

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.008

神经生长因子抗体在小鼠膝关节炎疼痛模型中的作用研究*

陈永锋 冯亚非 宋和强 王 鹏 燕 明[△]

(空军军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)抗体 L148M 在碘乙酸(Monoiodoacetate, MIA)诱导的膝关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)小鼠模型中的作用机制。**方法:**随机将 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠分为对照组、MIA 组和 L148M 组。采用关节腔注射 20 mg/mL MIA 诱导 KOA 小鼠模型。手术后 2 周, L148M 组小鼠给予腹腔注射 L148M(10 mg/kg)处理。通过苏木精-伊红(HE)染色、番红 O 染色、OARSI 评分和 Micro-CT 分析评估小鼠膝关节软骨及软骨下骨组织形态学变化。通过 qRT-PCR 检测 CCR2、MCP1、MMP-1、MMP-3、MMP-13、COL10、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平。通过 Western blotting 检测 INOS、COX-2、Collagen II 和 Aggrecan 的蛋白表达水平。通过免疫组织化学法分析 VEGFA 和 Ang-1 的蛋白表达水平。通过 Micro-CT 血管造影分析软骨下骨血管形成数量。**结果:**HE 染色结果显示, L148M 组小鼠软骨细胞数和关节软骨厚度均高于 MIA 组。番红 O 染色显示, L148M 组小鼠基质降解小于 MIA 组。L148M 组 OARSI 评分显著低于 MIA 组($P<0.05$)。micro-CT 扫描结果表明, L148M 组小鼠软骨和软骨下骨结构完整, 没有明显病理损伤。qRT-PCR 检测结果显示, 与 MIA 组相比, L148M 组小鼠 COL10、MMP1、MMP3 和 MMP-13 表达水平均显著降低($P<0.05$)。Western blotting 检测结果表明, 与 MIA 组相比, L148M 组小鼠 Collagen II 和 Aggrecan 表达水平升高, INOS 和 COX-2 表达水平降低($P<0.05$)。疼痛行为学分析显示, 与 MIA 组相比, L148M 组小鼠行走距离和机械刺激反应阈值均降低($P<0.05$)。micro-CT 血管造影分析显示, L148M 小鼠组微血管数量和体积明显低于 MIA 组($P<0.05$)。免疫组化检测显示, L148M 组小鼠 VEGFA 和 Ang-1 蛋白表达水平均显著低于 MIA 组($P<0.05$)。**结论:**L148M 通过抑制软骨下骨异常血管生成, 缓解关节炎疼痛; 并通过抑制炎症细胞因子表达, 减轻软骨和软骨下骨病理损伤。

关键词:膝关节炎; 神经生长因子抗体; 软骨基质; 血管形成

中图分类号:R-33; R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)21-4038-07

The Effect of Nerve Growth Factor Antibody in Mouse Knee Arthritis Pain Model*

CHEN Yong-feng, FENG Ya-fei, SONG He-qiang, WANG Peng, YAN Ming[△]

(Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the molecular mechanism of the protective effect of Nerve growth factor (NGF) antibody L148M in a mouse model of Kio osteoarthritis (KOA) induced by iodoacetic acid (MIA). **Methods:** Eight-week-old male C57BL/6 male mice were randomly divided into a control group, MIA group, and L148M group. KOA mouse model was induced by injecting 20 mg/mL MIA into joint cavity. Two weeks after the operation, mice in the L148M group were intraperitoneally injected with L148M (10 mg/kg). Hematoxylin-eosin (HE) staining, safranin O staining, OARSI score, and Micro-CT analysis were used to observe the morphological changes of knee joint cartilage and subchondral bone in mice. The expression levels of CCR2, MCP1, MMP-1, MMP-3, MMP-13, COL10, IL-1 β and TNF- α mRNA were detected by qRT-PCR. The expression levels of INOS, COX-2, Collagen II and Aggrecan were detected by Western blotting. The expression of VEGFA and Ang-1 protein was analyzed by immunohistochemistry. Micro-CT angiography analyzes the number of new blood vessels in subchondral bone. **Results:** HE staining results showed that the number of chondrocytes and cartilage thickness in the L148M group were higher than those in the MIA group. Safranin O staining showed that the matrix degradation of the L148M group was less than that of the MIA group. The OARSI score of the L148M group was significantly lower than that of the MIA group ($P<0.05$). The results of micro-CT scan showed that the cartilage and subchondral bone of the L148M group were intact and there was no obvious pathological damage. The results of qRT-PCR showed that compared with the MIA group, the mRNA expression level of COL10, MMP1, MMP3 and MMP-13 in the L148M group were significantly reduced ($P<0.05$). Western blotting results showed that compared with the MIA group, the protein expression levels of Collagen II and Aggrecan were increased in the L148M group, and the protein expressions level of INOS and COX-2 were decreased ($P<0.05$). Pain behavior analysis showed that compared with the MIA group, the travel distance and mechanical stimulus response threshold were decreased in the L148M group ($P<0.05$).

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81871799)

作者简介: 陈永锋(1986-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 骨关节炎, 电话: 17782599527, E-mail: 394906660@qq.com

[△] 通讯作者: 燕明(1987-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 骨关节炎, 电话: 13572020883, E-mail: YanMing13XJ@163.com

(收稿日期: 2021-03-02 接受日期: 2021-03-25)

05). Micro-CT angiography analysis showed that the number and volume of microvessels in the L148M group were significantly lower than those in the MIA group ($P<0.05$). Immunohistochemical examination showed that the protein expression level of VEGFA and Ang-1 in L148M group were significantly lower than those in MIA group ($P<0.05$). **Conclusion:** L148M can alleviate the joint pain response by inhibiting abnormal angiogenesis of subchondral bone; and reduce the pathological damage of cartilage and subchondral bone by inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

Key words: Knee arthritis; Nerve growth factor antibody; Cartilage matrix; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4038-07

前言

膝关节骨性关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是一种严重的慢性退行性疾病,衰老、肥胖和关节损伤都是 KOA 诱发因素,已发展成老年群体面临的重大公共卫生问题^[1]。由于目前对 KOA 疼痛机制尚未阐述清楚,现有大多数药理治疗都集中于缓解炎症反应和改善关节功能^[2,3]。但通常伴随中度至重度疾病复发,以及胃肠道、肾脏和心血管副作用问题^[4,5]。关节置换手术同样面临高龄患者手术成功率和较高疾病复发风险等问题^[6,7]。因此,目前仍需要积极探索行之有效的预防和治疗策略。

神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)属于与外周神经系统和脑细胞发育相关的分泌蛋白^[8]。除在神经元生长、分化、成熟,以及损伤修复过程中发挥重要作用外^[9],临床研究数据也表明,患有类风湿性关节炎和其他类型关节炎(包括 KOA)患者滑液中检测到 NGF 含量显著升高^[10]。而在炎症或退化关节部位,NGF 表达水平异常和慢性炎症反应被认为是导致患者疼痛的主要原因^[11]。动物模型及临床研究显示,抑制 NGF 可以减轻疼痛和痛觉过敏^[12,13],但其作用机制仍有待深入研究。

本研究分析了 NGF 抗体--L148M 对碘乙酸(Monoiodoacetate, MIA)诱导 KOA 小鼠模型的治疗效果,通过检测小鼠膝关节中炎症因子、氧化应激因子,以及血管生成水平的变化,解析了 NGF 抗体缓解 KOA 膝关节病理损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 MIA、碘伏、水合氯醛和 1%戊巴比妥钠购自美国 Sigma-Aldrich 公司;L148M 购自 Exalpha Biological 公司;10%福尔马林缓冲液、EDTA、苏木精、改良番红 O- 固绿软骨染色液试剂盒和辣根过氧化物酶链霉素亲和素购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;BCA 蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;脱钙剂溶液(Rapid Cal Immuno)购自美国 Lymed 公司;抗体 INOS、COX-2 和 Ang-1 购自英国 Abcam 公司;抗体 Collagen II、Ag-grecan 和 VEGFA 购自 Abnova 公司;高分辨率 micro-CT (SkyScan 1176) 购自德国布鲁克公司;Real-Time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级健康 8 周龄 C57BL/6(18~22 g)雄性小鼠空军军医大学第二附属医院骨科实验室提供[许可证号:SYXK(陕)2020-007],所有小鼠先进行 7 天适应性饲养,湿度:50~60%,温度:24±1℃,维持 12 h 明/暗循环照明,小鼠可自由获取食物和饮水。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及小鼠膝关节炎模型制备 按照随机数法将 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:对照组,小鼠麻醉后右膝关节腔内注射 50 μL 无菌生理盐水;MIA 组,小鼠麻醉后右膝关节腔内注射 50 μL 20 mg/mL MIA 溶液,手术后 2 周于腹腔注射无菌生理盐水(10 mg/kg);L148M 组,小鼠麻醉后右膝关节腔内注射 50 μL 20 mg/mL MIA 溶液,手术后 2 周于腹腔注射 L148M(10 mg/kg)。用 1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉,右膝手术部位常规碘伏消毒,使右膝屈膝 90 度,27G 针垂直髌韧带穿刺至有落空感。根据不同分组,向膝关节腔内缓慢注射 50 μL 无菌生理盐水或 MIA 溶液。拔针后用纱布压迫 10 s,再屈伸膝关节 5 次。结束后将小鼠置于温暖处,待小鼠苏醒再放回动物房,允许自由进食。

1.2.2 HE 染色观察软骨组织形态 在 MIA 造模后第 4 周(L148M 干预后第 2 周),随机从对照组、MIA 组、L148M 组各抽取 8 只小鼠,分别经腹膜注射水合氯醛麻醉,颈部脱臼法处死后,用咬骨钳和手术刀分离取出小鼠右膝关节,仔细清理膝关节周围软组织及肌肉。用 10%福尔马林缓冲液固定 24 h。再经 10% EDTA(pH7.3)脱钙 3 周。然后用石蜡包埋,制备 4 μm 切片。切片脱蜡,水化后,加入苏木素染色 20 min,蒸馏水冲洗 1 min。再于 1%氨水酒精中处理 30 s,蒸馏水冲洗 30 min。用 95%酒精脱水 1 min 后,加入 0.5%伊红染色 90 s。脱水封片。将封片置于 Olympus 光学显微镜 200 倍镜下观察记录染色情况。

1.2.3 番红 O 染色观察软骨组织病变情况 按 1.2.2 实验方法制备小鼠膝关节组织切片,在脱蜡水化后,按照改良番红 O-固绿软骨染色液试剂盒操作说明进行染色。最终在 Olympus 光学显微镜 200 倍镜下观察软骨组织病变情况。

1.2.4 膝关节软骨病理评分 采用双盲法,由 1 名熟练掌握 OARSI 关节软骨病理评分法^[14]的实验者进行关节软骨评分。

1.2.5 qRT-PCR 测定 mRNA 表达水平 按 1.2.2 实验方法取出小鼠膝关节,去除骨骼上附着的组织,分离出软骨部分,加入液氮研磨,使用 TRIzol 试剂从软骨细胞中提取总 RNA,并进行反转录以产生 cDNA。在 ABI QuantStudio™7 Flex Real-Time PCR 系统上完成检测。qPCR 反应条件:95℃预变性 30 s,然后再 95℃变性 5 s,60℃退火延伸 34 s,重复 40 个循环,再 72℃延伸 40 s。PCR 反应结束,进行熔解曲线分析。GAPDH 为参考基因,以 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达。

1.2.6 Western blotting 测定蛋白表达水平 按 1.2.2 实验方法取出小鼠膝关节,仔细去除骨骼上附着的软组织组织,分离出软骨部分。用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液提取膝关节软骨细胞总蛋白,软骨组织置于在冰上超声破碎,13800×g 4℃

表 1 qRT-PCR 检测所用引物序列信息
Table 1 qRT-PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
IL-1 β	F: CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT
	R: GCAGCTGACTTCAGGGATGT
TNF- α	F: TGAACCTCGGGGTGATCG
	R: GGGCTTGTCACCTCGAGTT
COL10	F: CACAGCCATTTTCGAGCTT
	R: TCTAAGTTGCCCCAGGTA
MMP-1	F: TCAGTTCGTCCTCACTCCAG
	R: TTGGTCCACCTGTCATCTTC
MMP-3	F: TCGGTGGCTTCAGTACCT
	R: CCTCCTCCAGACCTTC
MMP-13	F: TGGACAAGCAGCTCCAAAG
	R: GTCCAGACCGAGGGAGTG
MCP1	F: AAAACACGGGACGAGAAACCC
	R: ACGGGAACCTTTATTAACCCCT
CCR2	F: ATCCACGGCATACTATCAACATC
	R: TCGTAGTCATACGGTGTGGTG
GAPDH	F: GCAAGTTCAACGGCACAG
	R: CGCCAGTAGACTCCACGAC

离心 30 min。使用 BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。将 40 μ g 总蛋白上样至 10% SDS-PAGE 凝胶,然后在 300 mA 恒定电流下转移到 PVDF 膜。将膜在含 0.1% Tween-20 和 5%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液中室温孵育 2 h,再用 TBS-T 洗涤 3 次。将膜与抗 INOS (1:1000)、COX-2 (1:1000)、Collagen II (1:1000)、Aggrecan (1:1000)一抗 4℃孵育过夜。再用 TBS-T 清洗膜 3 次。然后在室温下与二抗孵育 2 h。用 TBS-T 洗涤后,使用增强化学发光试剂盒进行检测,并通过 Quantity ONE 定量分析。

1.2.7 Von frey 测试 测试前,先将小鼠置于测试装置内适应 40 min。按照 up-down 方法推算 50%机械缩足阈值。每只小鼠用 von frey hairs 从 0.4、0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0 和 8.0 g 刺激后足正中,每次刺小鼠 5 s,至出现抬足或舔爪行为反应时记录数值,重复进行 5 次^[15]。

1.2.8 移动行为测试 测试前,先将小鼠置于测试装置内适应 40 min。测试时将小鼠放置在一个有机玻璃观察室(50 cm $\times$ 50 cm)中心,在 6 min 测试期间内让小鼠自由探索。用摄像机全程记录小鼠运动。两名观察员独立跟踪记录小鼠运动过程,并计算 6 min 内小鼠在观察室中的移动距离。

1.2.9 Micro-CT 分析 按 1.2.2 实验方法取出整个小鼠膝关节,并用 10%福尔马林缓冲液固定过夜。使用高分辨率 micro-CT(SkyScan 1176)扫描标本。扫描参数:峰值电压 65 KVp,管电流 142 mA,CCD 曝光时间 2.96 s,像素分辨率 18 μ m。

1.2.10 Micro-CT 血管造影分析 腹膜注射水合氯醛将小鼠麻醉,腹部脱毛,取正中切口,暴露出腹主动脉和下腔静脉,分别远端置管近端结扎。腹主动脉注入 500 μ L 肝素化盐水(125000 U 肝素加 500 mL 生理盐水),然后持续注入生理盐水至下腔静脉流出液变清亮。采用颈部脱臼法处死小鼠,再从注

入端注入 3000 mL 4%甲醛,注入完毕封闭注入端及流出端。将标本置于 4℃过夜。然后收集膝关节,并在 10%中性福尔马林缓冲液中固定 4 天。再将标本于快速脱钙剂溶液(Rapid Cal Immuno)中脱钙 2 天。使用高分辨率 micro-CT(SkyScan 1176)扫描标本,扫描分辨率 46 μ m,单次扫描时间 18 min。

1.2.11 VEGFA 和 Ang-1 免疫组化检测分析 按 1.2.2 实验方法制备组织切片,脱蜡水化后,用 3% H₂O₂ 淬灭内源性过氧化物酶,然后在 37℃下用 0.1%胰蛋白酶处理 30 min 恢复抗原。再将切片于 37℃下用在 3% BSA 稀释的 20%马血清封闭 30 min。将切片与抗 VEGFA(1:100)和 Ang-1(1:100)4℃孵育过夜。通过辣根过氧化物酶链霉素亲和素检测免疫活性,再用苏木精复染。通过 Olympus DP26 显微镜进行组织形态观察,并使用 cellSens(Olympus)进行定量分析。从每组每个样本的 5 个连续切片中计数软骨下骨或软骨区域中阳性染色的细胞数。

1.3 统计分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所有实验至少重复 3 次,所有数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差。两两比较采用 t 检验分析,多组间均数比较运用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 L148M 显著减轻 KOA 小鼠软骨和软骨下骨病理损伤

HE 染色结果显示,对照组小鼠关节软骨形态结构正常;MIA 组小鼠软骨细胞数和关节软骨厚度均明显减少,形态结构不规则;而 L148M 组小鼠关节软骨厚度显著增加,软骨损伤减轻。蛋白聚糖番红 O 染色结果显示,与对照组相比,MIA 组小鼠软骨基质明显减少,L148M 组小鼠软骨基质降解少于 MIA 组,其红色染色面积与总面积之比高于 MIA 组。OARS1 评分结果显示,MIA 组小鼠 OARS1 评分(8.21 $\pm$ 0.53)高于假对照组(2.53 $\pm$ 0.37)(P<0.05),而 L148M 组小鼠 OARS1 评分(3.89 $\pm$ 0.42)明显低于 MIA 组(P<0.05)。小鼠膝关节 micro-CT 扫描结果表明,相较于对照组,MIA 组小鼠软骨和软骨下骨呈现严重病理损伤,软骨下骨塌陷,关节表面和胫骨端结构不规则;L148M 组小鼠软骨和软骨下骨形态与对照组类似,软骨和软骨下骨结构完整。见图 1。

2.2 L148M 明显抑制 KOA 小鼠细胞炎症反应水平

qRT-PCR 检测结果显示,与对照组比较,MIA 组小鼠关节肥大相关的蛋白 COL10、MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的 mRNA 表达水平升高(P<0.05);L148M 组小鼠 COL10、MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的 mRNA 表达水平均低于 MIA 组(P<0.05)。Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,MIA 组小鼠 INOS 和 COX-2 蛋白表达水平均升高(P<0.05),Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达水平均降低(P<0.05);与 MIA 组比较,L148M 组小鼠 INOS 和 COX-2 表达水平均降低(P<0.05),Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达水平均升高(P<0.05)。见图 2。

2.3 L148M 显著减轻骨关节炎相关疼痛症状

疼痛行为学分析结果显示,在诱导 KOA 小鼠模型后第 14 天,对照组小鼠行进距离为 927 $\pm$ 4.03 cm/6 min,MIA 组小鼠行进距离为 562 $\pm$ 3.91 cm/6 min,差异具有显著性(P<0.05);MIA 组小鼠对机械刺激的反应阈值与对照组相比显著降低(P<0.001);

L148M 组小鼠行进距离和机械刺激反应阈值均显著低于 MIA 组 ($P<0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,MIA 组小鼠 MCP1、CCR2、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平均明

显上调 ($P<0.05$); 而 L148M 组小鼠 MCP1、CCR2、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平均显著低于 MIA 组 ($P<0.05$)。见图3。

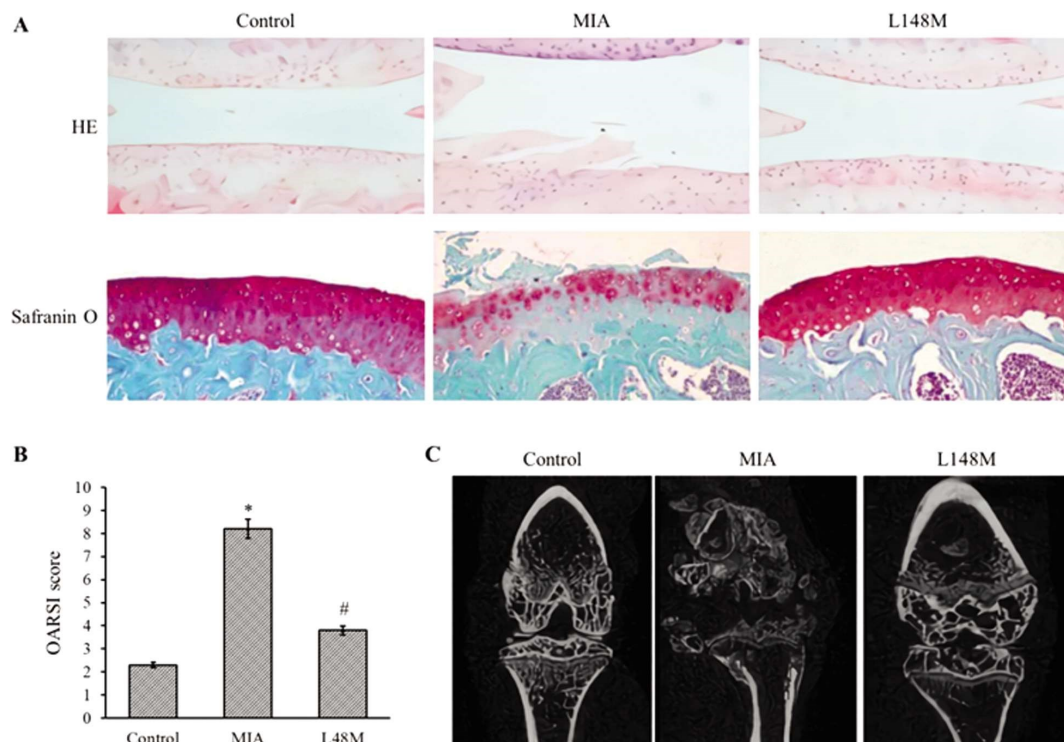


图1 L148M 干预减轻 KOA 小鼠软骨和软骨下骨病理损伤

Fig.1 L148M intervention reduces the pathological damage of cartilage and subchondral bone in KOA mice

Note: (A) Microscopic examination results of HE staining and Safranin O staining; (B) OARSI score of each group of mice; (C) Micro-CT scan images of mouse knee joints in each group. * $P<0.05$, compared with control group; # $P<0.05$, compared with MIA group.

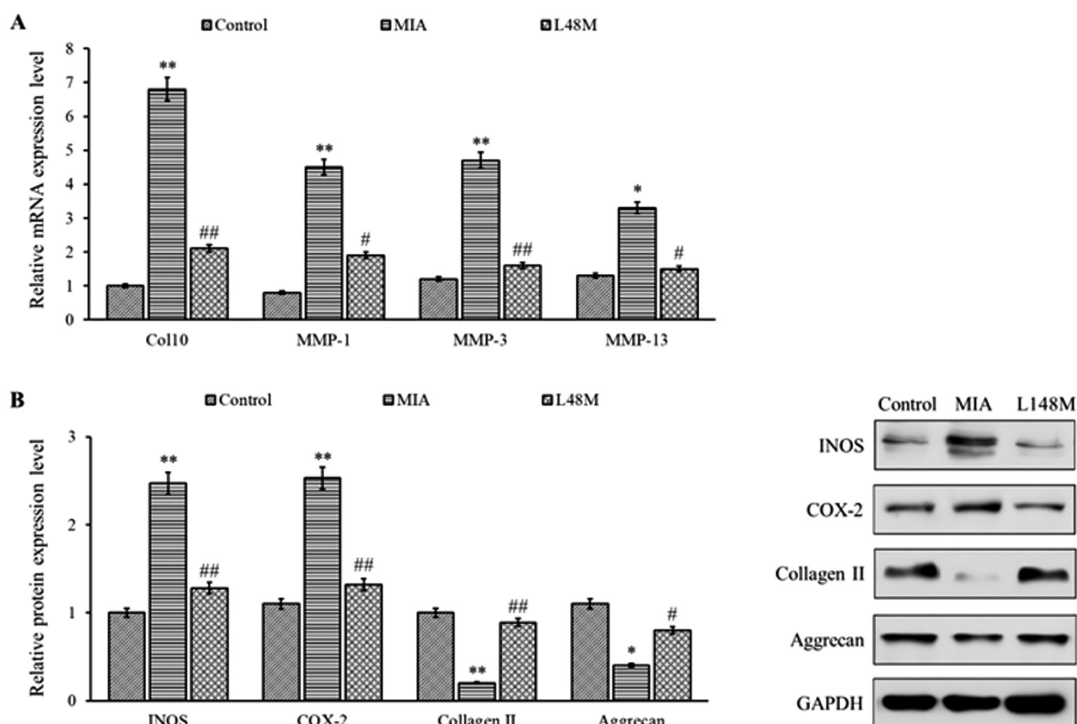


图2 炎症因子表达水平检测分析

Fig.2 Detection and analysis of the expression level of inflammatory factors

Note: (A) The mRNA expression level of COL10, MMP-1, MMP-3 and MMP-13; (B) The protein expression level of INOS, COX-2, Collagen II and Aggrecan; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, Compared with MIA group.

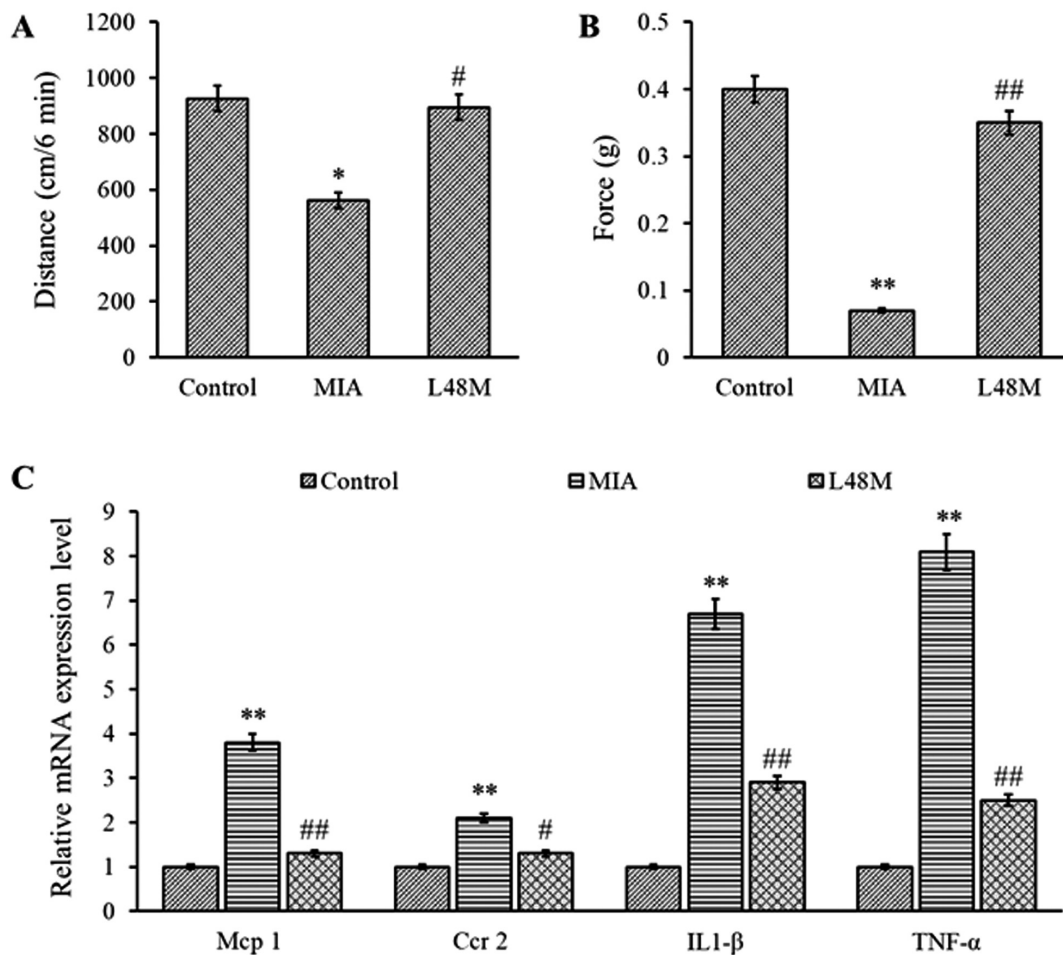


图3 L148M 缓解小鼠 KOA 相关疼痛症状

Fig.3 L148M relieves pain associated with KOA in mice

Note: (A) Statistical analysis results of travel distance; (B) Statistical analysis results of mechanical stimulus response threshold; (C) The mRNA expression level of MCP1, CCR2, IL-1 β and TNF- α ; * P <0.05, ** P <0.01, compared with control group; # P <0.05, ## P <0.01, compared with MIA group.

2.4 L148M 明显抑制 KOA 小鼠异常血管生成

micro-CT 血管造影分析结果显示,与对照组相比,MIA 组小鼠软骨下骨微血管数量和体积均显著升高(P <0.05);L148M 组小鼠软骨下骨微血管数量和体积明显低于 MIA 组(P <0.05)。VEGFA 和 Ang-1 免疫组化检测结果显示,与对照组相比,MIA 组小鼠的 VEGFA 和 Ang-1 蛋白表达水平显著上调(P <0.05);L148M 组小鼠的 VEGFA 和 Ang-1 蛋白表达水平显著低于 MIA 组(P <0.05)。见图 4 和图 5。

3 讨论

骨关节炎通常被定义为非炎性疾病,但其疾病发展与关节内部炎症细胞因子增加之间紧密关联^[16]。软骨损伤后软骨细胞产生的细胞因子,如 IL-1 β 和 TNF- α ,可以上调 MMP 基因表达水平,加剧关节软骨结构病变^[17]。而 IL-1 β 诱导的软骨合成代谢和炎症相关基因表达水平失衡会引起软骨细胞凋亡^[18]。

在关节组织中,基质金属蛋白酶 3 (Matrix metalloproteinase 3, MMP-3)通过降解细胞外基质组分(如蛋白聚糖),加重骨关节炎炎症反应^[19]。临床研究数据显示,与对照组患者相比,KOA 患者的 MMP-3 表达水平升高幅度远大于 MMP-1 升高水平^[19]。本研究 qRT-PCR 检测结果表明,NGF 抗体 L148M 在

转录水平显著抑制 KOA 小鼠 IL-1 β 诱导的 MMP-3 基因表达。同时,L148M 上调了 KOA 小鼠软骨细胞中被 IL-1 β 抑制的 II 型胶原(Collagen II)基因表达水平。

作为一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase NOS)家族的成员,INOS 能够合成炎症介质 NO。COX-2 也是 KOA 疼痛和炎症反应的关键效应因子,其产生的另一种炎症介质 PGE2,与 NO 协同作用,促进 MMP 合成和释放,抑制软骨基质主要成分--Collagen II 和蛋白聚糖的产生,诱导软骨细胞凋亡^[20]。下调 PGE2 和 NO 表达水平被证实可延缓 KOA 发展^[21],选择性抑制 COX-2 和 INOS 的表达可以有效保护关节软骨结构^[22,23]。本研究实验结果显示,L148M 显著抑制 KOA 小鼠软骨细胞 INOS 和 COX-2 蛋白表达水平。

上述实验结果表明,L148M 通过抑制与破坏骨关节软骨基质有关的多种蛋白酶基因表达,以及上调 II 型胶原蛋白表达对 KOA 小鼠软骨组织发挥保护作用。

关节运动可触发 KOA 疼痛,并导致关节活动度降低,KOA 患者机械刺激疼痛感阈值也明显较低^[24]。本研究疼痛行为学分析显示,相较于 MIA 组,L148M 组小鼠表现出更活跃的运动行为(即行进距离增加),机械刺激反应阈值也显著提高。这表明 L148M 干预明显改善 KOA 相关性疼痛。

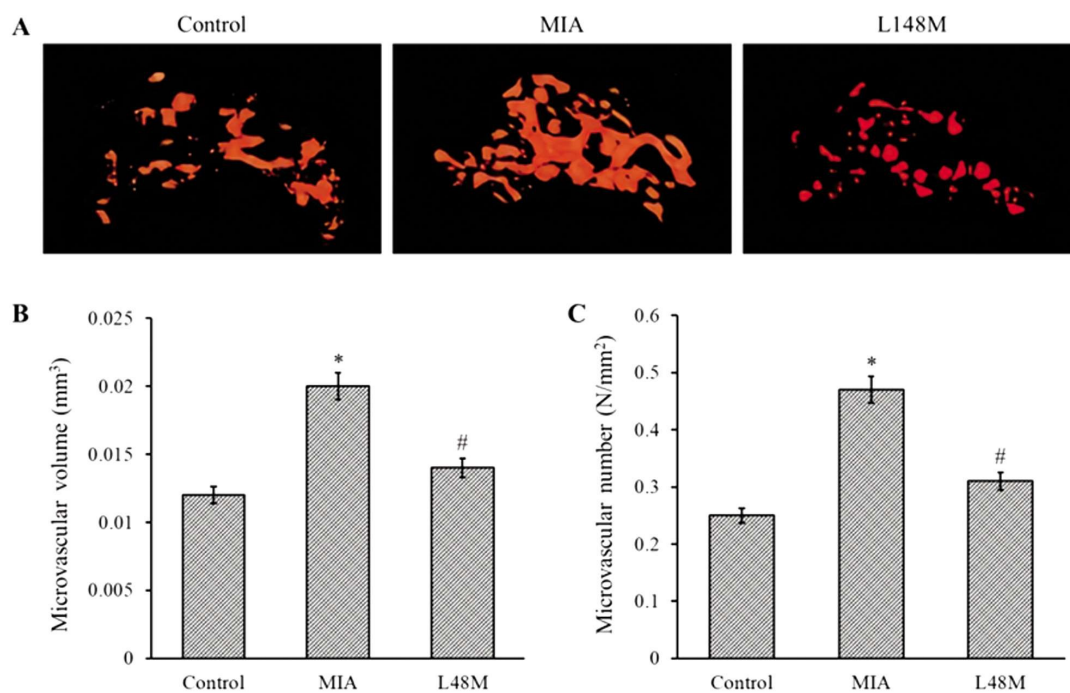


图4 Micro-CT 血管造影分析

Fig.4 Micro-CT angiography analysis

Note: (A) The result of Micro-CT angiography analysis; (B) Microvascular volume; (C) Microvascular number; * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with MIA group.

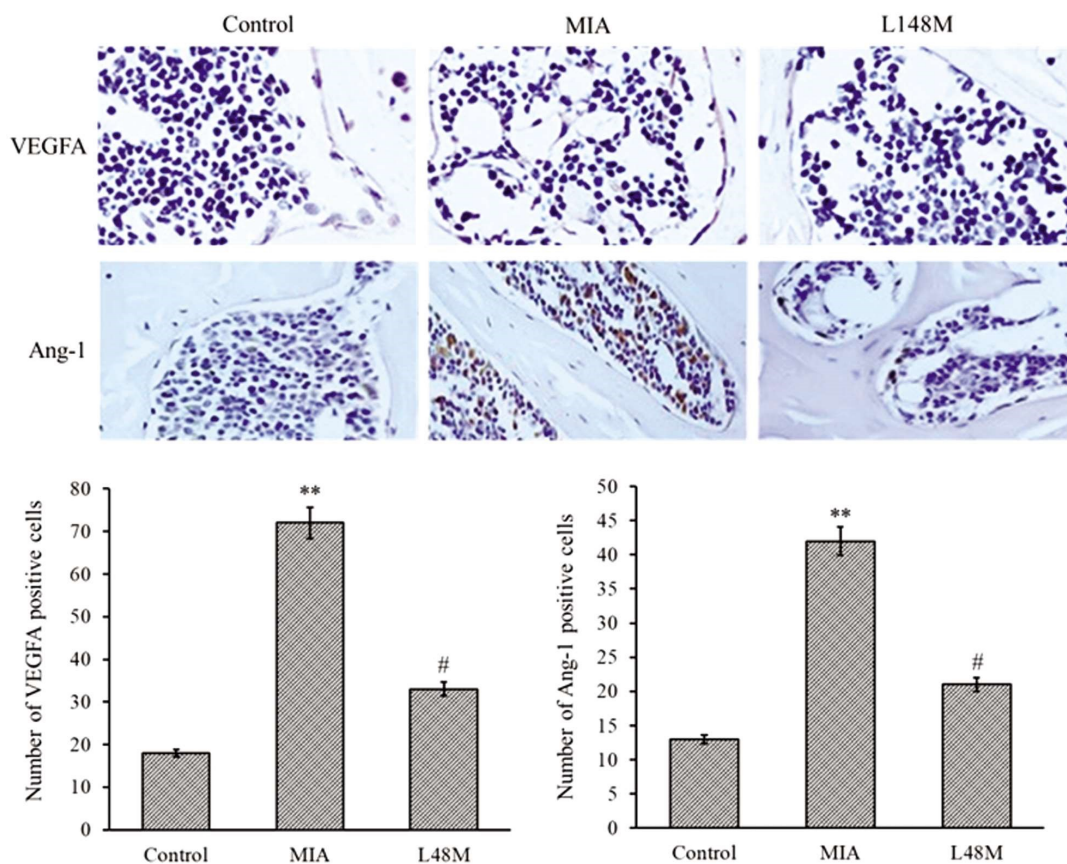


图5 VEGFA 和 Ang-1 免疫组化检测分析

Fig.5 The immunohistochemical detection analysis of VEGFA and Ang-1

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with MIA group.

MCP-1 和 CCR2 是介导 KOA 小鼠疼痛的主要调控因子^[25]。本研究通过 qRT-PCR 分析 L148M 对 KOA 小鼠 MCP-1 和

CCR2 以及慢性疼痛相关促炎性细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平的影响,发现 L148M 干预显著抑制 MIA 诱导

的 MCP1、CCR2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 水平升高。这表明, L148M 通过靶向疼痛敏化途径中的疼痛相关细胞因子减轻 KOA 疼痛症状。

充足的血液供应对维持骨骼组织结构至关重要,直接影响骨重塑过程^[26]。软骨下骨中血管生成异常已被证实是 KOA 的一个显著特征^[27]。而在 KOA 患者骨软骨交界处过度表达的 NGF、VEGFA 和 Ang-1,使本无神经分布的软骨组织出现神经分布紊乱,以及血管生成异常,新生血管可能是软骨组织病变和骨性关节炎疼痛的重要原因^[28]。本研究 micro-CT 微血管造影分析显示,MIA 组小鼠软骨下骨血管体积和血管数目均显著高于对照组。这一结果证实软骨下骨中血管形成异常在 KOA 进展过程中的重要作用。通过腹腔注射 L148M,可有效抑制软骨下骨血管数量和体积,将血管生成维持在正常生理水平。VEGF 是最重要的促血管生成因子,而 Ang-1 介导血管重塑和成熟^[29]。免疫组织化学分析显示,L148M 可抑制 MIA 诱导的软骨下骨 VEGFA 和 Ang-1 蛋白水平上调。这表明,L148M 通过下调 VEGFA 和 Ang-1 蛋白表达,以抑制 MIA 诱导 KOA 小鼠模型软骨下骨中异常血管生成,在改善 KOA 相关性疼痛中发挥作用。

关节软骨和软骨下骨是关节构成和维持关节内稳态的主要功能单元。本研究运用膝关节腔注射 MIA 诱导 KOA 小鼠模型,证明 NGF 抗体 L148M 通过下调 VEGFA 和 Ang-1 蛋白水平抑制软骨下骨异常血管生成,缓解关节炎疼痛反应;并通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP 表达,减轻软骨和软骨下骨病理损伤。

参考文献(References)

- [1] Sharma L. Osteoarthritis year in review 2015: Clinical[J].Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(1): 36-48
- [2] Richards MM, Maxwell JS, Weng L, et al. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: From anti-inflammatories to products of regenerative medicine [J]. The Physician and Sportsmedicine, 2016, 44(2): 101-108
- [3] Wu Y, Goh EL, Wang D, et al. Novel treatments for osteoarthritis: An update[J]. Open Access Rheumatol, 2018, 10: 135-140
- [4] Kang Y-H, Lee HJ, Lee CJ, et al. Natural products as sources of novel drug candidates for the pharmacological management of osteoarthritis: A narrative review [J]. Biomol Ther (Seoul), 2019, 27(6): 503-513
- [5] 许颖, 范凯健, 王婷玉. 骨关节炎的发病机制及其药物治疗进展[J]. 实用药物与临床, 2018, 21(12): 1424-1429
- [6] Kunutsor SK, Barrett MC, Whitehouse MR, et al. Incidence, temporal trends and potential risk factors for prosthetic joint infection after primary total shoulder and elbow replacement: Systematic review and meta-analysis [J]. Elsevier Ltd, 2020, 80(4): 36-46
- [7] 刘鹏, 赵茂盛, 曹国定, 等. 创伤性关节炎的手术治疗现状 [J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(5): 559-567
- [8] Schnitzer TJ, Marks JA. A systematic review of the efficacy and general safety of antibodies to ngf in the treatment of oa of the hip or knee [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(1): 8-17
- [9] 许真真. 肌萎缩侧索硬化 sod1*g93a 转基因小鼠脊髓内神经生长因子表达与分布的实验研究[D]. 南昌大学, 2019
- [10] 代静杨. 艾灸对类风湿关节炎患者血清中 mmp1、mmp3、vegf 含量的影响[D]. 成都中医药大学, 2019
- [11] 付鑫, 何锦泉, 马信龙. 神经生长因子在骨关节炎疼痛中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2020, 28(1): 58-61
- [12] Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, et al. Efficacy of nerve growth factor antibody in a knee osteoarthritis pain model in mice [J]. BioMed Central, 2017, 18(1): 428-435
- [13] 何三军, 韩亦非. 抗神经生长因子抗体在预防治疗膝骨关节炎中的作用研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(5): 605-608+615
- [14] Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2006, 14(1): 13-29
- [15] 马永圆. 膝骨关节炎穴位敏化研究模型的建立及背根神经节 c 类神经元 i h 电流在穴位敏化中的作用[D]. 中国人民解放军空军军医大学, 2018
- [16] Wang Z, Huang J, Zhou S, et al. Anemonin attenuates osteoarthritis progression through inhibiting the activation of il-1 β /nf- κ b pathway [J]. Journal of Cellular And Molecular Medicine, 2017, 21 (12): 3231-3243
- [17] Jong RH, Jae LH, Seung JH, et al. Betulin suppressed interleukin-1 β -induced gene expression, secretion and proteolytic activity of matrix metalloproteinase in cultured articular chondrocytes and production of matrix metalloproteinase in the knee joint of rat [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2017, 21(1): 19-26
- [18] Choudhary D, Kothari P, Tripathi AK, et al. Spinacia oleracea extract attenuates disease progression and sub-chondral bone changes in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. BMC complementary and alternative medicine, 2018, 18(1): 69-69
- [19] 管永志. β -catenin 和 mmp-3 在 oa 患者软骨组织中的表达及临床意义. 石河子大学, 2019
- [20] 赵恒. 对侧单关节炎加重神经压迫性损伤引起疼痛的机制研究 [D]. 山东大学, 2019
- [21] Cheleschi S, Pascarelli NA, Valacchi G, et al. Chondroprotective effect of three different classes of anti-inflammatory agents on human osteoarthritic chondrocytes exposed to il-1 β [J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(1): 794-801
- [22] Malemud CJ. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS [J]. Biochemical Pharmacology, 2019, 165: 33-40
- [23] Satyavrata S, Patricia DR, D E-MJ, et al. A three-dimensional chondrocyte-macrophage coculture system to probe inflammation in experimental osteoarthritis[J]. Tissue engineering Part A, 2017, 23(3-4): 1-52
- [24] 谢军, 柳建德. 膝关节骨性关节炎的临床研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(6): 68-68
- [25] Longobardi L, Temple TD, Tagliafierro L, et al. Role of the c-c chemokine receptor-2 in a murine model of injury-induced osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(6): 1-12
- [26] 蔡悦, 刘晓龙, 郭静, 等. 甘草附子汤治疗佐剂性关节炎模型小鼠的抗滑膜血管生成机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30(12): 1618-1623
- [27] Mu W, Xu B, Ma H, et al. Halofuginone attenuates osteoarthritis by rescuing bone remodeling in subchondral bone through oral gavage [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 269-278
- [28] 陈能. 补肾活血方对膝骨关节炎疼痛及致痛因子表达的影响[D]. 广州中医药大学, 2017
- [29] Huang SC, Rehman MU, Lan YF, et al. Tibial dyschondroplasia is highly associated with suppression of tibial angiogenesis through regulating the hif-1 α /vegf/vegfr signaling pathway in chickens [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 9089