

## • 药理与临床 •

## 基于非靶向代谢组学探讨川芎嗪抑制高湿环境骨关节炎模型大鼠关节软骨铁死亡的作用机制

孙诗琪<sup>1,2</sup>, 胡瑶立<sup>1,2</sup>, 赵金龙<sup>2</sup>, 杨 园<sup>3</sup>, 古卓栩<sup>1,2</sup>, 周光辉<sup>4,5</sup>, 杨均政<sup>4,5</sup>, 陈柏豪<sup>4,5</sup>, 曾令烽<sup>1,2,6</sup>, 潘建科<sup>1,2</sup>, 郑 阳<sup>1,2</sup>, 杨伟毅<sup>1,2</sup>, 刘 军<sup>4,5,6\*</sup>, 梁桂洪<sup>1,2,6\*</sup>

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院), 广东省中医药防治难治性慢病重点实验室, 广东 广州 510120

3. 华南师范大学体育科学学院, 广东 广州 510006

4. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510405

5. 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广东 广州 510095

6. 广东省中医药科学院, 骨与关节退变及损伤研究团队, 广东 广州 510120

**摘要:**目的 探讨川芎嗪对高湿环境骨关节炎(high humidity osteoarthritis, HHOA)模型大鼠的治疗作用及潜在机制。方法 建立 HHOA 大鼠模型, 给予川芎嗪干预 8 周后, 通过番红 O-固绿染色观察软骨组织形态学变化; 检测血清中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1)、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的水平; 通过普鲁士蓝染色检测软骨组织的铁沉积情况; 免疫组化法检测软骨组织中 GPX4 和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)蛋白表达; 结合血清非靶向代谢组学分析代谢物变化及其富集的通路。体外构建软骨细胞铁死亡模型, 给予主要代谢物 N-乙酰基血清素干预后, 测定 GSH/氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)值、MDA 和 SOD 水平, 采用 Western blotting 检测 GPX4 和 ACSL4 蛋白的表达。结果 与 HHOA 组比较, 川芎嗪组大鼠血清中 MMP-9、PTGS2 和 MDA 水平明显降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 血清中 TIMP-1、GPX4、SOD 和 GSH 水平明显升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 关节软骨的病理损伤得到明显改善, 关节软骨中铁离子沉积减少, GPX4 蛋白表达增加, ACSL4 蛋白表达减少。代谢组学分析结果显示, HHOA 组与假手术组之间共筛选出 2 695 个差异代谢物, 其中下调代谢物数量显著多于上调代谢物; 川芎嗪高剂量组与 HHOA 组之间共筛选出 2 846 个差异代谢物, 以上调代谢物为主。KEGG 通路富集分析结果显示, HHOA 组与假手术组差异代谢物主要富集于碳代谢和氨基酸代谢等多条代谢通路, 川芎嗪与 HHOA 组差异代谢物主要富集于与氨基酸代谢及物质转运密切相关的多条通路。与假手术组比较, HHOA 组大鼠血清中  $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸、3-吡啶丙酸和 N-乙酰基血清素水平显著降低( $P<0.05$ ); 与 HHOA 组比较, 川芎嗪高剂量组  $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸、3-吡啶丙酸和 N-乙酰基血清素水平显著升高( $P<0.05$ )。体外实验结果显示, 主要代谢物 N-乙酰基血清素显著提高软骨细胞铁死亡模型 GSH/GSSG 值和 SOD 活力( $P<0.05$ ), 降低 MDA 水平( $P<0.05$ ), 上调 GPX4 蛋白和下调 ACSL4 蛋白的表达( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。结论 川芎嗪能通过改善 HHOA 大鼠的代谢组学谱, 调节以 N-乙酰基血清素为代表的色氨酸代谢途径, 缓解 GPX4/ACSL4 轴介导的脂质过氧化及铁离子沉积, 从而减轻软骨细胞铁死亡并延缓 HHOA 的进展。

**关键词:** 骨关节炎; 高湿环境; 川芎嗪; 非靶向代谢组学; 铁死亡; GPX4/ACSL4 轴; N-乙酰基血清素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)02-0500-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.011

收稿日期: 2025-10-13

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(82305263); 国家自然科学基金资助项目(82575098); 国家自然科学基金资助项目(82205147); 广东省基础与应用基础研究基金资助项目(2025A1515010393, 2023A1515012626); 广州市中医药重大科技项目(2025CX002); 广州中医药大学联合科技创新基金资助项目(GZYSE2024U01, GZYFT2024G08); 广东省中医药防治难治性慢病重点实验室开放课题(KF2023MB03); 国家中医药管理局郭程湘全国名老中医药专家传承工作室[国中医药人教发(2016)41]

**作者简介:** 孙诗琪, 硕士研究生, 研究方向为中医骨伤科学。E-mail: sunsisisqi347@gmail.com

**\*通信作者:** 刘 军, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治骨与关节退行性疾病的临床与基础研究。E-mail: liujun.gdctm@hotmail.com

梁桂洪, 助理研究员, 硕士生导师, 主要从事中医药防治骨与关节退行性疾病的临床与基础研究。

E-mail: liangguihong@gzucm.edu.cn

# Mechanisms of tetramethylpyrazine in inhibiting ferroptosis of articular cartilage in osteoarthritis rats under high humidity environment based on non-targeted metabolomics

SUN Shiqi<sup>1,2</sup>, HU Yaoli<sup>1,2</sup>, ZHAO Jinlong<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>3</sup>, GU Zhuoxu<sup>1,2</sup>, ZHOU Guanghui<sup>4,5</sup>, YANG Junzheng<sup>4,5</sup>, CHEN Bohao<sup>4,5</sup>, ZENG Lingfeng<sup>1,2,6</sup>, PAN Jianke<sup>1,2</sup>, ZHENG Yang<sup>1,2</sup>, YANG Weiyi<sup>1,2</sup>, LIU Jun<sup>4,5,6</sup>, LIANG Guihong<sup>1,2,6</sup>

1. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Refractory Chronic Diseases, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, China

3. School of Sports Science, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

4. The Fifth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

5. Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital (Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510095, China

6. The Research Team on Bone and Joint Degeneration and Injury of Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510120, China

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic effects and potential mechanisms of tetramethylpyrazine (TMP) in a high humidity osteoarthritis (HHOA) rat model. **Methods** The HHOA rat model was established, and rats were given TMP for eight weeks. Safranin O-fast green staining was used to observe morphological changes in cartilage tissue. The levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), glutathione peroxidase 4 (GPX4), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in serum were measured. Prussian blue staining was performed to detect iron deposition in cartilage. Immunohistochemistry was used to assess the expressions of GPX4 and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) in cartilage. Serum untargeted metabolomics was performed to analyze changes in metabolites and their enriched pathways. *In vitro*, a ferroptosis model of chondrocytes was established and treated with main metabolite *N*-acetylserotonin. GSH/oxidized glutathione (GSSG) value, MDA and SOD levels were measured, the expressions of GPX4 and ACSL4 were measured by Western blotting. **Results** Compared with HHOA group, levels of MMP-9, PTGS2 and MDA in serum of rats in TMP group were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ), while the levels of TIMP-1, GPX4, SOD and GSH in serum were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). The pathological damage to the articular cartilage was significantly improved, and the deposition of iron ions in articular cartilage was reduced, GPX4 protein expression was increased, and ACSL4 protein expression was reduced. Metabolomics analysis showed that 2 695 differential metabolites were screened between HHOA group and sham group, with significantly more down-regulated metabolites than up-regulated metabolites; A total of 2 846 differential metabolites were screened between TMP high-dose group and HHOA group, with up-regulated metabolites being the main ones. KEGG pathway enrichment analysis results showed that the differential metabolites between HHOA group and sham group were mainly enriched in multiple metabolic pathways such as carbon metabolism and amino acid metabolism, the differential metabolites between TMP group and HHOA group were mainly enriched in multiple pathways closely related to amino acid metabolism and substance transport. Compared with sham group, the levels of  $\gamma$ -glutamylleucine, 3-indolepropionic acid and *N*-acetylserotonin in serum of HHOA group rats were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with HHOA group, the levels of  $\gamma$ -glutamylleucine, 3-indolepropionic acid and *N*-acetylserotonin in TMP high-dose group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The *in vitro* experimental results showed that the main metabolite *N*-acetylserotonin significantly increased the GSH/GSSG value and SOD activity in ferroptosis model of chondrocytes ( $P < 0.05$ ), decreased MDA level ( $P < 0.05$ ), up-regulated GPX4 protein and down-regulated ACSL4 protein expressions ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** TMP could improve the metabolomic profile of HHOA rats, regulate the tryptophan metabolism pathway represented by *N*-acetylserotonin, alleviate GPX4/ACSL4 axis mediated lipid peroxidation and iron ion deposition, thereby reducing ferroptosis in chondrocytes and delaying the progression of HHOA.

**Key words:** osteoarthritis; high humidity environment; tetramethylpyrazine; non-targeted metabolomics; ferroptosis; GPX4/ACSL4 axis; *N*-acetylserotonin

骨关节炎是一种以关节软骨退行性变、软骨下骨质反应性改变、关节边缘骨赘形成、滑膜病变、

韧带松弛或挛缩、肌肉痿软无力等为特征的慢性骨关节疾病<sup>[1]</sup>。流行病学研究显示, 2021 年 40 岁以

上的成年人中有 22% 以上患有膝关节骨关节炎, 随着人口的老齡化, 肥胖人群比例上升, 膝关节骨关节炎的患病率将逐步上升, 导致个人和社会负担的经济成本显著增加<sup>[2-3]</sup>。中医学认为骨关节炎属于“痹证”范畴, 而高湿环境是痹症发生和进展的风险因素之一。有研究表明外湿可以导致小鼠机体脂质过氧化损伤和抗氧化酶活性下降<sup>[4]</sup>, 而谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 依赖的谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 可将脂质氢过氧化物转化为无毒的脂质醇来防止细胞铁死亡<sup>[5]</sup>。因此, 通过调控脂质代谢, 控制氧化还原平衡, 抑制软骨细胞铁死亡是一种极具潜力的针对高湿环境骨关节炎 (high humidity osteoarthritis, HHOA) 的治疗策略。

针对中药治疗骨关节炎的用药分析发现川芎是较为常用的药物<sup>[6]</sup>, 而川芎的主要活性成分川芎嗪是一种四甲基吡嗪衍生物类活性化合物, 具有抗血栓、抗缺血再灌注损伤、保肝、保肾等药理作用<sup>[7]</sup>。研究表明, 川芎嗪也是治疗骨关节炎的潜在候选药物<sup>[8]</sup>, 课题组前期研究发现川芎嗪可通过改善血管新生等多方面的组织表现, 实现修复骨关节炎大鼠模型关节软骨的作用, 抑制早期骨关节炎的进展<sup>[9-10]</sup>。但目前关于川芎嗪治疗湿证型骨关节炎的机制尚不明确。有研究通过代谢组学分析发现川芎、淫羊藿单用和两者配伍均可回调骨关节炎大鼠的差异代谢物<sup>[11]</sup>。血清代谢物是基因和蛋白表达的最终产物, 与机体表型的联系更加紧密, 通过代谢组学技术发现并鉴定证候/疾病的生物标记物, 能更为全面地了解高湿环境对机体的作用机制<sup>[12]</sup>。有研究运用血清代谢组学与蛋白质组学技术, 筛选出与湿证症状相关的共同通路以及差异代谢物<sup>[13]</sup>。表明湿证状态下, 机体血清中的代谢物会发生明显改变, 通过代谢组学探索高湿环境影响骨关节炎进展并揭示川芎嗪治疗 HHOA 的潜在作用机制具有重要意义。

本研究以 HHOA 大鼠为模型, 基于血清非靶向代谢组学系统解析 HHOA 模型的代谢异常特征, 并评估川芎嗪干预的关键代谢通路及差异代谢物。在此基础上, 联合组织学染色、普鲁士蓝铁染色、免疫组化及 ELISA 等方法, 证实川芎嗪可减轻 HHOA 大鼠软骨结构损伤和铁沉积, 调节 GPX4 和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 等铁死亡相关蛋白表达; 并通过围绕代表性差异代谢物 *N*-乙酰基血清

素的体外功能实验, 进一步从“代谢调节-抗氧化应激-铁死亡抑制”层面阐明川芎嗪抑制 HHOA 大鼠关节软骨铁死亡的作用机制, 为川芎嗪治疗湿证型骨关节炎提供了代谢组学基础上的实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只, 雌雄各半, 5~6 周龄, 体质量 (110±10) g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物合格证号 NO.44007200103590。动物饲养于广东省中医药科学院实验动物中心 SPF 级屏障环境中, 实验动物使用许可证号 SYXK (粤)-2023-0094。动物实验经广东省中医院动物伦理委员会批准 (批准号 2020050)。

### 1.2 药品与试剂

磷酸川芎嗪片 (国药准字 H44024348, 50 mg/片, 批号 210908) 购自丽珠集团利民制药厂; Triton X-100 (批号 T8200) 购自北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇 (批号 100092683) 购自国药集团化学试剂有限公司; 骨组织番红固绿染色试剂盒 (批号 S191031)、普鲁士蓝染色试剂盒 (批号 S191029)、组化笔 (批号 P0104)、苏木素染液 (批号 P0064)、TRIS-EDTA 修复液 (批号 P0027)、柠檬酸修复液 (批号 P0026)、HRP 标记的山羊抗大鼠二抗 (批号 PN0081) 购自皮诺飞生物科技有限公司; GPX4 抗体 (批号 ab125066)、ACSL4 抗体 (批号 ab155282) 购自英国 Abcam 公司; *N*-乙酰基血清素 (批号 HY-107854) 购自美国 MCE 公司; 铁死亡诱导剂 Ras 选择性致死 3 (Ras-selective lethal 3, RSL3, 批号 S8155) 购自 Selleck 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D2650) 购自美国 Sigma 公司; 大鼠基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) ELISA 试剂盒 (批号 MM-20918R1)、大鼠基质金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0056R1)、大鼠 GPX4 ELISA 试剂盒 (批号 MM-70433R1)、大鼠前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) ELISA 试剂盒 (批号 MM-70227R1)、大鼠 GSH ELISA 试剂盒 (批号 MM-0602R1)、大鼠超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0386R1) 购自江苏酶免实业有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 S0131S)、总 SOD 活性检测试剂盒 (批号 S0101S)、

GSH 和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)检测试剂盒(批号 S0053)购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

JT-12S 型脱水机、JB-L5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机(德国 LEICA 公司); Thermo Vanquish 超高效液相色谱系统、Thermo Orbitrap Exploris 120 型高分辨质谱仪、311 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HR30-IIA2 型生物安全柜(海尔生物医疗股份有限公司); IC-1000 型 Count Star 自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司); Centrifuge 5424R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); RODI-220BI 型全自动纯水设备(厦门锐思捷水纯化技术有限公司); Pronerpac basic 型蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Infinite M1000 PRO 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Touch Imager Pro 型接触式蛋白化学发光成像系统(上海易亨特光电技术有限公司); ECLIPSE-Ci 型显微镜(日本 Nikon 公司); Panoramic SCAN II 型扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 骨关节炎模型构建

采用内侧半月板不稳术构建大鼠骨关节炎模型,气麻机使用异氟烷麻醉大鼠,双膝关节备皮,消毒。将大鼠置于仰卧位,沿膝关节内侧做一纵长约 2 cm 的切口,分离皮下筋膜和关节囊,打开关节腔,找出并切断内侧半月板胫副韧带,内侧半月板出现明显松动。随后在关节腔中加入少量青霉素粉,逐层缝合,双膝操作相同。术后 ip 8×10<sup>4</sup> U 青霉素,每天 1 次,预防感染 3 d。假手术组双膝切开膝关节皮肤,探查后不切除内侧半月板胫副韧带,仅进行常规暴露与缝合操作,以排除单纯切开因素对实验结果的干扰。

### 2.2 高湿环境的模拟

在人工气候箱中设定相对湿度为(95±2)%,温度为(22±2)℃<sup>[4]</sup>。

### 2.3 动物分组与给药

SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组、骨关节炎组、HHOA 组和川芎嗪低、高剂量(31.25、62.50 mg/kg)组,每组 6 只。在骨关节炎造模 4 周后,将 HHOA 组和给药组大鼠放入高湿环境的人工气候箱中,每天接受外湿刺激 1 次,每次

持续 6 h;同时给药组大鼠 ig 相应药物,假手术组、骨关节炎组和 HHOA 组大鼠 ig 等体积的生理盐水,每天 1 次,连续给药 8 周。

### 2.4 样品的采集与处理

给药结束后,使用异氟烷过度麻醉大鼠,腹主动脉采血,室温静置 2 h 后,4℃、1 500 r/min 离心 15 min,取血清,于-80℃冰箱中保存。随后立即分离双膝关节,剥离周围软组织后收集膝关节组织,部分组织置于 4%多聚甲醛固定,用于组织学及免疫组化检测;其余组织经液氮速冻后转移至-80℃保存备用。

### 2.5 膝关节组织番红 O-固绿染色

取于 4%多聚甲醛中固定的膝关节组织,梯度乙醇脱水,石蜡包埋后切片,切片脱蜡至水,固绿染色,水洗;滴加媒染剂,水洗;番红染色至软骨呈鲜红色,水洗;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,于显微镜下观察关节软骨破坏程度。根据国际骨关节炎研究协会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)病理学评价方法,对番红 O-固绿染色的病理结果进行评分。

### 2.6 血清中 MMP-9、TIMP-1、PTGS2、GPX4、GSH、SOD 和 MDA 水平

取大鼠血清,按照试剂盒说明书测定 MMP-9、TIMP-1、PTGS2、GPX4、GSH、SOD 和 MDA 水平。

### 2.7 膝关节组织普鲁士蓝染色

取膝关节组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡后,用无水乙醇脱水,再经流水充分冲洗。切片以纯水洗 3 次,并用组化笔圈定组织区域后置于湿盒中,滴加按 1:1 配制的普鲁士蓝混合染色液,室温孵育 1 h,纯水冲洗后再放入普鲁士蓝复染液中 3~5 min,继以纯水漂洗至无背景色。随后,切片经无水乙醇脱水,二甲苯透明,风干后以中性树胶封片,使用扫描仪扫描切片并保存。

### 2.8 免疫组化检测膝关节组织 GPX4 和 ACSL4 表达

取膝关节组织石蜡切片,脱蜡至水,置于抗原修复液中进行热修复;将切片放于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中,室温孵育 20 min;用组化笔在组织周围画圈,在组织上滴加血清,37℃孵育 30 min;滴加一抗,于 4℃冰箱湿盒中孵育过夜。次日,切片经 PBS 洗涤后,加入 HRP 标记的二抗,于室温孵育 1 h。滴加 DAB 显色液反应,经自来水充分冲洗终止反应,并以苏木素复染细胞核;切片依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,以中性树胶封片,使用扫描仪扫描切片并

保存。

## 2.9 非靶向代谢组学检测川芎嗪对 HHOA 大鼠血清代谢物的影响

**2.9.1 样品处理** 取假手术组、HHOA 组和川芎嗪高剂量组大鼠血清进行代谢物分析。精确称定适量样本于 2 mL 离心管中,准确加入 1 mL 组织提取液 [75%甲醇-氯仿 (9:1)],加入钢珠;放入组织研磨器中,50 Hz 研磨 60 s,重复上述操作 2 次;室温超声 30 min,冰上放置 30 min;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于离心管中,浓缩干燥;准确加入 200  $\mu$ L 2-氯-L-苯丙氨酸溶液 (4 mg/L,以 50%乙腈配制)复溶样品,滤液加入到检测瓶中,用于 LC-MS 检测。

**2.9.2 色谱条件** Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2  $\mu$ L。正离子模式条件:流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A1)-0.1%甲酸乙腈溶液 (B1),梯度洗脱:0~1.0 min, 8% B1; 1.0~8.0 min, 8%~98% B1; 8.0~10.0 min, 98% B1; 10.0~10.1 min, 98%~8% B1; 10.1~12.0 min, 8% B1。负离子模式条件:流动相为 5 mmol/L 甲酸铵水溶液 (A2)-乙腈 (B2),梯度洗脱:0~1.0 min, 8% B2; 1.0~8.0 min, 8%~98% B2; 8.0~10.0 min, 98% B2; 10.0~10.1 min, 98%~8% B2; 10.1~12.0 min, 8% B2。

**2.9.3 质谱条件** 电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI),于正、负离子模式下采集数据。正离子喷雾电压为 3.50 kV,负离子喷雾电压为 -2.50 kV;鞘气流量 40 arb;辅助气流量 10 arb;毛细管温度 325 °C;以分辨率 60 000 进行一级全扫描,一级离子扫描范围  $m/z$  100~1 000,并采用高能碰撞解离 (higher-energy collisional dissociation, HCD) 进行二级裂解,碰撞能量为 30%,二级分辨率为 15 000,采集信号前 4 离子进行碎裂,同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

**2.9.4 差异代谢物的鉴定** 通过与 HMDB (<http://www.hmdb.ca>)、Metlin (<http://metlin.scripps.edu>)、massbank (<http://www.massbank.jp/>)、mzcloud (<https://www.mzcloud.org>) 数据库中代谢物的保留时间、相对分子质量 (误差 $<1\times 10^{-5}$ )、二级碎裂谱图、碰撞能等信息进行匹配,对生物样本中的代谢物进行结构鉴定。鉴定等级在 Level 2 及以上。

**2.9.5 数据分析** 代谢组学原始 LC-MS 数据首先

通过 ProteoWizard 软件转换为 mzXML 格式,随后采用 XCMS 平台进行峰识别、保留时间校正和峰面积提取,并结合质控样本的总离子流图 (total ion chromatogram, TIC) 重叠、Pearson 相关性及 RSD 分布评估仪器稳定性和数据质量。两组比较的差异代谢物采用差异倍数 (fold change, FC) 分析结合非配对  $t$  检验,筛选阈值设定为  $FC>1$  或  $FC<1$  且  $P<0.05$ ;同时参考正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 的变量权重值 (variable importance for the projection, VIP),以  $VIP>1$  且  $P<0.05$  作为显著差异代谢物的综合筛选标准。3 组及以上比较时,根据数据分布采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验,  $P<0.05$  视为差异有统计学意义。

## 2.10 主要代谢物 *N*-乙酰基血清素对软骨细胞铁死亡模型氧化应激和铁死亡相关蛋白表达的影响

**2.10.1 大鼠软骨细胞提取和培养** 将大鼠膝关节浸泡于含 1%双抗的 PBS 溶液中,于超净工作台去除关节周围肌肉组织,分离并保留软骨组织,将其剪碎成细小块后,以含 1%双抗的 PBS 洗涤 2 次;加入 0.25%胰酶,于 37 °C、120 r/min 消化 30 min,弃去胰酶并再次洗涤 2 次后,加入 0.2% II 型胶原蛋白酶溶液,于 37 °C、120 r/min 消化 5 h。收集消化液,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清后用完全培养基重悬细胞,接种于细胞培养瓶中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,常规每 2 天换液 1 次,细胞完全贴壁后用于后续实验。

**2.10.2 CCK-8 法测定细胞活力** 将大鼠软骨细胞消化后重悬计数,以  $3\times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中。细胞贴壁后,加入含不同浓度 (1、5、10、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L) 的 *N*-乙酰基血清素分别培养细胞 24、48、72 h 后 (对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基),加入 10  $\mu$ L CCK-8 工作液,置于细胞培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值,计算细胞活力。

**2.10.3 GSH/GSSG、MDA 和 SOD 水平的检测** 大鼠软骨细胞接种于 6 cm 培养皿,设置对照组、铁死亡诱导剂 RSL3 组和 RSL+*N*-乙酰基血清素 (80、100  $\mu$ mol/L) 组。细胞贴壁后,采用 0.25  $\mu$ mol/L 的 RSL3 诱导软骨细胞发生铁死亡<sup>[15]</sup>,给予 80、100  $\mu$ mol/L 的 *N*-乙酰基血清素干预 24 h 后 (对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基),收集细胞,按照试剂盒说明书测定 GSH/GSSG、MDA 和 SOD 水平。

**2.10.4 Western blotting 检测 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达** 按“2.10.3”项下方法进行分组和给药,收集细胞,加入裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶,于室温封闭 1 h;加入相应一抗,4℃冰箱中孵育过夜;次日,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入相应二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次后,孵育 ECL 工作液,放入显影仪中曝光,保存图片。使用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

## 2.11 统计学分析

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 Graphpad Prism 10.0 软件进行统计分析。两组间差异比较使用独立样本 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

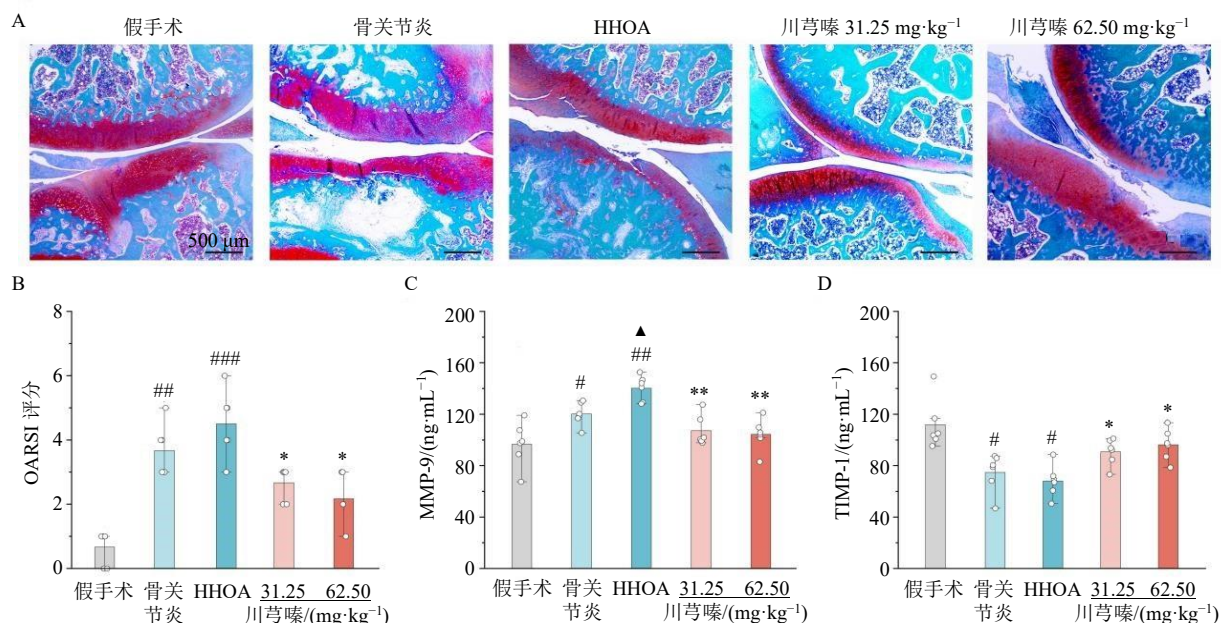
### 3.1 川芎嗪对 HHOA 大鼠关节软骨损伤的影响

番红-O 固绿染色结果(图 1-A)显示,与假手术组比较,骨关节炎和 HHOA 组大鼠的关节软骨均出现明显的病理损伤,OARSI 评分显著升高( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ,图 1-B);与骨关节炎组比较,HHOA

组大鼠的关节软骨病理损伤加重,但 OARSI 评分无统计学差异;而低、高剂量的川芎嗪均可缓解 HHOA 大鼠关节软骨的损伤,OARSI 评分显著降低( $P < 0.05$ )。ELISA 结果(图 1-C、D)显示,与假手术组比较,骨关节炎组和 HHOA 组大鼠血清中 MMP-9 水平明显升高( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),TIMP-1 水平明显降低( $P < 0.05$ );与骨关节炎组比较,HHOA 组大鼠血清中 MMP-9 水平显著升高( $P < 0.05$ ),TIMP-1 水平无统计学差异;与 HHOA 组比较,川芎嗪各剂量组大鼠血清中 MMP-9 水平明显降低( $P < 0.01$ ),TIMP-1 水平明显升高( $P < 0.05$ )。表明高湿环境可通过进一步破坏骨关节炎大鼠关节软骨基质代谢的能力加速软骨退变,而川芎嗪具有缓解 HHOA 模型大鼠关节软骨退变的作用。

### 3.2 川芎嗪对 HHOA 大鼠血清代谢物的影响

对假手术组、HHOA 组和川芎嗪高剂量组大鼠血清样品进行非靶向代谢组学分析。层次聚类分析结果(图 2-A)显示,组内样品表现出较高的相关性,说明样本聚集、重复性好、检测系统稳定。火山图结果显示,HHOA 组与假手术组之间共筛选出 2 695 个差异代谢物,其中 655 个代谢物上调,2 040



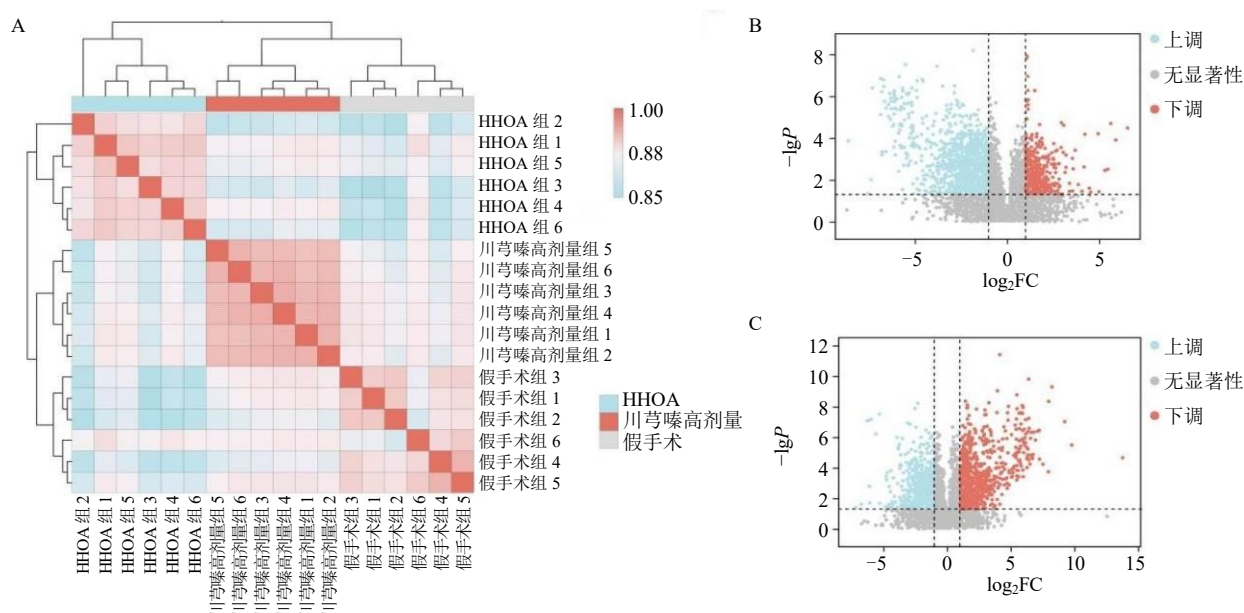
A-各组大鼠关节软骨番红-O 固绿染色结果( $\times 40$ ); B-OARSI 评分; C、D-各组大鼠血清中 MMP-9 和 TIMP-1 水平;与假手术组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ;与 HHOA 组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ;与骨关节炎组比较: ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  ▲▲▲ $P < 0.001$ ,图 6、8 同。

A-Safranin O-fast green staining of articular cartilage in each group ( $\times 40$ ); B-OARSI score; C, D-levels of MMP-9 and TIMP-1 in serum of rats in each group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs sham group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs HHOA group; ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  ▲▲▲ $P < 0.001$  vs osteoarthritis group, same as Figs. 6, 8.

图 1 川芎嗪对 HHOA 模型大鼠关节软骨损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 1 Effect of tetramethylpyrazine on articular cartilage injury in HHOA model rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )





A-聚类分析热图; B-假手术组 vs HHOA 组火山图; C-HHOA 组 vs 川芎嗪高剂量组火山图。

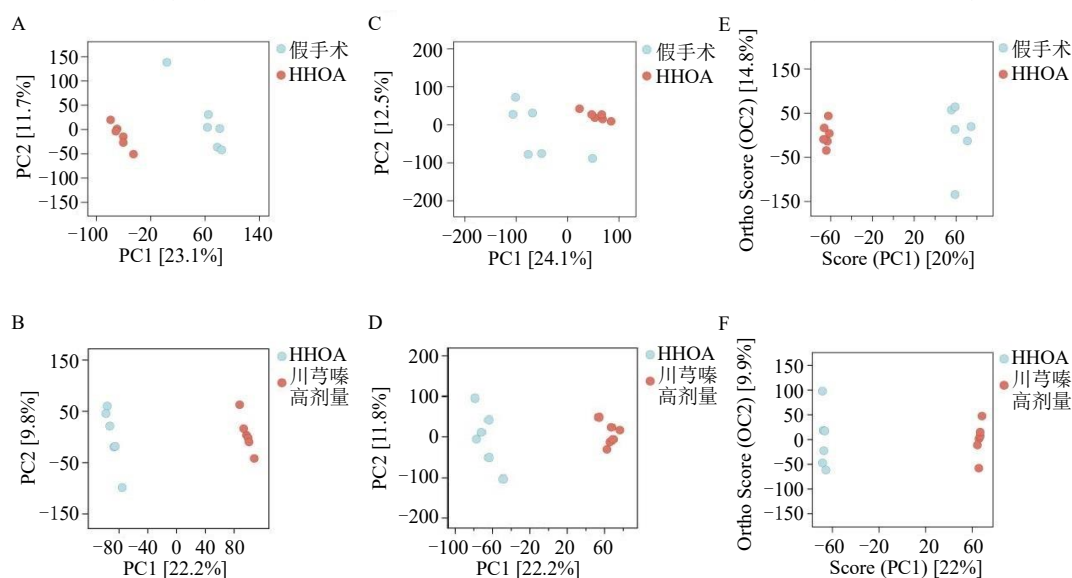
A-heatmap of clustering analysis; B-volcano plot of sham group vs HHOA group; C-volcano plot of HHOA group vs tetramethylpyrazine high-dose group.

图 2 差异代谢物的聚类分析热图和火山图

Fig. 2 Heatmap of clustering analysis and volcano plots of differential metabolites

个代谢物下调, 下调代谢物数量显著高于上调代谢物数量 (图 2-B); 川芎嗪高剂量组与 HHOA 组之间共筛选出 2 846 个差异代谢物, 其中 1 732 个代谢物上调, 1 114 个代谢物下调, 上调代谢物数量高于下调代谢物数量 (图 2-C), 提示川芎嗪能够有效逆转 HHOA 引起的代谢异常。

多元统计分析结果表明, HHOA 组与假手术组在代谢物谱上存在显著差异。主成分分析 (principal components analysis, PCA) 与偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 均显示 2 组样本能够明显区分 (图 3-A、C、E), 提示 HHOA 状态下机体代谢谱发生了显著改



A、C、E-假手术组 vs HHOA 组 PLS-DA、PCA 和 OPLS-DA 图; B、D、F-HHOA 组 vs 川芎嗪高剂量组 PLS-DA、PCA 和 OPLS-DA 图。

A, C, E-PLS-DA, PCA and OPLS-DA plots of sham group vs HHOA group; B, D, F-PLS-DA, PCA and OPLS-DA plots of HHOA group vs tetramethylpyrazine high-dose group.

图 3 各组代谢谱的多元统计分析

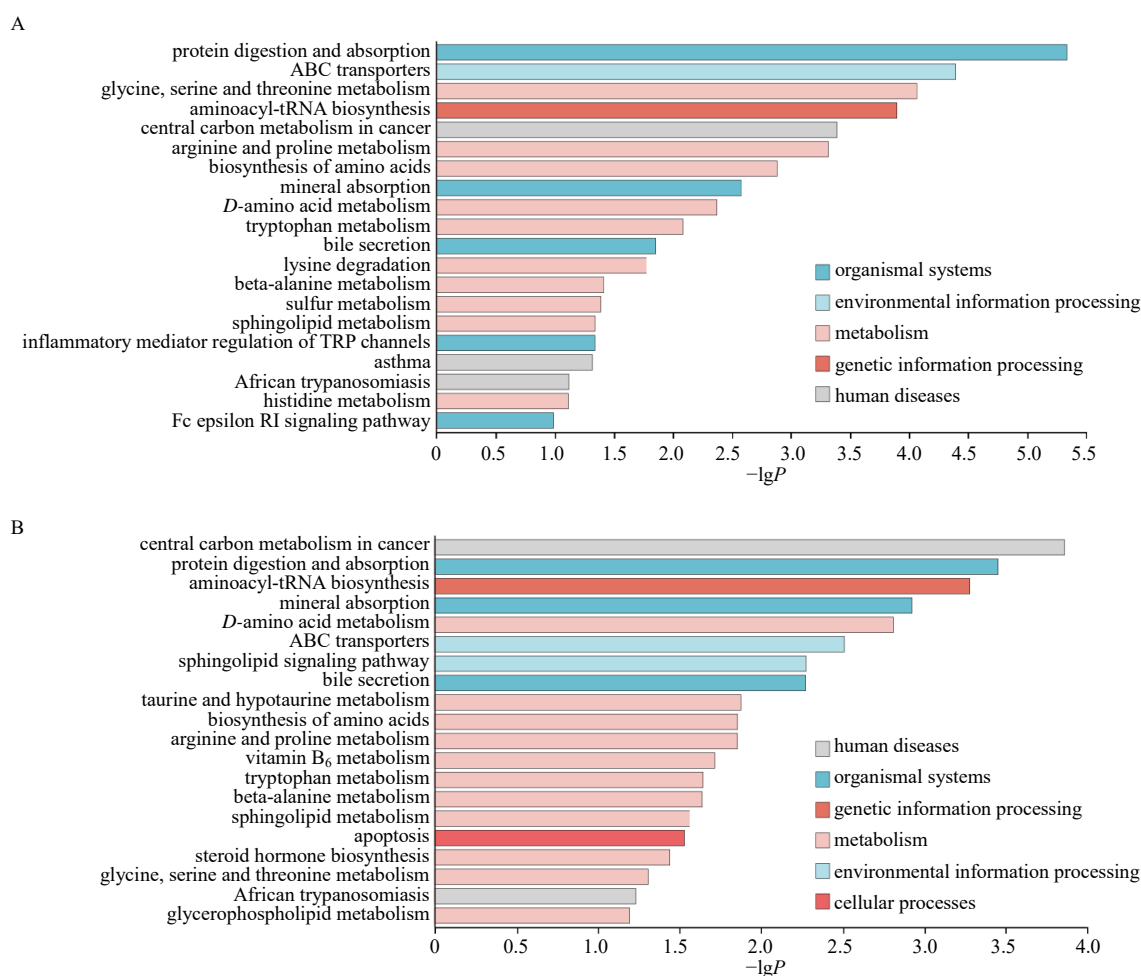
Fig. 3 Multivariate statistical analysis of metabolic profiles in each group

变。进一步分析川芎嗪高剂量组与 HHOA 组的样本,结果显示,川芎嗪干预后,样本在 PCA、PLS-DA 及 OPLS-DA 模型中均能与 HHOA 组形成清晰分离(图 3-B、D、F),表明川芎嗪能够显著改善 HHOA 导致的代谢异常,使代谢谱整体趋于正常。

KEGG 通路富集分析结果显示,HHOA 组与假手术组差异代谢物主要富集于碳代谢、蛋白质消化吸收、氨酰-tRNA 合成、矿物质吸收以及氨基酸代谢等多条代谢通路(图 4-B),提示 HHOA 状态下机体能量代谢及氨基酸代谢紊乱显著。相比之下,川芎嗪高剂量组与 HHOA 组差异代谢物主要富集于蛋白质消化吸收、ABC 转运体、甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢、精氨酸/脯氨酸代谢等通路(图 4-A),其中多条通路与氨基酸代谢及物质转运密切相关。

表明川芎嗪可以通过调控氨基酸代谢与能量代谢通路,改善 HHOA 所致的代谢异常。

利用机器学习方法对差异代谢物进行重要性排序,结果显示在 HHOA 组与假手术组比较中,*N*-乙酰基血清素、乙酰左旋肉碱、己酰肉碱等代谢物具有较高的重要性(图 5-A),提示其可能在 HHOA 的发生发展中发挥关键作用。而在川芎嗪高剂量组与 HHOA 组比较中,二甲基缬氨酸、乙酰左旋肉碱、神经酰胺等代谢物具有较高的重要性(图 5-B),表明川芎嗪可能通过调控上述关键代谢物实现代谢谱的回调。整体结果表明,随机森林模型筛选出的特征代谢物不仅可用于组间鉴别,也为解析川芎嗪治疗 HHOA 的作用机制提供了潜在的生物学标志物。



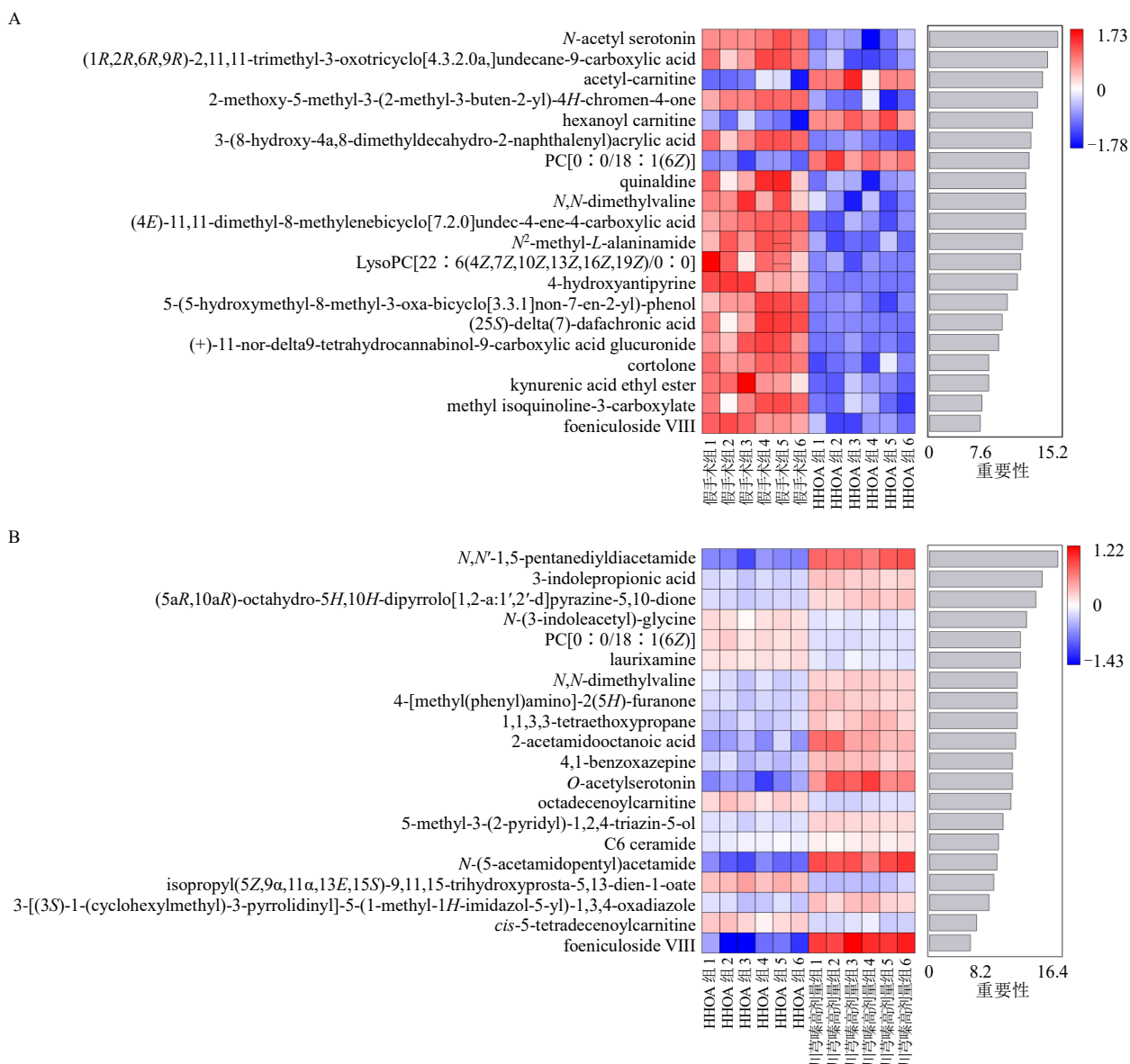
A-HHOA 组 vs 川芎嗪高剂量组差异代谢物通路富集分析; B-假手术组 vs HHOA 组差异代谢物通路富集分析。

A-pathway enrichment analysis of differential metabolites between HHOA group vs tetramethylpyrazine high-dose group; B-pathway enrichment analysis of differential metabolites between sham group vs HHOA group.

图 4 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis





A-假手术组 vs HHOA 组; B-HHOA 组 vs 川芎嗪高剂量组。

A- sham group vs HHOA group; B-HHOA group vs tetramethylpyrazine high-dose group.

图 5 差异代谢物机器学习分析结果

Fig. 5 Machine learning analysis results of differential metabolites

### 3.3 川芎嗪对 HHOA 大鼠关节软骨铁死亡的影响

上述分析发现川芎嗪回调的代谢物中存在部分抗氧化代谢物,如 3-吡啶丙酸、*N*-乙酰基血清素、 $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸。进一步通过定量分析结果(图 6)显示,与假手术组比较,HHOA 组  $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸、3-吡啶丙酸和 *N*-乙酰基血清素的水平均显著降低( $P<0.05$ );与 HHOA 组比较,川芎嗪能够显著提高  $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸、3-吡啶丙酸及 *N*-乙酰基血清素的水平( $P<0.05$ ),表明上述代谢物可能作为高湿环境加速骨关节炎进展的重要生物标志物,其水平

的回调提示川芎嗪通过调控关键代谢物改善 HHOA 相关的代谢紊乱。

有研究发现 *N*-乙酰基血清素是抑制铁死亡的主要代谢物<sup>[16]</sup>。因此,在细胞实验中进一步验证 *N*-乙酰基血清素对软骨细胞铁死亡模型的影响。CCK-8 结果(图 7-A)显示,1~100  $\mu\text{mol/L}$  的 *N*-乙酰基血清素处理大鼠软骨细胞 24、48、72 h 后,细胞活力无明显改变。使用 0.25  $\mu\text{mol/L}$  的 RSL3 诱导软骨细胞发生铁死亡<sup>[15]</sup>,观察 *N*-乙酰基血清素对软骨细胞铁死亡模型中氧化应激和相关蛋白表达的影响。

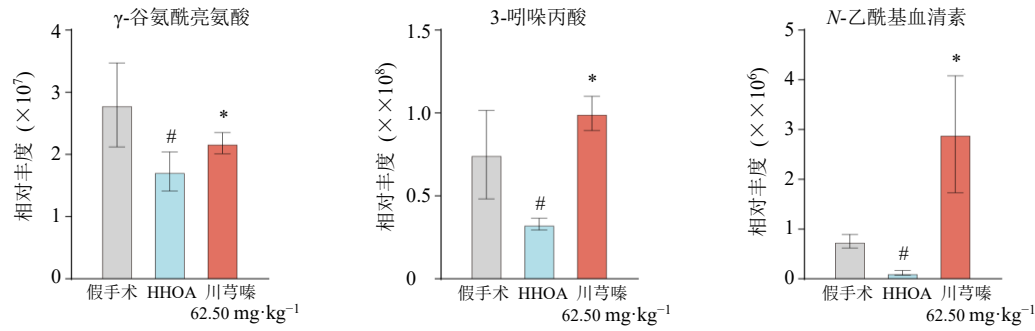
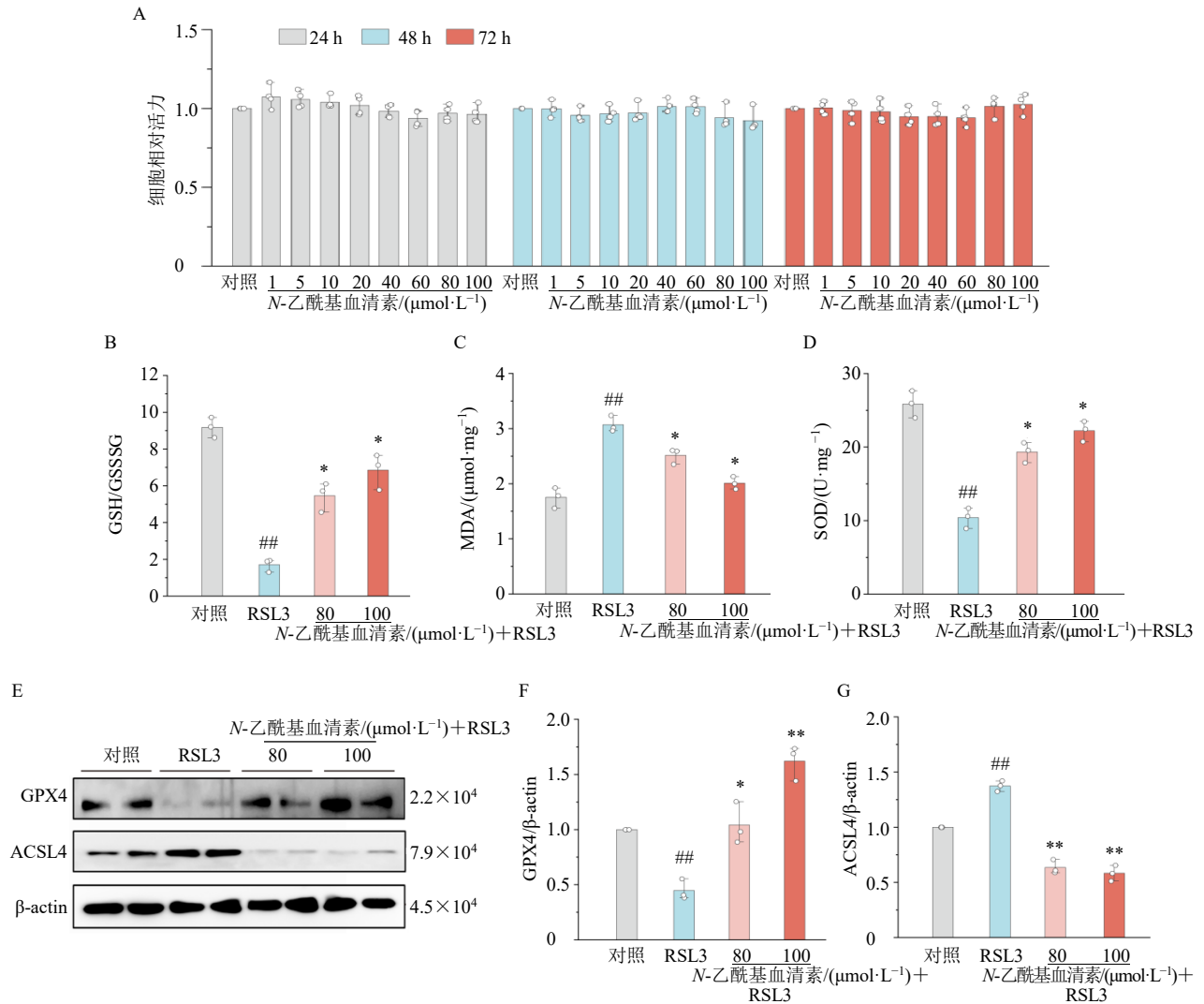


图 6 各组差异代谢物相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Relative expression levels of differential metabolites in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



A-不同浓度的 *N*-乙酰基血清素处理大鼠软骨细胞 24、48、72 h 后, CCK-8 法测定细胞活力; B~D-各组软骨细胞中 GSH/GSSG、MDA 和 SOD 水平; E~G-Western blotting 检测各组 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达; 与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 RSL3 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

A-after treating rat chondrocytes with different concentrations of *N*-acetylserotonin for 24, 48, 72 h, cell viability was measured using CCK-8 method; B—D-levels of GSH/GSSG, MDA and SOD in chondrocytes of each group; E—G-GPX4 and ACSL4 protein expressions in each group detected by Western blotting; <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs RSL3 group.

图 7 *N*-乙酰基血清素对软骨细胞铁死亡模型的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of *N*-acetylserotonin on chondrocytes in a ferroptosis model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

如图 7-B~D 所示,与对照组比较,RLS3 组 GSH/GSSH 值和 SOD 活力明显下降 ( $P<0.01$ ),MDA 水平明显升高 ( $P<0.01$ );与 RLS3 组比较, $N$ -乙酰基血清素 (80、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 GSH/GSSH 值和 SOD 活力明显升高 ( $P<0.05$ ),MDA 水平明显降低 ( $P<0.05$ )。Western blotting 结果 (图 7-E~G) 显示,与对照组比较,RLS3 组 GPX4 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ),ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ );与 RLS3 组比较, $N$ -乙酰基血清素 (80、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 GPX4 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ 、0.01),ACSL4 的表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。表明川芎嗪可能通过上调  $N$ -乙酰基血清素的水平抑制软骨细胞铁死亡,从而发挥对 HHOA 的治疗作用。

因此,进一步检测 HHOA 模型大鼠血清中氧化应激相关指标水平及铁死亡相关蛋白表达水平。

如图 8 所示,与假手术组比较,骨关节炎组和 HHOA 组大鼠血清中 PTGS2 和 MDA 水平明显升高 ( $P<0.05$ 、0.01、0.001),GPX4 水平明显降低 ( $P<0.01$ 、0.001),HHOA 组大鼠血清中 GSH 和 SOD 水平明显降低 ( $P<0.05$ 、0.001);与骨关节炎组比较,HHOA 组大鼠血清中 PTGS2 和 MDA 水平明显升高 ( $P<0.05$ 、0.001),GPX4、GSH 和 SOD 水平明显降低 ( $P<0.05$ );与 HHOA 组比较,川芎嗪低、高剂量组大鼠血清中 PTGS2 和 MDA 水平明显降低 ( $P<0.05$ 、0.01),GPX4、GSH 和 SOD 水平明显升高 ( $P<0.05$ 、0.01)。

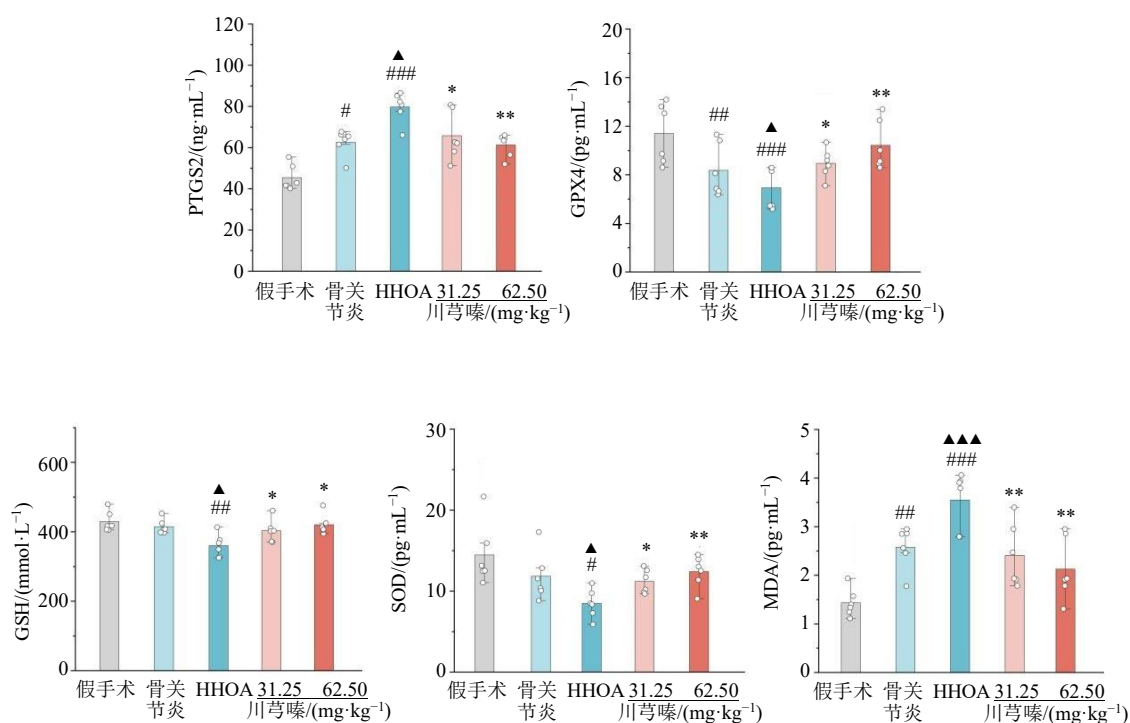


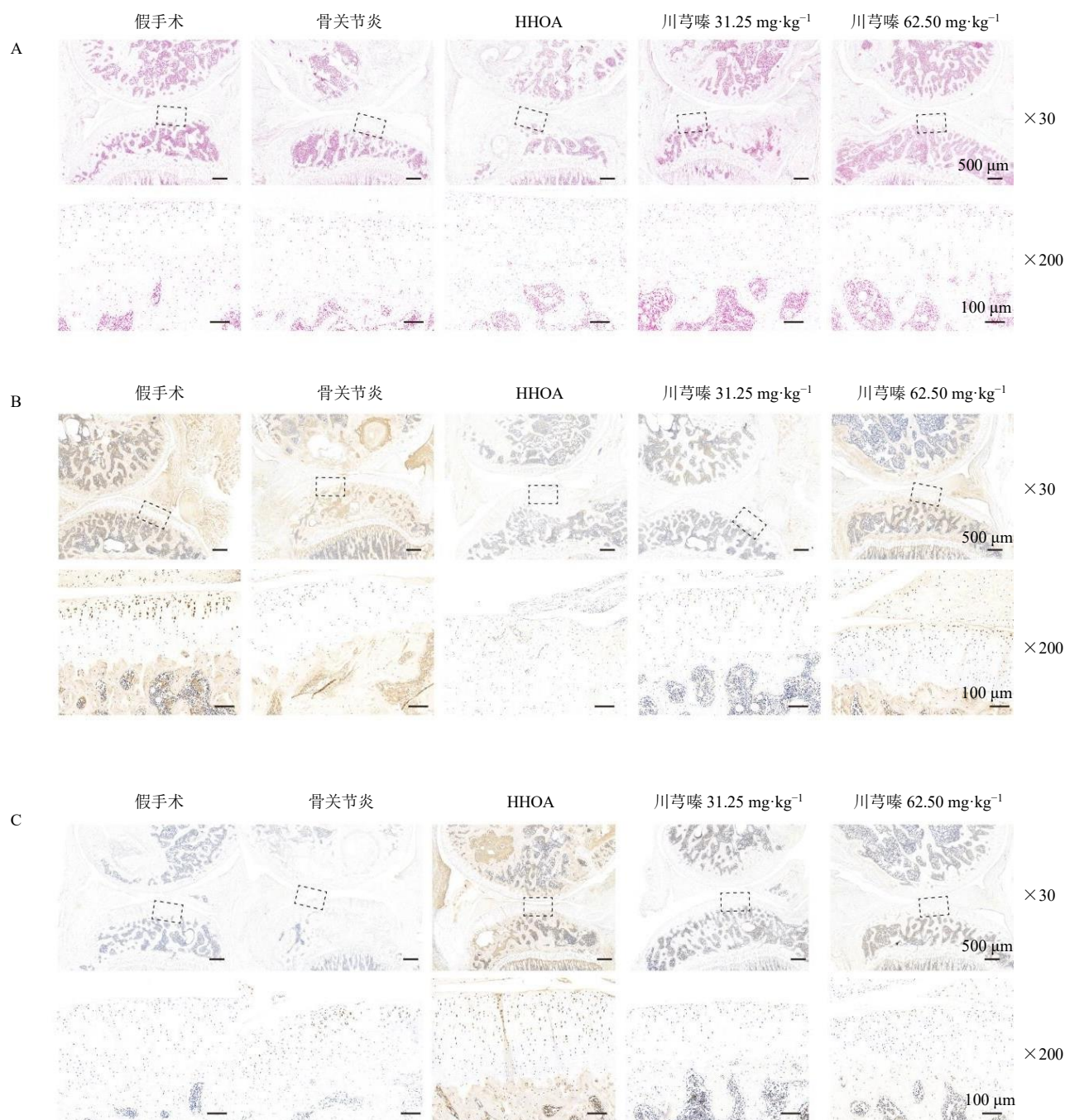
图 8 各组大鼠血清中 PTGS2、GPX4、GSH、SOD 和 MDA 水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 8 Levels of PTGS2, GPX4, GSH, SOD and MDA in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

如图 9-A 所示,与骨关节炎组比较,HHOA 组大鼠关节软骨组织中的铁沉积明显增多;与 HHOA 组比较,川芎嗪低、高剂量组软骨组织中铁离子沉积明显减少。免疫组化结果 (图 9-B、C) 显示,与 HHOA 组比较,川芎嗪低、高剂量组软骨组织中 GPX4 阳性表达增加,ACSL4 阳性表达减少,表明川芎嗪可能通过减少 HHOA 大鼠关节软骨中的铁离子沉积,并通过调节 GPX4/ACSL4 的抗氧化防御机制,抑制铁死亡过程,进而发挥保护软骨的作用。

#### 4 讨论

骨关节炎在世界范围内的发病率呈增长趋势,而高湿环境是诱发骨关节炎的常见外在因素,湿证型膝关节骨关节炎是一种极其复杂的滑膜全关节疾病,其发生发展机制尚未完全明确<sup>[17]</sup>。潮湿环境会引起小鼠体内 MDA 水平升高,SOD 活性和 GSH 水平降低,导致机体过氧化与抗氧化之间的平衡失调,造成脂质过氧化损伤<sup>[4]</sup>。铁在生物体内参与许多生物过程,是机体必须的成分,但当机体内出现



A-各组大鼠关节软骨普鲁士蓝染色；B、C-免疫组化检测各组大鼠关节软骨中 GPX4、ACSL4 蛋白表达。

A-Prussian blue staining of articular cartilage of rats in each group; B, C-GPX4 and ASCL4 protein expressions in articular cartilage of rats in each group detected by immunohistochemistry.

图 9 各组大鼠关节软骨组织中铁沉积以及铁死亡相关蛋白表达

Fig. 9 Iron deposition and ferroptosis-related protein expressions in articular cartilage tissues of rats in each group

过量铁或铁负荷可诱导脂质过氧化物在细胞膜上的毒性积累，引起细胞发生铁依赖调节性细胞死亡，加剧炎症反应，最终诱发细胞损伤和铁死亡<sup>[18-19]</sup>。研究发现，骨关节炎患者软骨中出现明显的脂质过氧化物的积累，并伴有铁死亡的特征<sup>[15]</sup>；而且膝

关节骨关节炎患者中滑膜铁超载的程度与骨关节炎滑膜炎的严重程度呈正相关<sup>[20]</sup>。因此，高湿环境导致的代谢异常引起的脂质过氧化损伤可能是导致骨关节炎软骨细胞铁死亡的主要因素。研究表明，艾灸联合川芎嗪治疗可有效控制寒湿凝滞型慢



性盆腔炎的感染状况<sup>[21]</sup>；川芎嗪可调节铁调素-膜转运蛋白信号，降低铁调素的表达水平，减少内皮细胞铁沉积<sup>[22]</sup>，表明川芎嗪可能是治疗湿证型骨关节炎的潜在药物。本研究构建了高湿环境下的大鼠骨关节炎模型，并评估了川芎嗪对 HHOA 大鼠关节软骨的影响。番红 O-固绿染色结果显示，骨关节炎组可见明显软骨退变，基质染色减弱、缺失区明显；HHOA 组软骨退变进一步加重；给予川芎嗪干预后，HHOA 大鼠软骨基质染色显著恢复，其中高剂量组尤为明显，提示川芎嗪在软骨保护与修复中发挥了显著作用。MMP 是一类锌依赖性蛋白水解酶，可裂解细胞外基质蛋白，其中 MMP-9 在膝关节骨关节炎中表达上调，参与细胞外基质降解，并促进白细胞介素-1 等炎症因子的释放及趋化过程的调控<sup>[23]</sup>。TIMP 是控制 MMP 活性的一种内源性抑制剂，可通过调控细胞功能抑制细胞外基质降解<sup>[24]</sup>。本研究结果显示，川芎嗪能够回调 HHOA 大鼠血清中 MMP-9 和 TIMP-1 的水平，表明川芎嗪可通过调控软骨基质代谢平衡，从而发挥保护高湿环境下骨关节炎模型关节软骨的作用。

为进一步阐释川芎嗪延缓 HHOA 关节软骨退变的作用机制，本研究开展了血清非靶向代谢组学分析。代谢组学分析结果显示，HHOA 组与假手术组在代谢物谱上存在显著差异，主要以下调代谢物为主，而川芎嗪干预后多数代谢物呈上调趋势。KEGG 通路富集结果提示差异代谢物主要涉及氨基酸和能量代谢通路。进一步筛选出 *N*-乙酰基血清素、 $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸和 3-吡啶丙酸等关键代谢物水平在 HHOA 组显著下降，经川芎嗪干预后明显升高。其中 3-吡啶丙酸是一种由肠道细菌产生的色氨酸代谢物，是一种强效的神经保护抗氧化剂，可清除羟基自由基<sup>[25]</sup>；高浓度  $\gamma$ -谷氨酰亮氨酸也与氧化应激有关<sup>[26]</sup>；*N*-乙酰基血清素是血清素在内源性产生褪黑素过程中天然存在的化学中间体，具有抗氧化作用<sup>[27]</sup>。基于 *N*-乙酰基血清素在抗氧化和铁死亡调控中的关键作用，进一步研究 *N*-乙酰基血清素发挥保护软骨细胞的作用机制。结果显示，在 RSL3 诱导的软骨细胞铁死亡模型中，*N*-乙酰基血清素能显著改善氧化应激指标，升高 GSH/GSSG 值和 SOD 活性，降低 MDA 水平，并能上调 GPX4 蛋白表达和下调 ACSL4 蛋白表达。表明 *N*-乙酰基血清素可通过调节 GPX4/ACSL4 轴的抗氧化系统，抑制脂质过氧化，调控铁死亡相关蛋白表达，从而对软骨细

胞铁死亡起到抑制作用。

铁死亡由铁过载和脂质过氧化引起，脂质过氧化可产生多种过氧化产物，其中 MDA 为脂质过氧化的生物标志物<sup>[28]</sup>。ACSL4 是一种脂质代谢酶，为脂质过氧化所必需，能够促进细胞的铁死亡<sup>[29]</sup>。而 GSH 可作为多种抗氧化蛋白辅助因子进行抗氧化作用，去除活性氧<sup>[30]</sup>。半胱氨酸不足可诱导一种铁依赖性细胞死亡，即铁死亡，而铁死亡保护途径包括 GSH 依赖性和非 GSH 依赖性，保护细胞免受膜脂质过氧化<sup>[31]</sup>。课题组前期研究发现，川芎嗪可通过上调软骨下骨中 miR-20b 表达水平抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达，同时激活骨形态发生蛋白 2/SMAD 家族成员 1 (bone morphogenetic protein 2/SMAD Family member 1, BMP2/Smad1) 信号通路，从而实现修复骨关节炎模型大鼠损伤的关节软骨的作用<sup>[9]</sup>；川芎嗪也可通过抑制滑膜、软骨及软骨下骨中 VEGF/Notch 受体 1 (Notch receptor 1, Notch1) 信号通路介导的血管新生，改善多方面的组织表现，从而减缓早期骨关节炎的进展<sup>[10]</sup>。然而关于川芎嗪对湿证型骨关节炎关节软骨的保护机制尚不明确。本研究发现川芎嗪可上调 HHOA 模型中抗氧化损伤的代谢物水平。研究发现川芎嗪可通过调节铁代谢平衡，降低脊髓组织的铁含量，抑制神经细胞铁死亡，发挥神经保护作用<sup>[32-33]</sup>；也有研究发现中药复方可以通过增强线粒体自噬，改善铁死亡，抑制炎症反应等实现对骨关节炎的治疗作用<sup>[34]</sup>。因此，本研究进一步探索了川芎嗪对 HHOA 模型关节软骨氧化损伤和铁死亡的影响。结果显示，川芎嗪能够通过降低 PTGS2、MDA 水平，并升高 GPX4、SOD 和 GSH 水平，有效缓解氧化应激，从而增强软骨细胞的抗氧化防御能力。普鲁士蓝染色结果显示，HHOA 大鼠的关节软骨中铁离子沉积明显增多，川芎嗪处理可有效减少 HHOA 大鼠关节软骨中过量铁离子的沉积。免疫组化结果进一步证实，川芎嗪能够显著增加关节软骨 GPX4 蛋白表达，并减少 ACSL4 蛋白表达。上述结果表明，高湿环境可能通过增强骨关节炎大鼠关节软骨的铁离子沉积，加速软骨细胞铁死亡，而川芎嗪通过降低软骨组织中的铁沉积并调节 GPX4/ACSL4 轴的抗氧化防御途径，从而抑制 HHOA 大鼠软骨细胞的铁死亡进程。

综上，本研究通过体内外实验结合血清非靶向代谢组学的方法，研究川芎嗪延缓 HHOA 进展的作



用机制。发现高湿环境可能通过改变机体的代谢物,促进关节软骨中铁离子沉积,加速骨关节炎软骨细胞的铁死亡;而川芎嗪能够通过改善 HHOA 模型的代谢物谱及降低铁离子沉积,调节 GPX4/ACSL4 依赖的抗氧化防御,缓解氧化应激并抑制软骨细胞铁死亡,从而发挥保护 HHOA 大鼠关节软骨的作用。提示川芎嗪在湿证型骨关节炎中具有一定应用潜力,后续可在更大样本及临床人群中进一步验证关键代谢通路和指标,并优化给药方案与联合治疗策略,以推动川芎嗪在湿证型骨关节炎中的规范化和精准应用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中华中医药学会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南 (2023 年版) [J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
- [2] 刘朝晖, 马剑雄, 张顺, 等. 膝骨关节炎的现状与治疗方法的研究进展 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2020, 13(8): 688-693.
- [3] Yao Q, Wu X H, Tao C, *et al.* Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 56.
- [4] 赵丽, 刘波, 张效莉. 外湿对正常小鼠过氧化与抗氧化影响的实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 211-212.
- [5] Zaloga G P. Narrative review of *n*-3 polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 662.
- [6] 高欢欢, 薛志鹏, 李泰贤, 等. 治疗膝骨关节炎的中成药的组方规律分析 [J]. 中国药房, 2019, 30(15): 2096-2100.
- [7] 姜宇懋, 王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1364-1370.
- [8] 梁桂洪, 曾令烽, 潘建科, 等. 川芎嗪干预骨性关节炎的机制研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6228-6232.
- [9] 梁桂洪, 梁祖建, 谢平金, 等. 川芎嗪对膝骨性关节炎大鼠软骨下骨中 miR-20b/VEGF 和 BMP2/Smad1 通路的影响 [J]. 中国药房, 2019, 30(4): 448-453.
- [10] 谢平金, 罗臻, 卢启贵, 等. 川芎嗪和过表达 miR-20b-5p 干预早期膝骨关节炎模型大鼠滑膜、软骨和软骨下骨血管新生的组织学变化 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(2): 237-245.
- [11] 吴恩慧, 章建华, 张琳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术研究淫羊藿-川芎对骨关节炎大鼠的调控作用 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7445-7454.
- [12] 刘鸿达, 孔玲, 孙晖, 等. 方证代谢组学理论及方法的形成和发展 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2629-2637.
- [13] Wang W K, Yang L, Li W H, *et al.* Multi-omics driven paradigm for construction of traditional Chinese medicine Zheng (syndrome) diagnosis and treatment model, taking Shi Zheng (syndrome of dampness) as an example [J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 33.
- [14] 孙野, 杨乐, 王文凯, 等. 基于方证代谢组学的三妙丸干预湿热下注型痛风的药效物质基础研究 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2709-2724.
- [15] Dai T M, Xue X, Huang J, *et al.* SCP2 mediates the transport of lipid hydroperoxides to mitochondria in chondrocyte ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 234.
- [16] Cheng Y, Gao Y, Li J, *et al.* TrkB agonist *N*-acetylserotonin promotes functional recovery after traumatic brain injury by suppressing ferroptosis via the PI3K/Akt/Nrf2/Ferritin H pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 194: 184-198.
- [17] 康俊峰, 茆军, 揭立士, 等. 王培民教授从寒湿致病探讨膝骨关节炎病机及辨治经验 [J]. 现代中医药, 2025, 45(2): 72-76.
- [18] Co H K C, Wu C C, Lee Y C, *et al.* Emergence of large-scale cell death through ferroptotic trigger waves [J]. *Nature*, 2024, 631(8021): 654-662.
- [19] Ru Q, Li Y S, Chen L, *et al.* Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: Mechanisms and therapeutic prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 271.
- [20] Jin Z Z, Zhang H, Bai L H, *et al.* Synovium is a sensitive tissue for mapping the negative effects of systemic iron overload in osteoarthritis: Identification and validation of two potential targets [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 661.
- [21] 农贤刚, 程卫萍. 艾灸配合川芎嗪治疗寒湿凝滞型慢性盆腔炎疗效及对 CRP、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 387-389.
- [22] Sun M Y, Zhang M, Chen S L, *et al.* The influence of hyperlipidemia on endothelial function of FPN1 tek-cre mice and the intervention effect of tetramethylpyrazine [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1): 119-128.
- [23] Kobayashi T, Kim H, Liu X D, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- $\beta$  and stimulates fibroblast contraction of collagen gels [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(11): L1006-L1015.
- [24] Stetler-Stevenson W G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: Metalloproteinase-independent biological activities [J]. *Sci Signal*, 2008, 1(27): re6.

- [25] Cao B, Zhao R Y, Li H H, *et al.* Oral administration of asparagine and 3-indolepropionic acid prolongs survival time of rats with traumatic colon injury [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 37.
- [26] Metrustry S J, Karhunen V, Edwards M H, *et al.* Metabolomic signatures of low birthweight: Pathways to insulin resistance and oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194316.
- [27] Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic *O*-methylation of *N*-acetylserotonin to melatonin [J]. *Science*, 1960, 131(3409): 1312.
- [28] Zhang X, Hou L C, Guo Z, *et al.* Lipid peroxidation in osteoarthritis: Focusing on 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 320.
- [29] Zhang H L, Hu B X, Li Z L, *et al.* PKC $\beta$ II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.
- [30] Harris I S, DeNicola G M. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 440-451.
- [31] Gao M H, Yi J M, Zhu J J, *et al.* Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363.
- [32] Liu G, Deng B W, Huo L Y, *et al.* Tetramethylpyrazine alleviates ferroptosis and promotes functional recovery in spinal cord injury by regulating GPX4/ACSL4 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 977: 176710.
- [33] Zhu Z Q, Li J, Song Z Y, *et al.* Tetramethylpyrazine attenuates renal tubular epithelial cell ferroptosis in contrast-induced nephropathy by inhibiting transferrin receptor and intracellular reactive oxygen species [J]. *Clin Sci*, 2024, 138(5): 235-249.
- [34] 王丽娟, 孟美辰, 王志远, 等. 基于网络药理学探讨金藤清痹颗粒对大鼠膝关节炎的影响及与促进线粒体自噬改善铁死亡的相关性 [J]. *中草药*, 2025, 56(4): 1244-1253.

[责任编辑 李亚楠]