

高良姜素对膝关节炎大鼠软骨细胞自噬和凋亡的影响[△]

杨青^{1*}, 黄伟², 刘清毅³, 周仲瑜² (1. 湖北省妇幼保健院康复理疗科, 武汉 430070; 2. 湖北省中医院针灸科, 武汉 430070; 3. 武汉市青山区冶金街社区卫生服务中心中医科, 武汉 430070)

中图分类号 R965; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)03-0312-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.03.09



摘要 **目的** 探讨高良姜素(GLA)调节腺苷一磷酸活化的蛋白质激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51样激酶1(ULK1)信号通路对膝关节炎(KOA)大鼠软骨细胞自噬和凋亡的影响。**方法** 构建KOA大鼠模型,将其分为模型组, GLA低、中、高剂量组(皮下注射100、200、400 μg/kg的GLA), GLA+Compound C组(皮下注射400 μg/kg的GLA+0.2 mg/kg的AMPK抑制剂Compound C), 每组10只;另选取10只正常饲养的大鼠作为假手术组。末次给药后,检测大鼠膝关节肿胀程度,观察大鼠膝关节软骨组织病理学;检测大鼠血清中基质金属蛋白酶13(MMP-13)、白细胞介素1β(IL-1β)水平;观察大鼠软骨细胞自噬情况;检测大鼠软骨细胞凋亡情况;检测大鼠膝关节软骨组织中AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白磷酸化水平。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠关节软骨细胞排列紊乱,细胞核固缩,关节软骨层纤维化严重,且伴有大量炎症细胞浸润;膝关节肿胀程度,软骨细胞自噬空泡数、凋亡率,血清中MMP-13、IL-1β水平,膝关节软骨组织中mTOR蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);膝关节软骨组织中AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组相比, GLA低、中、高剂量组大鼠膝关节软骨损伤明显改善,炎症细胞浸润减轻,上述定量指标除自噬空泡数进一步升高外均显著逆转,且具有剂量依赖性($P<0.05$)。与GLA高剂量组比较, GLA+Compound C组大鼠膝关节软骨损伤和炎症细胞浸润加重,上述定量指标均显著逆转($P<0.05$)。**结论** GLA可促进KOA大鼠软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,其作用机制可能与激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路有关。
关键词 高良姜素;膝关节炎;软骨细胞;自噬;凋亡;AMPK/mTOR/ULK1信号通路

Effects of galangin on autophagy and apoptosis of chondrocytes in knee osteoarthritis rats

YANG Qing¹, HUANG Wei², LIU Qingyi³, ZHOU Zhongyu² (1. Dept. of Rehabilitation and Physiotherapy, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China; 2. Dept. of Acupuncture and Moxibustion, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430070, China; 3. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Qingshan District Metallurgical Street Community Health Service Center, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of galangin (GLA) on autophagy and apoptosis of chondrocytes in knee osteoarthritis (KOA) rats by regulating the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **METHODS** KOA rat model was constructed and separated into model group, L-GLA, M-GLA, H-GLA groups [subcutaneous injection of 100, 200, 400 μg/kg GLA], GLA+Compound C group [subcutaneous injection of 400 μg/kg GLA+0.2 mg/kg AMPK inhibitor Compound C], with 10 rats in each group. Additionally, 10 normally fed rats were selected as the sham operation group. After the last medication, the degree of knee joint swelling of rats in each group was detected; the pathology of knee joints in KOA rats was observed. The serum expressions of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and interleukin-1β (IL-1β) in KOA rats were detected; the autophagy of chondrocytes in KOA rats was observed; the chondrocyte apoptosis in KOA rats was detected; the phosphorylation of AMPK/mTOR/ULK1 pathway-related proteins in cartilage tissue of knee joint were detected in rats. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the arrangement of articular chondrocytes in the model group was disordered, with nuclear pyknosis and severe fibrosis of the articular cartilage layer, accompanied by a large amount of inflammatory cell infiltration; the degree of joint swelling, the number of autophagic vacuoles and apoptosis rate of chondrocytes, serum levels of MMP-13 and IL-1β, and the phosphorylation of mTOR protein in cartilage tissue of knee joint were all increased significantly ($P<0.05$), while the phosphorylation of AMPK and ULK1 protein were all decreased significantly in cartilage tissue of knee joint ($P<0.05$). Compared with the model group, L-GLA, M-GLA, H-GLA groups showed significant improvement in joint cartilage injury and reduced infiltration of inflammatory cells in rats. The above quantitative indicators were significantly reversed in a dose-dependent manner,

△基金项目 湖北省科技计划项目(No.2022EHB054)
* 第一作者 副主任医师。研究方向:中医康复。E-mail: yq37rf@163.com

except the number of autophagic vacuoles increased significantly ($P<0.05$). Compared with the H-GLA group, the GLA+Compound C group showed aggravated cartilage tissue of joint cartilage injury and inflammatory cell infiltration in rats, and the above quantitative indicators were reversed significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** GLA can promote autophagy and inhibit apoptosis of chondrocytes in KOA rats, the mechanism of which may be associated with activating AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

KEYWORDS galangin; knee osteoarthritis; chondrocytes; autophagy; apoptosis; AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是临床上常见的一种慢性退行性疾病,以关节疼痛、畸形和功能障碍为特征,其进展缓慢,最终因疼痛和关节运动受损而导致患者活动能力丧失^[1]。我国KOA的患病率为25.51%,且随着人口老龄化加剧和平均预期寿命延长,KOA的患病率将进一步上升^[2]。目前,KOA患者的治疗以口服非甾体抗炎药为主,严重者需要进行全关节置换术来恢复关节功能;然而,药物只能暂时缓解症状,而手术是一种危险且昂贵的选择,效果有限^[3],加之学界对KOA的病因认识有限,因此有必要进一步阐明该病的生理病理,并开发新的治疗手段。

在细胞饥饿状态下,腺苷一磷酸活化的蛋白质激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)可通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)来激活UNC-51样激酶1(UNC-51-like kinase 1, ULK1),从而触发软骨细胞自噬抑制细胞凋亡,参与调控KOA的疾病进展^[4]。高良姜素(galangin, GLA)是一种重要的具有天然活性的类黄酮,具有抗炎、抗菌、抗氧化应激、抗纤维化、抗高血压等生物活性,对类风湿性关节炎、骨关节炎(osteoarthritis, OA)、骨质疏松症等疾病具有较好的疗效^[5]。相关研究显示,GLA可通过调控AMPK/mTOR信号通路,促进细胞自噬,抑制细胞凋亡,从而减轻镉诱导的肾毒性^[6]。然而,GLA在KOA中的作用机制尚不清楚。基于此,本研究通过探讨GLA调节AMPK/mTOR/ULK1信号通路对KOA大鼠软骨细胞自噬和凋亡的影响,以期为KOA的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Talos F200X S型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)购自北京欧波同光学技术有限公司;MACSQuant[®] VYB型流式细胞仪购自德国美天旌生物技术有限公司;LK-YG96型倒置显微镜购自天津徕科光学仪器有限公司;SH-523型凝胶成像系统购自杭州申花科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

GLA对照品(批号ES-1114S,纯度 $\geq 99\%$)购自上海玉博生物科技有限公司;AMPK抑制剂Compound C对

照品(批号orb1909567,纯度 $\geq 98\%$)购自武汉博欧特生物科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号G1120-10)购自北京祥生兴业科技有限公司;基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为F16182、F15810)购自上海西唐生物科技有限公司;自噬检测试剂盒(批号A486454)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(批号JC-A80300)购自上海机纯实业有限公司;BCA蛋白定量试剂盒、ECL试剂盒(批号分别为KL-X126、KL-X122)购自上海康朗生物科技有限公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、AMPK、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)、mTOR、磷酸化ULK1(phosphorylated ULK1, p-ULK1)、ULK1抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号分别为ab181095、ab68206、ab271188、ab137133、ab32028、ab133766、ab177472、ab6721)购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为雄性SD大鼠,体重250~300 g,购于武汉有度生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0025。所有大鼠均置于温度24℃、湿度55%、12 h光/暗循环的环境中自由进食和饮水。本实验经武汉有度生物科技有限公司动物伦理委员会审批(批件号2242930)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药

将56只大鼠采用0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,于右后肢膝关节腔内侧切口后暴露关节腔,之后横切前交叉韧带,切除内侧半月板,然后将髌骨复位,缝合内侧囊切口,闭合皮肤。6周后,对大鼠进行X射线检查,若显示关节面粗糙变形,边缘有明显骨赘,内侧间隙变窄,软骨下骨的骨密度明显增高,则说明KOA模型构建成功^[7]。另选择10只正常饲养的大鼠打开关节腔,但保持半月板完整,作为假手术组(即Sham组)。

将建模成功的大鼠分为模型组(即KOA组),GLA低、中、高剂量组(即L-GLA、M-GLA、H-GLA组,皮下注射100、200、400 $\mu\text{g/kg}$ 的GLA^[8],临用时以二甲基亚砜溶

解),GLA+Compound C组(皮下注射400 μg/kg的GLA+0.2 mg/kg的AMPK抑制剂Compound C^[9]),每组10只。各给药组皮下注射相应药液,Sham组和KOA组大鼠注射等量的生理盐水,每天1次,连续给药21 d。

2.2 大鼠膝关节肿胀程度检测

于给药第7、21天时,采用游标卡尺测量大鼠左右膝关节直径,计算右膝关节肿胀度(即右膝关节直径与左膝关节直径的差值)。

2.3 样品采集

测量完大鼠左右膝关节直径后,各组大鼠以颈椎脱臼法处死,于眼眶采集全血标本,分离血清,保存于一80℃。将右后肢膝关节软骨组织分成两部分:一部分置于10%多聚甲醛中固定,用于病理学观察;另一部分保存于一80℃,备用。

2.4 大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平检测

采用ELISA法检测。取“2.3”项下血清样品,按试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度,并绘制MMP-13、IL-1β的标准曲线,然后计算大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平。

2.5 大鼠膝关节软骨组织病理学特征观察

取“2.3”项下固定的膝关节软骨组织适量,用水冲洗30 min,在乙二胺四乙酸中室温脱钙4~6周,每周更换脱钙液,然后用水冲洗30 min,用不同浓度的乙醇(50%~100%)脱水,再以二甲苯透明,经石蜡包埋后制成5 μm切片;切片经苏木素染色10 min,再以伊红染色3~5 min,然后在显微镜下观察其病理学特征。

2.6 大鼠软骨细胞自噬观察

取“2.3”项下冻存的膝关节软骨组织适量,修剪为1 mm×1 mm×1 mm大小,在四氧化锇(1%)中固定3 h,经脱水、包埋后,切成70 nm厚的薄片,再以柠檬酸铅、醋酸铀进行双重染色,然后采用TEM观察,并统计自噬空泡数。

2.7 大鼠软骨细胞凋亡检测

取“2.3”项下冻存的膝关节软骨组织适量,用0.25%胰蛋白酶消化10 min,加入500 μL结合缓冲液重悬,再加入5 μL Annexin V-FITC试剂和5 μL碘化丙啶(PI),室温下黑暗反应15 min,采用流式细胞仪检测软骨细胞凋亡情况,并计算凋亡率(凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%)。

2.8 大鼠膝关节软骨组织中AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3”项下冻存的膝关节软骨组织适量,用RIPA裂解液裂解,提取总蛋白,采用BCA试剂盒检测上清液中的蛋白浓度。蛋白经变性处理后,取50 μg至10%十二烷基硫酸钠凝胶上,并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将分离的样品

转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST在室温下阻断1 h,加入β-actin(稀释度为1:1 000)、p-AMPK(稀释度为1:2 000)、AMPK(稀释度为1:1 000)、p-mTOR(稀释度为1:1 000)、mTOR(稀释度为1:1 000)、p-ULK1(稀释度为1:1 000)、ULK1(稀释度为1:10 000)一抗在4℃下孵育过夜;用TBST洗涤10 min,加入二抗(稀释度为1:5 000)在室温下孵育1 h,使用ECL试剂盒进行显色、成像。使用Image J软件进行分析,以β-actin为内参进行归一化,以p-AMPK与AMPK、p-mTOR与mTOR、p-ULK1与ULK1的比值表示AMPK、mTOR、ULK1的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 GLA对KOA大鼠膝关节肿胀程度的影响

GLA处理7、21 d后,KOA组大鼠膝关节肿胀程度均显著高于Sham组($P<0.05$);L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠膝关节肿胀程度均显著低于KOA组,且具有剂量依赖性($P<0.05$);GLA+Compound C组大鼠膝关节肿胀程度显著高于H-GLA组($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠膝关节肿胀程度比较($\bar{x} \pm s, n=10, mm$)

组别	7 d	21 d
Sham组	0.11±0.01	0.15±0.01
KOA组	4.37±0.42 ^a	5.17±0.53 ^a
L-GLA组	3.45±0.35 ^b	2.72±0.30 ^b
M-GLA组	3.11±0.32 ^{bc}	2.23±0.28 ^{bc}
H-GLA组	2.72±0.28 ^{cd}	1.85±0.21 ^{cd}
GLA+Compound C组	3.62±0.37 ^e	3.69±0.41 ^e

a:与Sham组比较, $P<0.05$;b:与KOA组比较, $P<0.05$;c:与L-GLA组比较, $P<0.05$;d:与M-GLA组比较, $P<0.05$;e:与H-GLA组比较, $P<0.05$ 。

3.2 GLA对KOA大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平的影响

KOA组大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平均显著高于Sham组($P<0.05$);L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平均显著低于KOA组,且具有剂量依赖性($P<0.05$);GLA+Compound C组大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平均显著高于H-GLA组($P<0.05$)。结果见表2。

3.3 GLA对KOA大鼠膝关节软骨组织病理学的影响

Sham组大鼠膝关节软骨细胞排列整齐、形态规则,组织结构完整,无炎症细胞浸润;KOA组大鼠膝关节软骨细胞排列紊乱,细胞核固缩,关节软骨层纤维化严重,伴有大量炎症细胞浸润;与KOA组相比,L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠膝关节软骨损伤得到明显改善,炎

表2 各组大鼠血清中MMP-13、IL-1β水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$, pg/mL)

组别	MMP-13	IL-1β
Sham组	5.23 ± 2.05	24.93 ± 3.29
KOA组	60.76 ± 7.14 ^a	82.01 ± 8.74 ^a
L-GLA组	42.51 ± 5.33 ^b	61.44 ± 6.46 ^b
M-GLA组	29.24 ± 4.31 ^{bc}	49.85 ± 5.32 ^{bc}
H-GLA组	13.57 ± 3.27 ^{cd}	31.46 ± 4.18 ^{cd}
GLA+Compound C组	56.34 ± 6.08 ^e	71.33 ± 7.55 ^e

a: 与Sham组比较, $P<0.05$; b: 与KOA组比较, $P<0.05$; c: 与L-GLA组比较, $P<0.05$; d: 与M-GLA组比较, $P<0.05$; e: 与H-GLA组比较, $P<0.05$ 。

症细胞浸润减轻,且呈现剂量依赖趋势;与H-GLA组相比, GLA+Compound C组大鼠膝关节软骨损伤加重,炎症细胞浸润加重。结果见图1。

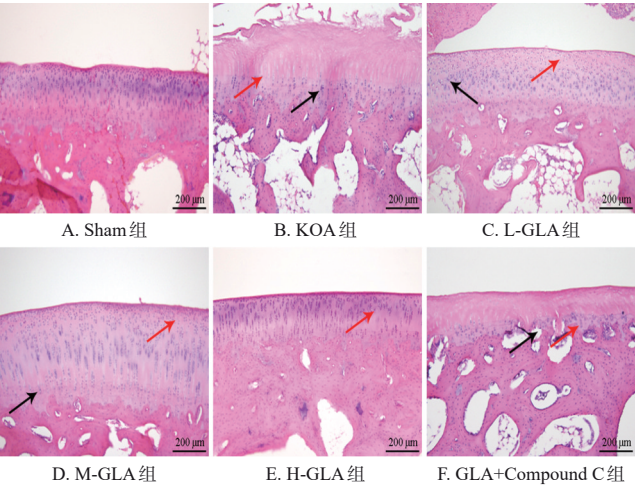


图1 各组大鼠膝关节软骨组织病理学观察结果(HE染色)

3.4 GLA对KOA大鼠软骨细胞自噬的影响
KOA组大鼠软骨细胞自噬空泡数显著高于Sham组($P<0.05$); L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠软骨细胞自噬空泡数显著高于KOA组,且具有剂量依赖性($P<0.05$); GLA+Compound C组大鼠软骨细胞自噬空泡数显著低于H-GLA组($P<0.05$)。结果见图2、表3。

3.5 GLA对KOA大鼠软骨细胞凋亡的影响
KOA组大鼠软骨细胞凋亡率显著高于Sham组($P<0.05$); L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠软骨细胞凋亡率显著低于KOA组($P<0.05$),且具有剂量依赖性($P<0.05$); GLA+Compound C组大鼠软骨细胞凋亡率显著高于H-GLA组($P<0.05$)。结果见表3、图3。

3.6 GLA对KOA大鼠膝关节组织中AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白表达的影响
KOA组大鼠膝关节组织中AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均显著低于Sham组, mTOR蛋白的磷酸化水

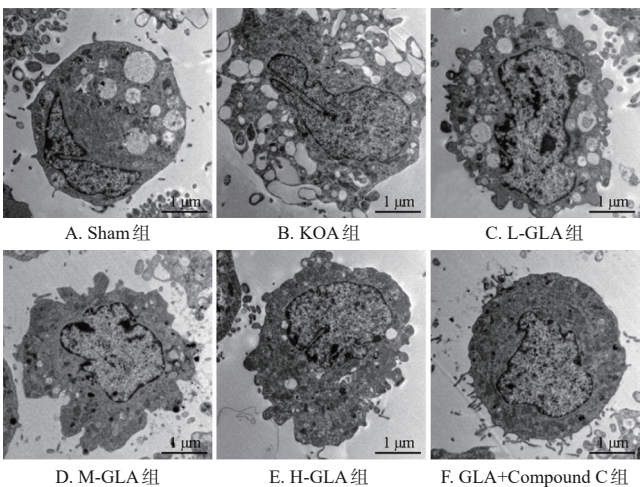


图2 各组大鼠软骨细胞自噬情况观察结果

表3 各组大鼠软骨细胞自噬空泡数和凋亡率比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	自噬空泡数/个	凋亡率/%
Sham组	1.64 ± 0.42	2.03 ± 0.54
KOA组	8.31 ± 1.33 ^a	47.22 ± 5.08 ^a
L-GLA组	17.54 ± 3.57 ^b	36.51 ± 3.84 ^b
M-GLA组	29.79 ± 4.38 ^{bc}	28.96 ± 2.96 ^{bc}
H-GLA组	42.84 ± 5.29 ^{cd}	12.05 ± 1.37 ^{cd}
GLA+Compound C组	12.47 ± 2.46 ^e	41.48 ± 4.69 ^e

a: 与Sham组比较, $P<0.05$; b: 与KOA组比较, $P<0.05$; c: 与L-GLA组比较, $P<0.05$; d: 与M-GLA组比较, $P<0.05$; e: 与H-GLA组比较, $P<0.05$ 。

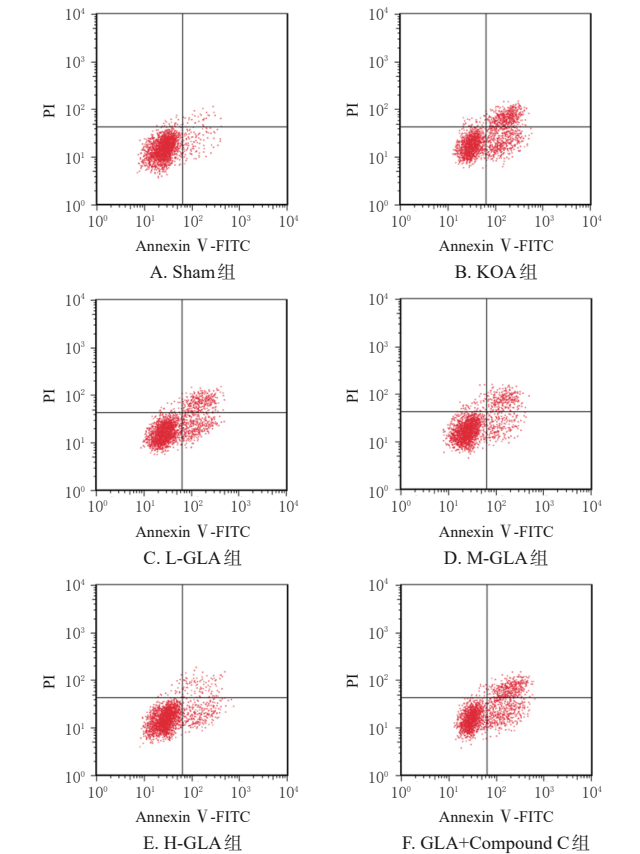
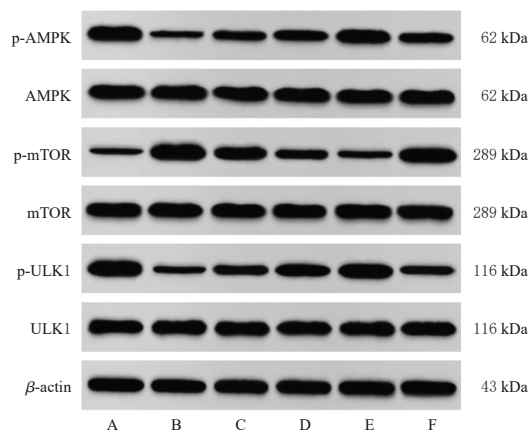


图3 各组大鼠软骨细胞凋亡流式图

平显著高于Sham组($P<0.05$);L-GLA、M-GLA、H-GLA组大鼠膝关节组织中AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均显著高于KOA组,mTOR蛋白的磷酸化水平显著低于KOA组($P<0.05$),且具有剂量依赖性($P<0.05$);GLA+Compound C组大鼠膝关节组织中AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均显著低于H-GLA组,mTOR蛋白磷酸化水平显著高于H-GLA组($P<0.05$)。结果见图4、表4。



A: Sham组;B: KOA组;C: L-GLA组;D: M-GLA组;E: H-GLA组;F: GLA+Compound C组。

图4 大鼠膝关节组织中AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠膝关节组织中AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
Sham组	1.25±0.18	0.35±0.11	1.37±0.14
KOA组	0.31±0.10 ^a	1.34±0.16 ^a	0.45±0.09 ^a
L-GLA组	0.57±0.13 ^b	1.06±0.14 ^b	0.70±0.11 ^b
M-GLA组	0.86±0.15 ^{bc}	0.78±0.13 ^{bc}	0.96±0.12 ^{bc}
H-GLA组	1.09±0.17 ^{cd}	0.42±0.12 ^{cd}	1.24±0.13 ^{cd}
GLA+Compound C组	0.72±0.14 ^c	1.19±0.15 ^c	0.58±0.10 ^c

a: 与Sham组比较, $P<0.05$; b: 与KOA组比较, $P<0.05$; c: 与L-GLA组比较, $P<0.05$; d: 与M-GLA组比较, $P<0.05$; e: 与H-GLA组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

OA是全球致残疾病的主要原因,临床上膝关节是最常见的OA部位^[10]。KOA的发病机制复杂,包括机械负荷、炎症、代谢改变、细胞衰老等,这些因素共同导致滑膜关节的结构恶化和功能衰竭,其中炎症反应在KOA的发展中起着至关重要的作用^[2]。关节损伤会导致无菌性炎症,而高水平的炎症因子,如MMP-13、IL-1 β 等,可增强破骨细胞分化,导致软骨细胞凋亡和软骨退变^[11]。自噬是一种重要的细胞功能,可通过降解冗余或受损的蛋白质和细胞器来保护细胞免于凋亡。在KOA的进展过程中,软骨细胞的自噬活性存在缺陷,导致细胞凋亡增加,从而加剧KOA的病理进程^[12]。因此,探讨KOA软骨细胞自噬和凋亡相关的分子机制,对寻找新的治疗靶点和药物至关重要。本研究构建KOA大鼠模型后发

现,大鼠关节肿胀、炎症因子表达升高,软骨细胞自噬空泡数、凋亡率增加,关节软骨细胞排列紊乱,且伴有大量炎症细胞浸润,说明KOA伴随着明显的炎症反应,存在细胞自噬和细胞凋亡,表现出膝关节自噬损伤。

研究发现,提取自中药高良姜根部的GLA可以调控软骨细胞,参与OA的进展^[13]。相关研究显示,GLA可通过抑制氧化应激,减弱软骨细胞外基质降解,从而改善OA进展^[14]。此外,有研究表明,GLA在体外可抑制IL-1 β 诱导的炎症反应,在体内可改善软骨退行性变化,可作为治疗OA的潜在新药物^[15]。GLA还可在体内抑制类风湿性关节炎的发展,可作为治疗类风湿性关节炎的潜在新药物^[16]。本研究结果显示,GLA可促进大鼠软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡和炎症反应,减轻软骨细胞的炎症浸润。这提示GLA可能通过抑制炎症反应,促进软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,进而减轻KOA组织损伤。

研究表明,AMPK/mTOR/ULK1信号通路在自噬和凋亡中具有重要作用:AMPK可直接磷酸化mTOR,导致mTOR活性下调;还可通过调节ULK1泛素化,促进细胞自噬,抑制细胞凋亡^[17]。Xiao等^[18]研究发现,基烯醇可以通过调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路,促进急性肺损伤细胞自噬,减轻脂多糖诱导的肺部炎症和白细胞浸润。吴伟欣等^[19]研究发现,龟鹿二仙胶可通过调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路诱导自噬,减少软骨细胞凋亡,对KOA具有较好的治疗效果。蔡猛等^[20]研究发现,牛蒡子苷元可激活AMPK/ULK1信号通路,促进OA细胞自噬,抑制软骨细胞焦亡,减轻关节软骨组织损伤。本研究结果显示,KOA组大鼠膝关节组织中AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均低于Sham组,mTOR蛋白的磷酸化水平高于Sham组,这提示AMPK/mTOR/ULK1信号通路被抑制,可能是KOA发生的重要原因。经GLA干预后,AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均高于KOA组,mTOR蛋白的磷酸化水平低于KOA组;进一步以AMPK抑制剂Compound C干预后发现,其可逆转GLA对AMPK/mTOR/ULK1信号通路的激活作用。这提示,GLA可能通过激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路,促进KOA大鼠软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,从而改善KOA组织损伤。

综上所述,GLA可促进KOA大鼠软骨细胞自噬,抑制细胞凋亡,其作用机制可能与激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路有关。

参考文献

[1] WANG S, YANG J Y, XIANG R A, et al. Research and publication trends on knee osteoarthritis and cellular senescence: a bibliometric analysis[J]. Front Physiol, 2023, 14:1269338.

- [2] WANG Y H, ZHOU Y, GAO X, et al. Duhuo jisheng decoction regulates intracellular zinc homeostasis by enhancing autophagy via PTEN/Akt/mTOR pathway to improve knee cartilage degeneration[J]. PLoS One, 2024, 19(1): e0290925.
- [3] JIANG W, CHEN H X, LIN Y, et al. Mechanical stress abnormalities promote chondrocyte senescence: the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115552.
- [4] LU M, MENG D H, SHE Z Y, et al. Promotion and mechanism of acupotomy on chondrocyte autophagy in knee osteoarthritis rabbits[J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(9): 809-817.
- [5] WANG D B, CHEN J R, PU L, et al. Galangin; a food-derived flavonoid with therapeutic potential against a wide spectrum of diseases[J]. Phytother Res, 2023, 37(12): 5700-5723.
- [6] ARAB H H, ASHOUR A M, EID A H, et al. Targeting oxidative stress, apoptosis, and autophagy by galangin mitigates cadmium-induced renal damage: role of SIRT1/Nrf2 and AMPK/mTOR pathways[J]. Life Sci, 2022, 291: 120300.
- [7] 陈俊, 林洁, 赵忠胜, 等. 乌头汤对膝关节炎模型大鼠滑膜组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4381-4386.
CHEN J, LIN J, ZHAO Z S, et al. Effect of Wutou decoction on TLR4/NF- κ B signaling pathway in synovial tissue of rat models with knee osteoarthritis[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2019, 23(27): 4381-4386.
- [8] 李旭峰, 冷冬月, 施斌. 高良姜素对膝关节炎大鼠软骨损伤的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(6): 7-12.
LI X F, LENG D Y, SHI B. Efficacy of galangin on cartilage damage in rats with knee osteoarthritis[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop, 2024, 32(6): 7-12.
- [9] 李庆贵, 陈康, 郭召, 等. 汉黄芩素调节 AMPK/SIRT1 信号通路对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响[J]. 实用医学杂志, 2023, 39(4): 410-416.
LI Q G, CHEN K, GUO Z, et al. Effect of wogonin on bone fracture healing in rats with osteoporosis by regulating AMPK/SIRT1 signaling pathway[J]. J Pract Med, 2023, 39(4): 410-416.
- [10] HU S L, ZHANG C W, NI L B, et al. Stabilization of HIF-1 α alleviates osteoarthritis via enhancing mitophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 481.
- [11] ZHANG W, ZHANG L L, YANG S, et al. Electroacupuncture ameliorates knee osteoarthritis in rats via inhibiting NLRP3 inflammasome and reducing pyroptosis[J]. Mol Pain, 2023, 19: 17448069221147792.
- [12] DONG J, ZHANG K J, LI G C, et al. CDDO-Im ameliorates osteoarthritis and inhibits chondrocyte apoptosis in mice via enhancing Nrf2-dependent autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(7): 1793-1802.
- [13] CHEN W J, ZHONG Y J, FENG N, et al. New horizons in the roles and associations of COX-2 and novel natural inhibitors in cardiovascular diseases[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 123.
- [14] LIN Q, ZHANG Y X, HONG W S, et al. Galangin ameliorates osteoarthritis progression by attenuating extracellular matrix degradation in chondrocytes via the activation of PRELP expression[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 936: 175347.
- [15] WANG Y B, ZHANG T, YANG Q C, et al. Galangin attenuates IL-1 β -induced catabolism in mouse chondrocytes and ameliorates murine osteoarthritis[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(8): 8742-8753.
- [16] DENG X W, LE H L, WAN T H, et al. Galangin alleviates rheumatoid arthritis in rats by downregulating the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 11192-11201.
- [17] BU H Q, LIU D L, ZHANG G L, et al. AMPK/mTOR/ULK1 axis-mediated pathway participates in apoptosis and autophagy induction by oridonin in colon cancer DLD-1 cells[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 8533-8545.
- [18] XIAO J, SHEN X F, KOU R M, et al. Kirenol inhibits inflammation challenged by lipopolysaccharide through the AMPK-mTOR-ULK1 autophagy pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109734.
- [19] 吴伟欣, 郑珍萍, 顾富城, 等. 龟鹿二仙胶对 IL-1 β 诱导的 AMPK/mTOR/ULK1 通路介导的体外培养软骨细胞自噬的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(4): 799-804.
WU W X, ZHENG Z P, GU F C, et al. Effect of Guilu erxian jiao on IL-1 β -induced AMPK/mTOR/ULK1 pathway mediated autophagy in cultured chondrocytes *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(4): 799-804.
- [20] 蔡猛, 陈文恒, 徐琳琳, 等. 基于 AMPK/ULK1 介导的自噬通路探究牛蒡子苷元对骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡的影响[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(20): 1839-1848.
CAI M, CHEN W H, XU L L, et al. Effect of arctigenin on chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis rats based on AMPK/ULK1-mediated autophagy pathway[J]. Chin Pharm J, 2023, 58(20): 1839-1848.

(收稿日期: 2024-08-05 修回日期: 2024-12-30)

(编辑: 唐晓莲)