

紫花前胡素调节HMGB1-RAGE信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡的影响

刘佳伟¹ 辛智丰¹ 赛音都楞² 张飞^{1*}

(¹内蒙古医科大学第三临床医学院(内蒙古包钢医院), 骨科, 包头 014010;

²巴林左旗中医蒙医医院, 骨科, 赤峰 025450)

摘要 该研究旨在探讨紫花前胡素(DE)调节HMGB1-RAGE信号通路对膝骨关节炎(KOA)大鼠软骨细胞凋亡的影响。首先, 分离、培养KOA大鼠软骨细胞, 并将其随机分为Control组, 模型组, L-DE、M-DE、H-DE组(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的DE), H-DE+HMGB1组(10 $\mu\text{mol/L}$ DE+3 $\mu\text{g/mL}$ 重组HMGB1蛋白)。以甲苯胺蓝染色、II型胶原免疫荧光染色鉴定软骨细胞; CCK-8法检测软骨细胞增殖; 流式细胞术检测软骨细胞凋亡; ELISA法检测软骨细胞上清液中IL-6、TNF- α 水平; JC-1检测软骨细胞线粒体膜电位变化; Western blot检测软骨细胞中HMGB1-RAGE信号通路蛋白及C-Caspase-3、Pro-Caspase-3表达。该研究发现, 采用甲苯胺蓝及免疫荧光染色鉴定所分离的大鼠软骨细胞符合要求。模型组软骨细胞较Control组存活率降低, 凋亡率, 上清液中IL-6、TNF- α 水平, JC-1 monomers/JC-1 aggregate值, HMGB1、RAGE、C-Caspase-3蛋白表达水平及C-Caspase-3/Pro-Caspase-3值升高, Pro-Caspase-3蛋白表达水平降低($P<0.05$); L-DE、M-DE、H-DE组软骨细胞较模型组存活率升高, 凋亡率, 上清液中IL-6、TNF- α 水平, JC-1 monomers/JC-1 aggregate值, HMGB1、RAGE、C-Caspase-3蛋白表达水平及C-Caspase-3/Pro-Caspase-3值降低, Pro-Caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.05$); H-DE+HMGB1组软骨细胞较H-DE组存活率降低, 凋亡率, 上清液中IL-6、TNF- α 水平, JC-1 monomers/JC-1 aggregate值, HMGB1、RAGE、C-Caspase-3蛋白表达水平及C-Caspase-3/Pro-Caspase-3值升高, Pro-Caspase-3蛋白表达水平降低($P<0.05$)。总之, DE可通过抑制HMGB1-RAGE信号通路, 进而减少KOA大鼠软骨细胞线粒体相关的细胞凋亡。

关键词 紫花前胡素; 高迁移率族蛋白B1; 晚期糖基化终产物受体; 膝骨关节炎; 软骨细胞凋亡

The Effect of Decursin on Chondrocyte Apoptosis in Knee Osteoarthritis Rats by Regulating the HMGB1-RAGE Signaling Pathway

LIU Jiawei¹, XIN Zhifeng¹, Saiyinduleng², ZHANG Fei^{1*}

(¹Department of Orthopedics, the Third Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University

(Inner Mongolia Baogang Hospital), Baotou 014010, China; ²Department of Orthopedics,

Balin Left Banner Hospital of Traditional Chinese Medicine and Mongolian Medicine, Chifeng 025450, China)

Abstract This study aimed to investigate the effects of DE (decursin) on regulating the HMGB1-RAGE signaling pathway to modulate apoptosis in chondrocytes from KOA (knee osteoarthritis) in rats. First, KOA rat chondrocytes were isolated and cultured and randomly assigned to the Control group, Model group, L-DE, M-DE,

收稿日期: 2025-07-11 接受日期: 2025-09-15

内蒙古医科大学联合项目(批准号: YKD2021LH053)资助的课题

*通信作者。Tel: 15947228265, E-mail: 16291179@qq.com

Received: July 11, 2025

Accepted: September 15, 2025

This work was supported by Nei Mongol Medical University Joint Project (Grant No. YKD2021LH053)

*Corresponding author. Tel: +86-15947228265, E-mail: 16291179@qq.com

and H-DE groups (1, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$ DE, respectively), and the H-DE+HMGB1 group (10 $\mu\text{mol/L}$ DE+3 $\mu\text{g/mL}$ recombinant HMGB1 protein). Chondrocytes were identified by toluidine blue staining and type II collagen immunofluorescence; cell proliferation was measured by the CCK-8 assay; apoptosis was assessed by flow cytometry; IL-6 and TNF- α levels in the culture supernatant were detected by ELISA; mitochondrial membrane potential changes were evaluated by JC-1 assay; and HMGB1-RAGE pathway proteins as well as C-Caspase-3 (cleaved caspase-3) and Pro-Caspase-3 expression were analyzed by Western blot. The results showed that the isolated rat chondrocytes were correctly identified by toluidine blue staining and immunofluorescence for type II collagen. In the Model group, chondrocyte viability decreased compared with the Control group, while apoptosis, supernatant IL-6 and TNF- α levels, JC-1 monomers/JC-1 aggregates ratio, and expression of HMGB1, RAGE, C-Caspase-3, and the C-Caspase-3/Pro-Caspase-3 ratio increased, whereas Pro-Caspase-3 expression decreased ($P<0.05$). In the L-DE, M-DE, and H-DE groups, chondrocyte viability was higher than in the Model group, apoptosis and levels of IL-6 and TNF- α in the supernatant, JC-1 monomer/JC-1 aggregate ratio, HMGB1, RAGE, C-Caspase-3 expression, and the C-Caspase-3/Pro-Caspase-3 ratio were reduced, and Pro-Caspase-3 expression increased ($P<0.05$). In the H-DE+HMGB1 group, chondrocyte viability was lower than in the H-DE group, while apoptosis and levels of IL-6 and TNF- α in the supernatant, JC-1 monomer/JC-1 aggregate ratio, HMGB1, RAGE, C-Caspase-3 expression, and the C-Caspase-3/Pro-Caspase-3 ratio were increased, and Pro-Caspase-3 expression decreased ($P<0.05$). In summary, DE may reduce mitochondrial-associated apoptosis of KOA rat chondrocytes by inhibiting the HMGB1/RAGE signaling pathway.

Keywords decursin; high mobility group B1; receptor for advanced glycation endproducts; knee osteoarthritis; chondrocyte apoptosis

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种慢性疾病,也是最常见的骨科疾病,关节软骨变性退变、关节边缘和软骨下骨增生及骨赘生成是其特征,可致关节畸形、疼痛、运动障碍等,更甚者可致肢体残疾^[1]。其中关节软骨退变是引起KOA主要病理机制,而炎症促进关节软骨细胞异常凋亡是引发KOA关键因素,因此探索KOA疾病发展机制并寻求新型可抑制软骨细胞凋亡的药物,对保护软骨、延缓关节损伤至关重要^[2-3]。高迁移率族蛋白B1(high mobility group B1, HMGB1)是一种非组蛋白DNA结合蛋白,可在细胞核内调节染色质结构、基因表达,当细胞受损或受炎症刺激时,可被释放至细胞外,并被视为一种危险相关分子模式。晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)属于多配体受体,主要识别与糖基化终产物相关分子,也可结合包括HMGB1等的多种炎症介质,其激活后可促进炎症反应、氧化应激和细胞迁移等过程。研究表明, HMGB1/RAGE信号通路激活后可促进炎症反应、氧化应激等,从而参与慢性炎症和组织退行性病变,提示有效调控该信号通路对改善KOA患者软骨损伤有重大意义^[4]。紫花前胡

素(decursin, DE)是从朝鲜当归中提取得到的,兼具抗炎、抗氧化、细胞保护等多重生物活性,相关研究报道, DE可改善类风湿关节炎大鼠免疫功能,减轻大鼠关节组织病理损伤^[5]。然而, DE对KOA大鼠软骨细胞的保护作用尚未可知,为进一步了解DE在KOA中的应用价值,提高KOA治疗效能,本研究围绕相关作用及机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4周龄SD雄性大鼠购自斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号: SCXK(苏)2022-0006。本研究所有动物实验均经内蒙古包钢医院伦理委员会批准(2025-MER-064)。

1.2 主要试剂与仪器

DE、重组HMGB1(货号: HY-18981、HY-P73102)购自美国MedChemExpress公司; CCK-8试剂盒(货号: MA0218)购自大连美仑生物技术有限公司; IL-6、TNF- α 试剂盒(货号: PI325、PT518), JC-1线粒体膜电位试剂盒(货号: C2006)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 一抗HMGB1、

RAGE、C-Caspase-3、 β -actin(货号: 6893、55222、9664、8457)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Pro-Caspase-3(货号: ab342150)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(货号: ab6702)购自英国 Abcam 公司; 细胞凋亡检测试剂盒(货号: 40302ES60)购自上海翊圣生物科技股份有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒(货号: 71285-M)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 酶标仪(型号: Tecan Infinite)购自瑞士 Tecan 公司; 流式细胞仪(型号: BB12038)购自美国 Beckman 公司; 荧光显微镜(型号: TE2000-U)购自日本 Nikon 公司; 化学发光成像仪(型号: 733BR2073)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞分离及鉴定 参考相关文献[6]分离大鼠软骨细胞。无菌环境下刮取(用刀片)双侧膝关节透明软骨组织并将软骨组织切碎(更换新刀片切至约 1 mm×1 mm×1 mm), 加入预先配制的 0.2% II 型胶原酶溶液, 于 37 °C 培养箱中消化, 2 h 后吸取消化液置于 15 mL 离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 3 min 后, 可见白色沉淀于离心管底部, 此为原代软骨细胞, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的完全培养基重悬沉淀, 后将细胞悬液转移至培养瓶中, 放入条件为 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 标记为原代; 待细胞融合约 90% 后传代。以甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫荧光染色对第 2 代软骨细胞鉴定。

1.3.2 细胞模型建立及分组 参考相关文献[6], 用 2 μ mol/L 毒胡萝卜素干预 4 h 诱导软骨细胞发生损伤、退变, 并将细胞分为模型组(更换为正常培养基)、L-DE、M-DE、H-DE 组(分别更换为含 1、5、10 μ mol/L DE 的培养基^[7])、H-DE+HMGB1 组(更换为含 10 μ mol/L DE+3 μ g/mL 重组 HMGB1 蛋白的培养基^[8]), 同时取未被诱导损伤的软骨细胞作为 Control 组(正常培养基)。

1.3.3 CCK-8 法检测软骨细胞增殖活力 将软骨细胞(2×10⁴/孔)接种于 96 孔板中, 按分组干预 24 h。结束后, 按试剂盒说明加入 CCK-8 试剂(10 μ L/孔), 继续孵育 2 h(37 °C)。孵育结束, 于 450 nm 波长处测定吸光度(D)值, 计算软骨细胞存活率。

1.3.4 流式细胞术检测软骨细胞凋亡 将软骨细胞(2.5×10⁵/孔)接种于 6 孔板中, 24 h 后收集细胞, 以预冷 PBS 重悬后按细胞凋亡试剂盒步骤添加一定量 PI 及 FITC 染液, 共孵育 15 min(室温、避光)。结束后

以流式细胞仪检测软骨细胞凋亡情况。

1.3.5 ELISA 检测软骨细胞上清液中 IL-6、TNF- α 水平 收集细胞培养液离心(3 500 r/min、15 min、4 °C)分离, 按 ELISA 说明书检测软骨细胞上清液中 IL-6、TNF- α 水平。

1.3.6 JC-1 检测线粒体膜电位变化 JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的理想荧光探针, 正常生理条件下, JC-1 于高线粒体膜电位下形成聚合物, 呈红色荧光; 而在病理条件下, 线粒体膜电位下降时 JC-1 形成单体, 呈现绿色荧光, 当用荧光显微镜观察时可发现 JC-1 单体/聚合物的荧光强度比值增大, 表明线粒体膜电位降低, 促使细胞发生凋亡。收集各组处理后的软骨细胞, 使用胰酶将软骨细胞消化后离心、重悬, 按 JC-1 线粒体膜电位试剂盒说明书操作, 加入 JC-1 工作液孵育, 结束后观察软骨细胞 JC-1 单体/聚合物荧光强度变化。

1.3.7 Western blot 检测软骨细胞中 HMGB1-RAGE 信号通路蛋白及 C-Caspase-3、Pro-Caspase-3 蛋白表达 以已预冷 RIPA 裂解液提取软骨细胞蛋白并对蛋白定量(BCA 试剂盒), 于金属浴中变性蛋白后行 SDS-PAGE 电泳、转膜(湿法转于 NC 膜)、封闭。结束后, 配制一抗稀释液并将条带与对应一抗 HMGB1(1:1 000)、RAGE(1:1 000)、C-Caspase-3(1:1 000)、Pro-Caspase-3(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)过夜孵育(4 °C)。第二天, 将膜表面抗体洗去(摇床匀速洗涤 3 次, 每次 5 min), 随后配制二抗稀释液, 于膜表面加入适量二抗(1:2 000)孵育(常温 2 h)。结束后, 准备曝光检测, 分析软骨细胞中 HMGB1-RAGE 信号通路蛋白及 C-Caspase-3 蛋白相对表达量。

1.4 统计学分析

所有数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示; Graph-Pad Prism 7.0 软件用于分析数据; 单因素方差分析和 Tukey's 检验用于多组间的比较; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠软骨细胞鉴定

甲苯胺蓝染色: 镜下可见大鼠软骨细胞形态不一, 多呈梭形, 胞质着浅蓝色, 细胞核呈圆形, 着深蓝色(图1)。

免疫荧光染色: 镜下可见 COL2A1 染色阳性呈绿色荧光, 细胞核经 DAPI 复染后呈蓝色荧光, 细胞

质及胞膜呈绿色荧光, 具有软骨细胞特性(图2)。

2.2 DE提高软骨细胞存活率

模型组软骨细胞相比 Control组存活率降低 ($P<0.05$); L-DE组、M-DE组、H-DE组软骨细胞相比模型组存活率升高且具有浓度依赖性 ($P<0.05$); H-DE+HMGB1组软骨细胞相比 H-DE组存活率降低 ($P<0.05$)(图3)。

2.3 DE降低软骨细胞凋亡

模型组软骨细胞相比 Control组凋亡率升高 ($P<0.05$); L-DE组、M-DE组、H-DE组软骨细胞相比模型组凋亡率降低且具有浓度依赖性 ($P<0.05$);

H-DE+HMGB1组软骨细胞相比 H-DE组凋亡率升高 ($P<0.05$)(图4)。

2.4 DE降低软骨细胞上清液中IL-6、TNF- α 水平

模型组软骨细胞相比 Control组上清液中 IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$); L-DE组、M-DE组、H-DE组软骨细胞相比模型组上清液中 IL-6、TNF- α 水平降低且具有浓度依赖性 ($P<0.05$); H-DE+HMGB1组软骨细胞相比 H-DE组上清液中 IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)(图5)。

2.5 DE升高软骨细胞线粒体膜电位

模型组软骨细胞相比 Control组红色荧光强

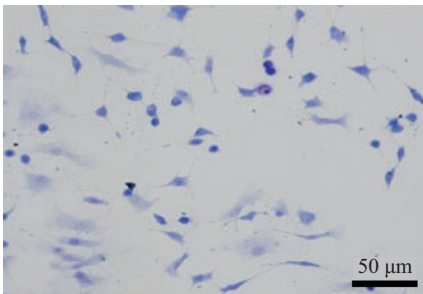


图1 甲苯胺蓝染色对软骨细胞鉴定
Fig.1 Toluidine blue staining for chondrocyte identification

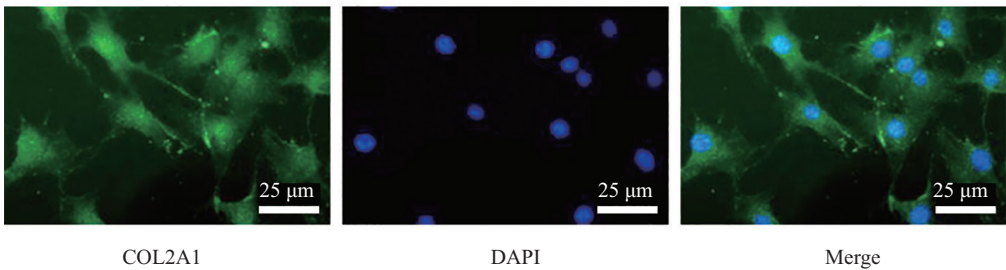
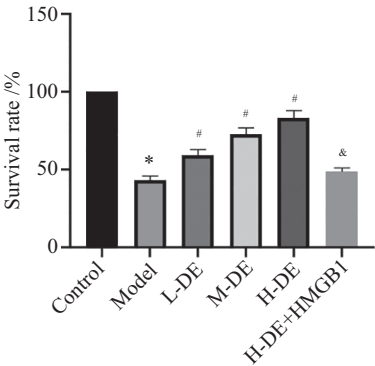


图2 II型胶原免疫荧光染色对软骨细胞鉴定
Fig.2 Type II collagen immunofluorescence staining for chondrocyte identification



* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较; & $P<0.05$, 与H-DE组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the Model group; & $P<0.05$ compared with the H-DE group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

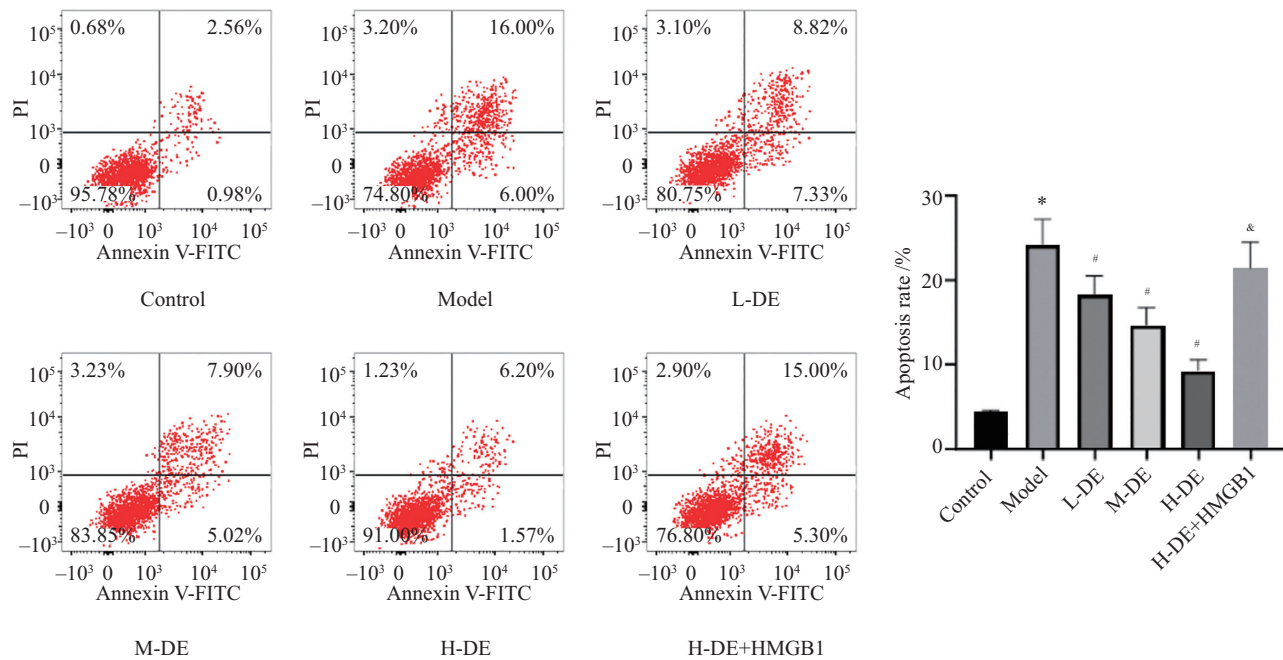
图3 软骨细胞存活率比较
Fig.3 Chondrocyte viability comparison

度减弱,绿色荧光强度增强,JC-1 monomers/JC-1 aggregate值增大,线粒体膜电位下降($P<0.05$); L-DE组、M-DE组、H-DE组软骨细胞相比模型组红色荧光强度增强,绿色荧光强度减弱,JC-1 monomers/JC-1 aggregate值减小,线粒体膜电位升高且具有浓度依赖性($P<0.05$); H-DE+HMGB1组软骨细胞相比H-DE组红色荧光强度减弱,绿色荧光强度增强,JC-1

monomers/JC-1 aggregate值增大,线粒体膜电位下降($P<0.05$)(图6)。

2.6 DE下调软骨细胞中HMGB1-RAGE信号通路蛋白及C-Caspase-3、Pro-Caspase-3蛋白表达

模型组软骨细胞相比Control组HMGB1、RAGE、C-Caspase-3蛋白表达及C-Caspase-3/Pro-Caspase-3值上调,Pro-Caspase-3蛋白表达下调

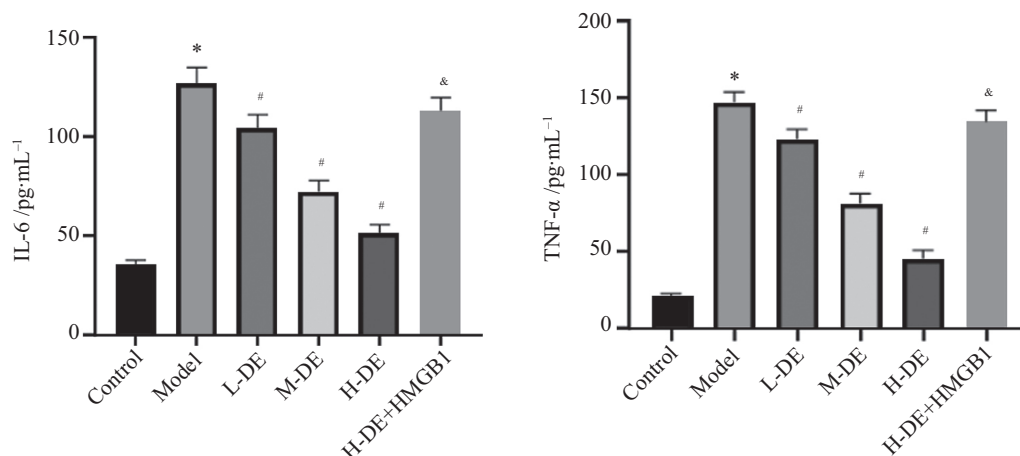


* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较; & $P<0.05$, 与H-DE组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the Model group; & $P<0.05$ compared with the H-DE group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 流式细胞仪检测软骨细胞凋亡

Fig.4 Flow cytometry detection of chondrocyte apoptosis

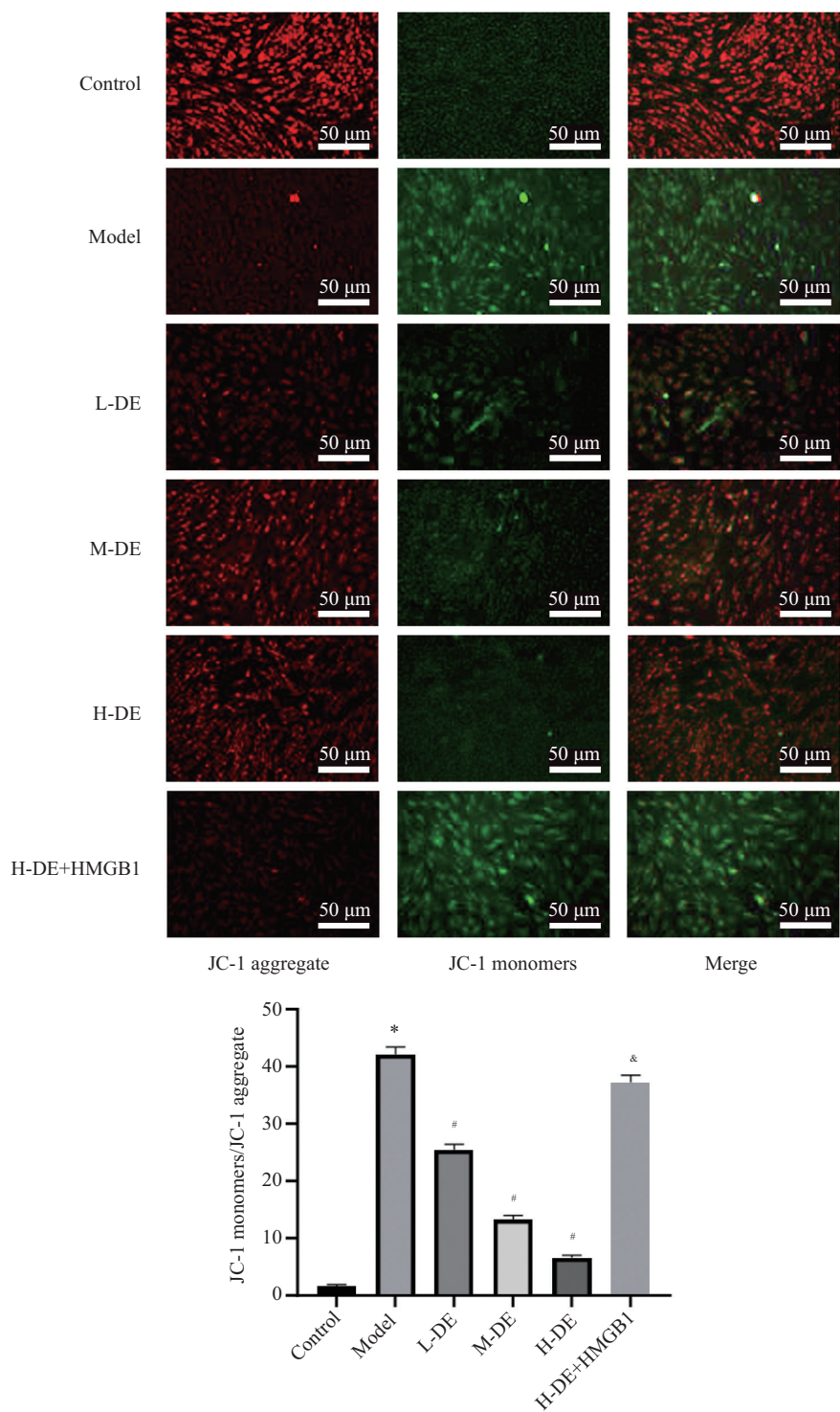


* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较; & $P<0.05$, 与H-DE组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the Model group; & $P<0.05$ compared with the H-DE group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 DE对软骨细胞上清中IL-6、TNF-α水平的影响

Fig.5 Effect of DE on levels of IL-6 and TNF-α in chondrocyte culture supernatants

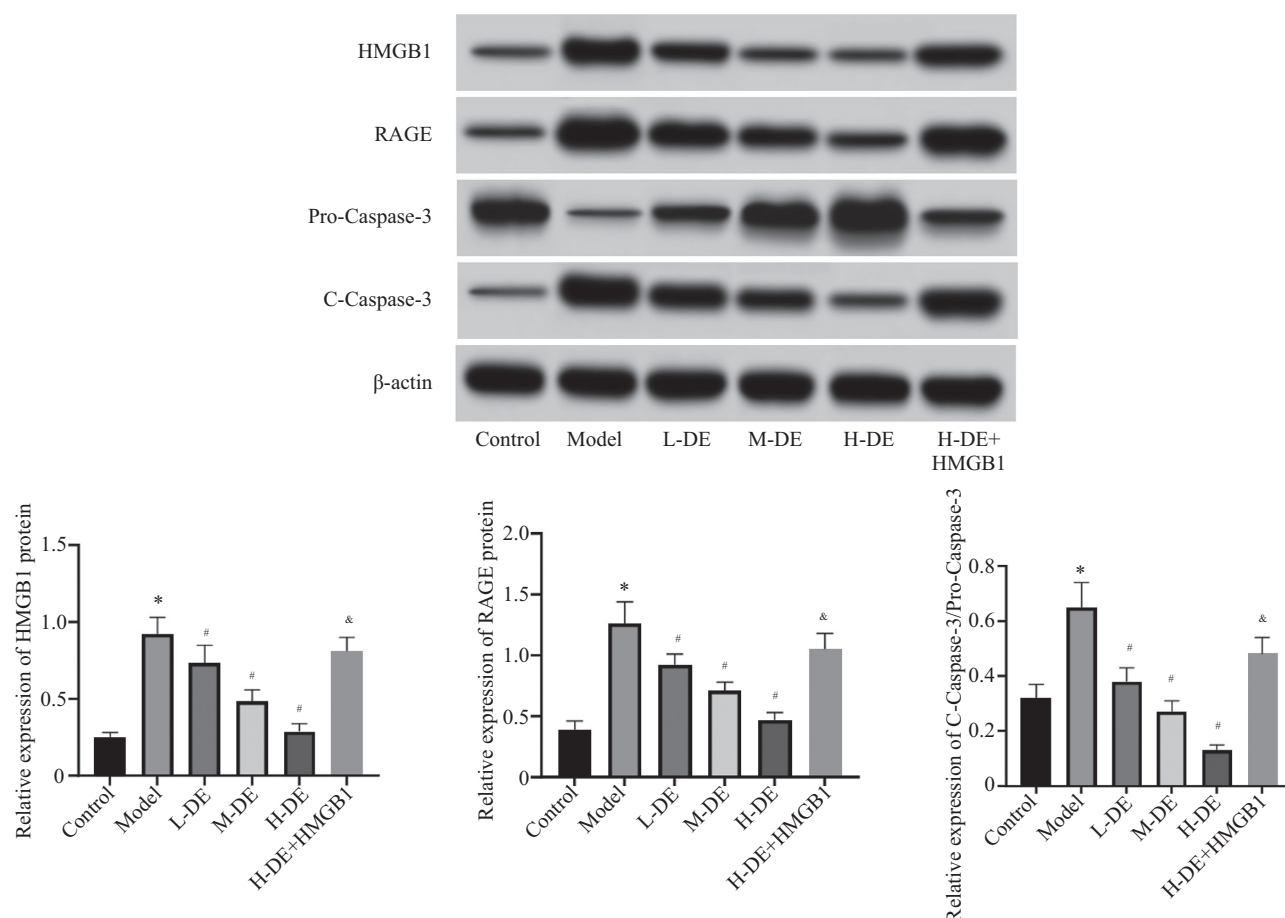


* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较; & $P<0.05$, 与H-DE组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the Model group; & $P<0.05$ compared with the H-DE group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

图6 JC-1检测软骨细胞线粒体膜电位

Fig.6 JC-1 assay of chondrocyte mitochondrial membrane potential

($P<0.05$); L-DE组、M-DE组、H-DE组软骨细胞相比模型组 HMGB1、RAGE、C-Caspase-3 蛋白表达及 C-Caspase-3/Pro-Caspase-3 值下调, Pro-Caspase-3 蛋白表达上调且具有浓度依赖性 ($P<0.05$); H-DE+HMGB1 组软骨细胞相比 H-DE 组 HMGB1、RAGE、C-Caspase-3 蛋白表达及 C-Caspase-3/Pro-Caspase-3 值上调, Pro-Caspase-3 蛋白表达下调 ($P<0.05$) (图7)。



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与模型组比较; & $P < 0.05$, 与H-DE组比较。 $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; # $P < 0.05$ compared with the Model group; & $P < 0.05$ compared with the H-DE group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$.

图7 Western blot检测软骨细胞中HMGB1-RAGE信号通路蛋白及C-Caspase-3、Pro-Caspase-3蛋白表达

Fig.7 Western blot detection of HMGB1-RAGE signaling pathway proteins and cleaved Caspase-3, Pro-Caspase-3 in chondrocytes

3 讨论

KOA常导致关节肿胀、疼痛、僵硬,严重降低患者生活质量,目前,临床常用治疗方法包括关节置换术、环氧合酶抑制剂、非甾体抗炎药等,虽能缓解部分疼痛,但引发严重并发症,患者治疗依从性不佳,影响整体治疗效果^[9]。而炎症反应在软骨损伤、软骨细胞凋亡、加速KOA进展中发挥重要促进作用^[10-11]。本研究通过分离大鼠软骨细胞,并经甲苯胺蓝及II型胶原免疫荧光染色对细胞鉴定,结果显示所分离培养的软骨细胞符合实验需求。因此以将其为研究对象展开探讨,通过给予毒胡萝卜素诱导软骨细胞损伤、退变,并经CCK-8法、流式细胞术、ELISA检测发现,模型组软骨细胞相比Control组活力显著降低;凋亡率,细胞上清液中IL-6、TNF- α 水平显著升高,这与KOA患者临床特征具有一致性。因此如何有效抑制软骨细胞凋亡,抑制炎症反应是

保护软骨、延缓关节损伤、减缓KOA进展的关键。

DE是从当归中提取的吡喃香豆素化合物,具有抗炎、抗氧化、抗菌等多种药理作用,能通过抑制细胞凋亡、促进细胞增殖而参与多种疾病进展。王冰钰等^[12]发现,DE通过激活PPAR信号通路抑制椎间盘退变模型髓核细胞凋亡,提高髓核细胞活力。王谢等^[5]的研究发现,DE可通过抑制CCL2-CCR2信号轴,减轻骨破坏,抑制滑膜成纤维细胞增生,降低炎性细胞浸润,并改善类风湿性关节炎大鼠免疫功能。然而,其对KOA软骨细胞保护作用及相关作用机制尚不清楚,因此本研究通过分离、培养大鼠软骨细胞进行相关探讨,给予不同浓度DE处理后发现,其可浓度依赖性促进软骨细胞存活,并抑制细胞炎症反应(下调软骨细胞中IL-6、TNF- α 水平),表明DE可通过抑制炎症反应,发挥保护软骨细胞作用。然而,其具体作用机制有待进一步探讨。

HMGB1-RAGE信号通路的持续激活可导致慢性炎症,如在感染、自身免疫性疾病等情况下, HMGB1的释放和RAGE的激活形成正反馈循环,促进炎症反应,进而引发组织损伤和功能障碍,因此靶向抑制HMGB1-RAGE信号通路可能是治疗炎症和炎症性疾病的有利策略^[13-14],正如JING等^[15]证实,从蔷薇花中纯化出一种新型RG-I类果胶多糖YJ3A1,可通过抑制HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路相关炎症和纤维化,改善非酒精性脂肪性肝炎。WEI等^[16]证实,龙胆苦苷通过调节HMGB1介导的PI3K/AKT信号轴改善KOA大鼠滑膜炎症和纤维化。近年来研究进一步发现, HMGB1-RAGE信号通路激活可导致线粒体膜电位改变,诱导线粒体功能障碍,催化凋亡执行分子Caspase-3剪切和激活,引发一系列Caspase联级反应,启动细胞凋亡过程^[17-18]。徐可欣等^[19]发现,毛兰素可通过调节HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1信号通路,降低线粒体活性氧水平,进而缓解特异性皮炎。然而,DE能否调控HMGB1-RAGE信号通路,影响线粒体膜电位进而降低软骨细胞凋亡,尚不清楚。为进一步明确DE在KOA中的应用价值,丰富基础研究依据,本研究展开了相关探讨。结果发现,DE可浓度依赖升高线粒体膜电位(JC-1 monomers/JC-1 aggregate值降低),且软骨细胞中HMGB1、RAGE、C-Caspase-3蛋白表达下调,而在高浓度基础上给予重组HMGB1后,线粒体膜电位下降(JC-1 monomers/JC-1 aggregate值升高),以上蛋白表达趋势、炎症因子IL-6、TNF- α 水平发生逆转,且软骨细胞凋亡率升高,这与ZHANG等^[20]发现的研究结果具有相似性,该研究结果表明利格列汀可通过减轻线粒体损伤,下调HMGB1、MMPs、Caspase-3、cytochrome C,进而保护人软骨ATDC5细胞免受晚期糖基化终产物诱导的凋亡,提示DE可能通过抑制HMGB1-RAGE信号通路,调节线粒体膜电位、减轻线粒体损伤进而发挥降低软骨细胞凋亡的作用。然而,DE介导的线粒体膜电位变化机制还有待进一步验证,如后续可通过分别敲除HMGB1和RAGE,探讨DE是否通过HMGB1和RAGE起作用,并确认HMGB1和RAGE在DE发挥效应过程中的上下游关系,以更加明确其作用机制。

综上所述,DE可减少KOA大鼠软骨细胞凋亡,这可能主要通过抑制HMGB1-RAGE信号通路激活,保护线粒体功能,进而降低炎症反应实现的,这体现本研究创新之处,可为KOA软骨保护作用提供新理

论与实验依据。然而,DE是否同时触发其他信号通路共同发挥作用,且DE是否同时具有时间依赖性保护软骨细胞,尚不清楚,还需后续展开实验做进一步探讨,以期提供更加全面的参考依据。

参考文献 (References)

- [1] GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6405.
- [2] XU K, HE Y, MOQBEL S 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: 351-60.
- [3] DAINESI P, WYNGAERT K V, DE MITS S, et al. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(4): 516-34.
- [4] AWAN U N, WARAICH R S, NANGREJO R, et al. RAGE signalling contributes to oxidative stress and inflammation in knee osteoarthritis patients with metabolic syndrome [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2024, 42(11): 2258-64.
- [5] 王谢, 王进军, 陈丽川. 紫花前胡素调节CCL2-CCR2信号轴对类风湿关节炎大鼠免疫功能的影响[J]. 河北医学(WANG X, WANG J J, CHEN L C. The effect of Zi hua qian hu su on the CCL2-CCR2 signaling axis and immune function in rheumatoid arthritis rats [J]. *Hebei Medicine*), 2025, 31(2): 234-9.
- [6] 吴伟欣, 郑珍萍, 顾富城, 等. 基于ATF6/GRP78/CHOP信号通路探讨龟鹿二仙胶对膝关节炎大鼠退变软骨细胞内质网稳态的影响[J]. 中药药理与临床(WU W X, ZHENG Z P, GU F C, et al. Investigating the influence of the ATF6/GRP78/CHOP signaling pathway on endoplasmic reticulum homeostasis in degenerated chondrocytes of knee osteoarthritis rats treated with Gujiu Er Xian Jiao [J]. *Chinese Pharmacology and Clinical Medicine*), 2024, 40(10): 33-40.
- [7] HE L, PAN Y, YU J, et al. Decursin alleviates the aggravation of osteoarthritis via inhibiting PI3K-Akt and NF- κ B signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107657.
- [8] 陈茹茹, 韩璐, 何海兰, 等. BRD4通过HMGB1/TGF- β 1/Smad通路参与调控肺泡上皮细胞间质转化[J]. 安徽医科大学学报(CHEN R R, HAN L, HE H L, et al. BRD4 participates in regulating alveolar epithelial-mesenchymal transition via HMGB1/TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Journal of Anhui Medical University*), 2025, 60(2): 247-54.
- [9] BROPHY R H, FILLINGHAM Y A. AAOS clinical practice guideline summary: management of osteoarthritis of the knee (nonarthroplasty), third edition [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2022, 30(9): e721-9.
- [10] DU X, LIU Z Y, TAO X X, et al. Research progress on the pathogenesis of knee osteoarthritis [J]. *Orthop Surg*, 2023, 15(9): 2213-24.
- [11] FAN Y, BIAN X, MENG X, et al. Unveiling inflammatory and prehypertrophic cell populations as key contributors to knee cartilage degeneration in osteoarthritis using multi-omics data integration [J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, 83(7): 926-44.

- [12] 王冰钰, 邓志军, 胡涛, 等. 紫花前胡素通过激活PPAR信号通路抑制髓核细胞凋亡[J]. 广州医科大学学报 (WANG B Y, DENG Z J, HU T, et al. Zi hua qian hu su inhibits marrow nuclear cell apoptosis by activating the PPAR signaling pathway [J]. Journal of Guangzhou Medical University), 2024, 52(3): 11-8.
- [13] XUE J, SUAREZ J S, MINAAI M, et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5): 3406-19.
- [14] YANG H, WANG H, ANDERSSON U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. Front Immunol, 2020, 11: 484.
- [15] JING X, ZHOU G, ZHU A, et al. RG-I pectin-like polysaccharide from *rosa chinensis* inhibits inflammation and fibrosis associated to HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway to improve non-alcoholic steatohepatitis [J]. Carbohydr Polym, 2024, 337: 122139.
- [16] WEI Y, MA Z, LI Z, et al. Gentiopicroside ameliorates synovial inflammation and fibrosis in KOA rats by modulating the HMGB1-mediated PI3K/AKT signaling axis [J]. Int Immunopharmacol, 2025, 147: 113973.
- [17] FAN C Y, YE F H, PENG M, et al. Endogenous HMGB1 regulates GSDME-mediated pyroptosis via ROS/ERK1/2/caspase-3/GSDME signaling in neuroblastoma [J]. Am J Cancer Res, 2023, 13(2): 436-51.
- [18] LI K, FENG Z, WANG L, et al. Chlorogenic acid alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress, inflammation, and mitochondria-mediated apoptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. Inflammation, 2023, 46(3): 1061-76.
- [19] 徐可欣, 王丹丹, 金泓宇, 等. 毛兰素通过调节HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1信号通路缓解特应性皮炎[J]. 中国比较医学杂志.(XU K X, WANG D D, JIN H Y, et al. Erianin ameliorates atopic dermatitis by modulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine), 2025, 13(6): 1-10.
- [20] ZHANG Y, HUANG X, YUAN Y. Linagliptin protects human chondrogenic ATDC5 cells against advanced glycation end products (AGEs)-induced apoptosis via a mitochondria-dependent pathway [J]. Chem Biol Interact, 2020, 315: 108901.