

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.004

柚皮苷对骨关节炎软骨破坏的保护作用研究*

彭侃 鲁超 胡守业 李政 武文韬

(西安交通大学医学部附属红会医院关节病医院骨坏死与关节重建病区 陕西 西安 710054)

摘要 目的:考察柚皮苷对骨关节炎软骨破坏的保护作用。**方法:**将 60 只 7 周龄雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和柚皮苷组,每组 20 只。模型组和柚皮苷组大鼠通过切断右膝关节的前交叉韧带建立骨关节炎模型,建模后,柚皮苷组大鼠每天灌胃 200 mg/kg 的柚皮苷溶液,共灌胃 4 周。通过番红 O/固绿染色和 OARSI 评分评估大鼠的关节软骨损伤程度。通过免疫组织化学染色检测软骨组织中 p-IkB α 和 NLRP3 的表达。通过用 IL-1 β 体外诱导 SW1353 细胞来模拟骨关节炎软骨细胞的病理微环境,并分别应用 NF- κ B 抑制剂(PDTC)或 NLRP3 抑制剂(CY-09)处理 SW1353 细胞。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 NF- κ B、NLRP3、caspase-1、IL-6、IL-10、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5 的表达。通过 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡。**结果:**与模型组相比,柚皮苷组的 OARSI 评分显著降低(2.63 vs 0.94, $P<0.05$)。柚皮苷组的 p-IkB α 和 NLRP3 蛋白表达水平显著低于模型组($P<0.05$)。与 IL-1 β 组相比,IL-1 β +柚皮苷组的 SW1353 细胞中 NF- κ B、NLRP3、caspase-1、IL-6、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5 的表达水平均显著降低,而 IL-10 显著升高($P<0.05$)。PDTC 和 CY-09 对 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路相关分子的调控作用与柚皮苷一致。与 IL-1 β 组相比,IL-1 β +柚皮苷组、IL-1 β +PDTC 组和 IL-1 β +CY-09 组的细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$)。**结论:**柚皮苷可在体内和体外抑制骨关节炎的进展,柚皮苷对骨关节炎的治疗作用部分依赖于对 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路的抑制。

关键词:柚皮苷;骨关节炎;软骨;NF- κ B 信号通路;NLRP3 信号通路

中图分类号:R-33;R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)13-2418-07

Protective Effect of Naringin on Cartilage Destruction in Osteoarthritis*

PENG Kan, LU Chao, HU Shou-ye, LI Zheng, WU Wen-tao

(Osteonecrosis and Joint Reconstruction Ward, Department of Joint Surgery, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of naringin on cartilage destruction in osteoarthritis. **Methods:** Sixty 7-week-old male SD rats were randomly divided into a sham group, a model group and a naringin group, with 20 rats in each group. The osteoarthritis model was established in the model group and naringin group by cutting the anterior cruciate ligament of the right knee. After modeling, rats in naringin group were given 200 mg/kg naringin solution daily for 4 weeks. The degree of articular cartilage damage in rats was assessed by saffron O/fast green staining and OARSI score. The expression of p-IkB α and NLRP3 in cartilage tissue was detected by immunohistochemical staining. The pathological microenvironment of osteoarthritis chondrocytes was simulated by inducing SW1353 cells with IL-1 β in vitro, and SW1353 cells were treated with NF- κ B inhibitor (PDTC) or NLRP3 inhibitor (CY-09), respectively. The expressions of NF- κ B, NLRP3, caspase-1, IL-6, IL-10, IL-18, MMP13 and ADAMTS-5 were detected by RT-PCR and Western blot. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI method. **Results:** Compared with the model group, the OARSI score of the naringin group was significantly reduced (2.63 vs 0.94, $P<0.05$). The expression levels of p-IkB α and NLRP3 proteins in the naringin group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). Compared with IL-1 β group, the expression levels of NF- κ B, NLRP3, caspase-1, IL-6, IL-18, MMP13 and ADAMTS-5 in SW1353 cells of IL-1 β +naringin group were significantly reduced, while IL-10 significantly increased ($P<0.05$). PDTC and CY-09 have the same regulatory effect on NF- κ B and NLRP3 signaling pathway related molecules as naringin. Compared with the IL-1 β group, the apoptosis rates in the IL-1 β +naringin group, the IL-1 β +PDTC group, and the IL-1 β +CY-09 group were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** Naringin can inhibit the progression of osteoarthritis in vitro and in vivo. The therapeutic effect of naringin on osteoarthritis depends in part on the inhibition of NF- κ B and NLRP3 signaling pathways.

Key words: Naringin; Osteoarthritis; Cartilage; NF- κ B signaling pathway; NLRP3 signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)13-2418-07

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772410);陕西省重点研发计划项目(2019SF-201)

作者简介:彭侃(1979-),男,博士研究生,副主任医师,研究方向:关节外科、骨与软骨基础研究,

电话:13772400768, E-mail: pengkan00@126.com

(收稿日期:2020-02-07 接受日期:2020-03-04)

前言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)在全世界范围内具有较高的发病率,其发病人群主要为中老年人,因此也是一种与年龄有关的退行性关节疾病。骨关节炎的特征是滑膜炎、软骨退化和骨赘形成,严重时可导致患者行动障碍或残疾^[1]。柚皮苷(Naringin)是一种多功能生物类黄酮,主要来自葡萄柚和其他柑橘类水果,据报道,柚皮苷具有抗氧化、清除自由基、抗衰老、抗炎等作用^[3,4]。骨关节炎的发病过程中伴随着多种炎症细胞因子的异常表达以及相关炎症信号通路的活化。例如,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的高表达可加重骨关节炎的进展,核转录因子 NF- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路及其下游分子的激活可导致软骨降解和破坏^[5]。其他研究者已经报道了柚皮苷在糖尿病心肌病、椎间盘退变中对 TNF- α 和 NF- κ B 信号通路的抑制作用^[6],最近研究显示,柚皮苷在关节炎动物模型中发挥了关节保护作用。张昀等研究发现,柚皮苷能通过阻断一氧化氮生成和抑制 caspase 信号通路抑制人骨关节炎软骨细胞凋亡^[7]。Xu 等人研究发现,在骨关节炎大鼠模型中,柚皮苷可通过减少前列腺素 E2(PGE2)、一氧化氮(NO)、白介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生发挥抗炎作用^[8]。但柚皮苷在软骨降解和骨关节炎发生过程中的作用机制仍有待进一步研究。此外,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症体信号通路参与介导骨关节炎的发病过程^[9]。本研究旨在考察柚皮苷对骨关节炎大鼠模型的潜在治疗作用,及其对软骨细胞生物学行为的影响,以期对骨关节炎发生的分子机制及临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠来自西安交通大学医学部实验动物中心(SYXK(陕)2018-001);60 只 7 周龄雄性 SD 大鼠体重为 220~260 g,平均为 233.32 $\pm$ 14.58 g。将大鼠饲养在标准环境控制室中,室温 25 $^{\circ}$ C、湿度 55%、光照 12 h 光暗循环,不限制饮食。

柚皮苷购自美国 Sigma 公司,纯度为 98%。多聚甲醛、乙二胺四乙酸、番红 O/固绿染色试剂购自北京索莱宝科技有限公司;p-I κ B α 一抗、山羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;NLRP3、caspase-1、IL-6、IL-10、IL-18 和 GAPDH 一抗购自英国 Abcam 公司;二氨基联苯胺(DAB)购自武汉艾美捷科技有限公司;NF- κ B 抑制剂(PDTC)购自上海碧云天生物技术有限公司;NLRP3 抑制剂(CY-09)、细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI)购自北京百奥莱博科技有限公司;人软骨肉瘤细胞 SW1353 购自美国 ATCC;IL-1 β 购自上海恒雅生物科技有限公司;DMEM 培养基购自上海一研生物科技有限公司;IL-1 β 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;RNeasy 试剂盒德国 Qia-gen 公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、SYBR Green I 染料购自北京凯瑞基生物科技有限公司;ImProm-II(TM)反转录系统购自美国 Promega 公司;RIPA 缓冲液购自北京普利莱基因技术有限公司公司;BCA 试剂盒测定蛋白质浓度购自上海碧云天生物技术有限公司公司;5%牛血清白蛋白购自吉诺生物

医药技术有限公司公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司公司。

1.2 方法

1.2.1 骨关节炎模型的建立 将大鼠随机分为假手术组、模型组和柚皮苷组,每组 20 只。对大鼠进行麻醉后,按照先前报道的方法切断大鼠右膝关节的前交叉韧带进行骨关节炎模型的建立^[10]。模型组和柚皮苷组大鼠进行建模,假手术组大鼠进行相同的手术操作,但不切断前交叉韧带。建模后,柚皮苷组大鼠每天灌胃 200 mg/kg 的柚皮苷溶液,共灌胃 4 周。假手术组和模型组大鼠灌胃等体积的生理盐水。给药完成后,处死大鼠并分离膝关节组织。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色 实验完成后分离各组大鼠膝关节组织,石蜡包埋,制作 4 μ m 厚切片,根据制造商说明书采用苏木精-伊红(HE)染色试剂盒进行染色。

1.2.3 番红 O/固绿染色 将大鼠膝关节组织在 4%多聚甲醛溶液中固定 3 天,在 10%乙二胺四乙酸中脱钙 2 周,然后梯度乙醇脱水并石蜡包埋,切成 5 μ m 厚切片。按照生产商说明,将切片用番红 O/固绿染色。切片用 Weigert 染色 5 min,然后酸性分化液分化 15 s,清洗后用固绿染液染色 5 min,用弱酸溶液洗涤 15 s,番红 O 溶液孵育 5 min。然后将切片脱水,透明,中性树胶封片。通过国际骨关节炎研究协会(OARSI)评分评估各组大鼠的关节软骨损伤程度^[11]。

1.2.4 免疫组织化学染色 将大鼠软骨组织制备 4 μ m 厚石蜡切片,然后在二甲苯中脱蜡并用梯度乙醇脱水。在柠檬酸钠缓冲液中回收抗原后,将切片与 p-I κ B α (1:1000)和 NLRP3(1:1000)一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 PBS 洗涤 3 次后,将切片与生物素化的山羊抗兔二抗(1:500)在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,然后用 PBS 洗涤 3 次。将切片用二氨基联苯胺(DAB)进行着色 3 min。在光学显微镜下随机选择 5 个视野计数阳性染色细胞。

1.2.5 人软骨肉瘤细胞 SW1353 的培养 人软骨肉瘤细胞 SW1353 在添加了 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中于 37%和 5% CO₂ 条件下培养,3 天传代 1 次。通过用 IL-1 β 体外诱导 SW1353 细胞来模拟骨关节炎软骨细胞的病理微环境。将一部分细胞用 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理 24 h。然后收集 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞用于后续实验。SW1353 细胞分为 5 组,即对照组(Control,未用药物处理)、IL-1 β 诱导组(IL-1 β)、IL-1 β 诱导+柚皮苷组(IL-1 β +Naringin)、IL-1 β 诱导+NF- κ B 抑制剂 PDTC 处理组(IL-1 β +PDTC)、IL-1 β 诱导+NLRP3 抑制剂 CY-09 处理组(IL-1 β +CY-09)。将 IL-1 β 诱导的细胞分别应用 10 μ mol/L 柚皮苷、100 μ mol/L 的 NF- κ B 抑制剂(PDTC)或 100 μ mol/L 的 NLRP3 抑制剂(CY-09)处理 48 h。

1.2.6 RT-PCR 使用 RNeasy 试剂盒从大鼠关节软骨组织或 SW1353 细胞中提取总 RNA,并使用 ImProm-II(TM)反转录系统生成第一链 cDNA。使用 SYBR Green I 染料进行实时 PCR。设计引物序列,将目的基因标准化为 GAPDH。通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因相对表达。见表 1。

1.2.7 Western blot 使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解软骨组织或 SW1353 细胞。使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。将 30 μ g 蛋白在 10%SDS-PAGE 电泳并转移到 PVDF 膜上,将膜在 5%牛血清白蛋白中室温封闭 2 h。然后将膜与

p-I κ B α (1:500)、NLRP3 (1:500)、caspase-1 (1:1000)、IL-6 (1:500)、IL-10 (1:1000)、IL-18 (1:1000)、MMP13 (1:500)、ADAMTS-5 (1:500) 和 GAPDH (1:1000) 一抗在 4℃ 下孵育过

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

Primer name	Primer sequence (5'-3')
NF- κ B2	F: AACAGACACAGATCTCTCTCA
	R: AAGTCCCTCATTCCGGTGATC
NLRP3	F: GGCCTGCTTTTCTGTGG
	R: TTGGTGGAGACCGCTCTTG
IL-6	F: AAGGCAGGATGAAGCGGTTC
	R: TTACCAGGTCAAGTCCGGG
IL-10	F: ATGACCAATACTAATGGATGCA
	R: AAGATAAGGCTGCGTGTAAGT
IL-18	F: GCCAAGCTCGAACCAATTC
	R: CGGGATAGCTGGTTACAAGTCACAC
MMP13	F: GCGAATTTACGTCGAACCCC
	R: CGGGACCAAGTTACACAC
ADAMTS-5	F: GCCAATATCTGTTGGGAACGTCC
	R: GTACACCAAACAGCTGGACAC
GAPDH	F: AATCCCTGATCCCGCATAAC
	R: AGATAGCTGAGTTTGACGTTGC

夜。TBST 洗涤后,将膜与 HRP 标记的山羊抗兔二抗 IgG (1:1000) 室温下孵育 1 h。高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒进行显影。GAPDH 作为内参,ImageJ 软件用于量化条带密度。

1.2.8 细胞凋亡检测 使用细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC/PI) 在流式细胞仪上测定细胞凋亡。用 0.1% 胰蛋白酶消化 SW1353 细胞并加入结合缓冲液 (pH 7.4、2.5 m CaCl₂、140 mM NaCl、10 mM HEPES、0.1% BSA) 中,浓度为 10⁵ 个细胞/mL。100 μ L 细胞悬液中加入 10 μ L Annexin V, 冰上孵育 15 min 后,将 10 μ L PI 溶液和 380 μ L 结合缓冲液加到细胞悬液中。通过流式细胞仪检测染色细胞数量。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件分析所有数据。数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用 t 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 及 Tukey 事后检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的膝关节大体观察及 HE 染色

解剖大鼠膝关节胫骨平台表面软骨,结果显示,假手术组软骨表面光滑,边缘平整,无凹痕或损伤。模型组软骨表面有凹陷 (蓝色箭头),说明前十字韧带切除后由于关节不稳而引起了软骨磨损。柚皮苷治疗组的凹陷较浅,说明柚皮苷能修复软骨表面的损伤。见图 1。

HE 染色结果显示,假手术组大鼠关节组织形态正常,排列规则,未见明显病变。模型组关节软骨层发生缺损,排列紊乱,炎性细胞浸润明显。而柚皮苷组关节病变程度明显减轻。见图 2。

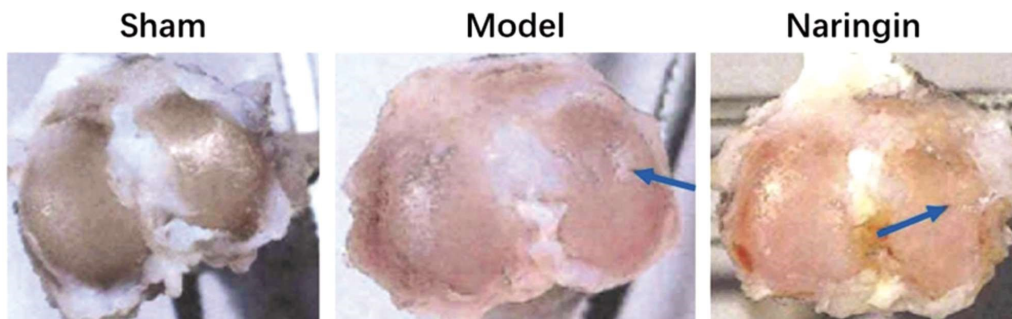


图 1 大鼠膝关节观察

Fig.1 Rat knee joint observation

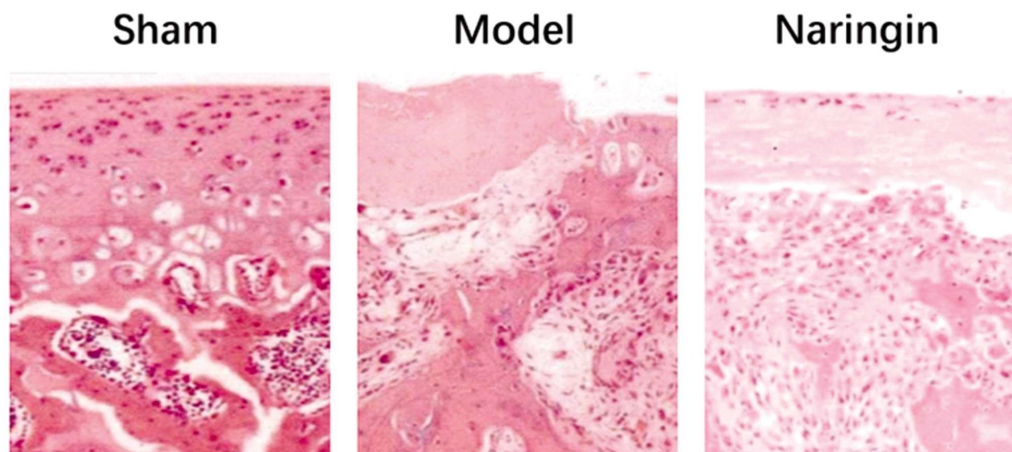


图 2 大鼠膝关节组织 HE 染色

Fig.2 HE staining of rat knee joint tissue

2.2 柚皮苷减弱骨关节炎大鼠的软骨退变

番红 O/ 固绿染色结果显示, 假手术组大鼠膝关节软骨结构正常, 而模型组大鼠膝关节软骨出现番红 O 失染现象, 局部结构破坏严重。柚皮苷组的膝关节软骨退变情况明显减轻。与

假手术组相比, 模型组大鼠的 OARSI 评分显著提高 (0.54 vs 2.63, $P<0.05$)。而与模型组相比, 柚皮苷组的 OARSI 评分显著降低 (2.63 vs 0.94, $P<0.05$)。见图 3。

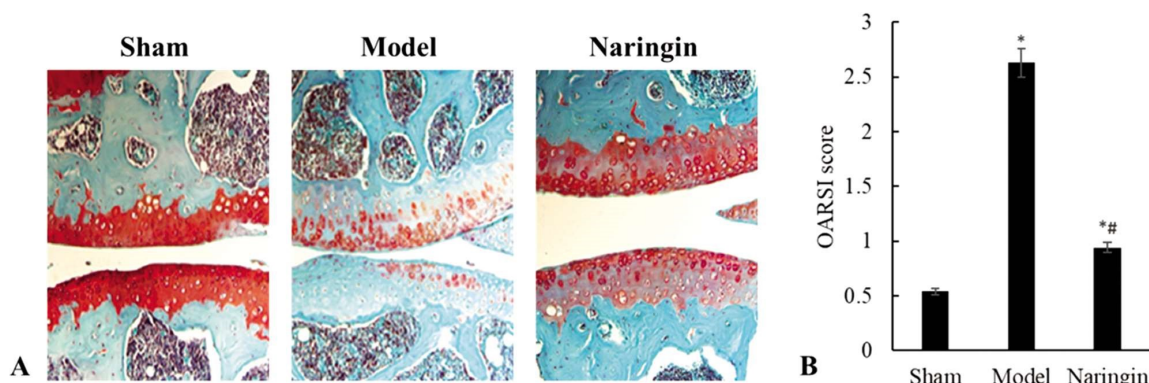


图 3 柚皮苷减弱骨关节炎大鼠的软骨退变

Fig.3 Naringin attenuated cartilage degeneration in osteoarthritis rats

Note: A: Saffron O / fast green staining ($\times 100$); B: OARSI score; Compared with the sham group, $*P<0.05$; Compared with the model group, $^{*}P<0.05$.

2.3 柚皮苷抑制骨关节炎大鼠软骨组织中 p-I κ B α 和 NLRP3 的表达

免疫组织化学染色显示, 模型组大鼠软骨组织中 p-I κ B α 和 NLRP3 主要为阳性表达, 而柚皮苷组的阳性染色细胞明显

减少 ($P<0.05$)。Western blot 结果也证实, 模型组的 p-I κ B α 和 NLRP3 蛋白表达水平显著高于假手术组, 而柚皮苷组的 p-I κ B α 和 NLRP3 蛋白表达水平显著低于模型组 ($P<0.05$)。见图 4。

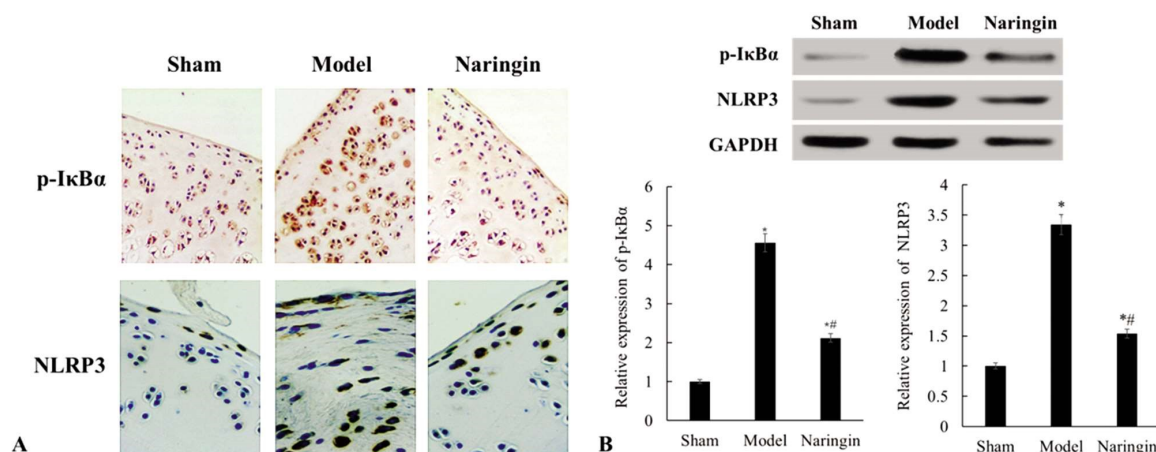


图 4 柚皮苷抑制骨关节炎大鼠软骨组织中 p-I κ B α 和 NLRP3 的表达

Fig.4 Naringin inhibited the expression of p-I κ B α and NLRP3 in cartilage tissue of osteoarthritis rats

Note: A: Immunohistochemical staining ($\times 200$); B: Western blot result; Compared with the sham group, $*P<0.05$;

Compared with the model group, $^{*}P<0.05$.

2.4 柚皮苷通过抑制软骨细胞中 NF- κ B 和 NLRP3 炎性体信号通路减轻软骨细胞损伤

RT-PCR 结果显示, 与对照组 SW1353 细胞相比, IL-1 β 诱导组细胞中 NF- κ B2、NLRP3、caspase-1、IL-6、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5 的 mRNA 表达水平均显著升高, 而 IL-10 显著降低 ($P<0.05$)。然而, 与 IL-1 β 组相比, IL-1 β + 柚皮苷组的 NF- κ B2、NLRP3、caspase-1、IL-6、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5 的 mRNA 表达水平均显著降低, 而 IL-10 显著升高 ($P<0.05$)。Western blot 结果与 RT-PCR 一致, NF- κ B 和 NLRP3 信号通路相关分子的蛋白表达也表现出相同的变化趋势。见图 5。

此外, 本研究还分别应用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 和 NLRP3

抑制剂 CY-09 来处理 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞, 结果与柚皮苷对 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路相关分子的调控作用一致。说明柚皮苷是通过调控 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路来抑制软骨退变及炎症反应。见图 6 和图 7。

2.5 柚皮苷通过抑制软骨细胞中 NF- κ B 和 NLRP3 炎性体信号通路抑制细胞凋亡

细胞凋亡检测结果显示, 与对照组相比, IL-1 β 组的 SW1353 细胞的凋亡率显著升高 ($P<0.05$), 而与 IL-1 β 组相比, IL-1 β + 柚皮苷组、IL-1 β +PDTC 组和 IL-1 β +CY-09 组的细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.05$)。见图 8。

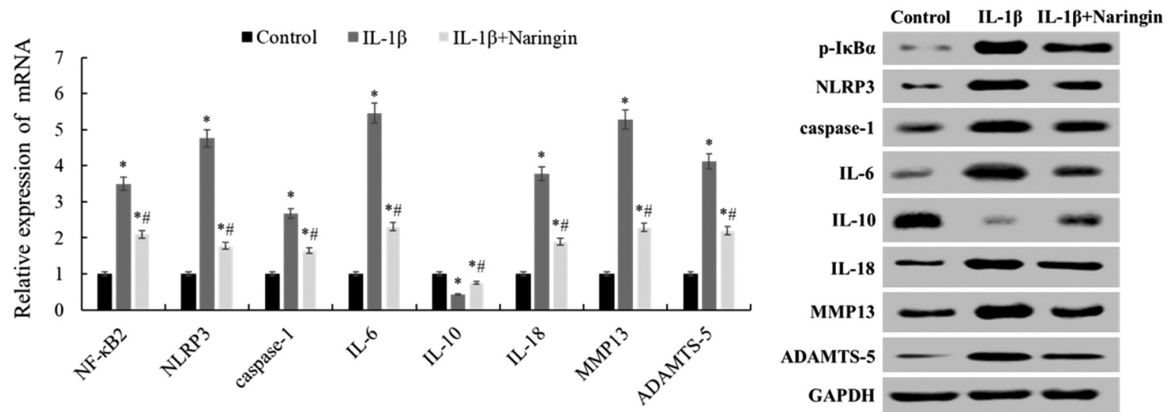


图5 柚皮苷对 SW1353 细胞中 NF-κB 和 NLRP3 炎症体信号通路相关分子表达的影响

Fig.5 Effect of naringin on the expression of NF-κB and NLRP3 inflammasome signaling pathway-related molecules in SW1353 cells

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the IL-1β group, # $P < 0.05$.

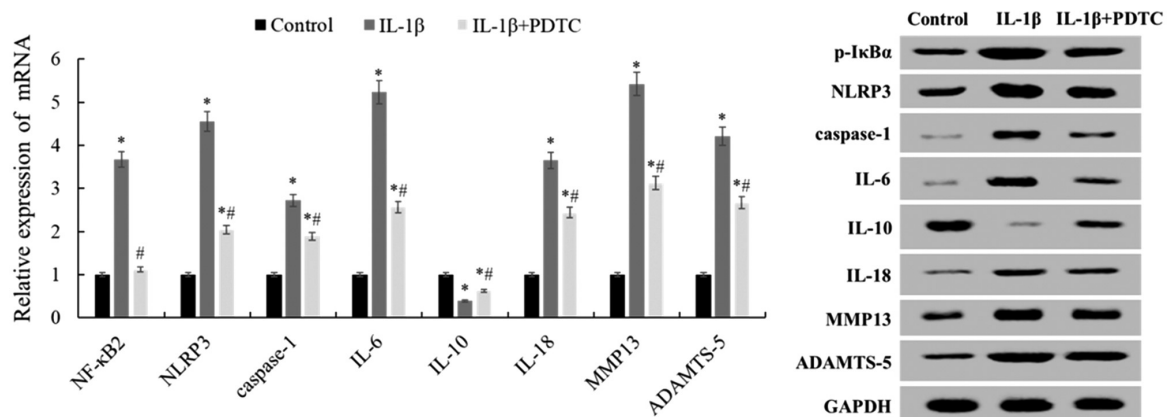


图6 NF-κB 抑制剂 PDTC 对 SW1353 细胞中 NF-κB 和 NLRP3 炎症体信号通路相关分子表达的影响

Fig.6 Effect of NF-κB inhibitor PDTC on the expression of NF-κB and NLRP3 inflammasome signaling pathway-related molecules in SW1353 cells

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the IL-1β group, # $P < 0.05$.

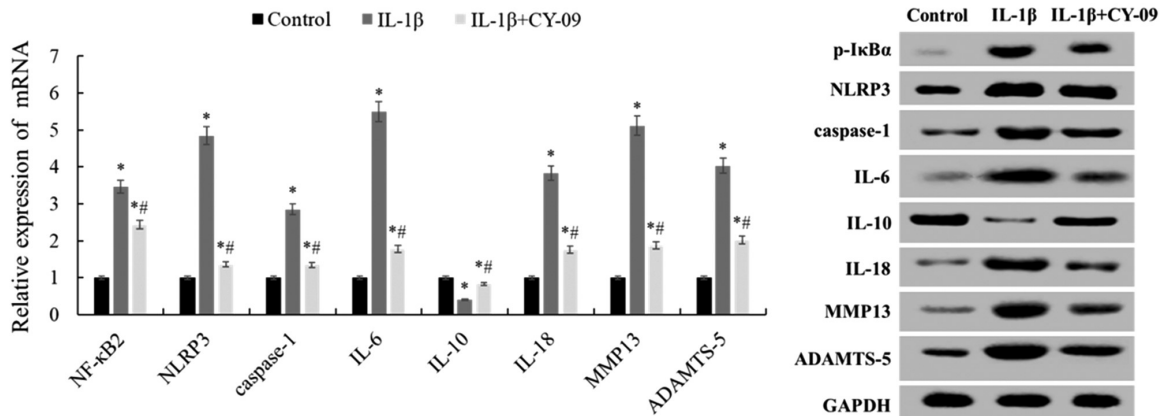


图7 NLRP3 抑制剂 CY-09 对 SW1353 细胞中 NF-κB 和 NLRP3 炎症体信号通路相关分子表达的影响

Fig.7 Effect of NLRP3 inhibitor CY-09 on the expression of NF-κB and NLRP3 inflammasome signaling pathway-related molecules in SW1353 cells

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the IL-1β group, # $P < 0.05$.

3 讨论

软骨细胞凋亡和细胞外基质降解是骨关节炎的主要病理变化^[12,13],虽然目前包括物理、药物、手术等治疗方法已经广泛开展,但通常无法达到治愈效果^[14,15],因此急需开发新的药物来治疗骨关节炎。柚皮苷(Naringin)是一种在芸香科柑橘属植物

的干燥果皮中提取的淡黄色双氢黄酮类化合物^[16]。柚皮苷的化学式为 4,5,7- 三羟基黄酮-7- 鼠李糖苷,分子式为 C₂₇H₃₂O₁₄,分子量为 80.53,在 1928 年 Asahina 和 Inubuse 首次阐明柚皮苷的化学结构^[17]。柚皮苷是一种多功能生物类黄酮,主要来自葡萄柚和其他柑橘类水果,据报道,柚皮苷具有抗衰老、抗炎、抗凋亡、抗癌、抗氧化、降血糖、清除自由基和心脏

和心血管保护作用^[18-21]。最近研究显示,柚皮苷在关节炎动物模型中发挥了关节保护作用^[3,4],柚皮苷对多种疾病的治疗机制涉

及抑制炎症、氧化应激损伤等方面,然而尚不清楚柚皮苷对骨关节炎的治疗机制。

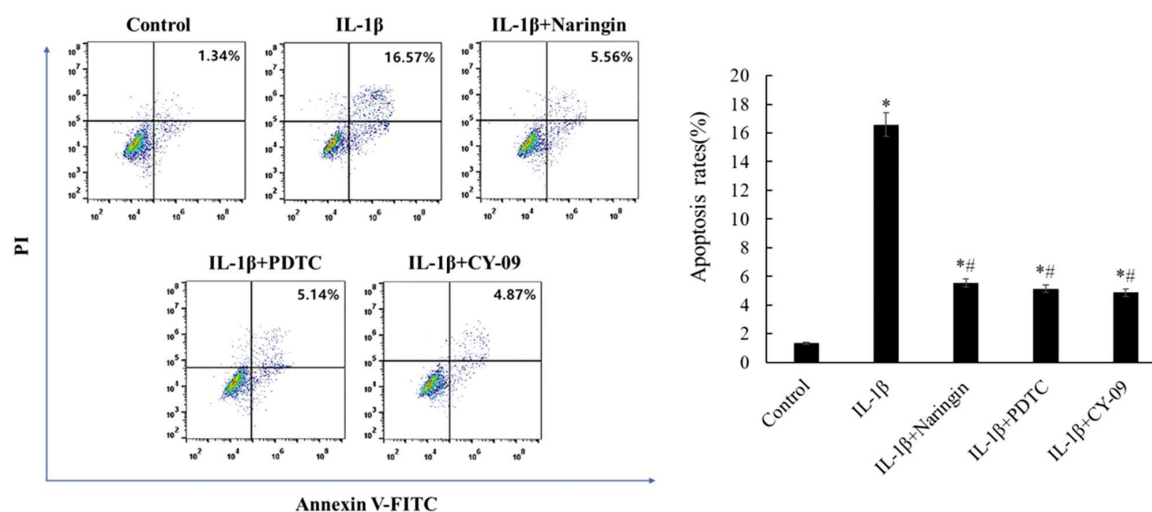


图8 柚皮苷通过抑制 SW1353 细胞中 NF- κ B 和 NLRP3 炎性体信号通路抑制细胞凋亡

Fig.8 Naringin inhibited apoptosis by inhibiting NF- κ B and NLRP3 inflammasome signaling pathways in SW1353 cells

Note: Compared with the control group, * P <0.05; Compared with the IL-1 β group, # P <0.05.

本研究通过切断大鼠右膝关节的前交叉韧带建立了骨关节炎模型,然后应用柚皮苷治疗大鼠 4 周,番红 O / 固绿染色证实了柚皮苷对骨关节炎大鼠膝关节软骨组织的保护作用, OARS1 评分结果也说明柚皮苷明显减轻了大鼠的关节软骨损伤程度。为了考察柚皮苷在治疗骨关节炎中的确切机制,本研究采用免疫组织化学染色检测了大鼠软骨组织中 p-I κ B α 和 NLRP3 的表达。由于 NF- κ B 信号通路是炎症反应的典型途径, NF- κ B 信号通路的激活可调节炎症细胞因子、基质降解酶和其他因子的释放。通常情况下, NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B α 以无活性形式存在于细胞质中, 当 NF- κ B 信号通路激活后, 活化的 NF- κ B 转位到核内与其相关的 DNA 基序结合并诱导靶基因的转录^[22,23]。NF- κ B 信号通路的激活可导致软骨破坏,其他研究发现柚皮苷在糖尿病心肌病、椎间盘退变中对 NF- κ B 信号通路具有抑制作用^[6]。Ran 等人研究发现,复方五味子素 B 可通过 NF- κ B 信号通路来发挥治疗骨关节炎的作用^[24]。本研究发现,骨关节炎大鼠软骨组织中 p-I κ B α 的表达水平显著升高,而柚皮苷可显著降低 p-I κ B α 的表达。提示柚皮苷可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活来发挥关节软骨保护作用。

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症体信号通路参与介导骨关节炎的发病过程,NLRP3 炎性体通过调节促炎性细胞因子和降解酶的释放参与各种关节炎疾病的发生发展^[25]。例如,兔膝骨性关节炎模型关节软骨中 NLRP3 的水平显著升高^[26]。NLRP1 和 NLRP3 参与介导脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的成纤维样滑膜细胞的凋亡,抑制 NLRP1 和 NLRP3 可明显抑制凋亡相关细胞因子的表达^[27]。最近的研究报道,姜黄素或雌二醇主要通过抑制 NLRP3 炎性体信号通路来抑制炎症反应并发挥关节保护作用^[28]。本研究发现,骨关节炎大鼠软骨组织中 NLRP3 的表达水平显著升高,而柚皮苷可显著降低 NLRP3 的表达。提示柚皮苷可能通过抑制 NLRP3 炎性体信号通路来抑制炎症反应。

炎症在骨关节炎的发生发展中起着重要作用,多项研究均报道了骨关节炎、类风湿关节炎、滑膜炎中的促炎细胞因子如 TNF α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平明显升高^[29]。因此,早期阻断炎症途径可能有助于抑制骨关节炎疾病的进展。张昀等^[7]应用不同浓度的柚皮苷处理骨关节炎软骨细胞 24 h,然后应用炎症因子混合液(IL-1 β 5 ng/ml 和 TNF- α 20 ng/ml)共作用 24 h,发现柚皮苷显著减轻了炎症因子诱导的软骨细胞凋亡,并且抑制了一氧化氮(NO)的合成和 caspase 信号通路的激活。该研究说明 caspase 信号通路的抑制可减少软骨细胞凋亡。殷方明等人^[30]应用柚皮苷治疗胶原诱导小鼠关节炎模型 20 d,发现柚皮苷可通过抑制对 HIF-1 α 上游的炎症因子 IL-6、TNF- α 及下游的 CXCR4 来降低胶原诱导小鼠炎症反应。然而,张昀等^[7]和殷方明等^[30]的研究并未深入探讨柚皮苷对调控 caspase 或炎症因子 IL-6、TNF- α 的信号通路的影响,并且检测指标较少。

多项研究证实,IL-1 β 可在体外诱导骨关节炎,并诱导软骨细胞中 aggrecan 和 collagen II 的下调^[31],而 aggrecan 和 collagen II 是关节软骨细胞外基质的主要组分,对关节软骨的结构和功能具有重要作用^[32]。为了进一步揭示柚皮苷对软骨破坏的保护作用及对炎症反应的调控机制,本研究在体外用 IL-1 β 处理 SW1353 细胞来模拟骨关节炎软骨细胞的炎症微环境。观察到 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞中 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路相关分子(caspase-1、IL-6、IL-10、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5)的表达水平发生明显变化。caspase-1 在多种疾病中参与介导细胞凋亡和细胞焦亡,可导致细胞溶解和胞浆内含物释放到细胞外环境。caspase-1 介导的细胞凋亡和细胞焦亡在动脉硬化、视网膜炎、神经系统疾病等多种疾病中起调节作用,抑制 caspase-1 的表达可降低慢性关节炎的关节病理改变^[33]。此外,caspase-1 是 NLRP3 的下游靶基因。IL-6 和 IL-18 是促炎细胞因子,而 IL-10 是抗炎细胞因子。MMP-13 参与骨关节炎软骨退变,其对 collagen II 具有强大的水解作用^[34]。ADAMTS-4 是与

关节疾病相关的 ADAMTS 家族聚集蛋白聚糖酶^[35]。敲除 ADAMTS-4 会减弱由炎症介质引起的软骨细胞中 aggrecan 的降解,从而发挥骨关节炎保护作用^[36]。IL-6、IL-10、IL-18、MMP13 和 ADAMTS-5 均是 NF- κ B 信号通路的下游靶基因。为了证实柚皮苷对骨关节的保护作用是否通过 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路介导,本研究分别应用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 和 NLRP3 抑制剂 CY-09 来处理 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞,结果与柚皮苷对 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路相关分子的调控作用一致。证实了柚皮苷是通过调控 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路来抑制软骨退变及炎症反应。另外,细胞凋亡与骨关节炎的发生发展密切相关,软骨细胞凋亡是骨关节炎的主要病理特征^[37,38]。本研究发现柚皮苷处理通过抑制 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路显著阻滞了 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。

虽然目前已经有许多学者研究了柚皮苷的药用价值,然而柚皮苷在骨关节炎方面的研究较少,且大多数研究集中在体外细胞层面,缺乏柚皮苷在体内对骨关节炎治疗方面的数据。因此,本研究从体内和体外两个方面探讨了柚皮苷治疗骨关节炎的潜在价值。另外,目前关于柚皮苷对 NLRP3 信号通路的调控方面的文献鲜见报道。本研究表明柚皮苷可在体内和体外抑制骨关节炎的进展。柚皮苷对骨关节炎的治疗作用部分依赖于对 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路的抑制。因此,柚皮苷在治疗骨关节炎方面具有较高的潜在应用价值。在接下来的研究中,需要进一步比较柚皮苷与常用骨关节炎治疗药物在治疗骨关节炎方面的优势和劣势。

参考文献(References)

- [1] 李涛,宋奇志,裴建祥,等. 体外冲击波治疗早中期膝关节骨关节炎的近期临床疗效观察[J]. 重庆医学, 2017, 46(3): 338-340
- [2] 陈芬琴,王秋月. 柚皮苷对糖尿病肾脏疾病的作用机制 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2017, 37(4): 239-253
- [3] Rong W, Pan YW, Cai X, et al. The mechanism of Naringin-enhanced remyelination after spinal cord injury [J]. Neural Regeneration Research, 2017, 12(3): 470-477
- [4] Liu LH, Zuo ZF, Lu SJ, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- κ B activation in vivo and in vitro [J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2017, 20(7): 814-822
- [5] Bowles RD, Mata BA, Bell RD, et al. In vivo luminescent imaging of NF- κ B activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis[J]. Arthritis and Rheumatology, 2014, 66(3): 637-646
- [6] Sun H, Liu K, Meng Q, et al. Naringin inhibits TNF- α induced oxidative stress and inflammatory response in HUVECs via Nox4/NF- κ B and PI3K/Akt pathways [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(12): 1173-1182
- [7] 张昀,殷方明,王永森,等. 柚皮苷抑制骨关节炎软骨细胞凋亡实验研究[J]. 国际骨科学杂志, 2014, 35(5): 329-332
- [8] Xu Q, Zhang Z, Sun W. Effect of naringin on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rats [J]. Medical Science Monitor, 2017, 23: 3746
- [9] Zhao LR, Xing RL, Wang PM, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP induced pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4): 5463-5469
- [10] Chen WH, Lo WC, Hsu WC, et al. Synergistic anabolic actions of hyaluronic acid and platelet-rich plasma on cartilage regeneration in osteoarthritis therapy[J]. Biomaterials, 2014, 35(36): 9599-9607
- [11] Zhang W, Nuki G, Moskowitz R W, et al. OARS recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009 [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2010, 18(4): 476-499
- [12] 吴毅华,罗高斌,黄煜朗,等. 关节镜下清理术联合腓骨截骨术治疗膝关节骨性关节炎的疗效及对炎性因子的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(10): 1966-1969
- [13] 贾笛,李彦林,王坤,等. 非编码 RNA 调控骨关节炎的分子生物学研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, (3): 374-378
- [14] 王晓玲,陈峰,王勇,等. 膝关节炎患者静态平衡能力的影响因素分析[J]. 中国全科医学, 2017, 20(20): 2464-2468
- [15] 李冬生,李剑锋,张建,等. 人工全膝关节置换术治疗老年重度膝关节骨性关节炎临床观察[J]. 山东医药, 2017, 57(20): 74-76
- [16] Nday CN, Eleftheriadou D, Jackson G. Naringin nanoparticles against neurodegenerative processes: A preliminary work [J]. Hell J Nucl Med, 2019, 22: 32-41
- [17] Lavrador P, Gaspar VM, Mano JF. Bioinspired bone therapies using naringin: applications and advances [J]. Drug discovery today, 2018, 23(6): 1293-1304
- [18] Alam MA, Subhan N, Rahman MM, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action[J]. Adv Nutr, 2014, 5(4): 404-417
- [19] Aroui S, Najlaoui F, Chtourou Y, et al. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway[J]. Tumor Biology, 2016, 37(3): 3831-3839
- [20] Dhanya R, Arun KB, Nisha VM, et al. Preconditioning L6 muscle cells with naringin ameliorates oxidative stress and increases glucose uptake[J]. Plos One, 2015, 10(7): e0132429
- [21] Chen R, Qi QL, Wang MT, et al. Therapeutic potential of naringin: an overview[J]. Pharmaceutical biology, 2016, 54(12): 3203-3210
- [22] Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria[J]. Cell, 2016, 164(5): 896-910
- [23] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 545-558
- [24] Jisheng R, Chiyan M, Kai X, et al. Schisandrin B ameliorated chondrocytes inflammation and osteoarthritis via suppression of NF- κ B and MAPK signal pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 1195-1204
- [25] 党万太,谢文光,赵明才,等. 痛风性关节炎患者 NLRP3 炎性体基因转录剪接体 mRNA 表达与临床检测指标的相关分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(16): 1713-1719
- [26] 孙银铁,郭开今,蔡红星. NOD2、NLRP3 在石膏关节制动法建立兔膝骨性关节炎模型关节软骨中的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(8): 1211-1216
- [27] Zhao LR, Xing RL, Wang PM, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP induced pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4): 5463-5469

- (2): 361-366
- [18] 刘阳, 秦旭平, 李洁. 血管胰岛素抵抗与 PI3K 通路关系的研究进展[J]. 湘南学院学报(医学版), 2015, 17(04): 72-75
- [19] David L Morris, Kae Won Cho, Yingjiang Zhou, et al. SH2B1 Enhances Insulin Sensitivity by Both Stimulating the Insulin Receptor and Inhibiting Tyrosine Dephosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins[J]. Diabetes, 2009, 58(9): 2039-2047
- [20] Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, et al. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Enhances Mitogenic Actions of Insulin in Endothelial Cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(3): 1794-1799
- [21] 洪郁芝, 李真真. 糖尿病肾病与胰岛素抵抗[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(9): 843-845
- [22] K Hotta, T Funahashi, Y Arita, et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(6): 1595-1599
- [23] Xing JH, Li R, Gao YQ, et al. NLRP3 inflammasome mediate palmitate-induced endothelial dysfunction[J]. Life Sci, 2019, 239: 116882
- [24] Mezza T, Cinti F, Cefalo CMA, et al. β -Cell Fate in Human Insulin Resistance and Type 2 Diabetes: A Perspective on Islet Plasticity[J]. Diabetes, 2019, 68(6): 1121-1129
- [25] Massimo Federici, Assunta Pandolfi, Elena Anna De Filippis, et al. G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells [J]. Circulation, 2004, 109(3): 399-405
- [26] Yarbeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8152-8161
- [27] Han P, Shao M, Guo L, et al. Niclosamide ethanolamine improves diabetes and diabetic kidney disease in mice[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(4): 1071-1084
- [28] Ferruh Artunc, Erwin Schleicher, Cora Weigert, et al. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(12): 721-737
- [29] Cullen M Taniguchi, Brice Emanuelli, C Ronald Kahn. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(2): 85-96
- [30] Yu S, Zhao H, Yang W, et al. The Alcohol Extract of Coreopsis tinctoria Nutt Ameliorates Diabetes and Diabetic Nephropathy in db/db Mice through miR-192/miR-200b and PTEN/AKT and ZEB2/ECM Pathways [J]. BioMed research international, 2019, 2019, 5280512-5280514

(上接第 2424 页)

- [28] Sun Y, Liu W, Zhang H, et al. Curcumin Prevents Osteoarthritis by Inhibiting the Activation of Inflammasome NLRP3[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2017, 37(10): 449-455
- [29] Scanzello CR, Umoh E, Pessier F, et al. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(8): 1040-1048
- [30] 殷方明, 肖涟波, 张昀, 等. 柚皮苷抑制胶原诱导小鼠关节炎作用机制的实验研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(3): 285-288
- [31] Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, et al. MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 β -induced catabolic effects in human chondrocytes [J]. Arthritis & Rheumatism, 2013, 65(12): 3141-3152
- [32] Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis [J]. Journal of cellular biochemistry, 2011, 112(12): 3507-3514
- [33] Joosten LAB, Netea MG, Fantuzzi G, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107188
- [34] Takaishi H, Kimura T, Dalal S, et al. Joint Diseases and Matrix Metalloproteinases: A Role for MMP-13 [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9(1): 47-54
- [35] Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, et al. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation[J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2001, 9(6): 539-552
- [36] Majumdar MK, Askew R, Schelling S, et al. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis & Rheumatism, 2014, 56(11): 3670-3674
- [37] 沈鹏飞, 瞿玉兴, 王斌, 等. miR-30a-5p 靶向作用蛋白激酶 B 基因促进骨关节炎患者软骨细胞的凋亡 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(39): 3079-3084
- [38] 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