

· 基础研究 ·

基于“柔肝养筋”理论探讨小鼠肝脏来源外泌体对膝关节炎模型小鼠膝关节软骨的影响

廖太阳, 马振源, 康俊峰, 杨楠, 王培民, 邢润麟

(江苏省中医院, 江苏 南京 210029)

摘 要 **目的:**基于“柔肝养筋”理论探讨小鼠肝脏来源外泌体对膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型小鼠膝关节软骨的影响。**方法:**以超速离心法从 3 月龄(年轻)和 22 月龄(老年)C57BL/6 雄性小鼠肝脏提取外泌体。将 48 只 7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 4 组, 每组 12 只。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组小鼠采用前交叉韧带横断术进行 KOA 造模, Sham 组小鼠接受手术但不离断前交叉韧带。术后 14 d 开始, 向 Young-EVs 组和 Aged-EVs 组小鼠膝关节腔分别注射 10 μ L 年轻和老年小鼠肝脏来源外泌体, 每周 2 次, 连续注射 4 周; Sham 组和 KOA 组用同样方法向膝关节腔注射 10 μ L PBS 溶液。外泌体干预结束后, 对各组小鼠造模侧膝关节进行 X 线检查; 苏木精-伊红染色和番红 O-固绿染色后进行组织病理学观察, 并采用国际骨关节炎研究协会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)骨关节炎软骨组织病理学评价系统及 Mankin 病理评分系统评价小鼠软骨退变程度; 免疫组化法检测软骨组织中 II 型胶原蛋白(collagen II, COL II)、聚集蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)13 和一种具有血小板反应蛋白基序的去整合素和金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)5 表达量。**结果:**①小鼠膝关节 X 线检查结果。Sham 组小鼠膝关节间隙正常, 关节面平整光滑, 软骨完整, 关节边缘无骨赘形成, Kellgren-Lawrence 分级为 0 级; KOA 组小鼠膝关节间隙未见明显狭窄, 关节面粗糙, 软骨出现部分缺损, 关节边缘可见明显骨赘形成, Kellgren-Lawrence 分级为 II 级; Young-EVs 组小鼠膝关节间隙轻微变窄, 关节表面稍有粗糙表现, 软骨缺损较 KOA 组减少, 关节边缘可见轻微骨赘形成, Kellgren-Lawrence 分级为 I 级; Aged-EVs 组小鼠膝关节间隙、关节表面粗糙程度、软骨缺损情况、关节内游离体数量较 KOA 组更为严重, Kellgren-Lawrence 分级为 III 级。②小鼠膝关节软骨组织病理学观察结果。4 组小鼠膝关节软骨 OARSI 评分和 Mankin 评分组间总体比较, 差异均有统计学意义[OARSI 评分: (0.417 \pm 0.376) 分, (4.500 \pm 0.632) 分, (2.417 \pm 0.492) 分, (5.417 \pm 0.492) 分, $F=116.800$, $P=0.000$; Mankin 评分: (1.083 \pm 0.665) 分, (7.250 \pm 0.880) 分, (3.583 \pm 0.917) 分, (8.833 \pm 0.683) 分, $F=117.100$, $P=0.000$]。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均高于 Sham 组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); Young-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均低于 KOA 组($P=0.000$, $P=0.000$); Aged-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均高于 KOA 组、Young-EVs 组($P=0.025$, $P=0.000$; $P=0.015$, $P=0.000$)。③小鼠膝关节软骨组织免疫组织化学检测结果。4 组小鼠膝关节软骨中 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比组间总体比较, 差异均有统计学意义[COL II: (40.050 \pm 2.324)%, (26.083 \pm 1.119)%, (23.317 \pm 2.599)%, (16.717 \pm 2.479)%, $F=118.500$, $P=0.000$; ACAN: (51.500 \pm 3.191)%, (17.700 \pm 3.415)%, (19.383 \pm 3.924)%, (12.300 \pm 1.908)%, $F=185.500$, $P=0.000$]。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比均低于 Sham 组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); Young-EVs 组与 KOA 组 COL II、ACAN 阳性表达面积比的组间差异均无统计学意义($P=0.167$, $P=0.799$); Aged-EVs 组的 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比均低于 KOA 组、Young-EVs 组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.039$, $P=0.005$)。4 组 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比组间总体比较, 差异均有统计学意义[MMP13: (11.733 \pm 2.191)%, (46.150 \pm 6.237)%, (34.417 \pm 5.027)%, (57.233 \pm 4.049)%, $F=106.600$, $P=0.000$; ADAMTS5: (7.950 \pm 1.344)%, (30.533 \pm 6.184)%, (22.083 \pm 3.418)%, (39.317 \pm 5.606)%, $F=51.450$, $P=0.000$]。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均高于 Sham 组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); Young-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均低于 KOA 组($P=0.002$, $P=0.021$); Aged-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均高于 KOA 组、Young-EVs 组($P=0.003$, $P=0.000$; $P=0.016$, $P=0.000$)。**结论:**小鼠肝脏来源外泌体可能参与软骨细胞合成及分解代谢反应; 其中老年小鼠肝脏来源外泌体可加速细胞外基质降解、减少聚集蛋白聚

基金项目: 国家自然科学基金项目(81804123); 江苏省第六期“333 人才”培养资助项目(第三层次青年人才项目); 江苏省中医药科技发展计划青年人才项目(QN202210); 南京中医药大学自然科学基金项目(XZR2020005); 江苏省中医院高峰学术人才项目(Y2021rc39); 江苏省医学重点学科和医学重点实验室建设项目(JSDW202252)

通讯作者: 邢润麟 E-mail: xingrunlin@126.com

糖合成,加剧 KOA 小鼠软骨退变;而年轻小鼠肝脏来源外泌体可抑制软骨细胞外基质降解,保护 KOA 小鼠软骨。

关键词 外泌体;软骨;骨关节炎,膝;小鼠;动物实验

Effects of hepatocyte-derived exosomes from mice on knee cartilage of model mice with knee osteoarthritis: a softening liver and nourishing tendons theory-based experimental study

LIAO Taiyang, MA Zhenyuan, KANG Junfeng, YANG Nan, WANG Peimin, XING Runlin

Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effects of hepatocyte-derived exosomes (HDEs) from mice on knee cartilage of model mice with knee osteoarthritis (KOA) based on softening liver and nourishing tendons theory. **Methods:** The exosomes were isolated and extracted from the livers of young (3-month-old) and aged (22-month-old) male C57BL/6 mice by using ultracentrifugation. Forty-eight 7-week-old specific pathogen free (SPF)-grade male C57BL/6J mice were randomized into KOA group, Young-EVs group, Aged-EVs group and Sham group, 12 ones in each group. The mice in KOA group, Young-EVs group and Aged-EVs group were subjected to anterior cruciate ligament (ACL) transection for inducing KOA; while the ones in Sham group only underwent surgery, but without transecting ACL. At postoperative day 14 after the modeling, the mice in Young-EVs group and Aged-EVs group were intervened by knee intra-articular injection of 10 μ L HDEs extracted from young and aged mice, respectively, two times a week for consecutive 4 weeks; while the ones in Sham group and KOA group with 10 μ L phosphate buffered saline (PBS) solution. After the end of intervention, the knee joints of the modeling side in mice of each group were checked by X-ray scanning, and were evaluated by Kellgren-Lawrence (K-L) grading system. After the end of X-ray examination, the knees were harvested from mice of each group, and the knee tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and safranin O-fast green (SO-FG) for observing the histopathological changes; meanwhile, the degree of knee articular cartilage degeneration was evaluated by using Osteoarthritis Research Society International (OARSI) osteoarthritis cartilage histopathology assessment system and Mankin scoring system. Furthermore, the expression levels of collagen II (COL II), aggrecan (ACAN), matrix metalloproteinase (MMP) 13 and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) 5 in knee cartilage tissues were detected by using immunohistochemistry (IHC). **Results:** ①The results of X-ray examination showed that the mice in Sham group presented with normal knee joint space, smooth articular surface, and intact cartilage, and no osteophyte was observed at the margin of knee joint. The K-L classification belonged to grade 0. The changes, manifesting as rough articular surface, partially defective cartilage and definite osteophytes at the margin of knee joint, were observed, while, the marked knee joint space narrowing (JSN) were unobserved in mice of KOA group. The K-L classification belonged to grade II. The slight JSN, slightly rough articular surface, defective cartilage (decreased compared to KOA group), and small osteophytes at the margin of knee joint were observed in mice of Young-EVs group. The K-L classification belonged to grade I. Compared to KOA group, the changes, including knee joint space, articular surface roughness, cartilage defects, and the number of free bodies within the joint, were more severe in mice of Aged-EVs group. The K-L classification belonged to grade III. ②There was statistical difference in OARSI score and Mankin score between the 4 groups (OARSI score: 0.417 ± 0.376 , 4.500 ± 0.632 , 2.417 ± 0.492 , 5.417 ± 0.492 points, $F = 116.800$, $P = 0.000$; Mankin score: 1.083 ± 0.665 , 7.250 ± 0.880 , 3.583 ± 0.917 , 8.833 ± 0.683 points, $F = 117.100$, $P = 0.000$). The OARSI score and Mankin score were higher in KOA group, Young-EVs group and Aged-EVs group compared to Sham group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), and were higher in KOA group compared to Young-EVs group ($P = 0.000$, $P = 0.000$), and were highest in Aged-EVs group ($P = 0.025$, $P = 0.000$; $P = 0.015$, $P = 0.000$). ③There was statistical difference in the positive expression area ratios of COL II and ACAN in knee cartilage between the 4 groups (COL II: 40.050 ± 2.324 , 26.083 ± 1.119 , 23.317 ± 2.599 , $16.717 \pm 2.479\%$, $F = 118.500$, $P = 0.000$; ACAN: 51.500 ± 3.191 , 17.700 ± 3.415 , 19.383 ± 3.924 , $12.300 \pm 1.908\%$, $F = 185.500$, $P = 0.000$). The positive expression area ratios of COL II and ACAN were lower in KOA group, Young-EVs group and Aged-EVs group compared to Sham group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), and were lower in Aged-EVs group compared to KOA group and Young-EVs group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.039$, $P = 0.005$), while, the comparison between Young-EVs group and KOA group revealed no significant differences ($P = 0.167$, $P = 0.799$). There was statistical difference in the positive expression area ratios of MMP13 and ADAMTS5 in knee cartilage between the 4 groups (MMP13: 11.733 ± 2.191 , 46.150 ± 6.237 , 34.417 ± 5.027 , $57.233 \pm 4.049\%$, $F = 106.600$, $P = 0.000$; ADAMTS5: 7.950 ± 1.344 , 30.533 ± 6.184 , 22.083 ± 3.418 , $39.317 \pm 5.606\%$, $F = 51.450$, $P = 0.000$). The positive expression area ratios of MMP13 and ADAMTS5 were higher in KOA group,

Young-EVs group and Aged-EVs group compared to Sham group ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in KOA group compared to Young-EVs group ($P = 0.002, P = 0.021$), and were highest in Aged-EVs group ($P = 0.003, P = 0.000; P = 0.016, P = 0.000$). **Conclusion:** The mice HDEs may be involved in the synthesis and catabolic reactions of chondrocytes, among which HDEs from the aged mice can accelerate the degradation of extracellular matrix and reduce the synthesis of ACAN, thereby exacerbating the cartilage degeneration in KOA mice; whereas the ones from the young mice can inhibit the degradation of cartilage extracellular matrix, thus exerting the effect of protecting cartilage in KOA mice.

Keywords exosomes; cartilage; osteoarthritis, knee; mice; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是常见的退行性骨关节疾病, 相关调查显示其发病率和致残率均仅次于心脑血管疾病, 居全疾病谱第 2 位^[1]。调查显示, 2010—2019 年 KOA 全球发病率增加了 27.5%^[2]。随着人口老龄化进程的加剧及 KOA 本身发病的年轻化趋势, 该病已成为全球性公共健康面临的严峻挑战。依据“筋骨共病、痿痹共存”的证候特点, KOA 应归属于中医“痹证”“骨痹”“筋痹”等范畴^[3]。在长期的临床实践中, 历代中医骨伤科医家积累了大量确有疗效的 KOA 辨治经验, 其中以“肝主筋”“膝为筋府”“柔肝养筋”为逻辑闭环所构建的辨治体系, 以及一系列具有“柔肝养筋”作用的中药 (如赤芍、白芍、当归、木瓜等) 和方剂 (如桂芍知母汤、四物汤、补肝汤等) 的临床疗效, 均获得了不同时代、不同地域医家的认可^[4-5]。

KOA 是一种与衰老密切相关的骨关节病变。深入研究肝脏衰老对 KOA 膝关节软骨的影响, 可能是揭示“柔肝养筋”治膝理论作用原理的关键, 相应的研究结果也可能是防治 KOA 极具价值的潜在靶点^[6]。本课题组前期通过细胞实验证实, 肝细胞外泌体是肝-软骨细胞间通讯的参与者, 而白芍等柔肝养筋类中药的药效作用与之密切相关^[7-8]。本研究拟在前期研究基础上, 进一步探索肝脏来源外泌体对 KOA 软骨的影响, 以期进一步阐释中医“肝主筋”“膝为筋府”“柔肝养筋”的治膝理论, 丰富其现代科学内涵。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 48 只, 体质量 22 ~ 25 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (苏) 2018 - 0008], 在南京中医药大学实验动物中心 [实验许可证号: SYXK (苏) 2018 - 0049] SPF 级动物房适应性饲养 1 周后开始实验。3 月龄 SPF 级 C57BL/6 雄性年轻小鼠 3 只, 体质量 25 ~ 28 g, 22 月龄 SPF 级 C57BL/6 雄性老年

小鼠 3 只, 体质量 42 ~ 45 g, 均购自苏州西山生物技术有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (沪) 2018 - 0005], 直接用于肝脏来源外泌体提取。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: 202302A077。

1.2 实验药物及试剂

苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色液、番红 O-固绿 (safranin O-fast green, SO-FG) 染色液 (武汉谷歌, 货号: G1005、G1031); 免疫组织化学检测试剂盒 (DAKO, 货号: PN0016); 兔源基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 13 抗体 (Protenitech, 货号: 18165-1-AP); 兔源一种具有血小板反应蛋白基序的去整合素和金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) 5 抗体 (武汉博士德, 货号: A02802-1); 兔源 II 型胶原蛋白 (collagen II, COL II) 抗体、兔源聚集蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN) 抗体 (Affinity, 货号: AF0135、DF7561); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (APExBIO, 货号: K1223); 青霉素钠 (华北制药, 货号: F0112104)。

1.3 实验仪器

EM UC6 型超薄切片机 (Leica); ECLIPSE CI 型正置光学显微镜、DS-U3 型成像系统 (Nikon); Optima L-90K 型超速离心机 (Beckman); 便携式 X 线成像仪 (深圳奥龙医疗); ImageQuant LAS-4000 型化学发光成像分析仪 (GE); JEM-1230 型透射电子显微镜 (JEOL); EpPlus 增强型电泳仪 (上海羿圣); ZetaView 型纳米颗粒追踪分析仪 (Particle Metrix)。

2 方法

2.1 小鼠肝脏来源外泌体制备及鉴定

2.1.1 小鼠肝脏来源外泌体制备 将 SPF 级 C57BL/6 雄性年轻及老年小鼠腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 仰卧位固定, 剪开腹部皮肤, 暴露腹腔。向上翻开暴露肝门静脉及下腔静脉,

在下腔静脉处缓慢灌入预热好的 D-Hanks 溶液,再剪开肝门静脉,直至没有血液冲出。剪下肝脏组织置于 100 mm 培养皿中,以 D-Hanks 溶液冲洗 2 遍,剪成约 1 mm^3 大小的组织碎片,置于 15 mL 离心管中,加入 0.2% IV 型胶原酶,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 轻微震荡消化 2~3 h,待细胞悬液呈乳浊状后加入等量含 10% 无外泌体血清的 DMEM 培养基终止消化。室温下 $300\times\text{g}$ 离心 10 min、 $2000\times\text{g}$ 离心 10 min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\,000\times\text{g}$ 离心 30 min,使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤器过滤上清液转移至超滤离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $100\,000\times\text{g}$ 离心 2 h,小心吸出上清液,用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 重悬沉淀。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $100\,000\times\text{g}$ 离心 2 h,加入预冷 100 μL PBS 重悬底部沉淀, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.1.2 小鼠肝脏来源外泌体鉴定 通过透射电镜观察、纳米颗粒跟踪分析和 CD9、CD63、CD81 蛋白检测鉴定小鼠肝脏来源外泌体,具体操作步骤参考本课题组前期研究^[7],其中蛋白检测以提取外泌体后的肝组织为对照组。

2.2 年轻/老年小鼠肝脏来源外泌体对 KOA 模型小鼠膝关节软骨损伤的作用观察

2.2.1 动物分组 将 48 只 C57BL/6J 雄性小鼠称重后按体质量排序编号,从随机数字表中选取 48 个连续 2 位数记录在小鼠编号下方,再将 48 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1~12 对应的小鼠纳入 Sham 组、13~24 对应的小鼠纳入 KOA 组、25~36 对应的小鼠纳入 Young-EVs 组、37~48 对应的小鼠纳入 Aged-EVs 组。

2.2.2 造模及干预 采用前交叉韧带横断术进行 KOA 造模,具体方法如下:腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,膝关节备皮、消毒,Sham 组不切断前交叉韧带,其余各组经膝前正中切口切开,并沿内侧打关节囊,过伸膝关节使髌骨向外侧脱位,屈曲膝关节,找到前交叉韧带并切断;伸直膝关节,复位髌骨,逐层缝合关闭切口。前抽屉试验阳性表明手术造模成功。术后连续注射 4 d 青霉素钠预防切口感染。术后 14 d 开始,使用微量注射器向 Young-EVs 组和 Aged-EVs 组小鼠膝关节腔分别注射 10 μL 年轻和老年小鼠肝脏来源外泌体,每周 2 次,连续注射 4 周,注射完毕后屈伸膝关节若干次,以便外泌体均匀分布于关节腔中;Sham 组和 KOA 组用同样方法向膝关节腔注射 10 μL PBS 溶液。

2.2.3 小鼠膝关节 X 线检查 外泌体干预结束后,各组小鼠均于麻醉状态下标记数字后进行造模侧膝关节 X 线检查,并采用 Kellgren-Lawrence 分级系统^[9]评价。

2.2.4 小鼠膝关节软骨组织病理学观察 X 线检查结束后,取小鼠膝关节,经固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡和包埋处理后制成厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片,HE 染色及 SO-FG 染色后于显微镜下观察并采集图像,采用国际骨关节炎研究协会 (Osteoarthritis Research Society International, OARSI) 骨关节炎软骨组织病理学评价系统^[10]及 Mankin 病理评分系统^[11]评价小鼠软骨退变程度,以平均值作为评分结果。

2.2.5 小鼠膝关节软骨组织免疫组化检测 取小鼠软骨组织石蜡切片,经烘片、脱蜡、抗原修复、血清封闭处理后,加入 MMP13、ADAMTS5、COL II、ACAN 抗体孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、显色剂,经复染、脱水、封片,于显微镜下观察小鼠膝关节软骨组织中 MMP13、ADAMTS5、COL II、ACAN 表达情况,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行定量分析。

2.3 数据统计

采用 SPSS25.0 软件进行数据统计分析,4 组小鼠 OARSI 评分、Mankin 评分及小鼠软骨组织中 COL II、ACAN、MMP13、ADAMTS5 阳性表达面积比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 小鼠肝脏来源外泌体鉴定结果

透射电镜下小鼠肝脏来源外泌体呈圆盘状,中间凹陷,边缘可见双层膜结构[图 1(1)]。粒径分析显示肝外泌体粒径为 30~120 nm,代表性粒径富集于 110 nm,外泌体颗粒物浓度为 $3.7\times 10^6\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ [图 1(2)]。以年轻小鼠外泌体(外泌体组)为代表,选用提取外泌体后的肝组织作为对照(对照组),检测 3 种外泌体蛋白标记物(CD9、CD63、CD81)表达量,结果显示与对照组相比,外泌体组 3 种外泌体蛋白标记物表达量均明显升高[图 1(3)]。

3.2 小鼠膝关节 X 线检查结果

Sham 组小鼠膝关节关节间隙正常,关节面平整光滑,软骨完整,关节边缘无骨赘形成, Kellgren-Lawrence 分级为 0 级[图 2(1)];KOA 组小鼠膝关节

间隙未见明显狭窄,关节面粗糙,软骨出现部分缺损,关节边缘可见明显骨赘形成,Kellgren-Lawrence 分级为Ⅱ级[图 2(2)];Young-EVs 组小鼠膝关节间隙轻微变窄,关节表面稍有粗糙表现,软骨缺损较 KOA 组减少,关节边缘可见轻微骨赘形成,Kellgren-Lawrence 分级为Ⅰ级[图 2(3)];Aged-EVs 组小鼠膝关节间隙、关节表面粗糙程度、软骨缺损情况、关节内游离体数量较 KOA 组更为严重,Kellgren-Lawrence 分级为Ⅲ级[图 2(4)]。

3.3 小鼠膝关节软骨组织病理学观察结果

Sham 组小鼠软骨表面平滑完整、无毛糙,各层结构连续、清晰,潮线完整,软骨下骨未损伤,软骨细胞排列有序,未见炎症细胞簇集,HE 染色、SO-FG 染色均匀[图 3(1)、图 4(1)];KOA 组出现明显的软骨破坏病理表现,表面毛糙,潮线部分中断,部分损伤直达软骨下骨,软骨细胞排列紊乱,局部出现炎症细胞簇

集,软骨层基质淡染[图 3(2)、图 4(2)];Young-EVs 组软骨较 KOA 组软骨表面平滑,但仍有少部分毛糙,潮线层次清晰,软骨细胞排列较为整齐,炎症细胞浸润减少[图 3(3)、图 4(3)];Aged-EVs 组软骨结构破坏最为严重,可见大面积软骨破坏甚至纤维化,软骨厚度变薄,潮线中断严重,部分裂隙深达软骨下骨[图 3(4)、图 4(4)]。4 组小鼠膝关节软骨 OARSI 评分和 Mankin 评分组间总体比较,差异均有统计学意义。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均高于 Sham 组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$);Young-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均低于 KOA 组($P = 0.000, P = 0.000$);Aged-EVs 组的 OARSI 评分和 Mankin 评分均高于 KOA 组、Young-EVs 组($P = 0.025, P = 0.000; P = 0.015, P = 0.000$)。见表 1。

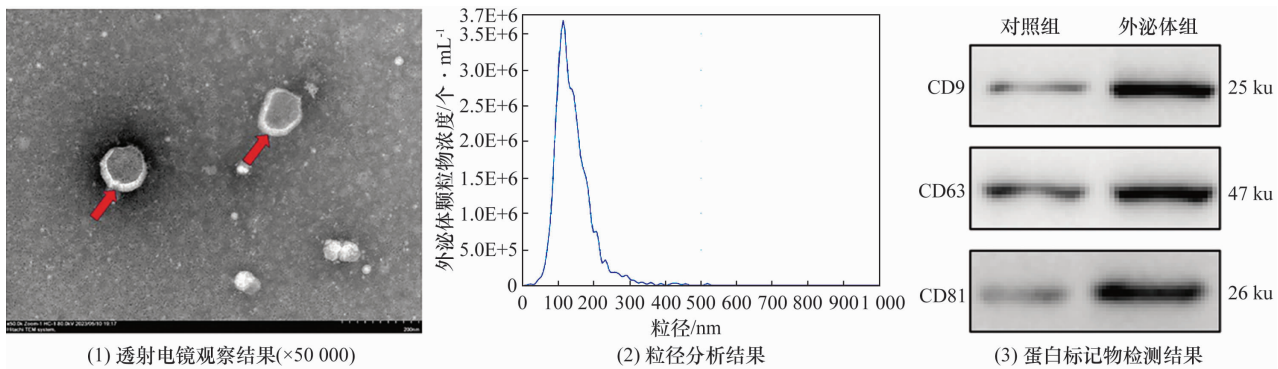


图 1 小鼠肝脏来源外泌体鉴定结果

注:图 1(1)红色箭头指示处即为肝脏来源外泌体。



图 2 4 组小鼠膝关节 X 线片

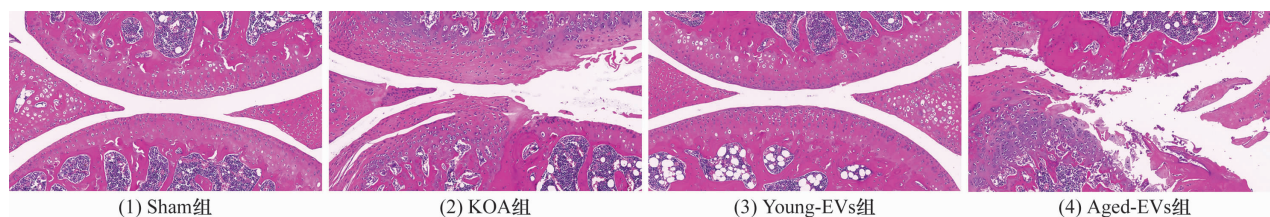


图 3 4 组小鼠膝关节软骨组织苏木精-伊红染色结果(×200)

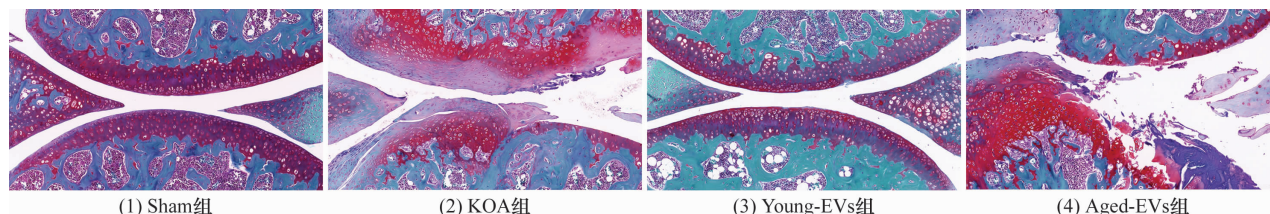


图 4 4 组小鼠膝关节软骨组织番红 O-固绿染色结果(×200)

表 1 4 组小鼠膝关节软骨 OARSI 评分和 Mankin 评分

组别	样本量/只	OARSI ¹⁾ 评分/($\bar{x} \pm s$, 分)	Mankin 评分/($\bar{x} \pm s$, 分)
Sham 组	6	0.417 ± 0.376	1.083 ± 0.665
KOA 组	6	4.500 ± 0.632	7.250 ± 0.880
Young-EVs 组	6	2.417 ± 0.492	3.583 ± 0.917
Aged-EVs 组	6	5.417 ± 0.492	8.833 ± 0.683
<i>F</i> 值		116.800	117.100
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:1) 为国际骨关节炎研究协会。

3.4 小鼠膝关节软骨组织免疫组化检测结果

4 组小鼠膝关节软骨中 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比组间总体比较,差异均有统计学意义。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比均低于 Sham 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); Young-EVs 组与 KOA 组 COL II、ACAN 阳性表达面积比的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.167, P = 0.799$); Aged-EVs 组的 COL II 和 ACAN 阳性表达面积比均低于 KOA 组、Young-EVs 组 ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.039, P = 0.005$)。见图 5、图 6、表 2。

4 组小鼠膝关节软骨中 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比组间总体比较,差异均有统计学意义。KOA 组、Young-EVs 组及 Aged-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均高于 Sham 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); Young-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均低于 KOA 组 ($P = 0.002, P = 0.021$); Aged-EVs 组的 MMP13 和 ADAMTS5 阳性表达面积比均高于 KOA 组、Young-EVs 组 ($P = 0.003, P = 0.000; P = 0.016, P = 0.000$)。见图 7、图 8、表 2。

4 讨论

KOA 是中老年人群最常见的骨伤科退行性疾病,以膝关节疼痛、肿胀、畸形、功能障碍为主要临床表现,后期整个关节活动能力的丧失将严重降低患者生活质量^[3]。KOA 的发病机制至今未能明确,滑膜炎、软骨退变、软骨下骨病变等均被认为可能是病情进展的始动因素^[12-13]。但这些因素均与衰老关系密切,如衰老的慢性炎症状态、衰老引起的软骨组织结构改变、衰老相关的软骨下骨骨质疏松等^[6]。衰老和 KOA 之间的具体联系机制,有可能是揭示 KOA 病理机制的关键钥匙。

中医典籍中既往并无“膝骨关节炎”的病名,但根据症状,可将其归入“痹证”“膝痹”等范畴进行辨治。基于“肝主筋”“膝为筋府”的脏腑相关理念,以“柔肝养筋”“柔肝缓急”“缓急止痛”为代表的 KOA 治法理念,在临床上获得了广泛的应用和认可。具有柔肝养筋作用的中药及汤剂在临床的大量应用,均证实了中医这一独特治膝理念的优势^[14-15]。中医学对于“肝”的朴素认识,不仅包括最基础和原始的脏腑解剖概念,也包括以肝脏为中心,又与胆、胰腺甚至脾等脏器密切相关的功能概念^[16]。中医学认为,肝血充盈、肝

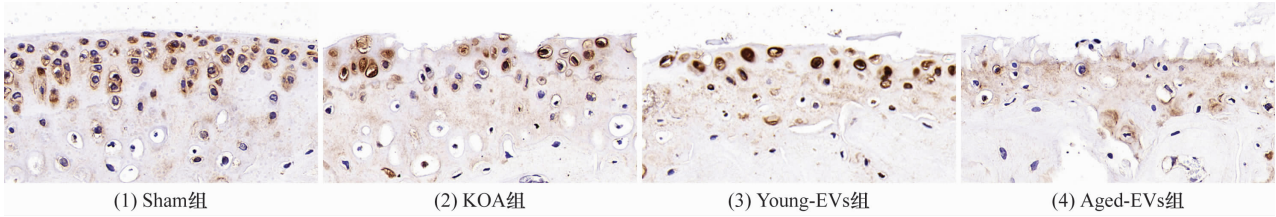


图 5 4 组小鼠膝关节软骨组织聚集蛋白聚糖免疫组化染色结果(×1000)

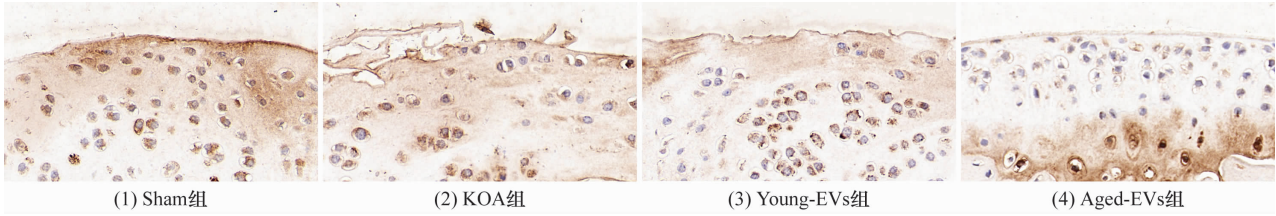


图 6 4 组小鼠膝关节软骨组织Ⅱ型胶原蛋白免疫组化染色结果(×1000)

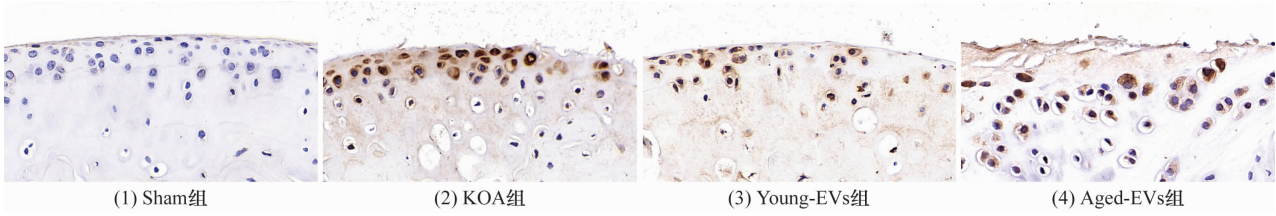


图 7 4 组小鼠膝关节软骨组织基质金属蛋白酶 13 免疫组化染色结果(×1000)

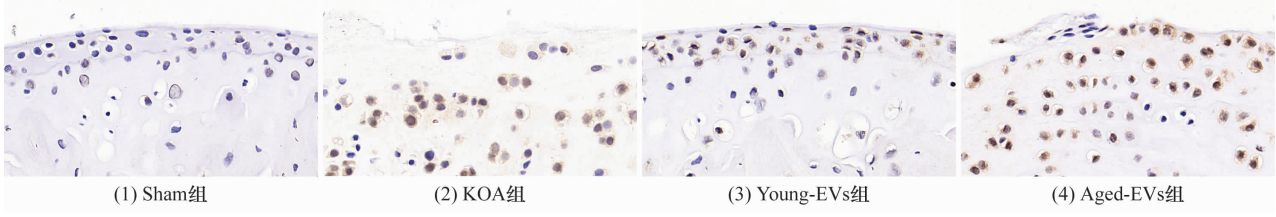


图 8 4 组小鼠膝关节软骨组织一种具有血小板反应蛋白基序的去整合素和金属蛋白酶 5 免疫组化染色结果(×1000)

表 2 4 组小鼠膝关节软骨组织中 COLⅡ、ACAN、MMP13、ADAMTS5 阳性表达面积比

组别	样本量/ 只	COLⅡ ¹⁾ / ($\bar{x} \pm s, \%$)	ACAN ²⁾ / ($\bar{x} \pm s, \%$)	MMP13 ³⁾ / ($\bar{x} \pm s, \%$)	ADAMTS5 ⁴⁾ / ($\bar{x} \pm s, \%$)
Sham 组	6	40.050 ± 2.324	51.500 ± 3.191	11.733 ± 2.191	7.950 ± 1.344
KOA 组	6	26.083 ± 1.119	17.700 ± 3.415	46.150 ± 6.237	30.533 ± 6.184
Young-EVs 组	6	23.317 ± 2.599	19.383 ± 3.924	34.417 ± 5.027	22.083 ± 3.418
Aged-EVs 组	6	16.717 ± 2.479	12.300 ± 1.908	57.233 ± 4.049	39.317 ± 5.606
F 值		118.500	185.500	106.600	51.450
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)为Ⅱ型胶原蛋白,2)为聚集蛋白聚糖,3)为基质金属蛋白酶 13,4)为一种具有血小板反应蛋白基序的去整合素和金属蛋白酶 5。

气条达,则充足的气血能够正常输布、濡养筋脉,使其柔顺有力,即关节功能正常的骨正筋柔状态。膝关节的骨正筋柔,软骨下骨的结构稳固、支撑功能可靠,软骨、韧带、滑膜、肌肉、肌腱等则得以有效附着,充分发挥其“束骨利机关”的功能,确保膝关节的稳定^[17-18]。肝的藏血功能不足,或是疏泄功能失调,则影响周身筋脉濡养,引起膝部诸筋退变,出现拘挛疼痛、活动障碍等表现。这是中医学对膝关节病变与肝脏功能相

关性的认识^[19-21]。

在中医学概念中,衰老与肝的联系独特而紧密。《灵枢·天年》即已记载了中医对于人体衰老过程,脏腑衰老先后顺序的观察,并认为肝是最先发生衰老的脏腑:“五十岁,肝气始衰,肝叶始薄,胆汁始灭减,目始不明。六十岁,心气始衰,苦忧悲,血气懈堕,故好卧。七十岁,脾气虚,皮肤枯。八十岁,肺气衰,魄离,故言善误。九十岁,肾气焦,四藏经脉空虚。百岁,五

脏皆虚,神气皆去,形骸独居而终矣。”^[22]伴随着“肝气始衰”,肝血濡养功能减退、肝主疏泄功能异常,筋脉无法获得充分的濡养^[6]。“人老膝先老”是中医学对“肝气始衰”与 KOA 之间联系的朴素认识。KOA 作为一类骨关节退行性疾病,与衰老关系密切。深入研究肝脏衰老对 KOA 膝关节软骨的影响,可能是揭示“柔肝养筋”治膝理论作用原理的关键。

本课题组前期研究^[7-8]证实了肝细胞外泌体在肝-软骨两个不同系统的细胞通讯中的作用,并观察到白芍等柔肝养筋类药物的药效作用与之密切相关。以此为基础,本研究观察到年轻小鼠肝脏来源外泌体可改善 KOA 模型小鼠的膝关节退变程度,减少 MMP13、ADAMTS5 表达,但是对 COL II、ACAN 的表达无影响。另一方面,老年小鼠肝脏来源外泌体能加重 KOA 模型小鼠的软骨病理变化,增加 MMP13、ADAMTS5 表达,减少 COL II、ACAN 表达。COL II 和 ACAN 是软骨细胞外基质的主要成分,前者可形成纤维网络结构使软骨具有抗张强度,后者主要维持软骨的弹性和黏度,二者对于维持软骨的结构完整与功能正常十分重要^[23]。ADAMTS 和 MMP13 被认为是 KOA 软骨破坏的关键因子,二者可通过介导多种胶原蛋白及各种基质蛋白质降解,加速软骨退变^[24]。来自年轻和老年小鼠肝脏外泌体的作用,初步验证了肝细胞衰老对于软骨组织的影响,也揭示了 KOA 一个新的潜在干预靶点。

综上所述,小鼠肝脏来源外泌体可能参与软骨细胞合成及分解代谢反应;其中老年小鼠肝脏来源外泌体可加速细胞外基质降解、减少聚集蛋白聚糖合成,加剧 KOA 小鼠软骨退变;而年轻小鼠肝脏来源外泌体可抑制软骨细胞外基质降解,保护 KOA 小鼠软骨。本实验对于从现代医学角度部分阐释中医“柔肝养筋”理论,丰富其理论内涵具有一定价值。但本研究也存在一些不足之处:众所周知,拥有纳米级结构的外泌体可穿过生物屏障,将其内容物(如蛋白质、miRNA、mRNA 等)递送到靶细胞中,激活靶细胞内信号通路,进而影响靶细胞的生物学功能,然而本实验未探究年轻肝脏来源外泌体和老年肝脏来源外泌体对于软骨造成不同影响的原因和潜在机制,推测这可能与外泌体差异内容物有关,这也是本团队目前正在着手的研究,以期揭示其背后的分子机制。

参考文献

- [1] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2021, 384(1): 51-59.
- [2] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [3] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.
- [4] 施彦龙, 李应福, 谢兴文, 等. 基于“肝主筋, 肾主骨”理论探讨膝骨关节炎的中医治疗[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(11): 56-59.
- [5] 周晓红. 从肝论治针灸对 OA 模型大鼠软骨损伤的效应机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [6] 王玉芳. 肝与衰老的理论研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2006.
- [7] 廖太阳, 李晓辰, 张力, 等. 基于柔肝养筋理论研究肝外泌体减少膝骨关节炎软骨凋亡及木瓜的疗效机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(10): 6031-6036.
- [8] 张力, 李晓辰, 廖太阳, 等. 衰老表型肝细胞外泌体对脂多糖致炎软骨细胞的影响及白芍的干预效应[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(5): 702-708.
- [9] KELLGREN J H, LAWRENCE J S. Radiological assessment of osteo-arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4): 494-502.
- [10] PRITZKER K P, GAY S, JIMENEZ S A, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(1): 13-29.
- [11] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3): 523-537.
- [12] 贾笛, 韦佳佳, 段修权, 等. 基于全球视角的中国骨关节炎疾病负担分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(13): 2312-2316.
- [13] HE L, XU Z, NIU X, et al. GPRC5B protects osteoarthritis by regulation of autophagy signaling[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(7): 2976-2989.
- [14] SHEN P, SERVE S, WU P, et al. NOS inhibition reverses TLR2-induced chondrocyte dysfunction and attenuates age-related osteoarthritis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(29): e2207993120.

(下转第 22 页)

- tosis in bladder cancer cells by downregulating FTH1 [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11 (12): 4045 – 4054.
- [4] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42 (1): 88 – 96.
- [5] XING D, GAO H, LIU Z, et al. Baicalin inhibits inflammatory responses to interleukin-1 β stimulation in human chondrocytes [J]. J Interferon Cytokine Res, 2017, 37 (9): 398 – 405.
- [6] HE J, HE J. Baicalin mitigated IL-1 β -Induced osteoarthritis chondrocytes damage through activating mitophagy [J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101 (6): 1322 – 1334.
- [7] CHEN X, LIU J, SUN Y, et al. Correlation analysis of differentially expressed long non-coding RNA HOTAIR with PTEN/PI3K/AKT pathway and inflammation in patients with osteoarthritis and the effect of baicalin intervention [J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18 (1): 34.
- [8] ZHENG M, LI R G, SONG J, et al. Hippo-YAP signaling maintains sinoatrial node homeostasis [J]. Circulation, 2022, 146 (22): 1694 – 1711.
- [9] 邓新超, 钱亮, 邹曼. 藏红花素调节 Hippo-YAP 信号通路抑制膝关节炎大鼠软骨细胞凋亡 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29 (4): 538 – 543.
- [10] 曾智, 李浩, 王晓旭, 等. 罗汉果皂苷 VI 对膝关节炎大鼠模型的治疗作用及其机制探讨 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38 (9): 804 – 809.
- [11] 孙标, 邓翠翠, 王加, 等. 黄芩苷对大鼠类风湿性关节炎软骨损伤的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38 (7): 1440 – 1446.
- [12] HAO X, ZHAO J, JIA L, et al. XMU-MP-1 attenuates osteoarthritis via inhibiting cartilage degradation and chondrocyte apoptosis [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 998077.
- [13] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53 (3): 523 – 537.
- [14] SHEN Y, MALIK S A, AMIR M, et al. Decreased hepatocyte autophagy leads to synergistic IL-1 β and TNF mouse liver injury and inflammation [J]. Hepatology, 2020, 72 (2): 595 – 608.
- [15] AMELI F, GHAFOURINA NASSAB F, MASIR N, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) expression in benign and malignant breast lesions [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22 (8): 2603 – 2609.
- [16] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax [J]. Clin Exp Reprod Med, 2020, 47 (3): 155 – 160.
- [17] YANG S, CHEN L, WANG Z, et al. Neutrophil extracellular traps induce abdominal aortic aneurysm formation by promoting the synthetic and proinflammatory smooth muscle cell phenotype via Hippo-YAP pathway [J]. Transl Res, 2023, 255: 85 – 96.
- [18] DENG Y, LU J, LI W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B regulates osteoarthritic cartilage degradation [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 4564.
- [19] CUI Y, MIAO M Z, WANG M, et al. Yes-associated protein nuclear translocation promotes anabolic activity in human articular chondrocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2023, 31 (8): 1078 – 1090.
- [20] SU S, JIANG W, WANG X, et al. Resolvin D1 inhibits the proliferation of osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes through the Hippo-YAP signaling pathway [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2022, 23 (1): 149.

(收稿日期: 2023-12-26 本文编辑: 吕宁)

(上接第 14 页)

- [15] 王一方, 孙实, 赵新杰, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的“桂枝-白芍”药对治疗骨关节炎的潜在作用机制研究 [J]. 中医临床研究, 2022, 14 (25): 7 – 12.
- [16] 刘晓峰, 邢士新, 任锡禄, 等. 从肝论治绝经后膝关节关节炎探析 [J]. 河北中医, 2020, 42 (6): 945 – 947.
- [17] 刘晓培, 夏婧, 王志红. 肝为“罢极之本”的研究进展 [J]. 四川中医, 2016, 34 (3): 209 – 212.
- [18] 邢金丽, 张秋云, 王天芳, 等. 肝藏血理论探讨 [J]. 中医药导报, 2014, 20 (4): 1 – 4.
- [19] 谢有琼, 彭锐, 周晓红. 从肝论治针灸调控 Bmal1 介导 ERK1/2 抑制大鼠 OA 模型炎症的机制 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (8): 2033 – 2037.
- [20] 陆嘉柯, 陈佳俊, 张小宁, 等. 从肝论治膝骨性关节炎研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2022, 57 (1): 74 – 75.
- [21] 张喜芬, 梅晓云. 肝脾与运动关系的中医研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21 (3): 202 – 204.
- [22] 张觉人, 刘静, 丁念. 《灵枢·天年》篇研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2019.
- [23] 廖太阳, 张力, 杨楠, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路研究膝痹宁方对膝关节炎模型大鼠的改善作用机制 [J]. 中国药房, 2023, 34 (1): 23 – 28.
- [24] MALEMUD C J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 33 – 40.

(收稿日期: 2023-09-03 本文编辑: 李晓乐)