

# 川芎嗪对膝骨性关节炎大鼠软骨下骨中 miR-20b/VEGF 和 BMP2/Smad1 通路的影响<sup>△</sup>

梁桂洪<sup>1,2\*</sup>, 梁祖建<sup>3</sup>, 谢平金<sup>4</sup>, 潘建科<sup>1</sup>, 曾令烽<sup>1,2</sup>, 杨伟毅<sup>1</sup>, 黄和涛<sup>1</sup>, 韩燕鸿<sup>1</sup>, 刘 军<sup>1,2#</sup>(1.广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院大骨科, 广州 510120; 2.广东省中医药科学院骨与关节退变及损伤研究团队, 广州 510120; 3.广州中医药大学第三附属医院老年骨科, 广州 510240; 4.深圳市罗湖区中医院/上海中医药大学深圳医院骨科, 广东深圳 518001)

中图分类号 R274.9;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0448-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.04

**摘要** 目的:研究川芎嗪对膝骨性关节炎(KOA)模型大鼠软骨下骨中微小核糖核酸miR-20b/血管内皮生长因子(VEGF)和骨形态发生蛋白2(BMP2)/Smad1通路的影响,并探讨川芎嗪防治KOA的作用机制。方法:取健康雄性SD大鼠18只,随机分为正常对照组、模型组、川芎嗪组,每组6只。对后两组大鼠通过膝关节腔注射4%木瓜蛋白酶溶液建立KOA模型。末次注射后第2天起,川芎嗪组大鼠灌胃川芎嗪混悬液(100 mg/kg)2 mL,正常对照组、模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续6周。给药结束后,暴露大鼠双侧膝关节软骨进行大体情况观察。截取大鼠膝关节,进行切片和苏木精-伊红(HE)染色,在显微镜下观察组织病理学变化,并采用改良的Mankin's评分进行组织学评分。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测大鼠软骨下骨组织中VEGF、BMP2、Smad1的mRNA表达和miR-20b表达水平;采用Western Blot法检测VEGF、BMP2、Smad1的蛋白表达水平。结果:模型组和川芎嗪组大鼠的膝关节均出现不同程度的软骨损伤;与正常对照组比较,模型组大鼠膝关节软骨组织Mankin's评分显著升高( $P<0.01$ );软骨下骨组织中BMP、Smad1的mRNA和蛋白表达以及miR-20b表达水平均显著降低,VEGF的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,川芎嗪组大鼠关节软骨组织Mankin's评分显著降低( $P<0.01$ );软骨下骨组织中BMP、Smad1的mRNA和蛋白表达以及miR-20b表达水平均显著升高,VEGF的mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:川芎嗪能修复KOA模型大鼠损伤的关节软骨,其机制可能是通过上调软骨下骨中miR-20b表达水平,促进VEGF mRNA降解继而抑制VEGF蛋白的表达,同时激活BMP-2/Smad1信号通路而实现的。

**关键词** 川芎嗪;膝骨性关节炎;软骨下骨;大鼠;miR-20b;血管内皮生长因子;骨形态发生蛋白;Smad;作用机制

## Effects of Ligustrazine on miR-20b/VEGF and BMP2/Smad1 Pathways in Subchondral Bone of Knee Osteoarthritis Model Rats

LIANG Guihong<sup>1,2</sup>, LIANG Zujian<sup>3</sup>, XIE Pingjin<sup>4</sup>, PAN Jianke<sup>1</sup>, ZENG Lingfeng<sup>1,2</sup>, YANG Weiyi<sup>1</sup>, HUANG Hetao<sup>1</sup>, HAN Yanhong<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM & Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. Bone and Joint Research Team of Degeneration and Injury, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medicinal Sciences, Guangzhou 510120, China; 3. Dept. of Elder Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510240, China; 4. Dept. of Orthopedics, Shenzhen Luohu District Hospital of TCM & Shenzhen Hospital of Shanghai University of TCM, Guangdong Shenzhen 518001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of ligustrazine on miR-20b/VEGF and BMP2/Smad1 pathways in subchondral bone of knee osteoarthritis (KOA) model rats, and to investigate the mechanism of ligustrazine for KOA prevention and treatment.

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473698、81873314);广东省自然科学基金项目(No.2014A030310242);广东省财政厅项目(No.粤财社[2014]157号、粤财社[2018]8号)

\* 研究实习员,硕士。研究方向:骨与关节退变及损伤疾病的基础与临床研究。电话:020-81887233-35633。E-mail:liangguihonghe@163.com

# 通信作者:主任中医师,博士生导师,硕士。研究方向:骨与关节退变及损伤疾病的基础与临床研究。电话:020-81887233-35633。E-mail:liujun.tcm@163.com

**METHODS:** Totally 18 healthy male SD rats were randomly divided into normal control group, model group and ligustrazine group, with 6 rats in each group. The rats in the latter two groups were used to establish KOA model by intra-articular injection of 4% papain solution. From the 2nd day after the last injection, ligustrazine group was given intragastrical administration of Ligustrazine suspension (100 mg/kg) 2 mL; normal control group and model group were

given intragastrical administration of isometrical normal saline, once a day, for consecutive 6 weeks. After the last after medication, the situation of bilateral knee articular cartilage of rats were observed after exposure. The knee joints of rats were sectioned and stained with HE. The pathological change of articular cartilage were observed by microscope and scored by modified Mankin's score. mRNA expression of VEGF, BMP2 and Smad1, and the expression of miR-20b were detected by RT-PCR; the protein expression of VEGF, BMP2 and Smad1 were detected by Western blot assay. RESULTS: Model group and ligustrazine group suffered from cartilage injury of knee joint at varying degrees. Compared with normal control group, Mankin's scores of knee joint and cartilage tissue were increased significantly in model group ( $P < 0.01$ ); mRNA and protein expression of BMP and Smad1, the expression of miR-20b in subchondral bone of model group were decreased significantly, while mRNA and protein expression of VEGF were increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, Mankin's score of cartilage tissue were decreased significantly in ligustrazine group ( $P < 0.01$ ); mRNA and protein expression of BMP and Smad1, the expression of miR-20b in subchondral bone were increased significantly, while mRNA and protein expression of VEGF were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Ligustrazine can repair damaged articular cartilage in KOA model rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting the protein expression of VEGF and activating BMP-2/Smad1 signaling pathway via up-regulating the expression of miR-20b, and promoting the degradation of VEGF mRNA in subchondral bone.

**KEYWORDS** Ligustrazine; Knee osteoarthritis; Subchondral bone; Rat; miR-20b; VEGF; BMP; Smad; Mechanism

膝骨性关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)的发生与发展涉及韧带、肌肉、滑膜、关节软骨和软骨下骨等关节周围组织的结构病变,目前大多数相关研究主要以软骨自身修复为主,而忽略了周围组织或软骨下骨对软骨修复的影响<sup>[1]</sup>。近来有研究者认为,在骨关节炎(OA)发生过程中,软骨下骨的病变可能早于关节软骨的退变,并提出关节软骨的完整性可能取决于软骨下骨的力学性能<sup>[2]</sup>;另有研究发现,调控软骨下骨的骨形态发生蛋白(BMP)信号通路可能有助于促进关节软骨的再生修复<sup>[3]</sup>。由于软骨下骨和关节软骨有共同的组织细胞起源,BMP-Smad信号通路可能共同调节软骨下骨的骨重塑和关节软骨的生长发育<sup>[4]</sup>,因此调控两者共有的信号通路可能在软骨下骨和软骨生长发育和代谢中发挥重要作用。有研究发现,微小核糖核酸(miRNA)可通过调节血管内皮生长因子(VEGF)的表达来干预关节组织的炎症反应及血管再生,从而参与OA的进展<sup>[5]</sup>;而在OA患者的软骨下骨中发现有大量血管增生,其机制可能是新生血管侵入钙化软骨层及非钙化软骨,激活软骨下骨的重塑过程,进而引发关节软骨的退变<sup>[6]</sup>。川芎嗪是从川芎中提取的一种有效活性物质,其能通过上调抗凋亡因子Bcl-2和促凋亡因子Bax、Caspas-3的表达,从而抑制软骨细胞的凋亡<sup>[7]</sup>;或者通过降低OA大鼠关节液中一氧化氮(NO)、前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)的含量,对减轻OA炎症反应有一定的作用<sup>[8]</sup>;或者通过降低OA患者关节液中基质细胞衍生因子1(SDF-1)、基质金属蛋白酶(MMPs)水平从而提高治疗效果<sup>[9]</sup>,但相关作用机制尚不明确。为此,本课题组对川芎嗪能否通过调控膝骨软骨与软骨下骨共有的miR-20b/VEGF和BMP2/Smad1信号通路从而影响软骨下骨的骨重建过程进行研究,为临床使用川芎嗪治疗KOA提供实验依据和治疗思路。

## 1 材料

### 1.1 仪器

XP205型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];RM2125RTS型轮转式石蜡切片机(德国Leica公司);D3024型台式高速离心机(美国SCIlogex公司);7500型实时荧光定量-聚合酶链反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);SMA4000型微量核酸定量仪(美国Merinton公司);318型多功能酶标仪(上海现科仪器有限公司);Aquaplore 3型超纯水机(美国Aquapro公司)。

### 1.2 药品与试剂

磷酸川芎嗪片(丽珠集团利民制药厂,批号:160703,规格:50 mg);木瓜蛋白酶(上海源叶科技有限公司,批号:S10011,活性:800 U/mg);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号:DH0006);Trizol试剂(北京天根生化科技有限公司,批号:DP424);BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、苯甲基磺酰氟(PMSF)(杭州弗德生物科技有限公司,批号分别为FD2001、FD008、FD1001、FD1002、FD100);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0012A);反转录试剂盒(上海星汉生物科技有限公司,批号:DBI-2220);PCR引物(广州四和生物科技有限公司);荧光定量PCR检测试剂盒(美国Genecopoeia公司,批号:AOPR-1200);VEGF兔多克隆抗体、BMP2兔多克隆抗体、Smad1兔多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为Ab46154、Ab14933、Ab131371); $\beta$ -actin抗体(内参)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为3700、BA1054、AR1112);ECL发光液(德国Merck公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为双蒸水。

### 1.3 动物

健康雄性SD大鼠18只,3月龄,体质量180~220 g,

由广州中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SYXK(粤)2016-0023。所有大鼠均在环境温度(25±1)℃、湿度68%、12 h光照/黑暗交替的清洁环境中饲养,任意进食标准饲料和自来水。本实验方案通过广州中医药大学动物实验伦理审查。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模和给药

将大鼠随机分为正常对照组、模型组、川芎嗪组,每组6只。对模型组、川芎嗪组大鼠采用关节腔注射木瓜蛋白酶建立KOA模型:在无菌条件下以生理盐水配制4%木瓜蛋白酶溶液,于4℃保存,在实验开始前4 h取出放至室温备用;对大鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉后,在其双膝关节处备皮、消毒并屈曲约45°,从髌骨下缘前内侧的膝眼向髌间窝方向进针,待明显有落空感后,针尖抵达股骨内侧髌再回撤2 mm,然后注射4%木瓜蛋白酶溶液(双侧膝关节均注射0.2 mL),在第1、4、7天分别注射1次,共注射3次<sup>[10]</sup>。正常对照组大鼠同法注射等体积生理盐水。自造模第1天起,每天驱赶大鼠活动2次,每次1 h,连续驱赶1周。

末次注射木瓜蛋白酶或生理盐水第2天起,川芎嗪组大鼠灌胃川芎嗪混悬液(100 mg/kg,参考文献<sup>[11]</sup>确定剂量;取川芎嗪片以生理盐水配制适当浓度后给药)2 mL,正常对照组、模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续6周。

### 2.2 大鼠软骨组织大体情况和组织病理学观察

给药结束后,断颈处死全部大鼠,解剖双侧膝关节并暴露关节软骨,大体观察关节软骨光滑度、色泽,表面是否有糜烂、溃疡及纤维性增生,边缘是否有骨赘形成等情况。剔除膝关节周围的肌肉组织,在胫骨近端1/4至股骨远端1/4的范围截取整个膝关节。一部分膝关节组织于-80℃条件下保存备用;另一部分膝关节组织在4℃条件下置于40 g/L多聚甲醛溶液中固定,然后脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋制成石蜡标本,行厚切片(4~6 μm)。切片以HE染色后在显微镜下观察;采用改良的Mankin's评分<sup>[12]</sup>对软骨组织结构、细胞、染色以及潮线的完整性进行组织学评分,评分范围为0~13分,评分越高表明软骨退变越严重。

### 2.3 大鼠软骨下骨组织中VEGF、BMP2、Smad1的mRNA和miR-20b表达水平检测

采用逆转录(RT)-PCR法进行检测。取“2.2”项下部分冻存膝关节组织,采用Trizol试剂分别提取软骨下骨总RNA和mRNA,采用反转录试剂盒制得cDNA第一链,然后行RT-PCR扩增,引物序列见表1,扩增条件见表2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法<sup>[13]</sup>,以GAPDH为内参计算VEGF、BMP2、Smad1的mRNA表达水平,以U6为内参计算miR-20b的表达水平。

### 2.4 大鼠软骨下骨组织中VEGF、BMP2、Smad1的蛋白表达水平检测

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	扩增长度, bp
GAPDH	5'-GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG-3'	98
	5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGATG-3'	
Smad1	5'-GGGACTGCCTCATGTTCATTTA-3'	119
	5'-AGACTTCTTCTGCTTGGAAAC-3'	
BMP2	5'-CAGTGGGAGAGCTTTGATGT-3'	108
	5'-ACCTGGCTTCTCCTCTAAGT-3'	
VEGF	5'-GAAGACACAGTGGTGAAGAAG-3'	111
	5'-ACAAGGTCTCCTGAGCTATAC-3'	
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	61
	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	
miR-20b	5'-CGAAAGTGCTCATAGTGCAGG-3'	61
	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	

表2 PCR扩增条件

Tab 2 PCR amplification conditions

循环次数	步骤	温度	时间
1	预变性	95℃	10 min
40	变性	95℃	10 s
	退火	55℃	20 s
	延伸	72℃	35 s

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下部分冻存膝关节组织,采用全蛋白提取液(RIPA裂解液-蛋白酶抑制剂混合物-蛋白磷酸酶抑制剂混合物-PMSF)的体积比为100:1:1:1提取软骨下骨全蛋白,采用Bradford比色法测定蛋白浓度。离心收集软骨下骨全蛋白,加入SDS蛋白上样缓冲液×5次,95℃孵育5 min,在-20℃条件下保存备用。分别采用浓缩胶和分离胶进行蛋白电泳,235 mA转膜60~120 min,5%脱脂奶粉封闭1 h。将PVDF膜分别放入VEGF、BMP2、Smad1、β-actin抗体稀释液(1:1 000)3 mL中,4℃孵育过夜,次日以TBST缓冲液洗膜5 min×4次;再将PVDF膜放入二抗稀释液(1:20 000)3 mL中,室温下平缓摇动孵育1 h后,以TBST缓冲液洗膜5 min×4次;采用ECL发光液显色。采用Image J 1.46r软件对蛋白条带进行分析,以β-actin为内参计算相对灰度值,以表示蛋白表达水平。

### 2.5 统计学方法

所有试验至少独立重复3次。采用GraphPad Prism 7统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey's或Dunnett's检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大鼠关节软骨大体情况及组织病理学观察结果

肉眼观察可见,与正常对照组比较,模型组和川芎嗪组大鼠的关节均出现不同程度的软骨损伤,包括关节软骨光滑度下降、色泽变暗淡,表面不平整并伴有糜烂,无骨赘形成。但两组间大体情况无明显差别。组织切片HE染色后在镜下可见,正常对照组大鼠关节软骨结构清晰,软骨表面完整、光滑,基质染色基本均匀;模型组大鼠关节软骨浅表层纤维化,表面完整性被破坏,软

骨细胞成簇增殖、肥大、排列紊乱,潮线不完整或消失,基质染色丢失;川芎嗪组大鼠关节软骨表层不平整,偶见少量簇集的软骨细胞,基质染色尚可。改良的 Mankin's 评分结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠软骨组织评分显著升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,川芎嗪组大鼠软骨组织评分显著降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。各组大鼠关节软骨组织病理学显微图见图1, Mankin's 评分柱形图见图2。

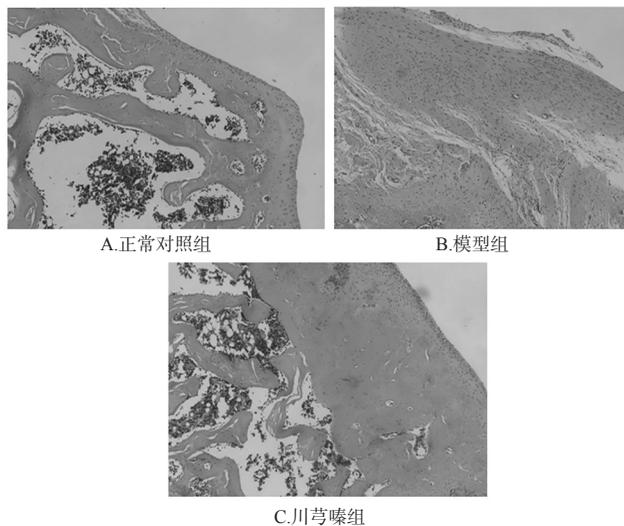
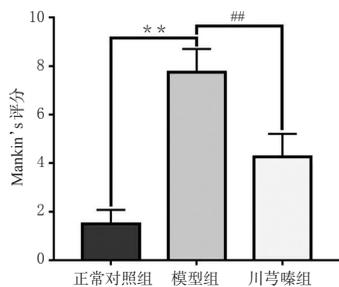


图1 各组大鼠关节软骨组织病理学显微图(HE染色, ×200)

Fig 1 Histopathological micrograph of articular cartilage in rats of each group (HE staining, ×200)



注:与正常对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, ## $P<0.01$

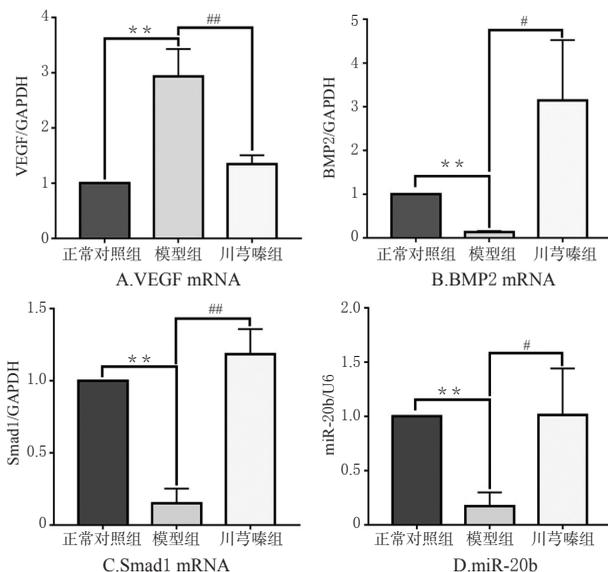
Note: vs. normal control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, ## $P<0.01$

图2 各组大鼠关节软骨组织 Mankin's 评分柱形图

Fig 2 Column diagram for Mankin's score of articular cartilage in rats of each group

### 3.2 大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2、Smad1 的 mRNA 和 miR-20b 表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠软骨下骨组织中 VEGF 的 mRNA 表达水平显著升高, BMP2、Smad1 的 mRNA 和 miR-20b 表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,川芎嗪组大鼠软骨下骨组织中 VEGF 的 mRNA 表达水平显著降低, BMP2、Smad1 的 mRNA 和 miR-20b 的表达水平显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。各组大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2、Smad1 的 mRNA 和 miR-20b 表达水平柱形图见图3。



注:与正常对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

0.01

Note: vs. normal control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图3 各组大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2、Smad1 的 mRNA 和 miR-20b 表达水平柱形图

Fig 3 Column diagram for the expression levels of VEGF, BMP2, Smad1 mRNA and miR-20b in subchondral bone of rats in each group

### 3.3 大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP-2、Smad1 的蛋白表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠软骨下骨组织中 VEGF 的蛋白表达水平显著升高, BMP2、Smad1 的蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,川芎嗪组大鼠软骨下骨组织中 VEGF 的蛋白表达水平显著降低, BMP2、Smad1 的蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。各组大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2、Smad1 的蛋白电泳图见图4,蛋白表达水平柱形图见图5。

## 4 讨论

OA 是一种以关节软骨退变、软骨下骨反应性增生及硬化,并伴随骨赘形成为主要病理特点的疾病,其在临床上最直观的病理改变是软骨受损、退变,因此对 OA 的防治工作主要集中在关节软骨方面<sup>[14]</sup>。本课题组前期研究发现,与 OA 模型组比较,正常对照组、阳性药物组(塞来昔布)和川芎嗪高、低剂量组(100、50 mg/kg)大鼠关节软骨组织中 BMP2、Smad1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高;与阳性药物组比较,川芎嗪高剂量组大鼠关节软骨组织中 BMP2、Smad1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,而川芎嗪低剂量组上述指标水平则降低<sup>[15]</sup>。另通过研究证实,川芎嗪可上调 KOA 模型大鼠关节软骨中 miR-20b 的表达水平,下调 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平,且高剂量川芎嗪的效果优于低剂量川芎

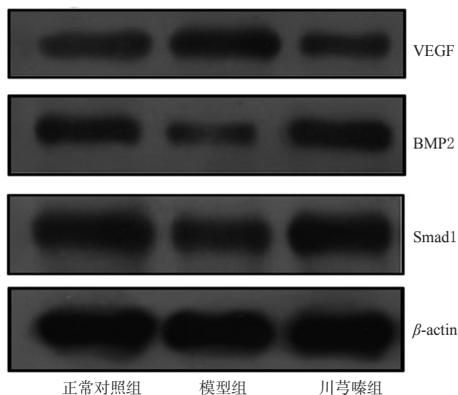
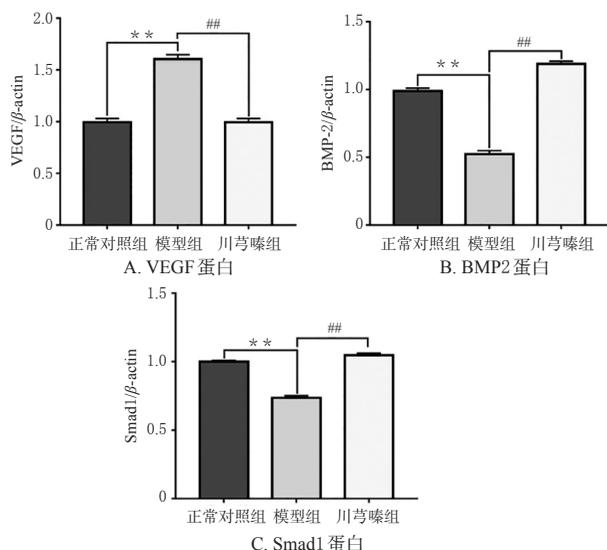


图4 各组大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2、Smad1 的蛋白电泳图

Fig 4 Electrophoretic diagrams for protein expression levels of VEGF, BMP2 and Smad1 in subchondral bone of rats in each group



注:与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, ## $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, ## $P < 0.01$

图5 各组大鼠软骨下骨组织中 VEGF、BMP2 和 Smad1 蛋白表达水平柱形图

Fig 5 Column diagram of the protein expression levels of VEGF, BMP2 and Smad1 in subchondral bone of rats in each group

嗪和阳性药物塞来昔布<sup>[16-17]</sup>。因此本研究重点探索高剂量川芎嗪对大鼠膝关节软骨下骨中上述相关基因表达的影响。

本研究结果显示,大鼠关节腔注射木瓜蛋白酶后,关节软骨组织的Mankin's评分较正常对照组显著升高;而以川芎嗪干预处理后可降低关节软骨组织的Mankin's评分,减轻大鼠软骨退变程度。RT-PCR和Western blot法检测结果显示,模型组大鼠软骨下骨组织中VEGF的mRNA和蛋白表达水平较正常对照组均显著升高,而BMP2、Smad1的mRNA和蛋白表达以及miR-20b表达水平均显著降低;而以川芎嗪干预处理后大鼠软骨下骨

组织中VEGF的mRNA和蛋白表达水平均显著降低,BMP2、Smad1的mRNA和蛋白表达以及miR-20b表达水平均显著升高。这表明在KOA发展过程中,大鼠软骨下骨中的miR-20b/VEGF和BMP2/Smad1信号通路均发生了明显改变,而川芎嗪可逆转这种现象。

VEGF是一个重要的促进血管生成因子,可由破骨细胞、成骨细胞、骨细胞以及软骨细胞产生,其过度表达可引起软骨下骨血管异常新生,或者诱发软骨细胞炎症反应<sup>[18]</sup>。有研究显示,在胚胎肢体发育过程中,可通过抑制VEGF的表达来诱导肌肉来源干细胞向软骨分化,进一步促进缺损软骨的修复<sup>[19]</sup>。而部分miRNA则可通过调节VEGF的表达来激活关节局部炎症反应以及血管再生,从而参与到OA的进程中<sup>[20]</sup>。研究表明,miR-20b可通过靶向作用于缺氧诱导因子1(HIF-1)、信号传导与转录激活因子3(STAT3),从而间接调控VEGF的表达<sup>[21]</sup>;可直接靶向作用于VEGF3'-非编码区,从而抑制VEGF的表达<sup>[22]</sup>。这表明干预miR-20b/VEGF信号通路的表达将有助于调控软骨下骨的血管生成及炎症反应。结合前期研究结果表明,川芎嗪可能是通过上调软骨及软骨下骨中miR-20b表达,促进VEGF mRNA降解,继而抑制VEGF蛋白的表达,从而抑制血管侵入钙化软骨层,维持软骨下骨及骨小梁的重塑平衡,并抑制新生血管蔓延至非钙化软骨,来发挥缓解炎症反应和关节软骨退变的作用。

BMP2是BMPs蛋白家族中的一员,可调节骨生成与吸收的平衡,在骨重塑过程中发挥着重要作用;也可通过调节细胞外基质发挥软骨保护及修复的作用<sup>[23]</sup>。已有研究证实,BMP2可加快软骨损伤后的软骨修复进程,减少纤维软骨的形成从而改善软骨基质的外观和构成<sup>[24]</sup>;也有研究显示,通过干预软骨下骨BMPs相关蛋白的表达可促进关节软骨的再生修复<sup>[3]</sup>。而Smad1/5和Smad4对破骨细胞的分化有重要作用,其形成的BMP-Smad信号通路参与了骨重塑的过程<sup>[25]</sup>。本实验结果也证实,川芎嗪可上调OA大鼠软骨下骨组织中BMP2、Smad1的mRNA和蛋白表达。结合前期研究结果表明,川芎嗪可能通过调控关节软骨及软骨下骨BMP2/Smad信号通路从而调控软骨下骨的骨重塑过程。

综上所述,川芎嗪能修复KOA模型大鼠损伤的关节软骨,其机制可能是通过上调软骨及软骨下骨中miR-20b表达,促进VEGF mRNA降解继而抑制VEGF蛋白的表达,同时激活BMP2/Smad1信号通路而实现的。但软骨下骨与关节软骨中miR-20b/VEGF和BMP2/Smad1信号通路之间是否存在相互调节的作用,而它们之间又是如何调控的? miR-20b是否通过靶向作用于VEGF来调控BMP2/Smad1信号通路的活性,从而影响软骨下骨骨重塑的稳态并进一步调节软骨修复?对以上问题,本课题后续拟进一步研究探索miR-20b/VEGF

和BMP2/Smad1 信号通路之间的调控关系,深入揭示川芎嗪临床防治KOA的分子机制。

## 参考文献

- [1] KARUPPAL R. Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration[J]. *J Orthop*, 2017, 14(2): A1-A3.
- [2] ILAS DC, CHURCHMAN SM, MCGONAGLE D, et al. Targeting subchondral bone mesenchymal stem cell activities for intrinsic joint repair in osteoarthritis[J]. *Future Sci OA*, 2017. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0055.
- [3] 曹一汀. FGF2 调控软骨下骨活性促进关节软骨损伤修复的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [4] ZHANG Z, YANG W, CAO Y, et al. The functions of BMP3 in rabbit articular cartilage repair[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(1): 25934-25946.
- [5] PRASADAM I, BATRA J, PERRY S, et al. Systematic identification, characterization and target gene analysis of microRNAs involved in osteoarthritis subchondral bone pathogenesis[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(1): 43-55.
- [6] OGINO S, SASHO T, NAKAGAWA K, et al. Detection of pain-related molecules in the subchondral bone of osteoarthritic knees[J]. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(1): 1395-1402.
- [7] 胡旭光, 甘仲霖, 张毅. 川芎嗪对骨关节炎兔软骨细胞增殖与凋亡的影响及其机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(22): 2418-2421.
- [8] 梁桂洪, 孙赫, 黄宇新, 等. 川芎嗪对实验性骨关节炎模型大鼠关节液中 NO 和 PGE<sub>2</sub> 的调节作用[J]. 动物医学进展, 2014, 35(9): 66-69.
- [9] 刘刚, 周海宇. 川芎嗪注射液灌洗联合玻璃酸钠注射对退行性膝骨关节炎患者关节液中 SDF-1、MMPs 水平的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(31): 48-49.
- [10] 段文秀, 汪宗保, 张浩, 等. 木瓜蛋白酶诱导早期膝骨关节炎模型大鼠软骨超微结构的动态变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(18): 2789-2793.
- [11] 刘国玲, 芦琨, 郭辉, 等. 川芎嗪对大鼠胶原性关节炎及免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 52-55.
- [12] MANKIN HJ, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II: correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. *J Bone Joint Surg*, 1971, 53(3): 523-537.
- [13] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [14] MOBASHERI A, RAYMAN MP, GUALILLO O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5): 302-311.
- [15] 谢平金, 史桐雨, 梁桂洪, 等. 川芎嗪对膝骨性关节炎大鼠软骨 BMP-2、Smad1 及 BMP-2 mRNA、Smad1 mRNA 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(6): 727-731、825.
- [16] 谢平金, 余翔, 柴生颢, 等. 川芎嗪干预早期膝骨关节炎大鼠软骨 II 型胶原纤维 α1 基因与血管内皮生长因子 mRNA 及 miR20b 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(12): 1846-1851.
- [17] 李飞龙, 谢平金, 柴生颢, 等. 川芎嗪对膝骨性关节炎大鼠软骨 VEGF 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 904-909.
- [18] HAMILTON JL, NAGAO M, LEVINE BR, et al. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(5): 911-924.
- [19] KUBO S, COOPER GM, MATSUMOTO T, et al. Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1): 155-165.
- [20] LIU SC, CHUANG SM, HSU CJ, et al. CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2014. DOI: 10.1038/cddis.2014.453.
- [21] CASCIO S, D'ANDREA A, FERLA R, et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(1): 242-249.
- [22] 陶象男, 汪忆梦, 宋传旺. miR-20b 直接靶向 3'-UTR 负性调节 VEGF 的表达[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(1): 22-26.
- [23] KUMAR Y, BISWAS T, THACKER G, et al. BMP signaling-driven osteogenesis is critically dependent on Prdx-1 expression-mediated maintenance of chondrocyte prehypertrophy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.016.
- [24] ABEDE, BOUVARD B, MARTINEAU X, et al. Elevated hepatocyte growth factor levels in osteoarthritis osteoblasts contribute to their altered response to bone morphogenetic protein-2 and reduced mineralization capacity[J]. *Bone*, 2015. DOI: 10.1016/j.bone.2015.02.001.
- [25] TASCA A, STEMIG M, BROEGE A, et al. Smad1/5 and smad4 expression are important for osteoclast differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(7): 1350-1360.

(收稿日期: 2018-08-29 修回日期: 2019-01-02)

(编辑: 段思怡)