

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.01.005
文章编号: 1005-8982 (2025) 01-0027-09

实验研究·论著

牛膝醇提物通过滑膜液外泌体介导的m6A修饰抑制膝骨关节炎的分子机制研究*

高坤, 王燕飞, 靳连海, 刘伟东, 张少群

[广州中医药大学第四临床医学院(深圳市中医院), 广东 深圳 518033]

摘要: **目的** 基于滑膜液外泌体介导的m6A修饰, 探讨牛膝醇提物对膝骨关节炎(KOA)的影响。**方法** 利用改良Hulth法复制KOA大鼠模型, 提取并鉴定滑膜液外泌体。通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等方法检测KOA大鼠滑膜液外泌体中m6A修饰的变化, 识别差异m6A。构建滑膜炎细胞模型, 将实验分为对照组、IL-1 β 组、IL-1 β + si-NC组、IL-1 β + si-METTL3组, 检测METTL3对滑膜细胞存活率及趋化因子分泌的影响。通过HE和番红固绿染色评估METTL3对KOA滑膜退变的组织学影响。使用Nanosight和RT-PCR检测牛膝醇提物对滑膜液外泌体的数量、活性及METTL3表达的影响。**结果** KOA大鼠模型成功复制后, micro-CT显示对照组大鼠的膝关节表面光滑, 关节间隙正常; 而模型组大鼠的膝关节表面粗糙, 关节间隙狭窄。通过Nanosight检测, 外泌体颗粒丰度为76~80 nm, Western blotting检测结果显示, CD9和TSG101高表达, 电子显微镜下外泌体为椭圆形, 直径<200 nm。m6A定量检测结果显示, KOA模型组m6A总量、METTL3表达均高于对照组($P < 0.05$), 去甲基化酶表达均无明显变化($P > 0.05$)。METTL3沉默对滑膜细胞存活率的影响检测结果显示, 与IL-1 β 组和IL-1 β + si-NC组比较, IL-1 β + si-METTL3组的细胞存活率升高($P < 0.05$)。检测METTL3沉默对滑膜细胞趋化因子SDF-1和MCP-1分泌的影响, 结果表明, 与IL-1 β 组和IL-1 β + si-NC组比较, IL-1 β + si-METTL3组SDF-1和MCP-1浓度均降低($P < 0.05$)。HE和番红固绿染色结果显示, 对照组细胞层次分明, 无明显炎症浸润; 模型组和Scr-RNA组细胞排列紊乱, 有血管增生和炎症浸润; Sh-METTL3组炎症浸润减少, 血管增生缓解。牛膝醇提物含药血清刺激实验检测滑膜细胞存活率结果显示, 与模型组比较, 牛膝醇提物组滑膜细胞存活率升高($P < 0.05$)。与METTL3过表达组比较, METTL3过表达加牛膝醇提物组滑膜细胞存活率升高($P < 0.05$)。动物实验中, 与对照组比较, 牛膝醇提物组外泌体数量和乙酰胆碱酯酶活性均无明显变化($P > 0.05$), 但模型组METTL3基因相对表达量高于对照组和牛膝醇提物组($P < 0.05$)。**结论** KOA滑膜液外泌体中METTL3高表达, 能够降低滑膜细胞存活率并促进趋化因子分泌。牛膝醇提物可能通过降低外泌体中METTL3的表达缓解KOA滑膜炎。

关键词: 膝骨关节炎; 滑膜细胞; 牛膝醇提物; 外泌体; N6甲基腺苷修饰

中图分类号: R684

文献标识码: A

Research on the molecular mechanism by which achyranthes bidentata ethanol extract inhibits knee osteoarthritis via m6A modification mediated by synovial fluid exosomes*

Gao Kun, Wang Yan-fei, Jin Lian-hai, Liu Wei-dong, Zhang Shao-qun

[Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine
(Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital), Shenzhen, Guangdong 518033, China]

收稿日期: 2024-07-11

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No:82104884); 广东省基础与应用基础研究基金(No:2020A1515110559); 广东省中医药管理局项目(No:20221356)

Abstract: Objective To explore the effects of *Achyranthes bidentata* ethanol extract on knee osteoarthritis (KOA) based on m6A modifications mediated by synovial fluid exosomes. **Methods** Establish a KOA rat model using a modified Hulth method, and extract and identify synovial fluid exosomes. Use RT-PCR and other methods to detect changes in m6A modifications in KOA synovial fluid exosomes and identify differential m6A. Construct a synovial cell inflammation model, dividing the experiment into: control group, IL-1 β group, IL-1 β + si-NC group, and IL-1 β + si-METTL3 group, to assess the impact of METTL3 on synovial cell viability and chemokine secretion. Evaluate the histological impact of METTL3 on KOA synovial degeneration using HE staining and Safranin O-Fast Green staining. Use Nanosight and RT-PCR to examine the effects of *Achyranthes bidentata* ethanol extract on the quantity, activity, and METTL3 expression in synovial fluid exosomes. **Results** After successful model establishment, micro-CT showed that the knee joint surface in the control group was smooth with normal joint spacing, whereas the model group exhibited a rough joint surface and narrowed joint space. Nanosight detection showed that exosome particles ranged from 76 to 80 nanometers. Western Blot analysis indicated high expression of CD9 and TSG101, and electron microscopy observed that the exosomes were elliptical with diameters less than 200 nanometers. m6A quantification kit detection revealed that the total m6A level was elevated in the KOA model, with METTL3 expression significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), while the expression of demethylases showed no significant change ($P > 0.05$). The impact of METTL3 silencing on synovial cell viability was examined. Compared to the IL-1 β group and the IL-1 β +si-NC group, the IL-1 β + si-METTL3 group exhibited increased cell viability, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The effect of METTL3 silencing on the secretion of synovial cell chemokines SDF-1 and MCP-1 was also assessed. Results indicated that the concentrations of SDF-1 and MCP-1 were reduced in the IL-1 β + si-METTL3 group compared to the IL-1 β group and the IL-1 β + si-NC group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). HE and Safranin O-Fast Green staining showed that the normal group had distinct cell layers with no significant inflammatory infiltration; the model group and the Scr-RNA group displayed disorganized cell arrangements along with vascular proliferation and inflammatory infiltration; the Sh-METTL3 group and the *Achyranthes bidentata* extract group showed reduced inflammatory infiltration and alleviated vascular proliferation. In cell experiments using serum containing *Achyranthes bidentata* extract, synovial cell viability was assessed. Compared to the model group, the *Achyranthes bidentata* extract group showed increased synovial cell viability, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared to the METTL3 overexpression group, the METTL3 overexpression plus *Achyranthes bidentata* extract group also exhibited increased synovial cell viability, with statistically significant differences ($P < 0.05$). At the animal level, compared to the control group, the *Achyranthes bidentata* extract gavage group showed no significant change in exosome quantity and ACHE activity ($P > 0.05$), but METTL3 expression levels were reduced, showing statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** High expression of METTL3 in KOA synovial fluid exosomes can reduce synovial cell viability and promote chemokine secretion. *Achyranthes bidentata* ethanol extract may alleviate KOA synovial degeneration by reducing METTL3 expression in exosomes.

Keywords: knee osteoarthritis; synovial cells; *achyranthes bidentata* ethanol extract; exosomes; N6-methyladenosine modification

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)滑膜细胞产生的炎症因子、趋化因子、前列腺素E2、神经肽等炎性介质促进软骨细胞的凋亡、退变^[1-2]。软骨细胞退变分泌的炎症因子等反过来又促使滑膜炎加重及蛋白水解酶的过量产生。滑膜炎和软骨退化交叉对话及双向调节形成恶性循环,导致软骨基质破坏与修复失衡,进一步加重KOA。因此,在病变的早期进行干预,抑制滑膜-软骨之间的交叉对话,是治疗KOA的有效途径。外泌体在滑膜液中广泛存在,携带大量信息分子,具有稳定性好及特异

性强的传输优势^[3-4]。N6甲基腺苷(m6A)修饰在多种病理生理过程中起着关键作用。近期研究显示,m6A修饰能够通过外泌体激活炎症通路,调控炎症因子表达。而m6A RNA甲基化的调控主要依赖于转移酶负责提高m6A修饰水平,去转移酶负责去除m6A修饰^[5-6]。

本院临床应用牛膝醇提物透入疗法治疗KOA取得了显著疗效。前期研究发现,该疗法能通过外泌体抑制KOA滑膜炎水平,延缓关节软骨降解退变,但其具体作用机制未作阐明^[7-8]。既然m6A修饰

是介导关节滑膜和软骨之间信号传递、交流的关键元件,牛膝醇提物是否能够通过抑制滑膜液外泌体的m6A信号分子传递功能,抑制滑膜炎症并保护关节软骨?针对这些问题,本研究通过复制、构建KOA动物和细胞模型,提取滑膜液外泌体,检测并验证m6A修饰水平差异。进一步使用牛膝醇提物进行干预,探讨m6A修饰在滑膜液外泌体介导的信号传递中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器及耗材

外泌体提取试剂ExoQuick(美国SBI公司,EXOTC10A-1),DAPI染液(上海碧云天生物研究所),CD9抗体、TSG101抗体、鼠源IgG的二抗(美国Abcam公司)。DMEM培养基(美国HyClone公司,货号:SH30243.01),TEM透射电子显微镜(FEI TECNAI G2,美国FEI公司),纳米颗粒追踪分析仪(Malvern Nanosight NS300,英国),Lipofectamine 2000转染试剂(美国赛默飞公司,货号:11668),SDF-1、MCP-1酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Corning,货号35-015-CV、25-053-CI),EpiQuik™ m6A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric)(Base Catalog # P-9005),全自动酶标仪(WD-2102B,北京市六一仪器厂),蛋白垂直电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂),全自动样品快速研磨仪(Tiss-12,上海净信实业发展有限公司),全自动化学发光图像分析系统(Tanon-5200,上海天能科技有限公司),Marker(#26617,美国赛默飞公司);PVDF膜(IPVH00010,美国默克公司),RIPA细胞裂解液(C1053,北京普利莱基因技术有限公司),Trizon Reagent(CW0580S,江苏康为世纪生物科技股份有限公司),超纯RNA提取试剂盒(CW0581M,江苏康为世纪生物科技股份有限公司),HiScript II qRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(R223-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711-02,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),普通PCR扩增仪(TC-EA,杭州博日科技有限公司),荧光PCR仪[CFX Connect™,伯乐生命医学产品(上海)有限公司],腺相关病毒

(AAV)采用血清型AAV9,包含Sh-SCR(对照病毒)、Sh-METTL3(敲低病毒)(广州锐博生物有限公司)。

1.2 实验动物

健康SPF级SD大鼠86只,雄性,6~8周龄,购自珠海百试通生物科技有限公司,饲养于北京大学深圳医院实验动物中心。实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2020-0051;实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2022-0172。实验方案获北京大学深圳医院实验动物福利伦理委员会批准(批准号:2023-776)。

1.3 KOA大鼠模型复制

采用改良HULTH法复制KOA大鼠模型^[9]。大鼠经静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。在右膝关节内侧切开约0.5 cm的纵形切口,精细切断内侧副韧带及前交叉韧带,并摘除内侧半月板,确保不损伤关节软骨面。手术结束后逐层缝合并常规消毒包扎,同时每天肌内注射青霉素预防感染。术后1周开始每天强制大鼠活动30 min。4周后,通过组织学检测验证KOA模型是否复制成功,表现为软骨损伤,软骨基质染色不均,软骨细胞排列紊乱,细胞簇集,即为KOA大鼠模型复制成功。

1.4 外泌体的提取鉴定及数量、活性检测

外泌体数量检测采用纳米颗粒跟踪分析技术进行。首先将外泌体样品适当稀释(1:1 000),随后注入仪器样品室。通过软件捕获颗粒运动视频,每个样品采集60 s视频,重复3次。分析所得数据以获取颗粒浓度和粒径分布信息,最后根据稀释倍数计算原始样品中的外泌体浓度。外泌体活性采用乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)比色法进行。将外泌体样品裂解后提取总蛋白,测定蛋白浓度。随后配制底物溶液,将等量的样品与底物溶液混合,于37℃孵育30 min。使用酶标仪在412 nm波长处测量吸光度值,根据预先绘制的标准曲线计算AChE活性。每个样品重复测定3次,取平均值进行统计分析。

1.5 m6A总甲基化检测

预先计算实验所需8联管数量,加入BS溶液(结合液)、NC(阴性对照)、PC(阳性对照)和RNA到指定孔中,轻柔地从一边到另一边倾斜或者轻轻摇晃混合溶液。确保溶液平坦地覆盖住每个孔底。覆盖并在37℃下孵育90 min,移除每个孔中的BS

溶液,加入洗涤液洗涤。m6A RNA 捕获:加入抗 m6A 抗体覆盖并孵育 60 min,移除捕获抗体溶液,加入洗涤液洗涤 3 次,加入检测抗体,覆盖并孵育 30 min,移除检测抗体溶液,加入洗涤液洗涤 4 次,加入显色底物覆盖并孵育 30 min,加入洗涤液洗涤 5 次。通过加入显色溶液室温避光孵育,观察样本颜色,当颜色变为中度蓝色后,加入终止溶液阻止酶反应,颜色变为黄色,酶标仪记录 450 nm 波长处吸光度值。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测甲基化基因的相对表达量

处理完组织、细胞后,将培养液倒出,用 PBS 清洗细胞,加入 TransZol 裂解细胞,静置片刻确保细胞完全裂解。用移液枪轻轻吹打细胞,将裂解液移至离心管中,加入 RNA 提取试剂,剧烈震荡短暂,室温下孵育 5 min,然后在低温下高速离心,收集上层水相,进一步通过异丙醇-乙醇抽提法提取 RNA,并将提取的 RNA 溶解在 RNA 溶解液中备用。配置逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)体系:4 μ L PrimeScript Buffer、1 μ L PrimeScript RT Enzyme Mix、1 μ L Oligo dT Primer(50 μ mol/L)、1 μ L Random 6 mers(100 μ mol/L)、1 μ g 总 RNA,并用 DEPC 处理的水补足到 20 μ L。逆转录反应条件:42 $^{\circ}$ C 反应 15 s,再升高温度至 85 $^{\circ}$ C 反应 5 s 以灭活逆转录酶。接着,配置 PCR 反应体系,包括 10 μ L TB Green Fast qPCR Mix、0.8 μ L 前引物(10 μ mol/L)、0.8 μ L 后引物(10 μ mol/L)、2 μ L DNA 模板,用灭菌水加至 20 μ L。聚合酶链反应扩增程序设置为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。扩增引物序列见表 1。

1.7 滑膜细胞的培养、计数、转染及炎症处理

从大鼠的膝关节中获取滑膜组织,无菌条件下用刀片将其切成薄片,再用剪刀剪碎后置于含 I 型胶原酶的培养基中进行消化。消化完成后,用过滤器去除未消化的组织块,离心后收集滑膜细胞。将这些细胞重悬于胎牛血清培养基中,接种在培养瓶里,并在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳的环境下培养。用锥虫蓝染色计数细胞,评估其活力及数量。倒置显微镜下观察细胞贴壁情况,视细胞生长情况 2~3 d 更

表 1 扩增引物序列

| 基因 | 引物序列 | 长度/ bp |
|---------|------------------------------------|-----------|
| GAPDH | 正向: 5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTTCCT-3' | 23 |
| | 反向: 5'-TCGTCCTCCTCTGGTCTCT-3' | 20 |
| METTL3 | 正向: 5'-TGACCTATGCTGACCATTCCA-3' | 21 |
| | 反向: 5'-GCCAGTCCAGAGGCTAAAGAG-3' | 21 |
| METTL4 | 正向: 5'-AAACTGTCTTGTGTTACTTGGGTG-3' | 25 |
| | 反向: 5'-TTTGTGATCTGGAATGGGGAG-3' | 22 |
| METTL14 | 正向: 5'-AAATGCTGGACTTGGGATGAT-3' | 21 |
| | 反向: 5'-GTCTTTGCTTGGCAGGATTGT-3' | 22 |
| WTAP | 正向: 5'-TGGCGACCAAGGAGCAA-3' | 17 |
| | 反向: 5'-AGCGCTAAACTTCCAGGCAC-3' | 20 |
| YTHDF2 | 正向: 5'-CCAAAAGGTCAAAGAAACAAAAG-3' | 22 |
| | 反向: 5'-AGGAAAAGCCAATGGAGGG-3' | 19 |
| FTO | 正向: 5'-CTCACTCCAGTATCTCGCATCC-3' | 22 |
| | 反向: 5'-GGTTTGACAAGCAGCACCTATT-3' | 22 |
| ALKBH5 | 正向: 5'-CTGCGTGAGAAGCTCAAAGTCC-3' | 21 |
| | 反向: 5'-AGCCCTCGCCGAAGAAGTA-3' | 19 |

换一次培养基。细胞增殖至 90% 融合时进行传代。用细胞计数试剂盒检测滑膜细胞增殖。将第三代细胞放入 96 孔板中培养 12 h 后分组处理,然后用 0.75 mmol/L 硝普钠处理 48 h。加入 CCK-8 溶液孵育 2 h,通过微孔板读数仪在 450 nm 波长处测量吸光度。为了进行 siRNA 转染,将滑膜细胞以 3×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后,进行转染操作。将 20 pmol 的 siRNA 与 OPTIMEM 培养基混合,加入 siRNA-mate 转染试剂,涡旋后静置形成复合物。更换新鲜培养基后,将转染复合物加入细胞中,培养 48 h 以收集样品,并验证 RNA 表达的变化。

将重组人 IL-1 β 蛋白加入到滑膜细胞培养孔中,使其终浓度达到 10 ng/mL,然后继续培养 24 h,将滑膜细胞分为 4 组:对照组(不进行任何处理,正常培养)、IL-1 β 组(采用 10 ng/mL 的 IL-1 β 刺激滑膜细胞 24 h)、IL-1 β + si-NC 组(转染 NC siRNA 48 h 后,进行 IL-1 β 刺激)及 IL-1 β + si-METTL3 组(转染 siRNA 48 h 后,进行 IL-1 β 刺激)。细胞活性实验检测软骨细胞存活率。

1.8 ELISA 检测基质细胞衍生因子-1 和单核细胞趋化蛋白-1

在完成对细胞的处理后,首先,以 68 r/min 的速度离心 5 min,收集上清液,将收集到的上清液加入 ELISA 板中,每孔加入 100 μ L,用封板膜密封反应

孔,并在室温下孵育 120 min。接着,洗板 5 次,每次洗后用厚的吸水纸将板拍干,每孔加入 100 μL 的生物素化抗体溶液,在室温下孵育 60 min。再次洗板 5 次,并用厚吸水纸拍干,每孔加入 100 μL 的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,在室温下孵育 20 min。再次洗板 5 次,并用厚吸水纸拍干,加入 100 μL 的显色剂 TMB 溶液,在室温下反应 20 min。最后,加入 50 μL 的终止液混匀,在 450 nm 波长处用酶标仪测量吸光度,并计算基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的浓度。

1.9 组织病理学检测

通过大鼠腹腔注射腺病毒敲低 METTL3 表达复制 KOA 模型,观察 METTL3 缺失对 KOA 大鼠滑膜组织病理变化的影响。共 40 只大鼠,随机分为对照组、模型组、Scr-RNA 组、Sh-METTL3 组,每组 10 只。4 周后取材,首先将大鼠的胫骨平台和股骨髁样本置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h。接着,使用 Calci-Clear Slow 溶液对样本进行为期 3 周的脱钙处理,并随后进行石蜡包埋。通过 micro-CT 扫描对膝关节进行成像分析,结合 3D 微断层扫描数据,评估骨体积分数(BV/TV, %)、小梁厚度(Tb.Th, mm)和小梁分离度(Tb.Sp, mm)等参数,辅助评估整体结构变化。

番红固绿染色:样本固定于 10% 甲醛溶液中 24 h 后,依次通过一系列浓度递增的乙醇和二甲苯进行脱水和透明化。样本石蜡包埋后切成 5~7 μm 的薄片,将切片分别置于二甲苯和乙醇梯度中进行脱蜡和再水化处理。如果需要,可对细胞核进行苏木精染色。切片在番红 O 溶液中浸泡 5~10 min,随后用流水冲洗,然后在固绿染液中染色 2~5 min,并用 1% 醋酸溶液快速漂洗。最后,切片经过乙醇梯度脱水,使用二甲苯透明化,最后以中性树胶封片。番红 O 染色使软骨基质呈红橙色,而固绿染色则使纤维蛋白和胶原纤维显示绿色。

HE 染色:样本在 10% 甲醛中固定后,经过逐步递增浓度的乙醇梯度进行脱水,再用二甲苯进行透明化。石蜡包埋后,样本切成薄片,依次通过二甲苯和乙醇梯度进行脱蜡和再水化。随后,将切片浸入苏木精溶液中进行核染色,用水冲洗,再浸入伊红溶液进行细胞质染色。染色后的切片再次通过乙醇梯度脱水,经过透明化处理后,用中性树胶封

片。苏木精将细胞核染成蓝色或紫色,伊红使细胞质和细胞外基质呈现粉红或红色。

1.10 牛膝醇提物、含药血清的制备及实验分组

由本院药剂科依据《中国药典》浸渍法制备物(怀牛膝,院内制剂批号:2019103)。1 000 g 粉碎的怀牛膝置于有盖容器内,加入 400 mL 50% 乙醇(无水乙醇配制),密盖,振荡,浸渍 7 d,取上清液;再加入 300 mL 50% 乙醇液,依法浸渍 7 d,再次取上清液后加入 300 mL 50% 乙醇液,依法浸渍 7 d,最后取出上清液。合并浸出液,静置 24 h,过滤,浓缩,即得受试药液,1 mL 醇提液相当于含原材料 1 g。按照药理试验中动物与人体间的等效剂量进行换算,实验动物每日用量约 1 g/kg(等效于人的常规高用量 12 g),灌胃 2 次/d,连续 6 周,每次灌胃时用蒸馏水配成 10 mL。最后 1 次灌胃后 2 h 采集静脉血,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,0.22 μm 滤膜过滤灭菌,分装,置入 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。

滑膜细胞存活率实验分组:对照组(不进行任何处理,正常培养)、模型组(采用 10 ng/mL 的 IL-1 β 刺激滑膜细胞 24 h)、METTL3 过表达组(转染 METTL3 的质粒 48 h 后,进行 IL-1 β 刺激 24 h)、牛膝醇提物组(含药血清刺激 48 h 后,进行 IL-1 β 刺激 24 h)、METTL3 过表达+牛膝醇提物组(转染 METTL3 的质粒+含药血清刺激 48 h 后,进行 IL-1 β 刺激 24 h)。

1.11 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若满足正态性和方差齐性,两两比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,若不满足正态性采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

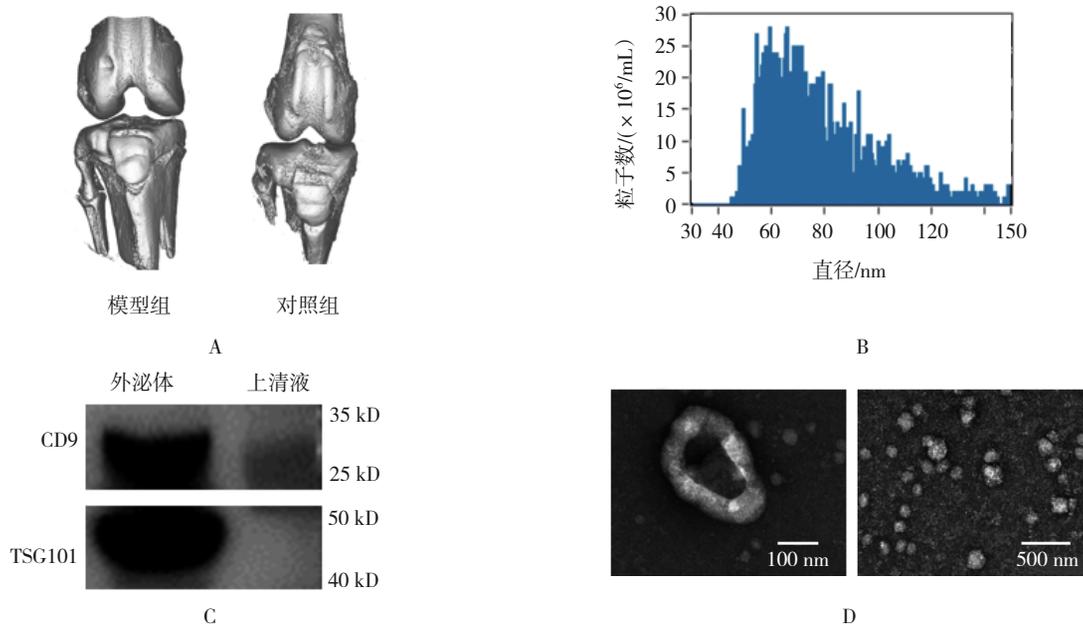
2 结果

2.1 KOA 大鼠模型的构建及滑膜液外泌体的提取

右膝关节 micro-CT 检查结果显示,对照组大鼠的膝关节表面光滑,关节间隙正常;而模型组大鼠的膝关节表面出现粗糙和不平整现象,关节间隙也有所狭窄(见图 1A)。收集 KOA 滑膜液,提取外泌体,通过 Nanosight 检测发现,颗粒的丰度为 76~80 nm(见图 1B)。Western blotting 检测结果表

明,外泌体表面的标志蛋白 CD9 和 TSG101 高表达,其蛋白峰度值明显高于离心后上清液中的蛋白峰

度值(见图 1C)。电子显微镜下观察显示,外泌体颗粒为椭圆形,大小不一,直径均<200 nm(见图 1D)。



A:右膝关节 micro-CT 检查结果; B:外泌体颗粒峰度值; C:外泌体标志蛋白 CD9、TSG101 的 Western blotting 鉴定; D:外泌体电子显微镜检测。

图 1 KOA 模型大鼠的复制及滑膜液外泌体的提取鉴定

2.2 m6A 修饰在 KOA 滑膜液外泌体内的表达

m6A 定量检测结果显示,模型组与对照组 m6A 总量比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),模型组 m6A 总量高于对照组。RT-PCR 结果显示,模型组与对照组 m6A RNA 甲基化转移酶 METTL3

表达比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),模型组 METTL3 表达高于对照组;两组 m6A RNA 甲基化转移酶 (METTL14、WTAP) 和去甲基化转移酶 (METTL4、YTHDF2、FTO、ALKBH5) 表达比较,经 *t* 检验,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 m6A 甲基化的表达水平比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 总 m6A | METTL3 | METTL4 | METTL14 | WTAP | YTHDF2 | FTO | ALKBH5 |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 模型组 | 6.96 ± 1.10 | 6.14 ± 0.69 | 1.05 ± 0.19 | 1.20 ± 0.26 | 1.25 ± 0.29 | 0.99 ± 0.17 | 1.10 ± 0.23 | 1.18 ± 0.18 |
| 对照组 | 2.83 ± 0.54 | 1.12 ± 0.15 | 1.06 ± 0.17 | 1.17 ± 0.32 | 1.15 ± 0.33 | 1.04 ± 0.24 | 1.07 ± 0.18 | 1.04 ± 0.21 |
| <i>t</i> 值 | -9.465 | -19.813 | -0.041 | 0.239 | 0.639 | -0.464 | 0.298 | 1.406 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.000 | 0.968 | 0.815 | 0.533 | 0.650 | 0.770 | 0.181 |

2.3 METTL3 对滑膜细胞炎症模型的影响

对照组、IL-1 β 组、IL-1 β + si-METTL3 组及 IL-1 β + si-NC 组的 METTL3 表达比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-1 β + si-METTL3 组低于 IL-1 β + si-NC 组 ($P < 0.05$)。各组滑膜细胞存活率比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较,IL-1 β 组和 IL-1 β + si-NC 组滑膜细胞的存活率均降低 ($P < 0.05$);

与 IL-1 β 组和 IL-1 β + si-NC 组比较,IL-1 β + si-METTL3 组的细胞存活率均提高 ($P < 0.05$)。各组 SDF-1 和 MCP-1 浓度比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较,IL-1 β 组和 IL-1 β + siNC 组中滑膜细胞上清液的 SDF-1 和 MCP-1 浓度均增加 ($P < 0.05$)。而 IL-1 β + si-METTL3 组趋化因子的浓度较 IL-1 β 组和 IL-1 β + si-NC 组均降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 METTL3 的沉默效率及软骨细胞生存率、趋化因子的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | METTL3 | 存活率/% | SDF-1/(pg/mL) | MCP-1/(pg/mL) |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 1.02 ± 0.13 | 88.90 ± 4.70 | 24.80 ± 10.69 | 32.80 ± 10.61 |
| IL-1β组 | 2.96 ± 0.52 ^{①②} | 54.40 ± 6.60 ^{①②} | 427.00 ± 84.97 ^{①②} | 230.90 ± 64.70 ^{①②} |
| IL-1β + si-NC组 | 2.72 ± 0.43 ^{①②} | 53.60 ± 6.76 ^{①②} | 417.50 ± 102.08 ^{①②} | 217.00 ± 39.78 ^{①②} |
| IL-1β + si-METTL3 | 1.22 ± 0.33 | 84.70 ± 4.87 | 115.10 ± 45.39 ^① | 80.50 ± 25.06 ^① |
| F值 | 71.060 | 106.912 | 86.286 | 59.846 |
| P值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

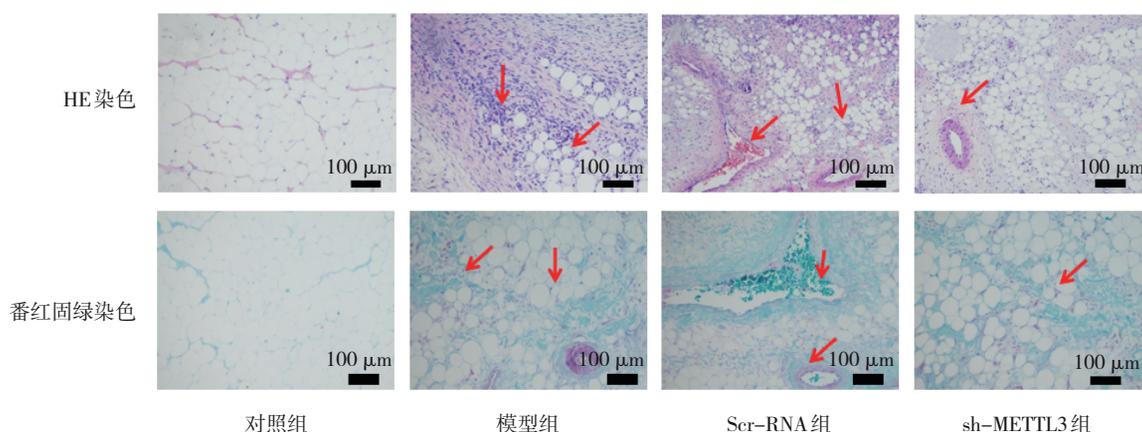
注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 IL-1β + si-METTL3 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 METTL3对KOA模型大鼠滑膜组织的病理学影响

HE 和番红固绿染色结果显示, 对照组的细胞层次分明, 细胞质和细胞核染色均匀一致, 没有明显的炎症细胞浸润。模型组和 Scr-RNA 组的细胞呈现不规则形态, 排列紊乱, 并伴有血管增生和大量炎症细胞浸润。与模型组和 Scr-RNA 组比较, Sh-

METTL3 组细胞形态部分不均匀, 但炎症细胞浸润减少, 血管增生现象也有所缓解。见图 2。

各组的 Mankin's 评分比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 31.677$, $P = 0.000$)。与模型组 (12.62 ± 2.83) 分和 Scr-RNA 组 (12.25 ± 3.11) 分比较, Sh-METTL3 组 Mankin's 评分 (6.87 ± 1.35) 分均降低 ($P < 0.05$)。



红色箭头示不规则细胞排列、炎症细胞浸润及血管增生。

图 2 METTL3对KOA模型大鼠滑膜组织的病理学影响

2.5 牛膝醇提物通过滑膜液外泌体 METTL3对滑膜细胞存活率的影响

细胞模型中给予牛膝醇提物含药血清刺激, 检测滑膜细胞存活率。实验结果显示, 对照组、模型组、METTL3 过表达组、牛膝醇提物组及 METTL3 过表达+牛膝醇提物组的滑膜细胞存活率比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组存活率 (88.00 ± 8.19)% 比较, 模型组存活率 (56.80 ± 4.96)% 和 METTL3 过表达组存活率 (49.10 ± 8.22)% 均降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 牛膝醇提物组存活率 (80.20 ± 5.39)% 升高 ($P < 0.05$); 与 METTL3 过表达组比较, METTL3 过表达+牛膝醇提

物组存活率 (68.00 ± 7.27)% 升高 ($P < 0.05$)。

2.6 牛膝醇提物对KOA动物模型滑膜液外泌体数量、活性及 METTL3相对表达量的影响

KOA 模型给予牛膝醇提物灌胃处理, 通过 Nanosight 检测滑膜液中分泌的外泌体数量及活性。实验结果显示, 对照组、模型组和牛膝醇提物组在单位体积内的外泌体分泌数量及 AChE 活性, 经单因素方差分析, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组外泌体中 METTL3 基因相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型组 METTL3 基因相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$); 牛膝醇提物组的 METTL3 基因相对表达量低于模型组 ($P <$

0.05)。见表 4。

表 4 各组滑膜液外泌体、AChE 及 METTL3 基因相对表达量的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 外泌体数量/ (E ⁸ /个) | AChE 活性 | METTL3 基因 |
|--------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| 对照组 | 1.01 ± 0.12 | 1.02 ± 0.22 | 1.08 ± 0.21 |
| 模型组 | 1.11 ± 0.20 | 1.08 ± 0.36 | 4.21 ± 0.68 ^① |
| 牛膝醇提物组 | 1.06 ± 0.20 | 1.13 ± 0.38 | 1.87 ± 0.47 ^{①②} |
| F 值 | 0.698 | 0.469 | 118.306 |
| P 值 | 0.506 | 0.631 | 0.000 |

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

滑膜在膝骨关节炎的发病与进展中扮演着重要角色。正常情况下,成纤维样滑膜细胞负责为关节软骨提供营养,并保护关节结构及周围的肌肉骨骼组织。然而,在 KOA 中,这些细胞通过分泌炎症和分解代谢因子,促成软骨的降解^[10-11]。滑膜与软骨之间形成的交叉对话和双向调节机制引发恶性循环,导致组织稳态失衡,加重 KOA。因此,要深入了解 KOA 中软骨损伤的病理机制,必须全面解析滑膜组织中的细胞和分子活动。外泌体属于细胞外囊泡,其承载着丰富的信号分子和遗传信息,是细胞间通信的重要渠道。这些囊泡因其长效稳定性、抗降解能力、远程传递及精准传输特性而独具优势^[12]。有研究揭示,膝关节的滑膜液中含有大量外泌体,这些外泌体由不同细胞分泌,能够在滑膜液中运作,通过调节炎症、传递 microRNA 及影响细胞外基质,促进滑膜与软骨细胞的相互作用,在维持关节内的平衡状态上扮演着关键角色^[13-14]。m6A 修饰占据 RNA 甲基化的 80% 以上,是真核生物中最常见的信使 RNA 转录后修饰,同时也是非编码 RNA 的一种常见修饰形式。其通过促进前体 RNA 的剪接、增强信使 RNA 的翻译效率,以及提高 RNA 稳定性,在多种生物学过程中发挥重要作用。现有研究表明,RNA 的 m6A 修饰在许多病理生理过程中具有关键作用,能够通过外泌体发挥调控作用^[5-6]。因此,本研究检测 KOA 模型滑膜液外泌体内 m6A 的差异表达,并探讨其作用机制。

本实验通过复制 KOA 大鼠模型,收集滑膜液样本,进行分析、验证。为研究 m6A 修饰在发病中的作用,首先需要确认其是否存在差异以及具体差异类型。通过定量试剂盒进行分析,本研究发现,KOA

滑膜液外泌体中的 m6A 总量相较于正常组织呈上升趋势。为了进一步深入探究导致 KOA 滑膜样本中 m6A RNA 甲基化水平升高的原因,本研究检测了 m6A RNA 主要的甲基化转移酶 (METTL3、METTL14、WTAP) 和主要的去甲基化转移酶 (METTL4、YTHDF2、FTO、ALKBH5) 在两组样本中的表达。m6A RNA 甲基化的调控主要依赖于这两类酶的作用:转移酶负责增加 m6A 修饰水平,去转移酶则负责去除这种修饰。RT-PCR 分析结果发现,甲基化转移酶 METTL3 的 mRNA 水平在 KOA 模型中的表达明显高于对照组。而 m6A RNA 去甲基化酶的表达在两组样本中基本保持不变。并且,近期的研究也发现,m6A 修饰在慢性炎症过程中扮演重要角色,METTL3 能够增加炎症细胞因子的表达,且与 NF- κ B 有关^[15]。

甲基化转移酶 METTL3 在 KOA 的发展过程中起到什么样的作用,目前尚未见相关报道。本实验沉默 METTL3,检测到对炎症模型下滑膜细胞的存活率有提升作用。结果说明,METTL3 的高表达促进了 KOA 滑膜细胞的退化死亡。在一项最新的关于黑色素瘤 PD-1 抗体耐药性的研究中,发现 CXCR4、SOX10 是 FTO 的靶基因,敲减 FTO 导致 CXCR4 水平升高^[5]。同样,在另外一项研究中,发现乳腺癌细胞中高表达的 LNC942 可能是通过促进 m6A 甲基化转移酶 METTL14 基因的稳定性,上调 METTL14 基因和蛋白表达,进而上调下游靶基因 CXCR4 和 CYP1B1 的表达,促进 BRCA 的进展^[16]。这些研究说明 m6A 修饰对趋化因子 CXCR4 的表达具有重要意义。CXCR4 是 SDF-1 已知的唯一天然受体。SDF-1 与 CXCR4 受体结合,能够激活细胞外信号调节酶及相关激酶的信号通路,从而诱导软骨细胞释放 MMP-3、MMP-9、MMP-13,这些因子皆能诱导关节软骨破坏及 II 型胶原降解^[17]。SDF-1 和 MCP-1 能够通过促进细胞迁移、增殖和炎症反应,对滑膜细胞的功能和行为产生显著影响,在关节炎的发生、发展中发挥重要作用。本研究发现沉默 METTL3 能够降低滑膜细胞 SDF-1 和 MCP-1 的表达,说明在 KOA 发病过程中,促进滑膜细胞炎症的趋化因子 SDF-1 和 MCP-1 的高表达与 m6A 有关。

根据“乙癸同源”理论,治疗骨关节炎的核心在于补益肝肾和活血通络。牛膝被列为《本草经》中的上品,具有“主寒湿痿痹,四肢拘挛,膝痛不可屈伸,逐血气,伤热火烂”等功效,是中医补肝肾、活血通络法的典型药物。有统计数据显示,在用于关节

炎的内服方剂中,牛膝的使用频率最高。尽管目前对中药单体的研究较多,但中药的疗效并非单一成分所致,因此本实验选择整体研究牛膝。牛膝的有效成分提取有多种方法,其中以醇类溶剂最为成熟。牛膝的甲醇和乙醇提取物能够促进软骨细胞的增殖,增加 II 型胶原的表达,并促进骨髓来源的成体干细胞的软骨分化。临床应用牛膝醇提物透入疗法治疗 KOA 取得了显著疗效,前期发现其能通过外泌体抑制 KOA 滑膜炎水平,延缓关节软骨降解退变,但具体作用机制未阐明。本实验通过复制、构建 KOA 模型,检测了牛膝醇提物通过 METTL3 对 KOA 滑膜细胞的影响,结果显示牛膝醇提物能够影响外泌体 METTL3 的表达,而该影响与滑膜液外泌体的数量及活性无关。

综上所述,KOA 滑膜液外泌体 METTL3 高表达,具有降低滑膜细胞存活率及促进趋化分子分泌的作用。牛膝醇提物能够缓解 KOA 滑膜退变,可能与降低外泌体 METTL3 表达有关。

参 考 文 献 :

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] HÜGLE T, GEURTS J. What drives osteoarthritis? -Synovial versus subchondral bone pathology[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56(9): 1461-1471.
- [3] CHEN P, RUAN A M, ZHOU J, et al. Extraction and identification of synovial tissue-derived exosomes by different separation techniques[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 97.
- [4] HUANG L Z, DONG G, PENG J, et al. The role of exosomes and their enhancement strategies in the treatment of osteoarthritis[J]. *Hum Cell*, 2023, 36(6): 1887-1900.
- [5] YANG S, WEI J B, CUI Y H, et al. m⁶A mRNA demethylase FTO regulates melanoma tumorigenicity and response to anti-PD-1 blockade[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2782.
- [6] ZHOU H, SHEN X, YAN C, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis of the knee in mice model by interacting with METTL3 to reduce m6A of NLRP3 in macrophage[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 322.
- [7] GAO K, ZHU W X, LI H, et al. Association between cytokines and exosomes in synovial fluid of individuals with knee osteoarthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2020, 30(4): 758-764.
- [8] 高坤, 陈大宇, 张勇, 等. 牛膝醇提物调控滑膜成纤维细胞外泌体抑制软骨细胞外基质降解[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(23): 3636-3640.
- [9] 彭旭, 熊华章, 杨继滨, 等. 不同膝骨关节炎模型兔的构建方法: 合理选择及特点[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(28): 4550-4556.
- [10] DING X Q, ZHANG Y J, HUANG Y L, et al. Cadherin-11 involves in synovitis and increases the migratory and invasive capacity of fibroblast-like synoviocytes of osteoarthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(1): 153-161.
- [11] NAIR A, KANDA V, BUSH-JOSEPH C, et al. Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(7): 2268-2277.
- [12] RAPOSO G, STOOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- [13] WITHROW J, MURPHY C, LIU Y T, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 286.
- [14] NAWAZ M, SHAH N, ZANETTI B R, et al. Extracellular vesicles and matrix remodeling enzymes: the emerging roles in extracellular matrix remodeling, progression of diseases and tissue repair[J]. *Cells*, 2018, 7(10): 167.
- [15] WANG J H, YAN S S, LU H Y, et al. METTL3 attenuates LPS-induced inflammatory response in macrophages via NF- κ B signaling pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 3120391.
- [16] SUN T, WU Z K, WANG X F, et al. LNC942 promoting METTL14-mediated m6A methylation in breast cancer cell proliferation and progression[J]. *Oncogene*, 2020, 39(31): 5358-5372.
- [17] CHENG M, HUANG K, ZHOU J L, et al. A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 81: 49-53.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 高坤, 王燕飞, 靳连海, 等. 牛膝醇提物通过滑膜液外泌体介导的 m6A 修饰抑制膝骨关节炎的分子机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(1): 27-35.

Cite this article as: GAO K, WANG Y F, JIN L H, et al. Research on the molecular mechanism by which *Achyranthes bidentata* ethanol extract inhibits knee osteoarthritis via m6A modification mediated by synovial fluid exosomes[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(1): 27-35.