



盐酸青藤碱诱导黏连性膝关节强直家兔成纤维细胞凋亡的机制研究*

侯新聚¹⁾ 雷洪峰¹⁾ 陈勇¹⁾ 黎笑希²⁾ 孙敬宁²⁾ 刘佳铭³⁾ 马红梅^{1)**}

(¹⁾ 南昌市洪都中医院, 南昌 330008; (²⁾ 广州中医药大学第四临床医学院, 广州 510006;

(³⁾ 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006)

摘要 目的 观察盐酸青藤碱对膝关节黏连强直的家兔成纤维细胞增殖和相关基因表达的影响, 并进一步尝试探讨其对抗膝关节黏连强直的作用机制。方法 以体外培养法培养成纤维细胞, 并设对照组、盐酸青藤碱低中高浓度实验组。CCK-8法检测成纤维细胞增殖的情况; 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测经过盐酸青藤碱处理后, 成纤维细胞相关基因 mRNA 表达的改变, 用 ELISA 法检测药物的作用对血清中炎症因子等水平的影响, 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白质的表达。结果 盐酸青藤碱能降低成纤维细胞存活率, 且随浓度升高存活率逐渐降低。盐酸青藤碱中各个组的效果均十分明显 ($P<0.05$)。在相关基因的 mRNA 表达层面, 与对照组比较, 盐酸青藤碱各组炎症因子均显著下调 ($P<0.05$), 凋亡蛋白的表达量显著上升、Bcl-2 的 mRNA 表达量下降 ($P<0.05$), 而 PI3K/mTOR/AKT3 信号通路分子的 mRNA 表达量均下降 ($P<0.05$)。在蛋白质表达层面, 与对照组相比较, 中、高剂量盐酸青藤碱组血清中炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TGF- β 的水平均明显下调 ($P<0.05$), 凋亡蛋白 cleaved-PARP、cleaved caspase-3/7 及 Bax 的表达量均上调, 并且与给药剂量成正相关, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2、PI3K/AKT3/mTOR 信号通路的表达量则与给药剂量成负相关。盐酸青藤碱对家兔膝关节成纤维细胞的存活表现为显著的抑制作用, 作用机制或与下调炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达, 并促进凋亡蛋白 cleaved-PARP、cleaved caspase-3/7 及 Bax 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达, 抑制其下游 PI3K/AKT3/mTOR 信号通路的基因表达有关。结论 盐酸青藤碱可抑制黏连性膝关节强直家兔膝关节成纤维细胞的炎症反应和加速成纤维细胞的凋亡, 或可通过该机制为改善和治疗黏连性膝关节强直提供新的方法。

关键词 盐酸青藤碱, 黏连性膝关节强直, 家兔, 成纤维细胞

中图分类号 Q5, R36, R68

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0188

黏连性膝关节强直是膝关节和周围组织在创伤后或者术后或因功能锻炼的缺乏、或进行了不专业的功能锻炼、或因制动时间过长以及不正确的内固定等因素造成的严重并发症, 其发病率可达 3%~7%^[1-2]。若治疗不恰当, 致残率可达 10% 左右, 作为致残率较高的关节骨损伤, 目前为止在临床上发病率仍居高不下, 归于临床多发病的范畴, 损伤严重的患者预后差, 对后续的生活质量产生不良影响, 给家庭以及社会带来经济负担和诸多压力^[3]。截至目前, 保守治疗还没有发现针对此疾病行之有效的的方式方法, 主要以手术松解为主, 这往往导致术后患者的力量下降或者进一步的黏连, 具有很高的致残率^[4-5], 故而寻找一种简便经济的治疗方法

已为该方向的燃眉之急。

青藤碱的临床应用最早能够追溯到宋代的医籍, 记载为: 医治风湿麻痹、伤口脓肿等^[6]。其现代用药多采取其盐酸盐的形式, 临床中盐酸青藤碱多用于进行止痛消炎、抗血管生成、抗组胺等^[7]。盐酸青藤碱作为传统医学领域的实用药物已在临床中被使用多年, 但多应用于关节炎、肿瘤以及部分自身免疫病的治疗, 对于膝关节黏连研究

* 江西省卫生健康委科技计划 (202140175) 和江西省中医药管理局科技计划 (2021A196) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13755677762, E-mail: 94043722@qq.com

收稿日期: 2023-05-13, 接受日期: 2023-10-12

尚少^[8-11]。

本研究拟建立膝关节黏连家兔模型，治疗性给予盐酸青藤碱模拟临床治疗规律，从关节成纤维细胞的炎症因子、凋亡蛋白、促进成纤维细胞生成的信号通路等角度探讨其对抗膝关节黏连的机制，通过观察该药物对黏连性膝关节强直家兔的成纤维细胞影响，为黏连性膝关节强直治疗方案提供新的思路，探讨临床应用盐酸青藤碱治疗黏连性膝关节强直的理论依据。

1 实验方法

1.1 实验动物

实验各项操作中，严格按照中国科技部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》进行。获南昌市洪都中医院医学伦理委员会审查批准(批件号: KYKS-2021097)。选取体重2.2~3 kg的成年雄性新西兰家兔，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 药物及试剂

盐酸青藤碱为湖南正清制药集团股份有限公司生产，纯度>98%；地塞米松（批号：D1756）、大肠杆菌内毒素（LPS，批号：L2880），美国Sigma公司；鸡Ⅱ型胶原（CII，批号：20012）；肿瘤坏死因子β（TGF-β，批号：227846-010）、白介素-6（IL-6、批号：234277-007）、酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒，购于美国Invitrogen公司。胎牛血清、DMEM高糖培养基、0.25%胰酶（Gibco公司，批号分别为2260087、8120321、2186974）、PBS（普诺赛公司，批号：WH052E101）、青链霉素（Hyclone公司，批号：J210011）、CCK-8（Solarbio公司，批号：702H011）、碘化丙啶（propidium iodide, PI）（西格玛公司，批号：81845）、RNA酶（西格玛公司，批号：MB3087）、EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix（TransGen公司，批号：P20329）、琼脂糖（西班牙琼脂糖，批号：OZT100）、BAC蛋白质定量试剂盒（Solarbio公司，批号：PC0020）、ECL发光液（Merck Millinore公司，批号：WBKLS0100）、PI3K kinase p110a（C73F8）Rabbit mAb、AKT3（E1Z3W Rabbit mAb、mTOR（7C10）Rabbit mAb、GAPDH兔多克隆抗体（Cell Signaling Technology公司，批号分别为4249T、14982S、2983T、

5174）。实时荧光定量聚合酶链反应（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）所用引物由金唯智生物科技有限公司（苏州）合成（表1）。

Table 1 RT-qPCR sequencing primer

Gene name	Primer (5'→3')
GAPDH	Forward: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	Reverse: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
IL-6	Forward: CCTGAACCTTCCAAAGATGGC
	Reverse: CGTTCGCCACCGTATAGTTGAT
IL-8	Forward: TCCTGATTCTGCAGCTTGTGTG
	Reverse: AATTCTGTGTTGGCGCAGTGTGG
IL-1β	Forward: ACCAAACCTCTTCGAGGCAC
	Reverse: AGCCATCATTTCACTGGCGA
TGF-β	Forward: AAGGACCTCGGCTGGAAGTG
	Reverse: CCGGGTTATGCTGGTTGTA
Bax	Forward: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG
	Reverse: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
Bcl-2	Forward: GGTGGGGTCATGTGTGTGG
	Reverse: CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC
PI3K	Forward: AGATGAGATGCTGGTTGTGCTTCC
	Reverse: CTCCACCTCTGTCTAGTTGCTCTTG
AKT3	Forward: GGGCGAGCTGTTTTTCCAT
	Reverse: CGGTACACAATCTTTCGGAAT
mTOR	Forward: TCCGAGAGATGAGTCAAGAGG
	Reverse: CACCTTCCACTCCTATGAGGC

1.3 主要仪器

Heraguard ECO超净工作台、Forma系列二氧化碳恒温细胞培养箱、Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo公司），PRISM 7500 Sequence Detection System型RT-qPCR仪（美国ABI公司），BioPhotometer-plus型核酸蛋白测定仪（德国Eppendorf公司），BDY-A恒温摇床振荡器、HWS-5A型恒温水浴锅（上海百典仪器设备有限公司），VE-180型湿转膜仪、EPS-200型电泳仪（Tanon公司）。

1.4 膝关节黏连家兔模型的建立

造模方法参照文献[12]并改进。在造模手术开始前约15 min左右，以肌肉注射的方式给与家兔以2.5 mg/kg的安定。然后实施1 ml、1%的盐酸利多卡因家兔术区部位的注射。完成局麻后，将家兔右侧膝内侧纵向切开约3 cm长，将关节暴露出来，随后将家兔的髌骨向外翻动，用合适大小的小刀轻轻搔刮髌上囊的滑膜，形成一个1 cm×1 cm左

右的创伤区域, 完成操作后进行髌骨的位置复原和皮肤肌肉的缝合。然后将膝关节的屈曲角度设为约30°, 将踝关节的背屈角度设置为约50°, 用石膏对其后肢进行管型的固定。术后以肌肉注射的方式给药庆大霉素, 2次/d, 2×10^4 U/次, 共计注射3 d即可。为家兔连续固定管型石膏30 d, 到期即拆除石膏, 造模即可完成。

1.5 成纤维细胞的分离与培养

取家兔术区的瘢痕组织, 漂洗后用眼科剪剪碎, 倒入0.25%的II型胶原酶对其进行消化, 将上清液部分转移到无菌离心管, 最后在离心管中加入2 ml胎牛血清, 重复上述消化步骤4次, 将所有的上清液收集并用大于100目的金属筛过滤。将过筛后的上清液移入离心管, 10 min $\times$ 800 r/min离心, 移去上清液, 以约 2×10^6 /ml的密度将成纤维细胞加入含20%胎牛血清的DMEM培养液中, 放到恒温二氧化碳培养箱(5% CO₂, 37°C)中进行初代培养。待细胞的融合率达到80%~90%, 方可进行接下来的接种操作。接下来的操作为PBS溶液冲洗3遍, 而后用胰蛋白酶消化后传代培养。

1.6 CCK-8法检测盐酸青藤碱对家兔成纤维细胞增殖的影响

取培养到第4~5代的家兔成纤维细胞, 接种于96孔板中, 按 1×10^5 /ml的细胞密度进行接种, 100 μ l/孔, 并将其分成对照组、地塞米松阳性对照组(0.5 μ mol/L)、盐酸青藤碱各浓度组(6.25、12.5、25 μ mol/L)。细胞预培养24 h后以PBS溶液冲洗, 弃废液, 加入完全培养基。通过完全培养基进行稀释, 地塞米松阳性对照组和盐酸青藤碱各浓度组中加入相应浓度的药液。48 h后, 吸取、弃去上清液, 再加入10 μ l CCK-8溶液于待测孔中。孵育2 h后, 通过测定待测液体450 nm波长处的吸光度(A)值来检测家兔成纤维细胞增殖情况。细胞抑制率(IR) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 $\times 100\%$, 使用Logit法计算药物的半数抑制浓度(IC), 以观察盐酸青藤碱对成纤维细胞增殖的影响。

1.7 RT-qPCR法检测盐酸青藤碱对家兔成纤维细胞有关基因mRNA表达的影响

家兔成纤维细胞培养、给药的步骤同1.6。收集成纤维细胞后, 按照Trizol试剂盒操作说明书提取家兔总RNA, 用DNA酶1(Dnase 1)法去除基因

组DNA, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值, A_{260}/A_{280} 接近2.0提示提取的RNA较纯。并通过琼脂糖凝胶电泳法检测总RNA 5S、18S、28S三条带的完整程度。然后按照RT-qPCR试剂盒说明书的指示, 从每个样本中取出1 μ l RNA, 进行逆转录合成cDNA, 并将得到的产物作为模板, 检测操作均在20 μ l体系下进行。目的片段: 凋亡蛋白基因(Bax、cleaved-PARP)、抗凋亡蛋白基因(Bcl-2)、PI3K/AKT3/mTOR信号通路、炎症因子(IL-6、IL-8、IL-1 β 、TGF- β)。内参片段: GAPDH。通过RT-qPCR仪自带功能观察各片段扩增曲线, 计算样本所得 $\Delta\Delta C_t$ 值, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行各样本之间的比较。

1.8 ELISA法检测盐酸青藤碱对家兔血清中炎症因子的影响

收集成纤维细胞的上清液, 室温下静置1 h后, 离心半径 $r=16$ cm, 3 000 r/min离心15 min。在测试板条上的样品孔位加入待测样品100 μ l/孔, 在标准孔位加入标准品100 μ l/孔, 同时设置对照孔位。最后采用ELISA法, 严格按照说明书操作, 检测家兔血清中细胞因子IL-6、IL-8、IL-1 β 和TGF- β 的水平。

1.9 蛋白质印迹(Western blot)法检测盐酸青藤碱对家兔相关蛋白质表达的影响

细胞培养、给药同1.6。加入药品培养48 h后, 弃上清液, 收集成纤维细胞提取总蛋白, 并通过BCA法测定蛋白质浓度。取总蛋白(20 μ l/孔), 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 结束后转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉常温封闭2 h, 加入凋亡蛋白(Bax、cleaved-PARP)、抗凋亡蛋白(Bcl-2)、PI3K/AKT3/mTOR信号通路的蛋白质一抗(1:1 000)在常温摇床中振荡孵育2 h; 4°C孵育过夜后洗膜, 加入二抗(1:5 000)在常温条件下振荡孵育1 h, 再次洗膜, 显影定影, 扫描, 通过凝胶图像处理系统进行分析。目标蛋白的相对表达量用上述得到的蛋白质吸光度值的比值表示。实验重复3次, 确保实验可靠性。

1.10 数据分析

使用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。数据表示为均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。多组间比较采用单因素方差分析, 采用最小显著差异法进行进一步两两比较的差异分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 盐酸青藤碱对家兔关节成纤维细胞存活率的影响

CCK-8法发现,家兔关节的成纤维细胞存活率与盐酸青藤碱浓度呈反相关(图1)。随盐酸青藤碱浓度增加,细胞存活率逐渐降低($P<0.05$),阳性对照组降低更为明显($P<0.05$,图1)。

2.2 盐酸青藤碱对相关基因mRNA表达的影响

相较于对照组,盐酸青藤碱各剂量组炎症因子IL-6、IL-8、IL-1 β 、TGF- β mRNA表达均显著下调($P<0.05$),凋亡蛋白Bax、cleaved-PARP mRNA表达显著上调,抗凋亡蛋白Bcl-2的mRNA表达显著下调($P<0.05$),而PI3K/AKT3/mTOR信号通路mRNA表达均下调($P<0.05$,图2)。

2.3 盐酸青藤碱对家兔血清中炎症因子IL-6、IL-8、IL-1 β 、TGF- β 的影响

相较于对照组,盐酸青藤碱各剂量组及地塞米松组的血清IL-6、IL-1 β 的水平均明显降低($P<0.05$),IL-8的下降幅度较小,中剂量组才具有比

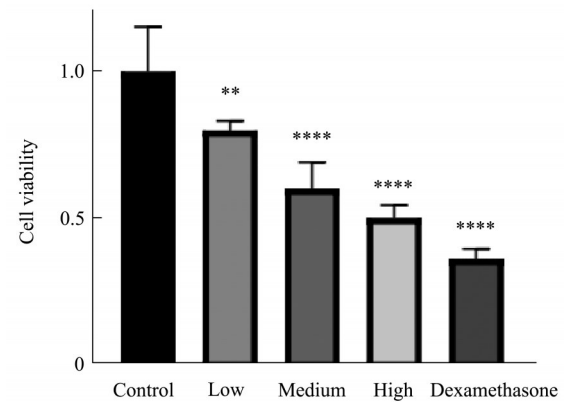


Fig. 1 Detection of the effect of sinomenine hydrochloride on the survival rate of fibroblasts by CCK-8 assay

The low, medium, high represents the group treated with 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$ sinomenine hydrochloride of fibroblasts respectively. ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, compared with the control group, $n=3$.

较明显的效果($P<0.05$),TGF- β 的下降幅度也不太明显。结果表明,盐酸青藤碱可明显降低家兔血清中炎症性细胞因子IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达水平(图3)。

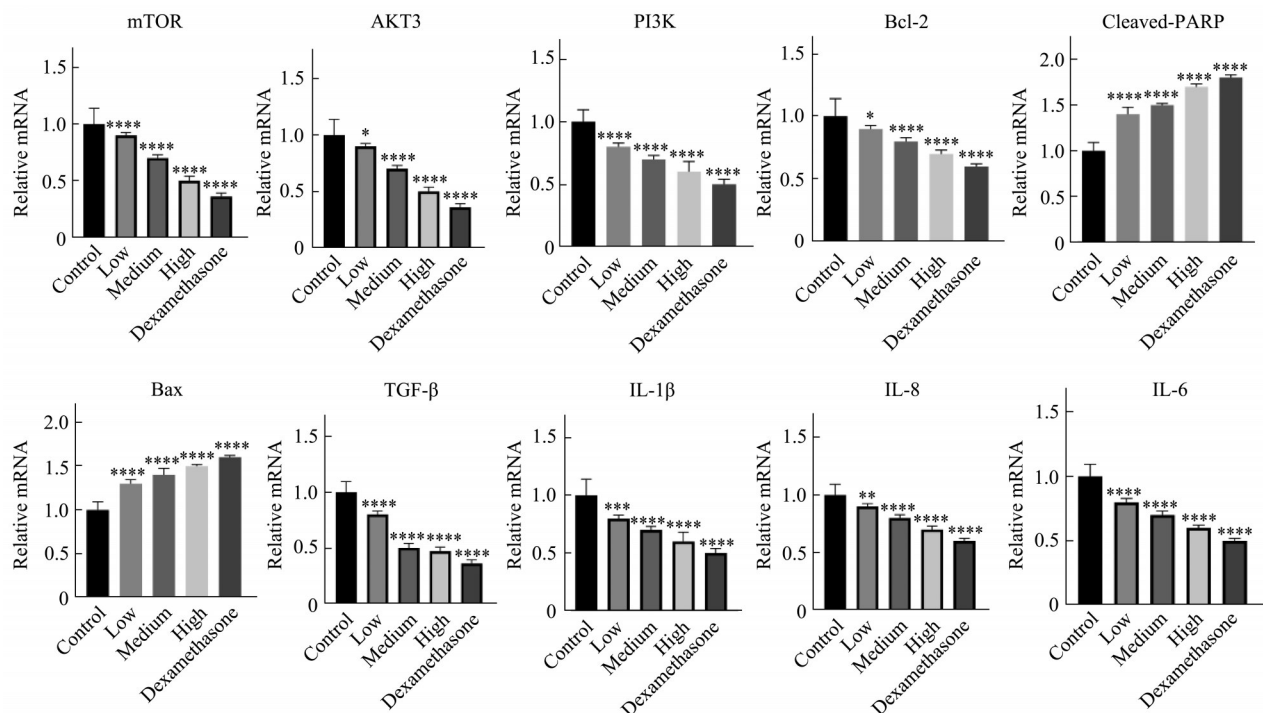


Fig. 2 The effect of sinomenine hydrochloride on expression of fibroblast related gene mRNA by RT-qPCR

The low, medium, high represents the group treated with 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$ sinomenine hydrochloride of fibroblasts respectively. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with the control group, $n=3$.

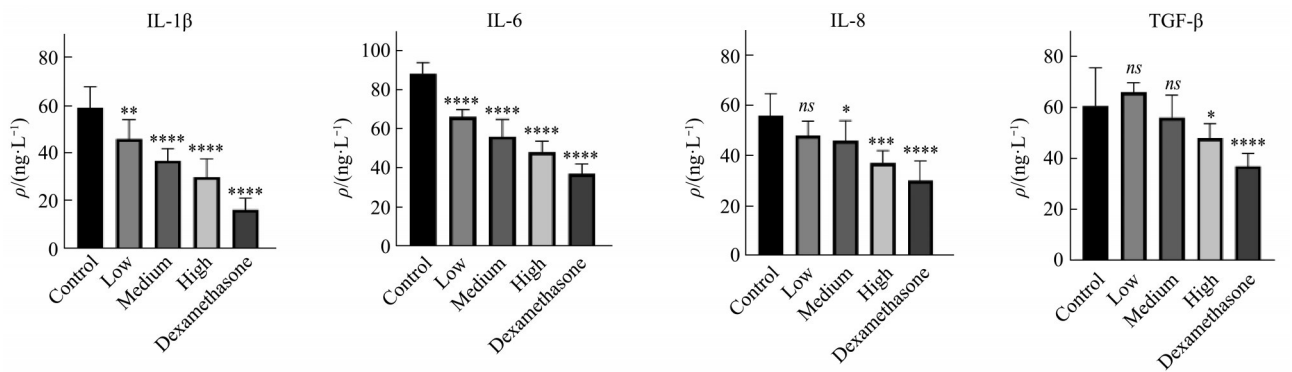


Fig. 3 The levels of IL-6, IL-8, IL-1 β and TGF- β measured by ELISA in fibroblasts treated by sinomenine hydrochloride with different concentration

The low, medium, high represents the group treated with 6.25, 12.5, 25 μ mol/L sinomenine hydrochloride of fibroblasts respectively. *ns*, no significance, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1, compared with the control group.

2.4 盐酸青藤碱对相关蛋白质表达的影响

Western blot检测结果表明, 盐酸青藤碱作用于成纤维细胞后, 凋亡蛋白 cleaved-PARP、cleaved caspase-3/7 及 Bax 的表达量增加, 并且随着剂量的增大而逐渐增加, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2、

PI3K/AKT3/mTOR 信号通路的表达量则逐渐下降, Bax/Bcl-2 的比值总体来说成上升的态势, 并且这种态势呈浓度依赖性。说明盐酸青藤碱可以诱导成纤维细胞的凋亡, 该作用效果稍弱于地塞米松 (图4、5)。

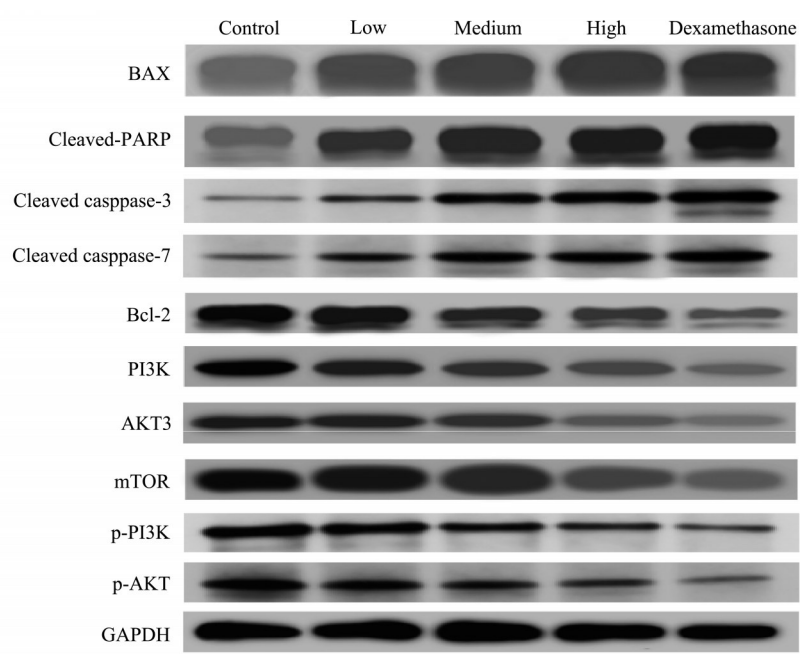


Fig. 4 The expression level of related proteins detected by Western blot in fibroblasts treated by sinomenine hydrochloride with different concentration

The low, medium, high represents the group treated with 6.25, 12.5, 25 μ mol/L sinomenine hydrochloride of fibroblasts respectively.

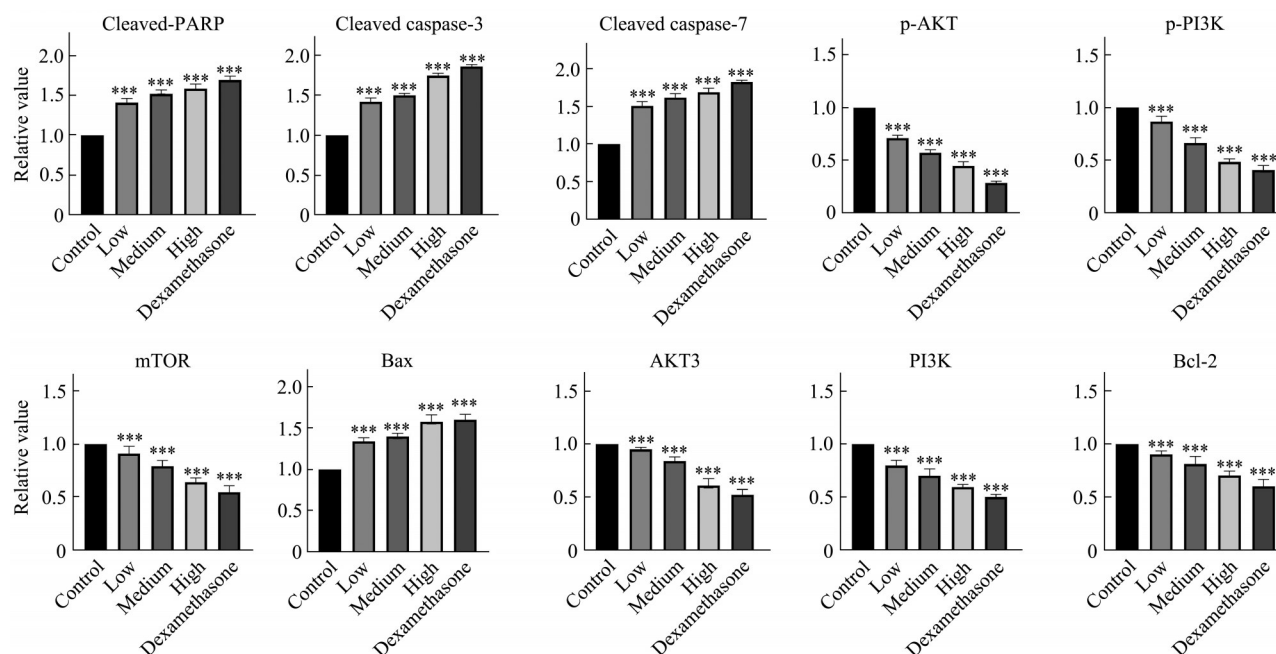


Fig. 5 The gray value analysis of Western blot detection of relevant apoptotic proteins in fibroblasts treated by sinomenine hydrochloride with different concentration

The low, medium, high represents the group treated with 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$ sinomenine hydrochloride of fibroblasts respectively. *** $P < 0.001$, compared with the control group.

3 讨 论

黏连性膝关节强直是膝关节手术或创伤后出现的严重并发症之一，据研究统计，膝关节置换术后发生黏连的概率高达28.2%^[13]。膝关节强直在传统医学中隶属于“膝痹”范畴，谓“膝为筋之会”，膝关节创伤或膝关节长时间制动等导致局部气滞血瘀，气血运行不畅，不能濡养筋脉肌肉而导致筋脉的拘急^[14]。以现代医学的角度分析，一旦损伤了膝关节内部周围组织，便会出现以关节中或者外黏连与拘急的情况，并且一般还会伴随炎症反应与中性粒细胞的浸润，从而引起纤维蛋白和炎性细胞的渗出，导致纤维蛋白堆积形成黏连基质，这些细胞外的黏连基质可以促进成纤维细胞的增殖，进一步形成基质沉积，最终导致瘢痕组织在膝关节周围黏附^[15-17]。基于此，本文从关节成纤维细胞中炎症因子、凋亡蛋白，以及促进成纤维细胞生成的信号通路蛋白的基因转录与表达角度入手，探讨盐酸青藤碱影响膝关节黏连的机制。

青藤碱是一种从青风藤根茎中提取出来的生物碱，中医认为青风藤具有祛风止痛、通络活血的作用，常常将青风藤水煎用于治疗疼痛和风湿性疾

病^[18-19]，这与所分析的膝关节黏连在传统医学上的病因具有对抗作用。盐酸青藤碱在临床治疗关节炎也有一定疗效，其能降低治疗的不良反应，配合其他疗法（如针灸）能够明显改善患者疼痛、关节僵硬及关节生理功能状况^[20-21]。基础医学研究表明，盐酸青藤碱可通过抑制细胞凋亡及多条炎症通路减轻骨关节炎软骨细胞损伤^[22-23]。盐酸青藤碱可通过抑制核转录因子（NF- κ B）的结合活性来达到降低TGF- β 、白介素等炎症因子mRNA的表达，从而抑制炎性细胞因子的恶性循环，抑制炎症过程中的血管和白细胞反应，降低膝关节黏连中的炎症指数，并且可以通过促进凋亡蛋白的表达而促进成纤维细胞凋亡发挥治疗膝关节黏连的作用^[18, 24-25]。本研究也能得出相同的结论，即盐酸青藤碱可以通过抑制炎症因子的形成和促进成纤维细胞凋亡从而有效预防和治疗黏连性膝关节强直。

为验证盐酸青藤碱在黏连性膝关节强直中的作用，本研究建立了膝关节黏连家兔模型，培养其成纤维细胞。通过CCK-8法检测发现，用药组成纤维细胞增殖情况明显低于未加干预的对照组；以ELISA、Western blot检测与黏连性膝关节强直致病的相关蛋白质表达水平，证明盐酸青藤碱可以降低

炎症因子以及促进成纤维细胞生成的信号通路蛋白的表达水平, 升高凋亡蛋白的表达水平; 以 RT-qPCR 法检测亦能发现经盐酸青藤碱处理后成纤维细胞相关基因 mRNA 表达水平与对照组的差异, 这些差异也指向对黏连性膝关节强直的对抗作用。

综上所述, 盐酸青藤碱明显降低家兔膝关节成纤维细胞存活率, 作用机制与下调炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达, 促进凋亡蛋白 cleaved-PARP、cleaved caspase-3/7 及 Bax 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达, 抑制其下游 PI3K/AKT3/mTOR 信号通路的基因表达有关。PI3K/AKT3/mTOR 中上游基因表达的 p-AKT 和 p-PI3K 蛋白水平已在本实验中被证明与盐酸青藤碱存在剂量依赖效应, 即盐酸青藤碱浓度越高, p-AKT 和 p-PI3K 表达越低, 但盐酸青藤碱对下游 mTOR 信号通路上相关蛋白质磷酸化水平表达的影响还需进一步研究。本文探讨了盐酸青藤碱缓解黏连性膝关节强直家兔的机制, 但临床上其是否是通过抑制成纤维细胞的凋亡, 降低炎症反应发挥对黏连性膝关节强直的治疗作用, 仍需要更多体外实验和临床证据验证。

4 结 论

本实验提取造模成功的黏连性膝关节强直家兔的关节成纤维细胞, 以不同浓度盐酸青藤碱处理, 证明了盐酸青藤碱能促进黏连性膝关节强直家兔的关节成纤维细胞的凋亡, 其机制可能与降低炎症因子表达和抑制 PI3K/AKT3/mTOR 信号通路有关, 为临床应用盐酸青藤碱治疗黏连性膝关节强直提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 李应福, 李宁, 谢兴文, 等. 中西医结合治疗膝关节粘连性强直的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2016, **22**(8): 1068-1072
Li Y F, Li N, Xie X W, *et al.* Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, **22**(8): 1068-1072
- [2] 何金国, 刘翔飞, 吴献民, 等. 针刀闭合松解术治疗粘连性膝关节强直 30 例疗效观察. 临床医药实践, 2013, **22**(12): 907-908
He J G, Liu X F, Wu X M, *et al.* Proceeding of Clinical Medicine, 2013, **22**(12): 907-908
- [3] Eakin C L. Knee arthrofibrosis: prevention and management of a potentially devastating condition. Phys Sportsmed, 2001, **29**(3): 31-42
- [4] 杨丽超. 持续性被动运动锻炼与护理康复用于促进膝关节损伤术后膝关节功能恢复中的效果. 实用临床护理学电子杂志, 2017, **2**(1): 165-169
Yang L C. Electronic Journal of Practical Clinical Nursing, 2017, **2**(1): 165-169
- [5] 郭坤. 早期 CPM 训练对膝关节周围骨折术后膝关节功能恢复的影响. 中外医学研究, 2016, **14**(13): 143-145
Guo K. Chinese and Foreign Medical Research, 2016, **14**(13): 143-145
- [6] 钱振昊. 基于 NF- κ B 及 PI3K 通路探究青藤碱对骨关节炎的作用和机制[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021
Qian Z H. The Effect and Mechanism of Sinomenine on Osteoarthritis Based on NF- κ B and PI3K Signaling[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2021
- [7] 葛红星, 李庆, 雷招宝. 正清风痛宁的不良反应与合理用药建议. 中成药, 2010, **32**(2): 287-289
Ge H X, Li Q, Lei Z B. Chinese Traditional Patent Medicine, 2010, **32**(2): 287-289
- [8] 杨艳, 韦炎龙, 方峰. 青藤碱的抗肿瘤活性研究进展. 中医临床研究, 2020, **12**(27): 112-114
Yang Y, Wei Y L, Fang F. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2020, **12**(27): 112-114
- [9] 尚昱志, 韦露秋, 陈秋霞, 等. 基于生物信息学的青藤碱治疗类风湿关节炎作用机制研究. 中国现代中药, 2020, **22**(10): 1668-1674
Shang Y Z, Wei L Q, Chen Q X, *et al.* Modern Chinese Medicine, 2020, **22**(10): 1668-1674
- [10] 滕健, 赵丽娟, 周思航, 等. 盐酸青藤碱治疗肾病的研究进展. 中医药导报, 2019, **25**(16): 120-124
Teng J, Zhao L J, Zhou S H, *et al.* Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, **25**(16): 120-124
- [11] Zhao X X, Peng C, Zhang H, *et al.* Sinomenium acutum: a review of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. Pharm Biol, 2012, **50**(8): 1053-1061
- [12] 黄崇博, 向孝兵, 叶勇光, 等. 舒筋活络方治疗创伤性膝关节粘连实验研究. 辽宁中医药大学学报, 2011, **13**(6): 29-33
Huang Q B, Xiang X B, Ye Y G, *et al.* Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011, **13**(6): 29-33
- [13] 章玲娟. 中药熏洗联合关节镜治疗术后膝关节强直的效果分析. 中国中医药科技, 2021, **28**(2): 314-316
Zhang L J. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2021, **28**(2): 314-316
- [14] Rutherford R W, Jennings J M, Levy D L, *et al.* Revision total knee arthroplasty for arthrofibrosis. J Arthroplasty, 2018, **33**(7S): S177-S181
- [15] Thompson R, Novikov D, Cizmici Z, *et al.* Arthrofibrosis after total knee arthroplasty: pathophysiology, diagnosis, and management. Orthop Clin North Am, 2019, **50**(3): 269-279
- [16] Chen H, Tao J, Wang J, *et al.* Artesunate prevents knee intraarticular adhesion via PRKR-like ER kinase (PERK) signal pathway. J Orthop Surg Res, 2019, **14**(1): 448
- [17] Mercer P F, Chambers R C. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. Biochim Biophys Acta, 2013, **1832**(7): 1018-1027
- [18] 李修政, 董家潇, 许晓东. 青藤碱抗炎镇痛作用及机制的研究新进展. 河北医药, 2020, **42**(20): 3148-3153

- Li X Z, Dong J X, Xu X D. Hebei Medical Journal, 2020, **42**(20): 3148-3153
- [19] 徐佳. 青风藤醇提物治疗类风湿性关节炎的疗效及其作用机制的探究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015
- Xu J. Acutum Alcohol Eluate in Treating Rheumatoid Arthritis And explore Its Mechanism of Action[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2015
- [20] 杨雪. 火针配合青藤碱穴位注射治疗中重度老年性膝关节炎临床研究. 中医临床研究, 2022, **14**(24): 111-113
- Yang X. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2022, **14**(24): 111-113
- [21] 冯立清, 冯国燕, 马智勇, 等. 盐酸青藤碱治疗双膝骨性关节炎 350 例. 甘肃医药, 2016, **35**(4): 288-290
- Feng L Q, Feng G Y, Ma Z Y, *et al.* Gansu Medical Journal, 2016, **35**(4): 288-290
- [22] 陈晨, 郑润泉, 李宗玉. 青藤碱调控 LncRNA BLACAT1 对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响. 中国免疫学杂志, 2022, **38**(17): 2069-2073
- Chen C, Zheng R Q, Li Z Y. Chinese Journal of Immunology, 2022, **38**(17): 2069-2073
- [23] 付美艳, 杨镜以, 温欣, 等. 青藤碱通过阻止 NF- κ B 通路激活抑制 IL-1 β 诱导的椎间盘终板软骨细胞炎症及退变. 中国老年学杂志, 2022, **42**(16): 4045-4049
- Fu M Y, Yang J Y, Wen X, *et al.* Chinese Journal of Gerontology, 2022, **42**(16): 4045-4049
- [24] Feng Z T, Yang T, Hou X Q, *et al.* Sinomenine mitigates collagen-induced arthritis mice by inhibiting angiogenesis. Biomed Pharmacother, 2019, **113**: 108759
- [25] 肖敬, 冯双燕, 李昆英, 等. 青藤碱对痛风性关节炎大鼠模型滑膜组织白细胞介素-6 影响实验研究. 辽宁中医药大学学报, 2018, **20**(12): 44-47
- Xiao J, Feng S Y, Li K Y, *et al.* Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018, **20**(12): 44-47

Study on The Mechanism of Sinomenine Hydrochloride Induced Fibroblast Apoptosis in Rabbits with Adhesive Knee Ankylosis*

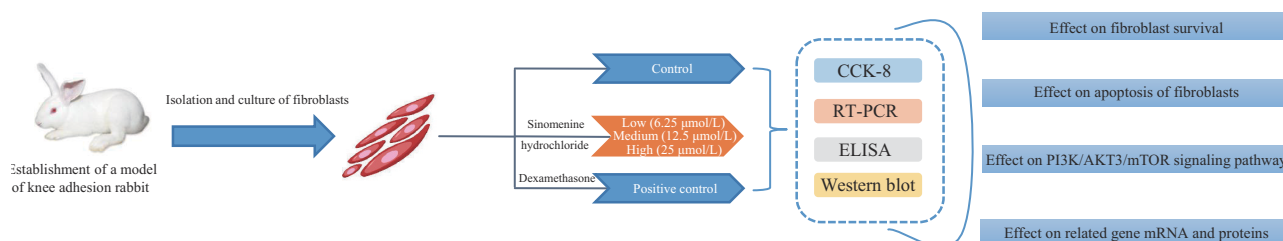
HOU Xin-Ju¹⁾, LEI Hong-Feng¹⁾, CHEN Yong¹⁾, LI Fu-Xi²⁾, SUN Jing-Ning²⁾,
LIU Jia-Ming³⁾, MA Hong-Mei^{1)**}

¹⁾Nanchang Hongdu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330008, China;

²⁾The Fourth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

³⁾Guangzhou University of Chinese Medicine, Second Clinical Medical College, Guangzhou 510006, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study aimed to observe the impact of sinomenine hydrochloride on the proliferation of fibroblasts and the mRNA expression of related genes in knee joint adhesion and contracture in rabbits. Additionally, we sought to explore its potential mechanisms in combating knee joint adhesion and contracture.

Methods Fibroblasts were cultured *in vitro*, and experimental groups with varying concentrations of sinomenine hydrochloride were established alongside a control group. Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay. Changes in the mRNA expression of fibroblast-related genes following sinomenine hydrochloride treatment were evaluated using RT-qPCR. The impact of the drug on serum levels of inflammatory cytokines was determined using the ELISA method, and the expression of related proteins was assessed using Western blot.

Results Sinomenine hydrochloride was found to inhibit fibroblast viability, with viability decreasing as the concentration of sinomenine hydrochloride increased. The effects of sinomenine hydrochloride in all experimental groups were highly significant ($P<0.05$). At the mRNA expression level, compared to the control group, sinomenine hydrochloride led to a significant downregulation of inflammatory cytokines in all groups ($P<0.05$). Additionally, the expression levels of apoptosis-related proteins significantly increased, while Bcl-2 mRNA expression decreased ($P<0.05$). The mRNA expression levels of the PI3K/mTOR/AKT3 signaling pathway also decreased ($P<0.05$). At the protein expression level, in comparison to the control group, the levels of

* This work was supported by grants from Science and Technology Program of Jiangxi Provincial Health Commission (202140175) and Jiangxi Administration of Traditional Chinese Medicine Project (2021A196).

** Corresponding author.

Tel: 86-13755677762, E-mail: 94043722@qq.com

Received: May 13, 2023 Accepted: October 12, 2023

inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-1 β , and TGF- β were significantly downregulated in the middle and high-dose sinomenine hydrochloride groups ($P<0.05$). The expression levels of cleaved-PARP, cleaved caspase-3/7, and Bax increased and were positively correlated with the dose, while the expression levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the PI3K/AKT3/mTOR signaling pathway were negatively correlated with the dose. Sinomenine hydrochloride exhibited a significant inhibitory effect on the viability of rabbit knee joint fibroblasts, which may be associated with the downregulation of inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and IL-1 β , promotion of apoptosis-related proteins cleaved-PARP, cleaved caspase-3/7, and Bax, suppression of Bcl-2 expression, and inhibition of gene expression in the downstream PI3K/AKT3/mTOR signaling pathway. **Conclusion** Sinomenine hydrochloride can inhibit the inflammatory response of fibroblasts in adhesive knee joints and accelerate fibroblast apoptosis. This mechanism may offer a novel approach to improving and treating knee joint adhesion.

Key words sinomenine hydrochloride, adhesion knee rigidity, domestic rabbits, fibroblasts

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0188