DOI: 10.14188/j.1671-8852.2023.0468
文章编号 1671-8852(2025)03-0302-05

银杏双黄酮通过抑制软骨细胞肿瘤坏死因子α改善膝骨关节炎表型的研究

王 芸[1] 周 颖[2] 杨 岚[3]
[1]武汉市第四医院中医科 湖北 武汉 430022；
武汉大学中南医院 [2]医保部，[3]医务处 湖北 武汉 430071

摘要 目的：探索银杏双黄酮是否具有抗骨关节炎（OA）功效并探讨其机制。方法：利用前交叉韧带切断建立大鼠膝关节骨关节炎模型，关节腔注射银杏双黄酮，观察大鼠膝关节软骨退变表型；利用重组白细胞介素1β（IL-1β）构建体外退变软骨模型，予以50 μmol•L^{-1}银杏双黄酮处理，检测软骨退变指标。结果：在体研究发现，银杏双黄酮关节腔注射可显著改善大鼠膝关节OA表型，降低关节软骨肿瘤坏死因子α（TNF-α）蛋白表达水平及关节液TNF-α浓度；体外研究发现，银杏双黄酮可显著降低IL-1β诱导的原代软骨细胞TNF-α mRNA及蛋白表达水平，并降低培养基TNF-α浓度；另外，银杏双黄酮可上调软骨细胞2型胶原（Col2a1）、蛋白多糖（Acan）mRNA水平，抑制基质金属蛋白酶13（MMP-13）、聚蛋白多糖酶5（Adamts-5）mRNA水平，并通过上调凋亡抑制基因B淋巴细胞瘤-2基因（Bcl-2）mRNA表达水平、抑制凋亡诱导基因硫胱胺酸蛋白酶3（Caspase 3）mRNA水平起到抗凋亡的作用。结论：银杏双黄酮可能通过抑制软骨细胞TNF-α、促进软骨基质合成、抑制软骨基质降解及软骨细胞凋亡，进而起到抗OA的作用。

关键词 骨关节炎；银杏双黄酮；肿瘤坏死因子α；软骨细胞
中图分类号 R961.1
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

Ginkgetin attenuates the osteoarthritis progression by inhibiting the tumor necrosis factor α from chondrocytes

WANG Yun[1], ZHOU Ying[2], YANG Lan[3]
[1]Dept. of Chinese Traditional Medicine, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China;
[2]Dept. of Medicare, [3]Dept. of Medical Affaire, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To study the possible effect and mechanism of Ginkgetin in osteoarthritis (OA) treatment. **Methods:** Rat knee OA models were developed by cutting the anterior cruciate ligament, and then the degeneration of the cartilage was observed after 4 times of intra-articular Ginkgetin (50 μL of 100 μg•mL^{-1}) injection in the knee. Also, chondrocytes were treated with 50 μmol•L^{-1} Ginkgetin after induced by 10 ng•mL^{-1} IL-1β for 24 h *in vitro*, and the degenerative features of the chondrocytes was detected. **Results:** Intra-articular Ginkgetin injection could partially rescue the cartilage from degeneration during OA progression *in vivo*, by down-regulating the protein expression of tumor necro-

作者简介：王芸，女，1991—，医学硕士，主要从事骨关节退行性病变的中医与康复治疗，E-mail: 617126994@qq.com
通信作者：杨岚，女，1973—，主任科员，主要从事医务管理及老年退行性疾病康复研究，E-mail: yanglanlan730330@163.com

sis factor α (TNF-α) in the cartilage and the level of TNF-α in the synovial fluid. Also, Ginkgetin attenuated the stimulated gene expression of TNF-α by interleukin 1β in the primary chondrocyte *in vitro*, as well as down-regulating the concentration of TNF-α in the culture supernatant. Further, we found that Ginkgetin also up-regulated the stimulated gene expression of collagen type 2a1 (Col2a1), aggrecan (Acan) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and down-regulated the gene expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), Adamts-5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 5), and Caspase 3. **Conclusion:** Ginkgetin might be a potential anti-OA agent, which promotes the biosynthesis and inhibits the degeneration of cartilage matrix, and inhibits the apoptosis of chondrocyte during OA progression.

Key Words　Osteoarthritis; Ginkgetin; Tumor Necrosis Factor α; Chondrocyte

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种中老年常见的慢性退行性关节疾病,主要病理改变为关节软骨的退变及滑膜的炎性增生[1-3]。研究[4-5]提示,OA人群发病率已超过10%,60岁以上人群甚至超过50%。目前,OA的药物治疗均难以逆转OA的最终结局,因此亟需开发新的有效的抗OA药物。肿瘤坏死因子α(TNF-α)是OA病程中最主要的炎症因子之一,参与软骨凋亡、软骨基质降解等多个病理过程,也是目前临床OA及类风湿性关节炎靶向治疗的重要靶点[6-7]。

白果及银杏叶具有活血、化瘀、通络的功效[8-9]。HAN[10]的研究显示,银杏提取物具有一定的抗炎作用;HO等[11]则发现,银杏提取物可能通过激活JNK/c-Jun通路进而对抗白细胞介素1β(IL-1β)的促炎作用,进而可能起到软骨保护作用。白果双黄酮又称银杏双黄酮或银杏素(Ginkgetin),是银杏提取物的主要有效成分。ZHANG等[12]研究发现,白果双黄酮可有效改善大鼠的缺血再灌注损伤;XU等[13]则发现,白果双黄酮可通过STAT3/JAK2/SIRT1通路抑制神经炎症反应,改善大鼠的缺血再灌注损伤。提示银杏双黄酮可能用于改善膝关节骨关节炎软骨退变和关节炎症。本项目即利用体内、体外实验探讨银杏双黄酮对骨关节炎关节软骨的影响,并初步探讨其作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料　DMEM/F12(1∶1)培养基、胎牛血清购自赛默飞世尔(北京)公司;人重组IL-1β购自美国PeproTech公司;青链双抗、RIPA裂解液及蛋白定量试剂盒(BCA)均购自碧云天公司;胰酶及谷氨酰胺购自Amresco公司;Ⅰ型胶原酶、Ⅱ型胶原酶、1,9-二甲基亚甲基蓝(DMMB)均购自Sigma公司;所有抗体及酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自Abcam公司;TRIzol试剂购自Life Technologies公司;逆转录试剂盒及实时定量试剂盒购自宝生物工程(大连)公司;引物均由上海生工合成,序列见表1;ECL显色试剂盒购自Advansta公司;银杏双黄酮购自上海源叶生物科技有限公司(分子结构式见图1);Tran-well培养体系由康宁公司提供。

表1　实时定量PCR引物序列及反应条件

基因	正向序列(5′—3′)	反向序列(5′—3′)	退火温度/℃
TNF-α	GGCTTTCGGAACTCACTGGA	CCCGTAGGGCGATTACAGTC	60
Col2a1	GCTCCCAGAACATCACCTACCA	ACAGTCTTGCCCCACTTACCG	60
Acan	AAGGGCGAGTGGAATGATGT	CGCTTCTGTAGTCTGCGTTTGT	60
Bcl-2	GGTGAACTGGGGGAGGATTG	AGAGCGATGTTGTCCACCAG	60
Caspase 3	GAGCTTGGAACGCGAAGAAA	TAACCGGGTGCGGTAGAGTA	59
MMP-13	ACCATCCTGTGACTCTTGCG	TTCACCCACATCAGGCACTC	60
Adamts 5	GGCCATACCATTCCGAGACC	CGGGCCTTAACCTGTCCAA	60
Gapdh	GCAAGTTCAACGGCACAG	GCCAGTAGACTCCACGACA	60

1.2　膝骨关节炎大鼠模型建立　麻醉完成后,Wista大鼠剃去膝关节处毛发并消毒皮肤,髌骨外推,暴露膝关节滑车沟取纵行皮肤切口,暴露股骨滑车及髁间窝。膝关节屈曲90°,分离髌下脂肪垫,暴露前交叉韧带,予以切断(即前交叉韧带切断术,ACLT)。缝合切口并予以镇痛、预防感染处理。

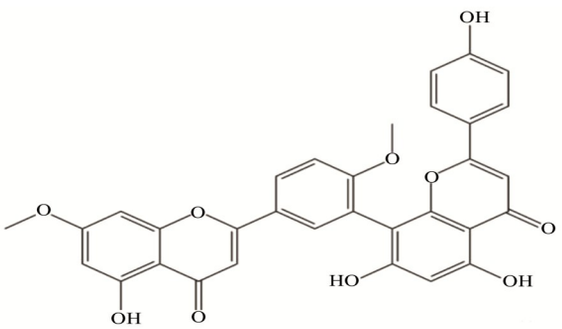


图1 银杏双黄酮分子结构式

ACLT术后2月,将所有大鼠随机分为两组:对照组,关节腔内注射生理盐水50 μL,1周1次,连续4次;治疗组,关节腔注射100 μg•mL^{-1}银杏双黄酮50 μL,1周1次,连续4次。ACLT术后3月处死动物,取膝关节行病理学检查,取关节液行生化检查。

1.3 细胞获取与培养 3月龄Wista大鼠,麻醉后处死,取股骨头软骨帽以提取原代软骨细胞。软骨组织中加入20倍体积0.5% Ⅱ型胶原酶,37 ℃下消化12 h;1 200 *g*离心5 min,沉淀用PBS洗2遍。加10%FBS的DMEM/F-12培养基于37 ℃、5% CO_2、95%湿度下培养。胰酶消化传代。对照组细胞予以10 ng•mL^{-1} IL-1β,治疗组予以10 ng•mL^{-1} IL-1β+50 μmol•L^{-1}银杏双黄酮,持续处理24 h获取细胞进行检测相关指标。

1.4 病理学检测 本研究涉及的甲苯胺蓝染色及免疫组化样本制备及结果检测均参照标准操作手册,由武汉谷歌生物技术有限公司代为完成。

1.5 实时定量PCR TRIzol试剂提取总RNA。总RNA浓度调整为300 ng•μL^{-1}后逆转录,调整cDNA浓度为1 000 ng•μL^{-1},RT-PCR检测mRNA表达水平。PCR条件(表1)为:95 ℃预变性30 s、95 ℃变性5 s、退火30 s、72 ℃延伸30 s,后3步设40循环。同时,以GAPDH为内参,对各目的基因mRNA水平相对定量。

1.6 Western Blot RIPA裂解液提取细胞总蛋白。BCA法检测样本蛋白浓度,并将其调整为2.5 μg•μL^{-1},加入5×蛋白上样缓冲液后100 ℃水浴10 min,−20 ℃保存。配制5%浓缩胶和分离胶,电泳,醋酸纤维膜转印。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,4 ℃下TNF-α(Abcam,Cambridge,UK)一抗孵育过夜。TBST洗膜3次,室温下二抗孵育2 h。TBST洗膜3次,ECL显色剂显影。Fusion FX7系统(Vilber Lourmat,Marne-la-Vallée,France)拍照记录,Quantity One 4.6(Bio-Rad Laboratories,CA,USA)分析条带灰度值,并以GAPDH为内参校正。

1.7 ELISA 大鼠关节液及软骨细胞培养上清TNF-α浓度的ELISA检测方法严格参照厂商试剂盒说明书进行。首先,用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中浓度为10 μg•mL^{-1}的捕获抗体包被PVC微量滴定板的样品孔,用黏合塑料制品覆盖微量滴定板并在4 ℃下孵育过夜,弃去包被液,并洗涤微量滴定板2次,每次在微孔中加入200 μL PBS。除去溶液或洗涤液,每孔添加200 μL封闭缓冲液(5%脱脂奶粉)PBS,封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点。用黏合塑料制品覆盖微量滴定板并在室温下孵育至少2 h,或在4 ℃下孵育过夜。用200 μL PBS洗涤微量滴定板2次。每孔添加100 μL经过稀释的样品,在37 ℃下孵育90 min。每孔添加100 μL经过稀释的检测抗体,用黏合塑料制品覆盖微量滴定板并在室温下孵育2 h,用PBS洗涤微量滴定板4次,添加100 μL偶联二抗,其在使用之前便用封闭缓冲液进行稀释,用黏合塑料制品覆盖微量滴定板并在室温下孵育1 h,用PBS洗涤微量滴定板4次。加入硝基苯磷酸盐(pNPP)底物,在室温下孵育15~30 min后,在405 nm处测定光度值。

1.8 统计学分析 数据表示为均数±标准差,SPSS 21.0软件分析数据,Graphpad PRISM 8软件制图。检验数据方差齐性或正态性后利用单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银杏双黄酮改善大鼠膝关节骨关节炎表型 利用ACLT术建立大鼠膝骨关节炎模型,并予以银杏双黄酮处理,我们发现:ACLT术后2月可诱导大鼠膝关节软骨退行性改变,表现为软骨表面不连续,软骨基质甲苯胺蓝着色较浅,软骨细胞肥大化;而银杏双黄酮处理1月可显著改善软骨表面的磨损情况,并增加软骨基质甲苯胺蓝着色(图2A)。同时,银杏双黄酮处理组大鼠膝关节Mankin评分较对照组显著降低(图2B,$P<0.05$)。提示银杏双黄酮关节腔注射可改善膝关节骨关节炎表型。

2.2 银杏双黄酮抑制膝骨关节炎软骨组织肿瘤坏死因子α(TNF-α)表达和分泌 在上述大鼠模型检测炎性因子TNF-α发现:相比对照组,银杏双黄酮处理组膝关节软骨组织TNF-α蛋白抗体着色细胞数量更少、着色更浅(图3A),且光密度分析提示银杏双黄酮组软骨组织TNF-α蛋白表达水平显著低

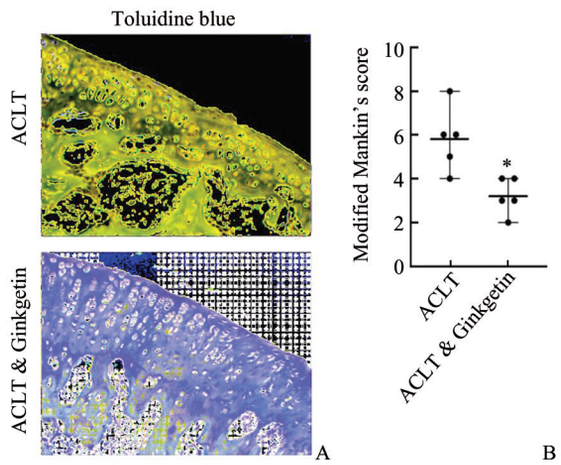


图 2　银杏双黄酮改善大鼠膝关节骨关节炎表型

A. 大鼠膝关节软骨蕃红-固绿染色；B. 大鼠膝关节软骨改良 Mankin 评分。与 ACLT 组组比，$^{*}P<0.05$，$n=5$

于对照组（图 3B，$P<0.05$）。同时，我们也发现银杏双黄酮可显著降低骨关节炎大鼠关节内关节液 TNF-α 浓度（图 3C，$P<0.05$）。提示银杏双黄酮可能通过抑制软骨细胞 TNF-α 表达和分泌，起到抗 OA 的作用。

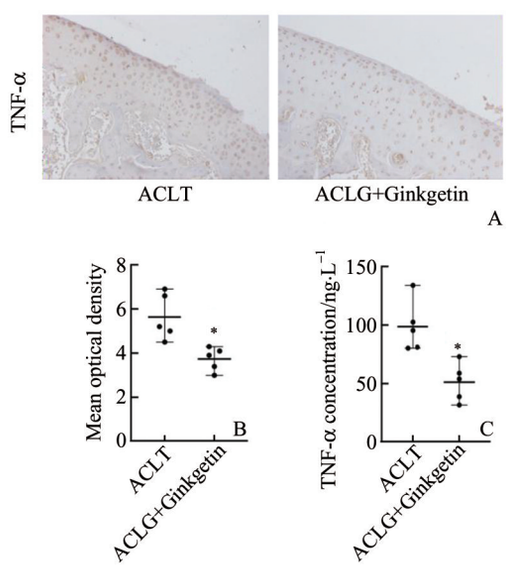


图 3　银杏双黄酮抑制膝骨关节炎软骨组织肿瘤坏死因子 α（TNF-α）蛋白表达和关节液 TNF-α 含量

A. 大鼠关节软骨 TNF-α 蛋白表达水平的免疫组化检测；B. 软骨组织 TNF-α 蛋白表达水平的定量分析；C. 大鼠关节液 TNF-α 蛋白浓度。与 TCLT 组比，$^{*}P<0.05$，$n=5$

2.3　银杏双黄酮抑制骨关节炎软骨细胞 TNF-α 表达和分泌　IL-1β 是骨关节炎病程中最重要的炎性因子之一，也是建立骨关节炎细胞模型的主要诱导因子。我们发现，银杏双黄酮显著降低 IL-1β 诱导的原代软骨细胞培养上清 TNF-α 浓度（图 4A，$P<0.01$）；同时，银杏双黄酮显著降低 IL-1β 诱导的原代软骨细胞 TNF-α mRNA 表达水平（图 4B，$P<0.01$）；Western Blot 检查也发现，银杏双黄酮显著降低软骨细胞 TNF-α 蛋白表达水平（图 4C、4D，$P<0.01$）。提示银杏双黄酮可能通过抑制软骨细胞 TNF-α 合成和分泌起到抗 OA 的作用。

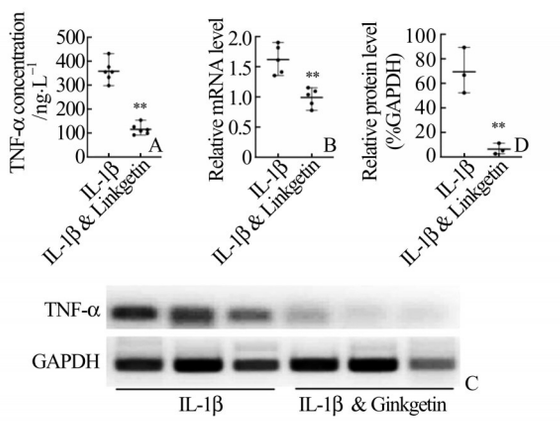


图 4　银杏双黄酮抑制骨关节炎软骨细胞 TNF-α 表达和分泌

A. 培养上清 TNF-α 浓度；B. TNF-α mRNA 表达水平；C. TNF-α 蛋白表达水平的 Western Blot 检测；D. TNF-α 蛋白表达水平的定量分析。与 IL-1β 组比，$^{*}P<0.01$

2.4　银杏双黄酮改善骨关节炎软骨细胞的退变表型　相比单独 IL-1β 诱导 24 h 的软骨细胞，IL-1β＋银杏双黄酮组软骨细胞基质合成关键基因 2 型胶原（Col2a1）、蛋白多糖（Acan）mRNA 水平显著升高（图 5A、5B，$P<0.01$）；凋亡抑制基因 B 淋巴细胞瘤-2 基因（Bcl-2）mRNA 水平显著升高（图 5C，$P<0.01$），凋亡诱导基因硫胱胺酸蛋白酶 3（Caspase 3）mRNA 水平显著降低（图 5D，$P<0.01$）；另外，软骨基质降解酶基质金属蛋白酶 13（MMP-13）、聚蛋白多糖酶 5（Adamts-5）mRNA 表达水平显著降低（图 5E～5F，$P<0.01$）。提示银杏双黄酮可能具有促进软骨基质合成、抑制软骨基质降解，并抑制软骨细胞凋亡的作用。

3　讨论

OA 是以局部炎性反应为典型病理改变的关节退行性疾病，其所涉及的细胞微环境极其复杂，多种炎性因子通过内分泌、自分泌和旁分泌的方式建立起复杂的炎症调控网络，并参与调控包括软骨细胞、滑膜细胞、成骨细胞、破骨细胞及血管内皮细胞在内的多种细胞的功能及交互作用[14]。其中，肿瘤坏死因子 α（TNF-α）是最为重要炎性因子之一，其

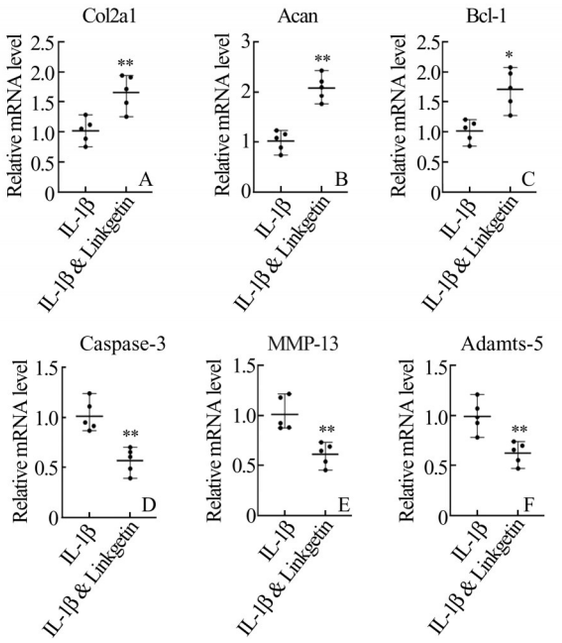


图5 银杏双黄酮改善骨关节炎软骨细胞的退变表型

A～B. 软骨基质合成标志基因Col2a1、Acan的mRNA表达水平；C～D. 软骨增殖和凋亡标志基因Bcl-1、Caspase-3的mRNA表达水平；E～F. 软骨基质降解标志基因MMP-13、Adamts-5的mRNA表达水平。与IL-1β组比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

可独立或与其他细胞因子协同作用参与调控关节内炎症反应及关节退变表型[14]。TNF-α可抑制软骨细胞基质合成功能，导致软骨基质蛋白多糖及Ⅱ型胶原含量的降低，进而影响软骨基质稳态和力学性能；同时，TNF-α还可诱导软骨细胞及滑膜细胞分泌基质金属蛋白酶家族酶(MMPs)及含血小板反应蛋白基序的解聚素样金属蛋白酶(ADAMTS)等其他基质降解酶，其中以MMP-3、MMP-13及ADAMTS-5等的功能最为重要，他们通过分解软骨细胞和细胞外基质破坏软骨结构完整性；另外，TNF-α还可诱导软骨细胞发生细胞凋亡，进而打破软骨损伤与修复之间的稳态平衡，致使软骨出现不同程度的溶解与损伤；TNF-α可通过刺激滑膜及骨组织血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血小板衍生生长因子(PDGFB)等生长因子的释放，诱导滑膜及软骨下骨血管扩张和增生，双向侵蚀关节软骨引起软骨组织的退变及骨关节炎的疼痛症状[14]。

因此，针对关节内TNF-α的靶向治疗是目前OA治疗的研究热点之一。GÜLER-YÜKSEL等[15]的研究发现，TNF-α单克隆抗体英夫利西单抗(Infliximab)可改善类风湿关节炎手部关节的骨关节炎临床症状；MAKSYMOWYCH等[16]的研究则发现阿达木单抗(Adalimumab)可显著改善膝关节骨关节炎的WOMAC评分，尤其改善膝关节僵硬及功能评分。本研究发现，银杏双黄酮在体内、体外均可显著降低软骨细胞TNF-α的基因表达及细胞外分泌，并改善膝关节软骨退变表型，提示银杏双黄酮可能通过作用于软骨细胞TNF-α改善膝关节局部炎症微环境，进而起到抗OA的作用。进一步，我们发现银杏双黄酮可上调软骨细胞基质合成基因Col2a1、Acan mRNA表达水平，并增加软骨基质蛋白多糖含量；银杏双黄酮还可通过抑制MMP-13、*A*damts-5基因mRNA水平抑制软骨基质降解；另外，银杏双黄酮还可上调凋亡抑制基因Bcl-2基因mRNA表达水平、抑制凋亡诱导基因Caspase 3基因mRNA水平起到抗软骨细胞凋亡的作用。这与银杏双黄酮抑制软骨细胞TNF-α的基因表达及细胞外分泌功能相吻合。综上所述，银杏双黄酮可能抑制软骨细胞TNF-α促进软骨基质合成、抑制软骨基质降解及软骨细胞凋亡，进而起到抗OA的作用。本研究揭示了银杏双黄酮的抗OA功效，并为银杏提取物在OA治疗领域的应用提供了实验依据。

参考文献

[1] GOLDRING M B. Articular cartilage degradation in osteoarthritis [J]. HSS J, 2012, 8(1): 7-9.

[2] LOESER R F, GOLDRING S R, SCANZELLO C R, et al. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697-1707.

[3] GOLDRING M B, GOLDRING S R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192: 230-237.

[4] NEOGI T, ZHANG Y. Epidemiology of osteoarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2013, 39(1): 1-19.

[5] BIJLSMA J W, BERENBAUM F, LAFEBER F P. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice [J]. Lancet, 2011, 377(9783): 2115-2126.

[6] SANCHEZ-LOPEZ E, CORAS R, TORRES A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression [J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(5):258-275.

[7] DIEPPE P A, LOHMANDER L S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis [J]. Lancet, 2005, 365(9463):965-973.

[8] EVANS J R. Ginkgo biloba extract for age-related macular degeneration [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2000, (2):CD001775.

(下转第356页)