DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0119 文章编号 1671-8852(2025)04-0446-10

姜黄素通过抑制lncRNA ARFRP1缓解继发性软骨损伤的机制

史桂荣[1] 任博文[2] 张仲博[2] 王莉莎[2] 张啟威[2] 史栋梁[2]
[1]商丘医学高等专科学校临床医学院中医教研室 河南 商丘 476000；
[2]河南省中医院骨病一科 河南 郑州 450000

摘要 目的：探讨姜黄素对大鼠继发性软骨损伤的影响。方法：将SD大鼠随机分为假手术组、软骨损伤模型组、50 mg·kg^{-1}姜黄素组、100 mg·kg^{-1}姜黄素组，每组10只大鼠。建立继发性软骨损伤大鼠模型，给予不同剂量姜黄素（50、100 mg·kg^{-1}）干预。给药10周后，切取软骨组织进行番红O-固绿染色，采用OARSI关节病理评分评价染色结果。体外分离培养软骨细胞，姜黄素对软骨细胞的毒性采用CCK-8实验进行评估。分别用浓度为10、40 μmol·L^{-1}的姜黄素预先处理细胞24 h，随后用10 μg·L^{-1}的IL-1β刺激细胞24 h。构建长链非编码RNA ADP-核糖基化因子相关蛋白1（lncRNA ARFRP1）过表达载体转染细胞。采用流式细胞仪检测细胞凋亡能力，酶联免疫吸附实验（ELISA）检测炎症因子水平，实时荧光定量-PCR（RT-qPCR）检测ARFRP1表达，蛋白质印记法（Western Blot）检测Ⅱ型胶原（Collagen Ⅱ）、凋亡蛋白（Caspase3、Caspase9）和JNK/MAPK通路相关蛋白（p-JNK、p-p38）的表达。结果：100 mg·kg^{-1}姜黄素治疗组OARSI评分为3.03，较模型组7.38明显降低。此外，姜黄素呈剂量依赖性促进软骨细胞增殖，降低IL-1β诱导的细胞凋亡和炎症因子分泌，以及Collagen Ⅱ、凋亡蛋白以及JNK通路蛋白表达。过表达lncRNA ARFRP1或JNK通路激活剂茴香霉素（Anisomycin）处理能抑制姜黄素对软骨细胞的保护作用。结论：姜黄素通过抑制lncRNA-ARFRP1表达缓解继发性大鼠软骨损伤。

关键词 软骨损伤；姜黄素；lncRNA ARFRP1；JNK/MAPK信号通路；Ⅱ型胶原
中图分类号 R274.12
文献标识码 A 开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

Mechanism of curcumin alleviating secondary cartilage damage by inhibiting lncRNA ARFRP1

SHI Guirong[1], REN Bowen[2], ZHANG Zhongbo[2], WANG Lisha[2], ZHANG Qiwei[2], SHI Dongliang[2]
[1]Dept. of Traditional Chinese Medicine, School of Clinical Medicine, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476000, Henan, China;
[2]Dept. of Orthopedics, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China

Abstract

Objective: To investigate the effect of curcumin on secondary cartilage damage in rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into the sham operation group, cartilage injury model group, 50 mg·kg^{-1} curcumin group, and 100 mg·kg^{-1} curcumin group, with 10 rats in each group. A rat model of secondary cartilage damage was established, different concentrations of curcumin (50, 100

作者简介：史桂荣，女，1970—，医学硕士，主要从事骨与关节相关疾病的研究，E-mail: gqgalbert@sina.com
通信作者：史栋梁，男，1974—，副主任医师，主要从事骨代谢相关疾病的研究，E-mail: quomogvk446383@163.com

mg•kg^{-1}) were administered for intervention, and after 10 weeks of administration, cartilage tissues were excised for safranin O-fast green staining, and the staining results were evaluated by the osteoarthritis research society international (OARSI) joint pathology score. Chondrocytes were isolated and cultured *in vitro*, and the toxicity of curcumin on chondrocytes was evaluated by using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Cells were pretreated with curcumin at concentrations of 10 and 40 μmol•L^{-1} for 24 h and subsequently stimulated with IL-1β for 24 h. Long noncoding RNA ADP ribosylation factor-related protein 1 (lncRNA ARFRP1) overexpression vectors were constructed and transfected into cells. Cell apoptosis was assessed by flow cytometry, levels of inflammatory factors were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ARFRP1 expression was assessed by real-time quantitative PCR (RT qPCR), and protein levels of collagen type Ⅱ (Collagen Ⅱ), apoptotic proteins (Caspase3 and caspase9) and JNK/MAPK pathway-related proteins (p-JNK, p-p38) were assessed by Western Blot. **Results:** The OARSI score of rats in the 100 mg•kg^{-1} curcumin treatment group was 3.03, which was significantly lower than the score of 7.38 in the model group. Curcumin dose-dependently promoted the proliferation of chondrocytes and reduced IL-1β-induced apoptosis, expression levels of inflammatory factors, collagen Ⅱ, apoptotic proteins, as well as pathway proteins. Moreover, overexpression of lncRNA ARFRP1 or anisomycin, an activator of JNK, was able to inhibit the protective effect of curcumin on chondrocytes. **Conclusion:** Curcumin alleviates secondary rat cartilage damage by inhibiting lncRNA ARFRP1 expression.

Key Words　Cartilage Damage; Curcumin; LncRNA ARFRP1; JNK/MAPK Signaling Pathway; Collagen Ⅱ

骨关节炎(osteoarthritis，OA)是一种慢性退行性关节疾病，其主要特征是关节软骨退化、底层骨重塑和滑膜炎，会导致疼痛和残疾[1-2]。软骨稳态紊乱和软骨细胞凋亡在OA中起关键作用[2]。因此，鉴定软骨细胞凋亡生物标志物可促进OA新疗法的开发，以消除OA的病理特征或减缓OA疾病进展。

姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄中提取的一种黄色酸性酚类物质，是姜黄发挥药理作用的活性成分[3]。有报道[4]显示，姜黄素通过抑制氧化应激诱导的大鼠软骨细胞凋亡改善OA大鼠的疾病进展。此外，临床试验[5-6]结果表明，服用姜黄素补充剂可缓解OA患者的关节疼痛，并显著延缓患者关节病变进展，但其具体机制尚不清晰。长链非编码RNA(lncRNAs)失调在一系列人类疾病中发挥着重要作用。研究[7]显示，OA软骨组织中lncRNA ADP-核糖基化因子相关蛋白1(lncRNA ARFRP1)表达显著上调，敲低lncRNA ARFRP1可抑制LPS诱导的软骨细胞损伤。此外，也有报道[8]显示JNK/MAPK通路与OA进展密切相关，如lncRNA HOTAIRM1变体1的下调通过激活JNK/MAPK通路导致OA发生与发展；沉默FUT10的表达会通过阻碍p38/JNK-MAPK通路激活从而延缓暴露于肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α，TNF-α)的软骨细胞的细胞外基质(extracellular matrix，ECM)降解、衰老和凋亡[9]。因此，本研究推测姜黄素可能通过调节ARFRP1表达和JNK/MAPK通路活化缓解软骨损伤。本研究利用不同剂量姜黄素处理IL-1β诱导的软骨细胞和继发性软骨损伤模型大鼠，观察姜黄素对软骨细胞损伤的影响并探讨姜黄素治疗继发性软骨损伤(cartilage injury，CI)的可能机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　*药物与试剂*　姜黄素购自西安康诺化工有限公司；DMEM培养液和胎牛血清购自美国Hyclone公司；青霉素-链霉素、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液购自美国Sigma公司；转染试剂Lipofectamine®3000购自美国Sigma公司；凋亡蛋白Caspase3和Caspase9一抗及二抗购自美国Santa Cruz公司；RT-qPCR试剂盒、RNA提取试剂盒、RT反转录试剂盒、蛋白提取试剂盒以及CCK-8试剂盒、Annexin Ⅴ-FITC检测试剂盒均购自美国Millipore公司；引物合成由上海生工合成；RIPA缓冲液购自中国Beyotime公司。

1.1.2 *主要仪器* 高通量实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(Roche公司,瑞士),Western Blot系统(北京六一仪器厂DYY-7C),台式低温高速离心机(日本KUBOTA公司),恒温细胞培养箱(上海力申科学仪器公司),FC-500流式细胞仪(美国Beckman公司),凝胶成像分析仪(广州瑞丰实验设备有限公司),YP5002电子天平(上海越平科技),ReadMax 1900型酶标仪(上海闪谱生物科技)。

1.1.3 *实验动物* 6周龄SD大鼠50只,由河南省中医院实验中心提供,由实验动物中心适应性喂养1周后,体质量达(260±10) g进行实验;食物和水在整个实验过程中均由实验动物自由索取。实验经动物管理制度和使用委员会批准进行,实验过程中的动物处理均严格按照国际道德准则和国家健康指南关于维护和使用实验动物相关条例进行。

1.2 方法

1.2.1 *大鼠继发性CI模型的构建* 取0.3 mL、50 mg•kg^{-1}戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠5~20 min。麻醉后用绳子固定大鼠前肢,以大鼠膝关节为中心,沿髌旁内侧切口,长约1.5 cm。沿髌韧带与髌内侧支持带交界线切开,向外侧挤压髌骨至脱位,检测膝关节稳定性,随后切断前交叉韧带,确认是否已完全切断后将髌骨复位,缝合股内侧肌、髌韧带与髌内侧支持带裂口,最后闭合关节腔,局部消毒后归笼[10]。日常观察大鼠局部肿胀和损伤程度及全身总体状况,定期测量体质量,并作相关记录。

1.2.2 *大鼠软骨细胞的分离与培养* 采用颈椎脱臼法处死大鼠,无菌条件下分离股骨,切去骨两端,剔除周围组织,将软骨组织剪成约1 mm^{3}大小;选用二步酶消化法获得软骨细胞,加入含10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素-链霉素)的DMEM培养基吹打混匀后移入25 cm^{2}培养瓶内,于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养;每3~4 d更换培养基,待细胞融合80% 以上,使用0.25% 胰酶/0.1%EDTA消化细胞,1 000 r•min^{-1}离心5 min,按1∶3传代培养。当细胞融合至70% 时,根据FENG等[4]的报道选取不同浓度的姜黄素(0、10、40、80、120 μmol•L^{-1})分别处理细胞24 h,检测软骨细胞活性。根据细胞分组,将茴香霉素(Anisomycin)以4 μmol•L^{-1}的浓度添加到培养基中用来激活JNK信号通路。

1.2.3 *实验分组* 动物实验分组:在50只大鼠中随机选取10只设为假手术组;剩余40只大鼠做前交叉韧带横切和内侧半月板切除手术建模,建模成功的大鼠共34只,随机选取30只分为3组,并根据FENG等[4]报道选取2 mL、50与100 mg•kg^{-1}姜黄素处理模型大鼠(每组n=10)。其中,软骨损伤模型组不做药物处理;50、100 mg•kg^{-1}姜黄素组分别为50、100 mg•kg^{-1}•d^{-1}姜黄素灌胃处理。细胞实验分组:分离纯化实验动物对照组大鼠软骨细胞,设为对照组;10 μg•L^{-1}的IL-1β诱导软骨细胞损伤,设为IL-1β诱导组;10 μmol/L姜黄素预处理IL-1β诱导组大鼠软骨细胞24 h,设为10 μmol•L^{-1}姜黄素组;40 μmol•L^{-1}姜黄素预处理IL-1β诱导组大鼠软骨细胞24 h,设为40 μmol•L^{-1}姜黄素组。

1.2.4 *番红O-固绿染色* 番红O是碱性染料,与硫酸软骨素、硫酸角质素等酸性蛋白多糖结合,将软骨基质染成红色;固绿是酸性染料,与富含碱性氨基酸的胶原纤维结合,将软骨浅表层、软骨下骨染成绿色。组织切片常规脱蜡后,在Weigert染色液(A1∶A2=1∶1)中浸染5 min,酸性分化液处理30 s,蒸馏水清洗15 min。随后,使用固绿染色液浸染5 min,用弱酸溶液洗涤30 s以去除残余染液。番红O染色液浸染7 min,分别用95%、100% 乙醇脱水,二甲苯透明,干燥,封片,镜下观察软骨组织形态结构。每张切片选取3个不同视野,参照软骨国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International,OARSI)病理评分标准和滑膜组织学评分标准评分。

1.2.5 *骨关节炎评分* 分别在胫骨平台中点、两个边缘处、中点与边缘之间的中点处5个点测量透明软骨(hyaline cartilage,HC)厚度、全部软骨(total articular cartilage,TAC)厚度,然后取平均值计算OARSI评分。

1.2.5 *大鼠软骨细胞增殖检测* 将对数生长期的各组细胞按照每孔1×10^{5}的密度接种于96孔板中,用含10% 胎牛血清的DMEM培养基制成单细胞悬液,置于37 ℃、5%CO_2的条件下培养。每组设6个复孔,待细胞长至80% 融合时,于转染后48 h加入20 μL CCK-8溶液。培养24 h,于酶标仪450 nm处检测吸光度(A)值。取6孔A值的平均数,按照下列公式计算细胞相对活力:细胞相对活力(%)=处理组A/对照组A×100%。

1.2.6 *大鼠软骨细胞凋亡检测* 将各组细胞按照每孔1×10^{5}个的密度接种到6孔板12 h后换液,进行24 h无血清培养基培养。预冷PBS洗涤,加入预冷75% 乙醇溶液,4 ℃固定4 h以上。离心弃上清,PBS洗涤后,加入500 μL Binding Buffer悬浮细胞。加入5 μL Annexin Ⅴ-EGFP孵育15 min,再加入

5 μL 碘化丙啶(propidium iodide，PI)混匀。室温下避光反应5～15 min。于1 h内，在FC-500流式细胞仪上使用Beckman CXP软件检测细胞凋亡情况。

1.2.7　炎症因子水平检测　收集各组大鼠腹部主动脉血，3 000 r•min^{-1}，4 ℃下离心5 min，吸上清液，于－20 ℃下保存备用。将各组大鼠软骨细胞用PBS清洗，0.04 g•L^{-1}蛋白酶E消化并收集细胞，于－20 ℃中保存备用。使用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)试剂盒进行检测，利用抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合原理进行白细胞介素-6(IL-6)和TNF-α浓度的检测。操作过程全部按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.8　Lenti-ARFRP1慢病毒载体的构建　根据GenBank中lncRNA ARFRP1基因序列，采用Oligo 6.0软件设计引物，与DNA oligo一起由上海生工合成。5′端引入*Age* Ⅰ酶切位点，3′端引入*EcoR* Ⅰ酶切位点，退火形成黏性末端双链。将该黏性末端双链与pLenti6.3_MCS_IRES2-EGFP质粒载体进行连接，连接后的重组质粒Lenti-ARFRP1(ARFRP1)和对照Lenti-NC质粒(Vector)转化DH5α感受态细胞，用SOC培养基培养，取菌液进行平板克隆，从转化的平板上挑取多个单克隆测序验证。

1.2.9　重组慢病毒载体转染大鼠软骨细胞　将长至对数生长期的各组细胞按照每孔1×10^{5}的密度接种于6孔板中，用含10% 胎牛血清的DMEM培养基制成单细胞悬液，置于37 ℃、5% CO_2的条件下培养。每组设6个复孔，待细胞长至80% 融合时，用1 mL含10% 胎牛血清的DMEM/F12培养基制备一系列稀释度的病毒转染液，分别加入不同稀释倍数的转染液继续培养24 h。以合适的感染复数(multiplicity of infection，MOI)滴度感染细胞。感染后第2天，吸弃含病毒的培养液，换上完全培养液，放入37 ℃继续培养。

1.2.10　蛋白质印迹法(Western Blot)　检测基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ)、切割-Caspase3(Cleaved-Caspase3)和Cleaved-Caspase9的表达。将各组细胞按照每孔1×10^{5}的密度接种于6孔板，24 h后换液进行无血清培养基培养。24 h后采用BCA法进行蛋白定量，各取30 μL样品进行SDS-PAGE，再将蛋白转移至膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭1 h，加入一抗为鼠抗人的Collagen Ⅰ(稀释倍数1∶500)、Cleaved-Caspase3(稀释倍数1∶500)、Cleaved-Caspase9(稀释倍数1∶250)和GAPDH(稀释倍数1∶1 000)，4 ℃孵育过夜。加入HRP标记的兔抗鼠二抗(1∶1 000) 37 ℃孵育45 min，用ECL液显影，使用化学发光试剂盒在化学发光系统检测，随后结果采用Image-Pro Plus 6软件进行图片条带灰度值分析，以待测蛋白与内参照GAPDH的灰度值比值作为蛋白的相对表达量。

1.2.11　实时荧光定量-PCR(RT-qPCR)　按照说明采用TRIzol试剂提取总RNA。PrimeScript RT Master Mix扩增cDNA，反应体系共25 μL，其中包含12.5 μL的SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ，上游引物0.5 μL，cDNA 1 μL，灭菌三蒸水10.5 μL。PCR程序：95 ℃持续15 s，60 ℃持续60 s。用Imagemaster VDS图像分析软件测定产物条带的积分光密度值。β-actin作为内参，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算RNA表达水平。引物如下，lncRNA ARFRP1上游引物：5′-GGA CAA TGC TGG GAA GAC GA-3′，下游引物：5′-GCT GGT CAC CAC CTT CAA AC-3′；β-actin上游引物：5′-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3′，下游引物：5′-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3′。

1.2.12　统计学处理　数据均采用SPSS 22.0软件进行统计分析，以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用t检验，多组比较采用单因素方差分析，随后各组均数间的两两比较采用SNK-q检验，以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　姜黄素对大鼠软骨细胞损伤后功能的影响　体外分离培养软骨细胞，与不经过姜黄素处理组相比，80 μmol•L^{-1}和120 μmol•L^{-1}姜黄素降低了软骨细胞增殖能力($P<0.05$)，所以选取对软骨细胞无明显毒性的低(10 μmol•L^{-1})、高(40 μmol•L^{-1})浓度姜黄素做后续实验。与对照组相比，低、高剂量的姜黄素均可促进IL-1β诱导损伤软骨细胞的增殖($P<0.01$)，且呈剂量依赖性。此外，姜黄素呈剂量依赖性降低IL-1β诱导引起的软骨细胞凋亡，炎症因子(IL-6、TNF-α)水平以及ARFRP1的表达水平，且差异具有统计学意义($P<0.05$)，见图1。

2.2　lncRNA ARFRP1对姜黄素抑制软骨细胞损伤的影响　将慢病毒载体Lenti-ARFRP1转染于IL-1β诱导损伤的大鼠软骨细胞中，给予40 μmol•L^{-1}姜黄素治疗。病毒载体Lenti-ARFRP1能够显著促进ARFRP1表达水平、细胞凋亡率、炎症水平

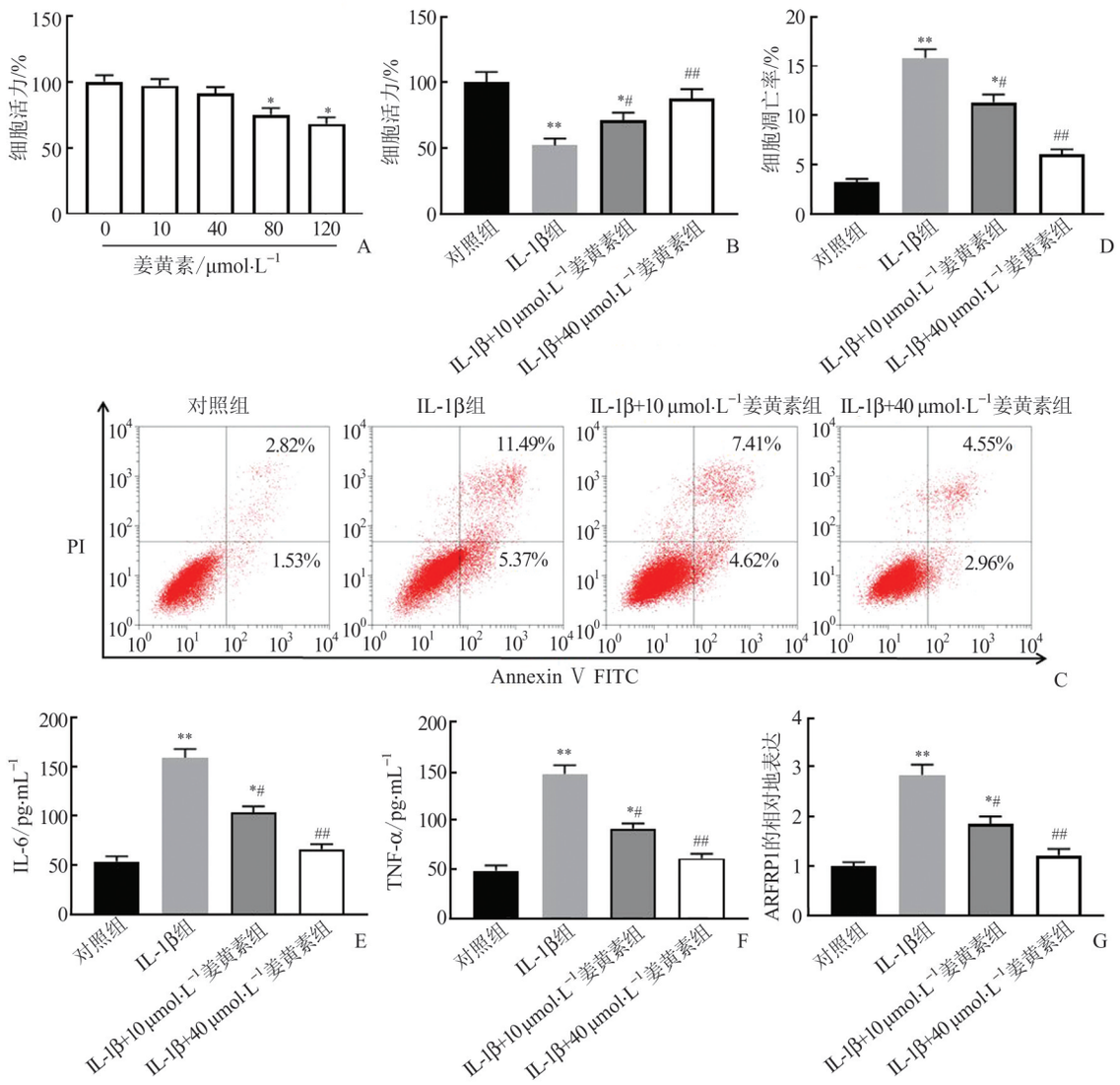


图1 姜黄素对大鼠软骨细胞损伤后功能的影响

A. 不同浓度姜黄素对软骨细胞的毒性检测；B. CCK-8检测不同浓度姜黄素对IL-1β诱导损伤的软骨细胞的增殖能力的影响；C. 流式细胞仪检测不同浓度姜黄素对IL-1β诱导损伤软骨细胞的凋亡能力的影响；D. 细胞凋亡率的统计图；E. ELISA检测炎症因子IL-6水平；F. ELISA检测炎症因子TNF-α水平；G. RT-qPCR检测ARFRP1的表达水平。与0 μmol/L姜黄素组/对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与IL-1β组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

和Collagen Ⅰ表达水平($P<0.01$)，抑制大鼠软骨细胞增殖($P<0.01$)。而利用姜黄素治疗后，ARFRP1表达水平、细胞凋亡率、炎症水平和Collagen Ⅰ表达水平显著降低($P<0.01$)，并促进软骨细胞增殖，且差异具有统计学意义($P<0.01$)，见图2。

2.3 姜黄素对JNK/MAPK通路的影响 通过免疫蛋白印迹法检测了姜黄素对JNK/MAPK通路产生的影响。实验结果显示，IL-1β诱导组JNK/MAPK通路相关蛋白p-JNK和p-p38表达水平升高($P<0.01$)，经姜黄素处理后逐渐降低($P<0.01$)，而Lenti-ARFRP1转染逆转并促进了通路蛋白的表达($P<0.01$)，见图3。

2.4 JNK激活剂对姜黄素改善软骨细胞损伤的影响 将JNK通路激活剂Anisomycin添加到培养基中诱导激活JNK及下游MAPK通路。结果显示，Anisomycin处理组JNK/MAPK通路相关蛋白p-JNK和p-p38的表达较IL-1β诱导组显著升高($P<0.01$)，给予40 μmol·L^{-1}姜黄素处理后明显降低，且差异具有统计学意义($P<0.01$)。此外，JNK通路激活剂处理IL-1β诱导损伤的大鼠软骨细胞后，细胞凋亡和炎症因子分泌水平明显升高($P<0.01$)，而给予40 μmol·L^{-1}姜黄素治疗后上述表达水平均显著降低，且差异具有统计学意义($P<0.01$)，说明姜黄素可通过JNK/MAPK通路治

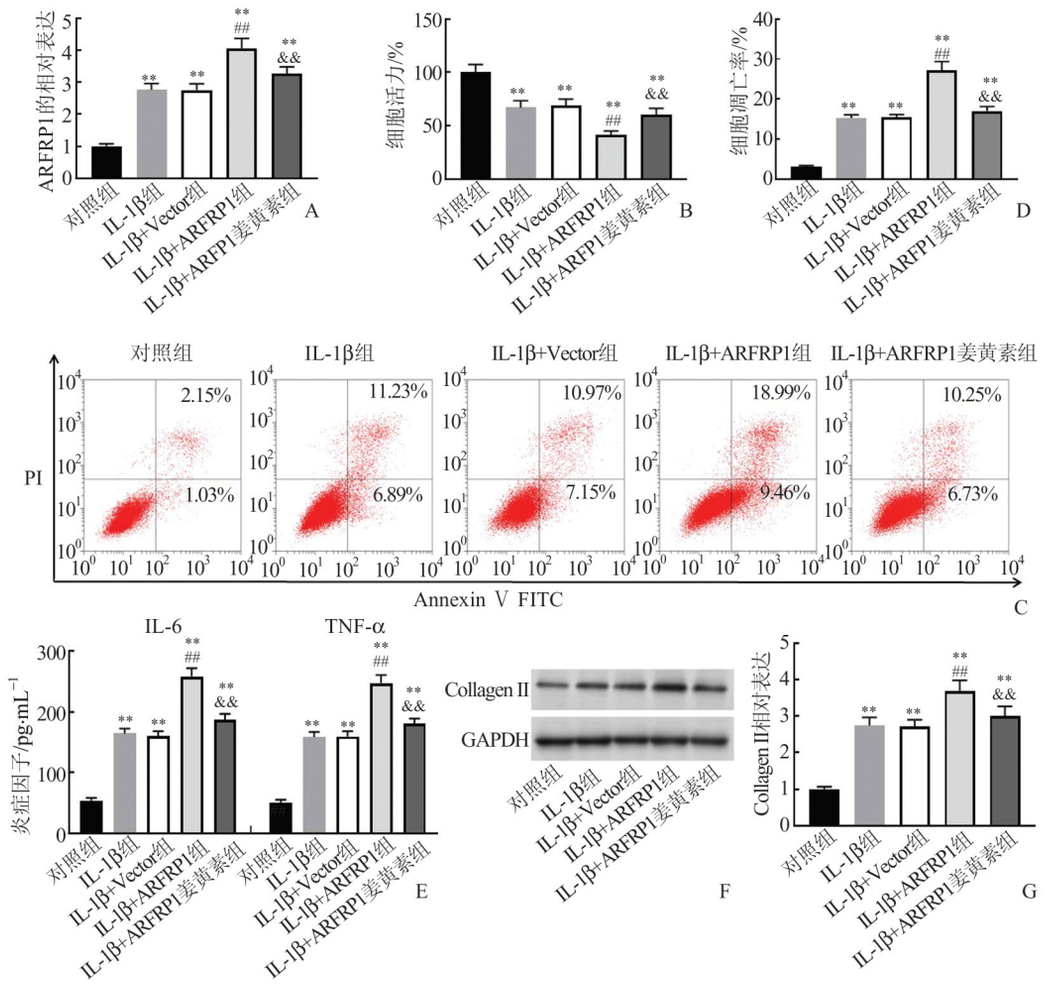


图 2　lncRNA ARFRP1 对姜黄素抑制软骨细胞损伤的影响

A. RT-qPCR 检测 ARFRP1 的表达水平；B. CCK-8 检测软骨细胞增殖能力；C. 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡能力；D. 细胞凋亡率统计图；E. ELISA 检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平；F. Western Blot 检测 Collagen Ⅱ 的蛋白表达；G. Collagen Ⅱ 蛋白表达水平统计图。与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与 IL-1β 组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与 IL-1β＋ARFRP1 组比较，$^{\&\&}P<0.01$

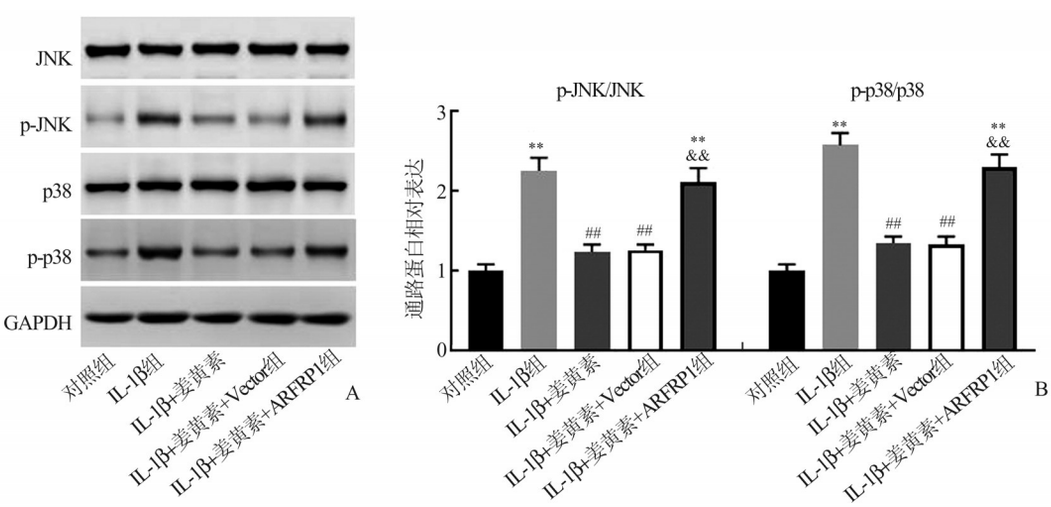


图 3　姜黄素对 JNK/MAPK 通路蛋白表达的影响

A. Western Blot 检测磷酸化 JNK 蛋白（p-JNK）、总 JNK 蛋白（JKN）、磷酸化 p38 蛋白（p-p38）、总 p38 蛋白（p38）的表达水平；B. p-JNK 与 JNK 比值，p-p38 与 p38 比值的统计图。与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与 IL-1β 组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与 IL-1β＋姜黄素组比较，$^{\&\&}P<0.01$

疗大鼠继发性软骨损伤,见图4。

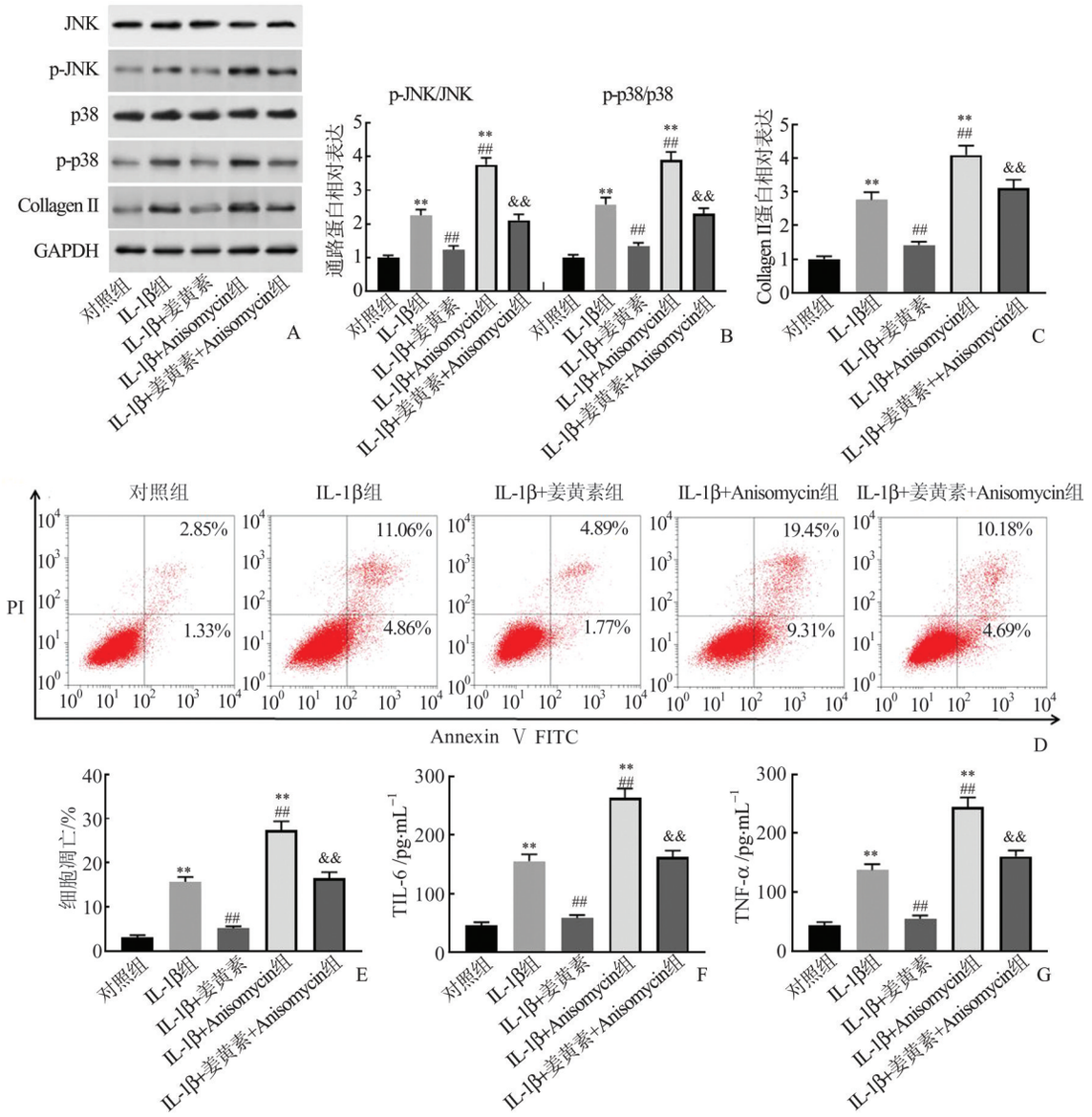


图4 JNK激活剂对姜黄素改善软骨细胞损伤的影响

A. Western Blot检测磷酸化JNK蛋白(p-JNK)、总JNK蛋白(JKN)、磷酸化p38蛋白(p-p38)、总p38蛋白(p38)、Collagen Ⅱ的蛋白表达水平;B. p-JNK与JNK比值,p-p38与p38比值的统计图;C. Collagen Ⅱ蛋白表达水平的统计图;D. 流式细胞术检测细胞凋亡率;E. 细胞凋亡率统计图;F. ELISA检测炎症因子IL-6水平;G. ELISA检测炎症因子TNF-α水平。与对照组比较,$^{**}P<0.01$;与IL-1β组比较,$^{\#\#}P<0.01$;与IL-1β+姜黄素组和IL-1β+Anisomycin组比较,$^{\&\&}P<0.01$

2.5 姜黄素对大鼠膝关节软骨损伤病理学影响 大鼠继发性软骨损伤造模后,分别给予低(50 mg·kg^{-1})、高(100 mg·kg^{-1})浓度姜黄素处理,10周后检测大鼠膝关节软骨损伤组织ARFRP1表达,组织学分析及组织评分。与CI模型相比,姜黄素呈剂量依赖性地降低ARFRP1的表达($P<0.01$)。与假手术组相比,CI模型组番红O-固绿染色着色重度减弱,部分失染,局部地方细胞增生、肥大,细胞数量增多。而姜黄素处理组较模型组改善,番红O-固绿染色增强,着色加深,基质丢失减少,细胞排列整齐,OARSI评分显著下降,滑膜炎评分也显著降低,组间差异有统计学意义($P<0.01$),见图5。

2.6 姜黄素对大鼠膝关节软骨损伤炎症反应和凋亡水平的影响 通过检测大鼠血清中IL-6和TNF-α含量评估大鼠的炎症程度。在假手术组,IL-6和TNF-α含量均较低,模型组显著升高,给予不同浓度姜黄素治疗后,IL-6和TNF-α含量呈剂量依赖性下降($P<0.01$)。此外100 mg·kg^{-1}姜黄素

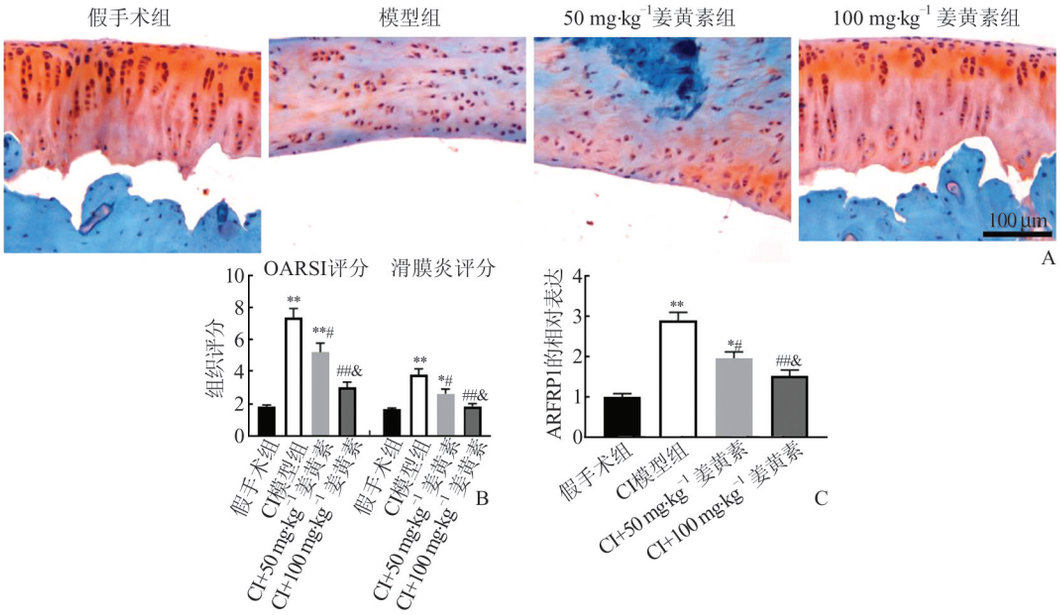


图 5　姜黄素对大鼠膝关节软骨损伤病理学影响

A. 各组大鼠膝关节软骨组织番红 O-固绿染色；B. 各组大鼠病理组织 OARSI 评分和滑膜炎评分；C. RT-qPCR 检测各组大鼠病理组织中 ARFRP1 的表达。与假手术组比较，$^{**}P<0.01$；与 CI 模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与 CI＋50 mg·kg^{-1}姜黄素组比较，$^{\&}P<0.05$

显著降低 Collagen Ⅱ的表达（$P<0.01$）。随后，检测 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9、p-JNK 和 p-p38 的蛋白表达水平。与模型组相比，姜黄素处理组细胞凋亡相关蛋白和通路蛋白表达水平均随着姜黄素给药量的增加而降低，且差异具有统计学意义（$P<0.05$），见图 6。

3　讨论

骨关节炎（OA）是全球最常见的关节疾病，也是疼痛、身体残疾和经济生产力损失的主要原因，目前尚无有效的治疗方法[2]。前交叉韧带（anterior cruciate ligament，ACL）是稳定膝关节的重要结构，ACL 损伤会导致股骨与胫骨在负重时半脱位，引发膝关节不稳的情况，这种不稳定会改变膝关节正常的关节面间接触面积和压力，最终导致半月板撕裂、软骨损伤，膝关节退行性性变、功能丧失。中药天然成分毒性低，疗效显著，已被认为是治疗多种疾病的候选新药。同时，许多中药关键成分已成为缓解继发性软骨损伤的途径之一。姜黄素具有抗炎、抗氧化等多种药理作用，从而抑制有害因子的释放，起到对软骨细胞的保护功能[11]。此外，有研究[12]发现姜黄素可以抑制由软骨细胞产生的多种炎症因子和分解代谢相关的因子（COX-2、TNF-α、MMP-13 等）改善细胞损伤。姜黄素还可通过促进大鼠软骨细胞中 SIRT1 的表达抑制 PERK-eIF2α-CHOP 通路，改善氧化应激诱导的大鼠骨关节炎进展[4]。还有报道[10]显示姜黄素通过抑制 NF-κB/Hif-2α 轴调节软骨细胞 ECM 稳态和细胞凋亡减轻 OA 进展。此外，临床研究[5-6]表明，口服姜黄或姜黄素补充剂能有效缓解 OA 患者的疼痛及其疾病进展。本研究表明，10 μmol·L^{-1}和 40 μmol·L^{-1}姜黄素对软骨细胞无毒性且能够缓解 IL-1β 诱导的软骨细胞损伤。与此同时，姜黄素干预还能够促进软骨细胞增殖，抑制细胞凋亡，减少炎症因子分泌和凋亡蛋白以及 JNK/MAPK 通路蛋白的表达，该结果与既往研究一致。

lncRNA 表达失调在一系列人类疾病中起重要作用。在人类 OA 软骨中已经检测到许多不同表达的 lncRNAs，它们可能参与了 ECM 降解，炎症反应，软骨细胞和滑膜细胞凋亡和 OA 的血管生成[13-14]。lncRNA ARFRP1 被发现在 OA 组织中表达显著升高，敲低 lncRNA ARFRP1 能够降低 LPS 诱导的软骨细胞中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量，抑制软骨细胞损伤[7]。已有研究[15]证明了许多中药化学物质调节 lncRNA 表达的疾病模型，如姜黄素通过 lncRNA NBR2/AMPK 途径促进结直肠癌细胞凋亡，抑制侵袭；抑制大鼠 lncRNA PVT1 减少 LPS 诱导的脓毒性急性肾损伤[16]。本实验结果表明，ARFRP1 在大鼠软骨损伤模型中高表达，其表达上调通过促进细胞凋亡、炎症因子分泌及 Collagen Ⅱ表

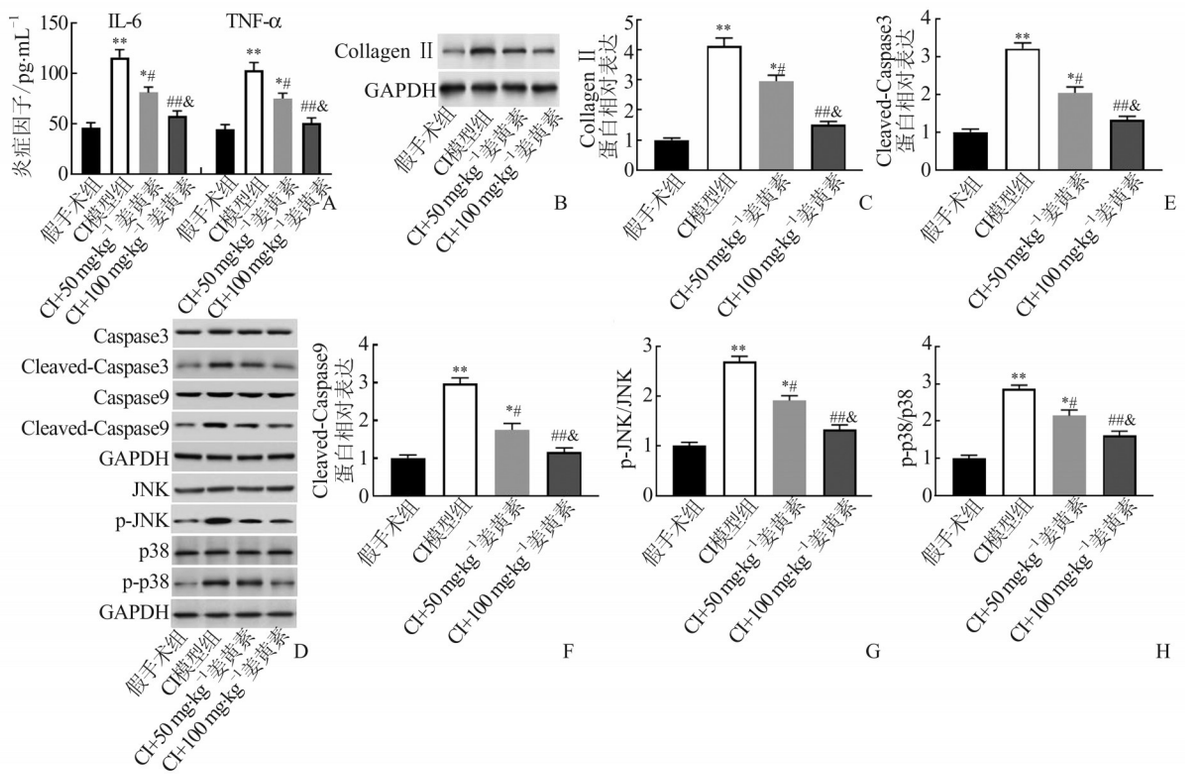


图6 姜黄素对大鼠膝关节软骨损伤炎症反应和凋亡水平的影响

A. ELISA检测各组大鼠血清中炎症因子IL-6和TNF-α的水平；B. Western Blot检测Collagen Ⅱ蛋白表达；C. Collagen Ⅱ蛋白表达水平的统计图；D. Western Blot检测Caspase-3、Cleaved-Caspase3、Caspase9、Cleaved-Caspase9、磷酸化JNK蛋白(p-JNK)、总JNK蛋白(t-JKN)、磷酸化p38蛋白(p-p38)、总p38蛋白(t-p38)的蛋白表达水平；E. Cleaved-Caspase3蛋白表达水平的统计图；F. Cleaved-Caspase9蛋白表达水平的统计图；G. 磷酸化的JNK蛋白(p-JNK)水平与JNK总蛋白(t-JNK)水平的比值；H. 磷酸化p38蛋白(p-p38)水平与总p38蛋白(t-p38)水平的比值。与假手术组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与CI模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与CI+50 mg·kg^{-1}姜黄素组比较，$^{\&}P<0.05$

达加速软骨细胞损伤，而给予姜黄素干预能够部分拮抗ARFRP1对软骨细胞的损伤作用。

既往研究[17]表明，JNK通路是人类继发性软骨损伤中的一个关键信号途径，在疾病发展中被显著激活。例如，LI等[18]研究显示，LINC00313在OA小鼠中显著下调，过表达LINC00313能够通过抑制JNK信号通路，缓解OA小鼠的疾病进展；膝骨关节炎患者软骨细胞外信号调节激酶(ERK)/c-Jun N末端激酶(JNK)信号通路的活化通过调节骨调节蛋白表达，参与OA患者软骨细胞的病理变化，促进膝关节炎的发生和发展[19]。除此之外，IL-1β刺激的小鼠软骨细胞转录组学分析显示，梓醇能够降低ERK、p38、JNK的磷酸化，抑制JNK通路活化，减少炎症细胞因子的释放，缓解IL-1β诱导的软骨细胞损伤[20]。在本研究中，姜黄素干预能显著抑制IL-1β诱导的软骨细胞中JNK/MAPK通路相关蛋白的表达水平，而JNK通路激活剂Anisomycin的处理可显著扭转姜黄素对JNK/MAPK通路的抑制作用，促进软骨细胞损伤，这与上述报道相一致。

综上所述，本研究确定了姜黄素可能通过下调lncRNA ARFRP1表达，抑制JNK/MAPK通路激活，从而改善继发性大鼠软骨细胞损伤。

参考文献

[1] SHIH P C, LEE Y H, TSOU H K, et al. Recent targets of osteoarthritis research [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2023, 37(2): 101851.

[2] MOBASHERI A, THUDIUM C S, BAY-JENSEN A C, et al. Biomarkers for osteoarthritis: Current status and future prospects [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2023, 37(2): 101852.

[3] LESTARI M L, INDRAYANTO G. Curcumin [J]. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2014, 39: 113-204.

[4] FENG K, GE Y, CHEN Z, et al. Curcumin inhibits the PERK-eIF2α-CHOP pathway through promoting SIRT1 expression in oxidative stress-induced rat chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8574386.

[5] PAULTRE K, CADE W, HERNANDEZ D, et al.

Therapeutic effects of turmeric or curcumin extract on pain and function for individuals with knee osteoarthritis: A systematic review [J]. BMJ Open Sport Exerc Med, 2021, 7(1): e000935.

[6] PANKNIN T M, HOWE C L, HAUER M, et al. Curcumin supplementation and human disease: A scoping review of clinical trials [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4476.

[7] ZHANG G, ZHANG Q, ZHU J, et al. LncRNA ARFRP1 knockdown inhibits LPS-induced the injury of chondrocytes by regulation of NF-κB pathway through modulating miR-15a-5p/TLR4 axis [J]. Life Sci, 2020, 261: 118429.

[8] XIAO Y, YAN X, YANG Y, et al. Downregulation of long noncoding RNA HOTAIRM1 variant 1 contributes to osteoarthritis via regulating miR-125b/BMPR2 axis and activating JNK/MAPK/ERK pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1569-1577.

[9] YU H, LI M, WEN X, et al. Elevation of α-1, 3 fucosylation promotes the binding ability of TNFR1 to TNF-α and contributes to osteoarthritic cartilage destruction and apoptosis [J]. Arthritis Res Ther, 2022, 24(1): 93.

[10] ZHOU Y, MING J, DENG M, et al. Chemically modified curcumin (CMC2.24) alleviates osteoarthritis progression by restoring cartilage homeostasis and inhibiting chondrocyte apoptosis via the NF-κB/HIF-2α axis [J]. J Mol Med (Berl), 2020, 98(10): 1479-1491.

[11] JIANG C, LUO P, LI X, et al. Nrf2/ARE is a key pathway for curcumin-mediated protection of TMJ chondrocytes from oxidative stress and inflammation [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(3): 395-406.

[12] PARK S, LEE L R, SEO J H, et al. Curcumin and tetrahydrocurcumin both prevent osteoarthritis symptoms and decrease the expressions of pro-inflammatory cytokines in estrogen-deficient rats [J]. Genes Nutr, 2016, 11: 2.

[13] ZHANG L, ZHANG H, XIE Q, et al. LncRNA-mediated cartilage homeostasis in osteoarthritis: A narrative review [J]. Front Med (Lausanne), 2024, 11: 1326843.

[14] ZHANG X, LIU Q, ZHANG J, et al. The emerging role of lncRNAs in osteoarthritis development and potential therapy [J]. Front Genet, 2023, 14: 1273933.

[15] YU H, XIE Y, ZHOU Z, et al. Curcumin regulates the progression of colorectal cancer via LncRNA NBR2/AMPK pathway [J]. Technol Cancer Res Treat, 2019, 18: 1533033819870781.

[16] HUANG W, LI X, WANG D, et al. Curcumin reduces LPS-induced septic acute kidney injury through suppression of lncRNA PVT1 in mice [J]. Life Sci, 2020, 254: 117340.

[17] GE H X, ZOU F M, LI Y, et al. JNK pathway in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2017, 37(5): 431-436.

[18] LI H, WANG Q, GONG D. LINC00313 alleviates osteoarthritis progression in mice through promoting TRAF1 promoter methylation and inhibiting the ASK1/JNK signaling pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(5): 732-745.

[19] XU Y, GU Y, JI W, et al. Activation of the extracellular-signal-regulated kinase (ERK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal pathway and osteogenic factors in subchondral bone of patients with knee osteoarthritis [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(8): 663.

[20] PANG Y, ZHAO L, JI X, et al. Analyses of transcriptomics upon IL-1β-stimulated mouse chondrocytes and the protective effect of catalpol through the NOD2/NF-κB/MAPK signaling pathway [J]. Molecules, 2023, 28(4): 1606.

（2024-02-21 收稿）
编辑　袁　靓