

棕矢车菊素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对骨关节炎大鼠炎症损伤的影响^Δ

魏超^{1*}, 于江^{2#}, 盛关云³, 蔡毅⁴(1. 江汉大学附属医院/武汉市第六医院疼痛科, 武汉 430015; 2. 江汉大学附属医院/武汉市第六医院骨外科, 武汉 430015; 3. 柳州市中医医院综合骨科, 广西柳州 545000; 4. 武汉市中心医院疼痛科, 武汉 430014)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)04-0421-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.04.06



摘要 **目的** 探讨棕矢车菊素激活腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)/NOD样受体蛋白3(NLRP3)信号通路对大鼠骨关节炎(OA)的影响。**方法** 大鼠随机分为OA组、棕矢车菊素(33.33 mg/kg)组、AMPK抑制剂(Compound C, 20 mg/kg)组、棕矢车菊素(33.33 mg/kg)+Compound C(20 mg/kg)组和假手术组,每组12只。除假手术组外,其余各组大鼠均通过改良Hulth法建立OA模型。建模成功后,各组大鼠灌胃相应剂量的棕矢车菊素或生理盐水,且腹腔注射相应剂量的Compound C或生理盐水,每天1次,持续8周。末次给药24 h后,检测各组大鼠膝关节肿胀度;观察大鼠膝关节软骨组织的病理并进行Mankin评分;检测大鼠膝关节软骨组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素18(IL-18)、IL-6水平,胶原蛋白II(collagen II)、聚集蛋白聚糖(ACAN)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶5(ADAMTS5)蛋白表达,以及磷酸化AMPK(p-AMPK)、AMPK、NLRP3、裂解的胱天蛋白酶1(cleaved-caspase-1)、裂解的IL-1 β (cleaved-IL-1 β)蛋白表达。**结果** 与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠软骨组织缺损现象有所缓解,软骨基质染色加深,软骨细胞数量增多;膝关节肿胀度、Mankin评分和膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平以及ADAMTS5、NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低或下调, collagen II、ACAN蛋白表达水平和AMPK磷酸化均显著升高或上调($P<0.05$)。Compound C显著逆转了棕矢车菊素对OA大鼠上述指标的改善作用($P<0.05$)。**结论** 棕矢车菊素可能通过调控AMPK/NLRP3信号通路来抑制OA大鼠炎症反应及细胞外基质降解。

关键词 棕矢车菊素;AMPK/NLRP3信号通路;骨关节炎;炎症;细胞外基质

Effects of jaceosidin on inflammatory injury in osteoarthritis rats by regulating AMPK/NLRP3 signaling pathway

WEI Chao¹, YU Jiang², SHENG Guanyun³, CAI Yi⁴(1. Dept. of Pain, Jiangnan University Affiliated Hospital/Wuhan Sixth Hospital, Wuhan 430015, China; 2. Dept. of Orthopedic Surgery, Jiangnan University Affiliated Hospital/Wuhan Sixth Hospital, Wuhan 430015, China; 3. Dept. of Orthopaedics, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangxi Liuzhou 545000, China; 4. Dept. of Pain, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of jaceosidin on osteoarthritis (OA) of rats by regulating adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) pathway. **METHODS** Rats were randomly separated into OA group, jaceosidin group (33.33 mg/kg), AMPK inhibitor (Compound C, 20 mg/kg) group, jaceosidin (33.33 mg/kg)+Compound C (20 mg/kg) group, and sham operation group, with 12 rats in each group. Except for the sham operation group, the OA model was induced with modified Hulth method in all other groups. After successful modeling, they were given a relevant dose of jaceosidin or normal saline intragastrically, and Compound C or normal saline intraperitoneally, once a day, for consecutive 8 weeks. Twenty-four h after the last medication, the degree of knee joint swelling in rats from each group was measured. The pathological changes of the articular cartilage tissue in the knee joints, and the Mankin score were assessed. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-18 (IL-18), and IL-6, as well as the protein expressions of collagen II, aggrecan (ACAN), and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5 (ADAMTS5), phosphorylated AMPK (p-AMPK), AMPK, NLRP3, cleaved-caspase-1, and cleaved-IL-1 β were detected in the articular cartilage tissue of rats' knees. **RESULTS** Compared with OA group, the cartilage tissue defect of jaceosidin group was relieved, the cartilage matrix staining was deepened,

and the number of chondrocytes was increased. Knee swelling, Mankin score, the levels of TNF- α , IL-18 and IL-6, and protein expressions of ADAMTS5, NLRP3, cleaved-caspase-1 and cleaved-IL-1 β in knee cartilage were significantly decreased or down-regulated. Protein expressions of collagen II, ACAN

^Δ 基金项目 湖北省自然科学基金项目(No.2022CFB185)

* 第一作者 主治医师,硕士。研究方向:骨关节疾病基础研究。

电话:027-82410046。E-mail:beca31@163.com

通信作者 主治医师,硕士。研究方向:骨关节及脊柱疾病基础研究。电话:027-82441142。E-mail:xua9gae@163.com

and phosphorylation level of AMPK were significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Compound C significantly reversed the improvement effects of jaceosidin on the above indexes of OA rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Jaceosidin may inhibit inflammation and extracellular matrix degradation in OA rats by regulating the AMPK/NLRP3 signaling pathway.

KEYWORDS jaceosidin; AMPK/NLRP3 signaling pathway; osteoarthritis; inflammation; extracellular matrix

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种与年龄相关的慢性退行性关节疾病,可引起严重和反复的炎症和疼痛症状,最终导致受影响关节的功能降低或完全丧失^[1]。近年来,随着人口老龄化和肥胖的加剧,OA的发病率和致残率逐年上升,已成为世界的重大公共卫生问题之一^[2]。目前OA的治疗策略包括早期使用非甾体抗炎药缓解疼痛,末期进行关节置换。然而,长期使用非甾体抗炎药可致多种副作用发生,如胃肠道副作用、肝肾功能损伤等,关节假体的寿命短也是一个严重问题^[3]。因此,亟须开发可有效逆转OA发展的新药。研究表明,炎症反应是OA发病机制的重要相关因素,可引发和加速疾病进展^[4]。这提示开发抑制OA炎性损伤的药物具有重要意义。

棕矢车菊素是一种从菊科、茜草科等植物中提取的天然类黄酮,具有抗炎、抗氧化等活性^[5]。已有研究报道,棕矢车菊素可减轻OA小鼠软骨损伤^[6],但具体机制尚不完全明确。相关研究显示,调节腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)通路可缓解类风湿性关节炎大鼠滑膜炎^[7],但棕矢车菊素是否可通过调节AMPK/NLRP3信号通路来影响OA大鼠炎性损伤尚不可知。基于此,本研究基于该通路探究了棕矢车菊素对OA大鼠炎性损伤的影响及机制,以期为OA的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有500-714-10型游标卡尺(日本Mitutoyo公司)、CX53型光学显微镜(日本Olympus公司)、ST-360型酶标仪(上海科华实验系统有限公司)、DYCZ-24DN型蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有棕矢车菊素(纯度 $\geq 98\%$,批号18085-97-7,四川精萃天成药物科技有限公司),AMPK抑制剂Compound C(批号HY-13418A,美国MCE公司),番红O-固绿染色试剂盒(批号BES21441BO,上海博尔森生物科技有限公司),大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素18(interleukin, IL-18)、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为20221105、20221129、20221227,上海广锐生物科技有限公司),兔源胶原蛋白II(collagen II)、聚集蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶5(a disintegrin and metalloproteinase

with thrombospondin 5, ADAMTS5)、AMPK、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、NLRP3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(批号分别为ab307674、ab313636、ab32047、ab41037、ab133448、ab263899、ab8245、ab6721,英国Abcam公司),兔源裂解的胱天蛋白酶1(cleaved-caspase-1)、裂解的IL-1 β (cleaved-IL-1 β)一抗(批号分别为4199、12242,美国CST公司)。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠,共60只,8周龄,体重为310~320 g,购自武汉有度生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0025。所有动物均饲养于温度为21~24℃、相对湿度为50%~60%、12 h昼夜交替的环境中。所有操作均遵循动物护理和使用委员会的指导,并由武汉有度生物科技有限公司动物伦理委员会批准(批准号202401016)。

2 方法

2.1 OA模型建立

采用改良Hulth法^[8]建立OA模型,具体操作方法如下:将大鼠仰卧位固定,麻醉,剃除右侧膝关节毛发、清洗、消毒后,沿右后膝关节前侧纵向切开皮肤,暴露关节腔,依次切断前交叉韧带、内侧副韧带,摘取半月板,缝合伤口。术后连续3 d肌肉注射青霉素以防感染。

2.2 大鼠分组与处理

将大鼠随机分为OA组、棕矢车菊素组、Compound C组、棕矢车菊素+Compound C组、假手术组,每组12只。假手术组大鼠除不做“切断前交叉韧带、内侧副韧带,摘取半月板”处理外,其余操作同“2.1”项;其余各组大鼠均按“2.1”项下方法建立OA模型,以大鼠出现膝关节肿胀、僵硬、活动受限等症状作为造模成功^[9]。建模成功后,棕矢车菊素组大鼠灌胃33.33 mg/kg棕矢车菊素^[6],且腹腔注射与Compound C等体积的生理盐水;Compound C组大鼠腹腔注射20 mg/kg Compound C^[10],且灌胃与棕矢车菊素等体积的生理盐水;棕矢车菊素+Compound C组大鼠灌胃33.33 mg/kg棕矢车菊素+腹腔注射20 mg/kg Compound C;OA组和假手术组大鼠灌胃与棕矢车菊素等体积的生理盐水+腹腔注射与Compound C等体积的生理盐水。各组大鼠每天给药1次,持续8周。

2.3 膝关节肿胀度检测

末次给药24 h后,利用游标卡尺测量所有大鼠的右膝关节直径,以右膝关节直径变化作为评估膝关节肿胀度的指标。

2.4 膝关节软骨组织病理观察

每组随机选取6只大鼠,麻醉后处死,收集膝关节软骨组织,用4%多聚甲醛溶液固定7 d后,将样品置于20%乙二胺四乙酸(pH 7.4)中脱钙,每3 d更换一次脱钙溶液,直到组织软化;然后将样品脱水,石蜡包埋后切片(5 μm)。取部分切片分别进行苏木精-伊红(HE)、番红O-固绿染色,通过光学显微镜观察并拍照,再根据Mankin评分标准^[1]对大鼠OA严重程度进行评价。

2.5 膝关节软骨组织中TNF-α、IL-18、IL-6水平检测

每组取剩余的6只大鼠,麻醉后处死,收集膝关节软骨组织。取部分组织,根据ELISA试剂盒说明书操作,检测膝关节软骨组织中TNF-α、IL-18、IL-6水平。

2.6 膝关节软骨组织中collagen II、ACAN、ADAMTS5蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.4”项下各组大鼠剩余膝关节软骨组织切片进行抗原修复,然后于100℃保存1 h,以阻断内源性过氧化物酶,再用10%牛血清白蛋白阻断后,加入collagen II、ACAN、ADAMTS5一抗(稀释比例分别为1:300、1:500、1:900),于4℃孵育过夜;次日用磷酸盐缓冲液洗涤切片,加入二抗(稀释比例1:1 000),于37℃孵育1 h;最后用二氨基联苯胺处理并切片。通过Image J软件分析collagen II、ACAN、ADAMTS5蛋白表达(染色呈棕黄色)的吸光度值。

2.7 膝关节软骨组织中AMPK/NLRP3信号通路相关蛋白表达检测

取“2.5”项下各组大鼠剩余膝关节软骨组织,先用RIPA缓冲液裂解并提取总蛋白,再用BCA法测量蛋白质浓度后,加热变性。取30 μg蛋白质进行电泳分离,将分离后的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h后,将膜与p-AMPK、AMPK、NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1β、GAPDH(稀释比例分别为1:3 000、1:6 000、1:4 000、1:4 000、1:4 000、1:2 000)一抗于4℃孵育过夜;次日用TBST缓冲液洗涤膜3次后,将膜与二抗(稀释比例1:4 000)于室温孵育2 h。使用ECL试剂检测条带,Image J软件分析灰度值,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平,再以p-AMPK与AMPK的灰度值比值作为AMPK蛋白的磷酸化水平。

2.8 统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用事后SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 棕矢车菊素对大鼠膝关节肿胀度的影响

与假手术组比较,OA组大鼠膝关节肿胀度显著升高($P<0.05$);与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠膝关节肿胀度显著降低($P<0.05$),Compound C组大鼠膝关节肿胀度显著升高($P<0.05$);与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠膝关节肿胀度显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠膝关节肿胀度和Mankin评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	膝关节肿胀度($n=12$)/cm	Mankin评分($n=6$)/分
假手术组	7.79±0.21	0.21±0.01
OA组	10.73±0.24 ^a	4.43±0.20 ^a
棕矢车菊素组	8.68±0.23 ^b	1.39±0.12 ^b
Compound C组	11.86±0.19 ^b	5.69±0.18 ^b
棕矢车菊素+Compound C组	9.53±0.20 ^c	2.88±0.13 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与OA组比较, $P<0.05$;c:与棕矢车菊素组比较, $P<0.05$ 。

3.2 棕矢车菊素对大鼠膝关节软骨组织病理的影响

HE染色结果(图1)显示,假手术组大鼠软骨组织形态正常;OA组大鼠软骨组织有缺损,软骨细胞分布不均且数量减少;与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠软骨组织缺损、软骨细胞分布不均且数量减少的现象有所缓解,Compound C组大鼠软骨组织缺损、软骨细胞分布不均且数量减少的现象较严重;与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠软骨组织缺损、软骨细胞分布不均且数量减少的现象更严重。

番红O-固绿染色结果(图2)显示,假手术组大鼠软骨基质染色呈红色,且染色均匀;OA组大鼠部分软骨基质染色较浅且软骨细胞数量减少;与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠软骨基质染色加深且软骨细胞数量增加,Compound C组大鼠软骨基质染色较浅且软骨细胞数量较少;与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠软骨基质染色更浅且软骨细胞数量更少。

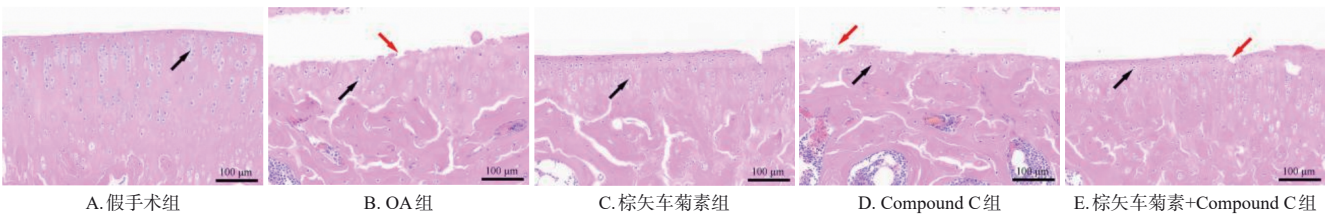


图1 各组大鼠膝关节软骨组织的HE染色显微图

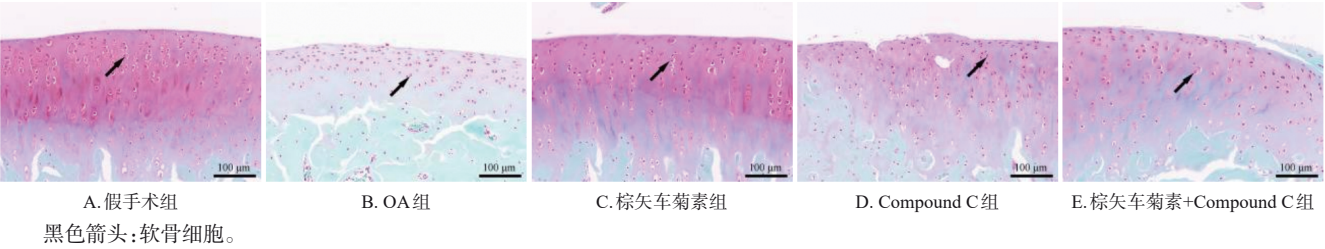


图2 各组大鼠膝关节软骨组织的番红O-固绿染色显微图

与假手术组比较,OA组大鼠Mankin评分显著升高($P<0.05$);与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠Mankin评分显著降低($P<0.05$),Compound C组大鼠Mankin评分显著升高($P<0.05$);与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠Mankin评分显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

3.3 棕矢车菊素对大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平的影响

与假手术组比较,OA组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著升高($P<0.05$);与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著降低($P<0.05$),Compound C组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著升高($P<0.05$);与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

3.4 棕矢车菊素对大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN、ADAMTS5蛋白表达的影响

与假手术组比较,OA组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN蛋白表达均显著下调,ADAMTS5蛋白表达显著上调($P<0.05$);与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN蛋白表达

表2 各组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-18	IL-6
假手术组	23.39 $\pm$ 1.05	57.56 $\pm$ 2.24	112.29 $\pm$ 5.03
OA组	76.65 $\pm$ 2.98 ^a	96.85 $\pm$ 4.03 ^a	178.83 $\pm$ 9.15 ^a
棕矢车菊素组	36.69 $\pm$ 1.54 ^b	69.22 $\pm$ 4.01 ^b	126.88 $\pm$ 5.04 ^b
Compound C组	90.81 $\pm$ 3.79 ^c	121.26 $\pm$ 5.43 ^c	195.56 $\pm$ 8.02 ^b
棕矢车菊素+Compound C组	53.34 $\pm$ 2.08 ^c	80.85 $\pm$ 3.52 ^c	157.72 $\pm$ 6.14 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与OA组比较, $P<0.05$;c:与棕矢车菊素组比较, $P<0.05$ 。

均显著上调,ADAMTS5蛋白表达显著下调($P<0.05$),而Compound C组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN蛋白表达均显著下调,ADAMTS5蛋白表达显著上调($P<0.05$);与棕矢车菊素组比较,棕矢车菊素+Compound C组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN蛋白表达均显著下调,ADAMTS5蛋白表达显著上调($P<0.05$)。结果见图3、表3。

3.5 棕矢车菊素对大鼠膝关节软骨组织中AMPK/NLRP3信号通路相关蛋白表达的影响

与假手术组比较,OA组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著降低,NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与OA组比较,棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著升高,NLRP3、cleaved-

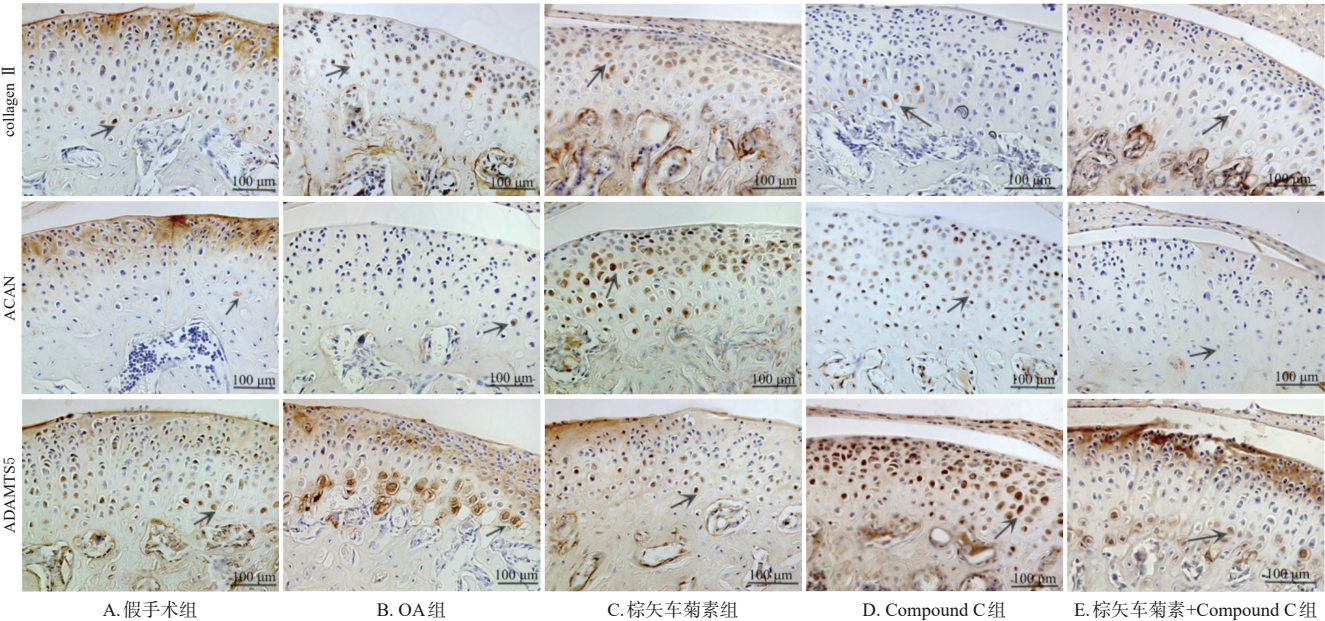


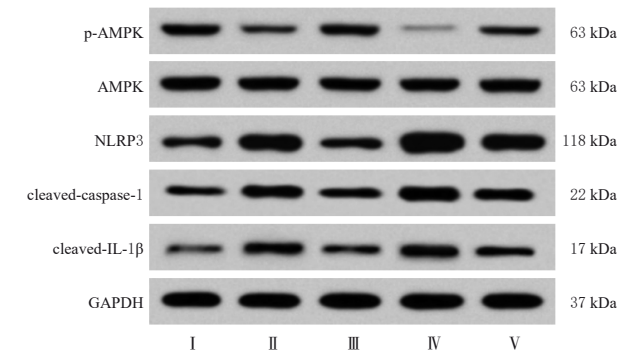
图3 各组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN、ADAMTS5蛋白表达的免疫组化染色图

表3 各组大鼠膝关节软骨组织中 collagen II、ACAN、ADAMTS5蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	collagen II	ACAN	ADAMTS5
假手术组	1.02±0.03	0.95±0.06	1.00±0.02
OA组	0.36±0.02 ^a	0.47±0.03 ^a	1.54±0.08 ^a
棕矢车菊素组	0.89±0.07 ^b	0.73±0.06 ^b	1.15±0.06 ^b
Compound C组	0.13±0.01 ^b	0.29±0.02 ^b	1.78±0.09 ^b
棕矢车菊素+Compound C组	0.55±0.04 ^c	0.58±0.03 ^c	1.39±0.08 ^c

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与OA组比较, $P<0.05$; c: 与棕矢车菊素组比较, $P<0.05$ 。

caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$), 而Compound C组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著降低, NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$); 与棕矢车菊素组比较, 棕矢车菊素+Compound C组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著降低, NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图4和表4。



I: 假手术组; II: OA组; III: 棕矢车菊素组; IV: Compound C组; V: 棕矢车菊素+Compound C组。

图4 各组大鼠膝关节软骨组织中 AMPK/NLRP3 信号通路相关蛋白的电泳图

表4 各组大鼠膝关节软骨组织中 AMPK/NLRP3 信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p-AMPK/AMPK	NLRP3/GAPDH	cleaved-caspase-1/GAPDH	cleaved-IL-1 β /GAPDH
假手术组	0.92±0.06	0.52±0.04	0.38±0.03	0.15±0.01
OA组	0.35±0.03 ^a	1.26±0.09 ^a	1.15±0.11 ^a	0.80±0.07 ^a
棕矢车菊素组	0.78±0.06 ^b	0.68±0.05 ^b	0.49±0.04 ^b	0.29±0.02 ^b
Compound C组	0.14±0.01 ^b	1.61±0.14 ^b	1.50±0.13 ^b	0.91±0.08 ^b
棕矢车菊素+Compound C组	0.56±0.05 ^c	0.91±0.07 ^c	0.77±0.07 ^c	0.46±0.04 ^c

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与OA组比较, $P<0.05$; c: 与棕矢车菊素组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

OA是最常见的关节疾病, 由于人口老龄化, OA的负担成为了全球主要的社会经济问题^[12]。随着OA病情的进展, 会出现严重的软骨退化、关节肿胀和疼痛等症状^[13]。本研究通过改良Hulth法建立了OA大鼠模型, 结果显示, 与假手术组比较, OA组大鼠膝关节肿胀度显著升高, 软骨组织有缺损, 部分软骨基质染色较浅, 软骨细胞数量减少, 膝关节软骨Mankin评分显著升高, 表明OA大鼠存在关节肿胀及膝关节软骨损伤, 符合OA的特征。越来越多的证据表明了炎症在OA中的核心作

用^[14]。TNF- α 、IL-18、IL-6是常见的促炎细胞因子, 在加重炎症反应方面发挥着重要的作用^[15]。本研究结果显示, OA组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著高于假手术组, 表明OA大鼠存在炎症反应。棕矢车菊素已被证明具有抗氧化、抗炎和免疫抑制特性^[16]。已有研究报道, 棕矢车菊素可抑制脂多糖所致急性肺损伤小鼠的炎症反应^[17]。本研究结果显示, 棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中TNF- α 、IL-18、IL-6水平均显著低于OA组, 表明棕矢车菊素可抑制OA大鼠炎症反应。

有研究显示, OA的发生与细胞外基质降解增强有关, 细胞外基质蛋白赋予细胞生物力学特性, 维持细胞表型并介导组织修复^[18]。collagen II和ACAN是细胞外基质的主要成分, 是维持软骨细胞表型所必需的成分, 可被ADAMTS5降解, 进而诱导软骨细胞失去正常表型, 导致软骨损伤^[19]。本研究结果显示, 棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中collagen II、ACAN蛋白表达显著高于OA组, ADAMTS5蛋白表达显著低于OA组, 表明棕矢车菊素可抑制OA大鼠细胞外基质降解。

AMPK几乎存在于哺乳动物的所有组织和细胞中, 其在调节能量和物质代谢方面起着至关重要的作用, 可参与各种生物学功能, 如炎症反应。NLRP3炎症小体活化后促使caspase-1活化, 随后切割IL-1 β 及IL-18前体, 产生具有生物活性的IL-1 β 及IL-18, 并释放到细胞外; 激活的AMPK可抑制NLRP3炎症小体激活, 进而下调下游IL-18等炎症因子的分泌, 抑制机体炎症反应^[20]。据报道, 通过激活AMPK信号通路抑制NLRP3炎症小体的激活, 可缓解脊髓损伤大鼠的炎症反应^[21]。本研究结果显示, 与假手术组比较, OA组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著降低, NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高; 与OA组比较, Compound C组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著降低, NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高, 表明AMPK/NLRP3信号通路参与了大鼠OA过程。此外, 与OA组比较, 棕矢车菊素组大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平显著升高, NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低, 表明棕矢车菊素可上调OA大鼠膝关节软骨组织中AMPK蛋白磷酸化水平且下调NLRP3、cleaved-caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达, 提示棕矢车菊素可能通过调控AMPK/NLRP3信号通路来抑制OA大鼠炎症反应及细胞外基质降解。为了验证上述结果的合理性, 本研究考察了AMPK抑制剂Compound C对棕矢车菊素上述抑制作用的影响, 结果显示, Compound C逆转了棕矢车菊素对OA大鼠炎症反应及细胞外基质降解的抑制作用, 进一步表明棕矢车菊素可能通过激活AMPK抑制NLRP3信号通路来抑制OA大鼠炎症反应及细胞外基质降解。

综上所述,棕矢车菊素可能通过调控 AMPK/NLRP3 信号通路来抑制 OA 大鼠炎症反应及细胞外基质降解。

参考文献

- [1] MORAIS S V, MENDONÇA P G, VASCONCELOS C C, et al. Cuminaldehyde effects in a MIA-induced experimental model osteoarthritis in rat knees[J]. *Metabolites*, 2023, 13(3):397.
- [2] GAN D H, TAO C, JIN X W, et al. Piezo1 activation accelerates osteoarthritis progression and the targeted therapy effect of artemisinin[J]. *J Adv Res*, 2024, 62: 105-117.
- [3] ZHANG Z W, WANG S, LIU X Q, et al. Secoisolariciresinol diglucoside ameliorates osteoarthritis via nuclear factor-erythroid 2-related factor-2/nuclear factor kappa B pathway: *in vitro* and *in vivo* experiments[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114964.
- [4] CUI X, WANG M F, LI H, et al. Tenacissoside G alleviated osteoarthritis through the NF- κ B pathway both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Immunol Lett*, 2023, 258: 24-34.
- [5] NAGEEN B, RASUL A, HUSSAIN G, et al. Jaceosidin: a natural flavone with versatile pharmacological and biological activities[J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27 (4) : 456-466.
- [6] LEE H, JANG D, JEON J, et al. Seomae mugwort and jaceosidin attenuate osteoarthritic cartilage damage by blocking I κ B degradation in mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14):8126-8137.
- [7] JIANG X L, LU Z J, ZHANG Q, et al. Osthole: a potential AMPK agonist that inhibits NLRP3 inflammasome activation by regulating mitochondrial homeostasis for combating rheumatoid arthritis[J]. *Phytomedicine*, 2023, 110: 154640.
- [8] 蔡猛, 陈文恒, 徐琳琳, 等. 基于 AMPK/ULK1 介导的自噬通路探究牛蒡子苷元对骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡的影响[J]. *中国药学杂志*, 2023, 58(20): 1839-1848.
- CAI M, CHEN W H, XU L L, et al. Effect of arctigenin on chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis rats based on AMPK/ULK1-mediated autophagy pathway[J]. *Chin Pharm J*, 2023, 58(20): 1839-1848.
- [9] 汤洁, 李烨, 胡勇, 等. 瑞香素调节 MCP-1/CCR2 通路对骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(12): 1731-1736.
- TANG J, LI Y, HU Y, et al. Effect of daphnetin on pyroptosis of chondrocytes in osteoarthritis rats by regulating the MCP-1/CCR2 pathway[J]. *Chin J Osteoporos*, 2024, 30(12): 1731-1736.
- [10] 邓宏哲, 陈昆, 李鹏, 等. 人参皂苷 Rg₃ 通过调控 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡抑制大鼠肺纤维化研究[J]. *中草药*, 2023, 54(3): 841-848.
- DENG H Z, CHEN K, LI P, et al. Ginsenoside Rg₃ inhibits pulmonary fibrosis in rats by regulating AMPK/NLRP3 pathway-mediated pyroptosis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(3): 841-848.
- [11] 徐田杰, 樊佳欣, 郭小玲, 等. 二甲双胍抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路保护骨关节炎模型大鼠关节软骨[J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(5): 1003-1012.
- XU T J, FAN J X, GUO X L, et al. Metformin exerts a protective effect on articular cartilage in osteoarthritis rats by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *CJTER*, 2025, 29(5): 1003-1012.
- [12] KAWATA M, MCCLATCHY D B, DIEDRICH J K, et al. Mocetinostat activates Krüppel-like factor 4 and protects against tissue destruction and inflammation in osteoarthritis[J]. *JCI Insight*, 2023, 8(17): e170513.
- [13] ZHAO X Y, DUAN B Q, WU J N, et al. Bilirubin ameliorates osteoarthritis via activating Nrf2/HO-1 pathway and suppressing NF- κ B signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(7): e18173.
- [14] KNIGHTS A J, REDDING S J, MAERZ T. Inflammation in osteoarthritis: the latest progress and ongoing challenges [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2023, 35(2): 128-134.
- [15] WANG X Y, PENG Z P, WANG L, et al. *Cordyceps militaris* solid medium extract alleviates lipoteichoic acid-induced MH-S inflammation by inhibiting TLR2/NF- κ B/NLRP3 pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15519.
- [16] LIU Y Z, ZHOU L Y, DU B B, et al. Protection against doxorubicin-related cardiotoxicity by jaceosidin involves the Sirt1 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9984330.
- [17] HUANG X L, WEI X C, GUO L Q, et al. The therapeutic effects of Jaceosidin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 140 (3) : 228-235.
- [18] ZHUANG H M, REN X S, JIANG F Z, et al. Indole-3-propionic acid alleviates chondrocytes inflammation and osteoarthritis via the AhR/NF- κ B axis[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 17.
- [19] WANG Z Y, SHI W M, WU L H, et al. TMF inhibits extracellular matrix degradation by regulating the C/EBP β /ADAMTS5 signaling pathway in osteoarthritis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116501.
- [20] ZHANG J, HUANG L L, SHI X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 24270-24287.
- [21] GUO R, GAO S T, FENG Y, et al. Ulinastatin attenuates spinal cord injury by targeting AMPK/NLRP3 signaling pathway[J]. *J Chem Neuroanat*, 2022, 125: 102145.

(收稿日期: 2024-08-12 修回日期: 2025-01-09)

(编辑: 邹丽娟)