

从空间异质性视角研究全杜仲胶囊 治疗膝骨关节炎的作用机制

马兆臣¹, 肖自青², 张楚³, 刘毓东¹, 胥明珠², 李小锋⁴, 吴志平⁴,
李玮婕¹, 杨怡新³, 林娜^{1*}, 张彦琼^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500;

3. 福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122;

4. 江西普正制药股份有限公司, 江西 吉安 331409)

[摘要] 旨在整合空间转录组学数据挖掘与动物实验验证, 系统表征全杜仲胶囊对膝骨关节炎软骨病变的干预作用, 并揭示其相关分子机制。采用改良 Huhh 法, 构建膝骨关节炎大鼠模型。采用苏木精-伊红 (HE) 染色检测膝关节软骨退化相关病理改变。利用 HIT 2.0 数据库收集方药候选靶标, 通过对临床膝骨关节炎患者软骨组织的空间转录组学数据集 (GSE254844) 进行生物信息学分析, 筛选软骨不同空间位置的疾病基因; 进一步构建“方药候选靶标-软骨病变空间特异性基因”相互作用网络, 挖掘全杜仲胶囊干预软骨不同空间位置的作用及核心机制, 并利用动物实验生物样本, 开展免疫组化等分子生物学检测, 对上述结果加以实验验证。结果显示, 全杜仲胶囊可有效抑制大鼠受累关节软骨的退行性病变。该药效作用与全杜仲胶囊调控关节软骨表层和浅层区的硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP)-含吡啶结构域的 NOD 样受体家族蛋白 3 (NLRP3)-骨形态发生蛋白受体 2 型 (BMP2)-纤维连接蛋白 1 (FN1)-基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 信号轴, 从而抑制相关靶位因氧化应激和炎症扩散所导致的软骨基质降解密切相关。综上, 该研究从药物作用的空间异质性视角, 阐释了全杜仲胶囊减轻膝骨关节炎不同软骨病变区域的特异性作用机制, 为该中成药品种在膝骨关节炎个性化治疗中的应用提供了实验依据。

[关键词] 全杜仲胶囊; 膝骨关节炎; TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴; 空间转录组学; 网络邻近度

Mechanism of Quanduzhong Capsules in treating knee osteoarthritis from perspective of spatial heterogeneity

MA Zhao-chen¹, XIAO Zi-qing², ZHANG Chu³, LIU Yu-dong¹, XU Ming-zhu²,

LI Xiao-feng⁴, WU Zhi-ping⁴, LI Wei-jie¹, YANG Yi-xin³, LIN Na^{1*}, ZHANG Yan-qiong^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

3. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

4. Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'an 331409, China)

[Abstract] This study aims to systematically characterize the targeted effects of Quanduzhong Capsules on cartilage lesions in knee osteoarthritis by integrating spatial transcriptomics data mining and animal experiments validation, thereby elucidating the related

[收稿日期] 2024-10-31

[基金项目] 国家重点研发计划项目 (2022YFC3502002); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82405060); 中国博士后科学基金面上项目 (2024M753647); 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室 2024 年度科研专项 (CI2023E002-10)

[通信作者] * 张彦琼, 博士, 研究员, 主要从事临床中药学研究, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn; * 林娜, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药性和中药药理学研究, E-mail: nlin@icmm.ac.cn

[作者简介] 马兆臣, 博士, 主要从事中药抗炎免疫药理学研究, E-mail: mazaoc@163.com

molecular mechanisms. A knee osteoarthritis model was established using Sprague-Dawley (SD) rats, via a modified Hulth method. Hematoxylin and eosin (HE) staining was employed to detect knee osteoarthritis-associated pathological changes in knee cartilage. Candidate targets of Quanduzhong Capsules were collected from the HIT 2.0 database, followed by bioinformatics analysis of spatial transcriptomics datasets (GSE254844) from cartilage tissues in clinical knee osteoarthritis patients to identify spatially specific disease genes. Furthermore, a "formula candidate targets-spatially specific genes in cartilage lesions" interaction network was constructed to explore the effects and major mechanisms of Quanduzhong Capsules in distinct cartilage regions. Experimental validation was conducted through immunohistochemistry using animal-derived biospecimens. The results indicated that Quanduzhong Capsules effectively inhibited the degenerative changes in the cartilage of affected joints in rats, which was associated with the regulation of Quanduzhong Capsules on the thioredoxin-interacting protein (TXNIP)-NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)-bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMP2)-fibronectin 1 (FN1)-matrix metalloproteinase 2 (MMP2) signal axis in the articular cartilage surface and superficial zones, subsequently inhibiting cartilage matrix degradation leading to oxidative stress and inflammatory diffusion. In summary, this study clarifies the spatially specific targeted effects and protective mechanisms of Quanduzhong Capsules within pathological cartilage regions in knee osteoarthritis, providing theoretical and experimental support for the clinical application of this drug in the targeted therapy on the inflamed cartilage.

[Key words] Quanduzhong Capsules; knee osteoarthritis; TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 signal axis; spatial transcriptomics; network proximity

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20241211.401

骨关节炎是一种常见的慢性退行性关节疾病, 关节疼痛是其临床主要症状^[1]。随着全球人口老龄化, 骨关节炎的发病率逐年上升。据 2019 年流行病学调查显示, 全球约有 2.5 亿人患有该疾病^[2], 而 2016 年报道中国约有 8.1% 的人群患有膝骨关节炎, 超过 1.2 亿人饱受膝骨关节炎疼痛和膝关节活动受限的困扰^[3]。膝骨关节炎主要表现为关节软骨的退化、软骨下骨的硬化及关节周围炎症, 通常伴随滑膜增生、骨赘形成和关节积液增多等病理过程^[4-5]。其中, 软骨退化在膝骨关节炎的发生中起着关键作用^[6]。目前, 治疗膝骨关节炎的药物主要包括非甾体类抗炎药、止痛药及关节腔注射类药物等, 但这些药物往往存在胃肠道不适、长期使用导致胃肠道出血以及关节腔感染等不良反应^[7]。因此, 寻找具有软骨保护作用且安全性良好的治疗药物已成为膝骨关节炎研究领域的重要科学问题之一。

中成药全杜仲胶囊是国家医保品种(国药准字 Z20055116), 具有补肝肾、强筋骨、降血压的功效, 临床常用于治疗肝肾亏虚型高血压病^[8-9]。近年来, 该中成药品种已逐渐被应用于骨关节炎的治疗, 可显著改善膝骨关节炎患者西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎指数评分(WOMAC)、视觉模拟评分(VAS)、Lysholm 膝关节评分量表(LKSS)、简明健康状况调查问卷(SF-36)等, 疗效显著^[10]。然而, 其治疗膝骨关节炎的核心功效环节、靶向调节部位以及具体的分子机制尚不明确, 严重制约了全杜仲胶

囊临床治疗膝骨关节炎的拓展应用。

本研究拟基于空间转录组学数据, 利用网络接近度计算, 探究全杜仲胶囊候选靶标集与膝骨关节炎相关基因集在不同软骨病变区域的互作关联性, 明确其优势靶向部位; 进一步构建“方药候选靶标-软骨病变空间特异性基因”相互作用网络, 并分析全杜仲胶囊干预膝骨关节炎的优势药效环节及其分子机制; 最后利用膝骨关节炎大鼠模型及其生物样本对上述机制加以实验验证。

1 材料

1.1 药品与试剂 全杜仲胶囊(江西普正制药有限公司, 批号 230301); 塞来昔布(辉瑞制药有限公司, 批号 8138327); 注射用青霉素钠(合肥中龙神力动物药业有限公司, 批号 20230316); 磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉博士德生物工程有限公司, 批号 202302); 生理氯化钠溶液(石家庄四药有限公司, 国药准字 H20066533, 批号 A2302175); 苏木精-伊红(HE)染色试剂(货号 G1120)、组织固定液(货号 P1110)均购自北京索莱宝科技有限公司; 3,3'-二氨基联苯胺显色(DAB)试剂盒(货号 AR1027)、乙二胺四乙酸抗原修复液(货号 AR1023)、乙二胺四乙酸脱钙液(货号 AR1071)、中性树胶(货号 AR0038)、超敏两步法检测试剂盒(货号 SV0001)均购自武汉博士德生物工程有限公司; 大鼠组织丙二醛(MDA)、4-羟基壬烯醛(4-HNE)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6

(IL-6)、Ⅱ型胶原(COL Ⅱ)、纤维连接蛋白(FN)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物有限公司,货号分别为 ml077384、ml095918、ml002859、ml037361、ml102828、ml058801、ml652417);硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、骨形态发生蛋白受体 2 型(BMP2)、纤维连接蛋白 1(FN1)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号分别为 A24289、A16778、A0093、A6247);含吡啶结构域的 NOD 样受体家族蛋白 3(NLRP3)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 68102-1-Ig)。

1.2 动物 无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(180 ± 20)g,6~8 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2021-0006。所有动物均在 SPF 条件下饲养,温度(24 ± 1)℃,光/暗循环各 12 h。所有动物实验均符合中国中医科学院中药研究所伦理委员会的规定(伦理批准号 2024B282),并符合《实验动物管理条例》及国际实验动物管理和使用指南的相关标准。

1.3 仪器 B-L7 生物组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);BX53M 光学显微镜(日本奥林巴斯公司);Fusion FX SPECTRA 多功能成像仪(法国 VILBER LOURMAT 公司);MK3 全自动酶标仪(美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 临床膝骨关节炎患者受累软骨组织的空间转录组学数据分析 对 GSE254844 数据集中膝骨关节炎患者受累软骨组织的空间转录组学数据进行分析^[11]。受累膝关节软骨区域共被划分为 4 个部分:关节表层区、浅层区、中层区、深层区。每个区域的特征如下:表层指关节软骨的透明表层,浅层指胶原纤维密集排列并平行于表层的浅层区域,中层指胶原纤维呈斜向排列、软骨细胞呈球形且密度低的中层区域,深层指胶原纤维垂直于关节表面排列且软骨细胞肥大的深层区域^[12]。各区域与对照组的差异基因采用 DESeq2 进行分析,分别筛选 $|\log_2$ 差异倍数(FC)| >1.5 , $P<0.05$ 的基因作为 4 个部分的差异基因。

2.2 全杜仲胶囊干预膝骨关节炎的潜能评估 从 HIT 2.0 数据库(hit2.badd-cao.net)收集全杜仲胶囊的候选靶标集;从人类疾病数据库(MalaCards, www.malacards.org)收集膝骨关节炎相关疾病基因及全

杜仲胶囊已知适应症——高血压病相关基因集作为阳性对照数据集。通过计算全杜仲胶囊候选靶标集与膝骨关节炎中 4 个受累关节部位的差异基因、高血压病基因集之间的网络接近距离,评估全杜仲胶囊干预膝骨关节炎的潜能及作用部位。其中,网络接近距离基于最短路径原理用于衡量背景网络中 2 个节点集合之间的拓扑距离($Z\text{-score}>0$ 代表 2 个节点集拓扑分离, $Z\text{-score}<0$ 代表 2 个节点集拓扑结合)^[13]。

2.3 全杜仲胶囊干预膝骨关节炎软骨不同空间位置的多维关联网络构建与分析 通过上述临床来源的空间转录组学数据分析,获得表层与浅层病变区域的空间特异性基因集;结合上述 HIT 2.0 数据库收集所得全杜仲胶囊候选靶标集,根据基因-基因相互作用信息,构建“方药候选靶标-软骨病变空间特异性基因”相互作用网络,并利用 CytoHubba 计算网络拓扑特征值,筛选最大团中心性、度值、中介中心性、接近中心性均大于相应中位数的靶标作为全杜仲胶囊干预膝骨关节炎的核心网络靶标。

2.4 动物分组、造模及给药 将大鼠随机分为 6 组,包括假手术组、模型组、全杜仲胶囊低剂量组($108 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,临床等效剂量的 0.5 倍)、全杜仲胶囊中剂量组($216 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,临床等效剂量)、全杜仲胶囊高剂量组($432 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,临床等效剂量的 2 倍)、塞来昔布组($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,临床等效剂量),每组 10 只。大鼠麻醉后剪去右后肢膝关节周围 1 cm^2 区域的鼠毛,使用络合碘消毒,假手术组仅打开关节腔;模型组及给药组打开关节腔,暴露前交叉韧带后,剪断前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板,进行抽屉实验,确认上述结构完全断离,从而成功建立膝骨关节炎大鼠模型^[14]。造模 10 周后,通过 HE 染色观察关节软骨组织,若模型组表现出软骨退变、表面粗糙等典型膝骨关节炎病理变化,且假手术组未见异常,可进一步说明成功建立膝骨关节炎大鼠模型。术后连续 3 d 肌肉注射 $8 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素钠溶液预防感染,造模后第 1 天起开始灌胃给药,连续 10 周。

2.5 免疫组织化学检测 使用特定抗体对膝骨关节炎大鼠软骨组织中 TXNIP、NLRP3、BMP2、FN1、MMP2(1:50)的表达进行检测,二抗稀释浓度为 1:3 000,详细方法见课题组前期研究报道^[15]。

2.6 生化指标检测 采用 ELISA 法按照试剂盒说明书检测膝骨关节炎大鼠关节软骨组织中 MDA、

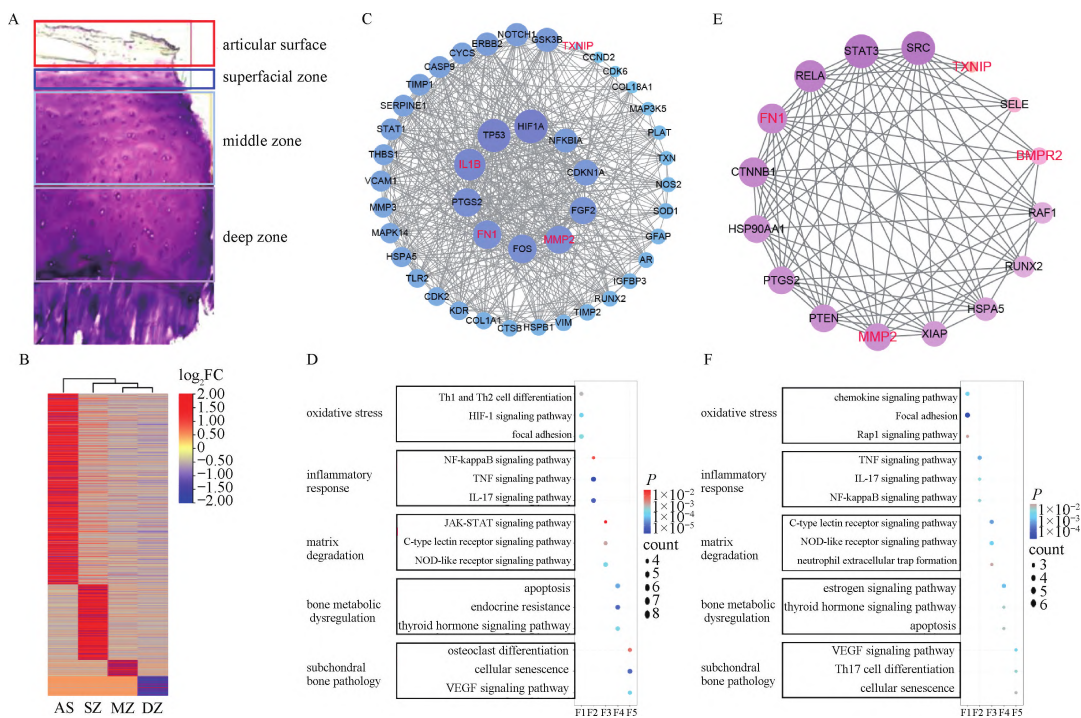
4-HNE、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COL II、FN 的含量。

2.7 统计学分析 使用 GraphPad Prism V8.0.2 进行数据分析。根据正态分布检验结果,采用参数或非参数统计分析;进一步采用单因素方差分析,并进行 Tukey 事后检验或 Kruskal-Wallis 检验的 Dunn 事后检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 全杜仲胶囊对膝关节炎具有干预潜能且主要作用于受累软骨的表层和浅层区域 从 HIT 2.0 收集得到 373 个全杜仲胶囊候选靶标;从 MalaCards 数据库分别收集得到 75、339 个膝关节炎和高血压病相关基因。空间转录组数据集 GSE254844 包含 4 例膝关节炎患者和 1 例对照病例,4 例患者均已通过改良 Outerbridge 分类标准并接受膝关节置换术,1 例对照病例接受截肢且无关节损伤或疾病史,软骨区域的结构划分见图 1A。利用 DESeq2

筛选受累关节软骨各区域的差异基因,共得到表层区差异基因 3 646 个、浅层区 2 092 个、中层区 563 个、深层区 600 个,表明表层和浅层区域可能是膝关节炎病变进展的高活跃区域,见图 1B。将上述药物候选靶标基因与膝关节炎、高血压病、软骨 4 个区域等疾病相关基因集分别映射到人类蛋白互作网络中,并计算药物候选靶标与疾病相关基因二者之间的网络拓扑距离。结果显示,全杜仲胶囊候选靶标基因集与高血压病、膝关节炎、软骨表层和浅层区域基因集均呈现拓扑结合性(Z -score 均 <0 , $P<0.05$),而对软骨中层及深层区域的差异基因则拓扑分离(Z -score 均 >0),见表 1。上述结果提示,全杜仲胶囊对于高血压病的干预效果最好,这也与其用于治疗高血压病的临床适应症相符合;其次,全杜仲胶囊也具有干预膝关节炎的潜能,且作用部位主要位于受累关节软骨的表层和浅层区域。



A. 膝关节炎受累关节软骨的区域划分^[12]; B. 受累关节软骨各区域的差异基因热图 (AS, 软骨表层区; SZ, 浅层区; MZ, 中层区; DZ, 深层区); C. “全杜仲胶囊候选靶标-表层差异基因”相互作用网络; D. 全杜仲胶囊干预软骨表层区域的核心网络靶标所参与的生物学功能模块(图中列出各模块- $\lg P$ 排名前 3 的通路名称, F1~F5 对应 5 个功能模块); E. “全杜仲胶囊候选靶标-浅层差异基因”相互作用网络; F. 全杜仲胶囊干预软骨浅层区域的核心网络靶标所参与的生物学功能模块(图中列出各模块- $\lg P$ 排名前 3 的通路名称, F1~F5 对应 5 个功能模块)。

图 1 “全杜仲胶囊候选靶标-软骨不同区域差异表达基因”相互作用网络的构建与功能富集分析

Fig.1 "Quanduzhong capsule candidate target-differentially expressed gene in various cartilage regions" interaction network construction and functional enrichment analysis

表1 全杜仲胶囊干预膝骨关节炎及软骨不同区域的潜能评估

Table 1 Evaluation of the therapeutic potentials of Quanduzhong Capsules in knee osteoarthritis and the different regions of cartilage tissues

药物靶标	疾病基因	网络接近距离 (Z-score)
全杜仲胶囊	高血压病(阳性对照数据集)	-9.01
	膝骨关节炎	-3.43
	表层(AS)	-0.46
	浅层(SZ)	-0.81
	中层(MZ)	1.81
	深层(DZ)	2.47

3.2 TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴可能是全杜仲胶囊缓解膝骨关节炎软骨表层和浅层区域病变的关键作用靶标。将全杜仲胶囊靶标与表层、浅层区域差异基因分别取交集,得到 93 个全杜仲胶囊 & 表层交集基因和 43 个全杜仲胶囊 & 浅层交集基因;根据“基因-基因”间相互作用信息,构建“全杜仲胶囊候选靶标-表层差异表达基因”和“全杜仲胶囊候选靶标-浅层差异表达基因”相互作用网络;通过网络拓扑特征值计算,分别筛选出 44、16 个核心靶标,见图 1C、1E。功能富集分析结果显示,上述 2 个相互作用网络主要参与氧化应激、炎症反应、基质降解、骨代谢紊乱及软骨下骨异常等病理环节,并显著富集于膝骨关节炎等疾病相关通路(均 $P < 0.05$),见图 1D、1F。在膝骨关节炎早期,持续的机械应力会引起软骨细胞损伤和周围组织的微小损伤,TXNIP 所介导的氧化应激被异常加重^[16];同时,TXNIP 激活 NLRP3 炎性小体,导致 NLRP3 释放 IL-1 β ,引发局部的促炎反应^[17],损伤软骨细胞^[18];炎症信号向下传递至 BMP2 和 FN1,导致关节软骨基质降解相关蛋白 FN1 的异常生成;MMP2 在 FN1 的刺激下被激活,进一步分解细胞外基质,加剧软骨和骨组织的破坏^[19]。可见,氧化应激、炎症扩展、基质降解通过 TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴的信号转导形成了正反馈,持续加重病程进展,并促进膝骨关节炎从早期炎症阶段逐步进入到软骨损伤阶段^[20]。更有趣的是,TXNIP、BMP2、FN1、MMP2 既是膝骨关节炎受累靶位软骨表层和浅层区域的显著高表达基因,又是全杜仲胶囊的候选靶标,见表 2。因此,TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴可能是全杜仲胶囊干预膝骨关节炎关节软骨表层和

浅层区域的关键作用靶标之一。

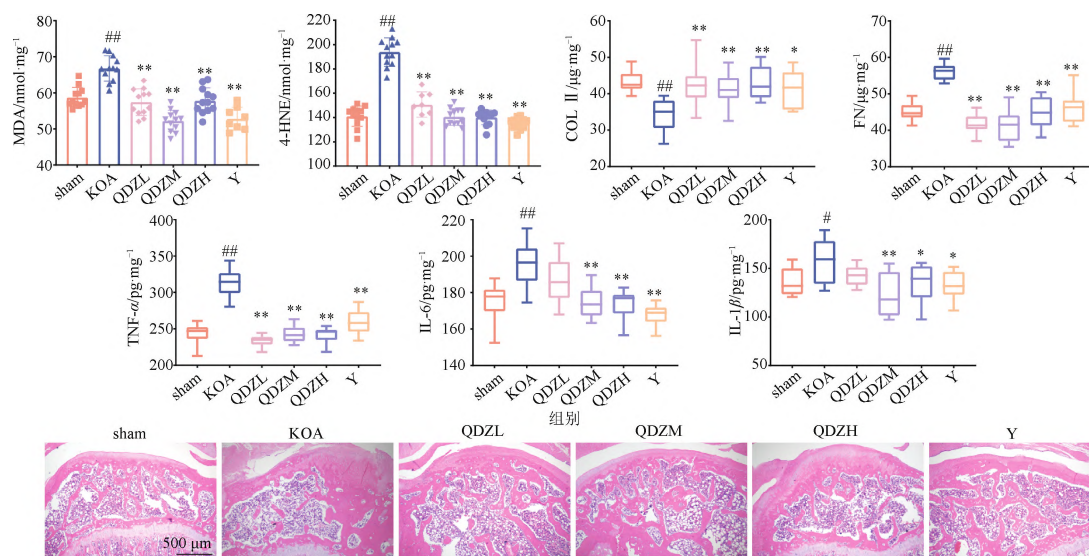
表2 膝骨关节炎受累关节软骨表层和浅层区域中目标信号轴成员分子的差异表达特征

Table 2 Differential expression characteristic of various components involved into the target signal axis in the surface and superficial zones of articular cartilage from osteoarthritis

区域	基因	log ₂ fold change	P	adjusted P	Entrez ID
表层	TXNIP	3.741	3.217×10^{-4}	5.003×10^{-3}	10628
	NLRP3	2.263	1.080×10^{-2}	4.324×10^{-2}	114548
	BMP2	2.035	5.140×10^{-3}	2.745×10^{-2}	659
	FN1	5.194	2.294×10^{-7}	4.192×10^{-5}	2335
	MMP2	3.375	5.200×10^{-4}	6.617×10^{-3}	4313
浅层	TXNIP	4.356	1.417×10^{-3}	1.713×10^{-2}	10628
	NLRP3	3.622	4.917×10^{-3}	3.326×10^{-2}	114548
	BMP2	3.089	7.730×10^{-3}	4.221×10^{-2}	659
	FN1	6.852	3.883×10^{-6}	5.993×10^{-4}	2335
	MMP2	3.705	2.808×10^{-3}	2.446×10^{-2}	4313

3.3 全杜仲胶囊可显著缓解膝骨关节炎关节软骨氧化应激、炎症反应和基质降解与假手术组相比,模型组大鼠关节软骨中氧化应激相关指标 MDA 和 4-HNE,促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平均显著升高;与模型组相比,全杜仲胶囊各剂量给药均可有效降低上述指标的异常升高,提示全杜仲胶囊可有效抑制关节软骨的氧化应激和炎症反应,见图 2。此外,模型组大鼠关节软骨中细胞外基质成分 COL II 的水平显著降低,FN 水平显著升高,全杜仲胶囊各剂量给药后则显著逆转了上述基质成分的水平,提示其可以抑制关节软骨基质降解和破坏,见图 2。HE 染色结果表明,膝骨关节炎大鼠软骨边界模糊且凹凸不平,边缘碎片化,软骨细胞排列混乱,发生软骨丢失,潮线残缺并呈放射状;全杜仲胶囊治疗组软骨边界则较为平滑,软骨细胞排列较为整齐,潮线较为完整且清晰,说明全杜仲胶囊可以显著改善关节软骨的完整性和细胞排列,最终延缓膝骨关节炎的病理进程,见图 2。

3.4 全杜仲胶囊通过抑制 TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴所介导的氧化应激-炎症反应-基质降解序贯环节而发挥其保护膝骨关节炎受累软骨表层和浅层区域的药效。本研究通过免疫组化检测膝骨关节炎大鼠受累软骨组织中 TXNIP、NLRP3、BMP2、FN1、MMP2 的表达水平与阳性表达区域。结果显示,TXNIP、NLRP3、BMP2、FN1、MMP2 蛋白



sham.假手术组;KOA.模型组;QDZL.全杜仲胶囊低剂量组;QDZM.全杜仲胶囊中剂量组;QDZH.全杜仲胶囊高剂量组;Y.阳性药组;与假手术组相比[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$;与模型组相比^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$ (图3同)。

图2 全杜仲胶囊对膝关节炎大鼠关节软骨组织中MDA、4-HNE、COL II、FN、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及软骨组织病理形态学的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$;HE染色, $\times 40$)

Fig.2 Effects of Quanduzhong Capsules on the levels of MDA, 4-HNE, COL II, FN, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in articular cartilage tissue and the histopathological morphology of cartilage in knee osteoarthritis rats($\bar{x}\pm s$, $n=5$;HE staining, $\times 40$)

在受累软骨组织中呈阳性表达。与空间转录组学的结果一致,上述蛋白的阳性表达区域主要位于受累软骨组织的关节表层和浅层区域,中层区和深层区则无明显差异;经过全杜仲胶囊干预,上述蛋白的异常表达均得以矫正,见图3。

4 讨论

全杜仲胶囊已被用于膝骨关节炎的治疗,但其作用机制尚不明确。本研究整合网络接近度、空间转录组学数据挖掘及动物层面实验验证,系统揭示了全杜仲胶囊在膝骨关节炎治疗中对特定部位的靶向效应、优势药效环节和作用机制,即全杜仲胶囊的主要作用靶位是受累关节软骨的表层和浅层区域,其通过调控TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2信号轴,干预氧化应激-炎症反应-基质降解序贯病理环节,从而保护关节软骨。

本研究通过计算网络邻近距离,定量评价全杜仲胶囊候选靶标与膝骨关节炎及其受累关节软骨不同区域相关基因的特定关联性^[21]。网络接近度对比结果表明,全杜仲胶囊候选靶标与膝骨关节炎及其受累关节软骨表层、浅层区域相关基因具有较强的拓扑邻近度($Z\text{-score}<0$),提示全杜仲胶囊的作用靶标更倾向于膝骨关节炎受累关节软骨的表层和浅层区域。

传统的转录组学分析通常忽略了不同组织区域之间的异质性,而空间转录组学提供了软骨组织在不同空间区域的基因表达信息,使在分区层面上观察膝骨关节炎分子变化成为可能^[22]。通过对空间转录组学数据的分析,本研究发现表层和浅层区域在膝骨关节炎中表现出更活跃的异常基因表达;同时高水平的TXNIP和NLRP3表达,提示这些区域可能是炎症和基质降解的“热点”区域。全杜仲胶囊通过在区域内降低TXNIP、NLRP3等分子的表达,显著缓解了局部的氧化应激和炎症反应。这一结果不仅证实了全杜仲胶囊在表层和浅层软骨中更具药效的特点,也进一步验证了空间转录组学在解析膝骨关节炎局部病理特征和中药靶向干预效果中的应用价值^[23]。

本研究首次明确了TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2信号轴在膝骨关节炎病理进展中的重要作用,该信号轴通过介导“氧化应激-炎症反应-基质降解”正反馈链路,促进膝骨关节炎由早期炎症反应阶段逐步向软骨损伤阶段转变。具体而言,TXNIP的上调触发氧化应激,激活NLRP3炎性小体,并导致下游IL-1 β 等促炎因子的释放,进而诱导软骨细胞损伤和基质降解。BMP2和FN1在NLRP3的上游刺激下显著增加,形成降解蛋白酶MMP2的

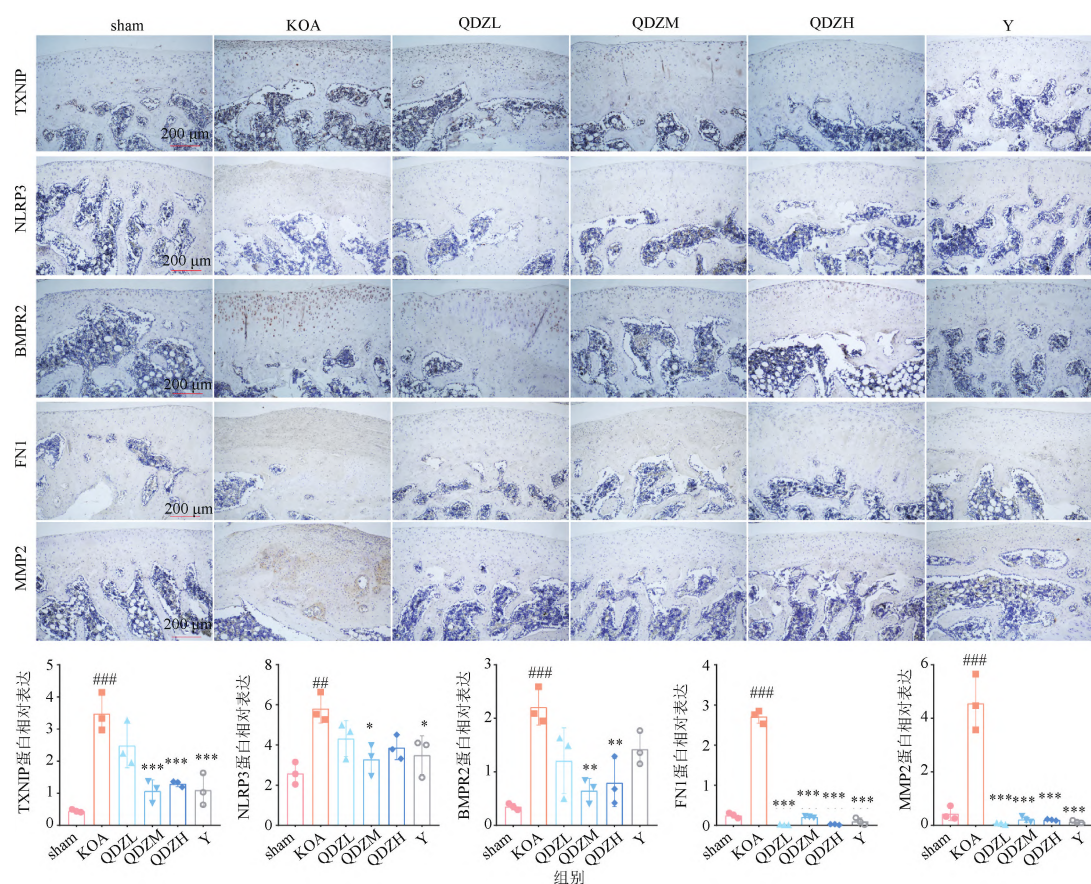


图3 全杜仲胶囊对膝骨关节炎大鼠受累软骨组织不同区域中 TXNIP、NLRP3、BMPR2、FN1、MMP2 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.3 Effects of Quanduzhong Capsules on the expression of TXNIP, NLRP3, BMPR2, FN1, and MMP2 proteins in various regions of the inflamed cartilage tissues from knee osteoarthritis rats (immunohistochemistry, $\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

激活链条,加速软骨结构的破坏。体内实验验证结果表明,全杜仲胶囊通过下调 TXNIP,抑制氧化应激指标 MDA 和 4-HNE,同时降低了 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL- 1β 等炎症因子水平,从而减轻了由 NLRP3 激活引发的炎症链式反应。此外,全杜仲胶囊显著提升了软骨基质成分 COL II 的表达,并降低了 MMP2 活性,缓解了软骨基质的降解。全杜仲胶囊在浅层区域(即关节表面与浅层区)有效调控了上述关键基因的表达,这种基因调控对于膝骨关节炎的治疗具有重要意义,因为浅层区域的软骨细胞受外界机械应力影响较大,容易出现炎症及氧化应激反应^[24],从而加速软骨降解和骨关节炎进展,也展现了全杜仲胶囊作为精准化膝骨关节炎治疗手段的潜在应用价值。

根据本课题组前期研究,全杜仲胶囊的主要活性成分包括绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、桃叶珊瑚

苷、京尼平苷酸和杜仲苷 B。这些成分通过抗氧化、抗炎和软骨保护 3 个主要环节干预膝骨关节炎的病理过程。在抗氧化方面,绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷等通过清除自由基、抑制活性氧(ROS)生成和激活核因子红细胞 2 相关因子 2(Nrf2)信号通路,减轻氧化应激损害^[25-26]。其中绿原酸通过激活自噬途径,减少氧化应激对软骨细胞的持续破坏^[27]。在抗炎方面,绿原酸、杜仲醇提取物等通过抑制炎症因子(如 IL- 1β 、 $\text{TNF-}\alpha$)和关键炎症通路,如 Janus 激酶 1(JAK1)/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)、核因子 κB (NF- κB),显著减轻关节滑膜炎和软骨炎症反应^[28-29]。在软骨保护方面,绿原酸和桃叶珊瑚苷通过抑制基质金属蛋白酶(MMPs)活性和促进软骨细胞修复,减缓软骨基质的降解^[25,30]。杜仲醇提取物和杜仲苷 B 则通过减少软骨损伤和维持基质完整性,进一步延缓骨关节炎进展^[31]。上述成分的协同

作用揭示了全杜仲胶囊通过多靶点机制治疗膝骨关节炎的科学依据。

综上所述,本研究系统整合了网络接近度分析、空间转录组学数据挖掘及体内实验验证,首次明确了全杜仲胶囊干预膝骨关节炎的关键作用靶位是受累关节软骨的表层和浅层区域,其主要通过抑制 TXNIP-NLRP3-BMP2-FN1-MMP2 信号轴的异常激活,缓解氧化应激-炎症反应-基质降解贯穿病理环节,从而保护关节软骨的结构和功能。相关研究结果将为全杜仲胶囊在膝骨关节炎个性化治疗中的应用提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1.
- [2] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745.
- [3] TANG X, WANG S, ZHAN S, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China Health and Retirement Longitudinal Study [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(3): 648.
- [4] LIU Y, XU T, MA Z, et al. Cartilage protective and anti-edema effects of JTF in osteoarthritis via inhibiting NCOA4-HMGB1-driven ferroptosis and aquaporin dysregulation [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155593.
- [5] KIM J R, YOO J J, KIM H A. Therapeutics in osteoarthritis based on an understanding of its molecular pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 27, 19(3): 674.
- [6] XIE J, WANG Y, LU L, et al. Cellular senescence in knee osteoarthritis: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Ageing Res Rev, 2021, 70: 101413.
- [7] GELBER A C. Knee osteoarthritis[J]. Ann Intern Med, 2024, 177(9): ITC129.
- [8] 江丽杰, 杨燕, 唐碧华, 等. 全杜仲胶囊降低轻度原发性高血压肾虚证患者血压的随机对照试验[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(4): 431.
- [9] 张桂霞, 宋昕, 郭六雷, 等. 全杜仲胶囊治疗新发轻度高血压的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(16): 54.
- [10] 刘东. 全杜仲胶囊联合针灸治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. 中国合理用药探索, 2018, 15(12): 5.
- [11] FAN Y, BIAN X, MENG X, et al. Unveiling inflammatory and prehypertrophic cell populations as key contributors to knee cartilage degeneration in osteoarthritis using multi-omics data integration[J]. Ann Rheum Dis, 2024, 83(7): 926.
- [12] 刘毓东, 徐腾腾, 马兆臣, 等. 从单细胞-空间异质性视角表征健脾通络方对膝骨关节炎的软骨保护作用[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(3): 741.
- [13] MORSELLI G D, DO VALLE Í, ZITNIK M, et al. Network medicine framework for identifying drug-repurposing opportunities for COVID-19[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(19): e2025581118.
- [14] 马兆臣, 张楚, 胥明珠, 等. 原发性高血压合并膝骨关节炎肝肾亏虚证大鼠模型建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(5): 652.
- [15] MA Z, CHEN W, LIU Y, et al. Artesunate sensitizes human hepatocellular carcinoma to sorafenib via exacerbating AFAP1L2-SRC-FUNDC1 axis-dependent mitophagy[J]. Autophagy, 2024, 20(3): 541.
- [16] ZHOU R, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 136.
- [17] SONG J, LI J, HOU F, et al. Mangiferin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated thioredoxin-interacting protein/NLRP3 inflammasome activation with regulation of AMPK in endothelial cells[J]. Metabolism, 2015, 64(3): 428.
- [18] LIAO C, WANG S, ZHU S, et al. Advanced oxidation protein products increase TNF- α and IL-1 β expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101306.
- [19] MADEJ W, VAN CAAM A, DAVIDSON E N, et al. Ageing is associated with reduction of mechanically-induced activation of Smad2/3P signaling in articular cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(1): 146.
- [20] KUMAR S, ADJEI I M, BROWN S B, et al. Manganese dioxide nanoparticles protect cartilage from inflammation-induced oxidative stress[J]. Biomaterials, 2019, 224: 119467.
- [21] 胥明珠, 李怀平, 马兆臣, 等. “药效-靶标-成分-药动”多维关联模式下的如意珍宝丸药效物质基础辨识[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(24): 68.
- [22] CHEN J, LARSSON L, SWARBRICK A, et al. Spatial landscapes of cancers: insights and opportunities[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21(9): 660.
- [23] BENJAMIN K, BHANDARI A, KEPPEL J D, et al. Multiscale topology classifies cells in subcellular spatial transcriptomics[J]. Nature, 2024, 630(8018): 943.
- [24] ANSARI M Y, AHMAD N, HAQQI T M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: role of polyphenols [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110452.
- [25] ZADA S, PHAM T M, HWANG J S, et al. Chlorogenic acid protects human chondrocyte C28/I2 cells from oxidative stress-induced cell death through activation of autophagy[J]. Life Sci, 2021, 285: 119968.
- [26] 楼红侃, 许旻鸣, 方剑利, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨松脂醇-二葡萄糖苷对兔膝骨性关节炎软骨细胞保护机制的研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 190.
- [27] LIU C C, ZHANG Y, DAI B L, et al. Chlorogenic acid prevents inflammatory responses in IL-1 β -stimulated human SW-1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1369.
- [28] CHEN W P, TANG J L, BAO J P, et al. Anti-arthritis effects of chlorogenic acid in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(1): 23.
- [29] 杨德猛, 王长庚, 胡芯源, 等. 杜仲醇提取物对骨关节炎模型大鼠关节软骨的保护[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3756.
- [30] 吴素雯. 桃叶珊瑚苷调控骨关节炎软骨细胞 ECM 代谢的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [31] 任虹, 刘娟, 于桂泳, 等. 杜仲苷对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(11): 1144.

[责任编辑 马超一]