

石松碱改善前交叉韧带重建术后创伤后骨关节炎模型中的炎症反应和软骨损害

高松年¹, 李 民^{2*}, 张言午¹, 葛永亮³, 陆 辉⁴

(1. 南通市第三人民医院, 南通大学附属南通第三医院康复科, 江苏 南通 226006; 2. 南京中医药大学南通中西医结合临床医学院, 南通市第三人民医院, 南通大学附属南通第三医院科教科, 江苏 南通 226006; 3. 南通市第三人民医院, 南通大学附属南通第三医院烧伤科, 江苏 南通 226006; 4. 南通市第三人民医院, 南通大学附属南通第三医院骨科, 江苏 南通 226006)

摘要: [目的] 评估天然药物化学成分石松碱(LAs)在前交叉韧带重建(ACLR)术后创伤后骨关节炎(PTOA)兔模型中对炎症通路和软骨完整性的调节作用。[方法] 结合生物信息学方法与传统研究手段, 识别关键基因并预测干预效果。将兔模型分为正常组、对照组、LAs 组和生理盐水组(NS 组), 并进行 ACLR 手术。通过分析血清中的促炎细胞因子、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-13、解聚蛋白酶-4(ADAMTS-4)和 ADAMTS-5 的 mRNA 和蛋白水平来评估治疗效果。组织病理学变化通过苏木精-伊红染色和番红-固绿染色进行评估。[结果] LAs 组中促炎细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平显著下调($P < 0.05$); 同时, MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 软骨降解得到抑制。组织学评估结果与分子水平的表现一致, 显示 LAs 组的软骨保存情况和炎症减轻情况显著优于对照组。[结论] LAs 在干预 PTOA 进程中可以显著降低炎症标志物和软骨降解酶的表达水平。

关键词: 石松碱; 创伤后骨关节炎; 前交叉韧带重建; 炎症细胞因子; 软骨降解; 生物信息学分析

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2025)05-0875-11

Lycopodium alkaloids attenuate inflammatory reaction and cartilage damage in a post-traumatic osteoarthritis model following anterior cruciate ligament reconstruction

GAO Songnian¹, LI Min^{2*}, ZHANG Yanwu¹, GE Yongliang³, LU Hui⁴

(1. Department of Rehabilitation, Nantong Third People's Hospital, Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China; 2. Nantong Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Department of Science and Education, Nantong Third People's Hospital, Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China; 3. Department of Burn, Nantong Third People's Hospital, Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China; 4. Department of Orthopedics, Nantong Third People's Hospital, Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China)

Abstract: [Objective] This study investigates the anti-inflammatory effects of *Lycopodium* alkaloids (LAs) in a rabbit model of post-traumatic osteoarthritis (PTOA) following anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR). Using bioinformatics tools and

收稿日期: 2024-05-23 录用日期: 2024-11-02

基金项目: 南通市卫生健康委员会面上课题(MS2022065)

*通信作者: limin_nantong@outlook.com

引文格式: 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后骨关节炎模型中的炎症反应和软骨损害[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2025, 64(5): 875-885.

Citation: GAO S N, LI M, ZHANG Y W, et al. *Lycopodium* alkaloids attenuate inflammatory reaction and cartilage damage in a post-traumatic osteoarthritis model following anterior cruciate ligament reconstruction[J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2025, 64(5): 875-885. (in Chinese)



molecular analyses, we explore how LAs modulate key inflammatory pathways and cartilage integrity in the PTOA model. [Methods] Bioinformatics tools were first applied to predict key molecular markers and pathways related to PTOA following ACLR. Potential targets for intervention with LAs were identified from existing databases. Subsequently, 24 New Zealand rabbits were randomly assigned to four groups: normal, control, normal saline (NS), and LAs-treated groups. All but the normal control group underwent ACLR surgery to induce PTOA. The LAs group received topical applications of LAs solution, while the NS group was treated with saline, three times per week for four weeks. Serum levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits specific for rabbits. After the final treatment, blood samples were collected, centrifuged, and the serum was stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. mRNA levels of matrix metalloproteinases (MMP-1 and MMP-13), and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) enzymes (ADAMTS-4 and ADAMTS-5) were quantified using real-time quantitative PCR (RT-qPCR), with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) serving as the reference gene. Protein expression levels of these markers were assessed by Western blotting. Histological analysis of cartilage tissues was conducted using hematoxylin-eosin (HE) staining for general morphology and safranin O-fast green (SO/FG) staining to assess cartilage matrix integrity. The Krenn synovitis score and Mankin scoring system were used to evaluate the extent of inflammation and cartilage degradation, respectively. [Results] The LAs-treated group showed a marked decrease in pro-inflammatory cytokine levels compared to the control and NS groups. Levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the LAs-treated group decreased significantly ($P < 0.05$), and their levels decreased more in the LAs-treated group than in the NS group. Histopathological analysis revealed less cartilage degradation in the LAs-treated group, as confirmed by SO/FG staining, which demonstrated better preservation of proteoglycan content. HE staining further confirmed lower inflammatory cell infiltration and cartilage erosion in the LAs-treated group, indicating that LAs played a protective role against cartilage degradation. At the molecular level, mRNA expression of MMP-1, MMP-13, ADAMTS-4, and ADAMTS-5, which are key enzymes involved in cartilage breakdown, were significantly downregulated in the LAs-treated group ($P < 0.05$). Protein analysis through Western blot confirmed these findings, with the expression of these matrix-degrading enzymes being substantially lower in the LAs-treated group compared to the control group. The inhibition of these enzymes corresponded with the observed improvements in cartilage integrity. Additionally, the NS group showed a moderate reduction in inflammatory markers compared to the control, though not as significant as the LAs-treated group. [Conclusion] This study confirms the significant anti-inflammatory effects of LAs in a rabbit model of PTOA induced by ACLR. The findings revealed that LAs could effectively reduce the expression of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6 and TNF- α , which are critical mediators in inflammatory process. Furthermore, LAs treatment led to a downregulation of MMP-1, MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5, which play a key role in cartilage degradation. These molecular changes corresponded with the preservation of cartilage integrity, as evidenced by histological analyses, which showed less cartilage erosion and higher proteoglycan content in the LAs-treated group. The results suggest that LAs hold therapeutic potential not only for mitigating inflammation but also for preventing cartilage degradation in PTOA. By targeting both cytokine-mediated inflammation and matrix-degrading enzymes, LAs could provide a multifaceted approach to the treatment of PTOA. These findings provide a strong basis for further exploration of LAs as a non-invasive treatment option for patients with osteoarthritis, highlighting their ability to reduce inflammation and preserve joint function.

Keywords: *Lycopodium* alkaloid; post-traumatic osteoarthritis; anterior cruciate ligament reconstruction; inflammatory cytokine; cartilage degradation; bioinformatic analysis

骨关节炎(OA)是全球最常见的关节疾病,影响超过2.7亿人,是成年人致残的主要原因之一^[1]. 创伤后骨关节炎(PTOA)通常发生在关节内骨折、韧带撕裂或软骨损伤后^[2]. 前交叉韧带(ACL)损伤在高冲击运动(如足球、篮球、滑雪)中尤为常见^[3],不仅影响初次受伤部位,还会在手术重建后的对侧或同侧膝盖及重返运动时增加风险^[4]. ACL损伤通常需要手术干预,尽管手术技术不断改进,但手术仍是进展为PTOA的重要风险因素^[5]. 研究显示^[6]:约33%接受手术的患者在10年内会出现进展为PTOA的影像学

证据,约50%的患者在多年后确诊为PTOA. 这一过程中,术后炎症反应中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子水平升高可能加速关节退变,导致患者最终发展为PTOA^[7]. 目前,关节内皮质类固醇注射是常用的PTOA治疗方法. 该方法虽能暂时缓解疼痛,但可能加速软骨退化,并存在感染风险^[8-9];同时,注射的疗效通常在几周内减弱,因此需要频繁治疗,增加并发症风险. 石松碱(LAs)也称石松生物碱,是经典中药方剂“伤肢熏洗方”的关键活性成分,以其抗炎、抗菌和神经保护作用著称^[10]. 从石

松科(Lycopodiaceae)、石杉科(Huperziaceae)及其近缘植物中提取的化合物,具有相同的生物来源和相似的结构,骨架形式多样,通常由 16 个碳原子的吡啶环或吡啶酮环构成。Brossi 等^[11]将超过 120 种石松碱分为 4 类:石松碱类(*Lycopodine* alkaloids)、马钱子碱类(*Fawcettimine* alkaloids)、菊石碱类(*Huperzine* alkaloids)和海金沙碱类(*Serratinine* alkaloids)。LAs 最早由中国科学家从蛇足石杉[*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.]中分离得到^[12],其在神经退行性疾病中的治疗潜力已得到广泛认可,但在骨科领域的研究相对较少。因此,本研究旨在深入探讨 LAs 对 PTOA 的影响,重点研究其抗炎作用和软骨保护机制,以期为预防和治疗 OA 及 PTOA 提供新的见解和策略。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂与amp;仪器

不可吸收缝线(0 号线, Ethibond[®], 强生(中国)医疗器材有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(型号 G1120, 北京索莱宝科技有限公司),番红-固绿(SO/FG)染色试剂盒(型号 G1371, 北京索莱宝科技有限公司);兔 IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(型号 ab273237, 艾博抗(上海)贸易有限公司);兔 IL-6 ELISA 试剂盒(型号 ab277389, 艾博抗(上海)贸易有限公司);重组 TNF- α 抗体(型号 ab183218, 艾博抗(上海)贸易有限公司);TRIzol[™] 试剂(型号 15596018CN, Thermo Fisher Scientific, Inc.);放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(型号 MFCD02100484, Sigma-Aldrich LLC.);基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-13、解聚蛋白酶-4(ADAMTS-4)、ADAMTS-5、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)及其多克隆抗体(型号 26585-1-AP、18165-1-AP、11865-1-AP、11834-1-AP、60004-1-Ig, 武汉三鹰生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(型号 31460, Thermo Fisher Scientific, Inc.);逆转录试剂盒(型号 15596769CN, Thermo Fisher Scientific, Inc.);伸筋草饮片(南通三越中药饮片有限公司);超声波提取萃取仪(型号 Scientz-C, 宁波新芝生物科技股份有限公司);旋转蒸发仪(型号 RV10, 广州仪科实验室技术有限公司);智能熏蒸仪(型号 LXZ-200S, 杭州立鑫医疗器械有限公司)。

1.2 OA 基因表达失调的生物信息学分析

从 GSE232867 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE232867>)获取

正常形态和患有 OA 的兔髌状软骨细胞的基因表达数据,以保证分析的一致性。首先,使用 limma 包进行差异表达分析,采用 $|\log_2(\text{fold change})| > 1.5$ 和调整后的 $P < 0.05$ 的阈值识别 OA 中显著失调的基因。随后,通过受试者工作特征(ROC)曲线分析评估这些基因的诊断潜力,重点关注曲线下面积(AUC)。接着,使用最小绝对收缩和选择算子(LASSO)回归精炼基因选择,优化一个最小化过拟合并保持预测准确性的 λ 值。再使用注释可视化和集成发现(DAVID)数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路分析,用 Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行基因本体(GO)术语富集分析,以揭示差异表达基因的生物学意义。最后进行交集分析,确定 LASSO 选择集和通路分析中识别的关键基因,以便深入理解 OA 的分子基础。

1.3 实验方法

1.3.1 LAs 提取物的制备

磨碎干燥的伸筋草饮片后,精确称取 50 g 药物饮片粉末,用 1 L 60%(体积分数)甲醇溶液在室温下进行两次超声辅助提取,每次 50 min。合并提取液并过滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩,随后真空干燥,获得 5.2 g LAs 提取物,提取率为 10.4%。将提取物溶解于 0.05%(质量分数)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶剂中,配制成 0.1 g/mL 的溶液,用于动物实验。

1.3.2 动物分组、模型制备及 ACLR 手术

将 24 只新西兰兔(南通大学实验动物中心)随机分为 4 组,每组 6 只,使用随机数表进行分组:正常组、对照组、LAs 组和生理盐水(质量分数 0.9%的 NaCl 溶液)组(NS 组)。正常组不进行任何手术或给药,对照组在前交叉韧带重建(ACLR)术后只进行石膏固定治疗。LAs 组在 ACLR 术后使用智能熏洗仪进行 LAs 提取物的熏浴治疗。NS 组在 ACLR 后接受安慰剂 NS 熏洗治疗。所有实验用兔均在南通大学实验动物中心饲养。环境温度维持在 20~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50%~70%,并保持良好通风。实验开始前所有实验用兔进入为期一周的适应期,定时喂养饲料和纯净水,每日清理排泄物。

在手术前一天晚 6 点后开始禁食禁水。手术区域的毛发被剃除,准备清洁和消毒。手术仅在兔右膝进行,左膝不进行任何处理。使用 10%(体积分数)水合氯醛溶液和生理盐水混合制备麻醉剂。通过电子秤精

确称量兔的体质量,并根据 3~5 mL/kg 的剂量进行腹腔注射麻醉。

手术时,兔被置于俯卧位,在右膝跟腱旁开刀,切开皮肤暴露腱体,并精准切除约 2 cm 长的腱段。切除后,使用 0 号缝线对腱进行编织缝合。随后将兔子调整为仰卧位,在右膝髌骨外侧边缘依次切开皮肤、皮下组织及关节囊,开放关节腔。翻转髌骨并完全屈膝,以完全暴露 ACL,并予以切除。利用拉赫曼(Lachman)测试^[13]检验关节的稳定性。接着使用与腱直径相匹配的 Kirschner 钢丝在胫骨和股骨预定位置钻孔,角度尽可能贴近原 ACL 的附着点。通过隧道引导编织好的腱,并在隧道出口处缝合固定韧带的末端。多次进行 Lachman 测试确认膝关节的稳定性后,使用生理盐水彻底冲洗关节腔,再依次缝合关节囊、皮下组织及皮肤。术后用无菌纱布严密包扎手术区,并用全长石膏固定整个肢体,保持伸展位,以便观察下肢的温度、血液循环和肿胀情况,预防缺血性坏死的发生。手术后 3 d 内通过肌肉注射青霉素防止感染,两周后拆除缝线。

所有动物操作程序均获南通大学附属南通第三医院及南通大学实验动物中心伦理委员会批准(审批号:IACUC20230918-1005)。所有动物均按照国际实验动物评估和认可协会(AAALAC)的指导方针进行处理。基于人道主义考虑,实验结束后使用 100~200 mg/kg 剂量的戊巴比妥进行安乐死。

1.3.3 LAs 提取物干预

手术后第 4 天开始,将兔的石膏固定取下,在熏洗设备中放入已调制好的 LAs 提取物溶液,对 LAs 组兔的右膝关节进行熏洗治疗,持续时间 2 min;同时,NS 组兔则使用生理盐水进行熏洗,持续时间 2 min。熏洗过程中需注意调节温度,以防止局部烫伤。以上程序每周重复 3 次,连续进行 4 周。

1.3.4 滑膜和软骨组织染色及病理学评分

术后 4 周,从对照组和模型组(NS 和 LAs 组)中提取关节滑膜和软骨组织,经固定、脱钙后嵌入石蜡,制备 5 μm 厚的常规切片。进行 HE 染色和 SO/FG 染色。滑膜标本按照 Krenn 滑膜炎评分系统进行评分^[14],评分指标包括滑膜内膜增厚、炎症细胞浸润、基质细胞活化和血管增生,每项评分范围为 0~3 分,分值越高表明病理损伤越严重。软骨切片的评估依据国际骨关节炎研究学会(OARSI)的改良滑膜组织病理学评分方案^[15]和改良 Mankin 评分系统^[16]进行评分,Mankin 评分系统染色(0~6)级、结构

(0~11)级、软骨细胞密度(0~4)级和簇形成(0~3)分级,总分表明病理严重程度,分值越高创伤越严重。

1.3.5 ELISA 测定血清炎症因子

干预 4 周后,在最后一次治疗熏蒸后 24 h 收集兔血清样本,从边缘耳静脉抽取血液,室温下静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min。得到的血清被分装并保存在 -70 °C 下,直至分析。使用兔特异性 ELISA 试剂盒按照说明书测定 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的浓度。用微孔板阅读器测定吸光度,并根据标准曲线确定细胞因子浓度。

1.3.6 RNA 提取和逆转录

从对照组和 PTOA 模型兔的浅层区域和髌状软骨细胞中提取总 RNA。使用 TRIzol™ 试剂处理组织样本,按照说明书进行 RNA 提取。通过测量 260 和 280 nm 波长下的吸光度比值评估提取的 RNA 纯度和浓度,确保比值在 1.8~2.1 范围内,随后使用逆转录试剂盒按照说明书将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。

1.3.7 实时定量 PCR 分析(RT-qPCR)

使用 RT-qPCR 定量测定 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5、ADAMTS-16、降钙素受体(CALCR)和 G 蛋白亚基 α-14(GNA14)mRNA 的表达水平,以 GAPDH 作为内参基因。PCR 反应程序:95 °C 变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 25 s,共 45 个循环。使用特异性引物(表 1)扩增目标基因。

表 1 目标基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the target genes

目标基因	引物序列
MMP-1	正向:5'-CCACAGACCCAAAAGTGTG-3'
	反向:5'-GCCCCGATGTAGAACCTGTC-3'
MMP-13	正向:5'-TCCAGTTTGCAGAGAGCTACC-3'
	反向:5'-GACTGCATTTCTCGGAGCCT-3'
ADAMTS-4	正向:5'-GGACCAGTGCAAACCTCACCT-3'
	反向:5'-GCCATCTATCACCCGTGGTT-3'
ADAMTS-5	正向:5'-GGTCTTCTCGCCAAAGGTGA-3'
	反向:5'-CCAATAATGCCATCGCAGCC-3'
ADAMTS-16	正向:5'-CTGGAGAACGTGCAGATCCT-3'
	反向:5'-TGCAGCTTGTCAAAGGTGAC-3'
CALCR	正向:5'-ATGCCAGTGACAGGAACATC-3'
	反向:5'-CCAGGTAGTAGCGGTCAATG-3'

续表

目标基因	引物序列
GNA14	正向:5'-GAGCTCAAGGTGGAGATTGC-3'
	反向:5'-TCAGCTTCCTCTGGATGTCC-3'
GAPDH	正向:5'-ATGCTGGTGTCTGAGTATGTC-3'
	反向:5'-CAGATTCATTGTCGTACCAGG-3'

1.3.8 蛋白免疫印迹分析

从对照组和 PTOA 模型兔的浅层区域及髌状软骨细胞中提取总 RNA 后,使用 RIPA 裂解缓冲液进行组织均质化.均质物在 4 °C 下以 14 000 g 离心 15 min,随后收集上清液.利用 Bradford 法测定并定量上清液中的蛋白浓度.所得蛋白样本通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜.转膜后在室温下用 2%(质量分数)牛血清白蛋白封闭 1 h,减少非特异性结合.随后膜在 4 °C 下过夜与 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 和 GAPDH 的多克隆抗体孵育.次日,将膜与相应的 HRP 偶联二抗孵育 1 h.加入化学发光底物后,在凝胶成像系统中进行检测.使用 ImageJ v1.8.0 软件对蛋白条带强度进行定量分析,评估目标蛋白的相对表达水平.

1.4 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,定量数据以平均值±标准差的形式表示.各组 $n=6$,组内数据差异评估采用独立样本 t 检验,组间比较则使用配对样本 t 检验.分类数据以比例形式表示,并通过卡方检验进行分析. $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 差异基因表达分析和基因表达可视化

本研究在表层区细胞中共发现 729 个差异表达基因,在髌状软骨细胞中共发现 720 个差异表达基因,两种细胞类型共有 278 个重叠的差异表达基因[图 1(a)].可视化展示这些差异表达基因的分布,并按照仅在表层区细胞、仅在髌状软骨细胞和两者均有的进行分类[图 1(b)].

2.2 LASSO 回归分析和 ROC 分析诊断潜力

对 278 个差异表达基因进行 ROC 分析,以评估其诊断效用.结果显示有 239 个基因表现出较高的诊断潜力[AUC=1.0,图 1(c)],这些基因有望彻底改变

OA 的诊断.随后,通过 LASSO 回归分析进一步筛选出 55 个关键基因,使用最优正则化参数($\lambda_{\min}=0.064\ 974\ 56$)[图 1(d)],该参数通过交叉验证确定,以最小化模型误差,保证预测准确性.用 ROC 曲线评估该 LASSO 模型的准确性,确认其具有较高的特异性和敏感性[AUC=1.0,图 1(e)].

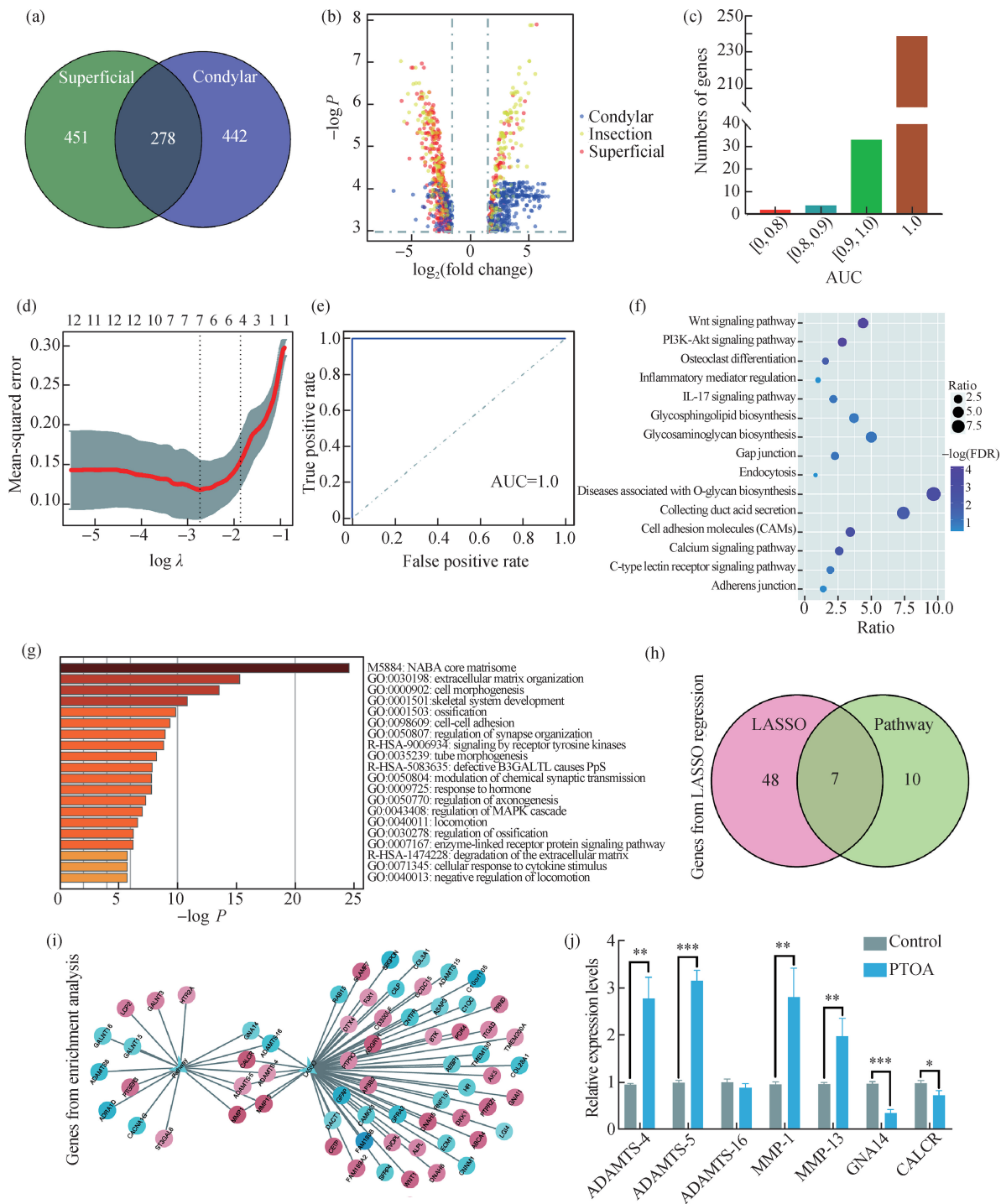
2.3 通路富集分析与交叉分析验证

对具有高诊断价值的 239 个基因进行通路富集分析.通过 DAVID 数据库进行的 GO 术语富集分析和 KEGG 通路分析显示,这些基因显著富集于与成骨分化和炎症相关的通路[图 1(f)].同时,通过 Metascape 数据库进行的 GO 分析表明这些基因在细胞外基质组织、骨骼系统发育和细胞因子反应等过程中富集[图 1(g)].整合 LASSO 回归和通路富集分析的结果,揭示由 LASSO 识别的 55 个基因与信号通路中富集的基因之间有重要交集.具体而言,发现了 7 个重叠基因[图 1(h)],即 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-16、ADAMTS-4、ADAMTS-5、CALCR 和 GNA14.它们的相互作用通过网络分析进一步得到验证[图 1(i)],展示出这些基因在细胞外基质重塑、炎症反应及软骨降解中的复杂关联.图中的节点代表基因,边表示它们之间的功能相互作用,揭示了它们在调控 PTOA 中的潜在作用.通过新西兰兔样本进行 RT-qPCR 确认,MMP-1($P=0.006\ 24$)、MMP-13($P=0.009\ 91$)、ADAMTS-4($P=0.002\ 17$)和 ADAMTS-5($P=0.000\ 076\ 76$)均为显著过表达.此外,ADAMTS-16 和 CALCR 的表达水平与预测结果不一致,而 GNA14($P=0.000\ 225$)显著低表达与预测一致[图 1(j)].

2.4 兔模型滑膜组织病理分析及 Krenn 评分

兔模型 HE 染色显示,在正常组中兔膝关节滑膜表面平滑,组织结构完整,层次清晰可辨,细胞核染色均匀,没有深染或核浓集的现象,提示没有炎症引起的细胞增生或凋亡[图 2(a)];相比之下,对照组显示出滑膜组织结构混乱,并有大量炎症细胞浸润[图 2(b)].在 NS 组中,滑膜细胞增生和炎症浸润虽有所减少,但末端生长差,染色核较少,表明生理盐水熏蒸的修复效果有限[图 2(c)].LAs 组受益于组织细胞的修复,末端部分有大量深染色核聚集[图 2(d)],表明其治疗比 NS 组更有效.

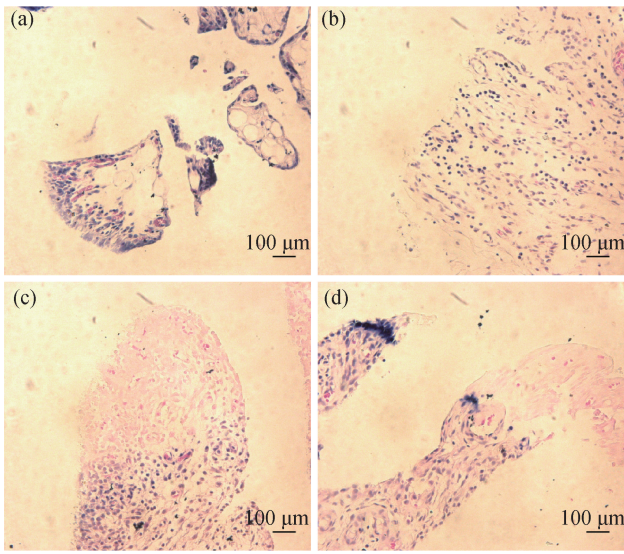
Krenn 评分结果显示(图 3):正常组评分最低;对照组评分最高,表明存在损伤;而两个治疗组的评分较低,其中 LAs 组的评分显著低于 NS 组($P<0.05$),表明 LAs 在 ACLR 后具有更好的抗炎和软骨保护作用.



(a) 维恩图, 展示表层区细胞样本与髌状软骨细胞样本之间差异表达基因的数量; (b) 散点图, 描述样本中差异表达基因的分布, 仅在表层区细胞中差异表达的基因用红色标记, 在髌状软骨细胞中的用蓝色标记, 两种细胞类型中都有的用黄色标记; (c) 直方图, 表示不同 AUC 值范围内基因的分布; (d) LASSO 回归分析结果, 上方数值表示不同正则化参数 λ 值下模型中非零系数的数量; (e) ROC 曲线, 展示使用 LASSO 分析开发的预测模型的灵敏度和特异性; (f) DAVID 分析的 KEGG 通路结果, 其中 FDR 表示假发现率(即调整后的 P 值, 用于控制多重检验中的假阳性率); (g) Metascape 分析的 GO 术语富集结果; (h) 维恩图, 描绘通过 LASSO 分析识别的基因与信号通路中富集的基因之间的重叠和独特贡献; (i) 网络图, 详细展示仅通过 LASSO 识别的基因、仅通过通路富集识别的基因, 以及两种方法共同识别的基因; (j) RT-qPCR 验证关键基因表达的结果, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 1 差异基因表达和诊断效能分析

Fig. 1 Analysis of differential gene expression and diagnostic efficacy



(a)正常组;(b)对照组;(c)NS组;(d)LAs组。

图 2 滑膜组织 HE 染色情况

Fig. 2 HE staining of synovial tissues

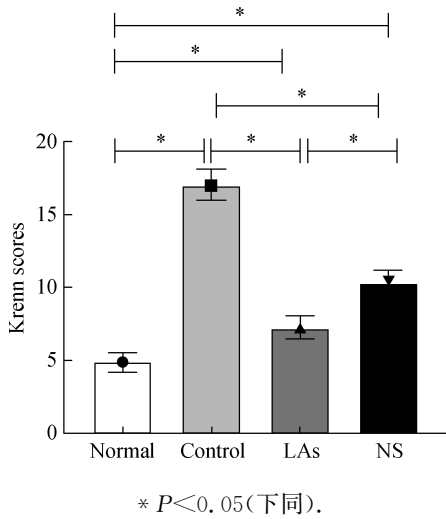


图 3 术后滑膜组织 Krenn 评分

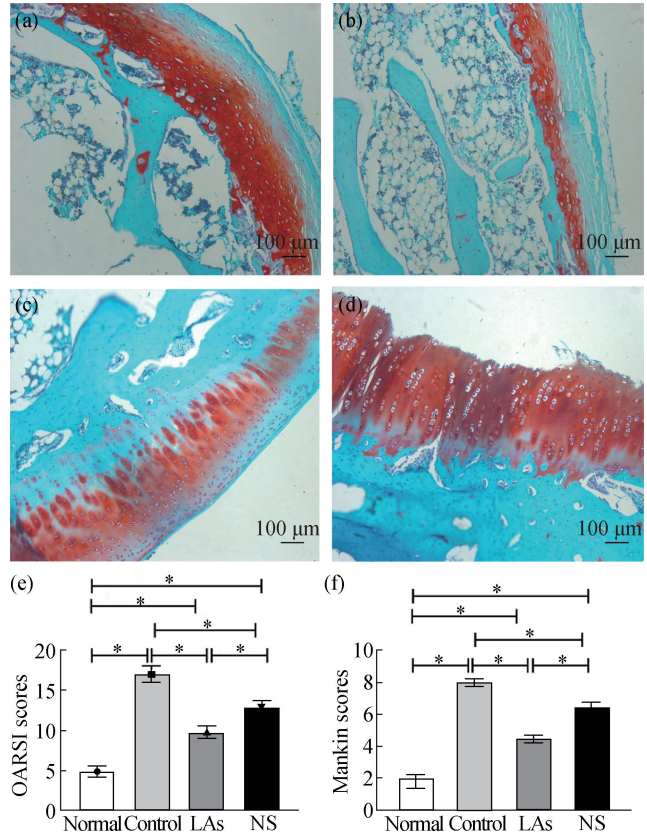
Fig. 3 Krenn scores of postoperative synovial tissues

2.5 兔模型软骨组织病理分析及评分

SO/FG 染色是一种常用于检测软骨中蛋白多糖含量的染色方法,可评估软骨的健康状况.结果显示[图 4(a)~(d)];正常组软骨完整;对照组中可见基质显著耗竭和软骨细胞丧失,出现细胞凝集和坏死,呈严重软骨病变的特征;与对照组相比,NS 组染色强度略有改善,但软骨退化仍然明显,表明修复效果有限;LAs 组表现出显著软骨修复趋势,活跃的组织修复和恢复中的骨结构初步形成.

软骨组织的退化情况通过 OARSI 评分进行量化

分析,结果表明:对照组的评分显著高于其他各组 ($P < 0.05$),提示严重的软骨病变;而 LAs 组的评分显著低于对照组 ($P < 0.05$),说明 LAs 治疗在减轻软骨退化方面具有明显效果[图 4(e)]. Mankin 评分结果显示:与正常组相比,对照组的评分显著增加 ($P < 0.05$);两个治疗组与对照组相比均显示出显著评分降低,其中 LAs 组的评分显著低于 NS 组 ($P < 0.05$),表明 LAs 治疗后软骨病变得得到更好的缓解[图 4(f)].



(a)正常组;(b)对照组;(c)NS组;(d)LAs组;

(e)OARSI 评分;(f)Mankin 评分。

图 4 软骨组织 SO/FG 染色分析

Fig. 4 Analyses of cartilage tissue with SO/FG staining

2.6 LAs 对 ACLR 后 PTOA 模型中血清炎症标志物水平的影响

如图 5 所示:对照组血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平相较于正常组显著升高 ($P < 0.05$),提示炎症活动增强;相比之下,NS 组和 LAs 组的这些炎症标志物水平显著降低 ($P < 0.05$),且 LAs 组的炎症标志物水平降低更明显,提示 LAs 具有更好的抗炎效果,可有效保护软骨组织.推测熏蒸方法本身(包括热敷)可能有助于缓解炎症反应.热疗可以促进血流,从而减

少局部炎症,可能增强 ACLR 后的恢复过程,并改善 PTOA 的症状.

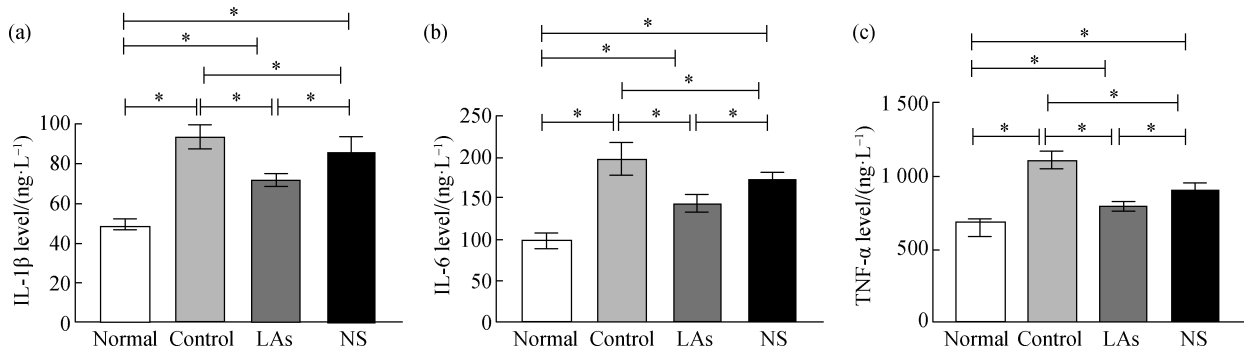


图 5 血清炎症标志物 IL-1β(a)、IL-6(b)和 TNF-α(c)水平变化

Fig. 5 Changes of serum inflammatory markers IL-1β (a), IL-6 (b) and TNF-α (c) levels

2.7 软骨组织中 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 mRNA 表达水平

如图 6 所示:与正常组相比,对照组的软骨组织中 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.05$);而 LAs 组和 NS 组与对照组相比,这些 mRNA 表达水平显著下调($P < 0.05$). LAs 组的 mRNA 表达水平显著低于 NS 组($P < 0.05$),提示 LAs 治疗对软骨组织炎症标志物的调节作用更强.

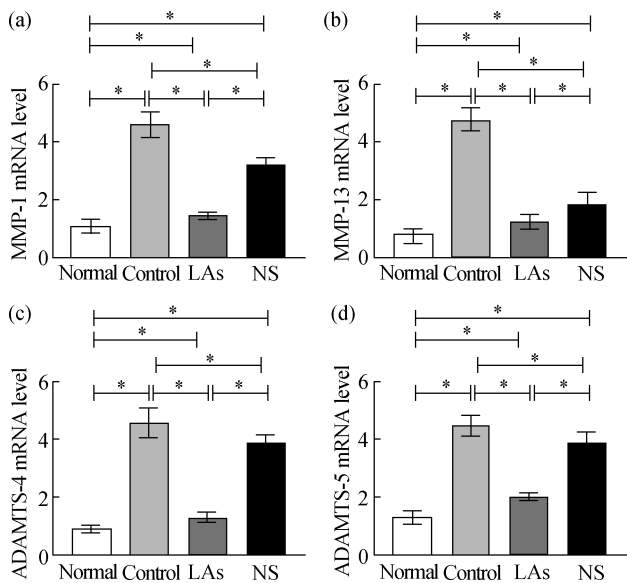


图 6 MMP-1(a)、MMP-13(b)、ADAMTS-4(c)和 ADAMTS-5(d)的 mRNA 表达水平

Fig. 6 mRNA expression levels of MMP-1 (a), MMP-13 (b), ADAMTS-4 (c) and ADAMTS-5 (d)

2.8 软骨组织中 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平

对兔软骨组织进行蛋白免疫印迹分析,结果如图

7 所示:与正常组相比,对照组中 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$);与对照组相比,LAs 组和 NS 组中这些蛋白的表达水平则明显下调($P < 0.05$). LAs 组的蛋白表达水平显著低于 NS 组($P < 0.05$),表明 LAs 治

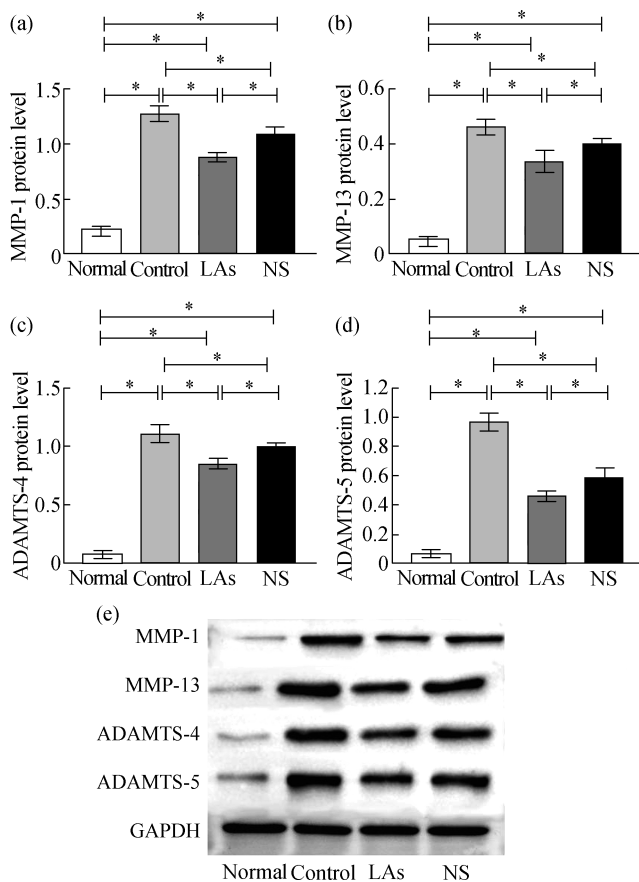


图 7 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平(a~d)及蛋白免疫印记检测结果(e)
Fig. 7 Protein expression levels of MMP-1, MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 (a-d), and Western blotting detection results (e)

疗实验条件可能对涉及软骨代谢的蛋白水解途径有更强的调节作用。

3 讨论

ACL 损伤是最常见且最具破坏性的膝关节损伤之一^[17],通常导致关节积液、运动模式以及能力的改变,并常伴有肌肉无力和运动能力的下降^[18]。ACL 损伤后 10~15 年内可能出现 PTOA 的风险高达 80%,除疼痛、不稳定和相关的长期后遗症外,ACL 损伤还会影响运动员的生活质量,大大增加了社会的医疗负担^[19]。目前,ACLR 仍是治疗 ACL 损伤的黄金标准,但既往 ACLR 手术方式并不能降低 PTOA 的发病率。一项持续 10 年随访的随机对照研究表明,新的手术方式在预防 PTOA 方面并不优于传统的手术方式^[20],也提示 ACLR 术后 PTOA 的发生不仅与伤后膝关节解剖结构、运动模式改变相关,还有其他因素参与。有研究表明,炎症反应及促炎细胞因子、抗炎细胞因子的相对变化可能参与触发骨性关节炎的发生与发展,其中 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 是主要的参与者^[21]。IL-1 β 可诱导核因子- κ B(NF- κ B)家族成员等抑制因子的表达,进而抑制 BCL-3 基因的表达,促进软骨细胞凋亡;此外,IL-1 β 可促进软骨细胞和滑膜细胞中 MMP 和前列腺素 E(PGE)的合成;IL-1 与 TNF- α 在关节损伤中具有协同作用,TNF- α 则可促进 PGE 的产生,诱导软骨细胞过氧化,从而与 IL-1 β 共同促进软骨吸收,导致 OA 的软骨破坏^[22]。进一步研究发现 IL-1 β 和 IL-6 在关节软骨破坏和炎性细胞浸润中起主要作用,而 TNF- α 在关节肿胀中起作用^[23]。

本研究基于动物模型发现,ACL 损伤后膝关节软骨细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平明显高于正常膝关节软骨细胞,且 HE 染色也佐证了对照组滑膜组织结构混乱,并有大量炎症细胞浸润。与正常膝关节相比,细胞因子浓度存在显著差异,提示细胞因子失衡参与了 ACL 损伤后软骨的逐渐降解^[24-25]。这也进一步解释了 ACLR 手术可能启动第二次“炎症冲击”,导致软骨降解标志物(如 MMPs)进一步增加^[26]。

MMP 家族中的 MMP-1 和 MMP-13 以其分解细胞外基质(ECM)的能力而著称,在生理和病理条件下的组织重塑中发挥关键作用。在骨关节中,MMP-1 和 MMP-13 对于软骨退化至关重要,因为它们能分解胶原蛋白和其他基质^[27]。同样,ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 作为 ADAMTS 家族成员,也参与分解

ECM,特别是软骨基质的主要成蛋白多糖^[28],这些酶的活性增加促进了软骨的损伤和退化。本研究发现,与正常组相比,对照组中 MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的蛋白表达水平显著上调,而与对照组相比,LAs 组和 NS 组中这些蛋白的表达水平显著下调。MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的上调与炎症反应和软骨退化密切相关,是研究 OA 及其他退行性关节疾病的重要分子指标^[29]。这些酶在炎症环境中的活性增强,导致软骨破坏和关节功能障碍。因此,针对这些酶的研究对于开发有效的 OA 治疗方法具有重要意义。

在中医理论中,ACLR 后肿痛病变部位主要在肌肉软组织,病位在“筋”,属中医“筋痹”范畴。《素问·痹论篇》云“凡痹之类,逢寒则急,逢热则纵”,强调理气活血化瘀、温阳散寒止痛是治疗筋痹的关键,因此在临床实践中会选择经典方剂“伤肢熏洗方”进行治疗。“伤肢熏洗方”由川乌、草乌、独活、桂枝、防风、刘寄奴、透骨草、花椒、艾叶、苍术、红花和伸筋草组成,通过现代技术分析化学表征其中主要的药理活性化合物之一为 LAs^[30]。本研究表明,LAs 在干预 PTOA 进程中具有显著效果,可显著降低炎症标志物和软骨降解酶的表达;显著下调促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平;同时,MMP-1、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,软骨降解得到抑制。

现代中医药研究发现,中药熏浴疗法配合现代康复手段对治膝关节障碍有确切临床疗效^[31]。相比于关节内皮质类固醇注射,熏浴疗法作为一种非侵入方式能提供更全面的炎症反应调节,同时避免直接注射相关的风险。在本研究中,使用智能蒸汽设备加热 LAs 提取物溶液,将其转化为药用蒸汽,这一过程可在皮肤的脂双层中产生高压瞬变形成水通道^[32]。设备的独特不对称脉冲电场使得活性药物成分通过角质层更有效、更深入地渗透至目标组织,即使不使用药物溶液,也可改善局部血液循环、缓解肌肉痉挛并加速炎症和代谢副产品的吸收。这从侧面解释了本研究中 NS 组在使用安慰剂生理盐水的情况下,与对照组相比显示出 Mankin 评分降低,滑膜细胞增生和炎症浸润虽有所减少,但末端生长差,染色核较少,表明生理盐水熏蒸的修复效果有限。已有研究显示,该疗法能够抑制关节炎中的炎症细胞浸润和成纤维细胞增生,并增强膝关节周围软组织的功能^[33]。

综上所述,LAs 提取物配方为中医药现代化发展

提供了可能性,也为 PTOA 的进展提供了一种有前景的干预措施,可有效地缓解与该疾病相关的炎症反应。LAs 不仅在减缓 PTOA 的进展方面具有潜力,而且在大幅减少加剧关节退化的炎症标志物方面也显示出潜力,为进一步临床试验和针对 PTOA 早期干预的治疗策略提供了参考。

参考文献:

- [1] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.
- [2] KHELLA C M, HORVATH J M, ASGARIAN R, et al. Anti-inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8005.
- [3] OPOKU M, FANG M, LU W, et al. Acute anterior cruciate ligament rupture: can repair become an alternative to reconstruction; a meta-analysis of randomized controlled trials and cohort studies [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 331.
- [4] ADHITYA I P G S, YU W Y, KURNIAWATI I, et al. Risk factors of knee reinjury after anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Int Orthop*, 2024, 48(4): 983-990.
- [5] MARKUS D H, HURLEY E T, MOJICA E S, et al. Concentration of synovial fluid biomarkers on the day of anterior cruciate ligament (ACL)-reconstruction predict size and depth of cartilage lesions on 5-year follow-up [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2023, 31(5): 1753-1760.
- [6] PIETROSIMONE B. Managing the early risk of posttraumatic osteoarthritis following anterior cruciate ligament injury [J]. *Journal of Science in Sport Exercise*, 2020, 2(3): 258-264.
- [7] WANG L J, ZENG N, YAN Z P, et al. Post-traumatic osteoarthritis following ACL injury [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 57.
- [8] RUDNIK-JANSEN I, TELLEGEN A R, POURAN B, et al. Local controlled release of corticosteroids extends surgically induced joint instability by inhibiting tissue healing [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(20): 4050-4064.
- [9] ALTMAN R, BEDI A, MANJOO A, et al. Anti-inflammatory effects of intra-articular hyaluronic acid; a systematic review [J]. *Cartilage*, 2019, 10(1): 43-52.
- [10] MA D K, GU X T, WANG X, et al. Pharmacokinetic studies of three alkaloids in rats after intragastrical administration of *Lycopodium herba* extract by LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1930.
- [11] BROSSI A. The alkaloids: chemistry and pharmacology [M]. Amsterdam: Academic Press, 1985: 371-374.
- [12] 谢振, 郑东昆, 王强, 等. 石松生物碱化学成分和生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022(15): 53.
- [13] PEARLE A D, NAWABI D H, MAROM N, et al. Editorial commentary: the pivot shift and lachman examinations. Teammates with distinct roles [J]. *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 2021, 37(2): 682-685.
- [14] KRENN V, MORAWIETZ L, KÖNIG B, et al. Low-grade-/high-grade-synovialitis: standardisierte diagnostik von synovialektomiepräparaten mittels des synovialitis scores [J]. *Der Orthopäde*, 2006, 35(8): 853-859.
- [15] KARSDAL M A, TAMBIAH J, HOCHBERG M C, et al. Reflections from the 2021 OARSI clinical trial symposium: considerations for understanding biomarker assessments in osteoarthritis drug development. Should future studies focus on disease activity, rather than status? [J]. *Osteoarthritis and Cartilage Open*, 2022, 4(3): 100262.
- [16] NAGARAJAN L, KHATRI A, SUDAN A, et al. Deep learning augmented osteoarthritis grading standardization [J]. *Tissue Eng Part A*, 2024, 30(19/20): 591-604.
- [17] BARBER-WESTIN S, NOYES F R. One in 5 athletes sustain reinjury upon return to high-risk sports after ACL reconstruction; a systematic review in 1 239 athletes younger than 20 years [J]. *Sports Health*, 2020, 12(6): 587-597.
- [18] WEBSTER K E, HEWETT T E. Anterior cruciate ligament injury and knee osteoarthritis: an umbrella systematic review and meta-analysis [J]. *Clin J Sport Med*, 2022, 32(2): 145-152.
- [19] DEFRANCESCO C J, LEBRUN D G, MOLONY J T, Jr, et al. Safer and cheaper: an enhanced milestone-based return to play program after anterior cruciate ligament reconstruction in young athletes is cost-effective compared with standard time-based return to play criteria [J]. *Am J Sports Med*, 2020, 48(5): 1100-1107.
- [20] BALASINGAM S, KARIKIS I, ROSTGÅRD-CHRISTENSEN L, et al. Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction is not superior to anatomic single-bundle reconstruction at 10-year follow-up: a randomized clinical trial [J]. *Am J Sports Med*, 2022, 50(13): 3477-3486.
- [21] LEITE C B G, MERKELY G, CHARLES J F, et al.

- From inflammation to resolution: specialized pro-resolving mediators in posttraumatic osteoarthritis[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2023, 21(6): 758-770.
- [22] XIN Y, YUAN Q, LIU C Q, et al. miR-155/GSK-3 β mediates anti-inflammatory effect of chikusetsusaponin IVa by inhibiting NF- κ B signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cell[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18303.
- [23] CHEN M, CHEN Z Y, HUANG D, et al. Myricetin inhibits TNF- α -induced inflammation in A549 cells via the SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 65: 102000.
- [24] 刘佳. 前交叉韧带损伤后软骨退变和骨性关节炎发生的分子变化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(1): 394-401.
- [25] JIN D J, LIU R P, XU N W. Decreased synovial fluid ghrelin level is associated with acute cartilage injury in patients with anterior cruciate ligament tear[J]. *Orthop J Sports Med*, 2023, 11(7): 23259671231178009.
- [26] HUNT E R, JACOBS C A, CONLEY C E W, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction reinitiates an inflammatory and chondrodegenerative process in the knee joint[J]. *J Orthop Res*, 2021, 39(6): 1281-1288.
- [27] CHRISTOPOULOU M E, PAPAKONSTANTINOUE, STOLZ D. Matrix metalloproteinases in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3786.
- [28] HU Q C, ECKER M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1742.
- [29] ASHRUF O S, ANSARI M Y. Natural compounds: potential therapeutics for the inhibition of cartilage matrix degradation in osteoarthritis[J]. *Life*, 2022, 13(1): 102.
- [30] 祁建华, 明洪, 张会择, 等. 基于数据挖掘法探讨《世医得效方》中治伤方剂的用药规律[J]. *中医正骨*, 2022, 34(3): 20-25, 31.
- [31] 李文哲, 王霖, 贺丹. 中药熏蒸在骨折患者康复治疗中的研究进展[J]. *中国疗养医学*, 2019, 28(12): 1278-1280.
- [32] 覃伟, 李仕杰. 针刺疗法结合中药熏蒸及康复训练促进胫骨中下段骨折术后康复效果研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(5): 1186-1189.
- [33] 刘馨, 罗家麒, 胡雯皎, 等. 中医外治法治疗膝关节骨性关节炎的研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2022, 31(22): 64-68.

(责任编辑:徐婷婷)

[上接第 797 页]

- [16] SHAVEZ M, PANDA A N. Assessing effects of different π bridges on properties of random benzodithiophene-thienothiophene donor and non-fullerene acceptor based active layer[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2021, 125(45): 9852-9864.
- [17] SHEN H J, REN Y, LI J F, et al. Enhanced performance via π -bridge alteration of porphyrin-based donors for all-small-molecule organic solar cells[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2023, 41(6): 644-650.
- [18] JING X, ZHAO Y, WANG Q L, et al. Terpolymers and additional π -bridges regulations for improving fill factors in efficient organic solar cells[J]. *Dyes and Pigments*, 2022, 206: 110609.
- [19] WU R, YIN L X, LI Y Q. π -linkage effect of push-pull-structure organic small molecules for photovoltaic application[J]. *Science China Materials*, 2016, 59(5): 371-388.
- [20] CHEN Y J, LIANG J T, YU Y F, et al. Effect of aromatic π -bridges on molecular structures and optoelectronic properties of A- π -D- π -A small molecular acceptors based on indacenodithiophene[J]. *Organic Electronics*, 2021, 89: 106015.
- [21] BALAJI G, PHUA D I, SHIM W L, et al. Synthesis and characterization of unsymmetric indolodithienopyrrole and extended diindolodithienopyrrole[J]. *Organic Letters*, 2010, 12(2): 232-235.
- [22] CHENG H, WU Y G, SU J Y, et al. Organic dyes containing indolodithienopyrrole unit for dye-sensitized solar cells[J]. *Dyes and Pigments*, 2018, 149: 16-24.
- [23] SUN Q J, WANG H Q, YANG C H, et al. Synthesis and electroluminescence of novel copolymers containing crown ether spacers[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2003, 13(4): 800-806.

(责任编辑:曾礼娜)