

引用: 王文渊, 唐雄, 袁尚锋, 彭真灵, 陈泽华, 彭铮磊, 胡伟. 基于AMPK/mTOR信号通路研究补骨膏对膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡的影响[J]. 中医导报, 2025, 31(4): 60-66.

基于AMPK/mTOR信号通路研究补骨膏对膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡的影响*

王文渊^{1,2,3,4}, 唐雄^{1,2,3,4}, 袁尚锋^{1,2,4}, 彭真灵^{1,2,4}, 陈泽华^{1,2,3}, 彭铮磊^{1,2}, 胡伟^{1,2}

(1. 株洲市中医伤科医院, 湖南 株洲 412007;

2. 湖南中医药高等专科学校附属医院, 湖南 株洲 412007;

3. 湖南省中西医结合诊治慢性骨关节病临床医疗技术示范基地, 湖南 株洲 412007;

4. 袁尚锋国家名老中医药专家传承工作室, 湖南 株洲 412007)

[摘要] 目的: 探究补骨膏对膝骨关节炎(KOA)大鼠腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的调控作用, 以及对软骨细胞自噬与凋亡的影响。方法: 将40只大鼠随机分为正常组、KOA组、激动剂组和补骨膏组, 采用双膝关节腔内注射木瓜蛋白酶及持续抽屈样运动建立KOA大鼠模型, 然后予相应药物灌胃8周。苏木精-伊红(HE)染色及番红O-固绿染色观察软骨组织病理形态; TUNEL染色观察软骨细胞凋亡情况; 透射电镜观察软骨细胞自噬情况; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测关节液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、MMP-13水平; 免疫组化法检测软骨组织中磷酸化腺苷酸激活的蛋白激酶(p-AMPK)、MMP-13阳性表达; 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测软骨组织中p-AMPK/AMPK、微管相关蛋白1轻链3(LC3)-II/I及mTOR、自噬效应蛋白1(Beclin1)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)相对表达量。结果: 正常组大鼠软骨组织形态正常, 潮线完整, 番红O-固绿染色正常; KOA组大鼠软骨组织可见裂隙形成, 潮线被破坏, 细胞排列紊乱, 关节面软骨局部或全层缺失, 番红O-固绿染色不均或失染; 激动剂组和补骨膏组大鼠潮线基本完整, 可见少量增生, 番红O-固绿染色稍显不均或轻染, 软骨破坏程度低于KOA组。KOA组大鼠软骨细胞自噬小体数量低于正常组($P < 0.01$), 软骨细胞凋亡率高于正常组($P < 0.01$); 激动剂组及补骨膏组大鼠软骨细胞自噬小体数量均高于KOA组($P < 0.01$), 软骨细胞凋亡率均低于KOA组($P < 0.01$)。KOA组大鼠关节液MMP-3、MMP-13、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平高于正常组($P < 0.01$); 激动剂组及补骨膏组大鼠关节液中MMP-3、MMP-13、IL-1 β 、TNF- α 水平均低于KOA组($P < 0.01$); 补骨膏组大鼠关节液中MMP-13水平高于激动剂组($P < 0.05$), IL-6、TNF- α 水平均低于激动剂组($P < 0.01$)。KOA组大鼠软骨组织p-AMPK蛋白阳性表达水平低于正常组($P < 0.01$), MMP-13蛋白阳性表达水平高于正常组($P < 0.01$); 激动剂组及补骨膏组大鼠软骨组织p-AMPK蛋白阳性表达水平高于KOA组($P < 0.01$), MMP-13蛋白阳性表达水平低于KOA组($P < 0.01$); 补骨膏组大鼠软骨组织MMP-13蛋白阳性表达水平高于激动剂组($P < 0.05$)。KOA组大鼠软骨组织p-AMPK/AMPK、LC3 II/I低于正常组, mTOR、Beclin1、Caspase-3蛋白相对表达量高于正常组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 激动剂组及补骨膏组大鼠软骨组织p-AMPK/AMPK、LC3 II/I均高于KOA组($P < 0.01$), mTOR、Caspase-3蛋白相对表达量均低于KOA组($P < 0.01$); 激动剂组大鼠软骨组织Beclin1蛋白相对表达量高于KOA组($P < 0.05$); 补骨膏组大鼠软骨组织p-AMPK/AMPK、LC3 II/I低于激动剂组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 补骨膏可能通过激活AMPK/mTOR信号通路增强软骨细胞自噬能力, 从而抑制软骨细胞凋亡, 减少促炎因子释放及软骨基质降解, 减轻KOA软骨组织病理损伤。

[关键词] 膝骨关节炎; 关节软骨; 补骨膏; AMPK/mTOR信号通路; 细胞自噬; 细胞凋亡; 大鼠

[中图分类号] R285.5; R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)04-0060-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.010

Effect of Bugu Ointment (补骨膏) on Autophagy and Apoptosis of Chondrocytes in Rats with Knee Osteoarthritis Based on AMPK/mTOR Signaling Pathway

*基金项目: 国家中医药管理局2022年全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号); 湖南省中医药管理局中医药科研计划项目(B2023153); 湖南省中医药管理局-局市(州)联合攻关科研项目(E2023016, E2023017)
通信作者: 唐雄, 男, 副主任医师, 研究方向为中老年退行性骨病发病机制及中医药干预

WAN Wenyuan^{1,2,3,4}, TANG Xiong^{1,2,3,4}, YUAN Shangfeng^{1,2,4}, PENG Zhenling^{1,2,4},
CHEN Zehua^{1,2,3}, PENG Zheng^{1,2}, HU Wei^{1,2}

(1. Zhuzhou Traditional Chinese Medicine Orthopedics Hospital, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou Hunan 412007, China; 3. Hunan Province Clinical Medical Technology Demonstration Base for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Diagnosis and Treatment of Chronic Osteoarthritis, Zhuzhou Hunan 412007, China; 4. YUAN Shangfeng National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio, Zhuzhou Hunan 412007, China)

[Abstract] Objective: To investigate the regulatory effects of Bugu ointment on the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in knee osteoarthritis (KOA) rats, and to evaluate its impact on chondrocyte autophagy and apoptosis. Methods: Totally 40 rats were randomly divided into normal group, KOA group, agonist group, and Bugu ointment group. KOA rat model was established through bilateral knee joint cavity injections of papain combined with persistent drawer-like motion, followed by 8-week oral gavage administration of corresponding medications. Histopathological morphology was assessed using Hematoxylin-eosin (HE) staining and Safranin O-Fast Green staining. Chondrocyte apoptosis was evaluated by TUNEL staining, and autophagy was observed via transmission electron microscopy (TEM). Synovial fluid levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and MMP-13 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemistry (IHC) detected the positive expression of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK) and MMP-13 in cartilage tissues. Western blotting analyzed the relative expression levels of AMPK/p-AMPK, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)- I/II, mTOR, autophagy effector protein 1 (Beclin1), and Caspase-3 in cartilage tissues. Result: In the normal group, the morphological structure of rat cartilage tissue was normal, and the tidemark was intact. The safranin and fast green staining results were normal in normal group. In the KOA group, the cartilage tissue of rats showed formation of fissures, and the tidemark was damaged. The cell arrangement was disordered, and there was local or full-thickness loss of articular surface cartilage in KOA group. The safranin staining was uneven or lost in KOA group. In the agonist group and Bugu ointment group, the tidemark of rat cartilage was basically intact, with a small amount of hyperplasia visible. The safranin staining was slightly uneven or lightly stained in agonist group and Bugu ointment group, and the degree of cartilage damage was lower than that in the KOA group. The KOA group showed lower number of autophagic vacuoles in chondrocytes than normal group ($P < 0.01$), while higher apoptosis rate of chondrocytes than normal group ($P < 0.01$). The agonist group and the Bugu ointment group showed higher number of autophagic vacuoles in chondrocytes than KOA group ($P < 0.01$), while lower apoptosis rate of chondrocytes than KOA group ($P < 0.01$). The KOA group showed higher levels of MMP-3, MMP-13, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the synovial fluid than normal group ($P < 0.01$). The agonist group and the Bugu ointment group showed lower levels of MMP-3, MMP-13, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the synovial fluid than KOA group ($P < 0.01$). The Bugu ointment group showed higher level of MMP-13 in the synovial fluid than agonist group ($P < 0.05$), while lower levels of IL-6 and TNF- α than agonist group ($P < 0.01$). The KOA group showed lower positive expression level of p-AMPK protein in the cartilage tissue than normal group ($P < 0.01$), while higher positive expression level of MMP-13 protein than normal group ($P < 0.01$). The agonist group and Bugu ointment group showed higher positive expression level of p-AMPK protein in the cartilage tissue than KOA group ($P < 0.01$), while lower positive expression level of MMP-13 protein than KOA group ($P < 0.01$). The Bugu ointment group showed higher positive expression level of MMP-13 protein in the cartilage tissue than agonist group ($P < 0.05$). The KOA group showed lower ratios of p-AMPK/AMPK and LC3 II/I than normal group, while higher relative expression levels of mTOR, Beclin1 and Caspase-3 proteins than normal group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The agonist group and the Bugu ointment group showed higher ratios of p-AMPK/AMPK and LC3 II/I than KOA group ($P < 0.01$), while lower relative expression levels of mTOR and Caspase-3 proteins than KOA group ($P < 0.01$). The agonist group showed higher relative expression level of Beclin1 protein in the cartilage tissue than KOA group ($P < 0.05$). The Bugu ointment group showed lower ratios of p-AMPK/AMPK and LC3 II/I

than agonist group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: Bugu ointment may enhance the autophagic ability of chondrocytes by activating the AMPK/mTOR signaling pathway, thereby inhibiting the apoptosis of chondrocytes, reducing the release of pro-inflammatory factors and the degradation of the cartilage matrix, and alleviating the pathological damage of the cartilage tissue in knee osteoarthritis.

[Keywords] knee osteoarthritis; articular cartilage; Bugu ointment; AMPK/mTOR signaling pathway; autophagy; apoptosis; rat

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是导致老年人残疾的最常见退行性疾病之一。KOA主要导致关节软骨进行性不可逆损伤,随后导致软骨下骨和周围滑膜结构的损伤^[1]。在我国, KOA的总体患病率为14.6%,且女性患病率(19.1%)高于男性(10.9%)^[2]。目前尚未发现能完全治愈KOA的治疗方案,治疗方法多为对症治疗。疾病早期积极进行临床干预,包括教育、自我管理、运动和减肥、生物力学干预等,可延缓疾病进展^[3]。治疗药物主要为对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药或皮质类固醇等。终末期KOA多采用手术治疗,如全膝关节置换术^[4],但会给患者造成极大的心理压力及经济负担。中医药治疗KOA具有一定的优势,疗效确切,治法多样,包括中药内服、中药外用、针灸、推拿等^[5]。补骨膏已在KOA的临床治疗中应用多年,疗效可靠。因此,本研究基于腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路探讨补骨膏对KOA模型大鼠软骨细胞自噬及凋亡的影响,旨在为补骨膏的临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠40只,2~3个月龄,体质量50.59~230.122 g,购自湖南斯莱克景达动物实验公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2023-0021。动物质量合格证号:430727340103367028。大鼠饲养于株洲市中医伤科医院实验协同中心标准动物房,12 h/12 h明暗交替,温度(25±3)℃,湿度(55±10)%,噪声≤60 dB,自由饮水进食。本研究经株洲市中医伤科医院实验动物福利伦理委员会批准执行,伦理批号:伦审科第(2023008)号。

1.2 试剂 AMPK激动剂阿卡地新(美国MCE公司,批号:HY-35417);苏木精染色剂(批号:AWI003a)、伊红染色剂(批号:AWI019a)均购自长沙艾碧维生物公司;兔磷酸化腺苷单磷酸激活的蛋白激酶(phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase, p-AMPK)单克隆抗体(批号:11604-3-AP)、兔基质金属蛋白酶-13(MMP-13)单克隆抗体(批号:13528-4-AP)均购自美国Proteintech Group公司;兔mTOR单克隆抗体(武汉博士德公司,批号:BM0121);兔微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)A单克隆抗体(批号:ab57963)、兔LC3B单克隆抗体(批号:ab73187)、兔自噬效应蛋白1(Beclin1)单克隆抗体(批号:ab73284)、兔胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease 3, Caspase-3)多克隆抗体(批号:ab43864)均购自美国Abcam公司;番红O-固绿染色试剂盒(上海联迈生物公司,

批号:13005);TUNEL凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物公司,批号:C1091);基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase, MMP-3)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:CSB-E05606r)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)ELISA试剂盒(批号:CSB-E22098r)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA试剂盒(批号:CSB-E05751r)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(批号:CSB-E05755r)、白细胞介素-1β(interleukin-1 beta, IL-1β)ELISA试剂盒(批号:CSB-E05754r)均购自武汉华美生物公司。

1.3 主要仪器 倒置荧光显微镜(日本尼康公司,型号:DS-U3);BX43光学显微镜(日本Olympus公司,型号:IX73-U);石蜡切片机(德国徕卡公司,型号:RM2235);蛋白凝胶电泳系统(美国Bio-RAD公司,型号:Gel Doc XR+);多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:SpectraMax5);高速冷冻离心机(日本日立公司,型号:CR22G II)。

1.4 药物制备 补骨膏为株洲市中医伤科医院院内协定方[龟甲胶5.0 g,鹿角胶5.0 g,山萸肉5.0 g,牡丹皮5.0 g,熟地黄7.5 g,核桃仁15.0 g,党参5.0 g,茯苓5.0 g,阿胶珠15.0 g,山药7.5 g,陈皮2.5 g,莲子20.0 g,黑芝麻5.0 g,大枣(去核)5.0 g]。龟甲胶(湖南亚飞药业有限公司,批号:2405261);鹿角胶(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:220303);山萸肉(湖南亚飞药业有限公司,批号:231101);牡丹皮(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:240501);熟地黄(湖南亚飞药业有限公司,批号:240801);核桃仁(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:230401);党参(湖南振兴药业有限公司,批号:240801);茯苓(湖南振兴药业有限公司,批号:24111509);阿胶珠(湖南亚飞药业有限公司,批号:240501);山药(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:240901);陈皮(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:240801);莲子(湖南亚飞药业有限公司,批号:241001);黑芝麻(湖南亚飞药业有限公司,批号:230801);大枣(湖南松龄堂中药饮片有限公司,批号:231201)。中药经株洲市中医伤科医院药剂科李杰主任药师鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)各品种项下的相关规定。全方煎煮前加入适量饮用水浸泡30 min,再武火、文火各煎煮20 min,滤除药渣,最后加热浓缩至原有生药材质量浓度为4.92 g/mL。

1.5 分组与造模 40只大鼠按体质量随机分为正常组、KOA组、激动剂组和补骨膏组,每组10只。除正常组外,其余各组采用文献中的方法^[6]建立KOA大鼠模型,首先3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射,麻醉结束后在双膝关节腔内注射4%的

木瓜蛋白酶溶液0.2 mL,注射结束后行抽屈样运动持续3 min,于第1、4、7天各注射1次,总共3次。正常组大鼠在相同位置予等量生理盐水注射并配合抽屈样运动3 min。若大鼠膝关节肿胀并出现屈伸功能障碍,则提示造模成功。

1.6 药物干预 造模成功后开始干预,根据人与不同种实验动物间用量换算^[7]。激动剂组予阿卡地新灌胃,79.6 mg/(kg·d);补骨膏组大鼠予补骨膏生药溶液灌胃,25.2 g/(kg·d);正常组和KOA组予生理盐水灌胃,10.0 mL/(kg·d)。持续8周。

1.7 大鼠关节液及软骨组织的取材 末次灌胃结束后处死大鼠,然后用注射器向大鼠右膝关节腔内缓慢注入1.5 mL生理盐水后反复拉伸活动右膝关节,回抽生理盐水后再次注入,重复操作3次,回抽液离心(3 500 r/min,离心半径10 cm)10 min,取上清,然后-20℃保存备用。关节液取材完毕后将大鼠右膝关节屈曲45°,剪开膝关节皮肤,使用手术刀从髌骨上侧向下两侧分离至胫骨,打开膝关节腔后剥离软骨组织,部分置于-80℃保存备用,部分置于4%多聚甲醛中固定。

1.8 观察指标

1.8.1 大鼠软骨组织病理形态 采用苏木精-伊红(HE)染色及番红O-固绿染色观察大鼠软骨组织病理形态。将固定好的软骨标本使用10% EDTA溶液脱钙4周,然后行常规石蜡包埋和切片,切片后脱蜡至水。脱水后进行HE染色及番红O-固绿染色。将切片浸没于苏木精染色液染核。冲洗后将切片浸入伊红染色液中1 min,冲洗。脱水、透明、封片。或者固绿染液5~10 min,冲洗,至软骨无色,分化液浸泡,洗后加入番红染液15~30 s,脱水、透明、封片,显微镜下观察软骨组织病理变化并拍照。

1.8.2 软骨细胞凋亡情况 采用TUNEL染色观察软骨细胞凋亡情况。取软骨组织切片,在室温下用平衡缓冲液覆盖切片,加入50 μL TUNEL反应混合物,37℃标记60 min。用DAPI标记细胞核后,荧光显微镜下摄片,随机选取5个视野,使用ImageJ v1.8.0进行TUNEL原位染色荧光定量分析以评估细胞凋亡情况。

1.8.3 软骨细胞自噬情况 采用透射电镜观察软骨细胞自噬情况。取部分软骨组织于电镜固定液中固定4 h,梯度酒精、100%丙酮依次脱水,渗透、包埋后切厚约70 nm的切片,用醋酸双氧铀-柠檬酸铅染液行铅铀双染,透射电镜观察软骨细胞超微结构改变。

1.8.4 关节液MMP-3、MMP-13、IL-1β、IL-6、TNF-α水平 取

关节液,室温静置30 min,然后严格按照ELISA试剂盒说明书中的步骤进行标准品制备、加样、孵育等操作,加入终止液后用酶标仪在450 nm波长检测每孔OD值,通过标准曲线计算MMP-3、MMP-13、IL-1β、IL-6、TNF-α浓度。

1.8.5 软骨组织中p-AMPK、MMP-13阳性表达水平 软骨组织切片脱蜡水化,3% H₂O₂封闭10 min,消除内源性过氧化物酶,微波抗原修复后,10% BSA封闭30 min,加p-AMPK、MMP-13一抗(1:100)4℃孵育24 h后,加HRP标记的二抗(1:400),孵育50 min,然后DBA显色。光学显微镜下观察。采用Image-Pro Plus 6.0对p-AMPK、MMP-13的平均光密度进行半定量分析。

1.8.6 软骨组织p-AMPK/AMPK、LC3 II / I及MTOR、Beclin1、Caspase-3蛋白相对表达量 采用Western blotting法检测软骨组织AMPK、p-AMPK、mTOR、LC3 I / II、Beclin1、Caspase-3蛋白相对表达量。取适量软骨组织于冰上裂解30 min(裂解液含蛋白酶抑制剂),于4℃条件下离心(12 000 r/min,离心半径10 cm)10 min,收集上清,BCA法蛋白定量;然后取适量蛋白样品进行电泳分离,5%浓缩胶60 V,10%分离胶90 V;电流300 mA湿转1.5 h,5%脱脂牛奶封闭1 h,加一抗(1:1 000),4℃孵育24 h。最后,TBST漂洗3次,二抗(1:5 000)室温孵育1 h,添加ECL发光液暗室曝片。用ImageJ v1.8.0软件分析各条带灰度值,统计目的蛋白灰度值与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)灰度值的比值。

1.9 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件进行分析。计量资料符合正态分布且方差齐,以“均数±标准差”(x̄±s)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,采用LSD法进行两两比较,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠软骨组织病理形态比较 正常组大鼠软骨组织形态正常,潮线完整,细胞排列整齐,番红O-固绿染色正常;KOA组大鼠软骨组织出现裂隙,潮线被破坏,细胞排列紊乱,关节面软骨局部或全层缺失,番红O-固绿染色不均或失染;激动剂组和补骨膏组大鼠软骨组织形态大部正常,潮线基本完整,细胞排列基本规整,可见少量增生,番红O-固绿染色稍显不均或轻染,软骨破坏程度低于KOA组。(见图1)

2.2 各组大鼠软骨细胞超微结构及自噬小体数量比较 透射电镜下,正常组大鼠软骨细胞形态正常,细胞膜完整,未见明显脱落颗粒,胶原纤维层排列致密,双膜球状自噬小体分布较多;KOA组大鼠软骨细胞囊颗粒脱出,软骨细胞内容物肿

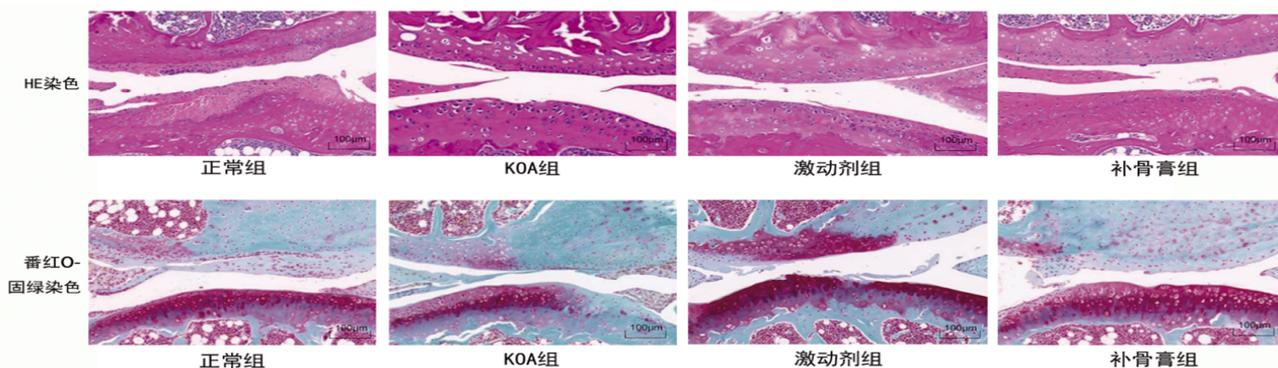


图1 各组大鼠软骨组织病理形态变化情况 (×200)

胀、增大,膜结构出现边缘空洞或空泡样结构,胶原纤维层疏松、断裂,自噬小体少见;激动剂组大鼠软骨颗粒脱落和空泡样结构改善,胶原纤维层仍保持紊乱,可见一定数量的吞噬泡及自噬小体;补骨膏组大鼠软骨脱落颗粒和空泡样结构明显减少,胶原纤维层排列尚紧密,可见大量自噬小体及自噬泡。(见图2)

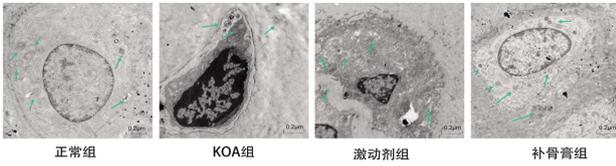


图2 各组大鼠软骨细胞超微结构及自噬小体变化情况 (×10 000)

2.3 各组大鼠软骨细胞自噬小体数量及软骨细胞凋亡率比较 KOA组大鼠软骨细胞自噬小体数量低于正常组($P<0.01$),软骨细胞凋亡率高于正常组($P<0.01$);激动剂组及补骨膏组大鼠软骨细胞自噬小体数量均高于正常组($P<0.01$),软骨细胞凋亡率均低于KOA组($P<0.01$);激动剂组大鼠软骨细胞自噬小体数量及软骨细胞凋亡率与补骨膏组比较,差异均无统计学意义($P>0.01$)。(见图3、表1)

表1 各组大鼠软骨细胞自噬小体数量及凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	自噬小体数量/个	软骨细胞凋亡率/%
正常组	10	10.0 mL/(kg·d)	16.8 ± 6.5	0.93 ± 0.14
KOA组	10	10.0 mL/(kg·d)	4.2 ± 1.9 ^a	10.36 ± 2.58 ^a
激动剂组	10	79.6 mg/(kg·d)	22.6 ± 8.4 ^b	2.27 ± 0.52 ^b
补骨膏组	10	25.2 g/(kg·d)	29.0 ± 5.5 ^{b,c}	2.39 ± 0.43 ^{b,c}
F			15.176	51.969
P			0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与KOA组比较,^b $P<0.01$;与激动剂组比较,^c $P>0.05$ 。

表2 各组大鼠关节液 MMP-3、MMP-13、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	MMP-3/(μg/mL)	MMP-13/(μg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
正常组	10	10.0 mL/(kg·d)	12.72 ± 3.34	21.84 ± 5.50	16.67 ± 3.90	10.59 ± 3.03	17.86 ± 4.33
KOA组	10	10.0 mL/(kg·d)	33.65 ± 5.13 ^a	76.01 ± 11.49 ^a	48.26 ± 5.40 ^a	49.49 ± 5.84 ^a	96.72 ± 10.36 ^a
激动剂组	10	79.6 mg/(kg·d)	23.08 ± 6.03 ^b	33.11 ± 7.82 ^b	29.02 ± 6.02 ^b	45.04 ± 5.21	68.31 ± 11.29 ^b
补骨膏组	10	25.2 g/(kg·d)	24.16 ± 5.27 ^b	47.90 ± 5.98 ^{b,c}	23.64 ± 6.33 ^b	24.32 ± 4.08 ^{b,d}	49.02 ± 8.35 ^{b,d}
F			14.419	42.390	30.427	75.997	68.023
P			0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与KOA组比较,^b $P<0.01$;与激动剂组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

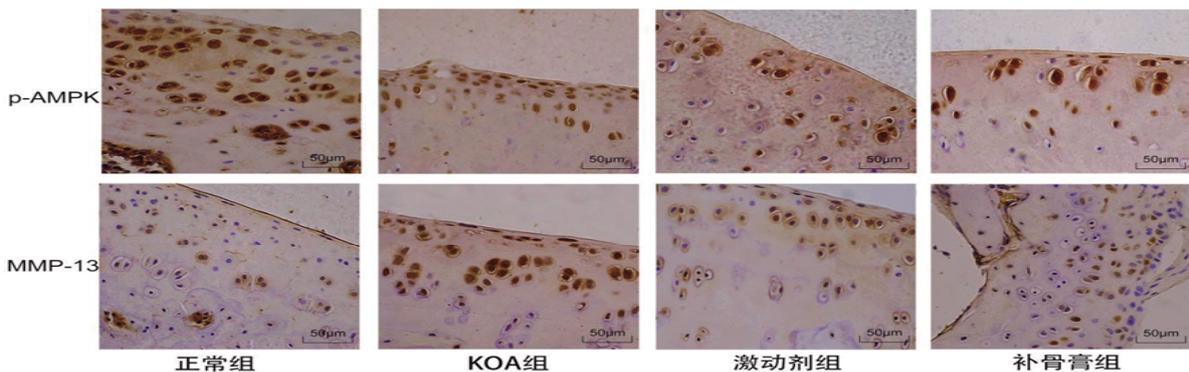


图4 各组大鼠软骨组织 p-AMPK、MMP-13 阳性表达情况 (免疫组化,×400)

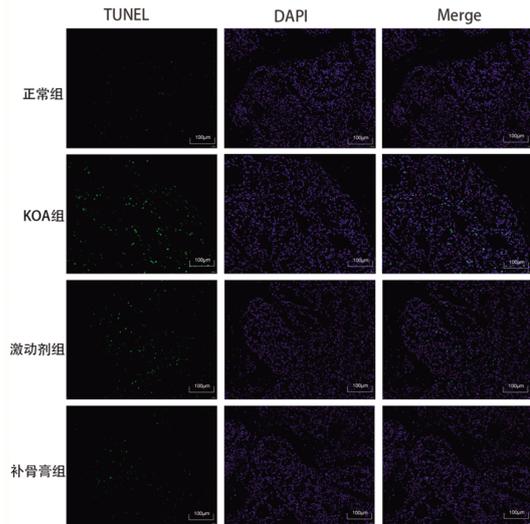


图3 各组大鼠软骨细胞凋亡情况 (TUNEL 染色,×200)

2.4 各组大鼠关节液MMP-3、MMP-13、IL-1β、IL-6、TNF-α水平比较 KOA组大鼠关节液MMP-3、MMP-13、IL-1β、IL-6、TNF-α水平均高于正常组($P<0.01$);激动剂组及补骨膏组大鼠关节液中MMP-3、MMP-13、IL-1β、TNF-α水平均低于KOA组($P<0.01$);补骨膏组大鼠关节液IL-6水平低于KOA组($P<0.01$);补骨膏组大鼠关节液MMP-13水平高于激动剂组($P<0.05$),IL-6、TNF-α水平均低于激动剂组($P<0.01$)。(见表2)

2.5 各组大鼠软骨组织p-AMPK、MMP-13阳性表达水平比较 KOA组大鼠软骨组织p-AMPK蛋白阳性表达水平低于正常组($P<0.01$),MMP-13蛋白阳性表达水平高于正常组($P<0.01$);激动剂组及补骨膏组大鼠软骨组织p-AMPK蛋白阳性表达水平均高于KOA组($P<0.01$),MMP-13蛋白阳性表达水平均低于KOA组($P<0.01$);补骨膏组大鼠软骨组织MMP-13蛋白阳性表达水平高于激动剂组($P<0.05$)。(见图4、表3)

表3 各组大鼠软骨组织 p-AMPK、MMP-13 蛋白免疫组化半定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	p-AMPK	MMP-13
正常组	10	10.0 mL/(kg·d)	91.41 ± 13.67	28.06 ± 6.51
KOA组	10	10.0 mL/(kg·d)	42.19 ± 8.38 ^a	83.80 ± 11.96 ^a
激动剂组	10	79.6 mg/(kg·d)	69.18 ± 11.46 ^b	35.21 ± 10.58 ^b
补骨膏组	10	25.2 g/(kg·d)	59.93 ± 15.68 ^b	48.67 ± 10.34 ^c
F			39.747	54.827
P			0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与KOA组比较,^b $P < 0.01$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.6 各组大鼠软骨组织 p-AMPK/AMPK、LC3 II/I 及 mTOR、Beclin1、Caspase-3 蛋白相对表达量比较 KOA 组大鼠软骨组织 p-AMPK/AMPK 及 LC3 II/I 低于正常组 ($P < 0.01$), mTOR、Beclin1、Caspase-3 蛋白相对表达量高于正常组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 激动剂组及补骨膏组大鼠软骨组织 p-AMPK/AMPK、LC3 II/I 均高于 KOA 组 ($P < 0.01$), mTOR、Caspase-3 蛋白相对表达量均低于 KOA 组 ($P < 0.01$); 激动剂组大鼠软骨组织 Beclin1 蛋白相对表达量高于 KOA 组 ($P < 0.05$); 补骨膏组大鼠软骨组织 p-AMPK/AMPK、LC3 II/I 低于激动剂组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。 (见图5、表4)

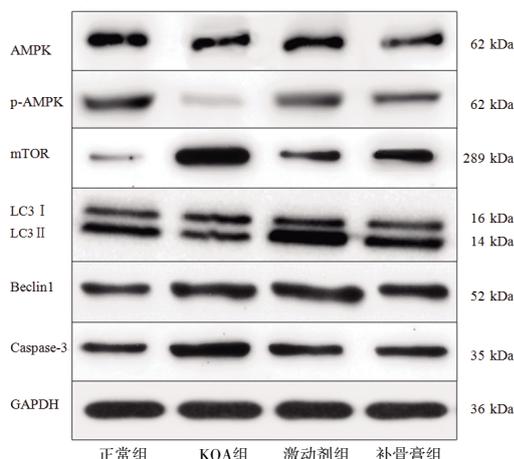


图5 各组大鼠软骨组织 AMPK、p-AMPK、mTOR、LC3 I、LC3 II、Beclin1、Caspase-3 蛋白表达 Western blotting 图

表4 各组大鼠软骨组织 p-AMPK/AMPK、LC3 II/I 及 mTOR、Beclin1、Caspase3 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	p-AMPK/AMPK	mTOR/GAPDH	LC3 II/I	Beclin1/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
正常组	10	10.0 mL/(kg·d)	0.87 ± 0.08	0.09 ± 0.04	1.24 ± 0.36	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.04
KOA组	10	10.0 mL/(kg·d)	0.48 ± 0.12 ^a	0.93 ± 0.05 ^a	0.93 ± 0.16 ^a	0.38 ± 0.08 ^b	0.83 ± 0.06 ^c
激动剂组	10	79.6 mg/(kg·d)	1.24 ± 0.23 ^b	0.26 ± 0.04 ^c	3.12 ± 0.21 ^c	0.50 ± 0.05 ^d	0.47 ± 0.05 ^d
补骨膏组	10	25.2 g/(kg·d)	0.90 ± 0.17 ^c	0.43 ± 0.06 ^c	1.58 ± 0.40 ^d	0.45 ± 0.15	0.47 ± 0.09 ^d
F			14.809	143.442	42.369	9.563	56.506
P			0.000	0.000	0.000	0.003	0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与KOA组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$;与激动剂组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ 。

3 讨 论

KOA 属中医学“膝痹”的范畴。脾主肌肉,肾主骨,脾肾共司肌骨。中老年人随年龄增长,肾气逐渐衰惫,日久则累及脾

脏。脾气虚衰可致水谷精微运化失调,进而使肾精失于后天之气充养,髓不生骨,形成恶性循环。脾肾两虚,则肉萎骨枯,关节痿废,活动无力^[8-9]。脾肾两虚是KOA的病理基础,故补肾健脾法常用于治疗KOA。有研究^[10]表明补肾健脾方内服能有效改善重度KOA患者病情。施氏伤科遵循“脾肾相关”理论提出“先后天兼顾,标本兼治”的治疗原则,采用脾肾双补法治疗KOA。补骨膏是基于该理论治法研制的一种具有补肾健脾作用的膏方。方中熟地黄、山萸肉、龟甲胶、鹿角胶共为君药,补肾填精,温养骨髓。其中龟甲胶、鹿角胶兼具“阳中求阴,阴中求阳”之妙。山药、党参、茯苓、莲子、大枣共为臣药,健脾益气以助运化,培补后天之本。阿胶珠、黑芝麻、核桃仁、牡丹皮、陈皮共为佐药。其中阿胶珠、黑芝麻、核桃仁滋阴养血;牡丹皮活血通络,清虚热,防滋补壅滞;陈皮理气和中,使补而不滞。全方脾肾同治,兼顾气血,契合KOA脾肾两虚,髓枯肉萎之病机,体现了施氏伤科“先后天兼顾,标本兼治”的学术思想。补骨膏在KOA的治疗中已应用多年,临床疗效可靠。本研究结果表明,补骨膏组大鼠软骨组织形态基本正常,潮线基本完整,软骨破坏程度低于KOA组,表明补骨膏可缓解KOA软骨组织病理损伤。

KOA作为一种退行性疾病,其发病机制与软骨细胞生成减少及细胞外基质合成失调有关,其中细胞自噬与凋亡在KOA发生发展中具有关键作用^[11]。自噬作为一种细胞保护机制,可选择性地清除受损的细胞器、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及错误折叠蛋白等,有助于维持细胞能量供应和代谢稳定^[12]。在生理状态下,软骨细胞凋亡与增殖处于动态平衡状态,生理水平下的细胞凋亡可维持软骨基本功能形态。在病理状态下,软骨细胞可通过启动自噬程序抑制细胞凋亡以维持平衡,但在应激源长期刺激下,其自噬水平不足以清除受损的细胞器、ROS等,从而引起软骨细胞过度凋亡,加重KOA的病程进展^[13-14]。AMPK/mTOR信号通路是参与细胞能量代谢的重要通路,同时也是调控自噬的重要信号通路^[15]。软骨细胞自噬激活主要依赖于磷酸化的AMPK对下游调节因子mTOR的抑制,从而影响软骨细胞凋亡^[16]。LC3和Beclin1是自噬相关标志性蛋白。LC3包括LC3 I和LC3 II。吞噬体的形成导致LC3 I通过脂化转化为LC3 II。作为自噬诱导的关键标志物,LC3 II/LC3 I比值与自噬水平呈正相关^[17]。Beclin1是自噬体形成过程中最重要的分子之一,是调控细胞自噬活性的关键靶点^[18]。本研究发现,KOA组大鼠软骨组织中自噬小体数量减少,p-AMPK/AMPK、LC3 II/I降低,一定程度上表明KOA大鼠软骨细胞自噬能力下降;补骨膏组大鼠软骨组织中自噬小体数量增多,且p-AMPK/AMPK、LC3 II/I升高,mTOR蛋白表达降低,表明补骨膏可能通过激活AMPK/mTOR信号通路提高KOA大鼠软骨细胞自噬能力,与相关研究结果^[19-20]基本一致。

软骨细胞凋亡是KOA发生发展的关键机制,因此抑制软骨细胞凋亡是治疗KOA的有效方法^[21-22]。本研究发现KOA组大鼠软骨细胞凋亡率上升,也证实了上述观点,并且KOA组大鼠软骨组织Caspase-3蛋白表达水平升高。Caspase-3被认为是促进凋亡的终末剪切酶,可通过上游凋亡信号刺激活化后发挥生物学作用^[23]。补骨膏干预后,大鼠软骨细胞凋亡率下

降,且Caspase-3蛋白表达水平降低,表明补骨膏可一定程度上抑制KOA软骨细胞凋亡。另外,KOA软骨细胞中的自噬水平不足还可导致软骨细胞分泌的促炎因子和MMPs增多,同时也会导致清除促炎因子的能力下降,最终促使软骨基质加速降解^[24-25]。本研究发现,补骨膏组大鼠关节液MMP-3、MMP-13、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均下降,表明补骨膏可增强KOA大鼠软骨细胞自噬能力,从而降低关节液中促炎因子的水平,减少软骨基质的降解。

综上所述,补骨膏可抑制软骨细胞凋亡,减少促炎因子释放及软骨基质降解,从而减轻KOA软骨组织病理损伤,其机制可能与激活AMPK/mTOR信号通路,从而增强软骨细胞自噬能力有关。本研究为补骨膏临床治疗KOA提供了一定的参考价值,但中医药治疗疾病具有多途径、多靶点的特点,未来还需进一步深入研究以更加全面地揭示其防治KOA的作用机理。

参考文献

[1] ZENG L F, ZHOU G H, YANG W Y, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of knee osteoarthritis with integrative medicine based on traditional Chinese medicine[J]. *Front Med (Lausanne)*,2023,10:1260943

[2] 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 MolSci*, 2023,24(7):6405.

[3] 邢丹,陈耀龙,曾宪涛,等.2019年《OARSI非手术治疗膝、髌及多关节骨关节炎临床实践指南》方法学解读和推荐意见阐释[J].*中国循证医学杂志*,2020,20(3):258-266.

[4] KAN H S, CHAN P K, CHIU K Y, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis[J]. *Hong Kong Med J*, 2019,25(2):127-133.

[5] 刘琼,邱潇锋,莫元森,等.中医治疗膝关节炎研究近况[J].*实用中医药杂志*,2022,38(12):2246-2249.

[6] 钱灿颖,刘磊.药物注射法建立膝骨性关节炎动物模型研究进展[J].*光明中医*,2023,38(23):4696-4698.

[7] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用药量换算[J].*畜牧兽医科技信息*,2010(5):52-53.

[8] 刘恒志,杨永菊,张宇,等.基于脾肾阳虚探讨膝骨性关节炎的发病机制及治疗思路研究[J].*中国中医基础医学杂志*, 2022,28(8):1355-1358.

[9] 赵浩茗,张乐,张子鸣,等.基于五体理论探讨膝骨性关节炎的诊治[J].*中医导报*,2024,30(7):171-175,179.

[10] 王海雄,桑志成,温建民,等.补肾健脾方内服治疗膝重度骨关节炎的随机对照研究[J].*世界中医药*,2017,12(1):37-41.

[11] TANG K H, SUN L, CHEN L, et al. Bioinformatics

analysis and experimental validation of mitochondrial autophagy genes in knee osteoarthritis[J]. *Int J Gen Med*,2024,17:639-650.

[12] CAO W Y, LI J H, YANG K P, et al. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress[J]. *Bull Cancer*,2021,108(3):304-322.

[13] YAO Q, WU X H, TAO C, et al. Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2023,8(1):56.

[14] 陈继鑫,周沁心,余伟杰,等.中医药靶向线粒体质量控制防治膝骨关节炎的研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*, 2024,30(19):245-253.

[15] YI D, YU H, LU K, et al. AMPK signaling in energy control, cartilage biology, and osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*,2021,9:696602.

[16] FENG X F, PAN J Y, LI J Y, et al. Metformin attenuates cartilage degeneration in an experimental osteoarthritis model by regulating AMPK/mTOR[J]. *Aging (Albany NY)*,2020,12(2):1087-1103.

[17] LAMARK T, JOHANSEN T. Mechanisms of selective autophagy[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*,2021,37:143-169.

[18] SUN K, JING X Z, GUO J C, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases[J]. *Autophagy*,2021,17(9):2082-2092.

[19] 李金鹏,刘涛,何志军,等.消肿止痛合剂对大鼠膝骨性关节炎软骨中AMPK/mTOR信号通路影响的实验研究[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(2):231-235.

[20] 张磊,赵敏.白藜芦醇通过调节SIRT1/AMPK信号通路介导自噬反应对膝骨性关节炎大鼠细胞凋亡的影响[J].*中国免疫学杂志*,2024,40(3):466-470,477.

[21] 左显锋,范建楠,莫愁,等.骨性关节炎关节软骨细胞凋亡的研究进展[J].*山东医药*,2022,62(4):108-111.

[22] 罗洁,仇湘中,匡建军,等.补肝健膝方对膝骨关节炎模型兔软骨Wnt信号通路的影响[J].*中医导报*,2023,29(11):50-54.

[23] ASADI M, TAGHIZADEH S, KAVIANI E, et al. Caspase -3: Structure, function, and biotechnological aspects[J]. *Biotechnol Appl Biochem*,2022,69(4):1633-1645.

[24] 金恒凯,王瑞,汪正明,等.细胞自噬在骨性关节炎发病中的作用研究进展[J].*浙江医学*,2023,45(20):2235-2240.

[25] 李辉,李宁,谢兴文,等.中医药干预基质金属蛋白酶表达治疗膝骨性关节炎研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2022,28(1):120-123,138.

(收稿日期:2025-01-09 编辑:蒋凯彪)