

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research贝母素乙通过 ADAMTS-5 调控 PPAR γ /c-SKI
信号通路影响大鼠膝骨关节炎的研究Research on knee osteoarthritis rats by regulating the PPAR γ /c-SKI
signaling pathway by ADAMTS-5陈红涛^{1a}, 吴金海^{1b}, 曲 军^{1a},
胡润武^{1a}(1. 南阳市第一人民医院 a. 急诊创伤外科; b.
急诊医学科, 河南 南阳 473000)CHEN Hong-tao^{1a}, WU Jin-hai^{1b},
QU Jun^{1a}, HU Run-wu^{1a}(1. a. Department of Emergency Trauma
Surgery; b. Department of Emergency
Medicine, Nanyang First People's
Hospital, Nanyang 473000, Henan
Province, China)作者简介: 陈红涛(1985-), 男, 主治医师, 主要
从事急诊创伤方面的临床工作
和研究通信作者: 胡润武, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13949376626

E-mail: cht15936422670@163.com

摘要:目的 探讨贝母素乙(PEI)通过含血小板蛋白结合基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5(ADAMTS-5)调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)/细胞型禽肉瘤病毒癌基因同源物(c-SKI)信号通路影响膝骨关节炎(KOA)大鼠的作用机制。方法 通过关节腔内注射碘乙酸钠构建大鼠 KOA 模型。将大鼠分为对照组、模型组、实验组(腹腔注射 3.5 mg·kg⁻¹ PEI)和 ADAMTS-5 过表达组(尾静脉注射 oe-ADAMTS-5 质粒)。用机械刺激法检测大鼠疼痛阈值;用苏木精-伊红染色法检测大鼠膝关节病理损伤情况;用蛋白质印迹法检测大鼠膝关节组织中的 ADAMTS-5、基质金属蛋白酶(MMP)-3、MMP-13 和 PPAR γ /c-SKI 信号通路蛋白水平;用免疫组化法检测大鼠膝关节组织中的 II 型胶原蛋白 α 1 链(Col2 α 1)蛋白水平;用相应试剂盒检测大鼠血清中的炎症因子水平。结果 对照组、模型组和实验组的疼痛阈值分别为(19.15 $\pm$ 2.87)、(7.10 $\pm$ 1.03)和(13.69 $\pm$ 1.27)g, ADAMTS-5 蛋白相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.16、1.77 $\pm$ 0.21 和 1.35 $\pm$ 0.18;对照组、模型组、实验组和 ADAMTS-5 过表达组的 Col2 α 1 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.10、0.28 $\pm$ 0.04、0.76 $\pm$ 0.13 和 0.58 $\pm$ 0.06, MMP-3 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.15、2.11 $\pm$ 0.36、1.62 $\pm$ 0.22 和 1.83 $\pm$ 0.25, MMP-13 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.18、1.98 $\pm$ 0.28、1.27 $\pm$ 0.16 和 1.45 $\pm$ 0.19, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平分别为(62.74 $\pm$ 6.93)、(159.37 $\pm$ 26.40)、(98.08 $\pm$ 14.09)和(124.43 $\pm$ 17.79)pg·mL⁻¹, 白细胞介素(IL)-4 水平分别为(75.62 $\pm$ 11.54)、(19.56 $\pm$ 2.59)、(53.28 $\pm$ 6.34)和(41.67 $\pm$ 5.31)pg·mL⁻¹, IL-6 水平分别为(42.65 $\pm$ 9.77)、(133.84 $\pm$ 13.22)、(84.19 $\pm$ 11.71)和(105.24 $\pm$ 18.19)pg·mL⁻¹, IL-10 水平分别为(98.06 $\pm$ 24.50)、(23.42 $\pm$ 10.61)、(64.72 $\pm$ 20.96)和(38.09 $\pm$ 12.86)pg·mL⁻¹, PPAR γ 蛋白相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.13、0.39 $\pm$ 0.07、0.73 $\pm$ 0.09 和 0.51 $\pm$ 0.08, c-SKI 蛋白相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.17、0.32 $\pm$ 0.05、0.86 $\pm$ 0.15 和 0.44 $\pm$ 0.09, 模型组的上述指标与对照组比较, 实验组的上述指标与模型组比较, ADAMTS-5 过表达组的上述指标与实验组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 PEI 抑制 KOA 大鼠炎症因子水平, 减轻骨纤维化, 改善骨损伤, 从而缓解关节疼痛, 可能是通过下调 ADAMTS-5 表达激活 PPAR γ /c-SKI 信号通路来实现的。

关键词: 贝母素乙; 膝骨关节炎; 含血小板蛋白结合基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ /细胞型禽肉瘤病毒癌基因同源物 c-SKI 信号通路; 软骨损伤

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.05.015

中图分类号: R684.3 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)05-0693-07

Abstract: Objective To investigate the mechanism of peiminine

(PEI) affects pain and cartilage injury in rats with knee osteoarthritis (KOA) by regulating the peroxisome proliferator – activated receptor gamma (PPAR γ)/cellular sloan kettering institute(c – SKI) signaling pathway through a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS – 5). **Methods** The KOA model was established in rats by intra – articular injection of sodium iodoacetate. The rats were divided into control group, model group, experimental group (intraperitoneal injection of 3.5 mg · kg⁻¹ PEI) and ADAMTS – 5 overexpression group (tail vein injection of oe – ADAMTS – 5 plasmid). The pain threshold of rats was measured using the mechanical stimulation method; the pathological injury of the rat knee joint was examined by hematoxylin – eosin (HE) staining; the protein levels of ADAMTS – 5, matrix metalloproteinase (MMP) – 3, MMP – 13 and proteins in the PPAR γ /c – SKI signaling pathway in rat knee joint tissues were detected by Western blot; the protein level of collagen type II alpha 1 chain (Col2 α 1) in rat knee joint tissues was determined by immunohistochemistry; the levels of inflammatory factors in rat serum were measured using corresponding commercial kits. **Results** The pain thresholds in control group, model group and experimental group were (19.15 ± 2.87), (7.10 ± 1.03) and (13.69 ± 1.27) g, respectively; the relative expression levels of ADAMTS – 5 were 1.00 ± 0.16, 1.77 ± 0.21 and 1.35 ± 0.18, respectively; Col2 α 1 levels in control, model, experimental, and ADAMTS – 5 overexpression groups were 1.00 ± 0.10, 0.28 ± 0.04, 0.76 ± 0.13 and 0.58 ± 0.06, respectively; the relative expression levels of MMP – 3 were 1.00 ± 0.15, 2.11 ± 0.36, 1.62 ± 0.22 and 1.83 ± 0.25, respectively; the relative expression levels of MMP – 13 were 1.00 ± 0.18, 1.98 ± 0.28, 1.27 ± 0.16 and 1.45 ± 0.19, respectively; the tumor necrosis factor – alpha (TNF – α) levels were (62.74 ± 6.93), (159.37 ± 26.40), (98.08 ± 14.09) and (124.43 ± 17.79) pg · mL⁻¹, respectively; the interleukin (IL) – 4 levels were (75.62 ± 11.54), (19.56 ± 2.59), (53.28 ± 6.34) and (41.67 ± 5.31) pg · mL⁻¹, respectively; IL – 6 levels were (42.65 ± 9.77), (133.84 ± 13.22), (84.19 ± 11.71) and (105.24 ± 18.19) pg · mL⁻¹, respectively; IL – 10 levels were (98.06 ± 24.50), (23.42 ± 10.61), (64.72 ± 20.96) and (38.09 ± 12.86) pg · mL⁻¹, respectively; the relative expression levels of PPAR γ were 1.00 ± 0.13, 0.39 ± 0.07, 0.73 ± 0.09 and 0.51 ± 0.08, respectively; the relative expression levels of c – SKI were 1.00 ± 0.17, 0.32 ± 0.05, 0.86 ± 0.15 and 0.44 ± 0.09, respectively. The above indicators in model group were statistically significantly different from those in control group, those in experimental group were statistically significantly different from those in model group, and those in ADAMTS5 overexpression group were statistically significantly different from those in experimental group (all $P < 0.05$). **Conclusion** PEI inhibits inflammatory cytokine levels, alleviates bone fibrosis, and improves bone injury in KOA rats, thereby relieving joint pain, possibly by downregulating ADAMTS – 5 expression to activate the PPAR γ /c – SKI signaling pathway.

Key words: peiminine; knee osteoarthritis; disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5; peroxisome proliferator – activated receptor gamma/cellular sloan kettering institute signaling pathway; cartilage injury

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是临床常见的慢性退行性骨关节病,主要特征为关节软骨出现原发性或继发性退行性改变,伴随软骨下骨质增生及关节面破坏,严重者可见关节畸形^[1]。目前,对膝骨关节炎轻、中度的临床治疗多采用保守疗法,无法延缓病情进展且停药后易造成复发,故寻求安全有效的药物并明晰其分子机制为临床研究的重点^[2]。贝母素乙(peiminine, PEI)是贝母属药用植物的主要有效成分,除具有抗炎活性外,PEI还可以直接保护炎症性疾病中的气道上皮细胞、骨细胞,增加细胞对炎症因子的耐受性,从而抑制细胞凋亡^[3]。含血小板蛋白结合基序的解聚蛋

白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) – 5 属于 ADAMTS 家族成员,可以介导软骨基质中蛋白多糖的分解过程,其酶活性的增强,还会加速软骨的损伤与退化^[4]。PEI 通过 ADAMTS – 5 调控下游信号通路影响 KOA 的机制仍需进一步研究。基于此,本研究旨在探讨 PEI 通过 ADAMTS – 5 调控过氧化物酶体增植物激活受体 γ (peroxisome proliferator – activated receptor gamma, PPAR γ)/细胞型禽肉瘤病毒癌基因同源物 (cellular sloan kettering institute, c – SKI) 信号对 KOA 大鼠的作用及其机制,以期为临床治疗提供新的思路。

材料与方法

1 材料

动物 雄性无特定病原体级 7 w 龄斯普拉格-道利 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠共 40 只, 体质量 240~290 g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2024-0001, 动物使用许可证号: SYXK(豫)2024-0003。本实验经南阳市第一人民医院伦理委员会审批(伦理批号: 2025-06-05)。

药品与试剂 PEI, 规格: 每瓶 10 mg, 纯度: $\geq 98.0\%$, 批号: 18063, 美国 MedChemExpress 公司生产; 碘乙酸钠(monodum iodoacetate, MIA), 规格: 每瓶 5 g, 纯度: 99.16%, 批号: D2110096, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产; 二喹啉甲酸试剂盒和苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒, 均由江苏杭州浩克生物技术有限公司生产; ADAMTS-5、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-3、MMP-13、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、PPAR γ 、II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type II $\alpha 1$ chain, Col2 $\alpha 1$)抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗, 均由英国 Abcam 公司生产; c-SKI 抗体, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产; 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂和二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB), 均由翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产; 白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒, 均由湖北武汉菲恩生物科技有限公司生产。

仪器 Electric Von Frey 电子测痛仪, 上海玉研科学仪器有限公司产品; EX33 光学显微镜, 浙江舜宇光学科技(集团)有限公司产品; PSB 离心机, 浙江金华正邦机械制造有限公司产品; 10180-220 切片机, 美国 Tedpella 公司产品。

2 实验方法

2.1 KOA 大鼠模型构建^[5]

将需建模大鼠麻醉后, 于右膝关节处消毒备皮并弯曲 90°, 由膝下髌骨韧带向关节腔内注射 20 mg·mL⁻¹ 的 MIA 溶液(167 μ L·kg⁻¹), 然后反复拉伸关节 5 次, 继续正常饲养 4 w。

2.2 动物分组及处理方法

将 SD 大鼠适应性饲养 1 w 后, 随机分为 4 组: 对照组、模型组、实验组和 ADAMTS-5 过表达组。对照组大鼠仅注射生理盐水; 模型组大鼠按照“2.1”中

方法处理; 实验组大鼠在模型组大鼠处理的基础上, 每天腹腔注射 3.5 mg·kg⁻¹ PEI, 持续 21 d; ADAMTS-5 过表达组大鼠在模型组大鼠处理的基础上, 腹腔注射 PEI, 给药剂量同实验组, 大鼠尾静脉注射 1×10^9 v. g. 慢病毒包被的 oe-ADAMTS-5 质粒, 间隔 3 d 注射 1 次, 共注射 2 次。

2.3 机械刺激法检测大鼠疼痛阈值^[6]

用电子测痛仪对末次给药后的大鼠右后爪足底进行刺激, 逐渐增大力度直到大鼠出现嘶鸣或抬腿挣扎等反应, 最终读数压力值视为大鼠疼痛阈值。

2.4 HE 染色法检测大鼠膝关节病理^[7]

取大鼠膝关节软骨组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 组织浸蜡, 石蜡包埋后, 制备为厚度 4 μ m 的石蜡切片。脱蜡处理完成后, 进行 HE 染色: 先以苏木素染液对细胞核染色 5 min, 经盐酸酒精分化处理后, 用伊红染液对细胞质染色 15 s; 染色完毕后, 用光学显微镜观察并分析组织的病理形态学变化。

2.5 蛋白印迹法检测大鼠膝关节组织中的 ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13 和 PPAR γ /c-SKI 信号通路蛋白水平^[8]

取大鼠膝关节组织研磨, 加组织裂解液, 提取蛋白, 离心收集上清液, 用二喹啉甲酸试剂盒测定蛋白浓度。取定量蛋白上样至含体积分数 10% 凝胶, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转移至聚偏二氟乙烯膜上, 将膜与以下抗体 ADAMTS-5 (1:250)、MMP-3 (1:1 000)、MMP-13 (1:3 000)、PPAR γ (1:1 000)、c-SKI (1:1 000)、GAPDH (1:1 000) 孵育过夜(4 °C), 次日清洗后, 加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, 用 ECL 试剂显色, 用 Image J 软件评估目的蛋白表达水平。

2.6 免疫组化法检测大鼠膝关节组织中的 Col2 $\alpha 1$ 蛋白水平^[9]

将“2.4”制备的切片脱蜡、水化后, 加入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复。滴加 3% 的牛血清白蛋白封闭 30 min, 加入 Col2 $\alpha 1$ 一抗(1:200)在 4 °C 中孵育过夜, 清洗后加二抗(1:2 000), 用 DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 乙醇脱水, 中性树胶封固, 用光学显微镜观察并拍照。用 Image J 软件对阳性染色区域进行定量分析, 计算阳性染色面积占比及平均光密度值(optical density, OD), 以均值表示 Col2 $\alpha 1$ 蛋白相对表达水平。

2.7 试剂盒法检测大鼠血清中的炎症因子水平^[10]

将大鼠麻醉后处死, 腹主动脉取血, 在 4 °C 下, 以

3 000 r · min⁻¹离心 10 min 后,取上层血清,严格按照试剂盒说明书要求依次加入 TNF- α 、IL-4、IL-6 和 IL-10 试剂盒中相应的反应试剂和终止试剂,测定光密度值,计算相应指标水平。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,多重比较通过 *LSD* 检验进行校正。

结 果

1 PEI 影响 KOA 大鼠疼痛

对照组大鼠关节腔注射生理盐水;模型组关节腔内注射 MIA 溶液;实验组大鼠造模后,腹腔注射 3.5 mg · kg⁻¹ PEI;ADAMTS-5 过表达组造模后,尾静脉注射 1 × 10⁹ v. g. 慢病毒包被的 oe-ADAMTS-5 质粒。

机械刺激法检测显示:对照组、模型组和实验组大鼠的疼痛阈值分别为 (19.15 ± 2.87)、(7.10 ± 1.03) 和 (13.69 ± 1.27) g,与对照组相比,模型组大鼠的疼痛阈值显著降低 (*P* < 0.001);与模型组相比,实验组大鼠的疼痛阈值显著升高 (*P* < 0.001)。

2 PEI 影响 KOA 大鼠膝关节组织病理

HE 染色显示:对照组大鼠膝关节软骨表明光滑,软骨层排列紧密整齐,软骨细胞数量正常;与对照组相比,模型组大鼠的软骨表面粗糙,有炎症浸润,软骨层排列紊乱,软骨细胞丢失;与模型组相比,实验组大鼠关节表面趋于光滑,软骨细胞数量略有恢复,软骨层排列较为整齐,见图 1。

3 PEI 影响 KOA 大鼠膝关节组织中 ADAMTS-5 蛋白水平

蛋白质印迹法检测显示:对照组、模型组与实验

组的 ADAMTS-5 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16、1.77 ± 0.21 和 1.35 ± 0.18,与对照组相比,模型组大鼠膝关节组织中的 ADAMTS-5 蛋白相对表达水平显著升高 (*P* < 0.001);与模型组相比,实验组大鼠膝关节组织中的 ADAMTS-5 蛋白相对表达水平显著降低 (*P* < 0.001),见图 2。

4 PEI 通过 ADAMTS-5 影响 KOA 大鼠膝关节软骨损伤

免疫组化法检测显示:Col2 α 1 蛋白阳性表达为细胞外基质出现棕黄色至棕褐色颗粒,对照组、模型组、试验组和 ADAMTS-5 过表达组的 Col2 α 1 蛋白阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.10、0.28 ± 0.04、0.76 ± 0.13 和 0.58 ± 0.06,与对照组相比,模型组大鼠膝关节组织中的 Col2 α 1 蛋白阳性表达水平显著降低 (*P* < 0.001);与模型组相比,实验组大鼠膝关节组织中的 Col2 α 1 蛋白阳性表达水平显著升高 (*P* < 0.001);与实验组相比,ADAMTS-5 过表达组大鼠膝关节组织中的 Col2 α 1 蛋白阳性表达水平显著降低 (*P* < 0.001),见图 3A。

蛋白质印迹法检测显示:与对照组相比,模型组大鼠膝关节组织中 MMP-3 和 MMP-13 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 *P* < 0.001);与模型组相比,实验组大鼠膝关节组织中的 MMP-3 和 MMP-13 蛋白相对表达水平均显著降低 (*P* < 0.01, *P* < 0.001);与实验组相比,ADAMTS-5 过表达组大鼠膝关节组织中的 MMP-3 和 MMP-13 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 *P* < 0.05),见图 3B 和表 1。

5 PEI 通过 ADAMTS-5 影响 KOA 大鼠炎症水平

对应试剂盒检测显示:与对照组相比,模型组大鼠血清中的 IL-6 和 TNF- α 的水平均显著升高 (均 *P* < 0.001),IL-4 和 IL-10 水平均显著降低

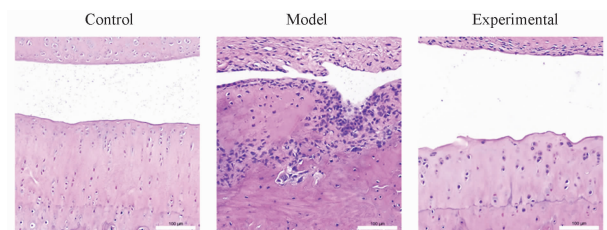


图 1 苏木精-伊红染色法检测各组大鼠膝关节病理 (×100)

Figure 1 Pathology of knee joints in rats of each group detected by hematoxylin and eosin staining (×100)

Control group: Intraperitoneal injection of normal saline; Model group: Intraperitoneal injection of monodiodoacetate (MIA) solution; Experimental group: Intraperitoneal injection of 3.5 mg · kg⁻¹ peiminine (PEI).

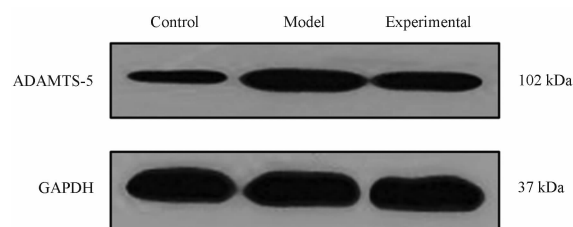


图 2 用蛋白质印迹法检测各组大鼠膝关节组织中含血小板蛋白结合基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 (ADAMTS-5) 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS-5) protein in knee joint tissues of rats in each group detected by Western blot

(均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠血清中的 IL-6 和 TNF- α 的水平均显著降低(均 $P < 0.001$),IL-4 和 IL-10 水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与实验组相比,ADAMTS-5 过表达组大鼠血清中的 IL-6 和 TNF- α 的水平均显著升高(均 $P < 0.01$),IL-4 和 IL-10 水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 2。

6 PEI 通过 ADAMTS-5 影响 PPAR γ /c-SKI 信号通路

蛋白质印迹法检测显示:与对照组相比,模型组大鼠膝关节组织中的 PPAR γ 和 c-SKI 蛋白相

对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠膝关节组织中的 PPAR γ 和 c-SKI 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与实验组相比,ADAMTS-5 过表达组大鼠膝关节组织中的 PPAR γ 和 c-SKI 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$),见图 4 和表 3。

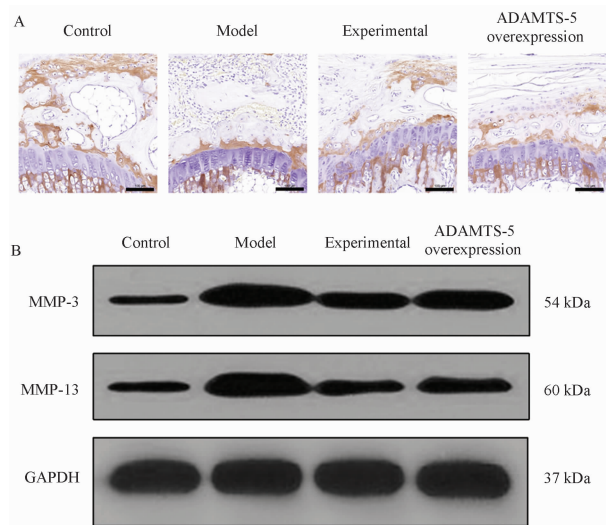


图 3 免疫组化法和蛋白质印迹法检测各组大鼠膝关节组织中软骨损伤相关蛋白相对表达水平

Figure 3 The relative expression levels of cartilage injury-related proteins in knee joint tissues of rats in each group detected by immunohistochemistry method and Western blot

ADAMTS-5 overexpression group: After modeling, 1×10^9 v. g. lentivirus coated oe-ADAMTS-5 plasmid was injected into the tail vein; A: Collagen type II alpha1 chain (Col2a1) protein in knee joint tissues of rats in each group (immunohistochemistry, optical microscope, $\times 100$); B: Relative expression levels of matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-13 protein in knee joint tissues of rats in each group.

表 2 各组大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-4、IL-6 和 IL-10 水平的比较($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-4, IL-6 and IL-10 levels in serum of rats in each group($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-10
Control	10	62.74 $\pm$ 6.93	75.62 $\pm$ 11.54	42.65 $\pm$ 9.77	98.06 $\pm$ 24.50
Model	10	159.37 $\pm$ 26.40 ***	19.56 $\pm$ 2.59 ***	133.84 $\pm$ 13.22 ***	23.42 $\pm$ 10.61 ***
Experimental	10	98.08 $\pm$ 14.09 $\Delta\Delta\Delta$	53.28 $\pm$ 6.34 $\Delta\Delta\Delta$	84.19 $\pm$ 11.71 $\Delta\Delta\Delta$	64.72 $\pm$ 20.96 $\Delta\Delta\Delta$
ADAMTS-5 overexpression	10	124.43 $\pm$ 17.79 $\Delta\Delta$	41.67 $\pm$ 5.31 $\Delta\Delta\Delta$	105.24 $\pm$ 18.19 $\Delta\Delta$	38.09 $\pm$ 12.86 $\Delta\Delta$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

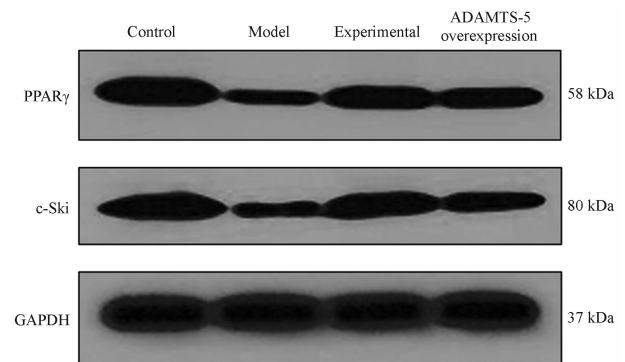


图 4 各组大鼠膝关节组织中的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)/(c-SKI) 信号通路相关蛋白相对表达水平

Figure 4 The relative expression levels of proteins related to the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)/(c-SKI) signaling pathway in knee joint tissues of rats in each group

表 1 各组大鼠膝关节组织中的基质金属蛋白酶(MMP)-3 和 MMP-13 蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of relative expression levels of matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-13 proteins in knee joint tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MMP-3	MMP-13
Control	10	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.18
Model	10	2.11 $\pm$ 0.36 ***	1.98 $\pm$ 0.28 ***
Experimental	10	1.62 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.27 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta\Delta$
ADAMTS-5 overexpression	10	1.83 $\pm$ 0.25 Δ	1.45 $\pm$ 0.19 Δ

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

表3 各组大鼠膝关节组织中 PPAR γ 和 c-SKI 蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of PPAR γ and c-SKI proteins in knee joint tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PPAR γ	c-SKI
Control	10	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.17
Model	10	0.39 $\pm$ 0.07 ***	0.32 $\pm$ 0.05 ***
Experimental	10	0.73 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta\Delta$
ADAMTS-5 overexpression	10	0.51 $\pm$ 0.08 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.44 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with experimental group, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

讨 论

膝关节病变可损伤关节滑膜,增加滑膜下毛细血管的渗透性,致使渗出物在关节腔内积聚,引发关节肿胀、疼痛及炎症反应^[11]。PEI 是从中药贝母中提取的生物碱,具有抗纤维化、抗炎、心脏保护的作用,能够降低炎症因子额度表达,抑制心肌细胞的凋亡,改善心功能^[12]。另有研究指出,PEI 可以对紫杉醇治疗癌症引起的神经病理性疼痛有良好的抑制作用,镇痛效果较为明显且毒性较低^[13]。本研究发现,用 PEI 处理 KOA 大鼠后,大鼠的疼痛阈值显著升高,关节表面损伤及软骨细胞数量有所恢复,提示 PEI 能够减轻 KOA 疼痛,改善关节损伤,与彭博文等^[14]研究中 PEI 可以降低 KOA 大鼠关节肿胀度和疼痛,减轻关节软骨细胞超微结构损伤的研究结果一致,提示 PEI 是治疗 KOA 的潜在药物。

ADAMTS 蛋白聚糖酶已被证实参与多种疾病模型的炎症调节,在杜氏肌营养不良症患者血清和肌营养不良蛋白基因突变小鼠中特异性上调,其可能作为治疗反应生物标志物^[15]。研究显示,抑制人软骨外植体中 ADAMTS-5 的表达可以减少细胞因子刺激的正常软骨中聚集蛋白聚糖的降解;在骨关节炎小鼠模型中,ADAMTS-5 基因缺失可以保护软骨免受降解并预防机械性异常疼痛^[16]。有研究发现,ADAMTS-5 水平的上调可以导致软骨细胞外基质降解,加剧关节软骨退变,促进骨关节炎病情发展^[17]。本研究提示,PEI 通过下调 ADAMTS-5 表达参与 KOA 的进程。在类风湿性关节炎中,IL-17 可以通过诱导软骨 MMP-3 表达,降低关节滑膜和软骨细胞 Col2 α 1 表达水平,从而促进骨破坏^[18]。炎症是 KOA 发病机制中的触发因素,且与关节炎的关联直接关系到疼痛的严

重程度,TNF- α 和 IL-1 β 能够直接破坏软骨细胞并抑制新软骨的生成,MMPs 则是一类能够分解软骨基质中蛋白质的强效酶,过度活跃导致软骨的进一步退化和损伤,IL-6 在骨关节炎患者的滑膜液中高表达^[19]。间充质基质细胞可以调节促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的生成,增加抗炎细胞因子如转化生长因子 β 1 和 IL-10 的表达,促进 KOA 软骨再生和缓解疼痛^[20]。本研究中,实验组大鼠膝关节组织中的 Col2 α 1 蛋白相对表达水平显著升高,MMP-3 和 MMP-13 蛋白相对表达水平均显著降低,过表达 ADAMTS-5 后,加重 KOA 大鼠的软骨损伤和炎症水平,说明 PEI 通过抑制 ADAMTS-5 表达来降低炎症水平,减轻骨破坏,促进软骨的生成。

PPAR γ 作为一种配体激活转录因子,可以阻断转化生长因子- β 1 信号,抑制 Smad 磷酸化及靶基因转录,减少细胞外基质合成^[21]。季楠等^[22]研究发现,姜黄素在乙型肝炎病毒性肝炎中通过激活 PPAR γ 、c-SKI 的表达来发挥抗纤维化的作用,改善肝组织损伤。本研究发现,KOA 大鼠经 PEI 处理后,PPAR γ 和 c-SKI 蛋白相对表达水平均显著升高,在此基础上,转染过表达 ADAMTS-5 质粒会削弱 PEI 对 PPAR γ /c-SKI 信号通路的激活作用,推测 PEI 调节 KOA 大鼠的纤维化可能与调控 PPAR γ /c-SKI 信号通路有关。本研究通过这一递进实验设计,明确 ADAMTS-5 是 PEI 调控 PPAR γ /c-SKI 信号通路的关键上游靶点。从自身实验数据来看,PEI 干预可以显著下调 KOA 大鼠膝关节组织中 ADAMTS-5 的表达,同时伴随 PPAR γ /c-SKI 通路的激活、软骨损伤相关蛋白 Col2 α 1 的显著升高及 MMP-3/13 的显著降低;而在 PEI 干预基础上过表达 ADAMTS-5 后,上述效应均被显著逆转。“PEI 下调 ADAMTS-5 $\rightarrow$ 激活 PPAR γ /c-SKI $\rightarrow$ 改善软骨损伤与炎症”的递进关系,直接证实 ADAMTS-5 是 PEI 发挥作用的下游关键分子,只有当 ADAMTS-5 被 PEI 抑制时,PPAR γ /c-SKI 通路才能被激活,进而发挥抗软骨纤维化、抗炎的作用。这与 ADAMTS-5 在软骨基质降解中的核心作用相契合,也为 PEI 调控 PPAR γ /c-SKI 通路的分子机制提供了直接的实验证据。

本研究证实,PEI 可以通过下调 ADAMTS-5 激活 PPAR γ /c-SKI 通路发挥作用,但不排除 PEI 存在直接调控 PPAR γ /c-SKI 通路的潜在替代机制。已有研究表明,贝母素乙可以通过直接结合核受体家族蛋白调控其活性,而 PPAR γ 作为核受体超家族成员,可能是 PEI 的直接作用靶点之一。本研究中,PEI 干

预可以直接升高 PPAR γ 的表达,而过表达 ADAMTS-5 仅能部分逆转该效应,提示 PEI 可能同时通过“下调 ADAMTS-5 的间接途径”和“直接结合 PPAR γ 的直接途径”调控该通路,这一假设需在后续实验中通过分子对接实验、荧光素酶报告基因实验进一步验证,明确 PEI 与 PPAR γ 的直接结合关系。本研究还存在一定局限性,动物模型用 MIA 诱导的化学性 KOA 模型,虽能模拟软骨损伤与炎症的核心特征,但与人类机械性损伤导致的 KOA 存在一定差异;仅使用雄性 SD 大鼠,未考虑雌激素对软骨代谢的保护作用。

本研究提示:PEI 可能通过下调 ADAMTS-5 表达,激活 PPAR γ /c-SKI 信号通路来抑制 KOA 大鼠体内炎症因子水平,减轻骨纤维化,改善骨损伤,从而缓解关节疼痛。

参考文献:

- [1] 马芸瑄,郭长青,齐昕,等. 针刀干预对膝骨关节炎模型兔软骨细胞铁死亡相关蛋白表达的影响[J]. 世界中医药,2025,20(5):746—751.
- [2] 但晶,丁华,王刚,等. 黑骨藤追风活络胶囊联合结筋病灶点温针灸对寒湿痹阻型膝骨关节炎患者的临床疗效[J]. 中成药,2025,47(5):1514—1519.
- [3] LUO Z, ZHENG B, JIANG B, *et al.* Peiminine inhibits the IL-1 β induced inflammatory response in mouse articular chondrocytes and ameliorates murine osteoarthritis[J]. *Food Funct*, 2019, 10(4): 2198—2208.
- [4] 高松年,李民,张言午,等. 石松碱改善前交叉韧带重建术后创伤性骨关节炎模型中的炎症反应和软骨损伤[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2025,64(5):875—885.
- [5] 谢晓婷,郑拥军. miR-29b 参与大鼠膝骨关节炎引起的软骨退变和股四头肌萎缩[J]. 中国疼痛医学杂志,2022,28(4): 249—257.
- [6] 丰瑞兵,黄勇,胡昊,等. 淫羊藿苷对膝创伤性关节炎模型大鼠的镇痛效果及机制[J]. 中国组织工程研究,2023,27(32): 108—5113.
- [7] 王金凤,王枫,刘杰,等. 艾拉莫德治疗胶原诱导性关节炎模型大鼠的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(21): 3144—3148.
- [8] 雷港,武和明,江飞. 成釉细胞瘤细胞抑制骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 口腔医学,2020,40(12): 1067—1072.
- [9] 许奇,许伟民,浦元臻,等. 膝骨关节炎小鼠软骨退变过程及温经通络汤对其治疗作用[J]. 中华中医药杂志,2022,37(12): 7070—7075.
- [10] 刘梦,刘舒庭,卢曦,等. 基于 AMPK/ACC 信号通路研究雷公菌活性成分对羟基苯甲醛对大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J]. 中国现代应用药学,2022,39(19): 2429—2436.
- [11] 张健,颜运涛,王响,等. 槲皮苷调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路缓解膝骨关节炎大鼠的炎症反应[J]. 中药药理与临床,2025,41(5):22—27.
- [12] 崔冬玲,王璐,曾理,等. 贝母素乙调节 SphK1/S1P 信号通路对心房颤动大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中药新药与临床药理,2025,36(1):66—71.
- [13] 徐朗希,范琳姿,姜爽,等. 贝母属植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2022,32(1): 61—73.
- [14] 彭博文,冯立,覃剑. 贝母素乙调节 RhoA/ROCK 信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2024,30(7): 980—984.
- [15] ADDINSALL A B, FORGAN L G, MCRAE N L, *et al.* Treatment of dystrophic mdx mice with an ADAMTS-5 specific monoclonal antibody increases the *ex vivo* strength of isolated fast twitch hindlimb muscles[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 416.
- [16] VAN DER AAR E, DECKX H, DUPONT S, *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the ADAMTS-5 inhibitor GLPG1972/S201086 in healthy volunteers and participants with osteoarthritis of the knee or hip[J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2022, 11(1):112—122.
- [17] 郭彦德. 血管活性肠肽和 NF- κ B 信号通路在骨关节炎中的作用机制[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(2): 814—821.
- [18] 李鑫,蔡雄,刘良. Th17 细胞在类风湿关节炎发病机制中的作用研究进展[J]. 中国药理学通报,2020,36(3): 309—312.
- [19] 王烨航,宋红,余王琴. 肾着汤调控 PI3K-Akt 信号通路抑制软骨细胞凋亡改善膝骨关节炎大鼠炎症水平机制研究[J]. 中国中药杂志,2025,50(12):3389—3398.
- [20] SADRI B, HASSANZADEH M, BAGHERIFARD A, *et al.* Cartilage regeneration and inflammation modulation in knee osteoarthritis following injection of allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cells: A phase II, triple-blinded, placebo controlled, randomized trial[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1):162.
- [21] 范文艳,郝君玉,陈虹秀,等. 肝纤维化相关信号通路及中药活性成分靶向调节作用机制[J]. 临床肝胆病杂志,2022,38(11):2599—2605.
- [22] 季楠,马娟,陈克研,尹中波. 姜黄素通过上调 PPAR γ /c-SKI 信号通路在大鼠乙型肝炎病毒性肝炎模型中发挥保护作用[J]. 解剖科学进展,2021,27(3):358—361,366.

(本文编辑:马凌云 投稿日期:2025-06-20)