

# 透骨消痛胶囊调控泛凋亡延缓膝骨关节炎软骨细胞退变的机制

叶锦霞<sup>1</sup>, 林亦欣<sup>1</sup>, 雷晓庆<sup>1</sup>, 黄艳峰<sup>2</sup>, 付长龙<sup>2</sup>, 李德森<sup>3</sup>, 王文义<sup>4\*</sup>, 王岚<sup>5\*</sup>

(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350122; 2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福州 350122; 3. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 4. 福建中医药大学科技创新与转化中心, 福州 350122; 5. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨透骨消痛胶囊调控软骨细胞泛凋亡,延缓软骨细胞退变,从而改善膝骨关节炎(KOA)症状的作用。方法:体内实验:50只C57BL/6雄性小鼠随机分为假手术组,模型组,透骨消痛胶囊低、高剂量组,双氯芬酸钠组,每组10只。除假手术组外,其余各组采用改良Hulth法建立KOA模型。造模成功后,透骨消痛胶囊组分别给予7.2、14.4 g·kg<sup>-1</sup>溶液灌胃,双氯芬酸钠组给予0.05 g·kg<sup>-1</sup>溶液灌胃,每日1次,持续6周。通过骨关节炎的严重程度指数(Lequesne MG)膝功能评分进行模型评价;采用微计算机断层扫描技术(micro-CT)扫描小鼠膝关节;苏木素-伊红(HE)染色和番红-固绿染色观察软骨组织形态;透射电镜(TEM)观察小鼠软骨组织泛凋亡的超微结构;多色免疫荧光(IF)共定位观察小鼠软骨组织中剪切的胱天蛋白酶(cleaved Caspase)-3、受体相互作用蛋白3(RIPK3)和消皮素D(GSDMD)的N端结构域(GSDMD-N)蛋白的共定位;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组软骨组织cleaved Caspase-3、RIPK3和GSDMD-N蛋白表达。体外实验:选取4周龄SD大鼠,运用机械-0.2%Ⅱ型胶原酶消化法,建立软骨细胞体外培养体系。将第2代软骨细胞分为空白组、模型组[10 mg·L<sup>-1</sup>脂多糖(LPS)预处理24 h+1 μmol·L<sup>-1</sup> Nigericin处理4 h]、透骨消痛胶囊组(10 mg·L<sup>-1</sup> LPS预处理24 h+1 μmol·L<sup>-1</sup> Nigericin处理4 h+100 g·L<sup>-1</sup>透骨消痛胶囊干预24 h)。荧光显微镜观察活性氧检测试剂盒、吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)试剂盒和YO-PRO-1/PI试剂盒染色后软骨细胞活性氧(ROS)水平和凋亡、坏死性凋亡与焦亡情况;TEM观察软骨细胞泛凋亡超微结构变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中白细胞介素(IL)-1β与IL-18含量;Western blot测定软骨细胞凋亡、坏死性凋亡与焦亡相关蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、Z-DNA结合蛋白1(ZBP1)、GSDMD-N和NOD样受体蛋白3(NLRP3)表达。结果:与假手术组比较,模型组小鼠Lequesne MG评分较高;关节间隙变窄,骨赘增多,软骨缺损严重;超微结构可见软骨细胞凋亡、坏死性凋亡与焦亡程度明显;软骨组织中cleaved Caspase-3、RIPK3和GSDMD-N表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),软骨细胞ROS水平显著升高( $P<0.01$ ),AO/EB染色橙红色荧光表达量显著增加( $P<0.01$ ),YO-PRO-1/PI染色绿色荧光与红色荧光表达量显著增加( $P<0.01$ );软骨细胞中上清液IL-1β和IL-18水平显著提高( $P<0.01$ );细胞中泛凋亡相关蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N和NLRP3的表达显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,透骨消痛胶囊组可明显改善小鼠相关参数,Lequesne MG评分降低,关节间隙增大,骨赘明显减少,软骨损伤减轻,软骨细胞凋亡、坏死性凋亡与焦亡程度减轻,线粒体肿胀及内质网扩张缓解,ROS、IL-1β和IL-18水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),软骨组织中泛凋亡相关蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),Western blot结果显示软骨细胞中泛凋亡相关蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N和NLRP3表达量也明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:透骨消痛胶囊能通过减轻氧化应激,下调泛凋亡相关蛋白GSDMD-N、cleaved Caspase-3和RIPK3等表达,从而延缓软骨细胞退变,改善KOA症状。

**[关键词]** 透骨消痛胶囊; 膝骨关节炎; 软骨细胞; 泛凋亡

**[中图分类号]** R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0149-13

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20251903

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251127.1445.002>

**[网络出版日期]** 2025-11-27 15:51:19



**[收稿日期]** 2025-07-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202836);国家中医药管理局临床中药学高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023107);福建省自然科学基金项目(2024J01137);陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2023004);福建中医药大学校管课题(X2023023)

**[第一作者]** 叶锦霞,博士,高级实验师,硕士生导师,从事中西医结合防治骨伤病研究,E-mail:xiaoyezhi1203@126.com

**[通信作者]** \*王文义,实验师,从事中药药理研究,E-mail:wangwy@fjtc.edu.cn;

\*王岚,主任技师,从事中药药理研究,E-mail:w111111@sina.com

## Mechanistic Study on Tougu Xiaotong Capsules in Regulating PANoptosis to Delay Degeneration of Chondrocytes in Knee Osteoarthritis

YE Jinxia<sup>1</sup>, LIN Yixin<sup>1</sup>, LEI Xiaoqing<sup>1</sup>, HUANG Yanfeng<sup>2</sup>, FU Changlong<sup>2</sup>,  
LI Desen<sup>3</sup>, WANG Wenyi<sup>4\*</sup>, WANG Lan<sup>5\*</sup>

(1. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350122, China; 2. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China; 3. College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 4. Innovation and Transformation Center, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 5. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Tougu Xiaotong capsules (TGXTC) on the regulation of chondrocyte PANoptosis, delay of chondrocyte degeneration, and improvement of the symptoms in knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** *In vivo* experiments: 50 male C57BL/6 mice were randomly assigned into five groups ( $n=10$  per group): sham operation group, model group, low-dose TGXTC group ( $7.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), high-dose TGXTC group ( $14.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and diclofenac sodium group ( $0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Except for the sham group, KOA models were established in all other groups using the modified Hulth method. Following successful model induction, the TGXTC groups received daily oral gavage of 7.2 or  $14.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 6 weeks, while the diclofenac sodium group received  $0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  solution daily over the same duration. Model evaluation was performed using Lequesne MG score; micro-computed tomography (micro-CT) was used to scan the knee, hematoxylin-eosin (HE) staining and safranin O-fast green staining were used to observe the morphology of cartilage, transmission electron microscopy (TEM) was used to determine ultrastructural changes of PANoptosis. Multiple immunofluorescence (IF) co-localization assays was performed to detect the co-localization of cleaved Caspase-3, receptor-interacting protein 3 (RIPK3), and the N-terminal domain of gasdermin D (GSDMD-N) in cartilage tissue, while western blot was employed to detect the expression levels of cleaved Caspase-3, RIPK3, and GSDMD-N. *In vitro* experiments: The knee cartilages of 4-week-old SD rats were isolated, and a chondrocyte in vitro culture system was established through mechanical digestion with 0.2% type II collagenase. Second-generation chondrocytes were divided into three groups: the control group, the model group (pretreated with  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  lipopolysaccharide (LPS) for 24 h followed by treatment with  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  nigericin for 4 h), and the TGXTC treatment group (pretreated with  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  LPS for 24 h, followed by exposure to  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  nigericin for 4 h and subsequently treated with  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TGXTC for an additional 24 h). The levels of reactive oxygen species (ROS), apoptosis, necroptosis, and pyroptosis of chondrocytes were evaluated via fluorescence microscopy following staining with ROS detection, AO/EB and YO-PRO-1/PI staining kits. Transmission electron microscopy was utilized to investigate the ultrastructural changes associated with PANoptosis in cartilage tissue of KOA mice. Inflammatory cytokine levels (IL-1 $\beta$  and IL-18) were measured using ELISA. Western blot was conducted to assess protein expressions related to PANoptosis, including cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, RIPK3, ZBP1, GSDMD-N, and NLRP3. **Results:** Compared with the sham group, the Lequesne MG scores were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ) in the model group, and the pathological changes of cartilage were significantly, with joint spaces narrower, osteophyte formation increased, severe abrasion of cartilage surface. Ultrastructural analysis revealed pronounced chondrocyte apoptosis, necroptosis, and pyroptosis, along with markedly elevated expression of cleaved Caspase-3, RIPK3, and GSDMD-N in cartilage tissue ( $P<0.01$ ). In addition, The mean fluorescence intensities of ROS, orange-red fluorescence in AO/EB staining, green fluorescence and red fluorescence in YO-PRO-1/PI staining were increased of chondrocyte in the model group ( $P<0.01$ ). The levels of inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-18 in the supernatant were increased ( $P<0.01$ ). The expression of PANoptosis related proteins (cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, RIPK3, ZBP1, GSDMD-N, and NLRP3) were also significantly upregulated ( $P<0.05$ ). Compared to the model group, the TGXTC group demonstrated a significant improvement in various parameters of mice. These included a reduction in the Lequesne MG score, an increase in joint space, a decrease in osteophyte formation, diminished cartilage damage, reduced release of ROS, and alleviation of apoptotic, necroptotic, and pyroptotic processes in chondrocytes. Additionally, mitochondrial swelling and endoplasmic reticulum dilation were also mitigated. The levels of ROS as well as IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Furthermore, the expression levels of proteins associated with PANoptosis in cartilage tissue showed marked reductions ( $P<0.05$ ). Similar results were observed in chondrocytes: cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, RIPK3, ZBP1, GSDMD-N, and NLRP3 exhibited significant decreases as well ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** TGXTC may mitigate chondrocytes degeneration and alleviate KOA symptoms by reducing oxidative stress and suppressing the activation of PANoptosis pathways.

**[Keywords]** Tougu Xiaotong capsules; osteoarthritis; chondrocytes; PANoptosis

膝关节炎(KOA)是一种以关节软骨进行性退变为核心病理特征的慢性骨关节疾病,临床主要表现为关节疼痛、晨僵及功能障碍,严重影响患者生活质量<sup>[1]</sup>。其发病机制涉及多因素、多环节的复杂病理过程,包括慢性炎症反应、氧化应激失衡及多种程序性细胞死亡途径异常激活等。其中,关节软骨细胞外基质降解与合成代谢失衡是导致软骨退变的关键环节<sup>[2-5]</sup>。近年来,泛凋亡(PANoptosis)作为一种新发现的程序性细胞死亡模式,因其整合了凋亡(apoptosis)、焦亡(pyroptosis)及坏死性凋亡(necroptosis)的核心分子特征<sup>[5-9]</sup>,在KOA发病机制中的重要作用日益受到关注,被认为是有潜力的治疗干预靶点<sup>[7,10-16]</sup>。

从中医理论角度,KOA归属于“痹证”“骨痹”及“痿证”范畴,其理论渊源可追溯至《黄帝内经》。《素问·痹论》明确提出:“风寒湿三气杂至,合而为痹也”,奠定了中医认识痹证的理论基础。现代中医理论认为KOA具有“本虚标实”的复合病机特点:肝肾亏虚、筋骨失养为发病之本,风寒湿邪侵袭、瘀血阻滞经络为致病之标。基于这一认识,课题组提出“本痿标痹”的治疗策略,并据此研制了福建中医药大学附属第二人民医院特色院内制剂——透骨消痛胶囊(批准文号闽药制备字Z20190010000)。该方由巴戟天、杭白芍、川芎、肿节风4味中药科学配伍而成,具有补肾填精以治本、祛风活血以治标的综合功效。前期临床研究证实,该制剂能显著改善KOA患者关节疼痛、肿胀及活动受限等临床症状<sup>[17]</sup>;基础研究亦表明其可通过抑制炎症介质释放、保护软骨细胞完整性等途径改善关节功能<sup>[18]</sup>。然而,关于透骨消痛胶囊发挥软骨保护作用的具体分子机制,尤其是其对新兴的泛凋亡死亡途径的调控作用,仍有待深入阐明。鉴于泛凋亡在KOA软骨退变中的关键作用,本研究拟通过建立退变软骨细胞模型和小鼠KOA在体模型,系统探讨透骨消痛胶囊是否通过调控泛凋亡相关信号通路减轻软骨损伤,从而为阐明其药效作用机制提供新的理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 2月龄C57BL/6小鼠50只,体质量(20±2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[合格证号SCXK(沪)2022-0004],于福建中医药大学实验动物中心饲养[许可证号SYXK(闽)2023-0004]。实验过程中,饲养于室温(24±2)℃,相对湿度40%,12h/12h光-暗循环的条件下。给予标准饲料,自由采食与饮水。

**1.2 伦理** 本研究经福建中医药大学动物伦理委员会批准(批准号FJTTCMIACUC2023377)。

**1.3 药物** 透骨消痛胶囊是福建中医药大学附属第二人民医院的院内制剂(批准文号闽药制备字Z20190010000,规格0.5g/粒,批号202205005),由巴戟天、杭白芍、川芎、肿节风组成,其安全性和质量控制已经完成,能够保障成分的均一、稳定、有效,符合用药标准。双氯芬酸钠缓释片(北京诺华制药有限公司,批号X0964)。

**1.4 试剂** 胎牛血清(FBS)、低葡萄糖Dulbecco改良Eagle(DMEM/LOW)培养基(美国Gibco公司,批号分别为A2743112CP、8122657);Ⅱ型胶原酶(美国Sigma公司,批号EZ63629121);脂多糖(LPS,北京兰博利德商贸技术有限公司,批号2880011741);尼日利亚菌素钠盐、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国Med Chemexpress公司,批号分别为262880、K101836133EF5E);活性氧(ROS)检测试剂盒、YO-PRO-1/PI试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号分别为Z905240814、061923240315);吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号J801FA0006];苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、骨组织番红O-固绿染液、电镜固定液、阿利新蓝染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为CR2411059、CR2502060、2504F064、CR2307127);0.5%甲苯胺蓝染液(北京索莱宝科技有限公司,批号2306001);白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为ml037361L、ml107045L);NOD样受体蛋白3(NLRP3)、消皮素D的N端结构域(GSDMD-N)、Z-DNA结合蛋白1(ZBP1)、剪切的胱天蛋白酶(cleaved Caspase)-8、Caspase-8、cleaved Caspase-3抗体(美国Immunoway公司,批号分别为YT5382、YT7991、YN2476、T5688、YM3377、YC0006);受体相互作用蛋白3(RIPK3)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号15828S);Caspase-3抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为19677-1-AP、10494-1-AP);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒、三色预染蛋白(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号分别为03851450、028B12005)。

**1.5 仪器** Quantum GX2型显微计算机断层扫描技术(micro-CT)成像系统[珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司];H7650型透射电子显微镜(日本

Hitachi公司);DMI8型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);ChemiDoc MP型化学发光成像系统、Mini-PROTEAN型电泳系统、ChemiDoc MP型化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);A51119500C型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司);MDS-MLF30X型智能切片扫描仪(杭州医派智能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验

**2.1.1 动物模型制备与分组** 适应性喂养1周后,将50只小鼠随机分为假手术组(10只)和造模组(40只)。造模组采用改良Hulth法建立模型<sup>[19-21]</sup>:小鼠使用2%异氟烷麻醉,确保生命体征平稳。在关节腔侧面凹陷处切开皮肤,钝性分离肌肉组织,切断内侧副韧带,完整摘除内侧半月板。假手术组仅切关节腔处皮肤后缝合。术后缝合切口,并肌注20万U青霉素钠预防感染。

造模1周后,将40只造模组小鼠随机分为模型组、透骨消痛胶囊低剂量组、透骨消痛胶囊高剂量组、双氯芬酸钠组,每组10只。透骨消痛胶囊原方36g,依据动物与人体表面积折算的药物等效剂量换算方法进行换算,小鼠给药量为36g生药量/60kg体重 $\times 12 = 7.2$ g生药量 $\cdot \text{kg}^{-1}$ ,设为低剂量,2倍剂量为高剂量为14.4g $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。本院内制剂用法用量:1粒0.5g,3次/d,2粒/次,共3g。参照课题组前期基础<sup>[22]</sup>小鼠给药量为3g/60kg体重 $\times 12 = 600$ mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ ,根据药物与辅料的比例,等效为368mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。2倍剂量为高剂量为736mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。双氯芬酸钠小鼠给药量为0.075g/60kg体重 $\times 12 = 0.015$ g $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。假手术组与模型组给予等量0.9%生理盐水。按0.01mL $\cdot \text{g}^{-1}$ 体积每日灌胃1次,持续6周<sup>[23]</sup>。实验结束后取小鼠双膝关节进行后续检测。

**2.1.2 骨关节炎的严重程度指数(Lequesne MG)评分对KOA小鼠模型鉴定** 对小鼠进行Lequesne MG行为学评分<sup>[24]</sup>,对小鼠患处疼痛情况、步态改变、关节活动范围及肿胀程度进行评分,其中局部疼痛刺激反应分4级,评分0~3分,步态改变分4级,评分0~3分,关节活动范围分4级,评分0~3分,关节肿胀分3级,评分0~2分。总得分0~11分,评分越高,代表症状越严重。

**2.1.3 micro-CT观察各组小鼠膝关节形态结构变化** 取浸泡于4%多聚甲醛固定液的小鼠腿组织固定于仪器上,腿组织以股骨朝内胫骨朝外,髌骨向上位置摆放,使腿骨位于扫描中心。设置扫描模式为“High Resolution, 4 min”。等待扫描完毕后,截取

骨关节3D成像图。

**2.1.4 HE染色和番红O-固绿染色观察各组小鼠软骨组织形态** 小鼠膝关节组织脱钙、石蜡包埋后制备6 $\mu\text{m}$ 切片,后经脱蜡、复水后进行HE染色及番红O-固绿染色,脱水、透明,中性树脂封片,在电子显微镜下观察软骨组织病理变化情况。

**2.1.5 透射电镜(TEM)观察各组小鼠软骨组织泛凋亡超微结构变化** 样本经电镜固定液固定、脱钙、脱水,浸透、包埋、切片、染色后,在10000倍和20000倍镜下记录细胞超微结构变化。

**2.1.6 多色免疫荧光(IF)共定位观察各组小鼠软骨组织凋亡、坏死性凋亡和焦亡蛋白的定位与表达** 样本脱蜡水化,使用cleaved Caspase-3(1:1000)、RIPK3(1:1000)及GSDMD-N(1:1000)抗体孵育过夜,用二抗(1:1000)孵育1h,将切片置于载玻片上,滴加荧光染料,封片,荧光显微镜拍照。

**2.1.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠软骨凋亡、坏死性凋亡和焦亡相关蛋白表达** 取冻存软骨组织,液氮研磨成粉末后称质量,加入裂解液于4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解30min,4 $^{\circ}\text{C}$ ,14000r $\cdot \text{min}^{-1}$ 离心15min(离心半径7.2cm,下同)。收集上清,采用BCA法测定蛋白浓度并进行变性处理。随后依次进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳、转膜及抗体孵育,一抗包括cleaved Caspase-3、RIPK3、GSDMD-N(1:1000)和GAPDH(1:10000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;二抗(1:10000)孵育后ECL显影,使用Image J软件分析条带灰度值。

### 2.2 细胞实验

**2.2.1 细胞培养及鉴定** 参照课题组前期方法<sup>[25-26]</sup>,取SD大鼠经2%异氟烷麻醉后颈椎脱臼处死,无菌条件下体外分离双膝关节软骨组织,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次后,采用0.2%Ⅱ型胶原酶消化,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>条件下培养获取原代软骨细胞。待细胞传代至第2代,通过甲苯胺蓝染色和阿利新蓝染色进行软骨细胞表型鉴定。

**2.2.2 细胞分组及处理** 将第2代软骨细胞接种于96孔板,待细胞融合度达50%时以透骨消痛胶囊组25、50、100、200mg $\cdot \text{L}^{-1}$ 进行筛选适宜干预浓度;进一步进行分组干预:空白组:低葡萄糖Dulbecco改良Eagle(DMEM/Low)培养液常规培养;模型组:10mg $\cdot \text{L}^{-1}$ LPS处理24h后,加1 $\mu\text{mol}\cdot \text{L}^{-1}$ Nigericin刺激4h;透骨消痛胶囊组:10mg $\cdot \text{L}^{-1}$ LPS处理24h后,加1 $\mu\text{mol}\cdot \text{L}^{-1}$ Nigericin刺激4h,同时给予100mg $\cdot \text{L}^{-1}$ 透骨消痛胶囊溶液干预24h;各组干预

完成后,采用CCK-8法检测细胞存活率。

**2.2.3 ROS试剂盒检测透骨消痛胶囊对退变软骨细胞ROS水平的影响** 药物干预结束后,PBS洗涤细胞3次,加入DCFH-DA工作液,37℃、5% CO<sub>2</sub>避光孵育15 min。弃去探针溶液,PBS清洗2次后每孔加入新鲜培养基1 mL。立即于荧光显微镜下观察并采集图像,使用Image J软件定量分析各组细胞荧光强度。

**2.2.4 AO/EB试剂盒检测各组软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡程度** 药物干预结束后,PBS洗涤细胞3次,每孔加入AO/EB染色液1 mL,细胞培养孔中原位染色,室温避光孵育5 min后,采用倒置荧光显微镜观察,使用Image J软件定量分析荧光强度。

**2.2.5 YO-PRO-1/PI试剂盒检测各组软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡程度** 药物干预结束后,PBS洗涤细胞3次,每孔加入YO-PRO-1/PI检测工作液1 mL,37℃避光孵育20 min后,采用倒置荧光显微镜观察,使用Image J软件定量分析荧光强度。

**2.2.6 透射电镜观察各组软骨细胞泛凋亡超微结构变化** 药物干预结束后,PBS洗涤细胞3次,预冷电镜固定液(4℃)冰上固定30 min;刮取细胞离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),弃上清,转移细胞团块至新鲜固定液,4℃保存2 d以上;PBS漂洗过夜后,1%锇酸溶液4℃避光固定2 h,PBS再次漂洗。依次经脱钙、梯度脱水、树脂浸透、包埋、超薄切片及钨铅双染色,电镜观察。

**2.2.7 ELISA试剂盒检测软骨细胞上清液IL-1β和IL-18表达水平** 通过ELISA试剂盒检测各组软骨细胞上清液中炎症因子IL-1β和IL-18表达水平,具体方法参照ELISA试剂盒说明书进行。

**2.2.8 Western blot检测各组软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡相关蛋白的表达** 细胞干预后,收集各组细胞,提取各组细胞总蛋白并进行BCA定量与变性。依次进行配胶、电泳、转膜和抗体孵育。一抗cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N、NLRP3(1:1 000)和GAPDH(1:10 000)在4℃冷库摇床过夜,二抗(1:10 000)孵育,曝光成像,Image J分析条带。

**2.3 统计学分析** 本研究采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若资料符合正态分布且方差齐,使用单因素方差分析最小显著性差异法(LSD);若资料符合正态分布,但方差不齐的组间比较,采用单因素方差分析Games-Howell法;当计量资料不符合正态分布时,采用秩和检验。多时间点数据,采用重复测量方差分析,以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 Lequesne MG评分鉴定小鼠关节疼痛、关节活动度、步态改变** 干预结束后对各组Lequesne MG评分进行组间比较,与假手术组比较,模型组Lequesne MG评分显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组Lequesne MG评分明显降低( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 透骨消痛胶囊对KOA小鼠不同时期Lequesne MG评分的影响 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ,  $n=6$ ]

Table 1 Effect of Tougu Xiaotong capsules (TGXTC) on lequesne MG scores in KOA mice [ $M(P_{25}, P_{75})$ ,  $n=6$ ]

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Lequesne MG评分/分
假手术组		0(0,0)
模型组		4.5(3.75,5.25) <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊低剂量组	7.2	0.5(0,1) <sup>2)</sup>
透骨消痛胶囊高剂量组	14.4	0.5(0,1) <sup>2)</sup>
双氯芬酸钠组	0.015	0(0,1.25) <sup>2)</sup>

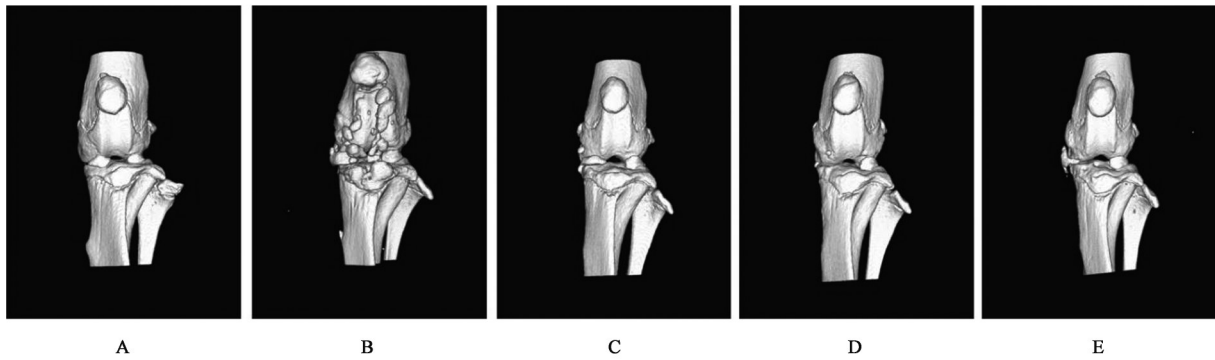
注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表3同)

**3.2 透骨消痛胶囊对小鼠膝关节形态结构变化的影响** micro-CT结果显示,假手术组关节面平整光滑,关节间隙正常;与假手术组比较,模型组胫骨平台及股骨髁有明显的骨赘形成,关节腔间隙变窄;与模型组比较,透骨消痛胶囊组骨赘形成减少,软骨轮廓平整,表面相对光滑,关节腔间隙变大,且呈现明显的剂量依赖性改善趋势。见图1。

**3.3 透骨消痛胶囊对KOA小鼠软骨组织病理变化的影响** HE染色和番红O-固绿结果显示,与假手术组比较,模型组软骨厚度变薄,软骨表面缺损严重,结构破坏,软骨细胞数量明显减少,蛋白多糖减少,软骨基质分布不均;与模型组比较,透骨消痛胶囊干预后小鼠关节软骨病变程度得到有效缓解,软骨表面趋向光滑完整,层次结构得到改善,软骨细胞数量变多,大小较均匀,蛋白多糖丢失情况明显改善,呈现剂量依赖性改善趋势。见图2。

**3.4 透骨消痛胶囊对小鼠软骨组织泛凋亡超微结构变化的影响**

**3.4.1 KOA小鼠膝关节软骨组织泛凋亡情况** 在模型组软骨组织中,可同时观察到细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡情况。透射电镜下细胞凋亡表现为细胞体积缩小,胞浆浓缩,结构紧密,线粒体、核糖体等聚集;染色质凝集,胞核高度固缩,并断裂成片段;凋亡小体从胞膜出芽。坏死性凋亡表现为细胞



注:A.假手术组;B.模型组;C.透骨消痛胶囊低剂量组;D.透骨消痛胶囊高剂量组;E.双氯芬酸钠组(图2和图4同)

图1 透骨消痛胶囊对KOA小鼠膝关节微结构的影响

Fig. 1 Effect of TGXTC on bone microstructure of knee joints of OA mice

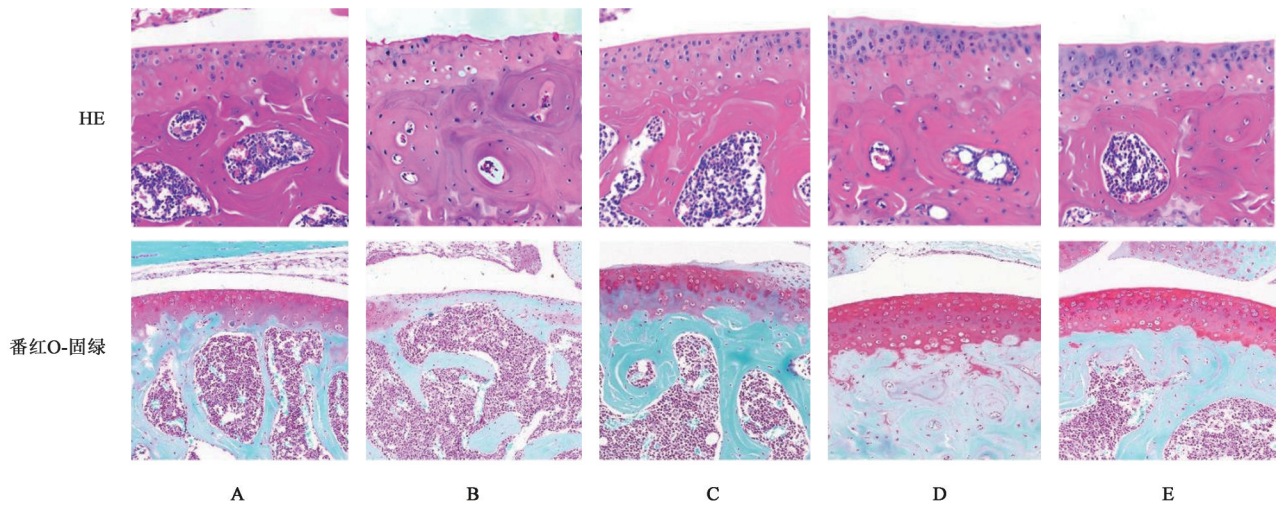
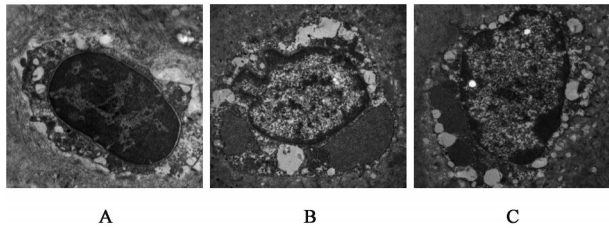


图2 透骨消痛胶囊对KOA小鼠软骨组织病理变化的影响(×200)

Fig. 2 Effect of TGXTC on pathological changes in cartilage tissue of KOA mice (×200)

质凝固或溶解,细胞器及基质崩解,出现严重空泡化。细胞焦亡表现为线粒体、内质网和其他细胞器严重肿胀及核糖体丢失,细胞上形成气泡状凸出物(焦亡小体)。见图3。



注:A.凋亡;B.坏死性凋亡;C.焦亡

图3 透射电镜观察KOA小鼠膝关节软骨泛凋亡情况(透射电镜,×20 000)

Fig. 3 TEM analysis of PANoptosis morphological changes in cartilage tissue of KOA mice (TEM, ×20 000)

3.4.2 透骨消痛胶囊对KOA小鼠软骨组织泛凋亡的影响 假手术组的软骨细胞形态正常完整,细胞

壁规整,细胞核无固缩,胞质均匀;与假手术组比较,模型组细胞壁不规则,胞质出现空泡化变性,细胞器肿胀,细胞核碎片化且染色加重;与模型组比较,透骨消痛胶囊低、高剂量组和双氯芬酸钠组的细胞形态结构均较为良好,胞浆内细胞器较为丰富,未出现空泡化。见图4。

3.5 透骨消痛胶囊对小鼠软骨组织cleaved Caspase-3、RIPK3、GSDMD-N蛋白定位与表达的影响 与假手术组比较,模型组小鼠关节软骨中3种死亡方式的标志性蛋白cleaved Caspase-3、RIPK3及GSDMD-N均有表达,提示KOA小鼠软骨组织中软骨细胞存在凋亡、坏死性凋亡与焦亡现象,即可见泛凋亡现象,cleaved Caspase-3、RIPK3、GSDMD-N表达明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组小鼠关节软骨cleaved Caspase-3、RIPK3、GSDMD-N表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见图5、表2。

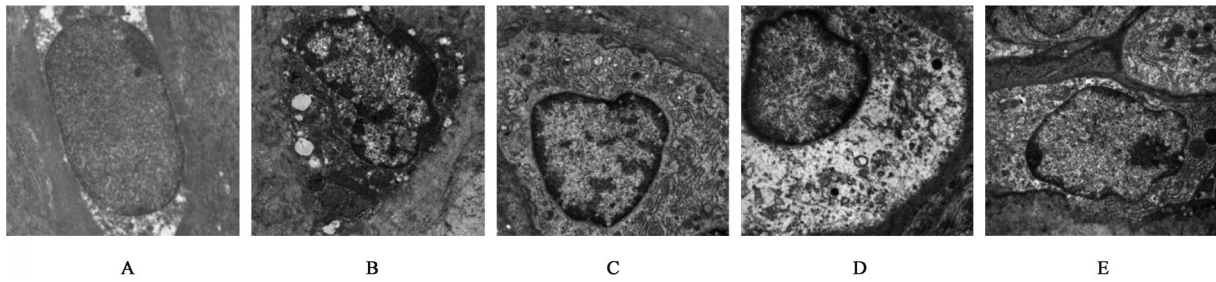
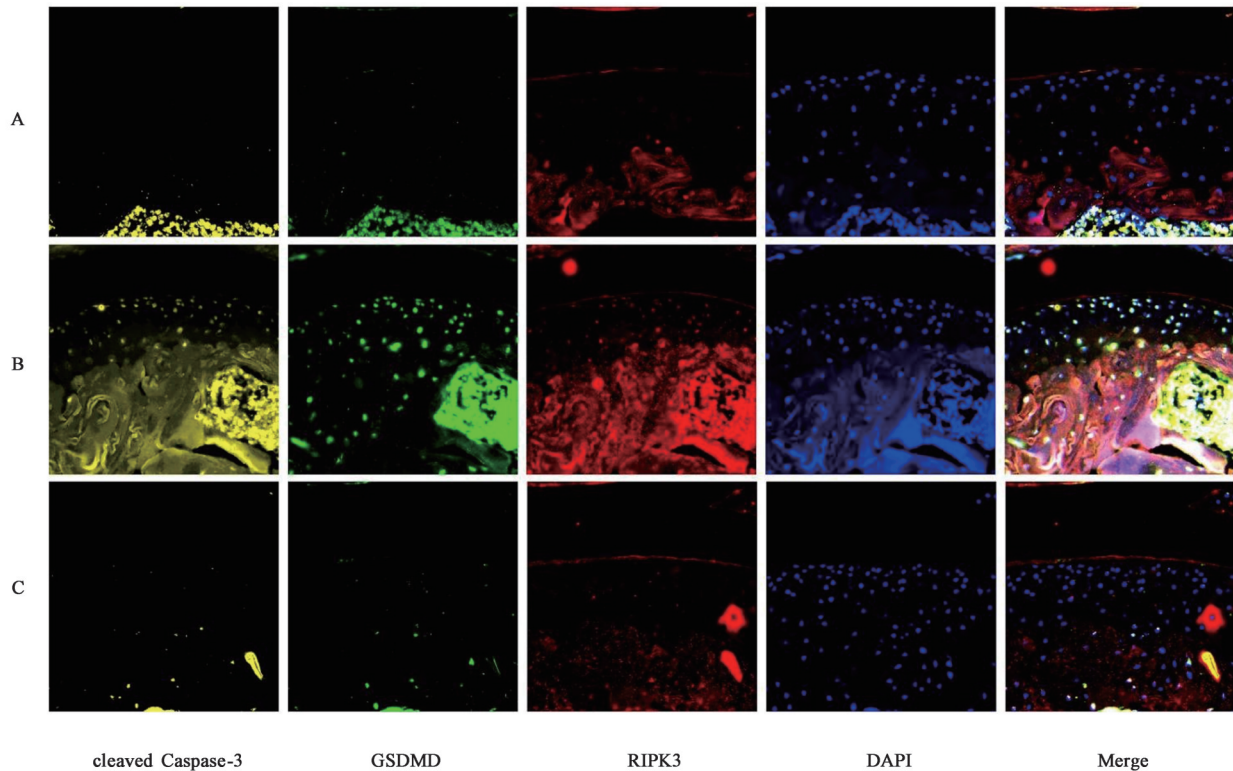


图4 透骨消痛胶囊对KOA小鼠软骨组织超微结构的影响(透射电镜,×20 000)

Fig. 4 Effect of TGXTC on ultrastructural changes of articular cartilage in KOA mice (TEM, ×20 000)



注:A.假手术组;B.模型组;C.透骨消痛胶囊组(图6同)

图5 透骨消痛胶囊对小鼠软骨组织泛凋亡相关蛋白定位与表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 5 Effect of TGXTC on PANoptosis-associated protein localization and expression of articular cartilage in KOA mice (IF, ×400)

表2 透骨消痛胶囊对各组小鼠泛凋亡相关蛋白荧光强度的影响(̄x±s, n=3)

Table 2 Effect of TGXTC on fluorescence intensity of PANoptosis-related protein of articular cartilage in KOA mice (̄x±s, n=3)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	cleaved Caspase-3	RIPK3	GSDMD-N
假手术组		1.00±0.29	1.00±0.41	1.00±0.46
模型组		36.33±11.99 <sup>2)</sup>	2.42±0.71 <sup>1)</sup>	21.62±15.52 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	7.2	2.00±0.95 <sup>4)</sup>	1.19±0.64 <sup>3)</sup>	2.42±2.59 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01

3.6 透骨消痛胶囊对小鼠软骨组织 cleaved Caspase-3、RIPK3 和 GSDMD-N 蛋白表达的影

响 与假手术组比较,模型组中 cleaved Caspase-3、RIPK3 和 GSDMD-N 蛋白的表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,透骨消痛胶囊组中 cleaved Caspase-3、RIPK3 和 GSDMD-N 蛋白的表达明显降低(P<0.05)。见图6、表3。

3.7 透骨消痛胶囊干预退变软骨细胞浓度筛选 软骨细胞经 LPS (10 mg·L<sup>-1</sup>) 干预 24 h 联合 Nigericin (1 μmol·L<sup>-1</sup>) 干预 4 h 后,设置透骨消痛胶囊干预浓度梯度为 25、50、100、200 mg·L<sup>-1</sup>,干预时间梯度为 12、24、48 h,检测各组软骨细胞存活率。结果显示,在 12 h 和 48 h 干预时,各浓度透骨消痛胶囊组与 LPS+Nigericin 组比较,软骨细胞存活率均差异无统计学意义;在 24 h 干预时,透骨消痛胶囊

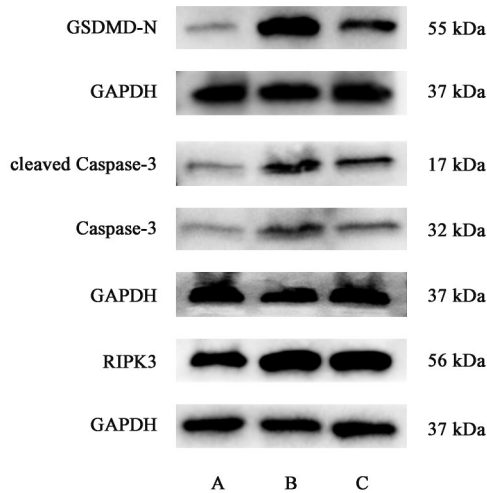


图6 各组小鼠膝关节软骨组织泛凋亡相关蛋白表达电泳  
Fig. 6 Electrophoretic expression of PANoptosis-related protein in articular cartilage tissue of KOA mice in different groups

表3 透骨消痛胶囊对KOA小鼠泛凋亡相关蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of TGXTC on expression levels of PANoptosis-related protein of articular cartilage in KOA mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	cleaved Caspase-3 /GAPDH	RIPK3 /GAPDH	GSDMD-N /GAPDH
假手术组		1.00±0.26	1.00±0.08	1.00±0.34
模型组		2.00±0.34 <sup>1)</sup>	1.68±0.27 <sup>1)</sup>	2.30±0.52 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊低剂量组	7.2	1.22±0.24 <sup>2)</sup>	1.20±0.05 <sup>2)</sup>	1.36±0.18 <sup>2)</sup>

呈浓度依赖性显著提高细胞存活率( $P<0.01$ ),其中100 mg·L<sup>-1</sup>组存活率显著最高( $P<0.01$ )。因此选择100 mg·L<sup>-1</sup>干预24 h作为后续实验条件。见表4。

表4 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

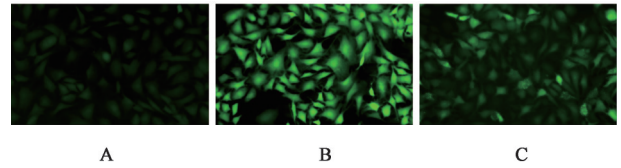
Table 4 Effect of TGXTC on survival of degenerated chondrocytes ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	12 h	24 h	48 h
空白组		99.86±7.67	99.67±72.25	99.80±1.48
模型组		82.71±3.09 <sup>1)</sup>	52.83±71.17 <sup>1)</sup>	49.80±2.49 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	25	84.43±4.93	54.17±72.48	49.20±3.96
	50	85.29±8.38	58.33±72.42 <sup>2)</sup>	49.80±1.10
	100	84.86±4.85	61.50±75.01 <sup>2)</sup>	51.20±2.77
	200	83.00±2.65	57.83±71.60 <sup>2)</sup>	49.80±1.30

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表5-表7同)

3.8 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞ROS水平的影响 与空白组比较,模型组绿色荧光强度显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组绿色荧光

强度显著减弱( $P<0.01$ )。见图7、表5。



注:A.空白组;B.模型组;C.透骨消痛胶囊组(图8-图11同)

图7 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞ROS水平的影响

Fig. 7 Effect of TGXTC on ROS levels in degenerated chondrocytes

表5 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞ROS水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of TGXTC on ROS levels in degenerated chondrocytes ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	ROS平均荧光强度
空白组		1.00±0.20
模型组		4.30±0.21 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	100	2.29±0.59 <sup>2)</sup>

3.9 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡的影响 AO/EB染色中,与空白组比较,模型组橙红色荧光表达量显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组橙红色光表达量显著减少( $P<0.01$ );YO-PRO-1/PI染色中,与空白组比较,模型组绿色荧光与红色荧光表达量显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组绿色荧光与红色荧光表达量显著减少( $P<0.01$ ),说明透骨消痛胶囊干预之后,降低了退变软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡的程度。见图8、图9、表6。

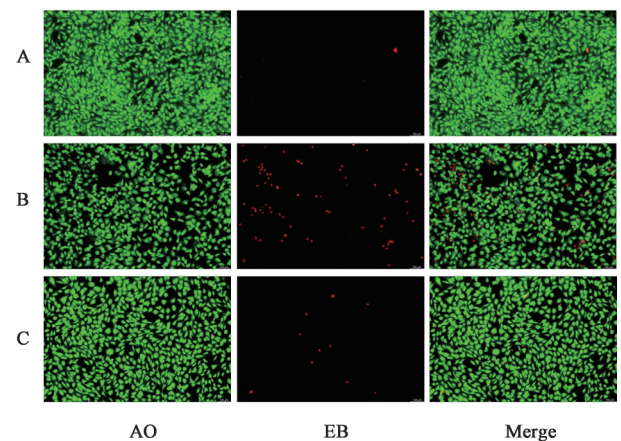


图8 透骨消痛胶囊对软骨细胞凋亡、坏死性凋亡的影响 (AO/EB,×400)

Fig. 8 Effect of TGXTC on apoptosis and necrotic apoptosis of chondrocytes (AO/EB,×400)

3.10 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞泛凋亡超微结构变化的影响 空白组软骨细胞形态规则,核膜完

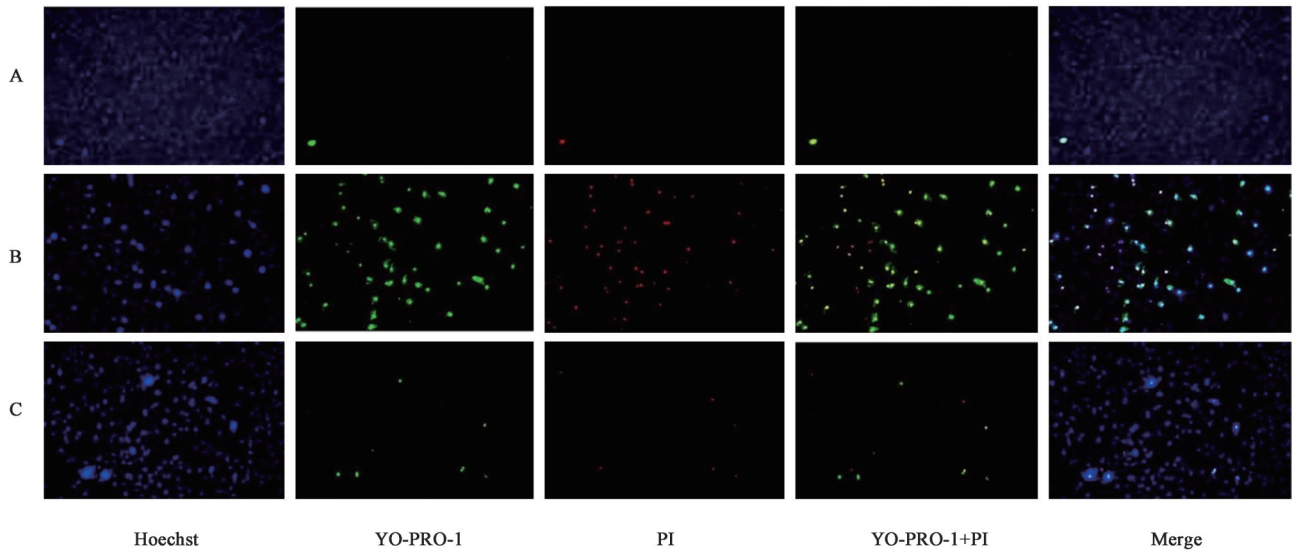


图9 透骨消痛胶囊对软骨细胞焦亡的影响(YO-PRO-1/PI,×400)

Fig. 9 Effect of TGXTC on pyroptosis of chondrocytes (YO-PRO-1/PI,×400)

表6 透骨消痛胶囊对软骨细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of TGXTC on expression of chondrocyte apoptosis, necroptosis, and pyroptosis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	AO/EB相对 荧光强度	YO-PRO-1/PI相对 荧光强度
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		34.20±11.57 <sup>1)</sup>	63.33±5.69 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	100	3.80±2.42 <sup>2)</sup>	5.67±2.52 <sup>2)</sup>

整清晰无破损,核内染色质分布均匀,胞质中线粒体、内质网丰富。与空白组比较,模型组细胞核内染色质凝聚,细胞质空泡样变性严重,线粒体结构异常,肿胀明显,嵴断裂甚至消失;内质网扩张明显,呈囊泡状,核糖体从内质网表面脱落。与模型组比较,透骨消痛胶囊干预后超微结构明显改善,线粒体肿胀程度减轻,内质网扩张现象明显缓解。见图10。

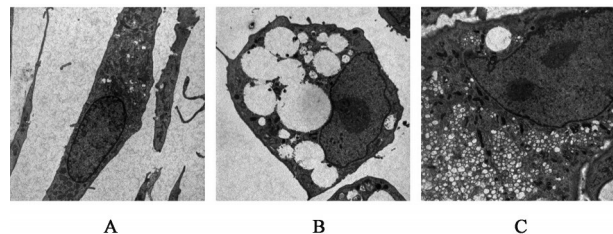


图10 透骨消痛胶囊对软骨细胞泛凋亡超微结构变化的影响(透射电镜,×10 000)

Fig. 10 Effect of TGXTC on ultrastructural changes of PANoptosis in chondrocytes (TEM,×10 000)

3.11 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞上清液中IL-1 $\beta$ 和IL-18含量的影响 与空白组比较,模型组

IL-1 $\beta$ 和IL-18含量显著提高( $P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊能够抑制退变软骨细胞下IL-1 $\beta$ 和IL-18的释放( $P<0.05$ )。见表7。

表7 透骨消痛胶囊对软骨细胞上清液IL-1 $\beta$ 、IL-18水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of TGXTC on IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in chondrocyte supernatant ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-18
空白组		15.40±5.74	10.50±1.37
模型组		65.64±10.30 <sup>1)</sup>	14.77±1.11 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	100	34.47±3.51 <sup>2)</sup>	11.13±0.48 <sup>2)</sup>

3.12 透骨消痛胶囊对退变软骨细胞泛凋亡相关蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N和NLRP3表达的影响

与空白组比较,模型组中泛凋亡相关蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N和NLRP3的表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,透骨消痛胶囊组中cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-8、RIPK3、ZBP1、GSDMD-N和NLRP3的蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图11、表8。

#### 4 讨论

KOA的中医病机特征表现为本虚标实,其中肝肾亏虚为发病之本,风寒湿邪外侵与瘀血阻滞经络则为致病之标。基于这一病机特点,课题组前期提出“本痿标痹”的治疗理念,确立了“治痿以补肝肾、益气血为主,治痹以祛风湿、止痹痛为先”的治疗原

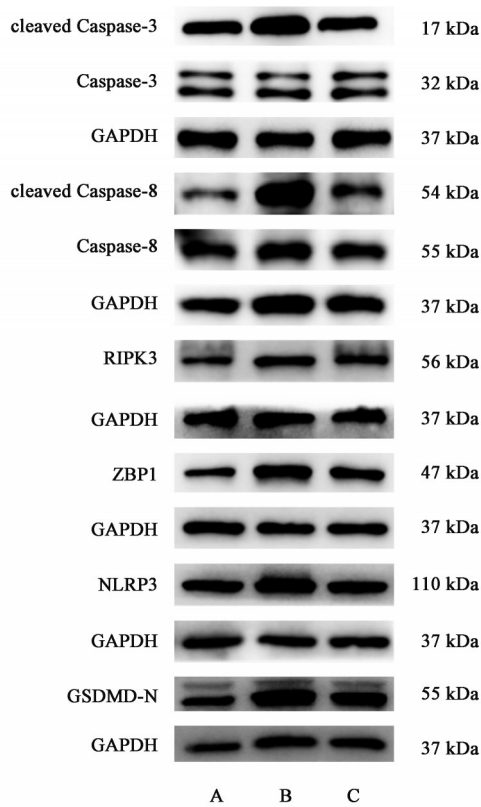


图11 各组软骨细胞中泛凋亡相关蛋白表达电泳  
Fig. 11 Electrophoretic expression of PANoptosis-related protein in chondrocytes

则,通过痿痹同治实现补益肝肾气血与祛除风湿痹痛的双重功效。在此理论框架指导下,团队成功研制了福建中医药大学附属第二人民医院特色院内制剂——透骨消痛胶囊。该方剂精选巴戟天、杭白芍、川芎、肿节风4味中药科学配伍,具有补肾填精、柔肝养血、活血化瘀、祛风除湿的综合功效,经多年临床实践证实对早中期KOA患者具有显著疗效<sup>[17]</sup>。该方以“肾主骨生髓”“肝主筋藏血”等中医经典理论为指导,君药巴戟天补肾壮骨,臣药白芍养血柔肝以固本培元,佐药川芎活血行气,使药肿节风祛风除湿,活血与养血协同,疏肝与柔肝并重,既能活血化瘀而不伤正气,又可疏肝解郁而不损阴液,彰显了中医方剂配伍的精妙之处。

表8 透骨消痛胶囊对各组软骨细胞泛凋亡相关蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of TGXTC on expression levels of PANoptosis-related Protein in chondrocytes ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	cleaved Caspase-3 /Caspase-3	cleaved Caspase-8 /Caspase-8	RIPK3 /GAPDH	ZBP1 /GAPDH	GSDMD-N /GAPDH	NLRP3 /GAPDH
空白组		1.00±0.09	1.00±0.24	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.02	1.00±0.09
模型组		1.46±0.04 <sup>2)</sup>	2.90±0.34 <sup>2)</sup>	1.25±0.03 <sup>2)</sup>	1.96±0.31 <sup>2)</sup>	1.49±0.02 <sup>2)</sup>	1.40±0.18 <sup>1)</sup>
透骨消痛胶囊组	100	1.26±0.08 <sup>3)</sup>	2.07±0.25 <sup>3)</sup>	1.06±0.08 <sup>3)</sup>	1.32±0.19 <sup>3)</sup>	1.24±0.04 <sup>4)</sup>	1.11±0.02 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01

在骨关节炎的现代病理机制研究中,现已明确软骨细胞的不同死亡方式——凋亡、坏死性凋亡及焦亡均与ROS的异常蓄积存在密切关联。过量的ROS通过诱发氧化应激反应,可导致软骨细胞发生多层面的病理损害,包括但不限于:细胞分化异常、多种程序性死亡途径激活、线粒体功能紊乱、细胞衰老加速及炎症反应失控等<sup>[27-30]</sup>,这些病理改变共同促使软骨基质降解代谢失衡,最终加速关节软骨退行性变<sup>[31-32]</sup>。从分子机制角度深入分析,ROS主要通过以下途径介导软骨细胞死亡:①激活Caspase依赖性凋亡通路(包括内源性的线粒体途径和外源性的死亡受体途径)<sup>[33-37]</sup>;②通过NLRP3炎症小体活化及线粒体功能障碍等机制调控程序性细胞死亡过程<sup>[38-39]</sup>;③经由受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)/RIPK3/混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)信号级联反应诱导线粒体膜电位改变,促进线粒体ROS(mtROS)大量产生,进而触发坏死性凋亡等<sup>[20]</sup>。这些复杂的分子事件构成了骨关节炎软骨退变的重要病理基础<sup>[40]</sup>。

本研究通过建立标准化的软骨细胞体外模型和小鼠KOA体内模型,综合运用AO/EB双染、YO-PRO-1/PI染色及透射电镜等多种先进技术进行系统观察,在KOA进程中证实了软骨细胞存在凋亡(特征为核固缩及凋亡小体形成)、坏死性凋亡(表现为细胞膜完整性破坏及胞浆内容物外漏)和焦亡(特征性GSDMD-N膜孔形成)3种死亡方式共存的泛凋亡现象。经透骨消痛胶囊干预后,电镜观察显示软骨细胞超微结构得到显著改善,包括细胞核形态恢复正常、细胞器结构完整、空泡化现象消失及细胞膜起泡减少等,这些形态学改变提示药物可显著降低泛凋亡水平,有效减轻炎症反应及软骨组织损伤。

为进一步验证上述发现,本研究采用多色免疫荧光技术对KOA软骨组织样本进行泛凋亡相关蛋白的空间共定位分析。结果显示,模型组软骨组织中cleaved Caspase-3(凋亡标志物)、RIPK3(坏死性

凋亡标志物)及GSDMD-N(焦亡标志物)均呈现强阳性表达,且3种蛋白信号存在明显的共定位现象。Western blot定量分析结果与免疫荧光观察一致:与正常空白组比较,模型组软骨组织中上述3种泛凋亡相关蛋白的表达均显著升高。透骨消痛胶囊治疗后可显著改善这一病理改变,表现为3种死亡标志蛋白的表达均明显下调,这一结果充分提示透骨消痛胶囊可能通过抑制泛凋亡级联反应发挥软骨保护作用。

虽然本研究在细胞实验中主要观察了固定时间点(LPS 24 h+Nigericin 4 h)的干预效应,但基于细胞死亡通路的激活动力学特征和现有文献证据,我们合理推测在刺激过程中3种死亡方式可能存在时序性差异:在LPS刺激初期,主要以凋亡和早期炎症信号激活为主。LPS通过Toll样受体4(TLR4)等模式识别受体激活核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路,显著上调促凋亡因[如Fas配体(FasL)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等]和焦亡相关前体蛋白[如前体(pro)-IL-1 $\beta$ 、NLRP3等]的表达<sup>[27-28,31]</sup>。在刺激中期,Nigericin作为强效的第二信号,可促使NLRP3炎症小体快速组装并激活Caspase-1,导致焦亡爆发性发生,同时伴随大量IL-1 $\beta$ 和IL-18等炎症因子的释放<sup>[38]</sup>。此阶段剧烈的炎症反应和氧化应激环境(如高浓度ROS)还会进一步加剧线粒体损伤和内质网应激,从而促进内源性凋亡和坏死性凋亡的发生<sup>[27,37,41]</sup>,因此这一时期可能是焦亡和坏死性凋亡表现最为突出的阶段。在刺激后期,持续的炎症和氧化损伤可能导致3种死亡方式长期共存并相互促进:未被及时清除的凋亡细胞可能发生继发性坏死,呈现坏死样表型;而焦亡细胞释放的DAMPs(损伤相关分子模式)又可持续刺激周围细胞,形成炎症-死亡恶性循环。这一动态过程充分体现了细胞死亡方式的复杂性和可塑性。

本研究采用LPS+Nigericin联合干预是经典的细胞焦亡诱导模型,最终选择的观察终点(LPS 24 h+Nigericin 4 h)具有重要的科学意义,很可能准确捕捉到焦亡和坏死性凋亡的活性高峰期。研究结果显示,透骨消痛胶囊能在这一关键时间点发挥多重保护作用:有效抑制ROS过度产生、显著减轻细胞膜完整性破坏、明显改善超微结构损伤,并同步下调所有3种死亡途径的关键标志物(包括cleaved Caspase-3/8、RIPK3、NLRP3和GSDMD-N等)。这些发现充分表明透骨消痛胶囊对整个泛凋亡过程具有广谱调控作用,能够有效阻

断不同死亡方式之间的恶性循环,这为其临床应用提供了重要的实验依据。

尽管本研究取得了上述发现,但仍存在若干需要完善的方面,后续研究将重点从以下维度进行深化探索:在细胞实验层面,拟采用时间梯度实验系统解析泛凋亡过程中3种细胞死亡方式的时空动态特征,精确界定其发生的时间窗口及先后顺序;重点研究凋亡、焦亡与坏死性凋亡之间的交互调控网络,特别是关键分子间的串扰机制;深入阐明多种泛凋亡小体在信号传导中的分子开关作用及其调控环节。考虑到透骨消痛胶囊具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,后续将整合网络药理学、分子对接和系统生物学等方法,构建“化学成分-作用靶点-信号通路-生物学效应”多维整合分析网络,全面解析其药效物质基础和作用机制。在动物实验方面,后续将通过CRISPR-Cas9基因编辑、腺相关病毒介导的基因过表达及特异性抑制剂干预等手段,针对NLRP3、GSDMD、RIPK3等关键节点开展靶向调控研究,以明确透骨消痛胶囊发挥软骨保护作用的核心靶标和分子机制,为将其开发成为治疗骨关节炎的创新药物提供坚实的理论支撑。

综上所述,透骨消痛胶囊能够显著改善KOA小鼠的症状,并有效逆转软骨细胞及软骨组织的超微结构损伤。同时,透骨消痛胶囊在临床上不仅对骨关节炎具有显著的治疗效果,同时对类风湿性关节炎及痛风性关节炎也展现出良好的疗效<sup>[42]</sup>。这提示该药物可能通过调控多种骨关节疾病中共通的病理环节实现“异病同治”。因此,深入探讨和挖掘其发病机制,不仅有助于阐明其多病种治疗的作用基础,也为该院内制剂的临床推广应用及后续二次开发提供重要的理论依据与科学支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] QUICKE J G, CONAGHAN P G, CORP N, et al. Osteoarthritis year in review 2021: Epidemiology & therapy [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2022, 30(2): 196-206.
- [2] BERNABEI I, SO A, BUSSO N, et al. Cartilage calcification in osteoarthritis: Mechanisms and clinical relevance [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2023, 19(1): 10-27.
- [3] JIANG Y. Osteoarthritis year in review 2021: Biology [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2022, 30(2): 207-215.
- [4] 廖晴,曾静,陈峻,等. 艾灸调节circ Pan3/mi R-667-5p/Ghrelin信号通路减轻膝骨关节炎大鼠的软骨病变[J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(12): 2475-2483.
- LIAO Q, ZENG J, CHEN J, et al. Moxibustion alleviates

- cartilage lesions in rats with knee osteoarthritis through regulating the circPan3/miR-667-5p/Ghrelin signaling pathway [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2025, 29(12): 2475-2483.
- [ 5 ] EBATA T, TERKAWI M A, KITAHARA K, et al. Noncanonical pyroptosis triggered by macrophage-derived extracellular vesicles in chondrocytes leading to cartilage catabolism in osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75(8):1358-1369.
- [ 6 ] DENG M, TANG C, YIN L, et al. Screening chondrocyte necroptosis-related genes in the diagnosis and treatment of osteoarthritis [J]. *Heliyon*, 2024, 10(15): e35263.
- [ 7 ] ZHU P, KE Z R, CHEN J X, et al. Advances in mechanism and regulation of PANoptosis: Prospects in disease treatment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1120034.
- [ 8 ] 蔡思雨,王萌,万毅刚,等. 基于线粒体稳态和ZBP1介导的泛凋亡探究黄蜀葵花总黄酮联合恩格列净多靶点减轻糖尿病肾小管病的作用和机制 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(13):3738-3753.
- WAN Y G, CHA S Y, WANG M, et al. Effects and mechanisms of total flavones of *Abelmoschus manihot* combined with empagliflozin in attenuating diabetic tubulopathy through multiple targets based on mitochondrial homeostasis and ZBP1-mediated PANoptosis [J]. *China J Chin Mater Med*, 2025, 50(13):3738-3753.
- [ 9 ] LIU S, ZHANG G, LI N, et al. The interplay of aging and PANoptosis in osteoarthritis pathogenesis: Implications for novel therapeutic strategies [J]. *J Inflamm Res*, 2025, 18: 1951-1967.
- [ 10 ] LIU S, PAN Y, 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.
- [ 11 ] GUAN M, YU Q, ZHOU G, et al. Mechanisms of chondrocyte cell death in osteoarthritis: Implications for disease progression and treatment [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1):550.
- [ 12 ] ZHOU D, LUO Y, LI F, et al. Exploring the mechanisms of PANoptosis in osteoarthritis and the therapeutic potential of andrographolide through bioinformatics and single-cell analysis [J]. *Biol Direct*, 2025, 20(1):41.
- [ 13 ] 万栋峰,李蔓玲,陈熙. 运动通过调控细胞焦亡延缓骨关节炎进展的研究 [J]. *中华骨科杂志*, 2025, 45(14):960-966.
- WAN D F, LI M L, CHEN X. Research progress of exercise delaying the development of osteoarthritis by regulating pyroptosis [J]. *Chin J Orthop*, 2025, 45(14):960-966.
- [ 14 ] CHEN X, CHEN R, XU Y, et al. PLC $\gamma$ 1 inhibition combined with inhibition of apoptosis and necroptosis increases cartilage matrix synthesis in IL-1 $\beta$ -treated rat chondrocytes [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(2):435-445.
- [ 15 ] 卢晓君,熊波涵,杨腾云,等. 骨关节炎软骨细胞的新型程序性死亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(28):4571-4576.
- LU X J, XIONG B H, YANG T Y, et al. Novel programmed cell death of chondrocytes in osteoarthritis [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(28):4571-4576.
- [ 16 ] WANG L, ZHU Y, ZHANG L, et al. Mechanisms of PANoptosis and relevant small-molecule compounds for fighting diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(12):851.
- [ 17 ] 陈鸿,洪昆达. 透骨消痛胶囊治疗疼痛性膝骨性关节炎30例 [J]. *福建中医药*, 2015, 46(2):21-22.
- CHEN H, HONG K D. Treatment of 30 cases of painful knee osteoarthritis with Tougu Xiaotong capsules [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2015, 46(2):21-22.
- [ 18 ] 叶锦霞,付长龙,林洁,等. 透骨消痛胶囊对毒胡萝卜素诱导的内质网应激(PEKR信号通路)介导的大鼠体外培养关节软骨细胞凋亡的影响 [J]. *中医正骨*, 2017, 29(6):1-7.
- YE J X, FU C L, LIN J, et al. Effect of Tougu Xiaotong Jiaonang on apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress (PEKR signaling pathway) and induced by thapsigargin in rat's articular chondrocytes cultured in vitro [J]. *J Tradit Chin Orthop Trauma*, 2017, 29(6):1-7.
- [ 19 ] 李路,王文义,潘丹虹,等. 荣筋拈痛方对膝骨关节炎大鼠软骨组织 Beclin1 及 LC3B 表达的影响 [J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(5):1-5, 11.
- LI L, WANG W Y, PAN D H, et al. Effect of rongjin niantong fang on the expression of beclin1 and LC3B in cartilage tissue of rats with knee osteoarthritis [J]. *Rheumatol Arthritis*, 2023, 12(5):1-5, 11.
- [ 20 ] HULTH A, LINDBERG L, TELHAG H. Experimental osteoarthritis in rabbits preliminary report [J]. *Acta Orthop Scand*, 1970, 41(5):522-530.
- [ 21 ] 樊佳欣,贾祥,徐田杰,等. 二甲双胍抑制铁死亡改善骨关节炎模型大鼠的软骨损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(30):6398-6408.
- FAN J X, JIA X, XU T J, et al. Metformin inhibits ferroptosis and improves cartilage damage in osteoarthritis model rats [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2025, 29(30):6398-6408.
- [ 22 ] LI X H, ZHANG Z L, LIANG W N, et al. Tougu Xiaotong capsules may inhibit p38 MAPK pathway-mediated inflammation: *In vivo* and *in vitro* verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249:112390.
- [ 23 ] 付长龙,徐鹭,陈若岚,等. 透骨消痛胶囊通过激活 CXCL12/GDF5 通路修复骨关节炎小鼠的软骨损伤 [J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(6):1122-1130.
- FU C L, XU L, CHEN R L, et al. Tougu Xiaotong capsule promotes repair of osteoarthritis cartilage damage in mice by activating the CXCL12/GDF5 pathway [J]. *J South Med Univ*, 2025, 45(6):1122-1130.
- [ 24 ] LEQUESNE G M, MERY C, SAMSON M, et al. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests [J]. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1987, 16(s65):85-89.
- [ 25 ] YE J X, WU G W, LI X H, et al. Millimeter wave treatment inhibits apoptosis of chondrocytes via regulation dynamic equilibrium of intracellular free Ca<sup>2+</sup> [J]. *Evid Based*

- Complement Alternat Med, 2015, doi: 10. 1155/2015/464161.
- [26] 林晴, 潘丹虹, 李路, 等. 荣筋拈痛方调控软骨细胞 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路改善骨关节炎炎性病变的机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(10): 5653-5658.
- LIN Q, PAN D H, LI L, et al. Mechanism of Rongjin Niantong formula in regulating chondrocyte NLRP3/Caspase-1/GSDMD and improving inflammatory lesions of osteoarthritis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(10): 5653-5658.
- [27] ZHANG S, WANG L, KANG Y, et al. Nanomaterial-based reactive oxygen species scavengers for osteoarthritis therapy [J]. Acta Biomater, 2023, 162: 1-19.
- [28] RIEGGER J, SCHOPPA A, RUTHS L, et al. Oxidative stress as a key modulator of cell fate decision in osteoarthritis and osteoporosis: A narrative review [J]. Cell Mol Biol Lett, 2023, 28(1): 76.
- [29] JI Z, REN X, JIN J, et al. Injectable hydrogel encapsulating siMMP13 with anti-ROS and anti-apoptotic functions for osteoarthritis treatment [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 466.
- [30] TONG Z, MA Y, LIANG Q, et al. An in situ forming cartilage matrix mimetic hydrogel scavenges ROS and ameliorates osteoarthritis after superficial cartilage injury [J]. Acta Biomater, 2024, 187: 82-97.
- [31] LIU H, ZHOU L, WANG X, et al. Dexamethasone upregulates macrophage PIEZO1 via SGK1, suppressing inflammation and increasing ROS and apoptosis [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 222: 116050.
- [32] LI H, YUAN Y, ZHANG L, et al. Reprogramming macrophage polarization, depleting ROS by astaxanthin and thioketal-containing polymers delivering rapamycin for osteoarthritis treatment [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(9): e2305363.
- [33] LING Z, PAN J, ZHANG Z, et al. Small-molecule Molephantin induces apoptosis and mitophagy flux blockage through ROS production in glioblastoma [J]. Cancer Lett, 2024, 592: 216927.
- [34] XU J, HUANG X, ZHOU Y, et al. The combination of gefitinib and acetaminophen exacerbates hepatotoxicity via ROS-mediated apoptosis [J]. Biomol Ther (Seoul), 2024, 32(5): 647-657.
- [35] LUO Y, LIU R, ZHANG H, et al. Amantadine against glioma via ROS-mediated apoptosis and autophagy arrest [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(11): 834.
- [36] 蒋总, 姚晓玲, 江瑶, 等. 黑骨藤提取物调控软骨细胞增殖治疗膝骨关节炎的机制 [J]. 世界中医药, 2025, 20(12): 2076-2082.
- JIANG Z, YAO X L, JIANG Y, et al. Mechanisms of *Periploca forrestii* extract in regulating chondrocyte proliferation for the treatment of knee osteoarthritis [J]. World Chin Med, 2025, 20(12): 2076-2082.
- [37] DAI D, CHEN C, LU C, et al. Apoptosis, autophagy, ferroptosis, and pyroptosis in cisplatin-induced ototoxicity and protective agents [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1430469.
- [38] BAI H, ZHANG Z, LIU L, et al. Activation of adenosine A3 receptor attenuates progression of osteoarthritis through inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD induced signalling [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(15): 4230-4243.
- [39] LI M, XIAO J, CHEN B, et al. Loganin inhibits the ROS-NLRP3-IL-1beta axis by activating the Nrf2/HO-1 pathway against osteoarthritis [J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(11): 977-990.
- [40] MARSHALL K D, BAINES C P. Necroptosis: Is there a role for mitochondria? [J]. Front Physiol, 2014, 5: 323.
- [41] TAN W J T, VLAJKOVIC S M. Molecular characteristics of cisplatin-induced ototoxicity and therapeutic interventions [J]. Int J Mol Sci, 2023, 20, 24(22): 16545.
- [42] 林亦欣, 王文义, 雷晓庆, 等. 透骨消痛胶囊异病同治关节炎: 网络药理学、分子对接及分子动力学模拟分析 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(24): 5093-5101.
- LIN Y X, WANG W Y, LEI X Q, et al. Tougu Xiaotong capsules for treating arthritis according to the principle of "same treatment for different diseases": Analysis based on integrated pharmacology, molecular docking techniques and molecular dynamics simulation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(24): 5093-5101.

[责任编辑 周冰冰]