

· 基础研究 ·

黄连素调控软骨下骨板骨保护素/核因子-κB 受体活化剂配体系统延缓兔骨关节炎发展的实验研究

张建方¹, 黄恺¹, 蔡海丽², 张朋里¹, 王健¹

(1. 浙江省立同德医院骨科, 浙江 杭州 310012; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第 903 医院特诊科, 浙江 杭州 310012)

【摘要】 目的:探讨关节腔内黄连素注射对兔骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨下骨板结构重塑以及骨保护素/核因子-κβ 受体活化剂配体(osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, OPG/RANKL)系统表达的影响。方法:选取 40 只 12 月龄雄性家兔,体重(2.73±0.18) kg,行左侧膝关节前十字韧带离断术(anterior cruciate ligament transection, ACLT),术后分为黄连素组和安慰剂组,每组 20 只。黄连素组术后每周给予左膝关节腔内注射 100 μmol/L 黄连素 0.3 ml,共 6 周。安慰剂组术后每周给予左膝关节腔内注射相同剂量 0.9%氯化钠注射液,共 6 周。另取 12 月龄雄性家兔 20 只,体重(2.68±0.18) kg,左膝关节行假手术,术后关节腔内不做注射干预(假手术组)。术后第 6 周最后 1 d,处死 3 组动物获取膝关节标本。获取股骨内髁标本行软骨及软骨下骨组织学评估,采用 Mankin 评分系统评估关节软骨结构,采用 Image-Pro Plus (IPP)软件评估软骨下骨板骨小梁体积(bone volume, BV),骨小梁体积百分比(bone volume/total volume, BV/TV),骨小梁周长(trabecular circumference, TC),平均骨小梁厚度(mean trabecular thickness, Tb.Th),采用实时定量反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测术后 6 周软骨下骨组织中的 OPG, RANKL 的 mRNA 表达水平。结果:软骨结构评估显示假手术组软骨组织表面光滑平整,番红在软骨全层着色丰满;黄连素组软骨组织可见表层不平整,番红素 O 染色轻度减退;安慰剂组可见表层纤维化,番红素 O 褪色明显。黄连素组 Mankin 评分低于安慰剂组($P<0.01$),但高于假手术组($P<0.01$)。软骨下骨板结构评估显示假手术组骨小梁排列致密;黄连素干预后小梁排列离较为紧密;安慰剂组软骨下骨小梁相对稀疏,小梁间距离较宽。软骨下骨板 IPP 软件评估显示,黄连素组 BV、BV/TV、TC、Tb.Th 均高于安慰剂组($P<0.01$),黄连素组 BV、BV/TV、TC、Tb.Th 均低于假手术组($P<0.01$)。PCR 检测结果显示,黄连素组 OPG mRNA 表达明显高于安慰剂组($P<0.01$),黄连素组 OPG mRNA 低于假手术组($P<0.05$)。3 组 RANKL 的 mRNA 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);黄连素组 OPG/RANKL 比值高于安慰剂组($P<0.01$),低于假手术组($P<0.01$)。结论:关节腔内注射黄连素可以有效抑制 OA 早期软骨下骨吸收,延缓疾病发展,具体机制可能是黄连素通过上调软骨下骨 OPG 基因表达,维持了 OPG/RANKL 系统的平衡。

【关键词】 骨关节炎; 黄连素; 软骨下骨重塑; OPG/RANKL 系统

中图分类号:R686.7

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.05.011

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Experimental study on the regulation of subchondral bone plate osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand system by berberine to retard the development of osteoarthritis in rabbits ZHANG Jian-fang, HUANG Kai*, CAI Hai-li, ZHANG Peng-li, and WANG Jian. *Department of Orthopaedics, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of intra-articular berberine injection on the structural remodeling of subchondral bone plate and osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (OPG/RANKL) system expression in rabbits with osteoarthritis (OA). **Methods:** Forty 12-month-old male rabbits with an average of (2.73±0.18) kg of body weight, underwent left anterior cruciate ligament transection (ACLT), and were divided into berberine group and placebo groups after operation, 20 rabbits in each group. The berberine group received intra articular injection of 100 μmol/L berberine 0.3 ml every week for 6 weeks. In placebo group, the same dose of 0.9% sodium chloride injection was injected into the left

基金项目:浙江省中医药科技计划(编号:2018ZB033);国家自然科学基金面上项目(编号:81871792);浙江省医药卫生科技项目(编号:2020KY498)

Fund program: Zhejiang Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Program (No.2018ZB033)

通讯作者:黄恺 E-mail: hzhuangk@163.com

Corresponding author: HUANG Kai E-mail: hzhuangk@163.com

knee joint cavity every week for 6 weeks. Another 20 12-month-old male rabbits, weighing (2.68 ± 0.18) kg, underwent sham operation on the left knee joint without intra-articular injection intervention (sham operation group). On the last day of the sixth week after operation, three groups of animals were sacrificed to obtain knee joint specimens. The femoral medial condyle samples were obtained for histological evaluation of cartilage and subchondral bone, Mankin scoring system was used to evaluate articular cartilage structure. Image-Pro Plus (IPP) software was used to evaluate subchondral bone plate bone volume (BV), bone volume/total volume (BV/TV), trabecular circumference (TC), mean trabecular thickness (Tb.Th). Real-time quantitative reverse transcription polymerization Enzyme chain reaction (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of OPG and RANKL in subchondral bone tissue at 6 weeks after operation. **Results:** The cartilage structure evaluation showed that the surface of cartilage tissue in the sham operation group was smooth and flat, and the safranin coloration was full in the full thickness of the cartilage; the cartilage tissue in the berberine group showed uneven surface layer, and the staining of safranin O was mildly decreased; the surface layer fibrosis was seen in placebo group, Safranin O faded significantly. The Mankin score in the berberine group was lower than that in placebo group ($P < 0.01$), but higher than that in sham operation group ($P < 0.01$). The structural evaluation of subchondral bone plate showed that the trabecular bone in sham-operated group was densely arranged; after berberine intervention, the trabeculae were closely arranged; the subchondral bone trabeculae in placebo group were relatively sparse, and the distance between trabeculae was wider. Subchondral bone plate IPP software evaluation showed that BV, BV/TV, TC, Tb.Th in berberine group were higher than those in placebo group ($P < 0.01$), BV, BV/TV, TC, Tb.Th in berberine group were higher than those in placebo group ($P < 0.01$), while lower than the sham operation group ($P < 0.01$). PCR test results showed that the expression of OPG mRNA in the berberine group was significantly higher than that in placebo group ($P < 0.01$), and OPG mRNA in the berberine group was lower than that in sham operation group ($P < 0.01$). There was no significant difference in mRNA expression of RANKL among three groups ($P > 0.05$); the ratio of OPG/RANKL in berberine group was higher than that in placebo group ($P < 0.01$), but lower than that in sham operation group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Intra-articular injection of berberine can effectively inhibit the resorption of subchondral bone in the early stage of OA and delay the development of the disease. The specific mechanism may be that berberine maintains the balance of OPG/RANKL system by up-regulating the expression of OPG gene in subchondral bone.

KEYWORDS Osteoarthritis; Berberine; Subchondral bone remodeling; OPG/RANKL system

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种与关节衰老和退变密切相关的退行性疾病, 主要病理学改变为关节软骨退变及软骨下骨板硬化, 对软骨下骨代谢起到关键作用的成员为破骨细胞, 其活性主要受骨保护素/核因子- κ B 受体活化剂配体 (osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, OPG/RANKL) 系统调控^[1]。已有研究证实黄连素具有改善关节软骨细胞代谢, 保护软骨细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 结构的效应, 提示其可能在将来成为一种非常有前景的天然抗 OA 药物^[2]。黄连素虽对关节软骨具有保护作用, 然而目前尚未有证据显示黄连素可以通过改善软骨下骨板重塑来缓解 OA 病情。本研究通过观察 OA 疾病早期 OPG/RANKL 系统在软骨下骨组织中的表达特征, 探索关节腔内黄连素干预对软骨下骨重塑的作用及相关的分子机制, 以便为 OA 的防治提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

试验仪器: 低温冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 型号 TG-16M); 冰冻切片 (徕克公司, 型号 CM1850); 摊片机 (徕克公司, 型号 PPTHK-21B); 移液器 (吉尔森 P 型移液器公司, 型号 P2、P10、P20、P100、P200、P1000); 正置显微镜 (日本

NIKON 公司, 型号 ECLIPSE Ni); 实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号 ABI-7300)。

主要试剂: 黄连素 (美国 Sigma 公司); 番红 (Safranin-O) 染色剂 (杭州皓天生物技术有限公司); 戊巴比妥钠 (杭州皓天生物技术有限公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司); RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); 反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂及引物 (上海英俊生物技术公司); RapidCal.ImmunoTM 快速脱钙液脱钙 (北京中杉金桥生物技术有限公司); iQTM SYBR Green supermix PCR 试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司)。黄连素溶于 0.9% 氯化钠注射液制成 100 μ mol/L 的溶液^[2]。

1.2 实验动物与分组

40 只 12 月龄雌性家兔, 体重 (2.73 ± 0.18) kg, 左侧膝关节常规消毒铺巾后施行前十字韧带离断术 (anterior cruciate ligament transection, ACLT)。另取 20 只 12 月龄家兔, 体重 (2.68 ± 0.18) kg, 左膝关节行假手术治疗。实验动物均由浙江省中医药研究院提供。术后根据随机化原则将接受 ACLT 手术的动物分为黄连素组和安慰剂组, 每组 20 只。黄连素组术后每只动物左膝关节腔内每周 1 次注射 100 μ mol/L

黄连素 0.3 ml。安慰剂组术后每周 1 次左膝关节腔内注射相同剂量 0.9%氯化钠注射液,假手术组术后关节腔内不做注射干预。术后第 6 周最后 1 d,处死 3 组动物获取膝关节标本行进一步检测评估。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 软骨组织病理学检查 术后 6 周处死动物,各组取 10 只兔膝关节股骨内髌关节面及骨组织,用 10%的甲醛固定 48 h,RapidCal.ImmunoTM 快速脱钙 2 d,石蜡纵向包埋,然后切成 5 μm 的切片,软骨切片分别作 Saffranin-O 染色。根据 Mankin 等^[3]评分标准,从软骨结构改变、软骨细胞数和形态变化、软骨基质番红 O 着色改变、潮线形态变化以及总分 5 个方面对 Saffranin-O 软骨切片进行定量评分。

1.3.2 软骨下骨板组织评估 获取兔股骨内髌番红固绿染色病理组织切片,使用 Image-Pro Plus (IPP)软件测量各组软骨下骨组织结构。软骨下骨板定义为:从骨-软骨交界区移行至松质骨的相对矿化程度较高的骨致密结构。通过在高倍镜下观察,发现兔软骨下骨板的厚度在 100~150 μm,由于骨-软骨交接线不规则,笔者选取了软骨潮线以下 200 μm 内的软骨下骨组织进行评估。评估区域定义为股骨内髌中心的矢状位番红固绿组织切片距软骨潮线以下 200 μm 以内的区域(图 1)。测量指标包括:(1)骨小梁体积(bone volume, BV)表示区域内骨小梁的实际测量体积。(2)骨小梁体积百分比(bone volume/total volume, BV/TV)表示测量区域内骨小梁的体积占松质骨总体积的百分比。(3)骨小梁周长(trabecular circumference, TC)表示骨小梁本身的周长。(4)平均骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)表示测量区域内骨小梁本身的平均厚度。

1.3.3 实时定量 RT-PCR 获取各组剩下的兔膝关节股骨髌软骨组织(每组 10 只),将每份标本股骨外髌关节面软骨刮除干净后,以微型摆锯截取约 1.5 mm 的软骨下骨组织进行靶基因 mRNA 表达的检测。软骨下骨组织约 10 mg 至 1 ml Trizol 中匀浆。按说明书的步骤提取总 RNA。取 2 μg RNA 逆转录成 cDNA,RT 反应依照逆转录试剂盒说明进行。OPG、RANKL 引物设计和合成在上海英骏生物技术公司完成,具体引物序列见表 1。使用美国 ABI 实时定量 PCR 仪定量检测,使用 iQTM SYBR Green supermix PCR 试剂盒行 PCR 扩增反应(5 ng cDNA,45 个循环:95 ℃/10 s,60 ℃/25 s)。各个靶基因的相对表达量以 18S 作为内参

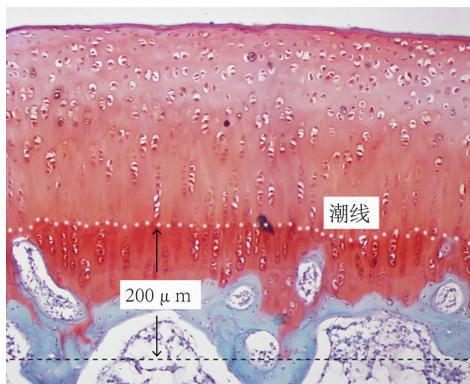


图 1 软骨下骨评估区域图(番红 O 固绿染色×200)
Fig.1 Subchondral bone assessment (Safranin-O fast green staining×200)

照按照以下公式计算: $n=10^6 \times 2^{(C_{18S}-C_{targeted\ genes})}$ 。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理,定量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,则采用 SNK-q 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨下骨板组织评估

术后 6 周股骨髌番红固绿染色切片发现各组骨小梁结构存在较为明显的差异,假手术组软骨下骨小梁排列致密,骨小梁间距较小(图 2a);黄连素干预后软骨下骨小梁丰富,骨小梁间距较为紧密(图 2b);而安慰剂组软骨下骨小梁相对稀疏,骨小梁间距较宽(图 2c)。通过 IPP 软件对番红固绿染色切片进行定量分析后发现,黄连素组的 BV、BV/TV、TC、Tb.Th 均高于安慰剂组($P < 0.01$),低于假手术组($P < 0.01$),见表 2。

2.2 组织病理学观察

假手术组软骨组织表面光滑平整,软骨细胞排列规则,番红在软骨全层着色丰满(图 3a);黄连素组软骨组织分层无明显破坏,可见表层不平整,潮线基本完整,见少量簇聚细胞,番红素 O 染色轻度减

表 1 靶基因引物序列
Tab.1 Primers of targeted genes

| 靶基因 | 产物长度(bp) | 引物序列(5'-3') | 基因库 |
|-------|----------|-------------------------|-------------|
| OPG | 205 | F:AACCCAGAGCGAAATAC | NM_002546.3 |
| | | R:AAGAATGCCTCCTCACAC | |
| RANKL | 101 | F:GGTCCCATAAAGTGAGTCTGT | NM_057149.1 |
| | | R:TTAAAAGCCCCAAAGTATG | |
| 18S | 119 | F:GACGACCAGAGCGAAAGC | NR_033238 |
| | | R:CGCCACTCGGCATCGTTTATG | |

退尤以软骨表层明显(图 3b);安慰剂组可见表层纤维化,细胞排列紊乱,潮线不规则,簇聚细胞出现频率增加,番红素 O 褪色明显(图 3c)。Mankin 评分结果显示黄连素组软骨结构、番红素 O 着色及总分均高于安慰剂组($P<0.05$),低于假手术组($P<0.01$),见表 3。

2.3 软骨下骨板靶基因 mRNA 表达量 RT-PCR 检测

黄连素组 OPG 表达高于安慰剂组($P<0.01$),低于假手术组($P<0.05$)。RANKL 的 mRNA 表达 3 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。黄连素组 OPG/RANKL 比值高于安慰剂组 ($P<0.01$), 低于假手术组 ($P<0.05$)。各组软骨靶基因的 mRNA 表达量均值见表 4。

3 讨论

3.1 黄连素对延缓关节软骨退变的作用机制

祖国医学认为 OA 属中医“骨痹”“痹症”范畴,其基本病机是肝

肾亏虚为本,风寒湿邪内侵,气滞血瘀为标,邪气日久,郁而化热,阻滞经脉。黄连来源于毛茛科植物根茎,《纲目》云:“其根连珠而色黄,故名”。本品味苦,性寒,具清热泻火,燥湿,通脉,补虚之功效。黄连素

表 2 各组软骨下骨板骨小梁组织评估($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Trabecular bone assessment for subchondral bone in different groups($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 兔数 | 骨小梁体积 (μm^3) | 骨小梁体积百分比 (%) | 骨小梁周长 (μm) | 平均骨小梁厚度 (μm) |
|------|----|------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------|
| 假手术组 | 10 | 22 057±2 975 | 81.2±4.7 | 1 020±157 | 108±20 |
| 黄连素组 | 10 | 19 288±1 922 ^a | 75.8±4.8 ^b | 917±104 ^c | 106±15 ^d |
| 安慰剂组 | 10 | 15 639±2 604 ^e | 64.5±6.4 ^f | 676±90 ^{gk} | 75±13 ^{hl} |
| F 值 | | 16.085 | 25.267 | 21.433 | 13.171 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与假手术组比较,^a $q=3.45, P<0.05$; ^b $q=3.168, P<0.05$; ^c $q=2.696, P<0.05$; ^d $q=-0.548, P<0.05$; ^e $q=7.996, P<0.01$; ^f $q=9.847, P<0.01$; ^g $q=9.019, P<0.01$; ^h $q=5.994, P<0.01$ 。与黄连素组比较,ⁱ $q=4.546, P<0.01$; ^j $q=6.679, P<0.01$; ^k $q=6.323, P<0.01$; ^l $q=6.542, P<0.01$

Note: Compared with sham operation group, ^a $q=3.45, P<0.05$; ^b $q=3.168, P<0.05$; ^c $q=2.696, P<0.05$; ^d $q=-0.548, P<0.05$; ^e $q=7.996, P<0.01$; ^f $q=9.847, P<0.01$; ^g $q=9.019, P<0.01$; ^h $q=5.994, P<0.01$ 。 Compared with berberine group, ⁱ $q=4.546, P<0.01$; ^j $q=6.679, P<0.01$; ^k $q=6.323, P<0.01$; ^l $q=6.542, P<0.01$

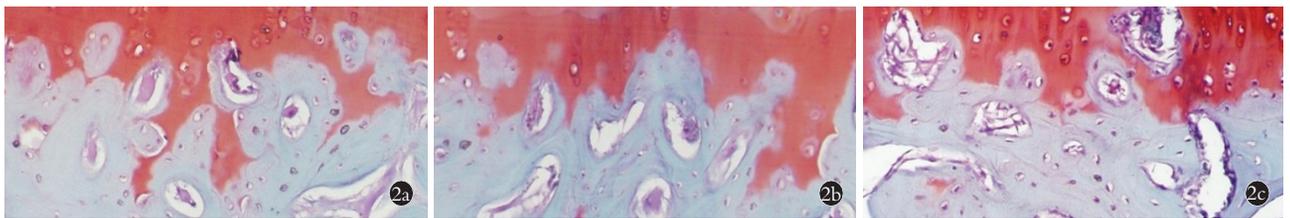


图 2 术后 6 周各组软骨下骨组织学观察(番红 O 固绿染色 $\times 200$) 2a. 假手术组软骨下骨小梁排列致密,骨小梁间距较小 2b. 黄连素干预后软骨下骨小梁丰富,骨小梁间距离较为紧密 2c. 安慰剂组软骨下骨小梁相对稀疏,骨小梁间距离较宽

Fig.2 Histological evaluation of subchondral bone at 6 weeks after surgery in different groups(Safranin-O fast green staining $\times 200$) 2a. Trabecular bone was closely arranged in sham operation group 2b. Trabecular bone was closely arranged with relatively small trabecular distance after berberine treatment 2c. Trabecular bone was sparsely arranged with relatively large trabecular distance in placebo group

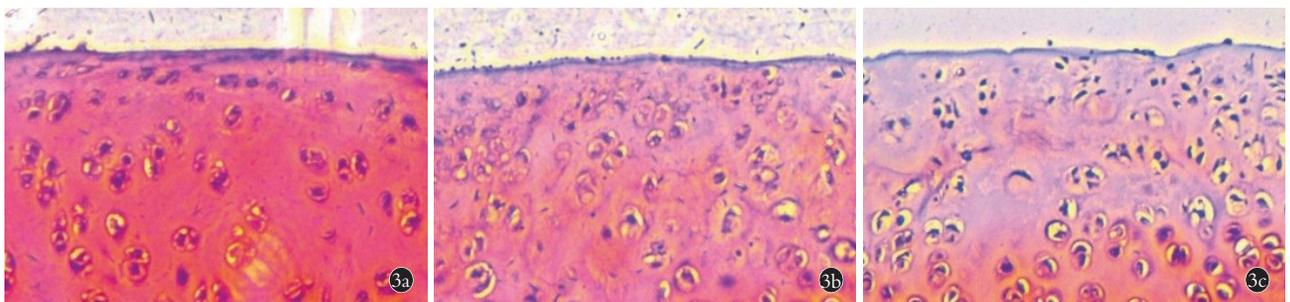


图 3 术后 6 周各组关节软骨组织学观察(番红 O 染色 $\times 200$) 3a. 假手术组软骨表面光滑平整,软骨细胞排列规则,番红在软骨全层着色丰满 3b. 黄连素组软骨组织分层无明显破坏,可见表层不平整,见少量簇聚细胞,番红 O 染色轻度减退尤以软骨表层明显 3c. 安慰剂组可见表层纤维化,软骨细胞减少,簇聚细胞出现频率增加,番红 O 褪色明显

Fig.3 Histological evaluation of cartilage at 6 weeks after surgery in different groups (Safranin-O staining $\times 200$) 3a. Cartilage surface is smooth and flat with regular arrangement of chondrocytes in sham operation group, the color of saffron was full throughout the cartilage 3b. Cartilage surface was a little irregular with less aggregation of the chondrocytes and loss of Safranin-O staining at the superficial layer of cartilage in berberine group 3c. Cartilage fibrosis, hypocellularity, obvious loss of Safranin-O staining and more aggregation of chondrocytes were observed after placebo treatment

表 3 各组股骨内髌关节软骨组织 Mankin 评分 ($\bar{x}\pm s$, 分)

Tab.3 The Mankins assessment of femoral condyle cartilage indifferent groups ($\bar{x}\pm s$, score)

| 组别 | 兔数 | 软骨结构 | 软骨细胞 | 番红 O 染色 | 潮线完整性 | 总分 |
|------|----|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 假手术组 | 10 | 1.40±0.46 | 1.10±0.32 | 1.10±0.57 | 0.10±0.32 | 3.70±0.98 |
| 黄连素组 | 10 | 2.80±0.63 ^a | 1.70±0.48 ^b | 2.45±0.69 ^c | 0.50±0.53 | 7.45±1.04 ^d |
| 安慰剂组 | 10 | 3.90±0.57 ^{ei} | 1.75±0.59 ^f | 3.10±0.39 ^{gk} | 0.60±0.52 | 9.65±1.18 ^{hl} |
| F 值 | | 50.464 | 5.767 | 32.965 | 3.259 | 79.213 |
| P 值 | | 0.000 | 0.008 | 0.000 | 0.054 | 0.000 |

注：与假手术组比较，^a $q=7.937, P<0.01$ ；^b $q=3.984, P<0.01$ ；^c $q=7.597, P<0.01$ ；^d $q=11.094, P<0.01$ ；^e $q=14.174, P<0.01$ ；^f $q=4.316, P<0.05$ ；^g $q=11.255, P<0.01$ ；^h $q=17.602, P<0.01$ 。与黄连素组比较，ⁱ $q=6.236, P<0.01$ ；^j $q=-0.332, P>0.05$ ；^k $q=3.658, P<0.05$ ；^l $q=-6.508, P<0.01$

Note: Compared with sham operation group, ^a $q=7.937, P<0.01$ ；^b $q=3.984, P<0.01$ ；^c $q=7.597, P<0.01$ ；^d $q=11.094, P<0.01$ ；^e $q=14.174, P<0.01$ ；^f $q=4.316, P<0.05$ ；^g $q=11.255, P<0.01$ ；^h $q=17.602, P<0.01$ 。Compared with berberine group, ⁱ $q=6.236, P<0.01$ ；^j $q=-0.332, P>0.05$ ；^k $q=3.658, P<0.05$ ；^l $q=-6.508, P<0.01$

表 4 各组股骨外髌软骨下骨板组织靶基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Relative mRNA gene expression of targeted genes in articular cartilage in different groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 兔数 | OPG | RANKL | OPG/RANKL 比值 |
|------|----|------------------------|----------|-----------------------|
| 假手术组 | 10 | 51.3±4.6 | 43.0±2.9 | 1.2±0.2 |
| 黄连素组 | 10 | 45.1±5.4 ^a | 41.3±3.4 | 1.0±0.1 ^b |
| 安慰剂组 | 10 | 33.6±5.8 ^{ce} | 44.6±3.3 | 0.8±0.1 ^{df} |
| F 值 | | 28.843 | 2.682 | 24.312 |
| P 值 | | 0.000 | 0.087 | 0.000 |

注：与假手术组比较，^a $q=-3.733, P<0.05$ ；^b $q=-3.718, P<0.05$ ；^c $q=-10.589, P<0.01$ ；^d $q=-3.718, P<0.05$ 。与黄连素组比较，^e $q=-6.856, P<0.01$ ；^f $q=6.051, P<0.01$

Note: Compared with sham operation group, ^a $q=-3.733, P<0.05$ ；^b $q=-3.718, P<0.05$ ；^c $q=-10.589, P<0.01$ ；^d $q=-3.718, P<0.05$ 。Compared with berberine group, ^e $q=-6.856, P<0.01$ ；^f $q=6.051, P<0.01$

作为黄连的主要单体活性成分，其与黄连在性味、功效和主治证上具有一致性，故以黄连素治疗 OA 具有一定的中医辨证施治根据。现代医学认为黄连素具有广泛的药理作用，包括抗炎、抗肿瘤、抑菌、降脂等^[4]。前期研究发现黄连素具有改善 OA 动物模型关节软骨细胞代谢、保护软骨 ECM 结构的效应，其主要机制是通过抑制软骨组织中聚蛋白多糖酶-4/5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4/5, ADAMTS-4/5) 的表达，上调金属蛋白酶组织抑制剂-3 (tissue inhibitors of metalloproteinase-3, TIMP-3) 的表达，减轻软骨 ECM 蛋白多糖的丢失^[2]。研究采用的软骨组织 Mankin 手段进一步细化了对关节软骨结构改变的评估，结果中发现与安慰剂组相比较，黄连素可以明显改善软骨结构并阻止蛋白多糖的丢失，这说明黄连素具有软骨形态学改善作用。然而与以往研究不同的是，黄连素

处理组在软骨细胞和潮线完整性方面与安慰剂组比较差异无统计学意义^[5]，推测原因如下：当前实验选取 ACLT 术后 6 周获取软骨标本，从组织切片上观察术后 6 周仅仅只有软骨表层的不平整和透明软骨浅层的蛋白多糖丢失，这提示术后 6 周的组织病理学改变与 OA 疾病的早期阶段相符合。而 Mankin 评分中的软骨细胞排列和潮线完整性两项指标发生异常多和 OA 疾病中晚期有关^[3]，因此可以解释在本实验中黄连素处理后对软骨细胞排列和潮线的影响均不显著，在今后的研究中若增加更长久的标本获取时间点并进行评估，以上两个指标可能会存在显著性差异，这还需将来进一步证实。

3.2 黄连素改善软骨下骨重塑的作用机制

软骨下骨的骨吸收作为先于关节软骨破坏的组织学事件，是早期 OA 的特征之一^[6]。在当前研究中对软骨下骨板的 BV、BV/TV、TC、Tb.Th 进行了组织学评估，其中 BV 可以反映软骨下骨板的骨量，而 TC 和 Tb.Th 可以反映骨小梁的丰满度，BV/TV 可以反映骨吸收程度或骨质疏松的情况。当前研究发现，黄连素处理后可以显著增高软骨下骨板上述 4 项指标值，这提示黄连素可以抑制软骨下骨的骨吸收，从而维持了正常的软骨下骨板的力学传导，进而延缓了 OA 的发展。结合目前研究，在早期 OA 中，软骨下骨板的重塑早于特征性的关节软骨退变^[7]，因此笔者推测本实验中黄连素保护关节软骨的效应可能是通过其抑制软骨下骨板的吸收来实现的。那么黄连素又是通过何种机制来改善软骨下骨板的重塑的呢？本研究进一步检测黄连素对骨重塑关键通路 OPG/RANKL 的影响。基因分析结果显示，OA 动物模型软骨下骨 OPG mRNA 表达及 OPG/RANKL 比值显著减低，这表明在 OA 早期 OPG 与 RANKL 之间的平衡已经被打破，OPG/RANKL 系统失衡是软骨下骨板吸收的可能分子机制，而黄连素干预后可

有效逆转上述改变,恢复 OPG/RANKL 系统的平衡。这说明黄连素改善早期 OA 软骨下骨重塑的分子药理机制可能是通过上调 OPG 表达和 OPG/RANKL 比值,从而抑制了破骨细胞活化诱导的骨吸收过程。

由于关节软骨破坏的“不可逆性”,迫使众多中晚期 OA 患者不得不接受人工关节置换术,因此,OA 的干预关键在于早期。本研究表明黄连素可以有效阻止 OA 发病的早期组织学事件“软骨下骨吸收”,这对临床上早期干预 OA 具有一定的指导意义。另外,黄连素作为一种常规止泻临床用药,具有安全性高,副作用小,患者耐受性佳的特点^[8]。因此,黄连素有望在将来成为一种新型的抗 OA 药物,然而目前有关黄连素作用于 OA 的分子药理机制研究还处在动物实验阶段,今后还需开展临床试验证实其有效性。

3.3 本研究的局限性

首先,OA 的病因复杂,除了创伤引起外,大多数和年龄相关,且关节软骨的退变是一个随着年龄增加的缓慢过程,而这一过程长达数 10 年^[9]。本研究使用的 ACLT 动物模型是通过人为制造关节结构损伤来诱导 OA 发生,因此仅能体现创伤后 OA 的相关组织及分子生物学改变^[10]。其次,最近研究^[11]已经表明在 OA 早期,关节软骨与软骨下骨之间存在“串扰对话”(即软骨即骨各自的生化学改变会相互影响)。由于实验动物数量的限制,本研究中并未深入探索这种“串扰对话”对 OA 发展的影响,有待于将来大样本动物实验中进一步完善。

综上所述,关节腔内注射黄连素可以有效抑制 OA 早期软骨下骨吸收,延缓疾病发展,具体机制可能是黄连素通过上调软骨下骨 OPG 基因表达,维持 OPG/RANKL 系统的平衡。这一结论为 OA 的病理机制提供新理论,为新型抗 OA 药物的研究提供新的分子靶点。

参考文献

[1] 宋才渊,彭冰,沈佳怡,等. 破骨细胞分化调节机制的研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(6):580-584.

SONG CY, PENG B, SHEN JY, et al. Research on regulation mechanism of osteoclast differentiation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6):580-584. Chinese with abstract in English.

- [2] 黄恺,蔡海丽,张建方,等. 黄连素抑制兔骨关节炎软骨基质金属蛋白酶-13 及血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-5 表达保护软骨基质的实验研究[J]. 中华风湿病学杂志,2016,20(8):514-519.
- HUANG K, CAI HL, ZHANG JF, et al. The effect of berberine on the expression of matrix metalloproteinase-13 and ADAMTS-5 in articular cartilage in a rabbit model of osteoarthritis[J]. Zhonghua Feng Shi Bing Xue Za Zhi, 2016, 20(8):514-519. Chinese.
- [3] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3):523-537.
- [4] Jin Y, Khadka DB, Cho WJ. Pharmacological effects of berberine and its derivatives: a patent update [J]. Expert Opin Ther Pat, 2016, 26(2):229-243.
- [5] Hu PF, Chen WP, Tang JL, et al. Protective effects of berberine in an experimental rat osteoarthritis model [J]. Phytother Res, 2011, 25(6):878-885.
- [6] Coughlin TR, Kennedy OD. The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2016, 1383(1):58-66.
- [7] 庞坚,曹月龙,石印玉. 骨关节炎软骨下骨研究进展[J]. 中国骨伤,2011,24(8):702-704.
- PANG J, CAO YL, SHI YY. Subchondral bone in osteoarthritis: a review [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(8):702-704. Chinese with abstract in English.
- [8] 邢娟,何梦静. 黄连素的临床应用[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(72):231-232.
- XING J, HE MJ. Clinical application of berberine [J]. Shi Jie Zui Xin Yi Xue Xin Xi Wen Zhai, 2019, 19(72):231-232. Chinese.
- [9] Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(7):412-420.
- [10] Levillain A, Boulocher C, Kaderli S, et al. Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7):1186-1193.
- [11] Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(11):632-644.

(收稿日期:2021-04-14 本文编辑:李宜)