

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.08.014

加味独活寄生合剂对膝骨关节炎模型兔膝关节软骨组织细胞自噬及凋亡相关蛋白的影响

曾凡^{1,2}, 陈柏屹², 王康³, 段航^{1,2}, 邝高艳², 卢敏^{1,2}✉



1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院; 3. 湖南省怀化市中医院

[摘要] **目的** 探讨加味独活寄生合剂治疗膝骨关节炎的可能作用机制。**方法** 46 只雄性新西兰大白兔随机分为空白组 (8 只)、常规模型组 (19 只) 和 3MA 自噬抑制剂造模组 (19 只)。常规模型组使用高分子树脂石膏绷带固定兔右侧后肢建立膝骨关节炎模型, 3MA 自噬抑制剂造模组在上述造模基础上加用自噬抑制剂 3MA 关节腔注射造模, 造模周期为 6 周, 两个造模组均造模成功各 16 只。将常规造模组分为模型组和加味独活寄生合剂组, 3MA 自噬抑制剂组分为 3MA 组和 3MA+加味独活寄生合剂组, 每组 8 只。加味独活寄生合剂组和 3MA+加味独活寄生合剂组均给予加味独活寄生合剂单次生药量为 2.26 g/kg 灌胃, 其余各组予以 3.4 ml/kg 蒸馏水灌胃, 每日 2 次, 持续 4 周。给药结束后观察各组兔膝关节软骨大体情况, 苏木素-伊红 (HE) 染色检测软骨组织病理学变化, 并分别通过 Pelletier 评分、Mankin 评分进行量化评估; 检测各组兔膝关节软骨组织中自噬相关蛋白 [自噬相关基因 7 (ATG7)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1 (Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)] 及凋亡相关蛋白 [B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase3)] mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较, 模型组兔膝关节软骨病理损伤明显, Pelletier 评分及 Mankin 评分升高, 软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达均升高, Beclin-1、LC3、ATG7、Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 加味独活寄生合剂组关节软骨损伤改善, Pelletier 评分及 Mankin 评分降低, 软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达升高, Caspase-3 mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与加味独活寄生合剂组比较, 3MA+加味独活寄生合剂组 Pelletier 评分、Mankin 评分升高, 软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达降低, Caspase-3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 加味独活寄生合剂对膝骨关节炎兔的关节软骨具有保护作用, 其机制可能是通过诱导软骨组织自噬、抑制细胞凋亡实现的。

[关键词] 膝骨关节炎; 加味独活寄生合剂; 自噬; 细胞凋亡

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种世界范围内普遍存在的关节疾病, 以逐渐发展的膝关节疼痛、畸形、运动功能减退为主要特征, 其病理表现多为关节软骨渐进性退变、软骨代谢的破坏及滑膜的炎性变化^[1]。流行病学调查显示, 我国 45 岁以上成年人中, 症状性 KOA 发病率高达 8.5%, 给患者家庭以及全球卫生系统造成庞大的经济负担^[2]。相关研究结果已从多个层次证实骨关

节炎的发生发展与关节软骨细胞凋亡、自噬密切相关^[3-4]。软骨细胞的凋亡是造成软骨退变的主要机制, 细胞自噬是真核细胞重要的分解代谢系统之一, 能够维持细胞内环境稳态, 提高细胞生存能力, 自噬的激活能够调控软骨细胞凋亡并保护关节软骨^[5-6]。KOA 在中医学中属“痹证”范畴, 《备急千金要方》中记载的经典复方独活寄生汤具有补肝肾强筋骨、养血活血之功效, 被广泛运用于临床治疗骨关节疾病, 常获良效^[7]。加味独活寄生合剂为独活寄生汤加味后的改革制剂, 本课题组前期研究证实其疗效显著, 可促进软骨细胞增殖分化, 减

基金项目: 国家自然科学基金 (81874476)

✉ 通讯作者: lumin6563@163.com

少膝关节液中炎症因子水平,减轻关节疼痛,改善关节功能^[8-10]。本研究通过建立兔 KOA 模型,以加味独活寄生合剂及自噬抑制剂 3MA 为干预措施,探究加味独活寄生合剂对 KOA 兔模型关节软骨的影响及可能作用机制,以期对加味独活寄生合剂的临床合理应用提供理论支持。本研究经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理编号:LLBH-202006190001)。

1 材料与方法

1.1 动物

46 只普通级雄性新西兰大白兔,3 月龄,体重 2.0~2.5 kg,购于湖南中医药大学动物实验中心,实验动物许可证号:SCXK(湘)2020-0005。所有兔单笼饲养,室温(22±0.5)℃,光照时间每天 12 h,适应性喂养 7 天后开始实验。

1.2 药物

加味独活寄生合剂购于湖南中医药大学第一附属医院药剂科,湘药制备字:Z20190064,批号:20191111。方药组成:独活 6 g,桑寄生 18 g,杜仲 12 g,牛膝 6 g,细辛 3 g,秦艽 6 g,川芎 6 g,茯苓 12 g,党参 12 g,肉桂 3 g,防风 6 g,白芍 10 g,甘草 3 g,当归 12 g,熟地黄 15 g,制天南星 6 g,木瓜 12 g,黄芩 6 g,威灵仙 12 g。每瓶 250 ml,含生药 0.664 g/ml。自噬抑制剂 3MA(美国 Sigma 公司,批号:M9281-100MG)。

1.3 主要试剂及仪器

自噬相关基因 7(ATG7,批号:10088-2-AP)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1(Beclin-1,批号:11306-1-AP)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2,批号:12789-1-AP)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号:66009-1-Ig)、HRP-羊抗鼠 IgG(批号:SA00001-1)、HRP-羊抗兔 IgG(批号:SA00001-2),美国 Proteintech 公司;微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3,批号:ab192890),英国 Abcam 公司;半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3,批号:#9664),美国 CST 公司;4%多聚甲醛(批号:70081800),广州赛国生物科技有限公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒(批号:C0105S)、RIPA 裂解液(批号:P0013B),碧云天生物技术有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA,批号:MB2514),中国大连美伦科技有限公司;Trizol 试剂(批号:15596026),美国 Thermo 公司;UltraSYBR Mixture(批号:CW2601)、mRNA 逆转录试剂盒(批号:CW2569),中国北京康为世纪科

技有限公司;SuperECL Plus 超敏发光液(批号:K-12045-D50),美国 Advanta 公司;高分子树脂石膏绷带(批号:200801),泰州医疗科技有限公司。

台式冷冻离心机(中国湖南湘仪仪器有限公司,型号:H1650R);生物样品均质仪(中国杭州奥盛仪器有限公司,型号:BioPrep-24);荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKOREAL96);电泳仪(中国北京六一仪器厂,型号:DYY-2C);切片机(浙江金华益迪科技有限公司,型号:YD-315);显微镜(Motic 公司,型号:BA210T)。

1.4 动物分组、造模及干预方法

将 46 只兔按随机数字表法分为空白组(8 只)、常规模型组(19 只)和 3MA 自噬抑制剂造模组(19 只)。常规模型组参考经典 Videman 造模法^[11]造模:使用高分子树脂石膏绷带固定兔右侧后肢于伸直位,长度约为腹股沟至踝关节上 1 cm,持续固定 6 周。3M 自噬抑制剂造模组在常规造模的基础上参考 Cheng 等方法^[12]于造模的第 1、4 天以 5 mmol/L 3MA 自噬抑制剂 0.5 ml 关节腔注射,整个造模周期为 6 周。造模结束后,各造模组采用随机数字表法挑选 3 只兔通过拍摄膝关节 X 片影像学及解剖观察膝关节软骨损伤程度,根据影像学示关节间隙变窄,髌间嵴增生,股骨弯曲;肉眼解剖见软骨面部分区域明显变薄,粗糙无光泽,提示造模成功^[13]。

两组各造模成功 16 只兔,采用随机数字表法将常规模型组分为模型组和加味独活寄生合剂组,3MA 自噬抑制剂造模组分为 3MA 组和 3MA+加味独活寄生合剂组,每组 8 只。加味独活寄生合剂组和 3MA+加味独活寄生合剂组兔均给予加味独活寄生合剂灌胃,剂量参考《药理实验方法学》^[14]中体表面积剂量换算法,兔单次生药量为 2.26 g/kg,相当于体重 70 kg 成人单次用量,其余各组给予 3.4 ml/kg 蒸馏水灌胃,每日 2 次,持续 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 关节软骨大体情况观察及 Pelletier 评分 灌胃 4 周后,将兔处死,无菌操作下依次切开膝关节各层组织,显露关节腔,肉眼观察关节软骨大体情况。根据 Pelletier 评分标准^[15]评估各组兔关节软骨退变情况。0 分:关节面光滑,色泽如常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰;2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表层或中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:软骨下骨暴露。随后各组使用随机数字表法选 4 只兔关

节软骨用于 HE 染色，余下 4 只用于后续 qRT-PCR 及 Western blot 检测。

1.5.2 HE 染色检测关节软骨组织病理 将软骨浸泡 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后，10% EDTA 溶液对样本进行 6 周脱钙，梯度浓度乙醇脱水，二甲苯透明，浸蜡包埋切片；烤片后脱蜡至水，苏木素及伊红依次染色，梯度浓度酒精脱水，采用二甲苯透明后中性树胶封片，显微镜下观察并采集图形，采用 Mankin 评分细则^[16] 评估关节软骨病理形态变化。1) 软骨结构：光整如常计 0 分，表明出现不规则裂隙计 1 分，裂隙深达移行层计 2 分，裂隙深达辐射层计 3 分，裂隙深达钙化层计 4 分，软组织层脱落计 5 分；2) 软骨细胞：数量如常计 0 分，数量弥散性增多计 1 分，出现大量簇集样细胞团计 2 分，数量明显减少计 3 分，染色完全消失计 4 分；3) 基质染色：染色正常计 0 分，染色轻度减退计 1 分，染色中度减退计 2 分，染色重度减退计 3 分；4) 潮线的完整性：潮线完整计 0 分，多重潮线计 1 分，软骨下血管侵入潮线计 2 分。计算总评分，评分越高，病理损伤越严重。

1.5.3 qRT-PCR 检测 LC3、Beclin-1、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达 取 0.025 g 软骨组织，通过 Trizol 法分离软骨组织总 RNA，逆转录为 cDNA 后加入扩增反应体系，使用 SYBR 法进行 qRT-PCR 反应，基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。引物由上海生工生物工程有限公司合成，以 β -actin 为内参，相关引物序列信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
LC3	上游 ACGTCCACCCAATCAGTCC	195
	下游 TTA CTGGCGACTCAGAATGCAA	
Beclin-1	上游 TGCCCTATGGAATCACTCGT	172
	下游 GTCTCGCCCTTTTCAACCTC	
ATG7	上游 CTGTGCGTTTCATGGCTCCT	143
	下游 GCCCTGGAAGCTTAACACA	
Bcl-2	上游 GACGACTTCTCCCGCGCTA	171
	下游 ACACATGACCCACCGAAC	
Caspase-3	上游 ACGTGAAGAAATCATGGAATCA	95
	下游 CATCACCGTGGCTTAGAATCACA	
β -actin	上游 TGGCCGAGGACTTTGATTGT	170
	下游 TTACACAAATGCGATGCTGCC	

注：LC3，微管相关蛋白 1 轻链 3；Beclin-1，自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1；ATG7，自噬相关基因 7；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2；Caspase-3，半胱氨酸蛋白酶 3； β -actin， β -肌动蛋白。

1.5.4 Western blot 法检测 LC3、Beclin-1、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达 剪取 0.025 g 软骨组织，300 μ l RIPA 裂解液于生物样品均质仪中反复研磨至匀浆状态，冰上裂解 10 min 后，4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心（离心半径 8 cm）15 min，取上清，测定蛋白总含量。SDS-PAGE 凝胶电泳分离后，转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭，加入一抗 LC3（1：2000），Beclin-1、Bcl-2、Caspase3（1：1000），ATG7（1：500），孵育，4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 洗一抗反应膜 3 次后，将膜放入二抗（1：6000）中，室温孵育 90 min，再次洗膜 3 次，随后 ECL 化学发光液显色曝光，最后使用 Image J v1.8.0 软件行条带分析。

1.6 统计学方法

研究数据分析均由 R4.1.1 软件完成。计量数据符合正态分布且方差齐时，采用单因素方差分析，Turkey 检验继以进行多重比较，方差不齐则采用 Games-Howell 检验，结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示；不符合正态分布则采用 Mann-Whitney *U* 检验，结果以中位数(四分位数间距)表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔膝关节软骨大体情况观察及 Pelletier 评分比较

兔关节软骨大体情况观察示，空白组关节软骨面平整，颜色润泽明亮；与空白组比较，模型组和 3MA 组，软骨表面粗糙无光泽，股骨内侧软骨表面明显变薄，部分区域软骨下骨显露；与模型组比较，加味独活寄生合剂组及 3MA+加味独活寄生合剂组软骨表面粗糙程度减轻，未见明显软骨缺损。表 2 示，与空白组比较，模型组和 3MA 组 Pelletier 评分升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，加味独活寄生合剂组 Pelletier 评分降低 ($P<0.05$)；与加味独活寄生合剂组比较，3MA+加味独活寄生合剂组 Pelletier 评分升高 ($P<0.05$)。

表 2 各组兔膝关节软骨 Pelletier 评分比较 [分, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	兔数	Pelletier 评分
空白组	8	0.00 (0.00, 0.00)
模型组	8	3.00 (2.75, 3.00) ^{a)}
加味独活寄生合剂组	8	1.00 (1.00, 2.00) ^{b)}
3MA 组	8	3.00 (3.00, 3.25) ^{a)}
3MA+加味独活寄生合剂组	8	2.00 (2.00, 3.00) ^{c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与加味独活寄生合剂组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组兔膝关节软骨组织病理形态及 Mankin 评分比较

图 1 示 (彩色病理图片请扫描本文二维码获取), 空白组关节软骨全层形态结构正常, 软骨细胞数量如常, 基质染色均匀, 潮线完整; 模型组则软骨表面不平整, 组织结构分层紊乱, 可见多重潮线; 3MA 组移行区和辐射区软骨囊内空腔增多, 软骨细胞减少, 可见软骨下血管侵入潮线; 加味独活寄生合剂组软骨表面较光滑, 未见明显裂隙, 组织结构分层较为清晰, 基质染色相对均匀; 3MA+加味独活寄生合剂组软骨表面存在少量裂隙, 组织分层紊乱, 部分区域可见成簇软骨细胞。表 3 示, 与空白组比较, 模型组和 3MA 组 Mankin 评分升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 加味独活寄生合剂组和 3MA+加味独活寄生合剂组 Mankin 评分降低 ($P<0.05$); 与加味独活寄生合剂组比较, 3MA+加味独活寄生合剂组 Mankin 评分升高 ($P<0.05$)。

2.3 各组兔膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 加味独活寄生合剂组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、

表 3 各组兔膝关节软骨组织 Mankin 评分比较 [分, $M(P_{25}, P_{75})$]

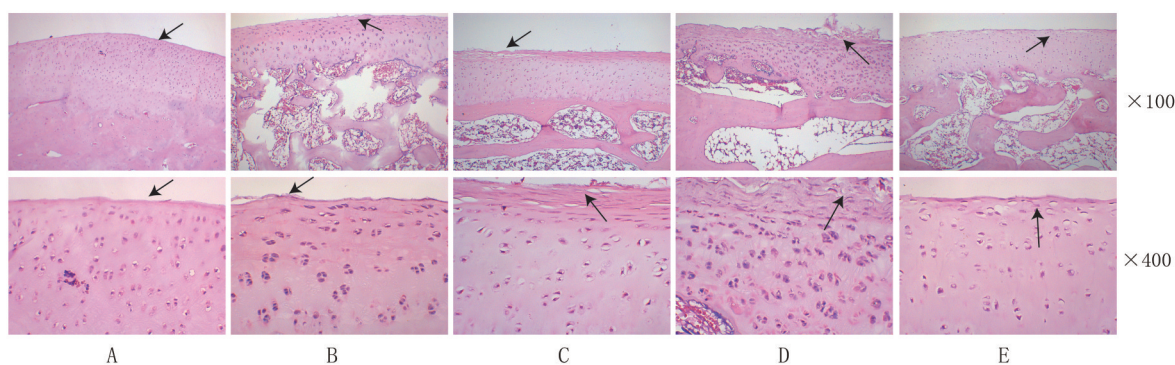
组别	兔数	Mankin 评分
空白组	4	1.00 (0.00, 1.00)
模型组	4	9.00 (8.75, 10.00) ^{a)}
加味独活寄生合剂组	4	5.00 (4.00, 5.25) ^{b)}
3MA 组	4	10.50 (9.75, 12.00) ^{a)}
3MA+加味独活寄生合剂组	4	6.50 (5.75, 7.25) ^{b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与加味独活寄生合剂组比较, $P<0.05$ 。

Bcl-2 mRNA 表达均升高, Caspase-3 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 3MA 组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 mRNA 表达均降低, Caspase-3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与加味独活寄生合剂组比较, 3MA+加味独活寄生合剂组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 mRNA 表达均降低, Caspase-3 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。

2.4 各组兔膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达比较

LC3 可分为 I 型和 II 型两种, 本研究以 LC3 II/LC3 I 表示蛋白表达水平。表 5 示, 与空白组比较, 模型组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Caspase-3 蛋白表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较, 加味独活寄生合剂组兔软骨组织中



注: 箭头所指为关节软骨面; A, 空白组; B, 模型组; C, 加味独活寄生合剂组; D, 3MA 组; E, 3MA+加味独活寄生合剂组。

图 1 各组兔膝关节软骨组织 HE 染色结果 ($\times 100$, $\times 400$)

表 4 各组兔膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达比较 [$[\beta\text{-actin}, \bar{x}\pm s/M(P_{25}, P_{75})]$]

组别	兔数	Beclin-1	LC3	ATG7	Bcl-2	Caspase-3
空白组	4	0.92 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.23	0.86 (0.66, 1.00)	0.82 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.14
模型组	4	2.44 $\pm$ 0.62 ^{a)}	2.10 $\pm$ 0.41 ^{a)}	1.66 (1.38, 2.06) ^{a)}	1.22 $\pm$ 0.22 ^{a)}	4.51 $\pm$ 0.72 ^{a)}
加味独活寄生合剂组	4	4.79 $\pm$ 0.82 ^{b)}	3.80 $\pm$ 0.74 ^{b)}	2.35 (2.01, 2.66) ^{b)}	1.89 $\pm$ 0.23 ^{b)}	1.90 $\pm$ 0.23 ^{b)}
3MA 组	4	1.36 $\pm$ 0.22 ^{b)}	0.98 $\pm$ 0.18 ^{b)}	0.49 (0.41, 0.61) ^{b)}	0.52 $\pm$ 0.15 ^{b)}	5.55 $\pm$ 0.71 ^{c)}
3MA+加味独活寄生合剂组	4	2.33 $\pm$ 0.40 ^{d)}	1.97 $\pm$ 0.49 ^{d)}	1.27 (1.24, 1.50) ^{d)}	1.29 $\pm$ 0.22 ^{d)}	3.21 $\pm$ 0.31 ^{d)}

注: LC3, 微管相关蛋白 1 轻链 3; Beclin-1, 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1; ATG7, 自噬相关基因 7; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Caspase-3, 半胱氨酸蛋白酶 3; $\beta\text{-actin}$, β -肌动蛋白。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与加味独活寄生合剂组比较, $P<0.01$ 。

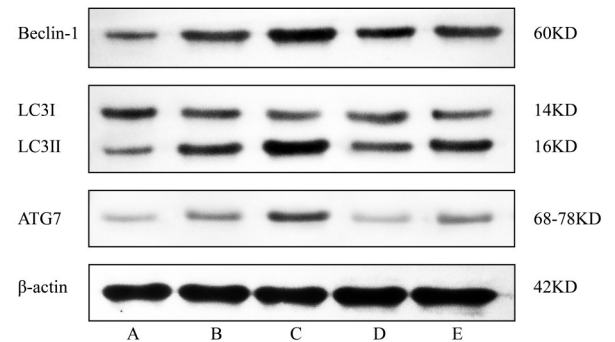
表 5 各组兔膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达比较 (x̄±s)

组别	兔数	Beclin-1/β-actin	LC3 II /LC3 I	ATG7/β-actin	Bcl-2/β-actin	Caspase-3/β-actin
空白组	4	0.19±0.07	0.73±0.28	0.16±0.03	0.43±0.14	0.40±0.06
模型组	4	0.47±0.06 ^{a)}	1.53±0.04 ^{a)}	0.22±0.01 ^{b)}	0.64±0.07	0.95±0.15 ^{a)}
加味独活寄生合剂组	4	0.65±0.05 ^{c)}	2.30±0.06 ^{d)}	0.31±0.03 ^{d)}	0.90±0.03 ^{c)}	0.54±0.15 ^{d)}
3MA 组	4	0.28±0.06 ^{c)}	1.07±0.09 ^{c)}	0.15±0.03 ^{c)}	0.38±0.12 ^{c)}	0.99±0.14
3MA+加味独活寄生合剂组	4	0.45±0.08 ^{e)}	1.66±0.19 ^{f)}	0.21±0.02 ^{f)}	0.58±0.09 ^{f)}	0.72±0.12

注：LC3 I，I 型微管相关蛋白 1 轻链 3；LC3 II，II 型微管相关蛋白 1 轻链 3；Beclin-1，自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1；ATG7，自噬相关基因 7；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2；Caspase3，半胱氨酸蛋白酶 3；β-actin，β-肌动蛋白。

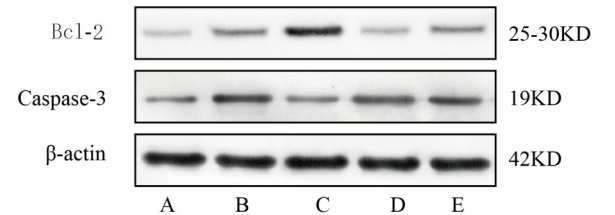
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ ；e) 与加味独活寄生合剂组比较， $P<0.05$ ；f) 与加味独活寄生合剂组比较， $P<0.01$ 。

Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 蛋白表达均升高，Caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；3MA 组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与加味独活寄生合剂组比较，3MA+加味独活寄生合剂组兔软骨组织中 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组兔关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7、Bcl-2、Caspase-3 蛋白电泳图见图 2-3。



注：A，空白组；B，模型组；C，加味独活寄生合剂组；D，3MA 组；E，3MA+加味独活寄生合剂组；LC3 I，I 型微管相关蛋白 1 轻链 3；LC3 II，II 型微管相关蛋白 1 轻链 3；Beclin-1，自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1；ATG7，自噬相关基因 7；β-actin，β-肌动蛋白。

图 2 各组兔膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、ATG7 蛋白电泳图



注：A，空白组；B，模型组；C，加味独活寄生合剂组；D，3MA 组；E，3MA+加味独活寄生合剂组；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2；Caspase-3，半胱氨酸蛋白酶 3；β-actin，β-肌动蛋白。

图 3 各组兔膝关节软骨组织 Bcl-2、Caspase-3 蛋白电泳图

3 讨论

本课题组基于湖南中医药大学附属第一医院名

老专家卢敏教授临床治疗经验，提出 KOA 存在“虚、瘀、毒”的病机特点^[17]。脾主四肢，肝主筋藏血，肾主骨生髓，一旦肝、脾、肾虚损，可致肌肉筋骨失充，髓枯骨萎，渐而发为痹病。本虚为先，经脉闭阻、瘀血内生，复感风、寒、湿外邪，邪胜谓之毒，进而“瘀、毒”复致脏腑虚损，从而导致“虚、瘀、毒三邪互结”之痹证^[18]。加味独活寄生合剂以经典复方独活寄生汤为基础，进行药物加减、改革制剂而成。原方中以独活为君药祛风除湿、散寒祛痹止痛；防风、秦艽祛风除湿，细辛、肉桂辛温散寒，为臣药；佐使以杜仲、桑寄生、牛膝补肝肾，强筋骨，生地黄、川芎、白芍、当归养血活血，茯苓、甘草、人参补气健脾。针对 KOA “虚、瘀、毒”的病机，加味独活寄生合剂在独活寄生汤的基础上，以党参易人参，增其清补健脾之力，以熟地黄易干地黄，增其补髓之功，加入黄芩、木瓜、威灵仙、制天南星四味中药，增其祛风除湿、解毒除痹之效。前期研究^[19]发现，加味独活寄生合剂可减少关节液中炎症因子水平，抑制炎症反应，改善患者关节功能和临床症状。本研究结果显示，KOA 模型兔膝关节屈伸受限，关节软骨表面粗糙无光泽，股骨内侧软骨表面明显变薄，HE 染色示组织结构分层紊乱，可见多重潮线，Pelletier 评分及 Mankin 评分均较空白组升高，证实本次研究的 KOA 兔模型建立成功。予以加味独活寄生合剂干预后，加味独活寄生合剂组的软骨损伤程度较模型组明显改善，Pelletier 评分降低，HE 染色示组织结构分层较为清晰，基质染色相对均匀，Mankin 评分降低，提示加味独活寄生合剂可以有效改善 KOA 软骨损伤程度，对关节软骨具有保护效应。

自噬的发生是骨关节炎的发生发展过程中重要的病理特征，对骨关节炎疾病的进展有着不可忽视的调节作用^[20-21]。自噬是一种分解代谢过程，可通

过吞噬和降解受损的细胞器和蛋白质来维持能量水平和更新细胞器,维持细胞内环境稳定,自噬体的形成是自噬的必要步骤。LC3 是自噬体的主要成分,可分为 I 型和 II 型两种,当自噬被激活时, I 型 LC3 被诱导与磷脂酰乙醇胺进行结合生成 II 型 LC3 并始终位于自噬体的膜上,并且这一过程可由 ATG7 介导^[22],本研究以 LC3 II/LC3 I 表示蛋白表达水平。Beclin-1 是这一过程的另一关键蛋白,其可与多种蛋白复合物相互作用,进而促进自噬体的形成,与自噬的发生呈正相关^[23]。本研究结果显示,相比空白组,模型组软骨中自噬水平升高,这与 Sasaki 等研究结果^[24]相似,可能是机体保护细胞免受各种不利因素影响的适应性反应结果;而予以加味独活寄生合剂干预后, Beclin-1、LC3、ATG7 mRNA 及蛋白表达进一步显著升高,提示加味独活寄生合剂可促进自噬,并可能通过提高自噬水平来达到保护关节软骨的作用。

许多研究已证实软骨细胞凋亡有助于骨关节炎的发生和发展^[25]。Bcl-2 表达降低时可导致线粒体膜的通透性被破坏,使得细胞色素 C 扩散至细胞质,随后激活下游关键执行程序 Caspase-3,裂解细胞底物并诱导细胞凋亡^[26],故 Bcl-2 及 Caspase3 含量的变化可用来衡量细胞的凋亡水平。本研究显示,相比于空白组,模型组 Bcl-2 蛋白表达无差异, Caspase-3 mRNA 及蛋白表达增加,提示在 KOA 兔模型的软骨中凋亡水平是升高的,而使用加味独活寄生合剂干预后,逆转了凋亡相关蛋白的表达,提示加味独活寄生合剂可能通过抑制软骨细胞凋亡水平达到保护关节软骨的作用。

为进一步验证,本研究引入自噬抑制剂 3MA 进行自噬抑制模型的建立,通过反证法使实验结果得到佐证。通过 3MA 组的检测结果可知,造模后自噬指标 Beclin-1、LC3 mRNA 及蛋白表达水平较模型组均下降,说明自噬抑制模型的建立是成功的。相比加味独活寄生合剂组, 3MA+加味独活寄生合剂组兔关节软骨损伤更为严重,并且其凋亡水平是上升的,提示抑制自噬后,加味独活寄生合剂对关节软骨的保护作用减弱,进一步验证了加味独活寄生合剂可能是通过诱导自噬达到保护关节软骨的作用。

综上所述,加味独活寄生合剂对关节软骨具有保护作用,调控自噬及凋亡水平可能是加味独活寄生合剂改善 KOA 软骨损伤作用的机制之一。然而自噬与凋亡调控机制复杂,涉及诸多信号通路,加

味独活寄生合剂通过何种信号通路对其进行调控也是本课题组后续研究重点关注的方向。

参考文献

- [1]ROSETI L, DESANDO G, CAVALLLO C, et al. Articular cartilage regeneration in osteoarthritis[J]. *Cells*, 2019, 8 (11):1305.
- [2]REN Y, HU J, TAN J, et al. Incidence and risk factors of symptomatic knee osteoarthritis among the Chinese population: analysis from a nationwide longitudinal study [J]. *BMC Public Health*, 2020, 20(1):1491.
- [3]JEON H, IM GI. Autophagy in osteoarthritis[J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(6):497-508.
- [4]DUAN R, XIE H, LIU ZZ. The role of autophagy in osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 608388. doi: 10.3389/fcell.2020.608388.
- [5]CASTROGIOVANNI P, RAVALLI S, MUSUMECI G. Apoptosis and autophagy in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *J Invest Surg*, 2020, 33(9):874-875.
- [6]LOTZ M, CARAMÉS B. Autophagy: a new therapeutic target in cartilage injury and osteoarthritis[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2012, 20(4):261-262.
- [7]曾凡,王康,卢敏. 独活寄生汤联合常规西药治疗膝骨关节炎疗效的 Meta 分析[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(20):1574-1580.
- [8]张永辉,欧梁,邝高艳,等. 加味独活寄生合剂促进膝骨关节炎软骨修复疗效及作用机制研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(1):28-32.
- [9]严可,谢佳佳,邝高艳,等. 加味独活寄生合剂联合股四头肌功能锻炼治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. *中医药导报*, 2019, 25(4):108-110.
- [10]严可,欧梁,邝高艳,等. 加味独活寄生汤对兔膝骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(4):1-6.
- [11]VIDEMAN T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization[J]. *Acta Orthop Scand*, 1982, 53(3):339-347.
- [12]CHENG NT, MENG H, MA LF, et al. Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: the autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (5):1224-1232.
- [13]LIU JW, WU YL, WEI W, et al. Effect of warm acupuncture combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on cartilage tissue in rabbit knee osteoarthritis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:5523726. doi: 10.1155/2021/5523726.
- [14]魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北

- 京:人民卫生出版社, 2010:28-46.
- [15]PELLETIER JP, JOVANOVIĆ D, FERNANDES JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. *Arthritis Rheum*, 1998,41(7):1275-1286.
- [16]MANKIN HJ, JOHNSON ME, LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1981,63(1):131-139.
- [17]邝高艳, 严可, 陈国茜, 等. 从“虚、瘀、毒”论治膝关节骨性关节炎的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(2):334-336.
- [18]谭旭仪, 邝高艳, 卢敏. 膝关节炎的“虚、瘀、毒”病机特点探析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018,24(24):201-206.
- [19]邝高艳, 严可, 柴爽, 等. 加味独活寄生合剂治疗膝关节炎临床疗效及对关节液中 IL-1, IL-6, TNF- α 及 NO 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(1):174-178.
- [20]TANG Y, LI Y, XIN D, et al. Icariin alleviates osteoarthritis by regulating autophagy of chondrocytes by mediating PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. *Bioengineered*, 2021,12(1):2984-2999.
- [21]YAN J, NI B, SHENG G, et al. Rhoifolin ameliorates osteoarthritis via regulating autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 661072. doi: 10.3389/fphar.2021.661072.
- [22]KLIONSKY DJ, ABDEL-AZIZ AK, ABDEL-FATAH S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) [J]. *Autophagy*, 2021,17(1):1-382.
- [23]WANG XJ, TIAN W, XU WW, et al. Loss of autophagy causes increased apoptosis of tibial plateau chondrocytes in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis [J]. *Cartilage*, 2021,13(2 suppl):796S-807S.
- [24]SASAKI H, TAKAYAMA K, MATSUSHITA T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6):1920-1928.
- [25]BOLDUC JA, COLLINS JA, LOESER RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019,132:73-82. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.038.
- [26]SONG P, HUANG H, MA Y, et al. Davidone C induces the death of hepatocellular carcinoma cells by promoting apoptosis and autophagy[J]. *Molecules*, 2021,26(17):5219.

Effect of *Jiawei Duhuo Jisheng Mixture* (加味独活寄生合剂) on Autophagy and Apoptosis-related Proteins of Articular Cartilage Tissue in Rabbit Model of Knee Osteoarthritis

ZENG Fan^{1,2}, CHENG Baiyi², WANG Kang³, DUAN Hang^{1,2}, KUANG Gaoyan², LU Min^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine; 3. Huaihua Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan Province

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jiawei Duhuo Jisheng Mixture* (JDJM, 加味独活寄生合剂) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Forty-six male New Zealand white rabbits were randomly divided into blank group (n=8), conventional model group (n=19) and 3MA autophagy inhibitor model group (n=19). The conventional model group used polymer resin plaster bandage for immobilization of the right hindlimb to establish the KOA model, while the 3MA autophagy inhibitor model group used the autophagy inhibitor 3MA by joint cavity injection additionally to establish the model, with a period of six weeks. After successful modeling, the conventional model group was divided into model group and JDJM group, while the 3MA autophagy inhibitor group was divided into 3MA group and 3MA+JDJM group, with eight rabbits in each group. Both the JDJM group and the 3MA+JDJM group were given 2.26 g/kg of JDJM by gavage, while the other groups were given 3.4 mL/kg of distilled water by gavage, twice daily for four weeks. The cartilage of the knee joints was observed, and the histopathological changes of cartilage were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining and quantitatively evaluated by Pelletier's and Mankin's scoring criteria, respectively. The mRNA and protein expression levels of autophagy-related proteins including autophagy-related 7 (ATG7), autophagy key molecule yeast Atg6 homolog 1 (Beclin-1), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and apoptosis-related proteins including B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and cysteine protease 3 (Caspase3) in cartilage tissues of rabbits were measured. **Results** Compared to those in the blank group, the cartilage damage in the model group was obvious; the Pelletier score and Mankin score significantly in-

creased, and the mRNA expression levels of Beclin-1, LC3, ATG7, Bcl-2 and Caspase-3 as well as the protein expression levels of Beclin-1, LC3, ATG7 and Caspase-3 significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the articular cartilage damage was improved in the JDJM group; the Pelletier score and Mankin score were reduced; the mRNA and protein expression levels of Beclin-1, LC3, ATG7 and Bcl-2 significantly increased, while those of Caspase-3 in the cartilage tissue were reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the JDJM group, the 3MA+JDJM group had higher Pelletier score and Mankin score, lower mRNA and protein expression levels of Beclin-1, LC3, ATG7, and Bcl-2, and higher Caspase3 mRNA expression level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion JDJM has a protective effect on the articular cartilage of knee osteoarthritic rabbits, which may be achieved by inducing cartilage autophagy and inhibiting apoptosis.

Keywords knee osteoarthritis; *Jiawei Duhuo Jisheng Mixture* (加味独活寄生合剂); autophagy; apoptosis

(收稿日期: 2021-10-18; 修回日期: 2022-01-14)

[编辑: 邓媛]

· 信息窗 ·

《英国医学杂志》为何聚焦针灸

《英国医学杂志》，与《新英格兰医学杂志》《柳叶刀》及《美国医学会杂志》齐名，被称为世界四大顶级医学期刊。今年2月，以《针灸研究的现状、问题、共识和方向》为主题，以中国科学家为主联合全球多学科专家开展的系列研究登上《英国医学杂志》，受到广泛关注。该专辑由中国中医药循证医学中心和中国中医科学院针灸研究所发起，与加拿大麦克马斯特大学教授张誉清领衔组稿，联合瑞士、美国等9个国家48家单位的109位国内外中西医临床专家、循证医学专家、流行病与统计学专家、卫生经济学和卫生政策专家共同参与，对目前针灸随机对照临床试验、系统评价、临床实践指南及卫生经济学研究的现状和质量进行评价，并提出方法学建议，形成专家共识，形成系列文章。

顶级期刊关注针灸是一种导向

这次《英国医学杂志》聚焦针灸研究，对针灸的传播和研究意义重大。目前，针灸已经在全球多个国家和地区得到广泛应用，但针灸证据的缺乏影响着其在国际传播应用中的深度和广度。在强调循证决策的时代，证据质量如何，证据与实践的关系如何，是否能够转化为临床、医保或政策决策，以及该如何转化利用，都成为影响针灸发展的问题。针灸在国际上受认可程度比较高的主要原因在于安全性和有效性，而其作用机制还有待更好地研究。此次系列研究文章在医学顶级期刊的集中发表，正是一种好的尝试，可以引起更多专家的重视。

系列研究旨在推动针灸在全球高质量发展

此次“针灸研究”专辑的系列文章包括了针对不同主题的研究，证实针灸类型、治疗频次及结局指标类型等是针灸临床研究疗效的重要影响因素；研究明确了针灸RCT（随机对照试验）设计和实施面临的三个独特方法学挑战；形成了针灸RCT研究的方法学国际专家共识；绘制了针灸治疗77种疾病的证据图谱，明确针灸优势病种和潜在优势病种；评估涵盖中西医、国内和国际涉及针灸的133部临床指南，以及433条推荐意见，评价了指南和推荐意见的临床实用性；加强针灸卫生经济学研究，更好地支持医保决策。

针灸国际化之路仍需凝聚学界努力

张誉清表示，“在这次的研究过程中，我们发现了目前针灸学发展存在的一些问题。首先，对于疗效较为确定的疾病领域，依然在重复发表大量的低质量临床研究文章。其次，依然存在较多针灸疗效尚不明确的疾病领域。”鉴于此，建议开展任何一项临床研究之前，应该首先进行系统综述和循证研究，确定研究的意义和必要性。

(摘自《中国中医药报》)