

[19]

Wang L F, Shi Z X, Wang X Y, *et al.* Protective effects of bovine milk exosomes against oxidative stress in IEC-6 cells[J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60(1): 317-327.

[20]

Afshari-Kaveh M, Abbasalipourkabir R, Nourian A, *et al.* The protective effects of vitamins A and E on titanium dioxide nanoparticles (nTiO2) -induced oxidative stress in the spleen tissues of male wistar rats[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(10): 3367-3687.

[21]

田婵婵, 王宏志, 马欣悦. 人参皂苷 Rg1 对大鼠阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征引起的肺损伤及 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J]. *实用药物与临床*, 2021, 24(4): 294-299.

[22]

Ulasov A V, Rosenkranz A A, Georgiev G P, *et al.* Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation[J]. *Life Sci*, 2022, 291: 120111.

[23]

Uddin M J, Kim E H, Hannan M A, *et al.* Pharmacotherapy against oxidative stress in chronic kidney disease: promising small molecule natural products targeting Nrf2-HO-1 signaling[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 258-270.

[24]

Deng S X, Liu S P, Jin P, *et al.* Albumin reduces oxidative stress and neuronal apoptosis *via* the ERK/Nrf2/HO-1 pathway after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8891373.

姜黄素对 LPS 诱导小鼠滑膜成纤维细胞炎症和纤维化的影响

宋亚丽, 秦凯丽*, 公慧萍, 来晓炜, 原子琦, 田吉梅, 宋秀珍
(长治医学院附属和平医院, 山西 长治 046000)

摘要: **目的** 探讨姜黄素对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠滑膜成纤维细胞炎症和纤维化的影响。**方法** 0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用小鼠滑膜成纤维细胞 24 h, MTT 法检测细胞增殖情况, 筛选最佳作用浓度。将细胞分为对照组、模型组 (10 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、姜黄素组 (20 $\mu\text{mol/L}$)、SB-431542 组 (100 $\mu\text{mol/L}$) 和姜黄素+SB-431542 组 (20 $\mu\text{mol/L}$ +100 $\mu\text{mol/L}$)。ELISA 法检测 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平, Western blot 法检测 COL1A1、TIMP1、TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组滑膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平, 以及 COL1A1、TIMP1、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 姜黄素组和 SB-431542 组滑膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平, 以及 COL1A1、TIMP1、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与 SB-431542 组比较, 姜黄素+SB-431542 组滑膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平, 以及 COL1A1、TIMP1、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 姜黄素通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路, 从而抑制 LPS 诱导小鼠滑膜成纤维细胞炎症和纤维化。**关键词:** 姜黄素; 滑膜成纤维细胞; 炎症; 纤维化; TGF- β 1/Smad 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)04-1356-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.04.048

骨关节炎是最常见的关节疾病, 主要表现为关节软骨退化及滑膜炎, 导致疼痛和残疾^[1]。滑膜成纤维细胞在骨关节炎的炎症和关节破坏中发挥重要作用, 主要通过分泌多种促炎介质及金属蛋白酶等, 促进细胞外基质降解, 进一步加剧骨关节炎进展^[2]。研究表明, 在骨关节炎的发展过程中滑膜会发生纤维化, 并在软骨破坏中起关键作用, 这也是导致关节僵硬及滑膜增生等常见症状的重要原因之一^[3-4], 因此, 减轻滑膜炎症及纤维化是治疗骨关节炎的有效途径。临床上治疗骨关节炎的常用药物是非甾体抗炎药, 然而长期使用可能会引起胃肠道和心血管不良反应, 因此寻找安全有效的药物尤为重要^[5]。姜黄素是姜黄的主要活性成分, 具有抗癌、抗炎、抗氧化等作用^[6], 可减轻骨关

节炎症症状, 延缓其进程, 在治疗骨关节炎方面具有巨大潜力^[7]。本研究通过体外实验观察姜黄素对 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞炎症及纤维化的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以期为其深入考察提供参考。

1 材料

小鼠滑膜成纤维细胞来源于青旗 (上海) 生物科技发展有限公司。

胎牛血清 (货号 SH30022.01B) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DMEM (货号 SH30022.01B) 购自美国 HyClone 公司; IL-1 β (货号 MU30369)、TNF- α (货号 MU30030)、IL-6 (货号 MU30044) ELISA 试剂盒, COL1A1 (货号 PAB45893)、TIMP1 (货号 PAB38546)、

收稿日期: 2023-02-09
基金项目: 长治医学院附属和平医院院级科研基金 (HPYJ201941, HPYJ202029)
作者简介: 宋亚丽 (1984—), 女, 硕士, 主治医师, 从事骨关节炎发病机制研究。E-mail: songyali1984@163.com
* 通信作者: 秦凯丽 (1990—), 女, 硕士, 主治医师, 从事骨关节炎发病机制研究。E-mail: caryqin1990@163.com

TGF-β1 (货号 PAB39276)、Smad2 (货号 PAB30712)、Smad3 (货号 PAB44700) 抗体均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;姜黄素 (货号 C110685, 纯度 99%)、LPS (货号 L118716) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;SB-431542 (TGF-β1 受体抑制剂, 货号 HY-10431) 购自上海皓元生物医药科技有限公司;MTT (货号 M1025)、RIPA (强) 组织细胞快速裂解液 (货号 R0010)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 PC0020) 均购自北京索莱宝科技有限公司;DMSO (货号 D2650) 购自美国 Sigma 公司;PVDF 转移膜 (货号 IPVH00010)、化学发光试剂 (货号 WBKLS0500) 均购自沃卡威 (北京) 生物技术有限公司;p-Smad2 (货号 ab188334)、p-Smad3 (货号 ab52903) 抗体均购自英国 Abcam 公司。

倒置荧光显微镜 (型号 DMIL LED) 购自德国 Leica 公司;酶标分析仪 (型号 AMR-100) 购自杭州奥盛仪器有限公司;电泳仪 (型号 mini protean 3 cell) 购自美国 Bio-Rad 公司;全自动化学发光分析仪 (型号 Tanon-5200) 购自上海天能生命科学有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养及造模 小鼠滑膜成纤维细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 收集细胞, 分为对照组和模型组, 对照组细胞正常培养, 模型组细胞加入 10 μg/mL LPS, 均置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h^[8], ELISA 法检测细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平, 进行细胞模型鉴定。

2.2 MTT 法检测细胞增殖 收集细胞, 调整密度至 3×10³/孔, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 培养过夜, 使细胞贴壁, 分别加入含 0、5、10、20、40、80、160 μmol/L 姜黄素的完全培养基, 继续培养 24 h^[9], 取出细胞培养板, 每孔加入 10 μL MTT, 继续培养 4 h, 吸取上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 490 nm 波长处检测光密度, 计算细胞增殖抑制率, 筛选姜黄素最佳作用浓度^[10]。

2.3 细胞分组与处理 将造模成功的细胞分为模型组、姜黄素组 (20 μmol/L)、SB-431542 组 (100 μmol/L)、姜黄素+SB-431542 组 (20 μmol/L 姜黄素+100 μmol/L SB-431542), 并设置对照组, 加入相应药物处理 24 h。

2.4 ELISA 法检测细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平 取对数生长期细胞, 调整密度至 1.0×10⁶/孔, 接种于 6 孔板中, 培养过夜, 融合度达到 70% 时收集上清, 按照相关试剂盒说明书操作, 检测 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平。

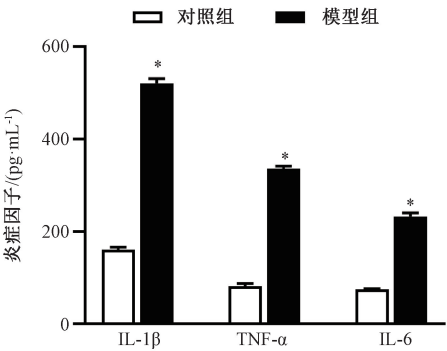
2.5 Western blot 法检测 COL1A1、TIMP1、TGF-β1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3 蛋白表达 取对数生长期细胞, 调整密度至 1.0×10⁶/孔, 接种于 6 孔板中, 培养过夜, 融合度达到 70% 时加入 RIPA 裂解液, 离心后取上清, BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测浓度, 蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉在 4 ℃ 下封闭过夜, 加入 COL1A1、TIMP1、TGF-β1、Smad2、p-Smad2、

Smad3、p-Smad3、GAPDH 一抗 (1:1 000), 在 4 ℃ 下孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (1:20 000), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, ECL 试剂显色, 全自动化学发光分析仪和 TANON GIS 软件采集图像。以 GAPDH 为内参, 计算蛋白条带灰度值。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

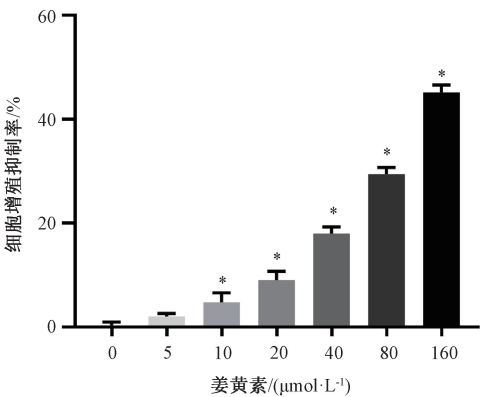
3.1 细胞模型鉴定 如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平升高 ($P<0.05$), 表明模型构建成功。



注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 细胞模型鉴定结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 姜黄素对滑膜成纤维细胞增殖的影响 如图 2 所示, 与 0 μmol/L 姜黄素组比较, 10、20、40、80、160 μmol/L 姜黄素组细胞增殖抑制率升高 ($P<0.05$)。参考文献 [10] 报道, 选用细胞增殖抑制率小于 15% 的 20 μmol/L 进行后续实验。

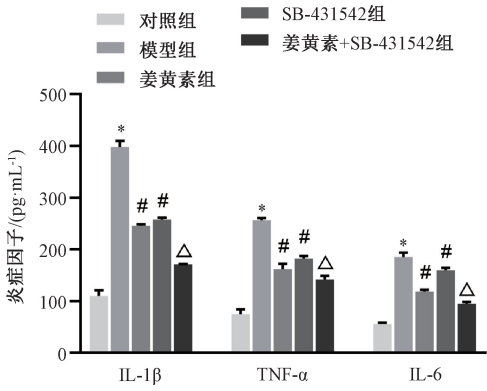


注: 与 0 μmol/L 姜黄素组比较, * $P<0.05$ 。

图 2 姜黄素对滑膜成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 姜黄素对滑膜成纤维细胞 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 姜黄素组和 SB-431542 组细胞上清液 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平降低 ($P<0.05$); 与 SB-431542 组比较, 姜黄素+SB-

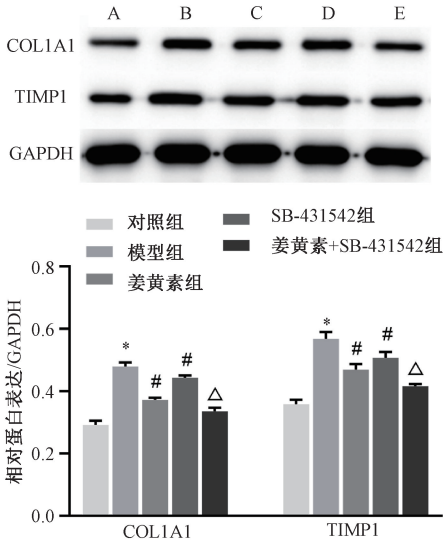
431542 组细胞上清液 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.05$)。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与 SB-431542 组比较， $\Delta P<0.05$ 。

图 3 姜黄素对滑膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 姜黄素对滑膜成纤维细胞 COL1A1、TIMP1 蛋白表达的影响 如图 4 所示，与对照组比较，模型组细胞 COL1A1、TIMP1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，姜黄素组和 SB-431542 组细胞 COL1A1、TIMP1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与 SB-431542 组比较，姜黄素+SB-431542 组细胞 COL1A1、TIMP1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

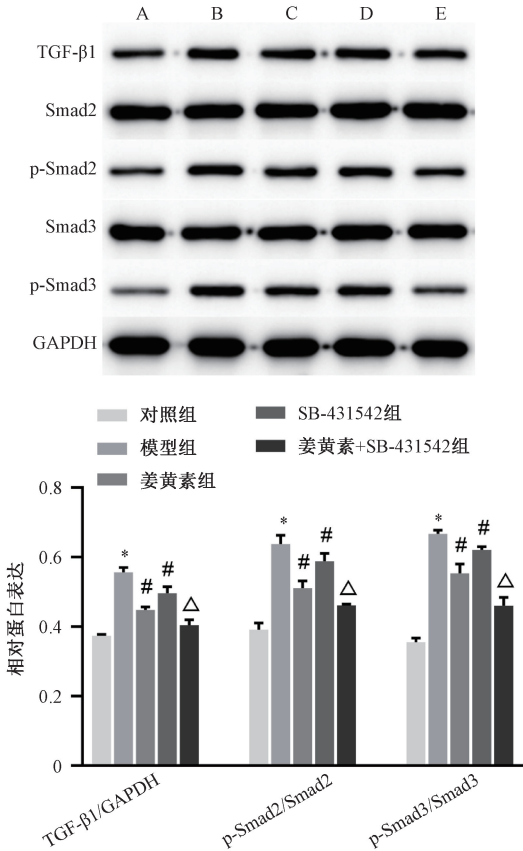


注：A~E 分别为对照组、模型组、姜黄素组、SB-431542 组、姜黄素+SB-431542 组。与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与 SB-431542 组比较， $\Delta P<0.05$ 。

图 4 姜黄素对滑膜成纤维细胞 COL1A1、TIMP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 姜黄素对滑膜成纤维细胞 TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3 蛋白表达的影响 如图 5 所示，与对照组比较，模型组细胞 TGF- β 1 蛋白表达及 p-Smad/Smad2、p-Smad3/Smad3 升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，姜黄素组和 SB-431542 组细胞 TGF- β 1 蛋白表达及 p-Smad/Smad2、p-

Smad3/Smad3 降低 ($P<0.05$)；与 SB-431542 组比较，姜黄素+SB-431542 组细胞 TGF- β 1 蛋白表达及 p-Smad/Smad2、p-Smad3/Smad3 降低 ($P<0.05$)。



注：A~E 分别为对照组、模型组、姜黄素组、SB-431542 组、姜黄素+SB-431542 组。与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与 SB-431542 组比较， $\Delta P<0.05$ 。

图 5 姜黄素对滑膜成纤维细胞 TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

滑膜炎存在于骨关节炎的所有阶段，在病理条件下滑膜成纤维细胞可被活化，产生与骨关节炎相关的促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-15、IL-17、IL-21，以及基质金属蛋白酶 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 等，促进骨关节炎发生发展^[11-13]。Baek 等^[14]研究了一种新型多蛋白激酶抑制剂 KMU-1170 在人骨关节炎滑膜成纤维细胞中的炎症抑制信号转导机制，发现 KMU-1170 减弱滑膜成纤维细胞中 LPS 诱导的炎症反应，表现为抑制 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 和蛋白表达。Dai 等^[15]研究结果显示，姜黄素可抑制类风湿关节炎大鼠血清和滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-3 水平，抑制滑膜增生。本研究发现，姜黄素可抑制 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平，表明姜黄素可减轻 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞炎症反应。

与骨关节炎相关的纤维化包括软骨修复或骨关节炎进

展过程中的软骨纤维化和骨关节炎发病及进展过程中的滑膜纤维化，滑膜纤维化的特点是成纤维细胞过度增至以及胶原合成与分解之间失衡^[3,16]。研究表明，COL1A1 和 TIMP1 在骨关节炎相关纤维化中上调，通常认为是纤维化的标志物^[17]。本研究发现，姜黄素可降低 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞中 COL1A1、TIMP1 蛋白表达，表明姜黄素可抑制 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞纤维化。

TGF-β 被认为是纤维化的主要调节因子，可激活滑膜成纤维细胞，促进细胞外基质基因表达，抑制其降解^[18]。Remst 等^[19]研究表明，在 TGF-β 诱导的骨关节炎成纤维细胞中 COL1A1 和 TIMP1 表达上调。Deng 等^[20]研究了氯沙坦在骨关节炎中调节 PPARγ 的机制，发现氯沙坦通过上调 PPARγ，抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号通路，从而减少 IL-1β、TNF-α、IL-6、COX-2 和 MMP-13 等的表达缓解骨关节炎进程。本研究发现，姜黄素可抑制 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞中 TGF-β1 蛋白表达，下调 p-Smad/Smad2 和 p-Smad3/Smad3，表明姜黄素对 LPS 诱导的滑膜成纤维细胞炎症反应和纤维化的影响可能与 TGF-β1/Smad 信号通路有关。

综上所述，姜黄素通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路从而抑制 LPS 诱导的小鼠滑膜成纤维细胞炎症和纤维化。这为姜黄素治疗骨关节炎的临床应用提供了一定的理论基础。

参考文献:

[1] 赵洪升, 顾玲丽, 肖勇洪. 中医药外治法治疗骨关节炎研究进展[J]. 世界中医药, 2023, 18(13): 1923-1927.

[2] Abramoff B, Caldera F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.

[3] Rim Y A, Ju J H. The role of fibrosis in osteoarthritis progression[J]. *Life (Basel)*, 2020, 11(1): 3.

[4] Zhang L, Xing R L, Huang Z Q, *et al.* Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 684389.

[5] Nakagawa Y, Mukai S, Yamada S, *et al.* The efficacy and safety of highly-bioavailable curcumin for treating knee osteoarthritis: a 6-month open-labeled prospective study [J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2020, 13: 1179544120948471.

[6] Kotha R R, Luthria D L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects [J]. *Molecules*, 2019, 24(16): 2930.

[7] Peng Y, Ao M Y, Dong B H, *et al.* Anti-inflammatory effects of curcumin in the inflammatory diseases: status, limitations and countermeasures [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4503-4525.

[8] Li X C, Mei W, Huang Z Q, *et al.* Casticin suppresses monoiodoacetic acid-induced knee osteoarthritis through inhibiting HIF-1α/NLRP3 inflammasome signaling [J]. *Int*

Immunopharmacol, 2020, 86: 106745.

[9] Moon D O, Kim M O, Choi Y H, *et al.* Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1beta-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(5): 605-610.

[10] 彭梦媛, 邱峰, 黄丹, 等. 姜黄素对胰腺癌 SW1990 细胞耐吉西他滨的逆转作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(9): 1192-1197.

[11] Bhattaram P, Jones K. Regulation of fibroblast-like synoviocyte transformation by transcription factors in arthritic diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 145-151.

[12] Han D F, Fang Y L, Tan X W, *et al.* The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in osteoarthritis: An update[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9518-9532.

[13] Wang T T, He C Q. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38-50.

[14] Baek H S, Hong V S, Kim S H, *et al.* KMU-1170, a novel multi-protein kinase inhibitor, suppresses inflammatory signal transduction in THP-1 cells and human osteoarthritic fibroblast-like synoviocytes by suppressing activation of NF-κB and NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1194.

[15] Dai Q D, Zhou D, Xu L P, *et al.* Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4095-4105.

[16] Li D, Wang H, He J Y, *et al.* Inflammatory and fibrosis infiltration in synovium associated with the progression in developmental dysplasia of the hip[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2808-2816.

[17] Remst D F, Blaney Davidson E N, Vitters E L, *et al.* Osteoarthritis-related fibrosis is associated with both elevated pyridinoline cross-link formation and lysyl hydroxylase 2b expression [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(1): 157-164.

[18] Zhang L, Zhang L, Huang Z Q, *et al.* Increased HIF-1α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synoviocyte pyroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6326517.

[19] Remst D F G, Blom A B, Vitters E L, *et al.* Gene expression analysis of murine and human osteoarthritis synovium reveals elevation of transforming growth factor β-responsive genes in osteoarthritis-related fibrosis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(3): 647-656.

[20] Deng Z H, Chen F, Liu Y W, *et al.* Losartan protects against osteoarthritis by repressing the TGF-β1 signaling pathway via upregulation of PPARγ [J]. *J Orthop Translat*, 2021, 29: 30-41.