

雷公藤多苷通过 Wnt/ β -catenin 缓解 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤

齐秀春, 陈 昕*, 曹玉净, 李 扬, 艾进伟, 李浩亮
(河南省中医院骨伤科, 河南 郑州 450002)

摘要: **目的** 探究雷公藤多苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的作用及其潜在的分子机制。**方法** 密度梯度分离法分离 SD 大鼠软骨细胞。软骨细胞随机分为对照组、模型组、雷公藤多苷组 (10、50 $\mu\text{g/mL}$ 雷公藤多苷)、LiCl 组 (50 $\mu\text{g/mL}$ 雷公藤多苷+20 mmol/L LiCl), 加入 10 ng/mL IL-1 β 诱导软骨细胞 24 h, 各给药组加入相应药物继续处理 24 h。CCK-8 检测细胞存活率, 试剂盒检测 LDH 释放量及 GAG 水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡, ELISA 检测细胞培养上清液中 COX-2、iNOS 水平, RT-PCR 检测 *MMP13*、*Acan*、*Sox-9* mRNA 表达, Western blot 检测 Wnt 通路 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白的表达。**结果** 雷公藤多苷单独作用对软骨细胞存活率及 LDH 释放无影响。与对照组比较, 模型组细胞存活率降低, LDH 释放量增加, 细胞凋亡率增加, GAG 水平及 *Acan*、*Sox-9* mRNA 表达降低, COX-2、iNOS 水平及 *MMP13* mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 经雷公藤多苷 (50 $\mu\text{g/mL}$) 干预后, 细胞存活率升高、LDH 释放量降低, 细胞凋亡率降低, GAG 水平及 *Acan*、*Sox-9* mRNA 表达升高, COX-2、iNOS 水平及 *MMP13* mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 而将 Wnt 通路激活剂作用之后, 雷公藤多苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞上述作用全部被反转。**结论** 雷公藤多苷通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路缓解 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤。

关键词: 雷公藤多苷; 软骨细胞; Wnt3a; β -catenin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)11-2890-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.012

Alleviation of IL-1 β -induced chondrocyte injury by tripterygium glycosides via Wnt/ β -catenin pathway

QI Xiu-chun, CHEN Xin*, CAO Yu-jing, LI Yang, AI Jin-wei, LI Hao-liang
(Department of Orthopedics, Henan Provincial Hospital of TCM, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of tripterygium glycosides on IL-1 β -induced chondrocyte injury and its potential molecular mechanism. **METHODS** Chondrocytes isolated from SD rats by density gradient separation were randomly divided into control group, model group, tripterygium glycosides group (10, 50 $\mu\text{g/mL}$), and LiCl group (50 $\mu\text{g/mL}$ tripterygium glycosides +20 mmol/L LiCl). The chondrocytes exposed to 10 ng/mL IL-1 β for 24 h were treated with corresponding agents for another 24 h. The chondrocytes had their cellular viability detection by CCK-8, their determination of LDH release and GAG level by kit, their assessment of apoptosis by flow cytometry, the detection of COX-2 and iNOS levels in the supernatant of cell culture by ELISA, the detection of expression of *MMP13*, *Acan* and *Sox-9* mRNA by RT-PCR, and detection of expression of Wnt pathway Wnt3a and β -catenin protein by Western blot. **RESULTS** Tripterygium glycosides alone had no effect on the survival rate and LDH release of chondrocytes. Compared with the control group, the model group displayed decreased survival rate, increased LDH release and apoptosis rate, decreased GAG level and *Acan*, *Sox-9* mRNA expression, and increased COX-2, iNOS and *MMP13* mRNA expression ($P<0.05$). The intervention of tripterygium glycosides (50 $\mu\text{g/mL}$) brought forth increased cell survival rate, decreased LDH release and cell apoptosis rate, increased GAG level and *Acan*, *SARBOX-9* mRNA expression, and decreased COX-2, iNOS and *MMP13* mRNA expression ($P<0.05$).

收稿日期: 2020-03-25

作者简介: 齐秀春 (1982—), 男, 硕士, 主治医师, 从事中医骨伤临床科研及教学工作。Tel: 13633823901

* 通信作者: 陈 昕 (1979—), 男, 硕士, 主治医师, 从事创伤骨科临床科研及教学工作。Tel: (0371) 60976973, E-mail: drxincheng_csgk@163.com

The use of Wnt pathway activator completely reversed tripterygium glycosides' s effects on IL-1 β -induced chondrocytes. **CONCLUSION** Tripterygium glycosides alleviates IL-1 β -induced chondrocyte injury via Wnt/ β -catenin pathway inhibition.

KEY WORDS: tripterygium glycosides; chondrocyte; Wnt3a; β -catenin

创伤性关节炎是踝关节骨折治疗后容易发生的一种并发症，主要呈现出严重的肿胀和疼痛，危害踝关节的功能，影响患者的身体健康和正常生活^[1]。它主要表现为关节软骨的变性和破坏，受损的软骨组织修复与再生能力较弱，因此创伤后造成的软骨损伤及退变成为临床修复的难题^[2]。雷公藤多苷是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中提取的一种水-氯仿提取物，具有较强的抗炎及免疫抑制作用^[3-4]。因此，本研究拟通过体外培养软骨细胞并加入白介素 1 β (IL-1 β) 模拟创伤性关节炎时软骨细胞的环境，检测不同浓度雷公藤多苷对软骨细胞活性和功能的影响，以期创伤性关节炎的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠(雄性，4 周，体质量 60~80 g)购自河南省中医院中心实验室(使用许可证号 SYXK(豫) 2016-0009)。

1.2 药物与试剂 雷公藤多苷片购于江苏美通制药有限公司(批号 151206，规格 10 mg/片)，加入少量 DMEM 培养液充分溶解，以 0.45 μ m 滤膜过滤除菌，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液分别稀释至 5、10、25、50 μ g/mL。DMEM 低糖培养基(批号 C11885500BT)、胎牛血清(批号 C20012500BT)、含 50 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的双抗(批号 15140-122)、胰蛋白酶(批号 25200-056)购于美国 Gibco 公司；氯化锂(LiCl)溶液(批号 R00473，规格 1 mol/L)购自北京雷根生物技术有限公司，蒸馏水稀释至 20 mmol/L；CCK-8 细胞活性检测试剂盒(批号 KGA317)、LDH 检测试剂盒(批号 KGT02424)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 KGA1012)购自江苏凯基生物科技股份有限公司；Col-II(批号 69-98687)、葡萄糖氨基聚糖(glycosaminoglycan, GAG)(批号 69-98547)、COX-2(批号 69-36228)、iNOS(批号 69-98762) ELISA 检测试剂盒，BCA 蛋白检测试剂盒(批号 69-97682)购自武汉默沙克生物科技有限公司；ECL 显色剂(批号 P0018FS)购于上海碧云天生物技术有限公司；兔抗鼠 MMP13(批号 ab219620)、Aggrecan

(Acan)(批号 ab186414)、Sox9(批号 ab185966)单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(批号 ab172730)购于英国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 软骨细胞分离培养 将 SD 大鼠处死，消毒后剪开膝关节，用刀片刮取关节表面软骨，放入加有 PBS 的培养皿中，清除表面血污及附着组织，用 PBS 溶液冲洗后，将软骨剪切到 1 mm³ 大小的组织块放入无菌培养皿内，加入 0.25% 胰蛋白酶在恒温摇箱中 37 $^{\circ}$ C 下摇荡消化 30 min。弃去上清液，加入 2 mg/mL 的 II 型胶原酶，放入恒温摇箱中 37 $^{\circ}$ C 下摇荡消化 2~4 h，低温离心 5 min 后弃去上清液，DMEM 培养液冲洗 3 次，加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。将含有完全培养基的组织块均匀铺在培养瓶内，再加入适量完全培养基，继续放在培养箱中静置培养，每 2~3 天换液 1 次，待组织块中软骨细胞长出后，传代培养，取第 3 代软骨细胞进行后续实验。

2.2 分组、造模及 CCK-8 检测软骨细胞存活率 取第 3 代软骨细胞，以 2×10^3 /孔接种于 96 孔板中，分别用不同浓度雷公藤多苷(0、5、10、25、50 μ g/mL)处理 24 h，其中未加雷公藤多苷的细胞组作为对照组，每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液，用加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照，继续孵育培养 2~4 h。在酶联免疫检测仪上检测 450 nm 处的吸光度值(OD)。细胞存活率 = $[(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。第 3 代软骨细胞分为对照组、模型组(10 ng/mL IL-1 β)、雷公藤多苷组(10、50 μ g/mL 雷公藤多苷)、LiCl 组(50 μ g/mL 雷公藤多苷 + 20 mmol/L LiCl)，加入 10 ng/mL IL-1 β 诱导软骨细胞 24 h，给药组加入相应药物继续处理 24 h。按上述 CCK-8 法，检测各组细胞存活率。

2.3 LDH 释放率检测 取第 3 代软骨细胞，以 5×10^4 /孔的浓度接种于培养瓶中，按照“2.2”项下分组处理细胞，根据 LDH 检测试剂盒检测各组细胞中 LDH 释放量。LDH 释放率 = $[\text{细胞上清液中 LDH 水平} / (\text{细胞上清液 LDH 水平} + \text{细胞裂解液中$

LDH 水平)] × 100%, 结果以实验组与对照组 LDH 释放率的比值来表示。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡检测 取第 3 代软骨细胞, 按照“2.2”项下分组处理细胞后, 0.25%胰蛋白酶加入到各组的培养皿中消化收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒的说明书进行操作, 将细胞重悬后加入 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光条件下分别孵育 15、5 min。最后, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.5 检测细胞培养上清液中 COX-2 和 iNOS 的水平 取第 3 代软骨细胞, 按照“2.2”项下分组处理细胞后, 收集细胞培养上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测细胞培养上清液中 COX-2 和 iNOS 的水平。

2.6 葡萄糖氨基聚糖 (glucose aminoglycan, GAG) 水平检测 取第 3 代软骨细胞, 按照“2.2”项下分组处理细胞后, 换液时的培养液 100 μL, 加入至含 1.5 mL 1.5% 阿利新蓝染液的试管内, 室温放置 10 min, 酶标仪在 490 nm 波长处吸光度值 (OD)。以硫酸软骨素制作标准对照曲线, 计算出各组细胞培养液 GAG 水平。

2.7 Western blot 检测蛋白表达 取第 3 代软骨细胞, 按照“2.2”项下分组处理细胞后, 收集细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 每孔上样量为 20 μg, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜, 加入 Wnt3a (1 : 800) 和 β-catenin 抗体 (1 : 1 000) 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 摇床孵育 1 h, 常规洗膜化学发光试剂显色。Quantity One 软件分析灰度值。

2.8 RT-PCR 检测 mRNA 表达 取第 3 代软骨细胞, 按照“2.2”项下分组处理细胞后, 收集细胞并提取总 RNA, 按照 M-MLV 逆转录试剂盒说明转录 cDNA, 引物序列为 MMP13 (正向 5'-CTTC-CCAACCGTATTGATGC-3', 反向 5'-TTTGAAGAC-CCAGTTCAGA-3'); Acan (正向 5'-TCGAGGACA GCGAGGCC-3', 反向 5'-TCGAGGGTGTAGCGTG-TAGAGA-3'); Sox-9 (正向 5'-TACGACTGGAC GCTGGTGCC-3', 反向 5'-CCGTTCTTCACCGACT-TCCTCC-3'); GAPDH (正向 5'-ATG TTCGTCAT-GGCTGTGAA-3', 反向 5'-GGTGCTAAGCAGTTGCT-GGT-3')。取 cDNA 进行扩增。反应条件为预变性 95 ℃、30 s; 变性 65 ℃、3 s, 退火 72 ℃ 30 s, 共 40 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 法计算出各个 mRNA 的相对表

达量。

2.9 统计学分析 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 所有细胞实验每组设 3 个复孔, 每个实验独立实验重复 3 次, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 GraphPad Prism 7.0 制图, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

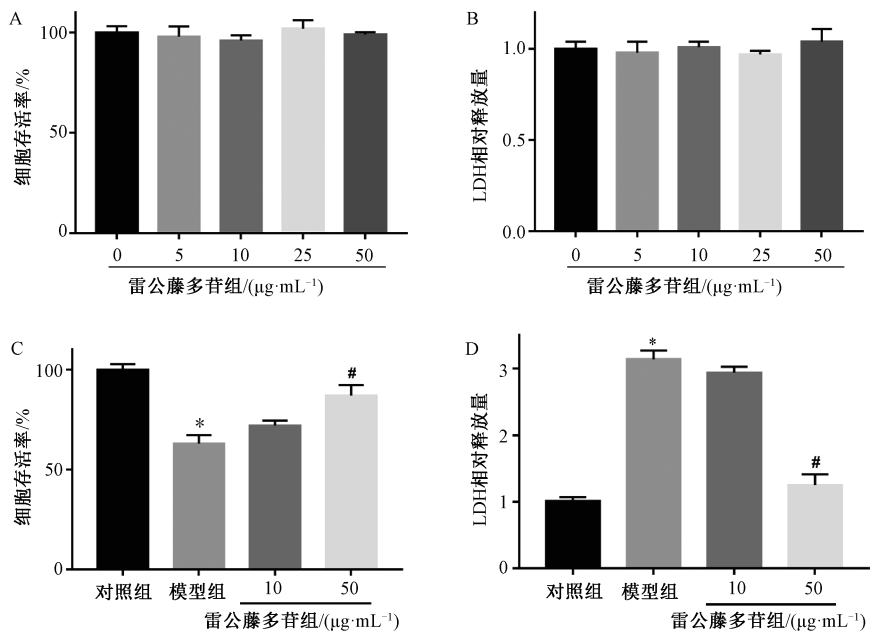
3.1 雷公藤多苷对 IL-1β 诱导软骨细胞增殖和毒性影响 CCK-8 检测结果表明, 与对照组比较, 雷公藤多苷 (5、10、25、50 μg/mL) 作用之后, 软骨细胞存活率及细胞内 LDH 水平无变化 (图 1A~1B)。与对照组比较, 模型组细胞存活率降低 ($P < 0.05$) LDH 释放升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 雷公藤多苷 (50 μg/mL) 干预后, 细胞存活率升高 ($P < 0.05$), LDH 释放降低 ($P < 0.05$) (图 1C~1D)。

3.2 雷公藤多苷抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡 流式细胞仪检测结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率上升 ($P < 0.05$), 而雷公藤多苷作用之后, 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 雷公藤多苷可以降低 IL-1β 诱导的细胞凋亡。见图 2。

3.3 雷公藤多苷缓解 IL-1β 诱导的软骨细胞退化及炎症反应 与对照组比较, 模型组 GAG 水平降低, 而雷公藤多苷作用之后, 细胞中 GAG 水平上升 (图 3A, $P < 0.05$); 与对照组比较, 模型组 COX-2 和 iNOS 水平升高, 而雷公藤多苷作用之后, 细胞中 COX-2 和 iNOS 水平降低 (图 3B, $P < 0.05$); 与对照组比较, 模型组细胞中 MMP13 mRNA 升高, Acan、Sox-9 mRNA 下降, 而雷公藤多苷作用后, 细胞中 MMP13 mRNA 降低, Acan、Sox-9 mRNA 上升 (图 3C, $P < 0.05$)。结果表明, 雷公藤多苷可以降低 IL-1β 诱导的软骨退化及炎症反应。

3.4 雷公藤多苷抑制 IL-1β 诱导软骨细胞中 Wnt/β-catenin 通路的激活 Western blot 结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞中 Wnt3a 和 β-catenin 的表达上调, 而雷公藤多苷作用之后细胞中 Wnt3a 和 β-catenin 表达下降 ($P < 0.05$), 见图 4。结果表明雷公藤多苷可以抑制 IL-1β 诱导软骨细胞中 Wnt/β-catenin 通路的激活。

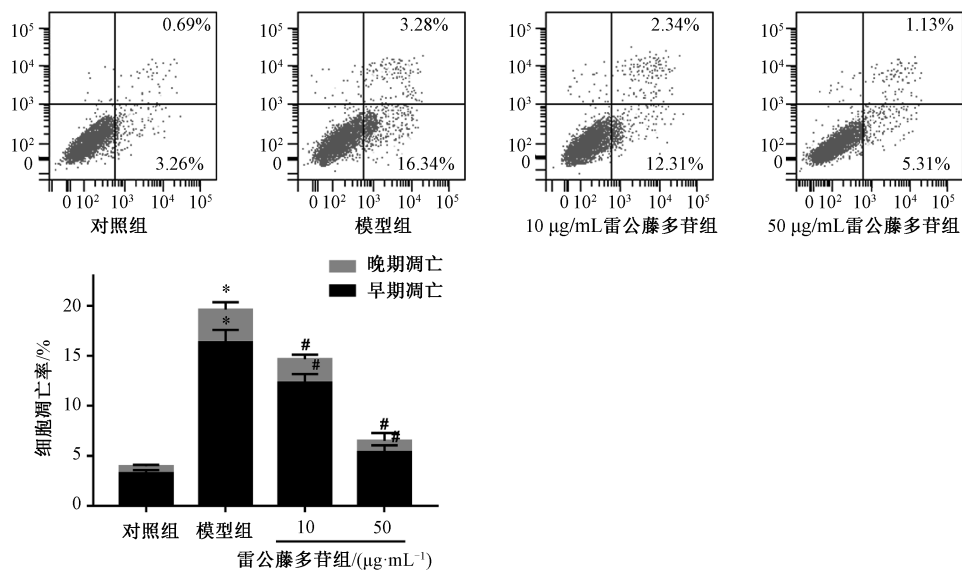
3.5 雷公藤多苷通过抑制 Wnt/β-catenin 通路缓解 IL-1β 诱导的软骨细胞损伤 为了检测雷公藤多苷是否通过抑制 Wnt/β-catenin 通路缓解 IL-1β 诱导



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

图 1 雷公藤多苷对 IL-1β 诱导软骨细胞增殖和毒性影响 (n=3)

Fig. 1 Effects of tripterygium glycosides on the proliferation and cytotoxicity of IL-1β-induced chondrocytes (n=3)



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

图 2 雷公藤多苷对 IL-1β 诱导的软骨细胞凋亡的影响 (n=3)

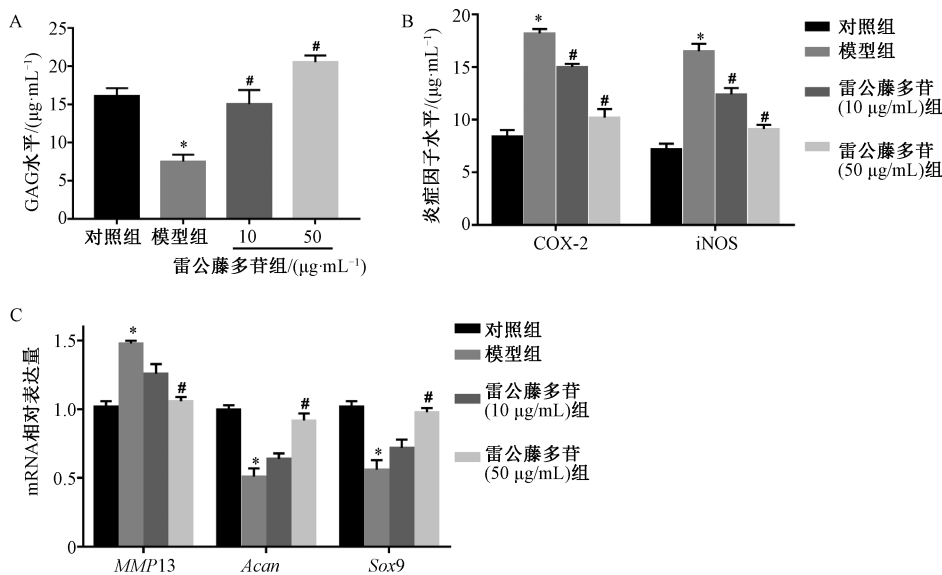
Fig. 2 Effects of tripterygium glycosides on the apoptosis of IL-1β-induced chondrocytes (n=3)

的软骨细胞损伤，将 Wnt/β-catenin 通路激动剂 LiCl 作用于雷公藤多苷干预的 IL-1β 诱导的软骨细胞。Western blot 结果表明，LiCl 作用之后细胞中 Wnt3a 和 β-catenin 的表达上升（图 5A， $P<0.05$ ）；与雷公藤多苷组比较，LiCl 激动剂作用之后细胞存活率降低（ $P<0.05$ ），LDH 释放上升（ $P<0.05$ ），细胞凋亡率增加（ $P<0.05$ ），GAG 水平及 Acan、Sox-9 mRNA 降低（ $P<0.05$ ），MMP13 mRNA 及

COX-2、iNOS 水平上升（ $P<0.05$ ），均逆转了雷公藤多苷对 IL-1β 诱导的细胞损伤的缓解作用。结果表明，雷公藤多苷通过抑制 Wnt/β-catenin 通路缓解 IL-1β 诱导的软骨细胞损伤。

4 结论

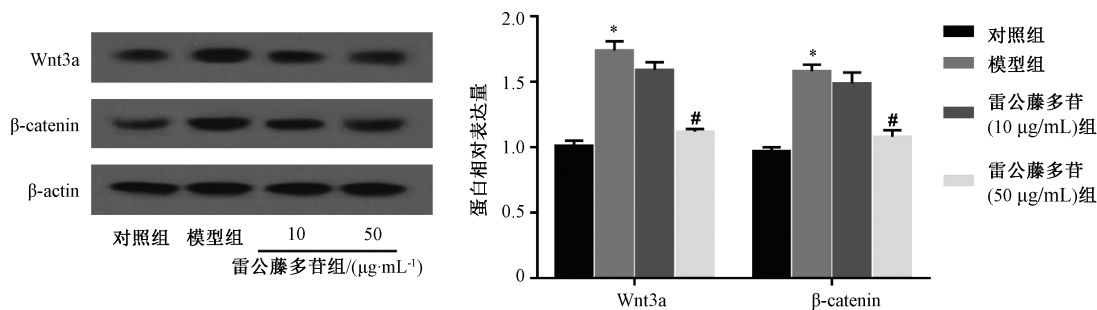
关节软骨是固态的结缔组织，由分布在其中的特异性软骨细胞及大量的细胞外基质组成。软骨基质中含有水分、蛋白多糖和胶原纤维，还包括一些



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

图 3 雷公藤多苷对 IL-1β 诱导的软骨细胞退化及炎症反应的影响 (n=3)

Fig. 3 Effects of tripterygium glycosides on the degeneration and inflammation of IL-1β-induced chondrocytes (n=3)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

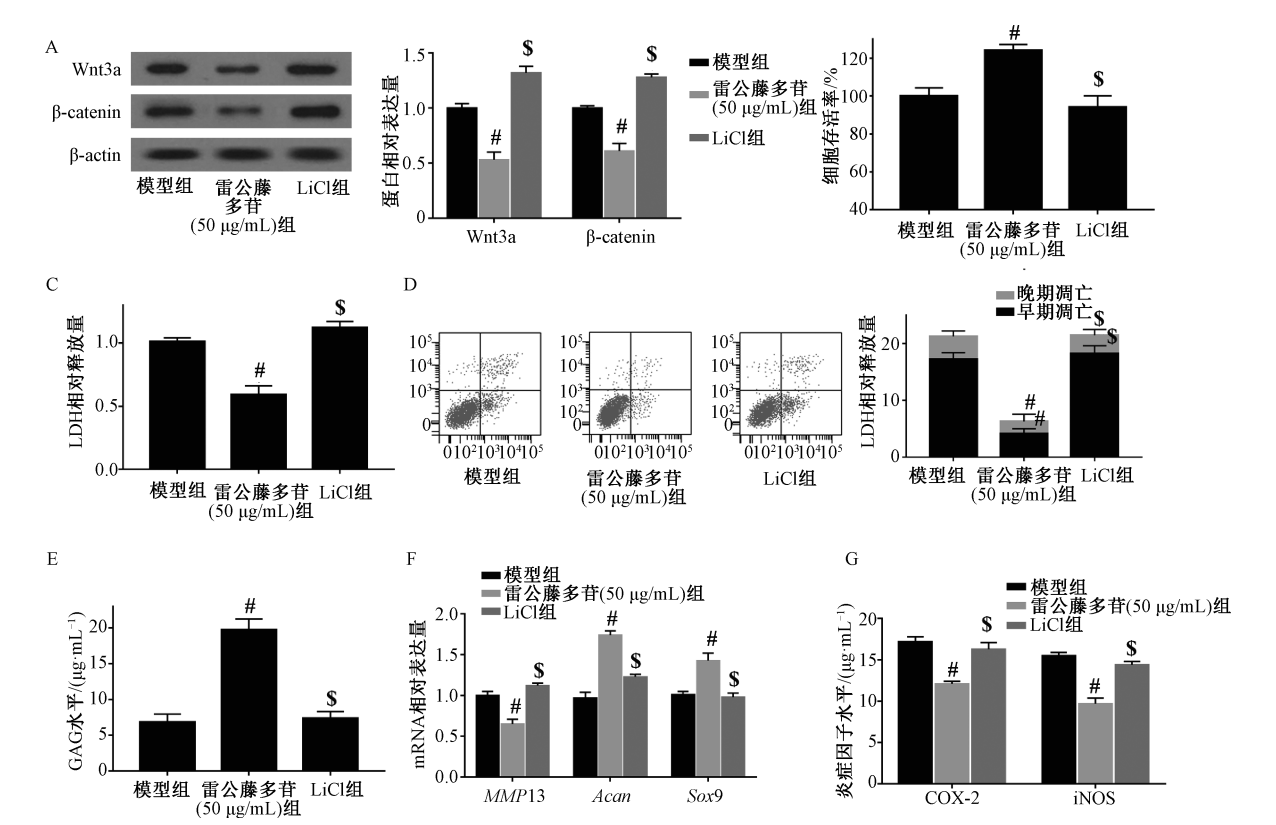
图 4 雷公藤多苷对 IL-1β 诱导软骨细胞中 Wnt/β-catenin 通路的影响 (n=3)

Fig. 4 Effects of tripterygium glycosides on Wnt/β-catenin Pathway of IL-1β-induced chondrocytes (n=3)

脂肪、蛋白质、糖蛋白和无机盐等^[5-6]。创伤性关节炎导致的软骨、滑膜损伤及变性将导致关节功能障碍，其中炎症是创伤性关节炎病理变化过程中的重要环节^[7]。因此，本研究通过 IL-1β 诱导软骨细胞模拟创伤性关节炎发生的软骨细胞环境，探究雷公藤多苷对创伤性关节炎软骨细胞的保护作用及其潜在的分子机制。

雷公藤多苷具有抗炎、抗肿瘤和免疫抑制等多种生物功能，其活性主要由二萜内酯、生物碱和三萜等多种有效成分协同产生。在临床上，雷公藤多苷主要用于风湿性关节炎、急性肾小球肾炎和强直性脊柱炎等自身免疫性疾病和炎症性疾病的治疗^[8]。有研究表明，使用雷公藤多苷治疗关节炎模型大鼠之后，大鼠的足肿胀度、关节炎症指数均显著降低，且其机制可能是雷公藤多苷上调了调节性 T 细胞以及炎症细胞抑制因子白介素 10 水平^[9]。

环氧合酶 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 是前列腺素合成和起始步骤的关键酶，而前列腺素与滑膜、软骨破坏，关节周围组织炎症等病变过程息息相关^[10]。诱导型一氧化氮合成酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) 在软骨细胞损伤和退变中发挥重要作用。目前很多研究证实，iNOS 抑制剂的应用有助于炎性软骨代谢的恢复。iNOS 抑制剂能抑制 iNOS 的表达，减少软骨细胞产生 NO 的同时，抑制基质金属蛋白酶 (MMPs) 和胶原酶的活性及基因表达，使软骨细胞合成蛋白多糖的能力逐渐恢复，并能抑制自由基和 IL-1β 诱发的软骨细胞凋亡^[11-12]。葡萄糖氨基聚糖 (GAG) 是软骨基质的主要成分，软骨基质合成关键基因 Acan、Sox-9 蛋白等的水平均作为关节炎中软骨损伤的指标受到广泛的研究^[13-14]。另外，MMP13 是唯一能够裂解胶原分子中三维螺旋结构的酶，对胶原具有特异



注：与模型组比较，# $P<0.05$ ；与雷公藤多苷组比较，\$ $P<0.05$ 。

图 5 雷公藤多苷通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路缓解 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤 (n=3)

Fig. 5 Alleviation of IL-1 β -induced chondrocyte injury by tripterygium glycosides via Wnt/ β -catenin pathway inhibition (n=3)

性，软骨破坏中研究较多^[15]。本研究表明，IL-1 β 诱导之后，软骨细胞的增殖活性降低，细胞凋亡率增加，COX-2、iNOS 的表达水平提高，GAG、Acan 和 Sox-9 的水平降低，而雷公藤多苷作用之后细胞活性上升，炎性相关 COX-2、iNOS 的表达水平降低，GAG、Acan 和 Sox-9 的水平提高。结果表明，雷公藤多苷能够保护 IL-1 β 诱导的软骨损伤。

Wnt 信号通路包含多种通路系统，调节生细胞形态与功能的分化与维持、免疫、应激等过程，其中典型的 Wnt/ β -catenin 通路在关节炎中具有至关重要的作用^[16]。Wnt/ β -catenin 通路的激活增强肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的分泌，促进 MMP 的生成，从而导致细胞外基质降解，引起关节软骨破坏。有研究表明，雷公藤多苷能够通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路延缓糖尿病肾病的进展^[17]。为了检测 Wnt/ β -catenin 通路的抑制是否同样参与了雷公藤多苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用，我们将 Wnt/ β -catenin 通路的激活剂作用于雷公藤多苷处理的软骨细胞损伤模型中，结果表明，Wnt/ β -catenin 通路的激活剂反转了雷公藤多苷对

IL-1 β 诱导的软骨细胞的保护作用。

综上所述，雷公藤多苷可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路反转 IL-1 β 诱导的软骨细胞活性降低、LDH 分泌和细胞凋亡率的增加，以及 GAG、MMP13、Acan、Sox-9 水平的降低和 COX-2、iNOS 水平的上升等，以期这一结果为创伤性关节炎的临床治疗提供理论支持。

参考文献：

[1] Burkhart K J, Hollinger B. Post-traumatic arthritis in the young patient: treatment options before the endoprosthesis [J]. *Orthopade*, 2016, 45 (10) : 832-843.

[2] Olson S A, Furman B D, Kraus V B, *et al.* Therapeutic opportunities to prevent post-traumatic arthritis: Lessons from the natural history of arthritis after articular fracture [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33 (9) : 1266-1277.

[3] 刘素晓, 闫凤娜, 王幼平. 雷公藤多苷的抗炎作用与临床应用进展 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9 (32) : 131-134.

[4] Luo J, Song W J, Xu Y, *et al.* Benefits and safety of tripterygium glycosides and total glucosides of paeony for rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25 (9) : 696-703.

[5] Sun H B. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1211: 37-50.

[6] Pap T, Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis-two unequal siblings [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(10): 606-615.

[7] Lieberthal J, Sambamurthy N, Scanzello C R. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis cartilage*, 2015, 23(11): 1825-1834.

[8] 杨冬梅, 刘俊. 雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(20): 2185-2190.

[9] Wan L, Liu J, Huang C B, *et al.* Effect of tripterygium glycosides on pulmonary function in adjuvant arthritis rats[J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(12): 715-723.

[10] Fan H W, Liu G Y, Zhao C F, *et al.* Differential expression of COX-2 in osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 12872-12879.

[11] More A S, Kumari R R, Gupta G, *et al.* Effect of iNOS inhibitor S-methylisothiurea in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 103(4): 764-772.

[12] Gul A, Kunwar B, Mazhar M, *et al.* Rutin and rutin-conjugated

gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF- κ B and iNOS activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 310-317.

[13] Ko J Y, Kim K I, Park S, *et al.* *In vitro* chondrogenesis and *in vivo* repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (11): 3571-3581.

[14] Bar Oz M, Kumar A, Elayyan J, *et al.* Acetylation reduces SOX9 nuclear entry and ACAN gene transactivation in human chondrocytes[J]. *Aging cell*, 2016, 15(3): 499-508.

[15] Scanzello C R, Umoh E, Pessler F, *et al.* Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(8): 1040-1048.

[16] Sassi N, Laadhar L, Allouche M, *et al.* WNT signaling and chondrocytes: from cell fate determination to osteoarthritis physiopathology[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34 (2): 73-80.

[17] 李慧. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾间质 Wnt/ β -catenin 信号途径影响的实验研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2014.

膈下逐瘀汤对慢性盆腔炎大鼠 TLR4/NF- κ B 信号的影响

姚春娣, 朱澄漪, 温玲, 郁金芬, 蒋志涛*
(南京中医药大学附属张家港医院, 江苏 张家港 215600)

摘要: **目的** 探讨膈下逐瘀汤对慢性盆腔炎大鼠 TLR4/NF- κ B 信号的影响。**方法** 50 只成年未孕 SD 雌性大鼠随机分为假手术组、模型组及膈下逐瘀汤低、中、高剂量组, 每组 10 只。苯酚胶浆法复制慢性盆腔炎大鼠模型, 造模 1 周后, 各组灌胃给药 3 周。血液流变仪检测大鼠血液流变学变化, ELISA 法检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, HE 染色观察子宫内膜病理形态学, 免疫组化染色、RT-PCR 法检测大鼠子宫组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠在不同切变率的情况下全血黏度及血浆黏度升高 ($P<0.01$), 血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平升高 ($P<0.01$), 增加子宫炎细胞浸润, 促进大鼠子宫 TLR4 及 p-NF- κ B p65 的蛋白表达及 TLR4 及 NF- κ B mRNA 的表达。膈下逐瘀汤降低慢性盆腔炎模型大鼠全血黏度及血浆黏度 ($P<0.05$, $P<0.01$); 降低大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的水平 ($P<0.01$); 抑制大鼠子宫内的炎症, 改善大鼠子宫的病理组织学变化 ($P<0.01$); 降低慢性盆腔炎模型大鼠子宫中 TLR4 及 p-NF- κ B p65 的蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$) 及 TLR4、NF- κ B mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$) 的表达。**结论** 膈下逐瘀汤通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号, 降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子水平, 改善慢性盆腔炎大鼠血瘀症状。

关键词: 膈下逐瘀汤; 慢性盆腔炎; TLR4/NF- κ B 信号

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)11-2896-07

doi: 10. 3969/j.issn.1001-1528. 2020. 11. 013