

自拟骨痹散对膝关节骨性关节炎兔软骨组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

李东东 陈光友 朱凯 易露 (西南医科大学附属中医医院 四川 泸州 646000)

〔摘要〕 目的 观察自拟骨痹散对膝关节骨性关节炎兔的影响。方法 将 40 只新西兰大白兔分为空白组、模型组、阳性组(双氯芬酸钾凝胶)与骨痹散组,每组 10 只,使用改良 Hulth 法构建兔膝关节骨性关节炎模型,持续 8 w,模型构建完毕后连续用药 4 w。观察动物活动情况并进行行为评分,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中前列腺素(PG)E₂、环氧合酶(COX)-2、白细胞介素(IL)-1 β 与肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量,采用苏木素-伊红染色法与番红-O 染色法观察软骨组织的病理学改变,使用免疫组织化学法检测膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 蛋白表达水平,使用 Western 印迹检测膝关节软骨组织中 Wnt5a、 β -连环蛋白(catenin)、B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3 的蛋白表达水平。结果 与空白组相比,模型组动物行走困难,膝关节软骨组织损伤严重,血清中 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 含量显著升高,组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13、Bax、Caspase-3、Wnt5a 与 β -catenin 蛋白表达水平显著升高,Bcl-2 蛋白表达明显降低(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,阳性组与骨痹散组动物行走情况得到好转,血清中 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 含量明显降低,膝关节软骨组织结构损伤得到修复,组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13、Bax、Caspase-3、Wnt5a 与 β -catenin 蛋白表达水平明显降低,Bcl-2 蛋白表达明显升高($P < 0.05$ $P < 0.01$)。结论 自拟骨痹散能减轻兔膝关节骨性关节炎的症状,改善组织的病变,减少血清中炎症因子,作用机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

〔关键词〕 膝关节骨性关节炎;骨痹散;软骨组织;兔;中药复方

〔中图分类号〕 R965; R684 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2023)11-2790-06; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.11.060

膝关节骨性关节炎主要症状为关节疼痛、僵硬和肿胀,常见于致残性关节疾病,占骨关节炎总负担的 80% 以上^{〔1〕}。尽管膝骨关节炎发病率高,但由于其复杂的病因学,其发病机制目前尚不完全清楚,导致治疗手段的开发陷入瓶颈。典型的治疗手段包括使用止痛剂、非甾体抗炎药、关节内皮质类固醇注射和关节置换手术。虽然膝关节置换术已被证明有效的,但这种手术并不适用于所有患者,一般在疾病晚期或药物治疗无效后进行,而且高达 20% 的患者报告手术预后效果差^{〔2〕}。

经过多年的发展,中医药治疗膝关节骨性关节炎已经颇有成效,中药及其复方能减少膝骨关节炎膝关节中的炎症因子,防止软骨细胞的凋亡^{〔3,4〕}。最近研究发现在膝骨关节炎发病过程中观察到典型的 Wnt/ β -连环蛋白(catenin) 信号通路的激活及 β -catenin 蛋白的表达增加,而中药在这方面也有效果^{〔5〕}。本研究探讨自拟骨痹散对膝骨关节炎动物模型中炎症因子与 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰大白兔,清洁级,体质量 3~4 kg,购自成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号: SCXK(川) 2020-030,使用许可证号: SYXK(川) 2019-189。

1.2 实验试剂 骨痹散由西南医科大学附属中医医院提供(制川乌 18 g、制草乌 18 g、川芎 12 g、乳香 12 g、没药 12 g、海桐皮 24 g、透骨草 24 g、白鲜皮 18 g、酒军 18 g、秦艽 18 g、威灵仙 18 g、桑枝 18 g、甘草 12 g、禹白附 18 g、王不留行 24 g、莱菔子 24 g、蜂蜜调配);双氯芬酸钾凝胶,国药准字 H20020385,购自太极集团·四川天诚制药有限公司;环氧合酶(COX)-2、前列腺素(PG)E₂、白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司;B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13、Wnt5a、 β -catenin 和 β -actin 均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.3 实验仪器 酶标仪(美国 Thermo 公司)、倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、多功能凝胶成像仪、蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 膝关节骨性关节炎动物模型的构建^{〔6〕} 取 40 只健康新西兰大白兔,分为 4 组,每组 10 只,除空白

基金项目:西南医科大学附属中医医院课题(2018XYLH-019)

通信作者:陈光友(1974-),男,博士,副教授,副主任中医师,主要从事骨关节与脊柱疾病研究。

第一作者:李东东(1983-),男,硕士,主治医师,主要从事骨关节与脊柱疾病研究。

组外,模型组、阳性组与骨痹散组均采用改良 Hulth 法对新西兰大白兔构建膝关节炎动物模型,戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉注射麻醉,于右后肢膝关节内侧纵作 5 cm 切口,逐层切开、分离关节,探查关节腔无原发病变后,完整切除内侧半月板、前交叉韧带(ACL),内侧副韧带(MCL)。术侧肢体不固定,术后肌注青霉素 160 万 IU/(kg·d),连续 8 d。术后第 4 天即强迫兔奔跑(0.5 h/d),持续 8 w。空白组只进行关节探查而不进行半月板与韧带切除。

1.5 给药 模型构建 8 w 后,各组开始给药,空白组与模型组膝关节处涂抹生理盐水,阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶,骨痹散组涂抹骨痹散,2 次/d,持续 4 w。

1.6 动物一般性体征观察 各组动物手术后与给药进行观察,观察指标为奔跑与活动情况,后肢活动情况,并对步行情况进行分级评分:0 分正常步态;1 分轻度跛行;2 分中度跛行。

1.7 动物膝关节组织病理学观察 给药完成后处死大白兔,收集膝关节软骨组织制作石蜡切片,经苏木素-伊红染色与番红-O 染色后观察软骨组织病理学变化,并进行 Mankin 评分,Mankin 评分按以下 4 个项目评分相加为最终得分,骨组织按损伤情况:0 分为正常组织,1 分组织表面不规则,2 分为组织表面不规则及血管翳,3~5 分分别为组织裂隙深达软骨移行层、辐射层、钙化层,6 分为组织结构完全破坏;软骨细胞损伤情况:0 分为正常软骨细胞,1 分为弥散性细胞数量增多,2 分为出现增生性细胞簇,3 分为细胞数量减少;软骨基质染色情况:0 分为正常染色,1~3 分分别为染色轻度、中度、重度减弱,4 分为未染色;潮线完整度:0 分为完整,1 分为出现血管穿越。

1.8 动物血清中 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 炎症因子检测 各组动物给药完成后立即进行心脏采血,分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书对 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 进行检测。

1.9 免疫组织化学 免疫组化法检测软骨组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 的表达水平,每张组织切片在 100 倍放大倍数下采集 3 个视野计算平均光密度。

1.10 Western 印迹 收集各组动物膝关节软骨组织,冰上进行蛋白质提取与定量,然后按照 Western 印迹进行凝胶电泳,一抗浓度 Wnt5a(1:800)、 β -catenin(1:800)、Bax(1:800)、Caspase-3(1:800)、 β -actin(1:1500),最后使用 ECL 试剂盒进行蛋白条带显影后在凝胶成像系统中进行曝光分析拍照,以 β -actin 作为内参计算各蛋白表达水平。

1.11 统计学分析 采用 SPSS25.0 软件进行方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 自拟骨痹散对膝关节炎大白兔的一般性观察 空白组动物饮食正常,奔跑与活动未出现障碍;模型组动物出现食欲不振、活动减少、行走不便,奔跑困难等情况;与模型组相比,阳性组与骨痹散组动物食欲与精神状态有所好转,活动范围与幅度增加。活动评分见表 1。

2.2 自拟骨痹散对膝关节炎大白兔炎症因子的影响 与空白组相比,模型组 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 含量均显著升高($P < 0.01$),与模型组相比,阳性组与骨痹散组 PEG2、COX-2、IL-1 β 与 TNF- α 含量均显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组活动评分、软骨组织病理学评分及 PEG2、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	活动评分(分)	Mankin 评分(分)	PEG2(pg/ml)	COX-2(U/L)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
空白组	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	438.659 \pm 14.382	50.863 \pm 0.964	18.264 \pm 1.894	99.444 \pm 1.707
模型组	1.8 \pm 0.4 ¹⁾	11.7 \pm 0.5 ¹⁾	533.696 \pm 24.356 ¹⁾	59.543 \pm 2.456 ¹⁾	25.909 \pm 1.203 ¹⁾	116.475 \pm 3.394 ¹⁾
阳性组	0.8 \pm 0.4 ³⁾	3.7 \pm 1.4 ³⁾	477.974 \pm 16.536 ²⁾	54.341 \pm 2.279 ²⁾	22.588 \pm 1.766 ²⁾	110.831 \pm 3.946 ²⁾
骨痹散组	1.3 \pm 0.5 ²⁾	6.7 \pm 0.5 ³⁾	469.453 \pm 22.882 ²⁾	53.659 \pm 2.294 ³⁾	22.851 \pm 1.227 ²⁾	105.228 \pm 2.405 ³⁾

与空白组比较:1) $P < 0.01$; 与模型组比较:2) $P < 0.05$ 3) $P < 0.01$; 下表同

2.3 自拟骨痹散对膝软骨组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 表达的影响 与空白组相比,模型组 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,阳性组与骨痹散组 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.4 自拟骨痹散对膝关节炎大白兔病理学观察 空白组关节软骨结构完整,关节软骨结构分层清晰,未见明显潮线,软骨细胞分布均匀,软骨内无血管和神经,未见明显软骨缺损、软骨细胞坏死及纤维增生等病理改变;模型组关节软骨可见局部软骨面缺损,缺损区域软骨细胞显著减少,大量软骨细胞坏死,软

骨层明显变薄甚至丢失, 缺失区域大量纤维组织增生, 见较多胶原纤维和核呈长梭形的纤维细胞; 其他未见明显病理改变。阳性组关节软骨可见局部软骨面缺损, 软骨细胞排列紊乱, 软骨细胞数量减少, 软骨细胞坏死, 部分软骨层丢失, 缺失区域存在纤维组织

增生情况, 见较多胶原纤维和纤维细胞, 未见明显炎性细胞浸润。骨痹散组关节软骨可见局部软骨面不同程度缺损, 局部软骨面缺损, 软骨细胞数量减少, 部分软骨层丢失, 多量纤维组织增生, 见较多胶原纤维和纤维细胞, 未见明显炎性细胞浸润。见表 1、图 2。

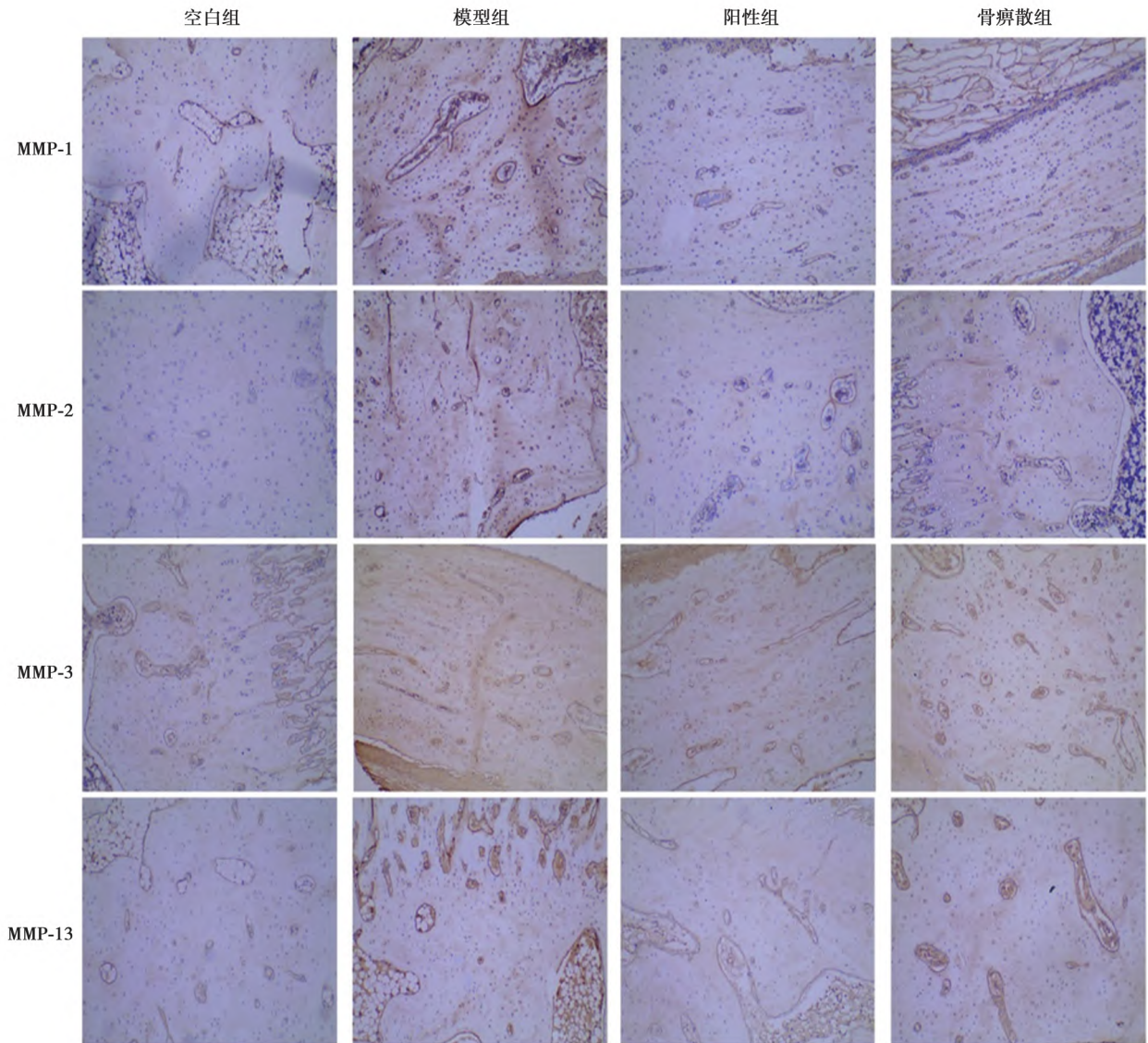


图 1 自拟骨痹散对膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 蛋白表达的影响 (DAB 染色, $\times 100$)

表 2 自拟骨痹散对膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-13 的影响 ($\bar{x} \pm s$, IOD 值, $n = 10$)

组别	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-13
空白组	0.188 \pm 0.003	0.181 \pm 0.009	0.171 \pm 0.001	0.172 \pm 0.005
模型组	0.227 \pm 0.009 ¹⁾	0.209 \pm 0.005 ¹⁾	0.185 \pm 0.004 ¹⁾	0.200 \pm 0.008 ¹⁾
阳性组	0.191 \pm 0.001 ²⁾	0.185 \pm 0.004 ³⁾	0.176 \pm 0.002 ²⁾	0.179 \pm 0.001 ²⁾
骨痹散组	0.201 \pm 0.001 ³⁾	0.193 \pm 0.002 ³⁾	0.176 \pm 0.005 ²⁾	0.190 \pm 0.002 ²⁾

2.5 自拟骨痹散对膝软骨组织中基质蛋白、凋亡蛋白与 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 与空白组相比, 模型组 Bax、Caspase-3、Wnt5a 与 β -catenin 蛋白

表达水平显著升高, Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 阳性组与骨痹散组 Bax、Caspase-3、Wnt5a 与 β -catenin 蛋白表达水平显著降

低, Bcl-2 蛋白表达显著升高, 阳性组效果更优 ($P < 0.05$), 见表 3、图 3。

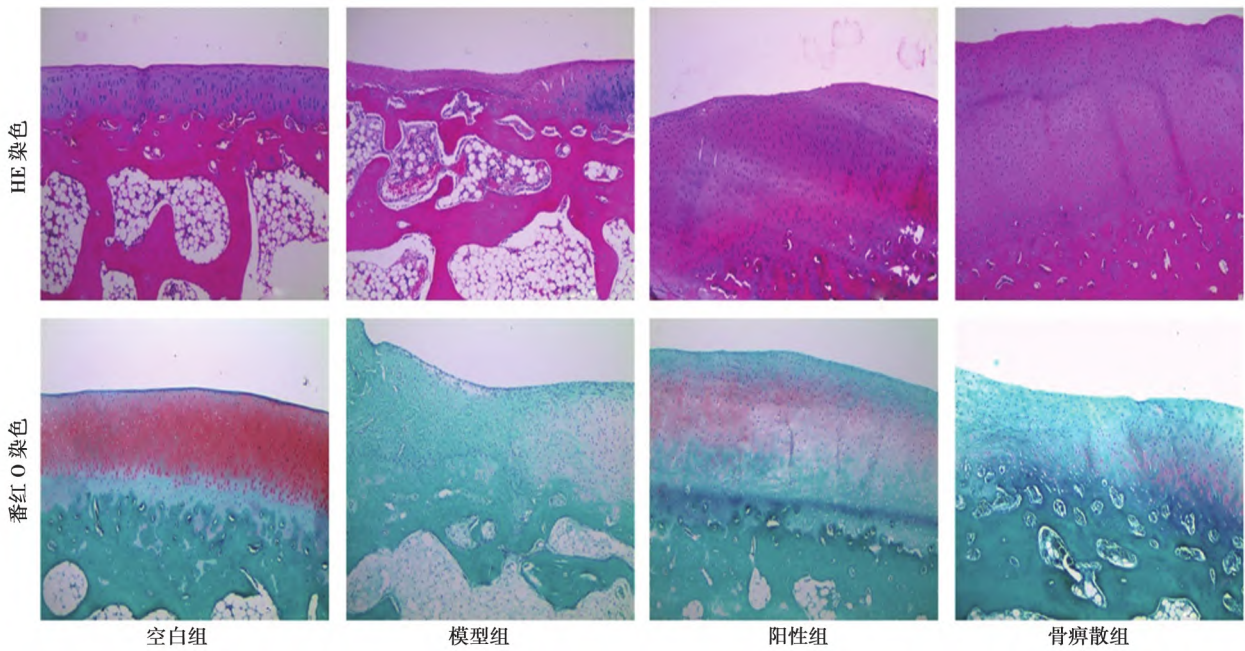


图 2 各组软骨组织 ($\times 100$)

表 3 自拟骨痹散对膝关节软骨组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Wnt5a、 β -catenin 的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3	Wnt5a	β -catenin
空白组	1.003 \pm 0.073	1.005 \pm 0.098	1.004 \pm 0.087	1.001 \pm 0.029	1.005 \pm 0.108
模型组	1.885 \pm 0.039 ¹⁾	0.611 \pm 0.028 ¹⁾	2.399 \pm 0.050 ¹⁾	1.940 \pm 0.100 ¹⁾	1.977 \pm 0.125 ¹⁾
阳性组	1.379 \pm 0.185 ³⁾	0.854 \pm 0.046 ³⁾	1.703 \pm 0.029 ³⁾	1.578 \pm 0.166 ³⁾	1.628 \pm 0.172 ³⁾
骨痹散组	1.618 \pm 0.115 ²⁾	0.827 \pm 0.025 ³⁾	1.785 \pm 0.016 ³⁾	1.590 \pm 0.132 ³⁾	1.678 \pm 0.066 ²⁾

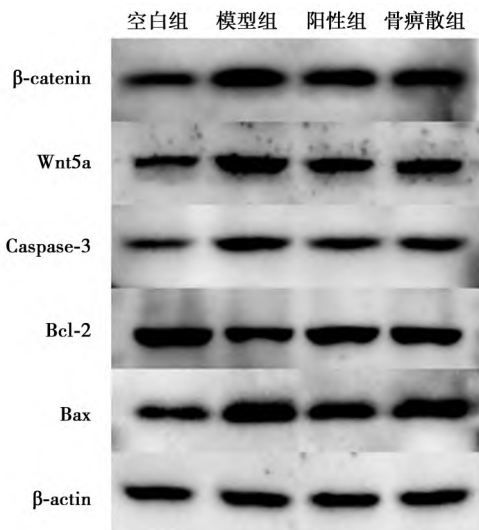


图 3 Western 印迹检测各组 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达

3 讨论

骨性关节炎是关节炎最常见的形式, 随着社会

的老龄化和肥胖的流行, 骨性关节炎的发病率预计将在未来 20 年内继续增加⁽⁷⁾。骨性关节炎的特征是软骨降解和软骨下骨改变, 骨赘形成, 并伴有滑膜局部炎症, 在膝关节也有半月板退变和挤压的情况发生。膝关节骨性关节炎的药物治疗用于对症治疗, 以控制疼痛、改善自我报告的身体功能和健康相关的生活质量为目的⁽⁸⁾。但口服非甾体抗炎药只能间歇性地使用最短的时间和尽可能低的剂量来控制疼痛, 并且会对心血管、肝脏、肾脏等器官造成不良影响⁽⁹⁾。本实验使用的自拟骨痹散, 其中制川乌、制草乌、秦艽、威灵仙都是治疗关节炎的常用中药, 具有抗炎止痛的功效, 毒副作用小。本实验结果发现, 骨痹散在治疗膝骨关节炎中发挥与非甾体抗炎药基本一致的效果, 鉴于中药复方具有副作用小与不良反应发生率低的优点, 这对膝关节骨性关节炎治疗药物的选择有一定的指导作用。

膝关节骨性关节炎的主要病理特征是软骨组织退化、降解。软骨细胞是成人软骨组织中唯一的细胞, 调节细胞外基质的分泌。细胞外基质的正常组

成与关节软骨的稳态和软骨的正常生物力学功能密切相关。软骨细胞依赖正常的软骨稳态来维持细胞存活和正常的生物合成功能⁽¹⁰⁾。当出现膝关节骨性关节炎时,代谢稳态的细胞外基质被打乱,细胞外基质的合成减少,导致软骨中分解代谢酶活性增强,最终造成细胞外基质的降解⁽¹¹⁾。本研究通过对比模型组与骨痹散组动物体征与膝关节病理学后发现,使用骨痹散后,动物后肢活动幅度增大,活动范围变广,食欲增加,膝关节中的软骨组织退化情况减弱,软骨结构分层逐渐清晰,缺损区域得到修补,炎性细胞的聚集与浸润减少,从症状上缓解膝关节骨性关节炎的进程。

膝关节骨性关节炎发病的确切机制尚不清楚,但主要因素被认为是促炎细胞因子触发的慢性炎症所引起的软骨损伤。研究表明,IL-1 β 是这种炎症反应的主要决定因素⁽¹²⁾。IL-1 β 极大地影响软骨细胞中细胞外基质的成分,干扰关键性结构蛋白的合成⁽¹³⁾,同时影响软骨细胞中 MMP-13 等 MMP 的合成,对软骨成分具有破坏作用⁽¹¹⁾。IL-1 β 和 TNF- α 含量增加后,刺激软骨降解酶的生产,进一步损伤关节软骨⁽¹⁴⁾。类前列腺素是存在于滑膜液中的一类重要信号分子,而 COX-2 被认为是炎症亚型⁽¹⁵⁾。非甾体抗炎药就是以抑制体内 COX-2 提供一种有效的缓解疼痛的手段,从而减缓膝关节骨性关节炎进展。由于炎性细胞因子在促进软骨分解代谢酶促介质中的重要作用,因此炎性细胞因子被认为是治疗膝关节骨性关节炎的重要靶点,而中药因为其多靶点的药理特性,在抗感染上具有巨大优势。本研究说明骨痹散在膝关节骨性关节炎的抗炎效果上与非甾体抗炎药拥有相同的效果,且未发现对胃肠道等副作用。

Wnt 通路在物种间高度保守,在器官生成、细胞分化和组织重塑中发挥着核心作用。细胞质中的 β -catenin 转运到细胞核并与 T 细胞因子/淋巴样增强因子转录因子相互作用以激活 Wnt 下游靶基因表达⁽¹⁶⁾。在膝关节骨性关节炎中,Wnt 信号被激活,导致 β -catenin 分泌增加,并促进骨分化、软骨降解、软骨细胞肥大和炎症⁽¹⁷⁾。之前的研究表明,在退行性软骨细胞中, β -catenin 表达水平上调,导致软骨丢失⁽¹⁸⁾。此外,有条件激活的 β -catenin 导致成年小鼠软骨细胞异常分化⁽¹⁹⁾,促进 Wnt5a 生成使软骨细胞中 MMP 表达增多并抑制胶原 II 表达,诱发膝关节骨性关节炎⁽²⁰⁾。本研究说明,软骨细胞的降解与凋亡得到抑制,疾病进程得到延缓。

综上,膝关节骨性关节炎的发病机制复杂,当前

实验只能证明自拟骨痹散在 Wnt/ β -catenin 信号通路上有治疗膝关节骨性关节炎潜力,具有一定的局限性,今后将设计更多实验完善自拟骨痹散抗膝关节骨性关节炎研究。

4 参考文献

- Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis (J). *Lancet*, 2019; 393 (10182): 1745-59.
- Price AJ, Alvand A, Troelsen A, et al. Knee replacement (J). *Lancet*, 2018; 392(10158): 1672-82.
- 李广广, 马勇, 郭杨, 等. 通络治痹汤对兔膝关节炎软骨形态改变和炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 (J). *中国中医基础医学杂志* 2018; 24(4): 467-70.
- 陈海霞, 张开伟, 马文娟, 等. 补肾活血汤干预骨质疏松并骨关节炎模型兔软骨多种细胞因子 mRNA 的表达 (J). *中国组织工程研究* 2018; 22(32): 5123-32.
- 谢晓晴, 郑洪新. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的中医药干预骨关节炎的研究进展 (J). *中国骨质疏松杂志* 2018; 24(5): 664-70.
- 王恒树, 张冲. 自拟组方补肾固筋方对膝骨性关节炎兔血清及关节液白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 的影响 (J). *中国老年学杂志* 2017; 37(5): 1079-81.
- Hootman JM, Helmick CG, Barbour KE, et al. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015-2040 (J). *Arthritis Rheumatol* 2016; 68(7): 1582-7.
- Sabha M, Siaton BC, Hochberg MC. Lorecivivint, an intra-articular potential disease-modifying osteoarthritis drug (J). *Expert Opin Investig Drugs* 2020; 29(12): 1339-46.
- Arden NK, Perry TA, Bannuru RR, et al. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines (J). *Nat Rev Rheumatol* 2021; 17(1): 59-66.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate (J). *Nature* 2003; 423(6937): 332-6.
- Wu X, Cai Y, Lu S, et al. Intra-articular injection of chloramphenicol reduces articular cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis (J). *Clin Orthop Relat Res* 2019; 477(12): 2785-97.
- Turhan Y, Arican M, Karaduman ZO, et al. Chondroprotective effect of Nigella sativa oil in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in rabbits (J). *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2019; 19(3): 362-9.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, et al. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 β -induced inhibition of collagen type II and beta-1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study (J). *Ann Anat* 2005; 187(5-6): 487-97.
- Timur UT, Caron MMJ, Jeuken R M, et al. Chondroprotective actions of selective COX-2 inhibitors in vivo: a systematic review (J). *Int J Mol Sci* 2020; 21(18): 6962.
- Kim HA, Yeo Y, Jung HA, et al. Phase 2 enzyme inducer sulphoraphane blocks prostaglandin and nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes and inhibits cartilage matrix degradation (J). *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(6): 1006-16.
- Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral pro-

- gram for tissue renewal and regeneration: wnt signaling and stem cell control (J). *Science* 2014; 346(6205) : 12480-12.
- 17 Deshmukh V, O'green AL, Bossard C, *et al.* Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment (J). *Osteoarthritis Cartilage* 2019; 27(9) : 1347-60.
- 18 Xia C, Wang P, Fang L, *et al.* Activation of β -catenin in Col2-expressing chondrocytes leads to osteoarthritis-like defects in hip joint (J). *J Cell Physiol* 2019; 234(10) : 18535-43.
- 19 Ma L, Liu Y, Zhao X, *et al.* Rapamycin attenuates articular cartilage degeneration by inhibiting β -catenin in a murine model of osteoarthritis (J). *Connect Tissue Res* 2019; 60(5) : 452-62.
- 20 Tao SC, Yuan T, Zhang YL, *et al.* Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model (J). *Theranostics* 2017; 7(1) : 180-95.

(2022-03-27 修回)
(编辑 杜娟)

lncRNA ARAP1-AS2 通过 JAK2/STAT3 信号通路对小鼠糖尿病肾病的影响

王丽¹ 卢发菊² 李薇³

(青海省第五人民医院 1 内分泌科, 青海 西宁 810000; 2 肾内科; 3 康复医学科)

摘要 目的 探讨 lncRNA 锚蛋白重复和 pH 结构域/反义 RNA(ARAP1-AS) 2 通过酪氨酸激酶(JAK) 2/信号转导和转录激活因子(STAT) 3 信号通路对糖尿病肾病的影响及其机制。方法 将 MPC-5 细胞分为对照组、高糖组、高糖+pcDNA3.1 组、高糖+pcDNA3.1-ARAP1-AS2 组、高糖+AG490 组、高糖+pcDNA3.1-ARAP1-AS2+AG490 组。四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT) 检测细胞存活率; 流式细胞术检测 MPC-5 细胞凋亡率; Western 印迹检测细胞增殖核抗原 Ki67、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase) 3、酪氨酸激酶(JAK) 2、磷酸化(p)-JAK2、信号转导和转录激活因子(STAT) 3、磷酸化 STAT3(p-STAT3) 蛋白表达; 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测 ARAP1-AS2 和突触孔蛋白(Synaptopodin)、结蛋白(Desmin)、波形蛋白(Vimentin) mRNA 的表达水平。结果 与对照组比较, 高糖诱导的 MPC-5 细胞的存活率及 Ki67 表达水平明显降低, 细胞凋亡率及 Caspase3 表达水平明显升高, Synaptopodin mRNA 表达水平明显降低, Desmin mRNA、Vimentin mRNA 表达水平明显升高, p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 表达水平明显升高, ARAP1-AS2 表达水平明显降低($P < 0.05$); 过表达 ARAP1-AS2 后, 高糖诱导的 MPC-5 细胞的存活率及 Ki67 表达水平明显升高, 细胞凋亡率及 Caspase3 表达水平明显降低, Synaptopodin mRNA 表达水平明显升高, Desmin mRNA、Vimentin mRNA 表达水平明显降低, p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 表达水平明显降低($P < 0.05$)。JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490 增强了 ARAP1-AS2 对高糖诱导的足细胞增殖、凋亡及 Synaptopodin、Desmin、Vimentin 表达的影响。结论 过表达 lncRNA ARAP1-AS2 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路促进 MPC-5 细胞存活, 抑制高糖诱导的足细胞损伤。

关键词 lncRNA ARAP1-AS2; 酪氨酸激酶(JAK) 2/信号转导和转录激活因子(STAT) 3 信号通路; 糖尿病肾病; 足细胞; 增殖; 凋亡

(中图分类号) R587.1 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2023)11-2795-05; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.11.061

糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的并发症之一, DN 主要临床表现为蛋白尿和肾功能进行性衰退, 最终进展为肾衰竭; 足细胞作为肾小球滤过的最后屏障, 其结构和功能的完整性与蛋白尿密切相关, 肾脏足细胞凋亡、损伤参与了 DN 的发生发展过程⁽¹⁻³⁾。因此, 研究足细胞凋亡、损伤的分子机制, 通过抑制足细胞损伤可为 DN 的早期诊断提供新的思路, 也可为 DN 的治疗提供新的靶点。研究表明 lncRNA 在 DN 肾小球足细胞损伤、肾小管上皮细胞损伤、肾小球系膜细胞的增殖和纤维化、肾小球细胞外基质积聚等过程中起重要作用⁽⁴⁾。锚蛋白重复和 PH 结构域(ARAP) 1 基因位于 2 型糖尿

病的风险等位基因附近, ARAP1 反义 RNA2 (ARAP1-AS2) 是一种 lncRNA, 其参与调控高糖诱导的人肾小管上皮细胞的骨架重排和上皮间质转化(EMT)⁽⁵⁾。糖尿病和 DN 患者血清中 ARAP1-AS2 表达下调, 其可能参与了糖尿病和 DN 的发生, 有望成为其新的生物标志物⁽⁶⁾。然而 ARAP1-AS2 对足细胞增殖、凋亡的影响及其机制尚不清楚。

酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT) 通路是一条由多种细胞因子和生长因子介导的信号通路, 其广泛参与细胞增殖、分化、凋亡及炎症反应等; JAK 和 STAT 是其主要组分, 其中 JAK 包括 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2, STAT 包括含 STAT3 在内的 7 个成员, 其激活可促进多种疾病的进展, 且其与肾脏疾病的病理生理过程密切相关⁽⁷⁾。JAK2/

第一作者: 王丽(1983-) 女, 副主任医师, 主要从事内分泌学研究。