

豆腐果苷通过抑制 TrkA-TRPV1 信号通路 减轻大鼠膝骨关节炎疼痛

项婷¹, 贾元威², 郭南¹, 王萍¹, 王昌茂¹, 詹翠娇¹, 徐新徽¹, 沈杰^{2*}

¹皖南医学院; ²皖南医学院弋矶山医院, 芜湖 241000

摘要: 本研究探讨豆腐果苷对膝骨关节炎大鼠疼痛的作用及机制。SD 大鼠适应性饲养后测得基础痛阈值, 根据基础痛阈值筛选后将大鼠随机分为空白组、模型组、假手术组、给药组。大鼠右膝关节腔内注射单钠碘乙酸盐(MIA)诱导膝骨关节炎(KOA)模型, 定期测量大鼠痛阈和关节直径, 14 天后处死部分大鼠检测大鼠背根神经节(DRG)内 TrkA 及 TRPV1 阳性细胞数及荧光强度。与模型组相比, 豆腐果苷给药能明显改善 MIA 诱导的热痛敏和机械痛敏。且给药组 L4 DRG 中 TrkA 免疫荧光强度、TRPV1 荧光阳性细胞数均低于模型组。表明豆腐果苷可缓解大鼠 KOA 疼痛, 其机制与 KOA 大鼠 L4 DRG 中 TrkA-TRPV1 通路的抑制有关。

关键词: 豆腐果苷; 膝骨关节炎; 疼痛; TrkA; TRPV1

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)10-1659-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.10.005

Helicid reduces pain of knee osteoarthritis in rats by inhibiting TrkA-TRPV1 signaling pathway

XIANG Ting¹, JIA Yuan-wei², GUO Nan¹, WANG Ping¹,
WANG Chang-mao¹, ZHAN Cui-jiao¹, XU Xin-hui¹, SHEN Jie^{2*}

¹Wannan Medical College; ²Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

Abstract: In this paper, the effect and mechanism of helicid on pain in rats with knee osteoarthritis are studied. The basic pain threshold is measured after adaptive feeding of SD rats, and unqualified rats are eliminated accordingly. According to the basic pain threshold, SD rats are randomly divided into blank group, model group, sham operation group and administration group. The KOA model is induced by injecting MIA into the right knee joint of rats. The pain threshold and joint diameter are measured regularly. After 14 days of model establishment, the number and fluorescence intensity of tyrosine kinase A (TrkA) and transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) positive cells in dorsal root ganglia (DRG) are measured. Compared with the model group, helicid can significantly improve the thermal and mechanical pain sensitivity induced by MIA. The TrkA immunofluorescence intensity and the number of TRPV1 positive cells in L4DRG of the administration group were lower than the model group. The results show that helicid can alleviate the pain of KOA in rats, the mechanism of which is related to the inhibition of TrkA-TRPV1 pathway in L4DRG.

Key words: helicid; KOA; pain; TrkA; TRPV1

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的关节进行性、退行性病变, 全世界预估有超过 2 亿的膝骨关节炎患者^[1]。随着我国社会人口结构的老龄化, KOA 患病率也在增加^[2]。KOA 的治疗多

以对症治疗为主, 疼痛是 KOA 的主要临床症状, 也是 KOA 治疗的主要目标之一^[3]。

TrkA-TRPV1(酪氨酸激酶 A-瞬时感受器电位香草酸受体 1)是在疼痛信号的发生和传递过程中的关键通路。在疼痛的传导过程中, 信号由 TrkA 受体传导至作为疼痛发生器的 TRPV1 受体, 最后传导至中枢或再反馈到各种其他受体。TRPV1 等疼痛相关通道主要在 DRG 等神经节中表达。TrkA-TR-

收稿日期: 2020-02-17 接受日期: 2020-08-06

基金项目: 皖南医学院弋矶山医院引进人才专项(YR201913, YR202015); 皖南医学院弋矶山医院科研能力“高峰”培训计划精英项目(GF2019J05, GF2019J06)。

*通信作者 Tel: 86-015922318586; E-mail: jie_shen23@aliyun.com

PV1 在 KOA 的疼痛中起着重要作用^[4,5]。

目前 KOA 的药物治​​疗使用非甾体抗炎药等,但因长期不良反应等原因使临床使用受限^[6]。我国地方性天然药物药用植物及其衍生产物,在治疗慢性及疑难疾病方面具有独特优势,目前天然药用植物及其衍生物用于骨关节炎治疗引起广泛关注^[7,8],如芍药甙、冠盖藤水提物、黄芩素、白藜芦醇、阿魏酸、胡椒碱及豆腐果苷类似物天麻素等。

豆腐果苷(helicid,4-甲酰苯基 β -D-阿咯吡喃糖苷)为我国首次分离鉴定的、天然植物来源的民族药物,结构与天麻素类似,1984 年开始应用于临床治疗神经病理性疼痛及炎性疼痛,效果显著,无成瘾性,无长期毒性,副作用低。本研究旨在探讨豆腐果苷在 KOA 疼痛中的作用,及其是否与 DRG 中 TrkA-TRPV1 信号通路有关。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 80 只,体重为 160~180 g,由上海杰思捷实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2018-0004。饲养环境恒温(22±2℃),自由饮水饮食,饲养环境为 12 h 光照/黑暗循环。所有试验操作均符合皖南医学院动物伦理委员会的批准。

1.2 药物

豆腐果苷(TCI Japan 公司,纯度>98%,批号:QCCYK-GS);单碘乙酸钠(MIA, Sigma-Aldrich, ≥98%,批号:SLBZ7569);水合氯醛(麦克林,AR, >99%,批号:C10147287);戊巴比妥钠(Sigma,批号:20160925);生理盐水(0.9%氯化钠注射液,安徽双鹤药业有限责任公司,批号:1908202B)。

1.3 实验仪器与试剂

50 μ L 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司);Von-Frey 纤维丝(Touch Test,英国);红外热痛测试仪(Biological Reserch Apparatus 21036 Gemonio VA Italy);数显游标卡尺(杭州钢拓工具有限公司);Leica Cryostat 冰冻切片机(CM3000;Nussloch, Germany);TrkA 一抗(兔来源,Abcam ab76291);TRPV1 一抗(兔来源,Abcam ab6166);二抗(抗兔 Abcam ab150078)。

2 实验方法

2.1 造模分组及给药

SD 大鼠按照造模前一天机械痛阈值随机分组:即空白组、KOA 模型组(简称模型组)、假手术组、

KOA 模型+豆腐果苷 50 mg/kg 灌胃给药组(简称给药组)。豆腐果苷目前在抗抑郁和抗神经病理性疼痛中的研究较多。目前尚无豆腐果苷用于治疗骨关节炎的明确报道,无明确的剂量参考。因此本试验中选择在其他模型中都有较好的治疗效果的剂量:50 mg/kg^[9]。

参考 Philpott 等^[10]的造模方法造模:大鼠 10%水合氯醛(3 mL/kg, ip)麻醉后,一次性膝关节腔注射用无菌 0.9%生理盐水溶解的 MIA(60 mg/mL);假手术组大鼠膝关节腔内注射无菌 0.9%生理盐水 50 μ L;空白对照组不做处理。MIA 注射前一天给药,随后每天于 7:30~8:30 灌胃给予豆腐果苷或生理盐水,给药 2 周后处死取 L4 DRG 组织。麻醉前和取组织前均至少禁食 12 h。

2.2 观察指标

2.2.1 机械刺激回缩阈值(PWT)

用 Von-Frey 纤维丝法^[11]进行测定。

将大鼠放在金属筛网上的有机玻璃罩中至少 20 min,然后用 Von-Frey 纤维丝直接刺激大鼠后肢足底中部,持续时间为 3~5 s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,撤除纤维丝后立即缩足也被认为是阳性反应;纤维丝弯曲 90 度无抬足反应为阴性反应。本试验中用的细丝为 0.4~15 g,测定时,力度从 2 g 开始,若出现阳性反应则降低力度,若为阴性反应则加大力度。在第一次出现不同反应后再进行 4 次测量,再根据公式计算 PWT 值,如果观察到对最小克数纤维丝的阳性反应或对最大克数纤维丝的阴性反应,则停止测试 PWT 为最小(0.4 g)或最大值(15 g)。每次测量时间为给药后 4 h 左右。

2.2.2 热刺激回缩潜伏期(PWL)

按 Hargreaves 法^[12]用红外热痛刺激仪照射大鼠足底。照射开始至大鼠出现抬腿回避时为 PWL。红外强度为 55,自动切断时间为 30 s,以防止组织损伤。热刺激强度在整个实验过程中保持一致。每只动物测定 3 次,每次间隔 3 min,取 3 次平均值为大鼠 PWL 值。每次测量时间为给药后 4 h 左右。

2.2.3 关节直径差值

用数字电子卡尺测量膝关节直径,记录左右膝关节直径差值。每次测量时间为 19:00~20:00,造模和处死当天除外。

2.3 组织病理学检测

2.3.1 组织获取

用 1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉大

鼠后,进行心脏灌注,先用 100 mL 0.9% 生理盐水,然后用 300 mL 4% 多聚甲醛(PFA;pH 7.4),灌注后截取大鼠整段腰椎和膝关节。腰椎 PFA 中固定 20 h,分离 L4 DRG,PFA 中固定 24 h,之后在 4 °C 环境下采用 20% 和 30% 蔗糖梯度脱水,OTC 胶包埋,-80 °C 下保存;切片前于-20 °C 中放置 2 h,冰冻切片,切片厚度为 6 μm ,组织切片置 37 °C 温箱孵育 48 h,取出后室温放置 10 min,进行染色或-20 °C 保存。膝关节 PFA 中固定 48 h,解剖、拍照观察后评分。

2.3.2 免疫荧光化学法

组织切片室温放置 10 min;2.5% PBST 打孔 10 min;5% 牛血清 37 °C 孵育 1 h;滴加 TrkA(1:100)或 TRPV1(1:100)抗体,置湿盒 4 °C 24 h;次日 37 °C 恒温箱复温 1 h,滴加二抗(1:500),37 °C 下孵育 2 h;DAPI 染色 8 min;期间均用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min \times 3 次,晾干后滴加抗荧光淬灭剂封片。使用 EWROS 显微镜观察并拍照。未滴加一抗的组织切片作为荧光阴性对照,切片显示没有特异性荧光表达。使用 Image J,测量 DRG 切片中 TrkA、TRPV1 的平均 IntDen 值,并对 DRG 中有 TrkA、TRPV1 表达的细胞进行计数。

2.3.3 关节股骨大体观察评分

大鼠活体观察指标为关节直径差值,病理学观察中大体观察体评分标准如下(0~4 分共 5 级)^[13]:0 分,关节面光滑,色泽如常;1 分,关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2 分,关节面糜烂,软骨侵蚀深达软骨浅中层;3 分,关节面溃疡形成,软骨侵蚀深达软骨深层;4 分,软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

2.4 统计学分析

用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行分析,各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据采用单因素方差分析,数据间的多重比较采用 LSD-t 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 机械刺激回缩阈值(PWT)的变化

3.1.1 各组大鼠早中期(MIA 注射 14 天内)PWT 值变化

膝关节内注射 MIA 后,大鼠 PWT 值明显降低,注射 8 h 后大鼠 PWT 值为:模型组 = 给药组 = 假手术组 < 空白组 = 造模前($P < 0.05$)。假手术组于注射后 1 天恢复为正常状态。MIA 注射 7 天后,给药组 PWT 值于明显高于模型组($P < 0.05$)。空白组造模前后 PWT 值变化无统计学意义($P > 0.05$)。

表明豆腐果苷可以抑制 OA 大鼠的 PWT 值下降,如图 1 所示。

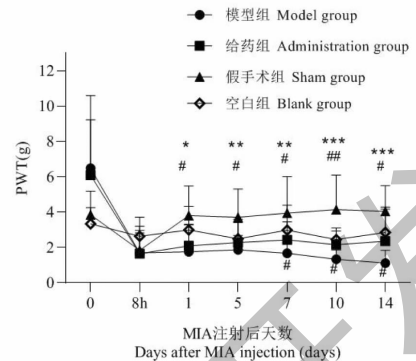


图 1 MIA 注射后 PWT 值变化 ($n = 12$)

Fig. 1 PWT changes after MIA injection ($n = 12$)

注:与模型组相比,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;与给药组相比,### $P < 0.01$,# $P < 0.05$ 。Note:Compared with model group,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;Compared with administration group,### $P < 0.01$,# $P < 0.05$ 。

3.1.2 各组大鼠晚期(MIA 注射 14 天后)PWT 变化

造模后 14 天每组随机处死 6 只大鼠,剩余 6 只大鼠继续观察。MIA 注射 14 天后大鼠 PWT 值变化较小,但给药组 PWT 值始终高于模型组。表明豆腐果苷长期给药对 KOA 的疼痛的抑制作用较为稳定,如图 2 所示。

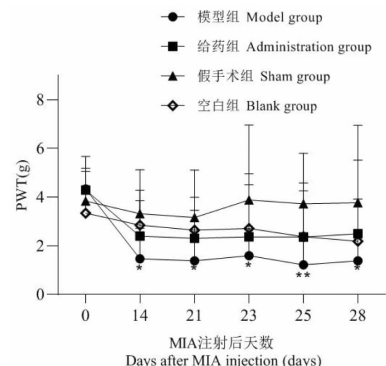


图 2 MIA 注射 14 天后 PWT 值变化 ($n = 6$)

Fig. 2 PWT changes after 14 days of MIA injection ($n = 6$)

注:给药组与模型组相比,给药组 PWT 值高于模型组,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。Note:Compared with the model group,the PWT of the administration group is higher,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

3.2 热刺激回缩潜伏期(PWL)的变化

3.2.1 各组大鼠早中期 PWL 值变化

膝关节注射 MIA 导致大鼠 PWL 值显著降低,产生热痛敏,模型组在注射后 5 天恢复,给药组可以于注射后 1 天提前改善热痛敏($P < 0.05$)。而假手

术组和空白组 PWL 的改变无统计学意义,如图 3 所示。

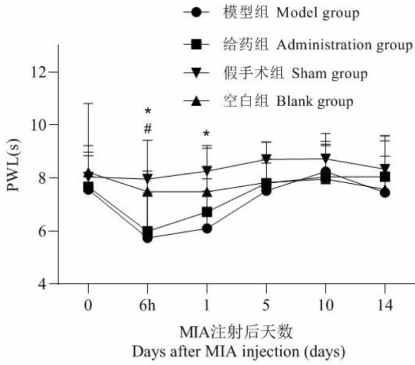


图 3 MIA 注射后 PWL 值变化 (n = 12)

Fig. 3 The changes of PWL value after MIA injection (n = 12)

注:与模型组相比, * P < 0.05; 与给药组相比, # P < 0.05。Note: Compared with model group, * P < 0.05; Compared with administration group, # P < 0.05.

3.2.2 各组大鼠晚期 PWL 值变化

MIA 注射 14 天后,各组大鼠 PWL 值变化无统计学差异,表明在晚期 KOA 模型中大鼠热痛阈值无明显改变,如图 4 所示。

3.3 大鼠关节的改变

3.3.1 各组大鼠关节直径差值变化

关节直径差值为大鼠活体状态下判断造模是否成功的标准之一。MIA 注射后大鼠注射侧膝关节肿胀,关节直径差值显著增加,初步判断模型建立成功。模型组和给药组于 MIA 注射后 3 天关节直径差值缩小,但差值仍大于造模前。如图 5、图 6 所示。

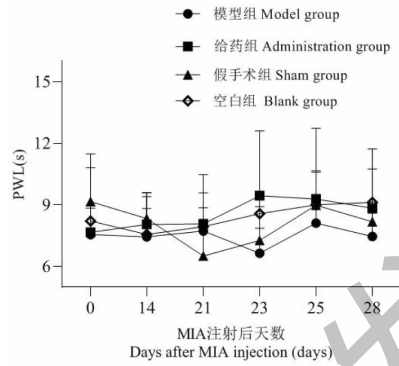


图 4 MIA 注射 14 后 PWL 值变化 (n = 6)

Fig. 4 The changes of PWL value after 14 days of MIA injection (n = 6)

注:各组 PWL 值变化无统计学意义。Note: There is no significant change in PWL.

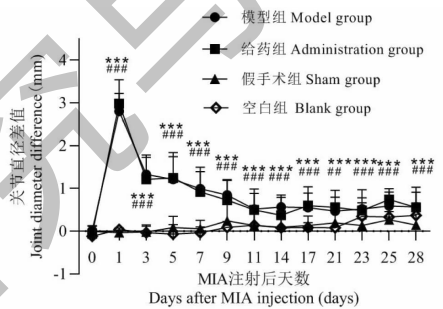


图 5 关节直径差值 (注射侧-非注射侧) (n = 6)

Fig. 5 Knee joint diameter differences (injection side - non injection side) (n = 6)

注:与注射前相比,模型组:*** P < 0.001, 给药组:#### P < 0.001。Note: Compared with before injection, model group: *** P < 0.001; administration group: #### P < 0.001.

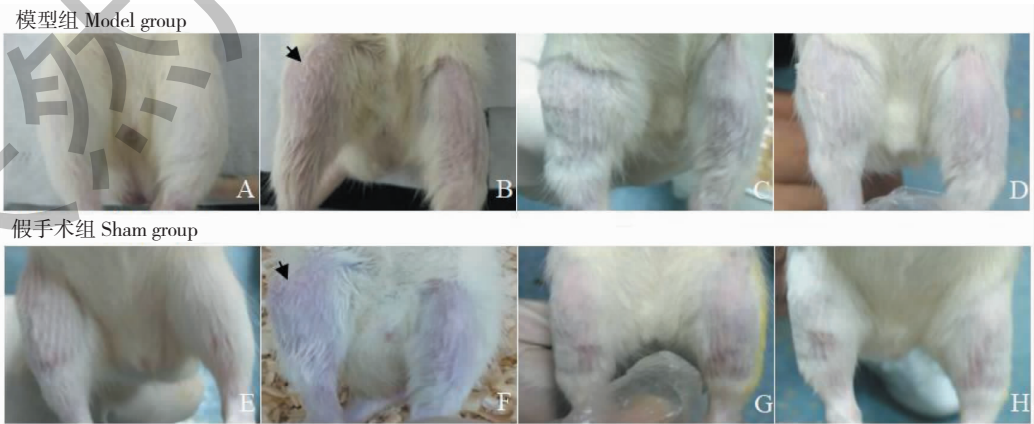


图 6 MIA 注射前后大鼠膝关节照片

Fig. 6 Photos of knee joint of rats before and after MIA injection

注:A 和 E:注射前;B 和 F:注射后;C 和 G:注射后 1 天;D 和 H:注射后 5 天。Note: A and E: Before injection; B and F: After injection; C and G: 1 day after injection; D and H: 5 days after injection.

3.3.2 各组大鼠关节软骨变化情况

MIA 注射 14 天后处死取膝关节,拍照观察 MIA 注射侧膝关节股骨软骨改变。结果表明:空白组膝关节股骨表面光滑,软骨正常;假手术组膝关节股骨基本与空白组相同,仅少数股骨表面颜色略灰;模型

组膝关节股骨软骨异常增厚,表面粗糙,部分糜烂;给药组膝关节股骨软骨增厚,但膝盖表面比模型组光滑。表明豆腐果苷可能可以抑制 OA 模型的股骨软骨改变,如图 7 所示。

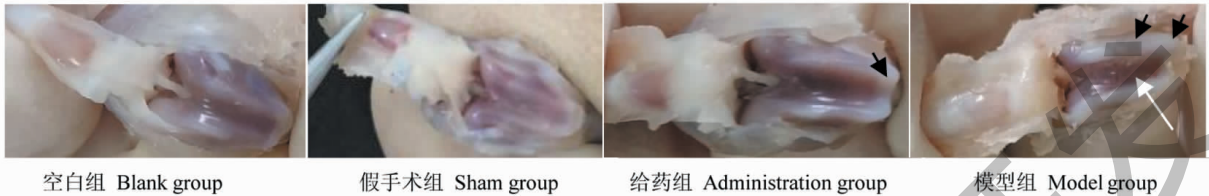


图 7 大鼠膝关节股骨照片

Fig. 7 Photos of femur of rat knee joint

注:如图中箭头所示,给药组膝关节股骨软骨异常增厚;模型组膝关节股骨软骨异常增厚,表面粗糙,部分糜烂。Note: As shown by the arrow in figures, the femoral cartilage of administration group (H) is abnormally thickened; the femoral cartilage of model group is abnormally thickened, with rough surface and partial erosion.

对各组大鼠股骨进行大体观察评分,结果表明与假手术组或空白组相比,模型组和给药组软骨评分都明显升高,结合关节直径差值表明造模成功。其中给药组分值低于模型组,但并未表现出明显的统计学差异($P > 0.05$)。如表 1 所示。

表 1 大鼠股骨软骨大体观察评分表($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 General observation score of femoral cartilage in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	评分 Score
模型组 Model group	2.33 ± 0.82 ***
给药组 Administration group	1.50 ± 0.55 **
假手术组 Sham operation group	0.33 ± 0.52
空白组 Blank group	0

注:与假手术组相比,模型组与给药组评分明显升高,*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, the scores of model group and administration group are significantly higher, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

3.4 大鼠 DRG 组织中 TrkA 的表达情况

MIA 注射后第 14 天行为学评估后处死大鼠,取双侧 L4 DRG 组织。用免疫荧光化学法对组织进行分析。以假手术组作为对照,术侧:模型组中 TrkA 荧光强度增加了 104.05% ($P < 0.01$),给药组增加了 49.20% ($P < 0.01$),但显著低于模型组($P < 0.05$);非术侧:模型组中 TrkA 荧光强度也增加了 48.74% ($P < 0.01$),给药组增加了 21.04%,但是非手术侧的变化差异无统计学意义。结果表明 MIA 膝关节腔内注射不会增加 TrkA 表达的细胞数,但是可使 TrkA 在 DRG 神经元细胞中表达强度增强,豆

腐果苷可以抑制 TrkA 表达增强作用,如图 8,图 9 所示。

3.5 大鼠 DRG 组织中 TRPV1 的表达情况

以假手术组作为对照,TRPV1 荧光强度:模型组增加了 42.39% ($P < 0.05$),给药组增加了 32.49% ($P < 0.05$);与假手术组相比,有 TRPV1 表达的细胞数:模型组增加了 17.56% ($P < 0.05$),给药组与模型组、假手术组之间未呈现统计学意义差距。结果表明 MIA 膝关节腔内注射会增加 TRPV1 的荧光强度和细胞数,豆腐果苷给药可以减少 TRPV1 在 DRG 中表达的细胞数,但是并未显著减少荧光强度的增加,如图 10 所示。

4 讨论

KOA 是常见的关节病变,患病率较高,严重影响患者的生活质量。目前常用的治疗方法为基础治疗、药物治疗和手术治疗。基础治疗一般为控制体重,改变不良生活习惯等,主要为 KOA 初期的改善措施;药物治疗为单独基础治疗无效时使用非甾体抗炎药等对疼痛和关节病变进行治疗;手术治疗常用关节置换术等,用于药物治疗无效的患者。在 KOA 的梯度治疗和个体化治疗中,药物治疗接受程度较高,但是因各种不良反应等目前常用的非甾体抗炎药等无法用于长期治疗^[6]。

根据骨关节炎诊疗指南(2017 版),减轻或消除疼痛是 KOA 的主要治疗目标之一。因此本实验主要对 KOA 引起的疼痛进行了研究,结果表明豆腐果苷 50 mg/kg 可以抑制 KOA 机械痛,作用稳定,但是

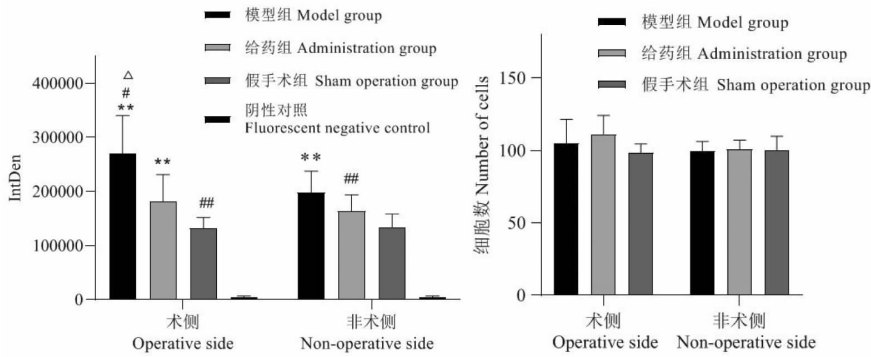


图 8 L4DRG 中 TrkA 的表达 ($n = 6$)

Fig. 8 Expression of TrkA in L4 DRG ($n = 6$)

注: 各组术侧与假手术组相比, $**P < 0.01$; 与给药组相比, $###P < 0.01$, $#P < 0.05$; 与非术侧相比, $\Delta P < 0.05$ 。Note: Compared with the sham group, $**P < 0.01$; Compared with the administration group, $###P < 0.01$, $#P < 0.05$; Compared with the non-operative side, $\Delta P < 0.05$.

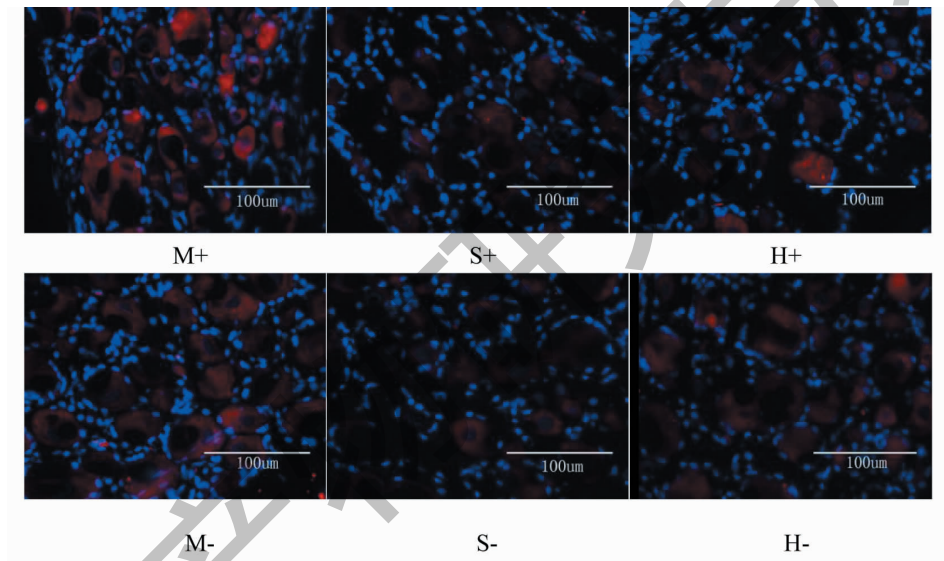


图 9 L4 DRG 中 TrkA 免疫荧光照片 (EnVISION $\times 400$)

Fig. 9 Photos of TrkA immunofluorescence in L4 DRG

注: M+: 模型组手术侧; M-: 模型组非手术侧; S+: 假手术组手术侧; S-: 假手术组非手术侧; H+: 给药组手术侧; H-: 给药组非手术侧。
Note: M+: Operation side of model group; M-: Non-operation side of model group; S+: Operation side of sham operation group; S-: Non-operation side of sham operation group; H+: Operation side of administration group; H-: Non-operation side of administration group.

始终未能使痛敏完全消失, 可能需要改变豆腐果苷剂量, 寻找最佳剂量, 或尝试与其他药物联合使用以增强疗效, 但还有待研究。此外, 豆腐果苷 50 mg/kg 仅对早期 KOA 的热痛有抑制作用, 对中晚期 KOA 大鼠的 PWL 值无明显影响。本试验中 KOA 大鼠仅在早期(造模前 7 天)出现了热痛敏, 而在造模 7 天后热痛敏消失, PWL 值恢复正常, 豆腐果苷并不能提高正常大鼠的热痛敏, 因此对于中晚期 KOA 大鼠的 PWL 值并无升高作用。

NGF-TrkA-TRPV1 信号通路是疼痛信号产生和

传递的关键通路。当 NGF、TrkA、TRPV1 先天性缺陷时, 动物会产生先天性痛觉不敏^[3]。TRPV1 作为疼痛发生器, 主要分布在 DRG 等神经节中, 可以被多种刺激激活, 如物理刺激; IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子表达增加; PI3K、PKC、TrkA 等通道激活等。TRPV1 在 KOA 的慢性疼痛中可以通过 PKC 活化在 DRG 神经元中致敏, 且有研究表明 TRPV1 拮抗剂可以减轻急性炎性关节痛^[14]。因此, TRPV1 也是 KOA 治疗的潜在靶标之一。但是值得思考的是: 单次关节内注射 RTX (树脂毒素, 一种 TRPV1 激动

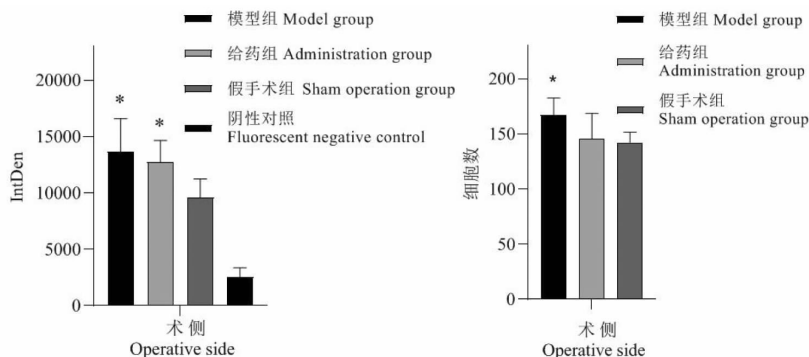


图 10 L4DRG 中 TRPV1 的表达 ($n = 6$)

Fig. 10 Expression of TRPV1 in L4 DRG ($n = 6$)

注:与假手术组相比, $*P < 0.05$ 。Note: Compared with the sham group, $*P < 0.05$.

剂)可以对 KOA 疼痛进行长期缓解^[15],与本实验结果不一致。可能是因为 RTX 持续的刺激使 TRPV1 去磷酸化而产生了脱敏现象(又称为快速耐受)等,从而使疼痛缓解。本试验中使用的关节内给 MIA 并未产生脱敏现象,可能是 MIA 浓度还未达到标准或者是 MIA 本身并无此作用。

TrkA 作为 NGF 的特异性受体可以通过激活 PI3K、PLC 等降低 TRPV1 的开放阈值;激活 p38MAPK 的转录和翻译上调 TRPV1 的表达产生反馈作用,使伤害感受器进一步释放炎症因子而降低痛阈。抑制软骨组织、关节滑膜附近的肥大细胞、滑膜感觉神经元、背根神经节等中的 TrkA 受体作用,都可以抑制 KOA 疼痛。NGF-TrkA 信号的阻断是抑制 KOA 疼痛的有效措施,TrkA 的选择性抑制剂具有缓解 KOA 疼痛的潜力^[16],如 ASP7962、AR786 等,目前已进入临床试验阶段。

神经生长因子(NGF)是骨关节炎(OA)疼痛的主要驱动因素,NGF 抗体是有效的镇痛药^[17],缓解疼痛效果良好持久,但有关节相关的副作用发生,如原发性骨坏死、水肿、肢体感觉异常等,因此 NGF 抗体的使用还有待优化^[18]。

本实验中,豆腐果苷可以抑制 KOA 大鼠 DRG 中 TrkA、TRPV1 的表达水平,是其减轻 KOA 疼痛的机制之一。在疼痛信号的传递过程中 NGF 可以与 TrkA 特异性结合传递疼痛信号,也可与 TRPV1 受体直接结合,因此推测豆腐果苷可能对 NGF 的作用也有一定的抑制,但还需研究进一步验证。

目前有研究^[19]表明豆腐果苷类似物天麻素可

以预防 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,抑制核因子 κ B (NF- κ B) 途径,减少炎症介质(IL-6、TNF- α)的释放,并减少 IL-1 β 处理的软骨细胞中的基质分解代谢,改善 KOA 模型大鼠的软骨退化。豆腐果苷与天麻素结构相似,在治疗神经病理性疼痛和炎症疼痛中机制相似,因此我们推测在 KOA 中,豆腐果苷可能与天麻素有相同的机制,也可以通过抑制炎症介质释放等途径,同时改善 KOA 大鼠的疼痛和软骨退化,对治疗 KOA 产生重要作用,但还有待实验进一步验证。

综上所述,豆腐果苷可以抑制 KOA 疼痛,抑制 TrkA-TRPV1 信号通路为其机制之一。但是豆腐果苷用于 KOA 疼痛的治疗还需要更多的实验进行说明,其具体机制也还需要进一步完善。

致谢:感谢皖南医学院麻醉学实验实训中心和人体解剖教研室提供的仪器和技术支持。

参考文献

- O'Neill TW, McCabe PS, McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018, 32:312-326.
- Wang B, Xin D, Dong SJ, et al. Systematic evaluation of epidemiology and disease burden of knee osteoarthritis in China [J]. Chin J Evid-Based Med(中国循证医学杂志), 2018, 18:134-142.
- Conaghan PG, Gook AD, Hamilton JA, et al. Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15:355-363.
- Sousa-Valente J, Calvo L, Vacca V, et al. Role of TrkA sig-

- nalling and mast cells in the initiation of osteoarthritis pain in the monoiodoacetate model [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2018, 26(1):84-94.
- 5 Ohtsuki T, Shinaoka A, Kumagishi-Shinaoka K, et al. Mechanical strain attenuates cytokine-induced ADAMTS9 expression via transient receptor potential vanilloid type 1 [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383:111556-111566.
- 6 Majeed MH, Sherazi SAA, Bacon D, et al. Pharmacological treatment of pain in osteoarthritis: a descriptive review [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2018, 20(12):88-98.
- 7 Kang YH, Lee HJ, Lee CJ, et al. Natural products as sources of novel drug candidates for the pharmacological management of osteoarthritis: a narrative review [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2019, 27:503-513.
- 8 Ye ZL, Qin LH, Chen XY, et al. Effects of aqueous extract of *Celastrus capillaris* on the expression of COX-2, NO, IOS and the histomorphology of knee osteoarthritis in rats [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2014, 26:1081-1085.
- 9 Zhao N, Yang HJ, Wang YH, et al. Pharmacodynamic evaluation of tofu glycoside on neuropathic pain [J]. *Chin Pharm Comm (中国药理通讯)*, 2005, 22(3):38-39.
- 10 Philpott HT, O'Brien M, McDougall JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis [J]. *Pain*, 2017, 158:2442-2451.
- 11 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- 12 Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1):77-88.
- 13 Zhou K, Luo XM, Zhu MS. Current situation of evaluation methods for rat knee osteoarthritis model [J]. *Rheumat Arthritis (风湿病与关节炎)*, 2015, 4(7):66-69.
- 14 Chakrabarti S, Pattison LA, Singhal K, et al. Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a TRPV1-dependent manner [J]. *Neuropharmacol*, 2018, 143:49-62.
- 15 Iadarola MJ, Sapio MR, Raithel SJ, et al. Long-term pain relief in canine osteoarthritis by a single intra-articular injection of resineratoxin, a potent TRPV1 agonist [J]. *Pain*, 2018, 159:2105-2114.
- 16 Nwosu LN, Mapp PI, Chapman V, et al. Blocking the tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor inhibits pain behaviour in two rat models of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75:1246-1254.
- 17 von Loga IS, El-Turabi A, Jostins L, et al. Active immunisation targeting nerve growth factor attenuates chronic pain behaviour in murine osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78:672-675.
- 18 Schmelz M, Mantyh P, Malfait AM, et al. Nerve-growth-factor antibody for the treatment of osteoarthritis pain and chronic low back pain: mechanism of action in the context of efficacy and safety [J]. *Pain*, 2019, 160:2210-2220.
- 19 Chen J, Gu YT, Xie JJ, et al. Gastrodin reduces IL-1beta-induced apoptosis, inflammation, and matrix catabolism in osteoarthritis chondrocytes and attenuates rat cartilage degeneration in vivo [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:642-651.