

· 基础研究 ·

通络止痛凝胶制剂对 KOA 滑膜组织中 p53/miR-502-5p/NF-κBp65 的影响

张晓哲, 张栋, 阮安民, 李惠娟, 陈谱, 周俊, 马玉峰, 祁印泽, 王庆甫
(北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

【摘要】 目的: 观察通络止痛凝胶制剂对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)滑膜组织中 p53、miR-502-5p、NF-κBp65 的影响, 探讨通络止痛凝胶制剂治疗 KOA 的作用机制。方法: 选取 8 周龄 Wistar 大鼠 36 只, 体重 200~220 g, 平均 208 g, 采用随机数字表法分为正常组、模型组、中药组, 每组 12 只。采用改良 Hulth 法建立 KOA 模型, 造模 4 周后, 中药组给予通络止痛凝胶制剂外擦, 3 次/天, 共 2 周; 正常组和模型组正常饲养、不干预。治疗结束后, 观察各组标本形态学变化; 采用 qPCR 检测滑膜组织 miR-502-5p 的变化, 再分别采用 qPCR、Western Blot 法检测滑膜组织 p53、NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的含量。结果: (1) 标本形态学观察结果, 模型组关节软骨透明度下降、表面不平整, 滑膜肥厚增生并有大量炎性细胞浸润, 关节液质地较黏稠; 中药组关节软骨透明度下降不明显, 关节面较平整, 滑膜轻度增生并有少量炎性细胞浸润, 关节液质地较清晰。(2) 与正常组比较, 模型组、中药组滑膜组织 miR-502-5p 含量升高 ($P < 0.05$), p53 的 mRNA 及蛋白表达下降 ($P < 0.05$), NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的 mRNA 及蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。 (3) 与模型组比较, 中药组滑膜组织 miR-502-5p 含量降低 ($P < 0.05$), p53 的 mRNA 及蛋白表达升高 ($P < 0.05$), NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的 mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论: 滑膜组织中 p53、miR-502-5p、NF-κBp65 的表达与滑膜的增生及炎症反应密切相关, 通络止痛凝胶制剂可能是通过调控滑膜组织中 p53、miR-502-5p、NF-κBp65 的表达, 从而减轻 KOA 滑膜的增生及炎症反应。

【关键词】 骨关节炎, 膝; 滑膜; 凝胶类; 基因表达
中图分类号: R684

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.07.010

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Tongluo Zhitong (通络止痛, TLZT) gel preparation on p53/miR-502-5p/NF-κBp65 in synovial tissue of knee osteoarthritis ZHANG Xiao-zhe, ZHANG Dong, RUAN An-min, LI Hui-juan, CHEN Pu, ZHOU Jun, MA Yu-feng, QI Yin-ze, and WANG Qing-fu. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT **Objective:** To observe effects of Tongluo Zhitong (通络止痛, TLZT) gel preparation on p53, miR-502-5p, NF-κBp65 in synovial tissue of knee osteoarthritis (KOA), and to explore mechanism of TLZT gel preparation in treating KOA. **Methods:** Thirty-six Wistar rats aged 8 weeks and weighed 200 to 220 g (meaned 208 g) were randomly divided into normal group, model group and traditional Chinese medicine (TCM) group, 12 rats in each group. KOA model was established by modified Hulth method. After 4 weeks of modeling, TCM group treated with TLZT gel preparation for external use, 3 times daily for 2 weeks; normal group and model group were fed normally without intervention. After treatment, morphological changes of specimens in each group were observed, changes of miR-502-5p in synovial tissue were detected by qPCR, and contents of p53, NF-κBp65, IL-1β, TNF-α, MMP-13 in synovial tissue were detected by qPCR and Western Blot respectively. **Results:** (1) Morphological observation of specimens showed that the articular cartilage in model group was hyaline and uneven, the synovial membranes were hypertrophic and proliferative with a large number of inflammatory cells infiltrating, the joint fluid was thicker in texture; the articular cartilage in TCM group was more transparent and smooth, synovial hyperplasia was mild with a small amount of inflammatory cell infiltration, the texture of articular fluid was clear and sparse. (2) Compared with normal group, content of miR-502-5p of synovial tissue in model and TCM group were increased, mRNA and expression of p53 decreased, expression of NF-κBp65, IL-1β, TNF-α, MMP-13 increased. (3) Compared with model group, content of miR-502-5p in synovial tissue of TCM group decreased ($P < 0.05$), mRNA and protein expression of p53 increased ($P < 0.05$), mRNA and protein expression of NF-κBp65, IL-1β, TNF-α, MMP-13 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Expression of p53,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81373662); 北京中医药大学自主课题项目(编号: 2018-JYBZZ-XS236)

Fund program: National Natural Science Foundation (No. 81373662)

通讯作者: 王庆甫 E-mail: qingpu-wang@sohu.com

Corresponding author: WANG Qing-fu E-mail: qingpu-wang@sohu.com

miR-502-5p, NF-κBp65 in synovial tissue is closely related to synovial hyperplasia and inflammatory reaction, TLZT gel preparation may reduce proliferation and inflammatory reaction of KOA synovium by regulating the expression of p53, miR-502-5p, NF-κBp65 in synovial tissues.

KEYWORDS Osteoarthritis, knee; Synovial membrane; Gels; Gene expression

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的骨关节炎,其发病与高龄、肥胖、性别密切相关,可严重影响中老年人的生活甚至发生膝关节畸形,因此,找到安全有效的治疗措施显得尤为重要。研究^[1]发现超声促透通络止痛方比传统中医外治法治疗 KOA 更有效,且通络止痛方可以抑制滑膜细胞的增殖^[2],并有抑制关节液中白细胞介素 1β (interleukin-1β, IL-1β),一氧化氮(nitric oxide, NO)和促进透明质酸分泌的作用^[3]。本研究采用大鼠 KOA 模型,通过研究通络止痛凝胶制剂对滑膜组织的增生和 miR-502-5p、p53、NF-κBp65、IL-1β、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor, TNF-α),基质金属蛋白酶-13 (metal matrix proteinase-13, MMP-13)的影响来探讨通络止痛凝胶制剂治疗 KAO 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

TRIZOL RNA 提取液(美国 Invitrogen 公司,批号:10296028);DEPC 水(MDL 公司,批号:md911875)。UltraPure Agarose, SuperScript III RT 反转录 kit, Sybr qpcr mix (美国 ABI-invitrogen 公司,批号分别为:16500100、11752050、4472920);Anti-NF-κBp65 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号:8242S);Anti-p-53 抗体、Anti-IL-1β 抗体、Anti-TNF-α 抗体、Anti-MMP-13 抗体(英国 abcam 公司,批号分别为:ab61241、ab9722、ab6671、ab39012)。

1.2 实验动物

选取 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 200~220 g,平均 208 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SYXK(京)2012-0036。饲养环境为中日友好医院实验动物中心 SPF 级动物房,许可证编号:SYXK(京)2016-0043,适应性饲养 1 周后开始实验。

1.3 通络止痛凝胶制剂的制备

通络止痛凝胶制剂将卡波姆基质 900 ml (上海源叶生物科技有限公司),浓煎中药液 60 ml (桂枝 100 g、白芍 60 g、桃仁 30 g、红花 30 g、牛膝 20 g、制草乌 20 g、细辛 20 g、川椒 20 g,购自北京中医药大学第三附属医院中药房),桂皮醛脂质体混悬液 100 ml 和乳香 30 g、没药 30 g 细粉按规定的流程(专利名称:一种通络止痛凝胶制剂及其制备方法;专利号:201810315891.8)制作而成,其中桂皮醛脂质体混悬

液由桂皮醛(上海麦克林生化科技有限公司)、卵磷脂(德国, Lipoid)、胆固醇(美国, Amresco)按配方比例 9:256:32 制成。

1.4 模型制备、分组与干预方法

36 只大鼠先进行标号,采用随机数字表法分为正常组、模型组、中药组,每组 12 只。模型组、中药组采用改良 Hulth 法^[4]构建大鼠 KOA 模型,采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,取髌骨内侧切口,依次切断内侧副韧带、前交叉韧带后,完全切除内侧半月板,逐层缝合,术后连续 3 d 注射青霉素 2×10⁴ U 防止感染。造模 4 周后,将中药组大鼠右下肢膝关节周围皮肤脱毛后开始干预,每次予 0.7 cm 通络止痛凝胶制剂,3 次/天,干预 2 周。正常组、模型组不干预。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 取材及样本观察 使用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,备皮、消毒后,取髌骨内侧切口,依次切开皮肤、关节囊,首先肉眼观察股骨髁上软骨的颜色和表面形态、滑膜有无增生肥厚及关节液的质地,然后取部分滑膜组织做病理切片,行苏木精-伊红染色,光镜下观察。剩余滑膜组织置于-80℃冰箱中保存待测。

1.5.2 滑膜组织中 miR-502-5p 信号通路及炎症因子的 mRNA 表达检测 根据目的基因设计引物序列(见表 1)。使用 Trizol RNA 提取液提取滑膜组织的 RNA,按照反转录试剂盒 Superscript III 操作合成 cDNA。每个样本分别用待检测基因和内参基因引物扩增,每个反应做 3 个重复,按照 PCR 扩增体系(表 2)及 qPCR 扩增条件:95℃ 2 min, 94℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s, 40 次循环。PCR 结束后,以 β-actin 作为内参照,与目的产物进行比较进行相对定量,检测荧光值得到 CT 值,根据 2^{-ΔΔCT} 方法计算获得相对定量结果。

1.5.3 滑膜组织中 miR-502-5p 信号通路及炎症因子的蛋白表达检测 将滑膜组织样品,加入液氮研磨后,加入总蛋白裂解液,冰浴中以最大功率超声破碎细胞(3×10 s)后,在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液。采用 BCA 蛋白定量法测量上清液的蛋白浓度后,在 SDS-PAGE 凝胶电泳系统中电泳,并将分离的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜(Millipore, USA)后,将其置于封闭液中,在室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h。将封闭后的膜分别加入对应的一抗工作液中(8242S/

表 1 荧光定量 PCR 所测基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences of genes measured by quantitative PCR

目的基因	上游	下游
miR-502-5p	AATCCTTGCTATCTGGGTGC	TGCGTGTCTGGAGTGC
p53	ACGTGCTCACAACCTGGCTAAA	TTTAGGCTGCTCCTATCGGC
MMP-13	ACCCAGCCCTATCCCTTGAT	TCTCGGGATGGATGCTCGTA
NF-κBp65	TGCATTCTGACCTTGCCTAT	TCCAGTCTCCGAGTGAAGC
IL-1β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCCGAGATT
TNF-α	GATCGGTCCCAAGGGATG	CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG

表 2 PCR 反应体系

Tab.2 Reaction system of PCR

PCR 成分	体积(μl)
cDNA	2
qPCR mix	10
primer F	1
primer R	1
ddH ₂ O	6

ab61241/ab9722/ab6671/ab39012), 4 ℃ 下反应一夜。将一抗反应膜使用 TBST 洗涤 3 次后放入二抗工作液中, 在室温、避光下作用 60 min。采用 ECL 化学发光方法, 使用化学发光成像系统成像, 用 Image J 软件定量多肽条带, 计算各组条带的灰度值, 将目的基因与内参基因灰度值的比值作为滑膜组织 p53、NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的相对蛋白表达量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 定量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组比较采用方差分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理观察

2.1.1 大体观察 正常组膝关节股骨髁上的软骨表面光滑平整, 呈淡蓝色、无裂纹及软化灶; 滑膜无肥厚增生; 关节液透明, 未见炎症反应(图 1a)。模型组膝关节股骨髁上的软骨面呈乳白色, 透明度下降, 表面不平整, 部分关节软骨表面可见软化灶及骨赘形成; 滑膜呈乳黄色, 肥厚增生; 关节液呈黄色, 质地较黏稠(图 1b)。中药组膝关节股骨髁上的软骨稍

白, 软骨透明度略有下降, 关节面平整, 未见软化灶; 滑膜为淡黄色, 轻度肥厚增生; 关节液略增多, 呈淡黄色, 部分可见少量滤泡(图 1c)。

2.1.2 滑膜组织切片观察 膝关节滑膜组织病理学观察: 正常组滑膜衬里细胞 1~2 层, 排列整齐, 滑膜组织无增生及炎性细胞浸润(图 2a); 模型组滑膜衬里细胞 5~7 层, 排列紊乱, 滑膜组织可见血管扩张、增生及大量的炎细胞浸润(图 2b); 中药组滑膜衬里细胞 3~4 层, 排列相对整齐, 滑膜组织可见轻度增生及少量炎性细胞浸润(图 2c)。

2.2 滑膜组织中 miR-502-5P 信号通路及炎症因子的 mRNA 表达检测结果

与正常组比较, 模型组、中药组大鼠滑膜组织 miR-502-5p、NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), p53 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组 miR-502-5p、NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), p53 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 滑膜组织中 miR-502-5p 信号通路及炎症因子的蛋白表达检测结果

与正常组比较, 模型组、中药组大鼠滑膜组织 NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 的相对蛋白表

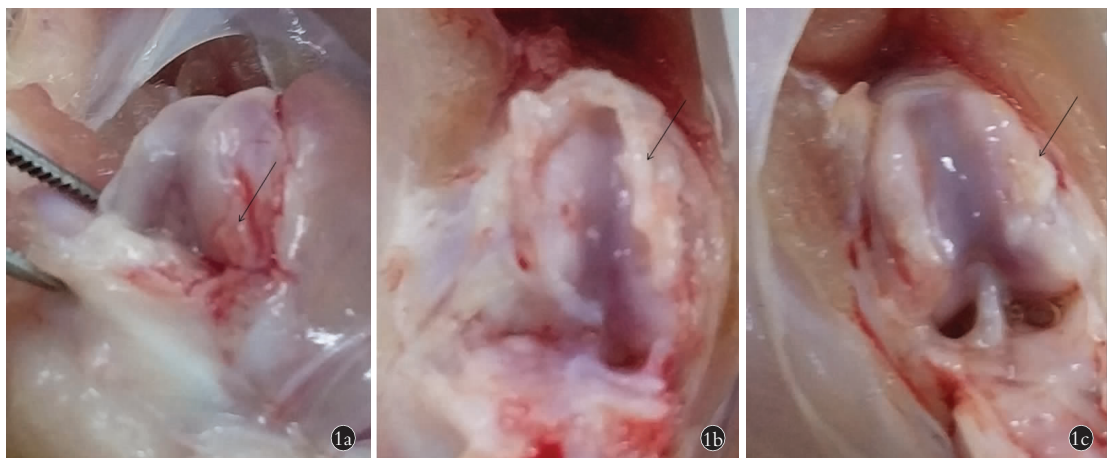


图 1 各组大鼠膝关节外观图, 箭头所示为膝关节滑膜组织 1a. 正常组 1b. 模型组 1c. 中药组

Fig.1 Apparent picture of knee joint among 3 groups, the arrows showed synovial tissue of knee joint 1a. Normal group 1b. Model group 1c. TCM group

达量升高 ($P<0.05$), p53 的相对蛋白表达量下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 中药组 NF- κ Bp65、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 的相对蛋白表达量下降 ($P<0.05$), p53 相对蛋白表达量升高 ($P<0.05$)。见图 3, 表 4。

3 讨论

本研究团队前期已通过基础和临床试验证实了

通络止痛方的疗效^[1-3], 但目前临床应用中主要采用低频超声促透通络止痛方治疗膝骨关节炎, 此种治疗方式需要低频超声促透仪的辅助, 不适合在医院外推广。研究证实使用凝胶剂作为中药成分的载体, 可使中药有效成分直接在患处皮肤被吸收到治疗局部的目的^[5], 故本研究选取卡波姆 940 为凝胶剂

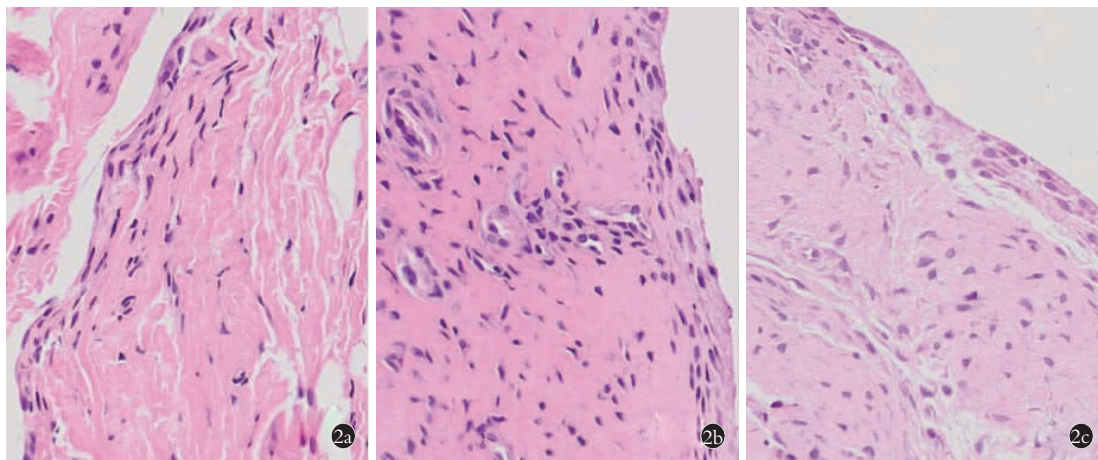


图 2 滑膜组织病理切片(HE 20×10) 2a. 正常组 2b. 模型组 2c. 中药组

Fig.2 Histopathological section of synovial tissue (HE 20×10) 2a. Normal group 2b. Model group 2c. TCM group

表 3 各组滑膜组织信号通路及炎症因子的 mRNA 表达检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Signal passway of miR-502-5p in synovial tissue and mRNA expression of inflammatory factor among 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	miR-502-5p	p53	NF- κ Bp65	IL-1 β	TNF- α	MMP-13
正常组	6	0.39±0.10	1.73±0.29	0.72±0.13	0.43±0.17	0.43±0.13	0.34±0.09
模型组	6	1.02±0.20 ^{a1}	0.53±0.14 ^{a2}	4.83±0.94 ^{a3}	2.02±0.33 ^{a4}	1.14±0.17 ^{a5}	1.04±0.15 ^{a6}
中药组	6	0.57±0.12 ^{b1c1}	0.96±0.27 ^{b2c2}	2.44±0.57 ^{b3c3}	1.09±0.19 ^{b4c4}	0.74±0.12 ^{b5c5}	0.64±0.13 ^{b6c6}
F 值		25.27	31.44	51.53	56.43	30.78	38.79
P 值		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: 与正常组比较, ^{a1}t=6.33, ^{a2}t=8.36, ^{a3}t=9.61, ^{a4}t=9.67, ^{a5}t=7.41, ^{a6}t=8.81, ^{b1}t=3.37, ^{b2}t=4.32, ^{b3}t=6.56, ^{b4}t=2.78, ^{b5}t=3.73, ^{b6}t=4.23, $P<0.05$; 与模型组比较, ^{c1}t=3.89, ^{c2}t=3.21, ^{c3}t=4.83, ^{c4}t=5.54, ^{c5}t=4.31, ^{c6}t=4.52, $P<0.05$

Note: Compared with normal group, ^{a1}t=6.33, ^{a2}t=8.36, ^{a3}t=9.61, ^{a4}t=9.67, ^{a5}t=7.41, ^{a6}t=8.81, ^{b1}t=3.37, ^{b2}t=4.32, ^{b3}t=6.56, ^{b4}t=2.78, ^{b5}t=3.73, ^{b6}t=4.23, $P<0.05$; compared with model group, ^{c1}t=3.89, ^{c2}t=3.21, ^{c3}t=4.83, ^{c4}t=5.54, ^{c5}t=4.31, ^{c6}t=4.52, $P<0.05$

表 4 各组滑膜组织 miR-502-5p 信号通路及炎症因子的蛋白表达检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Signal passway of miR-502-5p in synovial tissue and protein expression of inflammatory factor among 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	p53	NF- κ Bp65	IL-1 β	TNF- α	MMP-13
正常组	6	0.59±0.10	0.32±0.04	0.21±0.03	0.23±0.04	0.33±0.05
模型组	6	0.23±0.06 ^{a1}	0.55±0.07 ^{a2}	0.50±0.04 ^{a3}	0.63±0.08 ^{a4}	0.57±0.09 ^{a5}
中药组	6	0.37±0.05 ^{b1c1}	0.38±0.06 ^{b2c2}	0.29±0.03 ^{b3c3}	0.46±0.07 ^{b4c4}	0.39±0.03 ^{b5c5}
F 值		35.21	20.10	57.08	38.74	13.27
P 值		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: 与正常组比较, ^{a1}t=7.42, ^{a2}t=6.45, ^{a3}t=9.97, ^{a4}t=8.75, ^{a5}t=5.22, ^{a6}t=4.70, ^{b1}t=1.84, ^{b2}t=3.53, ^{b3}t=6.12, ^{b4}t=2.33, $P<0.05$; 与模型组比较, ^{c1}t=4.29, ^{c2}t=3.98, ^{c3}t=6.80, ^{c4}t=3.20, ^{c5}t=4.24, $P<0.05$

Note: Compared with normal group, ^{a1}t=7.42, ^{a2}t=6.45, ^{a3}t=9.97, ^{a4}t=8.75, ^{a5}t=5.22, ^{a6}t=4.70, ^{b1}t=1.84, ^{b2}t=3.53, ^{b3}t=6.12, ^{b4}t=2.33, $P<0.05$; compared with model group, ^{c1}t=4.29, ^{c2}t=3.98, ^{c3}t=6.80, ^{c4}t=3.20, ^{c5}t=4.24, $P<0.05$

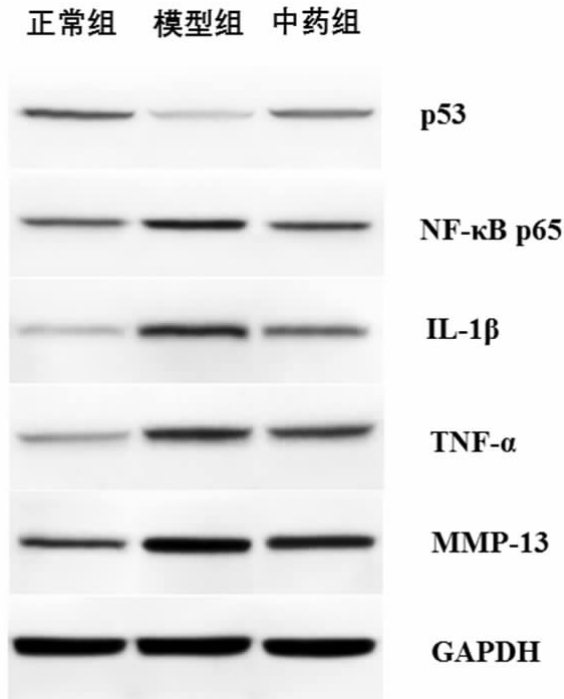


图 3 各组大鼠滑膜 p53、NF-κBp65、IL-1β、TNF-α、MMP-13 比较
Fig. 3 Comparison of p53, NF-κBp65, IL-1β, TNF-α and MMP-13 in synovium among three groups of rats

的基质，将通络止痛方制成可以直接涂抹于膝关节表面中药凝胶制剂，以方便治疗 KAO。

3.1 通络止痛凝胶制剂对滑膜中炎症因子的影响

软骨破坏、软骨下骨骨化、骨质增生及滑膜炎症反应是 KOA 发病过程中的主要病理变化，本研究病理学观察发现通络止痛凝胶制剂可以有效抑制滑膜的炎症反应。有报道称 OA 模型小鼠滑膜中 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平升高^[6]，而 IL-1β 和 TNF-α 等炎症介质的释放可以诱导蛋白水解酶（如基质金属蛋白酶）的表达，从而破坏关节软骨^[7]，同时，IL-1β 也可以通过激活 NF-κB 通路使滑膜间充质干细胞炎症活化，从而加速 KOA 的进展^[8]。MMP-13 具有降解 II 型胶原和促进滑膜炎症反应的作用，并有研究发现 MMP-13 在家兔 KOA 模型滑膜和滑液中的含量均明显升高^[9]。综上所述，滑膜中 IL-1β、TNF-α、MMP-13 含量的升高对于促进滑膜炎症反应及 KOA 病程的进展具有重要作用^[10]。因此，本研究在 KOA 大鼠模型中评估了通络止痛凝胶制剂对滑膜中炎症因子的影响。研究结果显示：通络止痛凝胶制剂可有效抑制滑膜中炎症因子（IL-1β、TNF-α、MMP-13）的表达，这表明通络止痛凝胶制剂缓解滑膜的炎症反应可能源于其对滑膜中炎症因子的抑制作用。有研究发现 IL-1β 和 TNF-α 可以通过调节 OA 滑膜巨噬细胞和成纤维细胞中神经生长因子来

缓解 OA 的疼痛^[11]，由此推断，通络止痛凝胶制剂缓解滑膜的炎症反应的同时也可以缓解 KOA 引起的疼痛。

3.2 通络止痛凝胶制剂对滑膜增生的影响

随着对 OA 发病机制的深入研究，发现滑膜增生、纤维化并分泌炎症介质是导致 OA 进展的重要原因，且滑膜组织可以通过固有免疫系统影响软骨组织的病理变化^[12]。因此，抑制滑膜增生及其炎症反应在 OA 的治疗过程中便具有重要意义。本研究观察了通络止痛凝胶制剂对滑膜增生的影响，结果显示通络止痛凝胶制剂可有效抑制滑膜的增生。p53 是一种抑癌基因，具有调控细胞凋亡、周期及转移的能力。报道称^[13]p53 可能是通过针对下游 *dup1* 基因参与 OA 的进展，提高 p53 的表达可以诱导滑膜细胞的凋亡。因此，p53 对于抑制滑膜的增生具有重要作用。本研究结果显示，通络止痛凝胶制剂可有效提高滑膜中 p53 的表达，提示通络止痛凝胶制剂抑制滑膜的增生可能是由于其对滑膜中 p53 的促进作用。

3.3 调控 miR-502-5p/NF-κB 的表达抑制滑膜的炎症反应

miRNA 是一种内源性非编码小分子核糖核酸，可以通过靶向沉默 mRNA 发挥重要的调控作用^[14]。研究^[15]发现 miRNA 在软骨功能、滑膜炎症反应中发挥重要作用。滑膜成纤维细胞中 miR-210 的高表达可以诱导血管内皮生长因子的分泌从而加速局部的炎症反应^[16]，而本研究所选取的 miR-502-5p 具有抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡并提升细胞的活力的作用。并有研究发现 miR-502-5p 与 p53 之间存在负反馈调节机制，且 miR-502-5p 的启动子区域也有 p53 结合位点^[17]，而在本研究中 KOA 模型组滑膜组织 miR-502-5p 的表达增强而 p53 的表达下降，正好印证了二者的负反馈调节关系。NF-κB 具有调节炎症反应、免疫反应、细胞凋亡以及细胞周期的功能，可通过激活 CD14/TLR-4 诱导滑膜分泌炎症性因子，从而导致 OA 的发生^[18]，另有研究证实可通过抑制 NF-κB 信号通路来降低成纤维滑膜细胞的活性以达到治疗 OA 的目的^[19]。综上所述，抑制滑膜中 miR-502-5p 及 NF-κB 信号通路对于抑制滑膜的炎症反应具有重要作用。本研究结果显示：通络止痛凝胶制剂可有效抑制滑膜中 miR-502-5p 及 NF-κB 信号通路的表达，这表明通络止痛凝胶制剂对滑膜炎症反应的抑制作用可能通过抑制 miR-502-5p 和 NF-κB 信号通路来实现的。研究^[20]发现 NF-κBp65 具有调节小 RNA 表达的作用，在 OA 中主要有 miR-1276 作为 NF-κB 的调控对象，而在本研究中滑膜组织中 miR-502-5p 和 NF-κBp65 同时出现

升高和降低的现象，这说明 NF-κB 可能对 miR-502-5p 也具有调控作用，但是 miR-502-5p 和 NF-κB 之间是否存在直接的调控关系仍有待进一步深入研究。

综上所述，滑膜组织中 p53、miR-502-5p、NF-κBp65 的表达与滑膜的增生及炎症反应密切相关，通络止痛凝胶制剂可能是通过调控滑膜组织中 p53、miR-502-5p、NF-κBp65 的表达，从而抑制 KOA 滑膜的增生和炎症反应，并最终起到治 KOA 的目的。鉴于通络止痛凝胶制剂有着安全、简便易行的特点，本研究可为通络止痛凝胶制剂的临床推广和应用提供初步的理论依据。

参考文献

[1] 戚晴雪, 马玉峰, 吴忌, 等. 低频超声促透通络止痛方对大鼠不同程度膝关节炎的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(3): 244-248.
 QI QX, MA YF, WU J, et al. Effects of low-frequency ultrasound-induced *Tongluo Zhitong* Recipe on different degrees of knee osteoarthritis in rats[J]. *Nan Jing Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*, 2014, 30(3): 244-248. Chinese.

[2] 杨黎黎, 王庆甫, 王欢, 等. MTT 法检测通络止痛方对人膝关节炎滑膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 1105-1108.
 YANG LL, WANG QF, WANG H, et al. MTT method was used to detect the effect of *Tongluo Zhitong* Recipe on the proliferation of human knee osteoarthritis synovial fibroblasts[J]. *Shi Jie Zhong Yi Yao*, 2017, 12(5): 1105-1108. Chinese.

[3] 杨黎黎, 王庆甫, 王欢, 等. 通络止痛方对大鼠膝关节液 IL-1β, HA 及 NO 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(1): 1-4.
 YANG LL, WANG QF, WANG H, et al. Effects of *Tongluo Zhitong* Recipe on IL-1beta, HA and NO in synovial fluid of human knee osteoarthritis[J]. *Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2017, 25(1): 1-4. Chinese.

[4] Zhou X, Zhang L, Guo X, et al. A macaca fascicularis knee osteoarthritis model developed by mmodified Hulth combined with joint scratches[J]. *Med.Sci Monit*, 2018, 24: 3393-3404.

[5] 崔和平, 郭兴凤. 多不饱和脂肪酸对人体神经系统保健作用研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2012, 33(3): 97-102.
 CUI HP, GUO XF. Research progress on the health effects of polyunsaturated fatty acids on human nervous system[J]. *He Nan Gong Ye Da Xue Xue Bao(Zi Ran Ke Xue Ban)*, 2012, 33(3): 97-102. Chinese.

[6] Takano S, Uchida K, Miyagi M, et al. Synovial macrophage-derived IL-1beta regulates the calcitonin receptor in osteoarthritic mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 183(1): 143-149.

[7] Nees TA, Rosshirt N, Reiner T, et al. Inflammation and osteoarthritis-related pain[J]. *Schmerz*, 2019, 33(1): 4-12.

[8] Liao W, Sun J, Liu W, et al. HDAC10 upregulation contributes to interleukin 1β-mediated inflammatory activation of synovium-de-

rived mesenchymal stem cells in temporomandibular joint[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12646-12662.

[9] Wei B, Zhang Y, Tang L, et al. Protective effects of quercetin against inflammation and oxidative stress in a rabbit model of knee osteoarthritis[J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(3): 360-367.

[10] 陈文晓, 单方军, 金红婷. 基质金属蛋白酶-13 的测定在骨关节炎中作用的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 27(7): 617-620.
 CHEN WX, SHAN FJ, JIN HT. Research on application of determination of MMP-13 in osteoarthritis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2014, 27(7): 617-620. Chinese with abstract in English.

[11] Takano S, Uchida K, Inoue G, et al. Nerve growth factor regulation and production by macrophages in osteoarthritic synovium[J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 190(2): 235-243.

[12] Wang H, Wang Q, Yang M, et al. Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis: does synovitis affect cartilage degradation[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1342.

[13] Ci B, Wang W, Ni Y. Inhibitory effect of Saposchnikovia divaricate polysaccharide on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis rat in vitro[J]. *Park J Pharm Sci*, 2018, 31(6): 2791-2798.

[14] Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh - Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation[J]. *Int J Genomics*, 2014, 10: 970607.

[15] MiRzamohammadi F, Papaioannou G, Kobayashi T. MicroRNAs in cartilage development, homeostasis, and disease[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12(4): 410-419.

[16] Liu SC, Chuang SM, Hsu CJ, et al. CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(10): e1485.

[17] 张国梁, 王跃文, 普日布苏荣, 等. p53/miR-502-5p/TRAF2 通路对骨关节炎软骨细胞损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(7): 1283-1290.
 ZHANG GL, WANG YW, PURIBU SR, et al. Effects of p53/miR-502-5p/TRAF2 pathway on chondrocyte damage in osteoarthritis[J]. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi*, 2018, 34(7): 1283-1290. Chinese.

[18] 王学宗, 丁道芳, 薛艳, 等. TLR4/NF-κB 通路参与大鼠膝关节炎滑膜早期病变的研究[J]. 中国骨伤, 2019, 32(1): 68-71.
 WANG XZ, DING DF, XUE Y, et al. Role of TLR4/NF-κB pathway for early change of synovial membrane in knee osteoarthritis rats[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2019, 32(1): 68-71. Chinese with abstract in English.

[19] Wu J, Zhao FT, Fan KJ, et al. Dihydropyrimidin inhibits inflammation of Fibrob-last-like synoviocytes through regulation of NF-κB signaling in collagen-induced arthritis rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 368(2): 218-228.

[20] Zhou F, Wang W, Xing Y, et al. NF-κB target microRNAs and their target genes in TNF α-stimulated HeLa cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(4): 344-354.

(收稿日期: 2019-05-15 本文编辑: 李宜)