

· 论 著 ·

整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在 Hartley 豚鼠自发性骨关节炎关节软骨退变中的作用研究*

李 远¹, 李 忠², 刘俊才^{2△}

(1. 遂宁市中心医院骨科中心三病区-关节外科, 四川 遂宁 629000; 2. 西南医科大学附属医院骨科/四川省骨科植入器械研发应用技术工程实验室, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 观察豚鼠原发性骨关节炎(OA)模型中疾病进展的相关病理改变,探究整合素 $\alpha 5\beta 1$ 对 OA 的关节软骨退变的初步作用,为 OA 的治疗提供参考。**方法** 选取 3 周龄的 SPF 级 Hartely 雌性豚鼠 24 只,进行 1 周的适应性喂养并记录初始体重后对其进行编号,然后采用随机分配法将 24 只豚鼠分为基线组、对照组、ATN-161 治疗组、盐水治疗组 4 组,每组 6 只。其中基线组豚鼠在实验开始时处死,对照组豚鼠正常饲养 3 月龄时处死,ATN-161 豚鼠在正常饲养 3 个月月开始予以 ATN-161 腹腔注射 1 mg/(kg·3 d)直至 3 个月处死,生理盐水治疗组豚鼠在正常饲养 3 个月月开始予以生理盐水腹腔注射 1 mg/(kg·3 d)直至 3 个月处死。取所有处死豚鼠的膝关节软骨标本,对其进行苏木精-伊红(HE)染色,观察并使用 Mankin 评分评估软骨退变程度;记录免疫组织化学染色分析力学传导分子(整合素 $\alpha 5\beta 1$)、氧化应急指标观察[基质金属蛋白酶(MMP)-13]以及细胞凋亡指标(Bax、bcl-2)在软骨中的表达情况。**结果** HE 染色组织学和 Mankin 评分结果显示,对照组豚鼠在 3 月龄时即发生了 OA 样改变,并且随着月龄的增长退变逐渐加重,通过 ATN-161 治疗后,ATN-161 治疗组在 6 月龄时 Mankin 评分明显降低($P < 0.05$)。免疫组化结果证实, $\alpha 5\beta 1$ 的表达在基线组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),之后随着月龄的增加,生理盐水治疗组中整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的表达高于对照组($P < 0.05$);与生理盐水治疗组比较,ATN-161 组治疗后能明显降低整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的表达($P < 0.05$);随着豚鼠月龄的增加,MMP-3 在软骨中的表达增多,对照组明显高于 BL 组,生理盐水组显著高于对照组($P < 0.05$);细胞凋亡(Bax、bcl-2)免疫组化指标均显示:基线组、对照组、ATN-161 治疗组三组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 Bax 在对照组中表达量最低,基线组中最高,ATN-161 组表达量明显高于生理盐水治疗组($P < 0.05$)。此外,bcl-2 在对照组表达量最高,基线组中最低,ATN-161 治疗组表达量明显低于生理盐水治疗组($P < 0.05$)。**结论** 3 月龄 DH 豚鼠即具有 OA 表现且退变随着年龄的增长进行性加重。腹腔注射 ATN-161[1 mg/(kg·3 d)]可通过抑制软骨内力学传导(整合素 $\alpha 5\beta 1$)、氧化应急速度下降(MMP-13 下调)、细胞凋亡指标 Bax 上调、bcl-2 下调阻止关节软骨的退变,表明 ATN-161 可能是针对整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的一种潜在治疗药物。

[关键词] 整合素 $\alpha 5\beta 1$; 豚鼠; 骨关节炎; 软骨

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.18.005 中图分类号:R684.3

文章编号:1009-5519(2023)18-3082-07 文献标识码:A

Role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in articular cartilage degeneration of spontaneous osteoarthritis in Hartley guinea pig*

LI Yuan¹, LI Zhong², LIU Juncai^{2△}

(1. Department of Joint Surgery, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629099, China;

2. Department of Orthopaedics, The Affiliated Hospital of Southwest Medical

University/Sichuan Orthopaedic Placement Devices R&D and Application

Technology Engineering Laboratory, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the pathological changes related to disease progression in guinea pig primary osteoarthritis (OA) model, and to explore the preliminary effect of integrin $\alpha 5\beta 1$ on articular cartilage degeneration of OA, so as to provide reference for the treatment of OA. **Methods** A total of 24 SPF-rated Hartely female guinea pigs aged three weeks were selected for adaptive feeding for a week and numbered after

* 基金项目:西南医科大学自然科学基金(青年)资助项目(2018-ZRQN-122)。

作者简介:李远(1995-),硕士研究生,医师,主要从事关节镜与运动医学相关研究。△ 通信作者, E-mail:ljc125520@163.com。

their initial weight was recorded. Then, the 24 guinea pigs were randomly divided into the baseline group, the control group, the ATN-161 treatment group, and the normal saline treatment group, with six in each group. The guinea pigs in the baseline group were killed at the beginning of the experiment, the guinea pigs in the control group were killed at three months of normal feeding, the guinea pigs in the ATN-161 were given intraperitoneal injection of 1 mg/(kg · 3 d) ATN-161 after three months of normal feeding until three months of death, and the guinea pigs in the normal saline treatment group were given intraperitoneal injection of 1 mg/kg/3d normal saline after normal feeding for three months until they were killed after three months. Samples of knee cartilage from all the executed guinea pigs were stained with hematoxylin-eosin (HE), and the degree of cartilage degeneration was observed and evaluated by Mankin score. The expressions of mechanical-conduction molecules (integrin $\alpha 5\beta 1$), oxidative emergency index observation (MMP-13) and apoptosis index (Bax, bcl-2) in cartilage were recorded by immunohistochemical staining. **Results** HE staining histology and Mankin score showed that OA-like changes occurred in guinea pigs in the control group at the age of three months, and the degeneration gradually worsened with the increase of age. After treatment with ATN-161, the ATN-161 treatment group significantly reduced Mankin score at six months of age ($P < 0.05$). Immunohistochemical results confirmed that there was no significant difference in $\alpha 5\beta 1$ expression between the baseline group and the control group ($P > 0.05$). After that, with the increase of months, the expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ in the normal saline treatment group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the saline treatment group, the ATN-161 group significantly decreased the expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ after treatment ($P < 0.05$). With the aging of guinea pigs, the expression of MMP-3 in cartilage increased, and the control group was significantly higher than that in the BL group, and the normal saline group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical indexes of apoptosis (Bax, bcl-2) showed that there were statistically significant differences among the baseline group, control group and ATN-161 treatment group ($P < 0.05$). Among them, the expression of Bax was the lowest in the control group and the highest in the baseline group. The expression of Bax in the ATN-161 group was significantly higher than that in the normal saline group ($P < 0.05$), in addition, the expression level of bcl-2 was the highest in the control group and the lowest in the baseline group, and the expression level of ATN-161 treatment group was significantly lower than that of the normal saline treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** DH guinea pigs at three months of age have OA and the degeneration increases with age. Intrapitoneal injection of ATN-161 1 mg/(kg · 3 d) inhibited chondral mechanical conduction (integrin $\alpha 5\beta 1$), decreased oxidation emergency rate (MMP-13 down-regulation), and apoptosis index (Bax up-regulated, bcl-2 down-regulated) to prevent degeneration of articular cartilage. It is suggested that ATN-161 may be a potential therapeutic drug against integrin $\alpha 5\beta 1$.

[Key words] Integrin $\alpha 5\beta 1$; Guinea pig; Osteoarthritis; Cartilage

骨关节炎(OA)是骨科临床最常见的慢性关节疾病,会导致关节疼痛并增加患者的经济负担。由于OA的病因及发病机制目前尚不清楚,临床仅能以延缓进展、缓解症状及晚期矫正畸形、改善功能为治疗目的。因此,原发性OA的防治一直是医学领域研究的热点和难点问题^[1]。近期研究发现,阻断整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达时,有利于抑制大鼠视网膜炎症反应及血管增生,改善视网膜剥脱^[2]。 $\alpha 5\beta 1$ 在软骨细胞力学信号转导中的作用最为突出^[3]。KHALILI等^[3]研究发现,ATN-161是整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的拮抗剂,整合素 $\alpha 5\beta 1$ 来源于人纤连蛋白的协同域(PHSRN),其中半胱氨酸残基取代了原序列(PHSCN)中的精氨酸。一些研究表明,在几种肿瘤模型中,无论是作为单一药物还是与放疗联合使用,ATN-161都能抑制肿瘤的生

长、转移和延长患者生存期^[3-5]。虽然整合素 $\alpha 5\beta 1$ 在OA及关节软骨中的研究有不少报道,但其特异性拮抗剂ATN-161在膝OA及软骨退变中的研究在国内外还鲜见报道。据此,本研究拟观察不同月龄豚鼠原发性OA模型中疾病进展的相关病理改变,进一步研究ATN-16对OA的治疗效果及机制,从而为临床运用ATN-161治疗OA提供可靠的理论依据和技术支持。

1 资料与方法

1.1 实验动物分组 选取3周龄的SPF级Hartely雌性豚鼠24只,进行1周的适应性喂养并记录初始体重并对其进行编号,然后采用随机分配法将24只豚鼠随机分为基线组、对照组、ATN-161治疗组、生理盐水治疗组,每组6只。其中基线组的豚鼠在实验开始时处死,对照组的豚鼠正常饲养3个月龄时处死,

ATN-161 的豚鼠在正常饲养 3 个月后将开始予以 ATN-161 腹腔注射 1 mg/(kg · 3 d) 直至 3 个月后将处死,生理盐水治疗组的豚鼠在正常饲养 3 个月后将开始予以生理盐水腹腔注射 1 mg/(kg · 3 d) 直至 3 个月后将处死。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理 膝关节软骨标本的选取及组织蜡块制作:动物在预定处死时间用颈椎脱臼法处死。动物处死后马上在无菌条件下解剖暴露双后肢膝关节,肉眼大体观察关节面的色泽、光滑度、滑液性状及有无关节面破损并留取影像资料。依据 Outerbridge 标准,以锐利手术刀片在股骨内髁关节负重面同一区域切取软骨标本各 6 例,大小约 1 cm × 0.5 cm × 0.5 cm,将软骨标本置于 10% 中性甲醛溶液内固定 48 h,流水冲洗 2~3 h,混合酸脱钙液脱钙 24~48 h,直至大头针能轻松穿透标本,再流水冲洗 2~3 h,10% 中性甲醛溶液内固定 24 h 后,常规组织脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋,制成组织块备用。软骨标本苏木精-伊红(HE)及特殊染色,显微组织学观察,Mankin 评分及造模成功以及自发性骨关节为进行性判定:软骨组织块 3~5 μm 厚度全层垂直切片,HE 染色制片、番红-固绿与阿利新蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)特殊染色制片及显微镜下形态学观察,观察软骨表面是否规则、有无裂隙,细胞数量、分布、排列是否规则,特染着色部位、分布、均匀度及深浅。根据 Mankin 评分将软骨损伤(OA)组织病理学改变分为 4 期。正常软骨 0 分;轻度 OA 1~<6 分;中度 OA 6~<10 分;重度 OA 10~<15 分。

1.2.2 干预后 Hartely 豚鼠膝关节软骨的检测指标及方法

1.2.2.1 检测指标 大体形态学观察、HE 组织学观察、氧化应激指标观察[基质金属蛋白酶(MMP)-13]、力学传导(整合素 α5β1)、细胞凋亡(Bax、bcl-2)。检测方法:大体形态学观察:股骨内髁负重关节面的大体形态学改变,包括关节软骨的光滑度、色泽、表面是否有糜烂及溃疡、是否有纤维增生及边缘是否有骨赘形成。HE 组织学观察参照 Mankin 评分标准。血炎症、力学传导、血管生成、细胞凋亡指标观察参照 Chemicon 公司购买相应检测试剂盒检测结果评定标准。为了提高检测准确性,整合素 α5β1、Bax、bcl-2 的检测采用免疫组化方法。

1.2.2.2 免疫组织化学检测 采用免疫组化(SP)法染色,其中抗人整合素 α5β1 抗体 1:100 稀释,二甲联苯胺(DAB)室温下显微镜下调控显色。SP 法结果判定参照 Jacobs 评定方法,由 3 名病理专业高级职称医师独立读片,其评定误差控制在 5% 以内,取三者平均值作为最后判定结果;选取 5~10 个高倍视野(400×),计数每个视野中细胞总数、阳性细胞数及着

色程度,显微镜下胞浆或包膜有棕黄色颗粒为阳性细胞;用阳性细胞积分作为整合素 α5β1 的表达量。依照阳性细胞所占比例分为:0~<25% 记为弱阳性(+),25%~<50% 记为中等阳性(++),50%~100% 记为强阳性(+++)。依照细胞阳性着色程度(抗原含量)分为:弱阳性(+)记为 1 分,中等阳性(++)记为 2 分,强阳性(+++)记为 3 分。积分综合计量,积分=弱阳性(+)%×1+中等阳性(++)%×2+强阳性(+++)%×3,积分<1.0 者为(+),1.0~1.5 者为中等阳性(++),>1.5 者为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析。各组数据经过 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Bartlett 方差齐性检验后,利用单因素方差分析(ANOVA),LSD-*t* test 比较各组之间存在的差异。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

HE 染色组织学和 Mankin 评分结果显示,对照组豚鼠在 3 月龄时即发生了 OA 样改变,并且随着月龄的增长退变逐渐加重,确定造模成功。见表 1。组织学和 Mankin 评分结果发现(图 2、表 2),对照组豚鼠在 3 个月时即发生了 OA 样改变,并且随着年龄的增长退变逐渐加重,通过 ATN-161 治疗后,ATN-161 治疗组豚鼠在 6 月龄时 Mankin 评分分值明显减少($P < 0.05$)。SP 法结果证实,α5β1 的表达(图 2)在基线组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),之后随着月龄的增加。生理盐水组中整合素 α5β1 的表达高于对照组($P < 0.05$);与生理盐水组比较,ATN-161 组治疗后能明显降低整合素 α5β1 的表达($P < 0.05$);随着豚鼠年龄的增加,MMP-3 在软骨中的表达增多(图 3),对照组明显高于 BL 组,生理盐水组又显著高于对照组($P < 0.05$);细胞凋亡指标(Bax、bcl-2)(图 4、5)免疫组织化学指标均显示:基线组、对照组、ATN-161 治疗组三组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 Bax 在对照组表达量最低,基线组中最高,ATN-161 治疗组表达量明显高于对照组(NS 组)($P < 0.05$);此外,bcl-2 在对照组表达量最高,基线组中最低,ATN-161 治疗组表达量明显低于生理盐水治疗组($P < 0.05$)。见表 3、4。

表 1 豚鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s, g, n=8$)

组别	体重
基线组	302.35 ± 17.82
对照组	608.42 ± 37.65 ^a
生理盐水治疗组	794.87 ± 57.71 ^{ab}
ATN-161 治疗组	803.00 ± 52.29 ^{ab}

注:与基线组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 Mankin 评分结果 ($\bar{x} \pm s$, 分, $n=8$)

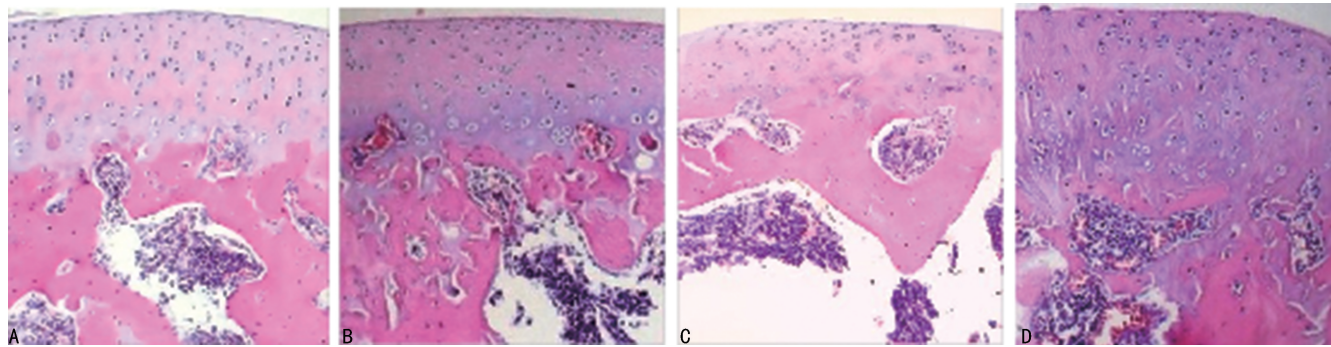
组别	分值
基线组	0.64 ± 0.07
对照组	3.26 ± 0.35 ^a
生理盐水治疗组	7.64 ± 0.87 ^{ab}
ATN-161 治疗组	4.05 ± 0.43 ^c

注:与基线组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与生理盐水治疗组比较,^c $P < 0.05$ 。

表 3 定量分析 $\alpha 5\beta 1$ 和 MMP-13 指标的免疫组化结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

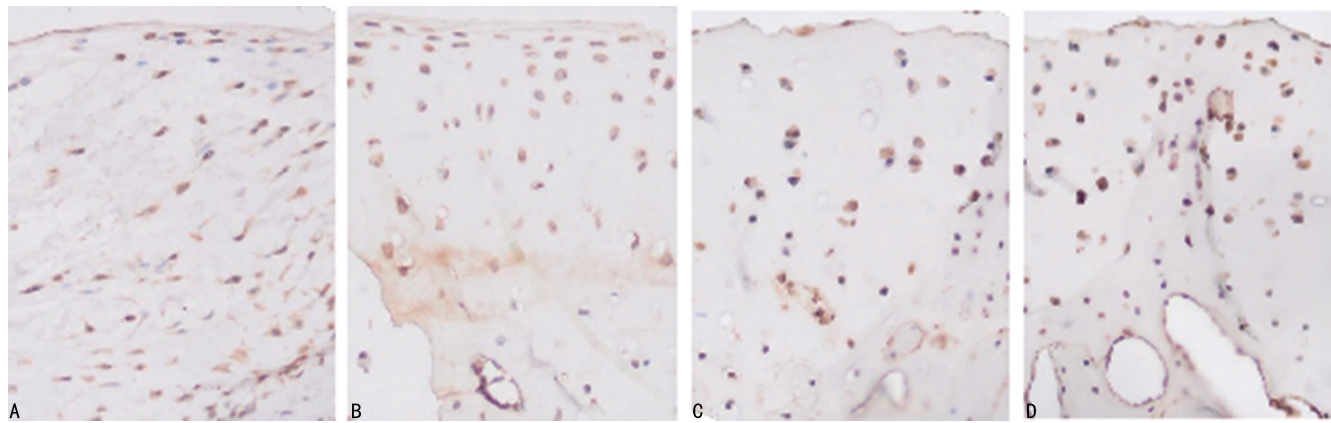
组别	$\alpha 5\beta 1$	MMP-13
基线组	467.32 ± 103.71	3 975.46 ± 987.35
对照组	1 004.01 ± 273.41 ^a	9 482.44 ± 2 690.45 ^a
生理盐水治疗组	3 563.73 ± 476.33 ^{ab}	2 535.986 ± 3 902.30 ^{ab}
ATN-161 治疗组	1 837.83 ± 374.18 ^c	12 973.38 ± 2 367.61 ^c

注:与基线组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与生理盐水治疗组比较,^c $P < 0.05$ 。



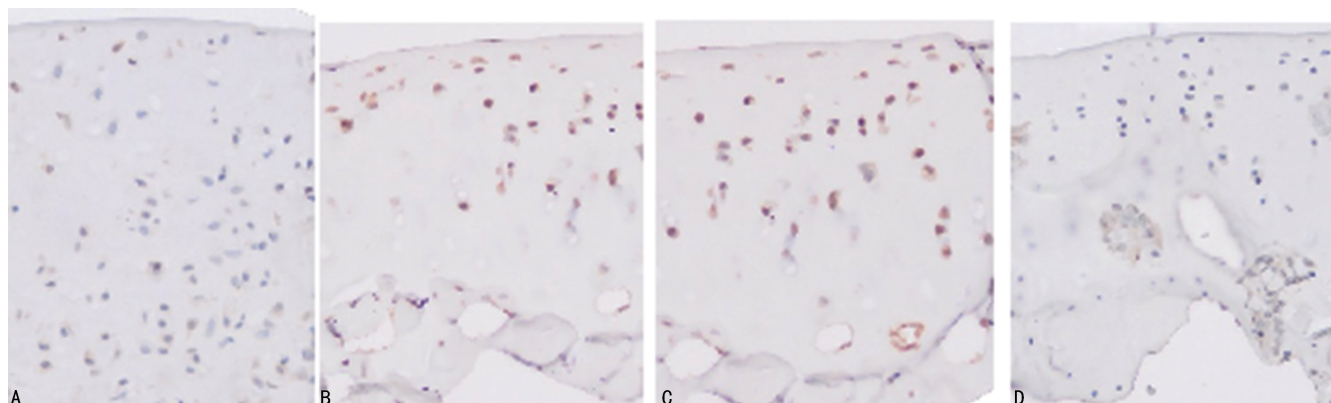
注:A.基线组膝关节软骨表面光滑、完整;B.对照组可见关节面稍微粗糙,软骨表面可见轻微的纤维化样改变;C.生理盐水治疗组关节面粗糙,不平整,软骨表面出现纤维化改变,切片中细胞排列紊乱,大小不均;D. ATN-161 治疗组部分区域关节面较为平整,表层及移行层内软骨细胞增多,胞体肿大。

图 1 关节软骨 HE 染色(200×)



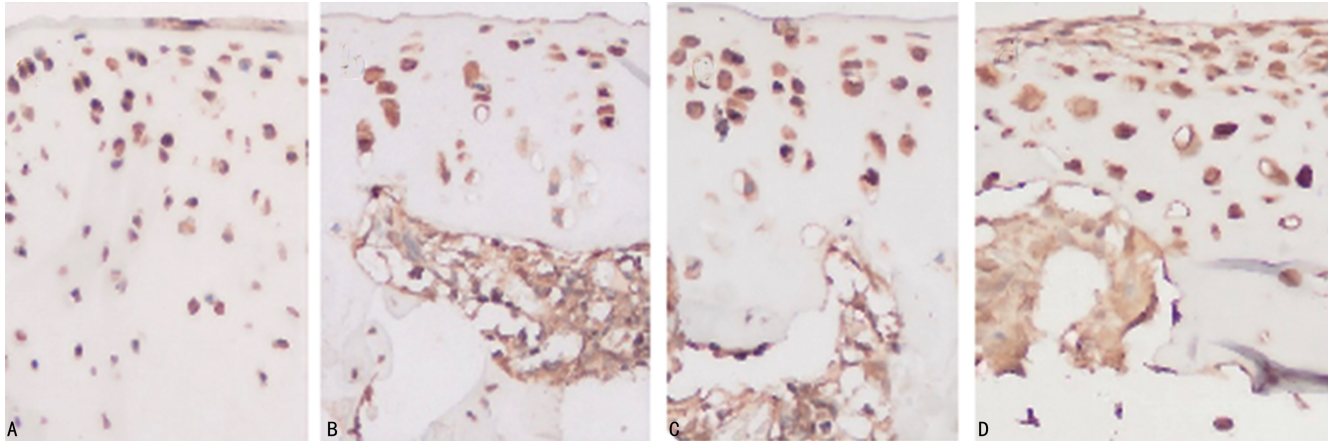
注:A.基线组 $\alpha 5\beta 1$ 表达较强,阳性细胞数量多,着色区域广、着色深;B.对照组 $\alpha 5\beta 1$ 着色区域、颜色较 BL 组都有所减少;C.生理盐水治疗组 $\alpha 5\beta 1$ 着色区域少颜色很浅;D. ATN-161 治疗组 $\alpha 5\beta 1$ 表达广泛,着色深。

图 2 关节软骨 $\alpha 5\beta 1$ 免疫组化(200×)



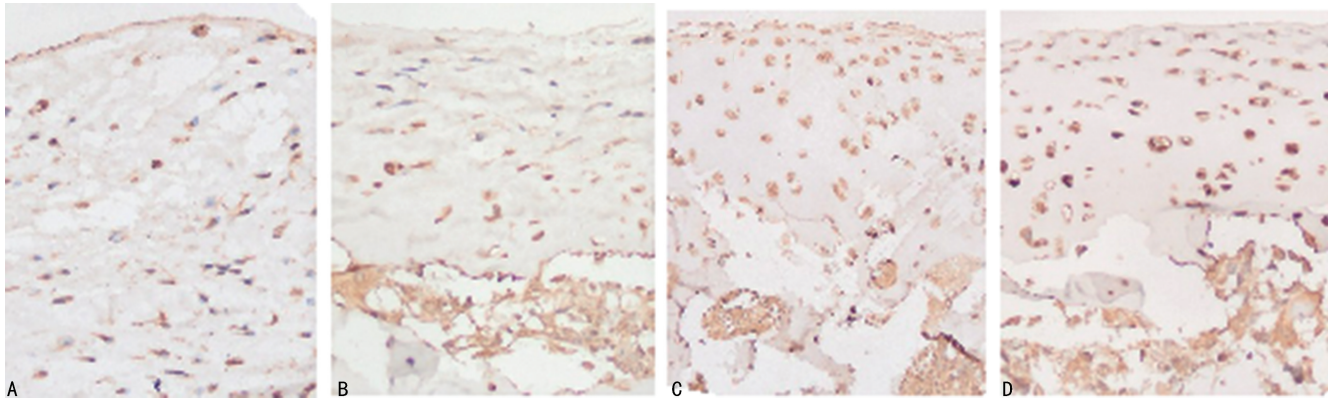
注:A.基线组 MMP-3 则基本无表达,着色区域小;B.对照组 MMP-3 着色区域、颜色较 BL 组都有所增加;C.生理盐水治疗组 MMP-3 表达广泛,颜色深;D. ATN-161 治疗组 MMP-3 在软骨浅层区域有表达,范围小,颜色浅。

图 3 关节软骨整合素 MMP-13 面免疫组化(200×)



注: A. 基线组; B. 对照组; C. 生理盐水治疗组; D. ATN-161 治疗组。

图 4 关节软骨 BXA 免疫组化结果(200×)



注: A. 基线组; B. 对照组; C. 生理盐水治疗组; D. ATN-161 治疗组。

图 5 关节软骨 Bcl-2 免疫组化结果(200×)

表 4 定量分析 BXA 和 Bcl-2 的免疫组化结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BXA	Bcl-2
基线组	2 846.32 ± 183.38	845.42 ± 395.52
对照组	1 683.54 ± 321.42 ^a	1 392.28 ± 4.37 ^a
生理盐水治疗组	653.98 ± 278.45 ^{ab}	2 439.48 ± 361.85 ^{ab}
ATN-161 治疗组	1 382.37 ± 382.36 ^c	1 295.33 ± 452.58 ^c

注:与基线组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与生理盐水治疗组比较,^c $P < 0.05$ 。

3 讨 论

OA 的特征是关节软骨进行性丧失,软骨下骨硬化和滑膜炎,是当今最常见的慢性疾病之一。因此 OA 动物模型的制作对于研究疾病的发生发展至关重要。Dunkin-Hartley(DH)豚鼠自发性骨关节炎模型在国内外文献中广泛报道^[6-8]。Hartely 豚鼠自发性 OA 模型的优点在于:(1)Hartely 豚鼠的 OA 随月龄的增加而逐渐加重,这在很大程度上避免了由手术方式、药物诱导造 OA 模型对实验本身的影响;(2)Hartely 豚鼠 OA 的膝关节软骨在形态学、影像学、生物化学等方面均与人类 OA 病理相似,这将更有利于

人类 OA 的研究。本实验采用 Hartely 豚鼠作为动物模型,有效模拟了人类 OA 的发生发展过程,为研究 ATN-161 对 OA 的软骨和软骨下骨的作用提供有效保障。本研究结果显示,随着豚鼠月龄的增长,体重逐渐增加,这与既往关于 DH 豚鼠制作骨关节炎模型的研究结论相吻合^[9-10],因此说明本实验成功复制了 OA 动物模型。ATN-161 是整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 的拮抗剂,能抑制肿瘤的生长、转移和延长生存期^[3-5]。既往研究表明,ATN-161 在抑制肿瘤血管生成和其他类型肿瘤转移中有重要作用,但在其特异性拮抗剂 ATN-161 在膝 OA 及软骨退变中的研究在国内外还鲜见报道。

WANG 等^[11]研究结果表明,软骨细胞自噬的功能可能至少部分涉及糖原的分解代谢。因此,在患有 OA 的豚鼠中,胫骨平台软骨细胞自噬水平降低,软骨细胞无法将细胞内糖原降解为葡萄糖,导致软骨细胞能量减少,细胞凋亡增加。大量研究表明,Notch 信号通路在调控软骨细胞增殖、分化,维持软骨表型及软骨基质代谢方面有重要作用。MOQBEL 等^[12]研究发现线粒体融合促进软骨祖细胞(CPSCs)的软骨形成分化。mitofusin 2(Mfn2)通过 Notch2 加速 CPSCs 的软骨形成分化。在体内,rCPSCs 片中的 Mfn2-

OE 改善了大鼠模型中的 OA。ZAMLI 等^[13] 研究认为,在 Hartely 豚鼠自发性骨关节炎模型中,骨关节炎病程进展同软骨细胞凋亡的增加有关。吴绍军等^[14] 研究发现,Notch 信号通路的激活与抑制可以通过凋亡途径改变 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达情况从而影响大鼠 OA 的进展。本研究中发现,ATN-161 组豚鼠关节软骨免疫组化结果也出现了凋亡指标 BXA 的下调和 Bcl-2 上调的变化,充分表明该阻断剂能在一定程度上减缓骨关节软骨退变速度,可抑制 Notch 信号通路发挥作用。有研究将 Notch 信号传导的下游效应物确定为疾病改善骨关节炎药物的潜在靶标^[15]。本研究表明,ATN-161 能对整合素 $\alpha 5\beta 1$ 起到直接的抑制作用,减少 MMP-13 的表达,减轻软骨的降解,下调 Bax 蛋白,上调 Bcl-2 蛋白,从而抑制软骨细胞凋亡,进而保护关节软骨,减缓关节软骨的退变速度。ATN-161 可能是一种骨关节炎治疗候选药物。

AMRUTA 等^[16] 通过 ATN-161 处理(10 $\mu\text{mol/L}$) 通过减少整合素 $\alpha 5$ 、MMP-9 和纤连蛋白的表达,以及通过减少线粒体超氧化物自由基、细胞内 ROS、炎症来减少氧化应激,有效抑制 OGD/R 诱导的细胞外基质(ECM)沉积通过减少 NLRP3 炎性体,通过降低 claudin-5 和 ZO-1 表达水平导致紧密连接丢失,通过抑制线粒体去极化导致线粒体损伤,通过调节磷酸化黏着斑激酶(p-FAK)和磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)水平导致细胞凋亡。SUN 等^[17] 研究表明,咖啡酸苯乙酯(CAPE)增加聚集蛋白聚糖和胶原蛋白 II 的表达,以及降低 MMP-3、MMP-13 和具有整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和金属蛋白酶的表达来减弱细胞外基质的降解。可能是预防或治疗 OA 的潜在治疗剂。总之,本研究结果进一步支持用 ATN-161 治疗性靶向抑制整合素 $\alpha 5\beta 1$ 改善豚鼠关节软骨的形态,降低氧化应急性损伤,抑制软骨基质中金属蛋白酶 MMP-13 的表达,进而对骨关节炎起到一定治疗作用。

整合素是广泛存在于人体免疫细胞中的跨膜受体,参与慢性炎症、血栓形成、恶性肿瘤形成等病理过程。它们主要介导细胞间黏附,协调细胞外基质成分的摄取,调节细胞骨架的形成,从而调节细胞信号传导^[18-19]。TAO 等^[20] 从小鼠的膝盖软骨分离细胞,并在各种浓度的纤连蛋白(FN)存在下进行培养并在体外进行增殖,迁移和软骨形成分化测定发现, FN 通过整合素 $\alpha 5\beta 1$ 依赖性信号通路增强软骨形成祖细胞(CPC)增殖,迁移和软骨形成分化。基于这些结果,可以开发出一种针对 FN 靶向激活软骨形成祖细胞(CPC)的新颖而有前途的疗法,以在临床环境中治疗软骨损伤。ATN-161 作为整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的特异性阻断剂。本研究发现,实验组豚鼠整合素 $\alpha 5\beta 1$ 明显下降,

且关节软骨大体形态和组织化学染色评分均高于对照组,这表明 ATN-161 可能是一种潜在的治疗药物。本研究着重观察了 ATN-161 对 DH 豚鼠自发性 OA 软骨改变和保护作用,其具体的作用机制还需要今后进一步研究;此外,钙化软骨是软骨的一部分,也是软骨和软骨下骨重要的连接组织,在 OA 中也起着至关重要的作用,ALN 对软骨都具有保护作用,然而 ALN 对钙化软骨的作用和机制,也是以后的研究需要补充完善的内容。

参考文献

- [1] HUSSAIN S M, NEILLY D W, BALIGA S, et al. Knee osteoarthritis: A review of management options[J]. *Scott Med J*, 2016; 61(1): 7-16.
- [2] SUI A, ZHONG Y, DEMETRIADE S A M, et al. Inhibition of integrin $\alpha 5\beta 1$ ameliorates VEGF-induced retinal neovascularization and leakage by suppressing NLRP3 inflammasome signaling in a mouse model[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2018, 256(4): 951-961.
- [3] KHALILI P, ARAKELIAN A, CHEN G, et al. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(9): 2271-2280.
- [4] STOELTZING O, LIU W, REINMUTH N, et al. Inhibition of integrin $\alpha 5\beta 1$ function with a small peptide(ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice[J]. *Int J Cancer*, 2003, 104: 496-503.
- [5] LIVANT D L, BRABEC R K, PIANTA K J, et al. Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 309-320.
- [6] VERONESI F, SALAMANNA F, MARTINI L, et al. Naturally occurring osteoarthritis features and treatments: Systematic review on the aged guinea pig model[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7309.
- [7] KIM J E, SONG D H, KIM S H, et al. Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194288.

- [8] SANTANGELO K S, PIECZARKA E M, NUOVO G J, et al. Temporal expression and tissue distribution of interleukin-1 β in two strains of guinea pigs with varying propensity for spontaneous knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2011, 19(4):439-448.
- [9] HENROTIN Y, PATRIER S, PRALUS A, et al. Protective actions of oral administration of bifidobacterium longum CBi0703 in spontaneous osteoarthritis in dunkin hartley guinea pig model[J]. *Cartilage*, 2021, 13(Suppl 2):S1204-1213.
- [10] MA X, ZHANG Z, KANG X, et al. Defining matrix Gla protein expression in the Dunkin-Hartley guinea pig model of spontaneous osteoarthritis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1):870.
- [11] WANG X J, TIAN W, XU W W, et al. Loss of autophagy causes increased apoptosis of tibial plateau chondrocytes in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis [J]. *Cartilage*, 2021, 13(Suppl 2):796-807.
- [12] MOQBEL S A A, ZENG R, MA D, et al. The effect of mitochondrial fusion on chondrogenic differentiation of cartilage progenitor/stem cells via Notch2 signal pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):127.
- [13] ZAMLI Z, ADAMS M A, TARLTON J F, et al. Increased chondrocyte apoptosis is associated with progression of osteoarthritis in spontaneous Guinea pig models of the disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9):17729-17743.
- [14] 吴绍军, 刘俊才, 左银龙, 李忠. Notch 信号通路在膝骨关节炎软骨细胞凋亡中的作用研究[J]. *华西医学*, 2018, 33(9):1162-1167.
- [15] LIU Z, CHEN J, MIRANDO A J, et al. A dual role for NOTCH signaling in joint cartilage maintenance and osteoarthritis[J]. *Sci Signal*, 2015, 8(386):ra71.
- [16] AMRUTA N, BIX G. ATN-161 ischemia/reperfusion-induced oxidative stress, fibroinflammation, mitochondrial damage, and apoptosis-mediated tight junction disruption in bEnd. 3 cells[J]. *Inflammation*, 2021, 44(6):2377-2394.
- [17] SUN W, XIE W, HUANG D, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates osteoarthritis progression by activating NRF2/HO-1 and inhibiting the NF- κ B signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 50(5):134.
- [18] SCHWARTZ M A, GINSBERG M H. Networks and crosstalk: Integrin signalling spreads[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(4):E65-68.
- [19] ROCA-CUSACHS P, ISKRATSCH T, SHEETZ M P. Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 13):3025-3038.
- [20] TAO T, LI Y, GUI C, et al. Fibronectin enhances cartilage repair by activating progenitor cells through integrin $\alpha 5 \beta 1$ receptor[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(13/14):1112-1124.

(收稿日期:2022-11-24 修回日期:2023-04-12)