

· 基础研究 ·

基于 Akt/mTOR 信号通路探讨补肾活血方对去卵巢大鼠软骨细胞自噬的影响

陶帅¹, 姜宏², 周海燕³

(1. 南京中医药大学泰州附属医院, 江苏 泰州 225300; 2. 南京中医药大学苏州附属医院, 江苏 苏州 215009; 3. 南京中医药大学翰林学院, 江苏 泰州 225300)

【摘要】 目的: 研究补肾活血方是否可以通过调控 Akt/mTOR 信号通路促进去卵巢大鼠软骨细胞自噬反应来保护关节软骨。方法: 选取 30 只 SPF 级 12 周龄雌性 SD 大鼠, 体重(247.0±7.0) g, 先随机选择 6 只为空白对照组, 剩余大鼠采用卵巢切除术结合右膝关节腔注射碘乙酸钠(monosodium iodoacetate, MIA)建立绝经后膝关节关节炎模型, 随机分为模型组、BSHXR-L 组、BSHXR-M 组、BSHXR-H 组, 每组 6 只。运用肉眼观察评分、番红 O-固绿染色、免疫组化等方法明确补肾活血方对大鼠关节软骨损伤的保护作用, Western-blot 检测自噬相关蛋白的表达, qPCR 检测 Akt、mTOR 及下游自噬基因的相对表达。结果: 造模后 BSHXR (L、M、H) 各组均可减轻软骨组织形态学损伤, 免疫组化示 Collagen-II、Aggrecan 表达逐渐升高, 基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 表达逐渐降低, 其中 BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组与模型组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。Western-blot 结果示 BSHXR(L、M、H) 各组自噬通路蛋白 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 受到抑制, 下游蛋白 Beclin-1、LC3 II 表达逐渐升高, 而 p62 逐渐降低, 呈剂量效应。qPCR 结果示 BSHXR(L、M、H) 各组均可促进 Beclin-1、LC3 II mRNA 的相对表达, 抑制 p62、Akt、mTOR mRNA 的相对表达, 与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论: 补肾活血方可以通过抑制 Akt/mTOR 信号通路增强软骨细胞自噬反应, 进而发挥保护软骨的作用。

【关键词】 补肾活血方; 绝经; 膝关节关节炎; 软骨细胞自噬; Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R274.9

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20220321

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of *Bushen Huoxue* (补肾活血) recipe on autophagy of ovariectomized rat chondrocytes based on Akt/mTOR signaling pathway

TAO Shuai¹, JIANG Hong², ZHOU Hai-yan³ (1. Taizhou Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, Jiangsu, China; 2. Suzhou Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu, China; 3. Hanlin College of Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, Jiangsu, China)

ABSTRACT Objective To investigate whether *Bushen Huoxue* recipe can protect articular cartilage by regulating Akt/mTOR signaling pathway to promote the autophagy of chondrocytes in ovariectomized rats. **Methods** Among 30 SPF 12-week-old female SD rats weighing (247.0±7.0) g, 6 were randomly selected as the blank control group, and the remaining rats were randomly divided into model group, BSHXR-L group, BSHXR-M group and BSHXR-H group, with 6 rats in each group. The protective effect of *Bushen Huoxue* recipe on articular cartilage injury in rats was determined by visual observation score, mucovine O-solid green staining and immunohistochemistry. The expression of autophagy related proteins was detected by Western-blot, and the relative expression of Akt, mTOR and downstream autophagy genes was detected by qPCR. **Results** After modeling, BSHXR (L, M, H) groups could alleviate the histological damage of cartilage. Immunohistochemistry showed that the expression of Collagen-II and Aggrecan gradually increased, and the expression of MMP-13 gradually decreased, and the differences between BSHXR-M and BSHXR-H groups and model group were statistically significant ($P<0.05$). The results of Western-blot showed that the autophagy pathway proteins p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR were inhibited in the BSHXR (L, M, H) groups, and the expressions of downstream proteins Beclin-1 and LC3 II were gradually increased, while p62 was gradually decreased, showing a dose effect. QPCR results showed that BSHXR (L, M, H) groups could promote the relative expression of Beclin-1 and LC3 II mRNA, and inhibit the relative expression of p62, Akt, mTOR mRNA, and the differences were

基金项目: 泰州市科技支撑计划(社会发展)项目(编号: TS201909)

Fund program: Taizhou Science and Technology Support Plan (Social Development) Project (No. TS201909)

通讯作者: 陶帅 E-mail: taoshuai130@163.com

Corresponding author: TAO Shuai E-mail: taoshuai130@163.com

statistically significant compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Bushen Huoxue recipe can enhance the cartilage autophagy response by inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway, and then protect the cartilage.

KEYWORDS Bushen Huoxue recipe; Menopause; Knee osteoarthritis; Chondrocyte autophagy; Akt/mTOR signaling pathway

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是由炎症加剧引起的关节疾病,软骨损伤是其特有的病理特征,其发病机制非常复杂,一般认为是在遗传易感性的基础上,人类内部环境的变化和局部理化因素的长期综合作用的结果,特别是绝经后雌激素大幅度降低的情况下妇女更易患膝 OA。有研究表明,软骨细胞的自噬水平与 OA 状态之间存在高度相关性,是一种抗凋亡的细胞保护机制,而 Akt/mTOR 信号通路在此过程中发挥着重要作用^[1]。补肾活血方由《备急千金要方》经典古方“独活寄生汤”化裁而成,绝经后妇女体弱腠理不密,无力抵御风、寒、湿外邪,外邪入侵而为痹,同时结合王清任在《医林改错》提出的“痹久必有瘀血”“久病入络”等理论,在补益肝肾的同时常常佐以活血行气之品,以寓补中有泻、补泻兼施。本方中重用怀牛膝,作为君药主奏调补肝肾、强筋壮骨之功,同时兼以活血通经;熟地、续断为臣药,辅助君药进一步加强补益肝肾之功效;膝痹标者,风寒湿邪侵袭,气血运行不畅致瘀血阻滞,故本方佐以独活祛风湿、止痹痛,同时佐以当归、川芎、白芍以柔肝舒筋,活血化瘀,通经止痛;甘草常作为使药,意在调和诸药,缓急止痛。本研究旨在从软骨细胞自噬过程着手,自 2019 年 8 月至 2019 年 12 月,采用雌性 SD 大鼠成功制备去卵巢大鼠模型,进一步探索补肾活血方调控 Akt/mTOR 信号通路发挥保护软骨的作用机制,拟为临床运用补肾活血方防治绝经后膝骨关节炎提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 12 周龄 SD 雌性大鼠 30 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2016-0011],体重(247.0±7.0)g,温度 20℃,湿度 30%~50%,昼夜循环 12 h/12 h,不限制大鼠的摄食、饮水和活动。鼠笼内垫料需高压灭菌后才能使用,隔日更换。实验中所有与动物有关的操作均应符合 2006 年 9 月中华人民共和国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》,并通过南京中医药大学动物伦理委员会审查批准(批准号:201910A050)。

1.2 实验药物

(1)补肾活血方:怀牛膝 20 g,熟地黄 15 g,川断 15 g,当归 10 g,川芎 10 g,独活 10 g,白芍 15 g,甘草 6 g,1 000 ml 去离子文火水煎,煎煮 3 次,每次 2 h,

收集 3 次煎煮液,干燥法浓缩至相对生药量为 1.5 g·ml⁻¹,4℃冰箱保存备用。(2)碘乙酸钠(monosodium iodoacetate, MIA):大鼠每次关节腔注射量为 50 mg·kg⁻¹,注射体积按 25 μl/100 g 体重计算,-20℃保存。

1.3 实验仪器与试剂

1.3.1 实验试剂及耗材 番红 O-固绿染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1031);Collagen-Ⅱ 抗体、Aggrecan 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab34712、ab216965);MMP-13 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc515284);Beclin1 抗体,LC3 Ⅱ 抗体,p62 抗体,p-Akt 抗体,Akt 抗体,p-mTOR 抗体,mTOR 抗体,内参 GAPDH 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab210498、ab63817、ab109012、ab38449、ab18785、ab137133、ab134903、ab8245);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix,HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为 Q711、R232-01)。

1.3.2 实验仪器 荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号 IX71),水浴恒温振荡器(苏州海思源仪器设备有限公司,型号 HZS-HA),全自动智能脱水机(深圳达科为生物技术股份有限公司,型号 HP300),蛋白印迹仪(美国 BIO-RAD 公司,型号 Trans-Blot Turbo),实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号 7500)。

1.4 造模及分组

30 只雌性 SD 大鼠先随机选择 6 只为空白对照组,剩余 24 只 SD 大鼠均行双侧卵巢切除术(ovariectomized, OVX)。术后 2 周右膝关节腔内注射 MIA,造绝经后膝骨关节炎模型^[2],并随机分为 4 组,每组 6 只。造模后观察 1 周,第 2 周开始干预治疗,灌胃,每日 1 次。

空白组:取同样切口及操作方法进入腹腔后,暴露卵巢后切取其旁一小块脂肪再缝合切口,术后常规处理,术后 2 周右膝关节腔内注射生理盐水(体积按 25 μl/100 g 体重计算),予以常规喂养。模型组:予以生理盐水(1 ml/100 g)灌胃。低剂量中药组(BSHXR-L 组):予以低剂量(0.9 ml/100 g)中药水煎剂灌胃;中剂量中药组(BSHXR-M 组):予以中剂量(1.8 ml/100 g)中药水煎剂灌胃。高剂量中药组(BSHXR-H 组):予以高剂量(3.6 ml/100 g)中药水煎剂灌胃。连续干预 4 周后颈椎脱臼处死各组大鼠,

切开膝关节腔,用手术刀小心地取出膝关节软骨于 -80°C 冰箱保存备用。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 肉眼观察膝关节软骨外观 软骨外观评分标准^[3]:1分,软骨表面微黄变色;2分,负重区域有少量软骨糜烂;3分:大面积软骨糜烂延伸至软骨下骨;4分,大面积软骨糜烂伴随软骨下骨外露。

1.5.2 番红 O-固绿染色软骨组织病理形态改变 室温下二甲苯常规脱蜡;无水乙醇重新水化 5 min,降级梯度酒精再水化 5 min,蒸馏水洗涤 2 min;苏木精染色 3 min,乙醇处理 15 s,蒸馏水洗涤 1 min;蒸馏水洗涤 3 次,并浸入固绿染色液中 3 min;1%的冰醋酸中洗涤,室温下 0.1%番红 O 中染色 1 min;二甲苯透明,中性树脂密封切片,图像采集。

1.5.3 免疫组化检测软骨组织 Collagen-Ⅱ、Aggrecan、MMP-13 表达 软骨组织切片常规脱蜡重新水化,PBS 洗涤 3 次;EDTA 缓冲液沸点加热 10 min。3% H_2O_2 孵育 10 min;山羊血清封闭液室温下封闭 1 h。 4°C 下与抗 Collagen-Ⅱ、Aggrecan、MMP-13 孵育过夜;山羊抗、兔二抗室温孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次。DAB 室温暗箱孵育 15 min,苏木精染色。生理盐水和乙醇浸泡,二甲苯透明,中性树脂封片。光镜下采集结果图像,使用 Image J 软件分析阳性表达情况。

1.5.4 Western-blot 检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 Ⅱ、p62、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 的表达 用液氮保存膝关节软骨,每 100 mg 软骨组织中加入 600 μl 蛋白裂解液,在冰上进行裂解匀浆,离心上清液;采用 BCA 法测定样品蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳浓缩和分离蛋白,转膜后置于 TBST 封闭液室温下封闭 1 h。 4°C 条件下加入特异性一抗孵育过夜,TBST 洗涤 3 次 \times 5 min,于室温下二抗孵育 1 h,TBST 再次洗涤 3 次 \times 5 min。加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

1.5.5 定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测 Beclin-1、LC3 Ⅱ、p62、Akt、mTOR mRNA 的相对表达 收集匀浆后的组织或细胞制备上清 RNA,至 1.5 ml 离心管加 60 μl 氯仿,混匀,15 000 r/min 离心 5 min。将 RNA 转移到另一管中,1.5 ml 离心管加 500 μl 异丙醇,混匀; -20°C 条件静置 10 min, 4°C 条件下离心 10 min,离心后管底部获得棉絮状沉淀,即为 RNA 沉淀。弃上清,加入 1 ml 75%乙醇,用移液枪反复吹打洗涤 RNA 沉淀。 4°C 条件下 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,5 min。将管开口置于超净台中 2 min,使 RNA 沉淀干燥。加入 20 μl 无 RNase 水溶解 RNA 沉淀,移液枪吹打帮助溶解。取 1 μl RNA 溶解液,以去离子水作对照,测吸光度 (op-

tical density, OD) 260/280 值及 RNA 浓度。将 RNA 逆转录为 cDNA 及荧光定量 PCR 扩增(均按照试剂盒说明书进行)。

1.6 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析。定量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对单因素两水平设计一元定量资料,采用独立样本 t 检验;对单因素四水平设计一元定量资料,先采用单因素四水平设计一元定量资料方差分析,若结果 $P<0.05$,再进行四组之间两两比较,采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝关节软骨损伤情况

肉眼观察下空白对照组软骨表面光滑发亮,未发现有明显软骨侵蚀及糜烂,软骨损伤评分明显低于模型组 ($P<0.01$);模型组软骨表面粗糙变色明显,大面积糜烂,软骨下骨外露,尤其在股骨滑车处较明显,软骨损伤评分最高;BSHXR-L 组软骨表面黄色较深,软骨糜烂面积较大,部分深及软骨下骨,其软骨损伤评分稍低于模型组 ($P>0.05$);BSHXR-M 组股骨滑车处表面略粗糙,有少量软骨糜烂,少部分深及软骨下骨,其软骨损伤评分低于模型组 ($P<0.05$);BSHXR-H 组软骨表面微黄,极少量区域软骨糜烂,未深及软骨下骨,其软骨损伤评分明显低于模型组和 BSHXR-L 组 ($P<0.05$)。见表 1,图 1。

2.2 番红 O-固绿染色结果

空白对照组软骨表面光滑完整,没有发现明显的糜烂缺损,软骨细胞的形态和分布基本正常,番红 O-固绿染色均匀,潮线完整连续清晰;模型组软骨糜烂缺损面积较大,局部破裂与脱落现象严重,大量软骨基质丢失,软骨细胞数量明显减少;BSHXR-L 组、BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组随着中药剂量的增加,软骨表面糜烂受损程度逐渐减轻,软骨细胞数量减少不明显,基质淡染程度逐渐减弱。其中,BSHXR-H 组软骨表面糜烂受损程度最轻,基质染色程度最弱。见图 2。

2.3 免疫组化结果

空白对照组 Col-Ⅱ 和 Aggrecan 表达最高且明显高于模型组 ($P<0.01$),Collagen-Ⅱ 表达 BSHXR (L、M、H) 各治疗组与模型组比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),但 BSHXR (L、M、H) 治疗各组之间比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Aggrecan 表达量随着中药剂量增加逐渐升高,BSHXR-H 组表达最为明显,与 BSHXR-L 组和 BSHXR-M 组相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3、图 4,表 1。

BSHXR (L、M、H) 治疗各组 MMP-13 表达量均

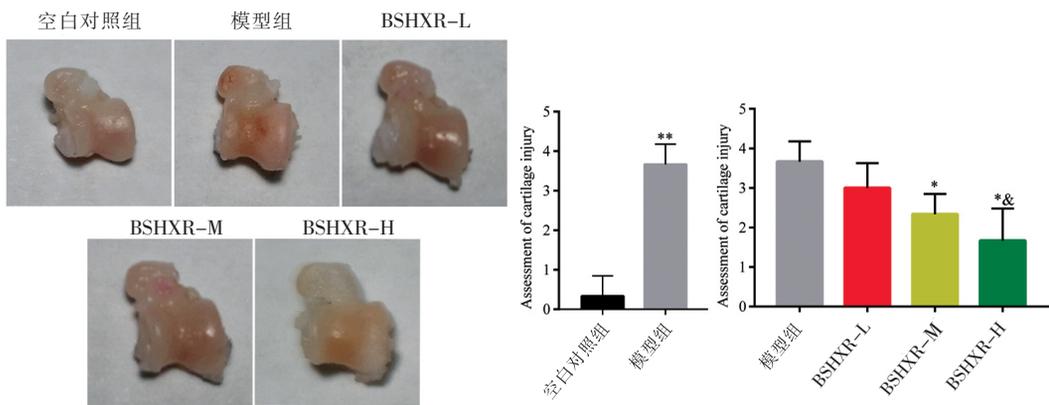
明显低于模型组 ($P<0.05$), 同时 BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组明显低于 BSHXR-L 组 ($P<0.05$), 且 BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 5, 表 1。

表 1 各组大鼠关节软骨损伤评分和组织免疫组化 Collagen-II、Aggrecan、MMP-13 表达结果

Tab.1 Articular cartilage injury score and immunohistochemical expression results of Collagen-II, Aggrecan and MMP-13 in tissues of rats in each group

组别	鼠数	软骨损伤评分	Collagen-II 表达	Aggrecan 表达	MMP-13 表达
空白对照组	6	0.33±0.516	1.000±0.100	1.000±0.108	1.000±0.070
模型组	6	3.67±0.516 ¹	0.387±0.040 ²	0.337±0.047 ³	1.730±0.080 ⁴
BSHXR-L 组	6	3.00±0.632	0.503±0.050 ^a	0.443±0.049	1.447±0.035 ^a
BSHXR-M 组	6	2.33±0.516 ^a	0.573±0.040 ^a	0.543±0.058 ^a	1.263±0.047 ^{ab}
BSHXR-H 组	6	1.67±0.816 ^{ab}	0.600±0.030 ^a	0.703±0.081 ^{abc}	1.250±0.040 ^{ab}
F 值		11.111	16.257	20.073	52.406
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白对照组比较,采用独立样本 *t* 检验,其中 $t^1=-11.18, P<0.01$; $t^2=9.849, P<0.01$; $t^3=9.733, P<0.01$; $t^4=-11.894, P<0.01$ 。除空白组外其余四组进行单因素方差分析,均得出 $P<0.01$,其中 a 表示与模型组比较, $^aP<0.05$; b 表示与 BSHXR-L 组比较, $^bP<0.05$; c 表示与 BSHXR-M 组比较, $^cP<0.05$



注: ** 表示与空白组比较 $P<0.01$; * 表示与模型组比较 $P<0.05$; & 表示与 BSHXR-L 组比较 $P<0.05$

图 1 各组软骨损伤外观肉眼观察及软骨损伤评分结果

Fig.1 The cartilage damage and related score were observed by naked eye

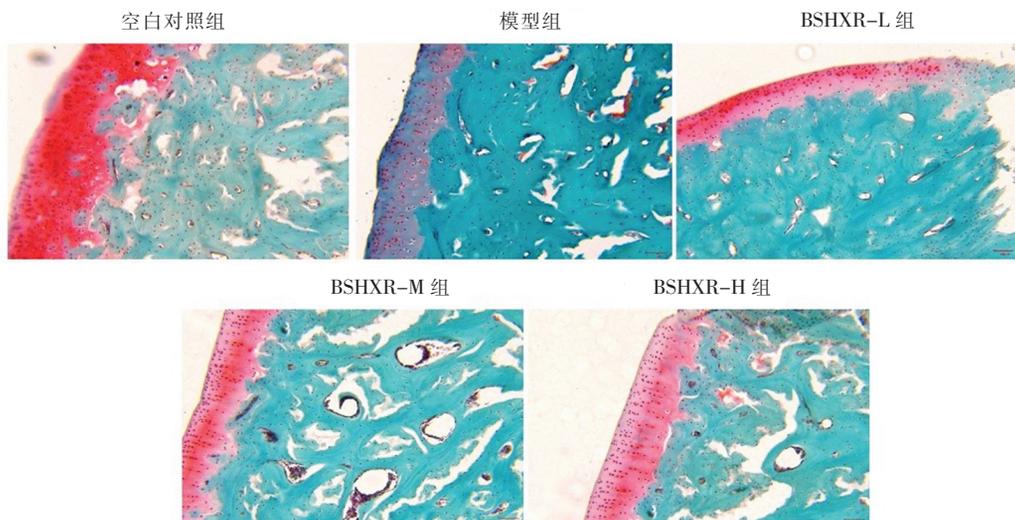
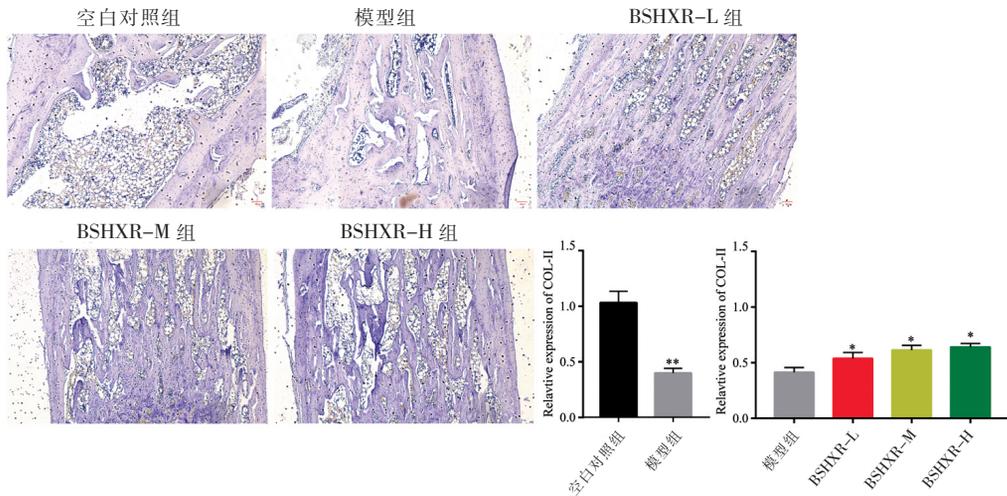


图 2 各组大鼠软骨组织番红 O-固绿染色结果

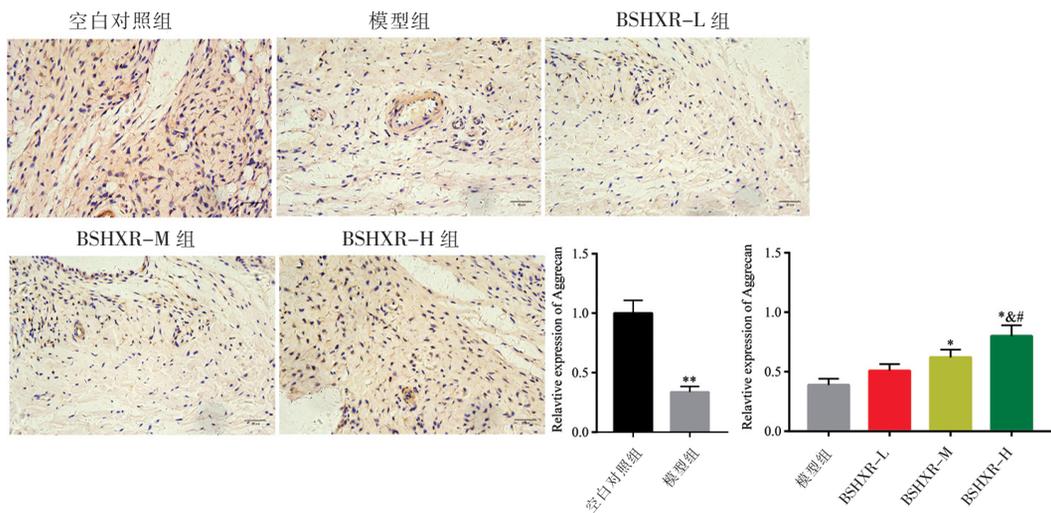
Fig.2 Results of Muscovite O-solid green staining in cartilage tissues of rats in each group



注: **表示与空白对照组比较 $P < 0.01$; *表示与模型组比较 $P < 0.05$

图 3 各组大鼠关节软骨组织免疫组化 Col-II 表达结果

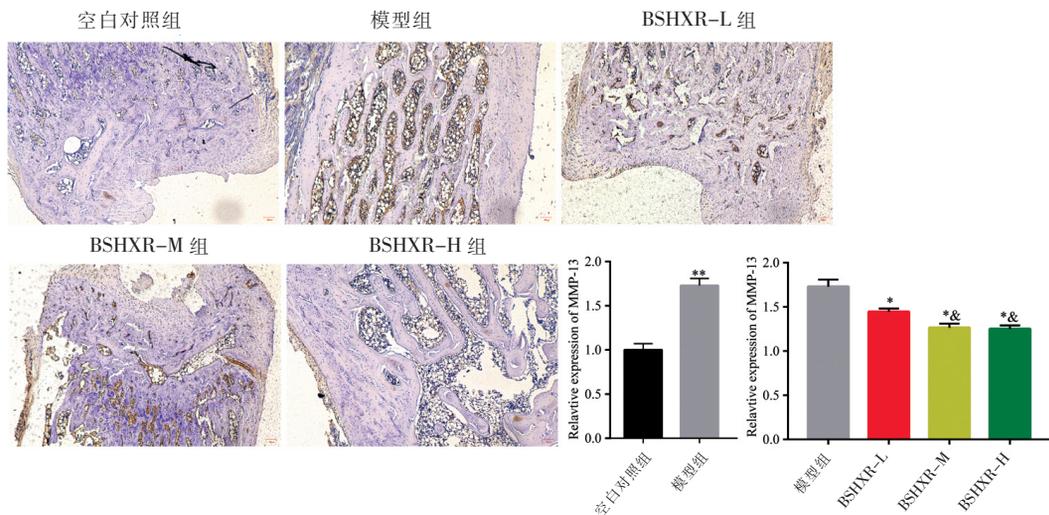
Fig.3 Immunohistochemical Col-II expression in articular cartilage of rats in each group



注: **表示与空白对照组比较 $P < 0.01$; *表示与模型组比较 $P < 0.05$; &表示与 BSHXR-L 组比较 $P < 0.05$; #表示与 BSHXR-M 组比较 $P < 0.05$

图 4 各组大鼠关节软骨组织免疫组化 Aggrecan 表达结果

Fig.4 Immunohistochemical Aggrecan expression results in articular cartilage tissues of rats in each group



注: **表示与空白对照组比较 $P < 0.01$; *表示与模型组比较 $P < 0.05$; &表示与 BSHXR-L 组比较 $P < 0.05$

图 5 各组大鼠关节软骨组织免疫组化 MMP-13 表达结果

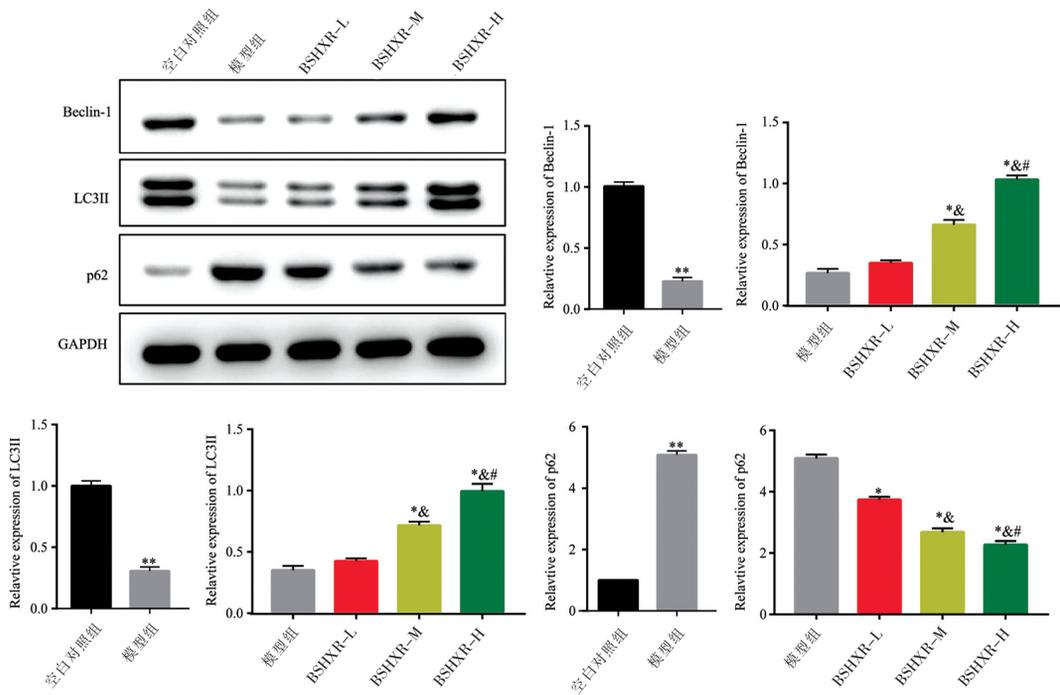
Fig.5 Immunohistochemical expression of MMP-13 in articular cartilage of rats in each group

2.4 各组大鼠关节软骨内自噬相关蛋白表达结果

Western-blot 检测自噬下游蛋白 Beclin-1、LC3 II、p62 的表达,Beclin-1 和 LC3 II 蛋白模型组表达明显低于空白对照组($P<0.01$),同时 BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组分别与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),随着中药剂量的增加,Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达量逐渐升高,BSHXR-H 组表达量最高,且与 BSHXR-L 组和 BSHXR-M 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。p62 蛋白表达则出现相反趋势,模型组表达最明显,与空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);经治疗后 p62 蛋白表达量减少且呈剂量效应,同时 BSHXR-H 组与 BSHXR-L 组

和 BSHXR-M 组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 6,表 2。

本研究中 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 在空白对照组表达较低,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.01$);模型组中 Akt 和 mTOR 被激活磷酸化,随着补肾活血方剂量的逐渐增加,磷酸化水平逐渐降低,BSHXR-H 组 Akt 磷酸化水平最低,其与 BSHXR-L 组和 BSHXR-M 组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。而 BSHXR-M 组和 BSHXR-H 组 mTOR 磷酸化水平显著均低于 BSHXR-L 组 ($P<0.05$);但两者之间比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 7,表 2。



注 * * 表示与空白对照组比较 $P<0.01$; * 表示与模型组比较 $P<0.05$; & 表示与 BSHXR-L 组比较 $P<0.05$; # 表示与 BSHXR-M 组比较 $P<0.05$

图 6 各组大鼠关节软骨组织自噬下游蛋白的表达

Fig.6 Expression of downstream protein of autophagy in articular cartilage of rats in each group

表 2 各组大鼠关节软骨组织自噬通路蛋白的表达

Tab.2 Expression of autophagy pathway proteins in articular cartilage of rats in each group

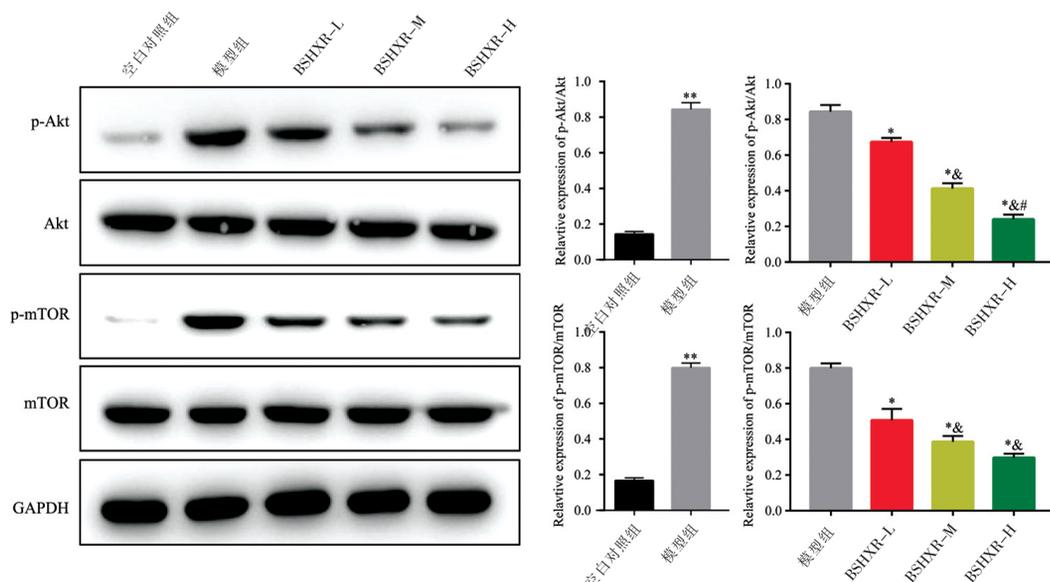
组别	鼠数	Beclin-1 表达	LC3 II 表达	p62 表达	p-Akt/Akt 表达	p-mTOR/mTOR 表达
空白对照组	6	1.000±0.036	1.000±0.040	1.000±0.000	0.143±0.015	0.167±0.015
模型组	6	0.227±0.031 ¹	0.307±0.032 ²	5.087±0.125 ³	0.843±0.038 ⁴	0.800±0.026 ⁵
BSHXR-L 组	6	0.300±0.020	0.373±0.021	3.740±0.098 ^a	0.673±0.023 ^a	0.507±0.064 ^a
BSHXR-M 组	6	0.577±0.035 ^{ab}	0.633±0.025 ^{ab}	2.683±0.127 ^{ab}	0.413±0.029 ^{ab}	0.387±0.032 ^{ab}
BSHXR-H 组	6	0.903±0.031 ^{abc}	0.880±0.053 ^{abc}	2.267±0.127 ^{abc}	0.240±0.026 ^{abc}	0.297±0.023 ^{ab}
F 值		323.721	168.372	331.059	246.638	90.13
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白对照组比较,采用独立样本 t 检验,其中 $t^1=28.343, P<0.01; t^2=23.402, P<0.01; t^3=-56.611, P<0.01; t^4=-29.698, P<0.01; t^5=-35.907, P<0.01$ 。除空白对照组外其余四组进行单因素方差分析,均得出 $P<0.01$,其中 a 表示与模型组比较, $P<0.05$; b 表示与 BSHXR-L 组比较, $P<0.05$; c 表示与 BSHXR-M 组比较, $P<0.05$

2.5 各组大鼠关节软骨内 Beclin-1、LC3 II、p62 和 Akt、mTOR 的 mRNA 相对表达量结果

模型组中 Beclin-1、LC3 II 的 mRNA 的相对表达量最低,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),BSHXR 可显著提高 Beclin-1、LC3 II 的表达,促进细胞自噬的发生,且随着药物剂量的增大,自噬促进作用越强;而 p62 的表达则呈相反趋势,在模型组中其 mRNA 相对表达量最高,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),且 BSHXR(L、M、H)对 p62 的表达呈抑制作用,药物剂量越大,抑制作用越明显。

上游 Akt/mTOR 的 mRNA 相对表达量模型组最高,均显著高于空白对照组($P < 0.01$),BSHXR(L、M、H)对该通路的表达有抑制作用,进而促进自噬的发生,调节软骨细胞自噬与凋亡平衡。见图 8,表 3。



注: ** 表示与空白组比较 $P < 0.01$; * 表示与模型组比较 $P < 0.05$; & 表示与 BSHXR-L 组比较 $P < 0.05$; # 表示与 BSHXR-M 组比较 $P < 0.05$

图 7 各组大鼠关节软骨组织自噬通路蛋白的表达

Fig.7 Expression of autophagy pathway proteins in articular cartilage of rats in each group

表 3 各组大鼠关节软骨组织 Beclin-1、LC3 II、p62 和 Akt、mTOR 的 mRNA 相对表达量

Tab.3 MRNA relative expression levels of Beclin-1, LC3 II, P62, Akt and mTOR in articular cartilage of rats in each group

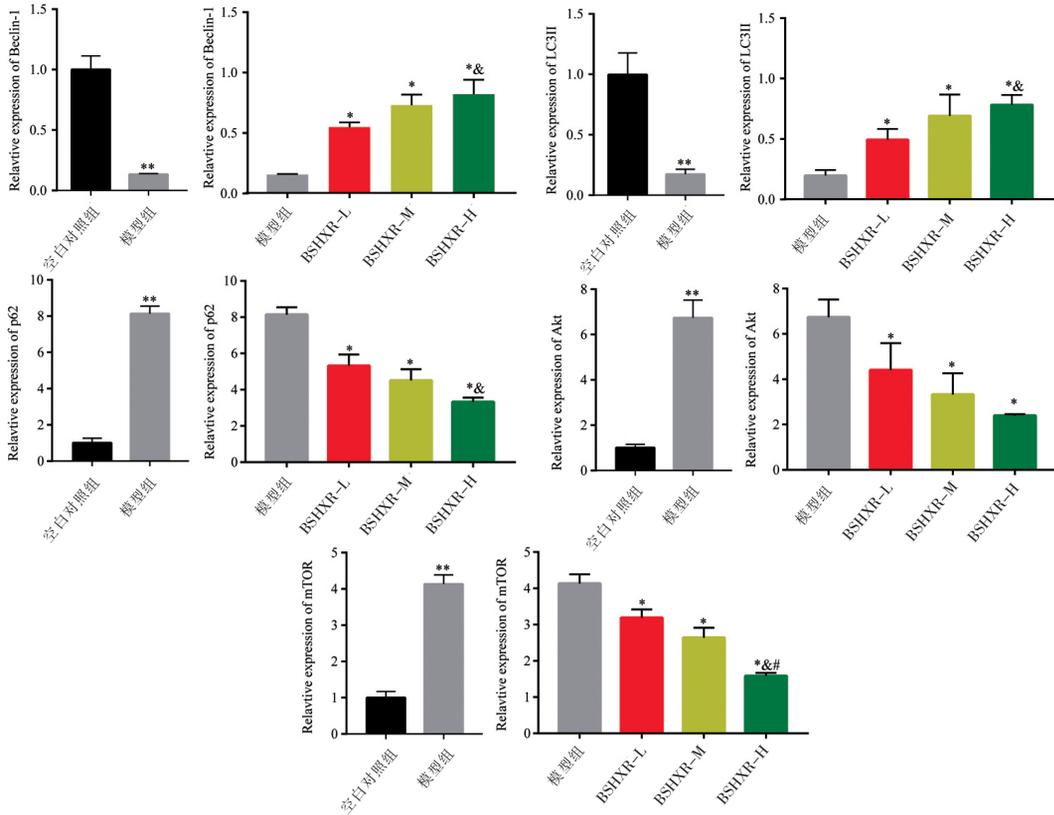
组别	鼠数	Beclin-1	LC3 II	p62	Akt	mTOR
空白对照组	6	1.000±0.113	0.997±0.180	1.000±0.262	1.000±0.149	1.000±0.171
模型组	6	0.133±0.006 ¹	0.173±0.042 ²	8.137±0.411 ³	6.740±0.779 ⁴	4.137±0.251 ⁵
BSHXR-L 组	6	0.483±0.035 ^a	0.437±0.081 ^a	5.313±0.623 ^a	4.403±1.186 ^a	3.190±0.231 ^a
BSHXR-M 组	6	0.647±0.076 ^a	0.613±0.156 ^a	4.510±0.615 ^a	3.327±0.938 ^a	2.640±0.274 ^a
BSHXR-H 组	6	0.727±0.105 ^{ab}	0.693±0.074 ^{ab}	3.317±0.249 ^{ab}	2.390±0.070 ^a	1.587±0.080 ^{abc}
F 值		45.791	16.7	50.539	14.533	68.876
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白对照组比较,采用独立样本 t 检验,其中 ¹t=13.303, $P < 0.01$; ²t=7.715, $P < 0.01$; ³t=-25.352, $P < 0.01$; ⁴t=-12.534, $P < 0.01$; ⁵t=-17.889, $P < 0.01$ 。除空白对照组外其余 4 组进行单因素方差分析,均得出 $P < 0.01$,其中 a 表示与模型组比较, $P < 0.05$; b 表示与 BSHXR-L 组比较, $P < 0.05$; c 表示与 BSHXR-M 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 OVX+MIA 诱导绝经后膝关节炎模型科学性

KOA 是由炎症加剧引起的关节疾病,软骨损伤是其特有的病理特征^[4-6]。研究显示该疾病的患病率随着年龄增长而增加,特别是绝经后雌激素大幅度降低的情况下妇女更易患 KOA,且其发病率明显高于绝经前女性和同龄男性^[7-8]。在 OA 的治疗过程中,为了达到疼痛缓解的目的,采用特异性的 OA 临床前模型研究非常重要,OVX 常被用作模拟女性绝经后状态^[3],而 MIA 注射至大鼠膝关节内可导致组织形态学和功能关节损伤,可微创、快速成功诱导可复制的 OA 模型,并产生与人类相似的 OA 疼痛行为^[9-10]。本研究采用 OVX 结合关节内注射 MIA 的方法诱发 SD 大鼠 OA 模型,其病理生理变化与绝经后女性 KOA 高度相似。



注: * 表示与空白模型组比较 $P < 0.01$; * 表示与模型组比较 $P < 0.05$; & 表示与 BSHXR-L 组比较 $P < 0.05$; # 表示与 BSHXR-M 组比较 $P < 0.05$

图 8 各组大鼠关节软骨组织 Beclin-1, LC3 II, p62 和 Akt, mTOR 的 mRNA 相对表达量

Fig.8 MRNA relative expression levels of Beclin-1, LC3 II, p62, Akt and mTOR in articular cartilage of rats in each group

3.2 补肾活血方对软骨组织形态学的保护作用

造模成功后, 软骨的组织学改变主要有软骨表面糜烂、软骨变薄和蛋白多糖丢失等^[11]。本研究中通过肉眼观察、番红 O-固绿染色观察发现各组膝关节软骨均发生了不同程度的退变和破坏, 其中模型组软骨损伤情况最为明显, 而 BSHXR(L、M、H)组随着中药剂量的增加, 软骨表面糜烂受损程度逐渐减轻, 软骨细胞数量减少不明显, 基质淡染程度也逐渐减弱。BSHXR-H 组软骨损伤程度最轻, 其软骨表面微黄, 极少量区域软骨糜烂, 未深及软骨下骨, 基质染色程度最弱。可以看出, 补肾活血方对软骨的保护作用在一定范围内呈现剂量效应。

3.3 补肾活血方对细胞外基质代谢的影响及其组方药理的文獻分析

关节软骨主要由细胞成分(如软骨细胞)和细胞外基质成分(extracellularmatrix, ECM)等组成, 其由于有限的再生能力及无血管性质而独特。软骨细胞通常是静止细胞, ECM 的主要结构由 Collagen-II 和 Aggrecan 组成, 可以保留软骨的正常生理功能, 使关节无摩擦^[12]。然而, 在不利条件下, 软骨细胞被激活并产生 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等大量促炎因子和趋化因子, 胶原酶和蛋白聚糖酶的表达也同时增加, 特别

是关节中 Collagen-II 水解的关键细胞诱导剂 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的分泌, 加速了 Collagen-II 和 Aggrecan 的分解, 进而促进软骨 ECM 的降解, 在关节退变过程中发挥重要作用^[13]。OA 中软骨损伤的主要组织学症状是 Aggrecan 的丢失, 可导致胶原网容易受到机械磨损和相关酶的攻击, OA 是软骨中 Aggrecan 逐渐丢失的结果, 进而胶原蛋白基质暴露被金属蛋白酶分解^[14-15]。有研究^[16]证实 OA 发生后在软骨基质降解过程中 MMP-13 的水平高度上调, Aggrecan 和 Collagen-II 的合成减少, 且 Aggrecan 和 Collagen-II 的损失有助于加速 OA 的发展。

本研究发现 BSHXR 治疗可上调 OVX+MIA 大鼠软骨细胞外基质中 Collagen-II、Aggrecan 的表达, 下调 MMP-13 的表达。为了证实以上结果, 笔者通过文献研究进一步分析补肾活血方各组方药物药理及活性成分对 OA 的影响, 发现君药怀牛膝可通过调节炎症、基质代谢、细胞凋亡和免疫反应等多种途径来发挥其在 OA 中的作用, 其中以槲皮素、小檗碱、山奈酚、 β -谷甾醇等活性成分最为关键^[17]。槲皮素是植物中最丰富的黄酮类化合物之一, 以其抗氧化剂和抗炎活性而闻名^[18-19], 它可显著抑制软骨细胞基质降解蛋白酶和炎症介质的表达, 促进大鼠软

骨细胞中软骨合成代谢因子的产生,同时调节滑膜巨噬细胞向 M2 巨噬细胞的极化并为软骨细胞提供促软骨形成的环境来增强软骨修复的作用^[20]。Catalpol 是从熟地黄的根中分离出的一种鸢尾糖苷,在多种疾病中具有抗炎、抗氧化和抗凋亡作用^[21-22],Catalpol 可以显著抑制 MMP-1、MMP-3、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 mRNA 和蛋白质表达,此外还可以减少 ECM 的胶原蛋白 II 和聚集蛋白聚糖的降解来减少软骨细胞凋亡和恢复软骨细胞的功能^[23]。木通皂苷(Akebia Saponin D, ASD)是从续断中提取的活性成分之一,有学者通过一系列体内和体外实验证明了 ASD 在 OA 中的抗炎活性,ASD 可抑制软骨细胞中环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、iNOS、NO、PGE2、IL-6 和 TNF- α 等炎症介质的产生,同时,还可抑制 ADAMTS-5 和 MMP13 表达并促进 Aggrecan 和胶原 II 的产生^[24]。独活的主要活性成分蛇床子素、香柑内酯、二氢山芹醇醋酸酯、异欧前胡素可发挥抗炎镇痛的作用,且随着独活剂量的增加,其对 COX-1 和 COX-2 的抑制作用增强^[25-26]。

3.4 补肾活血方通过 Akt/mTOR 信号通路促进软骨细胞自噬

自噬是一种非凋亡的细胞死亡程序,是细胞生存所必须的溶酶体降解途径,该过程可清除细胞内受损的细胞器,以重新循环和再利用细胞内的大型生物分子,对维持细胞内环境稳态,促进细胞存活具有积极作用^[27]。自噬存在于机体的各种组织中,并在各种疾病的进展中发挥着重要的保护作用。软骨是一种特化的间充质组织,研究表明在关节退行性疾病过程中,软骨自噬水平抑制同时发生,特别是在 OA 的早期,软骨细胞自噬水平与 OA 状态之间存在高度相关性,自噬可作为一种避免细胞死亡的适应性反应而被激活^[28-29]。当前的研究表明自噬是一种抗凋亡的细胞保护机制,是由多组织细胞驱动的,因此软骨细胞自噬水平的升高在一定程度上可抑制细胞凋亡的启动^[1,30]。Beclin-1 是自噬的关键参与者,被认为参与调节自噬小体的合成和成熟^[31]。LC3 是自噬的特异性标记物,可通过与 ATG7 和其他自噬效应子结合来激活自噬生物体的合成^[32]。p62 是一种能够传递自噬物的蛋白质,可以作为自噬通量的测量指标,与自噬发生呈负相关^[33]。

同时,软骨细胞自噬反应受到多种信号通路的调节,MI 等^[34]研究表明抑制 NF- κ B 通路可促进 Atg5、Atg7 和 LC3II 的表达并激活自噬。SHI 等^[35]发现在骨关节炎中激活 p38 信号通路后,自噬水平可被显著抑制。最近的研究^[36]表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是介导软骨细胞自噬的经典信号通路,Akt

是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被 PI3K 激活后被募集到质膜上,在介导细胞自噬和调节细胞生长、凋亡中起着至关重要的作用。众所周知,mTOR 是多种信号调控通路和分子机制的交叉点,在自噬调控中起关键作用,是自噬的负调控因子^[37],大量证据^[38-39]表明,在体内和体外实验中,抑制 mTOR 可以上调 OA 软骨细胞的自噬活性,降低软骨细胞凋亡率。mTOR 常受到 AMPK 和 PI3K/Akt 等上游信号传导途径的调控^[40]。AMPK 是一种能量感应激酶,是进化过程中高度保守的蛋白质分子,当发生代谢应激或 ATP 消耗时,可以激活 AMPK 来促进分解代谢。一旦 AMPK 通路激活,AMPK 就会使 TSC2 磷酸化,从而抑制 mTOR,并最终促进自噬。而 PI3K/Akt 主要发生在对化学、物理或遗传因素的反应中,常抑制自噬的发生^[41-42]。此外,PI3K/Akt 通路还负责调节软骨细胞的凋亡和炎症相关因子^[43]。PI3K 可被多种上游炎症介质激活,包括软骨细胞中的 IL-1 β ,激活的 PI3K 使 Akt 磷酸化,信号通过 Akt 传递到下游的 mTOR,进一步调节自噬下游蛋白(如 LC3、p62 等),从而影响软骨细胞自噬小体的形成^[44-45]。XUE 等^[43]提出利用阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的方法干预自噬,随后发现关节软骨细胞的自噬反应随之增强,大鼠关节的炎症反应减轻。本研究结果表明,OA 大鼠软骨组织中 Akt 和 mTOR 被激活磷酸化,随着补肾活血方剂量的逐渐增加,两者磷酸化水平逐渐降低,BSHXR-H 组磷酸化达到最低水平,其下游 Beclin-1、LC3 II 蛋白表达最高,p62 蛋白表达最低,软骨细胞自噬能力最强。综上所述,补肾活血方可能通过 Akt/mTOR 信号通路促进去卵巢大鼠软骨组织中细胞自噬反应。

综上所述,本研究观察到补肾活血方可调节软骨细胞外基质代谢,对大鼠软骨组织形态学有保护作用,并可能通过抑制 Akt/mTOR 信号通路,致下游 Beclin-1、LC3II 高表达,p62 低表达,进而促进去卵巢大鼠的软骨细胞自噬反应,且在一定范围内呈剂量效应。

参考文献

- [1] REN J,ZHANG Y M. Targeting autophagy in aging and aging-related cardiovascular diseases [J]. Trends Pharmacol Sci,2018,39(12): 1064-1076.
- [2] HØEGH-ANDERSEN P,TANKÓ L B,ANDERSEN T L, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application [J]. Arthritis Res Ther,2004,6(2):R169-R180.
- [3] GUINGAMP C,GEGOUT-POTTIE P,PHILIPPE L, et al. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis;a dose-response study of loss of mobility,morphology,and biochemistry [J]. Arthritis Rheum,1997,40(9):1670-1679.

- [4] MALDONADO M, NAM J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 284873.
- [5] 陈文晓, 单方军, 金红婷, 等. 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 W X, SHAN F J, JIN H T, et al. Research on application of determination of MMP-13 in osteoarthritis[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2014, 27(7): 617-620. Chinese.
- [6] 张栋, 王庆甫, 张晓哲, 等. β -catenin 与 NF- κ B 信号通路在膝骨关节炎滑膜炎中的表达特点及意义[J]. *中国骨伤*, 2019, 32(8): 721-726. ZHANG D, WANG Q F, ZHANG X Z, et al. Expression and significance of β -catenin and NF- κ B signaling pathway in knee osteoarthritis synovial inflammation[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2019, 32(8): 721-726. Chinese.
- [7] SRIKANTH V K, FRYER J L, ZHAI G J, et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(9): 769-781.
- [8] MARTÍN-MILLÁN M, CASTAÑEDA S. Estrogens, osteoarthritis and inflammation[J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(4): 368-373.
- [9] CHUN J M, LEE A Y, NAM J Y, et al. Effects of *Dipsacus asperoides* extract on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats based on gene expression profiling[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 615157.
- [10] HAMZA R Z, AL-SALMI F A, EL-SHENAWY N S. Chitosan and lecithin ameliorate osteoarthritis symptoms induced by monoiodoacetate in a rat model[J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5738.
- [11] KIM M H, CHOI Y, AHN K S, et al. Gumiganghwal-Tang ameliorates cartilage destruction via inhibition of matrix metalloproteinase[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113074.
- [12] 唐金烁, 周忠圣, 肖建林, 等. 骨性关节炎发病机制的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2021, 34(10): 985-990. TANG J S, ZHOU Z S, XIAO J L, et al. Research progression in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2021, 34(10): 985-990. Chinese.
- [13] KHAN N M, HASEEB A, ANSARI M Y, et al. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 288-301.
- [14] MORT J S, GENG Y Q, FISHER W D, et al. Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2016, 17: 89.
- [15] ISMAIL H M, MIOTLA-ZAREBSKA J, TROEBER L, et al. Brief report: JNK-2 controls aggrecan degradation in murine articular cartilage and the development of experimental osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(5): 1165-1171.
- [16] MORROVATI F, KARIMIAN FATHI N, SOLEIMANI RAD J, et al. Mummy prevents IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage matrix degradation via inhibition of NF- κ B subunits gene expression in pellet culture system[J]. *Adv Pharm Bull*, 2018, 8(2): 283-289.
- [17] CHEN Z Y, WU G W, ZHENG R X. A systematic pharmacology and in vitro study to identify the role of the active compounds of *Achyranthes bidentata* in the treatment of osteoarthritis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e925545.
- [18] ZHENG Y Z, DENG G, LIANG Q, et al. Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from Propolis: a theoretical study[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7543.
- [19] MENG L Q, YANG F Y, WANG M S, et al. Quercetin protects against chronic prostatitis in rat model through NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Prostate*, 2018, 78(11): 790-800.
- [20] HU Y, GUI Z P, ZHOU Y N, et al. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 146-160.
- [21] YANG C J, SHI Z Y, YOU L T, et al. Neuroprotective effect of catalpol via anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 690.
- [22] HU L A, SUN Y K, ZHANG H S, et al. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced cardiac myocytes through a mitochondrial-dependent caspase pathway[J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(3): e00348.
- [23] ZENG Y F, WANG R, BIAN Y, et al. Catalpol attenuates IL-1 β induced matrix catabolism, apoptosis and inflammation in rat chondrocytes and inhibits cartilage degeneration[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 6649-6659.
- [24] GU M B, JIN J, REN C H, et al. Akebia Saponin D suppresses inflammation in chondrocytes via the NRF2/HO-1/NF- κ B axis and ameliorates osteoarthritis in mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(12): 10852-10863.
- [25] LI J, ZHANG Q H, HE J, et al. An improved LC-MS/MS method for simultaneous determination of the eleven bioactive constituents for quality control of *Radix angelicae pubescentis* and its related preparations[J]. *Sci World J*, 2015, 2015: 365093.
- [26] 但飞君, 蔡正军, 朱烈彬, 等. 中药白根独活抗胃溃疡有效部位研究[J]. *三峡大学学报(自然科学版)*, 2008, 30(3): 87-88, 93. DAN F J, CAI Z J, ZHU L B, et al. Studies of anti-gastric ulcer active fraction of *Angelica polymorpha maxim*[J]. *J China Three Gorges Univ Nat Sci*, 2008, 30(3): 87-88, 93. Chinese.
- [27] LIU Y M, ZHUANG J, ZHANG X H, et al. Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 275: 39-48.
- [28] CONG L, ZHU Y, TU G. A bioinformatic analysis of microRNAs role in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartil*, 2017, 25(8): 1362-1371.
- [29] KIM E K, KWON J E, LEE S Y, et al. IL-17-mediated mitochondrial dysfunction impairs apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through activation of autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2565.
- [30] BAUDI P, CATANI F, REBUZZI M, et al. Morphological study: ultrastructural aspects of articular cartilage and subchondral bone in patients affected by post-traumatic shoulder instability[J]. *Anat Rec*, 2017, 300(7): 1208-1218.
- [31] HUANG R, LIU W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 852-853.
- [32] HILL S M, WROBEL L, RUBINSZTEIN D C. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(4): 617-629.
- [33] LONG M, LI X, LI L, et al. Multifunctional p62 effects underlie diverse metabolic diseases[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(11): 818-830.

[34] MI B B, WANG J Q, LIU Y, et al. Icarin activates autophagy via down-regulation of the NF- κ B signaling-mediated apoptosis in chondrocytes[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 605.

[35] SHI J, ZHANG C J, YI Z J, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis[J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(4): 293-302.

[36] ZHONG J T, YU J, WANG H J, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317697562.

[37] 张新涛, 江华基, 梁祖儒, 等. 骨碎补总黄酮通过激活 mTOR 信号通路促进大鼠腱骨愈合的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(3): 248-253.

ZHANG X T, JIANG H J, LIANG Z R, et al. Osteopractic total flavone promoting rat extra-articular tendon-bone healing through mTOR pathway[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2018, 31(3): 248-253. Chinese.

[38] KONG C Y, WANG C L, SHI Y Q, et al. Active vitamin D activates chondrocyte autophagy to reduce osteoarthritis via mediating the AMPK-mTOR signaling pathway[J]. *Biochim Biol Cell*, 2020, 98(3): 434-442.

[39] ZHAO X, LI Y, LIN X W, et al. Ozone induces autophagy in rat chondrocytes stimulated with IL-1 β through the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 3003-3017.

[40] YANG Q, GUAN K L. Expanding mTOR signaling[J]. *Cell Res*, 2007, 17(8): 666-681.

[41] BUJAK A L, CRANE J D, LALLY J S, et al. AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(6): 883-890.

[42] HA J, GUAN K L, KIM J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism[J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 46: 46-62.

[43] XUE J F, SHI Z M, ZOU J, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 89: 1252-1261.

[44] CAI C, MIN S X, YAN B, et al. MiR-27a promotes the autophagy and apoptosis of IL-1 β treated - articular chondrocytes in osteoarthritis through PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. *Aging*, 2019, 11(16): 6371-6384.

[45] RAO Z T, WANG S Q, WANG J Q. Peroxiredoxin 4 inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis via PI3K/AKT signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 414-420.

(收稿日期: 2022-09-20 本文编辑: 王玉蔓)

• 病例报告 •

经椎间孔入路腰椎内镜术后症状性血肿 3 例

唐晓东, 王瑞博, 王苗苗, 张长江

(郑州大学第五附属医院脊柱外科, 河南 郑州 450000)

关键词 经皮腰椎内镜; 症状性血肿; 术后并发症; 手术因素

中图分类号: R681.5+3

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20220325

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Postoperative symptomatic hematoma after percutaneous transforaminal endoscopic lumbar discectomy: 3 cases report

TANG Xiao-dong, WANG Rui-bo, WANG Miao-miao, ZHANG Chang-jiang (Department of Spinal Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan, China)

KEYWORDS Percutaneous lumbar endoscopy; Symptomatic hematoma; Postoperative complications; Surgical factor

病例 1: 男, 67 岁。因右下肢放射性疼痛, 行走受限 8 个月余入院, 既往有冠心病史 8 年, 长期口服阿司匹林片, 每日 1 次, 每次 100 mg; 曾行腰椎保守治疗 3 个月余未见缓解。查体: 右臀部、右大腿后侧、小

腿前外侧、足背皮肤痛觉减退, 右拇背伸肌力 IV 级, 右直腿抬高试验 20° 阳性。腰椎 MRI 和 CT 示 L_{4,5} 椎间盘突出合并右侧神经根管狭窄。诊断为 L_{4,5} 椎间盘突出症并冠心病。术前疼痛视觉模拟评分 (visual analogue scale, VAS) 6 分。手术方案: 停用阿司匹林 1 周, 局麻下 L_{4,5} 节段经椎间孔入路内镜下腰椎间盘切除术 (percutaneous endoscopic lumbar discectomy, PELD)。术中穿刺偏腹, 为达“靶点”反复调整数次, 套管位置偏椎间孔腹侧, 盲视下进行关节突成形。镜下见套管外持续渗血, 未找到明确出血点,

基金项目: 河南省医学科技攻关联合共建项目(编号: 2018020254)

Fund program: Henan Province Medical Science and Technology Co-construction Project(No. 2018020254)

通讯作者: 张长江 E-mail: 602078315@qq.com

Corresponding author: ZHANG Chang-jiang E-mail: 602078315@qq.com