5] 梅其杰，徐文飞，段戡，等. 十一方药酒涂擦结合艾瑞昔布片治疗膝骨关节炎的临床疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志，2021，29(10)：43-46.

[6] 梁春恒，谢杏花，洪光，等. 十一方酒+地塞米松+利多卡因离子导入治疗腰椎间盘突出症患者的效果观察[J]. 中外医学研究，2021，19(5)：16-18.

[7] 胡清军，付杰，刘武，等. 关节镜下微骨折技术结合术后十一方药酒外涂治疗膝关节软骨损伤的疗效观察[J]. 广西中医药大学学报，2012，15(4)：19-20.

[8] 潘勇才，彭镇耀. 跌打止痛散与十一方酒外敷治疗软组织损伤临床研究[J]. 中国医药导刊，2009，11(7)：1225-1226.

[9] 田慧，韦林利，曾昭清，等. 多指标综合加权评分法优选十一方药酒渗漉提取工艺研究[J]. 中药材，2021，44(5)：1199-1201.

[10] 孙鲁宁，黄桂成，赵燕华，等. 木瓜蛋白酶诱导兔膝关节骨关节炎模型滑膜中白细胞介素1、白细胞介素6、白三烯浓度变化与药物注射时间的关系[J]. 中国组织工程研究，2012，16(33)：6184-6188.

[11] 沈鹏，王腾腾，张浩，等. 芪防膝痹颗粒对大鼠膝骨关节炎疼痛的影响[J]. 中华中医药杂志，2019，34(9)：3990-3994.

[12] 陈人智，王明磊，朱凯，等. 管型石膏伸直位固定法对兔KOA模型膝关节X线及MRI检查改变的研究[J]. 宁夏医科大学学报，2019，41(5)：446-449.

[13] 张劲，赵亮，胡春生. 新型外固定支具建立兔膝骨性关节炎模型的研究[J]. 湖北中医药大学学报，2015，17(4)：8-9.

[14] 汪宗保，徐亚林，廖威明，等. 木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的电镜扫描[J]. 中国组织工程研究，2014，18(2)：177-182.

[15] 何俊君，黄泽灵，张应生，等. 早期骨关节炎动物模型的建立与评价[J]. 中国骨与关节损伤杂志，2019，34(4)：358-360.

[16] 张文贤，张晓刚. 骨性关节炎的实验研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志，2003，11(6)：51-54.

[17] 胥少汀，葛宝丰，徐印坎. 实用骨科学[M]. 3版. 北京：人民军医出版社，2006：1338-1339.

[18] 黄媛霞，徐海斌，郭春. IL-1β和MMP-13在兔骨关节炎模型软骨和滑液中的表达[J]. 西安交通大学学报（医学版），2017，38(4)：507-511，528.

[19] 陈兴华，黄珍谷，王棚，等. 葛根素通过调控炎性因子抑制兔膝关节骨性关节炎的研究[J]. 安徽医药，2017，21(2)：230-234.

[20] BAKER K，GRAINGER A，NIU J，et al. Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs[J]. Ann Rheum Dis，2010，69(10)：1779-1783.

[21] 刘姣，曲崇正，谢平金，等. 膝骨性关节炎模型大鼠接受推拿治疗后软骨Toll样受体4/髓样分化因子88信号转导通路的变化[J]. 中国组织工程研究，2019，23(19)：3019-3024.

[22] 庄宁彤，赵冬久，史丽云. Toll样受体4（TLR4）的内吞通路及其调控机制研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2016，32(11)：1574-1578.

[23] YU J E，KNIGHT A K，RADIGAN L，et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency[J]. J Allergy Clin Immunol，2009，124(2)：349-356.e3.

[24] DI DOMIZIO J，BLUM A，GALLAGHER-GAMBARELLI M，et al. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type Ⅰ IFN[J]. Blood，2009，114(9)：1794-1802.

[25] KONNO H，YAMAMOTO T，YAMAZAKI K，et al. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. PLoS One，2009，4(5)：e5674.

（收稿日期：2022-01-09　修回日期：2022-06-06）

（编辑：曾海蓉）