

· 论著 ·

吴茱萸碱调节Shh/Gli1信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响

涂仕娟¹, 杨红亚¹, 李桃², 梁雪梅³

(1. 成都中医药大学基础医学院病原生物学与免疫学教研室, 成都 610075; 2. 成都市温江区中医医院治未病科, 成都 611130; 3. 西南医科大学附属医院心内科, 成都 646000)

摘要 **目的** 探讨吴茱萸碱(Evo)对膝骨关节炎(KOA)大鼠软骨损伤的影响及其作用机制。**方法** 将60只大鼠随机分为对照组、模型组、Evo低剂量组、Evo中剂量组、Evo高剂量组、激活剂(Shh/Gli1信号通路激活剂Purmorphamine)+Evo高剂量组, 每组10只。构建大鼠KOA模型, 并对各组给予相应药物干预。对大鼠进行行为学观察及Lequesne MG评分, 苏木素伊红(HE)染色和番红O-固绿染色观察大鼠软骨组织病理变化及Mankin评分, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平, dUTP缺口末端标记(TUNEL)法检测软骨细胞凋亡, 免疫组织化学检测II型胶原蛋白(CII)、基质金属蛋白酶13(MMP13)蛋白表达, Western blotting检测Shh、Smo、Ptc1、Gli1蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠出现活动障碍、软骨组织损伤严重, Lequesne MG评分、Mankin评分、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平、软骨细胞凋亡率、MMP13蛋白表达及Shh、Smo、Ptc1、Gli1蛋白水平显著升高, CII蛋白表达降低($P < 0.05$); 与模型组相比, Evo低、中、高剂量组大鼠活动障碍、软骨组织受损减轻, Lequesne MG评分、Mankin评分、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平、软骨细胞凋亡率、MMP13蛋白表达及Shh、Smo、Ptc1、Gli1蛋白水平显著下降, CII蛋白表达升高($P < 0.05$); Shh/Gli1信号通路激活剂逆转Evo高剂量对KOA大鼠软骨损伤的改善作用。**结论** Evo可能通过抑制Shh/Gli1信号通路减轻KOA大鼠炎症反应和软骨细胞凋亡, 改善软骨损伤。

关键词 膝骨关节炎; 软骨损伤; 吴茱萸碱; Shh/Gli1信号通路

中图分类号 R684.3 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2024)09-0827-07

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240909.1652.006>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.09.011

Effect of evodiamine on cartilage damage in knee osteoarthritis model rats by regulating the Shh/Gli1 signaling pathway

TU Shijuan¹, YANG Hongya¹, LI Tao², LIANG Xuemei³

(1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Preventive Medicine Department, Chengdu Wenjiang District Chinese Medicine Hospital, Chengdu 611130, China; 3. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Chengdu 646000, China)

Abstract **Objective** To investigate the effect of evodiamine (Evo) on cartilage damage in knee osteoarthritis (KOA) model rats and analyze its mechanism of action. **Methods** Sixty rats were randomly divided into control, model, low-dose Evo, medium-dose Evo, high-dose Evo, and activator (Shh/Gli1 signaling pathway activator purmorphamine) + high-dose Evo groups, with 10 rats per group. A rat KOA model was constructed, and the corresponding drug interventions were administered to each group. Behavioral observations and Lequesne MG scores were conducted among rats in each group. Hematoxylin & eosin staining and safranin O-fixed green staining were applied to observe the pathological changes and Mankin score of rat cartilage tissue. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) were applied to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), while dUTP nick end labeling was applied to detect chondrocyte apoptosis. Immunohistochemistry was applied to detect the expression of type II collagen (CII) and matrix metalloproteinase 13 (MMP13) proteins, and Western blotting was applied to detect the expression of Shh, Smo, Ptc1, and Gli1 proteins. **Results** The rats in the model group showed movement disorders and severe cartilage tissue damage compared with the control group. The Lequesne MG score, Mankin score, IL-1 β , IL-18, and TNF- α levels, chondrocyte apoptosis rate, MMP13 protein expression, and Shh, Smo, Ptc1, and Gli1 protein levels obviously increased, while the CII protein expression decreased ($P < 0.05$) compared with the model group. The activity disorders and cartilage tissue damage in rats in the low, medium, and high dose Evo groups were alleviated, the Lequesne MG

基金项目: 四川省医学(青年创新)科研课题(S21007)

作者简介: 涂仕娟(1993-), 女, 硕士研究生.

通信作者: 李桃, E-mail: 285959610@qq.com

收稿日期: 2023-09-14

网络出版时间: 2024-09-10 15:44:52

score, Mankin score, IL-1 β , IL-18, TNF- α levels, chondrocyte apoptosis rate, MMP13 protein expression, and Shh, Smo, Ptc1, and Gli1 protein levels were obviously decreased, the C II protein expression increased ($P < 0.05$); while the Shh/Gli1 signaling pathway activator reversed the improvement effect of high-dose Evo on cartilage damage in KOA rats. **Conclusion** Evodiamine may reduce the inflammatory response and chondrocyte apoptosis in KOA rats by inhibiting the Shh/Gli1 signaling pathway, thereby improving cartilage damage.

Keywords knee osteoarthritis; cartilage injury; evodiamine; Shh/Gli1 signaling pathway

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是由多种因素引起的慢性退行性关节疾病,主要临床表现为关节软骨丧失、软骨下骨硬化、囊肿形成、骨赘形成、慢性疼痛、僵硬和下肢残疾等,严重影响患者的生活质量^[1]。近年来,KOA的发病率显著增加,在65岁以上的人群中KOA的发病率已超过80%^[2]。年龄、性别、肥胖、创伤和遗传等因素均会导致KOA的发生发展,但其确切发病机制尚未完全阐明。研究^[3]表明,关节软骨的破坏可能是KOA的关键发病机制,主要由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢紊乱引起,当炎症反应发生时,内环境平衡被破坏,导致软骨损伤的发生,并加速软骨侵蚀和KOA的发展。目前,KOA常用的治疗方法包括手术关节置换术、注射透明质酸、环氧合酶抑制剂和非甾体抗炎药等,但这些治疗方法仅能缓解部分疼痛,还可能引发严重的并发症^[4]。因此,探索有效和安全的治疗措施来预防KOA具有重要意义。

吴茱萸碱(evodiamine, Evo)是吴茱萸的主要成分,具有抗炎、抗肿瘤、抗肥胖等多种生物学作用。研究^[5]发现,Evo能够通过抑制滑膜炎减轻佐剂诱导的大鼠关节炎。Sonic Hedgehog(Shh)通路在胚胎发生、器官发生和组织稳态中发挥着重要作用,通过与其受体Patched(Ptc)结合,激活Hedgehog(Hh)信号通路,从而导致Gli家族锌指蛋白1(Gli family zinc finger 1, Gli1)转录因子的激活和下游靶基因的转录^[6]。Shh/Gli1信号级联与关节炎的发生相关,抑制Shh/Gli1信号通路可提高软骨细胞体外活力,减轻关节炎^[7]。然而,Evo对KOA大鼠软骨损伤的改善作用与Shh/Gli1信号通路是否相关,尚不完全清楚。基于此,本研究通过构建KOA大鼠模型,探讨Evo对KOA大鼠软骨损伤的治疗作用及机制,为临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周雄性SD大鼠60只,体重220~250 g,购自

成都药康生物科技有限公司,生产许可证号SCXK(川)2020-0034,动物饲养于成都中医药大学,使用许可证号SYXK(川)2019-0049,置于温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度(55 \pm 10)%、光暗周期12 h的房间。本研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 主要药物、试剂与仪器

Evo(分子式C₁₉H₁₇N₃O,分子量303.36,纯度>98%,大连美仑生物技术有限公司);木瓜蛋白酶(上海源叶生物科技有限公司);Purmorphamine(上海碧云天公司);苏木素-伊红染色液(hematoxylineosin, HE)(上海江莱生物科技有限公司);白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒、番红O-固绿(北京索莱宝科技有限公司);IL-18、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(上海酶研生物科技有限公司);dUTP缺口末端标记(TUNEL)凋亡试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司);一抗II型胶原蛋白(collagen type II, C II)、基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)、Shh、Gli1、Ptc1、平滑受体蛋白(smooth receptor protein, Smo)和三磷酸-甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(英国Abcam公司);二抗(艾美捷科技有限公司)。全自动酶标仪(美国clover公司);光学显微镜(日本Nikon公司);蛋白电泳仪(美国伯乐公司)。

1.3 分组、建模与给药

将60只大鼠随机分为对照组、模型组、Evo低剂量组、Evo中剂量组、Evo高剂量组、激活剂(Shh/Gli1信号通路激活剂Purmorphamine)+Evo高剂量组,每组10只。选取除对照组外的50只大鼠采用木瓜蛋白酶法构建KOA模型^[8],将4%木瓜蛋白酶溶液与0.03 mol/L的L-半胱氨酸按2:1的比例混合后,取0.2 mL木瓜蛋白酶混合物注射至大鼠右膝关节腔,分别于第1、4和7天注射,共3次。对照组注射相同剂量的生理盐水。每天驱赶动物跑动,促进药物吸收,2周后大鼠出现明显易疲劳、关节红肿、活动僵硬、关节畸形等表明模型构建成功。

造模成功后,对Evo低、中、高剂量组和激活剂组分别给予药物干预,每天8时,Evo低、中、高剂量组给予各组大鼠10、20和40 mg/kg Evo灌胃^[5],激活剂+Evo高剂量组给予大鼠40 mg/kg Evo灌胃外,间隔0.5 h后腹腔注射Purmorphamine (10 mg/kg)^[9],对照组和模型组给予相同剂量的生理盐水,1次/d,连续2周。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 行为学观察及Lequesne MG评分:各组大鼠于治疗前和治疗后2周进行行为学观察及Lequesne MG评分^[10],主要包括疼痛刺激反应、步态反应、关节活动度和关节肿胀度4项。其中,疼痛刺激反应、步态反应、关节活动度为0~3分共4个等级,关节肿胀度为0~2分共3个等级。分值越高代表关节严重程度越高。

1.4.2 样本取材:给药结束后,大鼠右膝关节腔内注入0.2 mL生理盐水,活动关节后抽取冲洗液,离心取上清,-20℃保存备用。麻醉后颈椎脱臼法处死大鼠,无菌条件下手术切除大鼠右侧膝关节软骨组织。每组取5只大鼠软骨组织,用4%多聚甲醛固定,EDTA脱钙,脱水后用石蜡包埋,制成5 μm组织切片;另外5只大鼠软骨组织-80℃保存用于Western blotting检测。

1.4.3 HE染色和番红O-固绿染色观察大鼠软骨组织病理变化:取大鼠软骨组织石蜡切片,脱蜡至水后,按照HE染色试剂盒说明书、番红O-固绿染色说明书分别对大鼠进行染色,光学显微镜下观察软骨组织的形态。采用Mankin评分^[11]对关节软骨病变程度进行评估,包括软骨结构(0~5分)、软骨细胞(0~3分)、基质着色(0~4分)、潮汐线完整性(0~1分),评分越高代表关节退变越严重。

1.4.4 ELISA检测炎性细胞因子水平:取-20℃保存的关节液,按照ELISA试剂盒说明书检测关节液中IL-1β、IL-18和TNF-α水平。

1.4.5 TUNEL法检测软骨细胞凋亡:取大鼠软骨组织石蜡切片,脱蜡、脱水后与蛋白酶K反应15~30 min,50 μL TUNEL反应液培养1 h,50 μL转化剂POD培养30 min,DAB培养10 min,后经苏木精染色,经二甲苯透化,封片,在5个视野下观察。分析软骨细胞TUNEL阳性率。

1.4.6 免疫组织化学检测C II、MMP13蛋白表达:取大鼠软骨组织石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度甲醇进

行再水化,用3%过氧化氢室温封闭内源性过氧化物酶30 min,在4℃孵育一抗C II、MMP13(1:1 000)过夜,漂洗后,将玻片与二抗室温孵育1 h,使用DAB进行显影,复染、封片后在显微镜下观察。

1.4.7 Western blotting检测Shh/Gli1信号通路蛋白表达:将各组大鼠软骨组织与RIPA裂解液混合,研磨10~15 min,离心收集上清,用BCA蛋白测定试剂盒对蛋白进行定量,将样品在SDS-PAGE中进行电泳,分离蛋白条带,将蛋白从凝胶转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭2 h。将膜与一抗Shh、Smo、Ptch1、Gli1和GAPDH在4℃孵育过夜,然后与二抗孵育2 h。经增强化学发光剂处理后,通过Image J软件进行分析。

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用Tukey's事后检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Evo对各组大鼠行为学及Lequesne MG评分的影响

干预前,与对照组相比,模型组、Evo低剂量组、Evo中剂量组、Evo高剂量组、激活剂+Evo高剂量组大鼠Lequesne MG评分显著升高($P < 0.05$),大鼠出现跛行、活动障碍、关节肿胀、疼痛反应明显。干预后,与对照组相比,模型组大鼠Lequesne MG评分显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,Evo低、中、高剂量组大鼠Lequesne MG评分显著降低($P < 0.05$),关节肿胀、疼痛反应得到改善,无活动障碍;与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组Lequesne MG评分显著升高($P < 0.05$),活动障碍、关节肿胀、疼痛反应加重,见表1。

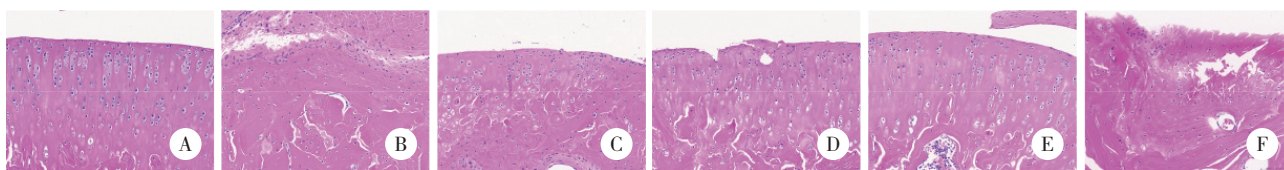
2.2 Evo对各组大鼠软骨组织病理变化的影响

HE染色结果显示,对照组软骨组织整体结构清晰,软骨细胞基本正常有序;模型组软骨变薄,整体结构紊乱,软骨表面凹陷,形成软骨缺损,软骨细胞减少;Evo低、中、高剂量组软骨加厚,整体结构相对清晰,软骨损伤减轻,软骨细胞增多,少数软骨细胞肥大、空泡化;激活剂+Evo高剂量组相比于Evo高剂量组软骨组织损伤加重,见图1。

表1 各组大鼠Lequesne MG评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.1 Comparison of Lequesne MG scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Lequesne MG scores	
	Before intervention	After intervention
Control	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Model	8.21 ± 1.04 ¹⁾	8.15 ± 0.86 ¹⁾
Evo-L	8.05 ± 0.98 ¹⁾	5.37 ± 0.59 ²⁾
Evo-M	8.14 ± 0.87 ¹⁾	4.26 ± 0.48 ²⁾
Evo-H	8.23 ± 0.96 ¹⁾	2.07 ± 0.29 ²⁾
Activator+Evo-H	8.09 ± 0.91 ¹⁾	6.68 ± 0.70 ³⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. model group; 3) $P < 0.05$ vs. Evo-H group.



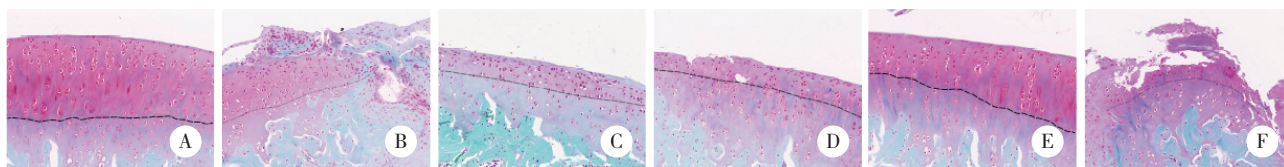
A, control group; B, model group; C, Evo-L group; D, Evo-M group; E, Evo-H group; F, activator+Evo-H group.

图1 各组大鼠软骨组织HE染色结果 × 200

Fig.1 Hematoxylin and eosin staining of rat cartilage tissue × 200

番红O-固绿染色结果显示,对照组软骨表层光滑,染色均匀,潮线完整而清晰;模型组软骨表层不光滑,表面结构受损,染色较浅,裂纹明显,潮线不

清;Evo低、中、高剂量组软骨浅表层较为光滑,染色相对均匀,潮线相对完整。激活剂+Evo高剂量组相比于Evo高剂量组软骨组织病变加重,见图2。



A, control group; B, model group; C, Evo-L group; D, Evo-M group; E, Evo-H group; F, activator+Evo-H group. The dotted line shows the position of the tidal line.

图2 各组大鼠软骨组织软番红O-固绿染色结果 × 200

Fig.2 Soft safranin O-fast green staining of rat cartilage tissue × 200

对照组、模型组、Evo低、中、高剂量组和激活剂+Evo高剂量组的Mankin评分依次为(0.30 ± 0.01)分、(8.86 ± 1.14)分、(4.72 ± 0.51)分、(3.25 ± 0.38)分、(2.19 ± 0.25)分、(7.35 ± 0.86)分。与对照组相比,模型组大鼠Mankin评分显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,Evo低、中、高剂量组Mankin评分显著下降($P < 0.05$);与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组Mankin评分显著升高($P < 0.05$)。

2.3 Evo对各组大鼠IL-1 β 、IL-18和TNF- α 水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠IL-1 β 、IL-18、TNF- α

水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,Evo低、中、高剂量组大鼠IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$);与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组大鼠IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$),见表2。

2.4 Evo对各组大鼠软骨细胞凋亡的影响

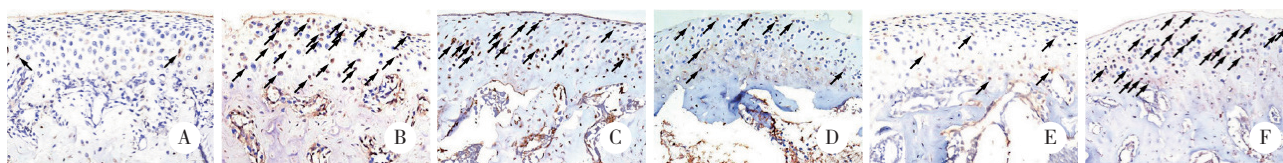
对照组、模型组、Evo低、中、高剂量组和激活剂+Evo高剂量组的软骨细胞凋亡率分别为(4.28 ± 0.57)%、(23.85 ± 2.58)%、(16.73 ± 1.82)%、(10.07 ± 1.24)%、(7.39 ± 0.83)%、(18.37 ± 2.06)%。与对照组相比,模型组大鼠软骨细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$);

与模型组相比,Evo低、中、高剂量组大鼠软骨细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组大鼠软骨细胞凋亡率水平显著升高($P < 0.05$),见图3。

表2 各组大鼠IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平比较 (pg/mL, $n = 10$)
Tab.2 Comparison of IL-1 β , IL-18, and TNF- α levels of the rats in each group (pg/mL, $n = 10$)

Group	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
Control	45.37 \pm 4.82	92.35 \pm 9.64	107.39 \pm 12.58
Model	92.47 \pm 10.13 ¹⁾	173.91 \pm 17.26 ¹⁾	282.57 \pm 30.65 ¹⁾
Evo-L	72.38 \pm 7.67 ²⁾	142.36 \pm 15.24 ²⁾	216.42 \pm 23.91 ²⁾
Evo-M	61.03 \pm 6.25 ²⁾	128.47 \pm 13.08 ²⁾	165.83 \pm 17.24 ²⁾
Evo-H	50.28 \pm 5.49 ²⁾	105.39 \pm 11.28 ²⁾	124.63 \pm 13.59 ²⁾
Activator+Evo-H	83.58 \pm 8.64 ³⁾	155.83 \pm 16.92 ³⁾	235.88 \pm 24.17 ³⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. model group; 3) $P < 0.05$ vs. Evo-H group.



A, control group; B, model group; C, Evo-L group; D, Evo-M group; E, Evo-H group; F, activator+Evo-H group. Arrow indicates apoptotic cells.

图3 各组大鼠软骨细胞凋亡情况 $\times 200$

Fig.3 Chondrocyte apoptosis of the rats in each group $\times 200$

2.5 Evo对各组大鼠C II、MMP13蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠C II蛋白表达降低,MMP13蛋白表达升高;与模型组相比,Evo低、中、高

剂量大鼠C II蛋白表达升高,MMP13蛋白表达降低;与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组大鼠C II蛋白表达降低,MMP13蛋白表达升高,见图4。

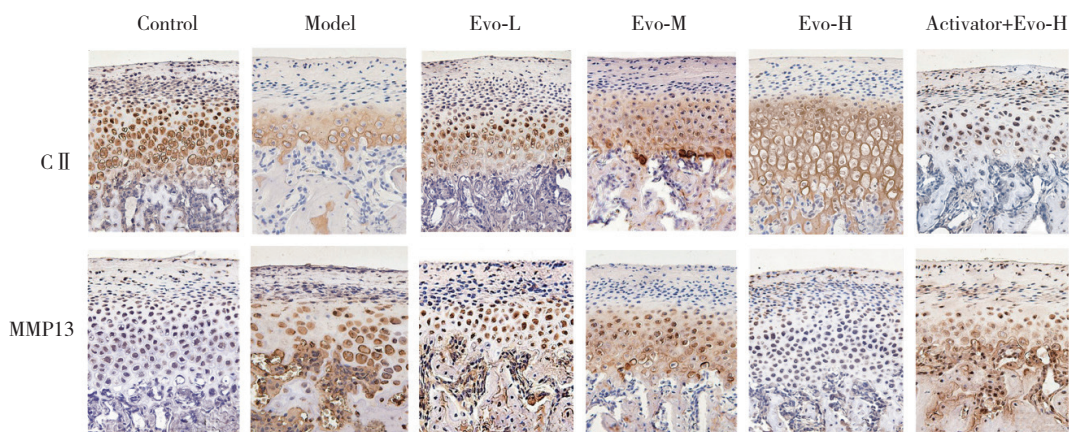


图4 各组大鼠C II、MMP13蛋白表达情况 $\times 200$

Fig.4 Expression of CII and MMP13 proteins of the rats in each group $\times 200$

2.6 Evo对各组大鼠Shh/Gli1信号通路蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠Shh、Smo、Ptch1、Gli1蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,

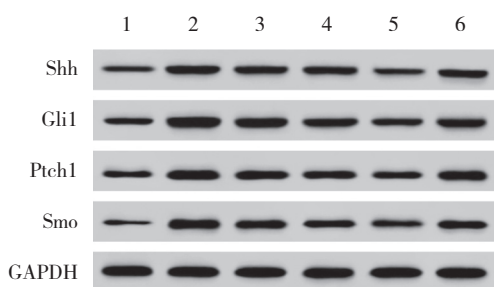
Evo低、中、高剂量组大鼠Shh、Smo、Ptch1、Gli1蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与Evo高剂量组相比,激活剂+Evo高剂量组大鼠Shh、Smo、Ptch1、Gli1蛋白表达显著升高($P < 0.05$),见表3、图5。

表3 各组大鼠Shh/Gli1信号通路蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.3 Comparison of the Shh / Gli1 signaling pathway protein expression of the rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Group	Shh	Smo	Ptch1	Gli1
Control	0.35 ± 0.04	0.52 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.22 ± 0.03
Model	0.88 ± 0.09 ¹⁾	1.28 ± 0.13 ¹⁾	1.03 ± 0.10 ¹⁾	0.83 ± 0.09 ¹⁾
Evo-L	0.61 ± 0.06 ²⁾	0.93 ± 1.08 ²⁾	0.85 ± 0.09 ²⁾	0.65 ± 0.07 ²⁾
Evo-M	0.50 ± 0.06 ²⁾	0.75 ± 0.08 ²⁾	0.62 ± 0.07 ²⁾	0.42 ± 0.04 ²⁾
Evo-H	0.39 ± 0.04 ²⁾	0.57 ± 0.06 ²⁾	0.48 ± 0.05 ²⁾	0.28 ± 0.03 ²⁾
Activator+Evo-H	0.75 ± 0.08 ³⁾	0.82 ± 0.09 ³⁾	0.88 ± 0.09 ³⁾	0.68 ± 0.07 ³⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. model group; 3) $P < 0.05$ vs. Evo-H group.



1, control group; 2, model group; 3, Evo-L group; 4, Evo-M group; 5, Evo-H group; 6, activator+Evo-H group.

图5 各组Shh/Gli1信号通路蛋白表达

Fig.5 Shh/Gli1 signaling pathway proteins in each group

3 讨论

KOA的临床表现为关节软骨变性、滑膜炎和软骨损伤,是中老年人群的主要致残性疾病^[1]。目前,尚缺乏有效的治疗方法^[12],迫切需要寻求新的KOA治疗手段。木瓜蛋白酶作为构建KOA的常用方法,具有成功率高、可重复等优点^[13]。本研究采用膝关节注射木瓜蛋白酶法构建KOA大鼠,发现大鼠出现活动障碍、关节肿胀、疼痛反应等症状,且Lequesne MG评分和Mankin评分显著升高,表明大鼠KOA模型构建成功。

研究^[14]认为,软骨细胞和炎症为KOA进展的重要因素,软骨细胞在应激环境中分泌IL-1 β 、IL-18和TNF- α 等促炎细胞因子,促炎细胞因子可诱导EMC降解,抑制蛋白多糖和胶原合成,破坏膝关节内环境稳态,诱导软骨细胞凋亡,加剧KOA的发展和软骨损伤的发生。本研究发现模型组大鼠IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平、软骨细胞凋亡率、MMP13蛋白表达显著升高,C II 蛋白表达降低,表明KOA中的炎症反应能够诱导基质破坏酶MMP13的产生和胶原蛋白C II 降解,引起软骨降解和软骨损伤。Evo在抗炎、抗细

胞凋亡等方面作用显著。KUAI等^[15]研究发现,Evo通过减少促炎细胞因子的产生,促进MMP13下调和C II 上调,进而减轻脂多糖诱导的椎间盘退行性变。XIAN等^[16]发现Evo通过抑制IL-1 β 刺激的MMP-13蛋白表达,增加细胞Col- II 的产生,表现出良好的抗关节炎活性。此外,Evo还对痛风性关节炎^[17]、佐剂性关节炎^[5]表现出抗炎特性。本研究结果显示,Evo干预后,KOA大鼠活动障碍、软组织受损均减轻,Lequesne MG评分、Mankin评分、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平、软骨细胞凋亡率、MMP13表达下降,C II 表达升高。表明Evo可能通过减少炎症反应,抑制MMP表达和软骨细胞,促进胶原蛋白C II 合成,进而改善KOA大鼠软骨损伤。

Shh的异常活化参与多种疾病的炎症和免疫反应^[18]。已有研究^[19]表明,Shh信号通路的激活可以诱导人骨关节炎软骨间充质基质细胞衰老和软骨细胞凋亡,参与骨关节的破坏。此外,Shh可通过促进类风湿性关节炎中成纤维细胞样滑膜细胞的增殖和迁移,促进软骨的骨破坏^[20]。在炎症性疾病中,Shh通过与Ptch结合,减弱Ptch对Smo的抑制作用,激活下游核转录因子Gli家族,加重炎症反应。WAN等^[21]发现,层黏连蛋白 α 4通过靶向Shh/Gli1通路调节关节成纤维细胞的增殖和迁移,导致膝关节纤维化的发展。SONG等^[7]也发现,Hh信号通路抑制剂可降低关节炎软骨细胞中Shh/Gli1通路蛋白的表达,抑制软骨细胞的凋亡,改善关节炎。本研究结果显示,模型组大鼠Shh、Smo、Ptch1、Gli1表达升高。Evo已被发现能够降低Hh信号通路中Shh、Gli1、Smo等多种蛋白的表达,诱导结直肠癌细胞凋亡^[22]。本研究发现,Evo干预后Shh、Smo、Ptch1、Gli1表达降低。Evo可能通过抑制Shh/Gli1信号通路

改善KOA大鼠软骨损伤和炎症反应。Shh/Gli1信号通路激活剂Purmorphamine干预大鼠后,可逆转Evo高剂量对KOA大鼠软骨损伤、炎症反应和细胞凋亡的改善作用。

综上所述,Evo可能通过抑制Shh/Gli1信号通路减少KOA大鼠炎症反应和软骨细胞凋亡,从而改善软骨损伤。

参考文献:

- [1] JANG S, LEE K, JU JH. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (5) : 2619. DOI: 10.3390/ijms22052619.
- [2] XIAO YC, DING L, YIN SJ, et al. Relationship between the pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes and HMGB1 secretion in knee osteoarthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23 (2) : 97. DOI: 10.3892/mmr.2020.11736.
- [3] DUAN A, SHEN K, LI BC, et al. Extracellular vesicles derived from LPS-preconditioned human synovial mesenchymal stem cells inhibit extracellular matrix degradation and prevent osteoarthritis of the knee in a mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12 (1) : 427. DOI: 10.1186/s13287-021-02507-2.
- [4] YANG WT, KE CY, YEH KT, et al. Stromal-vascular fraction and adipose-derived stem cell therapies improve cartilage regeneration in osteoarthritis-induced rats [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1) : 2828. DOI: 10.1038/s41598-022-06892-3.
- [5] ZHANG H, YIN L, LU M, et al. Evodiamine attenuates adjuvant-induced arthritis in rats by inhibiting synovial inflammation and restoring the Th17/Treg balance [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72 (6) : 798-806. DOI: 10.1111/jphp.13238.
- [6] KE B, WANG XN, LIU N, et al. Sonic hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates cell migration and invasion via induction of epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (13) : 3932-3943. DOI: 10.7150/jca.42900.
- [7] SONG XB, ZHANG B, WANG TR, et al. Effects of cyclopamine on the viability of articular chondrocytes in rats with adjuvant arthritis in vitro [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2020, 50 (1) : 85-91.
- [8] 张燕珍, 梁超, 鲍春龄, 等. 壮医药线灸通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调节MMP对膝骨性关节炎大鼠的治疗作用[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (1) : 111-115. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.01.026.
- [9] GUPTA R, MEHAN S, SETHI P, et al. Smo-shh agonist purmorphamine prevents neurobehavioral and neurochemical defects in 8-OH-DPAT-induced experimental model of obsessive-compulsive disorder [J]. *Brain Sci*, 2022, 12 (3) : 342. DOI: 10.3390/brainsci12030342.
- [10] LI JR, ZHU XB, SHAO Q, et al. Allogeneic adipose-derived stem cell transplantation on knee osteoarthritis rats and its effect on MMP-13 and DDR2 [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18 (1) : 99-104. DOI: 10.3892/etm.2019.7554.
- [11] KUROKI H, NAKAGAWA Y, MORI K, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6 (6) : R492-R504. DOI: 10.1186/ar1219.
- [12] AKALTUN MS, ALTINDAG O, TURAN N, et al. Efficacy of high intensity laser therapy in knee osteoarthritis: a double-blind controlled randomized study [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40 (5) : 1989-1995. DOI: 10.1007/s10067-020-05469-7.
- [13] YAO N, CHEN GC, LU YY, et al. Bushen Qiangjin capsule inhibits the Wnt/ α -catenin pathway to ameliorate papain-induced knee osteoarthritis in rat [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41 (6) : 935-942. DOI: 10.19852/j.cnki.jtcm.2021.06.010.
- [14] LI J, JIANG MQ, YU ZT, et al. Artemisinin relieves osteoarthritis by activating mitochondrial autophagy through reducing TNFSF11 expression and inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling in cartilage [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27 (1) : 62. DOI: 10.1186/s11658-022-00365-1.
- [15] KUAI JB, ZHANG N. Upregulation of SIRT1 by evodiamine activates PI3K/AKT pathway and blocks intervertebral disc degeneration [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26 (2) : 265. DOI: 10.3892/mmr.2022.12781.
- [16] XIAN SY, LIN Z, ZHOU C, et al. The protective effect of evodiamine in osteoarthritis: an in vitro and in vivo study in mice model [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13 : 899108. DOI: 10.3389/fphar.2022.899108.
- [17] CHENG Y, HUANG XP, TANG Y, et al. Effects of evodiamine on ROS/TXNIP/NLRP3 pathway against gouty arthritis [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397 (2) : 1015-1023. DOI: 10.1007/s00210-023-02654-8.
- [18] DENG H, XIAO X, CHILUFYA MM, et al. Altered expression of the hedgehog pathway proteins BMP2, BMP4, SHH, and IHH involved in knee cartilage damage of patients with osteoarthritis and kashin-beck disease [J]. *Cartilage*, 2022, 13 (1) : 19476035221087706. DOI: 10.1177/19476035221087706.
- [19] FENG M, LIU WG, DING J, et al. Sonic hedgehog induces mesenchymal stromal cell senescence-associated secretory phenotype and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9 : 716610. DOI: 10.3389/fcell.2021.716610.
- [20] HU ZY, CHEN YD, ZHU SL, et al. Sonic hedgehog promotes proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via rho/ROCK signaling [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022 : 3423692. DOI: 10.1155/2022/3423692.
- [21] WAN Q, LIU F, ZHANG J, et al. Overexpression of laminin α 4 facilitates proliferation and migration of fibroblasts in knee arthrofibrosis by targeting canonical Shh/Gli1 signaling [J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62 (4) : 464-474. DOI: 10.1080/03008207.2020.1773451.
- [22] 孙强, 刘茂伦, 杨寒, 等. 吴茱萸碱通过调控Hedgehog信号通路诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡的研究[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38 (1) : 71-77. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2022.01.005.

(编辑 于 溪)