

## • 实验研究 •

## 蓝萼甲素对膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬和凋亡的影响

罗锐<sup>1</sup> 王智<sup>1</sup> 鲁林<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨蓝萼甲素(GLA)对膝骨关节炎(KOA)大鼠软骨细胞自噬和凋亡及低氧诱导因子1 $\alpha$ /腺病毒E1B相互作用蛋白3(HIF-1 $\alpha$ /BNIP3)信号通路的影响。方法:构建膝骨关节炎大鼠模型,将造模成功大鼠随机分为KOA组、GLA低/高剂量组(GLA-L/GLA-H组)、GLA高剂量+si-NC组(GLA-H+si-NC组)、GLA高剂量+si-HIF-1 $\alpha$ 组(GLA-H+si-HIF-1 $\alpha$ 组),另取健康大鼠作为对照组(Control组);对各组大鼠膝关节临床症状评分;ELISA法检测血清炎症因子水平;HE染色观察膝关节退变情况;TUNEL染色检测细胞凋亡;免疫组化检测细胞自噬相关蛋白表达;Western Blot法检测HIF-1 $\alpha$ /BNIP3信号通路相关蛋白表达。结果:KOA组较Control组结构破坏、退变现象明显,软骨浅层出现缺失及裂缝,且裂隙深达钙化层,潮线断裂,细胞数量减少、排列紊乱,炎症浸润明显,膝关节临床症状评分、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平及细胞凋亡率、Bax、C-caspase-3、beclin 1、BNIP3表达升高,P62、HIF-1 $\alpha$ 表达降低( $P<0.05$ );GLA-L组及GLA-H组较KOA组结构破坏、退变现象得到改善,软骨表面相对平整光滑,潮线清晰,偶见微小裂隙,软骨细胞形态相对正常、排列相对整齐,少量细胞肿胀及炎症细胞浸润,膝关节临床症状评分、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平及细胞凋亡率、Bax、C-caspase-3、beclin 1、BNIP3表达降低,P62、HIF-1 $\alpha$ 表达升高( $P<0.05$ );GLA-H+si-HIF-1 $\alpha$ 组较GLA-H+si-NC组结构破坏严重,软骨浅层缺失及裂缝加剧,潮线断裂,细胞排列紊乱且数量减少,炎症细胞浸润现象加剧,膝关节临床症状评分、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平及细胞凋亡率、Bax、C-caspase-3、beclin 1、BNIP3表达升高,P62、HIF-1 $\alpha$ 表达降低( $P<0.05$ )。结论:蓝萼甲素可抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡,其作用机制与激活HIF-1 $\alpha$ /BNIP3信号通路相关。

**[关键词]** 蓝萼甲素;低氧诱导因子1 $\alpha$ /腺病毒E1B相互作用蛋白3信号通路;膝骨关节炎;自噬;凋亡  
**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)05-0006-07

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.250502

## Effects of Glaucocalyxin A on Chondrocytes Autophagy and Apoptosis in Rat with Knee Osteoarthritis

LUO Kun<sup>1</sup> WANG Zhi<sup>1</sup> LU Lin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effects of glaucocalyxin A (GLA) on chondrocytes autophagy, apoptosis and hypoxia induction factor 1 $\alpha$ /adenovirus E1B interacting protein 3 (HIF-1 $\alpha$ /BNIP3) signaling pathway in knee osteoarthritis (KOA) rat. **Methods:** The KOA rat model was constructed, and the rats were randomly separated into KOA group, GLA low and high-dose groups (GLA-L, GLA-H groups), GLA high-dose + si-NC (GLA-H + si-NC group), and GLA high-dose + si-HIF-1 $\alpha$  (GLA-H + si-HIF-1 $\alpha$  group). The healthy rats were taken as control group. The clinical symptoms of knee joints in rats were scored; ELISA was applied to detect the serum levels of inflammatory factors; HE staining was applied to observe the degeneration of knee joints; TUNEL staining was applied to detect apoptosis; immunohistochemistry was applied to detect the protein expression of autophagy; Western Blot analysis of HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 signaling pathway related protein expression. **Results:** Compared with control group, KOA group showed obvious structural damage and degeneration, the shallow layer of cartilage was deficient and cracked, and the cracks reached the calcification layer, the tide

line was broken, the number of cells was reduced, the arrangement was disordered, the inflammatory infiltration was obvious, the knee clinical symptom score, levels of IL-6,

基金项目:武汉市中医药科研项目(WZ24B06)

<sup>1</sup> 武汉市中医医院(武汉, 430050)

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , apoptosis rate, the expression of Bax, C-caspase-3, beclin 1, and BNIP3 elevated, the expression of P62 and HIF-1 $\alpha$  reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with KOA group, the structural destruction phenomenon of GLA-L and GLA-H groups showed improved structural damage and degeneration. The cartilage surface was relatively smooth, the tide line was clear, and occasionally small cracks were seen. The shape of chondrocytes was relatively normal and the arrangement was relatively neat, and a small amount of cells were swollen and inflammatory cell infiltrated, the knee clinical symptom score, levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , apoptosis rate, the expression of Bax, C-caspase-3, beclin 1, and BNIP3 reduced, the expression of P62 and HIF-1 $\alpha$  increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the GLA-H + si-NC group, the GLA-H + si-HIF-1 $\alpha$  group had severe structural destruction, aggravated loss and cracks of superficial cartilage, tidal line fracture, disordered cell arrangement and reduced number, intensified inflammatory cell infiltration phenomenon, the knee clinical symptom score, levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , apoptosis rate, the expression of Bax, C-caspase-3, beclin 1, and BNIP3 increased, the expression of P62 and HIF-1 $\alpha$  reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** GLA can inhibit autophagy and apoptosis in KOA rats, and its mechanism is related to the activation of HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 signaling pathway.

**Keywords:** glaucocalyxin A; hypoxia induction factor-1 $\alpha$ /adenovirus E1B interacting protein 3 signaling pathway (HIF-1 $\alpha$ /BNIP3); knee osteoarthritis; autophagy; apoptosis

膝骨关节炎(KOA)属于关节软骨变性退变、关节边缘和软骨下骨增生及骨赘生成的一种膝关节慢性退行性疾病,其可致使患者关节畸形、疼痛、运动障碍等,严重者可造成肢体残疾<sup>[1-2]</sup>。蓝萆甲素(GLA)是一种二萜类化合物,具有抑菌抗炎、抗肿瘤、抗凋亡等作用,在治疗关节痛、腹痛、胃炎等疾病方面具有重要作用。蓝萆甲素可抑制软骨细胞中炎症细胞因子的产生,减轻 IL-1 $\beta$  诱导的骨关节炎软骨细胞炎症反应和软骨降解<sup>[3]</sup>。低氧诱导因子 1 $\alpha$ /腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (HIF-1 $\alpha$ /BNIP3)信号通路属于经典自噬相关通路,其在骨退行性疾病的发展中发挥重要作用,其中上调 HIF-1 $\alpha$ ,下调 BNIP3 表达,可通过抑制炎症、软骨细胞自噬与凋亡,减轻膝骨关节炎兔膝关节软骨组织退变、疼痛及功能障碍等<sup>[4]</sup>。本研究主要通过探究蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠细胞自噬和凋亡及 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路的影响,以期对膝骨关节炎的治疗提供新思路,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠(SCXK(鄂)2021-0027)购自湖北贝恩特生物科技有限公司。

### 1.2 实验试剂

蓝萆甲素标准品(LA3557)购自北京康瑞纳生物科技有限公司;HE 染色试剂盒(60524ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(70-EK306/3, 70-EK301B/3, 70-EK3823/2)购自杭州联科生物技术股份有限公司;P62、beclin 1、HIF-1 $\alpha$ 、BNIP3 抗体(GTX128173, GTX37770, GTX33617, GTX111902)购自深圳欣博盛生物科技有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 膝骨关节炎大鼠模型构建** 实验大鼠先适应性喂养 1 周,然后麻醉固定,剃毛消毒,左前腿膝关节内侧纵向切开暴露整个膝关节,分离血管、结缔组织后,弯曲膝关节,切除半月板,并切断前交叉韧带,保留关节软骨面,冲洗关节腔,抽屈试验阳性后快速止血,缝合伤口,连续 3 d 注射青霉素,然后每日驱赶大鼠 30 min 使其运动,若大鼠发生膝关节肿胀、行走不便或跛行,表示建模成功<sup>[5]</sup>。本研究已经贝恩特生物科技公司动物伦理委员会审核批准。

**1.3.2 分组与处理** 将造模成功大鼠随机分为 KOA 组、GLA 低/高剂量组(GLA-L/GLA-H 组)、GLA 高剂量 + si-NC 组(GLA-H + si-NC 组)、GLA 高剂量 + si-HIF-1 $\alpha$  组(GLA-H + si-HIF-1 $\alpha$  组),每组各 12 只,另取 12 只健康大鼠作为对照组(Control 组)。GLA-L 组和 GLA-H 组<sup>[6]</sup>分别皮下注射 10, 40 mg/kg 蓝萆甲素;GLA-H + si-NC 组和 GLA-H + si-HIF-1 $\alpha$  组均皮下注射 40 mg/kg 蓝萆甲素,然后分别注射 si-NC 和 si-HIF-1 $\alpha$  质粒病毒;Control 组与 KOA 组皮下注射等量生理盐水;持续给药 21 d。

**1.3.3 膝关节临床症状评分** 给药结束后,从步态、关节肿胀程度、局部疼痛度、关节活动范围 4 个方面对大鼠患肢进行评分<sup>[7]</sup>。步态:0 分正常行走;1 分轻度跛行,触地有力;2 分跛行明显;3 分不能行走。关节肿胀程度:0 分无肿胀;1 分轻度肿胀,骨性标记线变浅;2 分重度肿胀,骨性标记线消失。局部疼痛度:0 分无疼痛;1 分出现收缩;2 分出现收缩,轻度全身反应;3 分出现收缩,全身颤抖乃至挣扎。关节活动范围:0 分关节活动度  $> 90^\circ$ ,无明显疼痛反应;1 分关节活动度为  $45^\circ \sim 90^\circ$ ,无明显疼痛反应;2 分关节活动度为  $15^\circ \sim$

44°,无明显疼痛反应;3分关节活动度<15°,无明显疼痛反应。总分为0~11分,分值越高膝骨关节炎越严重。

**1.3.4 炎症因子水平** 评分结束后,麻醉大鼠取腹主动脉血,静置后离心取上清,ELISA试剂盒检测血清IL-6、IL-1β、TNF-α水平。

**1.3.5 膝关节软骨组织退变观察** 取血结束,处死各组大鼠取膝关节软骨组织,其中各组任选6个组织,清洗后固定,浸蜡包埋,制石蜡切片,然后脱蜡水化,进行HE染色,显微镜下观察分析图像。

**1.3.6 膝骨关节软骨细胞凋亡检测** 取膝关节软骨组织石蜡切片,常规处理后行TUNEL染色,随后干燥密封,用显微成像系统采集图像,并观察各组大鼠膝关节软骨组织细胞总数及凋亡数,计算分析凋亡率。

**1.3.7 软骨细胞自噬相关蛋白检测** 取膝关节软骨组织石蜡切片,常规处理后进行抗原修复,然后与P62、beclin 1一抗低温反应,次日与HRP标记二抗共反应,加入DAB显色,最后采集图像并分析各蛋白光密度值。

**1.3.8 HIF-1α/BNIP3 信号通路相关蛋白检测** 将各组剩余6个膝关节软骨组织研碎后与蛋白裂解液共反应,然后离心取上清,提取总蛋白并进行定量分析,然后根据蛋白样大小进行凝胶电泳分离,湿转PDVF膜,血清封闭,随后与HIF-1α、BNIP3一抗低温共孵育,次日与山羊抗兔二抗室温共孵育,再与ECL共孵育,最后采集图像并对各蛋白进行定量分析。

1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式描述,两组间比较行 $t$ 检验,多组

间比较及进一步两两比较分别行单因素方差分析和SNK- $q$ 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠膝关节临床症状评分的影响

KOA组较Control组膝关节临床症状评分升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GLA-L组和GLA-H组较KOA组膝关节临床症状评分降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GLA-H+si-HIF-1α组较GLA-H+si-NC组膝关节临床症状评分升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 各组大鼠膝关节临床症状评分比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	临床症状评分/分
Control组	0.71±0.08
KOA组	8.79±0.41 <sup>1)</sup>
GLA-L组	5.94±0.33 <sup>2)</sup>
GLA-H组	2.85±0.25 <sup>23)</sup>
GLA-H+si-NC组	2.96±0.27
GLA-H+si-HIF-1α组	7.24±0.37 <sup>4)</sup>

注:1)与Control组比, $P < 0.05$ ;2)与KOA组比, $P < 0.05$ ;3)与GLA-L组比, $P < 0.05$ ;4)与GLA-H+si-NC组比, $P < 0.05$ 。

2.2 蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠炎症因子水平的影响

KOA组较Control组IL-6、IL-1β、TNF-α水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GLA-L组和GLA-H组较KOA组IL-6、IL-1β、TNF-α水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GLA-H+si-HIF-1α组较GLA-H+si-NC组IL-6、IL-1β、TNF-α水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 各组大鼠炎症因子水平比较( $n=12, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α
Control组	32.14±1.82	9.78±1.03	189.64±10.56
KOA组	97.36±3.91 <sup>1)</sup>	52.19±2.74 <sup>1)</sup>	458.36±25.44 <sup>1)</sup>
GLA-L组	71.48±3.22 <sup>2)</sup>	31.64±2.08 <sup>2)</sup>	339.57±19.68 <sup>2)</sup>
GLA-H组	44.83±2.45 <sup>23)</sup>	10.51±1.36 <sup>23)</sup>	226.83±12.57 <sup>23)</sup>
GLA-H+si-NC组	46.57±2.57	12.37±1.44	229.45±13.64
GLA-H+si-HIF-1α组	80.26±3.56 <sup>4)</sup>	38.76±2.41 <sup>4)</sup>	374.22±21.83 <sup>4)</sup>

注:1)与Control组比, $P < 0.05$ ;2)与KOA组比, $P < 0.05$ ;3)与GLA-L组比, $P < 0.05$ ;4)与GLA-H+si-NC组比, $P < 0.05$ 。

2.3 蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠膝关节退变的影响

Control组软骨组织结构完整清晰,软骨表面光滑,潮线清晰,细胞形态正常、排列规则,整体无退变表现;KOA组较Control组结构破坏、退变现象明显,软骨浅层出现缺失及裂缝,且裂隙深达钙化层,潮线断裂,细胞数量减少、排列紊乱,炎性浸润明显;GLA-L组和GLA-H组较KOA组结构破坏、退变现象得到改善,软骨表面相对平整光滑,潮线清晰,偶见微小裂隙,软骨细胞形态相对正常、排列相对整齐,少量细胞肿胀

及炎性细胞浸润;GLA-H+si-HIF-1α组较GLA-H+si-NC组结构破坏严重,软骨浅层缺失及裂缝加剧,潮线断裂,细胞排列紊乱且数量减少,炎性细胞浸润现象加剧,见图1。

2.4 蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠膝关节软骨细胞凋亡的影响

KOA组较Control组细胞凋亡率、Bax、C-caspase-3表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GLA-L组和GLA-H组较KOA组细胞凋亡率、Bax、



C-caspase-3 表达降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); GLA-H+si-HIF-1 $\alpha$  组较 GLA-H+si-NC 组细胞调 亡率、Bax、C-caspase-3 表达升高,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见图 2、图 3 及表 3。

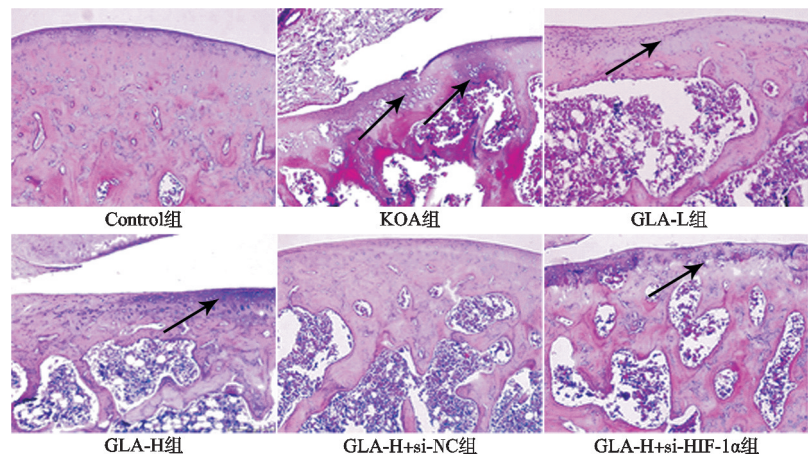


图 1 HE 染色观察各组大鼠膝关节软骨组织退变情况(箭头指向软骨损伤,×200)

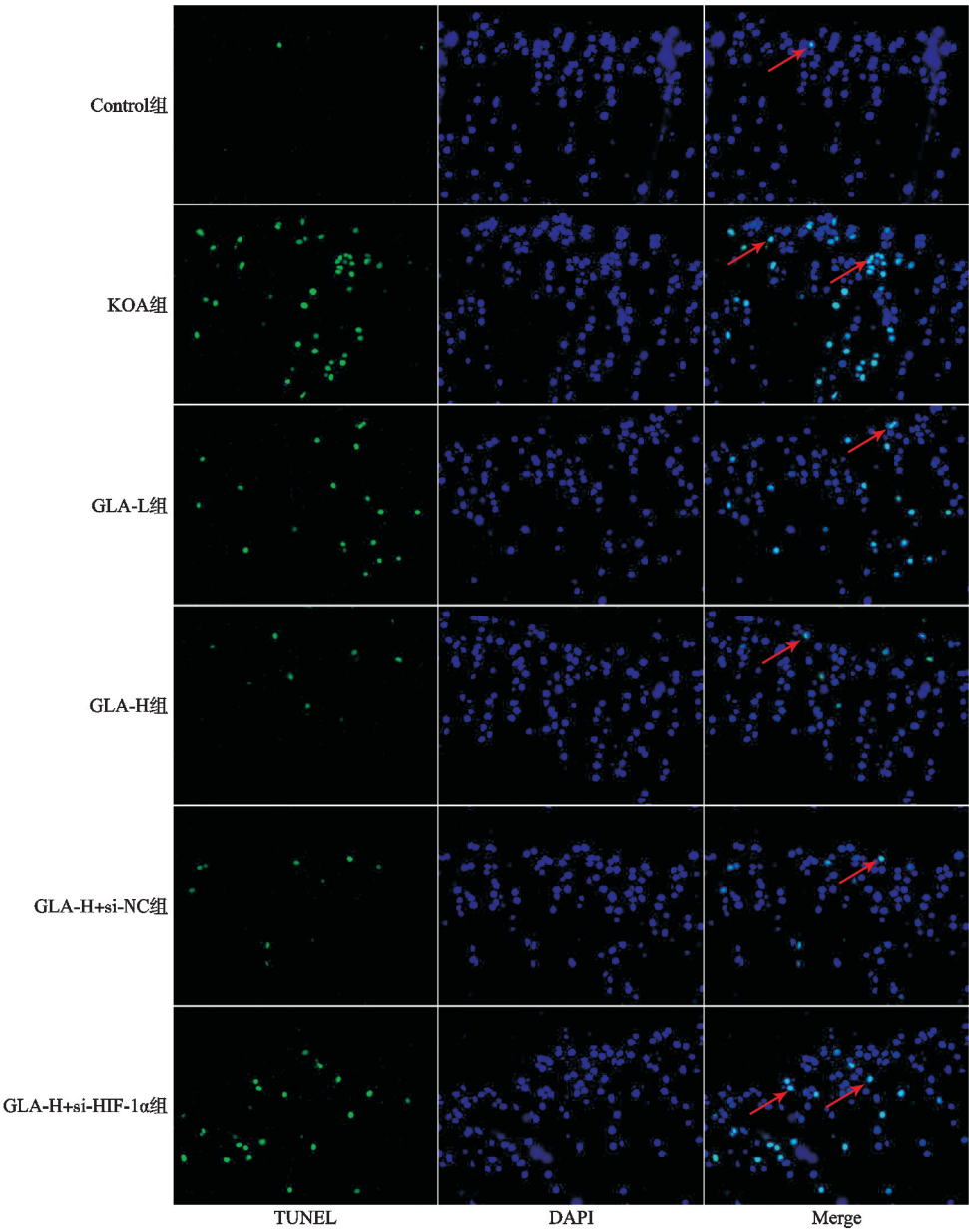
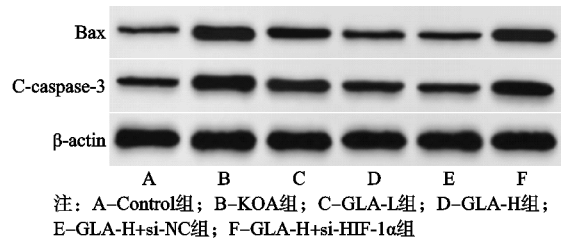


图 2 TUNEL 染色检测各组大鼠膝关节软骨细胞凋亡情况(箭头指向凋亡细胞)



注: A-Control组; B-KOA组; C-GLA-L组; D-GLA-H组; E-GLA-H+si-NC组; F-GLA-H+si-HIF-1α组

图3 Western Blot 法检测 Bax 及 C-caspase-3 蛋白表达

表3 各组大鼠膝关节软骨细胞凋亡情况比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率/%	Bax/ $\beta$ -actin	C-caspase-3/ $\beta$ -actin
Control 组	$1.06 \pm 0.35$	$0.26 \pm 0.03$	$0.34 \pm 0.03$
KOA 组	$35.26 \pm 1.97^{1)}$	$0.79 \pm 0.08^{1)}$	$0.85 \pm 0.09^{1)}$
GLA-L 组	$21.17 \pm 1.56^{2)}$	$0.58 \pm 0.06^{2)}$	$0.63 \pm 0.06^{2)}$
GLA-H 组	$6.99 \pm 1.03^{2)3)}$	$0.35 \pm 0.04^{2)3)}$	$0.40 \pm 0.04^{2)3)}$
GLA-H+ si-NC 组	$7.52 \pm 1.12$	$0.37 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.04$
GLA-H+ si-HIF-1α 组	$23.87 \pm 1.69^{4)}$	$0.66 \pm 0.07^{4)}$	$0.71 \pm 0.07^{4)}$

注:1)与 Control 组比,  $P<0.05$ ;2)与 KOA 组比,  $P<0.05$ ;3)与 GLA-L 组比,  $P<0.05$ ;4)与 GLA-H+si-NC 组比,  $P<0.05$ 。

2.5 蓝萆甲素对膝骨关节炎大鼠膝关节软骨细胞自噬的影响

KOA 组较 Control 组 beclin 1 升高, P62 表达降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); GLA-L 组和 GLA-H 组较 KOA 组 beclin 1 表达降低, P62 表达升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); GLA-H+si-HIF-1α 组较 GLA-H+si-NC 组 beclin 1 表达升高, P62 表达降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 4 及表 4。

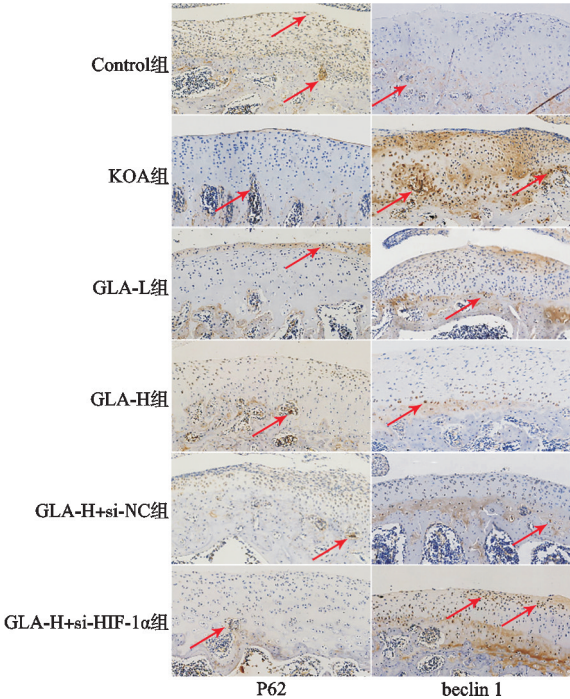


图4 免疫组化检测 P62 及 beclin 1 表达(箭头指向阳性表达)

2.6 蓝萆甲素对 HIF-1α/BNIP3 信号通路的影响

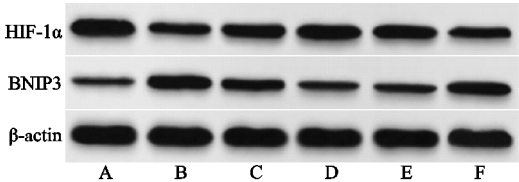
KOA 组较 Control 组 HIF-1α 表达降低, BNIP3 表达升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); GLA-L 组

表4 各组大鼠膝关节软骨组织 P62 及 beclin 1 光密度值比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	P62	beclin 1
Control 组	$0.82 \pm 0.08$	$0.15 \pm 0.02$
KOA 组	$0.22 \pm 0.02^{1)}$	$0.78 \pm 0.08^{1)}$
GLA-L 组	$0.45 \pm 0.05^{2)}$	$0.57 \pm 0.06^{2)}$
GLA-H 组	$0.71 \pm 0.07^{2)3)}$	$0.34 \pm 0.03^{2)3)}$
GLA-H+si-NC 组	$0.69 \pm 0.07$	$0.36 \pm 0.04$
GLA-H+si-HIF-1α 组	$0.37 \pm 0.04^{4)}$	$0.62 \pm 0.06^{4)}$

注:1)与 Control 组比,  $P<0.05$ ;2)与 KOA 组比,  $P<0.05$ ;3)与 GLA-L 组比,  $P<0.05$ ;4)与 GLA-H+si-NC 组比,  $P<0.05$ 。

和 GLA-H 组较 KOA 组 HIF-1α 表达升高, BNIP3 表达降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); GLA-H+si-HIF-1α 组较 GLA-H+si-NC 组 HIF-1α 表达降低, BNIP3 表达升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 5 及表 5。



注: A-Control组; B-KOA组; C-GLA-L组; D-GLA-H组; E-GLA-H+si-NC组; F-GLA-H+si-HIF-1α组

图5 Western Blot 法检测 HIF-1α 及 BNIP3 表达

表5 各组大鼠膝关节软骨组织 HIF-1α 及 BNIP3 表达比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	HIF-1α/ $\beta$ -actin	BNIP3/ $\beta$ -actin
Control 组	$0.97 \pm 0.10$	$0.22 \pm 0.02$
KOA 组	$0.42 \pm 0.04^{1)}$	$0.73 \pm 0.07^{1)}$
GLA-L 组	$0.63 \pm 0.06^{2)}$	$0.52 \pm 0.05^{2)}$
GLA-H 组	$0.87 \pm 0.09^{2)3)}$	$0.28 \pm 0.03^{2)3)}$
GLA-H+si-NC 组	$0.85 \pm 0.09$	$0.31 \pm 0.03$
GLA-H+si-HIF-1α 组	$0.55 \pm 0.06^{4)}$	$0.64 \pm 0.06^{4)}$

注:1)与 Control 组比,  $P<0.05$ ;2)与 KOA 组比,  $P<0.05$ ;3)与 GLA-L 组比,  $P<0.05$ ;4)与 GLA-H+si-NC 组比,  $P<0.05$ 。

3 讨论

膝骨关节炎发病涉及全关节及关节周围组织, 主要表现为软骨退变、继发性骨质增生等骨质结构及关节周围肌肉组织异常改变, 其引起的关节肿胀疼痛、关节畸形、功能障碍等严重影响患者正常生活, 尤其是中老年患者<sup>[8-9]</sup>。其中关节软骨退变是引起膝骨关节炎的主要病理机制, 而关节软骨细胞过度自噬和凋亡, 是引发膝骨关节炎的关键因素, 因此寻求新型可抑制软骨细胞自噬和凋亡的药物, 对于保护软骨、延缓关节损伤、减缓膝骨关节炎发生及病情进展至关重要<sup>[10]</sup>。蓝萆甲素是提取自中草药植物中的一种生物碱, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、心血管及神经保护等作用, 在骨相关疾病治疗中发挥重要作用。研究显示蓝萆甲素抑制 TNF-α 诱导的类风湿关节炎模型大鼠中炎症因子的



产生,进而抑制炎症反应并诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。蓝萼甲素能抑制 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞中炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的表达,减轻骨关节炎软骨细胞的炎症反应<sup>[11]</sup>;另外,蓝萼甲素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞生成和卵巢切除术诱导的骨质疏松,对骨丢失发挥保护作用<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,蓝萼甲素可改善软骨变性退变及炎性细胞浸润现象,进而减轻关节肿胀程度,缓解关节疼痛,改善膝骨关节炎大鼠的步态及关节活动范围。

炎症反应贯穿膝骨关节炎发生发展始终,其中促炎因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的大量表达不仅可以促进软骨中的胶原蛋白、蛋白聚糖降解,增加软骨细胞的凋亡,促进软骨退化,同时还可以促进软骨下骨和滑膜组织血管扩张增生,导致炎症加剧,破坏关节软骨<sup>[13-14]</sup>。研究显示抑制 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平,可降低炎症反应,减少软骨细胞凋亡,改善膝骨关节炎大鼠软骨退变及软骨表面膜样结构破坏<sup>[15]</sup>。软骨细胞过度凋亡是引起膝骨关节炎的重要病理机制之一,已知 Bax、C-caspase-3 是参与软骨细胞凋亡的经典蛋白,当软骨细胞接收到凋亡信号时,促凋亡蛋白 Bax 被活化在线粒体外膜上形成孔, Cyt-c 被释放到细胞质然后与 Apaf-1、ATP/dATP 及 pro-caspase-9 形成凋亡复合体,活化 caspase-9 进而激活 caspase-3,引发细胞凋亡,加速关节软骨退化<sup>[16-17]</sup>。研究显示 IL-1 $\beta$  可诱导 Bax、C-caspase-3 表达上调,促进软骨细胞凋亡,抑制 Bax、C-caspase-3 表达可延缓膝骨关节炎小鼠病理进程<sup>[18]</sup>;另外,抑制 Bax、C-caspase-3 表达可抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,蓝萼甲素可抑制 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平,抑制炎症反应;抑制 Bax、C-caspase-3 表达,抑制软骨细胞凋亡,进而改善膝骨关节炎大鼠软骨退变。

软骨细胞过度自噬是引起膝骨关节炎的另一重要病理机制,当软骨细胞发生凋亡时,为了维持机体正常生命活动需要通过自噬降解凋亡的细胞,一旦软骨细胞过度自噬,会加剧软骨退化,抑制软骨细胞自噬及凋亡对于改善膝骨关节炎至关重要<sup>[20]</sup>。研究显示抑制自噬相关蛋白 beclin 1 表达,促进 P62 表达,抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平,可抑制早期膝骨关节炎模型大鼠软骨细胞过度自噬及凋亡,减轻关节炎症反应及损伤,延缓关节退变进程<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,蓝萼甲素可抑制 beclin 1 表达,促进 P62 表达,抑制软骨细胞过度自噬,改善膝骨关节炎大鼠软骨退变。

HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路是参与骨关节炎软骨细胞自噬、凋亡等进程的关键通路,其中 HIF-1 $\alpha$  可在缺氧条件下稳定表达,减轻膝骨关节炎小鼠软骨细胞的衰老、凋亡及软骨降解,在软骨细胞分化和代谢进程中发挥重要作用<sup>[22]</sup>;而抑制自噬调控因子 BNIP3 表达同样可减

少骨关节炎诱导的软骨细胞凋亡<sup>[23]</sup>。另外,抑制 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 通路,可通过促进细胞自噬,引发骨关节炎软骨细胞凋亡级联反应<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,蓝萼甲素可上调 HIF-1 $\alpha$  表达,下调 BNIP3 表达,抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡,推测其可能通过激活 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡。对蓝萼甲素高剂量处理的膝骨关节炎大鼠转染 si-HIF-1 $\alpha$  质粒后,发现其可部分逆转蓝萼甲素对膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡的抑制作用,说明蓝萼甲素可通过激活 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡。

综上所述,蓝萼甲素可抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞自噬与凋亡,其作用机制与激活 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路相关。本研究也存在局限性,蓝萼甲素对膝骨关节炎及 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路的作用机制尚不明确,仍需进一步实验验证。

### 参考文献

- [1] SUKERRAR P A, DOYLE Z. Imaging of osteoarthritis of the knee[J]. Radiol Clin North Am, 2022, 60(4): 605-616.
- [2] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 1291-1314.
- [3] ZHU W, ZHANG Y, LI Y, et al. Glaucocalyxin A attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response and cartilage degradation in osteoarthritis chondrocytes via inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Dis Markers, 2022(1): 6516246-6516254.
- [4] 王柯, 叶寒露. 隐丹参酮调节 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 信号通路对兔膝骨关节炎模型软骨细胞自噬和凋亡的影响[J]. 天津医药, 2024, 52(4): 372-378.
- [5] FENG K, CHEN Z, PENGCHENG L, et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18192-18205.
- [6] ZHANG C, MA K, YANG Y, et al. Glaucocalyxin A suppresses inflammatory responses and induces apoptosis in TNF- $\alpha$ -induced human rheumatoid arthritis via modulation of the STAT3 pathway[J]. Chem Biol Interact, 2021, 341(1): 109451-109458.
- [7] 黄滢, 何智军, 庄礼兴. 不同针灸方法对膝骨关节炎大鼠骨桥蛋白、基质金属蛋白酶-3 和转化生长因子- $\beta$ 1 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(10): 1820-1825.
- [8] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2021, 384(1): 51-59.
- [9] SUN X, ZHEN X, HU X, et al. Osteoarthritis in the middle-aged and elderly in China: prevalence and influencing factors[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(23): 4701-4718.

- [10] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis; a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(8):854-888.
- [11] 朱伟东, 刘岗, 费国策, 等. 蓝萼甲素抑制骨关节炎软骨细胞炎症反应的研究[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2023, 20(1):19-24.
- [12] ZHU M, SHAN J, XU H, et al. Glaucocalyxin A suppresses osteoclastogenesis induced by RANKL and osteoporosis induced by ovariectomy by inhibiting the NF- $\kappa$ B and Akt pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276 (1): 114176-114184.
- [13] 唐金烁, 周忠圣, 肖建林, 等. 骨性关节炎发病机制的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2021, 34(10):985-990.
- [14] GUAN T, DING L G, LU B Y, et al. Combined administration of curcumin and chondroitin sulfate alleviates cartilage injury and inflammation via NF- $\kappa$ B pathway in knee osteoarthritis rats [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13 (1): 882304-882314.
- [15] 赵胜豪, 李子熙, 黄辉, 等. 虎杖苷调节酪氨酸激酶 3/信号转导因子和转录激活因子 3 信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨退变的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2024, 41(3): 548-552.
- [16] 吴成武, 王伟, 汤休书, 等. 徐长卿丹皮酚通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路保护 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞损伤[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(23):5346-5351.
- [17] MIAO G, ZANG X, HOU H, et al. Bax targeted by miR-29a regulates chondrocyte apoptosis in osteoarthritis[J]. *Biomed Res Int*, 2019(1):1434538-1434546.
- [18] 钱佳佳, 许奇, 许炜民, 等. 山柰酚调控白细胞介素-1 $\beta$  诱导的软骨细胞的药理学研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(22):3311-3315.
- [19] 邓新超, 钱亮, 邹曼. 藏红花素调节 Hippo-YAP 信号通路抑制膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(4):538-543.
- [20] XU K, HE Y, MOQBEL S A A, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175(1):351-360.
- [21] 吴福春, 陈晓婷, 余德标, 等. 温针灸对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡及 MiR-27a 介导的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2024, 46(2): 105-111.
- [22] HU S, ZHANG C, NI L, et al. Stabilization of HIF-1 $\alpha$  alleviates osteoarthritis via enhancing mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6):481-496.
- [23] WANG W F, LIU S Y, QI Z F, et al. MiR-145 targeting BNIP3 reduces apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis through Notch signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(16):8263-8272.
- [24] LU J, PENG Y, ZOU J, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  is a regulator of autophagy in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Cartilage*, 2021, 13(2\_suppl):1030S-1040S.

(收稿日期:2024-11-12)

(上接第 5 页)

- [11] 薛艳, 胡鸿扬, 蒋鼎, 等. 膝骨关节炎患者膝关节区域局部皮温与临床症状及炎症因子的相关性研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(36):3991-3994.
- [12] ZHAO L, ZHOU S, WANG S, et al. Zhuifeng Tougou capsules in the treatment of knee osteoarthritis (cold dampness obstruction syndrome): a randomized, double blind, multicenter clinical study[J]. *Chinese Medicine*, 2024, 19 (1):18.
- [13] 杨北仁, 郑世维, 胡学伏. 疏风健步汤治疗风寒湿痹型膝骨关节炎的临床研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(5): 1181-1183.
- [14] 曹锐剑, 刘慧, 汪湘. 温针灸联合健骨养元汤治疗风寒湿痹型膝骨关节炎临床研究[J]. *新中医*, 2023, 55(13):134-138.
- [15] 赖展少, 王洁琼. 温针灸配合火罐治疗 20 例退行性膝关节炎的临床疗效分析[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(5):21-22.
- [16] 邓美娇, 陈丽兰. 中药热奄包佐治风寒湿痹型膝骨性关节炎临床观察[J]. *光明中医*, 2023, 38(2):277-279.
- [17] 高飞, 杜龙龙, 王桐, 等. 应用磁热疗法治疗膝骨关节炎的疗效观察及机制[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2023, 44(5):784-793.
- [18] 马静, 仇丽珍, 齐云影. 塌渍热疗在老年风寒湿痹型膝骨性关节炎患者中的应用效果观察[J]. *实用中西医结合临床*, 2024, 24(6):60-62.
- [19] 罗仕华, 万世元, 奚小冰, 等. 魏氏手法联合外用蒸敷方对膝骨关节炎患者生存质量的改善作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(3):44-47.
- [20] 杨慧, 田茂林. 中药热奄包联合中药熏洗治疗膝骨关节炎的临床效果[J]. *中外医学研究*, 2024, 22(18):33-37.
- [21] 王林, 徐勤光, 蒋鼎, 等. 风寒湿血清影响软骨细胞 TR-PM8/TRPV1/TRPA1 表达的研究[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(8):2022-2026.
- [22] VRINTEN D H, HAMERS F F. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing[J]. *Pain*, 2003, 102(1/2):203-209.
- [23] OU S H, CHOU C L, LIN C W, et al. Association between gout and injury risk: a national retrospective cohort study[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(10):3679.

(收稿日期:2024-11-07)