

骨研究专题

基于核因子- κ B 信号通路分析补肾活血祛湿中药
治疗膝关节骨性关节炎的作用机制

莫志生, 徐培青, 李桓宇, 滑国田, 程戴维, 扈自然

[北京中医药大学深圳医院(龙岗)骨伤一科, 广东 深圳, 518100]

摘要:目的 基于核因子- κ B(NF- κ B)信号通路分析补肾活血祛湿中药治疗膝关节骨性关节炎(KOA)的作用机制。方法 对模型对照组、地塞米松组、补肾活血祛湿中药各剂量组(中药低剂量组、中药高剂量组)大鼠采用前交叉韧带横断术(ACLT)建立 KOA 模型。正常对照组大鼠无任何操作;地塞米松组、中药低剂量组、中药高剂量组在造模成功第 1 天开始给予相应剂量(依次为 50、50、100 mg/kg)的药物灌胃,持续给予 4 周;正常对照组和模型对照组给予等体积生理盐水。实验结束后,测定大鼠缩爪热潜伏期(PWTL)、Mankin's 评分。采用酶联免疫吸附法测定血清白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-1b(IL-1b)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法及蛋白印记法测定膝关节滑膜组织微小 RNA-26a(miR-26a)、NF- κ B、toll 样受体 4(TLR4)水平。**结果** 与正常对照组比较,模型对照组 PWTL 缩短, Mankin's 评分(中药低剂量组除外)、IL-1b、IL-4、TNF- α 以及 miR-26a、NF- κ B、TLR4 的 mRNA、蛋白表达水平延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、地塞米松组 PWTL 延长, Mankin's 评分(中药低剂量组除外)、IL-1b、IL-4、TNF- α 以及 miR-26a、NF- κ B、TLR4 的 mRNA、蛋白表达水平降低,且中药高剂量组 PWTL 长于中药低剂量组, Mankin's 评分、IL-1b、IL-4、TNF- α 以及 miR-26a、NF- κ B、TLR4 的 mRNA、蛋白表达水平低于中药低剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与地塞米松组比较,中药低剂量组 PWTL 缩短, Mankin's 评分、IL-1b、IL-4、TNF- α 以及 miR-26a、NF- κ B、TLR4 的 mRNA、蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与地塞米松组比较,中药高剂量组 PWTL 轻微缩短, Mankin's 评分、IL-1b、IL-4、TNF- α 以及 miR-26a、NF- κ B、TLR4 的 mRNA、蛋白表达水平轻微升高,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 补肾活血祛湿中药能显著抑制 KOA 炎症反应,其机制可能与抑制 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TLR4 mRNA 表达水平以及抑制 miR-26a/NF- κ B/TLR4 通路的激活有关。

关键词: 微小 RNA-26a; toll 样受体 4; 核因子- κ B; 补肾活血祛湿中药; 膝关节骨性关节炎

中图分类号: R 684.3; R 285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)11-087-07 DOI: 10.7619/jcmp.20220631

Analysis in mechanism of tradition Chinese medicine
for tonifying kidney, activating blood circulation
and removing dampness in treatment
of knee osteoarthritis based on nuclear
factor- κ B signal pathway

MO Zhisheng, XU Peiqing, LI Huanyu, HUA Guotian, CHENG Daiwei, HU Ziran

(First Department of Bone Trauma, Shenzhen Hospital (Longgang) of Beijing University
of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, 518100)

Abstract: Objective To analyze the mechanism of tradition Chinese medicine for tonifying kidney, activating blood circulation and removing dampness in the treatment of knee osteoarthritis (KOA) based on nuclear factor- κ B (NF- κ B) signal pathway. **Methods** KOA model was established by anterior cruciate ligament transection (ACLT) in the rats of model control group, dexamethasone group, and groups with various doses of traditional Chinese medicine for tonifying the kidney, activating blood circulation and removing dampness (low dose of traditional Chinese medicine group and high dose of traditional Chinese medicine group). No operation was given for rats in the normal control group; the dexamethasone group, the low dose of traditional Chinese medicine group and the high dose of traditional

Chinese medicine group were given corresponding doses of drugs for gavage (50, 50 and 100 mg/kg) on the first day, and the gavage was lasted for 4 weeks; normal control group and model control group were given equal volume of normal saline. When the experiment was over, the paw withdrawal thermal latency (PWTL) and Mankin's score of rats were measured. Levels of serum interleukin-4 (IL-4), interleukin-1b (IL-1b) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay; the levels of microRNA-26a (miR-26a), NF- κ B and toll-like receptor 4 (TRL4) in synovial tissues of knee joints were determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot. **Results** Compared with the normal control group, PWTL in the model control group shortened significantly, while the Mankin's score, IL-1b, IL-4, TNF- α and mRNA and protein expression levels of miR-26a, NF- κ B and TRL4 prolonged significantly ($P < 0.05$). Compared with the model control group, PWTL prolonged significantly, while the Mankin's score (except for the low dose of traditional Chinese medicine group), IL-1b, IL-4, TNF- α and mRNA and protein expression levels of miR-26a, NF- κ B and TRL4 decreased significantly in the low dose of traditional Chinese medicine group, high dose of traditional Chinese medicine group and dexamethasone group, and PWTL in high dose of traditional Chinese medicine group was significantly longer than that in the low dose of traditional Chinese medicine group, while the Mankin's score, IL-1b, IL-4, TNF- α and mRNA and protein expression levels of miR-26a, NF- κ B and TRL4 were significantly lower than those in low dose of traditional Chinese medicine group ($P < 0.05$). Compared with dexamethasone group, PWTL shortened significantly, while the Mankin's score, IL-1b, IL-4, TNF- α and mRNA and protein expression levels of miR-26a, NF- κ B and TRL4 increased significantly in low dose of traditional Chinese medicine group ($P < 0.05$). Compared with dexamethasone group, PWTL shortened slightly while the Mankin's score, IL-1b, IL-4, TNF- α and mRNA and protein expression levels of miR-26a, NF- κ B and TRL4 increased slightly in high dose of traditional Chinese medicine group, and there were no significant differences between two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Tradition Chinese medicine for tonifying kidney, activating blood circulation and removing dampness can significantly inhibit the inflammatory response of KOA, and its mechanism may be related to the inhibition on expression levels of miR-26a mRNA, NF- κ B mRNA and TRL4 mRNA, and inhibition on activation of miR-26a/NF- κ B/TRL4 pathway.

Key words: microRNA-26a; toll-like receptor 4; nuclear factor- κ B; traditional Chinese medicine for tonifying kidney, activating blood circulation and removing dampness; knee osteoarthritis

膝关节骨性关节炎(KOA)是一种常见的关节疾病,全球有超过2.5亿人群受累。人群流行病学研究^[1]显示,KOA患者的病死率较健康人群高55%。KOA的危险因素包括半月板切除、肥胖、体力劳动和膝外伤。微小RNA(miRNA)无编码能力,含有约20个核苷酸,具有调节某些靶基因的能力^[2-3]。微小RNA-26a(miR-26a)与多种人类疾病有关,包括乳腺癌、肺动脉高压和多发性硬化症。研究^[4]表明miR-26a参与了KOA的发生和发展。研究^[5]显示,toll样受体4(TLR4)是toll样受体(TLRs)成员之一,核因子- κ B(NF- κ B)则是常见的转录因子,与免疫和炎症有关。有研究^[6-7]揭示了TLR4/NF- κ B信号通路与KOA有关。然而,miR-26a/TLR4/NF- κ B信号通路与

KOA的关系尚未得到证实。中医认为KOA病因是肝肾亏损、气血不足致筋骨失养而拘急,又有慢性损伤、风寒湿邪内侵,导致脉络不通、气血瘀滞,故治以补肾壮骨、化瘀通络兼祛寒除湿为主^[8]。补肾活血祛湿的中药主要有黄芩、巴戟天、生地、熟地等,临床研究^[9]显示补肾活血祛湿中药治疗KOA的有效率可达93.5%。本研究基于miR-26a/TLR4/NF- κ B信号通路探讨补肾活血祛湿中药治疗KOA的效果及作用机制,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 动物饲养

清洁级SD(Sprague-Dawley)大鼠100只,26

周龄,体质量(180 ± 20) g,由昆明医科大学动物试验中心提供[许可证号:SCXK(云)2019-0052;合格证号:SCXK(渝)2020-0015]。将大鼠随机分为 5 组,即正常对照组、模型对照组、地塞米松组(天津天药业股份有限公司,批号 20201455,给药剂量 50 mg/kg)、补肾活血祛湿中药低剂量组(简称中药低剂量组,给药剂量 50 mg/kg,组方包括黄芩、巴戟天、生地黄、熟地各 20 g,薏苡仁 12 g,枸杞、泽泻、红花各 10 g,沙参、紫丹参、羌活各 15 g)、补肾活血祛湿中药高剂量组(简称中药高剂量组,给药剂量 100 mg/kg),每组 20 只,雌雄各半。所有动物手术均已获得本院生物伦理委员会批准,并按照美国国立卫生研究院有关处理和护理实验动物的指南标准进行。

1.2 大鼠模型制备

模型对照组、地塞米松组、中药低剂量组及高剂量组大鼠采用前交叉韧带横断术(ACLT)建立 KOA 模型。术前称重,给予大鼠 0.1 mL/kg 的戊巴比妥钠腹腔麻醉,仰卧置于手术台上,右触髌骨,在距髌骨内侧 5 mm 处纵向切开,直至暴露膝关节腔;行髌骨脱位屈膝,前交叉韧带切断,内侧半月板切除,闭合关节腔,层层缝合切口,然后分层缝合,待完全清醒后关笼饲养。当大鼠缩爪热潜伏期(PWTL)明显缩短、Mankin's 评分明显升高时,说明膝骨关节炎模型建立成功。正常对照组大鼠不给予任何操作;地塞米松组、中药低剂量组及高剂量组在造模成功第 1 天开始给予相应剂量的药物灌胃(灌胃体积为 20 mL/kg),持续给予 4 周;正常对照组和模型对照组给予等体积生理盐水。

1.3 大鼠处死及样本采集

试验结束后,在 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉(腹腔注射)下心脏取血 10 mL,分离血清,随后采用颈椎断头术对大鼠实施安乐死。取出大鼠膝关节滑膜组织,并固定在 10% 福尔马林中进行组织学分析。将部分关节组织在 PBS 中匀浆(10%),用于生化和分子生物分析。

1.4 大鼠 PWTL 的测定

试验结束后,采用 Ugo Basile 热痛测试仪测定大鼠 PWTL。将大鼠置于玻璃底的试验室中并适应环境 15 min;调节测试仪红外辐射探头的强度,使其对大鼠的刺激能力维持在 10 s 左右,切割时间设为 25 s。行为升高或跛行的大鼠被判定为阳性,产生阳性反应的最短时间是 PWTL。每

只大鼠测试 3 次,每次间隔 5 min。

1.5 大鼠 Mankin's 评分的测定

由 2 名独立观察者根据改良的 Mankin's 评分标准对膝关节软骨病变的程度进行评分。评分范围为 0~14 分,评分越高表示膝关节退变越严重。

1.6 大鼠膝关节滑膜组织病理学检测

膝关节滑膜组织经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片。依次在二甲苯 I 和二甲苯 II 中脱蜡 10 min;脱蜡后的组织依次用无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇、80% 乙醇和 70% 乙醇浸泡 2 min, PBS 漂洗 2 次,5 min/次。采用苏木精染色 3 min,自来水冲洗 3 min,1% 盐酸显色 2 s,自来水冲洗 2 min,依次在 50%、70%、80% 的乙醇中浸泡 2 min,伊红中浸泡 5 s,自来水冲洗 3 min,将组织切片依次浸泡在 90% 乙醇、无水乙醇 II、无水乙醇 II 中 3 min,然后依次浸泡在二甲苯中 I 和二甲苯 II 中 5 min;采用中性树脂密封并进行显微镜检查。

1.7 血清白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-1b(IL-1b)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的测定

采用 IL-4、IL-1b、TNF- α ELISA 试剂盒(研城上海化学试剂有限公司,批号为 415548、541214、6598218)测定 IL-4、IL-1b、TNF- α 水平。采集麻醉大鼠股动脉动脉血 10 mL,离心收集血清标本,分装于无菌 Eppendorf (EP) 管中。根据 IL-4、IL-1b、TNF- α ELISA 试剂盒制备 8 个标准物质,第 8 孔为空白对照组。将标准物质和样品(100 μ L)分别加入 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加入 100 μ L 一抗,孵育 1 h;每孔加入 100 μ L 二抗,然后每孔再加入 100 μ L 显色试剂,孵育 30 min;每孔加入 50 μ L 终止液终止反应。测定各孔的吸光度值和浓度,绘制标准曲线。

1.8 miR-26a、NF- κ B、TRIL4 在膝关节滑膜组织中表达的测定

采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 批号为 GH-521 459.3)从膝关节滑膜组织中提取总 RNA。miR-26a、NF- κ B、TRIL4 引物由 Takara Biotechnology Co., Ltd. (日本大阪)设计。miR-26a、NF- κ B、TRIL4 序列为:① miR-26a 正向为 5'-TCGGGATCGATCGTAGCTCGATCGATCGATCGTAGCTAGCTAGCTAGTCCC-3',反向为 5'-TGGGTCGATGCTAGCTAGCTGATCGATCGATCGTAGCTAGTCACTCGATCGCTGCTA-3'。② NF- κ B 正向

2.2 各组大鼠血清 IL-4、IL-1b、TNF- α 水平比较

与正常对照组比较,模型对照组血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、地塞米松组血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平降低,且中药高剂量组血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平低于中药低剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药低剂量组血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药高剂量组血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平轻微升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠膝关节滑膜组织结构比较

正常对照组膝关节滑膜组织结构正常,软骨细胞圆润,排列均匀整齐;模型对照组关节面凹凸不平,多毛刺,滑膜表面凹凸不齐,软骨细胞增殖,排列变厚,可见明显中性粒细胞浸润;应用地塞米松

及补肾活血祛湿中药干预后,滑膜结构趋于平整,中性粒细胞浸润减少,结构趋于正常。见图 1。

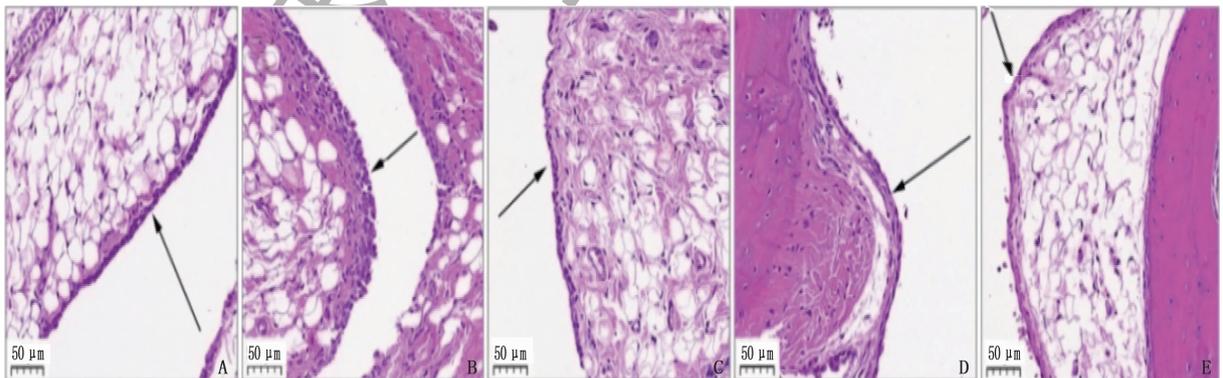
2.4 各组大鼠膝关节滑膜组织 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达比较

与正常对照组比较,模型对照组 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达水平升高($P < 0.05$);与模型对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、地塞米松组 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达水平降低,且中药高剂量组 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达水平低于中药低剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药低剂量组 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药高剂量组 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达水平轻微升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠血清 IL-4、IL-1b、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	IL-1b	TNF- α	IL-4
正常对照组	20	—	126.48 \pm 56.74	159.63 \pm 42.24	199.96 \pm 23.34
模型对照组	20	—	569.85 \pm 45.02*	621.89 \pm 32.27*	549.96 \pm 18.54*
地塞米松组	20	50	218.35 \pm 23.34#	341.63 \pm 36.52#	156.63 \pm 19.75#
中药低剂量组	20	50	429.47 \pm 56.57 Δ	466.98 \pm 48.34 Δ	337.96 \pm 15.27 Δ
中药高剂量组	20	100	220.26 \pm 32.41 \blacktriangle	349.96 \pm 35.47 \blacktriangle	160.52 \pm 15.41 \blacktriangle

IL-1b: 白细胞介素-1b; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; IL-4: 白细胞介素 4。与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。



A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 地塞米松组; D: 中药低剂量组; E: 中药高剂量组。

图 1 各组大鼠膝关节滑膜组织结构的 HE 染色结果(放大倍数 400 倍)

表 3 各组大鼠膝关节滑膜组织 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、TRLA mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	miR-26a mRNA	NF- κ B mRNA	TRLA mRNA
正常对照组	20	—	0.84 \pm 0.25	0.97 \pm 0.41	1.32 \pm 0.32
模型对照组	20	—	5.20 \pm 0.24*	5.96 \pm 0.43*	6.40 \pm 0.35*
地塞米松组	20	50	2.59 \pm 0.23#	2.55 \pm 0.48#	2.43 \pm 0.33#
中药低剂量组	20	50	3.81 \pm 0.19 Δ	3.72 \pm 0.47 Δ	3.90 \pm 0.37 Δ
中药高剂量组	20	100	2.62 \pm 0.32 \blacktriangle	2.56 \pm 0.49 \blacktriangle	2.45 \pm 0.30 \blacktriangle

miR-26a: 微小 RNA-26a; NF- κ B: 核因子- κ B; TRLA: toll 样受体 4。与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠膝关节滑膜组织 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平比较

与正常对照组比较,模型对照组 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、地塞米松组 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平降低,且中药高剂量组 NF- κ B、TRL4 蛋白

表达水平低于中药低剂量组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药低剂量组 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与地塞米松组比较,中药高剂量组 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平轻微升高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 各组大鼠膝关节滑膜组织 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量/(mg/kg)	NF- κ B 蛋白/GAPDH	TRL4 蛋白/GAPDH
正常对照组	20	—	0.32 ± 0.05	0.19 ± 0.03
模型对照组	20	—	1.58 ± 0.06*	1.35 ± 0.04*
地塞米松组	20	50	0.49 ± 0.07 [#]	0.38 ± 0.05 [#]
中药低剂量组	20	50	0.60 ± 0.05 ^{#Δ}	0.59 ± 0.04 ^{#Δ}
中药高剂量组	20	100	0.51 ± 0.05 ^{#▲}	0.40 ± 0.03 ^{#▲}

NF- κ B: 核因子- κ B; TRL4: toll 样受体 4。与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

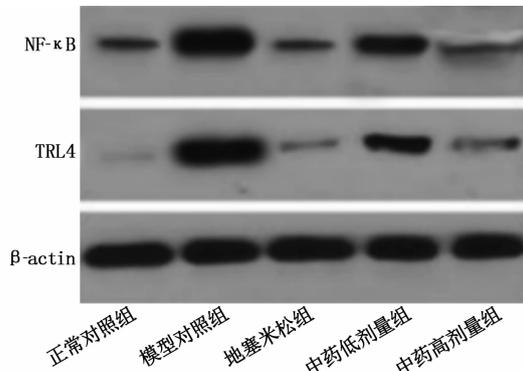


图 2 各组大鼠膝关节滑膜组织 NF- κ B、TRL4 蛋白表达水平比较

结果显示模型对照组关节面凹凸不平,多毛刺,滑膜表面凹凸不齐,软骨细胞增殖,排列变厚,可见明显的中性粒细胞浸润,这说明 KOA 大鼠膝关节软骨组织存在损伤及严重的炎症反应,建模成功。

中医^[12]认为 KOA 病因为肝肾不足,表现为腰膝酸软、骨节疼痛、屈伸不利、筋肉萎缩、肢体麻木、遇劳加重、反复发作,且伴有面色少华、形寒肢冷,或头晕耳鸣、筋脉拘急,舌淡苔白或舌红少苔,脉沉弱或沉数。补肾活血祛湿中药可滋补肾脏、填精补肾、健壮骨筋、活血通络、搜风祛邪止疼,治疗 KOA 的效果显著^[13];此外,补肾活血祛湿中药对神经性疼痛和慢性炎症性疼痛也具有显著的镇痛作用,但其机制尚未明确。本研究中,与模型对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、地塞米松组 PWTL 延长,血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);应用地塞米松及补肾活血祛湿中药干预后,滑膜结构趋于正常,中性粒细胞浸润减少,这说明补肾活血祛湿中药能显著抑制 KOA 炎症反应。

miRNA 是一类小的、非蛋白质编码的 RNA,作为基因调节因子,控制靶基因和多种生物途径。miR-26a 位于 CTDSPL 基因的非编码区,通过靶向基因的 mRNA 和介导免疫信号来调节炎症反应、癌症发病机制和癌症发展。研究^[14]证明,上调的 miR-26a、miR-26b 表达可通过促进 p65 易位而导致 KOA 的发病。研究^[15]表明, KOA 患者 hsa-circ-0005105 的上调可以通过调节 miR-26a 促进软骨细胞细胞外基质的降解。上述研究表明 miR-26a 在 KOA 中起重要作用。NF- κ B 被认为是

3 讨论

KOA 是世界范围内最常见的关节炎类型,是导致老年人疼痛和残疾的主要原因。KOA 累及髌、膝等负重关节,可导致关节损伤、关节结构进行性加重和愈合反应不足。KOA 的特征是滑膜关节中关节软骨的丢失、损伤以及炎症反应,多种炎症因子在 KOA 的发病机制中起重要作用。白细胞介素-1 (IL-1) 被认为是炎症调节的起始因子,可以被模式识别受体 (PRRs) 识别而参与级联放大的炎症效应。IL-1b 是 IL-1 家族的主要成员,已被证明在 KOA 的进展中起重要作用^[10]。在 KOA 患者的关节液中可检测到大量 IL-1b,在 KOA 患者的软骨组织中也发现了 IL-1b 的高表达,组织中 IL-1b 的水平则直接反映了 KOA 的严重程度^[11]。本研究中,与正常对照组比较,模型对照组 PWTL 缩短, Mankin's 评分、血清 IL-1b、IL-4、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);病理学结

调节炎症产生的分子开关,是近年来炎症免疫研究领域的热点。NF- κ B 的激活导致 caspase-1 的裂解^[16],活化的 caspase-1 能够切割和加工 pro-IL-1 β 和 IL-18,以促进其切割为成熟的 IL-1 β 和 IL-18 并分泌细胞,这些细胞因子进一步参与炎症级联反应的调节。NF- κ B 已被证明在包括骨关节炎在内的多种疾病的炎症反应中发挥重要作用^[17],并提出抑制 NF- κ B 可以改善糖尿病肾病的肾功能障碍。研究^[18]表明抑制 NF- κ B 激活可以逆转肝脏炎症并改善肝纤维化;此外,抑制 NF- κ B 激活可以改善骨关节炎的内侧半月板 (DMM) 模型不稳定的骨关节炎疾病进展。因此,作为炎症反应的核心,NF- κ B 炎症小体可能为治疗 KOA 提供新的靶点。一项研究^[19]表明,miR-26a 过表达会促进心脏纤维化中的 NF- κ B 活性,通过抑制 miR-26a 来灭活 NF- κ B 可抑制促炎细胞因子的产生。因此,干扰 miR-26a 而调控 NF- κ B 信号通路的靶向策略可以为 KOA 的治疗提供新的潜在的治疗选择。

本研究结果显示,补肾活血祛湿中药可抑制 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、*TRL4* mRNA 表达水平,进而抑制 miR-26a/NF- κ B/*TRL4* 通路的激活。研究^[20]表明,miR-26a 的高表达水平与肥胖小鼠模型中软骨细胞的慢性炎症增加有关,下调 miR-26a 表达则减弱了关节软骨细胞中 NF- κ B 的激活和促炎细胞因子的分泌。基于 RT-PCR 结果、蛋白质印迹分析,在 KOA 大鼠的滑膜组织中发现 NF- κ B 水平增加,表明 NF- κ B 信号通路存在异常激活;NF- κ B 信号通路激活后可触发 *TRL4* 基因的蛋白表达,诱导关节破坏,导致 KOA 的发生和进展。当 NF- κ B 依赖基因基于 Sirtuin 6 的过度表达而耗尽时,KOA 的发展会通过减少炎症反应和软骨细胞的衰老而受到抑制。此外,通过抑制 NF- κ B 信号通路,胸腺醌抑制了 IL-1 β 诱导的 KOA 软骨细胞炎症。滑膜成纤维细胞中 NF- κ B 信号通路的高激活导致大部分与类风湿性关节炎相关的滑膜炎。血管活性肠肽作为抗炎和抗风湿剂,通过下调 NF- κ B 的活性和表达来改善胶原诱导性关节炎大鼠的滑膜细胞功能。

综上所述,补肾活血祛湿中药能显著抑制 KOA 炎症反应,其机制可能与补肾活血祛湿中药抑制 miR-26a mRNA、NF- κ B mRNA、*TRL4* mRNA 表达水平以及抑制 miR-26a/NF- κ B/*TRL4* 通路的激活有关。

参考文献

- [1] MORA J C, PRZKORA R, CRUZ-ALMEIDA Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities[J]. J pain Res, 2018, 11(1): 2189-2196.
- [2] BRUYÈRE O, HONVO G, VERONESE N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO)[J]. Semin Arthritis Rheum, 2019, 49(3): 337-350.
- [3] JONES I A, TOGASHI R, WILSON M L, et al. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(2): 77-90.
- [4] ZHAO Z, DAI X S, WANG Z Y, et al. MicroRNA-26a reduces synovial inflammation and cartilage injury in osteoarthritis of knee joints through impairing the NF- κ B signaling pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): 52-54.
- [5] ZHANG Y, ZENG Y. Curcumin reduces inflammation in knee osteoarthritis rats through blocking TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway[J]. Drug Dev Res, 2019, 80(3): 353-359.
- [6] LEI J, FU Y, ZHUANG Y, et al. miR-382-3p suppressed IL-1 β induced inflammatory response of chondrocytes via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway by directly targeting CX43[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23160-23168.
- [7] 李冉,白岚,李树祝. 膝关节骨性关节炎中医治疗模式研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(1): 104-107.
- [8] 李刚,杨勇,胡仕其,等. 补肾活血祛湿除痹法联合玻璃酸钠治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(9): 134-138.
- [9] ZHANG J, LI Q Y, CHANG S Y. The effects of particle density in moxa smoke on the ultrastructure of knee cartilage and expressions of TNF- α , IL-1 β , BAX, and Bcl-2 mRNA in a rat model for osteoarthritis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6589-6595.
- [10] SHIRINSKY V S, KAZYGASHEVA E V, SHIRINSKY I V. Inflammation and immunity: a role of pathogenesis of osteoarthritis[J]. Med Immunol, 2019, 21(1): 39-48.
- [11] 张海生. 魏中海学术思想与临床经验总结及补肾温阳活血治疗膝骨性关节炎临床研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [12] 刘丽,姚炎炎,余佳栖,等. 少阴生骨方中药泥灸治疗膝骨性关节炎的效果观察[J]. 中西医结合护理, 2020, 6(6): 46-49.
- [13] SHEN H, WANG Y, SHI W, et al. LncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 signal axis enhances proliferation of chondrocyte in osteoarthritis[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2018, 50(2): 191-198.
- [14] HUANG Z, XING S, LIU M, et al. MiR-26a-5p enhances cells proliferation, invasion, and apoptosis resistance of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by regulating PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(7): BSR20182192.

操作空间有限,可能出现脑脊液漏、感染、硬膜囊损伤和神经根损伤等并发症^[17],故治疗前应严格评估患者的适应证、禁忌证,不断总结经验,以进一步提升手术疗效、安全性。

综上所述,Quadrant 通道下肌间隙入路 MIS-TLIF 治疗腰椎退行性疾病创伤小且安全性高,患者术后恢复快,预后良好,建议在临床推广应用。

参考文献

- [1] 吴翔,徐晓华,杨志华. 后路椎体间融合术与后外侧融合术治疗退行性腰椎滑脱症的 Meta 分析[J]. 浙江创伤外科, 2020, 25(4): 718 - 721.
- [2] 陈文,赵继荣,薛旭,等. MIS-TLIF 与 PLIF 治疗单节段退行性腰椎疾病的临床疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(15): 3224 - 3227.
- [3] FOLEY K T, LEFKOWITZ M A. Advances in minimally invasive spine surgery[J]. Clin Neurosurg, 2002, 49: 499 - 517.
- [4] 薛文,管晓鹏,刘林,等. Quadrant 通道下 MIS-TLIF 联合膨胀式椎弓根螺钉治疗老年脊柱化脓性骨髓炎[J]. 中国骨伤, 2019, 32(10): 937 - 940.
- [5] 蒲俊刚,王腾羽,王钟,等. Wiltse 入路结合改良 TLIF 治疗中重度腰椎滑脱症的临床疗效[J]. 局解手术学杂志, 2020, 29(8): 630 - 635.
- [6] 卢洋,王瑜,李征宇,等. Quadrant 通道下改良微创 TLIF 术在腰椎间盘突出症中的应用研究[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(5): 86 - 89.
- [7] 宋国涛. ALLIF 对 I 度退变性腰椎滑脱患者影像学参数及 ODI 指数的影响[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(13): 2141 - 2143.
- [8] 刘剑伟,蒋卫平. Quadrant 通道下 MIS-TLIF 联合单侧椎弓根钉内固定治疗复发腰椎间盘突出症的疗效分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(11): 1176 - 1178.
- [9] GE D H, STEKAS N D, VARLOTTA C G, et al. Comparative analysis of two transforaminal lumbar interbody fusion

techniques: open TLIF versus wiltse MIS TLIF[J]. Spine, 2019, 44(9): E555 - E560.

- [10] SAYARI A J, PATEL D V, YOO J S, et al. Device solutions for a challenging spine surgery: minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (MIS TLIF)[J]. Expert Rev Med Devices, 2019, 16(4): 299 - 305.
- [11] ZHAO Y F, LIANG Y, MAO K Y. Radiographic and clinical outcomes following MIS-TLIF in patients with adult lumbar degenerative scoliosis[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 93.
- [12] KIM J S, JUNG B, LEE S H. Instrumented minimally invasive spinal-transforaminal lumbar interbody fusion (MIS-TLIF): minimum 5-year follow-up with clinical and radiologic outcomes[J]. Clin Spine Surg, 2018, 31(6): E302 - E309.
- [13] ZHAO Y W, JIA J, LIU W B, et al. Influence of contoured versus straight rod on clinical outcomes and sagittal parameters in minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (MIS-TLIF) at L4/5 level-more than 5 years follow-up[J]. J Orthop Sci, 2020, 25(1): 89 - 95.
- [14] 左镇华,朱明,张时文,等. PTED 治疗腰椎间盘突出的手术效果及对 CPK、IL-1 β 、CRP、5-HT 水平的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(8): 1022 - 1024, 1059.
- [15] 汤雄飞,钱越宁,顾宣歆,等. 后路经椎旁肌间隙入路椎弓根螺钉内固定对腰椎骨折患者关节与功能恢复及血清磷酸肌酸激酶水平的影响[J]. 中国现代医生, 2017, 55(13): 71 - 74.
- [16] HOCKLEY A, GE D, VASQUEZ-MONTES D, et al. Minimally invasive versus open transforaminal lumbar interbody fusion surgery: an analysis of opioids, nonopioid analgesics, and perioperative characteristics[J]. Global Spine J, 2019, 9(6): 624 - 629.
- [17] CHEN Y C, ZHANG L, LI E N, et al. An updated meta-analysis of clinical outcomes comparing minimally invasive with open transforaminal lumbar interbody fusion in patients with degenerative lumbar diseases[J]. Medicine, 2019, 98(43): e17420.

(本文编辑:陆文娟)

(上接第 93 面)

- [15] WANG C, WANG W, JIN X, et al. Puerarin attenuates inflammation and oxidation in mice with collagen antibody-induced arthritis via TLR4/NF- κ B signaling[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1365 - 1370.
- [16] LIANG H, WANG H, LUO L, et al. Toll-like receptor 4 promotes high glucose-induced catabolic and inflammatory responses in chondrocytes in an NF- κ B-dependent manner[J]. Life Sci, 2019, 228: 258 - 265.
- [17] 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- κ B pathway via miR-93-5p[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 5313 - 5325.

- [18] CHEN C, YIN P, HU S, et al. Circular RNA-9119 protects IL-1 β -treated chondrocytes from apoptosis in an osteoarthritis cell model by intercepting the microRNA-26a/PTEN axis[J]. Life Sci, 2020, 256(1): 117924.
- [19] WU Q, YUAN Z H, MA X B, et al. Low expression of CircRNA HIPK3 promotes osteoarthritis chondrocyte apoptosis by serving as a sponge of miR-124 to regulate SOX8[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(15): 7937 - 7945.
- [20] ZHANG J, YUAN J, WANG L, et al. MiR-26a targets EphA2 to resist intracellular Listeria monocytogenes in macrophages[J]. Mol Immunol, 2020, 128(1): 69 - 78.

(本文编辑:梁琥)