

# 基于 PINK1/Parkin 信号通路研究鞣酸促进软骨细胞线粒体自噬改善小鼠膝骨关节炎的机制

甘 纯<sup>1</sup>, 傅丹青<sup>2</sup>, 戴浩强<sup>1</sup>, 夏臣杰<sup>1\*</sup>

1. 宁波大学附属李惠利医院 关节与运动医学科, 浙江 宁波 315040

2. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 基于 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) /帕金蛋白 (Parkin) 通路探讨鞣酸促进软骨细胞线粒体自噬并减轻小鼠膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的作用机制。方法 采用内侧半月板不稳手术构建小鼠 KOA 模型, 设置假手术组、模型组和鞣酸低、高剂量 (25、50 mg/kg) 组, 给药干预 8 周。通过影像学、番红 O-固绿染色和甲苯胺蓝染色观察关节软骨病理变化; 免疫组化检测软骨组织中 II 型胶原蛋白 (collagen II, Col-II)、基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、PINK1、Parkin、p62 和微管相关蛋白轻链 3B (microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B) 蛋白表达。采用 IL-1 $\beta$  刺激小鼠 ATDC5 软骨细胞, 给予鞣酸干预后, CCK-8 法检测细胞活力; Western blotting 和 qRT-PCR 检测 Col-II、MMP13 和 IL-1 $\beta$  蛋白及 mRNA 表达; Western blotting 检测线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、p62 和 LC3-II/I 蛋白表达; 免疫荧光检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和线粒体膜电位变化; 透射电镜观察线粒体自噬水平; 并利用线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 进行反向机制验证。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠软骨严重磨损, OARSI 评分显著升高 ( $P < 0.01$ ), 软骨组织 Col-II、PINK1、Parkin 和 LC3B 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )、IL-1 $\beta$ 、MMP13 和 p62 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 鞣酸组小鼠软骨形态得到改善, OARSI 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ), 软骨组织 Col-II、PINK1、Parkin 和 LC3B 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$ 、MMP13 和 p62 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。细胞实验结果显示, IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$ 、MMP13 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), Col-II 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), LC3-II/I、PINK1、Parkin 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), p62 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞内 ROS 积累增加 ( $P < 0.01$ ), 线粒体膜电位下降 ( $P < 0.01$ ), 自噬小体减少; 与模型组比较, 鞣酸组细胞活力升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), ROS 积累显著减少 ( $P < 0.01$ ), 线粒体膜电位恢复 ( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ 、MMP13 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), Col-II 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), p62 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), LC3-II/I、PINK1、Parkin 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 联合使用线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 后, 鞣酸对软骨细胞的作用被逆转 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结论 鞣酸通过 PINK1/Parkin 信号通路促进软骨细胞线粒体自噬, 缓解关节软骨退变, 从而延缓 KOA 进展。

**关键词:** 鞣酸; 膝骨关节炎; 软骨细胞; 线粒体自噬; PINK1/Parkin 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5109-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.014

## Mechanism of tannic acid in promoting mitochondrial autophagy in chondrocytes and improving knee osteoarthritis in mice based on PINK1/Parkin signaling pathway

GAN Chun<sup>1</sup>, FU Danqing<sup>2</sup>, DAI Haoqiang<sup>1</sup>, XIA Chenjie<sup>1</sup>

1. Department of Joint and Sports Medicine, Affiliated Lihui Hospital of Ningbo University, Ningbo 315040, China

2. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of tannic acid in promoting mitochondrial autophagy in chondrocytes and improving knee osteoarthritis (KOA) in mice based on PINK1/Parkin signaling pathway. **Methods** A mouse KOA model was established via

收稿日期: 2025-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104885); 浙江省自然科学基金资助项目 (ZCLQN25H2701); 宁波市自然科学基金资助项目 (2023J215); 宁波市医学重点学科“运动医学”项目 (2026-A01); 宁波市医疗卫生高端团队重大攻坚项目 (2022020102)

作者简介: 甘 纯, 硕士研究生, 从事骨关节疾病治疗研究。E-mail: 2311140034@nbu.edu.cn

\*通信作者: 夏臣杰, 博士, 主治医师, 硕士生导师, 从事骨关节疾病治疗研究。E-mail: xiachenjie@zcmu.edu.cn

destabilization of medial meniscus surgery. Sham group, model group and tannic acid low-, high-dose (25, 50 mg/kg) groups were set up, drugs were given for intervention for eight weeks. Joint cartilage pathology was assessed by imaging, safranin O-fast green staining and toluidine blue staining. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of collagen II (Col-II), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), PINK1, Parkin, p62 and microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B) in cartilage tissue. ATDC5 mouse chondrocytes were stimulated with IL-1 $\beta$  and then treated with tannic acid. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expressions of Col-II, MMP13 and IL-1 $\beta$ . Western blotting was used to detect the expressions of mitophagy-related proteins PINK1, Parkin, p62 and LC3-II/I. Changes in reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential were detected by immunofluorescence. Mitochondrial autophagy level was observed by transmission electron microscopy. And reverse mechanism validation was performed using the mitochondrial autophagy inhibitor Mdivi-1. **Results** Compared with sham group, the cartilage of mice in model group was severely worn, OARSI score was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the protein expression levels of Col-II, PINK1, Parkin and LC3B in cartilage tissue were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), while the protein expression levels of IL-1 $\beta$ , MMP13 and p62 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the cartilage morphology of mice in tannic acid group was improved, OARSI score was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the protein expression levels of Col-II, PINK1, Parkin and LC3B in cartilage tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the protein expression levels of IL-1 $\beta$ , MMP13 and p62 were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The cell experiment results showed that IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte viability was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$ , MMP13 protein and mRNA expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ), Col-II protein and mRNA expression levels were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), LC3-II/I, PINK1, Parkin protein expression levels were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ), p62 protein expression level was significantly increased ( $P < 0.05$ ), intracellular ROS accumulation was increased ( $P < 0.01$ ), mitochondrial membrane potential was decreased ( $P < 0.01$ ), and autophagosome was decreased. Compared with model group, cell viability in tannic acid group was significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ), ROS accumulation significantly was decreased ( $P < 0.01$ ), mitochondrial membrane potential was recovered ( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ , MMP13 protein and mRNA expression levels were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), Col-II protein and mRNA expression levels were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ), p62 protein expression level was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), LC3-II/I, PINK1 and Parkin protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). After the combined use of mitochondrial autophagy inhibitor Mdivi-1, the therapeutic effect of tannic acid on chondrocytes was reversed ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Tannic acid alleviates articular cartilage damage and delays the progression of KOA by promoting chondrocyte mitophagy through PINK1/Parkin signaling pathway.

**Key words:** tannic acid; knee osteoarthritis; chondrocyte; mitophagy; PINK1/Parkin pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性退行性关节疾病, 其特征为关节软骨进行性破坏、软骨下骨异常重塑、骨赘形成及滑膜炎症<sup>[1]</sup>。关节疼痛、肿胀和僵硬是 KOA 的主要临床症状, 随着病情的持续进展, 严重者可能出现关节畸形甚至关节功能丧失<sup>[2]</sup>。近年来, 线粒体自噬被发现在 KOA 的预防和治疗中起着重要的调控作用<sup>[3]</sup>。线粒体自噬是一种特殊的自噬类型, 通过选择性自噬清除受损或功能障碍线粒体来维持线粒体稳态及细胞生理功能<sup>[4]</sup>。研究报道, KOA 患者软骨中的线粒体自噬水平显著低于健康软骨, 而提升线粒体自噬水平能够减轻 KOA 动物软骨细胞损伤, 表明线粒体自噬对维持软骨细胞稳态和功能至关重要<sup>[5]</sup>。线粒体自噬的发生受到多种信号通路与分子机制的共同调控, 其中 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) /帕金蛋白 (Parkin) 通路被认为是线粒体自噬中最为重要的信号通路之一<sup>[6]</sup>, 因此, 靶向激活 PINK1/Parkin 通路重建线粒体自噬

稳态, 可能为 KOA 治疗提供新型干预策略。

目前 KOA 的药物治疗主要依赖非甾体抗炎药和皮质类固醇, 这些药物虽能短期缓解症状, 却无法逆转疾病进展, 长期使用还伴随诸多不良反应<sup>[7]</sup>。因此, 多数患者病情仍会进展至晚期, 最终需要通过膝关节置换手术来恢复功能, 给患者和社会带来了巨大的经济和医疗负担, 凸显了开发更有效、低毒性的 KOA 治疗药物的迫切需求。中医药凭借其独特的理论框架、低毒性和个体化治疗的优势, 长期以来被广泛应用于 KOA 的防治<sup>[8]</sup>。中药及其生物活性成分 (如槲皮素、姜黄素和淫羊藿苷) 为开发安全有效的抗 KOA 疗法提供了宝贵资源<sup>[9-11]</sup>。鞣酸是一类天然存在的多酚类化合物, 广泛存在于五倍子、大黄、葡萄和石榴等药用及食用植物中<sup>[12]</sup>。研究表明, 鞣酸具有强效的抗炎和抗氧化作用, 在体内外 KOA 模型中均表现出显著的软骨保护作用<sup>[13]</sup>, 然而其治疗 KOA 的具体作用机制目前尚不明确。鞣酸纳米制剂 (如鞣酸-钕纳米酶)<sup>[14]</sup>及其他多酚类化合

物(如石榴中的可水解鞣质 punicalagin)<sup>[15]</sup>可通过调控线粒体质量控制过程(包括线粒体自噬)发挥细胞保护效应,提示鞣酸可能同样与线粒体稳态调节存在潜在关联。本研究通过建立小鼠 KOA 模型和软骨细胞验证实验,探讨鞣酸是否能通过 PINK1/Parkin 信号通路促进软骨细胞线粒体自噬来改善 KOA 的进展。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 32 只,10 周龄,体重质量(25±5)g,购自浙江中医药大学实验动物中心,实验动物许可证号 SYXK(浙)2021-0012。小鼠饲养于浙江中医药大学实验动物中心,温度(22±2)℃,相对湿度 50%~60%,昼夜交替照明 12 h,自由进食饮水,适应性喂养 1 周。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(批准号 20220822-11)。

小鼠 ATDC5 软骨细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

鞣酸(批号 MKCL9142,质量分数≥99%)购自美国 Sigma 公司;基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)抗体(批号 ab39012)、II 型胶原蛋白(collagen II, Col-II)抗体(批号 ab34712)、p62 抗体(批号 ab109012)、β-actin 抗体(批号 ab181602)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)抗体购自英国 Abcam 公司;PINK1 抗体(批号 WL04963)、Parkin 抗体(批号 WL02512)购自沈阳万类生物科技有限公司;微管相关蛋白轻链 3B(microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B)抗体(批号 83506S)购自美国 CST 公司;重组小鼠 IL-1β 蛋白(批号 211-11B-10UG)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1(批号 M0199)购自美国默克公司;山羊抗兔重组二抗(批号 RGAR001)购自武汉三鹰生物技术公司;CCK-8 试剂盒(批号 C0038)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 S0033S)、RIPA 裂解液(批号 P0013K)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 P0011)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;番红 O-固绿染色试剂盒(批号 G1371)、甲苯胺蓝试剂盒(批号 G3660)、JC-1 检测试剂盒(批号 M8650)购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM/F-12 培养基(批号 2963840)购自美国 Gibco 公司。

## 1.3 仪器

Bruker Skyscan 1172 型高分辨微型 CT 系统(比利时 Bruker 公司);HT7700 型透射电镜(日本日立公司);VersaMax 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];Tanon-5300M 型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司);DM3000 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模与给药

C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组和鞣酸低、高剂量(25、50 mg/kg)<sup>[16]</sup>组,每组 8 只。除假手术组外,其余小鼠均接受内侧半月板切除手术。小鼠 ip 0.3%戊巴比妥(0.01 mL/g)麻醉,术区进行剃毛处理,确保小鼠处于仰卧位,左后肢屈膝 90° 固定。术区进行充分消毒后,剪开皮肤暴露髌韧带,使用尖刀剪在髌韧带内缘处小心切开发节囊,并用钝性手法清理关节腔内脂肪组织。随后,通过内侧半月板与胫骨平台相连的内侧半月板胫副韧带进行切断。术后,冲洗创口并用 3-0 手术缝线逐层缝合关节腔和皮肤,创口外敷阿莫西林预防感染。假手术组仅进行关节囊剖开后逐层缝合,无其他操作。术后观察小鼠麻醉苏醒情况以及伤口愈合过程。于术后 24 h 开始,各给药组 ig 相应药物,假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 8 周。

### 2.2 Micro-CT 扫描分析小鼠膝关节骨微结构

将小鼠膝关节样本置于 Micro-CT 仪中进行扫描分析(扫描层厚为 10 μm)。利用软件完成图像 3D 重构,观察膝关节骨赘形成、软骨下骨硬化情况,进一步对骨微结构定量分析:骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)和骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)。

### 2.3 番红 O-固绿染色观察小鼠膝关节软骨病理变化

膝关节组织置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,随后进行脱钙、脱水及包埋处理,制作成 3 μm 厚度的石蜡切片后,置于二甲苯溶液中脱蜡 10 min,梯度乙醇复水。切片置于 Weigert 染液中浸染 5 min,蒸馏水洗 1 min,酸性分化液 15 s,蒸馏水洗 3 min,随后放入固绿染液浸染 5 min,酸洗后置于番红染液中浸染 5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明并树脂封片固定,次日置于显微镜下观察并拍照。

#### 2.4 甲苯胺蓝染色观察小鼠膝关节软骨病理变化

小鼠膝关节石蜡切片脱蜡复水后，蒸馏水洗 3 次，每次 1 min，置于甲苯胺蓝染液中染色 10 min；蒸馏水洗 3 次，每次 1 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明后用树脂封片，次日置于显微镜下观察并拍照。

#### 2.5 免疫组化检测膝关节软骨组织相关蛋白表达

小鼠膝关节石蜡切片置于柠檬酸钠缓冲液中热修复 4 h，PBS 清洗 3 次，每次 3 min，置于 0.1% Triton X-100 溶液中 10 min，滴加内源性过氧化物酶室温孵育 20 min；PBS 清洗 3 次，每次 3 min，滴加一抗 Col-II (1 : 1 000)、MMP13 (1 : 100)、IL-1 $\beta$  (1 : 100)、LC3B (1 : 100)、p62 (1 : 200)、PINK1 (1 : 100) 和 Parkin (1 : 100)，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日，加入二抗于 37  $^{\circ}$ C 孵育 20 min，PBS 冲洗，DAB 工作液显色，透明封片后，于显微镜下观察并拍照，利用 Image J 软件分析阳性表达情况。

#### 2.6 软骨细胞培养及造模

ATDC5 软骨细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基，于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养，待细胞长至融合度为 80%~90% 时，用 10 ng/mL 的 IL-1 $\beta$  干预 24 h，构建软骨细胞骨关节炎模型。

#### 2.7 软骨细胞活力检测

将 ATDC5 软骨细胞以 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 6 孔板中，分别加入含 IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 及不同质量浓度 (0、0.1、1、10、100、1 000  $\mu$ g/mL) 鞣酸的培养基，对照组加入不含药物的培养基，每组设 3 个复孔。干预 24 h 后，弃去培养基，每孔加入含 10% CCK-8 试剂的培养基，避光孵育 2 h。使用酶标仪于 450 nm 波长下测定吸光度 (A) 值，计算细胞活力，确定鞣酸作用的最佳质量浓度。

#### 2.8 软骨细胞中 ROS 水平的检测

将 ATDC5 软骨细胞接种于 6 孔板中，分别加入 IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 或鞣酸 (1  $\mu$ g/mL) 处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。弃去培养基，加入含 0.1% DCFH-DA 的无血清培养基室温避光孵育 20 min；无血清培养基洗涤 3 次，在荧光显微镜下观察 ROS 荧光表达情况，并利用 Image J 软件计算平均荧光强度。

#### 2.9 JC-1 检测软骨细胞线粒体膜电位变化

按“2.8”项下方法进行处理后，按照 JC-1 试剂盒说明书，加入 JC-1 染色工作液，于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20 min。离心弃上清，加入染色缓冲液洗

涤，荧光显微镜下观察线粒体膜电位变化。

#### 2.10 Western blotting 检测软骨细胞 Col-II、MMP13、IL-1 $\beta$ 蛋白表达

按“2.8”项下方法进行处理后，用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次，每孔加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，冰上裂解 30 min，12 000 $\times$ g 离心 15 min，取上清，利用 BCA 法测定蛋白浓度，与 5 $\times$  SDS 上样缓冲液混合，沸水煮 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10% 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 1 h，加入一抗，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，加入 HRP 标记的二抗，室温孵育 1 h。滴加增强型化学发光试剂，于凝胶成像系统显影，采用 Image J 软件分析目标条带灰度值。

#### 2.11 qRT-PCR 检测软骨细胞相关基因表达

按“2.8”项下方法进行处理后，用预冷 PBS 洗涤，利用 Trizol 试剂分离提取总 mRNA，反转录合成 cDNA。按照 SYBR Green 核酸检测试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 检测。以  $\beta$ -actin 为内参基因，采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
MMP13	F: CTTCTTGTTGAGCTGGACTC R: CTGTGGAGGTCAGTGTAGACT
Col-II	F: CCAGCTGACCTCGCCACTGA R: GGGTCCAGGCGCACCCCTTTT
IL-1 $\beta$	F: GTACATCAGCACCTCACAAAG R: CACAGGCTCTCTTTGAACAG
$\beta$ -actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA R: GACTCATCGTACTCCTTGCTGCTG

#### 2.12 透射电镜检测软骨细胞线粒体超微结构

将 ATDC5 软骨细胞接种于 6 孔板中，设置对照组、模型组、鞣酸组和鞣酸+Mdivi-1 组。对照组加入不含药物的培养基，模型组加入含 10 ng/mL IL-1 $\beta$  的培养基，鞣酸组加入含 10 ng/mL IL-1 $\beta$  和 1  $\mu$ g/mL 鞣酸的培养基，鞣酸+Mdivi-1 组加入含 10 ng/mL IL-1 $\beta$ 、1  $\mu$ g/mL 鞣酸和 50  $\mu$ mol/L Mdivi-1 的培养基，处理 24 h。收集细胞，先后置于 2.5% 戊二醛、1% 四氧化锇中固定 2 h 和 1 h。冲洗、脱水和烘烤后，用超薄切片机切成 60 nm 超薄切片，经乙酸铀酰和柠檬酸铅染色，用透射电子显微镜观察自噬小体形成情况。

### 2.13 Western blotting 检测 Mdivi-1 对软骨细胞 Col-II、MMP13、IL-1 $\beta$ 、LC3II/I、p62、PINK1 和 Parkin 蛋白表达的影响

将 ATDC5 软骨细胞接种于 6 孔板中，设置对照组、模型组、鞣酸组、鞣酸+Mdivi-1 组和 Mdivi-1 组。按“2.12”项下方法处理 24 h，收集细胞。按“2.10”项下方法检测相关蛋白表达。

### 2.14 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析，所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。若方差齐，则采用最小显著性差异法 (LSD) 进行事后两两比较；若方差不齐，则采用 Dunnett's T3 检验进行两两比较。

## 3 结果

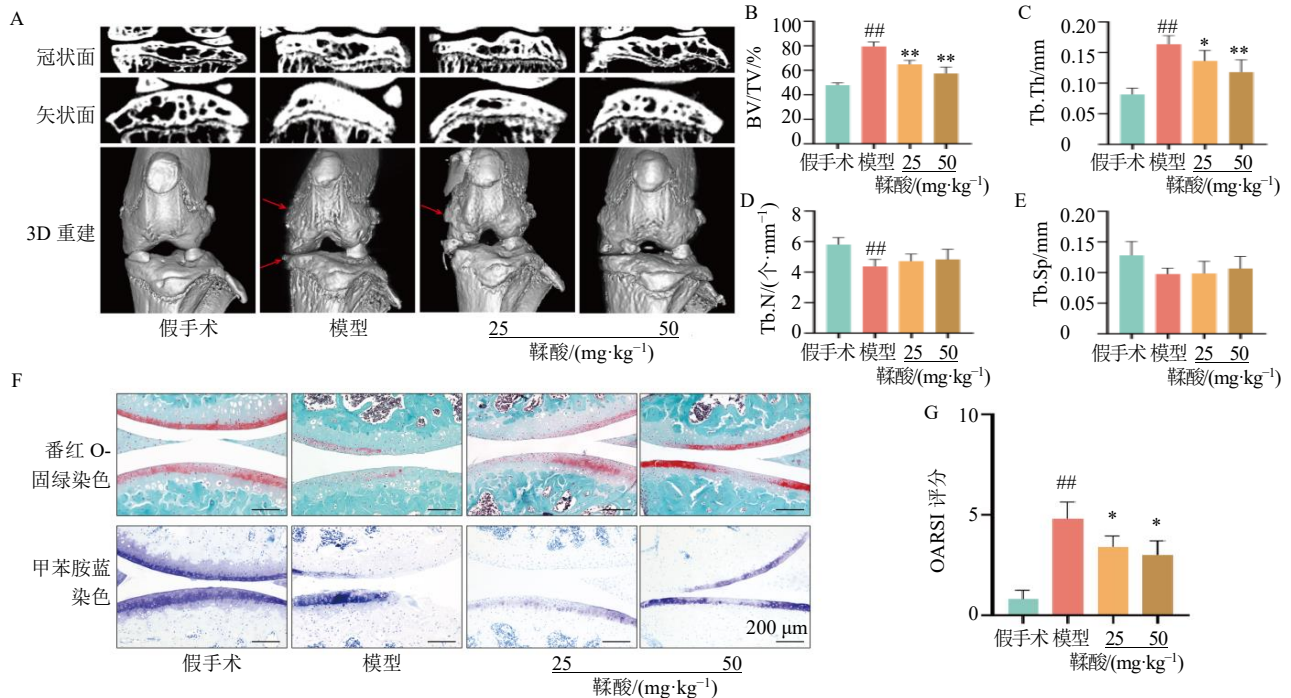
### 3.1 鞣酸减轻 KOA 小鼠膝关节软骨组织的病理变化

Micro-CT 扫描结果 (图 1-A) 显示，与假手术组比较，模型组小鼠膝关节出现胫骨软骨下骨硬化及大量骨赘形成；经鞣酸治疗后，上述病理改变得

到显著改善。骨微结构定量分析 (图 1-B~E) 表明，与假手术组比较，模型组小鼠 BV/TV 和 Tb.Th 显著升高 ( $P < 0.01$ )，Tb.N 显著降低 ( $P < 0.01$ )，Tb.Sp 呈降低趋势；与模型组比较，鞣酸各剂量组小鼠 BV/TV 和 Tb.Th 显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，Tb.N 和 Tb.Sp 无显著差异。组织形态学染色结果 (图 1-F) 进一步证实，模型组小鼠关节软骨存在基质丢失、表面纤维化及软骨细胞排列紊乱；给予鞣酸治疗后增强了基质染色强度，改善了软骨结构完整性。基于组织学的 OARSI 评分分析 (图 1-G) 显示，与模型组比较，鞣酸各剂量组小鼠 OARSI 评分均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 鞣酸减轻 KOA 小鼠膝关节软骨基质损伤并抑制软骨炎症

如图 2 所示，与假手术组比较，模型组小鼠软骨组织中 Col-II 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，MMP13 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，鞣酸各剂量组小鼠软骨组织中 Col-II 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )，MMP13 和



A-膝关节软骨下骨的二维 (冠状面和矢状面) 及三维微计算机断层扫描重建，红色箭头指示骨赘形成；B~E-软骨下骨参数的定量分析；F-番红 O-固绿染色和甲苯胺蓝染色的膝关节软骨代表性组织学图像 ( $\times 200$ )；G-OARSI 评分；与假手术组比较：<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ，图 2、3 同。

A-two-dimensional (coronal and sagittal) and three-dimensional micro-computed tomography reconstructions of subchondral bone in knee joint, red arrows indicate osteophyte formation; B-E-quantitative analysis of subchondral bone parameters; F-representative histological images of knee joint cartilage stained with safranin O-fast green and toluidine blue ( $\times 200$ ); G-OARSI scores; <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs sham group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group, same as Figs. 2, 3.

图 1 鞣酸减轻 KOA 小鼠膝关节软骨的病理变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Tannic acid attenuates pathological changes in articular cartilage in KOA mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

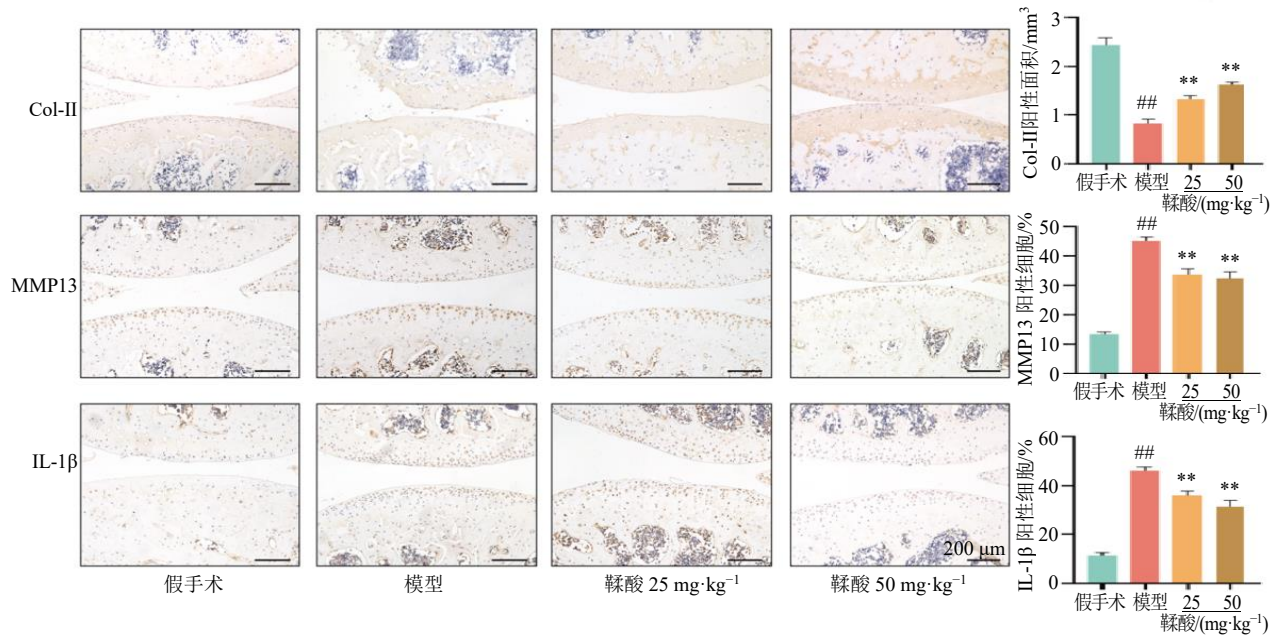


图2 鞣酸减轻 KOA 小鼠膝关节软骨基质损伤并抑制软骨炎症 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Tannic acid reduces knee cartilage matrix damage and inhibits cartilage inflammation in KOA mice (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

IL-1β 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.3 鞣酸上调 KOA 小鼠膝关节软骨组织中线粒体自噬相关蛋白的表达

采用免疫组化法检测各组小鼠膝关节软骨中

线粒体自噬通路关键蛋白 PINK1、Parkin、LC3B、p62 的表达情况, 如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠软骨组织中 PINK1、Parkin、LC3B 的阳性表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 p62 的阳性表达明

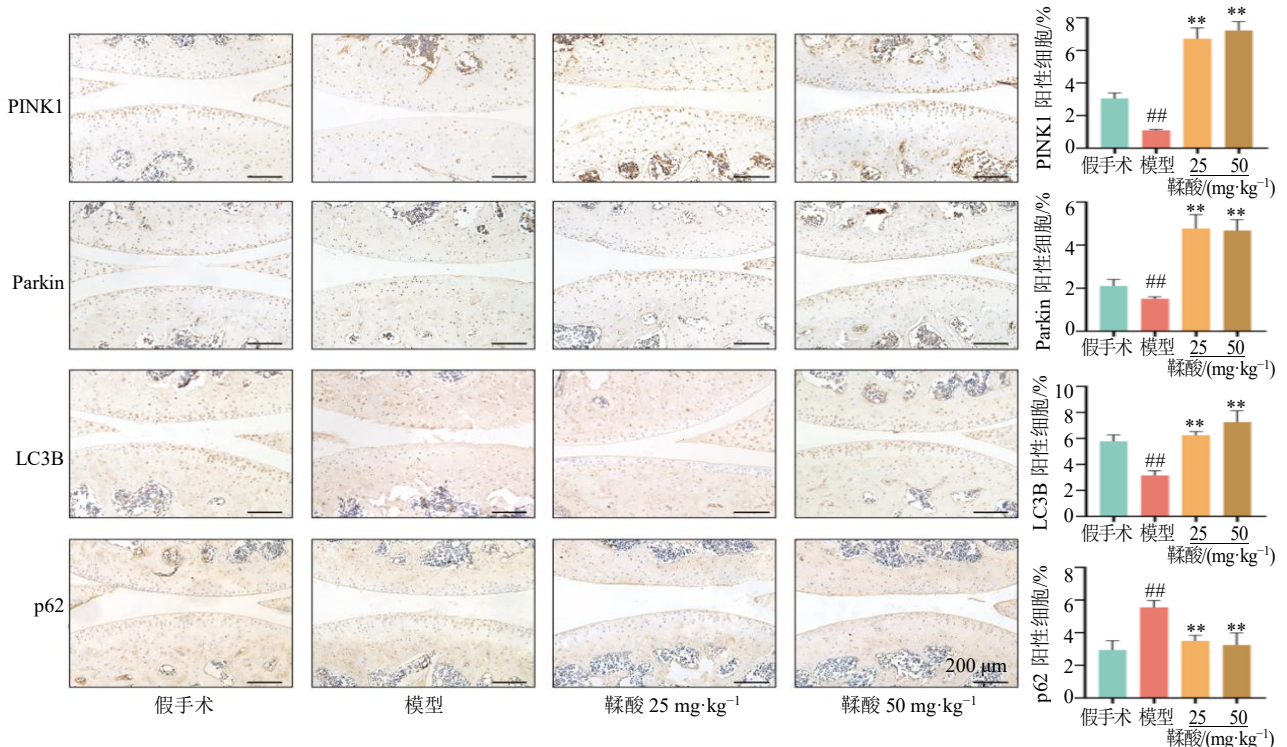


图3 鞣酸上调 KOA 小鼠膝关节组织中 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬标志物的表达 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Tannic acid upregulates expressions of PINK1/Parkin-mediated mitophagy markers in articular cartilage of KOA mice (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

显升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，鞣酸各剂量组小鼠软骨组织中 PINK1、Parkin 和 LC3B 的阳性表达显著升高 ( $P < 0.01$ )，p62 的阳性表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。

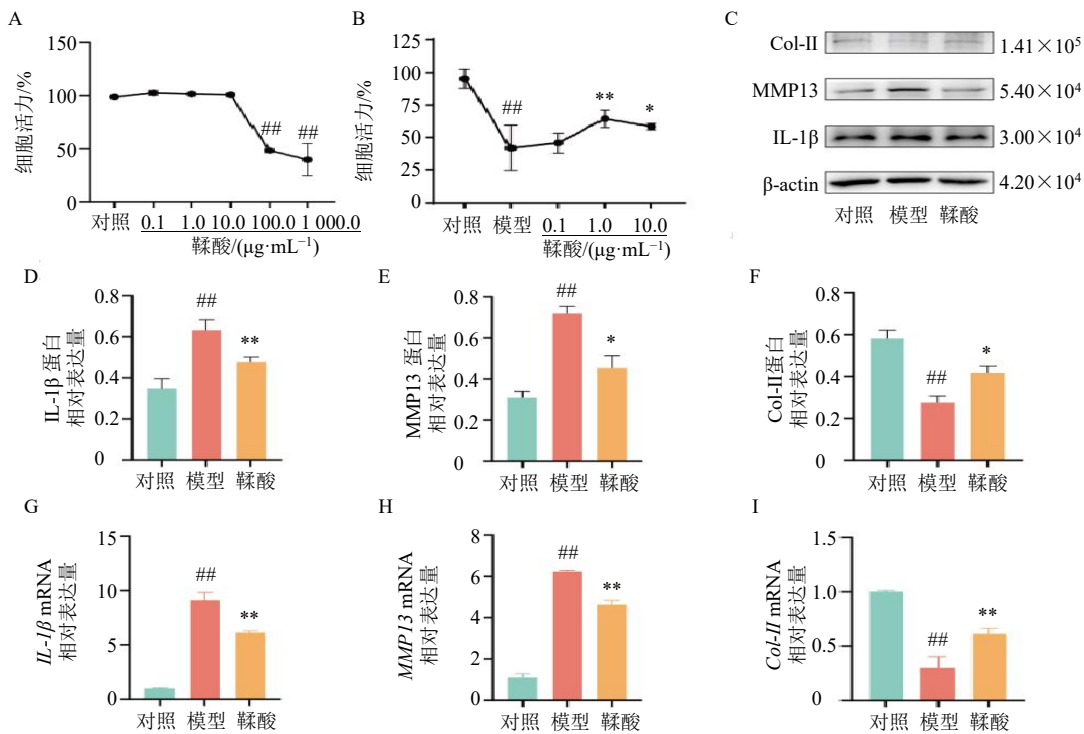
### 3.4 鞣酸对 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞活力、基质代谢及炎症反应的影响

如图 4-A 所示，0.1~10.0  $\mu\text{g/mL}$  鞣酸对小鼠软骨细胞活性无明显影响，100.0、1 000.0  $\mu\text{g/mL}$  鞣酸显著抑制细胞活力 ( $P < 0.01$ )。随后用 0.1~10.0  $\mu\text{g/mL}$  鞣酸处理经 IL-1 $\beta$  刺激的小鼠软骨细胞，如图 4-B 所示，IL-1 $\beta$  刺激显著抑制软骨细胞活力 ( $P < 0.01$ )，而鞣酸能够恢复软骨细胞活力，其中 1.0  $\mu\text{g/mL}$  作用最为显著 ( $P < 0.01$ )，因此采用 1.0  $\mu\text{g/mL}$  鞣酸进行后续实验。Western blotting 和 qRT-PCR 结果 (图 4-C~I) 显示，与对照组比较，模型组 Col-II 的蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，MMP13 和 IL-1 $\beta$  的蛋白和 mRNA 表达水平

显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，鞣酸显著上调 Col-II 的蛋白和 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、0.01)，同时显著下调 MMP13 和 IL-1 $\beta$  的蛋白和 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

### 3.5 鞣酸缓解 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞线粒体功能障碍

如图 5-A、B 所示，与对照组比较，IL-1 $\beta$  刺激显著升高软骨细胞内 ROS 水平 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，经鞣酸处理后 ROS 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )；鞣酸与线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 联合处理显著减弱了鞣酸对 ROS 的清除作用 ( $P < 0.05$ )。如图 5-C、D 所示，与对照组比较，IL-1 $\beta$  刺激导致线粒体膜电位显著下降 ( $P < 0.01$ )，表现为 JC-1 聚合物 (红色荧光) 与单体 (绿色荧光) 比值降低；与模型组比较，经鞣酸处理后线粒体膜电位显著升高 ( $P < 0.05$ )，而联合 Mdivi-1 处理则削弱了鞣酸对线粒体膜电位的恢复效应 ( $P < 0.05$ )。



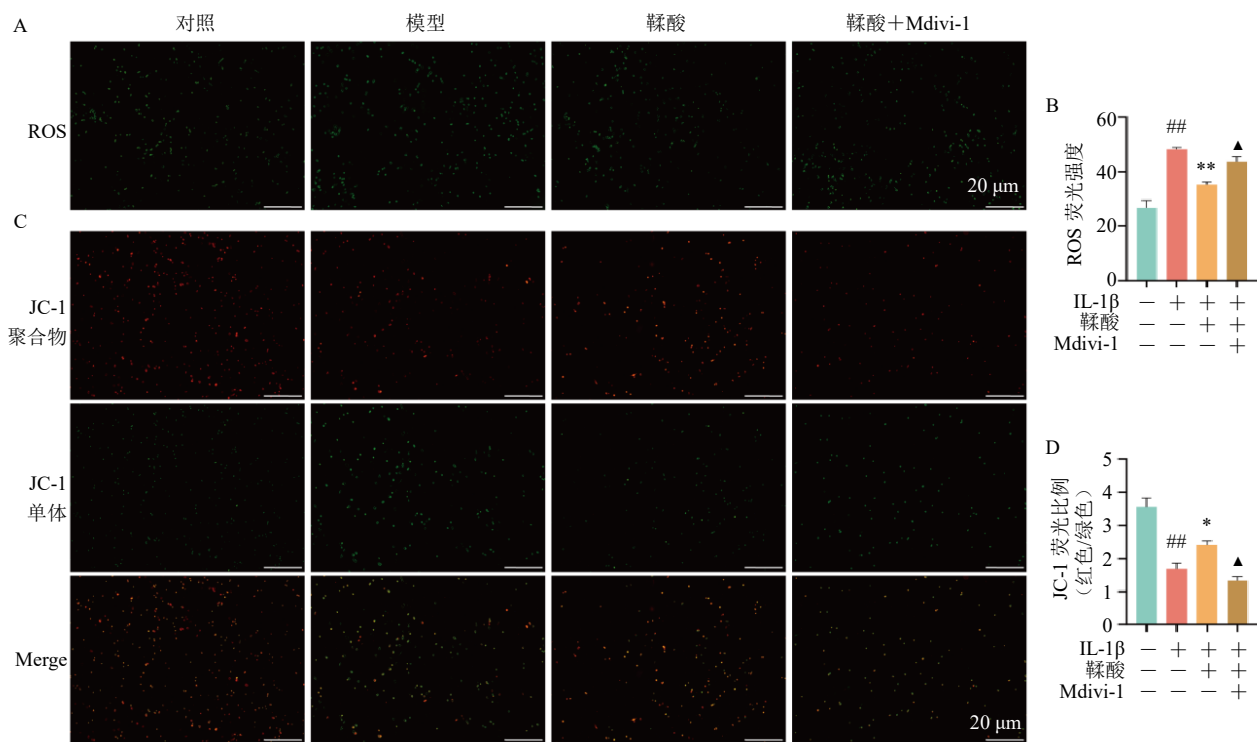
A-不同质量浓度的鞣酸对软骨细胞活力的影响；B-不同质量浓度的鞣酸对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞活力的影响；C~F-Western blotting 检测 Col-II、MMP13 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达；G~I-qRT-PCR 检测 Col-II、MMP13 和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达；与对照组比较：## $P < 0.01$ ；与模型组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

A-effect of different concentrations of tannic acid on chondrocyte viability; B-effect of different concentrations of tannic acid on IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte viability; C~F-Col-II, MMP13 and IL-1 $\beta$  protein expressions detected by Western blotting; G~I-Col-II, MMP13 and IL-1 $\beta$  mRNA expressions detected by qRT-PCR; ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 4 鞣酸对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞活力、基质代谢及炎症反应的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of tannic acid on cell viability, matrix metabolism and inflammatory response in IL-1 $\beta$ -induced chondrocytes

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A、B-免疫荧光检测 ROS 水平 (×40)；C、D-免疫荧光检测线粒体膜电位变化 (×40)；与对照组比较：<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ；与鞣酸组比较：<sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。  
A, B-ROS level detected by immunofluorescence (× 40)；C, D-changes in mitochondrial membrane potential detected by immunofluorescence (× 40)；<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group；<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group；<sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs tannic acid group.

图 5 鞣酸缓解 IL-1β 诱导的软骨细胞线粒体功能障碍 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Tannic acid rescues mitochondrial dysfunction in IL-1β-induced chondrocytes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

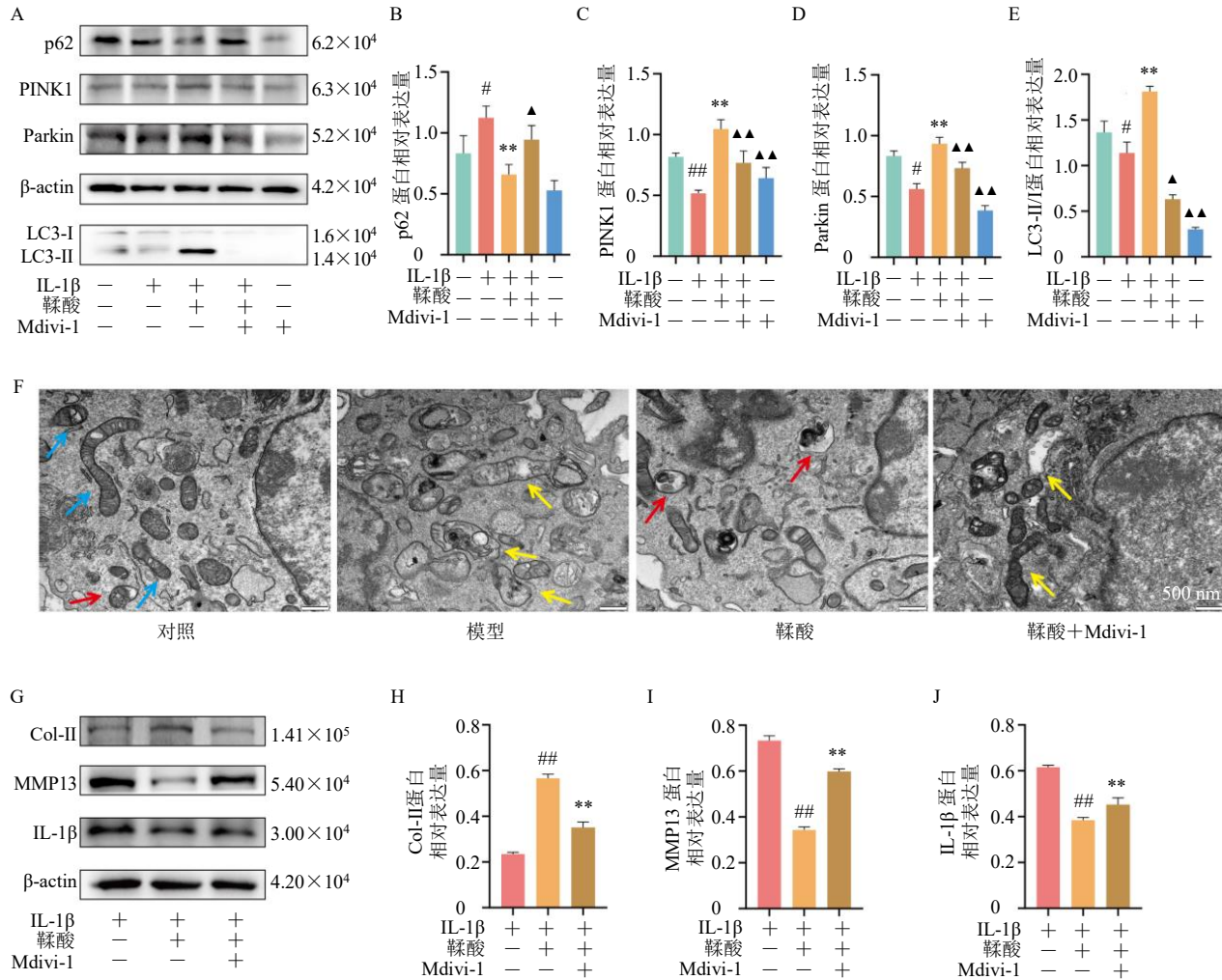
### 3.6 鞣酸通过激活 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞分解代谢

如图 6-A~E 所示，与对照组比较，IL-1β 刺激后软骨细胞中 PINK1、Parkin 和 LC3-II/I 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )，p62 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，给予鞣酸干预后 PINK1、Parkin 和 LC3-II/I 的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )，p62 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；鞣酸与线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 联合处理后，鞣酸对上述蛋白表达的调节作用被显著减弱 ( $P < 0.05, 0.01$ )。透射电镜结果 (图 6-F) 显示，与对照组比较，模型组软骨细胞中线粒体呈现肿胀、嵴结构破坏的形态，且视野内未见典型自噬体；与模型组比较，鞣酸组软骨细胞中受损线粒体减少，并可见受损线粒体被双层膜结构的自噬体包裹，形成典型的自噬结构；而在鞣酸与线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 联合处理组中，受损线粒体增多，未见明显的自噬结构。同时 Western blotting 结果 (图 6-G~J) 显示，与模型组比较，鞣酸组 Col-II 的蛋白表达

水平显著升高 ( $P < 0.01$ )，MMP13 和 IL-1β 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；与鞣酸组比较，鞣酸联合 Mdivi-1 处理能够显著下调 Col-II 的蛋白表达 ( $P < 0.01$ )，同时显著上调 MMP13 和 IL-1β 的蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。

### 4 讨论

KOA 是一种以进行性软骨破坏、滑膜炎症及软骨下骨重塑异常为特征的退行性关节疾病<sup>[17]</sup>。目前，临床尚缺乏能够有效延缓或逆转 KOA 进展的特效药物。本研究聚焦于天然多酚化合物鞣酸，旨在探讨其对 KOA 小鼠膝关节的保护作用及潜在药理机制，为未来抗 KOA 药物研发提供参考。本研究通过 Micro-CT 和组织形态学染色分析证实，鞣酸可有效缓解 KOA 小鼠膝关节的软骨退变、软骨下骨硬化及骨赘形成，且上述改善作用呈剂量相关性。免疫组化结果显示鞣酸能够减轻 KOA 小鼠软骨基质损伤，同时上调线粒体自噬关键蛋白 PINK1、Parkin、LC3B 蛋白和下调 p62 蛋白表达。体外实验进一步证实，鞣酸显著逆转 IL-1β 诱导的



A~E-Western blotting 检测 p62、PINK1、Parkin 和 LC3-II/I 蛋白表达; F-软骨细胞内超微结构的代表性透射电子显微镜图像, 蓝色箭头表示正常线粒体, 黄色箭头表示肿胀或空泡化的线粒体, 红色箭头表示自噬线粒体; G~J-Western blotting 检测 Col-II、MMP13 和 IL-1β 蛋白表达; 与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与鞣酸组比较: ^ $P < 0.05$  ^^ $P < 0.01$ 。

A~E-p62, PINK1, Parkin and LC3-II/I protein expressions detected by Western blotting; F-representative transmission electron microscopy images of ultrastructure in chondrocytes, blue arrows indicate normal mitochondria, yellow arrows indicate swollen or vacuolated mitochondria, and red arrows indicate mitophagosomes; G~J-Col-II, MMP13 and IL-1β protein expressions detected by Western blotting; ## $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group; ^ $P < 0.05$  ^^ $P < 0.01$  vs tannic acid group.

图 6 鞣酸通过激活 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬抑制 IL-1β 诱导的软骨细胞分解代谢 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Tannic acid inhibits IL-1β-induced chondrocyte catabolism by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

软骨细胞代谢失衡, 上调 Col-II 并下调 MMP13、IL-1β 的蛋白与 mRNA 表达。同时, 鞣酸能有效清除软骨细胞内 ROS, 恢复其线粒体膜电位, 并调控 PINK1、Parkin、LC3-II/I、p62 蛋白表达和促进自噬小体的形成。然而, 在联合使用线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 后, 鞣酸纠正软骨细胞代谢失衡以及改善软骨基质降解的效应被阻断。动物和细胞实验结果表明, 鞣酸通过 PINK1/Parkin 信号通路促进软骨细胞线粒体自噬, 从而改善 KOA。

线粒体是真核细胞中主导三羧酸循环和氧化磷酸化的细胞器, 其功能与多种决定细胞命运的生物过程密切相关。然而, 在 KOA 病理环境刺激下, 软骨细胞线粒体发生损伤, 进而触发三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 生成减少、ROS 水平升高、线粒体膜电位降低及 DNA 损伤等。上述改变会进一步加剧炎症和氧化应激反应, 最终导致软骨合成分解失衡、软骨退变<sup>[18]</sup>。线粒体自噬能够选择性清除受损线粒体, 打破氧化应激/炎症环境-线

粒体损伤-ROS 堆积、线粒体膜电位降低的恶性循环,恢复软骨细胞稳态平衡<sup>[19]</sup>。大量文献证实,线粒体自噬在维持关节软骨稳态的重要作用,而其自噬障碍会导致 KOA 发生及进展<sup>[20-21]</sup>。部分中药及其有效成分能够通过激活软骨细胞线粒体自噬来延缓小鼠 KOA 进展<sup>[10,22]</sup>。目前,已有关于鞣酸及其纳米制剂调控线粒体自噬的报道<sup>[4,23]</sup>,但其在防治 KOA 中的作用机制仍不清楚。本研究发现,鞣酸能够促进 KOA 小鼠膝关节软骨和 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞 Col-II 表达、抑制 MMP13 表达,表明其能够纠正 KOA 软骨细胞代谢失衡及软骨基质降解。同时,鞣酸能够显著降低 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞内 ROS 积累、恢复线粒体膜电位,促进自噬标志物 LC3-II/I 表达与自噬底物 p62 降解。然而,鞣酸清除软骨细胞 ROS 以及恢复线粒体膜电位的作用能够被线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 阻断。同时观察到鞣酸联合 Mdivi-1 干预后,软骨细胞 Col-II 表达下降,IL-1 $\beta$  和 MMP13 表达升高,即其纠正软骨细胞代谢失衡以及改善软骨基质降解的效应被阻断。以上结果表明,鞣酸改善 KOA 小鼠膝关节软骨退变可能是通过激活线粒体自噬功能、清除 ROS 堆积、恢复线粒体膜电位,来纠正软骨细胞代谢失衡及软骨基质降解。

PINK1/Parkin 信号通路是调控线粒体自噬的经典途径<sup>[6,24]</sup>。其核心机制在于当线粒体受损、膜电位降低时,PINK1 会积聚在线粒体外膜,进而募集和磷酸化 E3 泛素连接酶 Parkin。被激活的 Parkin 会对受损线粒体进行泛素化标记,使其能够被自噬小体识别并包裹,最终被溶酶体吞噬降解,以恢复细胞稳态<sup>[25]</sup>。文献报道,KOA 患者的膝关节软骨中 Parkin 蛋白表达显著下降<sup>[26]</sup>;经 IL-1 $\beta$  处理的软骨细胞 Parkin 表达减少,并会导致细胞代谢异常、凋亡增加<sup>[27]</sup>。动物实验证实,激活 PINK1/Parkin 信号通路能够有效改善 KOA 小鼠的关节软骨退变。由此可见,PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬在维持软骨细胞稳态平衡的重要作用。本研究发现,鞣酸在 KOA 小鼠关节软骨及 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞中均能有效激活 PINK1/Parkin 通路,表现为 PINK1 与 Parkin 蛋白表达上调,并进一步促进自噬相关蛋白 LC3B 表达及 p62 降解。同时,透射电镜观察显示鞣酸组软骨细胞内自噬小体数量显著增加,进一步证实线粒体自噬被激活。然而,当使用 Mdivi-1 阻断该通路后,鞣酸对软骨细胞线粒体自

噬的调控作用被显著抑制。上述结果表明,鞣酸通过激活 PINK1/Parkin 信号通路来促进软骨细胞线粒体自噬。

本研究仍存在若干局限性。首先,鞣酸能够促进软骨细胞 PINK1/Parkin 信号通路,但是鞣酸是直接作用于 PINK1/Parkin 蛋白,还是通过调控其他分子间接影响,还需进一步研究阐明。未来可利用分子对接、表面等离子共振等技术探寻鞣酸的直接作用靶点。其次,本研究尚未系统评估鞣酸在小鼠体内的口服生物利用度、药动学特征及长期安全性。最后,基于 IL-1 $\beta$  诱导软骨细胞模型得出的“鞣酸通过 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬”这一机制,尚未在动物模型中通过基因敲除或抑制剂等手段进行反向验证。后续可在体内实验中进一步确认该通路的必要性。

综上,本研究通过体内外实验发现鞣酸通过 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬来清除损伤线粒体、减少 ROS 堆积,进而恢复软骨细胞稳态平衡,延缓 KOA 进展。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Fu W Y, Vasylyev D, Bi Y F, *et al.* Na(v)<sub>1.7</sub> as a chondrocyte regulator and therapeutic target for osteoarthritis [J]. *Nature*, 2024, 625(7995): 557-565.
- [2] 中华中医药学会. 膝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.
- [3] 运行,魏民,魏钰. 线粒体自噬机制及其对骨关节炎的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27(23): 2166-2169.
- [4] Lin J N, Chen X Y, Du Y Y, *et al.* Mitophagy in cell death regulation: Insights into mechanisms and disease implications [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(10): 1270.
- [5] D'Amico D, Olmer M, Fouassier A M, *et al.* Urolithin A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis [J]. *Ageing Cell*, 2022, 21(8): e13662.
- [6] Narendra D P, Youle R J. The role of PINK1-Parkin in mitochondrial quality control [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(10): 1639-1651.
- [7] D'Arcy Y, Mantyh P, Yaksh T, *et al.* Treating osteoarthritis pain: Mechanisms of action of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, opioids, and nerve growth factor antibodies [J]. *Postgrad Med*, 2021, 133(8): 879-894.
- [8] Li W H, Yu L, Li W M, *et al.* Prevention and treatment of inflammatory arthritis with traditional Chinese medicine:

- Underlying mechanisms based on cell and molecular targets [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 89: 101981.
- [9] Hu Y, Gui Z P, Zhou Y N, *et al.* Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 146-160.
- [10] Jin Z Z, Chang B H, Wei Y L, *et al.* Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113092.
- [11] Xiao J, Luo C G, Li A M, *et al.* Icariin inhibits chondrocyte ferroptosis and alleviates osteoarthritis by enhancing the SLC7A11/GPX4 signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112010.
- [12] Wang J, Chen X L, Chen Y, *et al.* Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113561.
- [13] Soyocak A, Kurt H, Turgut Cosan D, *et al.* Tannic acid exhibits anti-inflammatory effects on formalin-induced paw edema model of inflammation in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(11): 1296-1301.
- [14] Fu H Y, Wang Y H, Huang B Q, *et al.* Tannic acid-cerium nanoenzymes serve as broad-spectrum antioxidants to alleviate acute kidney injury by modulating macrophage polarization, mitophagy and endoplasmic reticulum stress [J]. *J Control Release*, 2025, 380: 892-909.
- [15] Cao Y, Chen J H, Ren G F, *et al.* Punicalagin prevents inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages by inhibiting FoxO3a/autophagy signaling pathway [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2794.
- [16] Zhang J P, Song Q T, Han X, *et al.* Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47: 95-105.
- [17] Gelber A C. Knee osteoarthritis [J]. *Ann Intern Med*, 2024, 177(9): ITC129-ITC144.
- [18] Liu D, Cai Z J, Yang Y T, *et al.* Mitochondrial quality control in cartilage damage and osteoarthritis: New insights and potential therapeutic targets [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2022, 30(3): 395-405.
- [19] Wang G C, Zhang X, Xu J T, *et al.* The role of mitochondrial autophagy in osteoarthritis [J]. *iScience*, 2024, 27(9): 110741.
- [20] Liu L, Zhang W Y, Liu T H, *et al.* The physiological metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102663.
- [21] Sun K, Jing X Z, Guo J C, *et al.* Mitophagy in degenerative joint diseases [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2082-2092.
- [22] Kong X Y, Ning C, Liang Z, *et al.* Koumine inhibits IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte inflammation and ameliorates extracellular matrix degradation in osteoarthritic cartilage through activation of PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116273.
- [23] Wang X F, Hu B F, Hu H M, *et al.* Tannic acid suppresses HBV replication via the regulation of NF- $\kappa$ B, MAPKs, and autophagy in HepG2.2.15 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(29): 11069-11079.
- [24] 于利凯, 苏子珊, 刘尚齐, 等. 基于机械应力介导的 PINK1/Parkin 途径探讨汉黄芩素改善膝骨关节炎软骨损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(22): 8188-8200.
- [25] Onishi M, Yamano K, Sato M, *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): EMBJ2020104705.
- [26] Xu L, Wu Z, He Y, *et al.* MFN2 contributes to metabolic disorders and inflammation in the aging of rat chondrocytes and osteoarthritis [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2020, 28(8): 1079-1091.
- [27] Maneiro E, Martín M A, de Andres M C, *et al.* Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(3): 700-708.

[责任编辑 李亚楠]