

研究报告

葡萄籽原花青素提取物对运动性骨关节损伤大鼠的影响
及其作用机制的研究陈杰¹, 冯洪涛²

(1. 郑州大学体育学院, 河南 郑州 450044; 2. 郑州人民医院血管外科, 河南 郑州 450053)

摘要:目的 揭示葡萄籽原花青素提取物(GSPE)对大鼠运动性骨关节损伤(SJI)的治疗作用及机制。方法 建立 SJI 大鼠模型后, 各组大鼠经口给予不同剂量的 GSPE(0、50、100 和 200 mg/kg), 持续 4 周, 并设立正常对照组。受试物给药结束后, 通过机械痛阈(PWT)测定法测定各组模型大鼠疼痛情况; 取尾静脉血, 检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)含量。处死后, 取膝关节经番红 O-固绿染色后进行病理检查; 取膝关节组织, 通过 Western blot 方法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 α (PGC-1 α)、磷酸化-AMP 依赖的蛋白激酶 α (p-AMPK α)、AMPK α 、核呼吸因子 1(NRF1)和线粒体转录因子 A(TFAM)的蛋白表达水平。结果 随着 GSPE 剂量增加, SJI 大鼠的 PWT 显著上升($P<0.05$), 膝关节病变形态改善, SJI 大鼠的血清 SOD 和 GSH-Px 含量升高, MDA 含量显著降低($P<0.05$)。SJI 大鼠膝关节组织中 PGC-1 α 、p-AMPK α /AMPK α 、NRF-1 和 TFAM 的蛋白表达水平随着 GSPE 剂量增加而提高($P<0.05$)。结论 GSPE 摄入有效减轻了 SJI 大鼠疼痛和膝关节损伤, 作用机制与 AMPK/PGC-1 α 线粒体通路的激活抑制了体内氧化应激水平有关。

关键词:葡萄籽原花青素提取物; 运动性骨关节损伤; 疼痛; 氧化应激; AMPK/PGC-1 α 线粒体通路

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)05-0674-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.05.006

Effects of grape seed proanthocyanidin extract on sports joint injury in rats

CHEN Jie¹, FENG Hongtao²

(1. Physical Education College of Zhengzhou University, He'nan Zhengzhou 450044, China;

2. Vascular Surgery of Zhengzhou People's Hospital, He'nan Zhengzhou 450053, China)

Abstract: Objective To reveal the therapeutic effect and mechanism of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on sports joint injury (SJI) in rats. **Methods** After the establishment of the SJI rat model, rats in each group were orally administered different doses of GSPE (0, 50, 100, and 200 mg/kg) for 4 weeks, and a normal control group was established. After the administration of the test substance, the pain condition of the model rats in each group was assessed using the paw withdrawal threshold (PWT) assay. Tail vein blood was collected to detect serum superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA) content. After the rats were sacrificed, the knee joints were harvested and stained with safranin O-fast green for pathological examination. The protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator alpha (PGC-1 α), phosphorylated-AMP-dependent protein kinase alpha (p-AMPK α), AMPK α , nuclear respiratory factor 1 (NRF1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in knee joint tissue were determined using Western blot. **Results** With increasing GSPE dose, the PWT of rats with SJI increased ($P<0.05$), the shape of knee joint lesions improved, serum SOD and GSH-Px contents increased, and MDA content decreased ($P<0.05$). The protein expression levels of PGC-1 α , p-AMPK α /AMPK α , NRF-1, and TFAM in knee joint tissues of rats with SJI increased with increasing GSPE dose ($P<0.05$). **Conclusion** GSPE intake effectively alleviated pain and knee joint injury in rats with SJI, and the mechanism was related to the activation of the AMPK/PGC-1 α mitochondrial pathway, which inhibits oxidative stress *in vivo*.

Key words: Grape seed proanthocyanidin extract; sports joint injury; pain; oxidative stress; AMPK/PGC-1 α mitochondrial pathway

收稿日期: 2022-05-07

作者简介: 陈杰 男 实验师 研究方向为运动健康实验教学与管理 E-mail: chenjie197410@163.com

通信作者: 冯洪涛 男 主治医师 研究方向为血管外科 E-mail: 342304533@qq.com

长期剧烈运动极易造成骨关节损伤,尤其是在体育运动员人群中^[1-3]。关节的自身修复能力较差,因此,损伤发生后容易形成慢性永久性病变,造成关节功能障碍,影响患者生活质量^[4]。目前,已知活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的过量产生可激活破骨细胞,增加骨组织中脂质过氧化标志物和破坏骨组织中的抗氧化防御系统,从而破坏骨结构,运动性骨关节损伤(Sports joint injury, SJI)的加重与体内过度的氧化应激有关^[5]。因此,改善体内氧化应激水平成为治疗 SJI 的关键。线粒体是产生 ROS 的主要细胞器,可直接参与调节体内抗氧化防御系统,线粒体生物发生异常不仅可以导致线粒体 DNA 出现异常,而且可以导致 ROS 的过量产生。前期的研究也表明,线粒体生物发生通路的障碍与骨关节炎损伤密切相关^[6]。因此,进一步探讨线粒体发生的机制,及其通过氧化应激调节作用实现对骨关节损伤的环节,可为 SJI 治疗提供新的思路。

原花青素是葡萄籽提取物的主要活性成分之一,已被证明具有多种药理作用,包括肝脏^[7]和肾脏^[8]保护等作用。此外,它也是一种天然抗氧化剂,在体外或体内具有非常高的抗氧化活性^[9-10],因此其能否对运动损伤的疗效发挥作用受到关注。目前,尚无葡萄籽原花青素提取物(Grape seed proanthocyanidin extract, GSPE)对 SJI 治疗作用的研究报道,本研究将对 GSPE 对 SJI 的影响及线粒体通路在机制中的作用开展研究,为后续功能开发提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7~9 周龄雄性(体质量 230~280 g)Sprague-Dawley(SD)大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证:SCXK(京)2021-0006]。所有大鼠给予标准饲料和饮用水,饲养地点为郑州大学(实验动物中心),动物饲养室环境为 23℃、55%相对湿度、12 h 的暗/光周期,动物使用许可证:SYXK(豫)2021-0009。

1.1.2 主要仪器与试剂

BW-ZH-PT 型动物实验跑台(上海软隆科技发展有限公司),Von Frey 纤维丝测痛仪(意大利 Ugo Basile),GSPE(纯度>95%,上海同田生物技术股份有限公司)。

青霉素钠(国药准字:H37021950,购自瑞阳制药有限公司),番红 O-固绿染色试剂盒(货号:G1371,购自北京索莱宝科技有限公司),超氧化物

歧化酶(SOD,货号:S0101S)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,货号:S0056)、丙二醛(MDA,货号:S0131M)检测试剂盒、RIPA 裂解液(货号:P0013B)、BCA 试剂盒(货号:P0010S)、PBS(货号:C0221A)、TBST(货号:ST671-500 mL)、EDTA(货号:ST066)、ECL(货号:P0018S)(碧云天生物技术研究),PGC-1 α (货号:ab188102)、p-AMPK α (货号:ab133448)、AMPK α (货号:ab32047)、核呼吸因子 1(NRF1)(货号:ab175932)、线粒体转录因子 A(TFAM)(货号:ab131607)、 β -actin(货号:ab8226)一抗、IgG H&L 二抗(HRP,货号:ab6721)(美国 Abcam 公司),PVDF 膜(货号:YB101123-1,美国 Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 SJI 动物模型的建立

参考文献[11]方法,通过剪断右膝关节前后交叉韧带联合间歇性中等强度运动来建立 SJI 大鼠模型。麻醉大鼠,右膝关节剃毛、消毒、铺巾后,切开关节内侧皮肤及关节腔,剪断前后交叉韧带,使用生理盐水冲洗后缝合伤口。术后肌肉注射 20 万单位青霉素钠。术后 7 d 进行间歇性中等强度运动,运动设备为 BW-ZH-PT 型动物实验跑台。第一周为适应性训练,跑台速度从 10 m/min 递增至 16 m/min,时间为 30 min。第二周为正式训练,跑台速度为 16 m/min,时间为 30 min,每周训练 6 d,连续 2 周。

1.2.2 动物分组及给药

建模后,大鼠被分成 5 组:健康对照组(Control, $n=6$)、SJI 组($n=6$)、SJI+50GSPE 组($n=6$)、SJI+100GSPE 组($n=6$)和 SJI+200GSPE 组($n=6$)。Control 组大鼠为正常饲养不建模的大鼠。Control 组和 SJI 组大鼠每天灌胃 2 mL 蒸馏水,连续 4 周。SJI+50GSPE 组、SJI+100GSPE 组和 SJI+200GSPE 组大鼠每天分别灌胃 50、100 和 200 mg/kg 的 GSPE,连续 4 周。GSPE 的使用剂量参考文献[9,12]设定。

1.2.3 疼痛测定

受试物给药结束 24 h 后,参考文献[13]方法,通过机械痛阈(Paw withdrawal threshold, PWT)测定法采用 Von Frey 纤维丝测痛仪测定大鼠疼痛情况。将大鼠置于单独的塑料室中 30~60 min,使用不同强度的 Von Frey 纤维丝从网格地板下方施加到右后肢爪趾面。使用 up-down 法(强度:1.4~15 g)进行检测,强度由低到高,间隔 1 min。大鼠出现舔足、缩足、抬足时记为阳性,静止超过 5 s 则增加一级强度。分别记录每只大鼠右后肢的平均读数。重复测量 3 次,取平均值。

1.2.4 标本收集

疼痛测定结束后,3% 戊巴比妥钠麻醉下处死

大鼠。采集血样,4 000 r/min 离心(离心半径 8 cm) 10 min,分离血清。快速切除右膝关节,生理盐水冲洗。一部分右膝关节用匀浆机在 0.9% 生理盐水中匀浆,将匀浆离心,取上清液,在-20 °C下冻存。另一部分右膝关节立即用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.5 膝关节番红 O-固绿染色

4% 多聚甲醛固定的膝关节组织用 PBS(含 135 mmol/L NaCl,4.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值为 7.3±0.1)清洗,用 10%EDTA 脱钙 10 d,然后石蜡包埋并切成 5 μm 厚的切片,根据试剂盒说明进行番红 O-固绿染色。

1.2.6 血清氧化应激指标检测

根据试剂盒说明检测血清 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量。

1.2.7 Western blot 检测

使用 RIPA 裂解液从大鼠膝关节匀浆中提取总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白质浓度。取 40 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 上电泳,然后转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 h,然后在 4 °C 与一抗孵育过夜,一抗包括 PGC-1α、p-AMPKα、AMPKα、NRF1、TFAM 和 β-actin,稀释度均为 1:2 000。用 TBST(含有 20 mmol/L Tris,137 mmol/L NaCl,0.1% Tween-20,pH 7.6±0.1)洗涤 3 次后,将膜与 IgG H&L(HRP)二抗(稀释度为 1:2 000)室温孵育 2 h。ECL 溶液显影。将 p-AMPK 归一化为 AMPK,其余的归一化为 β-actin(内参蛋白)。

1.3 统计学分析

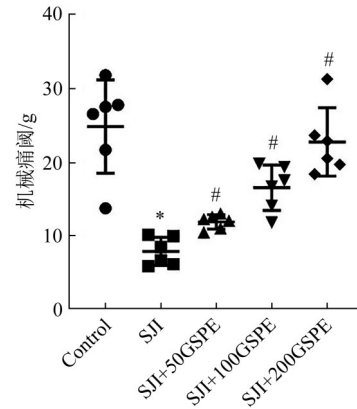
数据以平均值±标准差进行描述。使用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8.0 执行所有统计分析。采用单因素方差分析(ANOVA)和 LSD 事后检验评估各组之间的差异。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSPE 对 SJI 大鼠疼痛的影响

PWT 测定结果显示(图 1),各组大鼠的 PWT 存在显著差异($F=20.180, P<0.001$)。与 Control 组(24.88±6.33 g)比较,SJI 组(7.92±1.92 g)的 PWT 显著降低($P<0.05$);与 SJI 组比较,SJI+50GSPE 组

(11.93±0.97 g)、SJI+100GSPE 组(16.58±3.08 g)和 SJI+200GSPE 组(22.77±4.63 g)的 PWT 均显著升高($P<0.05$);与 SJI+50GSPE 组比较,SJI+100GSPE 组和 SJI+200GSPE 组的 PWT 均显著升高($P<0.05$),说明 GSPE 以剂量依赖性方式减轻了 SJI 大鼠的关节疼痛程度。



注:与 Control 比较,* $P<0.05$;与 SJI 比较,# $P<0.05$

图 1 各组大鼠的机械痛阈测定结果

Figure 1 Paw withdrawal threshold measurement of rats in each group

2.2 GSPE 对 SJI 大鼠膝关节病变的影响

膝关节番红 O-固绿染色显示(图 2),Control 组膝关节形态正常,SJI 组软骨细胞排列紊乱、细胞固缩或空泡化、潮线不齐、关节表明出现裂痕。与 SJI 组比较,SJI+50GSPE 组、SJI+100GSPE 组和 SJI+200GSPE 组的软骨细胞排列较整齐、细胞形态规则、空泡化减少、关节表明平整,无明显裂痕,表明 GSPE 明显改善膝关节形态明显好转。

2.3 GSPE 对 SJI 大鼠血清氧化应激指标的影响

图 3a 显示,各组大鼠的血清抗氧化酶 SOD 含量存在显著差异($F=30.395, P<0.001$)。与 Control 组(296.55±18.32 U/mL)比较,SJI 组(116.42±25.76 U/mL)的血清 SOD 含量显著降低($P<0.05$)。与 SJI 组比较,SJI+50GSPE 组(166.18±39.08 U/mL)、SJI+100GSPE 组(192.03±35.25 U/mL)和 SJI+200GSPE 组(222.38±25.97 U/mL)的血清 SOD 含量均显著升高($P<0.05$)。与 SJI+50GSPE 组比较,SJI+100GSPE 组和 SJI+200GSPE 组的血清 SOD 含

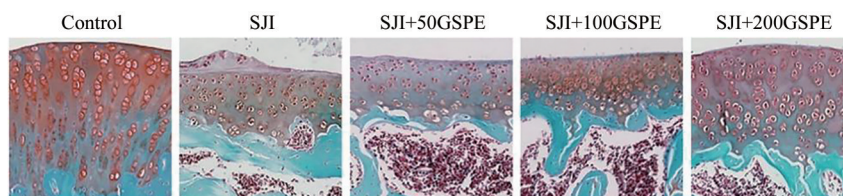
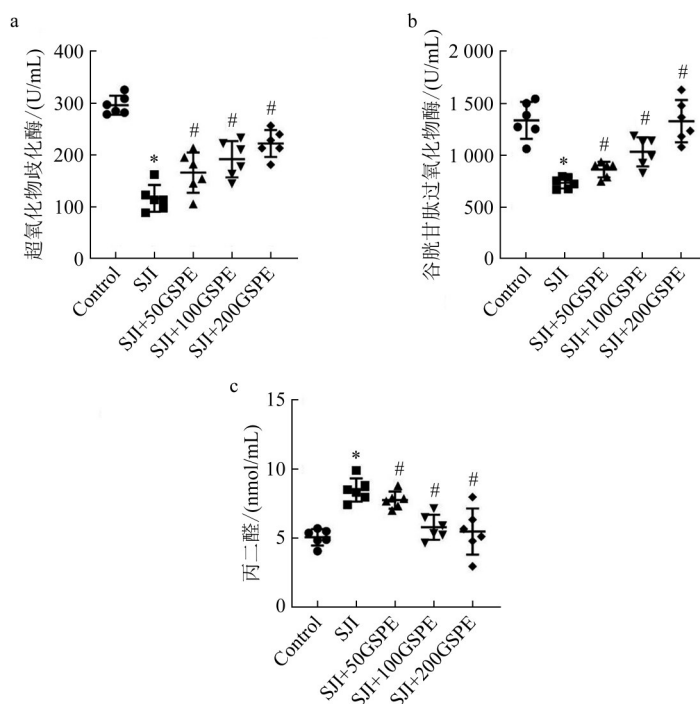


图 2 各组大鼠的膝关节番红 O-固绿染色结果(×200)

Figure 2 Safranin O-fast green staining results of knee joints of rats in each group (×200)



注:a:超氧化物歧化酶;b:谷胱甘肽过氧化物酶;c:丙二醛;与Control比较,* $P<0.05$;与SJI比较,# $P<0.05$

图3 各组大鼠的血清超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和丙二醛含量比较

Figure 3 Comparison of serum SOD, GSH-Px and MDA content of rats in each group

量均显著升高($P<0.05$)。

图3b显示,各组大鼠的血清抗氧化酶GSH-Px含量存在显著差异($F=21.770, P<0.001$)。与Control组(1335.91 ± 178.97 U/mL)比较,SJI组(731.50 ± 54.57 U/mL)的血清GSH-Px含量显著降低($P<0.05$)。与SJI组比较,SJI+50GSPE组(860.04 ± 75.12 U/mL)、SJI+100GSPE组(1031.81 ± 140.61 U/mL)和SJI+200GSPE组(1327.67 ± 204.20 U/mL)的血清GSH-Px含量均显著升高($P<0.05$)。与SJI+50GSPE组比较,SJI+100GSPE组和SJI+200GSPE组的血清GSH-Px含量均显著升高($P<0.05$)。

图3c显示,各组大鼠的血清过氧化产物MDA含量存在显著差异($F=13.557, P<0.001$)。与Control组(5.06 ± 0.59 nmol/mL)比较,SJI组(8.49 ± 0.84 nmol/mL)的血清MDA含量显著升高($P<0.05$)。与SJI组比较,SJI+50GSPE组(7.76 ± 0.61 nmol/mL)、SJI+100GSPE组(5.80 ± 0.91 nmol/mL)和SJI+200GSPE组(5.48 ± 1.68 nmol/mL)的血清MDA含量均显著降低($P<0.05$)。与SJI+50GSPE组比较,SJI+100GSPE组和SJI+200GSPE组的血清MDA含量均显著降低($P<0.05$)。

综上,GSPE以剂量依赖性方式减轻了SJI大鼠关节组织中的氧化应激损伤。

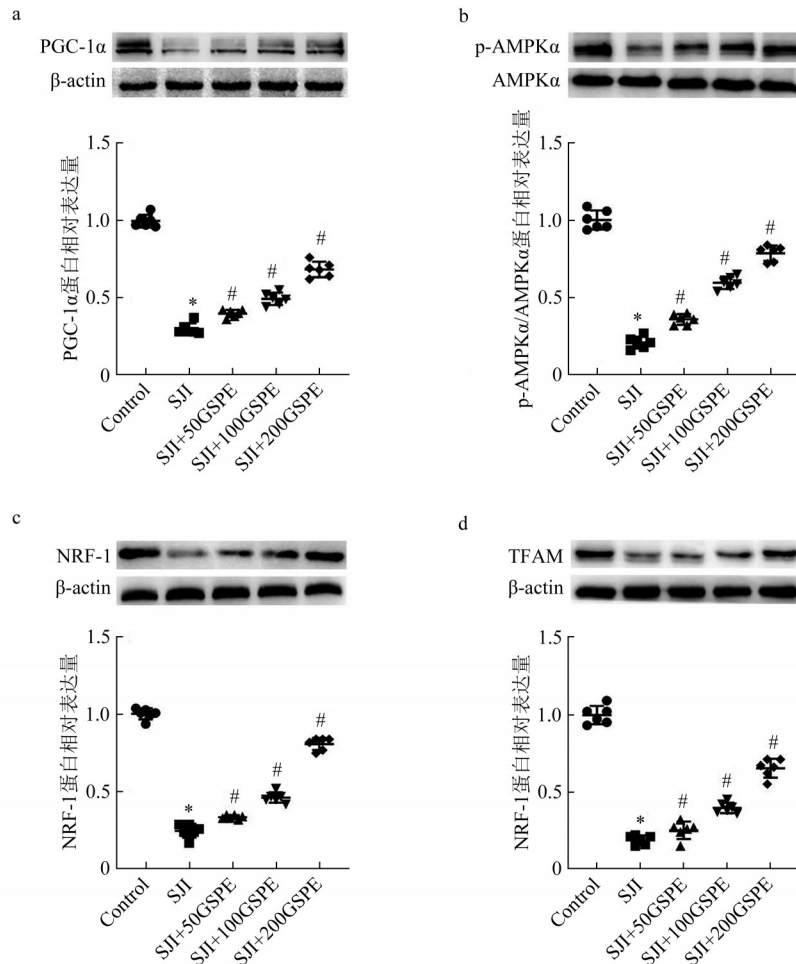
2.4 GSPE对SJI大鼠膝关节组织AMPK/PGC-1 α 线粒体通路的影响

图4显示,各组大鼠的膝关节组织PGC-1 α 、p-

AMPK α /AMPK α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平存在显著差异($F=294.027, P<0.001$; $F=291.913, P<0.001$; $F=514.952, P<0.001$; $F=267.781, P<0.001$)。与Control组比较,SJI组的PGC-1 α 、p-AMPK α /AMPK α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与SJI组比较,SJI+50GSPE组、SJI+100GSPE组和SJI+200GSPE组的PGC-1 α 、p-AMPK α /AMPK α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与SJI+50GSPE组比较,SJI+100GSPE组和SJI+200GSPE组的PGC-1 α 、p-AMPK α /AMPK α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。综上,GSPE以剂量依赖性方式激活了SJI大鼠膝关节组织中的AMPK/PGC-1 α 线粒体通路。

3 讨论

氧化应激是指细胞和组织的氧化和抗氧化系统之间失衡,导致ROS的过量生成。有研究表明,GSPE在体外和体内比维生素C、E和 β -胡萝卜素具有更有效的自由基清除能力^[14]。其他文献表明,当GSPE的剂量在35~400 mg/kg/d时,GSPE在动物实验中表现出良好的抗氧化应激作用,主要作用机制在于抑制脂质过氧化和ROS的产生,从而减轻细胞膜脂质过氧化损伤^[15]。考虑到氧化应激在SJI发病过程中的作用,本课题组推测GSPE可能是治疗SJI的潜在天然药物,因此,本研究选择了50、



注:a:PGC-1 α ;b:p-AMPK α /AMPK α ;c:NRF-1;d:TFAM;与Control比较,* $P<0.05$;与SJI比较,# $P<0.05$

图4 各组大鼠膝关节组织中PGC-1 α 、p-AMPK α /AMPK α 、NRF-1和TFAM的蛋白表达

Figure 4 Protein expressions of PGC-1 α , p-AMPK α /AMPK α , NRF-1 and TFAM in knee joint tissues of rats in each group

100和200 mg/kg/d的GSPE对SJI大鼠进行治疗,番红O-固绿染色结果表明GSPE以剂量依赖性方式减轻了SJI大鼠膝关节病变,GSPE以剂量依赖性方式显著提高了SJI大鼠血清SOD和GSH-Px水平,并显著降低了MDA水平。有研究表明,中等剂量的GSPE(50和100 mg/kg/d)通过增加T-AOC、SOD、CAT活性和降低血浆和骨骼肌中的MDA水平而显示出抗疲劳的作用^[16]。低剂量GSPE(35 mg/kgbw/d)连续给药10周,可通过增加GSH/GSSG比值和ORAC,降低GSSG含量,改善肥胖Zucker大鼠的肝脏氧化状态^[17]。本研究首次证实了GSPE对SJI的潜在治疗作用,其机制与改善体内抗氧化系统有关。

SJI的一项临床表现是慢性持续性疼痛,但慢性疼痛的潜在机制仍然不清楚。本研究显示,GSPE以剂量依赖性方式减轻了SJI大鼠的疼痛,表现为PWT升高。氧化应激和线粒体功能障碍是慢性疼痛的主要病理机制^[18-19]。线粒体是产生ROS的主要细胞器。在病理条件下,线粒体诱导ROS的异常产生,诱导钙积聚和细胞内死亡途径的激活,最终

导致细胞死亡^[20]。据报道,ROS和产生ROS的NADPH氧化酶NOX2有助于慢性疼痛的发展^[21-22]。线粒体功能障碍与多种慢性疼痛模型有关^[23]。因此,抑制氧化应激、保护或促进线粒体功能对于减轻SJI慢性疼痛非常重要。因此,GSPE的抗氧化作用减弱了SJI大鼠的疼痛,其机制可能与改善线粒体功能有关。

线粒体生物的发生是一个自我更新的过程,通过这个过程,现有的线粒体分裂并产生新的线粒体^[20]。据报道,线粒体生物发生可以减少代谢紊乱和慢性炎症,提高抗氧化能力并增加软骨细胞的活性^[24]。AMPK/PGC-1 α 信号通路通过调节线粒体的生物发生在许多疾病中发挥重要作用^[25-26]。AMPK激活促进了线粒体蛋白(PGC-1 α 、NRF1和TFAM)的表达^[27],启动线粒体DNA(mtDNA)转录和复制,促进了线粒体的生物发生^[28]。此外,AMPK/PGC-1 α 信号通路在疼痛调节中同样发挥重要作用,AMPK/PGC-1 α 的激活对骨性关节炎具有止痛作用,并可以限制骨性关节炎的进展^[6]。AMPK是一种具有神经保护作用的高能应激敏感蛋白,也是痛

觉的调节器^[29-30]。AMPK的激活可以抑制内毒素诱导的促炎细胞因子[如白介素-1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-18和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)],并抑制核因子- κ B的激活,从而抑制验证性疼痛^[31-32]。其他研究表明,PGC-1 α 介导的线粒体生物发生在神经病理性疼痛中具有强大的止痛作用^[33-34]。本研究显示,GSPE以剂量依赖性方式升高了SJI大鼠膝关节组织中PGC-1 α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平,激活了SJI大鼠膝关节组织中的AMPK信号通路。因此,本研究推测GSPE可能通过激活AMPK/PGC-1 α 线粒体通路,进而减轻了氧化应激诱导的疼痛及骨关节损伤,从而发挥了对SJI的治疗作用。鉴于线粒体生物发生在关节损伤发病机制和疼痛发生中的重要作用,本文认为诱导线粒体生物发生可能是SJI的有效治疗靶点。

综上,GSPE可有效减轻了SJI大鼠疼痛和膝关节损伤,作用机制可能与其通过AMPK/PGC-1 α 线粒体通路的激活抑制了体内氧化应激水平有关。后续将进一步开展功能和形态学检测来验证相关机制的推测。

参考文献

- [1] 侯建鹏,高俊虎,刘建伟,等.综合康复治疗治疗运动性膝关节损伤临床观察[J].针灸临床杂志,2020,36(4):36-39.
HOU J P, GAO J H, LIU J W, et al. Clinical study of comprehensive rehabilitation therapy on exercise-induced knee joint injury[J]. Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion, 2020, 36(4): 36-39.
- [2] 秦桂福,刘婉,梁博.温针灸联合运动疗法对运动性膝关节损伤恢复期患者的临床效果[J].中国医药导报,2020,17(24):79-83.
QIN G F, LIU W, LIANG B. Clinical effect of warm acupuncture combined with exercise therapy on sports knee injury in convalescent patients[J]. China Medical Herald, 2020, 17(24): 79-83.
- [3] 赵响,詹建国,许滨.整合性神经肌肉训练预防青少年女性运动性膝关节损伤[J].中国组织工程研究,2017,21(32):5108-5114.
ZHAO X, ZHAN J G, XU B. Integrative neuromuscular training protects juvenile female athletes from knee injury[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2017, 21(32): 5108-5114.
- [4] 王卫校.线粒体通路对骨关节运动损伤发生机制及预防措施研究[J].陕西医学杂志,2014,43(4):395-397.
WANG W X. The mitochondrial pathway for bone and joint sports injury research mechanism and prevention measures[J]. Shaanxi Medical Journal, 2014, 43(4): 395-397.
- [5] 徐瑞泽,张杭州,郭大伟,等.康复治疗联合玻璃酸钠关节腔注射对运动性膝关节损伤的关节腔氧化相关物质浓度影响[J].中国医药指南,2020,18(9):61-62.
XU R Z, ZHANG H Z, GUO D W, et al. Effect of rehabilitation therapy combined with sodium hyaluronate injection on the concentration of oxidization-related substances in joint cavity of exercise-induced knee joint injury[J]. Guide of China Medicine, 2020, 18(9): 61-62.
- [6] WANG L Y, SHAN H J, WANG B, et al. Puerarin attenuates osteoarthritis via upregulating AMP-activated protein kinase/proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 signaling pathway in osteoarthritis rats[J]. Pharmacology, 2018, 102(3-4): 117-125.
- [7] HASONA N, MORSI A. Grape seed extract alleviates dexamethasone-induced hyperlipidemia, lipid peroxidation, and hematological alteration in rats[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB, 2019, 34(2): 213-218.
- [8] SAAD A A, YOUSSEF M I, EL-SHENNAWY L K. Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: The protective effect of grape seed proanthocyanidin extract[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(7): 1499-1506.
- [9] 高璐,王滢,饶胜其,等.葡萄籽原花青素提取物对衰老模型小鼠抗氧化作用[J].食品科学,2014,35(23):253-256.
GAO L, WANG Y, RAO S Q, et al. Antioxidant activity of grape seed proanthocyanidin extract in aging mouse model[J]. Food Science, 2014, 35(23): 253-256.
- [10] 梁红敏,高德艳,胡文效.葡萄籽低聚原花青素体外抗氧化活性研究[J].中国酿造,2017,36(4):149-152.
LIANG H M, GAO D Y, HU W X. *In vitro* antioxidant capacity of grape seed oligomeric procyanidins[J]. China Brewing, 2017, 36(4): 149-152.
- [11] 容瑛.运动性骨关节损伤线粒体通路机制及干预初探[D].长沙:湖南师范大学,2010.
RONG Y. The mechanism of mitochondrial pathway of exercise-induced arthritis and the intervention preliminary[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2010.
- [12] 王颖,张桂芳,徐炳政,等.葡萄籽原花青素提取物对糖尿病小鼠血糖的影响[J].天然产物研究与开发,2012,24(9):1191-1195.
WANG Y, ZHANG G F, XU B Z, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin extracts on blood glucose of diabetic mice[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(9): 1191-1195.
- [13] NWOSU L N, GOWLER P R W, BURSTON J J, et al. Analgesic effects of the cathepsin K inhibitor L-006235 in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain[J]. Pain Reports, 2018, 3(6): e685.
- [14] BAGCHI D, SWAROOP A, PREUSS H G, et al. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2014, 768: 69-73.
- [15] RODRÍGUEZ-PÉREZ C, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E, et al. Grape seeds proanthocyanidins: An overview of *in vivo* bioactivity in animal models[J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2435.
- [16] XIANCHU L, MING L, XIANGBIN L, et al. Grape seed proanthocyanidin extract supplementation affects exhaustive

- exercise-induced fatigue in mice [J]. *Food & Nutrition Research*, 2018, 62: PMC5995222.
- [17] FERNÁNDEZ-IGLESIAS A, PAJUELO D, QUESADA H, et al. Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(4): 727-737.
- [18] TRECARICHI A, FLATTERS S J L. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. *International Review of Neurobiology*, 2019, 145: 83-126.
- [19] ZHOU Y Q, LIU D Q, CHEN S P, et al. PPAR γ activation mitigates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain via induction of Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 129: 110356.
- [20] LI P A, HOU X L, HAO S C. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [21] XU B Y, SUN J, CHEN S P, et al. Nox2 contributes to reactive oxygen species-induced redox imbalance in cancer-induced bone pain [J]. *American Journal of Translational Research*, 2021, 13(3): 1269-1279.
- [22] ZHOU Y Q, LIU D Q, CHEN S P, et al. Reactive oxygen species scavengers ameliorate mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain [J]. *Redox Biology*, 2018, 14: 391-397.
- [23] SUN J, LI J Y, ZHANG L Q, et al. Nrf2 activation attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain via induction of PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis in the spinal cord [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 9577874.
- [24] BLANCO F J, FERNÁNDEZ-MORENO M. Mitochondrial biogenesis: a potential therapeutic target for osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2020, 28(8): 1003-1006.
- [25] LI L Y, XIAO L N, HOU Y H, et al. Sestrin2 silencing exacerbates cerebral ischemia/reperfusion injury by decreasing mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC-1 α pathway in rats [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30272.
- [26] QUAN N H, WANG L, CHEN X, et al. Sestrin2 prevents age-related intolerance to post myocardial infarction via AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018, 115: 170-178.
- [27] JÄGER S, HANDSCHIN C, ST-PIERRE J, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α [J]. *Cell Metabolism*, 2007, 104(29): 12017-12022.
- [28] WU Z D, PUIGSERVER P, ANDERSSON U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, 98(1): 115-124.
- [29] GUI Y L, CHEN L, DUAN S Y, et al. Methyl cinnamate alleviated CCI-induced upregulation of spinal AMPA receptors and pain hypersensitivity by targeting AMPK [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 833: 183-189.
- [30] LU Y, YAO J, GONG C, et al. Gentiopicroside ameliorates diabetic peripheral neuropathy by modulating PPAR- γ /AMPK/ACC signaling pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(2): 585-596.
- [31] CHEN C C, LIN J T, CHENG Y F, et al. Amelioration of LPS-induced inflammation response in microglia by AMPK activation [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 692061.
- [32] HAN Y, JIANG C, TANG J, et al. Resveratrol reduces morphine tolerance by inhibiting microglial activation via AMPK signaling [J]. *European Journal of Pain: London, England*, 2014, 18(10): 1458-1470.
- [33] CHEN N, GE M M, LI D Y, et al. β 2-adrenoreceptor agonist ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain via induction of mitochondrial biogenesis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: 112331.
- [34] KASHIWAGI Y, YI H, LIU S E, et al. Mitochondrial biogenesis factor PGC-1 α suppresses spinal morphine tolerance by reducing mitochondrial superoxide [J]. *Experimental Neurology*, 2021, 339: 113622.