

基于缺氧组织中 NLRP3 炎症小体的活化研究膝痹宁减轻 KOA 滑膜炎症的效应机制

张力, 张立, 邢润麟, 黄正泉, 李晓辰, 徐波, 肖延成, 茆军, 王培民

(南京中医药大学附属医院/江苏省中医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 基于缺氧组织中 NLRP3 炎症小体的活化研究膝痹宁减轻膝骨关节炎滑膜炎症的效应机制。方法 大鼠分为空白组、KOA 组、膝痹宁组。膝痹宁组药液灌胃, 空白组、KOA 组消毒生理盐水灌胃作为对照; 第 56 天处死大鼠提取滑膜组织; HE 染色评估滑膜炎症; 缺氧探针免疫荧光染色观察大鼠膝关节滑膜组织缺氧程度; qPCR 和 Western blot 检测缺氧转录因子 1 α (HIF-1 α)、Caspase-1 p10、NLRP3 及 GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达; ELISA 法测定 NLRP3 炎症小体活化下游 IL-1 β 、IL-18 的水平。结果 HE 染色发现, KOA 组滑膜组织较空白组表现出更多的炎性细胞浸润, 衬里层细胞排列紊乱, 膝痹宁组较 KOA 组炎性细胞浸润减少。大鼠滑膜组织的探针免疫荧光染色显示, KOA 组与较空白组缺氧程度加重, 膝痹宁组则较 KOA 组减轻。同时, KOA 组滑膜组织中 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白表达水平均较高于空白组 ($P < 0.01$), 膝痹宁组则较 KOA 组降低 ($P < 0.01$)。此外, KOA 组 Caspase-1 p10、NLRP3、GSDMD 的 mRNA 及蛋白表达水平均高于空白组 ($P < 0.05$), 而膝痹宁组较 KOA 组有所降低 ($P < 0.05$)。KOA 组滑膜组织中 IL-1 β 、IL-18 的水平较空白组升高 ($P < 0.01$), 膝痹宁组较 KOA 组降低 ($P < 0.01$)。结论 膝痹宁能有效改善 KOA 滑膜组织缺氧状况, 降低 HIF-1 α 的表达, 减少 NLRP3 炎症小体的活化, 减轻滑膜炎症。

关键词: 膝骨关节炎; 滑膜炎症; 膝痹宁; 缺氧转录因子-1 α ; NLRP3 炎症小体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2020)01-0068-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0068

引文格式: 张力, 张立, 邢润麟, 等. 基于缺氧组织中 NLRP3 炎症小体的活化研究膝痹宁减轻 KOA 滑膜炎症的效应机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1): 68-72.

Mitigation Effect of Xibining on Synovitis of Knee Osteoarthritis Based on the Activation of NLRP3 Inflammasomes in Hypoxic Tissues

ZHANG Li, ZHANG Li, XING Run-lin, HUANG Zheng-quan, LI Xiao-chen, XU Bo, XIAO Yan-cheng, MAO Jun, WANG Pei-min

(Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mitigation effect of Xibining on synovitis of knee osteoarthritis based on the activation of NLRP3 inflammasomes in hypoxic tissues. **METHODS** The rats were divided into three groups: normal group, KOA group and Xibining group. Xibining group was gavaged with drug liquid while the normal group and KOA group were treated with the same amount of sterilized saline as control. On the 56th day, the rats were killed to obtain synovial tissue. HE staining was performed to evaluate synovial inflammation and Hypoxyprobe hypoxia probe immunofluorescence staining was used to observe the degree of hypoxia in the synovial tissue of rats. qPCR and Western blot were performed to detect both gene and protein expression of HIF-1 α , NLRP3, Caspase-1 p10 and GSDMD, respectively. The contents of IL-1 β and IL-18, which were downstream from the activation of NLRP3 inflammasomes, were determined by ELISA. **RESULTS** Immunofluorescence staining with hypoxyprobe probe showed that the degree of hypoxia in synovial tissue of KOA rats was more severe than that of normal rats, and Xibining group was less than KOA. In HE staining, the synovial tissue of the KOA group showed more inflammatory cell infiltration and the lining layer cells were more disarranged than that of the normal group. The infiltration of

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家自然科学基金(81573993, 81774334); 江苏省领军人才培养资助项目(SLJ0207)

第一作者: 张力, 男, 硕士研究生, E-mail: 183718670@qq.com

通信作者: 王培民, 男, 主任中医师, 博士生导师, 主要从事创伤与骨关节疾病研究, E-mail: drwpm@163.com

inflammatory cells in the Xibining group was less than that in the KOA group. Meanwhile, both mRNA and protein level of HIF-1 α in KOA group were higher than those in normal group ($P < 0.01$), and Xibining group were lower than those in KOA group ($P < 0.01$). In addition, both mRNA and protein expression of Caspase-1 p10, NLRP3 and GSDMD in KOA group were higher than those in normal group ($P < 0.05$), while those in Xibining group were lower than those in KOA group ($P < 0.05$). The contents of IL-1 β and IL-18 in synovial tissue of KOA group was higher than that of normal group ($P < 0.01$), and that of Xibining group was lower than that of KOA group ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Xibining can effectively improve the condition of hypoxia in synovial tissue of KOA, down-regulate the expression of HIF-1 α , decrease the activation of NLRP3 inflammasomes, and alleviate synovitis.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; synovitis; Xibining; HIF-1 α ; NLRP3 inflammasomes

膝骨关节炎(KOA)是临床常见的退行性病变之一,其病理机制十分复杂,滑膜炎症作为 KOA 的启动因素,贯穿全程并推动 KOA 的病程进展^[1]。低氧状态持续存在于 KOA 的病理过程中并促进缺氧转录因子(HIF-1 α)的表达^[2]。既往的研究表明,HIF-1 α 诱导 NLRP3 炎症小体的活化^[3]。本研究团队在 KOA 成纤维样滑膜细胞中找到了 NLRP1 和 NLRP3 炎症小体介导滑膜炎症的证据^[4],并证实了 KOA 滑膜组织的缺氧状态伴随着 HIF-1 α 的表达上调,激活 NLRP3 炎症小体加重 KOA 滑膜纤维化^[5]。

大量研究证实了活血类中药或复方能有效降低组织中 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白表达^[6-7]。膝痹宁(专利号:CN201010514325)是王培民教授针对 KOA 临床诊疗以温经活血立法研发的中药复方,长期临床应用发现,膝痹宁能有效缓解 KOA 疼痛、消除肿胀。基础研究也证实了膝痹宁可以有效降低 KOA 动物血清中 IL-1、IL-6、NO 的含量^[8]。

由此可见,膝痹宁治疗 KOA 滑膜炎症的效应特点,与 HIF-1 α 介导 NLRP3 炎症小体活化影响滑膜炎症的病理机制十分契合,本次研究基于上述机理对膝痹宁的疗效机制展开探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠,24 只,体重 280~320 g(北京维通利华实验动物技术有限公司)。动物分笼饲养,自由进食饮水,控制动物房室温(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(60 \pm 5)% ,12 h 的光/暗方案。所有动物实验规程均经南京中医药大学动物保护与使用委员会批准并在国家卫生研究所关于保护和利用实验动物的方针指导下进行的。

1.2 试剂与仪器

HIF-1 α 抗体(批号:ab179483,美国 Abcam 公司)、Caspase-1 p10 抗体(批号:ab179515,美国 Ab-

cam 公司)、NLRP3 抗体(批号:ab214185,美国 Abcam 公司)、GSDMD 抗体(批号:ab219800,美国 Abcam 公司)、GAPDH 抗体(批号:ab3243,美国 Abcam 公司)、逆转录试剂盒、荧光定量检测试剂盒(批号:RR036A、RR820A,日本 Takara 公司)、Hypoxyprome™-1 Plus Kit(批号:HP2-100Kit,美国 Hypoxyprome 公司)、IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(批号:ab100767、ab213909,美国 Abcam 公司)。

BioPhotometer plus 核酸蛋白检测仪(德国 Eppendorf 公司)、Mastercycler nexus 逆转录 PCR 仪(德国 Effendorf Minispin 公司)、7500 实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)、Carl Zeiss LSM710 共焦激光扫描显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及建模 由 SPSS 软件生成随机数,随机均分为 3 组:空白组、KOA 组、膝痹宁组,每组 8 只。动物适应性饲养 1 周,KOA 组、膝痹宁组大鼠 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,双侧膝关节备皮,常规 75% 酒精消毒。膝关节屈曲 45 $^{\circ}$,1 mL 注射器自髌骨下髌腱最外侧进针,抵股骨髁后退针 2 mm,注射 2% 碘乙酸钠 50 μ L。双膝关节依次注射,完成后大鼠回笼饲养,自由活动,关节不固定,14 d 后 KOA 模型构建成功。空白组大鼠关节腔注射 50 μ L 高温消毒的生理盐水作为对照。

1.3.2 膝痹宁药液的制备及药物干预 依据膝痹宁方临床使用剂量:附片 15 g,制狗脊 15 g,紫河车 10 g,山萸肉 15 g,川桂枝 15 g,巴戟天 10 g,生薏以仁 10 g,制首乌 10 g,川牛膝 10 g,生甘草 5 g。所需药材均购自南京中医药大学附属医院,混合后蒸馏水浸泡过夜。煎煮配合旋转蒸发仪浓缩药液至 1 mL 相当于原生药 1 g,冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

KOA 模型建立后,按临床人体剂量的 6.25 倍计算每日大鼠灌胃量(1.04 mL/100 g)^[8-9],空白组

和 KOA 组予相应体积消毒生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 8 周。药物干预当天记为 d1,d56 结束干预。

1.3.3 滑膜组织提取 d56 二氧化碳窒息处死大鼠,提取各大鼠滑膜组织。双膝关节去皮,沿髌韧带两侧做纵向切口。贴髌骨上缘,股四头肌远端做横切口,深及股骨。牵起髌骨及周围组织,翻开暴露淡黄透亮的薄膜组织,即为滑膜,手术刀片小心切取。每组随机挑选 2 只大鼠,在处死前 45 min,按 60 mg/kg 的剂量关节腔注射低氧探针,处死后取滑膜组织放入 4%多聚甲醛固定。

1.3.4 HE 及缺氧探针免疫荧光染色 常规石蜡包埋、切片、梯度脱水,HE 染色试剂盒染色后观察摄片。依据 Hypoxyprobe™-1 Plus Kit 试剂盒说明,在常规蜡块制作完成之后,一抗 FITC-MAb1(1:100)孵育 60 min,PBS 清洗后二抗 anti-FITC(1:100)孵育 60 min,常规 DAPI 复染、封片,荧光倒置显微镜观察。

1.3.5 qPCR 检测滑膜组织中 HIF-1 α 、Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达 严格按照 Trizol 试剂说明书,在无 RNA 酶环境下提取滑膜组织总 RNA。分光光度计测定 RNA 的水平,以 A₂₆₀/A₂₈₀ 的 OD 值评价 RNA 纯度,提取的总 RNA 按 Prime Script RT reagent Kit 10 μ L 反应体系,DEPC 水补齐至 10 μ L。混匀离心后 PCR 仪中按 37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s 逆转录。检索 GenBank 中相应的基因序列,采用 Oligo v6.6 软件设计引物,上海生物工程技术服务有限公司帮助合成。目的基因及内参基因 GAPDH 序列见表 1。

表 1 目的基因序列

目的基因	基因序列(3'→5')	引物长度/ bp
HIF-1 α	F:CGCAACTGCCACCACTGATGAA	22
	R:CCGACTGTGAGTACCACTGTATGC	24
Caspase-1	F:TCGGAGAGTCGGAGCTGATGTT	22
	R:CTCTGGGCAGGCAGCAAATTCT	22
NLRP3	F:CCATCCGCAGCCAATGAACAGA	22
	R:CCAGACCTCCAAGACCACGACT	22
GSDMD	F:TGCTTGCCGTACTCCATTCCATC	22
	R:AGTTCTGAAGAGCCTGCCTCCA	22
GAPDH	F:AGGTTGTCTCCTGTGACTTCAA	22
	R:CTGTTGCTGTAGCCATATTCATTG	24

1.3.6 Western blot 检测滑膜组织中 HIF-1 α 、Caspase-1 p10、NLRP3、GSDMD 的蛋白表达 组

织称质量后匀浆,BCA 试剂盒测定蛋白水平并绘制标准曲线,蛋白煮沸变性后加样电泳,湿转法转印至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭,1:1 000 加入一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。次日洗膜后,1:1 000 加入二抗室温孵育,显色液曝光。结果根据 GAPDH 内参半定量计算用于统计学分析。

1.3.7 ELISA 法检测滑膜组织中 IL-1 β 、IL-18 的水平 组织样本称质量后 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 匀浆,离心取上清,BCA 试剂盒校正蛋白水平。严格按照 ELISA 试剂盒说明,对标准品进行梯度稀释;设置 5 复孔,依次加样(每孔 100 μ L),孔板覆膜孵育;随后弃上清依次换用抗体工作液、酶结合液覆膜孵育;最后加入显色液,避光孵育后加入终止液,酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

1.3.8 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Graphpad5 进行统计学分析,分组间比较采用 one-way ANOVA 或 t 检验,P<0.05 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝痹宁对 KOA 大鼠滑膜炎症的影响

HE 染色观察各组大鼠滑膜组织炎症,结果显示,KOA 组滑膜组织较空白组表现出更多的炎性细胞浸润,衬里层细胞排列紊乱;膝痹宁组较 KOA 组炎性细胞浸润减少。膝痹宁可抑制 KOA 大鼠滑膜炎症,见图 1。

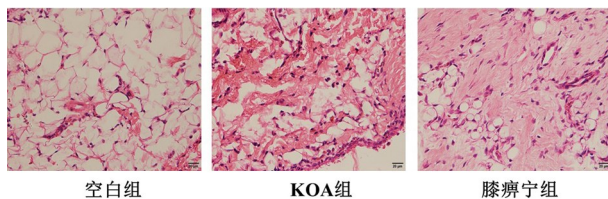
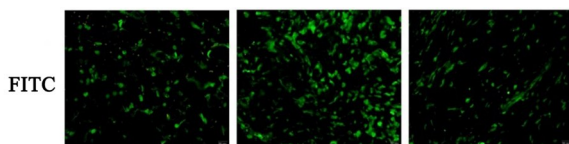


图 1 各组大鼠滑膜组织 HE 染色($\times 200$)

2.2 膝痹宁对 KOA 大鼠滑膜组织缺氧状况的影响

Hypoxyprobe 缺氧探针对各组大鼠的滑膜组织进行派莫硝唑染色显示,KOA 组较空白组缺氧程度加重,膝痹宁组大鼠的缺氧程度较 KOA 组减轻。膝痹宁可改善 KOA 大鼠滑膜组织的缺氧状况,见图 2。



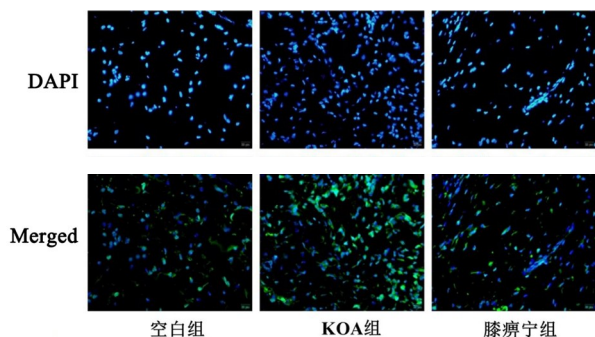
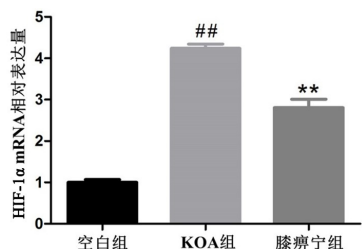


图2 各组大鼠滑膜组织派莫硝唑染色(×200)

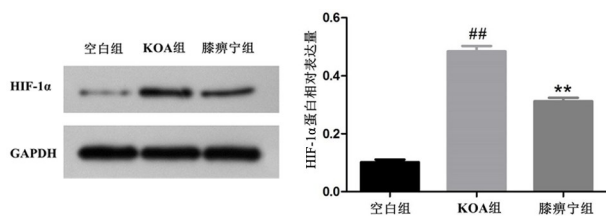
2.3 膝痹宁对 KOA 大鼠滑膜组织 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达的影响

如图 3~4 所示, KOA 组 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白表达均较空白组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 膝痹宁可显著降低 KOA 大鼠滑膜组织 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.01$)。



注:与空白组比较, $^{##} P < 0.01$;与 KOA 组比较, $^{**} P < 0.01$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图3 各组大鼠滑膜组织中 HIF-1 α mRNA 的相对表达量

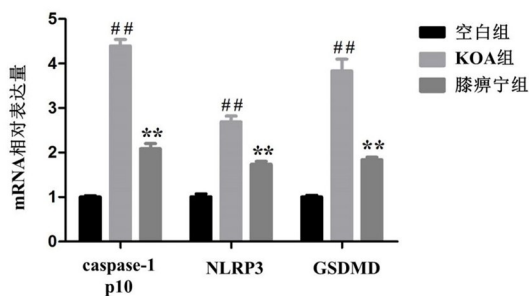


注:与空白组比较, $^{##} P < 0.01$;与 KOA 组比较, $^{**} P < 0.01$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图4 各组大鼠滑膜组织中 HIF-1 α 蛋白的相对表达量

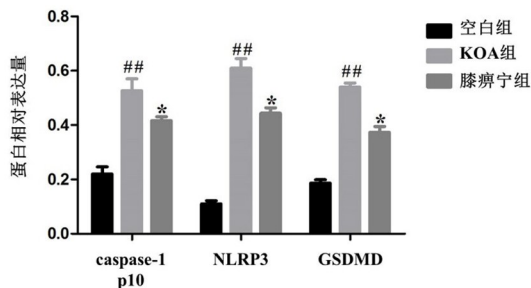
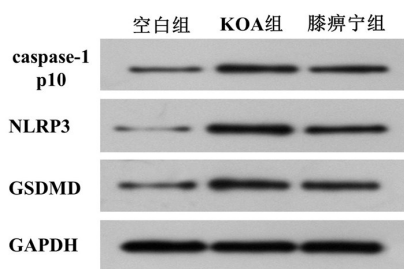
2.4 膝痹宁对 KOA 大鼠滑膜组织中 NLRP3 炎症小体活化的影响

如图 5~6 所示, KOA 组 Caspase-1 p10、NLRP3、GSDMD 的 mRNA 及蛋白表达水平均高于空白组 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 而膝痹宁组较 KOA 组有所降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。ELISA 检测各组滑膜组织中 NLRP3 炎症小体活化下游 IL-1 β 、IL-18 的水平, 2 者在 KOA 组的含量均高于空白组 ($P < 0.01$), 而膝痹宁组较 KOA 组有所降低 ($P < 0.01$), 见图 7。



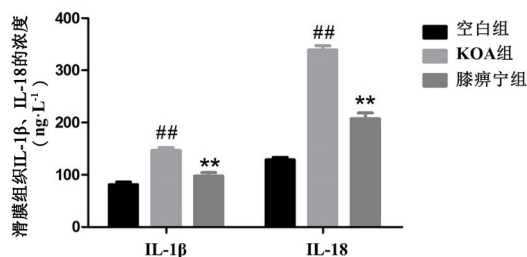
注:与空白组比较, $^{##} P < 0.01$;与 KOA 组比较, $^{**} P < 0.01$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图5 各组大鼠滑膜组织 Caspase-1 p10、NLRP3、GSDMD mRNA 的表达



注:与空白组比较, $^{##} P < 0.01$;与 KOA 组比较, $^{*} P < 0.05$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图6 各组大鼠滑膜组织 Caspase-1 p10、NLRP3、GSDMD 蛋白的表达



注:与空白组比较, $^{##} P < 0.01$;与 KOA 组比较, $^{**} P < 0.01$ 。
 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图7 各组大鼠滑膜组织 IL-1 β 、IL-18 的水平比较

3 讨论

慢性低度炎症与组织氧化还原水平一直是研究者们关注的焦点。在 KOA 研究领域,大量的研究

支持 HIF-1 α 对于软骨细胞存在保护作用,升高的 HIF-1 α 可以提高软骨细胞内胶原合成酶的基因表达,促进胶原合成^[10];也可以减少软骨细胞分化及细胞凋亡^[11]。在滑膜组织中,HIF-1 α 的升高诱导 VEGF、TGF 的表达,增加胶原沉积从而促进了组织纤维化,这一发现与 HIF-1 α 对软骨细胞的保护作用十分契合^[12]。HIF-1 α 引起 NLRP3 炎症小体的活化参与多种疾病的病理过程,例如学者们在慢性阻塞性肺疾病的患者血清中发现了 HIF-1 α 与 NLRP3 炎症小体的高度相关性^[13],HIF-1 α 参与人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧过程中 NLRP3 炎症小体的激活等^[14]。

本次研究表明,膝痹宁能减轻 KOA 滑膜炎,有效改善 KOA 滑膜组织缺氧状况,降低 HIF-1 α 的表达,减少 NLRP3 炎症小体的活化,减轻滑膜炎。本次研究尚有些许不足,尽管实验中发现了细胞焦亡核心执行蛋白 GSDMD 表达的异常,但对 KOA 中细胞焦亡的观察还需要进一步开展相关细胞实验,这将是本研究团队努力的方向。

参考文献:

[1] GLYN-JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991):376-387.

[2] QING L, LEI P, LIU H, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(1):63-68.

[3] GUPTA N, SAHU A, PRABHAKAR A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(18):4763-4768.

[4] ZHAO LR, XING RL, WANG PM, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4):5463-5469.

[5] ZHANG L, ZHANG L, HUANG Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synoviocyte pyroptosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6326517.

[6] 许勇,薛彬,孟祥超,等.伸筋活血汤对低氧诱导因子-1 α 缺失小鼠椎间盘退变的影响[J].中医正骨,2018,30(1):12-17.

[7] 郭秀伟,张培彤,王耀焯,等.川芎对肺癌干细胞样 PG 细胞荷瘤裸鼠手术前后 HIF-1 α 表达的影响[J].辽宁中医杂志,2017,44(5):1070-1074.

[8] 王培民,夏岩,许建安,等.膝宁方治疗膝关节骨性关节炎平地行走疼痛的临床观察[J].中国骨伤杂志,2005,18(4):240-241.

[9] 杨挺,王培民,诸方受.膝宁方治疗肾虚寒湿证膝关节炎患者的康复评定[J].辽宁中医杂志,2007,34(3):294-295.

[10] DUVAL E, BOUYOUCEF M, LECLERCQ S, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha down-regulates type I collagen through Sp3 transcription factor in human chondrocytes[J]. IUBMB Life, 2016, 68(9):756-763.

[11] CHARLIER E, RELIC B, DERoyer C, et al. Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): E2146.

[12] LI Y, LIU Y, WANG C, et al. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 126:1-14.

[13] 赵开顺,楚亚萍,余艳芳,等.慢性阻塞性肺疾病急性发作期患者血清 CG、NT-pro BNP、HIF-1 α 及 NLRP3 蛋白表达水平的意义[J].四川医学,2019,40(1):79-82.

[14] 魏祺.缺氧诱导因子-1 α 与缺氧复氧条件下 NLRP3 炎症小体激活的关系[D].南昌:南昌大学,2015.

(编辑:杨巍敏)