汉黄芩素调节炎症通路对膝骨关节炎大鼠炎性损伤的影响

李会东，杨学钰，郭文帆，郑雪君，卢吉高，杨 勇
（张家口市第二医院运动医学科，河北张家口 075000）

摘要：目的 探讨汉黄芩素（wogonin，Wog）调节核因子（nuclear factor，NF）红系 2 相关因子（NF-erythroid 2-related factor，Nrf2）/Toll 样受体（Toll like receptor，TLR）4/NF-κB 通路对膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）大鼠的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、Wog 低、中及高剂量（10、30 及 90 mg/kg）组，阳性对照组（塞来昔布，24 mg/kg），每组 10 只，用木瓜蛋白酶建立 KOA 大鼠模型，灌胃 28 d。检测大鼠机械痛和冷痛阈值、软骨病理变化、细胞凋亡、炎症因子、氧化应激和蛋白表达水平。**结果** 在术后 D7、D14、D21、D28，较模型组，Wog 中、高剂量组和阳性对照组机械痛阈值、冷痛阈值显著上升；软骨病理损伤显著好转；细胞凋亡率、白介素（interleukin，IL）-6、IL-1β、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α、丙二醛、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（caspase）-3 和 caspase-9、基质金属蛋白酶（matrix metallopeptidase，MMP）-1 和 MMP-13、TLR4 蛋白水平以及核 / 总 NF-κB p65 蛋白比值均显著降低；超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶活性、Nrf2 以及血红素加氧酶 -1 蛋白水平均显著增加（$P < 0.01$）。**结论** Wog 减轻 KOA 大鼠炎性损伤的机制可能与上调 Nrf2 表达及抑制 TLR4/NF-κB 活化有关。

关键词：汉黄芩素；膝骨关节炎；炎性损伤；氧化应激；核因子红系 2 相关因子 /Toll 样受体 4/ 核因子 -κB 信号通路
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）06-0552-09
DOI：10.13683/j.wph.2023.06.007

Effects of wogonin regulating inflammatory pathway on inflammatory injury in rats with knee osteoarthritis

LI Huidong, YANG Xueyu, GUO Wenfan, ZHENG Xuejun, LU Jigao, YANG Yong
（*Department of Sports Medicine, Zhangjiakou Second Hospital, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China*）

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of wogonin（Wog） on knee osteoarthritis（KOA） in rats by regulating nuclear factor（NF）-erythroid 2-related factor（Nrf2）/Toll like receptor 4（TLR4）/NF-κB signaling pathway. ***Methods*** SD rats were randomly divided into normal group, model group, Wog low, medium and high dose（10, 30 and 90 mg/kg） groups, and positive control group（celecoxib, 24 mg/kg）, with 10 rats in each group. KOA model was established by gavage of papain for 28 days. The mechanical and cold pain thresholds, pathological changes of cartilage, cell apoptosis, inflammatory factors, oxidative stress and protein expression levels were detected. ***Results*** At postoperative D7, D14, D21, and D28, compared with the model group, the mechanical pain threshold and cold pain threshold of Wog medium and high dose groups and positive control group were significantly increased. Pathological damage of cartilage was significantly improved. Cell apoptosis rate, interleukin（IL）-6, IL-1β, tumor necrosis factor（TNF）-α, malondialdehyde, caspase-3, caspase-9, matrix metalloproteinase（MMP）-1, MMP-13, TLR4 protein level and the ratio of nuclear/total NF-κB p65 protein were significantly decreased. The activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, Nrf2 and heme oxygenase-1 protein were significantly increased（$P<0.01$）. ***Conclusion*** The mechanism of Wog reducing inflammatory damage in KOA rats may be related to upregulating Nrf2 expression and inhibiting TLR4/NF-κB activation.

Key words: wogonin; knee osteoarthritis; inflammatory injury; oxidative stress; nuclear factor-erythroid 2-related factor

收稿日期：2022-09-26；**修回日期：**2023-02-03
作者简介：李会东，副主任医师，研究方向：骨关节炎、膝骨关节炎。

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）常表现为关节功能障碍、疼痛、僵硬、甚至丧失自由活动能力，且易致残[1]，其主要诱因为炎症[2—3]。当细胞受到炎性损伤时，会激活核因子（nuclear factor，NF）红系 2 相关因子（NF-erythroid 2-related factor，Nrf2），诱导血红素加氧酶（heme oxygenase，HO）-1 表达，达到细胞抗氧化目的[4—5]。而 Toll 样受体（Toll-like receptor，TLR）4/NF-κB 是机体发生炎症反应的重要通路[6]。目前治疗 KOA 的西医药物，如非甾体抗炎药或选择性环氧化酶（cyclooxygenase，COX）-2 抑制剂，仅用于缓解疼痛，并不能有效改善软骨健康，因此仍需要寻找可减轻或逆转软骨损伤的药物。

汉黄芩素（wogonin，Wog）属于黄酮类化合物，提取自黄芩根部，具有抗炎、抗病毒及抗肿瘤等多种药理活性[7]。研究表明，汉黄芩素可减轻 NF-κB p65 介导的炎症反应，抑制细胞凋亡[8]。在结肠炎的治疗中，Wog 调节 Nrf2 信号通路，可降低 TLR4 和 NF-κB p65 表达，减轻炎性细胞浸润和炎性损伤[9]。还有研究显示，治疗 KOA 小鼠时，使用 Wog 治疗可减轻 KOA 小鼠的炎症反应，并且降低 KOA 生物标志物的表达[10]。因此本研究建立 KOA 大鼠模型，使用 Wog 给药干预，探讨抗氧化应激通路和促炎通路 Nrf2/TLR4/NF-κB 在 KOA 大鼠炎性损伤发挥的作用，研究 Wog 减轻 KOA 炎症反应的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用周龄为 6 ～ 7 周的 SD 雄性大鼠 72 只，体质量 170 ～ 220 g，购自广州锐格生物科技有限公司，SCXK（粤）2021-0059，SYXK（冀）2021-005，所有大鼠饲养于本院实验动物中心，自由进食标准的饲料，随意饮用自来水，温度为（20±2）℃，湿度（50±10）%，12/12 h 光暗条件下分笼饲养。

1.2 试剂与仪器

Wog 标准品（HPLC ≥ 99%，10 mg，W820521）购自上海麦克林生化科技有限公司；木瓜蛋白酶（25 g，S10011）购自上海源叶生物科技有限公司；塞来昔布（1120120）购自美国辉瑞制药；白介素（interleukin，IL）-6（ml064292）、IL-1β（ml037361）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 试剂盒（ml002859）购自上海科艾博生物技术有限公司；苏木精 - 伊红（hematoxylin eosin，HE）染色试剂盒（G1120）、TUNEL 染色试剂盒（T2190）、丙二醛（malondialdehyde，MDA，BC0025）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD，BC0175）以及谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px，BC1195）检测试剂盒、BCA 试剂盒（PC0020）均购自北京索莱宝科技有限公司；兔抗鼠 Nrf2（100 μl，PA5-119633）、TLR4（100 μg，PA5-23124）抗体均购自赛默飞世尔科技中国有限公司；兔抗鼠 HO-1（100 μl，ab68477）、NF-κB p65（100 μl，ab76302）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（caspase）-3（100 μl，ab184787）、caspase-9（100 μl，ab184786）、基质金属蛋白酶（matrix metallopeptidase，MMP）-1（100 μl，ab137332）、MMP-13（100 μl，ab219620）、核纤层蛋白 B（100 μl，ab16048）、β- 肌动蛋白（β-actin，100 μl，ab8226）抗体及羊抗兔免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G 二抗（100 μl，ab6721）均购自艾博抗（上海）贸易有限公司。Varioskan LUX 多功能酶标仪（VLBLATGD2）、Sorvall ST4 Plus 离心机（75016056）均购自赛默飞世尔科技中国有限公司；光学显微镜（BX53M）购自奥林巴斯（中国）有限公司；Electric Von Frey 电子式机械痛测量仪（2091 型）购自上海玉研科学仪器有限公司；冷痛敏测量仪（35100）购自香港友诚生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 造模与分组

将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、Wog 低、中和高剂量组以及阳性对照（塞来昔布）组，每组各 12 只。根据 Yao 等[11] 的研究，采用关节腔注入木瓜蛋白酶的方式建立 KOA 大鼠模型。末次注射木瓜蛋白酶 1 周后，每组随机选取 2 只大鼠，取关节

软骨石蜡切片进行 HE 染色，大鼠软骨出现裂隙、结构受损，细胞排列紊乱，潮线完整性受损，说明模型构建成功。造模成功后，其中 Wog 低、中及高剂量组分别按照10、30及90 mg/kg剂量[6]的Wog灌胃，阳性药物组给予 24 mg/kg 塞来昔布灌胃[12]，正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃，所有大鼠一日 1 次，连续给药 28 d。

1.3.2 疼痛阈值测定

在造模手术前 1 d(D0)、术后 D7、D14、D21 和 D28 测定各组大鼠的机械痛阈值和冷痛阈值，机械痛采用电子机械痛测量仪测定，冷痛采用冷痛敏测量仪测定，记录首次缩足反应的时间，均重复 3 次。

1.3.3 样本采集

末次给药结束 12 h 后，3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉，收集腹主动脉取血 0.8 ml，−20 ℃冷冻，后处死所有大鼠，收集双侧膝关节软骨组织，左膝软骨组织用多聚甲醛固定进行后续 HE 染色和 TUNEL 染色，右膝软骨组织保存于 −80 ℃冰箱备用。

1.3.4 观察软骨组织病理学变化及病理学评分

将收集的左膝软骨组织进行固定、脱水、浸蜡以及包埋等操作后，HE 染色，显微镜下观察病理学变化，拍照。Mankin 评分细则[13]：软骨结构、细胞、基质染色正常，潮线完整，记为 0 分；软骨出现裂隙，弥漫性细胞增加，基质染色轻微减少，潮线被破坏，记为 1 分；软骨裂隙达肌层，细胞簇状，基质染色减退加深，记为 2 分；软骨裂隙达辐射层，细胞数目大幅减少，基质染色进一步减退，记为 3 分；软骨裂隙达钙化层，基质染色完全消失，记为 4 分；软骨层脱落，记为 5 分。

1.3.5 TUNEL 染色检测软骨组织细胞凋亡

将“**1.3.4**”制备的左膝软骨组织石蜡切片脱水后，采用 TUNEL 染色试剂盒染色，光学显微镜下观察并拍照，凋亡细胞为棕黄色细胞，对这些细胞进行计数，细胞凋亡率＝凋亡细胞数目 / 细胞总数 ×100%。

1.3.6 血清炎性因子检测

将取得腹主动脉血进行低温冷冻离心后，保留上清，按照酶联免疫吸附检测试剂盒说明书检测血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的水平。

1.3.7 氧化应激因子检测

采用 MDA、SOD、GSH-Px 试剂盒检测右膝软骨组织氧化应激因子，根据操作说明书，在酶标仪中读取对应波长的吸光值进行计算。

1.3.8 蛋白印迹法（western blot，WB）检测蛋白水平

将右膝软骨组织剪碎，液氮冷冻后在冰上研磨，然后加入预冷的裂解液，冰上匀浆后，4 ℃ 12 000 rpm 离心 20 min，取上清液，利用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量，然后进行电泳、转膜，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后加入 caspase-3、caspase-9、MMP-1、MMP-13、Nrf2、HO-1、TLR4、NF-κB p65 以及核纤层蛋白 B 一抗（1 ∶ 1 000），孵育 12 h 后，PBS 洗膜，加入羊抗兔 IgG 二抗（1 ∶ 2 000），室温封闭 1 h，以 β-肌动蛋白（actin）(1 ∶ 1 000) 为内参，ECL 显色，利用各条带灰度值计算蛋白水平。

1.4 统计与方法

采用 SPSS26.0 软件分析数据，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，两两间比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠疼痛阈值的影响

如表 1、2 所示，各组大鼠造模前 D0 机械痛阈值、冷痛阈值差异均无统计学意义（$P>0.01$）；模型组在术后 D7、D14、D21 及 D28 的机械痛阈值、冷痛阈值较正常组显著降低（$P<0.01$）；Wog 中剂量组在术后 D14、D21 的机械痛阈值较模型组显著上升（$P<0.01$），高剂量组和阳性对照组在术后 D7、D14、D21、D28 的机械痛阈值较模型组显著上升（$P<0.01$），Wog 低、中、高剂量组和阳性对照组在术后 D7、D14、D21、D28 的冷痛阈值较模型组显著上升（$P<0.01$）；Wog 低剂量组与模型组机械痛阈值差异无统计学意义（$P>0.01$）。

2.2 不同浓度 Wog 对大鼠软骨组织病理学变化的影响

如图 1 所示，正常组大鼠软骨组织结构正常，细胞排列整齐，潮线完整；模型组大鼠软骨结构受损严重，细胞排列紊乱，软骨出现裂隙，潮线完整性受损；Wog 低、中及高剂量组处理后，随着浓度增加，软骨层破坏程度逐渐减轻，裂隙减少，细胞排列渐趋均匀；阳性药物组大鼠软骨受损显著好转。

如表 3 所示，模型组 Mankin 评分显著高于正常组，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；Wog 低、中、高剂量组和阳性对照组 Mankin 评分显著低于模型组，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。

2.3 不同浓度 Wog 对大鼠软骨细胞凋亡的影响

如图 2、3、表 4 所示，模型组大鼠软骨细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 表达水平显著高于正常组，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；Wog 中、高剂量组和阳性对照组大鼠软骨细胞凋亡

表 3 软骨组织 Mankin 评分（n = 10，单位：分）

Table 3 Mankin score of cartilage tissue

(n=10, unit: score)

组别	Mankin评分
正常组	0.33±0.03
模型组	4.98±0.16*
Wog低剂量组	4.55±0.22#
Wog中剂量组	3.86±0.19#
Wog高剂量组	2.85±0.13#
阳性对照组	3.11±0.12#
*F*值	1 159.994
*P*值	＜0.001

注：较正常组，*P＜0.01；较模型组，#P＜0.01。

Note: *vs* normal group, *P＜0.01; *vs* model group, #P＜0.01.

表 1 Wog 处理对大鼠机械痛阈值的影响（n = 10）

Table 1 Effects of Wog treatment on mechanical pain threshold in rats(n=10)

组别	D0	D7	D14	D21	D28
正常组	25.51±1.53	26.58±1.21	27.15±1.45	27.11±1.28	26.88±1.56
模型组	25.44±1.66	16.88±2.11*	13.36±1.56*	13.11±1.54*	13.01±2.11*
Wog低剂量组	26.21±1.89	17.22±1.55	13.98±1.98	13.56±1.96	13.69±0.99
Wog中剂量组	26.11±1.55	19.11±1.45	16.01±1.88#	15.76±1.66#	15.07±1.22
Wog高剂量组	25.91±1.66	20.99±2.01#	17.88±1.21#	16.88±1.47#	16.79±1.54#
阳性对照组	25.46±2.01	21.01±1.36#	19.59±0.89#	16.44±1.36#	16.89±0.79#
*F*值	0.404	46.362	107.740	107.475	124.620
*P*值	0.844	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P＜0.01；较模型组，#P＜0.01。

Note: *vs* normal group, *P＜0.01; *vs* model group, #P＜0.01.

表 2 Wog 处理对大鼠冷痛阈值的影响（n = 10）

Table 2 Effects of Wog treatment on cold pain threshold of rats(n=10)

组别	D0	D7	D14	D21	D28
正常组	12.45±0.11	12.68±0.12	12.51±0.06	12.48±0.04	12.74±0.11
模型组	12.52±0.05	7.58±0.08*	7.55±0.05*	7.61±0.08*	7.54±0.11*
Wog低剂量组	12.48±0.09	8.01±0.15#	8.19±0.08#	8.11±0.06#	8.29±0.09#
Wog中剂量组	12.51±0.05	8.69±0.15#	8.78±0.08#	9.12±0.11#	10.05±0.12#
Wog高剂量组	12.53±0.06	9.33±0.11#	9.83±0.11#	10.26±0.07#	11.66±0.10#
阳性对照组	12.55±0.10	9.55±0.16#	10.13±0.09#	10.35±0.06#	11.80±0.09#
*F*值	2.021	1 910.972	4 788.609	5 845.323	4 029.691
*P*值	0.090	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P ＜ 0.01；较模型组，#P ＜ 0.01。

Note: *vs* normal group, *P ＜ 0.01; *vs* model group, #P ＜ 0.01.

率和凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 表达水平显著低于模型组，差异有统计学意义（$P < 0.01$），Wog 低剂量组与模型组差异无统计学意义（$P > 0.01$）。

2.4 不同浓度 Wog 对大鼠软骨组织氧化应激的影响

如表 5 所示，模型组大鼠 MDA 水平显著高于正常组，SOD、GSH-Px 水平显著低于正常组，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；Wog 中、高剂量组和阳性对照组大鼠 MDA 水平显著低于模型组，SOD 水平显著高于模型组，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；Wog 低剂量组与模型组 MDA、SOD、GSH-Px 水平差异均无统计学意义，Wog 中剂量组与模型组 GSH-Px 水平差异无统计学意义（$P > 0.01$）。

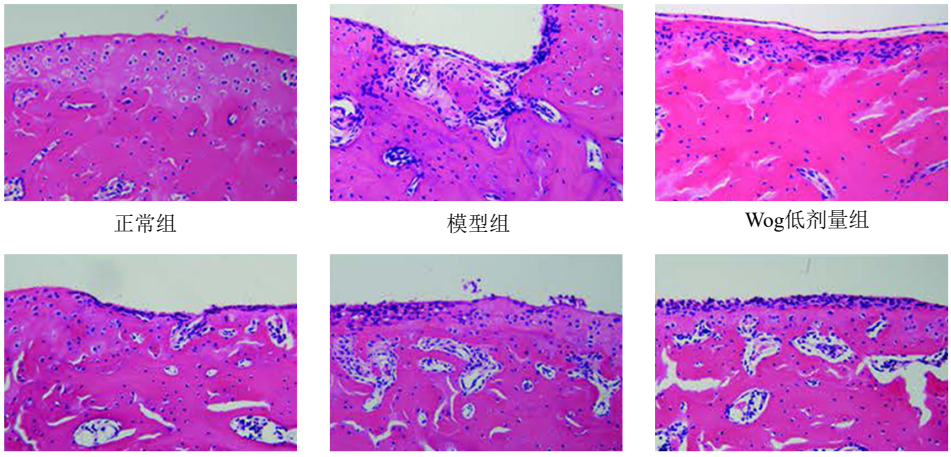


图 1 HE 染色观察大鼠软骨组织病理学变化（×200）

Figure 1 HE staining observation of pathological changes of rat cartilage tissue（×200）

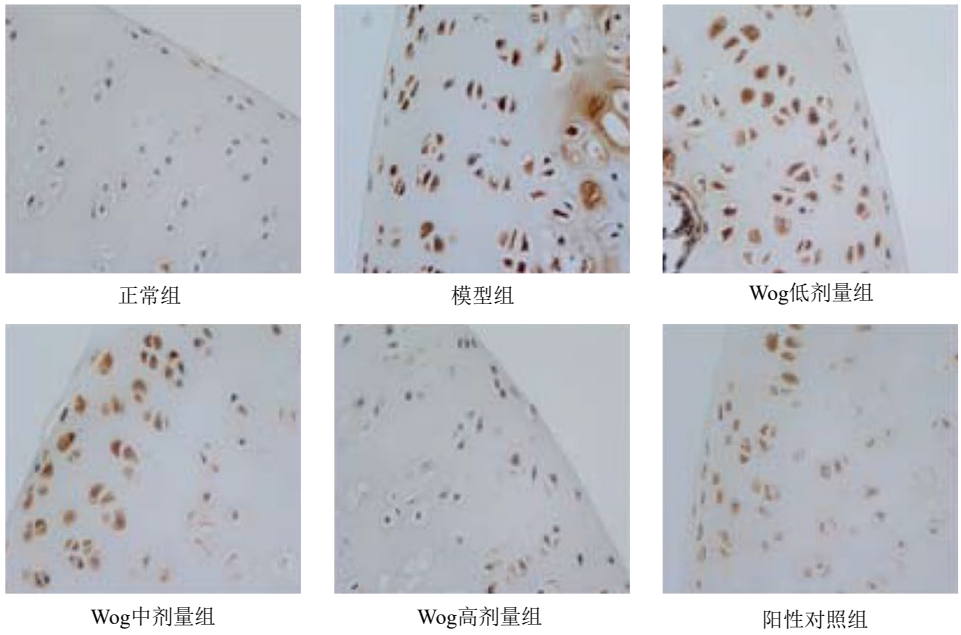


图 2 TUNEL 检测各组大鼠软骨组织细胞凋亡（×200）

Figure 2 TUNEL detected the apoptosis of rat cartilage tissue in each group（×200）

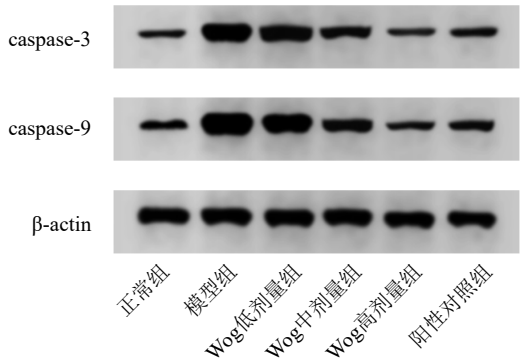


图 3 WB 法检测各组大鼠软骨组织中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达

Figure 3 The expression of caspase-3 and caspase-9 proteins in the cartilage tissues of rats in each group detected by WB

表 4 各组大鼠软骨组织细胞凋亡率及凋亡蛋白表达水平（n = 10）

Table4 Apoptosis rate and expression level of apoptotic protein in cartilage tissue of rats in each group（n=10）

组别	凋亡率/%	caspase-3	caspase-9
正常组	5.33±0.45	0.36±0.05	0.48±0.05
模型组	36.84±5.14*	1.45±0.12*	1.64±0.13*
Wog低剂量组	34.98±3.22	1.25±0.10	1.38±0.12
Wog中剂量组	23.51±4.18#	0.72±0.09#	0.85±0.08#
Wog高剂量组	13.86±3.13#	0.40±0.03#	0.42±0.13#
阳性对照组	15.42±5.13#	0.44±0.03#	0.56±0.14#
F值	103.036	361.396	203.716
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P ＜ 0.01；较模型组，#P ＜ 0.01。

Note: *vs* normal group, *P ＜ 0.01; *vs* model group, #P ＜ 0.01.

2.5 不同浓度 Wog 对大鼠血清炎症因子水平的影响

如表 6 所示，模型组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著高于正常组，差异有统计学意义（P ＜ 0.01）；Wog 中、高剂量组和阳性对照组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著低于模型组，差异有统计学意义（P ＜ 0.01），Wog 低剂量组与模型组差异无统计学意义（P ＞ 0.01）。

2.6 不同浓度 Wog 对大鼠软骨组织 MMP-1 和 MMP-13 蛋白的影响

如图4、表7所示，模型组大鼠软骨组织MMP-1和MMP-13 蛋白表达水平显著高于正常组，差异有统计学意义（P ＜ 0.01）；Wog 中、高剂量组和阳性对照组大鼠软骨组织 MMP-1 和 MMP-13 蛋白表达水平显著低于模型组，差异有统计学意义（P ＜ 0.01），Wog 低剂量组与模型组差异无统计学意义（P ＞ 0.01）。

2.7 Wog 处理对大鼠软骨组织 Nrf2/TLR4/NF-κB 通路蛋白的影响

如图 5、表 8 所示，模型组大鼠软骨组织 Nrf2、HO-1、TLR4 蛋白表达水平及 NF-κB p65/ 总 NF-κB p65 比值显著高于正常组，差异有统计学意义（P ＜ 0.01）；Wog 中、高剂量组和阳性对照组大鼠软骨

表 5 各组大鼠软骨组织中 MDA、SOD、GSH-Px 水平（n = 10）

Table 5 Levels of MDA, SOD, GSH-Px in cartilage tissue of rats in each group（n=10）

分组	MDA/μmol·L^{-1}	SOD/1×10^3 U·L^{-1}	GSH-Px/U·L^{-1}
正常组	19.85±2.45	93.18±8.26	98.99±11.14
模型组	48.62±5.18*	60.11±6.49*	61.56±4.58*
Wog低剂量组	45.36±3.14	63.41±6.01	65.48±3.58
Wog中剂量组	35.16±5.18#	75.55±8.56#	71.26±5.89
Wog高剂量组	21.36±3.41#	87.28±6.14#	88.33±6.74#
阳性对照组	22.58±4.13#	84.15±5.16#	84.36±7.58#
F值	99.474	37.605	43.031
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P ＜ 0.01；较模型组，#P ＜ 0.01。

Note: *vs* normal group, *P ＜ 0.01; *vs* model group, #P ＜ 0.01.

表 6 各组大鼠血清炎症因子水平（n = 10，单位：pg/L）

Table 6 Serum inflammatory factor level of rats in each group（n=10, unit: pg/L）

组别	TNF-α	IL-6	IL-1β
正常组	59.46±6.45	34.18±5.26	5.89±1.34
模型组	248.12±12.15*	122.36±11.14*	24.58±3.69*
Wog低剂量组	221.36±13.14	101.26±16.13	20.36±3.25
Wog中剂量组	145.16±11.16#	75.11±11.56#	12.59±2.88#
Wog高剂量组	85.36±10.01#	40.28±9.89#	8.42±2.14#
阳性对照组	88.23±11.16#	42.36±8.06#	9.56±3.46#
F值	514.278	113.026	63.724
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P＜0.01；较模型组，#P＜0.01。

Note: *vs* normal group, *P＜0.01; *vs* model group, #P＜0.01.

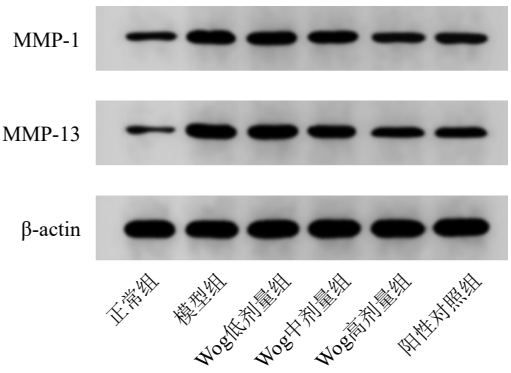


图 4 WB 法检测各组大鼠软骨组织中 MMP-1 和 MMP-13 的蛋白表达

Figure 4 The expression of MMP-1 and MMP-13 in the cartilage tissues of rats detected by WB

表 7 各组大鼠软骨组织 MMP-1 和 MMP-13 蛋白水平（n = 10）

Table 7 Protein levels of MMP-1 and MMP-13 in cartilage tissue of rats in each group（n=10）

组别	MMP-1	MMP-13
正常组	0.48±0.05	0.32±0.02
模型组	0.97±0.08*	0.99±0.11*
Wog低剂量组	0.91±0.07	0.90±0.12
Wog中剂量组	0.76±0.05#	0.75±0.07#
Wog高剂量组	0.61±0.04#	0.59±0.06#
阳性对照组	0.64±0.07#	0.61±0.08#
F值	92.570	83.522
P值	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P ＜ 0.01；较模型组，#P ＜ 0.01。

Note: *vs* normal group, *P ＜ 0.01; *vs* model group, #P ＜ 0.01.

组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平进一步高于模型组，TLR4 蛋白表达水平、核 NF-κB p65/ 总 NF-κB p65 比值显著低于模型组，差异有统计学意义（P＜0.01），Wog 低剂量组与模型组差异无统计学意义（P＞0.01）。

3 讨论

KOA 临床主要表现为关节功能障碍和疼痛，对患者自由行动造成不利影响[14]。目前临床治疗手段多使用非甾体药物治疗，易产生抗药性，而中医药可以辅助治疗 KOA，在临床上已被证实有效，主要

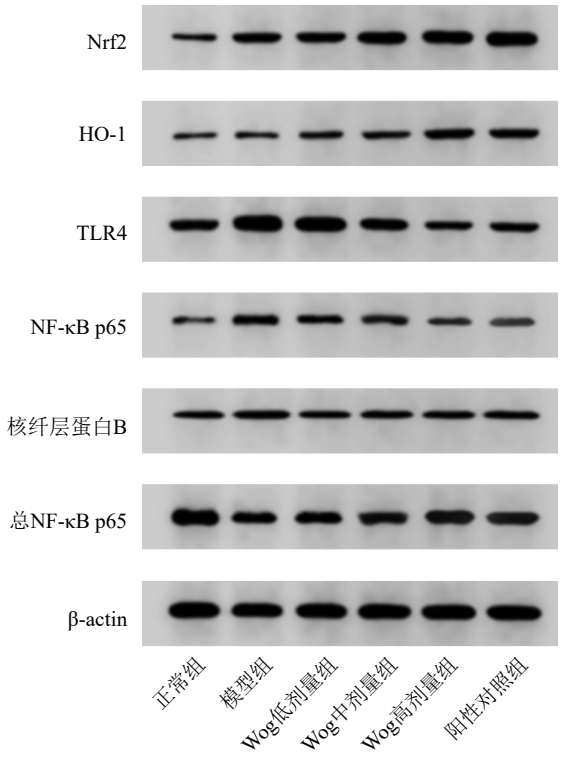


图 5 WB 法检测各组大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达

Figure 5 The expression of Nrf2, HO-1, TLR4, NF-κB p65 proteins in the cartilage tissues of rats in each group detected by WB

表 8 各组大鼠软骨组织中 Nrf2、HO-1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达（n = 10）

Table 8 The expression of Nrf2, HO-1, TLR4, NF-κB p65 protein in cartilage tissue of rats in each group（n=10）

组别	Nrf2	HO-1	TLR4	NF-κB p65/ 总NF-κB p65
正常组	0.26±0.02	0.15±0.01	0.56±0.07	0.35±0.03
模型组	0.59±0.03*	0.21±0.02*	1.04±0.10*	0.88±0.06*
Wog低剂量组	0.61±0.05	0.24±0.02	0.99±0.08	0.79±0.05
Wog中剂量组	0.78±0.04#	0.33±0.03#	0.77±0.07#	0.61±0.08#
Wog高剂量组	0.86±0.07#	0.48±0.03#	0.45±0.06#	0.48±0.04#
阳性对照组	0.91±0.04#	0.45±0.04#	0.51±0.11#	0.55±0.07#
F值	286.269	249.488	91.761	116.623
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较正常组，*P＜0.01；较模型组，#P＜0.01。

Note: *vs* normal group, *P＜0.01; *vs* model group, #P＜0.01.

手段包括针灸、中草药以及推拿等[15]。本研究通过建立 KOA 大鼠模型，探讨 Wog 对于 KOA 的抗炎作用机制。结果显示，KOA 大鼠模型，大鼠疼痛敏感性显著增强，且软骨呈现细胞排列紊乱、软骨裂隙、细胞凋亡较多等病理学变化，Mankin 评分显著升高，提示造模成功。

氧化应激会使 KOA 大鼠细胞凋亡增多并且加剧炎症反应[16]。caspase-9 在细胞内通过氧化应激被线粒体通路激活，促进 caspase-3 的表达，诱导细胞凋亡[17]。MDA 水平可反映氧化损伤程度，SOD 是抗氧化因子，当机体发生氧化损伤时，激活 SOD 可以发挥抗氧化作用[18]。GSH-Px 可以清除 MDA 升高带来的脂质过氧化，调控抗氧化平衡[19]。本研究结果显示，大鼠模型组 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达、MDA 水平显著升高，SOD、GSH-Px 水平显著降低，说明机体处于高氧化应激状态，细胞凋亡蛋白表达升高。Wog 作为传统中药材黄芩的天然提取物，具有抗炎、抗氧化应激作用[4]。本研究也显示，经过 Wog 处理后 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达显著下降，MDA 水平降低，抗氧化因子 SOD、GSH-Px 活性升高，表明 Wog 可调节模型大鼠的氧化平衡，抑制细胞凋亡蛋白表达。研究表明，IL-1β、IL-6、TNF-α 参与 OA 患者的炎症反应，导致软骨损伤和巨噬细胞浸润，而降低 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平可以减轻炎症反应，缓解关节炎[20]。本研究中模型组 IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 水平显著升高，经过 Wog 干预后显著降低，经过阳性药物处理后，也明显缓解了模型大鼠的炎症损伤，并且 Wog 高剂量组呈现出与阳性药物相当程度的治疗水平。说明 Wog 具有临床治疗模型的潜力，可以发挥抗炎作用，降低模型大鼠促炎细胞因子的水平，缓解模型大鼠的关节炎症。

KOA 疾病的显著特征是关节软骨破坏及慢性炎症，MMP 的调控在临床治疗 KOA 中具有重大意义，激活 MMP 可导致细胞外基质周转失调，导致软骨基质破坏，下调 MMP 的表达可以保护软骨基质[21]。本研究结果显示，经过 Wog 处理后，MMP-1 和 MMP-13 蛋白表达显著降低，表明 Wog 可以减轻软骨基质受损程度。KOA 患者机体处于高氧化损伤状态，氧化应激可激活 Nrf2 的核转位，进而促进下游 HO-1 的表达，而 HO-1 是抗氧化蛋白，具有抗氧化损伤的作用[22]。研究表明，激活 Nrf2/HO-1 信号可以抑制炎性体激活从而减轻 OA 的发展[23]。本研究中模型大鼠 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达显著提高，可能是机体应对氧化应激的保护机制；经过 Wog 处理后 Nrf2、HO-1 蛋白水平进一步提高，以应对氧化应激损伤。TLR4/NF-κB 通路是 OA 发病的关键通路，激活 TLR4/NF-κB 通路会导致软骨形成，潜力降低[24]，并且导致促炎因子如 TNF-α、IL-6 大量产生，降低 TLR4/NF-κB 通路蛋白的表达可以减轻 OA 炎症[25]。本研究中经过 Wog 处理后显著降低 TLR4 蛋白表达及 NF-κB p65 蛋白入核，表明 Wog 可以抑制 TLR4/NF-κB 通路活化，从而减轻 KOA 大鼠的氧化应激和炎症反应带来的损伤。

4 结论

综上所述，Wog 可以减轻模型大鼠的炎症和氧化损伤，其机制可能与激活 Nrf2 抗氧化信号并抑制 TLR4/NF-κB 通路活化有关，为临床治疗 KOA 提供理论参考。

参考文献：

[1] Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. J Am Med Assoc, 2021, 325(6): 568-578.

[2] Cleveland RJ, Alvarez C, Schwartz TA, *et al*. The impact of painful knee osteoarthritis on mortality: a community-based cohort study with over 24 years of follow-up[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(4): 593-602.

[3] Georgiev T, Angelov AK. Modifiable risk factors in knee osteoarthritis: treatment implications[J]. Rheumatol Int, 2019, 39(7): 1145-1157.

[4] Xu Y, Lin H, Wang H, *et al*. Fraxetin attenuates ferroptosis in myocardial infarction via AKT/Nrf2/HO-1 signaling[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(9): 10315-10327.

[5] Wang D, Liu J, Jiang H. Triclosan regulates the Nrf2/HO-1

pathway through the PI3K/Akt/JNK signaling cascade to induce oxidative damage in neurons[J]. Environ Toxicol, 2021, 36(9): 1953-1964.

[6] 朱艳, 俞红五, 潘喻珍, 等. 艾灸“足三里”“肾俞”抑制miR-155介导的TLR4/NF-κB信号通路改善大鼠佐剂性关节炎的研究[J]. 针刺研究, 2021, 46(3): 194-200.

[7] Huynh DL, Ngau TH, Nguyen NH, *et al*. Potential therapeutic and pharmacological effects of wogonin: an updated review[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(12): 9779-9789.

[8] Liu XQ, Jiang L, Li YY, *et al*. Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(1): 96-110.

[9] Zhou Y, Dou F, Song H, *et al*. Anti-ulcerative effects of wogonin on ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium via Nrf2/TLR4/NF-κB signaling pathway in BALB/c mice[J]. Environ Toxicol, 2022, 37(4): 954-963.

[10] Smith JF, Starr EG, Goodman MA, *et al*. Topical application of wogonin provides a novel treatment of knee osteoarthritis[J]. Front Physiol, 2020, 11: 80.

[11] Yao N, Chen GC, Lu YY, *et al*. Bushen Qiangjin capsule inhibits the Wnt/α-catenin pathway to ameliorate papain-induced knee osteoarthritis in rat[J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41(6): 935-942.

[12] 喻溢楠, 唐成林, 郭啸, 等. 电针对膝骨关节炎大鼠膝关节滑膜组织细胞焦亡的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(6): 471-478.

[13] Murat N, Karadam B, Ozkal S, *et al*. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2007, 41(3): 233-237.

[14] Zhang L, Yuan H, Zhang L, *et al*. Effect of acupuncture therapies combined with usual medical care on knee osteoarthritis[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(1): 103-110.

[15] 赵金龙, 梁桂洪, 潘建科, 等. 口服中成药治疗膝骨关节炎的网状meta分析[J]. 中国中药杂志, 2021, (4): 231-249.

[16] 谈倩, 李佳, 李柏村, 等. 温针灸减轻膝骨性关节炎大鼠软骨组织的氧化损伤和炎性反应[J]. 针刺研究, 2022, 47(4): 321-328.

[17] 吴鹏波, 宋琪, 余媛洁, 等. 二甲双胍对非酒精性脂肪性肝病细胞模型线粒体途径凋亡及氧化应激的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(1): 64-68.

[18] Reastuty R, Haryuna TSH. Correlation of SOD and MDA expression in the organ of corti and changes in the function of outer hair cells measured by DPOAE examination in noise-exposed rat cochlea[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2021, 10(1): 41-49.

[19] Jiang F, Xu XR, Li WM, *et al*. Monotropein alleviates H_2O_2-induced inflammation, oxidative stress and apoptosis via NF-κB/AP-1 signaling[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 4828-4836.

[20] Zhang J, Rong Y, Luo C, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization[J]. Aging(Albany NY), 2020, 12(24): 25138-25152.

[21] Flores-Espinosa P, Olmos-Ortíz A, Granados-Cepeda M, *et al*. Prolactin protects the structural integrity of human fetal membranes by downregulating inflammation-induced secretion of matrix metalloproteinases[J]. Immunol Invest, 2022, 51(5): 1313-1329.

[22] Wei R, Zhao Y, Wang J, *et al*. Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(11): 2703-2717.

[23] Yan Z, Qi W, Zhan J, *et al*. Activating Nrf2 signalling alleviates osteoarthritis development by inhibiting inflammasome activation[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(22): 13046-13057.

[24] Yoon DS, Lee KM, Choi Y, *et al*. TLR4 downregulation by the RNA-binding protein PUM1 alleviates cellular aging and osteoarthritis[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(7): 1364-1378.

[25] Meng Y, Qiu S, Sun L, *et al*. Knockdown of exosome-mediated lnc-PVT1 alleviates lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by mediating the HMGB1/TLR4/NF-κB pathway via miR-93-5p[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 5313-5325.

（编辑：沈佳婕）