

基于 PPAR γ /c-Ski 信号通路探讨蔓荆子黄素 对膝关节炎大鼠滑膜组织纤维化的影响 及其作用机制

胡恩睿, 魏义保, 廖太阳, 刘德仁, 龚子健, 王培民

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要 **目的:**探讨蔓荆子黄素对膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠滑膜组织纤维化的影响及其作用机制。**方法:**将 40 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、低浓度组、高浓度组和拮抗剂组, 每组 8 只。模型组、低浓度组、高浓度组和拮抗剂组大鼠均采用前交叉韧带离断法建立右侧 KOA 模型。造模 14 d 后, 低浓度组和高浓度组大鼠分别按照 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给予蔓荆子黄素灌胃; 拮抗剂组大鼠在给予蔓荆子黄素灌胃的同时, 每日按照 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射 GW9662 溶液; 假手术组、模型组、低浓度组、高浓度组大鼠均每日腹腔注射等体积生理盐水; 连续干预 14 d。干预结束后, 采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量; 采用 HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒分别对大鼠膝关节滑膜组织进行染色, 观察大鼠滑膜炎程度与纤维化程度; 分别采用实时定量 PCR 和 Western Blot 法检测大鼠膝关节滑膜组织中转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**①血清 IL-1 β 和 TNF- α 含量检测结果。模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均高于假手术组($P=0.000, P=0.000$), 低浓度组和高浓度组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均低于模型组(IL-1 β : $P=0.004, P=0.000$; TNF- α : $P=0.000, P=0.000$), 拮抗剂组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均高于高浓度组($P=0.027, P=0.005$)。②膝关节滑膜组织病理学观察结果。模型组大鼠膝关节滑膜组织部分缺损, 衬里层细胞排列不规则, 滑膜细胞大量增生, 炎症细胞浸润明显, 胶原纤维大量沉积; 与模型组相比, 低浓度组、高浓度组大鼠膝关节滑膜组织衬里层细胞排列较为规则, 炎症细胞浸润明显减轻, 胶原纤维沉积减轻; 与高浓度组相比, 拮抗剂组大鼠膝关节滑膜组织炎症细胞浸润更严重, 胶原纤维沉积更多。③滑膜组织纤维化相关基因的 mRNA 和蛋白表达量检测结果。模型组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于假手术组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于模型组(mRNA: $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$; 蛋白: $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于低浓度组($P=0.000, P=0.021, P=0.001; P=0.001, P=0.000, P=0.002$), 拮抗剂组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于高浓度组($P=0.000, P=0.001, P=0.001; P=0.002, P=0.001, P=0.020$)。④滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的 mRNA 和蛋白表达量检测结果。模型组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于假手术组($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), 低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于模型组(mRNA: $P=0.001, P=0.000; P=0.004, P=0.000$; 蛋白: $P=0.001, P=0.000; P=0.004, P=0.000$), 高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白相对表达量均高于低浓度组(mRNA: $P=0.000, P=0.000$; 蛋白: $P=0.049, P=0.000$), 拮抗剂组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白相对表达量均低于高浓度组(mRNA: $P=0.000, P=0.000$; 蛋白: $P=0.000, P=0.000$)。**结论:**蔓荆子黄素能够改善 KOA 大鼠滑膜组织纤维化, 且高浓度蔓荆子黄素比低浓度蔓荆子黄素的改善效果更佳; 其作用机制可能与其能够激活 PPAR γ /c-Ski 信号通路、抑制炎症反应有关。

关键词 骨关节炎; 膝; 滑膜; 纤维化; 蔓荆子; 黄酮醇类; 炎症; 过氧化物酶体增生物激活受体; c-Ski; 信号传导; 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金(82274545); 江苏省医学重点学科和医学重点实验室建设项目(JSDW202252); 江苏省中医院临床医学创新中心发展项目(Y2023zx05)

通讯作者: 王培民 E-mail: drwpm@163.com

Exploring the effects and mechanism of casticin on synovial fibrosis in knee osteoarthritis rats based on the PPAR γ /c-Ski signaling pathway

HU Enrui, WEI Yibao, LIAO Taiyang, LIU Deren, GONG Zijian, WANG Peimin

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of casticin (CAS) on synovial fibrosis in knee osteoarthritis (KOA) rats, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Forty adult male SD rats were randomized into sham-operated group, model group, low-concentration group, high-concentration group, and antagonist group, with 8 ones in each group. All rats but the ones in sham-operated group were modeled by anterior cruciate ligament transection (ACLT) on the right knees for inducing KOA. Fourteen days after successful modeling, the rats in low- and high-concentration groups were intervened by intragastric administration with CAS at doses of 0.2 and 0.4 mg/kg/day, respectively; the ones in antagonist group firstly by intragastric administration with CAS, followed by intraperitoneal injection of GW9662 solution at a dose of 1.0 mg/kg; while the ones in sham-operated group, model group, low-concentration group, and high-concentration group by intraperitoneal injection of the same dose of normal saline every day for consecutive 14 days. After the end of intervention, the serum levels of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected using ELISA kit. After that, the rat knee synovial tissues were harvested and stained with HE staining kit, and Masson staining kit, respectively, to observe the degree of synovial inflammation and fibrosis. Furthermore, the mRNA and protein expression levels of transforming growth factor (TGF)- β , α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , and c-Ski in the knee synovial tissues were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western Blot, respectively. **Results:** ①The serum levels of IL-1 β and TNF- α . The serum levels of IL-1 β and TNF- α were higher in model group compared to sham-operated group ($P=0.000$, $P=0.000$), were lower in low- and high-concentration groups compared to model group (IL-1 β : $P=0.004$, $P=0.000$; TNF- α : $P=0.000$, $P=0.000$), and were higher in antagonist group compared to high-concentration group ($P=0.027$, $P=0.005$). ②The pathological changes in knee synovial tissues. The changes, manifesting as partially defective knee synovial tissues, irregularly arranged lining layer cells, significantly proliferated synovial cells, substantially deposited collagen fibers, and obvious inflammatory cells infiltration, were observed in rats of model group. Compared with that of model group, the knee synovial tissues of rats in low- and high-concentration groups exhibited as more uniformly arranged lining layer cells, marked reduced inflammatory cell infiltration, and decreased collagen fiber deposition. While, compared with that of high-concentration group, the rats in antagonist group presented as more severe inflammatory cell infiltration and more increased collagen fiber deposition. ③The mRNA and protein expression levels of fibrosis-related genes in the knee synovial tissues. The relative mRNA and protein expression levels of TGF- β , α -SMA, and type I collagen in knee the synovial tissues were higher in model group compared to sham-operated group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), were lower in low- and high-concentration groups compared to model group (mRNA: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; protein: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), were lower in high-concentration group compared to low-concentration group ($P=0.000$, $P=0.021$, $P=0.001$; $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.002$), and were higher in antagonist group compared to high-concentration group ($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.001$; $P=0.002$, $P=0.001$, $P=0.020$). ④The mRNA and protein expression levels of PPAR γ /c-Ski signaling pathway-related genes in the knee synovial tissues. The relative mRNA and protein expression levels of PPAR γ and c-Ski in the knee synovial tissues were lower in model group compared to sham-operated group ($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$), were higher in low- and high-concentration groups compared to model group (mRNA: $P=0.001$, $P=0.000$; $P=0.004$, $P=0.000$; protein: $P=0.001$, $P=0.000$; $P=0.004$, $P=0.000$), were higher in high-concentration group compared to low-concentration group (mRNA: $P=0.000$, $P=0.000$; protein: $P=0.049$, $P=0.000$), and were lower in antagonist group compared to high-concentration group (mRNA: $P=0.000$, $P=0.000$; protein: $P=0.000$, $P=0.000$). **Conclusion:** CAS can ameliorate the fibrosis of synovial tissues in KOA rats, and the high-concentration CAS behaves better compared to the low-concentration one. It may work by activating the PPAR γ /c-Ski signaling pathway and inhibiting the inflammatory responses.

Keywords osteoarthritis; knee; synovial membrane; fibrosis; viticis fructus; flavonols; inflammation; peroxisome proliferator-activated receptors; c-Ski; signal transduction; rats

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是常见的关节退行性疾病, 主要病理特征有关节软骨损伤、滑

膜炎症和纤维化、骨赘形成和软骨下骨重塑等^[1-2]。正常的滑膜组织柔软、有弹性, 而 KOA 患者的膝关节

滑膜组织呈现增生和纤维化的病理特征^[3-4]。滑膜组织纤维化会引起膝关节疼痛、肿胀、僵硬,加剧 KOA 进程^[5]。因此,如何抑制滑膜组织的纤维化进程,已成为治疗 KOA 的关键问题之一。蔓荆子黄素是从蔓荆子中提取出来的一种黄酮醇类物质,具有抗炎、抗纤维化等作用^[6-7]。前期研究发现,蔓荆子黄素在改善 KOA 大鼠软骨损伤方面效果显著^[8]。然而,蔓荆子黄素对 KOA 滑膜纤维化的影响及其作用机制尚未明确。为此,我们开展了相关动物实验,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物生产许可证号:SYXK(京)2022-0052]。大鼠均于南京中医药大学实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(苏)2018-0049]饲养,饲养温度(25 ± 2)℃、相对湿度(60 ± 5)%,12 h 明暗交替,自由进食饮水。动物实验方案经南京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:202212A017。

1.2 实验主要试剂

蔓荆子黄素(货号:B20835,上海源叶生物科技有限公司),过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 抑制剂 GW9662(货号:HY-16578,美国 MedChemExpress 公司),HE 染色试剂盒(货号:G1120-100)、Masson 染色试剂盒(货号:G1340)均购自北京索莱宝科技有限公司,白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA 试剂盒(货号:JL18442-48T)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(货号:JL10484-48T)均购自上海江莱生物科技有限公司, RNA 快速提取试剂盒(货号:G3607,武汉赛维尔生物科技有限公司),逆转录试剂盒(货号:R222-01)、PCR 试剂盒(货号:Q331-02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 一抗(货号:3711S)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)一抗(货号:19245S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, I 型胶原一抗(货号:AF7001)、 β -actin 一抗(货号:AF7018)、PPAR γ 一抗(货号:AF6284)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司, c-Ski 一抗(货号:BS-1684R,美国 Thermo Fisher

Science 公司)。

1.3 实验主要仪器

Eclipse E100 型显微镜(日本尼康), ELX800 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司), ABI7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 170-3930 型凝胶电泳及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), LAS4000 型凝胶成像发光系统(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 分组方法

将 40 只大鼠按体重排序编号,从随机数字表中连续抄录 40 个随机数字记录在大鼠编号下方,再将 40 个随机数字从小到大排序,将随机数字排序 1~8 对应的大鼠纳入假手术组、9~16 对应的大鼠纳入模型组、17~24 对应的大鼠纳入低浓度组、25~32 对应的大鼠纳入高浓度组、33~40 对应的大鼠纳入拮抗剂组。

2.2 造模方法

在适应性饲养 1 周后,对模型组、低浓度组、高浓度组和拮抗剂组大鼠采用前交叉韧带离断法建立右侧 KOA 模型^[9]:按照 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,于右侧膝关节处常规备皮消毒,于膝关节内侧切开皮肤和皮下组织,显露膝关节腔,切断前交叉韧带,逐层缝合切口。采用前抽屉实验判断建模是否成功^[10]。假手术组大鼠切开右侧膝关节内侧皮肤及皮下组织,暴露关节腔后缝合。术后常规应用抗生素预防感染。

2.3 干预方法

造模 14 d 后,低浓度组和高浓度组大鼠分别按照 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给予蔓荆子黄素灌胃^[8,11];拮抗剂组大鼠在给予蔓荆子黄素灌胃的同时,每日按照 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射 GW9662 溶液;假手术组、模型组、低浓度组、高浓度组大鼠均每日腹腔注射等体积生理盐水;连续干预 14 d。

2.4 组织样本提取与保存方法

干预结束后,腹腔注射浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,采集腹主动血,静置 1.5 h,于 4°C 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 10 cm),取上清液,于 -80°C 保存备用。采血后采用 CO_2 窒息法处死大鼠,剥离大鼠膝关节,分离滑膜组织。每组随机选择 4 只大鼠的膝关节滑膜组织保存于 4% 多

聚甲醛,另 4 只大鼠的膝关节滑膜组织于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.5 血清炎症因子含量检测方法

取于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的上清液样品,采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量。

2.6 膝关节滑膜组织病理学观察方法

取保存于 4% 多聚甲醛中的大鼠膝关节滑膜组织,石蜡包埋、切片,分别采用 HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒染色,于显微镜下观察大鼠滑膜炎程度与纤维化程度。

2.7 膝关节滑膜组织中纤维化相关基因及 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平检测方法

取于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的膝关节滑膜组织,提取总 RNA,逆转录获得 cDNA 后,采用实时定量 PCR 检测大鼠膝关节滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原、PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 表达水平。以 β -肌动蛋白为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

2.8 膝关节滑膜组织中纤维化相关基因及 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测方法

取于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的膝关节滑膜组织,提取总蛋白,采用 Western Blot 法检测大鼠膝关节滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原、PPAR γ 、c-Ski 的蛋白表达水平。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -肌动蛋白为内参,计算各基因的蛋白相对表达量。

2.9 数据统计方法

采用 SPSS26.0 软件进行数据统计分析,采用 Graphpad Prism8.0 软件绘图。5 组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量,膝关节滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型

胶原、PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 血清炎症因子含量检测结果

5 组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量比较,组间差异均有统计学意义 ($F = 33.091, P = 0.000; F = 134.110, P = 0.000$)。模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均高于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$),低浓度组和高浓度组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均低于模型组 (IL-1 β : $P = 0.004, P = 0.000$; TNF- α : $P = 0.000, P = 0.000$),拮抗剂组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均高于高浓度组 ($P = 0.027, P = 0.005$)。见图 1。

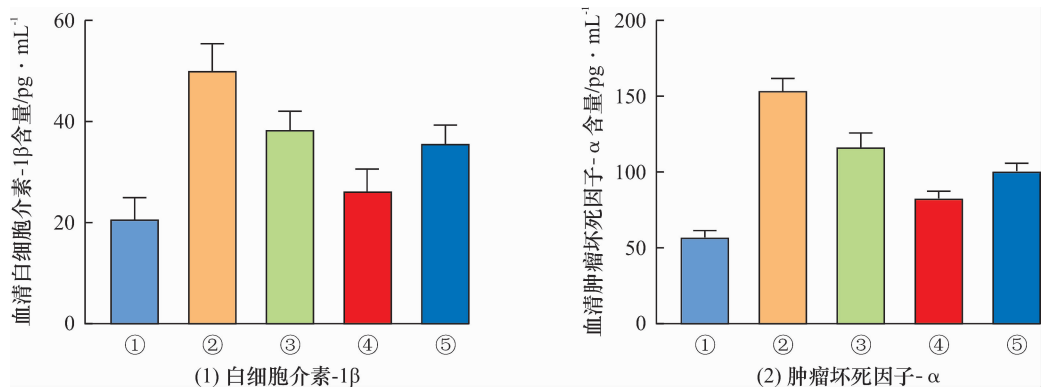
3.2 膝关节滑膜组织病理学观察结果

HE 染色结果显示,假手术组大鼠膝关节滑膜组织衬里层细胞排列规则,滑膜细胞无异常增生或炎症细胞浸润;模型组大鼠膝关节滑膜组织部分缺损,衬里层细胞排列不规则,滑膜细胞大量增生,炎性浸润明显;低浓度组、高浓度组大鼠膝关节滑膜组织相较于模型组,衬里层细胞排列较为规则,炎症细胞浸润明显减轻,且高浓度组改善更明显;拮抗剂组大鼠膝关节滑膜组织相较于高浓度组,炎症细胞浸润更严重 (图 2)。

Masson 染色结果,假手术组大鼠膝关节滑膜组织纤维化程度低;模型组大鼠膝关节滑膜组织胶原纤维大量沉积,纤维化程度高;低浓度组、高浓度组大鼠膝关节滑膜组织与模型组比较,纤维化程度减轻,且高浓度组改善更明显;拮抗剂组大鼠膝关节滑膜组织与高浓度组比较,胶原纤维沉积更多,纤维化程度更高 (图 3)。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列 (5'—3')
转化生长因子- β	上游引物 AGCTGCGCTTGCAGAGATTA
	下游引物 AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
α -平滑肌肌动蛋白	上游引物 TGAGCGTGCTATTCCCTTCG
	下游引物 AGCGTTCGTTTCCAATGGTG
I 型胶原	上游引物 AGCACGTCTGTTTGGAGAG
	下游引物 GACATTAGGCGCAGGAAGGT
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ	上游引物 CTCACAATGCCATCAGGTTT
	下游引物 AGATCAGCAGACTCTGGGTTC
c-Ski	上游引物 CACCAGAACCCCTTACTACG
	下游引物 GCTTTCAACTTCAACCTCGG
β -肌动蛋白	上游引物 GGAAGTGTACTGAGCTGCGTT
	下游引物 CGCCTTCACCGTCCAGTT



①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图 1 5 组大鼠血清白细胞介素-1β 与血清肿瘤坏死因子-α 含量

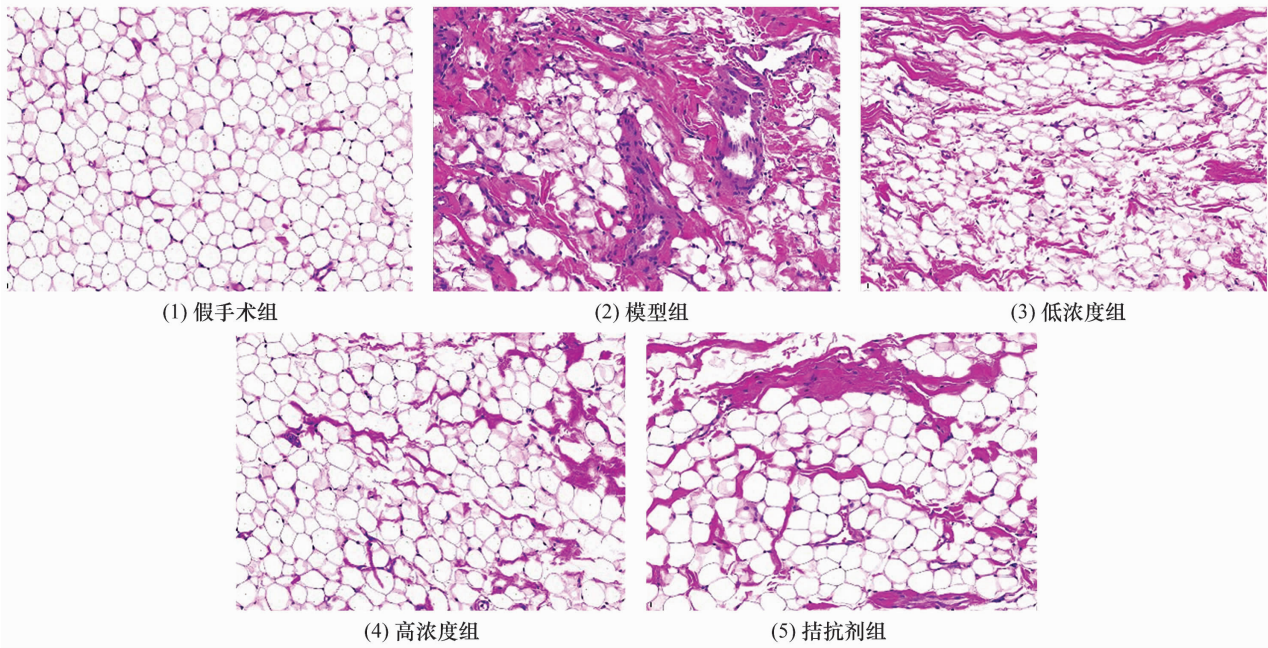


图 2 5 组大鼠膝关节滑膜组织 HE 染色图片 (×100)

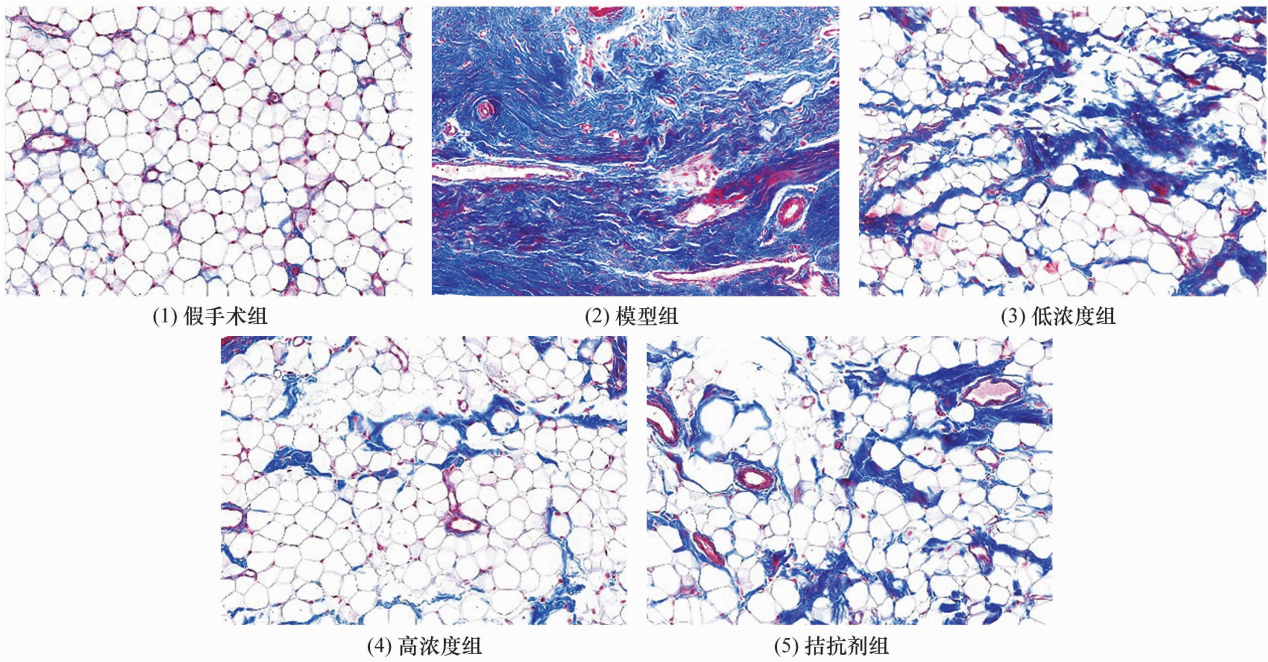


图 3 5 组大鼠膝关节滑膜组织 Masson 染色图片 (×100)

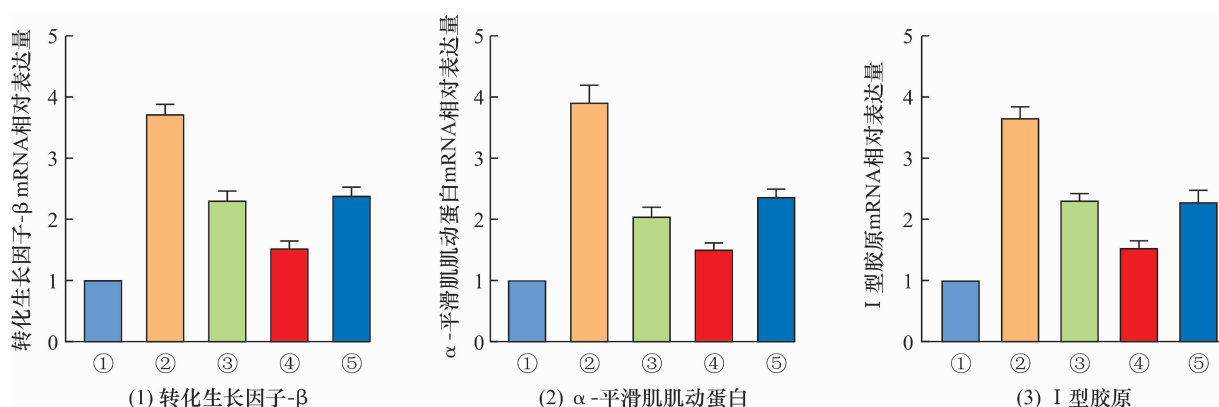
3.3 膝关节滑膜组织中纤维化相关基因的 mRNA 表达水平检测结果

5 组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 相对表达量比较,组间差异均有统计学意义 ($F = 186.143, P = 0.000; F = 118.680, P = 0.000; F = 144.936, P = 0.000$)。模型组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 相对表达量均高于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$),低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 相对表达量均低于模型组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$),高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 相对表达量均低于低浓度组 ($P = 0.000, P = 0.021, P = 0.001$),拮抗剂组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的 mRNA 相对表达量均高于高

浓度组 ($P = 0.000, P = 0.001, P = 0.001$)。见图 4。

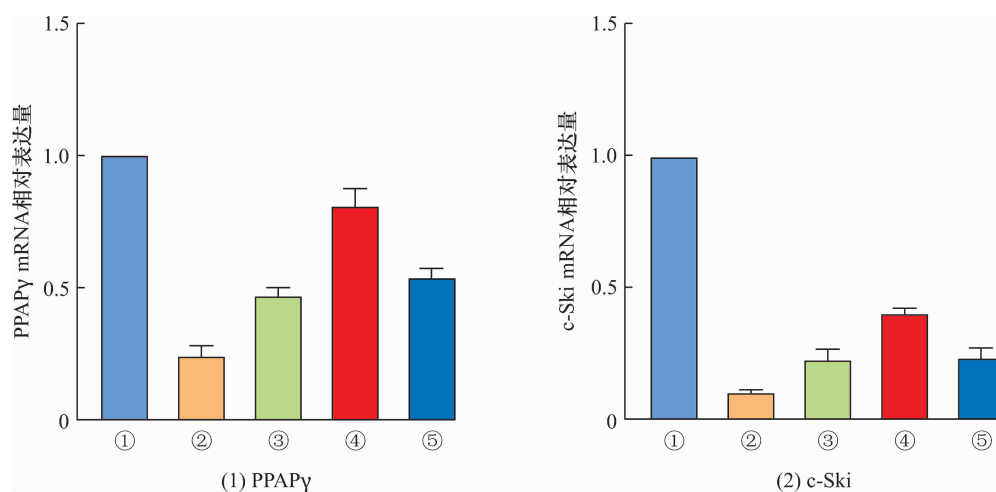
3.4 膝关节滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平检测结果

5 组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 相对表达量比较,组间差异均有统计学意义 ($F = 140.261, P = 0.000; F = 413.558, P = 0.000$)。模型组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 相对表达量均低于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$),低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 相对表达量均高于模型组 ($P = 0.001, P = 0.000; P = 0.004, P = 0.000$),高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 相对表达量均高于低浓度组 ($P = 0.000, P = 0.000$),拮抗剂组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 、c-Ski 的 mRNA 相对表达量均低于高浓度组 ($P = 0.000, P = 0.000$)。见图 5。



①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图4 5组大鼠膝关节滑膜组织中纤维化相关基因的 mRNA 相对表达量



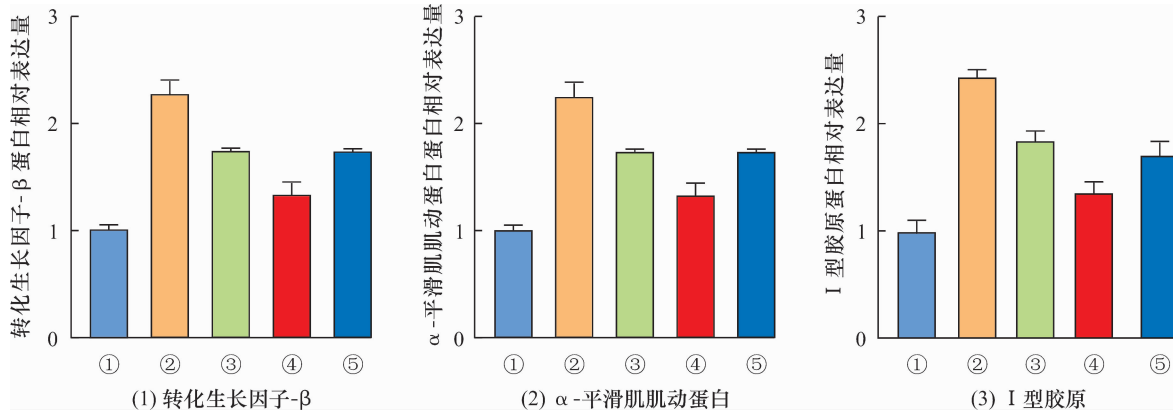
PPAR γ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; ①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图5 5组大鼠膝关节滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的 mRNA 相对表达量

3.5 膝关节滑膜组织中纤维化相关基因的蛋白表达水平检测结果

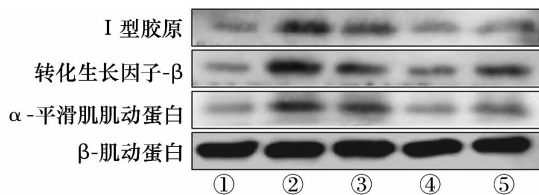
5 组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义 ($F = 85.218, P = 0.000; F = 202.690, P = 0.000; F = 70.818, P = 0.000$)。模型组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白相对表达量均高于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$),低浓度组和高浓

度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白相对表达量均低于模型组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$),高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白相对表达量低于低浓度组 ($P = 0.001, P = 0.000, P = 0.002$),拮抗剂组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白相对表达量均高于高浓度组 ($P = 0.002, P = 0.001, P = 0.020$)。见图 6、图 7。



①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图 6 5 组大鼠膝关节滑膜组织中纤维化相关基因的蛋白相对表达量



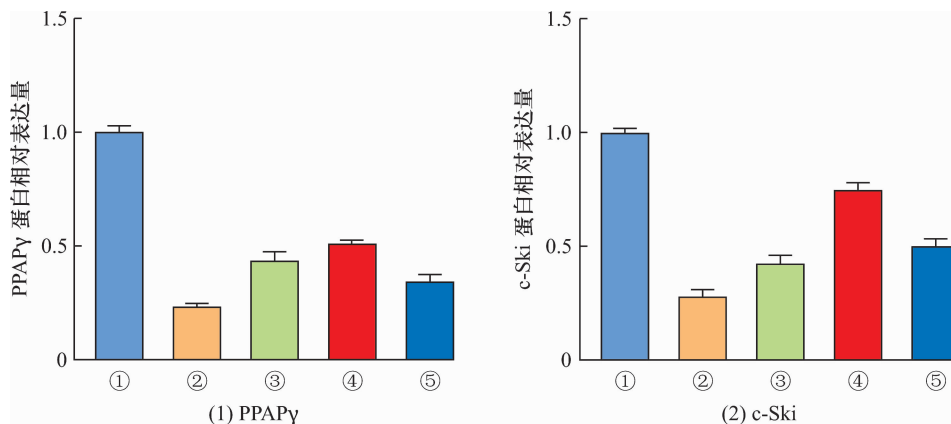
①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图 7 5 组大鼠膝关节滑膜组织中纤维化相关基因的蛋白表达 Western Blot 法检测结果

3.6 膝关节滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果

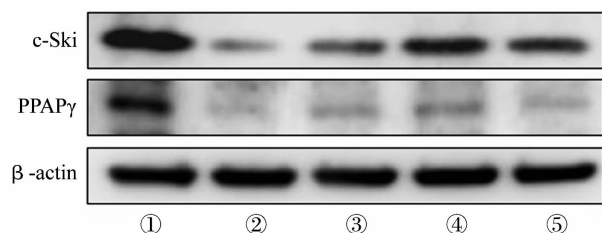
5 组大鼠滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 的蛋白相对

表达量比较,组间差异均有统计学意义 ($F = 334.172, P = 0.000; F = 237.251, P = 0.000$)。模型组大鼠滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 的蛋白相对表达量均低于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$),低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 的蛋白相对表达量均高于模型组 ($P = 0.001, P = 0.000; P = 0.004, P = 0.000$),高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 的蛋白相对表达量均高于低浓度组 ($P = 0.049, P = 0.000$),拮抗剂组大鼠滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 的蛋白相对表达量均低于高浓度组 ($P = 0.000, P = 0.000$)。见图 8、图 9。



PPAR γ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; ①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图 8 5 组大鼠膝关节滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的蛋白相对表达量



PPAR γ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ , β -actin 为 β -肌动蛋白;①为假手术组,②为模型组,③为低浓度组,④为高浓度组,⑤为拮抗剂组。

图 9 5 组大鼠膝关节滑膜组织中 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的蛋白表达 Western Blot 法检测结果

4 讨论

KOA 的发生与关节损伤、退行性变等因素有关^[12]。随着人口老龄化加剧及肥胖群体数量增加, KOA 发病率呈逐年增加趋势, 给社会带来了严重的经济负担^[13-14]。膝关节滑膜组织纤维化是 KOA 研究的重要问题之一。已有研究发现, 炎症诱导滑膜细胞外基质沉积^[15-16]、TGF- β 促进滑膜纤维母细胞的活化和增殖及胶原的合成^[17-18]、巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞的活化^[19]、 α -SMA 的过量表达^[20-21]等均是导致滑膜组织纤维化的可能原因。在机械应力作用下, 滑膜炎会引起成纤维细胞增殖与细胞外基质沉积, 最终导致滑膜内膜增生、滑膜纤维化^[22]。成纤维细胞增殖与细胞外基质沉积是滑膜纤维化的核心环节, 其中细胞外基质沉积会直接破坏滑膜组织的结构与功能^[23]。细胞外基质沉积以胶原沉积为主要表现, 其中 I 型胶原是重要胶原之一, 也是滑膜纤维化的重要标志物之一^[24-25]。相关研究^[26]结果表明, 抑制 TGF- β 的活性能够下调 I 型胶原的表达, 进而缓解滑膜组织纤维化。此外, α -SMA 也是纤维化的重要诱导因子, 在滑膜组织纤维化进程中起重要作用^[27]。因此, TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原等常作为检测纤维化程度的重要标志物^[28]。本研究发现, 模型组大鼠滑膜组织中胶原纤维大量沉积, TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的表达水平显著升高, 而低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中胶原纤维沉积减轻, 且高浓度组减轻更显著, 同时低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原的蛋白表达水平显著降低; 提示蔓荆子黄素在改善 KOA 大鼠滑膜组织纤维化方面效果显著。此外, 低浓度组和高浓度组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 含量均低于模型组, 提示蔓荆子黄素改善 KOA 大鼠滑膜组织纤维化可能与其抑制炎症反应有关。

PPAR γ 是核受体超家族成员, 也是配体依赖性转录因子, 对细胞增殖、细胞外基质重塑等生物过程有重要作用^[29-30]。c-Ski 是 Ski 原癌基因家族成员, 能够通过抑制胶原蛋白的合成和分泌抑制肝、肺、肾等器官的纤维化进程^[31]。相关研究^[32-35]结果表明, c-Ski 是 PPAR γ 的靶基因, PPAR γ 能够上调 c-Ski 表达, 进而缓解纤维化进程。GW9662 是 PPAR γ 的选择性拮抗剂, 其对 PPAR γ 的选择性分别是对 PPAR α 和 PPAR δ 的 10 倍和 1000 倍^[36]。本研究发现, 模型组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 和 c-Ski 的表达水平较假手术组显著降低, 低浓度组和高浓度组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 和 c-Ski 的表达水平较模型组显著升高; 而拮抗剂组大鼠滑膜组织中 PPAR γ 和 c-Ski 的表达水平较高浓度组降低。结合 5 组大鼠滑膜组织中 TGF- β 、 α -SMA、I 型胶原表达情况, 我们认为, 蔓荆子黄素改善 KOA 大鼠滑膜组织纤维化的作用机制可能是蔓荆子黄素激活 PPAR γ /c-Ski 信号通路相关基因的表达, 进而抑制 TGF- β 1、 α -SMA、I 型胶原等纤维化相关基因的表达。

本研究结果表明, 蔓荆子黄素能够改善 KOA 大鼠滑膜组织纤维化, 且高浓度蔓荆子黄素比低浓度蔓荆子黄素的改善效果更佳; 其作用机制可能与其能够激活 PPAR γ /c-Ski 信号通路、抑制炎症反应有关。

参考文献

- [1] PRIETO-ALHAMBRA D, JUDGE A, JAVAID M K, et al. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis; influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(9): 1659 - 1664.
- [2] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745 - 1759.
- [3] LI Z, HUANG Z, BAI L. Cell interplay in osteoarthritis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 720925.
- [4] MATHIESSEN A, CONAGHAN P G. Synovitis in osteoarthritis; current understanding with therapeutic implications [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 18.
- [5] HERRERO-BEAUMONT G, LARGO R. Glucosamine and O-GlcNAcylation: a novel immunometabolic therapeutic target for OA and chronic, low-grade systemic inflammation? [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(10): 1261 - 1263.
- [6] MU Y, HAO W, LI S. Casticin protects against IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 842: 314 - 320.

- [7] ZHOU L, DONG X, WANG L, et al. Casticin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by blocking TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (34): 56267 – 56280.
- [8] LIU D, MEI W, KANG J, et al. Casticin ameliorates osteoarthritic cartilage damage in rats through PI3K/AKT/HIF-1 α signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 391: 110897.
- [9] ZHANG L, LI M, LI X, et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia [J]. *J Adv Res*, 2021, 35: 141 – 151.
- [10] 廖太阳, 马振源, 康俊峰, 等. 基于“柔肝养筋”理论探讨小鼠肝脏来源外泌体对膝关节关节炎模型小鼠膝关节软骨的影响 [J]. *中医正骨*, 2024, 36 (3): 7 – 14.
- [11] LI X, MEI W, HUANG Z, et al. Casticin suppresses monoiodoacetic acid-induced knee osteoarthritis through inhibiting HIF-1 α /NLRP3 inflammasome signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106745.
- [12] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11 (8): 854.
- [13] BROPHY R H, FILLINGHAM Y A. AAOS clinical practice guideline summary: management of osteoarthritis of the knee (nonarthroplasty), third edition [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2022, 30 (9): e721 – e729.
- [14] LONG H, LIU Q, YIN H, et al. Prevalence trends of site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: findings from the global burden of disease study 2019 [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74 (7): 1172 – 1183.
- [15] RIM Y A, JU J H. The role of fibrosis in osteoarthritis progression [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11 (1): 3.
- [16] LIU Q, HAN M, WU Z, et al. DDX5 inhibits hyaline cartilage fibrosis and degradation in osteoarthritis via alternative splicing and G-quadruplex unwinding [J]. *Nat Commun*, 2024, 4 (5): 664 – 680.
- [17] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12 (6): 325 – 338.
- [18] VAN DER KRAAN P M. The changing role of TGF β in healthy, ageing and osteoarthritic joints [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13 (3): 155 – 163.
- [19] DAMERAU A, ROSENOW E, ALKHOORY D, et al. Fibrotic pathways and fibroblast-like synoviocyte phenotypes in osteoarthritis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1385006.
- [20] FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134 (6): 1655 – 1669.
- [21] CHANG X M, CHANG Y, JIA A. Effects of interferon- α on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor- β 1 and α -smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (17): 2634 – 2636.
- [22] DE LANGE-BROKAAR B J, IOAN-FACSINAY A, VAN OSCH G J, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20 (12): 1484 – 1499.
- [23] SRIWATANANUKULKIT O, DESCLAUX S, TAWONSAWATRUK T, et al. Effectiveness of losartan on infrapatellar fat pad/synovial fibrosis and pain behavior in the monoiodoacetate-induced rat model of osteoarthritis pain [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114121.
- [24] REMST D F, BLANEY DAVIDSON E N, VAN DER KRAAN P M. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54 (11): 1954 – 1963.
- [25] REMST D F, BLANEY DAVIDSON E N, VITTERS E L, et al. Osteoarthritis-related fibrosis is associated with both elevated pyridinoline cross-link formation and lysyl hydroxylase 2b expression [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21 (1): 157 – 164.
- [26] ZHANG L, XING R, HUANG Z, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 684389.
- [27] CUNNINGTON R H, NAZARI M, DIXON I M. c-Ski, Smurf2, and Arkadia as regulators of TGF- β signaling: new targets for managing myofibroblast function and cardiac fibrosis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87 (10): 764 – 772.
- [28] 刘德仁, 廖太阳, 魏义保, 等. 基于 PI3K/AKT/HIF-1 α 信号通路研究易层敷贴缓解 TGF- β 1 诱导的膝关节大鼠滑膜纤维化的机制 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39 (8): 738 – 745.
- [29] ABDELHADY R, CAVALU S, SABER S, et al. Mirtazapine, an atypical antidepressant, mitigates lung fibrosis by suppressing NLRP3 inflammasome and fibrosis-related mediators in endotracheal bleomycin rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114553.
- [30] LUAN Z L, ZHANG C, MING W H, et al. Nuclear receptors in renal health and disease [J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103855.

- [14] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5):52-53.
- [15] 梅伟,谷远洋,曹子丰,等. 周福胎教授治疗痛风性关节炎临床经验[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(7): 85-87.
- [16] 中华中医药学会. 膝关节炎中西医结合诊疗指南(2023 年版)[J]. 中医正骨, 2023, 35(6):1-10.
- [17] MARIANO A, DI SOTTO A, LEOPIZZI M, et al. Antiarthritic effects of a root extract from harpagophytum procumbens DC: novel insights into the molecular mechanisms and possible bioactive phytochemicals[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2545.
- [18] WU K C, WENG H K, HSU Y S, et al. Aqueous extract of arctium lappa L. root (burdock) enhances chondrogenesis in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1):364.
- [19] 吴鹏,单进军,黄正泉,等. 丁公藤对大鼠膝关节炎滑膜炎及痛阈的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6):837-841.
- [20] 王培民. 王培民效方治验——膝痹宁方[J]. 江苏中医药, 2021, 53(2):5-6.
- [21] 康俊峰,茆军,揭立士,等. 王培民教授从寒湿致病探讨膝关节炎病机及辨治经验[J]. 现代中医药, 2025, 45(2):72-76.
- [22] KOIVISTO A P, BELVISI M G, GAUDET R, et al. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(1): 41-59.
- [23] DAHMANI D, TAIK F Z, BERRICHI I, et al. Impact of central sensitization on pain, disability and psychological distress in patients with knee osteoarthritis and chronic low back pain[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2023, 24(1): 877.
- [24] LIANG H Y, YIN H X, LI S F, et al. Calcium-permeable channels cooperation for rheumatoid arthritis: therapeutic opportunities[J]. Biomolecules, 2022, 12(10):1383.
- [25] ZHOU Y S, CUI Y, ZHENG J X, et al. Luteolin relieves lung cancer-induced bone pain by inhibiting NLRP3 inflammasomes and glial activation in the spinal dorsal horn in mice[J]. Phytomedicine, 2022, 96:153910.
- [26] WEN L, TANG L, ZHANG M, et al. Gallic acid alleviates visceral pain and depression via inhibition of P2X7 Receptor[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11):6159.
- [27] ZHANG D, JING B, CHEN Z N, et al. Ferulic acid alleviates sciatica by inhibiting neuroinflammation and promoting nerve repair via the TLR4/NF- κ B pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(4):1000-1011.
- [28] 曹子丰,梅伟,张立,等. 膝痹宁 II 方内服治疗寒湿痹阻型膝关节炎临床疗效的回顾性队列研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14):122-129.
- [29] 廖太阳,马振源,邢润麟,等. 膝痹宁 II 方对膝关节炎软骨细胞铁死亡及 Nr2f2/GPX4 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(10):5182-5188.
- [30] 张力,黄正泉,李晓辰,等. 膝痹宁对膝关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 29-32.
- [31] 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 滑膜炎的效应机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1):68-72.
- [32] MATTA C, TAKÁCS R, DUCZA L, et al. Ion channels involved in inflammation and pain in osteoarthritis and related musculoskeletal disorders[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 325(1):C257-C271.

(收稿日期:2024-12-30 本文编辑:时红磊)

(上接第 19 页)

- [31] MIRZA A Z, ALTHAGAFI I I, SHAMSHAD H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications[J]. Eur J Med Chem, 2019, 166:502-513.
- [32] WANG J, GUO L, SHEN D, et al. The role of c-SKI in regulation of TGF β -induced human cardiac fibroblast proliferation and ECM protein expression[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(7):1911-1920.
- [33] 李工博,李军,曾益军,等. PPAR γ 对 TGF β /smad 信号通路阻遏子 c-Ski 的上调作用[J]. 生理学报, 2011, 63(1):62-68.
- [34] 康毅,罗伟生,黄红,等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠模型 PPAR γ /c-Ski 表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(1):106-111.
- [35] WANG F, FAN K, ZHAO Y, et al. Apigenin attenuates TGF- β 1-stimulated cardiac fibroblast differentiation and extracellular matrix production by targeting miR-155-5p/c-Ski/Smad pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113195.
- [36] BAUMANN A, BURGER K, BRANDT A, et al. GW9662, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist, attenuates the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Metabolism, 2022, 133:155233.

(收稿日期:2025-01-17 本文编辑:吕宁)