

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

于利凯^{1,2}, 苏子珊^{1,2}, 刘尚齐^{1,2}, 葛威强^{1,2}, 田地^{1,2}, 王培民¹, 张农山^{1*}

1. 南京中医药大学附属医院/江苏省中医院, 江苏 南京 210029

2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023

摘要:目的 探讨汉黄芩素通过调控 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白 (Parkin) 信号通路激活软骨细胞自噬的作用, 并阐明其对机械应力影响下的膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 软骨损伤的干预作用。方法 通过内侧半月板不稳手术建立小鼠 KOA 模型, 并随机分为假手术组、模型组及汉黄芩素 (40、80 mg/kg) 组和汉黄芩素 (80 mg/kg) + Piezo1 激动剂 Yoda1 (5 mg/kg) 组, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和番红 O-固绿染色评价软骨组织形态学改变; ELISA 检测血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; Western blotting 及 qRT-PCR 检测软骨组织 II 型胶原蛋白 (collagen II)、基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13)、Piezo1、微管相关蛋白 1 轻链 3-I/II (microtubule-associated protein 1 light chain 3-I/II, LC3-I/II)、p62、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达。使用应力加载装置处理小鼠软骨细胞建立应力损伤细胞模型, 设置对照组、模型组及汉黄芩素 (25、50、100 μ mol/L) 组和汉黄芩素 (100 μ mol/L) + Yoda1 (2.5 μ mol/L) 组, 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用 DHE、TUNEL 染色检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及细胞凋亡水平; ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平; 免疫荧光检测 Piezo1 表达; Western blotting 及 qRT-PCR 检测 collagen II、MMP13、Piezo1、LC3-I/II、p62、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达; 透射电镜观察线粒体形态。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠软骨出现严重破坏, 软骨组织 collagen II、LC3-II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), MMP13、p62、Piezo1 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 汉黄芩素各剂量组小鼠软骨形态改善明显, 软骨组织 collagen II、LC3-II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), MMP13、p62、Piezo1 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与汉黄芩素高剂量组比较, 汉黄芩素 + Yoda1 组软骨组织 collagen II、LC3-II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), MMP13、p62、Piezo1 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。细胞实验结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), ROS、细胞凋亡、IL-1 β 、TNF- α 水平及 MMP13、p62、Piezo1 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), collagen II、LC3-II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 汉黄芩素可呈剂量相关性增加细胞活力 ($P < 0.01$), 促进自噬, 并上调 collagen II、LC3-II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$); 与汉黄芩素组比较, 汉黄芩素 + Yoda1 组软骨损伤及自噬相关指标显著下降 ($P < 0.01$)。结论 汉黄芩素通过调控 PINK1/Parkin 通路, 激活细胞自噬程序并减轻线粒体损伤, 对机械应力干预下的 KOA 软骨损伤起到保护作用。

关键词: 机械应力; 汉黄芩素; 自噬; 软骨; 膝骨关节炎; PINK1/Parkin 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)22-8188-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.012

Mechanism of baicalein in improving cartilage injury in knee osteoarthritis through PINK1/Parkin pathway mediated by mechanical stress

YU Likai^{1,2}, SU Zishan^{1,2}, LIU Shangqi^{1,2}, GE Weiqiang^{1,2}, TIAN Di^{1,2}, WANG Peimin¹, ZHANG Nongshan¹

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

收稿日期: 2025-08-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274545); 江苏省中医院中医膝骨关节炎临床医学创新中心项目 (Y2023zx05); 江苏省医学重点学科/实验室建设单位项目 (JSDW202252); 南京中医药大学膝骨关节炎临床专病研究院项目 (LCZBYJZZ2024-003)

作者简介: 于利凯, 博士研究生, 从事骨关节疾病中医治疗研究。E-mail: ylk_012022@163.com

*通信作者: 张农山, 研究员, 从事骨关节疾病中医治疗研究。E-mail: zns0032@163.com

2. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of wogonin on activating chondrocyte autophagy by regulating the PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin signaling pathway, and elucidate its intervention effect on knee osteoarthritis (KOA) cartilage injury under mechanical stress. **Methods** A mouse KOA model was established through the destruction of medial meniscus surgery, and randomly divided into sham group, model group, wogonin (40, 80 mg/kg) group, and wogonin (80 mg/kg) + Piezo1 agonist Yoda1 (5 mg/kg) group. Hematoxylin-eosin (HE) staining and safranin O-green staining were used to evaluate the morphological changes of cartilage tissue; ELISA was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum; Western blotting and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expressions of collagen II, matrix metalloproteinase 13 (MMP13), Piezo1, microtubule-associated protein 1 light chain 3-I/II (LC3-I/II), p62, Beclin-1, PINK1 and Parkin in cartilage tissue. A stress injury cell model was established by treating mouse chondrocytes with stress loading. Control group, model group, wogonin (25, 50, 100 μ mol/L) group, and wogonin (100 μ mol/L) + Yoda1 (2.5 μ mol/L) group were set up. CCK-8 method was used to detect cell viability; DHE and TUNEL staining were used to detect levels of reactive oxygen species (ROS) and cell apoptosis; ELISA was used to detect the levels of IL-1 β and TNF- α ; Immunostaining was used to detect Piezo1 expression; Western blotting and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expressions of collagen II, MMP13, Piezo1, LC3-I/II, p62, Beclin-1, PINK1 and Parkin; Mitochondrial morphology was observed by transmission electron microscopy. **Results** Compared with sham group, mice in model group showed severe cartilage damage, with significantly reduced protein and mRNA expressions of collagen II, LC3-II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin in cartilage tissue ($P < 0.01$), and significantly increased protein and mRNA expressions of MMP13, p62 and Piezo1 ($P < 0.01$); Compared with model group, the cartilage morphology of wogonin in each dose group was significantly improved, the protein and mRNA expressions of collagen II, LC3-II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin in cartilage tissue were significantly increased ($P < 0.01$), while the protein and mRNA expressions of MMP13, p62 and Piezo1 were significantly decreased ($P < 0.01$); Compared with wogonin high-dose group, wogonin + Yoda1 group showed significantly reduced protein and mRNA expressions of collagen II, LC3-II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin in cartilage tissue ($P < 0.05, 0.01$), while significantly increased protein and mRNA expressions of MMP13, p62, and Piezo1 ($P < 0.01$). The cell experiment results showed that compared with control group, the cell viability of model group was significantly reduced ($P < 0.01$), the levels of ROS, apoptosis, IL-1 β , TNF- α , MMP13, p62, Piezo1 protein and mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.01$), the protein and mRNA expressions of collagen II, LC3-II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin were significantly reduced ($P < 0.01$); Compared with model group, wogonin increased cell viability in a dose-dependent manner ($P < 0.01$), promoted autophagy, and up-regulated the protein and mRNA expression levels of collagen II, LC3-II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin ($P < 0.01$); Compared with wogonin group, wogonin + Yoda1 group showed a significant decrease in cartilage damage and autophagy related indicators ($P < 0.01$). **Conclusion** Wogonin exerts a protective effect on KOA cartilage injury under mechanical stress intervention by regulating PINK1/Parkin pathway, activating cellular autophagy program and reducing mitochondrial damage.

Key words: mechanical stress; wogonin; autophagy; cartilage; knee osteoarthritis; PINK1/Parkin pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种临床常见的骨关节退行性疾病, 随着发病率的逐年升高, KOA 已成为引起中老年人下肢疼痛、活动功能障碍的主要问题, 严重影响患者身心健康^[1]。KOA 涉及全膝关节的多个组织, 但关节软骨的进行性退变被广泛认为是其关键病理环节^[2]。在 KOA 早期阶段, 软骨细胞自噬作为一种适应性反应被激活, 可以通过溶酶体将不必要的细胞成分降解为氨基酸、脂质等基本营养素, 以防止软骨退化^[3]。而随着疾病的发展, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶信号传导会关闭自噬溶酶体进程, 使微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 表达下降, 将保护性自噬转换为凋亡, 此时分解代

谢增加以及合成代谢抑制, 会使软骨组织出现不可逆的损伤^[4]。目前, 在 KOA 诊疗方面, 指南仍以胃肠道反应明显的非甾体抗炎药作为推荐方案, 而在患者出现晚期影像学改变或不可缓解的下肢疼痛时, 手术干预即为最终选择^[5]。中医药可以发挥其“治未病”优势, 从既病防变的角度调控软骨细胞自噬反应以延缓 KOA 病程进展。

除了遗传和代谢影响外, 异常的机械应力刺激也是调节 KOA 进展和软骨细胞状态的重要因素^[6]。2014 年, Lee 等^[7]发现软骨细胞表面高表达机械敏感离子通道 Piezo1, 这是一种响应力学刺激的阳离子蛋白, 可以通过诱导钙离子内流, 调节包括细胞增殖、分化和死亡在内的多种生理病理过程。在此

基础上,有研究通过对髓核细胞施加高强度牵拉力发现,在 Piezo1 激活的同时,自噬相关标志物如 LC3 及 Beclin-1 水平降低,这表明 Piezo1 可能在机械应力刺激下诱导细胞自噬抑制,并与 KOA 相关的软骨损伤存在潜在关联^[8]。值得注意的是, Piezo1 介导的钙离子内流会破坏细胞内钙稳态,导致线粒体功能损害,从而诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的大量释放及细胞凋亡^[9]。而线粒体自噬是线粒体质量控制的关键机制,可以通过消除受损的线粒体和过量 ROS,维持线粒体功能并防止进一步的细胞死亡^[10]。研究表明,细胞自噬和线粒体自噬在多种疾病中起到重要作用,包括骨关节炎、心血管疾病和神经系统疾病等^[11]。然而, KOA 软骨组织中的 Piezo1 表达和细胞自噬之间的关系仍未得到明确验证。因此,本研究旨在探讨 KOA 软骨组织中的 Piezo1 通道是否可以干预细胞的自噬和凋亡环节,从而影响 KOA 进程。

近年来,天然活性成分因其多途径药理特性成为大量疾病的研究重点。汉黄芩素是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 根部提取的黄酮类化合物,因其抗氧化、抗凋亡和调节细胞周期等作用,在炎症性疾病、过敏性疾病及代谢疾病中广泛应用^[12-13]。汉黄芩素能缓解糖尿病模型小鼠足细胞凋亡,并促进细胞自噬^[14]。在心血管疾病研究中,汉黄芩素可以增加心肌细胞中的自噬体数量,提高 LC3、Beclin-1 等自噬标志物表达,并有效抑制细胞凋亡^[15]。此外,在一项基于 HPLC 和串联质谱分析验证中,汉黄芩素被证明可以通过抑制氧化应激和炎症反应,减少人骨关节炎的软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解^[16]。本研究以细胞自噬环节为靶点展开讨论,以期阐明汉黄芩素在 KOA 中调控软骨组织损伤的具体机制,为临床治疗提供基础指导。

1 材料

1.1 动物

80 只 4 周龄 C57BL/6 雄性小鼠,体质量(20±5)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2021-0006。饲养于南京中医药大学实验动物中心,温度(22±2)℃,相对湿度 50%~60%,12 h 明暗周期,自由进食饮水。动物实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 202409A052)。

1.2 药品与试剂

汉黄芩素(批号 HY-N0400,质量分数为

99.92%)、Piezo1 激动剂 Yoda1(批号 HY-18723,质量分数为 99.97%)购自美国 MCE 公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、番红 O-固绿染色试剂盒(批号 G1371)购自北京索莱宝科技有限公司;β-actin 抗体(批号 AF7018)、II 型胶原(collagen II)抗体(批号 AF0135)、基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)抗体(批号 AF5355)、Piezo1 抗体(批号 DF12083)、LC3-I/II 抗体(批号 AF5402)、p62 抗体(批号 AF5384)、Beclin-1 抗体(批号 AF5128)、PTEN 诱导激酶 1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)抗体(批号 DF7742)、帕金蛋白(Parkin)抗体(批号 AF0235)购自 Affinity 公司;白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)ELISA 试剂盒(批号 PI301)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA 试剂盒(批号 PT512)、TUNEL 凋亡试剂盒(批号 C1086)、ROS 检测试剂盒(批号 S0064S)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 仪器

170-3930 型蛋白电泳仪及转膜仪系统(美国 Bio-Rad 公司);LAS4000 型超灵敏化学发光成像系统(美国 GE 公司);AB7500 型实时荧光定量聚合酶链反应系统(美国 Applied Biosystems 公司);FX-5000 型细胞压力培养系统(美国 FlexCell 公司);HT7700 型透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司);Eclipse Ti 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

2.1.1 汉黄芩素对 KOA 小鼠的影响 将小鼠随机分为假手术组、模型组及汉黄芩素低、高剂量(40、80 mg/kg)^[17]组,每组 10 只。

2.1.2 基于 Piezo1/PINK1/Parkin 轴考察汉黄芩素对 KOA 小鼠的影响 将小鼠随机分为假手术组、模型组、汉黄芩素(80 mg/kg)组和汉黄芩素(80 mg/kg)+Yoda1(5 mg/kg)^[18]组,每组 10 只。

小鼠于膝关节部位实施内侧半月板失稳(destabilization of medial meniscus, DMM)手术,于手术后第 2 周 ig 汉黄芩素或 ip Yoda1,1 次/d,连续干预 4 周。假手术组仅切开膝关节部位皮肤后缝合,不给予额外干预。给药结束后,小鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉,取血后分离取出膝关节软骨,置于 4%多聚甲醛中室温保存或冻存管-80℃冰箱保存。

2.2 膝关节软骨的 HE 染色

取固定后的膝关节软骨,经梯度乙醇脱水后石蜡包埋,用二甲苯浸泡,脱蜡 2 次,每次 5 min,复水,浸泡,苏木素染色 10 min,洗涤,用 1%盐酸乙醇分化。然后用伊红染色 1 min,梯度乙醇脱水,二甲苯浸泡 2 次,每次 1 min,使切片透明。最后,用中性树胶封片,并在光学显微镜下进行观察。

2.3 膝关节软骨的番红 O-固绿染色

取膝关节软骨石蜡切片,脱蜡复水后,在 Weigert 苏木素染色液滴染 5 min,水洗分化,固绿染色液滴染 3 min,酸洗晾干后番红染色液滴染 2 min。经梯度乙醇脱水、二甲苯中透明并封片后,在光学显微镜下观察并拍照。

2.4 软骨细胞的提取与培养

小鼠 ip 戊巴比妥钠处死,置于 75%乙醇中浸泡 5 min,无菌环境下提取双侧膝关节软骨组织,PBS 清洗后剪成 1 mm³ 小块,置于 0.2% II 型胶原酶中,37 °C 细胞培养箱中消化 6 h;消化完成后经 70 μm 筛网过筛,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,将细胞接种于细胞培养皿中,常规换液、传代,2 代后进行细胞实验。

2.5 细胞活力检测

软骨细胞以 5×10³ 个/孔接种于 96 孔板中,培养过夜,待其生长形态饱满、密度约 80% 时开始实验,加入不同浓度 (12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L) [19] 的汉黄芩素处理 24 h,另设置不含药物的对照组。PBS 洗涤,加入 10 μL CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

为考察汉黄芩素对机械应力干预后软骨细胞活力的影响,设置对照组、模型组和汉黄芩素 (25、50、100 μmol/L) 组。除对照组外,各组细胞均使用细胞培养拉力测试系统进行机械应力加载,参数设置为频率 1 Hz,幅度 10%,时间 12 h [20]。随后给药组加入不同浓度的汉黄芩素处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基,测定细胞活力。

2.6 细胞分组与处理

2.6.1 汉黄芩素对机械应力干预后软骨细胞的影响 设置对照组、模型组和汉黄芩素 (25、50、100 μmol/L) 组。除对照组外,各组细胞均接受应力干预,随后给药组加入不同浓度的汉黄芩素处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基。

2.6.2 基于 Piezo1/PINK1/Parkin 轴考察汉黄芩素对机械应力干预后软骨细胞的影响 设置对照组、模型组、汉黄芩素 (100 μmol/L) 组和汉黄芩素 (100 μmol/L) + Yoda1 (2.5 μmol/L) [21] 组。除对照组外,各组细胞均接受应力干预,随后给药组加入汉黄芩素或 Yoda1 处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基。

2.7 ELISA 检测小鼠血清和软骨细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 水平

取“2.1”项下各组小鼠血清和“2.6”项下各组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1β 和 TNF-α 水平。

2.8 Western blotting 检测小鼠软骨组织和软骨细胞中相关蛋白表达

取“2.1”项下各组小鼠软骨组织和“2.6”项下各组细胞,用含 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法测量蛋白浓度。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,封闭 1 h 后,分别加入 β-actin、collagen II、MMP13、Piezo1、LC3-I/II、p62、Beclin-1、PINK1、Parkin 一抗,4 °C 孵育过夜。加入相应二抗,室温孵育 2 h。加入 ECL 化学发光试剂进行曝光,并使用 Image J software 1.53 软件定量分析条带灰度值。

2.9 qRT-PCR 检测小鼠软骨组织和软骨细胞中相关基因表达

取“2.1”项下各组小鼠软骨组织和“2.6”项下各组细胞,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,并测定 RNA 浓度。使用逆转录试剂将 RNA 转录为 cDNA,利用 PCR 试剂盒对获得的 cDNA 进行扩增,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算各基因的相对表达量。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

2.10 免疫荧光染色检测软骨细胞 Piezo1、Parkin 蛋白表达

取“2.6”项下各组细胞,使用 4% 多聚甲醛将细胞固定,室温下进行通透、封闭。滴加 Piezo1、Parkin 抗体,4 °C 孵育过夜;滴加二抗,室温避光孵育 2 h。使用 DAPI 染核后,于倒置荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image J software 1.53 软件分析图像。

2.11 TUNEL 染色检测软骨细胞凋亡情况

取“2.6.1”项下各组细胞,使用 TUNEL 染色检测细胞在凋亡过程中细胞核 DNA 的断裂情况。根据试剂盒说明书将软骨细胞进行固定、通透等操作后,加入 50 μL TUNEL 工作液,37 °C 避光孵育 1 h。加入 PBS 洗涤 3 次,加入含 DAPI 封片剂进行

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>β-actin</i>	F: GGACTGTTACTGAGCTGCGTT R: CGCCTTCACCGTTCCAGTT	209
<i>collagen II</i>	F: CTGAAGGTGCTCAAGGTTCTC R: GATCCTTTGGCTCCAGGAATAC	109
<i>MMP13</i>	F: ACCCAGCCCTATCCCTTGAT R: GGTACGCGGATGGATGTTCA	180
<i>Piezo1</i>	F: CTTCGGGTGGAGAGGTACG R: ACTCAAAGGCTCTTCGGCTC	141
<i>p62</i>	F: GAGTCCCTCTCCAGATGCT R: GCCAAGACACTGGGCCTATC	227
<i>LC3-II</i>	F: TTGTCATCGTGGGAAGTGGG R: GGTGGCAAGGTATCGACCAA	109
<i>Beclin-1</i>	F: TAGCTGAAGACCGGGCGAT R: CCACCCAGGCTCGTTCTAC	92
<i>PINK1</i>	F: GGCCAGACAGGAATGAAGT R: TATGAGCCATGCTGGTTGCT	185
<i>Parkin</i>	F: CCTGCAAACAAGCAACCCTC R: CACCACTCATCCGGTTTGGA	81

封片后,在倒置荧光显微镜下观察,采用 Image J software 1.53 软件分析图像。

2.12 透射电镜观察软骨细胞自噬情况

取“2.6.1”项下各组细胞,使用透射电镜观察细胞自噬情况。将软骨细胞保存于电镜固定液中,随后进行脱水、包埋、切片、染色等步骤处理,使用透射电镜观察各组软骨细胞中线粒体与自噬体的形态变化。

2.13 软骨细胞中 ROS 水平的检测

取“2.6.1”项下各组细胞,使用 DHE 染色剂对细胞 ROS 水平进行检测。将软骨细胞在含 5 μmol/L DHE 的无血清培养基中孵育 20 min,吸弃培养基,用 PBS 洗涤 3 次。于倒置荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image J software 1.53 软件分析图像。

2.14 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。

3 结果

3.1 汉黄芩素对 KOA 小鼠软骨损伤的影响

软骨 HE 染色结果(图 1-A)显示,模型组小鼠软骨表面较假手术组更为粗糙,边缘损伤严重,细胞排列紊乱,炎性浸润明显;汉黄芩素各剂量组软骨结构趋于正常,软骨表面相对光滑,细胞排列略齐,炎性浸润减少。软骨番红 O-固绿染色结果(图 1-B)显示,模型组小鼠膝关节软骨较假手术组不光

滑,存在缺损及基质丢失;汉黄芩素各剂量组可改善软骨损伤,减轻基质丢失与形态缺损。如图 1-C、D 所示,与假手术组比较,模型组小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低($P < 0.01$)。ECM 的丢失是 KOA 软骨损伤的重要标志之一。如图 1-E、F 所示,与假手术组比较,模型组小鼠软骨组织中 collagen II 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$),MMP13 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$),表明 KOA 小鼠模型中存在严重的 ECM 丢失;与模型组比较,汉黄芩素各剂量组小鼠软骨组织中 collagen II 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$),MMP13 蛋白及 mRNA 表达水平显著下降($P < 0.01$),表明汉黄芩素能改善 KOA 的软骨基质损伤。

3.2 汉黄芩素对 KOA 小鼠软骨中线粒体自噬相关蛋白表达的影响

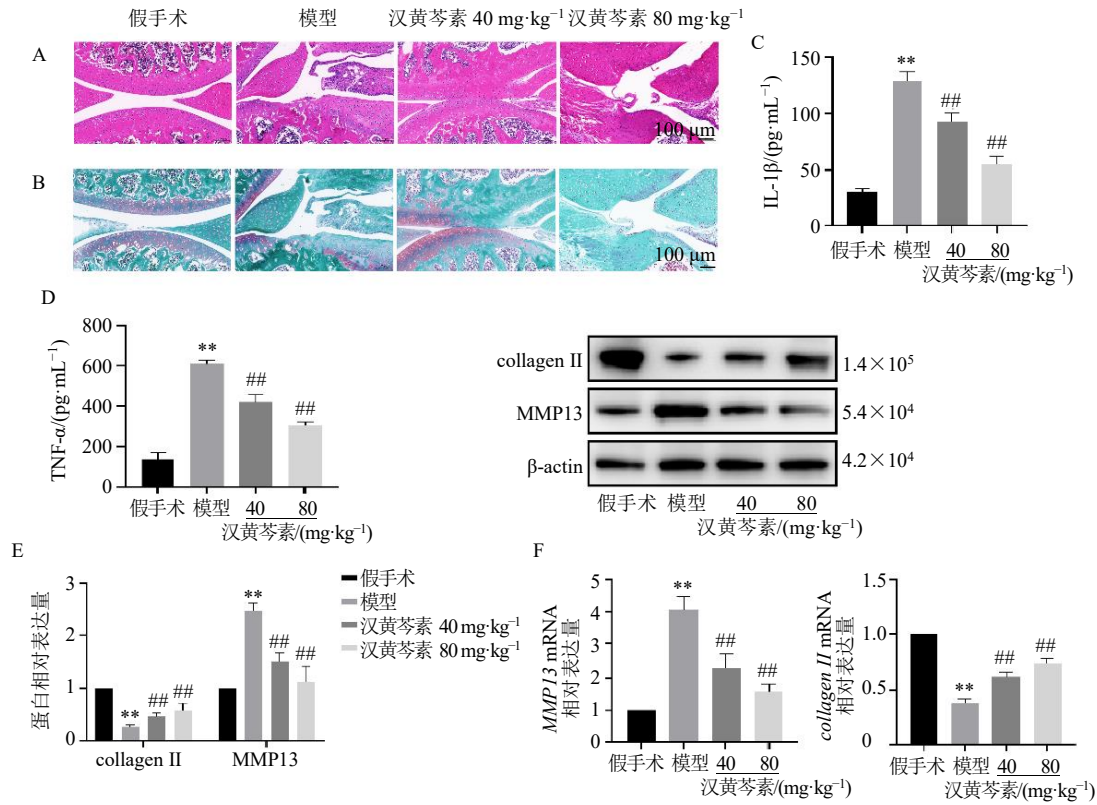
如图 2 所示,与假手术组比较,模型组小鼠软骨组织中 p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$),LC3-II/I、Beclin-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组 p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$),LC3-II/I、Beclin-1 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$)。

3.3 汉黄芩素对软骨细胞活力的影响

如图 3-A 所示,200 μmol/L 汉黄芩素处理软骨细胞 24 h 后,细胞活力显著降低($P < 0.01$);12.5~100.0 μmol/L 汉黄芩素对软骨细胞活力无明显影响。因此,选取 25、50、100 μmol/L 汉黄芩素用于后续实验。如图 3-B 所示,与对照组比较,模型组细胞活力显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素(25、50、100 μmol/L)组细胞活力显著升高($P < 0.01$),且呈剂量相关性。

3.4 汉黄芩素抑制软骨细胞机械应力损伤模型中机械敏感离子通道的激活

如图 4-A、B 所示,与对照组比较,模型组 Piezo1 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组 Piezo1 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。同时通过免疫荧光检测软骨细胞中 Piezo1 的表达,如图 4-C 所示,与对照组比较,模型组 Piezo1 阳性表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组 Piezo1 阳性表达显著降低($P < 0.01$)。



A-各组膝关节软骨组织 HE 染色 ($\times 200$); B-各组膝关节软骨组织番红 O-固绿染色 ($\times 200$); C、D-各组血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平; E-各组软骨组织 collagen II、MMP13 蛋白表达; F-各组软骨组织 collagen II、MMP13 mRNA 表达; 与假手术或对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同。

A-HE staining of knee joint cartilage tissue in each group ($\times 200$); B-safranin O-fast green staining of knee joint cartilage tissue in each group ($\times 200$); C, D-levels of IL-1 β and TNF- α in serum of each group; E-protein expressions of collagen II and MMP13 in cartilage tissue of each group; F-mRNA expressions of collagen II and MMP13 in cartilage tissue of each group; ** $P < 0.01$ vs sham or control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 汉黄芩素对 KOA 小鼠软骨损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of wogonin on cartilage injury in KOA mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

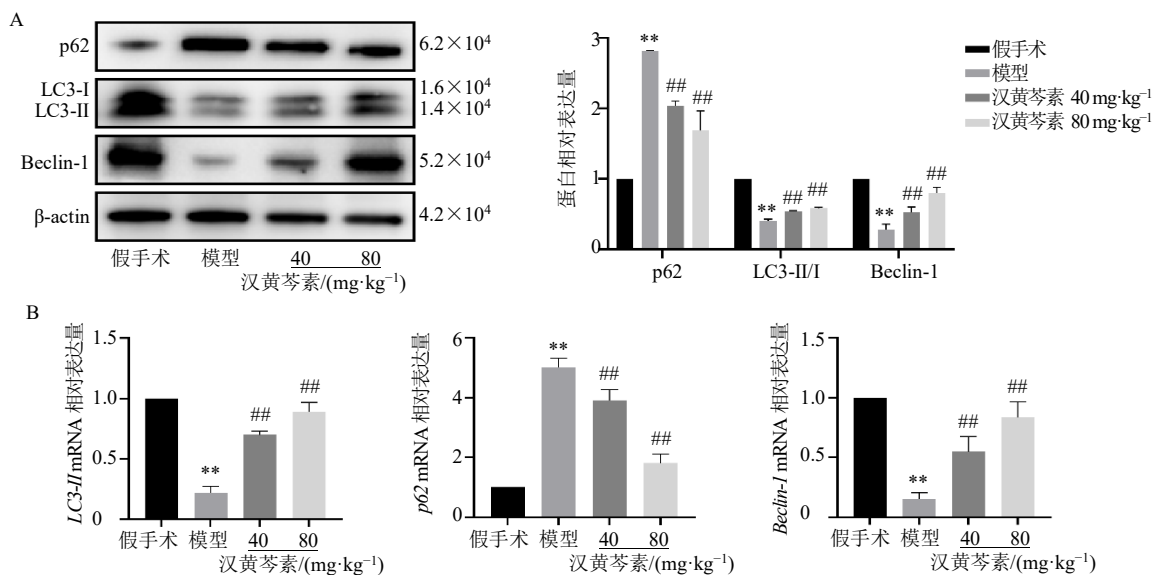


图 2 汉黄芩素对 KOA 小鼠软骨中线粒体自噬相关蛋白 (A) 和基因 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of wogonin on expressions of mitophagy-related proteins (A) and genes (B) in cartilage of KOA mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

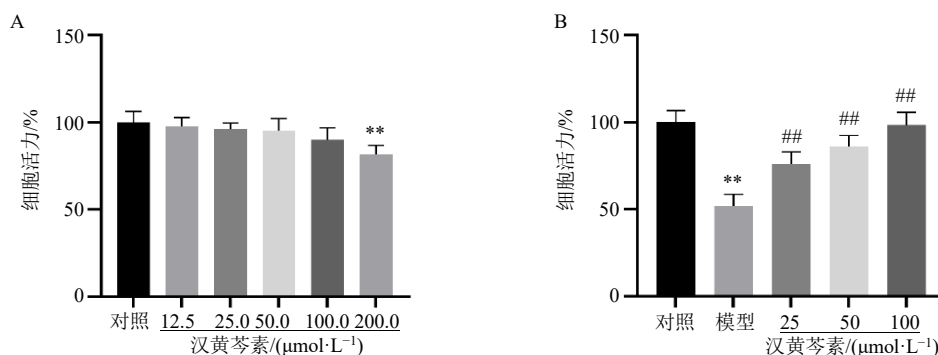
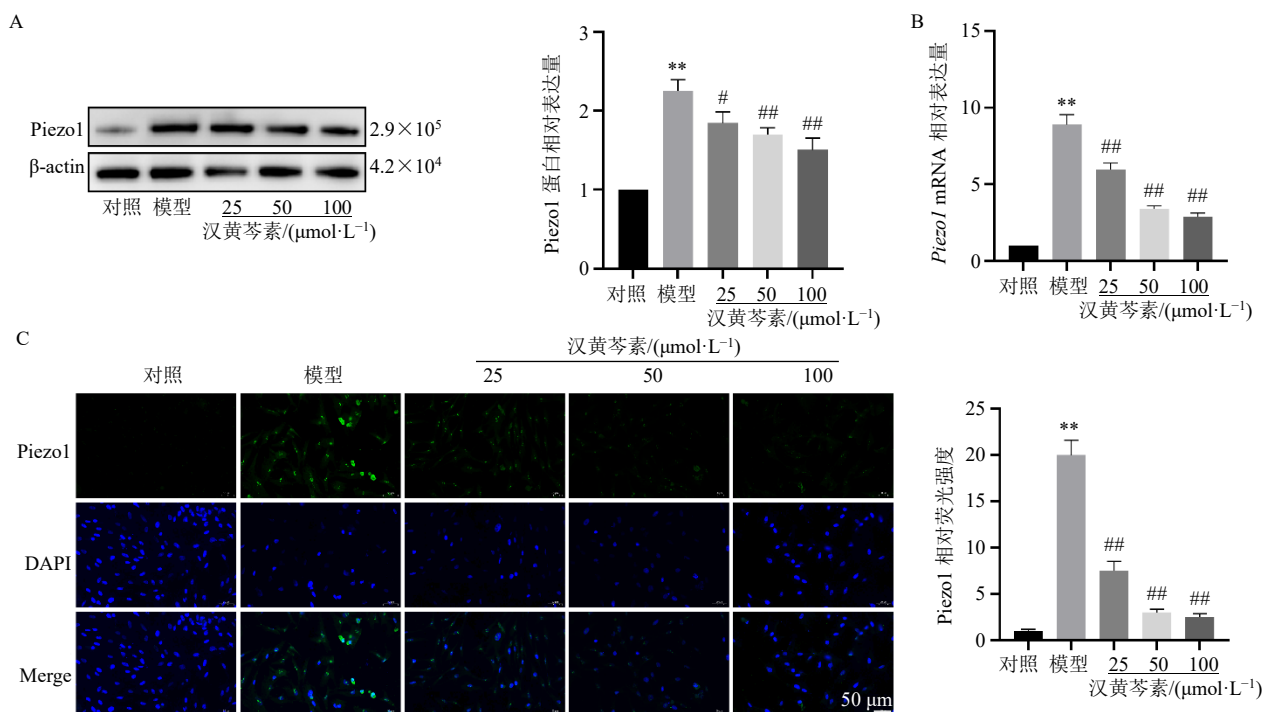


图 3 汉黄芩素对软骨细胞 (A) 和拉力干预的软骨细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of wogonin on viability of chondrocytes (A) and chondrocytes under tension intervention (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-各组软骨细胞 Piezo1 蛋白表达; B-各组软骨细胞 Piezo1 mRNA 表达; C-免疫荧光检测各组软骨细胞 Piezo1 蛋白表达 ($\times 400$)。

A-expression of Piezo1 protein in chondrocytes of each group; B-expression of Piezo1 mRNA in chondrocytes of each group; C-Piezo1 protein expression in chondrocytes of each group detected by immunofluorescence ($\times 400$).

图 4 汉黄芩素抑制软骨细胞机械应力损伤模型中机械敏感离子通道的激活 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Wogonin inhibits activation of mechanosensitive ion channels in a mechanical stress injury model of chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

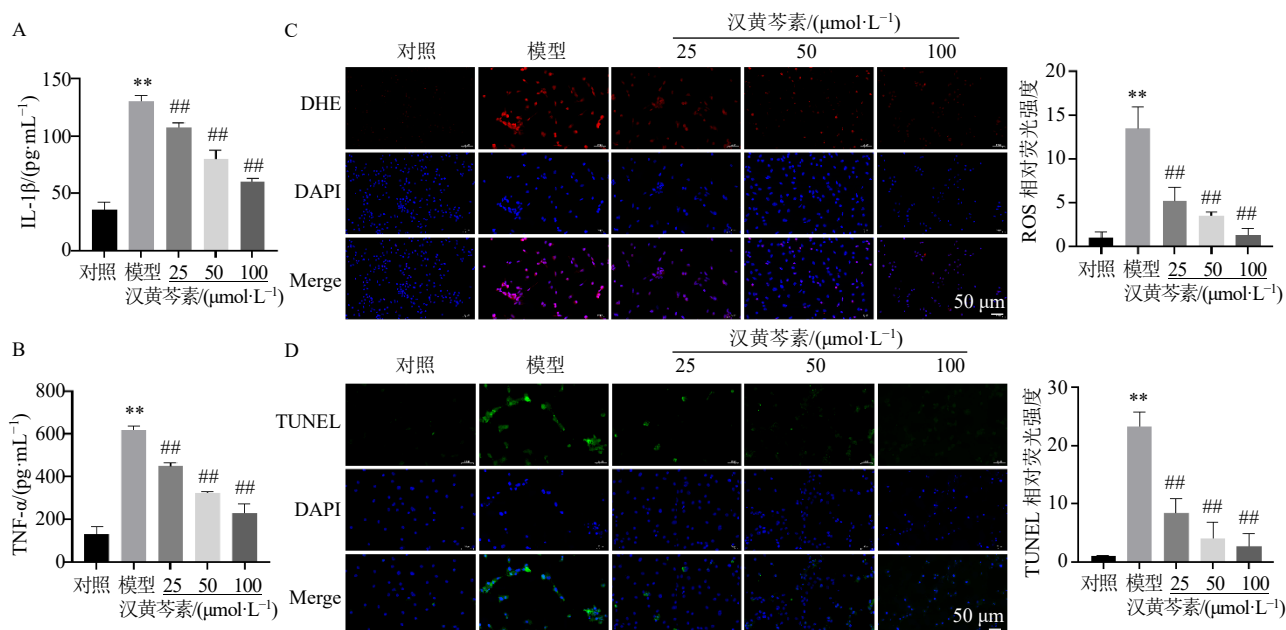
3.5 汉黄芩素对软骨细胞机械应力损伤模型中炎症反应、氧化应激和细胞凋亡的影响

如图 5-A、B 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 IL-1 β 及 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组细胞上清液中 IL-1 β 及 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量相关性。DHE、TUNEL 染色结果(图 5-C、D)显示,与对照组比较,模型组 ROS 及细胞凋亡水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩

素各剂量组 ROS 及细胞凋亡水平均显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量相关性。

3.6 汉黄芩素对软骨细胞机械应力损伤模型中线粒体自噬的影响

通过透射电镜观察各组软骨细胞线粒体结构,如图 6-A 所示,对照组软骨细胞中线粒体呈椭圆形或圆形,膜结构完整,被双层膜包围成封闭的自噬体。模型组软骨细胞的线粒体形态不完整,有明显肿胀,嵴柱结构消失或者断裂,呈空泡状,自噬小

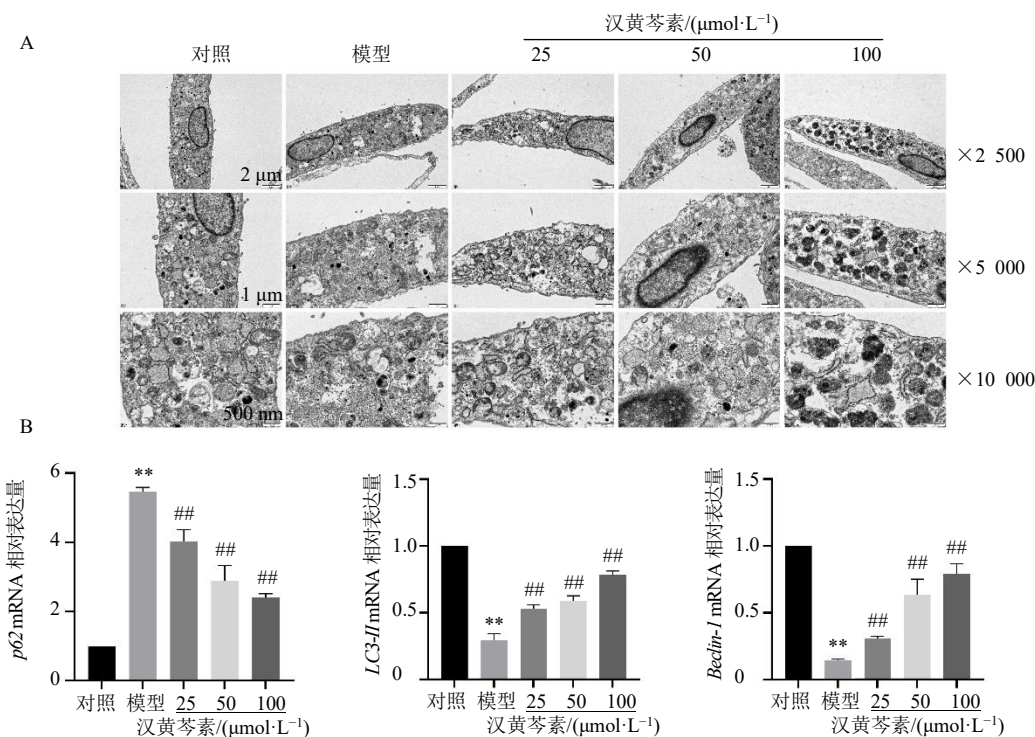


A、B-各组软骨细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 水平；C-DHE 染色检测 ROS 水平 ($\times 400$)；D-TUNEL 染色检测细胞凋亡水平 ($\times 400$)。

A, B-levels of IL-1 β and TNF- α in supernatant of chondrocytes in each group; C-ROS level detected by DHE staining ($\times 400$); D-level of cell apoptosis detected by TUNEL staining ($\times 400$).

图 5 汉黄芩素对软骨细胞机械应力损伤模型中炎症反应、氧化应激和细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of wogonin on inflammatory response, oxidative stress and cell apoptosis in a mechanical stress injury model of chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-透射电镜下的软骨细胞；B-各组软骨细胞 p62、LC3-II、Beclin-1 mRNA 表达。

A-chondrocytes under transmission electron microscopy; B-expressions of p62, LC3-II and Beclin-1 mRNA in chondrocytes of each group.

图 6 汉黄芩素对软骨细胞机械应力损伤模型中线粒体自噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

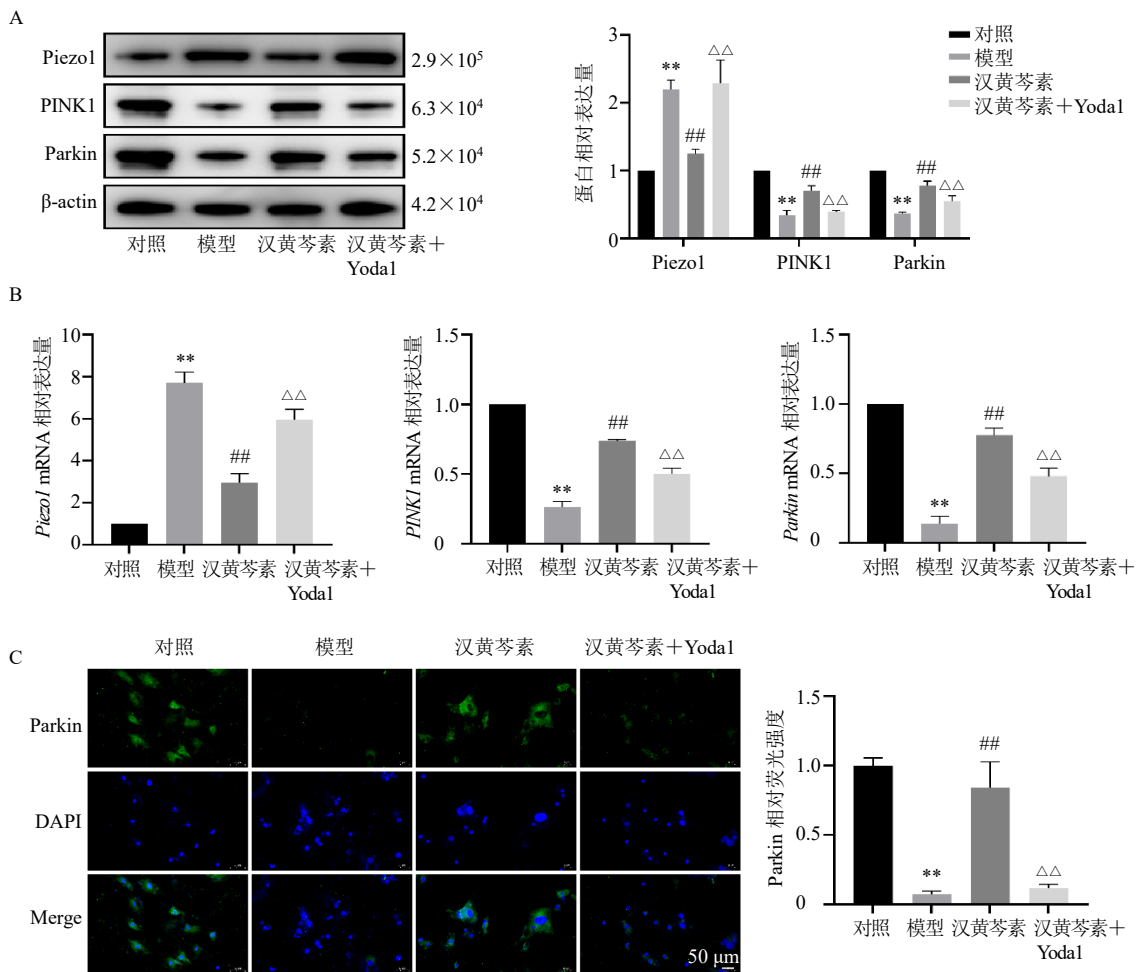
Fig. 6 Effect of wogonin on mitochondrial autophagy in a model of mechanical stress injury in chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

体数量减少。汉黄芩素干预后软骨细胞形态较模型组细胞更为趋近于对照组。如图 6-B 所示,与对照组比较,模型组 *p62* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *LC3-II*、*Beclin-1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素各剂量组 *p62* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *LC3-II*、*Beclin-1* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.7 汉黄芩素通过抑制 Piezo1/PINK1/Parkin 信号轴改善软骨细胞机械应力损伤

如图 7-A、B 所示,与对照组比较,模型组 Piezo1 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低

($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素组 Piezo1 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与汉黄芩素组比较,汉黄芩素+Yoda1 组 Piezo1 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。同时通过免疫荧光检测软骨细胞中 Parkin 的表达,如图 7-C 所示,与对照组比较,模型组 Parkin 阳性表达显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,汉黄芩素组 Parkin 阳性表达显著升高 ($P < 0.01$);与汉黄芩素组比较,汉黄芩素+Yoda1 组 Parkin 阳性表达显著下降 ($P < 0.01$)。



A-各组软骨细胞 Piezo1、PINK1、Parkin 蛋白表达; B-各组软骨细胞 *Piezo1*、*PINK1*、*Parkin* mRNA 表达; C-免疫荧光检测各组软骨细胞 Parkin 蛋白表达 ($\times 400$);与汉黄芩素组比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$, 图 8 同。

A-expressions of Piezo1, PINK1 and Parkin proteins in chondrocytes of each group; B-expressions of *Piezo1*, *PINK1* and *Parkin* mRNA in chondrocytes of each group; C-Parkin protein expression in chondrocytes of each group detected by immunofluorescence ($\times 400$); $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs wogonin group, same as Fig. 8.

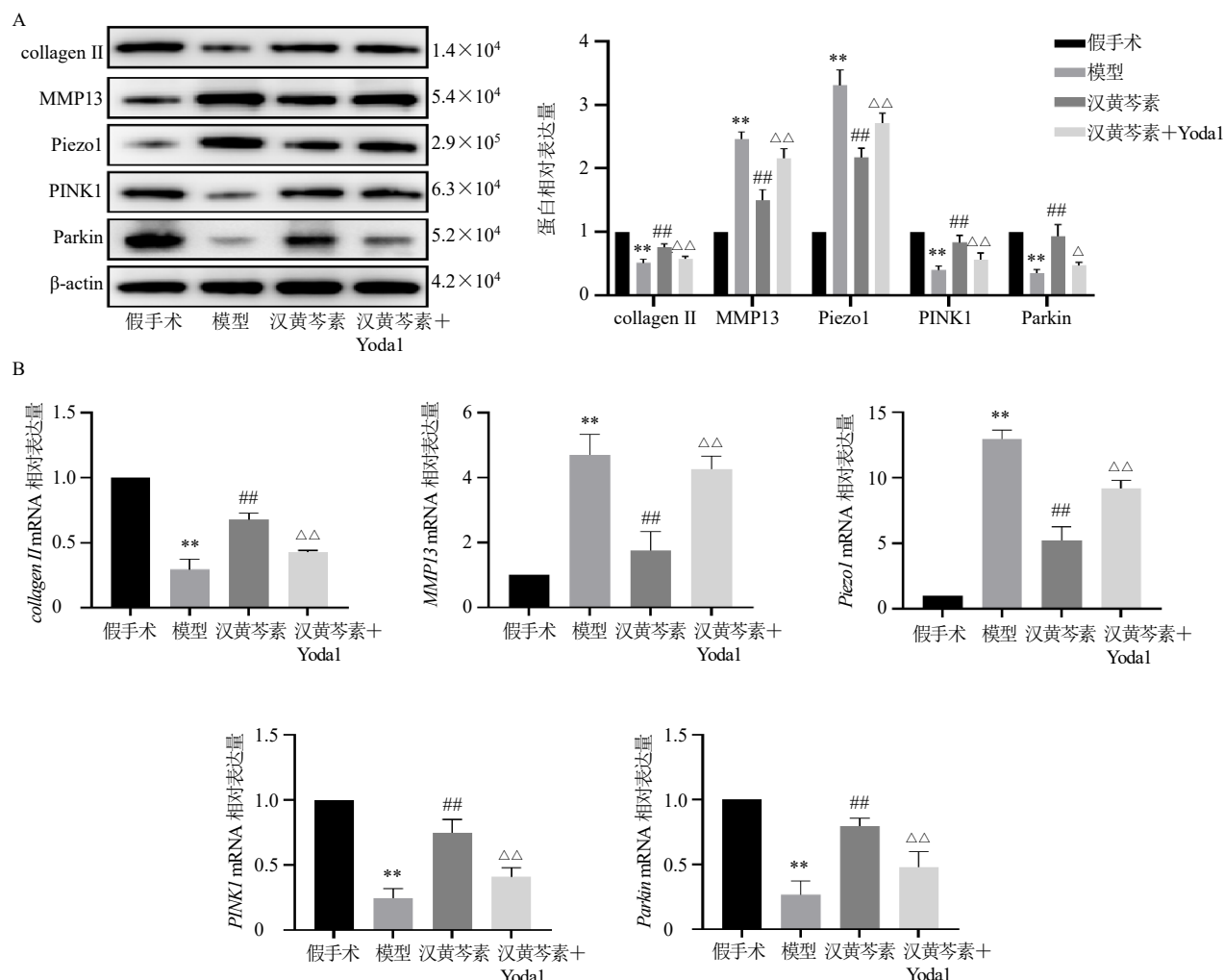
图 7 汉黄芩素通过抑制 Piezo1/PINK1/Parkin 信号轴改善软骨细胞机械应力损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Wogonin improves mechanical stress injury in chondrocytes by inhibiting Piezo1/PINK1/Parkin signaling axis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 汉黄芩素通过抑制 Piezo1/PINK1/Parkin 信号轴促进自噬改善小鼠 KOA

如图 8-A、B 所示,与假手术组比较,模型组小鼠软骨组织中 Piezo1、MMP13 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), collagen II、PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,汉黄芩素组软骨组织中 Piezo1、

MMP13 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), collagen II、PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$);与汉黄芩素组比较,汉黄芩素+Yoda1 组软骨组织中 Piezo1、MMP13 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), collagen II、PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。



A-各组软骨细胞 collagen II、MMP13、Piezo1、PINK1、Parkin 蛋白表达; B-各组软骨细胞 collagen II、MMP13、Piezo1、PINK1、Parkin mRNA 表达。

A-expressions of collagen II, MMP13, Piezo1, PINK1 and Parkin proteins in chondrocytes of each group; B-expressions of collagen II, MMP13, Piezo1, PINK1, Parkin mRNA in chondrocytes of each group.

图 8 汉黄芩素通过抑制 Piezo1/PINK1/Parkin 信号轴促进自噬改善小鼠 KOA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Wogonin promotes autophagy and improves KOA in mice by inhibiting Piezo1/PINK1/Parkin signaling axis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

软骨是关节表面的一层光滑结缔组织,在下肢运动过程中可以减少摩擦及振动,起到保护垫的作用,但异常应力刺激、炎症和代谢变化都会导致软骨损伤^[22]。例如,在关节过度使用或关节面受力不

均时,软骨层都会受到超过正常负荷的刺激,引起软骨细胞死亡及基质降解^[23]。本研究通过 DMM 手术使小鼠膝关节力学环境失衡,在异常应力刺激下,模型组小鼠关节软骨面粗糙,细胞排列紊乱。但经汉黄芩素治疗后,小鼠软骨基质丢失相对减

轻,炎症浸润范围缩小,同时维持软骨稳定性及抗压力的 collagen II 表达升高,分解 ECM 的 MMP13 表达降低,软骨损伤得到不同程度的改善。有研究表明,汉黄芩素通过抑制心肌细胞氧化应激反应,增加自噬小体数量以改善心脏肥大^[24]。Deng 等^[25]研究发现,p62 作为参与自噬体形成的关键蛋白,可以充当自噬标志物用于监测。李召彬等^[26]使用红景天苷促进心肌线粒体自噬,发现自噬体降解蛋白 p62 表达下调,且 LC3-II/I、Beclin-1 表达升高。这与本研究结果相似,在汉黄芩素处理后的小鼠软骨组织中 p62 表达降低,LC3-II/I、Beclin-1 表达上调,提示汉黄芩素对软骨细胞自噬的激活作用。表明汉黄芩素可以减轻机械应力刺激下的小鼠关节软骨损伤,而这一过程可能是通过提高软骨细胞自噬实现的。

在骨关节疾病的背景下,机械应力刺激与 Piezo1 介导的分子机制密切相关。据报道,Piezo1 可以通过感知机械负荷,在成骨细胞骨重塑中起调节作用,并通过这一机制介导强制性脊柱炎的病理性新骨形成^[27]。在软骨组织中,Piezo1 的特异性敲除可以减轻大鼠由前交叉韧带横断手术造成的软骨降解和炎症反应^[28]。本研究通过细胞牵拉装置对软骨细胞施加机械应力,并使用不同剂量的汉黄芩素进行干预,结果显示汉黄芩素抑制了被机械应力激活的 Piezo1 表达,并下调细胞上清液的炎症因子水平。相关研究表明,抑制 Piezo1 表达可以减弱机械应力诱导的软骨细胞凋亡,继而延缓 KOA 进展中的软骨退变^[6]。结合本研究结果,说明 Piezo1 可能是机械应力与细胞死亡的中间因素,且汉黄芩素可能通过影响 Piezo1 改善机械负荷对软骨细胞产生的不利影响。此外,本研究在干预软骨细胞的过程中观察到线粒体结构及功能的损伤,具体包括 ROS 释放增加、线粒体形态破坏及自噬小体数量减少。这与既往研究一致,即线粒体受损会膨胀、裂变,导致 ROS 生成增加、细胞色素 C 紊乱、细胞因子含量升高和细胞死亡^[29]。此外,当线粒体受损时,自噬障碍会影响代谢物的清除,使 ROS 水平进一步升高,从而导致线粒体功能衰退,能量代谢紊乱^[30]。而本研究发现,汉黄芩素的干预增加了自噬小体数量、改善线粒体形态并降低 ROS 水平,且呈剂量相关性,表明汉黄芩素具有改善线粒体功能、激活自噬程序的积极作用。

自噬是细胞自我消化和在循环的生物过程,主

要通过溶酶体将有害或不必要的成分降解,从而维持细胞内平衡^[31]。PINK1/Parkin 途径是自噬的核心机制之一,在氧化应激、低膜电位等压力条件下,线粒体外膜上的 PINK1 将细胞质中的 Parkin 引导至线粒体表面,启动自噬程序^[32]。但在本研究中,Piezo1 通道响应异常应力刺激而开放,使胞质钙离子水平升高,激活钙蛋白酶,从而裂解 PINK1 并阻止 Parkin 募集^[33]。此外,胞内钙稳态失衡导致线粒体通透性转换孔持续开放,使 ROS 大量逸出,将 Parkin 结构域中的关键半胱氨酸(Cys431/Cys95)失活,消除 E3 连接酶活性和泛素化信号传导^[34]。因此,为了探究汉黄芩素在机械应力影响下的软骨细胞自噬机制,本研究在体内外实验中通过汉黄芩素治疗应力刺激干预的软骨组织及细胞。结果显示,机械应力刺激使软骨组织及细胞中的 Piezo1 表达上调,PINK1、Parkin 表达下调;而汉黄芩素处理后,Piezo1 表达下降,PINK1、Parkin 表达升高,且软骨损伤情况得到改善,推测汉黄芩素可能通过调节 Piezo1 及 PINK1/Parkin 通路,促进细胞自噬,发挥对 KOA 小鼠的软骨保护作用。为了进一步验证此结论,本研究使用 Piezo1 激动剂 Yoda1 干预汉黄芩素治疗后的 KOA 小鼠及软骨细胞。发现 Yoda1 逆转了汉黄芩素对 PINK1/Parkin 通路表达的提升效果,并加剧了小鼠的软骨组织损伤。提示汉黄芩素激活 PINK1/Parkin 通路并改善细胞自噬的作用,或与其影响 Piezo1 表达相关。

综上,本研究发现汉黄芩素可以通过调节 Piezo1 表达,激活 PINK1/Parkin 通路并促进 KOA 小鼠细胞自噬,从而改善机械应力影响下的膝关节软骨损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田地,刘子修,于利凯,等. UHPLC-MS/MS-网络药理学联合实验验证探讨通络沐足散改善软骨损伤的作用机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(3): 363-374.
- [2] Jang S, Lee K, Ju J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2619.
- [3] Yu Q, Zhao B, He Q, et al. microRNA-206 is required for osteoarthritis development through its effect on apoptosis and autophagy of articular chondrocytes via modulating the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B-mTOR pathway by targeting insulin-like growth factor-1 [J]. *J*

- Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5287-5303.
- [4] Yang H X, Wen Y, Zhang M, *et al.* MTORC1 coordinates the autophagy and apoptosis signaling in articular chondrocytes in osteoarthritic temporomandibular joint [J]. *Autophagy*, 2020, 16(2): 271-288.
 - [5] Katz J N, Arant K R, Loeser R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(6): 568-578.
 - [6] Sun Y, Leng P, Guo P C, *et al.* G protein coupled estrogen receptor attenuates mechanical stress-mediated apoptosis of chondrocyte in osteoarthritis via suppression of Piezo1 [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 96.
 - [7] Lee W, Leddy H A, Chen Y, *et al.* Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): E5114-E5122.
 - [8] Shi S, Kang X J, Zhou Z, *et al.* Excessive mechanical stress-induced intervertebral disc degeneration is related to Piezo1 overexpression triggering the imbalance of autophagy/apoptosis in human nucleus pulposus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 119.
 - [9] Tsai S Y, Chung P C, Owaga E E, *et al.* Alpha-mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) pericarp extract reduces high fat-diet induced hepatic steatosis in rats by regulating mitochondria function and apoptosis [J]. *Nutr Metab*, 2016, 13: 88.
 - [10] Lu Y Y, Li Z J, Zhang S Q, *et al.* Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 736-766.
 - [11] Sun K, Jing X Z, Guo J C, *et al.* Mitophagy in degenerative joint diseases [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2082-2092.
 - [12] Fang E F, Hou Y J, Palikaras K, *et al.* Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 401-412.
 - [13] Zhang B S, Xu D. Wogonoside preserves against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by suppression of apoptosis, inflammation, and fibrosis via modulating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(6): 877-885.
 - [14] Liu X Q, Jiang L, Li Y Y, *et al.* Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 96-110.
 - [15] 姜海燕, 王颜, 王瑞华, 等. 汉黄芩素调节 Hippo-Yap 信号通路对 H/R 诱导的心肌细胞自噬和凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(13): 3191-3195.
 - [16] Khan N M, Haseeb A, Ansari M Y, *et al.* A wogonin-rich-fraction of *Scutellaria baicalensis* root extract exerts chondroprotective effects by suppressing IL-1 β -induced activation of AP-1 in human OA chondrocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43789.
 - [17] 刘霞, 初英杰, 张美琦, 等. 汉黄芩素抑制 NLRP3 炎症小体活化改善脂多糖诱导小鼠急性肺损伤作用 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(5): 1114-1123.
 - [18] Wasi M, Wang S B, Guerra R M, *et al.* Different effects of moderate tibial loading and Yoda1 on breast cancer-induced osteolysis in aged mice [J]. *Bone*, 2025, 197: 117517.
 - [19] 王瑜茹, 李思源, 徐烨, 等. 汉黄芩素对胶原诱导性关节炎大鼠关节炎症影响的内质网应激途径 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(5): 1026-1035.
 - [20] Javier Rendon C, Flood E, Thompson J M, *et al.* PIEZO1 mechanoreceptor activation reduces adipogenesis in perivascular adipose tissue preadipocytes [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 995499.
 - [21] Wang S Y, Li W W, Zhang P F, *et al.* Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis via Piezo1 channel facilitated calcium influx [J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 63-75.
 - [22] Diamond L E, Grant T, Uhlrich S D. Osteoarthritis year in review 2023: Biomechanics [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32(2): 138-147.
 - [23] Atcha H, Jairaman A, Holt J R, *et al.* Mechanically activated ion channel Piezo1 modulates macrophage polarization and stiffness sensing [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3256.
 - [24] 蒲俊, 何文凤, 胡厚祥. 汉黄芩素调控 PI3K/AKT 信号通路抑制 NLRP3 炎症小体活化改善老年冠心病大鼠心功能及心肌损伤 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(23): 5853-5859.
 - [25] Deng Y N, Shi J, Liu J, *et al.* Celastrol protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from rotenone-induced injury through induction of autophagy [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(1): 1-9.
 - [26] 李召彬, 孔佳杰, 席树强, 等. 红景天苷调节 PINK1/Parkin 信号通路对缺血性心肌病大鼠线粒体自噬的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2024, 28(22): 8-15.
 - [27] Chen S W, Li Z H, Chen D Y, *et al.* Piezo1-mediated mechanotransduction promotes entheseal pathological new bone formation in ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(4): 533-545.
 - [28] Brylka L J, Alimy A R, Tschaffon-Müller M E A, *et al.* Piezo1 expression in chondrocytes controls endochondral ossification and osteoarthritis development [J]. *Bone Res*,

- 2024, 12(1): 12.
- [29] Li X Z, Pan J, Li H L, *et al.* DsbA-L interacts with VDAC1 in mitochondrion-mediated tubular cell apoptosis and contributes to the progression of acute kidney disease [J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103859.
- [30] Cai C, Guo Z Z, Chang X, *et al.* Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102288.
- [31] Araya J, Tsubouchi K, Sato N, *et al.* PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis [J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 510-526.
- [32] Yu Q, Li L, Yu S Y, *et al.* Mitochondrial damage and autophagy dysregulation in Alzheimer's disease: Mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Neurochem Res*, 2025, 50(4): 251.
- [33] Todisco S, Musio B, Pesce V, *et al.* Targeting mitochondrial impairment for the treatment of cardiovascular diseases: From hypertension to ischemia-reperfusion injury, searching for new pharmacological targets [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 208: 115405.
- [34] Hausteiner M, Hannes T, Trieschmann J, *et al.* Excitation-contraction coupling in zebrafish ventricular myocardium is regulated by trans-sarcolemmal Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125654.

[责任编辑 李亚楠]