

刘敏,李玮琦,窦慧茹,等. 基于 NF- κ B 信号通路探索臭氧水关节腔注射调控 miR-214-3p 对 KOA 大鼠软骨损伤的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(6): 74-83.

Liu M, Li WQ, Dou HR, et al. Mechanism underlying ozonated water intra-articular injection in modulating miR-214-3p to alleviate cartilage damage in knee osteoarthritis rats via the nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 74-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.008

基于 NF- κ B 信号通路探索臭氧水关节腔注射调控 miR-214-3p 对 KOA 大鼠软骨损伤的作用机制

刘 敏¹, 李玮琦¹, 窦慧茹¹, 周友龙^{1,2*}

(1.河南中医药大学,郑州 450002;2.河南中医药大学国际教育学院,郑州 450003)

【摘要】 目的 基于 miR-214-3p/NF- κ B 信号通路探索臭氧水关节腔注射对 KOA 大鼠软骨修复的作用机制,为臭氧水临床运用提供理论依据。**方法** 60 只雄性 SD 大鼠,随机分为空白组和实验组。实验组采用碘乙酸钠关节腔注射建立 KOA 大鼠模型后,随机分为模型组、臭氧水组、臭氧水+AAV-NC 组和臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组。治疗后,通过关节软骨表面大体评分、HE 染色、改良的 Mankin's 评分评价关节软骨修复状态;ELISA 法检测血清 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 的表达水平;RT-PCR 检测 IKK β 、p65、I κ B α 及 miR-214-3p 的 mRNA 表达;Western blot 检测各组软骨组织中 IKK β 、p65 及 p-I κ B α 蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比,其余各组大鼠均出现不同程度软骨损伤,臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组评分较臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组显著降低($P<0.05$);ELISA 结果显示,臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组在 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 含量上,相比于模型组及臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组显著降低($P<0.05$)。RT-PCR 结果显示,与模型组和臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比,臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组的大鼠软骨组织中 IKK β 和 p65 的 mRNA 表达水平明显下调,同时 I κ B α 的 mRNA 明显上调($P<0.05$)。Western blot 结果显示,与模型组和臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比较,臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组的大鼠软骨组织中,IKK β 、p65 及 p-I κ B α 的蛋白表达水平呈显著下调,相反,I κ B α 蛋白表达水平呈上调表现($P<0.05$)。**结论** 臭氧水关节腔注射显著改善了 KOA 大鼠的软骨损伤,其作用机制可能与 miR-214-3p 介导的 NF- κ B 信号通路抑制有关。

【关键词】 膝骨性关节炎;臭氧水;软骨修复;关节腔注射;miR-214-3p;NF- κ B 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0074-10

Mechanism underlying ozonated water intra-articular injection in modulating miR-214-3p to alleviate cartilage damage in knee osteoarthritis rats via the nuclear factor- κ B signaling pathway

[基金项目] 河南省特色骨干学科建设项目(STG-ZYX02-202115);河南省特色骨干中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020032)。

[作者简介] 刘敏(1990—),女,在读博士研究生,主治医师,研究方向:针刺镇痛方向机制研究。E-mail:604371961@qq.com

[通信作者] 周友龙(1966—),男,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:针刺镇痛方向机制研究。

E-mail:zhou_youlong@hactcm.edu.cn

LIU Min¹, LI Weiqi¹, DOU Huiru¹, ZHOU Youlong^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China.

2. School of International Education, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism underlying the effect of intra-articular injection of ozonated water on cartilage repair in knee osteoarthritis (KOA) rats via the miR-214-3p/nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway, to provide a theoretical basis for the clinical application of ozonated water. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats were divided randomly into ozonated and experimental groups. Rats in the experimental group were further divided randomly into model, ozonated water, ozonated water + AAV-NC, and adeno-associated virus with ozonated water+AAV-miR-214-3p inhibitor groups. The articular cartilage repair status was evaluated after the respective treatments, using articular cartilage surface gross scoring, hematoxylin/eosin staining, and modified Mankin's score. Expression levels of interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , and matrix metalloproteinase (MMP)-13 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protein expression levels of I κ B kinase (IKK) β , p65, and phospho (p)-I κ B α were detected in cartilage tissues by Western blot, and gene expression levels of IKK β , p65, I κ B α , and miR-214-3p were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Rats in all groups showed different degrees of cartilage damage compared with the control group, and the scores were significantly lower in the ozonated water and ozonated water+AAV-NC groups compared with the ozonated water+AAV-miR-214-3p inhibitor group ($P < 0.05$). IL-1 β , TNF- α , and MMP-13 levels detected by ELISA were significantly lower in cartilage tissues from rats in the ozonated water and ozonated water+AAV-NC groups compared with the model and ozonated water+AAV-miR-214-3p inhibitor groups ($P < 0.05$). According to RT-PCR, IKK β and p65 mRNA levels were significantly down-regulated while I κ B α mRNA was significantly up-regulated in cartilage tissues from rats in the ozonated water and ozonated water+AAV-NC groups compared with the model and ozonated water+AAV-miR-214-3p inhibitor groups ($P < 0.05$). Similarly, IKK β , p65, and p-I κ B α protein expression levels detected by Western blot were significantly down-regulated while I κ B α protein expression levels were up-regulated in cartilage tissues from rats in the ozonated water and ozonated water+AAV-NC groups compared with the model and ozonated water + AAV-miR-214-3p inhibitor groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Ozone hydrotherapy significantly ameliorated cartilage damage in KOA rats, possibly via inhibiting activation of the NF- κ B signaling pathway through up-regulation of miR-214-3p expression and promoting cartilage repair in KOA rats.

【Keywords】 knee osteoarthritis; ozonated water; cartilage repair; articular cavity injection; miR-214-3p; NF- κ B signaling pathway

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

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的慢性退行性关节疾病,具有高发病率和致残率的特点。其主要表现为关节软骨的破坏、关节腔内结构的变化以及关节功能的障碍。随着年龄的增长,膝关节的软骨逐渐退化,导致骨骼间的摩擦增加,最终可能引起关节疼痛、僵硬、肿胀等症状,给社会和家庭造成了极大的经济负担^[1-2]。臭氧水是一种将臭氧(O₃)气体溶解到水中形成的水溶液,通过其强氧化作用来减少关节炎症,促进软组织的修复和再生。团队经过多年的临床研究发现,臭氧水关节腔注射治疗KOA临床效果显著,具有起效快、疗程短的特点,后期随访疗效稳定,未见明显的副作用等特

点^[3-7]。但是,臭氧水关节腔注射治疗KOA的作用机制仍有待于进一步探索。

微小核糖核酸 RNA (microRNA, miRNA) 是长度 20~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA,它与蛋白质编码基因的信息配对,以靶向这些基因进行转录后沉默^[8]。研究表明 miRNAs 在软骨细胞发育和软骨稳态中发挥关键作用,有望成为治疗 KOA 的新靶点^[9-10]。有报道发现,miR-214-3p 在炎症诱导的软骨细胞和 OA 软骨中下调引发自发性软骨丢失,而 miR-214-3p 模拟剂可减轻 OA 小鼠的软骨退变^[11]。前期课题组实验研究表明,臭氧水关节腔注射能够有效调节 NF- κ B 信号通路的激活状态,通过减轻炎症反应促进软骨修

复^[4]。基于此,本研究旨在探讨 miR-214-3p 是否作为臭氧水关节腔注射通过抑制 NF- κ B 信号通路,进而促进软骨修复的潜在上游机制,以期为臭氧水关节腔注射的临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,60 只,3 月龄,体重(300 $\pm$ 20)g。购自济南鹏悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2022-0006],均饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2021-0005]。本实验获得河南中医药大学动物实验中心伦理委员会批准(IACUC202302018)。在实验过程中,严格遵循《实验动物管理条例》和《关于善待实验动物的指导性意见》,并全面实施 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(G1003,美国 Servicebio 公司);碘乙酸钠(CAS305-53-3,麦克林生化科技有限公司);IL-1 β ELISA、TNF- α ELISA 试剂盒(E-EL-R00012c、E-EL-R2856c,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);p65 抗体、IKK β 抗体、I κ B α 抗体(GTX102090、GTX105690、GTX110521,GENETEX);p-I κ B α 抗体(2859s, CST);GAPDH(GTX627408, GENETEX);HR 标记山羊抗兔二抗、HR 标记山羊抗鼠二抗(RS0001、RS0002, Immunoway);高效 RIPA 裂解液(R0010,北京索莱宝生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020,北京索莱宝生物科技有限公司);AAV-NC(0.3 mL 购自吉玛基因,产品批号:20230323,序列(5'-3'):TTCTCCGAA CGTGTACACGT);AAV-miR-214-3p inhibitor(1 mL 购自吉玛基因,产品批号:20230323,序列(5'-3'):CTGCCTGTCTGTGCCTGCTGT)。冷冻研磨机(武汉塞维尔生物科技有限公司,KZ-III-FP);高速离心机(北京大龙,D3024);高速组织研磨仪(武汉塞维尔,KZ-II);医用臭氧水制备仪(济南三氧科技有限公司,SYZ-80A);100 μ L 小动物专用进样针(Hamilton,Jan-55)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

适应性饲养 1 周后,采用 3%戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/100 g)对大鼠进行麻醉处理^[12]。大鼠

右膝周围的毛发修剪至暴露皮肤,并暴露膝关节周边区域。在无菌条件下,将大鼠右膝关节固定于 45°屈曲状态,使用微型注射器从关节腔进针,朝髌间窝方向穿刺。确认无血液回抽后,注射 50 μ L(每只 20 mg/mL)碘乙酸钠溶液^[13]。随后,使用无菌棉签按压注射点,以防药液外溢。注射后,密切监测大鼠的生命体征,并在 1 周后进行模型效果评估。

1.3.2 模型评价

碘乙酸钠溶液注射 1 周后,观察各组大鼠膝关节外观及行为学变化,初步判断大鼠一般行为学改变,随机抽取 4 只处死后充分暴露膝关节面,通过关节软骨肉眼观察,判断大鼠关节软骨面损伤情况,若造模组大鼠软骨面损伤明显,则初步判断造模成功。随后取关节软骨行 HE 染色,光镜下观察软骨病理形态变化,若造模组大鼠发生明显病理改变,则确认造模组大鼠成功建立了 KOA 模型。

1.3.3 实验分组及给药

按随机数字法将大鼠分为空白组、模型组、臭氧水(OW)组、臭氧水+AAV-NC(OW+AN)组、臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor(OW+AM)组。空白组和模型组仅进行抓取操作,不进行干预。臭氧水组在造模两周后,给予大鼠右膝关节腔注射臭氧水(浓度为 20 μ g/mL)0.2 mL^[4];后两组在造模 1 周后,分别向臭氧水+AAV-NC 组大鼠右膝关节腔注射 AAV-NC(滴度:6.60 $\times$ 10¹² V·G/mL)和臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组注射 AAV-miR-214-3p inhibitor(滴度:1.59 $\times$ 10¹¹ V·G/mL)。并于 1 周后,向右膝关节注射臭氧水,每周 1 次,连续两周。

1.3.4 HE 染色及改良的 Mankin's 评分

取关节软骨样本,用多聚甲醛固定 24 h 并在 10% EDTA(pH=7.4)中脱钙 21 d 后,将组织包埋在石蜡中并切成 5 μ m 厚的切片。以 200 μ m 的间隔从内侧和外侧隔室获得连续切片。选定的切片在二甲苯中脱蜡,通过一系列分级乙醇洗涤再水化,然后进行 HE 染色。Mankin's 评分法由两位评分员采用盲法独立评分,取平均数。

1.3.5 ELISA 方法检测大鼠血清中 TNF- α 、MMP-13 及 IL-1 β 的浓度

ELISA 方法检测血清中 TNF- α 、MMP-13 及

IL-1 β 的表达水平,按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.6 RT-PCR 检测关节软骨组织中各基因表达水平

RT-PCR 检测软骨组织 p65、IKK β 、I κ B α 的 mRNA 表达,以及 miR-214-3p 的表达水平。提取软骨组织 RNA 后,测定其浓度及纯度,逆转录后进行扩增。以 GAPDH 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算出 IKK β 、NF- κ Bp65 和 I κ B α 的 mRNA 的表达水平;以 U6 为内参,计算出 miR-214-3p 的表达水平。

1.3.7 Western blot 检测关节软骨组织中各基因表达水平

提取软骨组织蛋白并进行定量分析,经过电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育显影后,对胶片进行扫描,并以 GAPDH 为内参,对 I κ B α 、p-I κ B α 、IKK β 、p65 等蛋白的条带灰度值进行分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)计数。既服从正态分布又具有相等方差的数据

集,运用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析;多重比较,则采用 LSD 检验。若数据方差不均,用非参数检验法,即对多个独立样本进行 Kruskal-Wallis H 秩和检验。当 $P<0.05$ 时差异具有统计学意义。

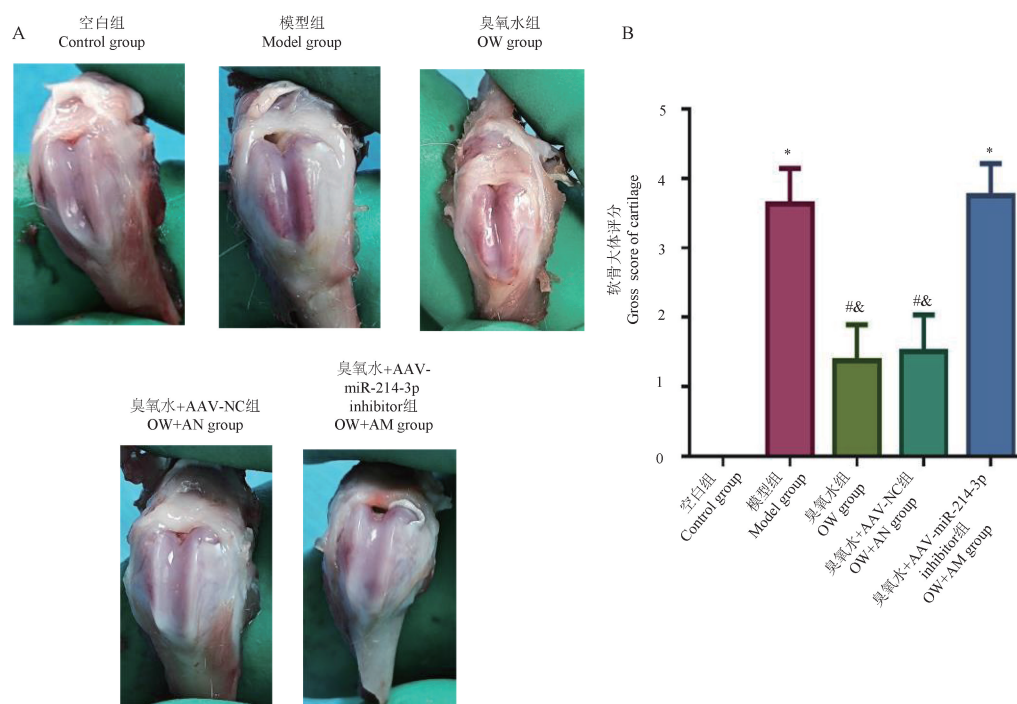
2 结果

2.1 一般健康状况观察

空白组大鼠展现出良好的活力与食欲,体重增长迅速,体形圆润,毛发浓密有光泽,活动敏捷,活动量较大。模型组及臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组精神萎靡、饮食减少、毛发发黄并稀疏,蜷缩角落。明显可见其右膝肿胀、跛行及频繁自舔行为。臭氧水及臭氧水+AAV-NC 治疗后,大鼠食欲有所恢复,精神状态提升,关节肿胀显著改善,恢复常规活动。

2.2 软骨表面观察及评分

如图 1 所示,空白组大鼠软骨表面平滑、光泽,关节液清澈。模型组与臭氧水+AAV-miR-



注:A:软骨表面观察;B:软骨表面大体评分。与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比,& $P<0.05$ 。

图1 关节软骨表面观察及大体评分

Note. A, Examination of the articular cartilage surface. B, Macroscopic scoring of the cartilage surface. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the OW+AM group, & $P<0.05$.

Figure 1 Macroscopic observation and scoring of the articular cartilage surface

214-3p inhibitor 组软骨表面均出现严重糜烂缺损,软骨颜色灰白,关节液量减少,颜色浑浊;臭氧水组与臭氧水+AAV-NC 组软骨表面显著修复,光滑平整,关节液趋向正常,软骨色泽透明度增加。软骨表面评分结果显示,空白组评分为“0”,显著低于其余 4 组 ($P<0.05$);与模型组相比,臭氧水及臭氧水+AAV-NC 组的大鼠关节软骨表面的评分明显降低 ($P<0.05$);与臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠软骨表面评分显著升高 ($P<0.05$)。

2.3 软骨组织病理变化及评价

2.3.1 HE 染色结果

与空白组相比,模型组与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠软骨细胞排列混乱,均出现严重软骨损伤;与模型组相比,臭氧水组及臭氧水+AAV-NC 组大鼠软骨较完整,浅层虽略粗糙,但细胞分布较均匀,数量有所增长,基质染色接近正常水平,基线保持较好的完整性,提示软骨修复迹象。与臭氧水组及臭氧水+AAV-NC 组大鼠相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠软骨细胞排列混乱,软骨形态损伤严重,提示敲低 miR-214-3p 的表达阻断了臭氧水对软骨

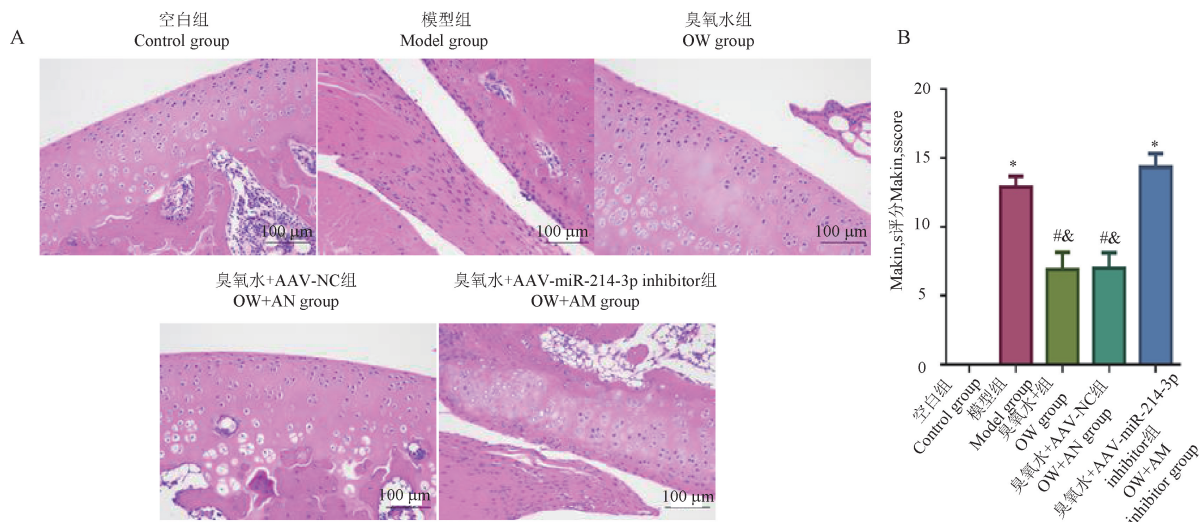
损伤的修复作用(见图 2)。

2.3.2 软骨 Mankin's 评分

软骨 Mankin's 评分用于评价软骨损伤程度。Mankin's 评分结果表明,空白组评分为“0”,显著低于其余 4 组 ($P<0.05$);与模型组相比,臭氧水及臭氧水+AAV-NC 组的大鼠 Mankin's 评分显著降低 ($P<0.05$),表明臭氧水关节腔注射能有效促进受损关节软骨的修复;与臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠软骨 Mankin's 评分显著升高 ($P<0.05$),表明敲低 miR-214-3p 的表达阻断了臭氧水对软骨损伤的修复作用(见图 2)。

2.4 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 含量

ELISA 结果表明,与空白组相比,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-13 含量显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,臭氧水及臭氧水+AAV-NC 组的大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-13 的含量显著下调 ($P<0.05$);与臭氧水组及臭氧水+AAV-NC 组相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠血清中指标的含量显著升高 ($P<0.05$),表明 AAV-miR-214-3p inhibitor 显著削弱了臭氧水的抗炎作用(见图 3)。



注:A:软骨 HE 染色结果;B:软骨 Mankin's 评分。与空白组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比, & $P<0.05$ 。

图 2 软骨组织 HE 染色以及 Mankin's 评分结果

Note. A, HE staining results of cartilage. B, Mankin's scoring of cartilage. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the OW+AN group, & $P<0.05$.

Figure 2 HE staining of cartilage tissue and Mankin's scoring results

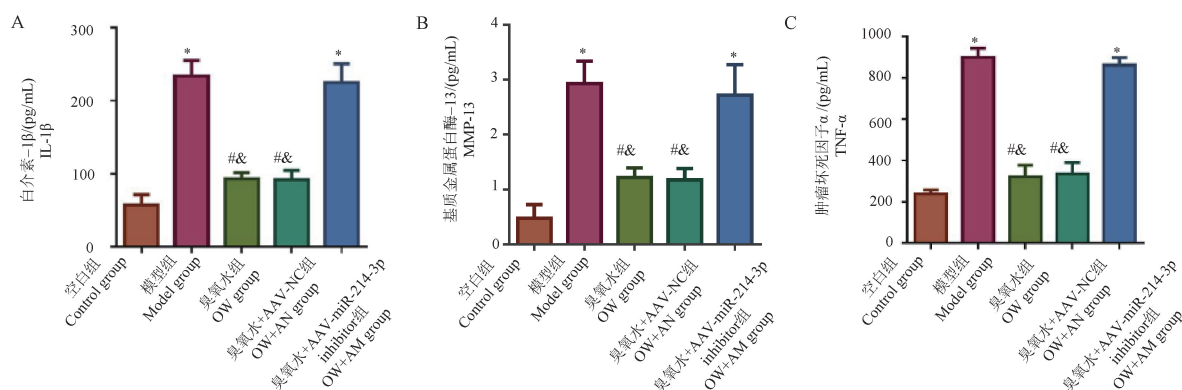
2.5 RT-PCR 检测结果

如图 4 RT-PCR 结果显示,与空白组相比,模型组大鼠软骨组织中 IKK β 、p65 的 mRNA 显著上升($P<0.05$),而 I κ B α 的 mRNA 及 miR-214-3p 的表达水平显著下降($P<0.05$);与模型组相比,臭氧水及臭氧水+AAV-NC 组大鼠的软骨组织中 IKK β 及 p65 的 mRNA 表达水平显著下调,而 I κ B α 的 mRNA 及 miR-214-3p 表达水平则呈上调趋势($P<0.05$);与臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大

鼠软骨组织中 p65 和 IKK β 的 mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$),而 I κ B α 的 mRNA 及 miR-214-3p 表达水平则呈下调趋势($P<0.05$)。

2.6 软骨组织中 p-I κ B α 、I κ B α 、p65、IKK β 的蛋白表达

如图 5 所示,与空白组相比,其余 4 组软骨组织内,IKK β 、p65 及 p-I κ B α 蛋白的表达量显著增加,而 I κ B α 的蛋白表达水平显著减少($P<0.05$),表明 KOA 时,NF- κ B 信号通路被广泛激活。与模型组相比,臭氧水组及臭氧水+AAV-NC 组的大鼠

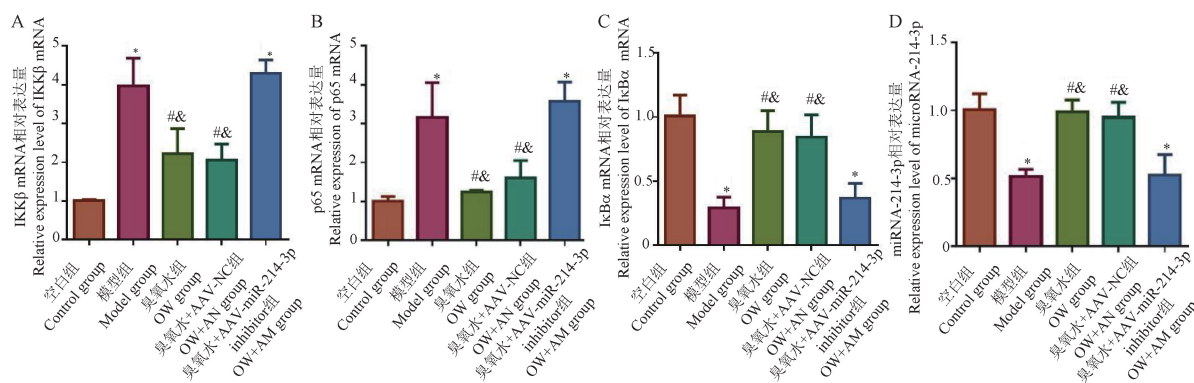


注:A:血清中 IL-1 β 含量;B:血清中 MMP-13 含量;C:血清中 TNF- α 含量。与空白组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比, & $P<0.05$ 。

图 3 血清中 IL-1 β 、MMP-13 及 TNF- α 含量

Note. A, Serum IL-1 β level. B, Serum MMP-13 level. C, Serum TNF- α level. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the Ozone water + AAV-miR-214-3p inhibitor group, & $P<0.05$.

Figure 3 Content of IL-1 β , MMP-13, and TNF- α in the serum

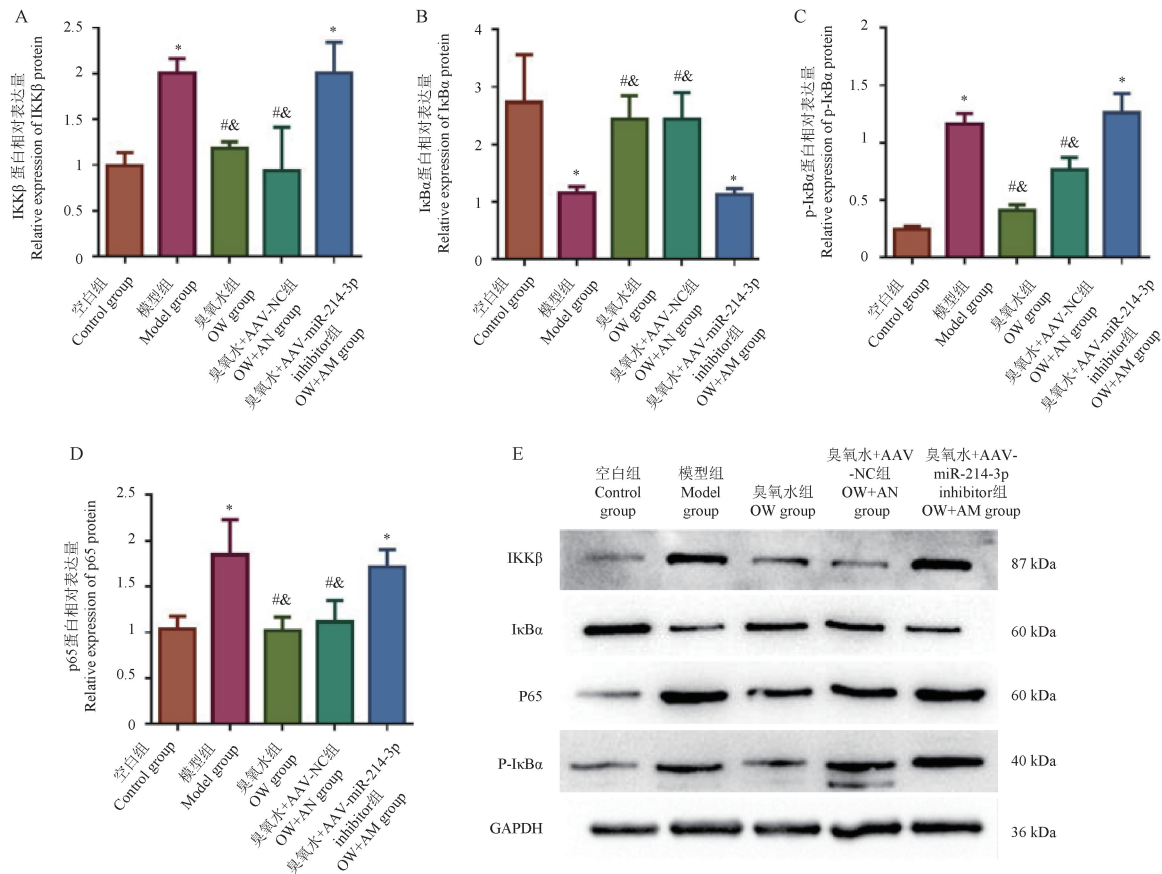


注:A:IKK β mRNA 相对表达量;B:p65 mRNA 相对表达量;C:I κ B α mRNA 相对表达量;D:miR-214-3p 相对表达量。与空白组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比, & $P<0.05$ 。

图 4 软骨组织 IKK β 、I κ B α 、p65 的 mRNA 及 miR-214-3p 的表达水平

Note. A, Relative expression level of IKK β mRNA. B, Relative expression level of P65 mRNA. C, Relative expression level of I κ B α mRNA. D, Relative expression level of miR-214-3p. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the Ozone water + AAV-miR-214-3p inhibitor group, & $P<0.05$.

Figure 4 Expression levels of IKK β , I κ B α , p65 mRNA and miR-214-3p in cartilage tissues



注:A:IKK β 的蛋白表达水平;B:I κ B α 的蛋白表达水平;C:p-I κ B α 的蛋白表达水平;D:p65 的蛋白表达水平;E:软骨组织中 IKK β 、I κ B α 、p-I κ B α 及 p65 的蛋白表达代表图。与空白组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组相比, & $P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测软骨组织中蛋白表达

Note. A, Protein expression level of IKK β . B, Protein expression level of I κ B α . C, Protein expression level of p-I κ B α . D, Protein expression level of p65. E, Representative images of IKK β , I κ B α , p-I κ B α , and p65 protein expression in cartilage tissue. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the OW+AM group, & $P<0.05$.

Figure 5 Protein expression in cartilage tissue was analyzed by Western blot

蛋白表达中,I κ B α 蛋白表达水平上调显著($P<0.05$),而 p-I κ B α 、p65 及 IKK β 蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$),这表明臭氧水疗法可显著抑制 NF- κ B 信号通路激活,与臭氧水组和臭氧水+AAV-NC 组相比,臭氧水+AAV-miR-214-3p inhibitor 组大鼠软骨组织中 I κ B α 蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),而 p-I κ B α 、p65 和 IKK β 蛋白的表达水平显著上调($P<0.05$),表明 AAV-miR-214-3p inhibitor 能够显著削弱臭氧水抑制 NF- κ B 信号通路激活的作用。

3 讨论

KOA 是以进行性关节软骨退变为核心病理特征,常伴继发性骨赘形成^[14-15]。随着年龄的增

长、过度使用或外伤,关节软骨逐渐变薄,结构发生变化,最终导致软骨的丧失。软骨的退化加剧了骨骼之间的摩擦,增加了关节的负担,造成持续的炎症反应和疼痛。同时,软骨损伤易引发关节内微环境的改变,其中炎症因子的释放是关键环节之一,这些炎症因子不仅会刺激软骨细胞代谢异常,导致软骨基质的合成与分解失衡,同时影响滑膜及周围组织,产生疼痛、肿胀等症状,是 KOA 发病和病情进展的关键因素^[14,16]。臭氧水关节腔注射因其安全高效且无毒副作用的优势,临床应用广泛。本研究通过构建 KOA 大鼠模型,利用关节软骨大体评分、软骨 Mankin's 评分、HE 染色等方法,证实了臭氧水关节腔注射能够有效改善 KOA 大鼠软骨关节形态。

在正常生理状态下,软骨细胞维持着软骨组织的稳态。但在机械应力或炎症因子等损伤因素刺激下,其代谢平衡被打破^[17]。一方面,软骨细胞会出现过度分泌分解代谢酶,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs),这些酶会降解细胞外基质成分。另一方面,软骨细胞合成细胞外基质成分如胶原蛋白和蛋白聚糖的能力下降,导致软骨修复能力减弱^[14,18]。关节软骨的破坏使得软骨失去正常的物理特性更易受损,受损的细胞外基质会进一步刺激周围软骨细胞产生炎症反应,形成恶性循环,推动 KOA 的病情进展。本研究结果表明,臭氧水关节腔注射治疗,能够显著降低 KOA 大鼠软骨组织中炎症因子的表达,减少软骨细胞 MMPs 的分泌,避免软骨细胞外基质过度降解,恢复细胞外基质合成与分解的平衡,进一步促进软骨的修复。

NF- κ B 信号通路在调节免疫应答、细胞增殖、凋亡以及炎症反应中起着至关重要的作用,该通路的异常激活是 KOA 疾病进展的关键因素之一^[19]。激活后的 NF- κ B 会促进多种炎症因子(如 IL-1 β 、TNF- α)的表达并进一步招募炎症细胞,如单核细胞、淋巴细胞等进入关节腔,加剧炎症反应^[20]。在关节腔内,炎症细胞会释放更多的活性氧和蛋白酶,破坏软骨细胞和细胞外基质。同时,在软骨损伤过程中,激活的 NF- κ B 可以上调一些促凋亡基因的表达,导致软骨细胞凋亡,使软骨损伤进一步恶化^[21]。此外,当 NF- κ B 被激活后,MMPs 的表达增加,加速细胞外基质的分解,导致软骨的弹性和抗压性下降,也是软骨损伤的发生和发展的重要环节之一^[22]。研究发现,臭氧水关节腔注射能够有效地调节 NF- κ B 信号通路的激活,抑制进入细胞核的 NF- κ B 前体蛋白的磷酸化和降解过程,从而减少其在核内的活性^[4]。正如本研究结果所示,臭氧水关节腔注射后 KOA 大鼠软骨组织中 p-I κ B α 、p65、IKK β 的基因和蛋白表达显著降低,I κ B α 的基因和蛋白表达显著上升,提示了关节腔注射臭氧水能够通过抑制 NF- κ B 的经典下游信号通路,改善因炎症反应导致的 KOA 软骨损伤。

值得注意的是,miRNAs 的调控作用与经典炎症通路存在紧密关联。miRNAs 是内源基因编码的小分子非编码 RNA,通过靶向结合并破坏靶

mRNA 的稳定或抑制其翻译来调节靶基因的表达,在 KOA 发病机制中扮演着关键角色^[23]。WANG 等^[24]的研究揭示,在 OA 患者体内,出现多个 miRNAs 的异常表达,通过调节基因的表达,影响骨关节炎的发展。其中,miR-214-3p 的表达水平可以影响炎症反应的程度和持续时间,参与调节软骨损伤的退变进程。研究表明,miR-214-3p 对软骨组织具有较高的特异性,其异常表达可导致骨和软骨发育障碍,进而导致 OA 的发生。CAO 等^[25]研究发现,与 IL-1 β 一起孵育的软骨细胞中,miR-214-3p 的表达降低。且来自人类 OA 患者的关节软骨未受损区域相比,受损软骨组织中 miR-214-3p 的表达下调。CAO 等^[25]研究进一步表明,在关节内注射 miR-214-3p 模拟剂可通过靶向 IKK β 能够显著抑制 NF- κ B 通路的激活,减轻滑膜炎状态,减少细胞凋亡和分解代谢的软骨生成过程。此外,在使用 IL-1 β 诱导的 KOA 细胞中,用 miR-214-3p 特异性模拟剂瞬时转染细胞,致使 miR-214-3p 过表达,能够部分逆转 IL-1 β 诱导的细胞凋亡和细胞外基质降解,并抑制 NF- κ B 信号通路的活化,减少炎症因子的释放,从而缓解关节炎症反应,改善患者的症状。这些研究结果为靶向 miR-214-3p/IKK β /NF- κ B 轴提供了理论基础。因此,本研究深入探究了 miR-214-3p 与 NF- κ B 信号通路的关系发现臭氧水关节腔注射可上调 KOA 大鼠软骨组织中 miR-214-3p 表达,抑制 NF- κ B 信号通路中关键分子 IKK β 的活性,降低炎症因子产生与释放,促进组织修复与再生。此外,对 KOA 大鼠进行 AAV-miR-214-3p inhibitor 干预后,NF- κ B 信号通路被激活,炎症因子产生与释放增加,臭氧水的治疗效果被部分抑制。

综上所述,本研究首次揭示臭氧水可通过 miR-214-3p/IKK β /NF- κ B 轴调控软骨代谢,拓展了其多靶点治疗机制的认识,通过深入探究 miR-214-3p 的作用机制,为开发新的 KOA 治疗策略提供重要理论基础,有望为 KOA 患者提供更加有效的临床治疗方案。尽管本研究揭示了 miR-214-3p 的关键介导作用,但臭氧水调控 miRNA 表达的具体上游机制(如是否涉及 DNA 甲基化或组蛋白修饰等表观遗传调控)仍需进一步探索。未来研究将进一步阐明 miR-214-3p 在 KOA 中的具体作

用机制,以及臭氧水关节腔治疗与 miR-214-3p 之间的相互作用关系,为 KOA 治疗提供更多科学依据。

参考文献:

- [1] ZHOU R, FU W, VASYLYEV D, et al. Ion channels in osteoarthritis: emerging roles and potential targets [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2024, 20(9): 545–564.
- [2] ZUO G, ZHUANG P, YANG X, et al. Regulating chondro-bone metabolism for treatment of osteoarthritis *via* high-permeability micro/nano hydrogel microspheres [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(5): e2305023.
- [3] 丁小芬, 周友龙, 田明月, 等. 臭氧水疗法对 KOA 大鼠关节软骨及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(5): 1167–1171.
- DING X F, ZHOU Y L, TIAN M Y, et al. Effects of ozone water therapy on articular cartilage and Wnt/ β -catenin signaling pathway in KOA rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(5): 1167–1171.
- [4] 田明月, 丁小芬, 韩松辰, 等. 臭氧水对膝关节骨关节炎关节软骨修复作用及对 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41(23): 1717–1725.
- TIAN M Y, DING X F, HAN S C, et al. Ozone water promotes articular cartilage repair in knee osteoarthritis and affects the NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Orthop*, 2021, 41(23): 1717–1725.
- [5] 刘敏, 白爽, 杨倩, 等. 臭氧水关节腔注射通过调节炎症和氧化应激促进大鼠膝关节软骨损伤后修复 [J]. *中医骨伤科杂志*, 2024, 32(4): 13–17, 23.
- LIU M, BAI S, YANG Q, et al. Study of injection of ozone water into joint cavity in promoting the repair of knee cartilage injury in rats by regulating inflammation and oxidative stress [J]. *Chin J Tradit Med Traumatol Orthop*, 2024, 32(4): 13–17, 23.
- [6] 白爽, 刘敏, 杨倩, 等. 臭氧水穴位注射联合腔内冲洗对膝骨性关节炎患者疼痛及相关因子的影响 [J]. *重庆医学*, 2024, 53(19): 2965–2969.
- BAI S, LIU M, YANG Q, et al. Effects of acupoint injection of ozone water combined with intracavitary irrigation on pain and related factors in patients with knee osteoarthritis [J]. *Chongqing Med*, 2024, 53(19): 2965–2969.
- [7] 田明月, 陈云杰, 丁小芬, 等. 基于 rs-fMRI 技术探讨臭氧水对膝骨性关节炎疼痛患者镇痛作用的中枢机制 [J]. *磁共振成像*, 2021, 12(1): 53–58.
- TIAN M Y, CHEN Y J, DING X F, et al. Using rs-fMRI technology to investigate the central mechanism of analgesic effect of ozone water in patients with knee osteoarthritis pain [J]. *Chin J Magn Reson Imaging*, 2021, 12(1): 53–58.
- [8] BILLI M, DE MARINIS E, GENTILE M, et al. Nuclear miRNAs: gene regulation activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 6066.
- [9] AN F, SUN B, LIU Y, et al. Correction to: Advances in understanding effects of miRNAs on apoptosis, autophagy, and pyroptosis in knee osteoarthritis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2024, 299(1): 4.
- [10] YIN Y, HE Q, HE J, et al. Inhibition of LINC00958 hinders the progression of osteoarthritis through regulation of the miR-214-3p/FOXO1 axis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 66.
- [11] FIORAVANTI A, TENTI S, CHELESCHI S. miR-214-3p, a novel possible therapeutic target for the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *EBioMedicine*, 2021, 66: 103300.
- [12] 任周新, 赵鹏, 李建生. 烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(8): 27–36.
- REN Z X, ZHAO P, LI J S. Evaluation of the pulmonary arteriopathy induced in rats by the combination of smoke exposure and *Klebsiella* infection [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(8): 27–36.
- [13] SUN J, SONG F H, WU J Y, et al. Sestrin2 overexpression attenuates osteoarthritis pain *via* induction of AMPK/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis and suppression of neuroinflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 102: 53–70.
- [14] YAO Q, WU X, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 56.
- [15] DENG R, ZHAO R, ZHANG Z, et al. Chondrocyte membrane-coated nanoparticles promote drug retention and halt cartilage damage in rat and canine osteoarthritis [J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(735): eadh9751.
- [16] LI M, YIN H, YAN Z, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair [J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 23–42.
- [17] DIEKMAN B O, LOESER R F. Aging and the emerging role of cellular senescence in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32(4): 365–371.
- [18] HU Q, ECKER M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1742.
- [19] CAPECE D, VERZELLA D, FLATI I, et al. NF- κ B: blending metabolism, immunity, and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2022, 43(9): 757–775.
- [20] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469.
- [21] GUO Z, LIN J, SUN K, et al. Deferoxamine alleviates

- osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis and activating the Nrf2 pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 791376.
- [22] CHEN R, LI X, SUN Z, et al. Intra-bone marrow injection of magnesium isoglyrrhizinate inhibits inflammation and delays osteoarthritis progression through the NF- κ B pathway [J]. J Orthop Surg Res, 2022, 17(1): 400.
- [23] SHI X, JIE L, WU P, et al. Calycosin mitigates chondrocyte inflammation and apoptosis by inhibiting the PI3K/AKT and NF- κ B pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297: 115536.
- [24] WANG X, NING Y, ZHOU B, et al. Integrated bioinformatics analysis of the osteoarthritis-associated microRNA expression signature [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1833-1838.
- [25] CAO Y, TANG S A, NIE X, et al. Decreased miR-214-3p activates NF- κ B pathway and aggravates osteoarthritis progression [J]. EBioMedicine, 2021, 65: 103283.
- [收稿日期] 2025-03-11

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R

国际刊号 ISSN 1671-7856

邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!