

基于 RhoA/ROCK 信号通路研究桔梗总皂苷对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响及作用机制

殷子越^{1,2,3}, 季佳庆^{1,2,3}, 赵海红^{1,4}, 樊健^{1,2,3*}

1. 同济大学医学院, 上海 200092

2. 同济大学附属同济医院 骨科, 上海 200065

3. 脊柱脊髓损伤再生修复教育部重点实验室, 上海 200065

4. 上海市杨浦区中心医院 骨科, 上海 200090

摘要: 目的 探讨桔梗总皂苷对膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 大鼠软骨损伤及 Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA) /Rho 相关的卷曲螺旋激酶 (Rho-associated coiled-coil kinase, ROCK) 信号通路的影响。方法 采用膝关节注射木瓜蛋白酶制备 KOA 模型, 随机分为模型组、硫酸氨基葡萄糖 (0.2 g/kg) 组及桔梗总皂苷低、高剂量 (100、200 mg/kg) 组和桔梗总皂苷 (200 mg/kg) + RhoA 激活剂 LPA (1 mg/kg) 组, 另设置假手术组, 每组 15 只。连续给药 4 周后, Micro CT 扫描观察各组大鼠膝关节变化, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和番红 O-固绿染色观察软骨组织病理学变化, ELISA 法检测关节液中基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平, TUNEL 染色观察软骨细胞凋亡, 透射电镜观察软骨细胞微观结构, Western blotting 检测软骨组织聚集蛋白聚糖 (aggrecan)、II 型胶原蛋白 (type II collagen, Col-II)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织病理损伤严重, 软骨细胞超微结构破坏, Mankin 评分和国际骨关节炎研究协会 (osteoarthritis research society international, OARSI) 评分、软骨细胞凋亡率及关节液中 TNF- α 、MMP-13、IL-6 水平和软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th) 和软骨组织 Bcl-2、aggrecan、Col-II 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组软骨组织病理损伤减轻, 软骨细胞超微结构较为正常, Mankin 评分、OARSI 评分、软骨细胞凋亡率及关节液中 TNF- α 、MMP-13、IL-6 水平和软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), BV/TV、Tb.Th 和软骨组织 Bcl-2、aggrecan、Col-II 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 联用 RhoA 激活剂 LPA 后, 桔梗总皂苷对以上指标的改善作用均被部分逆转 ($P < 0.05$)。结论 桔梗总皂苷通过抑制 RhoA/ROCK 通路, 改善 KOA 大鼠软骨损伤。

关键词: 桔梗总皂苷; 膝骨关节炎; RhoA/ROCK 信号通路; 软骨损伤; 炎症反应

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)19-7713-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.017

Effect and mechanism of total saponins of *Platycodon grandiflorum* on cartilage injury in rats with knee osteoarthritis based on RhoA/ROCK signaling pathway

YIN Ziyue^{1,2,3}, JI Jiaqing^{1,2,3}, ZHAO Haihong^{1,4}, FAN Jian^{1,2,3}

1. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China

2. Department of Orthopedics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

3. Key Laboratory of Spine and Spinal Cord Injury Repair and Regeneration, Ministry of Education, Shanghai 200065, China

4. Department of Orthopedics, Shanghai Yangpu Central Hospital, Shanghai 200090, China

收稿日期: 2026-04-17

基金项目: 上海市科技计划项目 (23ZR1457600)

作者简介: 殷子越 (1998—), 男, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为骨科。E-mail: zy10281031@163.com

*通信作者: 樊健 (1974—), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为骨科。E-mail: vxj390@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of total saponins of *Platycodon grandiflorum* on cartilage injury and Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling pathway in knee osteoarthritis (KOA) rats. **Methods** Knee joint injection of papain was used to prepare a KOA model. The rats were randomly divided into model group, glucosamine sulfate (0.2 g/kg) group, total saponins of *P. grandiflorum* low- and high-dose (100, 200 mg/kg) groups and total saponins of *P. grandiflorum* (200 mg/kg) + RhoA activator LPA (1 mg/kg) group. A sham group was also included, with 15 rats in each group. After four weeks of continuous administration, micro CT scanning was used to observe changes in knee joints of rats in each group. Hematoxylin-eosin (HE) and Safranin O-fast green staining were used to observe the pathological changes of cartilage tissue. ELISA was used to detect the levels of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in joint fluid. TUNEL staining was used to observe chondrocyte apoptosis, and transmission electron microscopy was used to observe the microstructure of chondrocytes. Western blotting was used to detect expressions of aggrecan, type II collagen (Col II), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3), RhoA, ROCK1 and ROCK2 proteins in cartilage tissue. **Results** Compared with sham group, rats in model group showed severe pathological damage to the cartilage tissue, destruction of the ultrastructure of chondrocytes, Mankin score, osteoarthritis research society international (OARSI) score, chondrocyte apoptosis rate, levels of TNF- α , MMP-13, IL-6 in joint fluid, as well as protein expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, Bax and cleaved Caspase-3 in cartilage tissue were significantly increased ($P < 0.05$), bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and protein expression levels of Bcl-2, aggrecan, Col-II in cartilage tissue were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with model group, glucosamine sulfate group and total saponins of *P. grandiflorum* groups showed reduced pathological damage to cartilage tissue, normal ultrastructure of chondrocytes, Mankin score, OARSI score, chondrocyte apoptosis rate, levels of TNF- α , MMP-13, IL-6 in joint fluid, as well as protein expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, Bax and cleaved Caspase-3 in cartilage tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). BV/TV, Tb.Th and protein expression levels of Bcl-2, aggrecan, Col-II in cartilage tissue were significantly increased ($P < 0.05$). After the combined use of RhoA activator LPA, the improvement effect of total saponins of *P. grandiflorum* on the above indicators was partially reversed ($P < 0.05$). **Conclusion** Total saponins of *P. grandiflorum* can improve cartilage damage in KOA rats by inhibiting RhoA/ROCK pathway.

Key words: total saponins of *Platycodon grandiflorum*; knee osteoarthritis; RhoA/ROCK signaling pathway; cartilage injury; inflammatory response

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 又称退行性滑膜关节疾病, 在老年人群中发病率逐年升高, 其主要表现为关节疼痛、僵硬及活动受限^[1]。目前临床治疗主要依赖非甾体抗炎药和关节内注射药物, 但只能缓解症状, 不能阻止骨关节炎疾病进展, 最终往往难以避免关节置换术, 对个人和社会带来巨大的经济负担^[2]。KOA 发病机制复杂, 涉及炎症反应、氧化应激等多种因素, 这些因素可诱导软骨退化, 而抑制膝关节炎症反应则有助于减轻软骨组织损伤^[3-4]。

桔梗总皂苷是桔梗 *Platycodonis Radix* 中的主要成分, 具有抗炎、解热、镇痛等多种药理学作用^[5]。研究显示, 桔梗总皂苷可降低炎症因子和过氧化物水平, 缓解单钠尿酸盐引起的痛风性关节炎^[6]。Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho 相关的卷曲螺旋激酶 (Rho-associated coiled-coil kinase, ROCK) 信号通路是调节细胞骨架的经典信号通路, RhoA 被转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF-

α) 等激活后, 激活 ROCK 蛋白, 通过调节下游信号分子, 调节细胞骨架重组, 引起软骨退变, 促进 KOA 进展^[7]。抑制 RhoA/ROCK 信号通路激活, 可抑制炎症反应, 同时能够减少关节软骨细胞的凋亡, 进而显著减轻 KOA 大鼠软骨损伤^[8]。本研究基于 RhoA/ROCK 信号通路, 探讨桔梗总皂苷对 KOA 大鼠软骨损伤的影响及可能的作用机制, 为 KOA 的治疗提供理论基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 220~230 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (浙) 2024-0001, 动物质量合格证号 NO.330480240317052136。动物饲养于上海市同济医院科技楼动物房, 使用许可证号 SYXK (沪) 2024-0004, 自由进食饮水, 环境温度 18~25 °C, 相对湿度 50%~70%, 12 h/12 h 昼夜交替。动物实验经同济大学实验动物福利伦理委员会批准 (批准号 TJBD00322107)。

1.2 药品与试剂

桔梗总皂苷(质量分数 $\geq 98\%$,批号 E-3306)购自上海同田生物技术有限公司;RhoA 激活剂 LPA(批号 857128P)购自美国 Merck 公司;硫酸氨基葡萄糖胶囊(国药准字 HJ20170108,批号 202304)购自辉瑞制药有限公司;基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)检测试剂盒(批号分别为 ZY72333H、ZY-TNF α -Ra、ZY72880R)购自上海泽叶生物科技有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、改良番红 O-固绿软骨染色试剂盒(批号 G1371)、TUNEL 凋亡检测试剂盒(批号 T2196)购自北京索莱宝科技有限公司;聚集蛋白聚糖(aggrecan)、II 型胶原蛋白(type II collagen, Col-II)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、RhoA、ROCK1、ROCK2、 β -actin 一抗和 IgG 二抗(批号分别为 ab315486、ab307674、ab194583、ab182734、ab214430、ab187027、ab134181、ab125025、ab8226、ab6721)购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

SkyScan 1276 型 Micro-CT 扫描系统(德国 Bruker 公司);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);HT7800 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);ChemiDoc MP 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

大鼠适应性饲养 1 周后,采用膝关节注射木瓜蛋白酶^[9]制备 KOA 模型。大鼠 ip 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,从右膝关节髌骨下极髌腱外缘处进针到达髌间,注射 4%木瓜蛋白酶与 0.03 mol/L L-半胱氨酸的混合液(体积比 2:1)150 μ L,假手术组注射等体积的生理盐水,分别于每周第 1、4、7 天注射,连续注射 3 周,对大鼠进行 Lequesne MG 行为学评分^[10],6 分以上则造模成功。

将造模成功的大鼠随机分为模型组、硫酸氨基葡萄糖(0.2 g/kg)组及桔梗总皂苷低、高剂量(100、

200 mg/kg^[11])组和桔梗总皂苷(200 mg/kg)+LPA(1 mg/kg^[8])组,每组 15 只,另取假手术组大鼠 15 只。硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷组 ig 相应药物,桔梗总皂苷+LPA 组 ig 桔梗总皂苷同时 ip LPA,假手术组和模型组给予生理盐水,1 次/d,连续给药 4 周。

2.2 关节液中 TNF- α 、MMP-13 和 IL-6 水平的检测

末次给药次日,麻醉大鼠,于右侧膝关节髌韧带外侧入针,用生理盐水反复灌洗关节腔,收集灌洗液,离心后取上清,按照试剂盒说明书检测关节液中 TNF- α 、MMP-13 和 IL-6 水平。

2.3 Micro CT 扫描膝关节变化

每组随机取 5 只大鼠,脱颈椎处死后,于右膝关节上下 2 cm 处进行离断,4%多聚甲醛固定,Micro CT 扫描关节变化,分析骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)和骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)。

2.4 软骨组织病理学观察

取于 4%多聚甲醛中固定的软骨组织,脱钙 4 周,石蜡包埋,制作厚度为 4 μ m 的切片,经脱蜡与水化后,进行 HE 及番红 O-固绿染色,于显微镜下观察软骨组织病理变化,分别用 Mankin 评分^[12]及国际骨关节炎研究协会(osteoarthritis research society international, OARSI)评分^[13]评估软骨组织损伤程度。

2.5 TUNEL 染色检测软骨组织细胞凋亡

取软骨组织石蜡切片,经脱蜡与水化后,用蛋白酶 K(20 μ g/mL)通透 20 min,滴加 TUNEL 试剂避光染色 2 h, PBS 清洗 2 次,再用 0.1% Triton X-100 清洗 3 次,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液(5 μ g/mL),室温避光孵育 5 min,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 透射电子显微镜观察软骨细胞超微结构变化

每组随机取 5 只大鼠,处死后取软骨组织,用电镜固定液固定 4 h,经过梯度乙醇、100%丙酮脱水后,渗透、包埋后切成 60~80 nm 的超薄切片,2%醋酸铀和 2.6%枸橼酸铅双染,于透射电子电镜下观察并拍照。

2.7 Western blotting 检测软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达

每组取 5 只大鼠,处死后取软骨组织,称取 50

mg 软骨组织剪碎，加入裂解液后匀浆，离心取上清，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，分别加入相应抗体，4 ℃ 孵育过夜；加入二抗，37 ℃ 孵育 1 h，加入 ECL 化学发光试剂显影，采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，数据经 Shapiro-Wilk 检验验证符合正态分布，经 Levene 检验验证符合方差齐性，计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 Tukey 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠膝关节 Micro CT 扫描结果

如图 1 所示，假手术组大鼠软骨结构正常，软骨表面光滑，节间隙正常；模型组大鼠关节结构损伤，软骨表面粗糙，关节间隙狭窄，可见骨赘生成；硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组大鼠关节结构损伤减轻，关节表面轻微受损，有少量骨赘，关节间隙增大；与桔梗总皂苷高剂量组比较，桔梗总皂苷+LPA 组大鼠关节结构损伤加重，大量骨赘生成。如表 1 所示，与假手术组比较，模型组 BV/TV、Tb.Th 显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组 BV/TV、Tb.Th

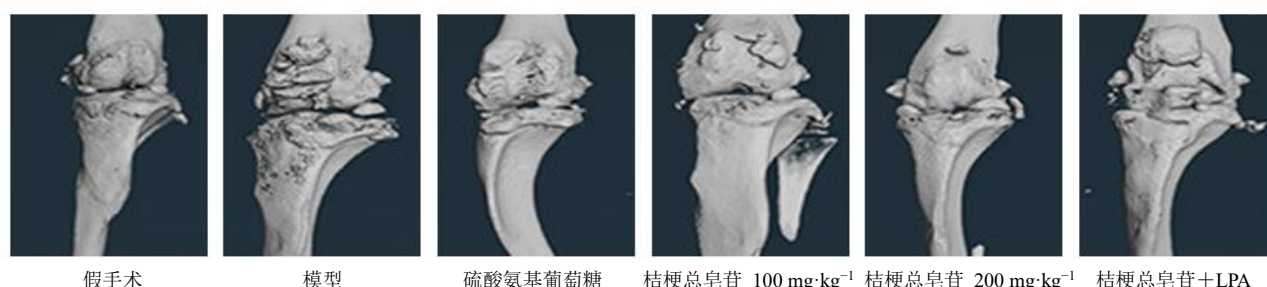


图 1 各组大鼠膝关节 Micro CT 扫描图像

Fig. 1 Micro CT scanning images of knee joint of rats in each group

表 1 各组大鼠 BV/TV 和 Tb.Th 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Comparison of BV/TV, Tb.Th levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BV/TV/%	Tb.Th/μm
假手术	—	61.35 ± 6.21	56.43 ± 5.71
模型	—	38.67 ± 5.20*	26.95 ± 4.70*
硫酸氨基葡萄糖	200	60.11 ± 6.03 [#]	52.36 ± 5.53 [#]
桔梗总皂苷	100	49.58 ± 5.73 ^{#Δ}	38.69 ± 4.96 ^{#Δ}
	200	60.03 ± 5.98 [#]	52.17 ± 5.50 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	41.69 ± 5.46 ^Δ	35.77 ± 4.83 ^Δ

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ；与桔梗总皂苷高剂量组比较：^Δ $P < 0.05$ ，下表同。

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs total saponins of *P. grandiflorum* high-dose group, same as below tables.

显著升高 ($P < 0.05$)；与桔梗总皂苷高剂量组比较，桔梗总皂苷低剂量组和桔梗总皂苷+LPA 组 BV/TV、Tb.Th 显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠关节液中 TNF-α、MMP-13 和 IL-6 水平

如表 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠关节液中 TNF-α、MMP-13 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组大鼠关节液中 TNF-α、MMP-13 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$)；与桔梗总皂苷高剂量组比较，桔梗总皂苷低剂量组和桔梗总皂苷+LPA 组大鼠关节液中 TNF-α、MMP-13 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠关节液中 TNF-α、MMP-13 和 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Comparison of TNF-α, MMP-13 and IL-6 levels in joint fluid of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	MMP-13/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	16.38 ± 2.56	245.63 ± 18.45	52.41 ± 5.75
模型	—	85.31 ± 8.64*	896.21 ± 84.22*	225.63 ± 18.41*
硫酸氨基葡萄糖	200	38.55 ± 4.21 [#]	378.69 ± 40.21 [#]	87.54 ± 8.76 [#]
桔梗总皂苷	100	61.36 ± 6.15 ^{#Δ}	557.69 ± 43.25 ^{#Δ}	156.43 ± 12.35 ^{#Δ}
	200	37.35 ± 4.32 [#]	343.24 ± 25.14 [#]	78.54 ± 8.71 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	59.64 ± 6.87 ^Δ	572.63 ± 50.33 ^Δ	147.34 ± 10.31 ^Δ

3.3 各组大鼠软骨组织病理变化

HE 染色及番红 O-固绿染色结果(图 2 和表 3)显示,假手术组大鼠软骨组织结构层次清晰,软骨细胞数量丰富,形态正常且排列整齐,无炎性细胞浸润,潮线清晰可见。模型组软骨组织损伤严重,表层结构受损,软骨细胞数量减少,细胞排列紊乱,细胞形态异常,细胞核出现浓缩,潮线结构模糊且不连续,Mankin 评分及 OARSI 评分较假手术组显著升高 ($P<0.05$)。桔梗总皂苷低剂量组软骨表面

轻微不规则,少量细胞排列紊乱、核浓缩,潮线较清晰,较模型组有所改善;硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷高剂量组软骨结构趋于正常,细胞排列较规整,较模型组有较大改善;与模型组比较,硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组 Mankin 评分及 OARSI 评分显著降低 ($P<0.05$)。与桔梗总皂苷高剂量组比较,桔梗总皂苷+LPA 组软骨组织损伤加重,软骨细胞聚集增多,潮线模糊,Mankin 评分及 OARSI 评分显著升高 ($P<0.05$)。

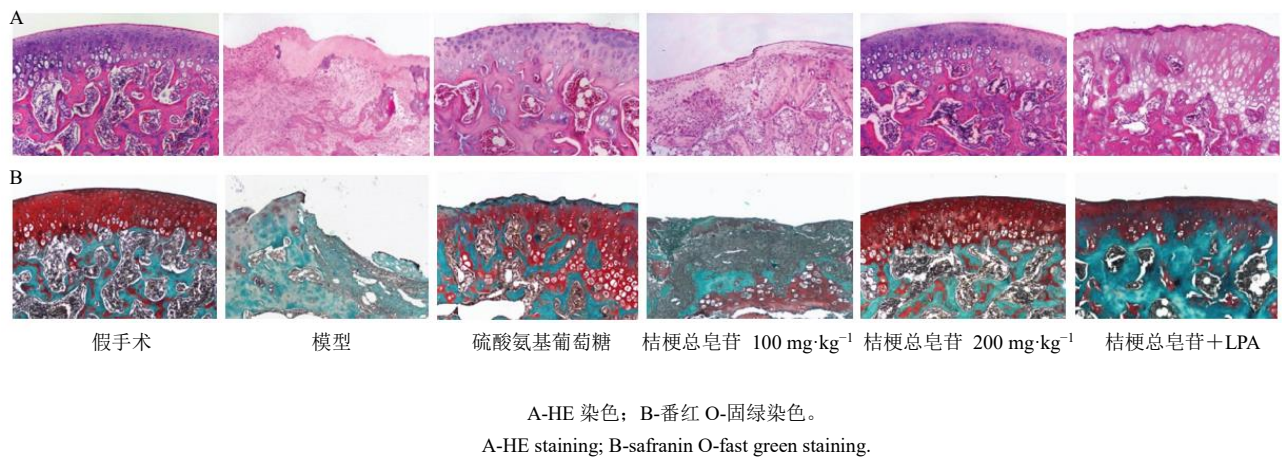


图 2 各组大鼠软骨组织病理变化 (×200)

Fig. 2 Pathological changes of cartilage tissue of rats in each group (× 200)

表 3 各组大鼠 Mankin 和 OARSI 评分比较
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Comparison of Mankin and OARSI scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Mankin评分	OARSI评分
假手术	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	8.60±1.50*	11.80±0.65*
硫酸氨基葡萄糖	200	2.40±0.40 [#]	4.40±0.85 [#]
桔梗总皂苷	100	6.20±1.15 ^{#△}	9.20±1.40 ^{#△}
	200	2.30±0.72 [#]	4.20±0.78 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	5.60±0.95 [△]	7.80±1.10 [△]

3.4 各组大鼠软骨组织细胞凋亡比较

如图 3 和表 4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 TUNEL 阳性染色增加,细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组大鼠软骨组织 TUNEL 阳性染色减少,细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$);与桔梗总皂苷高剂量组比较,桔梗总皂苷+LPA 组大鼠软骨组织 TUNEL 阳性染色增加,细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。

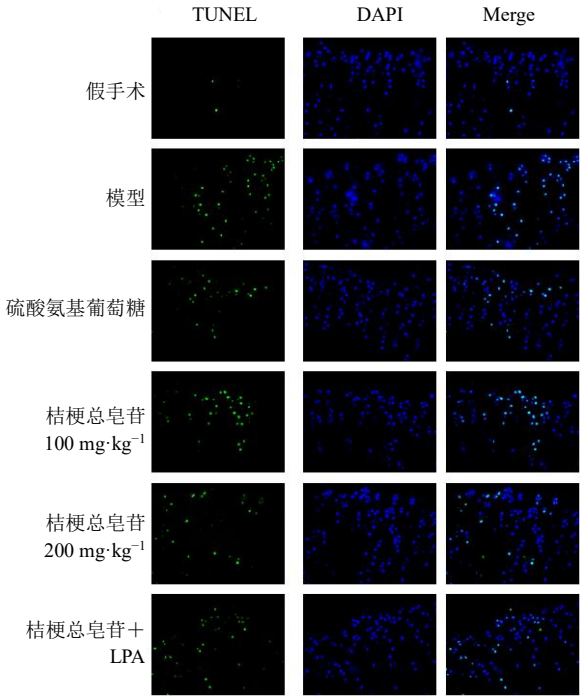


图 3 各组大鼠软骨组织 TUNEL 染色 (×200)

Fig. 3 TUNEL staining of cartilage tissue of rats in each group (× 200)

表 4 各组大鼠软骨组织细胞凋亡比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Comparison of chondrocyte apoptosis in cartilage tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞凋亡率/%
假手术	—	2.85±0.72
模型	—	35.42±3.85*
硫酸氨基葡萄糖	200	16.82±2.46 [#]
桔梗总皂苷	100	25.24±3.13 ^{#Δ}
	200	15.34±2.36 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	22.47±2.63 ^Δ

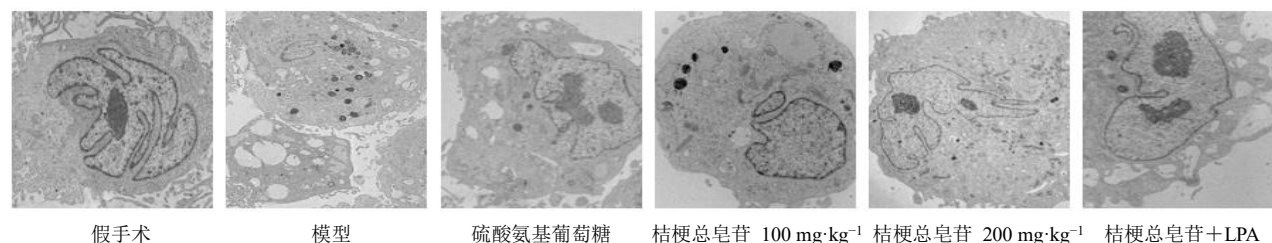


图 4 各组大鼠软骨细胞超微结构变化 (×5 000)

Fig. 4 Ultrastructure changes in chondrocytes of rats in each group (× 5 000)

3.6 各组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达

如图 5 和表 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,硫酸氨基葡萄糖

3.5 各组大鼠软骨细胞超微结构变化

如图 4 所示,假手术组大鼠软骨细胞核膜清晰,核仁明显,线粒体结构正常;模型组软骨细胞形态破坏,核固缩,线粒体肿胀扩张、嵴消失、空泡化;与模型组比较,硫酸氨基葡萄糖组和桔梗总皂苷各剂量组软骨细胞超微结构损伤程度显著减轻;与桔梗总皂苷高剂量组比较,桔梗总皂苷+LPA 组软骨细胞超微结构损伤加重。

组和桔梗总皂苷各剂量组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bcl-2、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与桔梗总皂苷高剂量组比较,桔梗总皂苷+LPA 组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

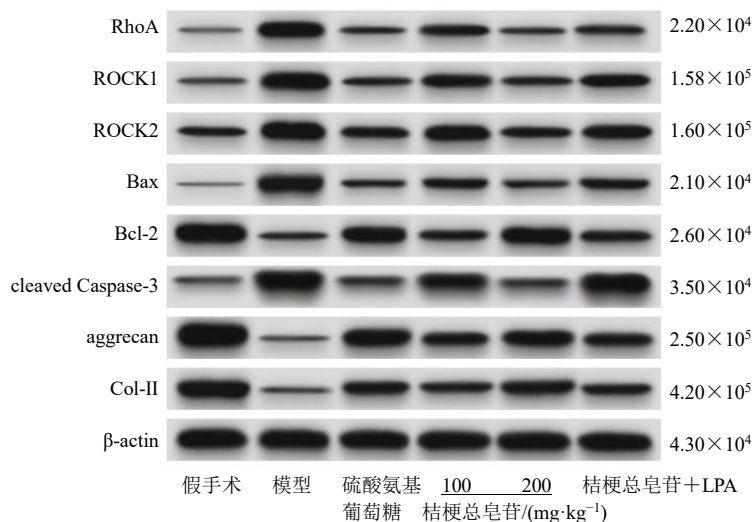


图 5 各组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达

Fig. 5 Expressions of RhoA, ROCK1, ROCK2, Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, aggrecan and Col-II proteins in cartilage tissue of rats in each group

表 5 各组大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、aggrecan 和 Col-II 蛋白表达比较
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Comparison of RhoA, ROCK1, ROCK2, Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, aggrecan and Col-II protein expressions in cartilage tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RhoA/β-actin	ROCK1/β-actin	ROCK2/β-actin	Bax/β-actin
假手术	—	0.21 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.15 ± 0.03
模型	—	0.95 ± 0.10*	1.12 ± 0.15*	1.24 ± 0.15*	0.87 ± 0.09*
硫酸氨基葡萄糖	200	0.41 ± 0.05 [#]	0.53 ± 0.06 [#]	0.65 ± 0.07 [#]	0.36 ± 0.04 [#]
桔梗总皂苷	100	0.65 ± 0.06 ^{#Δ}	0.74 ± 0.07 ^{#Δ}	0.93 ± 0.03 ^{#Δ}	0.51 ± 0.05 ^{#Δ}
	200	0.37 ± 0.03 [#]	0.55 ± 0.05 [#]	0.61 ± 0.06 [#]	0.35 ± 0.04 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	0.48 ± 0.05 ^Δ	0.72 ± 0.07 ^Δ	0.85 ± 0.07 ^Δ	0.49 ± 0.04 ^Δ
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bcl-2/β-actin	cleaved Caspase-3/β-actin	aggrecan/β-actin	Col-II/β-actin
假手术	—	1.13 ± 0.12	0.35 ± 0.04	1.32 ± 0.14	0.95 ± 0.09
模型	—	0.41 ± 0.04*	1.21 ± 0.13*	0.31 ± 0.03*	0.24 ± 0.03*
硫酸氨基葡萄糖	200	0.95 ± 0.10 [#]	0.49 ± 0.06 [#]	1.02 ± 0.11 [#]	0.73 ± 0.06 [#]
桔梗总皂苷	100	0.62 ± 0.06 ^{#Δ}	0.93 ± 0.10 ^{#Δ}	0.76 ± 0.07 ^{#Δ}	0.54 ± 0.05 ^{#Δ}
	200	0.91 ± 0.08 [#]	0.52 ± 0.08 [#]	0.98 ± 0.10 [#]	0.75 ± 0.08 [#]
桔梗总皂苷+LPA	200+1	0.63 ± 0.08 ^Δ	1.13 ± 0.11 ^Δ	0.72 ± 0.07 ^Δ	0.61 ± 0.07 ^Δ

4 讨论

KOA 是一种影响老年人的疾病，主要病理表现为关节软骨的退行性病变和损伤，随着人口老龄化的加剧，KOA 的发生率逐渐升高，已成为老年人主要致残性疾病之一^[14]。然而，目前的治疗和管理策略尚无法治愈 KOA。因此，迫切需要开发更有效的治疗方法与治疗药物。关节软骨的进行性破坏是 KOA 的核心病理特征，其中软骨细胞的死亡与细胞外基质（extracellular matrix, ECM）降解是 KOA 发病的关键，KOA 的初始发病源于软骨 ECM 分解代谢和合成代谢的失衡。Aggrecan、Col-II 蛋白是细胞 ECM 的重要组成成分，二者在维持细胞 ECM 的动态平衡中发挥重要作用；而 MMP-13 属于金属蛋白酶家族，可降解软骨基质中的 Col-II 和蛋白多糖，进而导致软骨组织退变及细胞凋亡^[15]。此外，KOA 滑膜中炎症因子 TNF-α、IL-1β 不仅可促进 ECM 降解，加速软骨破坏，还可诱导 MMP-13 大量表达，进一步促进软骨细胞变性凋亡^[16]。因此，抑制 MMP-13 及炎症因子表达，上调 aggrecan、Col-II 蛋白表达，是改善关节软骨代谢与损伤的重要策略^[17]。软骨细胞凋亡会导致软骨活力的丧失，其超微结构表现为细胞萎缩、细胞核固缩、线粒体肿胀，而线粒体中 Bax、Bcl-2 蛋白是凋亡信号的主要调节因子。本研究结果显示，模型组大鼠关节病理损伤严重，软骨细胞凋亡率升高，关节液中 TNF-α、MMP-13、IL-6 水平升高，而软骨组织 aggrecan、Col-II 蛋白表达降低，提示 KOA 大鼠软骨组织存在炎症反应，

引起软骨降解和软骨损伤。桔梗具有抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤等多种药理作用，对肺部损伤及炎症性疾病具有良好的治疗作用^[18]。桔梗总皂苷是桔梗的主要药理活性成分，研究显示，桔梗总皂苷通过介导 Notch 通路，调节辅助性 T 细胞 17（T helper cell 17, Th17）/调节性 T 细胞（regulatory T cell, Treg）平衡，从而减轻气道炎症，抑制小鼠哮喘发作^[19]。何晓丽等^[11]研究显示，桔梗总皂苷可抑制滑膜组织炎症反应，对胶原性关节炎大鼠具有一定治疗作用。在本研究中，使用桔梗总皂苷干预 KOA 大鼠后，大鼠关节病理损伤减轻，软骨细胞凋亡及炎症因子水平减少，软骨组织 aggrecan、Col-II 蛋白表达升高，这一结果提示桔梗总皂苷可抑制炎症反应与软骨细胞凋亡，改善 KOA 大鼠软骨病理损伤，且高剂量桔梗总皂苷与硫酸氨基葡萄糖的治疗效果相当，表明桔梗总皂苷对 KOA 具有良好的治疗作用。

在模型选择方面，本研究采用木瓜蛋白酶诱导的 KOA 大鼠模型，核心目的在于验证“桔梗总皂苷是否通过抑制 RhoA/ROCK 通路改善软骨损伤”，属于机制验证性研究。该模型通过关节腔注射蛋白酶快速降解软骨基质，可在短期内形成典型的软骨损伤表型，且在诱导软骨损伤、激活炎症反应及调控 RhoA/ROCK 通路方面病理特征明确、可重复性好。该模型在注射后第 3 周即可出现稳定的软骨退变表型，并在第 4~6 周内保持损伤程度的一致性，为药物干预机制的短期评价提供了稳定可靠的实

验窗口。然而,该模型主要反映软骨降解过程,与临床骨关节炎尤其是慢性退变型骨关节炎的病理演变存在一定差异,后续研究有必要进一步开展不同时间点的损伤演变及药物干预持久性研究,以更全面评估桔梗总皂苷的长期效应。

RhoA 广泛表达于多种组织细胞中,属于小 G 蛋白超家族,参与细胞生长、转化及细胞骨架的调节过程。ROCK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可被 RhoA 激活,其包括 ROCK1、ROCK2 两种亚型。ROCK 被激活后,可磷酸化 LIM 激酶、肌球蛋白轻链等下游分子,参与调节软骨细胞骨架重组等过程^[20]。研究表明,RhoA/ROCK 信号的激活可引起 Col-II、氨基葡萄糖等表达减少,导致细胞微丝骨架改变和应力纤维的生成,从而促进软骨退变^[21]。同时,RhoA/ROCK 信号的激活还可促进 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的释放,进而促进骨关节炎病理性疼痛^[22]。已有研究显示,桔梗提取物可抑制 RhoA/ROCK 通路,进而抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及转移^[23]。与上述报道一致,本研究结果显示,使用桔梗总皂苷干预 KOA 大鼠后,大鼠软骨组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达显著降低,提示桔梗总皂苷可抑制 RhoA/ROCK 通路。为进一步验证该通路的关键介导作用,本研究采用激活剂反向验证策略,其核心逻辑在于:若药物的治疗效应能够通过激活目标通路而被显著逆转,则可有力证明该通路是药物发挥作用的必要介导者。结果显示,联用 RhoA 激活剂 LPA 后,桔梗总皂苷对软骨损伤、炎症反应及细胞凋亡的改善作用均被部分逆转,完整呈现了“药物干预→通路抑制→表型改善→激活剂逆转”的逻辑链条,证实了 RhoA/ROCK 通路在桔梗总皂苷发挥软骨保护作用中的必要性。值得注意的是,RhoA/ROCK 信号通路不仅直接调控细胞骨架重组,还可通过影响线粒体通透性转换孔的开放及 Bax/Bcl-2 的平衡,进而调控线粒体依赖性凋亡通路。综合上述结果,可勾勒出“桔梗总皂苷抑制 RhoA/ROCK 通路→调节细胞骨架稳定性→改善线粒体功能→下调 Bax/Bcl-2 值→抑制 cleaved Caspase-3 激活→减少软骨细胞凋亡→最终改善 KOA 软骨损伤”的完整分子路径。基于此,可证实桔梗总皂苷通过抑制 RhoA/ROCK 通路,实现对炎症及软骨细胞凋亡的双重抑制作用,最终达到改善软骨损伤的目的。但本研究未单独设立 RhoA/ROCK 特异性抑制剂对照组,相关因果证据仍有待

进一步补充。后续研究将采用“激活剂+抑制剂”双向调控策略,以更全面验证桔梗总皂苷的通路特异性作用。

在给药安全性方面,本研究参考文献方法^[11]选择 100、200 mg/kg 作为桔梗总皂苷的干预剂量,并在此剂量下观察到一定的剂量相关性趋势。但本研究未检测各组大鼠的血药浓度,亦未系统评估肝肾功能、消化道毒性等安全性指标,药物系统暴露水平及长期安全性尚不明确。后续研究将结合药动学及毒理学评价,进一步研究桔梗总皂苷在 KOA 治疗中的安全窗口与最佳给药方案。本研究采用 ig 给药,虽动物依从性高,便于长期给药操作,但桔梗总皂苷的口服生物利用度通常较低,其在关节组织中的真实暴露水平仍需药动学研究加以明确。与单纯缓解症状的非甾体抗炎药及短期润滑的透明质酸相比,桔梗总皂苷通过抑制 RhoA/ROCK 通路展现出潜在的疾病修饰治疗特性。对于早中期 KOA 患者,尤其在全膝关节置换术前的“治疗窗口期”,桔梗总皂苷可能通过控制滑膜炎症、保护残余软骨,提供一种延缓疾病进展的保守治疗选择。

综上,桔梗总皂苷可抑制炎症反应,改善 KOA 大鼠软骨损伤,其机制可能与抑制 RhoA/ROCK 通路激活有关。桔梗总皂苷可能成为治疗 KOA 的潜在药物,但其具体作用机制仍需进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Perruccio A V, Young J J, Wilfong J M, *et al.* Osteoarthritis year in review 2023: Epidemiology & therapy [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2024, 32(2): 159-165.
- [2] García-Muñoz A M, Abellán-Ruiz M S, García-Guillén A I, *et al.* Efficacy of eggshell membrane in knee osteoarthritis: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2024, 16(16): 2640.
- [3] Liu Y, Da W, Xu M J, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals novel chondrocyte and osteoblast subtypes and their role in knee osteoarthritis pathogenesis [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2025, 10: 40.
- [4] Chen B H, He Q, Chen C Y, *et al.* Combination of curcumin and catalase protects against chondrocyte injury and knee osteoarthritis progression by suppressing oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115751.
- [5] Shang Y F, Chen H, Ni Z J, *et al.* *Platycodon grandiflorum* saponins: Ionic liquid-ultrasound-assisted extraction, antioxidant, whitening, and antiaging activity [J]. *Food*

- Chem*, 2024, 451: 139521.
- [6] 孙萍, 徐慧, 刘洋, 等. 桔梗总皂苷对痛风性关节炎小鼠的影响机制研究 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(4): 91-98.
- [7] 杨天翔, 王怡, 刘子歌, 等. Ras 同源基因家族成员 A/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶信号转导通路在膝骨性关节炎软骨组织中的表达及意义 [J]. 陕西医学杂志, 2024, 53(12): 1699-1703.
- [8] 彭博文, 冯立, 覃剑. 贝母素乙调节 RhoA/ROCK 信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(7): 980-984.
- [9] 卢梦雅, 伍闲, 余泽宇, 等. 针刀调控线粒体途径软骨细胞凋亡防治大鼠膝骨关节炎 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(32): 5190-5195.
- [10] Zheng X H, Lin J, Wang Z Z, *et al.* Research of the analgesic effects and central nervous system impact of electroacupuncture therapy in rats with knee osteoarthritis [J]. *Heliyon*, 2024, 10(1): e21825.
- [11] 何晓丽, 钟先锦, 龚菊梅, 等. 桔梗总皂苷对胶原性关节炎大鼠的抗炎作用及对 TLR/MyD88/NF- κ B 通路的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(8): 931-935.
- [12] Mankin H J, Johnson M E, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules [J]. *J Bone Jt Surg*, 1981, 63(1): 131-139.
- [13] Glasson S S, Chambers M G, Van Den Berg W B, *et al.* The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2010, 18: S17-S23.
- [14] 虞跃跃, 成杭洁, 孟梓涵, 等. 基于 Ihh-Gli 信号通路探究乌头汤治疗膝骨关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2026, 57(3): 990-1000.
- [15] Elahi S A, Castro-Viñuelas R, Tanska P, *et al.* Contribution of collagen degradation and proteoglycan depletion to cartilage degeneration in primary and secondary osteoarthritis: An *in silico* study [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2023, 31(6): 741-752.
- [16] Orhan C, Juturu V, Sahin E, *et al.* Undenatured type II collagen ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in the rat model of osteoarthritis [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 617789.
- [17] 涂仕娟, 杨红亚, 李桃, 等. 吴茱萸碱调节 Shh/Gli1 信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2024, 53(9): 827-833.
- [18] 吴朋, 李银华, 谭心海, 等. 桔梗总皂苷对支气管肺发育不良新生大鼠肺损伤的作用及机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(5): 52-57.
- [19] 彭峰, 林隆, 詹璐. 桔梗总皂苷调控 Th17/Treg 免疫失衡改善哮喘模型小鼠气道炎症 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2100-2107.
- [20] Jiang L F, Moqbel S A A, Zhu J X, *et al.* Nesfatin-1 suppresses autophagy of chondrocytes in osteoarthritis via remodeling of cytoskeleton and inhibiting RhoA/ROCK signal pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 153.
- [21] Yang J L, Wang L, Zhang Z J, *et al.* Downregulation of HAS-2 regulates the chondrocyte cytoskeleton and induces cartilage degeneration by activating the RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52: 57.
- [22] Sui C, Wu Y C, Zhang R, *et al.* Rutin inhibits the progression of osteoarthritis through CBS-mediated RhoA/ROCK signaling [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(6): 617-630.
- [23] 王洋, 田伟峰, 毛文娟. 基于 RhoA/ROCK 通路探讨桔梗提取物对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及转移的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2024, 43(4): 279-284.

[责任编辑 李亚楠]