

灯盏花素对大鼠膝骨关节炎膝关节软骨的影响

李金磊¹, 殷红², 刘维统¹, 杨景帆^{1*}

(1. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650011; 2. 昆明理工大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨灯盏花素(breviscapine, BE)对膝骨关节炎(osteoarthritis, OA)模型大鼠关节软骨的影响。**方法** 通过内侧半月板失稳(destabilization of the medial meniscus, DMM)诱导 OA 大鼠模型, BE 和塞来昔布(celecoxib, Cel)分别通过灌胃向大鼠给药。通过苏木精-伊红(hematoxylin & eosin, HE)染色观察大鼠骨关节炎软骨损伤和细胞浸润情况, 番红 O-固绿染色观察软骨损伤情况, 甲苯胺蓝染色观察软骨损伤, 免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)染色观察软骨组织中 collagen-Ⅱ 和 p-JNK 阳性细胞比例, 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测大鼠血清中炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的浓度。**结果** OA 组大鼠膝骨组织中软骨细胞层厚度较 sham 组变薄($P<0.0001$), 软骨细胞损伤加重($P<0.001$), 促炎细胞因子 IL-1 β ($P<0.001$)、TNF- α ($P<0.001$)和 IL-6($P<0.001$)水平与 sham 组相比明显升高, p-JNK 阳性率升高。相较于 OA 组, BE 灌胃给药可缓解 DMM 诱导的大鼠膝骨关节的软骨损伤($P<0.05$), 抑制促炎细胞因子的水平($P<0.01$)以及 p-JNK 的阳性率。**结论** BE 可缓解 DMM 诱导的 OA 大鼠软骨损伤, 抑制炎症细胞因子的生成。BE 可能通过调节 JNK 信号通路参与 OA 软骨细胞损伤的调控。

关键词: 膝骨关节炎; 灯盏花素; 软骨损伤; 炎症细胞因子

中图分类号: R274.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2023)03-0076-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.03.014

Effect of Breviscapine on Knee Joint Cartilage in Rats with Knee Osteoarthritis

LI Jinlei¹, YIN Hong², LIU Weitong¹, YANG Jingfan¹

(1. Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650011, China;

2. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of breviscapine (BE) on articular cartilage of knee osteoarthritis (OA) in model rats. **Methods** The knee OA rat model was induced by destabilization of the medial meniscus (DMM), and then the rats were given BE and celecoxib (Cel) by gastric infusion, respectively. Hematoxylin & eosin (HE) staining was used to observe the cartilage injury and cell infiltration in OA rats. Saffron O-solid green staining was used to observe the cartilage injury. Toluidine blue staining was used to observe the cartilage injury. The proportion of collagen-Ⅱ and p-JNK positive cells in the cartilage tissue was detected by immunohistochemistry (IHC) staining, and the concentrations of inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the serum of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the OA group, the thickness of the chondrocyte layer in the knee bone tissue was thinner than that in the sham group ($P<0.0001$), and the injury of chondrocytes was aggravated ($P<0.001$). Compared with the sham group, the level of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) was significantly higher ($P<0.001$), and the positive rate of p-JNK was increased. Compared with the OA group, gastric infusion of BE alleviated DMM-induced cartilage injury in the knee joints of rats ($P<0.05$), inhibited the levels of inflammatory cytokines ($P<0.01$) and the positive rate of p-JNK. **Conclusion** BE

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目[2019FF002(-085)]

作者简介: 李金磊(1987-), 男, 住院医师, 硕士研究生, E-mail: 453578805@qq.com

* 通信作者: 杨景帆(1971-), 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中西医结合诊疗骨关节疾病的研究, E-mail: tianguodeshu-2008@163.com

could alleviate DMM-induced cartilage injury in OA rats and inhibit the production of inflammatory cytokines. BE might be involved in the regulation of OA chondrocyte injury by regulating the JNK signaling pathway.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; breviscapine; cartilage injury; inflammatory cytokines

膝关节炎(osteoarthritis, OA)是一种普遍的慢性关节疾病,是由关节软骨退行性增生引起的骨骼疾病。临床上表现为关节肿胀或疼痛以及运动障碍。膝OA病程长,发病率随着年龄增长而增加,在老年人群中发病率较高^[1-2]。炎症被认为是促进OA发展的危险因素,软骨损伤与OA的临床症状发展密切。目前,非甾体类抗炎药是膝OA的临床一线治疗药物^[3]。塞来昔布(celecoxib, Cel)是常用非甾体类抗炎药之一,在缓解疼痛和延缓疾病进程中具有良好的效果^[3]。但由于Cel具有胃肠道、心血管疾病副作用以及过敏反应,不可长期服用。灯盏花素(breviscapine, BE)是传统中草药灯盏花的类黄酮粗提物,主要活性成分是灯盏花乙素(4,5,6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸苷)^[4]。最近的研究结果表明,BE具有抗氧化应激^[5]、抗细胞凋亡、神经功能改善^[6]和抗炎等作用^[7]。但关于BE对OA的作用尚不清楚。因此,本研究将探索BE对膝OA软骨损伤的调控作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 180~240 g(5周龄,共32只)雄性Sprague Dawley(SD)大鼠购自北京维通利华。大鼠适应性饲养1周,饲养温度为(25±1)℃,相对湿度为50%左右,12 h明暗交替。

1.2 主要试剂 HE染色试剂盒(货号:G1120)、改良番红O-固绿软骨染色液(货号:G1371)、甲苯胺蓝染色液(货号:G2543)购自北京索莱宝生物科技有限公司;Collagen-Ⅱ(货号:ab34712)和p-JNK(货号:ab124956)抗体购自Abcam;大鼠IL-1β(货号:ml037361)、TNF-α(货号:ml002953)、IL-6(货号:ml102828)ELISA检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。氯化钠购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。BE(编号:14002000884,规格:20 mg×24 s)购自广州彼迪药业有限公司。Cel(编号:14201843485,规格:0.2 g×6 s)购自辉瑞制药有限公司。

1.3 动物模型 32只雄性大鼠随机分为4组:sham组、OA组、OA+BE组、OA+Cel组,8只/组。采用内侧半月板切除手术构建OA大鼠模型。大鼠购买后饲养

4周,用(2.5±3)%的异氟醚麻醉大鼠。OA大鼠模型构建方法:1 mL/100 g的戊巴比妥那麻醉大鼠,在髌骨远端至胫骨近端平台上剪1个3 cm的纵向切口,切开紧靠腓腱内侧的关节囊,用显微外科剪刀切开关节囊。髌间区脂肪垫的钝性解剖用于暴露髌间区,手术切除内侧半月板,用可吸收缝线缝合手术切口。Sham组大鼠除不进行内侧半月板切除外,其余操作均与OA组相同。手术后,OA+BE组大鼠每天灌胃40 mg/kg BE,OA+Cel组大鼠每天灌胃30 mg/kg Cel,OA组和sham组同等剂量的生理盐水灌胃。灌胃6周后取材。该研究获得昆明市中医院实验动物伦理委员会批准。

1.4 苏木精-伊红(hematoxylin & eosin, HE)染色 取各组大鼠的膝关节组织,4%多聚甲醛用于固定各组大鼠膝关节组织,48 h后脱钙21 d,经脱水、石蜡包埋后切片。放入二甲苯中脱蜡以及浓度依次升高的乙醇中复水,再用蒸馏水浸润5 min。利用苏木精染液染色,5 min后通过流水洗去部分苏木精染液。0.5%盐酸乙醇分色至细胞核和核内染色染色质清晰。流水洗涤15 min至细胞核呈蓝色。蒸馏水冲洗后用0.5%伊红染色5 min,经浓度依次升高的梯度乙醇脱水后用二甲苯透明,滴加中性树胶封片。显微镜观察染色结果。

1.5 番红O固绿染色 各组骨组织固定后,经脱钙、脱水和石蜡包埋处理并切片,再用二甲苯I和II脱蜡以及梯度乙醇复水。经流水洗涤后用番红染液染色1 h,自来水洗去多余染料,用乙醇脱色。随后用固绿染液染色60 s,无水乙醇脱水,二甲苯溶液透明5 min,封片。显微镜采集图像后进行分析。

1.6 甲苯胺蓝染色 骨组织经脱钙处理,石蜡包埋后切片。用二甲苯脱蜡两次,梯度乙醇脱蜡至水。切片用甲苯胺蓝染色液染色30 min,随后经自来水洗涤2 min,滤纸吸去切片表面的水分。加入丙酮分化至切片中的软骨细胞呈紫蓝色且清晰可见,再用乙醇逐级脱水。在切片上滴加二甲苯使切片透明,最后加入中性树胶用于封片。显微镜观察各组大鼠膝关节骨组织软

骨损伤情况。

1.7 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色 4%多聚甲醛固定后的大鼠膝关节骨组织经脱钙、脱水、石蜡包埋处理后,采用连续矢状切片将膝关节组织切成4 μm 厚的切片。切片脱蜡、复水,用PBS洗涤3次 $\times 5\text{ min}$ 。将载玻片浸入修复液中修复抗原,10% H_2O_2 用于去除内源性过氧化物,经PBS洗涤后放入10%胎牛血清在室温中封闭1 h。随后将切片与一抗在4 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育过夜,洗涤后与二抗在室温中孵育2 h。切片洗涤后将DAB溶液滴至切片上进行显色反应,10 min后滴加去离子水终止反应。为有助于检测结果的判读用苏木精对细胞核进行复染,切片经脱水、中性胶封片后,利用显微镜观察染色结果。

1.8 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 灌胃后的第6周,通过心内穿刺收集各组大鼠的血液,置于不含EDTA的离心管中。在室温中静置1 h后离心机离心10 min,将血清转移至新的离心管中,并置于 -80°C 冰箱中保存备用。大鼠

IL-1 β 、TNF- α 和IL-6检测试剂盒分别用于测定大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的浓度。参照试剂盒说明书,分别检测各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平。

1.9 统计学分析 通过GraphPad Prism 8.0软件对实验数据进行统计并作图,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)统计。统计结果 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BE对OA模型大鼠软骨损伤和细胞免疫浸润的影响 取各组大鼠膝关节软骨组织进行HE染色(图1),染色显示sham组大鼠膝关节软骨清晰,表面光滑、完整。OA组中,软骨表面粗糙,出现滑膜增生和炎性细胞浸润,软骨层与sham组相比变薄,表明OA大鼠模型成功构建。相比较于OA组,OA+BE组和OA+Cel组大鼠软骨组织中炎性细胞浸润减少,软骨层增厚,表明BE可缓解大鼠膝骨关节炎的软骨损伤。见图1。

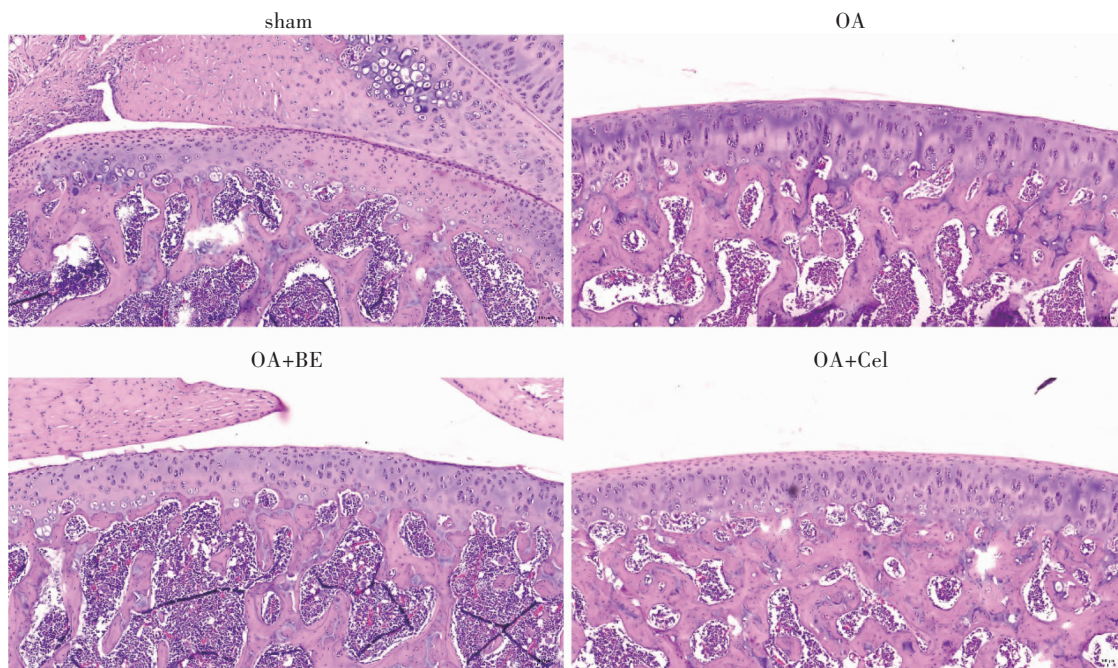


图1 HE染色观察OA大鼠膝关节软骨损伤情况(10 \times)

2.2 番红O-固绿染色观察大鼠软骨损伤的情况

番红O-固绿染色中,嗜酸性的软骨与碱性染料番红O结合呈红色,嗜碱性的骨组织与酸性染料固绿结合被染成绿色或蓝色。染色结果和Mankin's评分表明,相比较于sham组,OA组中大鼠关节红色染

色较浅,软骨减少($P < 0.0001$),软骨下骨增厚,结构紊乱。OA+BE组和OA+Cel组中红色软骨层明显厚于OA组($P < 0.0001$),说明BE可一定程度缓解DMM诱导的大鼠膝OA。见图2。

2.3 甲苯胺蓝染色观察BE对OA模型大鼠的软骨

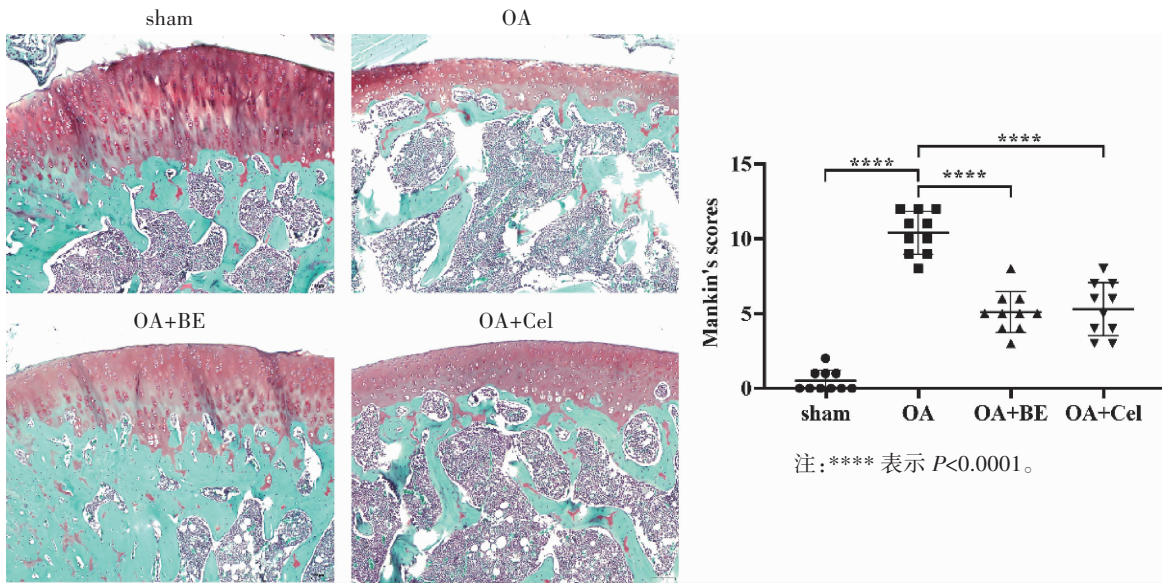


图 2 番红 O 固绿染色观察软骨损伤情况(10×)

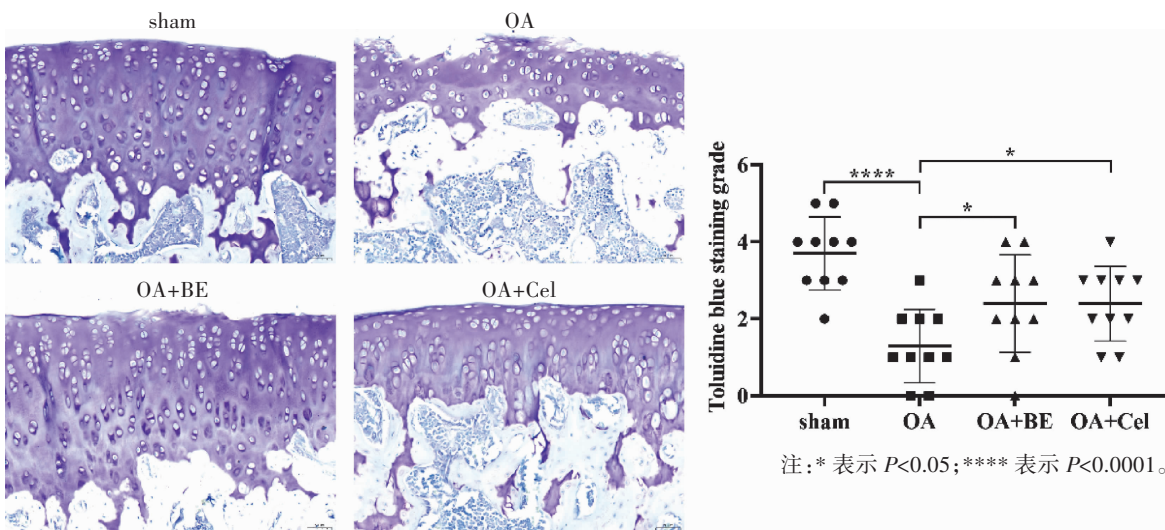


图 3 甲苯胺蓝染色观察大鼠软骨损伤(20×)

损伤情况的影响 甲苯胺蓝染色可使软骨呈紫色,其他为浅蓝色。染色结果表明,OA 组中大鼠膝关节软骨层厚度与 sham 组相比明显变薄($P<0.0001$)。OA+BE 组和 OA+Cel 组中的软骨层厚度比 OA 组相比增厚($P<0.05$)。由此表明,BE 可显著改善 OA 大鼠的软骨损伤。见图 3。

2.4 BE 可促进 OA 大鼠软骨组织中 Collagen- II 和 p-JNK 的阳性率的影响 IHC 染色结果显示,相比较于 sham 组,OA 组中 Collagen- II 的阳性率降低而 p-JNK 的阳性率升高。OA+BE 组和 OA+Cel 组中 Collagen- II 的阳性率高于 OA 组,p-JNK 的阳性率与 OA 组相比降低。由此可知,BE 可逆转 DMM 诱导的

OA 大鼠膝关节中 Collagen- II 减少以及 p-JNK 阳性率的增多,我们推测 BE 可能通过调控 JNK 信号通路参与 DMM 诱导的膝 OA 的发展进程。见图 4。

2.5 ELISA 试剂盒检测 OA 大鼠血清中炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 浓度 收集各组大鼠的血清,通过 ELISA 试剂盒检测炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的浓度。实验表明,相比较于 sham 组,OA 组中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度明显增多。OA+BE 组和 OA+Cel 组中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度显著低于 OA 组。由此可知,BE 可下调 DMM 诱导的大鼠血清中促炎细胞因子浓度的增加。见图 5。

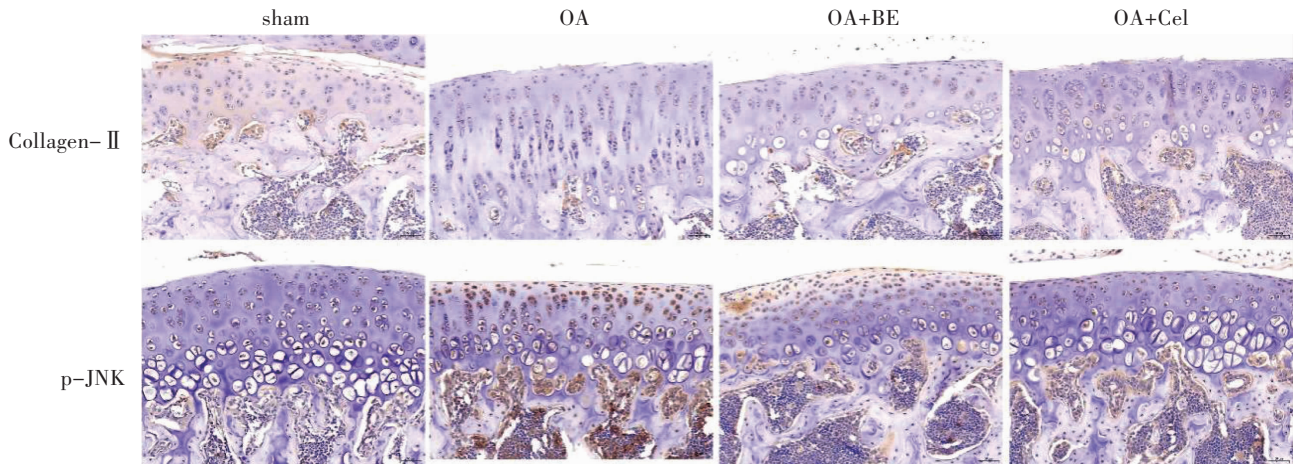
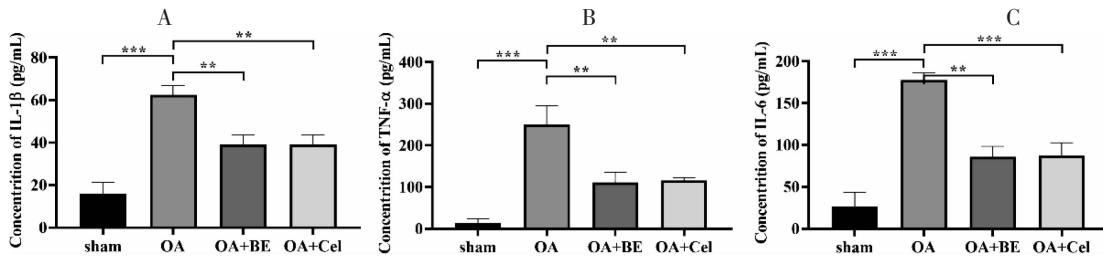


图 4 IHC 检测 Collagen-II 和 p-JNK 阳性率(20×)



注:ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 IL-1 β (A)、TNF- α (B)和 IL-6(A)(C)浓度; ** P <0.01, *** P <0.001。

图 5 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的浓度

3 讨论

膝 OA 不仅是关节软骨的退行性疾病,在炎症作用下软骨细胞合成的蛋白多糖减少,会导致免疫功能受损,进一步破坏关节软骨,加重炎症反应。骨性关节炎的特征是伴随软骨下骨的硬化改变以及骨赘进展的透明关节软骨的逐渐丧失,表现为患者膝关节经常疼痛、肿胀以及活动受限,严重影响患者的生活和学习^[8-9]。膝 OA 可由性别、肥胖、衰老、退化、劳损感染以及外伤等因素引起。目前,临床上使用的药物可在一定程度上缓解疾病,但一般维持时间较短,仍无法治愈疾病。因此,寻找 OA 的有效治疗药物仍然迫在眉睫。

BE 是类黄酮苷的混合物,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗血小板、抗凝以及心肌保护等多种生物活性,已在临床上用于治疗动脉粥样硬化、冠心病、脑供血不足等心脑血管疾病^[10-11]。Lan 等报道,BE 可在多种动物模型中抑制代谢应激下的肝脏炎症和纤维化以及小鼠肝脏中的脂质积累^[12]。在 Yang 等人的报道中,BE 可通过上调 miR-129-5p,靶向抑制 ZFP91 的表达,从而抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移,抑制疾病的发展进程^[13]。在大鼠冠状动脉栓塞中,BE 可通过激活 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路,

改善大鼠心功能障碍、降低血清心肌损伤标志物水平、缩小心肌微梗死面积和降低心肌细胞凋亡指数以及心肌组织中的炎症细胞因子^[14]。Peng 等^[15]研究发现,BE 通过抑制 NF- κ B/NLRP3 通路的激活,抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的炎症反应和上皮间质转化。在本研究中,我们发现 DMM 诱导的大鼠膝 OA 关节软骨层厚度变薄,软骨细胞受损,炎症细胞因子增多,p-JNK 阳性率增高;大鼠经 BE 灌胃后,关节软骨损伤得到缓解,软骨层增厚,炎症细胞因子减少,p-JNK 阳性率降低。

c-Jun N 末端激酶 JNK (c-Jun N terminal kinase, JNK) 又称应激激活蛋白激酶 (stress-activated protein kinase),是 MAPK 超家族的成员之一,参与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、细胞分化和细胞生长等多种生物过程^[16-19]。同时,JNK 信号通路也被报道参与 OA 的发展进程。例如,Li 等^[16]研究发现,氢通过抑制 JNK 信号的激活,减轻人 OA 软骨细胞凋亡和炎症因子。抑制巨噬细胞中 JNK-ERK-P38 的磷酸化水平可降低促炎细胞因子的水平和软骨细胞的凋亡,减弱小鼠 OA^[20]。JNK-JUN 信号依赖式上调 NCOA4 的表达,促进软骨细胞的铁死亡,通过铁蛋白吞噬加重 OA^[21]。然而,Tong 等报道激活 JNK-mTORC1-PTHrP

信号通路可抑制 OA 的发展进程^[22]。本研究发现, DMM 诱导的 OA 大鼠膝关节组织中 p-JNK 阳性率增强, BE 可抑制 p-JNK 的阳性率, 我们推测 JNK 信号通路参与 BE 调控膝 OA 的软骨损伤进程。

综上所述, 本研究中我们证明 BE 可通过抑制 JNK 信号通路的激活, 抑制 OA 大鼠膝关节软骨损伤以及血清中炎症因子的水平。

参考文献:

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019, 393(10182):1745-1759.
- [2] HE W W, WU Y J, LIU Q M, et al. Effect of Etoricoxib on miR-214 and inflammatory reaction in knee osteoarthritis patients[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8):9586-9592.
- [3] LIU B, JI C C, SHAO Y J, et al. Etoricoxib decreases subchondral bone mass and attenuates biomechanical properties at the early stage of osteoarthritis in a mouse model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127:110144.
- [4] GAO J L, CHEN G, HE H Q, et al. Therapeutic effects of breviscapine in cardiovascular diseases: a review[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:289.
- [5] LIN Y Z, LU Z Y, LIANG X H, et al. Effect of breviscapine against hepatic ischemia reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2016, 203(2):268-274.
- [6] JIANG L, HU Y, HE X, et al. Breviscapine reduces neuronal injury caused by traumatic brain injury insult: partly associated with suppression of interleukin-6 expression[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(1):90-95.
- [7] WANG Z J, LI H Y, YAN J Y, et al. Flavonoid compound breviscapine suppresses human osteosarcoma Saos-2 progression property and induces apoptosis by regulating mitochondria-dependent pathway[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(1):e22633.
- [8] MOLNAR V, MATISIC V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17):9208.
- [9] PEAT G, THOMAS M J. Osteoarthritis year in review 2020: epidemiology & therapy[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(2):180-189.
- [10] LI Z, ZHANG X B, GU J H, et al. Breviscapine exerts neuroprotective effects through multiple mechanisms in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 468(1-2):1-11.
- [11] LI Z K, LIN H, DONG Z X, et al. Protective effect of breviscapine in acute pulmonary embolism rats via regulation of MCP-1 and IL-13[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12):6405-6407.
- [12] LAN T, JIANG S, ZHANG J, et al. Breviscapine alleviates NASH by inhibiting TGF- β -activated kinase 1-dependent signaling[J]. *Hepatology*, 2022, 76(1):155-171.
- [13] YANG J, JIN W J, ZHANG X K, et al. Breviscapine participates in the progression of prostate cancer by inhibiting ZFP91 expression through upregulation of miRNA-129-5p[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:1511607.
- [14] CHEN Z Q, ZHOU Y, CHEN F, et al. Breviscapine pretreatment inhibits myocardial inflammation and apoptosis in rats after coronary microembolization by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15:843-855.
- [15] PENG L, WEN L, SHI Q F, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):978.
- [16] MANGALI S, BHAT A, UDUMULA M P, et al. Inhibition of protein kinase R protects against palmitic acid-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis through the JNK/NF- κ B/NLRP3 pathway in cultured H9C2 cardiomyocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):3651-3663.
- [17] JIA Z, ZHANG H T, MA C, et al. Celecoxib enhances apoptosis of the liver cancer cells via regulating ERK/JNK/P38 pathway[J]. *J Buon*, 2021, 26(3):875-881.
- [18] ZHAO H Q, YANG Y X, WANG Y, et al. MicroRNA-497-5p stimulates osteoblast differentiation through HMG2-mediated JNK signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1):515.
- [19] LI F L, HUANG T L, TANG Y, et al. Utidelone inhibits growth of colorectal cancer cells through ROS/JNK signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):338.
- [20] ZHOU F, MEI J T, HAN X G, et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- κ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5):973-985.
- [21] SUN K, HOU L C, GUO Z, et al. JNK-JUN-NCOA4 axis contributes to chondrocyte ferroptosis and aggravates osteoarthritis via ferritinophagy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 200:87-101.
- [22] TONG W X, ZENG Y L, CHOW D H K, et al. Wnt16 attenuates osteoarthritis progression through a PCP/JNK-mTORC1-PTHrP cascade[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(4):551-561.

(收稿日期:2022-10-17)