

乌头汤对膝骨关节炎 TLR4 信号通路的影响

陈靓靓 袁文琪 杨心悦 肖思雨 陈金铃 李奇 王忠良 艾瑀萍^(通讯作者)

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

【摘要】目的 观察乌头汤对膝骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)大鼠滑膜组织TLR4信号通路关键因子(TLR4/MyD88/NF-κB)的调控作用,从而探讨其作用机制。方法 取36只大鼠随机分为空白组(不进行任何处理)、模型组(膝关节骨性关节炎造模后生理盐水灌胃)、治疗组(膝关节骨性关节炎造模后乌头汤灌胃),干预2个月后比较各组大鼠膝关节滑膜组织特征指标差异,并观察大鼠膝关节软骨病理形态变化。结果:(1)大鼠滑膜组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子α(TNF α)、白细胞介素6(IL-6)的表达与空白组相比,模型组iNOS、TNF α和IL-6质量浓度显著升高(均P<0.05);治疗组iNOS、TNF α和IL-6质量浓度均显著升高(均P<0.05)。与模型组相比,治疗组iNOS、TNF α和IL-6质量浓度均显著降低(均P<0.05)。(2)相比空白组,模型组TLR4、TRAF6、NF-κB p65均有显著升高(均P<0.05);相比模型组,治疗组TLR4、MyD88、TRAF6、NF-κB p65均有下降(均P<0.05)。结论 乌头汤通过影响TLR4信号通路改善膝关节功能障碍程度,提高关节活动度。

【关键词】乌头汤;膝骨关节炎;TLR4信号通路;调节因子;作用机制

The effect of Aconitum Decoction on TLR4 signaling pathway in knee osteoarthritis

Chen Liangliang Yuan Wenqi Yang Xinyue Xiao Siyu Chen Jinling Li Qi Wang Zhongliang Ai Jueping^(corresponding author)

(Changsha Medical College Changsha Hunan 410219)

[Abstract] Objective To observe the regulatory effect of Aconitum Decoction on key factors of TLR4 signaling pathway (TLR4/MyD88/NF-κB) in synovial tissue of knee osteoarthritis (KOA) rats, and explore its mechanism of action. Method: 36 rats were randomly divided into a blank group (without any treatment), a model group (physiological saline gavage after knee osteoarthritis modeling), and a treatment group (aconite decoction gavage after knee osteoarthritis modeling). After 2 months of intervention, the differences in synovial tissue characteristic indicators of the knee joints in each group of rats were compared, and the pathological morphological changes of the knee joint cartilage in rats were observed. Result: (1) The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), and interleukin-6 (IL-6) in rat synovial tissue was significantly increased in the model group compared to the blank group (all P<0.05); The mass concentrations of iNOS, TNF α, and IL-6 in the treatment group were significantly increased (all P<0.05). Compared with the model group, the treatment group showed a significant decrease in the mass concentrations of iNOS, TNF α, and IL-6 (all P<0.05). (2) Compared with the blank group, the model group showed significant increases in TLR4, TRAF6, and NF-κB p65 (all P<0.05); Compared with the model group, the treatment group showed a decrease in TLR4, MyD88, TRAF6, and NF-κB p65 (all P<0.05). Conclusion: Aconitum decoction improves knee joint dysfunction and increases joint mobility by affecting the TLR4 signaling pathway.

[Key words] Aconitum Decoction; Knee osteoarthritis; TLR4 signaling pathway; Regulatory factors; Mechanism of Action

膝骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是膝关节软骨变性、骨质增生造成的退行性关节疾病,以关节疼痛、肿胀和僵硬为主要特点,影响全球近2.5亿人^[1]。KOA多发于中老年人群,严重影响了患者的日常生活,给患者和社会带来了沉重的医疗负担^[2]。目前KOA的发病机制尚不明确,近年来科研团队从炎性因子等介质的表达探究其发病机制寻求到了突破。其中多条通路参与和调控KOA的发生发展,作

为广泛调节炎性反应的TLR4信号通路,是导致KOA发生发展的关键环节^[3]。研究发现,TLR4信号通路在KOA滑膜炎中,软骨破坏激活表达显著^[4]。在不同阶段的KOA,软骨和滑膜组织也显著表达,并与KOA分期的软骨形态学改变有明显相关性^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 10 周龄雄性 SD 大鼠 36 只，雌雄各半。体重 180~270g 之间，大鼠应在实验开始前 7 天习惯新环境，并进行标准饲养，提供免疫调节食物和清水供应。饲养环境温度 20~25℃，湿度 50~70%。

1.2 主要试剂与仪器

乌头汤（川乌 6g，麻黄 9g，芍药 9g，炙甘草 9g，黄芪 9g 饮片购自长沙医学院第一附属医院中药房）；TLR4、MyD88、TRAF6、NF-κBp65 一抗（美国 abcam 公司）；二抗（美国 Millipore 公司）；iNOS（iNOS）检测试剂盒、双氯芬酸钠双释放肠溶胶囊（戴芬）（Temmler WerkeGmbH）、TNF-α（TNF-α）检测试剂盒、IL-6（IL-6）检测试剂盒（北京百奥思科生物医学技术有限公司）；酶标仪（ThermoFisherScientific 公司）；蛋白核酸分析仪（美国 Beckman Coulter 公司）等。

1.2 实验方法

36 只大鼠适应性喂养 7d 后，采用随机数字表法分为空白组、模型组和治疗组 3 组，每组 12 只。空白组不做任何处理，模型组和治疗组均采用改良 Hulth 法复制 KOA 模型。术后 20x10⁴U 青霉素，连续肌注 3d，2 次/d。术后 1 周，采用随机数字表法将大鼠分为空白组、（不进行任何处理）、模型组（造模后生理盐水灌胃）、治疗组（造模后乌头汤临床等效剂量灌胃），各组均有 12 只，模型组和治疗组采用改良 Hulth 法复制膝关节骨性关节炎模型。术后 1 周空白组不进行任何处理；模型组给予生理盐水，按照 10 mL/（kg·d）的

量进行灌胃；治疗组给予乌头汤，按照 4.2 g/（kg·d）的剂量进行灌胃，治疗 2 个月。

1.3 检测指标

检测大鼠关节滑膜组织 iNOS、TNF-α 和 IL-6 的表达；大鼠关节滑膜组织 TLR4、MyD88、TRAF6 和 NF-κB p65mRNA 的表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析，P<0.05 为差异有显著性意义。

2.结果

2.1 四组大鼠血清 iNOS、TNF-α 和 IL-6 浓度的比较

空白组与模型组在干预前、后各指标均存在显著差异（P<0.05），提示造模成功。治疗组干预后 iNOS、TNF-α 及 IL-6 浓度较模型组显著降低（P<0.05），表明乌头汤可有效抑制 TLR4 信号通路相关炎症因子表达，缓解 KOA 炎症反应。

2.2 四组大鼠关节滑膜组织 TLR4/MyD88 通路 mRNA 表达的比较

治疗组 TLR4、MyD88、TRAF6、NF-κB p65 均低于模型组（P<0.05），提示乌头汤可通过抑制 TLR4 信号通路的激活，下调 MyD88、TRAF6 及 NF-κB p65 的表达，从而阻断炎症信号的级联放大效应。

表1 四组大鼠血清iNOS、TNF-α和IL-6浓度的比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

分组	iNOS (U/mL)		TNF-α (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)	
	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
空白组 (n=12)	5.96 ± 5.24	5.73 ± 4.86	23.63 ± 3.98	22.68 ± 4.17	298.85 ± 30.23	292.30 ± 28.67
模型组 (n=12)	15.84 ± 6.63	16.32 ± 7.08	52.63 ± 8.31	64.18 ± 7.83	585.16 ± 63.08	632.13 ± 56.22
治疗组 (n=12)	15.73 ± 6.92	10.28 ± 5.59	50.35 ± 6.96	38.66 ± 6.40	598.34 ± 66.73	409.54 ± 63.21
空白组 vs 模型组: t (P)	4.050 (<0.05)	4.272 (<0.05)	10.903 (<0.05)	16.205 (<0.05)	14.179 (<0.05)	18.654 (<0.05)
空白组 vs 治疗组: t (P)	3.899 (<0.05)	2.128 (<0.05)	11.545 (<0.05)	7.247 (<0.05)	14.162 (<0.05)	5.851 (<0.05)
模型组 vs 治疗组: t (P)	0.0398 (0.969)	2.319 (<0.05)	0.729 (0.474)	8.742 (<0.05)	0.497 (0.624)	9.115 (<0.05)

表2 四组大鼠关节滑膜组织TLR4/MyD88通路mRNA表达的比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	TLR4 (pg/mL)	MyD88 (pg/mL)	TRAF6 (pg/mL)	NF-κB p65 (pg/mL)
空白组 (n=12)	1.023 ± 0.040	1.010 ± 0.061	1.052 ± 0.0903	1.012 ± 0.033
模型组 (n=12)	7.063 ± 0.174	6.381 ± 0.356	10.407 ± 0.203	1.729 ± 0.088
治疗组 (n=12)	5.054 ± 0.022	4.757 ± 0.350	6.314 ± 0.0853	1.418 ± 0.015

3 讨论

乌头汤是一种传统中药汤剂,含有炙甘草、麻黄、白芍、乌头以及黄芪五种传统药物,由于其优良的疗效和较少的不良反应,对类风湿关节炎的治疗已有两千年的历史^[6]。KOA是膝关节软骨变性、骨质增生造成的退行性关节疾病,影响全球约23%的40岁及以上人群,其发病率逐年上升,且患者逐渐年轻化,严重威胁着人类的健康和^[7]生活质量。现代药理研究表明,乌头汤具有抗炎、调节免疫、镇痛、抗血管生成等作用^[8]。

炎性介质(iNOS、TNF- α 、IL-6)的异常升高与KOA滑膜炎进展及软骨基质降解的病理过程密切相关。研究显示,双氯芬酸钠(模型组干预药物)虽能通过抑制环氧酶-2降低炎性介质释放,但其对TLR4/NF- κ B信号轴的抑制

作用并不完全。而乌头汤的治疗效应可能源于其对TLR4/MyD88/NF- κ B级联反应的靶向调控,该机制与VX765等药物通过激活Nrf2抗氧化通路改善骨关节炎微环境的作用模式具有可比性^[9]。通过本次研究表明,乌头汤通过显著抑制TLR4/MyD88信号通路关键分子的mRNA和蛋白表达,有效降低下游炎症因子的生成,从而发挥抗炎作用。这一机制揭示了乌头汤治疗KOA的核心靶点:TLR4信号通路的异常激活是炎症级联反应的重要驱动因素,而乌头汤通过多靶点干预阻断该通路,可能为临床治疗提供新的策略。与传统非甾体抗炎药相比,乌头汤具有多靶点调控的优势,可能减少单一靶点抑制导致的耐药性或副作用,尤其适用于慢性炎症的长期管理。

参考文献:

- [1]Li M, Zhang L, Liu Z, et al.Sanse powder essential oil nanoemulsion negatively regulates TRPA1 by AMPK/mTOR signaling in synovitis: knee osteoarthritis rat model and fibroblast-like synoviocyte isolates[J].Mediators Inflamm, 2021, 2021: 4736670.
- [2]王欢.中西医结合治疗膝骨关节炎(膝痹)专家共识[J].世界中医药, 2023, 18(17): 2407-2412.
- [3]Lu C, Li Y, Hu S, et al.Scoparone prevents IL-1-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J].Biomed Pharmacother, 2018, 10(106): 1169-1174.
- [4]王欢, 王庆甫, 石鑫超等. TLR4与NF- κ B在大鼠膝骨关节炎滑膜中的表达及意义[J].中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(6): 4-8.
- [5]ANG 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): 1342-1358.
- [6]Ba X, Huang Y, Shen P, et al.WTD attenuating rheumatoid arthritis via suppressing angiogenesis and modulating the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α Pathway[J].Front pharmacol, 2021, 12: 696802.
- [7]Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S.Osteoarthritis[J].Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [8]Hou PW, Liu SC, Tsay GJ, et al.The traditional Chinese medicine "hu-QIAN-wan" attenuates osteoarthritis-induced signs and symptoms in an experimental rat model of knee osteoarthritis[J].Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5367494.
- [9]Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al.Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new?an update[J].Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6405.

作者简介: 陈靓靓(2004年6月-),女,汉族,籍贯湖南岳阳,本科,主要研究方向:中医药治病机理;

共同一作: 袁文琪,长沙医学院在校生,主要研究方向:中医药治病机理;

通讯作者: 艾珏萍(1990年11月-),女,汉族,籍贯湖南株洲,硕士,讲师,主要研究方向:针灸推拿治病机理。

项目编号: 湘教通〔2024〕191号-5219; 湘教通〔2024〕191号-5193; 湘教通〔2024〕191号-5273; 湖南省教育厅科学研究一般项目(24C0607)