

• 论 著 •

MiR-29b 参与大鼠膝骨关节炎引起的 软骨退变和股四头肌萎缩 *

谢晓婷^{1,2} 郑拥军^{1△}

(¹复旦大学附属华东医院疼痛科 上海市老年医学临床重点实验室, 上海 200040; ²上海体育学院运动科学学院, 上海 200438)

摘 要 目的: 探讨 miR-29b 在膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 大鼠软骨自噬和肌肉萎缩中的作用及机制。方法: SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、KOA 组、KOA + miR-NC antagomir 组、KOA + miR-29b antagomir 组。前交叉韧带离断术诱导 KOA, 术前 1 周膝关节注射 miR-NC antagomir 或 miR-29b antagomir。30 天后取材, 验证造模是否成功; 检测肌肉和软骨中 miR-29b 含量及 miR-29b antagomir 对软骨退变、自噬、凋亡和肌肉萎缩的影响; 检测萎缩相关蛋白 MuRF1 和 Atrigon-1 的表达, 以及肌肉中 PI3K、p-AKT、P70 的表达。结果: qPCR 显示 antagomir 可下调关节和肌肉中的 miR-29b; 负重实验表明, 抑制 miR-29b 改善关节功能; HE、PAS 染色和 WB 显示下调 miR-29b 抑制肌肉萎缩; 免疫组化显示抑制 miR-29b 可通过激活软骨中 LC3 和 beclin-1 增加自噬; 免疫荧光和 WB 显示 miR-29b 下调影响 IGF/PI3K/AKT 信号。结论: miR-29b antagomir 对 KOA 后软骨自噬和肌肉萎缩具有治疗作用, miR-29b 可作为 KOA 潜在治疗靶点。

关键词 miR-29b; 膝骨关节炎; 肌肉萎缩; 软骨退变; 自噬

MiR-29b is involvement in cartilage autophagy and muscle atrophy resulting from knee osteoarthritis in rats *

XIE Xiaoting^{1,2}, ZHENG Yongjun^{1△}

(¹ Department of Pain, Huadong Hospital, Shanghai Key Laboratory of Clinical Geriatric Medicine, Shanghai 200040, China; ² Institute of Sports Medicine, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role and mechanism of miR-29b in cartilage autophagy and muscle atrophy in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** SD rats were randomly divided into control group, KOA group, KOA + miR-NC antagomir group, and KOA + miR-29b antagomir group. KOA was induced by anterior cruciate ligament amputation, and miR-NC antagomir or miR-29b antagomir was injected into the knee one week before surgery. After 30 days, the materials were collected to verify the success of the modeling; the content of miR-29b in muscle and cartilage and the effect of miR-29b antagomir on cartilage degeneration, autophagy, apoptosis and muscle atrophy were detected; the expression of atrophy-related proteins MuRF1 and Atrigon-1 was detected. expression, and expression of PI3K, p-AKT, P70 in muscle. **Results:** qPCR showed that antagomir could down-regulate miR-29b in joints and muscles; weight-bearing experiments showed that inhibition of miR-29b improved joint function; HE, PAS staining and WB showed that down-regulation of miR-29b inhibited muscle atrophy; immunohistochemistry showed inhibition of miR-29b can increase autophagy by activating LC3 and beclin-1 in cartilage; immunofluorescence and WB showed that downregulation of miR-29b affects IGF/PI3K/AKT signaling. **Conclusion:** miR-29b antagomir has therapeutic effects on cartilage autophagy and muscle atrophy in KOA, and miR-29b can be a potential therapeutic target for KOA.

Keywords miR-29b; knee osteoarthritis (KOA); muscle atrophy; cartilage degeneration; autophagy

* 基金项目: 国家重点研发计划“战略性先进电子材料”专项项目(2017YFB0403803); 上海科委临床医学研究资助项目(21MC1930200)

△ 通信作者 郑拥军 zhengyongjun1971@126.com



膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种关节退行性疾病, 其典型病理表现为滑膜炎症、软骨退变和软骨下骨板病变^[1]。主要临床表现为膝关节疼痛、躯体活动及日常生活活动能力下降等。膝关节周围肌肉在维持关节稳定、吸收应力中发挥重要作用^[2]。KOA 病人股四头肌肌力下降, 肌肉横截面积减小^[3,4], 肌肉的损伤可能与疾病的发生发展以及严重程度存在联系。根据最新临床实践指南可知, 针对下肢肌肉的强化锻炼是管理 KOA 的重要组成部分^[5], 改善下肢肌肉无力和萎缩可能会预防或治疗 KOA。

MicroRNA 是一类内生的、长度为 20~24 个甘氨酸的小 RNA, 转录后可调控基因的表达。MiR-29 家族包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c, 在肌肉生长中发挥着重要作用^[6]。其中 miR-29b 参与了多种因素引起的肌肉萎缩, 包括衰老、癌症、急性损伤等^[7]。研究表明, 在 KOA 的发病机制中, 软骨细胞死亡也是一个重要因素。细胞死亡分为两种: I 型死亡为凋亡, II 型死亡为自噬。KOA 后软骨细胞凋亡增加, miR-29b-3p 表达量上升, 抑制 miR-29b-3p 后, 软骨细胞凋亡减少^[8]。自噬对于 KOA 中软骨细胞的存活具有积极意义^[9]。本研究拟通过阐明 miR-29b 在 KOA 引起的股四头肌萎缩和关节软骨退变中的作用并对其相关机制进行初步探讨, 探究 KOA 具体发病机制, 为临床上制订 KOA 治疗方案提供新依据。

方 法

1. 实验动物

因雌性不易发生术后感染, 本实验选取雌性 SD 大鼠 40 只 (150~160 g, 6 周龄, 健康, SPF 级别), 来自上海灵畅生物科技有限公司。饲养于复旦大学, 动物房环境温度设置为 24℃, 湿度控制在 40%±5%, 明/暗周期为 12 小时, 常规喂食、饮水。涉及动物及其管理的实验方案经复旦大学动物科学部伦理委员会批准和执行 (伦理批准号: 202006007S)。

2. 药品与试剂

苯巴比妥钠 (生工公司); 甲苯胺蓝染液、Masson 染液、HE 染液、PAS 染液、抗原修复液 (servicebio); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、TRIZOL、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒 (Takara 公司); 氯仿、异丙醇 (国药); miR-29b antagomir、miR-NC antagomir (吉玛公司); Anti-MuRF1 抗体、Anti-Fbx32 抗体、Anti-LC3B 抗体、Anti-p38 alpha/MAPK14 抗

体、Anti-mTOR (phospho S2448) 抗体、Anti-PERK (phospho T982) 抗体、Anti-Beclin-1 抗体、Anti-PI3K 抗体、Anti-AKT (phospho T308) 抗体 (Abcam 公司); ECL 超敏试剂盒 (天能公司); HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG、HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (BBI 公司); 所有 PCR 引物由上海生工公司合成。

3. 实验方法

(1) 实验分组及处理: 40 只 6 周龄大鼠按随机数字表法分为 4 组, 对照组 (Con 组)、模型组 (KOA 组)、KOA + miR-NC antagomir 组和 KOA + miR-29b antagomir 组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余三组采用前交叉韧带离断术 (anterior cruciate ligament transaction, ACLT) 建立 KOA 模型, 空白对照组仅进行手术但不切断前交叉韧带。造模前 1 周, 将配置好的 miR-NC antagomir 和 miR-29b antagomir 分别在大鼠膝关节周围肌内多点注射, 每只大鼠固定注射 9 个点, 每点注射 15 μg, 隔天注射, 持续 1 周。

(2) 膝关节炎模型的建立: 采用 ACLT 建立大鼠膝关节炎模型, 腹腔注射苯巴比妥钠溶液麻醉后, 剔除大鼠右侧膝关节毛发, 暴露膝关节, 钝性分离关节囊周围组织, 使用眼科剪剪开关节囊, 移过髌韧带, 使大鼠膝关节屈曲 90°, 待完全暴露关节腔内韧带后小心切断前交叉韧带, 随后用抽厘试验验证模型。造模成功后将髌韧带恢复正常位置, 逐步缝合后清洁切口。为避免手术部位感染, 术后前 3 天向大鼠肌肉注射青霉素。

(3) 大鼠双足平衡测试: 为观察 miR-29b antagomir 对大鼠膝关节疼痛的影响, 使用双足平衡法测痛仪对大鼠进行检测, 双足负重差用于反映疼痛情况。造模前 2 周每天让大鼠熟悉 1 次, 将大鼠放入透明塑料测试盒中进行适应性训练。后将大鼠双足分别放在测试仪压力传感器上, 前肢置于斜板, 尾部自然下垂, 测试过程中及时清理大鼠粪便和尿液, 避免误差。连续采集大鼠 5 s 内左、右足负重值, 每次 3 组, 将患侧肢体取值减去对照侧肢体取值, 算出相应双足负重差, 取平均值。实验于造模前 1 周测试 1 次, 造模后 1 周测试 1 次。为避免外部因素干扰, 所有测试安排在同一时间段进行, 且避免声光刺激大鼠。

(4) 实验取材: 实验造模 4 周后, 向大鼠腹腔注射苯巴比妥钠, 大鼠处于完全麻醉状态时, 用冰生理盐水对大鼠进行灌流处理, 随后迅速收集大鼠股四头肌和膝关节组织。

(5) 组织染色: 膝关节、股四头肌 HE 染色, 用二甲苯、无水乙醇、75% 乙醇对切片进行脱蜡处



理, 自来水冲洗干净, 用苏木素染液处理 5 min 后再次水洗、分化、反蓝处理, 脱水后使用伊红染液处理 5 min, 中性树胶封片; 膝关节 Masson 染色脱蜡过程同 HE 染色, 用 Masson A 液浸泡切片过夜, Masson B 和 Masson C 液等比例混合浸染切片 1 min, 清洗, 1% 的盐酸乙醇分化, 后使用 Masson D, E, F 液分别浸染切片 6 min、1 min 和 30 s, 再用 1% 的冰醋酸漂洗后进行脱水处理, 中性树胶封片; 膝关节甲苯胺蓝染色脱蜡过程同 HE 染色, 使用染液 5 min 后水洗, 用 0.1% 的冰醋酸分化处理水洗透明后封片; 股四头肌 PAS 染色, 脱蜡过程同 HE 染色, 用 PAS 染液 B 染色 15 min 后水洗, 避光条件下用 PAS 染液 A 染 30 min, 水洗后用 PAS 染液 C 染色 30 s, 水洗透明后封片。

(6) 免疫组化: 使用二甲苯、无水乙醇、75% 乙醇对组织切片进行脱蜡处理, 用抗原修复缓冲液进行抗原修复。在避光条件下用 3% 过氧化氢溶液孵育切片 30 min, 后用 3% BSA 覆盖组化圈中组织, 室温封闭 40 min。滴加配好的一抗覆盖组织, 4℃ 条件下孵育过夜; 吸走一抗, 将切片清洗 3 次, 室温条件下避光孵育荧光二抗 1 h; 孵育结束后加入 DAB 染液, 待在显微镜下看到棕黄色阳性染液时吸除 DAB 染液清洗, 用苏木素、苏木素分化液和苏木素返蓝液对细胞核进行染色。脱水处理后进行封片。

(7) 免疫荧光染色: 使用二甲苯、无水乙醇、75% 乙醇对组织切片进行脱蜡处理, 用抗原修复缓冲液进行抗原修复。在组化圈内滴加 200 μ l 5% BSA, 室温条件封闭 40 min 后吸走封闭液, 加入一抗 4℃ 孵育过夜; 吸走一抗, 将切片清洗 3 次, 室温条件下避光孵育荧光二抗 1 h; 孵育结束后滴加 DAPI 避光孵育 10 min; 组织切片清洗 3 次后孵育自发光淬灭剂 5 min, 用抗荧光淬灭封片。

(8) 蛋白印迹 (Western blot, WB) 检测: 剪取米粒大小组织, 使用组织研磨仪破碎后加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂提取动物组织总蛋白, 并使用 BCA 法进行蛋白定量。向每管蛋白中加入 5X loading buffer, 震荡混匀离心后, 在 100℃ 的水浴锅中加热蛋白样品 10 min。分离胶和浓缩胶配制完成后, 加入准备好的蛋白样品及 marker 进行电泳, 电泳结束后进行 300 mA 和 120 min 的转膜; 使用 5% BSA 于室温封闭 2 h 后使用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入稀释好的一抗 MuRF1、Atrigon-1、LC3、Beclin-1、GAPDH 于 4 度摇床孵育过夜; 回收一抗, TBST 洗膜 3 次, 加入对应的抗兔、抗鼠二抗室温孵育 2 h, 再次 TBST 清洗 3 次; 最后均

匀滴加 ECL 发光液于凝胶成像仪进行曝光拍照。

(9) 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测: 称取 50 mg 组织到 EP 管中, 使用组织研磨仪破碎组织, 加入 Trizol 裂解组织, 加入氯仿和异丙醇提取组织中的总 RNA 用于后续试验。按照试剂盒说明进行 RT-PCR 反应, 条件为 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 20 s, 进行 40 个循环, 最后溶解 1 个循环 (95℃ 60 s, 55℃ 30 s)。引物设计为: miR-29a:5'-CGCTAGCAC-CATCTGAAATCGGTTA-3'; miR-29b:5'-CGCGTAG-CACCATTGAAATCAGTGTT-3'; miR-29c:5'-CG-CGTAGCACCATTGAAATCGGTTA-3'; U6 上游: 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3'; 下游: 5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGC-G-3'。使用 ddCt 法计算 RNA 的相对表达量。

4. 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析统计。所有实验数据表示为均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$)。两组间的数据使用 *t* 检验, 多样本数据使用单因素方差分析进行统计分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. KOA 大鼠股四头肌和软骨中的 miR-29b 均上升, 注射 miR-29b antagomir 可抑制 miR-29b 上升 qPCR 结果显示, KOA 组大鼠膝关节软骨和股四头肌中, miR-29b 上升 (见图 1B, 1E), 注射 miR-29b antagomir 后, 关节软骨和股四头肌中 miR-29b 均下降。而膝关节软骨和股四头肌中的 miR-29a 和 miR-29c 在造模前后以及注射 miR-29b antagomir 前后均无显著变化 (见图 1A, 1C, 1D, 1F)。

2. KOA 大鼠模型中, miR-29b antagomir 可缓解 KOA 引起的膝关节软骨退变

各组大鼠在造模前左右膝关节功能平衡。在接受 ACLT 术后, 右侧后肢负重能力下降。结果显示, miR-29b antagomir 可改善这种负重能力下降的程度 (见图 2A)。由此表明, miR-29b 参与了实验组大鼠右膝关节功能的恢复 (见图 2B)。

HE 染色结果显示 KOA 组大鼠膝关节组织发生改变, 如滑膜增生、炎症浸润、局灶性软骨损失、骨侵蚀等, 下调 miR-29b 明显缓解了以上症状 (见图 2C)。KOA 组的 Mankin 评分为 (4.6 $\pm$ 0.4) 分, 显著高于 Con 组评分; 然而与 Con 组相比, miR-29b antagomir 组的 Mankin 评分下降 (见图 2D)。此外, Masson 染色和甲苯胺蓝染色均显示软骨结构性改变

差异, KOA 组软骨厚度低于 Con 组, 而 miR-29b antagomir 可增加软骨厚度 (见图 2E, 2F)。由此表明, 下调 miR-29b 可减轻 KOA 症状。

3. KOA 大鼠模型中, miR-29b antagomir 可抑制 KOA 引起的股四头肌萎缩

KOA 造模 4 周后取材, 发现 KOA 组大鼠股四头肌体积及肌肉重量小于 Con 组 (见图 3A), 注射 miR-29b antagomir 后, 肌肉体积减小、重量减轻的情况得到改善, 而各组之间大鼠的体重无明显差异 (见图 3B)。

股四头肌 HE 染色显示 (见图 3C), ACLT 术后大鼠股四头肌横截面积以及最大直径均减小 (见图 3D-1), PAS 染色显示 (见图 3E), ACLT 术后, 大鼠股四头肌糖原含量减少。在注射 miR-29b antagomir 后, 股四头肌糖原减少情况受到抑制 (见图 3D-2)。MuRF1 和 Atrogen-1 是肌萎缩的特异性

蛋白, 在多种肌肉萎缩模型中表达均上升, 实验中注射 miR-29b antagomir 后, miR-29b antagomir 组与肌肉萎缩相关的蛋白表达量降低 (见图 3F-G)。由此表明, miR-29b antagomir 的干预可以抑制 KOA 引起的股四头肌肌肉萎缩。

4. KOA 大鼠关节软骨凋亡水平上升, 自噬水平降低, 注射 miR-29b antagomir 后, 凋亡受到抑制, 自噬水平上升

LC3B 和 Beclin-1 是自噬相关蛋白, 两种蛋白表达增加表明自噬活化。ERK 和 P38 被磷酸化为 p-ERK 和 p-P38 时, 表明蛋白活化, p-ERK 和 p-P38 表达增多时, 说明凋亡水平上升。

免疫组化结果显示, miR-29b antagomir 可上调软骨中的自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin-1 (见图 4A, 4B), 下调软骨中凋亡相关蛋白 p-ERK 和 p-P38 (见图 4C, 4D)。

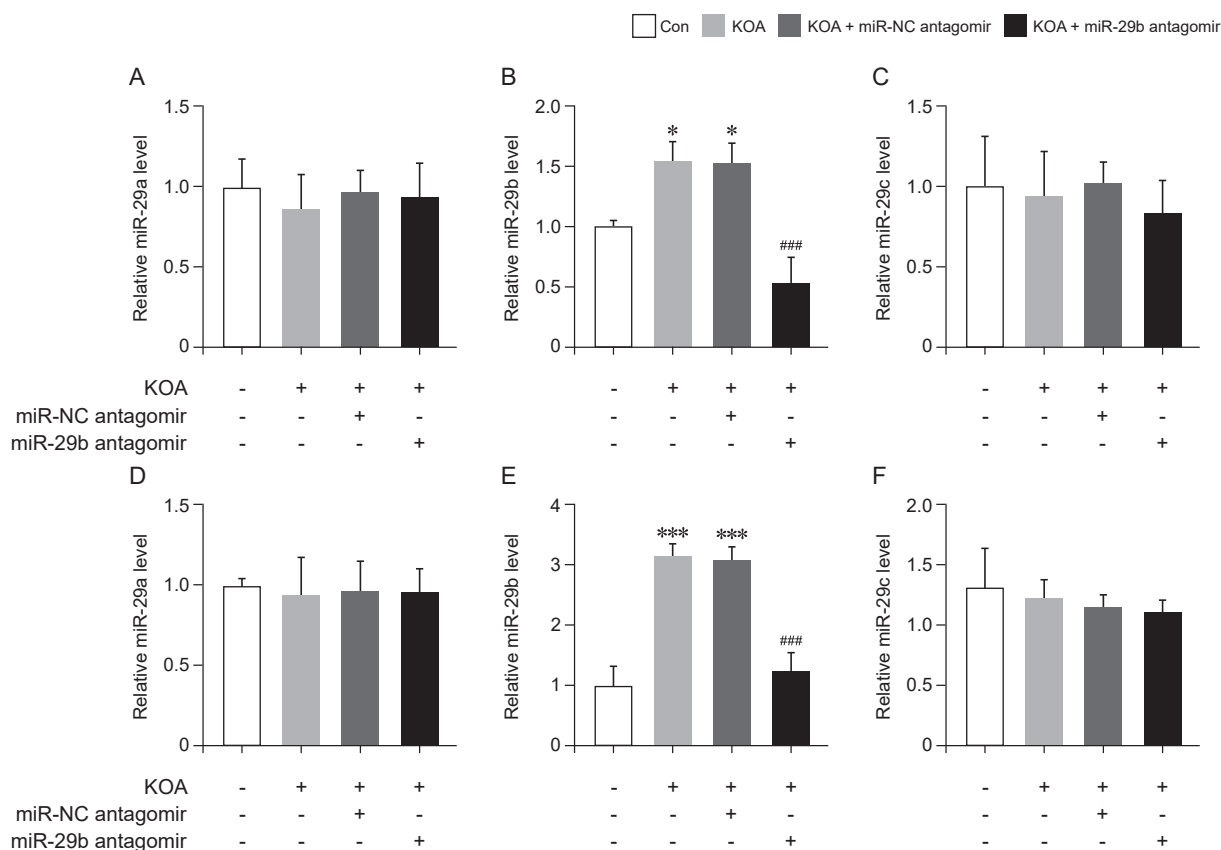


图 1 miR-29 家族在膝关节软骨和股四头肌中的表达水平

(A) miR-29a 在关节软骨中的表达; (B) miR-29b 在关节软骨中的表达; (C) miR-29c 在关节软骨中的表达; (D) miR-29a 在股四头肌中的表达; (E) miR-29b 在股四头肌中的表达; (F) miR-29c 在股四头肌中的表达

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 Con 组相比; ### $P < 0.001$, 与 KOA 组相比

Fig. 1 Expression levels of miR-29 family in knee articular cartilage and quadriceps

(A) miR-29a expression in articular cartilage; (B) miR-29b expression in articular cartilage; (C) miR-29c expression in articular cartilage; (D) miR-29a expression in quadriceps; (E) miR-29b expression in quadriceps; (F) miR-29c expression in quadriceps.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group Con; ### $P < 0.001$, compared with group KOA.

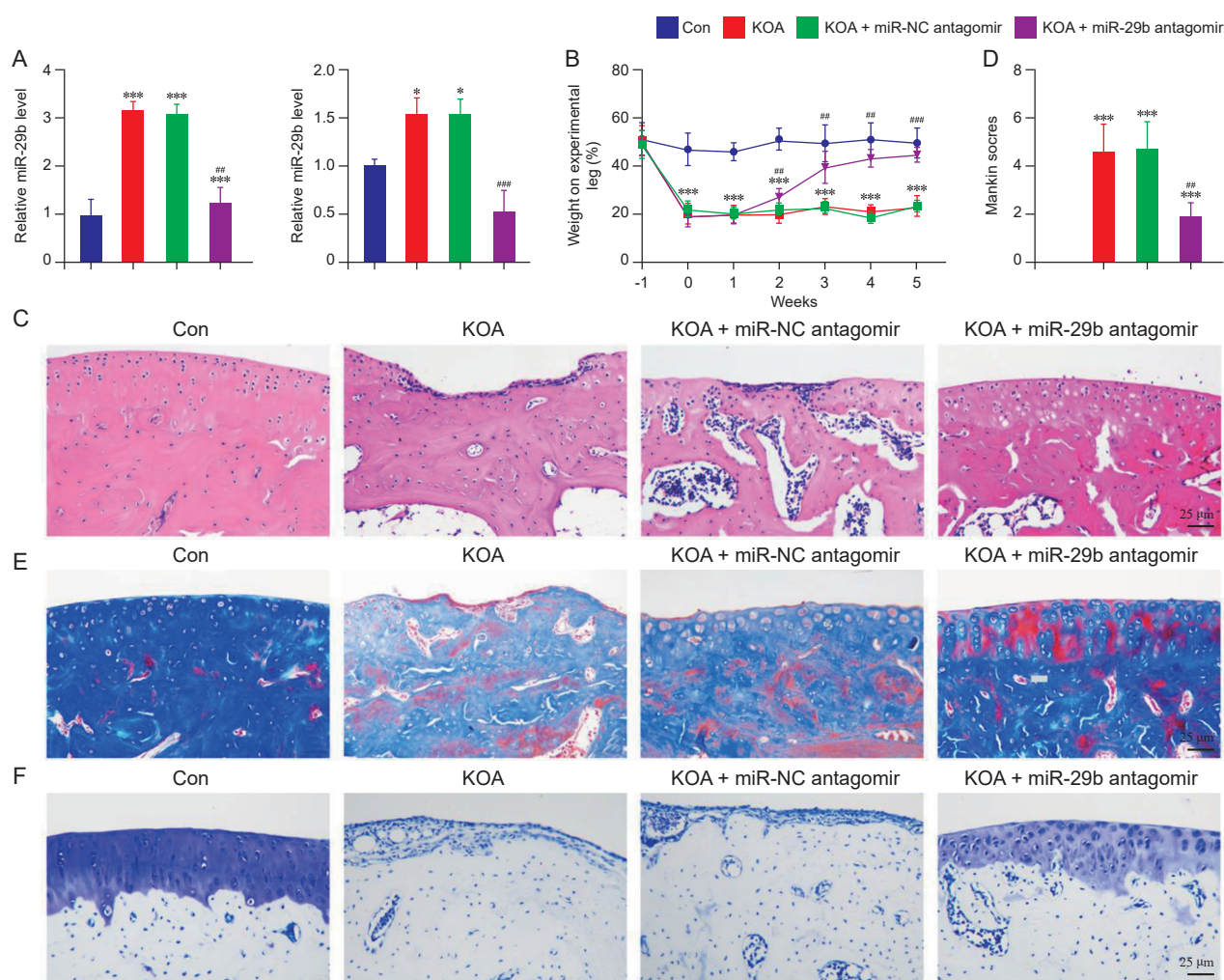


图2 KOA大鼠模型下肢行为及膝关节形态学变化

(A) miR-29b在膝关节软骨和股四头肌中的表达水平; (B) 各组大鼠双下肢的负重实验; (C) 膝关节软骨 HE 染色; (D) 膝关节软骨 Mankin 评分; (E) 膝关节软骨 Masson 染色; (F) 膝关节软骨甲苯胺蓝染色。标尺 = 25 μ m

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 Con 组相比; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, 与 KOA 模型组相比

Fig. 2 Behavior and morphology of the knee joint in a rat model of knee osteoarthritis (KOA)

(A) Expression of miR-29b in the joint and muscle; (B) Weight-bearing assay; (C) Hematoxylin-eosin staining of the cartilage in the knee joint; (D) Mankin scores across the different groups of rats; (E) Masson staining of the cartilage in the knee joint; (F) Toluidine blue staining of the cartilage in the knee joint. Scale bar = 25 μ m.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group Con; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, compared with group KOA.

5. KOA 大鼠模型中, PI3K/P-AKT/P70 通路, 在 KOA 导致的股四头肌萎缩中发挥作用

免疫荧光显示, KOA 模型股四头肌中 PI3K 和 p-AKT 的表达降低, 而 miR-29b antagonist 可增加其在股四头肌中的表达含量 (见图 5A-C); 此外, Western blot 结果显示, KOA 组股四头肌中 PI3K 和 p-AKT 的表达降低, AKT 下游 P70 含量也降低; 在注射 miR-29b antagonist 后, 与 KOA 组大鼠相比, PI3K、p-P70 和 p-AKT 的表达含量升高 (见图 5D-F)。由此表明 miR-29b antagonist 可能通过 PI3K/p-AKT/P70 信号通路抑制股四头肌萎缩。

讨论

膝骨关节炎是老年人群中常见的关节退行性病变疾病, 其潜在致病因素包括软骨细胞凋亡、炎症、自噬减少等, 其中自噬对于维持软骨细胞正常功能至关重要。最近的研究也表明, 炎症与自噬相关, 炎症可以抑制 KOA 病人软骨细胞的自噬, 加速膝骨关节炎疾病的进展。KOA 模型中 LC3B 和 Beclin-1 含量的增加, 可以促进软骨细胞自噬能力增强^[10]。因此, 调节自噬功能或许是临床上对于 KOA 的一种新的治疗策略。

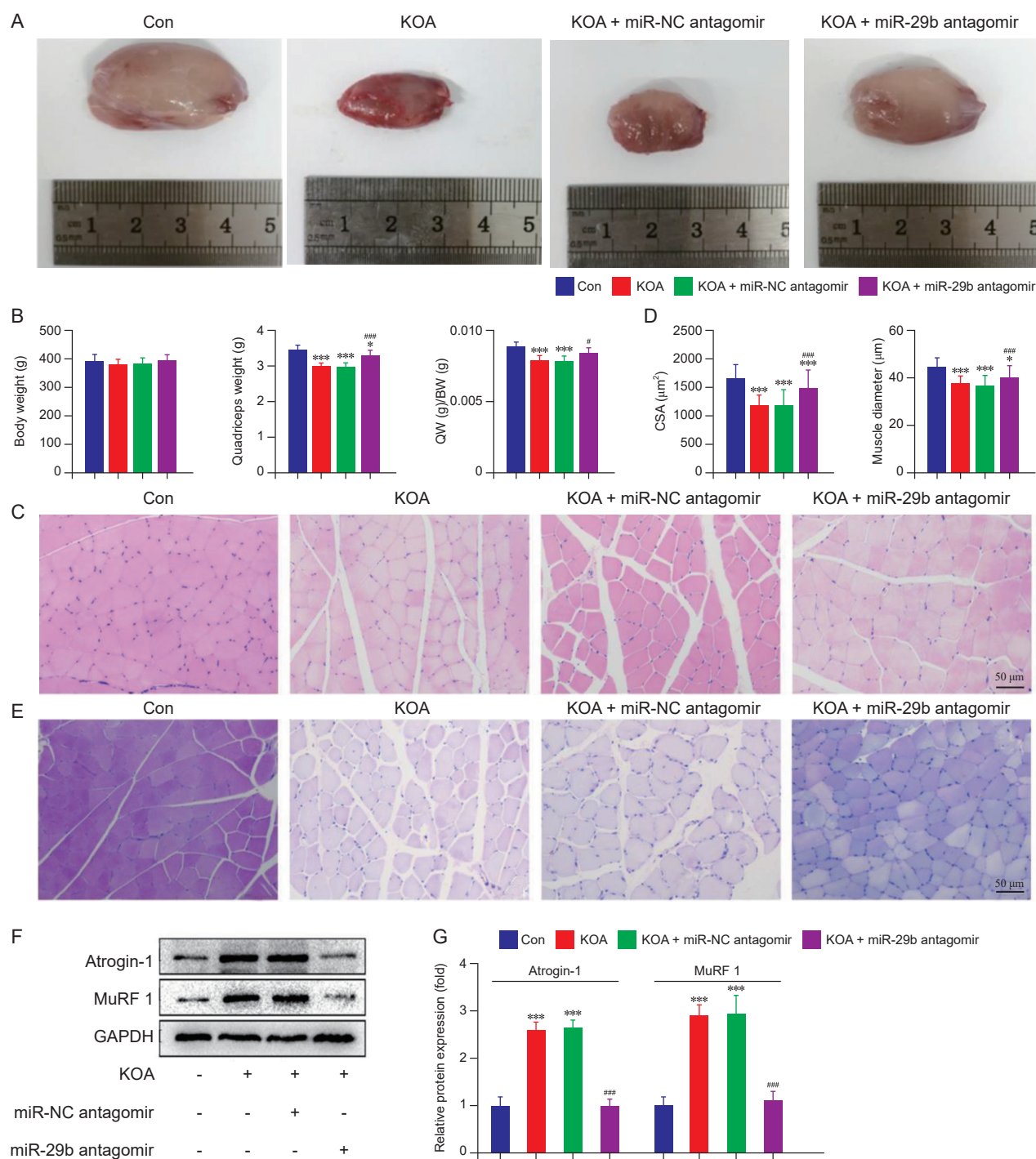


图 3 KOA 模型大鼠股四头肌形态变化

(A) 大鼠 KOA 模型中股四头肌形态变化; (B) 体重、股四头肌重量、股四头肌重量/体重比; (C) 股四头肌 HE 染色; (D) 股四头肌肌肉横截面积; (E) 股四头肌 PAS 染色; (F, G) 萎缩相关蛋白 Atrogin-1 和 MuRF1 表达含量。标尺 = 50 μm

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 Con 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与 KOA 组相比

Fig. 3 Morphology of the quadriceps muscle in the rat model of KOA

(A) A typical picture of the quadriceps muscle of each group; (B) Body weight, quadriceps weight, and quadriceps weight/body weight ratio; (C) Hematoxylin-eosin staining of the quadriceps muscle; (D) The diameter and cross-sectional area of the quadriceps; (E) Periodic acid-schiff staining of the quadriceps; (F, G) Western blot showed up-regulated MuRF1 and Atrogin-1 protein levels in KOA group, and downregulated levels in miR-29b antagonist group. Scale bar = 50 μm.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group Con; # $P < 0.005$, ### $P < 0.001$, compared with group KOA.

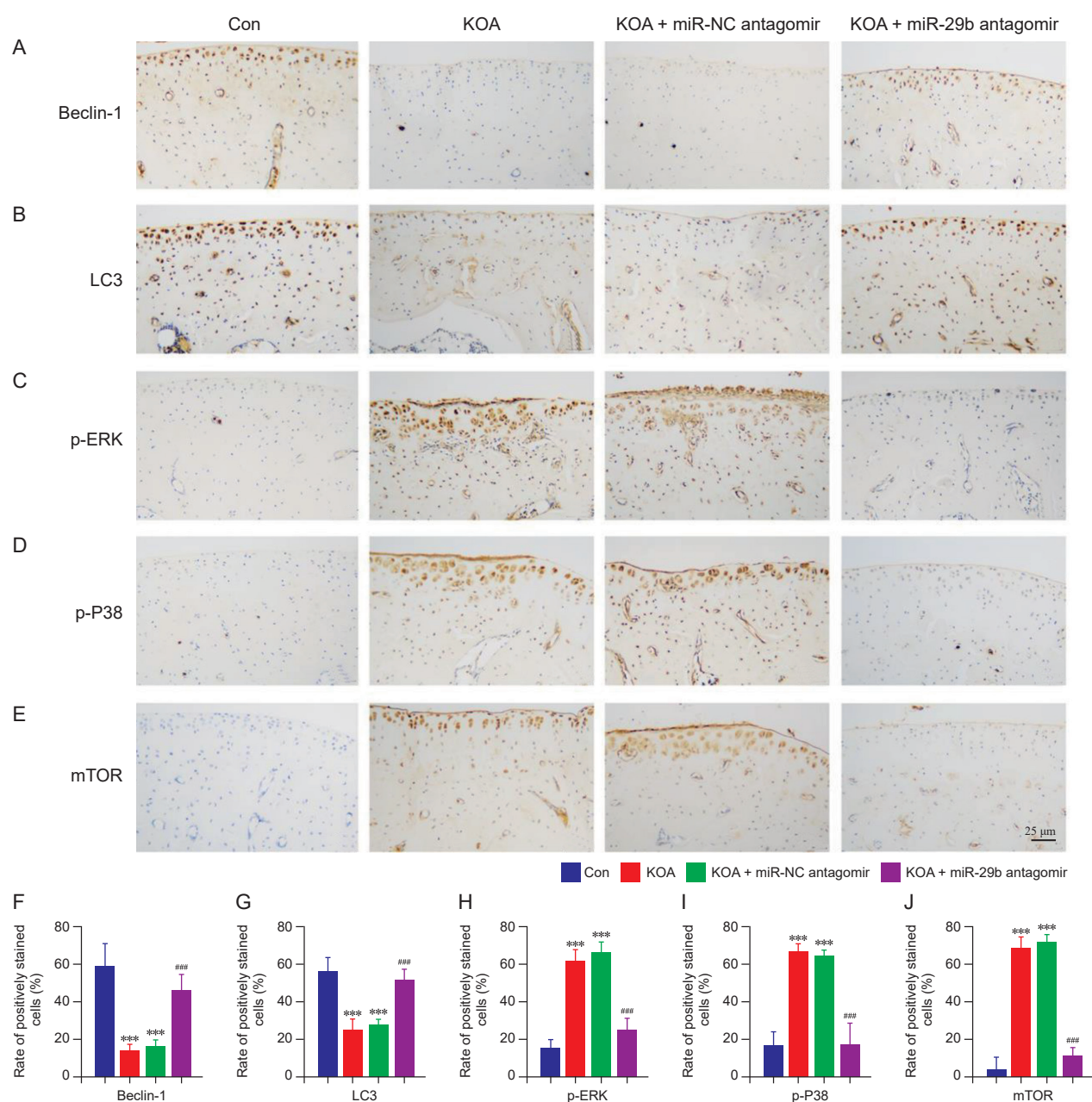


图 4 大鼠 KOA 模型中软骨自噬相关蛋白表达的免疫组化结果 (A) Beclin-1 的表达; (B) LC3 的表达; (C) p-ERK 的表达; (D) p-P38 的表达; (E) mTOR 的表达; (F-J) 蛋白表达的定量分析。标尺 = 25 μm
*** $P < 0.001$, 与 Con 组相比; #### $P < 0.001$, 与 KOA 组相比

Fig. 4 Immunohistochemistry for the expression of autophagy-related proteins in the cartilage of rats with KOA (A) Expression of Beclin-1; (B) Expression of LC3; (C) Expression of p-ERK; (D) Expression of p-P38; (E) Expression of mTOR; (F-J) Quantitative analysis of protein expression. Scale bar = 25 μm.
*** $P < 0.001$, compared with group Con; #### $P < 0.001$, compared with group KOA.

本研究表明, miR-29b antagonist 可通过上调自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin-1 的表达含量来减轻关节软骨退变, 改善 KOA 症状。细胞炎症相关因子 IL-1 β 和 TNF- α 与分解代谢增强有关, 这些炎症细胞因子同样会导致肌肉萎缩的发生^[11,12], miR-29b

antagonist 可下调这些炎症因子含量, 改善关节软骨退变及肌肉萎缩的发生发展。

MAPK 信号通路在 KOA 中发挥重要作用, 该通路主要包括 P38、JNK、ERK 等重要信号蛋白, 调控滑膜炎的发生发展^[13,14]。Akt 又称蛋白激酶 B,

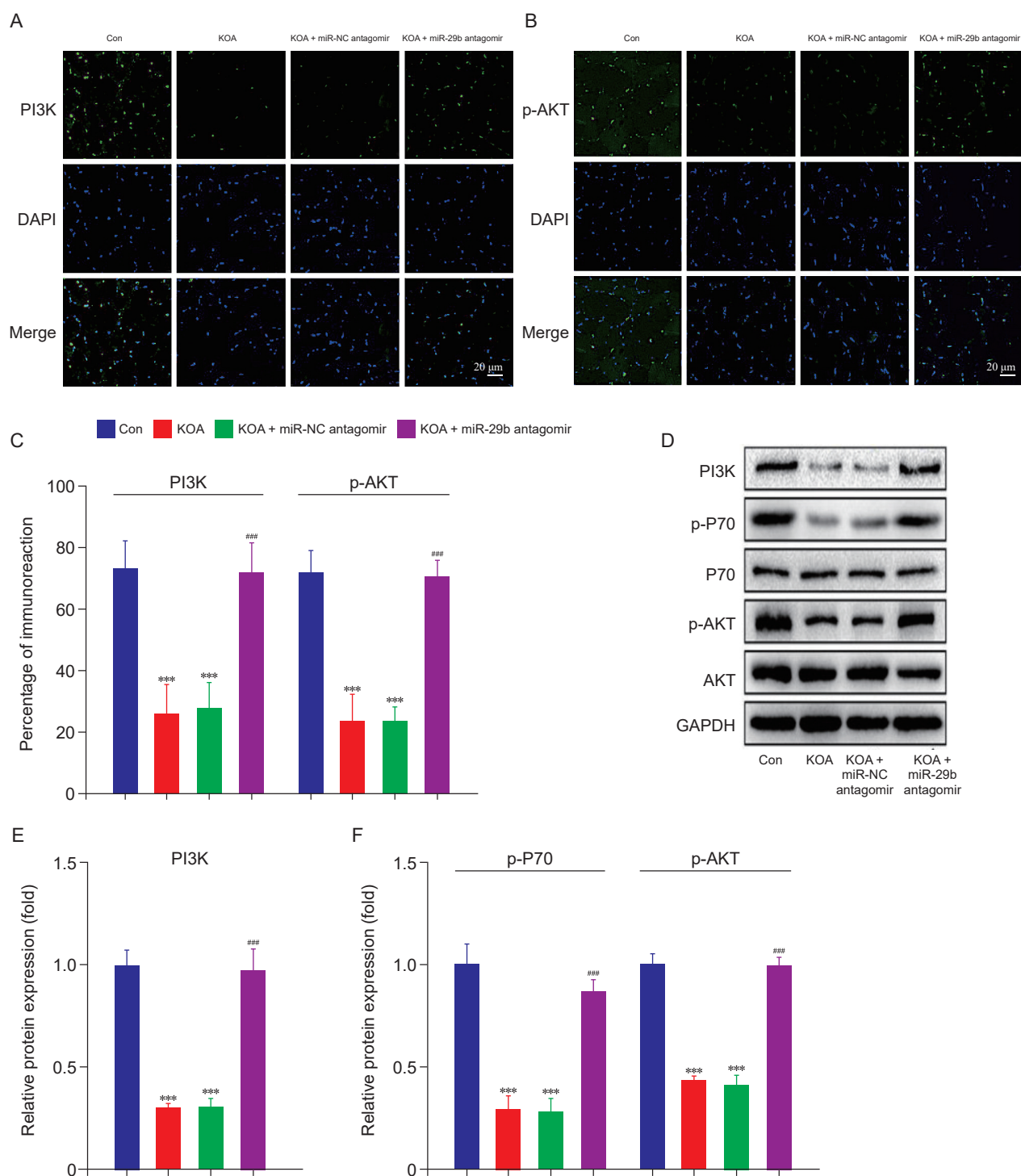
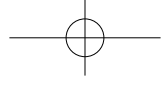


图 5 大鼠股四头肌萎缩相关通路蛋白的免疫荧光表达
(A, B) 大鼠股四头肌萎缩相关蛋白 PI3K 和 p-AKT 的免疫荧光表达; (C) PI3K 和 p-AKT 表达的定量分析; (D-F) PI3K、p-P70 和 p-AKT 的蛋白表达含量。标尺 = 20 μ m
*** P < 0.001, 与 Con 组相比; #### P < 0.001, 与 KOA 组相比

Fig. 5 Immunofluorescence expression of atrophy-related pathway proteins in rat quadriceps
(A, B) Immunofluorescence for the expression of the PI3K and p-AKT in the rat quadriceps muscle; (C) Quantitative analysis of PI3K and p-AKT expression; (D-F) Western blot analysis for the PI3K/AKT/P70 pathway showed decreased levels of PI3K, p-AKT and p-P70 in KOA group, and increased levels of PI3K, p-AKT and p-P70 in miR-29b antagonist group. Scale bar = 20 μ m
*** P < 0.001, compared with group Con; #### P < 0.001, compared with group KOA.



是 PI3K/Akt 信号通路的核心, PI3K/Akt 信号通路在调节细胞自噬中发挥重要作用。mTOR 蛋白作为 Akt 和 MAPK 通路的共有下游蛋白, 在 KOA 模型中可通过抑制软骨的自噬来抑制软骨细胞的分解代谢^[15], 因此, mTOR 蛋白很有可能是治疗 KOA 的潜在靶点。在本研究中, 也探讨了抑制 miR-29b 对 MAPK 信号通路的影响。

KOA 的发生和发展对膝关节周围的肌群影响严重。肌肉功能受到影响后将进一步加剧疾病的进展, 形成关节退化、肌肉无力甚至肌肉萎缩的恶性循环^[16]。研究表明, KOA 病人下肢肌肉横截面积降低了 12%~19%^[17]。肌肉萎缩的主要分子机制包括蛋白质合成减少、分解增加以及肌卫星细胞再生受损^[18]。PI3K/p-AKT 信号通路与蛋白质合成相关, 本研究发现 KOA 大鼠股四头肌中 miR-29b 水平升高, PI3K/p-AKT 信号降低, 下调 miR-29b 水平可增强 PI3K/p-AKT 信号通路, 上调蛋白合成水平, 并产生抗萎缩作用。因此, miR-29b antagomir 可有效改善 KOA 引起的股四头肌萎缩情况。

本研究从 KOA 引起股四头肌萎缩的临床现象出发, 发现 miR-29b 与肌肉萎缩和软骨退变均存在一定联系, 揭示了 miR-29b antagomir 对 KOA 大鼠软骨自噬和肌肉萎缩的改善作用。抑制 miR-29b 可促进下肢功能的恢复, 减轻软骨退变以及股四头肌萎缩。软骨中的 MAPK 信号通路和肌肉中的 PI3K/Akt/P70 信号通路在 miR-29b antagomir 发挥治疗作用中至关重要。由此可知, miR-29b 可能是 KOA 的潜在治疗靶点。但目前对于 KOA 引起股四头肌萎缩的深层机制尚不明确。本研究不足之处, 前期动物实验中膝关节局部注射 miR-29b antagomir 对软骨和肌肉均产生影响, 无法判断该作用是改善肌肉功能从而缓解软骨退变, 还是增强软骨细胞自噬、抑制关节炎进展从而改善肌肉萎缩的, 有待进一步研究。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Yunus MHM, Nordin A, Kamal H. Pathophysiological perspective of osteoarthritis[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(11):614.
- [2] Krishnasamy P, Hall M, Robbins SR. The role of skeletal muscle in the pathophysiology and management of knee osteoarthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, 57(suppl_4):iv124.
- [3] Aslan Ö, Batur EB, Meray J. The importance of functional hamstring/quadriceps ratios in knee osteoarthritis[J]. *J Sport Rehabil*, 2020, 29(7):866-870.
- [4] Yamauchi K, Suzuki S, Kato C, *et al.* Atrophy of individual thigh muscles measured by MRI in older adults with knee osteoarthritis: a cross-sectional study[J]. *Ann Phys Rehabil Med*, 2020, 63(1):38-45.
- [5] Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(11):1578-1589.
- [6] O'Reilly S. MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18:11.
- [7] Li J, Chan MC, Yu Y, *et al.* miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15201.
- [8] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(7):1237-1243.
- [9] 赵旭, 傅志俭. 自噬在骨性关节炎中的研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(4):241-244.
- [10] Bennell KL, Wrigley TV, Hunt MA, *et al.* Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2013, 39(1):145-176.
- [11] Vanderveen BN, Fix DK, Carson JA. Disrupted skeletal muscle mitochondrial dynamics, mitophagy, and biogenesis during cancer cachexia: a role for inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3292087.
- [12] Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease[J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(4):711-724.
- [13] Xu K, Ma C, Xu L, *et al.* Polygalacic acid inhibits MMPs expression and osteoarthritis via Wnt/ β -catenin and MAPK signal pathways suppression[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63:246-252.
- [14] LI X, Guo Y, Huang S, *et al.* Coenzyme Q10 prevents the interleukin-1 beta induced inflammatory response via inhibition of MAPK signaling pathways in rat articular chondrocytes[J]. *Drug Dev Res*, 2017, 78(8):403-410.
- [15] 阮丽萍, 刘健, 葛瑶, 等. 骨关节炎大鼠软骨 PI3K/Akt-mTOR 及 Beclin-1 自噬通路的表达及相关性分析 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2015, 44(4):429-433, 439.
- [16] Bennell KL, Wrigley TV, Hunt MA, *et al.* Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2013, 39:145-176.
- [17] Arokoski MH, Arokoski JP, Haara M, *et al.* Hip muscle strength and muscle cross sectional area in men with and without hip osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2002, 29:2185-2195.
- [18] Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(1):58-74.

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2022.04.004

天南星-生姜药对治疗疼痛机制的网络药理学研究 *

王泊宁¹ 樊碧发² 王延雷² 张 毅² 李怡帆² 刘 星¹ 毛 鹏^{2△}(¹北京中医药大学研究生院, 北京 100029; ²中日友好医院疼痛科, 北京 100029)

摘 要 目的: 运用网络药理学方法, 分析天南星-生姜药对治疗疼痛的潜在靶点和作用机制。**方法:** 通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 检索出天南星和生姜的活性成分和靶点。以 “pain” 为关键词, 通过 DisGeNet 数据库检索出和疼痛相关的靶基因, 并得到共同的靶点。通过 String 数据库构建蛋白互作网络图 (protein-protein interaction, PPI) 并进行分析, 筛选出重要靶点。通过 DAVID 网站对共同靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。**结果:** 从天南星和生姜药对中共筛选出 10 个有效成分, 药物与疾病有 63 个共同靶点, 包括 CNR1、ESR1、MAPK3、CYP3A4、JUN、HDAC1 等。GO 分析得出的生物学过程包括炎症反应过程、EKR1 和 EKR2 级联的正向调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录过程、G 蛋白偶联受体信号通路等。KEGG 富集共得到 53 条通路, 其中与疼痛关系较为密切的包括钙信号通路、胆碱能突触信号传递、雌激素信号通路、癌症途径、5-羟色胺能通路等。**结论:** 天南星-生姜药对中的豆甾醇、 β -谷甾醇、二氢辣椒碱等有效成分可能通过作用于 CNR1、ESR1、MAPK3、CYP3A4、JUN、HDAC1 等靶点, 调节细胞内钙离子传导、胆碱能突出信号传递、癌症信号通路等多种类型疼痛均可发挥作用, 为进一步的实验设计提供理论基础。

关键词 网络药理学; 天南星; 生姜; 疼痛; 信号通路

Study on mechanism of Tiannanxing-Shengjiang drug pair in treating pain based on network pharmacology *

WANG Boning¹, FAN Bifa², WANG Yanlei², ZHANG Yi², LI Yifan², LIU Xing¹, MAO Peng^{2△}(¹Department of Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ²Department of Pain Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To analyze the potential targets and mechanisms of Tiannanxing-Shengjiang drug pair in the treatment of pain using the network pharmacology approach. **Methods:** The TCMSP database was used to screen the active components and targets of the drug pair "Tiannanxing-Shengjiang". The target genes related to pain were retrieved from the DisGeNet database, and the intersection targets were obtained. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed and analyzed by string database to screen out the important targets. GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets were performed through the DAVID website. **Results:** A total of 10 active ingredients were screened from Tiannanxing-Shengjiang drug pair and we found 63 intersection targets between drug and disease, including CNR1, ESR1, MAPK3, CYP3A4, JUN, and HDAC1. The biological processes derived from GO analysis included inflammatory response, positive regulation of EKR1 and EKR2 cascade, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, and G-protein coupled receptor signaling pathway. A total of 53 pathways were obtained from KEGG, among which those more closely related to pain included calcium signaling pathway, cholinergic synapse, estrogen signaling pathway, cancer pathway, and serotonergic synapse. **Conclusion:** The active ingredients such as Stigmasterol, β -sitosterol, and dihydrocapsaicin in the Tiannanxing-Shengjiang pair may act on various types of pain by acting on CNR1, ESR1, MAPK3, CYP3A4, JUN, HDAC1 and other targets to regulate intracellular calcium ion conduction, cholinergic prominent signaling, cancer signaling pathway and so on, providing a theoretical basis for further experimental design.

Keywords network pharmacology; tiannanxing; shengjiang; pain; signaling pathway

* 基金项目: 国家临床重点专科建设项目 (2014-zdjk-002); 北京化工大学-中日友好医院生物医学转化工程研究中心联合项目 (XK2020-13)

△ 通信作者 毛鹏 doctormaopeng@126.com