

强骨通痹胶囊对大鼠骨关节炎氧化应激的影响及作用机制

李浩,张天臣

(湖北中医药大学第一临床学院,武汉 430061)

[摘要] **目的:**探讨强骨通痹胶囊对大鼠骨关节炎氧化应激的影响及作用机制。**方法:**将 24 只 SD 大鼠随机分为 2 组,其中 6 只作为对照组,18 只进行建模;建模完把 18 只大鼠随机分为模型组、强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组,并对应用药处理;苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosinstaining, HE)观察软骨组织变化;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒,微量丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒和一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒检测血清中 SOD,MDA 和 NO 水平;实时聚合酶链式反应(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测大鼠关节炎软骨组织中核因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor-erythroid 2-relaxed factor 2, Nrf2)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、巨噬细胞激活因子(macrophage activation factor, Maf)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶 1(NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1)mRNA 表达水平;Western blot 法检测 Nrf2, Keap1, Maf, HO-1 和 NQO1 的蛋白表达水平。**结果:**HE 染色结果表明,与空白对照组相比,模型组的软骨组织中有明显的致密炎性细胞浸润,而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的炎症细胞明显减少;和模型组相比,强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的抗氧化指标浓度显著上升,自由基浓度显著下降($P < 0.05$);和模型组相比,强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 Nrf2, Maf, HO-1 和 NQO1 的 mRNA 和蛋白表达水平都有明显上调($P < 0.05$),而 Keap1 的 mRNA 和蛋白表达水平下调。**结论:**强骨通痹胶囊能通过激活被负调控的 Nrf2-Keap1/抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)通路的相关蛋白及其 mRNA 的表达来改变血清中的抗氧化指标,从而恢复大鼠骨关节炎抗氧化应激的功能。

[关键词] 强骨通痹胶囊;骨关节炎;氧化应激;核因子 NF-E2 相关因子-Kelch 样 ECH 相关蛋白 1/抗氧化反应元件通道

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)14-1472-06

The effect and mechanism of Qianggu Tongbi capsules on oxidative stress in rats with osteoarthritis

LI Hao, ZHANG Tian-chen

(The First Clinical Medical School, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Qianggu Tongbi capsules on oxidative stress in rats with osteoarthritis. **Methods:** Twenty-four SD rats were randomly divided into two groups, 6 of which were used for control group and 18 were used for modeling. After modeling, the 18 rats were randomly divided into model group, Qianggutongbi capsules group, and glucosamine group. Hematoxylin eosin staining (HE) was used to observe the changes of cartilage. Superoxide dismutase (SOD) kit, malondialdehyde (MDA) kit, and nitric oxide (NO) kit were applied to detect the levels of SOD, MDA and NO in serum, respectively. Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to detect the expressions of nuclear factorerythroid 2-relaxed factor (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), macrophage activation factor (Maf), heme oxygenase-1 (HO-1), and NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in each group. Western blot was used to detect the expressions of Nrf2, Keap1, Maf, HO-1, and NQO1 in each group. **Results:** HE staining results showed that there was obvious infiltration of dense inflammatory cells in the cartilage tissue of the model group, while the inflammatory cells in the

[基金项目] 中国中医科学院中医基础理论研究所“院所协同创新”科研专项基金资助项目(Yz-1836)

[作者简介] 李浩,男,硕士,研究方向:中医药防治退行性骨关节疾病。联系电话:(027)88929225, E-mail:lihao@hbhctm.com。

Qianggu Tongbi capsules group and glucosamine group were significantly reduced compared with the blank control group. Compared with the model group, the levels of antioxidant indexes of Qianggu Tongbi capsules group and glucosamine group increased significantly, while the free radical concentrations decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of Nrf2, Maf, HO-1, and NQO1 in Qianggu Tongbi capsules group and glucosamine group were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression levels of Keap1 were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qianggu Tongbi capsules can change the antioxidant indexes in serum by activating the expression of Nrf2-Keap1/ARE pathway-related proteins and mRNA, so as to restore the function of antioxidant stress in rats with osteoarthritis.

[Key words] Qianggu Tongbi capsule; osteoarthritis; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1/antioxidant responsive element pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是由于膝关节局部生物学和力学的改变,引起软骨细胞、软骨细胞外基质以及软骨下骨三者合成-降解偶联机制失衡的一种慢性、进行性骨关节疾病^[1]。传统中医学认为OA多是因为肝肾不足,风邪入体造成的“骨痹”^[2]。目前对于OA的治疗尚无特效疗法,西医对此的保守治疗方法较多,但大多属于非特效疗法,以镇痛药物、非甾体抗炎药物为主,主要以缓解症状、提高生活质量为主^[3],但长期服用易引起胃肠道反应等诸多不良反应,极大地限制了其临床应用。

组方为骨碎补、牛膝、独活、续断、川芎和白芍的强骨通痹胶囊是中医中强筋壮骨,舒筋活血的热门药物,其主治腰腿疼痛、风寒湿痹、腰椎间盘突出症。以骨碎补、续断、黄芪等组成的强骨饮具有补肾活血、温经通络的功效,能有效缓解肾虚血瘀型膝骨关节炎^[4]。其余类似组方的壮骨止痛方、筋骨胶囊、独活寄生汤等,均能直接或间接抑制破骨细胞活性,改善痹症,从而提高骨生物性能、改善骨组织形态^[5]。虽然有大量研究表明,OA的发病机制与氧化应激密切相关,且核因子NF-E2相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)通路是迄今为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路^[6],但目前强骨通痹胶囊的组方对OA的治疗机制没有详细的报道,是否和氧化应激相关仍未清楚。因此本研究构建大鼠骨性关节炎模型,采用强骨通痹胶囊进行干预,探讨强骨通痹胶囊对大鼠OA氧化应激的影响和作用机制,为临床上治疗骨性关节炎提供指导。

材料与方 法

1 实验动物

健康雄性4~6周龄SPF级SD大鼠24只,实验

动物使用许可证号:SYXK(鄂)2018-0104;于温度22℃~26℃,相对湿度50%~60%的饲养条件下进行饲养,人工光照明暗各12h。该动物实验符合动物伦理学标准,并得到该研究机构伦理委员会的批准。在本次实验过程中,按照《实验动物管理条例》等相关文件标准进行饲养与处置。

2 药 物

强骨通痹胶囊组方为骨碎补445g、牛膝445g、独活445g、续断556g、川芎445g、白芍445g制成胶囊(每粒胶囊含生药2.781g),溶于水溶液中。

3 试 剂

戊巴比妥钠(sigma公司,货号:P3761);葡萄糖胺(sigma公司,货号:G1514);生理盐水(上海远慕生物科技公司,货号:YM-S2134);Trizol(ambion公司,货号:15596026);十二烷基硫酸钠(SJBIO公司,货号:100809);化学发光试剂(信帆公司,货号:ZDSJ140);RIPA(强)组织细胞快速裂解液(biosharp公司,货号:BL504A);伊红染料(碧云天公司,货号:C0109);苏木素(Servicebio公司,货号:G1004);中性树脂(上海国药公司,货号:213);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、微量丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒(南京建成公司,货号:A001-3-2, A003-1-2, A012-1-2);Nrf2蛋白一抗、Keap1蛋白一抗、巨噬细胞激活因子(macrophage activation factor, Maf)蛋白一抗、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白一抗、醌氧化还原酶1(NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1)蛋白一抗、 β -Actin蛋白一抗、羊抗兔IgG(bioswamp公司,货号:PAB30175, PAB43965, PAB37946, PAB36265, SAB43714, PAB38338, PAB43946)。

4 仪 器

CFX-Connect 96型荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司);V116295型正置显微镜(尼康公司);AMR-

100 型酶标分析仪(杭州奥盛公司);HT8300/8500 型全自动化学发光分析仪(鸿基公司);API-365 型石蜡切片机(艾普公司);TK7218 型摊片烤片机(恒松公司);HS-B 型生物组织包埋机-冷冻机(恒松公司);KH-BL1 型生物组织包埋机(孝感阔海公司);MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司)。

5 大鼠骨性关节炎模型的构建

采用抽签法将 24 只 SD 大鼠随机分为 2 组,对照组 6 只、造模组 18 只。用戊巴比妥钠对 SD 大鼠腹腔麻醉后,经膝关节内侧纵向切口,切断前交叉韧带,避开关节软骨面,逐层缝合关闭创口。术后对每天向每只大鼠注射阿米卡星,连续 3 d,笼内自由活动。术后 6 周可建立大鼠膝骨性关节炎模型^[7]。

造模 48 h 后,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠。打开腹腔,一次性采血针插入腹主动脉,取 3 mL 血液于采血管中。静置 1 h 后,转速 9 600 × g 离心时间 15 min。血清和血浆分离完毕后,吸取上层血清,置于 1.5 mL 的 EP 管中, - 80 °C 冰箱中进行冻存备检。

6 动物分组和药物干预

按抽签法将造模成功的造模组大鼠随机分为模型组、强骨通痹胶囊组、葡萄糖胺组,每组 6 只。正常组和模型组每天灌胃(ig)生理盐水,强骨通痹胶囊组用强骨通痹胶囊水溶液 ig,葡萄糖胺组用葡萄糖胺水溶液 ig,每天给药 1 次(0.09 g·kg⁻¹),连续给药 12 周。强骨通痹胶囊剂量根据人与小鼠药物剂量换算^[5],6 只大鼠每日用量约 108 g·kg⁻¹,连续给药 12 周。本实验共造模 18 只大鼠,造模成功率为 89%(死亡 2 只,其中模型组 1 只、葡萄糖胺组 1 只)。ig 干预 12 周后,经戊巴比妥钠麻醉处死后,取软骨组织待测。

7 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosinstaining, HE)观察软骨组织变化

切取 0.3 cm 厚的软骨组织,按常规步骤脱水浸蜡包埋,切片厚度为 3 μm,水浴展片后将切片贴附于载玻片上,然后将切片放入展片器展片,贴平黏紧后烤片。根据 HE 染色法对组织切片进行染色,通过显微镜拍照,Leica Application Suite 图像系统采集样本相关部位。

8 氧化损伤相关指标测定

根据 SOD 测定试剂盒、微量 MDA 测定试剂盒和 NO 测定试剂盒的说明书对各组大鼠血清中的

SOD,MDA 和 NO 水平进行检测。

9 RT-PCR 法检测大鼠关节炎软骨组织中 Nrf2, Keap1, maf 的 mRNA 水平

取大鼠关节炎软骨组织 100 mg 于 1 mL 的 Trizol 匀浆管中,于匀浆机匀浆 20 s,立即放于冰上,用 Trizol 裂解细胞,抽提总 RNA,进行反转录。再按照 SYBR GREEN PCR Kit 说明书进行 RT-qPCR 法检测。引物序列见表 1。以 GAPDH 作为内参,用 GAPDH 的 Ct 归一目标基因的 Ct 得 ΔCt,其次用校准样本的 ΔCt 归一样品的 ΔCt,最后计算表达水平比率:2^{-ΔΔCt} = 表达量的比值。

表 1 引物序列信息

引物名称	序列	扩增片段大小(bp)
Nrf2-F	TCCATTACGGAGACCCAC	106
Nrf2-R	GTGTTGGCTGTGCTTTAGGT	
Keap1-F	GGGGACGCGGTGATGTA	266
Keap1-R	CGAAGCCCGTTGGTGAA	
Maf-F	TCCTGGAGTCGGAGAAGAAC	91
Maf-R	TTGTAGGCGTCCCTTTCC	
HO-1-F	AGCGAAACAAGCAGAACC	191
HO-1-R	CAGCAGCTCAGGATGAGTAC	
NQO1-F	GAAGGGTGAAGAAGCGT	292
NQO1-R	TGGAACAAAGGCGAAAACT	
GAPDH-F	CAAGTTCAACGGCAGAC	138
GAPDH-R	CCAGTAGACTCCACGACAT	

10 Western blot 法检测大鼠关节炎软骨组织中 Nrf2, Keap1, Maf 蛋白水平

将组织剪成细小的碎片,按每 20 mg 组织加入 200 μL 裂解液的比例加入裂解液(裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂),匀浆器匀浆直至完全裂解。裂解后的样品在 4 °C, 12 000 × g 离心 15 min,取上清于 96 孔板测定蛋白含量,根据蛋白含量加入 5 × 缓冲上样液和 PBS,在 100 °C 水浴锅中煮样 5 min,待样品冷却后加入 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)分离目标蛋白并转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,将转膜完成的 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶进行封闭后,先后孵育一抗(Nrf2, Keap1, Maf)、二抗(羊抗兔 IgG),将膜放置在暗室中,根据用量取发光液 A 和 B 等量混匀,加在膜的正面与之充分接触。然后将膜

置于全自动化学发光分析仪中检测,通过 TANON GIS 软件读取相关条带灰度值。

11 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行数据分析。计量资料以均值 \pm 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠关节炎软骨组织 HE 染色结果

结果如图 1 所示,与空白对照组相比,模型组的软骨组织中有明显的致密炎性细胞浸润,而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的炎症细胞明显减少。

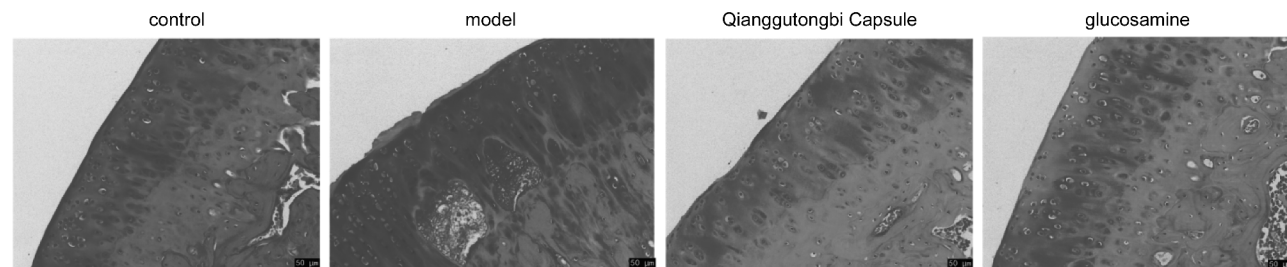


图 1 不同组的大鼠关节炎软骨组织 HE 染色结果($\times 200$)

2 血清中 SOD,MDA 和 NO 浓度水平

SOD 指标的测定结果中,与对照组相比,模型组的 SOD 浓度显著下降($P < 0.05$);而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 SOD 浓度则比起模型组显著上升($P < 0.05$),但都显著低于对照组($P < 0.05$)。

在 MDA 和 NO 指标的测定中,模型组比起对照组明显上升($P < 0.05$);而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组则比起模型组显著下降($P < 0.05$),但都显著高于对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 血清中 SOD,MDA 和 NO 的浓度比较

$\bar{x} \pm s, n = 5$

血清指标	对照组	模型组	强骨通痹胶囊组	葡萄糖胺组
SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	98.43 \pm 2.25	27.47 \pm 0.94 ^a	62.33 \pm 1.54 ^b	65.47 \pm 1.08 ^b
MDA/ $nmol \cdot mL^{-1}$	26.97 \pm 1.06	85.44 \pm 1.25 ^a	55.36 \pm 1.28 ^b	52.96 \pm 0.98 ^b
NO/ $\mu mol \cdot mL^{-1}$	18.89 \pm 0.73	38.28 \pm 0.93 ^a	26.41 \pm 0.28 ^b	27.95 \pm 0.37 ^b

与对照组相比,a: $P < 0.05$;与模型组相比,b: $P < 0.05$

3 软骨组织中 Nrf2,Keap1,Maf,HO-1 和 NQO1 mRNA 表达水平比较

和对照组相比,模型组的 Nrf2, Maf, HO-1 和 NQO1 mRNA 表达都显著下降($P < 0.05$);而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 Nrf, Maf, HO-1 和

NQO1 mRNA 表达都比起模型组显著上升($P < 0.05$)。和对照组相比,模型组的 Keap1 mRNA 表达显著上升($P < 0.05$);而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 Keap1 mRNA 表达都比起模型组显著下降($P < 0.05$),见表 3。

表 3 软骨组织中 Nrf2,Keap1,Maf,HO-1 和 NQO1 mRNA 表达水平比较

$\bar{x} \pm s, n = 6$

相关 mRNA	对照组	模型组	强骨通痹胶囊组	葡萄糖胺组
Nrf2	1.01 \pm 0.04	0.06 \pm 0.00 ^a	0.16 \pm 0.01 ^b	0.47 \pm 0.03 ^b
Keap1	1.03 \pm 0.08	7.32 \pm 0.28 ^a	3.48 \pm 0.16 ^b	2.09 \pm 0.12 ^b
Maf	1.01 \pm 0.05	0.04 \pm 0.00 ^a	0.07 \pm 0.00 ^b	0.19 \pm 0.01 ^b
HO-1	1.00 \pm 0.10	0.34 \pm 0.01 ^a	0.67 \pm 0.08 ^b	0.65 \pm 0.08 ^b
NQO1	1.00 \pm 0.05	0.30 \pm 0.05 ^a	0.56 \pm 0.02 ^b	0.54 \pm 0.02 ^b

与对照组相比,a: $P < 0.05$;与模型组相比,b: $P < 0.05$

3.4 软骨组织中 Nrf2, Keap1, Maf, HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平比较

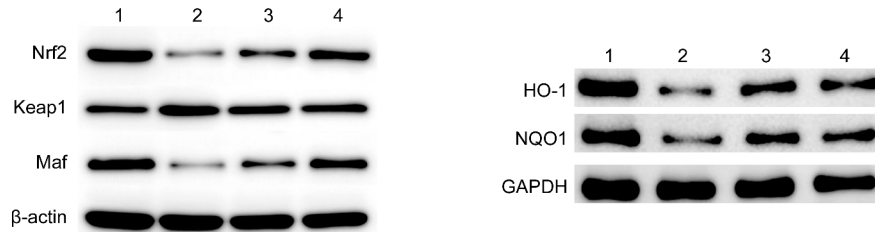
和对照组相比,模型组的 Nrf2 和 Maf 蛋白表达都显著下降;而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 Nrf2 和 Maf 蛋白表达都比起模型组显著上升,但都

显著低于对照组。和对照组相比,模型组的 Keap1 蛋白表达显著上升;而强骨通痹胶囊组和葡萄糖胺组的 Keap1 蛋白表达都比起模型组显著下降,但都显著高于对照组,见表 4 和图 2。

表 4 软骨组织中 Nrf2, Keap1, Maf, HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平比较 $\bar{x} \pm s, n = 5$

相关蛋白	对照组	模型组	强骨通痹胶囊组	葡萄糖胺组
Nrf2	0.78 ± 0.00	0.22 ± 0.00 ^a	0.39 ± 0.00 ^b	0.60 ± 0.00 ^b
Keap1	0.47 ± 0.00	0.68 ± 0.00 ^a	0.52 ± 0.00 ^b	0.50 ± 0.00 ^b
Maf	0.67 ± 0.01	0.21 ± 0.00 ^a	0.37 ± 0.00 ^b	0.58 ± 0.01 ^b
HO-1	0.66 ± 0.00	0.36 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.00 ^b	0.49 ± 0.00 ^b
NQO1	0.62 ± 0.01	0.35 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.01 ^b	0.47 ± 0.00 ^b

与对照组相比, a: $P < 0.05$; 与模型组相比, b: $P < 0.05$



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 强骨通痹胶囊组; 4: 葡萄糖胺组

图 2 Nrf2, Keap1, Maf, HO-1 和 NQO1 蛋白在 4 组中的表达情况

讨 论

WHO 将 OA 与心血管疾病及癌症一起列为威胁人类健康的“三大杀手”^[8], 统计显示, 全世界 60 岁以上女性 OA 患病率约占 18%, 男性 OA 患病率约占 9.6%, 且在发达国家中 OA 是最主要的致残疾病之一^[9]。随着人口老龄化加剧, 预计到 2050 年, 全世界将有 13 亿以上人患有 OA^[10]。近年来, 中医凭借辨证论治、简便验廉、不良反应少等优势而被广泛应用于骨伤病的治疗中, 中医药防治 OA 近年来成为研究热点, 疗效明确^[11]。强骨通痹胶囊组方均为治疗骨性关节炎方剂中高频使用药物, 其中牛膝既可祛风除湿、化痰通痹, 还能减轻麻痹无力症状^[12]; 骨碎补可活血强骨、消风祛斑; 独活作为治疗痹良药, 可抑制膝关节炎症, 缓解软骨退变^[13]; 续断、川芎和白芍是治疗痹证的基础组成药物, 可祛风湿、强骨通络、行气止痛, 对骨痹也有较好疗效^[14]。本次实验结果中, 软骨组织炎症模型中炎症细胞数量显著上升, 但在强骨通痹胶囊和葡萄糖胺分别作用后, 大鼠关节炎软骨组织的炎症细胞数量显著减少, 说

明强骨通痹胶囊对 OA 有一定的治疗效果, 这和之前报道的中成药^[15]和葡萄糖胺^[16]对 OA 的治疗效果相一致。

氧化应激是指机体或细胞内氧自由基的产生与清除失衡, 导致活性氧在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程^[17]。大量研究表明, 氧自由基的水平与骨质疏松、骨坏死、骨性关节炎、椎间盘退变等骨疾病发病机制密切相关^[18-20]。SOD 浓度和自由基浓度成反比, MDA 浓度与机体抗氧化潜在能力成正比, NO 则作为自由基的一种反应机体的自由基浓度。因此, SOD, MDA 和 NO 都能反映机体的氧自由基代谢状况。本次实验显示, 和对照组相比, 软骨组织炎症模型组的 SOD 显著下降, 而 MDA 和 NO 则显著上升; 但在强骨通痹胶囊作用后和葡萄糖胺作用后, SOD 显著回升, 而 MDA 和 NO 则显著回落, 但和对照组仍有显著差异; 这表明强骨通痹胶囊和葡萄糖胺均对机体的抗氧化应激有一定的作用。

Nrf2-Keap1/ARE 通路对于防御、减轻氧化应激对人体的危害起着举足轻重的作用^[6]。应对自由基损害的时候, 该通路会产生一系列的协调反应, 主

要由 ARE 来调控^[21]。通路中的主要蛋白有 Nrf2, Keap1 和 Maf。其中 Nrf2 是一个内源性保护的关键性转录因子,参与调节细胞内众多抗氧化物的表达,是 ARE 的激活因子,而 Keap1 是 Nrf2 的负调节因子,活化的 Nrf2 从 Keap1 解离后进入细胞核,在核内与 Maf 蛋白结合成异二聚体后与 ARE 序列结合,进而启动 ARE 下游功能性酶(如 HO-1, NQO1)的表达^[22-28]。NQO1 和 HO-1 是 Nrf2 重要的靶基因,能抑制氧化应激反应。NQO1 通过清除超氧化物来对抗氧化应激,而 HO-1 是一种细胞保护酶,促进促氧化剂血红素的氧化裂解,随后形成抗氧化剂一氧化碳和胆红素^[29]。本次研究发现,对比软骨组织炎症模型,强骨通痹胶囊和葡萄糖胺作用后, Nrf2 和 Maf, HO-1 和 NQO1 的 mRNA 和蛋白表达都显著上调,而 Keap1 的 mRNA 和蛋白表达则明显下调。实验表明,软骨组织炎症会负调控 Nrf2-Keap1/ARE 的通路,而强骨通痹胶囊和葡萄糖胺作用后,能够正调控 Nrf2-Keap1/ARE 通路,促进 HO-1 和 NQO1 的表达,恢复机体对氧化应激的防御功能。

综上所述,强骨通痹胶囊能通过激活被负调控的 Nrf2-Keap1/ARE 通路的相关蛋白及其 mRNA 的表达来改变血清中的抗氧化指标,从而恢复大鼠 OA 抗氧化应激的功能。本研究提示了强骨通痹胶囊对于治疗 OA 具有一定的作用,其能有效影响 Nrf2-Keap1/ARE 通路的功效也揭示了应对该通路相关疾病的可能性。

[参 考 文 献]

- LIU ZD, LIU RZ, WANG R, *et al.* Sinensetin attenuates IL-1 β -induced cartilage damage and ameliorates osteoarthritis by regulating SERPINA3[J]. *Food Funct*, 2022, 13(19): 9973-9987.
- 张璐瑶, 刘维. 中药治疗骨关节炎作用机制的研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(12): 1901-1904.
- SIDDIQ MAB, CLEGG D, JANSEN TL, *et al.* Emerging and new treatment options for knee osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2022, 18(1): 20-32.
- 崔龙慷, 李学飞, 沈高波, 等. 强骨饮联合西药治疗肾虚血瘀型膝骨关节炎合并骨质疏松症临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(9): 5512-5516.
- 卜寒梅, 王世坤, 李远栋, 等. 补肾中药基于 OPG/RANKL/RANK 信号通路对原发性骨质疏松症作用机制的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3209-3217.
- WANG QH, BOTCHWAY BOA, ZHANG Y, *et al.* Ellagic acid activates the Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway in improving Parkinson's disease: a review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156: 113848.
- 杨波, 龙慧, 王郑钢, 等. 黄芩素通过促进 miR-29a-3p 抑制 MAP2K6 改善骨性关节炎模型大鼠软骨细胞退化[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(6): 32-37.
- REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- LI MH, XIAO R, LI JB, *et al.* Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(10): 1577-1587.
- MAIESE K. Picking a bone with WISPI (CCN4): new strategies against degenerative joint disease[J]. *J Transl Sci*, 2016, 1(3): 83-85.
- 吴若辉, 孙立君, 王岚壹, 等. 平乐外洗方联合针灸治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(5): 51-54.
- 张健哲, 杨永菊, 关雪峰. 基于调控软骨细胞代谢的中药牛膝防治骨关节炎的药剂物质基础和作用机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1): 147-153.
- 柳博, 李宁, 谢兴文, 等. 基于 NF- κ B 信号通路的中医药治疗骨性关节炎的研究进展[J]. *中医药学报*, 2021, 49(7): 120-125.
- 聂坚, 杨绍丽, 吴云霞, 等. 基于中医传承辅助系统分析严继林教授治疗痹证的方药规律[J]. *中国中医药科技*, 2021, 28(2): 221-224.
- 杨学涛. 推拿配合健骨通痹冲剂治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. *医疗装备*, 2015, 28(4): 22-23.
- 罗庆锋, 胡文洁, 胡国锋, 等. 逐瘀通痹汤联合盐酸氨基葡萄糖片治疗膝骨关节炎临床研究[J]. *新中医*, 2021, 53(8): 82-84.
- CHENG XM, HU YY, YANG T, *et al.* Reactive oxygen species and oxidative stress in vascular-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7906091.
- TUDORACHI NB, TOTU EE, FIFERE A, *et al.* The implication of reactive oxygen species and antioxidants in knee osteoarthritis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 985.
- LI JM, DENG CJ, LIANG WY, *et al.* Mn-containing bio ceramics inhibit osteoclastogenesis and promote osteoporotic bone regeneration via scavenging ROS[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(11): 3839-3850.
- 袁晔, 费蓓蓓, 俞晨, 等. 铁蓄积通过还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 激活活性氧自由基抑制间充质干细胞与体内成骨功能[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(11): 1991-1994.
- LONG XS, HU X, PAN C, *et al.* Antioxidant activity of Gracilaria lemaneiformis polysaccharide degradation based on nrf-2/keap-1 signaling pathway in HepG2 cells with oxidative stress induced by H₂O₂[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(9): 545.
- ROZPEDEK-KAMIŃSKA W, SIWECKA N, WAWRZYŃK-IEWICZ A, *et al.* The PERK-dependent molecular mechanisms as a novel therapeutic target for neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2108.
- XIANG Q, ZHAO YZ, LIN JL, *et al.* The Nrf2 antioxidant defense system in intervertebral disc degeneration: molecular insights[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(8): 1067-1075.
- AI GX, WU XY, DOU YX, *et al.* Oxyberberine, a novel HO-1 agonist, effectively ameliorates oxidative stress and inflammatory response in LPS/D-GalN induced acute liver injury mice via co-activating erythrocyte metabolism and Nrf2 signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 166: 113215.
- 彭鹤松, 魏凡舒, 杨春娟. 莱菔硫烷: 一种潜力巨大的天然药物[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(4): 428-434.
- 王玉凤, 王歧黄, 张恒, 等. 衣康酸及其衍生物基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的药理作用研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(19): 1895-1902.
- 林琦, 李紫如, 郭锦玲, 等. 标准桃金娘油对慢性阻塞性肺疾病大鼠 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(22): 2105-2110.
- 卢琦, 邹林峰, 高远真, 等. 甘草素对长波紫外线诱导的皮肤光老化的保护作用及机制[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(20): 2056-2066.
- CAZUZA RA, BATALLÉ G, BAI X, *et al.* Effects of treatment with a carbon monoxide donor and an activator of heme oxygenase 1 on the nociceptive, apoptotic and/or oxidative alterations induced by persistent inflammatory pain in the central nervous system of mice[J]. *Brain Res Bull*, 2022, 188: 169-178.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2023-01-04