

于利凯,田地,苏子珊,等.机械应力经 Piezo1/ERK1/2 轴介导 KOA 滑膜纤维化的机制研究 [J].中国比较医学杂志,2024,34(10):47-56.

Yu LK, Tian D, Su ZS, et al. Mechanism of mechanical stress in knee osteoarthritis synovial fibrosis mediated via the Piezo1/ERK1/2 axis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 47-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.006

机械应力经 Piezo1/ERK1/2 轴介导 KOA 滑膜纤维化的机制研究

于利凯^{1,2},田地^{1,2},苏子珊^{1,2},揭立士^{1,2},郭少博^{1,2},王培民¹,张农山^{1*}

(1.南京中医药大学附属医院/江苏省中医院,南京 210029;2.南京中医药大学第一临床医学院,南京 210023)

【摘要】 目的 探讨机械应力激活 Piezo1,经 ERK1/2 信号通路对 KOA 滑膜纤维化的影响。**方法** 将 25 只 SD 大鼠分为空白组、运动组、运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组、运动+GsMTx4+PD98059 组,共 5 组,每组各 5 只。造模完成后提取大鼠血清及滑膜组织进行天狼猩红染色、Masson 染色评估胶原沉积,Western blot、RT-qPCR 检测 Piezo1、ERK1/2、p-ERK1/2、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I 及 TIMP-1 等相关蛋白及 mRNA 的表达,ELISA 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。细胞实验中将滑膜细胞分为空白组、拉力组、拉力+GsMTx4 组、拉力+PD98059 组、拉力+GsMTx4+PD98059 组,共 5 组。对造模完成后的细胞使用 Western blot、RT-qPCR 等技术进行上述指标的检测。**结果** 机械应力会增加大鼠滑膜组织胶原沉积,并提高通路相关指标及纤维化特异性指标 Piezo1、p-ERK/ERK、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$),使用抑制剂均可见明显下调 ($P<0.05$),但 ERK 抑制剂 (PD98059)对 Piezo1 表达无显著影响。运动组大鼠较空白组血清炎症因子含量显著提高 ($P<0.05$),使用抑制剂后改善明显 ($P<0.05$)。细胞实验中 Western blot 及 RT-qPCR 结果趋势同动物实验。**结论** Piezo1 离子通道可以感受机械应力,激活 ERK1/2 通路介导膝关节滑膜纤维化。

【关键词】 Piezo1;ERK1/2;机械应力;KOA 滑膜纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0047-10

Mechanism of mechanical stress in knee osteoarthritis synovial fibrosis mediated via the Piezo1/ERK1/2 axis

YU Likai^{1,2}, TIAN Di^{1,2}, SU Zishan^{1,2}, JIE Lishi^{1,2}, GUO Shaobo^{1,2}, WANG Peimin¹, ZHANG Nongshan^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China. 2. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Piezo1 activated by mechanical stress on knee osteoarthritis synovial fibrosis via the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signaling pathway. **Methods** Twenty-five Sprague Dawley rats were divided into blank, exercise, exercise+GsMTx4, exercise+PD98059, and exercise+GsMTx4+PD98059 groups ($n=5$ per group). After modeling, serum and synovial tissue were extracted and collagen deposition was evaluated by Sirius red and Masson staining. Expression levels of Piezo1, ERK1/2, phospho (p)-ERK1/2, α -smooth muscle actin (SMA), transforming growth factor (TGF)- β , Collagen I, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 were

【基金项目】江苏省中医院科主任学术提升专项(Y2022ZR26);国家自然科学基金面上项目(82274545)。

【作者简介】于利凯(1999—),男,博士研究生,研究方向:骨关节病。E-mail:ylk_012022@163.com

【通信作者】张农山(1982—),男,副研究员,研究方向:骨关节病。E-mail:zns0032@163.com

detected by Western blot and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α contents were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. For cell experiments, synovial cells were divided into blank, pull, pull + GsMTx4, pull + PD98059, and pull + GsMTx4 + PD98059 groups and the above indices were detected in the model cells by Western blot, RT-qPCR, and other techniques.

Results Mechanical stress increased collagen deposition in synovial tissues in the rats, and increased the protein and mRNA expression levels of the pathway-related and fibrosis-specific indicators Piezo1, p-ERK/ERK, α -SMA, TGF- β , Collagen I, and TIMP-1 ($P<0.05$). Piezo1 expression was significantly down-regulated by both inhibitors ($P<0.05$), but the ERK inhibitor (PD98059) had no significant effect on Piezo1 gene expression. Levels of serum inflammatory factors were significantly higher in the exercise group compared with the blank group ($P<0.05$), and levels were significantly reduced by the inhibitors ($P<0.05$). The *in vitro* experiments showed the same trends as the animal experiments.

Conclusions The Piezo1 ion channel can sense mechanical stress and activate the ERK1/2 pathway to mediate knee synovial fibrosis.

【Keywords】 Piezo1; ERK1/2; mechanical stress; KOA synovial fibrosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的骨关节退行性病变,涉及关节软骨、滑膜、软骨下骨等多个组织,表现为疼痛、肿胀、关节僵硬甚至残疾^[1-2]。其中,滑膜纤维化是 KOA 的特征性病理表现之一,参与到 KOA 的发生与进展期^[3]。滑膜是关节内的一层结缔组织,可以产生滑液,进而润滑关节并清除代谢产物^[4],在 KOA 疾病中,滑膜纤维化被认为是患者膝关节僵硬的根本原因^[5]。同时,大量研究发现,以滑膜纤维化为主的非软骨结构病变是造成 KOA 疼痛的主要原因^[6-8]。开放手术是治疗滑膜纤维化最直接及有效的方法,但侵入性手术本身通常切口较大,且需要对全关节进行广泛探查,故存在诱发滑膜纤维化的可能性,并导致关节僵硬随时间推移而复发^[9]。因此,研究滑膜纤维化的发生机制,探寻早期治疗靶点,可以为临床 KOA 诊疗提供新的思路与理论基础。

纤维化是组织修复反应失调的结果,涉及多种信号传导通路,有报道指出机械敏感离子通道 Piezo1 可以感受应力刺激,在心肌纤维化、肾纤维化以及肺纤维化等疾病进展中发挥着重要的生物学作用^[10-12]。Zhao 等^[13]研究发现, Piezo1 的激活可以上调 TGF- β 、 α -SMA 等促纤维化特异性指标,提高纤维连接蛋白表达,进而促进 ECM 过度沉积,以此证明了 Piezo1 通过调节 ECM 重塑相关基因的表达诱导各类型细胞中的促纤维化表型变化。ERK1/2 属于丝裂原活化蛋白激酶家族,可以响应机械应力,将细胞外刺激转化为细胞增殖、分化及基因表达的信号,并广泛参与到各类型纤维化疾病进程^[14]。但目前针对机械应力及 Piezo1/ERK1/2 通路对 KOA 的影响机制研究较为匮乏,因此本文以

KOA 滑膜纤维化为研究对象,探讨 Piezo1/ERK1/2 通路关系及机械应力对膝关节滑膜组织的作用机制,以期为 KOA 治疗提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

25 只雄性 4 月龄 SD 大鼠,SPF 级,体重 350~450 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011];5 只 4 周龄雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 120~150 g,购自杭州医学院[SCXK(浙)2019-0002]。均饲养于南京中医药大学实验动物中心[SYXK(苏)2023-0077],已获得南京中医药大学实验动物管理委员会与南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-202307A057)。饲养条件:维持饲料,自由饮水摄食,自然昼夜,恒温 20~22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%,遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

GsMTx4 (HY-P1410)、PD98059 (HY-12028) 购自 MCE;逆转录试剂盒 (R222-01)、PCR 试剂盒 (Q331-02) 购自南京诺唯赞;免疫染色封闭液 (P0260)、免疫染色强力通透液 (P0097)、抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) (P0131) 购自上海碧云天。Piezo1 (ab128245) 购自 Abcam;ERK1/2 (4695S)、p-ERK1/2 (4370S)、 α -SMA (19245S) 购自 CST; β -actin (AF7018)、TGF- β (AF1027)、Collagen I (AF7001)、TIMP-1 (AF7007) 购自 Affinity Biosciences。XR-PT-10B 型小动物跑步机 (上海欣软信息科技有限公司);FX-5000T 型细胞牵张拉伸应力加载系统 (美国 Flex cell 公司)。RT-qPCR 实验所需基因引物购自上海捷瑞生物公司,见表 1。

表 1 基因引物设计序列及长度
Table 1 Primer sequences and lengths for gene amplification

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	长度/bp Length
β-actin	F: CTATCGGCAATGAGCGGTTC R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	150
Piezo1	F: CAGCCGAGAGACAGAGAAGAAATAC R: GCAATGAGGAAGAGGATGATGAGAC	102
ERK1/2	F: GATTGCCTGCTGCTGTTCTC R: CATCGTAGCCACTGACTTCTTCC	139
α-SMA	F: CCACTGCTGCTTCCTCTTCTTC R: TGCCCGCCGACTCCATTC	138
TGF-β	F: TAGCAACAATTCTGGCGTTACC R: CCTGTATTCCGTCTCCTTGGTTC	125
Collagen I	F: GTGCGATGGCGTGCTATGC R: CTATGACTTCTGCGTCTGGTGATAC	116
TIMP-1	F: TCCTGGTTCCTGGCATAATCTG R: CACAAGCAATGACTGTCACTCTCC	139

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将 25 只 SD 大鼠随机分为 5 组:空白组、运动组、运动 + GsMTx4 组、运动 + PD98059 组、运动 + GsMTx4 + PD98059 组,每组各 5 只。适应性喂养 1 周。

1.3.2 动物造模

空白组正常饲养至实验结束。运动组使用动物跑台构建运动模型大鼠,适应性喂养结束后,进行为期 3 d 的适应性训练,跑台参数设定为速度 10 m/min,每天 2 次,每次 15 min。适应性训练完成后,进行正式训练,跑台参数设定为速度 25 m/min、坡度 10°,每次 1 h,每天 1 次,每周 5 d,持续 8 周^[15]。运动+GsMTx4 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行腹腔注射 Piezo1 抑制剂 GsMTx4,每只注射量 1 mg/kg^[16]。运动+PD98059 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行尾静脉注射 ERK 抑制剂 PD98059,每只注射量 0.3 mg/kg^[17]。运动+GsMTx4+PD98059 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行腹腔注射 1 mg/kg GsMTx4,同时进行尾静脉注射 0.3 mg/kg PD98059。

1.3.3 动物血清及滑膜组织提取

动物造模完成后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,沿腹中线剪开皮肤,暴露腹主动脉,刺入采血针,使血液吸入真空采血管,静置凝固后,离心分离,取上清于-80℃冰箱保存。采血完成后,膝关节备皮,手

术刀切开膝关节周围皮肤,钝性分离皮下组织沿髌骨上缘打开关节腔,分离周围肌腱及韧带,仔细分离滑膜组织,将其置于 4%多聚甲醛室温保存或冻存管-80℃冰箱保存。

1.3.4 大鼠原代滑膜细胞提取

处死大鼠,在无菌环境下提取膝关节滑膜组织置于 PBS 中,洗涤 3 次,随后将组织剪碎放置于含有 0.15% I 型胶原酶的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃环境下消化 4 h。消化完成后使用 70 μm 筛网过筛,离心,并弃去上清后,将细胞重悬种于细胞培养皿,24 h 后换液,待细胞长至 80%进行传代,3 代后进行细胞实验。

1.3.5 细胞造模

将滑膜细胞接种于膜性 6 孔板中,分为 5 组:空白组、拉力组、拉力+GsMTx4 组、拉力+PD98059 组和拉力+GsMTx4+PD98059 组。

空白组正常培养,不进行干预。拉力组置于应力加载系统,参数设置为周期每秒 6 次,幅度 20%,强度 50 Hz,时间梯度 24 h。拉力+GsMTx4 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 5 μmol GsMTx4 的完全培养基。拉力+PD98059 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 50 μmol PD98059 的完全培养基。拉力+GsMTx4+PD98059 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 5 μmol GsMTx4 及 50 μmol PD98059 的完全培养基。

1.3.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

解冻大鼠血清,稀释建立标准曲线,按照 ELISA 试剂盒说明书指示加入各工作液,依次检测各组样

本中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量。

1.3.7 天狼猩红染色

滑膜组织固定、脱水石蜡包埋、石蜡切片脱蜡至蒸馏水、滴加铁苏木素染色液染色 5~10 min、洗片、天狼猩红染色液滴染 1 h、流水冲洗、脱水透明、中性树胶封固。光镜观察。

1.3.8 Masson 染色

石蜡切片脱蜡至水、Weigert 苏木精液染核 5~10 min、水洗、Masson 丽春红酸性复红液 5~10 min、2%冰醋酸水溶液浸洗、1%磷钼酸水溶液分化 3~5 min、苯胺蓝复染 5 min、0.2%冰醋酸水溶液浸洗、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树胶封固。光镜观察。

1.3.9 蛋白免疫印迹(Western blot)

将上述的滑膜组织或细胞使用裂解液提取蛋白,测蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀煮沸,-80℃冰箱保存。配胶、上样、电泳、转膜、封闭、洗膜、4℃孵育 β -actin、Piezo1、ERK1/2、p-ERK1/2、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 一抗过夜、洗膜、孵育对应二抗、洗膜、曝光。

1.3.10 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

将上述的滑膜组织或细胞使用 TRIzol 法提取 RNA,使用分光光度计测得各样本 RNA 浓度。依据逆转录试剂盒将获得的 RNA 逆转录为 cDNA。再依据 RT-qPCR 试剂盒将获得的 cDNA 进行扩增。获得相应结果以 β -actin 为内参进行相应半定量处理。

1.4 统计学方法

实验数据使用 SPSS 26.0 进行数据分析,

Graphpad Prism 8、Adobe Illustrator 2022 等软件进行图片绘制。结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),事后多重比较使用 LSD 检验方法,数据以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 天狼猩红染色观察大鼠滑膜纤维化

天狼猩红染色显示运动组大鼠滑膜组织胶原沉积较空白组显著增加,各抑制剂组均能减少运动所导致的滑膜组织胶原沉积,见图 1。

2.2 Masson 染色观察大鼠滑膜纤维化

Masson 染色显示运动组大鼠滑膜组织蓝色胶原纤维较空白组显著增加,各抑制剂组均能减少运动所产生的滑膜组织蓝色胶原纤维,见图 2。

2.3 GsMTx4 和 PD98059 干预对 Piezo1/ERK1/2 通路蛋白表达的影响

大鼠滑膜组织 Western blot 结果显示,运动组与空白组相比,其 Piezo1、p-ERK/ERK 的蛋白表达均显著提高($P<0.05$)。运动+GsMTx4 组与运动+GsMTx4+PD98059 组的 Piezo1、p-ERK/ERK 的表达较运动组有所下降($P<0.05$)。而运动+PD98059 组与运动组相比,其 Piezo1 的蛋白表达无显著性差异($P>0.05$),但 p-ERK/ERK 的表达有所下降($P<0.05$),见图 3A。大鼠滑膜细胞 Western blot 结果显示,各组细胞间通路相关指标 Piezo1、p-ERK/ERK 的蛋白表达趋势与大鼠滑膜组织 Western blot 结果一致,见图 3B。

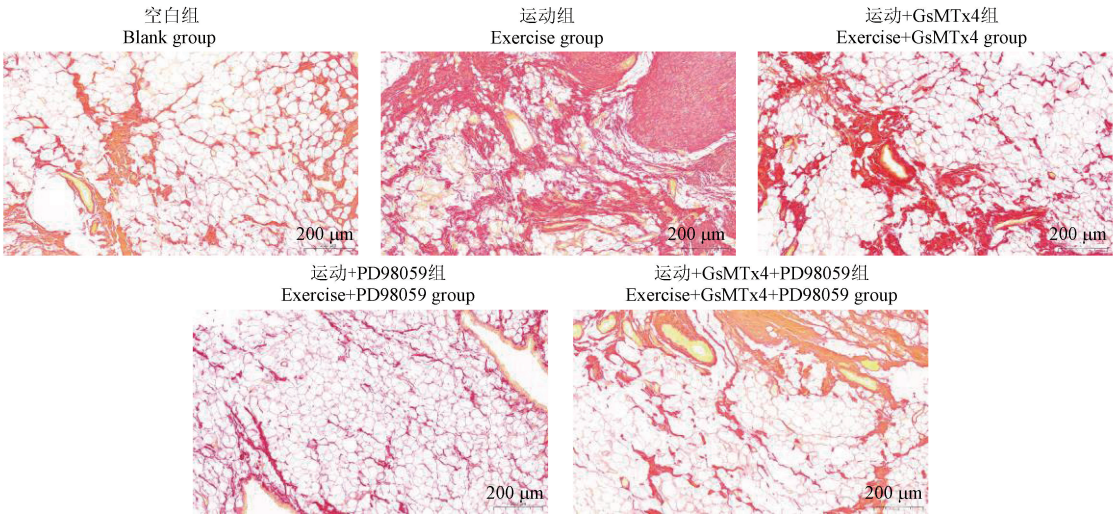


图 1 各组大鼠滑膜组织天狼猩红染色切片

Figure 1 Sirius red stained sections of synovial tissue from different rat groups

2.4 GsMTx4 和 PD98059 干预对 Piezo1/ERK1/2 通路基因表达的影响

大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果显示,运动组与空白组相比,其 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达均显著

提高($P<0.05$)。运动+GsMTx4 组与运动+GsMTx4+PD98059 组的 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达较运动组有所下降($P<0.05$)。而运动+PD98059 组与运动组相比,其 Piezo1 的 mRNA 表达无显著性差异(P

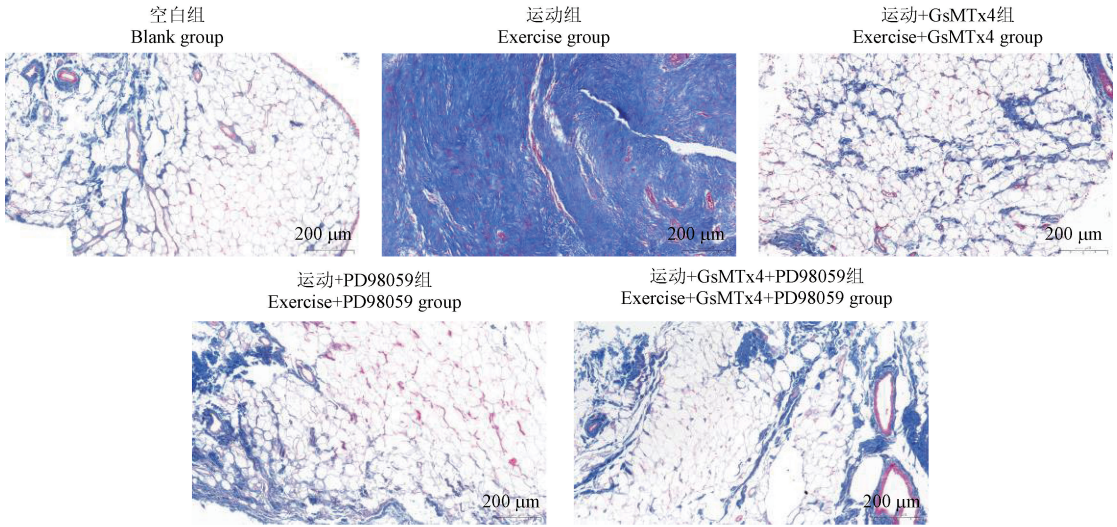
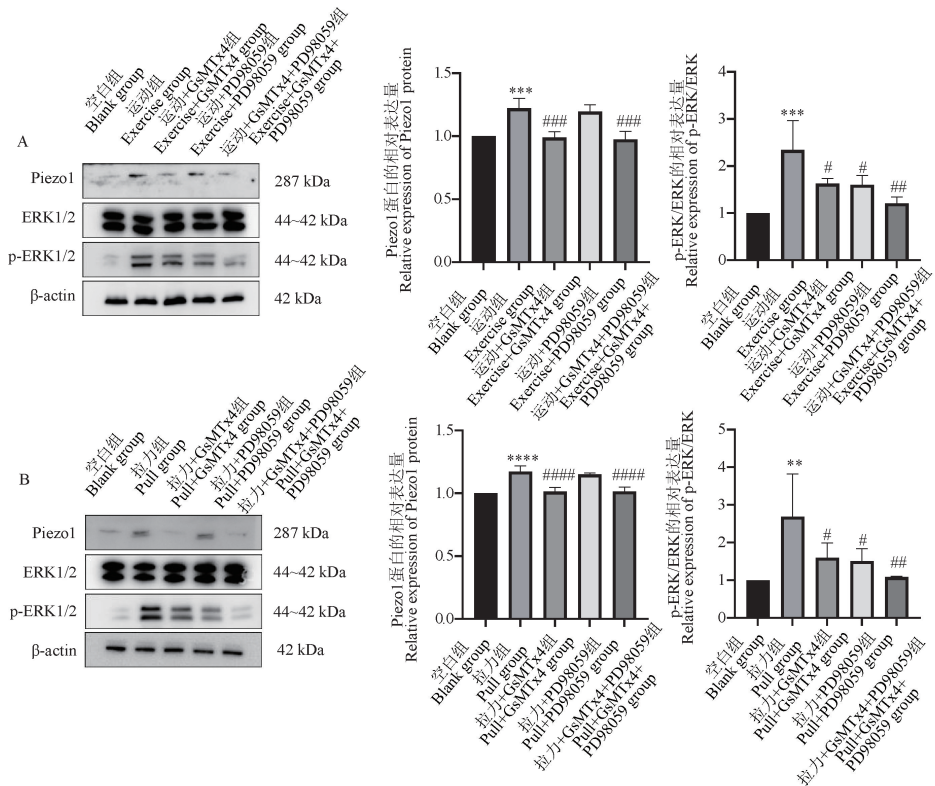


图 2 各组大鼠滑膜组织 Masson 染色切片

Figure 2 Masson's trichrome stained sections of synovial tissue from different groups of rats



注:A:滑膜组织蛋白表达;B:滑膜细胞蛋白表达。与空白组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与运动组(拉力组)比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$,#### $P<0.0001$ 。

图 3 各组滑膜组织及细胞中通路相关蛋白表达量

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$.

Figure 3 Changes in expression of pathway related proteins in synovial tissues and cells of each

>0.05), 但 ERK1/2 的 mRNA 表达有所下降 ($P<0.05$), 见图 4A。大鼠滑膜细胞 RT-qPCR 结果显示, 各组细胞间 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达趋势同大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果, 见图 4B。

2.5 GsMTx4 和 PD98059 干预对纤维化相关蛋白表达的影响

大鼠滑膜组织 Western blot 结果显示, 运动组与

空白组相比, 其纤维化相关指标如 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的蛋白表达均显著提高 ($P<0.05$)。运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组以及运动+GsMTx4+PD98059 组纤维化相关指标的蛋白表达较拉力组均有所下降 ($P<0.05$), 见图 5A。大鼠滑膜细胞 Western blot 结果显示, 各组细胞间纤维化相关指标的蛋白表达趋势同大鼠滑膜组织 Western

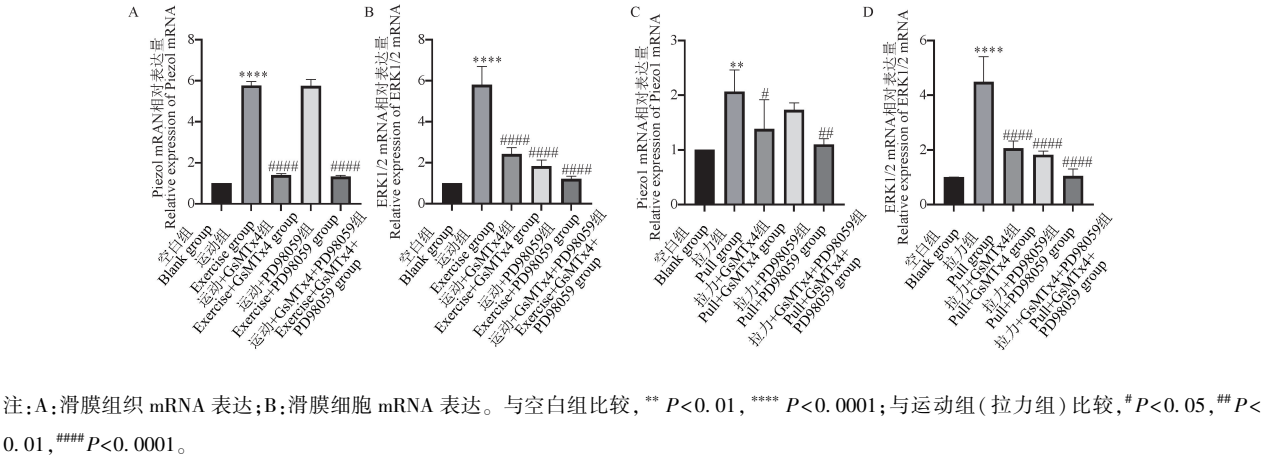


图 4 各组滑膜组织及细胞中的通路相关 mRNA 表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$.

Figure 4 Changes in mRNA expression related to pathways in synovial tissues and cells of each group

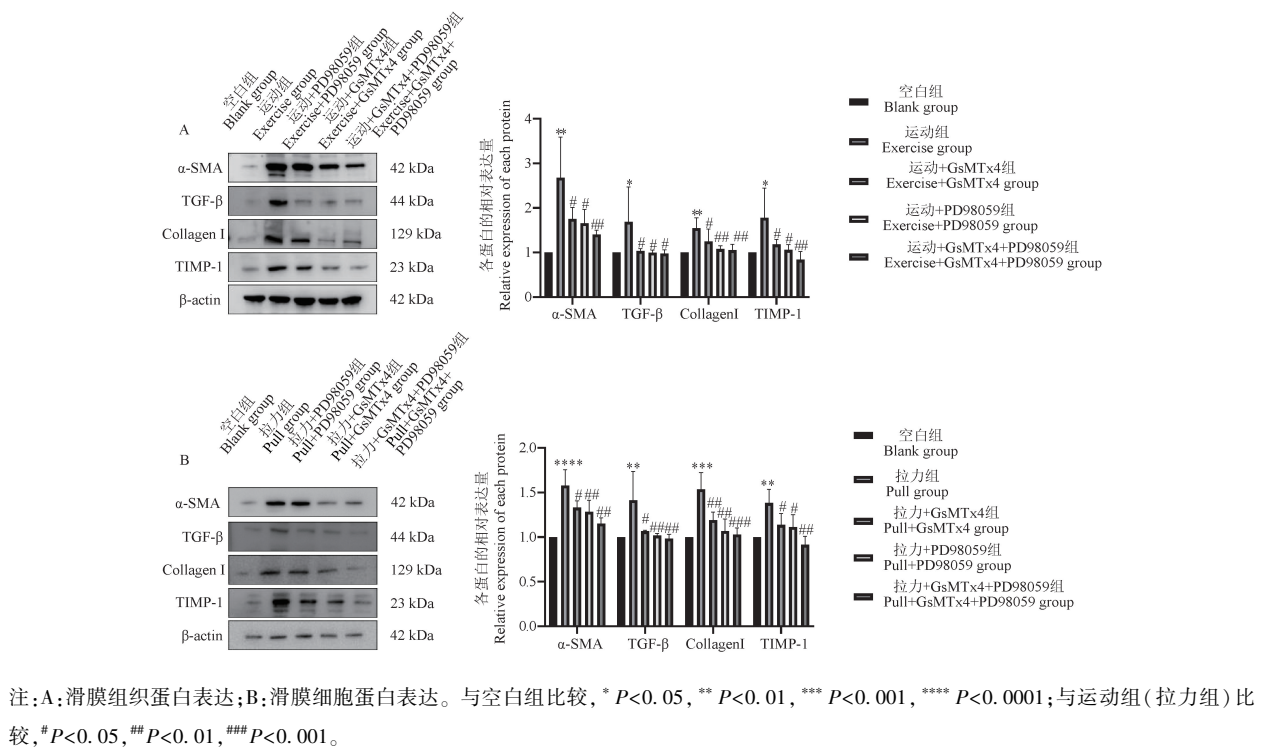


图 5 各组滑膜组织及细胞中的纤维化相关蛋白表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 5 Changes in fibrosis related protein expression in synovial tissues and cells of each group

blot 结果一致,见图 5B)。

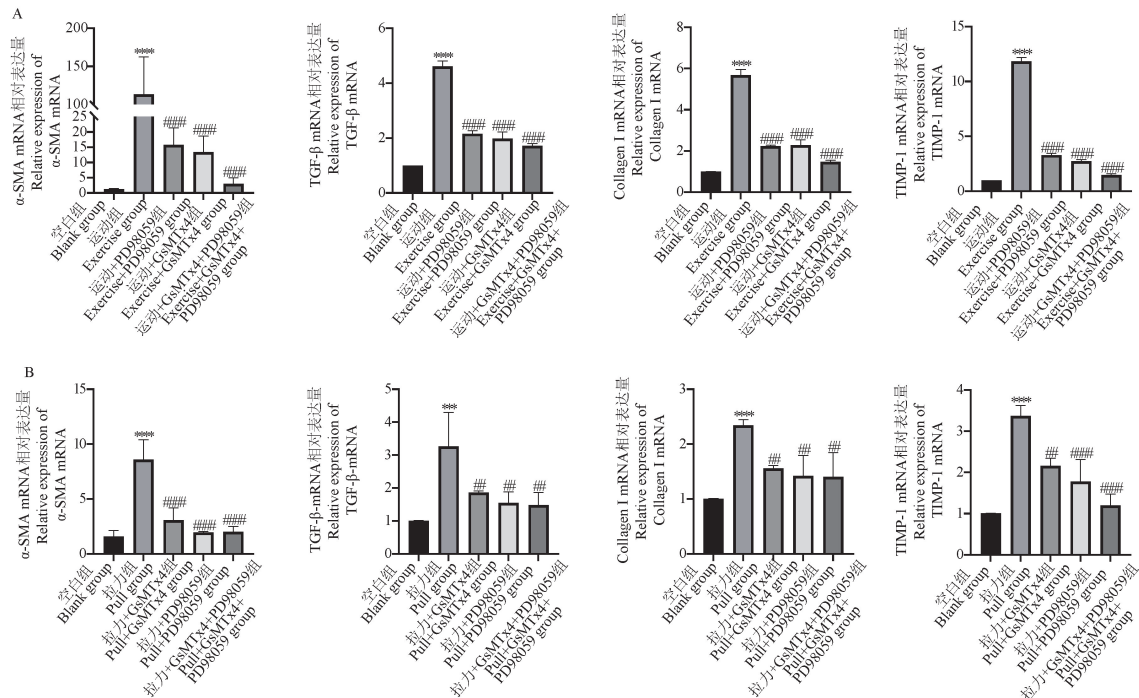
2.6 GsMTx4 和 PD98059 干预对纤维化相关基因表达的影响

大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果显示,运动组与空白组相比,其纤维化相关指标如 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的 mRNA 表达均显著提高 ($P<0.05$)。运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组以及运

动+GsMTx4+PD98059 组纤维化相关指标的 mRNA 表达较拉力组均有所下降 ($P<0.05$),见图 6A。大鼠滑膜细胞 RT-qPCR 结果显示,各组细胞间纤维化相关基因的 mRNA 表达趋势同大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果,见图 6B。

2.7 ELISA 检测大鼠血清炎症因子表达

大鼠血清 ELISA 结果如图 7 显示,运动较空白

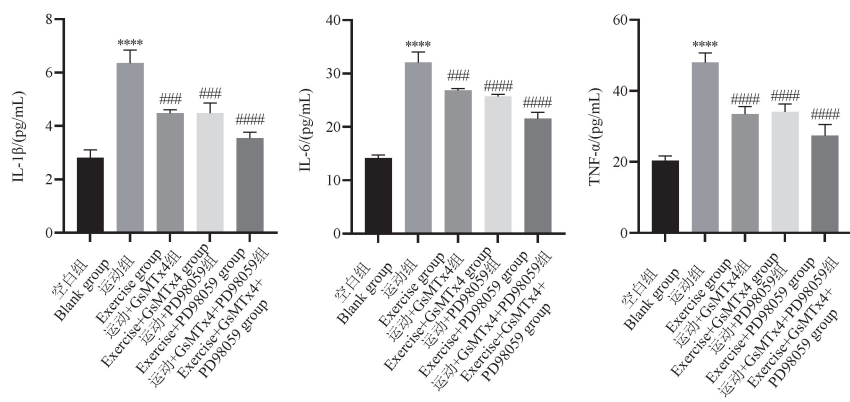


注:A:滑膜组织 mRNA 表达;B:滑膜细胞 mRNA 表达。与空白组比较,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与运动组(拉力组)比较,## $P<0.01$,#### $P<0.0001$ 。

图 6 各组滑膜组织及细胞中的纤维化相关指标 mRNA 表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with exercise group (pull group), ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$.

Figure 6 Changes in mRNA expression of fibrosis related indicators in synovial tissues and cells of each group



注:与空白组比较,**** $P<0.0001$;与运动组比较,### $P<0.001$,#### $P<0.0001$ 。

图 7 各组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量的比较

Note. Compared with blank group, **** $P<0.0001$. Compared with exercise group, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$.

Figure 7 Comparison of serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 density among different groups

组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度显著增高 ($P < 0.05$); 使用抑制剂后, 各炎症因子水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

KOA 是临床上最常见的慢性关节疾病之一, 其发病机制复杂, 主要与机体免疫、关节应力失衡、关节腔炎症、激素等因素相关^[18]。滑膜纤维化与 KOA 病情进展高度相关, 引起患者的关节僵硬与疼痛症状, 使下肢活动受限并最终导致膝关节功能丧失, 滑膜纤维化特征是滑膜内壁细胞增厚、基质血管化增加、炎症细胞浸润及亚内膜滑膜细胞纤维化, 主要原因在于成纤维细胞过度增殖以及胶原合成分解代谢之间的不平衡^[19-20]。在纤维化疾病中, TGF- β 、 α -SMA、Collagen I、TIMP-1 是重要的特异性指标, TGF- β 通过诱导胶原蛋白合成来促进 ECM 积累, 有研究通过阻断 TGF- β 减少了骨关节炎的骨赘形成及滑膜增厚^[21]。TIMP-1 表达升高在多种纤维化疾病中得到证实, 高表达的 TGF- β 诱导 TIMP-1, 并通过下调 MMP 促进滑膜增厚^[22]。本研究通过高强度跑台运动构建 KOA 大鼠模型, 病理学形态观察显示, 与空白组比较, 运动组大鼠滑膜胶原沉积显著增加, 并在使用抑制剂后明显减少; 同时, 运动组大鼠较空白组的 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I、TIMP-1 等纤维化特异性标志物蛋白及 mRNA 表达显著上升, 使用抑制剂后明显下降, 说明高强度机械应力负荷使大鼠膝关节滑膜发生纤维化改变, 而抑制 Piezo1 或 ERK 可以缓解纤维化症状, 并改善滑膜病理状态。

大量研究表明 Piezo1 蛋白在组织纤维化进展中发挥着重要的作用, ERK1/2 蛋白能够促进 MAPK 信号通路关键蛋白丝氨酸、苏氨酸双位点的磷酸化水平, 从而实现如细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学功能^[23-25]。有研究发现, Piezo1 蛋白的激活可以促进骨肉瘤细胞的侵袭, 使用抑制剂 GsMTx4 降低 Piezo1 表达后可以减少骨肉瘤细胞增殖、阻止侵袭^[26]。因此, 本研究基于机械应力, 探讨 Piezo1 及 ERK1/2 在 KOA 病程中介导滑膜纤维化的作用机制, 并挖掘它们二者之间的联系。本研究发现, 机械应力可以激活 Piezo1/ERK1/2 信号轴, 促进胶原沉积, 且使用 GsMTx4 抑制 Piezo1 的表达、PD98059 抑制 ERK 的表达以及两者联合使用均可抑制滑膜纤维化进展。其中 GsMTx4 的使用可以抑制 Piezo1 及 p-EKR/ERK 蛋白及相关 mRNA 表达,

但 PD98059 的使用仅可以抑制 p-EKR/ERK 表达, 对 Piezo1 无显著影响, 结果提示 ERK1/2 可能位于 Piezo1 的下游, 借此可以传递力学信号, 实现 Piezo1 的生物学功能。

KOA 患者膝关节病变与炎症因子表达同样具有密切联系, 虽然早期炎症反应有利于组织修复, 但持续炎症会激活 TGF- β 、血小板生长因子、成纤维细胞生长因子等信号, 使 ECM 在病变组织过量积累, 导致无功能性纤维组织形成^[27]。本研究通过动物实验发现, 运动组大鼠较空白组, 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显升高, 使用抑制剂后炎症因子含量显著降低, 提示高强度机械应力负荷会提高大鼠体内炎症因子含量, 而利用 GsMTx4 抑制 Piezo1 以及利用 PD98059 抑制 ERK1/2 后, 大鼠体内炎症环境得到明显改善。这与相关研究发现的 Piezo1 激活 MAPK/ERK1/2 信号通路, 介导过量机械应力刺激下的软骨细胞凋亡, 改变关节内环境进而产生大量氧自由基和炎症介质的结论是一致的^[28]。

本文尚存在一定的局限性, 首先我们仅探讨了机械应力对膝关节滑膜的直接影响。既往研究通过构建机械应力失稳模型, 发现膝关节组织出现纤维化反应, TGF- β 和血管内皮生长因子在其中起到核心作用^[29]。本文也得到了相似的结论, 但是并未深入研究机械应力通过影响大鼠其他生理功能对膝关节滑膜产生的间接作用。Warburton 等^[30]研究发现长期剧烈运动对人体内钾、钠、镁等离子代谢, 以及尿素、肌酐浓度影响较大。Gerche 等^[31]研究通过对专业运动员的调查发现, 长期剧烈运动导致心脏发生永久性结构变化, 心脏纤维化概率及心律失常风险增加。但国内外学者尚未对上述生理变化与膝关节滑膜纤维化的关系展开广泛探讨。此外, 本研究虽验证了 Piezo1 与 ERK1/2 信号传导的作用关系, 但二者之间或存在其他调控机制或通路参与。例如, Piezo1 感受应力刺激后, 介导钙离子进入细胞内, 使钙稳态失衡, 继而刺激活性氧过量逸出, 并以剂量依赖性的方式激活 ERK 信号通路^[32-33]。最后, 本文采用高强度跑台训练构建膝关节损伤模型, 目的是强调异常机械应力刺激对大鼠关节组织的影响, 虽然其他经典 KOA 造模方法, 如前交叉韧带横断手术等, 同样会对膝关节组织产生异常应力刺激, 或可与跑台造模产生相似影响, 但本研究结果是否能在 KOA 模型中转化, 以及其他运动训练强度是否会对大鼠滑膜造成相似影响, 仍需后续深入

挖掘^[34]。本文目前的研究只是对高强度机械应力诱导膝关节滑膜纤维化这一现象的初步观察,希望在未来可以深入探索相关机制,进一步推进研究结果在临床应用中的落实。

综上所述,本文发现机械应力负荷可能通过激活 Piezo1 蛋白并介导 ERK1/2 通路导致膝关节滑膜纤维化及炎性因子释放。但是否存在其他通路在这一机制中发挥作用,尚未完全探索,希望在今后实验中深入研究。

参考文献:

[1] 吴鹏,单进军,黄正泉,等. 丁公藤对大鼠膝关节炎滑膜炎症及痛阈的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36 (6): 837-841.

WU P, SHAN J J, HUANG Z Q, et al. The effect of *Erycibe obtusifolia* Benth on the synovial inflammation and threshold of pain in KOA rats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(6): 837-841.

[2] 张力,黄正泉,李晓辰,等. 膝痹宁对膝关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 29-32.

ZHANG L, HUANG Z Q, LI X C, et al. Effect of xibining on synovial fibrosis in rats with knee osteoarthritis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(1): 29-32.

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

[4] TAVALLAEE G, LIVELY S, ROCKEL J S, et al. Contribution of microRNA-27b-3p to synovial fibrotic responses in knee osteoarthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(12): 1928-1942.

[5] WANG M, LESSARD S G, SINGH P, et al. Knee fibrosis is associated with the development of osteoarthritis in a murine model of tibial compression [J]. J Orthop Res, 2021, 39(5): 1030-1040.

[6] SRIWATANANUKULKIT O, DESCLAUX S, TAWONSAWATRUK T, et al. Effectiveness of losartan on infrapatellar fat pad/synovial fibrosis and pain behavior in the moniodoacetate-induced rat model of osteoarthritis pain [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114121.

[7] NANUS D E, BADOUME A, WIJESINGHE S N, et al. Synovial tissue from sites of joint pain in knee osteoarthritis patients exhibits a differential phenotype with distinct fibroblast subsets [J]. EBioMedicine, 2021, 72:103618.

[8] REMST D F, BLANEY E N, et al. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(11):1954-1963.

[9] ZHANG L, XING R, HUANG Z, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis [J]. Front Med, 2021, 8: 684389.

[10] HE Y, DENG B, LIU S, et al. Myeloid *Piezo1* deletion protects renal fibrosis by restraining macrophage infiltration and activation [J]. Hypertension, 2022, 79(5): 918-931.

[11] BARTOLI F, EVANS E L, BLYTHE N M, et al. Global *PIEZO1* gain-of-function mutation causes cardiac hypertrophy and fibrosis in mice [J]. Cells, 2022, 11(7): 1199.

[12] FANG X Z, LI M, WANG Y X, et al. Mechanosensitive ion channel *Piezo1* mediates mechanical ventilation-exacerbated ARDS-associated pulmonary fibrosis [J]. J Adv Res, 2023, 53: 175-186.

[13] ZHAO X, KONG Y, LIANG B, et al. Mechanosensitive *Piezo1* channels mediate renal fibrosis [J]. JCI Insight, 2022, 7 (7): e152330.

[14] BASTOW E R, LAMB K J, LEWTHWAITE J C, et al. Selective activation of the MEK-ERK pathway is regulated by mechanical stimuli in forming joints and promotes pericellular matrix formation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11749-11758.

[15] LI Z, LIU S Y, XU L, et al. Effects of treadmill running with different intensity on rat subchondral bone [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1977.

[16] WANG Z, CHEN J, BABICHEVA A, et al. Endothelial upregulation of mechanosensitive channel *Piezo1* in pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 321(6): C1010-C1027.

[17] 王红霞,曾翔俊,江瑛,等. 11, 12-EET 的延迟性心脏保护作用与磷酸化 ERK1/2 的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2328-2331.

WANG H X, ZENG X J, JIANG Y, et al. Relationship between delayed cardioprotection effect of 11, 12-EET and phosphorylated ERK during ischemia and reperfusion in the rat myocardium [J]. Chin J Pathophysiol, 2006, 22(12): 2328-2331.

[18] 申延清,刘凤霞,曹红,等. 膝关节炎患者的临床表现及相关影响因素 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(9): 1643-1646.

SHEN Y Q, LIU F X, CAO H, et al. Clinical manifestation and influence factors in patients with knee osteoarthritis [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2011, 15(9): 1643-1646.

[19] MATHIESSEN A, CONAGHAN P G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 18.

[20] KUROWSKA-STOLARSKA M, ALIVERINI S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? [J]. RMD Open, 2017, 3 (2): e000527.

[21] SCHARSTUHL A, VITTERS E L, VAN DER KRAAN P M, et al. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3442-3451.

[22] ZHANG L, ZHANG L, HUANG Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis *via* fibroblast-like

synoviocyte pyroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6326517.

[23] 何珊, 王颖芳, 杜红卫, 等. siRNA-Piezol 通过 ERK1/2 信号通路抑制滑膜细胞增殖和炎性因子表达的相关机制 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(5): 434-443. HE S, WANG Y F, DU H W, et al. Mechanism research on siRNA-Piezol inhibiting cell proliferation of synoviocytes and expression of inflammatory factors through ERK1/2 signaling pathway [J]. *J Jinan Univ Nat Sci Med Ed*, 2020, 41(5): 434-443.

[24] LAVOIE H, GAGNON J, THERRIEN M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 607-632.

[25] SUN Y, LIU WZ, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.

[26] JIANG L, ZHAO Y D, CHEN W X. The function of the novel mechanical activated ion channel Piezol in the human osteosarcoma cells [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5070-5082.

[27] DISTLER J H W, GYÖRFI A H, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(12): 705-730.

[28] 李晓飞, 张钊, 李晓东, 等. 新型机械激活离子通道蛋白 Piezol 通过 MAPK/ERK1/2 信号通路介导软骨细胞凋亡的机制 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(31): 2472-2477. LI X F, ZHANG Z, LI X D, et al. Mechanism of the Piezol protein-induced apoptosis of the chondrocytes through the MAPK/ERK1/2 signal pathway [J]. *Chin Med J*, 2016, 96(31): 2472-2477.

[29] ZHANG L, LI M, LI X, et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia [J]. *J Adv Res*, 2022, 35: 141-151.

[30] WARBURTON D E, WELSH R C, HAYKOWSKY M J, et al. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise [J]. *Br J Sports Med*, 2002, 36(4): 301-303.

[31] GERCHE A L, PRIOR D L, HEIDBÜCHEL H. Strenuous endurance exercise: is more better for everyone? Our genes won't tell us [J]. *Br J Sports Med*, 2011, 45(3): 162-164.

[32] SZCZOT M, NICKOLLS A R, LAM R M, et al. The form and function of PIEZO2 [J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 507-534.

[33] ZHANG Y, MA Y, LIANG N, et al. Blockage of ROS-ERK-DLP1 signaling and mitochondrial fission alleviates Cr(VI)-induced mitochondrial dysfunction in L02 hepatocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 186: 109749.

[34] SHA Y, ZHANG B, CHEN L, et al. Mechano growth factor accelerates ACL repair and improves cell mobility of mechanically injured human ACL fibroblasts by targeting Rac1-PAK1/2 and RhoA-ROCK1 pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4331.

[收稿日期] 2024-04-26