

基于网络药理学及体外实验探讨梓醇激活 AMPK 抑制脂多糖诱导软骨细胞焦亡的作用机制

吴昱宸^{1,2,3,5}, 林郁桐^{1,2,3,5}, 肖嘉聪^{1,2,3,5}, 王厚元^{1,2,3}, 安彦超^{1,2,3}, 王海彬^{1,2,3,4,5}, 何健东^{1,2,4*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405
2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405
3. 广州中医药大学 岭南医学研究中心, 广东 广州 510405
4. 广州中医药大学第一附属医院 骨伤中心, 广东 广州 510405
5. 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510405

摘要: 目的 探讨梓醇对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的软骨细胞炎症损伤、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 代谢失衡及细胞焦亡的影响, 并探讨其与腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 信号轴的关系。方法 通过网络药理学筛选梓醇、膝骨关节炎与细胞焦亡的交集靶点并进行富集分析。采用 LPS 建立炎症损伤并诱导焦亡模型, 给予梓醇 (20、50 μ mol/L) 预处理 1 h, Western blotting 检测 ECM 相关蛋白 II 型胶原 α 1 链 (collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)、聚集蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN)、基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3, MMP3) 和 MMP13 及 AMPK/NF- κ B/NLRP3 信号轴关键蛋白表达; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放实验评估细胞膜完整性相关损伤; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 水平; qRT-PCR 检测 *NLRP3*、*IL-1 β* 、*IL-6* 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) 的 mRNA 表达。以半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 抑制剂 VX-765 为阳性对照, 并采用 AMPK 抑制剂 Compound C 进一步验证机制。结果 与对照组比较, LPS 刺激可诱导 ECM 合成下降、分解增强, 并显著激活 NLRP3 相关焦亡通路 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 梓醇可显著上调 COL2A1、ACAN 表达并下调 MMP3、MMP13 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 同时显著降低 LDH、IL-1 β 与 IL-18 的释放 ($P < 0.01$ 、 0.001), 并抑制 NLRP3、cleaved Caspase-1 及消皮素 D 的 N 端片段 (N-terminal fragment of gasdermin D, GSDMD-N) 等焦亡相关指标 ($P < 0.05$ 、 0.001); 此外, 梓醇可显著上调 p-AMPK/AMPK 及磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (phosphorylated acetyl-CoA carboxylase, p-ACC) /ACC 表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 并下调 p-p65/p65 表达 ($P < 0.001$), 同时下调 *NLRP3*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 炎症相关基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。AMPK 抑制剂 Compound C 可部分逆转梓醇的上述作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 梓醇可能通过激活 AMPK 并促进下游 ACC 磷酸化, 抑制 NF- κ B/NLRP3 相关通路, 从而保护软骨细胞基质稳态。

关键词: 梓醇; 软骨细胞; 细胞焦亡; AMPK; 膝骨关节炎; NF- κ B/NLRP3 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5095-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.013

Mechanism of catalpol against lipopolysaccharide-induced chondrocyte pyroptosis via AMPK activation based on network pharmacology and *in vitro* experiments

WU Yuchen^{1,2,3,5}, LIN Yutong^{1,2,3,5}, XIAO Jiacong^{1,2,3,5}, WANG Houyuan^{1,2,3}, AN Yanchao^{1,2,3}, WANG Haibin^{1,2,3,4,5}, HE Jiandong^{1,2,4}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
2. The First Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

收稿日期: 2026-02-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82575094); 广东省自然科学基金面上项目 (2024A1515012062); 中医证候全国重点实验室项目 (SLKY2025A0002); 广州中医药大学 2025 年校级“揭榜挂帅”研究生创新能力提升项目 (A3-0317-25-429-008)

作者简介: 吴昱宸 (2001—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医治疗骨与关节疾病。E-mail: 1572806414@qq.com

*通信作者: 何健东, 男, 博士, 副主任医师。E-mail: hjd198528@qq.com

3. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
4. Orthopedic Center, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
5. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To investigate the effect of catalpol on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury, extracellular matrix (ECM) metabolic dysregulation and pyroptosis in chondrocytes, and to explore whether these effects involve the AMP-activated protein kinase (AMPK)/nuclear factor- κ B (NF- κ B)/NOD like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) signaling axis. **Methods** Network pharmacology was used to screening the intersection targets of catalpol, knee osteoarthritis and pyroptosis and enrichment analysis were performed. LPS was used to establish an inflammatory injury and induce pyroptosis model, followed by pretreatment with catalpol (20, 50 μ mol/L) for 1 h. Protein expressions of collagen type II alpha 1 chain (COL2A1), aggrecan (ACAN), matrix metalloproteinase 3 (MMP3), MMP13 and key molecules in AMPK/NF- κ B/NLRP3 signaling axis were detected by Western blotting. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay was performed to assess cell membrane integrity-related injury. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 in supernatants were detected by ELISA. The mRNA levels of *NLRP3*, *IL-1 β* , *IL-6* and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) were detected by qRT-PCR. The cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1) inhibitor VX-765 was used as a positive control, the mechanism was further validated using AMPK inhibitor Compound C. **Results** Compared with control group, LPS stimulation could induce a decrease in ECM synthesis and an increase in ECM decomposition, significantly activate the NLRP3 related pyroptosis pathway ($P < 0.001$). Compared with model group, catalpol could significantly upregulate the expressions of COL2A1, ACAN and downregulate the expressions of MMP3, MMP13 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while significantly reduce the release of LDH, IL-1 β and IL-18 ($P < 0.01, 0.001$), and inhibit NLRP3, cleaved Caspase-1, N-terminal fragment of gasdermin D (GSDMD-N) and other pyroptosis related indicators ($P < 0.05, 0.001$). In addition, catalpol could significantly upregulate the expressions of p-AMPK/AMPK and phosphorylated acetyl CoA carboxylase (p-ACC)/ACC ($P < 0.05, 0.001$), and downregulate the expression of p-p65/p65 ($P < 0.001$), while downregulate the expressions of *NLRP3*, *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* inflammation related genes ($P < 0.05, 0.001$). AMPK inhibitor Compound C could partially reverse the above-mentioned effects of catalpol ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Catalpol may protect the matrix homeostasis of chondrocytes by activating AMPK and promoting downstream ACC phosphorylation, inhibiting NF- κ B/NLRP3 related pathways.

Key words: catalpol; chondrocytes; pyroptosis; AMPK; knee osteoarthritis; NF- κ B/NLRP3 pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是中老年人群中负担最重的退行性关节疾病之一, 临床多以持续或反复的膝痛、晨僵、活动后加重、功能受限为主要表现^[1], 可显著降低活动能力并增加致残风险, 进而带来严重的公共卫生与社会经济负担^[2]。KOA 并非单一“软骨磨损”, 更涉及膝关节整体结构的改变: 软骨基质退变与丢失、滑膜慢性炎症反应、软骨下骨重塑异常以及骨赘形成等^[1,3-4]。近年来, 相关研究也更强调“全关节器官”视角: 长期低度炎症与多种受调控的细胞死亡共同参与 KOA 进展, 使关节处于持续的炎症——分解代谢微环境中^[5-6], 因此, 单纯依赖镇痛、抗炎等对症手段虽可缓解症状, 但对阻断疾病演进与组织结构破坏的效果仍有限, 寻找可干预的关键炎症通路及细胞死亡环节具有现实意义。

细胞焦亡是一类由炎症小体如 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 驱动的溶解性程序性细胞死亡方式^[7-9], 典型特征为炎症小体组装后促使半胱氨

酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 活化, 裂解并激活焦亡执行蛋白消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 形成膜孔, 从而诱导细胞肿胀破裂并促进白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18 等促炎因子成熟与释放^[10-13], 进而放大局部炎症并加重组织损伤。在 KOA 相关研究中, NLRP3/Caspase-1/GSDMD 轴被反复报道与软骨细胞炎症损伤、滑膜细胞促炎表型及关节退变程度相关; 抑制该轴可在一定程度上减轻软骨基质降解与滑膜炎症反应, 提示以 NLRP3 炎症小体为核心的焦亡过程可能是推动 KOA 关节破坏的重要环节之一^[7-9,14-15]。

腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是细胞内重要的能量感受器, 在维持葡萄糖和脂质代谢稳态的同时, 对核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、NLRP3 等炎症通路具有负向调控作用。研究发现, AMPK 活性下降与软骨细胞炎症反应、代谢紊乱及焦亡水平升高密切相关^[16-18]。线性泛素化激活肝激酶 B1 (liver kinase B1,

LKB1)-AMPK 通路可显著抑制 NLRP3 炎症小体反应,减少软骨细胞焦亡,从而减轻骨关节炎样软骨损伤^[19];相反,抑制 AMPK 会加重 NLRP3 依赖的焦亡和基质破坏^[12,20]。以上研究提示“AMPK-NF- κ B/NLRP3-焦亡轴”可能是连接代谢应激与炎症损伤的关键枢纽,是 KOA 干预的潜在重要靶点。

梓醇是地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 中的代表性环烯醚萜苷类成分,具有较好的口服安全性及多靶点药理活性,在抗炎、抗氧化、抗凋亡、神经保护等方面均有报道。骨关节炎领域的研究表明,梓醇可显著抑制 IL-1 β 诱导的大鼠软骨细胞炎症反应,下调基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3, MMP3)、MMP13 等分解酶表达,减少细胞凋亡并抑制细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解,其作用与抑制 NF- κ B 通路活化存在关联;在 ATDC5 软骨样细胞和 KOA 大鼠模型中,梓醇同样表现出缓解氧化应激和软骨退变的作用,提示梓醇具有一定的软骨保护潜力^[21-24]。此外,在神经炎症与抑郁样行为等模型中,梓醇通过抑制 NF- κ B/NLRP3 炎症小体下调 NLRP3、凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1 以及 IL-1 β 、IL-18 表达的证据不断积累,提示其具备干预“炎症小体-焦亡”链条的潜在能力。然而,现有关于梓醇防治 KOA 的研究多聚焦于其抑制 NF- κ B 介导的炎症和基质分解,对梓醇是否能够调控软骨细胞 NLRP3 炎症小体介导的焦亡以及这种作用是否依赖 AMPK 激活,尚缺乏直接证据。基于上述背景,本研究拟在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的软骨细胞模型中,系统评价梓醇对软骨细胞 ECM 稳态和细胞焦亡的影响,并重点观察其对 AMPK 及 NF- κ B/NLRP3 信号轴关键分子表达及活化状态的调控作用,旨在从“AMPK 激活-NF- κ B/NLRP3 炎症小体-细胞焦亡”信号轴角度阐明梓醇改善 KOA 软骨细胞炎症损伤的新机制,为后续靶向干预策略与相关药物开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

原代软骨细胞来源于 SPF 级新生 SD 大鼠,购自广州中医药大学,生产许可证号 SCXK(粤)2023-0068,动物饲养于动物生物安全二级实验室。本研究经广州中医药大学伦理委员会批准(批准号 GZTCMF1-20250159)。

1.2 药品与试剂

梓醇(质量分数为 99.98%,货号 HY-N0820)购自美国 MedChemExpress 公司;LPS(货号 L2630)、AMPK 抑制剂 Compound C(货号 P5499)、Caspase-1 抑制剂 VX-765(货号 5313720001)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA(货号 25200056)、II 型胶原酶(货号 17101015)购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒(货号 CK04)购自日本 Dojindo Laboratories 公司;RIPA 裂解液(货号 P0013B)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号 P0012)、ECL 化学发光试剂盒(货号 P0018M)、TRIzol 试剂(货号 R0016)、反转录试剂盒(货号 D7180M)、SYBR Green qPCR Master Mix(货号 D7262)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(货号 C0016)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 货号 C1006)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;阿利新蓝染色液(货号 G1565)、甲苯胺蓝染色液(货号 G2543)、IL-1 β ELISA 试剂盒(货号 SEKM-0002)、IL-18 ELISA 试剂盒(货号 SEKM-0019)购自北京索莱宝科技有限公司;AMPK 抗体(货号 2532)、p-AMPK 抗体(货号 2535)、p-p65 抗体(货号 3033)、Caspase-1 抗体(货号 2225)、p65 抗体(货号 8242)、 β -actin 抗体(货号 8457)购自美国 CST 公司;II 型胶原 α 1 链(collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)抗体(货号 PA5-99159)、NLRP3 抗体(货号 MA5-23919)、cleaved Caspase-1 抗体(货号 PA5-99390)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;GSDMD 抗体(货号 ab219800)、GSDMD-N 抗体(货号 ab215203)、聚集蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)抗体(货号 ab315486)、MMP3 抗体(货号 ab52915)、MMP13 抗体(货号 ab39012)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号 ab205718)、免疫荧光二抗(货号 ab150073)购自英国 Abcam 公司;核因子- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B alpha, I κ B α)抗体(货号 80019-1-RR)购自武汉三鹰生物技术有限公司;乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)抗体(货号 AF6421)、p-ACC 抗体(货号 AF3421)购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 网络药理学数据库

TCMSP 数据库(<https://www.tcmsp-e.com/index.php>); SwissTargetPrediction 平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PharmMapper 平台(<http://www.pharmmapper.org/>)

www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>); Venny2.1.0 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) ; STRING 数据库 (<https://string-db.org/>); DAVID 平台 (<https://david.ncifcrf.gov/>); CNSknowall 平台 (<https://t.cnsknowall.com/#/HomePage>)。

1.4 仪器

Forma Series 3 型水套式 CO₂ 培养箱、Multiskan GO 型全波长酶标仪、Applied Biosystems 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMI3000 B 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); ChemiDoc MP 型全能型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Cytation 5 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学靶点预测与分析

以“catalpol”为关键词,在 PubChem 数据库获取其理化性质及 2D 结构信息,并在 TCMSP 数据库中查询梓醇的药动学参数。既往网络药理学研究在 TCMSP 数据库筛选活性成分时常采用口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 与类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为候选化合物初筛阈值,考虑到梓醇在 TCMSP 数据库中 DL 值满足常用纳入阈值且已有明确药理活性证据,本研究未将 OB 作为排除条件,仍将梓醇纳入后续靶点预测与网络构建。随后将梓醇结构分别导入 SwissTargetPrediction、PharmMapper 平台中进行逆向靶点预测,并统一映射成 HGNC 标准基因符号,疾病相关靶点通过 GeneCards 与 OMIM 数据库检索“knee osteoarthritis”“pyroptosis”等关键词获得,并与药物候选靶点取交集,作为后续蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 与富集分析中输入基因集。

将交集导入 STRING 数据库构建 PPI 网络,物种设为 *Homo sapiens*,最小互作置信度为 0.4^[25]。所得 PPI 网络导入 Cytoscape 软件进行可视化,并采用 CytoNCA 插件计算介数中心性 (betweenness centrality, BC)、紧密中心性 (closeness centrality, CC)、度中心性 (degree centrality, DC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、网络中心性 (network centrality, NC) 及局部平均连通性 (local average connectivity, LAC) 6 项拓扑参数^[26]。以各

指标中位数作为筛选阈值进行 2 轮筛选,最终获得核心靶点网络。

将交集靶点集在 DAVID 数据库中进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为显著阈值,筛选与炎症反应、细胞死亡及基质代谢相关的条目用于构建“成分-靶点-通路”整合网络并指导后续实验验证指标的选择。

2.2 原代大鼠软骨细胞的分离、培养与鉴定

取 5 日龄新生 SD 大鼠双侧膝关节软骨组织, PBS 冲洗后去除血迹与杂质,剪碎组织块并加入 0.2% II 型胶原酶,于 37 °C 振荡消化 4~6 h。消化液经滤网滤过后离心收集细胞,重悬于完全培养基并接种于培养瓶。细胞于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,隔日更换培养基,并将贴壁生长且形态符合软骨特征的细胞传代,取 2~4 代细胞用于后续实验。为鉴定软骨细胞表型,采用明场显微镜观察细胞形态,以阿利新蓝与甲苯胺蓝染色评估 ECM 成分沉积,并通过免疫荧光染色检测 COL2A1 表达确认软骨特异性蛋白表达。

2.3 CCK-8 检测细胞活力

将第 2~4 代软骨细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,细胞贴壁后分别加入 0、5、10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇处理 24、48 h。加入 CCK-8 工作液,每孔 10 μL ,37 °C 孵育 1~2 h,采用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值,以对照组归一化计算相对细胞活力。

2.4 LPS 造模浓度的筛选

虽然 IL-1 β 、TNF- α 更常用于模拟 KOA 软骨细胞的细胞因子炎症环境,但已有研究在原代软骨细胞或 ATDC5 细胞中采用 LPS 诱导炎症并触发 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 相关焦亡表型^[27-28]。因此,参考文献中软骨细胞炎症及焦亡模型的常用方法,并结合预实验结果,对 LPS 的造模浓度进行筛选。将第 3 代原代大鼠软骨细胞接种于 6 孔板,分别给予 0、0.1、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力,同时提取细胞中总 RNA,采用 qRT-PCR 法检测 *IL-6* 和 *TNF- α* 的 mRNA 表达。综合细胞活力变化及炎症相关基因响应强度,筛选后续模型建立所用 LPS 的质量浓度。

2.5 炎症模型建立与给药

既往研究在原代软骨细胞中报道 LPS 刺激可上

调 NLRP3 炎症小体及其下游焦亡相关分子并促进 IL-1 β 、IL-18 释放^[29], 因此本研究采用 LPS 单刺激用于建立软骨细胞炎症损伤并诱导焦亡样反应。将第 3 代原代大鼠软骨细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合至 70%~80% 时进行分组干预: 对照组给予等体积完全培养基; 模型组给予含 LPS (1 μ g/mL) 的培养基; 梓醇低剂量组在 LPS 刺激前先以梓醇 20 μ mol/L 预处理 1 h, 随后加入 LPS (1 μ g/mL) 继续培养 24 h; 梓醇高剂量组在 LPS 刺激前先以梓醇 50 μ mol/L 预处理 1 h, 随后加入 LPS (1 μ g/mL) 继续培养 24 h。各组细胞均在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

在焦亡相关实验中设置 Caspase-1 抑制剂组: VX-765 组于 LPS 刺激前加入 VX-765 (10 μ mol/L) 预处理 30 min^[30-31], 随后按上述给药方法继续处理。为进行 AMPK 依赖性机制验证, 设置 AMPK 抑制剂组: Compound C 组在 LPS 刺激前加入 Compound C (10 μ mol/L) 预处理 1 h; 梓醇 + Compound C 组在 LPS 刺激前加入 Compound C (10 μ mol/L) 预处理 1 h, 再给予梓醇 (50 μ mol/L) 预处理 1 h, 随后按上述给药方法继续处理。

2.6 Western blotting 检测 COL2A1、ACAN、MMP3、MMP13、AMPK、p-AMPK、p-p65、p65、I κ B α 、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、ACC 和 p-ACC 蛋白表达

收集各组细胞, 于冰上加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用 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% 脱脂牛奶封闭后, 加入一抗 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 90 min; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 化学发光试剂, 使用全能型凝胶成像系统显影, 并采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 免疫荧光染色检测 COL2A1 表达

收集各组细胞于载玻片或孔板上, 4% 多聚甲醛

固定 15 min, 0.1% TritonX 100 透化 20 min, 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min。滴加 COL2A1 抗体 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤后滴加荧光二抗 (1 : 150) 孵育 1 h, 并以 DAPI 复染细胞核, 于显微镜下观察并拍照。

2.8 LDH 释放实验

将第 3 代原代大鼠软骨细胞接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后更换为含 1% 胎牛血清的培养基, 并按“2.5”项下分组进行处理。取上清 120 μ L 加入新的 96 孔板中, 每孔加入 60 μ L LDH 检测工作液, 室温避光孵育 30 min 后, 于 490 nm 测定 A 值, 并以 600 nm 为参考波长进行双波长校正。各孔 A 值扣除空白对照孔后, 以对照组 A 值归一化为 1, 计算相对 LDH 释放水平。

2.9 ELISA 测定炎症因子水平

收集各组培养上清液, 1 500 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-1 β 和 IL-18 水平。

2.10 qRT-PCR 检测 NLRP3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 表达

收集各组细胞, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 检测 RNA 纯度与浓度后, 使用反转录试剂盒合成 cDNA, 采用 SYBR Green 体系进行 qRT-PCR 分析。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性, 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、60 s, 共 40 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析以确认特异性。以 β -actin 为内参; 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 NLRP3、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的相对表达量, 引物序列见表 1。

2.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 软件作图。采用 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性, Levene 检验评估方差齐性。若同时满足正态分布与方差齐性, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 Tukey 事后检验; 若满足正态分布但方差不齐, 则采用 Welch 校正的一元方差分析, 并采用 Dunnett's

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
NLRP3	GAGCTGGACCTCAGTGACAATGC	ACCAATGCGAGATCCTGACAACAC
TNF- α	CCACGCTCTTCTGTCTACTG	GCTACGGGCTGTCACTC
IL-1 β	ACAGCAGCATCTCGACAAGAGC	CCACGGGCAAGACATAGGTAGC
IL-6	TCTGACAGTGCATCATGGC	CCAGTTGCCCTTCTGGGAC
β -actin	CCAGATCATGTTTGGACCTTCAA	GTGGTACGACCAGAGGCATACA

T3 进行事后比较；若不满足正态分布，则采用 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 靶点相关基因的筛选 通过 SwissTarget Prediction、PharmMapper 平台获取梓醇潜在靶点共 897 个；以“knee osteoarthritis”为关键词从 GeneCards、OMIM 数据库检索 KOA 相关靶点 4 525 个；以“pyroptosis”为关键词检索细胞焦亡相关靶点 2 013 个，取三者交集得到 65 个交集靶点（图 1）。提示梓醇可能通过 65 个候选靶点通过细胞焦亡参与调控 KOA 进程。

3.1.2 PPI 网络分析 基于 65 个交集靶点，在 STRING 平台进行蛋白互作映射并构建 PPI 网络（图 2-A），随后将 PPI 网络导入 Cytoscape 软件进行可视化（图 2-B）。整体网络呈高度致密状态，节

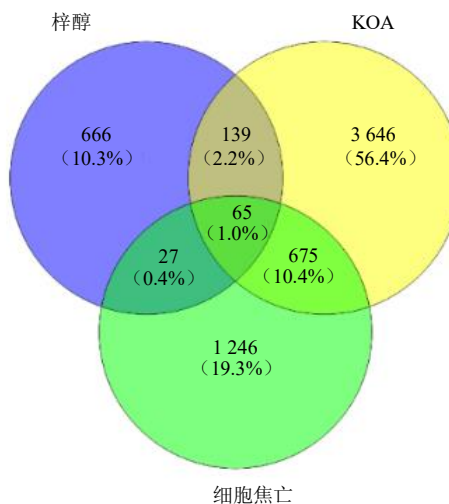
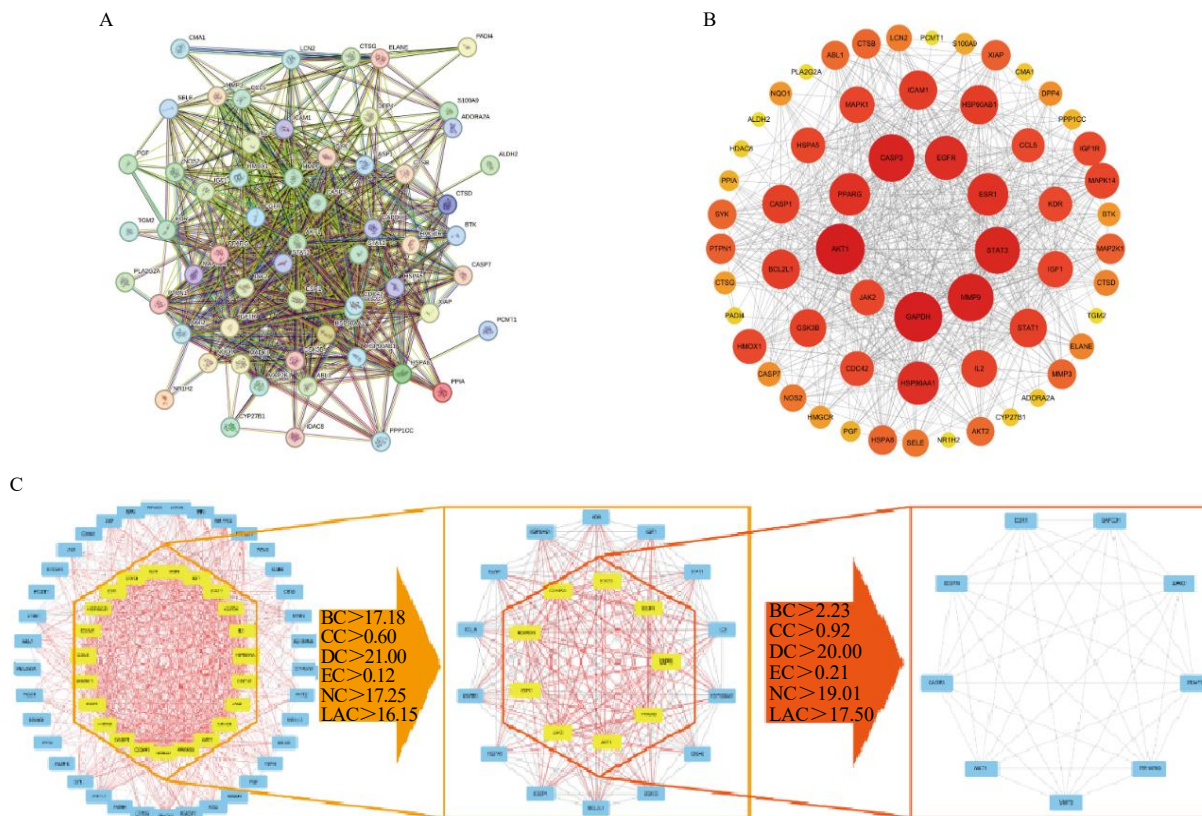


图 1 梓醇、KOA 及细胞焦亡相关基因靶点交集 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of overlapping gene targets associated with catalpol, KOA and pyroptosis



A-PPI 网络，圆形节点为潜在的靶点蛋白，节点之间的线条为靶点之间的作用关系；B-PPI 网络的 Cytoscape 可视化结果，节点大小及颜色深浅与其度值相关，值越大提示在网络中的枢纽性越强；C-基于 CytoNCA 拓扑参数（BC、CC、DC、EC、NC、LAC）进行 2 轮过滤后得到的核心子网络。

A-PPI network, circular nodes represent putative target proteins, and edges indicate interactions among targets; B-Cytoscape visualization of PPI network, where node size and color intensity correlate with degree values (higher degree indicates stronger hub properties in the network); C-core subnetwork after two rounds of filtering based on CytoNCA topological parameters (BC, CC, DC, EC, NC, LAC).

图 2 梓醇、KOA 及细胞焦亡的靶基因 PPI 网络以及核心基因的筛选

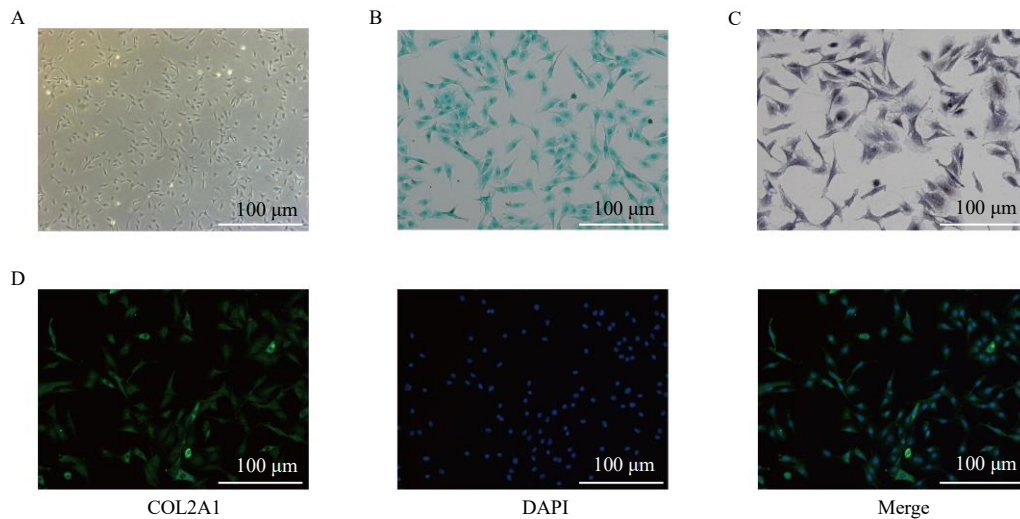
Fig. 2 PPI network of target genes related to catalpol, KOA, pyroptosis and screening of hub genes

3.2 体外实验结果

3.2.1 原代大鼠软骨细胞鉴定 光学显微镜下观察到培养的软骨细胞贴壁生长，形态以多角形及短梭形为主，细胞边界清晰、核染均匀，符合原代软骨细胞的典型形态特征（图 4-A）。阿利新蓝染色结果显示细胞基质呈现明显蓝绿色沉积（图 4-B），提示细胞外存在丰富的酸性多糖成分。甲苯胺蓝染色呈紫黑色，染色强度高（图 4-C），表明软骨细胞产生的蛋白聚糖等基质成分富集。免疫荧光染色结果显示，COL2A1 阳性表达，荧光信号主要分布于细胞胞体及邻近基质区域，与 DAPI 染核图像合并显示多数细胞均表达 COL2A1（图 4-D）。COL2A1 的表达直接反映软骨表型维持情况，是鉴定原代软骨

细胞的重要指标。原代大鼠软骨细胞经形态学观察、阿利新蓝与甲苯胺蓝染色以及 COL2A1 免疫荧光检测均表明所培养细胞具有软骨样表型，具备开展后续体外机制实验的基础。

3.2.2 LPS 造模条件筛选 如图 5-A 所示，LPS 处理 24 h 后，软骨细胞活力呈下降趋势，其中 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 显著抑制细胞活力 ($P < 0.01$)，表明高质量浓度的 LPS 已产生较明显细胞损伤。qRT-PCR 结果（图 5-B、C）显示，LPS 可剂量相关性地上调 *IL-6* 和 *TNF- α* 炎症相关基因表达，其中 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 已能诱导较明显的炎症反应 ($P < 0.001$)。综合细胞活力与炎症相关基因响应，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 可在不过度影响细胞活力的情况下稳定诱导炎症反应，为后续造模条件。

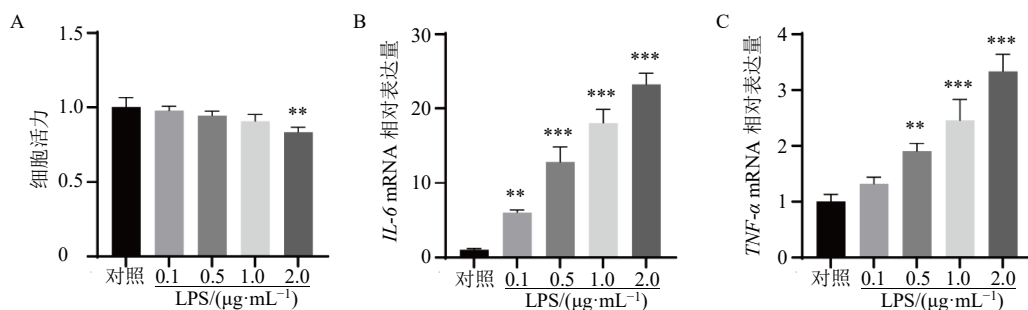


A-原代软骨细胞明场形态；B-阿利新蓝染色；C-甲苯胺蓝染色；D-免疫荧光染色检测 COL2A1 表达 ($\times 100$)。

A-bright-field morphology of primary chondrocytes; B-alcian blue staining; C-toluidine blue staining; D-COL2A1 expression detected by immunofluorescence staining ($\times 100$).

图 4 原代大鼠软骨细胞的鉴定

Fig. 4 Identification of primary rat chondrocytes



A-不同质量浓度的 LPS 处理 24 h 后软骨细胞活力；B、C-不同质量浓度的 LPS 处理 24 h 后软骨细胞中 *IL-6* 和 *TNF- α* 的基因相对表达量；与对照组比较：** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-chondrocyte viability after 24 h treatment with different concentrations of LPS; B, C-relative gene expressions of *IL-6* and *TNF- α* in chondrocytes after 24 h treatment with different concentrations of LPS; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 5 LPS 造模条件筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Screening of LPS modeling conditions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.3 梓醇对软骨细胞活力的影响 如图6所示, 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 的梓醇处理 24、48 h 均可显著提高原代软骨细胞活力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明梓醇在 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 对大鼠原代软骨细胞具有良好的细胞相容性。鉴于本研究中 CCK-8 实验筛选的主要目的在于确定后续机制实验的安全有效浓度范围, 而非单纯以正常培养条件下促增殖峰值作为唯一依据; 近年来亦有研究在炎症刺激的软骨细胞模型中

采用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇进行干预, 其中 20 $\mu\text{mol/L}$ 已表现出较好的保护作用, 提示 20 $\mu\text{mol/L}$ 属于具有生物学活性的常用浓度范围^[23]。同时, 为构建具有一定梯度间隔的低、高剂量分组并考察剂量相关性, 最终选取 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为梓醇低、高剂量用于后续实验。

3.2.4 梓醇对 LPS 诱导的软骨细胞 ECM 稳态的影响 如图 7-A~E 所示, 与对照组比较, 模型组 COL2A1

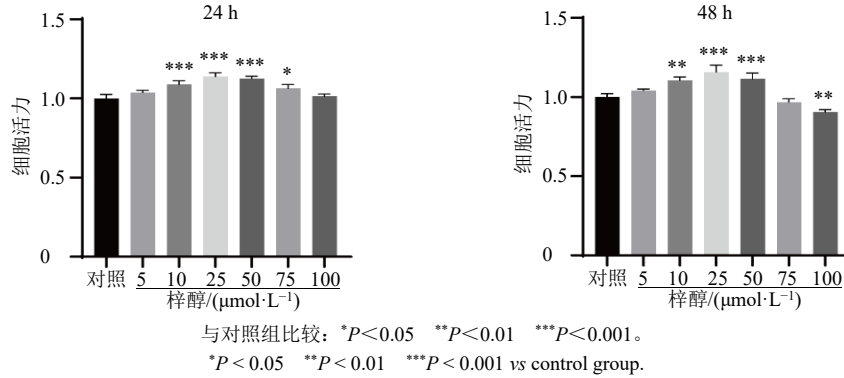
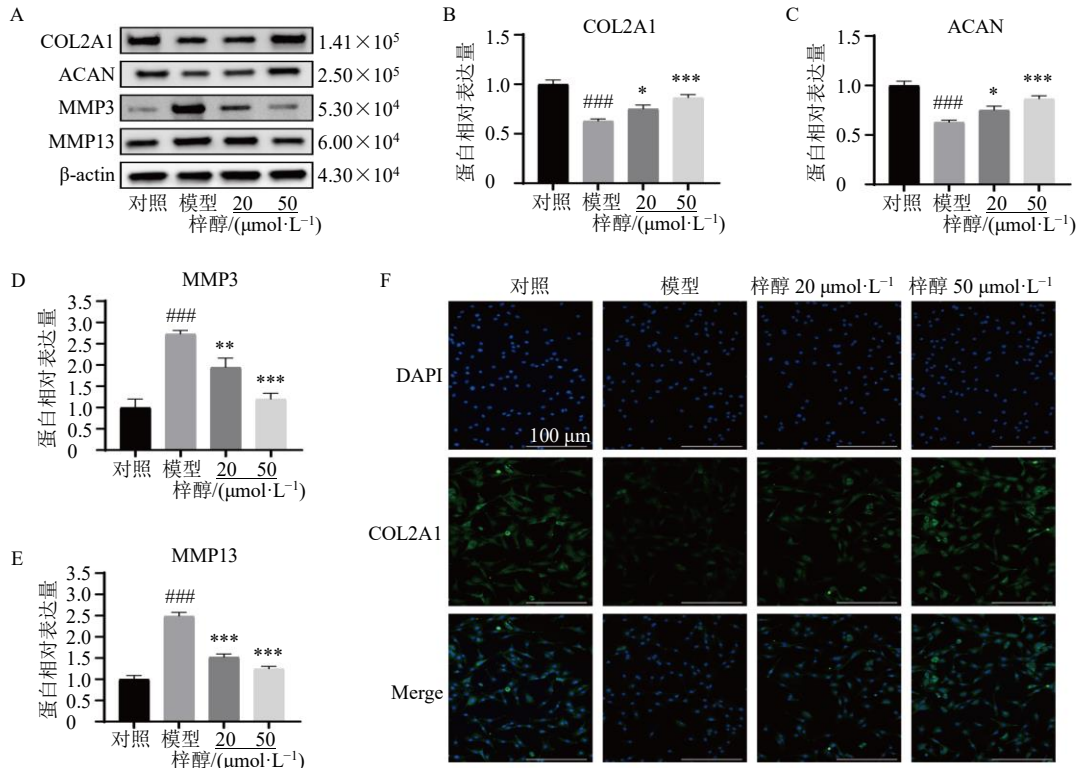


图6 梓醇对软骨细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of catalpol on viability of chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A~E-Western blotting 检测各组软骨细胞 COL2A1、ACAN、MMP3、MMP13 蛋白表达; F-免疫荧光染色检测 COL2A1 表达 ($\times 100$); 与对照组比较: #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A—E-expressions of COL2A1, ACAN, MMP3 and MMP13 in chondrocytes detected by Western blotting; F-COL2A1 expression detected by immunofluorescence staining ($\times 100$); #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

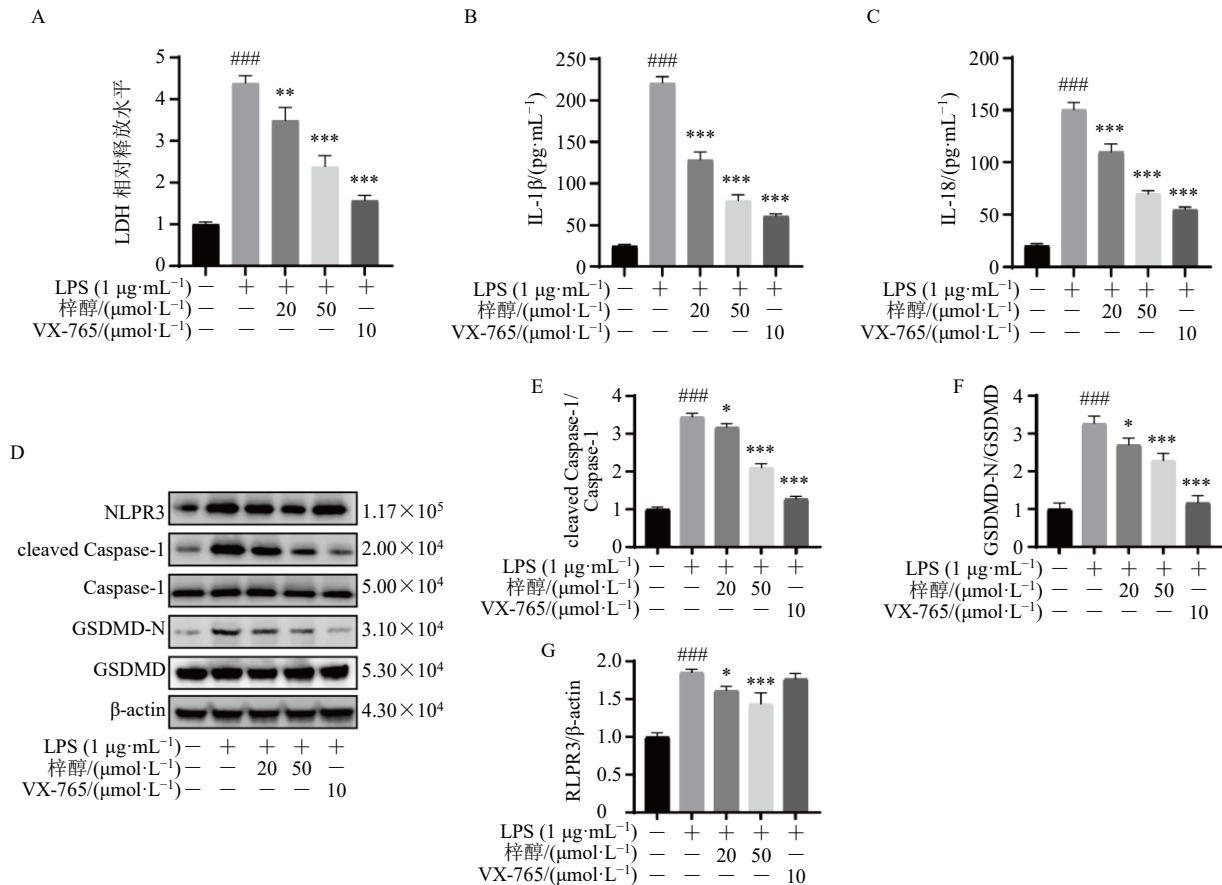
图7 梓醇改善 LPS 诱导的软骨细胞 ECM 稳态失衡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Catalpol alleviates LPS-induced ECM imbalance in chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和 ACAN 蛋白表达水平明显降低($P<0.001$), MMP3 和 MMP13 蛋白表达水平明显升高($P<0.001$), 提示炎症刺激可诱导软骨细胞由合成代谢向分解代谢转变, ECM 稳态受到破坏; 与模型组比较, 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇组 COL2A1 和 ACAN 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.001), MMP3 和 MMP13 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性, 表明梓醇可在炎症条件下部分逆转 LPS 诱导的基质分解代谢异常, 恢复 ECM 稳态。免疫荧光结果(图 7-F)进一步验证了上述结论, 与对照组比较, 模型组 COL2A1 荧光信号明显减弱; 梓醇处理后 COL2A1 阳性信号增加, 细胞内及周围基质区域的 COL2A1 表达增加, 其中高剂量组改善更为明显。

3.2.5 梓醇抑制 LPS 诱导的软骨细胞焦亡相关分子表达 如图 8-A 所示, 与对照组比较, 模型组软

骨细胞 LDH 释放量显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 给予 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇干预后 LDH 释放量显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性, 与 Caspase-1 抑制剂 VX-765 作用一致。如图 8-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 给予 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇干预后细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低 ($P<0.001$), 且呈剂量相关性, 与 Caspase-1 抑制剂 VX-765 作用一致。Western blotting 结果(图 8-D~G)显示, 与对照组比较, 模型组 cleaved Caspase-1/Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD 和 NLRP3 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 给予 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇干预后 cleaved Caspase-1/Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD 和 NLRP3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001),



A-各组软骨细胞 LDH 相对释放水平; B、C-各组细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平; D~G-Western blotting 检测焦亡相关蛋白 NLRP3、cleaved Caspase-1、Caspase-1、GSDMD-N、GSDMD 的表达; 与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。A-relative release level of LDH in chondrocytes; B, C-levels of IL-1 β and IL-18 in cells supernatants; D~G-expressions of pyroptosis-related proteins (NLRP3, cleaved Caspase-1, Caspase-1, GSDMD-N, GSDMD) detected by Western blotting; ### $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

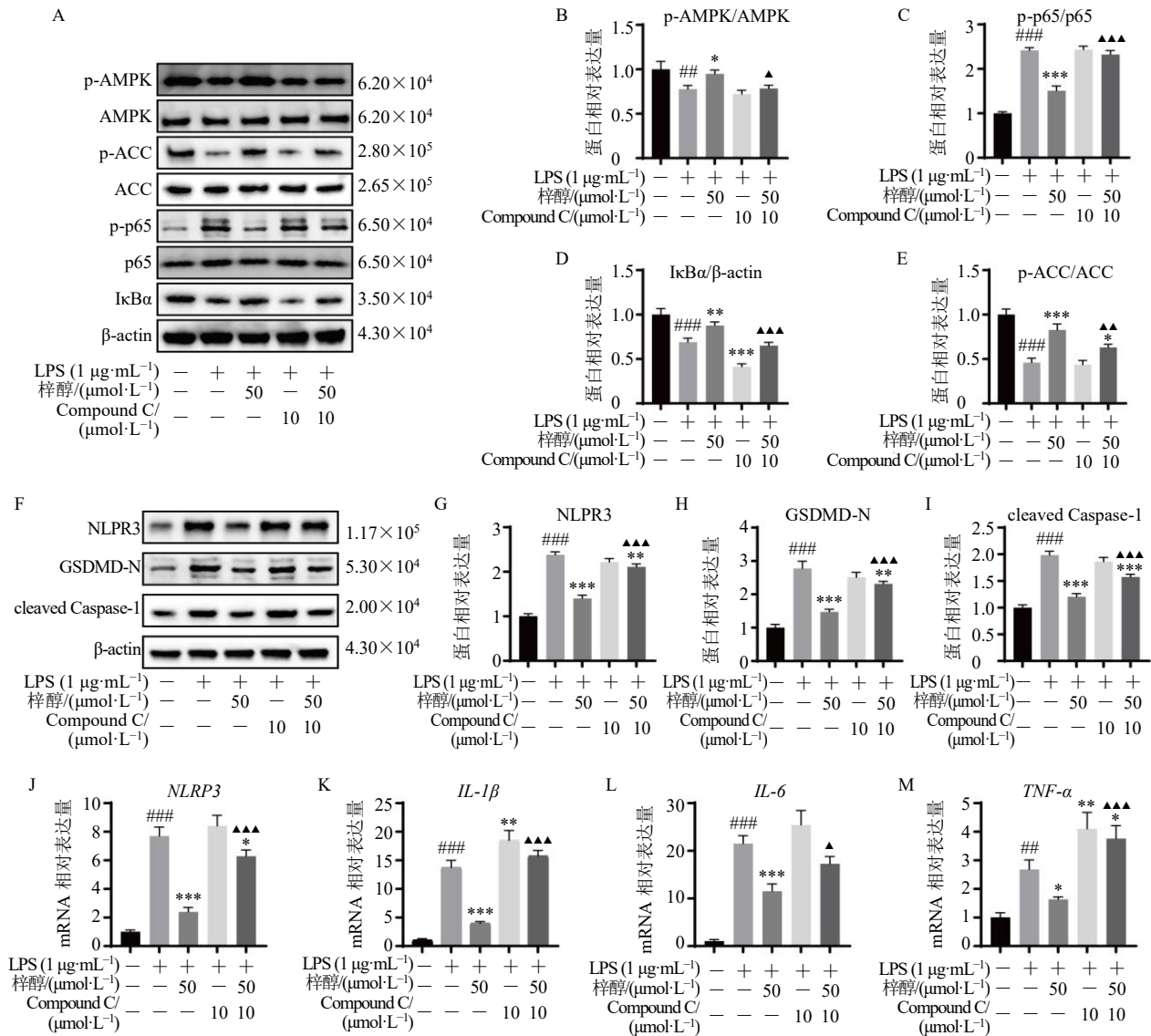
图 8 梓醇抑制炎症刺激诱导的软骨细胞焦亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Catalpol inhibits inflammatory stimulation-induced pyroptosis in chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

且呈剂量相关性, 与 Caspase-1 抑制剂 VX-765 的作用一致。VX-765 主要降低 cleaved Caspase-1 与 GSDMD-N 水平, 而对 NLRP3 蛋白表达的影响相对有限, 这与其主要阻断下游 Caspase-1 裂解事件的作用特点一致。以上结果表明, 梓醇可抑制 LPS 诱导的软骨细胞 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 轴相关焦亡分子表达, 并降低 IL-1 β 和 IL-18 释放。

3.2.6 梓醇通过激活 AMPK 抑制 NF- κ B/NLRP3 信号轴 为验证梓醇对 AMPK 信号的调控作用及其

与 NF- κ B 及 NLRP3 炎症小体通路的关联, 本研究在 LPS 刺激软骨细胞的基础上加入梓醇, 并以 AMPK 抑制剂 Compound C 进行干预验证。如图 9-A~E 所示, 与对照组比较, 模型组 p-AMPK/AMPK、I κ B α 、p-ACC/ACC 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), p-p65/p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 给予 50 μ mol/L 梓醇干预后 p-AMPK/AMPK、I κ B α 、p-ACC/ACC 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-p65/p65 蛋白



A~E-各组 p-AMPK、AMPK、p-ACC、ACC、p-p65、p65 及 I κ B α 蛋白表达; F~I-各组 NLRP3、GSDMD-N 及 cleaved Caspase-1 蛋白表达; J~M-各组 NLRP3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 相对表达量; 与对照组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与梓醇组比较: Δ $P < 0.05$ $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$ 。

A~E-expressions of p-AMPK, AMPK, p-ACC, ACC, p-p65, p65 and I κ B α in each group; F~I-expressions of NLRP3, GSDMD-N and cleaved Caspase-1 in each group; J~M-mRNA relative expression levels of NLRP3, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in each group; # $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; Δ $P < 0.05$ $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$ vs catalpol group.

图 9 梓醇通过激活 AMPK 抑制 NF- κ B 及 NLRP3 信号轴 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Catalpol suppresses NF- κ B/NLRP3 signaling axis by activating AMPK ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与梓醇组比较, 梓醇+Compound C 组 p-AMPK/AMPK、I κ B α 、p-ACC/ACC 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-p65/p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 提示 AMPK 抑制剂 Compound C 可减弱梓醇对 AMPK/NF- κ B 通路的调控作用。

进一步检测 NLRP3 炎症小体及焦亡相关蛋白, 如图 9-F~I 所示, 与对照组比较, 模型组 NLRP3、GSDMD-N 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 给予 50 μ mol/L 梓醇干预后 NLRP3、GSDMD-N 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与梓醇组比较, 梓醇+Compound C 组 NLRP3、GSDMD-N 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 提示 AMPK 抑制可部分逆转梓醇对 NLRP3 炎症小体及其下游焦亡相关蛋白表达的抑制作用。qRT-PCR 结果 (图 9-J~M) 显示, 与对照组比较, 模型组 NLRP3、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 与模型组比较, 给予 50 μ mol/L 梓醇干预后 NLRP3、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001); 与梓醇组比较, 梓醇+Compound C 组 NLRP3、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001), 提示 AMPK 抑制可削弱梓醇对 NLRP3 炎症小体相关基因及炎症因子表达的抑制作用。以上结果表明, 梓醇可能通过激活 AMPK 信号抑制 NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路, 从而减轻 LPS 诱导的软骨细胞炎症反应和焦亡相关分子表达。

4 讨论

KOA 并非单纯的软骨磨损, 而是长期低度炎症、细胞死亡失衡及代谢紊乱共同驱动的全关节病变过程^[32]。网络药理学结果提示, 梓醇、KOA 与细胞焦亡的交集靶点主要富集于炎症反应、细胞死亡及应激调控相关通路, 其中 AMPK、NF- κ B 和 NOD 样受体相关通路与本研究关注的“炎症-焦亡-ECM 失衡”终点具有较高一致性。PPI 网络中 STAT3、AKT1 等节点虽具有较高中心性, 但拓扑参数主要反映网络中的连通性, 并不等同于在本研究细胞模型中对终点事件的决定作用。因此, 本研究根据网络预测提出通路级假设, 再结合体外实验进行针对性验证的研究路径, 优先围绕 AMPK/NF- κ B/NLRP3 轴展开验证, 并观察梓醇对软骨细胞炎症损伤、

ECM 代谢及焦亡相关变化的整体影响。在体外模型中, 梓醇可显著改善 LPS 诱导的软骨细胞炎症损伤与 ECM 代谢失衡, 表现为促进 COL2A1、ACAN 等基质合成标志物回升, 抑制 MMP3、MMP13 等基质降解酶上调, 并同步降低 IL-1 β 、IL-18 释放及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 相关焦亡分子表达。表明梓醇不仅影响炎症因子释放, 也可同步干预与软骨基质稳态相关的分解代谢过程。

近年来的研究表明, 炎症性程序性细胞死亡在 KOA 的持续进展中具有重要地位, 其中细胞焦亡被视为连接“炎症放大-软骨细胞损伤-基质破坏”的关键环节。大量研究在 KOA 软骨组织及细胞模型中观察到焦亡相关分子上调, 如 NLRP3、Caspase-1 及 GSDMD 的裂解激活, 并伴随 IL-1 β 和 IL-18 成熟释放增加; 与此同时, 干预焦亡关键分子如抑制 Caspase-1 或阻断 GSDMD 介导膜孔形成可减轻炎症因子释放与基质降解, 提示焦亡并非单纯现象, 而可能直接参与驱动 KOA 病理改变^[7,10-12]。与上述报道一致, 本研究在 LPS 诱导的原代软骨细胞损伤模型中发现, 梓醇处理可显著降低软骨细胞 LDH 释放水平及 IL-1 β 、IL-18 等炎症介质的释放, 并下调 NLRP3、GSDMD-N 及 cleaved Caspase-1 等焦亡相关分子表达。基于此, 本研究结果支持梓醇可抑制与 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 轴活化相关的焦亡样分子事件, 从而减轻炎症放大及软骨细胞损伤。

AMPK 作为连接能量平衡与炎症应答的关键信号分子, 其活化主要表现为 AMPK α Thr172 位点磷酸化, 上游可由 LKB1 或 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase β , CaMKK β) 介导。既往研究提示, 在骨关节炎、衰老及机械损伤条件下, 软骨细胞中 LKB1 与 AMPK 活性可同步下降; 敲低 LKB1 会削弱 AMPK 活性, 并增强 IL-1 β /TNF- α 诱导的 NO、MMP-3 及 MMP13 等分解代谢反应。另有研究提示, LKB1/AMPK 轴的增强可抑制 NLRP3 炎症小体活化并减轻软骨细胞焦亡; 此外, 药理学干预或上游信号调控激活 AMPK 后, 可抑制 NF- κ B 转录活化, 降低炎症因子与基质降解相关分子的表达, 从而发挥软骨保护作用^[17,19,33]。与此同时, ACC 是 AMPK 经典下游底物之一, 其 Ser79 位点磷酸化常作为 AMPK 下游活化状态的重要指标, 已有骨关节炎及软骨细胞相关研究亦常联合检测 p-AMPK 和 p-ACC 表达, 以增强对 AMPK 通路活化的一致性判

断。基于此,本研究发现,梓醇不仅可上调 p-AMPK/AMPK 值,还可同步提高 p-ACC/ACC 值,并伴随 p-p65/p65 下降、I κ B α 回升以及 NLRP3 炎症小体和焦亡相关分子表达下调;当加入 AMPK 抑制剂 Compound C 进行阻断后,上述效应被部分削弱。由此提示,梓醇可在 LPS 诱导的原代软骨细胞炎症损伤模型中抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 轴相关焦亡分子表达,并伴随 AMPK 活化、ACC 磷酸化恢复及 NF- κ B/NLRP3 相关信号抑制,从而改善 ECM 代谢失衡。

本研究采用 LPS 刺激的原代软骨细胞模型,主要模拟关节炎微环境,并不能完全覆盖 KOA 真实病程中的机械负荷、滑膜与软骨交互、免疫细胞浸润及软骨下骨重塑等因素的影响^[34];另外,已有 AMPK 激动剂如 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷及二甲双胍在软骨细胞 OA 模型中通过 AMPK 相关信号减轻炎症-分解代谢反应^[19,35]。本研究结果提示梓醇在 AMPK/NF- κ B/NLRP3 上具有一定一致性,但其是否通过 LKB1 或 CaMKK β 等上游途径促进 AMPK Thr172 磷酸化以及与经典激动剂的效力差异,仍需进一步验证。其次,AMPK 的作用主要通过药理抑制剂进行验证,本研究采用 Compound C 作为 AMPK 抑制剂进行机制验证,尽管该化合物在相关研究中常被用于抑制 AMPK 信号,但已有研究提示其激酶选择性有限,可抑制多种非 AMPK 靶点^[36]。后续尚需在更接近疾病真实微环境中进一步验证梓醇的体内效应,如应用内侧半月板不稳定模型或前交叉韧带切断模型,联合遗传学干预如 AMPK α 亚基相关基因敲除后,进一步验证其相关机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kloppenburg M, Namane M, Cicuttini F. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2025, 405(10472): 71-85.
- [2] Mahmoudian A, King L K, Liew J W, et al. Timing is everything: Towards classification criteria for early-stage symptomatic knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2024, 32(6): 649-653.
- [3] Moseng T, Vliet Vlieland T P M, Battista S, et al. EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis: 2023 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, 83(6): 730-740.
- [4] Tong L P, Yu H, Huang X Y, et al. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches [J]. *Bone Res*, 2022, 10: 60.
- [5] Dell'Isola A, Recenti F, Giardulli B, et al. Osteoarthritis year in review 2025: Epidemiology and therapy [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2025, 33(11): 1300-1306.
- [6] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 33-42.
- [7] Lin M H, Zhang C X, Li H M, et al. Pyroptosis for osteoarthritis treatment: Insights into cellular and molecular interactions inflammatory [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1556990.
- [8] Kuang S D, Sheng W, Meng J H, et al. Pyroptosis-related crosstalk in osteoarthritis: Macrophages, fibroblast-like synoviocytes and chondrocytes [J]. *J Orthop Transl*, 2024, 47: 223-234.
- [9] Liu S Q, Pan Y R, Li T, et al. The role of regulated programmed cell death in osteoarthritis: From pathogenesis to therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5364.
- [10] Paik S, Kim J K, Shin H J, et al. Updated insights into the molecular networks for NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22(6): 563-596.
- [11] Broz P, Dixit V M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(7): 407-420.
- [12] Karmakar V, Chain M, Majie A, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome as a novel therapeutic target for osteoarthritis [J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(2): 461-484.
- [13] Yang F R, Li D B, Long W, et al. Role of pyroptosis in the pathogenesis of osteoarthritis: An updated review [J]. *J Inflamm Res*, 2025, 18: 15065-15079.
- [14] Guo X C, Feng X Y, Yang Y, et al. Spermidine attenuates chondrocyte inflammation and cellular pyroptosis through the AhR/NF- κ B axis and the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1462777.
- [15] Liu Y Z, Wang Y, Yan P, et al. NLRP3 inflammasome-mediated osteoarthritis: The role of epigenetics [J]. *Biology*, 2025, 14(1): 71.
- [16] Li Z, Zhang W T, Wei X Y, et al. TRIM15 drives chondrocyte senescence and osteoarthritis progression [J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(791): eadq1735.
- [17] Chen L, Hu X H, Wu X Y, et al. AMPK signaling in osteoarthritis: From mechanisms to targeted therapeutics [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1681610.
- [18] Goldring M B, Otero M. Inflammation in osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(5): 471-478.
- [19] Chen Y, Liu Y H, Jiang K, et al. Linear ubiquitination of LKB1 activates AMPK pathway to inhibit NLRP3

- inflammasome response and reduce chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 39: 1-11.
- [20] Bauernfeind F G, Horvath G, Stutz A, *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 787-791.
- [21] 商岚清, 程鑫雨, 单鸿哲, 等. 地黄及其有效成分干预膝关节关节炎的作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(1): 349-359.
- [22] Zeng Y F, Wang R, Bian Y, *et al.* Catalpol attenuates IL-1 β induced matrix catabolism, apoptosis and inflammation in rat chondrocytes and inhibits cartilage degeneration [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 6649-6659.
- [23] Zhou Z W, Zhang B H, Liu L, *et al.* Inhibition of heat shock protein 90 β by catalpol: A potential therapeutic approach for alleviating inflammation-induced cartilage injuries in osteoarthritis [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(26): 2503909.
- [24] Cai C, Sun P, Chen Z, *et al.* Catalpol protects mouse ATDC5 chondrocytes against interleukin-1 β -induced catabolism [J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(3): 333-344.
- [25] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al.* The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [26] Otasek D, Morris J H, Bouças J, *et al.* Cytoscape Automation: Empowering workflow-based network analysis [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [27] Fang Y Q, Lou C, Lv J L, *et al.* Sipeimine ameliorates osteoarthritis progression by suppression of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis through inhibition of PI3K/Akt/NF- κ B pathway: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. *J Orthop Transl*, 2024, 46: 1-17.
- [28] Zhai T J, Zhang Z Q, Hu X S, *et al.* Role of long intergenic nonprotein-coding RNA 00511 in NOD-like receptor protein pyrin domain 3-induced chondrocyte pyroptosis via the microRNA-9-5p/FUT1 axis [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2024, 34(7): 1511-1521.
- [29] Zu Y, Mu Y, Li Q, *et al.* Icarin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 307.
- [30] Zhang Z H, Bai H, Ma X Y, *et al.* Blockade of the NLRP3/Caspase-1 axis attenuates ketamine-induced hippocampus pyroptosis and cognitive impairment in neonatal rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 239.
- [31] Wen S, Deng F, Li L L, *et al.* VX-765 ameliorates renal injury and fibrosis in diabetes by regulating caspase-1-mediated pyroptosis and inflammation [J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(1): 22-33.
- [32] Yao Q, Wu X H, Tao C, *et al.* Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 56.
- [33] Li Z H, Huang Z Y, Zhang H, *et al.* Moderate-intensity exercise alleviates pyroptosis by promoting autophagy in osteoarthritis via the P2X7/AMPK/mTOR axis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 346.
- [34] Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, *et al.* Synovial inflammation in osteoarthritis progression [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(5): 258-275.
- [35] Li J, Zhang B, Liu W X, *et al.* Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(5): 635-645.
- [36] Dasgupta B, Seibel W. Compound C/dorsomorphin: Its use and misuse as an AMPK inhibitor [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1732: 195-202.

[责任编辑 李亚楠]