

# 二甲双胍修饰骨髓间充质干细胞外泌体调节软骨细胞的作用及机制

司马鑫利<sup>1</sup>, 刘丹平<sup>1</sup>, 慕惠<sup>2</sup>

<https://doi.org/10.12307/2025.550>

投稿日期: 2024-07-08

采用日期: 2024-08-31

修回日期: 2024-10-17

在线日期: 2024-10-29

中图分类号:

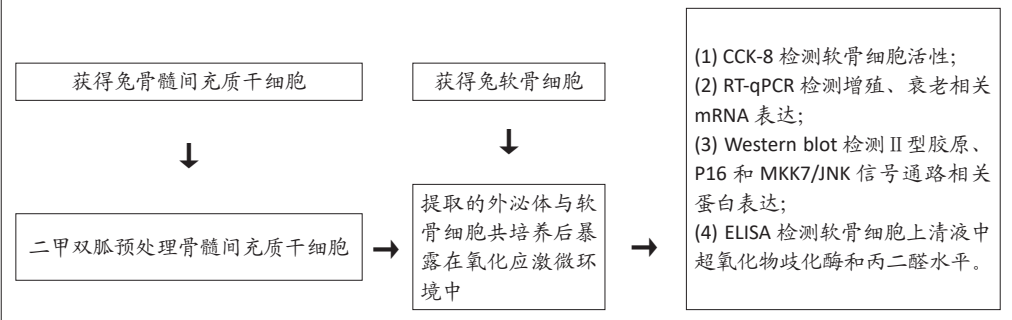
R459.9; R318; R681.3

文章编号:

2095-4344(2025)36-07728-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞外泌体对软骨细胞的调节作用



文题释义:

骨关节炎: 是一种以软骨基质持续性破坏为特征的退行性关节炎。

二甲双胍: 是一种常用的口服降糖药, 主要用于治疗2型糖尿病, 其涉及到的领域不仅限于糖尿病, 在炎症、肿瘤、衰老等病症的治疗中也展现出一定的效果。

摘要

背景: 骨关节炎是一种以软骨基质持续性破坏为特征的退行性关节炎, 目前仍无有效的药物治疗方案, 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体因避免了口服药物不良反应及免疫原性等特点, 可能成为治疗骨关节炎的新方法。

目的: 探讨二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体对软骨细胞的调节作用。

方法: 体外培养兔骨髓间充质干细胞和软骨细胞。使用超速离心法收集正常骨髓间充质干细胞源性外泌体和经过二甲双胍预处理的骨髓间充质干细胞源性外泌体, 分别用含外泌体的培养基培养软骨细胞24 h, 再用100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>干预24 h。采用CCK-8法和划痕愈合实验检测软骨细胞增殖和迁移能力变化; 采用Western blot和RT-qPCR检测软骨细胞中II型胶原、P16蛋白及mRNA的表达变化, 以及采用Western blot检测MKK7/JNK通路蛋白的表达变化; 使用ELISA试剂盒检测软骨细胞中超氧化物歧化酶活性和丙二醛水平。

结果与结论: ①在氧化应激环境下, 软骨细胞的增殖和迁移能力减弱, 两种外泌体能够一定程度恢复软骨细胞的增殖和迁移能力, 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体的改善效果更显著( $P < 0.05$ ); ②与正常骨髓间充质干细胞来源外泌体相比, 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体更能有效提高II型胶原表达和超氧化物歧化酶活性( $P < 0.05$ ), 同时也更能有效降低P16表达和丙二醛水平( $P < 0.05$ ); ③两种外泌体能够一定程度抑制MKK7和p-JNK蛋白表达, 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体的抑制效果更显著( $P < 0.05$ )。结果表明, 在氧化应激环境下, 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体通过抑制MKK7/JNK通路对抗软骨细胞衰老并促进软骨细胞增殖。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 二甲双胍; 外泌体; 软骨细胞; 骨关节炎; 氧化应激; 衰老; 工程化干细胞

## Effect and mechanism of metformin-modified bone marrow mesenchymal stem cell exosomes on regulating chondrocytes

Sima Xinli<sup>1</sup>, Liu Danping<sup>1</sup>, Qi Hui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Beijing Trauma Orthopedics Institute, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Sima Xinli, Master candidate, Attending physician, First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Corresponding author: Liu Danping, MD, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Co-corresponding author: Qi Hui, PhD, Associate researcher, Beijing Trauma Orthopedics Institute, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Abstract

**BACKGROUND:** Osteoarthritis is a progressive joint condition identified by ongoing deterioration of the cartilage matrix, and there is currently no effective drug treatment plan. Metformin-modified exosomes isolated from bone marrow-derived mesenchymal stem cells can become a new method for treating osteoarthritis due to their avoidance of oral drug adverse reactions and immunogenicity.

<sup>1</sup>锦州医科大学附属第一医院, 辽宁省锦州市 121000; <sup>2</sup>北京市创伤骨科研究所, 北京积水潭医院, 北京市 100035

第一作者: 司马鑫利, 男, 1984年生, 锦州医科大学在读硕士, 主治医师, 主要从事骨科、手足显微外科研究。

通讯作者: 刘丹平, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 锦州医科大学附属第一医院, 辽宁省锦州市 121000

共同通讯作者: 慕惠, 博士, 副研究员, 北京市创伤骨科研究所, 北京积水潭医院, 北京市 100035

<https://orcid.org/0009-0002-5285-5468> (司马鑫利)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81572140), 项目负责人: 刘丹平; 北京市自然科学基金面上项目(7172036), 项目负责人: 慕惠

引用本文: 司马鑫利, 刘丹平, 慕惠. 二甲双胍修饰骨髓间充质干细胞外泌体调节软骨细胞的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7728-7734.



**OBJECTIVE:** To study the controlling impact of exosomes from metformin-altered bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chondrocytes.

**METHODS:** Rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes were cultured *in vitro*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes and metformin pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes were collected using a high-speed centrifuge. Chondrocytes were cultured with exosome-containing culture medium for 24 hours and then treated with 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hours. The capability changes of two extracellular vesicles on chondrocyte proliferation and migration were detected using CCK8 assay and scratch healing experiment, respectively. Western blot analysis and RT-qPCR were employed to examine the alterations in the expression of type II collagen, P16 protein, and their mRNA in chondrocytes. Western blot analysis was utilized to assess the changes in the expression of MKK7/JNK pathway proteins. ELISA kits were utilized to measure the activity of cell superoxide dismutase and the levels of malondialdehyde in chondrocytes.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) In an oxidative stress environment, the proliferation and migration abilities of chondrocytes were weakened. The two types of exosomes could restore the proliferation and migration abilities of chondrocytes to a certain extent. Metformin pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes had a significantly better improvement effect ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with normal bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes, metformin pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes could more effectively increase type II collagen expression and superoxide dismutase activity ( $P < 0.05$ ), and were also more effective in reducing P16 expression and malondialdehyde levels ( $P < 0.05$ ). (3) The two types of exosomes could inhibit the expression of MKK7 and p-JNK proteins to a certain extent, and the inhibitory effect of metformin pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes was more significant ( $P < 0.05$ ). The results show that in an oxidative stress environment, metformin pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells derived exosomes resist chondrocyte aging and promote chondrocyte proliferation by inhibiting the MKK7/JNK pathway.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cell; metformin; exosome; chondrocyte; osteoarthritis; oxidative stress; aging; engineered stem cell

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 81572140 (to LDP); Beijing Natural Science Foundation (General Program), No. 7172036 (to QH)

**How to cite this article:** SIMA XL, LIU DP, QI H. Effect and mechanism of metformin-modified bone marrow mesenchymal stem cell exosomes on regulating chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7728-7734.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是最常见的骨关节疾病之一，其主要特点是骨软骨基质的持续丧失和微环境的病理改变，如形成骨赘和关节滑膜炎<sup>[1-2]</sup>。骨关节炎发生的病因除创伤和肥胖外，氧化应激微环境也会导致骨关节炎进一步加重<sup>[3-5]</sup>。在骨关节炎发展到终末期，多采用关节置换治疗<sup>[6-7]</sup>。课题组既往研究已经证实，骨髓间充质干细胞不但能够改善关节微环境，还能促进骨软骨损伤的修复<sup>[8-11]</sup>。二甲双胍是一种治疗糖尿病及肥胖等疾病的有效药物，目前作为一种衰老保护相关因子具有抗软骨细胞衰老及抗氧化的作用<sup>[12-15]</sup>。此研究将兔骨髓间充质干细胞来源外泌体和二甲双胍预处理兔骨髓间充质干细胞来源外泌体分别与兔软骨细胞共培养，然后采用  $\text{H}_2\text{O}_2$  干预软骨细胞建立氧化应激环境，以探讨 2 种外泌体对软骨细胞的调节作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞水平体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 4 月至 2024 年 7 月在锦州医科大学第一附属医院医学组织工程重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 普通级大耳白兔 24 只，雌雄各半，17-20 d 龄，体质量 200-250 g，用于骨髓间充质干细胞和软骨细胞提取，由锦州医科大学动物中心提供，许可证号：SCXK(辽)2019-0003。实验严格遵守了《实验动物管理条例》中的相关规定，并已通过锦州医科大学医学伦理委员会的审批(批准号：241108)。

1.3.2 实验试剂和仪器 盐酸二甲双胍(Sigma, 美国); 总超氧化物歧化酶、丙二醛试剂盒(南京建成, 中国); BCA 蛋白试剂盒(碧云天, 中国); 磷酸酶抑制剂(索莱宝, 中国); II 型胶原、P16、丝裂原活化蛋白激酶激酶 7 (mitogen-activated protein kinase kinase 7, MKK7)、c-Jun

氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated C-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体(Affinity, 美国);  $\alpha$ -MEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(Gibco, 美国); PBS(索莱宝, 中国); CCK-8 试剂盒(赛维尔, 中国); Trizol(Biosharp, 中国); Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(YEASEN, 11119ES60); SYBR Green Master Mix(YE SEN, 11201ES50); HRP Goat Anti-Rabbit IgG(赛维尔, 中国); AmershamImager 600 蛋白条带显影仪(GE 美国);  $\text{CO}_2$  培养箱(海尔); 超速离心机(HITACHI); 倒置荧光显微镜(Leica); 电泳仪(赛维尔); RT-qPCR 引物由上海赛维尔公司设计合成。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞及外泌体的提取和鉴定<sup>[16-18]</sup> 随机选取 17-20 d 龄乳兔 8 只，异氟烷吸入麻醉，睫毛刺激无明显反应后，脱颈处死，完整切除双侧后肢，将其浸入含有体积分数 75% 乙醇的无菌玻璃量杯中进行短时间表面消毒。转移至超净工作台中，再次浸泡无菌 PBS(1 $\times$ ) 中保湿，仔细剔除表面软组织，切除股骨头、股骨远端及胫骨近端、远端。将骨髓腔完全暴露，使用 5 mL 注射器吸取无血清的  $\alpha$ -MEM 培养基对股骨和胫骨骨髓腔进行多次冲洗，并通过细胞筛网过滤以剔除非细胞组织成分，然后 1 200 r/min 离心 3min，弃上清，使用含体积分数 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基对细胞沉淀进行重悬，将其转移至培养皿中，放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱进行细胞培养。当细胞融合度达到皿底面积的 80%-90%，用 0.25% 胰酶消化，以 1 : 2 比例细胞传代。选取生长状况优良的第 1 代骨髓间充质干细胞，以  $3 \times 10^5$ /孔接种于 12 孔板，当细胞长满约 60% 时，将培养基替换为专门的三系分化诱导液，对细胞进行定向诱导分化，当细胞长满 60%-70% 时，进行茜素红、油红 O 和阿利新蓝染色，检测其多向分化潜能。

使用无血清  $\alpha$ -MEM 培养基和含有二甲双胍 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的无血清  $\alpha$ -MEM 培养基繁育第 4 代骨髓间充质干细胞 48 h<sup>[19]</sup>, 收集上清液, 10 000 $\times g$  超速离心 30 min, 留取上清; 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器过滤后, 10 000 $\times g$  超速离心 120 min; 小心移除超离管上清剩约 1 mL, 浓缩外泌体, 然后再次 10 000 $\times g$  离心 120 min, 留取沉淀, 100  $\mu\text{L}$  PBS 重悬沉淀,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冻存, 即骨髓间充质干细胞源性外泌体 (NC-Exos) 和二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞源性外泌体 (MET-Exos)。使用透射电镜观察两种外泌体的形态特征, Western blot 检测 CD9、CD63、TSG101 的表达 (一抗稀释比例均为 1 : 2 000、二抗 HRP Goat Anti-Rabbit IgG 稀释比例为 1 : 3 000)。

1.4.2 软骨细胞培养及体外模型建立<sup>[20]</sup> 随机选取 17–20 d 龄乳兔 2 只, 异氟烷吸入麻醉, 睫毛刺激无明显反应后, 脱颈处死, 在超净工作台中分离乳兔双侧后肢股骨头、股骨下端及胫骨上端的软骨组织, 用手术刀将取得的软骨组织切割成精细的小块, 以 0.25% 胰酶在常温下消化 30 min, 通过等体积的 DMEM/F12 培养基终止消化过程, 然后用 0.5% II 型胶原酶处理 6 h, 200 目滤网过滤, 以 1 200 r/min 离心 3 min, PBS 清洗 3 遍, 再次重悬, 在 37  $^\circ\text{C}$  孵育箱中培养。当细胞生长状态良好并覆盖皿底大于 80% 时开始传代。在第 2 代软骨细胞中加入 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激 24 h, 体外构建氧化应激损伤软骨细胞衰老模型<sup>[21–23]</sup>。

1.4.3 CCK-8 检测二甲双胍对软骨细胞增殖活力的影响 第 2 代软骨细胞以约  $5\times 10^3$ /孔接种于 96 孔板, 对照组用 DMEM/F12 培养基培养, 实验组用含有不同浓度二甲双胍的 DMEM/F12 培养基培养, 浓度分别为 0, 50, 500  $\mu\text{mol/L}$ , 分别在培养 1, 3, 5 d 时, 各孔加入含 10% CCK-8 的 DMEM/F12 培养基, 避光孵育 2 h, 使用酶标仪检测各孔 450 nm 波长处的吸光度值, 以评估二甲双胍对软骨细胞增殖的影响。

1.4.4 软骨细胞摄取外泌体的能力 第 2 代软骨细胞以  $4\times 10^5$ /孔接种在 6 孔板中, 长至 70%–80% 融合时, 加入 1 mL Dil 标记的 NC-Exos 和 MET-Exos (质量浓度均为 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 在无血清 DMEM/F12 培养基中共培养 4 h, 然后将软骨细胞于 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 使用鬼笔环肽 (Phalloidin) 和 DAPI 染色, 在共聚焦显微镜下拍摄照片。

#### 1.4.5 软骨细胞分组

(1) 对照组: 用完全 DMEM/F12 培养基培养。

(2) 模型组: 用含 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DMEM/F12 培养基培养软骨细胞 24 h, 弃培养基, 用 DMEM/F12 完全培养基继续培养。

(3) NC-Exos 组: 用含有 NC-Exos (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 DMEM/F12 培养基培养软骨细胞 24 h, 再用含 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DMEM/F12 培养基培养软骨细胞 24 h, 弃培养基, 用 DMEM/F12 完全培养基继续培养。

(4) MET-Exos 组: 用含有 MET-Exos (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 DMEM/F12 培养基培养软骨细胞 24 h, 再用含 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DMEM/F12 培养基培养软骨细胞 24 h, 弃培养基, 用 DMEM/F12 完全培养基继续培养。

1.4.6 各组软骨细胞的增殖活性 将干预后的第 2 代各组软骨细胞用 0.25% 胰酶消化后, 计数软骨细胞, 以 3 000 个/孔密度接种于 96 孔板, 培养 24 h, 弃培养基, 每孔加入含有 10% CCK-8 的 DMEM/F12 培养基 100  $\mu\text{L}$ , 避光孵育 2 h, 使用酶标仪检测各孔 450 nm 波长处的吸光度值, 以评估各组软骨细胞的增殖能力。

1.4.7 各组软骨细胞的迁移能力 将干预后的第 2 代各组软骨细胞用 0.25% 胰酶消化后, 计数软骨细胞, 以  $4\times 10^5$ /孔密度接种于 6 孔板, 待细胞铺满皿底后, 用无菌 200  $\mu\text{L}$  移液器枪头于每孔中央竖直划“一”字划痕, 继续培养 24 h, 倒置相差显微镜观察划痕愈合程度, 每孔均设 3 个复孔。

1.4.8 qRT-PCR 检测 II 型胶原、P16 基因表达 第 2 代各组软骨细胞以  $4\times 10^5$ /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞长至 90% 融合时, 根据细胞分组进行干预, 干预结束后用 Trizol 试剂裂解细胞, 氯仿–异丙醇法提取细胞总 RNA, 根据 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书将 RNA 其反转录为 cDNA, 然后在 LightCycler480II 上使用 SYBR Green Master Mix 进行 qRT-PCR 反应。内参是 GAPDH, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | RT-qPCR 引物序列

Table 1 | RT-PCR primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
II 型胶原	上游: TGA GCC AAA TCC AGT TGA AGA C
	下游: TTC GCC TAA ATC TCC ATC TAC C
P16	上游: CTC CTC AGA GAC ACG TGA GCG
	下游: TGA CCT TAC GCT CGC TCC T
GAPDH	上游: TGA AGG TCG GAG TGA ACG GAT
	下游: CGT TCT CAG CCT TGA CCG TG

1.4.9 Western blot 检测 II 型胶原、P16 和 MKK7/JNK 通路相关蛋白的表达 第 2 代软骨细胞以  $4\times 10^5$ /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞长至 90% 融合时, 根据细胞分组进行干预, 干预结束后加入适量细胞裂解液、PMSF 和磷酸酶抑制剂 (比例 100 : 1 : 1), 裂解收集总蛋白, BCA 法定量蛋白浓度。上样孔蛋白质均 20  $\mu\text{g}$ , 凝胶电泳后, 得到目的条带, 采用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 加入 II 型胶原、P16、MKK7、JNK、p-JNK、GAPDH 一抗 (一抗稀释比例均为 1 : 2 000), 4  $^\circ\text{C}$  孵育过夜, 加入 HRP Goat Anti-Rabbit IgG 二抗 (稀释比例为 1 : 3 000), 室温孵育 60 min, 最后在全自动分析仪中进行 ECL 蛋白条带显影, 并使用 Image J 软件定量条带灰度值。

1.4.10 超氧化物歧化酶、丙二醛水平测定 第 2 代软骨细胞以  $4\times 10^5$ /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞长至 90% 融

合时, 根据细胞分组进行干预, 干预结束后软骨细胞经手动玻璃研磨器研磨处理后, 收集匀浆悬液, 依据超氧化物歧化酶、丙二醛试剂盒说明书进行处理, 使用酶标仪测定上清液中超氧化物歧化酶、丙二醛水平。

**1.5 主要观察指标** ①第1代骨髓间充质干细胞形态与鉴定结果; ② NC-Exos 和 MET-Exos 鉴定结果; ③软骨细胞摄取 NC-Exos 和 MET-Exos 的能力; ④二甲双胍对软骨细胞增殖的影响; ⑤ NC-Exos 和 MET-Exos 对氧化应激环境下软骨细胞活性的影响; ⑥ NC-Exos 和 MET-Exos 对氧化应激环境下软骨细胞中 II 型胶原、P16 表达的影响; ⑦ NC-Exos 和 MET-Exos 对氧化应激环境下软骨细胞中 MKK7/JNK 通路相关蛋白表达的影响; ⑧ NC-Exos 和 MET-Exos 对氧化应激环境下软骨细胞中超氧化物歧化酶、丙二醛水平的影响。

**1.6 统计学分析** 通过 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析和 *t* 检验, 然后用 GraphPad Prism 9.5 作图。  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过锦州医科大学附属第一医院统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞及其来源外泌体鉴定结果** 骨髓间充质干细胞具有成骨、成脂、成软骨分化能力<sup>[15-16]</sup>, 见图 1A。透射电镜观察 MET-Exos 与 NC-Exos 一样, 均呈类圆形, 见图 1B, Western blot 检测特异标志物 CD9、CD63、TSG101 表达阳性, 见图 1C。

**2.2 二甲双胍及外泌体对软骨细胞活性的影响** CCK-8 结果显示, 50, 500  $\mu\text{mol/L}$  二甲双胍作用 3 d 时软骨细胞活力显著提高 ( $P < 0.05$ ), 50  $\mu\text{mol/L}$  二甲双胍提高软骨细胞活力更明显, 见图 2A。与 NC-Exos 相比, MET-Exos 显著促进软骨细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。

**2.3 软骨细胞内吞外泌体的能力** 共聚焦显微镜下观察, Dil 标记的外泌体可以被 Phalloidin 标记的软骨细胞内吞, 主要位于软骨细胞胞质内, 分布在 DAPI 标记的蓝色核周围, 见图 3。

**2.4 外泌体对软骨细胞迁移能力的影响** 与对照组相比, 模型组划痕愈合率显著减小 ( $P < 0.05$ ); 与模型组和 NC-Exos 组相比, MET-Exos 组划痕愈合率显著增大 ( $P < 0.05$ ), 表明 MET-Exos 可促进软骨细胞迁移, 见图 4。

**2.5 外泌体对软骨细胞 II 型胶原、P16 和 MKK7/JNK 通路相关蛋白表达的影响** Western blot 结果表明, 与对照组相比, 模型组 II 型胶原蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), P16、MKK7 和 p-JNK 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 外泌体治疗组 P16、MKK7 和 p-JNK 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), II 型胶原蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 NC-Exos 组相比, MET-Exos 组 II 型胶原蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), P16、MKK7 和 p-JNK 蛋白表

达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。RT-qPCR 结果表明, 与 NC-Exos 组相比, MET-Exos 组 II 型胶原 mRNA 表达水平显著提高, P16 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 6, 表明 MET-Exos 有可能通过 MKK7/JNK 通路发挥对抗软骨细胞衰老、促进软骨细胞增殖的作用。

**2.6 外泌体对软骨细胞超氧化物歧化酶和丙二醛水平的影响** 与对照组相比, 模型组超氧化物歧化酶活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 当给予 NC-Exos 和 MET-Exos 后, 超氧化物歧化酶活性有明显恢复 ( $P < 0.05$ ), 但仍低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 NC-Exos 组和 MET-Exos 组之间没有显著差异。与对照组相比, 模型组丙二醛水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, NC-Exos 组、MET-Exos 组丙二醛水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 NC-Exos 组相比, MET-Exos 组丙二醛水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 | 外泌体对软骨细胞超氧化物歧化酶活性、丙二醛水平的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Table 2 | Effects of exosomes on superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in chondrocytes

组别	超氧化物歧化酶 (U/g)	丙二醛 (nmol/mg)
对照组	1 935.83±11.82	5.21±0.43
模型组	1 533.24±104.80 <sup>a</sup>	16.72±2.11 <sup>a</sup>
NC-Exos 组	1 834.67±43.25 <sup>ab</sup>	12.41±2.87 <sup>ab</sup>
MET-Exos 组	1 852.77±13.08 <sup>ab</sup>	7.18±0.08 <sup>bc</sup>

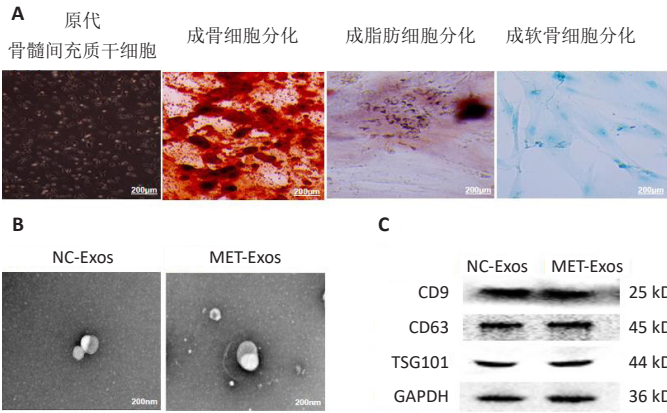
表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-Exos 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。MET-Exos: 二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体; NC-Exos: 正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。

## 3 讨论 Discussion

骨关节炎的发病机制是临床面临的难点, 如衰老、体质量增加等多种因素均与骨关节炎的发生发展密切相关, 而且目前尚无治愈的有效方法<sup>[24-26]</sup>。近年来, 骨髓间充质干细胞能够促进软骨细胞增殖备受关注<sup>[27-28]</sup>, 但潜在作用机制尚不清楚。一些文献显示, 骨髓间充质干细胞促进组织再生修复在很大程度上是由其分泌的外泌体实现的<sup>[29-32]</sup>。间充质干细胞分泌的外泌体可以治疗骨关节损伤以及改善骨关节炎<sup>[33-35]</sup>。移植骨髓间充质干细胞在体内可能会引起免疫排斥以及致瘤等风险<sup>[36-38]</sup>, 而外泌体可以有效避免以上不良反应和风险, 并且发挥骨髓间充质干细胞同样的功能, 治疗骨软骨损伤<sup>[39-40]</sup>。

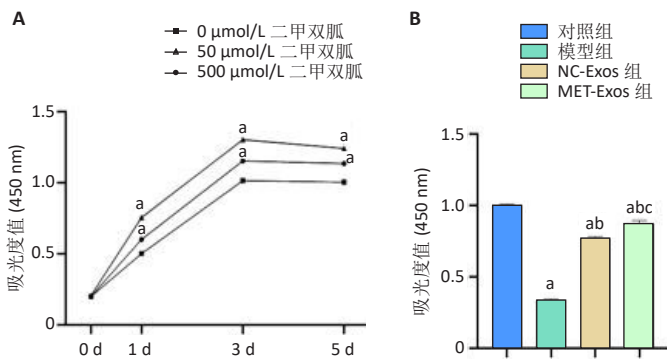
研究显示, 通过各种不同的处理因素, 比如物理处理、缺氧环境、药物干预等, 可以显著增强外泌体的治疗潜能<sup>[41]</sup>。吴志文等<sup>[42]</sup>实验表明, Chm-1 预处理干细胞来源外泌体可通过抑制血管生成、炎症因子分泌、细胞肥大来改善骨关节炎症状; 申恩谱等<sup>[43]</sup>研究证明, 褪黑素干预干细胞后提取外泌体, 通过 Wnt1/ $\beta$ -catenin 信号通路可有效地调节骨质生成和骨质吸收的平衡, 改善骨关节炎。

二甲双胍是一种常用的口服降糖药物, 近年来在骨关节炎治疗中也展现出一定的潜力<sup>[44-45]</sup>。二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞分泌的外泌体, 在避免口服药物引



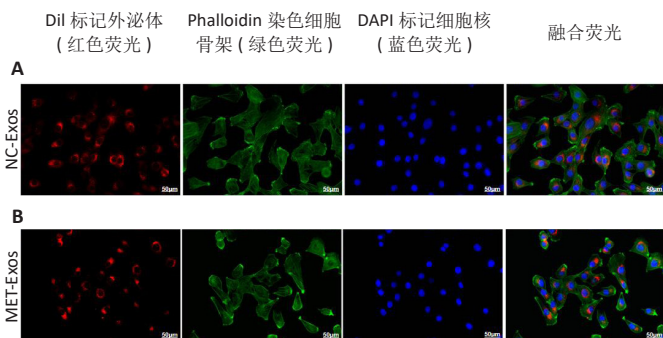
图注：图 A 为骨髓间充质干细胞多向分化能力：茜素红、油红 O、阿利新蓝染色阳性（标尺：200 μm）；B 为透射电镜观察外泌体的超微结构（标尺：200 nm）；C 为 Western blot 检测外泌体表面蛋白标志物。MET-Exos：二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体；NC-Exos：正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 1 | 兔骨髓间充质干细胞及其来源外泌体鉴定  
Figure 1 | Identification of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells and exosomes derived from them



图注：图 A 为二甲双胍作用下，软骨细胞增殖活力，与 0 d 比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；B 为不同条件下，软骨细胞的增殖活力。与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与 NC-Exos 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。MET-Exos：二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体；NC-Exos：正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 2 | 各组软骨细胞的增殖活力  
Figure 2 | Proliferation activity of chondrocytes in each group



图注：图 A 为软骨细胞对 NC-Exos 的摄取；B 为软骨细胞对 MET-Exos 的摄取。MET-Exos：二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体；NC-Exos：正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 3 | 共聚焦显微镜观察软骨细胞对外泌体的摄取情况（标尺：50 μm）  
Figure 3 | Confocal microscopy observation of chondrocyte uptake of exosomes (scale bars: 50 μm)

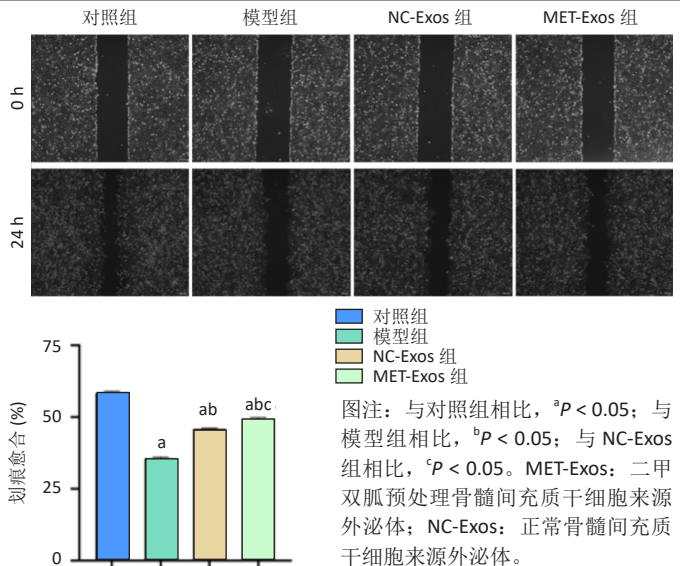
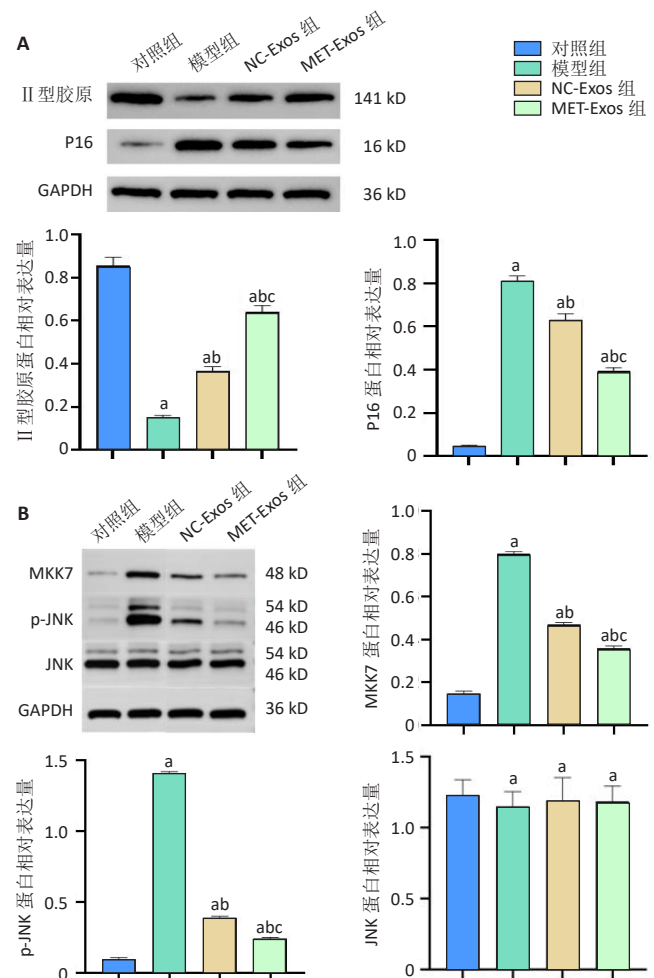
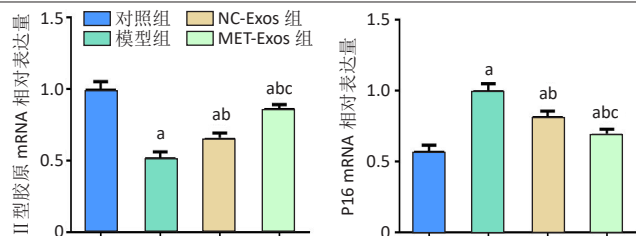


图 4 | 各组软骨细胞迁移能力 (×100)  
Figure 4 | Chondrocyte migration ability among different groups (×100)



图注：图 A 为 II 型胶原、P16 蛋白表达；B 为 MKK7/JNK 通路相关蛋白表达。与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与 NC-Exos 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。MET-Exos：二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体；NC-Exos：正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。MKK7：丝裂原活化蛋白激酶激酶 7；JNK：c-Jun 氨基末端激酶；p-JNK：磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶。

图 5 | Western blot 检测各组软骨细胞 II 型胶原、P16 和 MKK7/JNK 通路相关蛋白表达  
Figure 5 | Western blot detection of the expression of type II collagen, P16 and MKK7/JNK pathway-related proteins in chondrocytes of each group



图注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与 NC-Exos 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。MET-Exos：二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞来源外泌体；NC-Exos：正常骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 6 | RT-qPCR 检测各组软骨细胞中 II 型胶原、P16 mRNA 表达

Figure 6 | RT-qPCR detection of mRNA expression of type II collagen and P16 in chondrocytes of each group

起胃肠道不良反应的同时，可以提高软骨细胞的抗氧化能力。有资料显示，氧化应激是影响骨关节炎关节腔微环境的一项重要因素<sup>[46-47]</sup>。丙二醛和超氧化物歧化酶是软骨细胞氧化应激的标志物，在骨关节炎状态下，丙二醛含量明显升高，超氧化物歧化酶含量明显降低，二者可用作评价 MET-Exos 治疗骨关节炎的指标<sup>[48-50]</sup>。结果表明，二甲双胍预处理骨髓间充质干细胞提取的外泌体能够改善骨关节炎兔体内软骨细胞所处的氧化应激微环境，减轻细胞因氧化应激而受损，并延缓软骨细胞老化，改善骨关节炎。

MKK7/JNK 信号通路是一条关键的细胞信号传导通路，对细胞的应激反应、炎症反应和细胞凋亡等过程起着重要的调节作用<sup>[51-53]</sup>。研究表明，MKK7/JNK 通路在骨关节炎发病过程中发挥着重要作用，其活化与软骨细胞的功能障碍密切相关<sup>[54]</sup>。当软骨细胞受到机械性损伤或炎症因子刺激时，MKK7 被磷酸化激活，进而激活 JNK，同时这一过程也能够引发软骨基质金属蛋白酶的上调，促进软骨的降解和退化<sup>[55-56]</sup>。此外，MKK7/JNK 通路的激活还与促炎细胞因子的释放相关，如肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6，这些因子进一步加重了骨关节炎的炎症环境并加速软骨损伤的进展<sup>[57-58]</sup>。在骨关节炎模型中，MKK7/JNK 信号通路常常处于持续激活状态，导致软骨细胞的增殖和自噬过程受损，进而引发软骨细胞凋亡与功能失调<sup>[59-60]</sup>。最新的研究显示，抑制 MKK7/JNK 通路的激活能有效降低软骨细胞的凋亡率和促炎因子的释放，同时通过促进自噬过程，有助于修复受损软骨和维持软骨细胞的稳态<sup>[61-65]</sup>。因此，针对 MKK7/JNK 信号通路的干预可能是治疗骨关节炎的重要策略之一。选择 MKK7/JNK 信号通路进行研究，具有重要的科学价值和临床意义。首先，该通路在调节软骨细胞的生存和功能中扮演了中心角色，通过深入了解其机制，可为骨关节炎的发病机制提供新的见解；其次，鉴于 MKK7/JNK 信号通路在炎症反应和细胞凋亡中的重要作用，针对其进行调控将有助于开发新的药物或治疗手段，改善骨关节炎患者的治疗效果。因此，深入探讨 MKK7/JNK 信号通路在骨关节炎中的作用，具有重要的研究和应用价值。

二甲双胍是一种经典的抗糖尿病药物，通过激活

AMPK 来抑制肝脏葡萄糖生成、增强外周组织对胰岛素的敏感性<sup>[66-67]</sup>。二甲双胍在特定条件下修饰干细胞释放外泌体，能够影响靶细胞（例如软骨细胞）的信号转导<sup>[68]</sup>。MET-Exos 中可能富含特定的小分子、miRNA 或调节因子，这些分子通过直接或间接影响 MKK7/JNK 通路的表达和活性<sup>[69-72]</sup>，从而实现对软骨细胞的调节。

通过实验发现，相较于 NC-Exos，MET-Exos 能更好地在氧化应激下调关节腔微环境，延缓软骨细胞衰老，一定程度上恢复软骨细胞增殖和迁移能力。MET-Exos 更能有效提高 II 型胶原表达和超氧化物歧化酶活性，同时也更有效降低 P16 蛋白表达和丙二醛水平；同时，RT-qPCR 结果也说明了在氧化应激下软骨细胞抗衰老能力得到提高。此外，对 MET-Exos 延缓软骨细胞衰老的潜在机制进行了研究。夏帅<sup>[73]</sup>实验表明，抑制 MAPK 信号通路对治疗骨关节炎发挥重要作用，JNK 为 MAPK 通路中重要靶点，实验证明抑制 JNK 磷酸化，从而抑制软骨细胞凋亡，促进兔软骨细胞增殖，延缓骨关节炎。ZHANG 等<sup>[74]</sup>实验表明，抑制 MKK7 积累可以阻碍 JNK 信号传导，延缓软骨细胞衰老，从而减缓软骨细胞退化和骨关节炎发展。曾麒等<sup>[75]</sup>研究显示，JNK 信号通路抑制剂 SP600125 可以抑制 JNK 信号传导。在此研究中，MET-Exos 能抑制兔体内 JNK 通路上游靶点 MKK7 的蓄积，减少 JNK 磷酸化从而达到减轻骨关节炎兔软骨细胞的氧化损伤，促进软骨细胞增殖。

综上，在氧化应激环境下，MET-Exos 通过抑制 MKK7/JNK 通路对抗软骨细胞衰老并促进软骨细胞增殖。但是，该研究仅限于体外细胞实验，尚未经过体内动物研究和临床试验验证，还需要进一步研究外泌体内容物及后续释放过程对软骨细胞的影响。

致谢：感谢锦州医科大学（动物实验中心、第一附属医院外科实验室）的大力支持。

作者贡献：所有研究人员都参与了实验流程，主要作者起草了初稿，通讯作者进行了校对。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- 李继恩, 张静, 付大清, 等. 老年膝关节炎患者血清 LncRNA BLACAT1 和 LncRNA-H19 水平表达与病情严重程度的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2024, 39(4): 34-39.
- 马永胜, 刘洋, 杨文铭, 等. 组织培养法保存新鲜同种异体骨软骨移植物的研究进展 [J]. 实用骨科杂志, 2024, 30(3): 199-204.
- 符轩齐, 刘君, 史雪峰, 等. 踝关节骨关节炎的阶梯化治疗 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2024, 21(4): 5-9.
- 范元赫, 杨永菊, 张宇, 等. 从“脾主肌肉”理论探讨肌少症和骨关节炎发病相关性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(8): 83-87.
- LIU L, ZHANG W, LIU T, et al. The physiological metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress. Redox Biol. 2023;62:102663.

- [6] 刘梓冰, 段建辉. 健步虎潜丸联合海桐皮汤治疗早中期膝关节炎的疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志, 2024,45(4):103-106.
- [7] YAN YS, QU Z, YU DQ, et al. Sex Steroids and Osteoarthritis: A Mendelian Randomization Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:683226.
- [8] 慕惠, 刘丹平, 田大川, 等. 骨髓间充质干细胞源性外泌体对体外培养的软骨细胞增殖和迁移的调节作用 [J]. 中国运动医学杂志, 2019,38(1):40-45.
- [9] QI H, SHEN E, SHU X, et al. ERK-estrogen receptor  $\alpha$  signaling plays a role in the process of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protecting against ovariectomy-induced bone loss. *J Orthop Surg Res*. 2023;18(1):250.
- [10] HUANG B, SU Y, SHEN E, et al. Extracellular vesicles from GPNMB-modified bone marrow mesenchymal stem cells attenuate bone loss in an ovariectomized rat model. *Life Sci*. 2021;272:119208.
- [11] QI H, LIU DP, XIAO DW, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2019;55(3):203-210.
- [12] 张丽, 王晨菲, 陆春晖, 等. 达格列净联合水飞蓟宾治疗 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者疗效分析 [J]. 疑难病杂志, 2024,23(3): 328-333.
- [13] YAN S, DONG W, LI Z, et al. Metformin regulates chondrocyte senescence and proliferation through microRNA-34a/SIRT1 pathway in osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*. 2023;18(1):198.
- [14] MOHAMMED I, HOLLENBERG MD, DING H, et al. A Critical Review of the Evidence That Metformin Is a Putative Anti-Aging Drug That Enhances Healthspan and Extends Lifespan. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:718942.
- [15] QIU Y, JIANG X, LIU D, et al. The Hypoglycemic and Renal Protection Properties of Crocin via Oxidative Stress-Regulated NF- $\kappa$ B Signaling in db/db Mice. *Front Pharmacol*. 2020;11:541.
- [16] 马民, 吕志刚, 杜以宽, 等. BMSCs 的分离培养、纯化与鉴定 [J]. 中国老年学杂志, 2009,29(24):3209-3213.
- [17] 陶恩东, 夏伟杰, 王福林, 等. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体通过 PI3K/AKT 信号通路逆转高糖诱导的骨髓间充质干细胞成骨功能障碍 [J]. 温州医科大学学报, 2024,54(8):641-649.
- [18] 王小鑫, 王丽丽, 张益国, 等. 高效提取细胞培养上清外泌体方法的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2024,37(8):975-982+988.
- [19] CHEN D, XIA D, PAN Z, et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo. *Cell Death Dis*. 2016;7(10):e2441.
- [20] 张梓宁, 邓荣辉, 余家阔. 新型含 Mn 生物陶瓷粉体减轻软骨细胞的氧化应激损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2025,29(16):3335-3342.
- [21] LIU RF, HU L, WU JN, et al. Changes in tumor suppressors and inflammatory responses during hydrogen peroxide-induced senescence in rat fibroblasts. *Free Radic Res*. 2022;56(1):77-89.
- [22] ASADA S, FUKUDA K, NISHISAKA F, et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res*. 2001;50(1):19-23.
- [23] GÜLDEN M, JESS A, KAMMANN J, et al. Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(8):1298-1305.
- [24] JANG S, LEE K, JU JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5): 2619.
- [25] ZHOU J, HUANG J, LI Z, et al. Identification of aging-related biomarkers and immune infiltration characteristics in osteoarthritis based on bioinformatics analysis and machine learning. *Front Immunol*. 2023;14:1168780.
- [26] NEDUNCHEZHIAN U, VARUGHESE I, SUN AR, et al. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol*. 2022;13:907750.
- [27] SARSENOVA M, ISSABEKOVA A, ABISHEVA S, et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(21):11592.
- [28] 易林, 向文远, 张文豪, 等. 补肾痹通方联合骨髓间充质干细胞对损伤软骨细胞的保护机制及 SOX9、MMP-13 表达的影响 [J]. 陕西中医, 2024,45(6): 728-732+739.
- [29] ZHANG L, JIAO G, REN S, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):38.
- [30] ZHANG J, RONG Y, LUO C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):25138-25152.
- [31] YU H, HUANG Y, YANG L. Research progress in the use of mesenchymal stem cells and their derived exosomes in the treatment of osteoarthritis. *Ageing Res Rev*. 2022;80:101684.
- [32] JIN Y, XU M, ZHU H, et al. Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes on osteoarthritis. *J Cell Mol Med*. 2021;25(19):9281-9294.
- [33] ZHANG S, TEO KYW, CHUAH SJ, et al. MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis. *Biomaterials*. 2019;200:35-47.
- [34] KIM YG, CHOI J, KIM K. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Effective Cartilage Tissue Repair and Treatment of Osteoarthritis. *Biotechnol J*. 2020; 15(12):e2000082.
- [35] XU X, LIANG Y, LI X, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2021;269:120539.
- [36] 安香霖, 鲁金月, 董辉, 等. 中药多糖调控肿瘤微环境的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2022,37(9):2142-2147.
- [37] 唐璐, 舒晴, 贾绍辉, 等. 脂肪间充质干细胞外泌体改善骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023,29(5):707-712.
- [38] 田艺苑, 邓智中, 张安瑞, 等. 川芎嗪在中枢神经损伤中的作用及机制研究进展 [J]. 延安大学学报 (医学科学版), 2023,21(1):79-84.
- [39] 侯德淼, 唐梓晋, 李卓, 等. 外泌体在老年骨科疾病中治疗应用的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2024,44(5):1267-1273.
- [40] 郭天赐, 刘爱峰, 陈继鑫, 等. 间充质干细胞源性外泌体对骨性关节炎治疗机制的研究进展 [J]. 组织工程与重建外科, 2021,17(3): 262-265.
- [41] 王颖, 郝楠, 谢戴芳. 褪黑素在骨关节炎中作用机制的研究进展 [J]. 安徽医学, 2024,45(6):794-797.
- [42] 吴志文, 申恩谱, 李贝贝, 等. 高表达软骨素 1 骨髓间充质干细胞来源外泌体促进骨关节炎软骨细胞的增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2023,27(33):5277-5282.
- [43] 申恩谱, 黄蔚, 刘丹平, 等. 褪黑素预处理骨髓间充质干细胞外泌体促进骨髓间充质干细胞成骨 [J]. 中国组织工程研究, 2022,26(30):4800-4805.
- [44] 孔令俊, 李想, 邓叶龙, 等. 二甲双胍调控成骨细胞相关信号通路作用机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024,30(8):1244-1248.
- [45] LI J, ZHANG B, LIU WX, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(5):635-645.
- [46] 刘敏, 白爽, 杨倩, 等. 臭氧水关节腔注射通过调节炎症和氧化应激促进大鼠膝关节软骨损伤后修复 [J]. 中国组织工程杂志, 2024,32(4):13-17+23.
- [47] JIANG Y, LI T, YANG J, et al. Sustained intra-articular reactive oxygen species scavenging and alleviation of osteoarthritis by biocompatible amino-modified tantalum nanoparticles. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:118850.
- [48] 徐东, 于振和, 杨玉景, 等. 膝性关节炎氧化应激水平介导玻璃酸钠疗效的临床研究 [J]. 吉林医学, 2024,45(5):1062-1064.
- [49] HE R, WEI Y, PENG Z, et al.  $\alpha$ -Ketoglutarate alleviates osteoarthritis by inhibiting ferroptosis via the ETV4/SLC7A11/GPX4 signaling pathway. *Cell Mol Biol Lett*. 2024;29(1):88.
- [50] GUO Z, LIN J, SUN K, et al. Deferoxamine Alleviates Osteoarthritis by Inhibiting Chondrocyte Ferroptosis and Activating the Nrf2 Pathway. *Front Pharmacol*. 2022;13:791376.
- [51] 姚翠翠, 王璐, 刘镇亚, 等. 针刺调控 MAPK 信号通路治疗急性胰腺炎作用机制研究进展 [J]. 中国中医急症, 2023,32(12):2253-2256.
- [52] 丁洪波, 季晓珍, 许永安. 间充质干细胞及其外泌体在治疗 ALI/ARDS 中的机制研究进展 [J]. 中国急救医学, 2024,44(6):548-553.
- [53] 齐伟, 刘建军, 王凯, 等. 当归活性成分治疗骨关节炎的药理学机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2024,44(14):1708-1714.
- [54] 钟锦森, 唐福波, 张迪, 等. 基于 MAPK 信号通路探讨针灸治疗膝骨关节炎作用机制的研究进展 [J]. 广西医学, 2023,45(21):2643-2646.
- [55] YU J, LI X, CAO J, et al. Components of the JNK-MAPK pathway play distinct roles in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(19):17495-17509.
- [56] CALIZ AD, VERTII A, FISCH V, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 in inflammatory, cancer, and neurological diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:979673.
- [57] LUO J, PENG S, BAI W, et al. Matrilin-2 prevents the TNF $\alpha$ -induced apoptosis of WB-F344 cells via suppressing JNK pathway. *Biotechnol Appl Biochem*. 2019; 66(3):309-315.
- [58] LEE N, HEO YJ, CHOI SE, et al. Anti-inflammatory Effects of Empagliflozin and Gemigliptin on LPS-Stimulated Macrophage via the IKK/NF- $\kappa$ B, MKK7/JNK, and JAK2/STAT1 Signaling Pathways. *J Immunol Res*. 2021; 2021:9944880.
- [59] LIN Z, MIAO J, ZHANG T, et al. JUNB-FBXO21-ERK axis promotes cartilage degeneration in osteoarthritis by inhibiting autophagy. *Aging Cell*. 2021;20(2):e13306.
- [60] YAN J, FENG G, YANG Y, et al. Nintedanib ameliorates osteoarthritis in mice by inhibiting synovial inflammation and fibrosis caused by M1 polarization of synovial macrophages via the MAPK/PI3K-AKT pathway. *FASEB J*. 2023;37(10):e23177.
- [61] YAN J, NI B, SHENG G, et al. Rhoifolin Ameliorates Osteoarthritis via Regulating Autophagy. *Front Pharmacol*. 2021;12:661072.
- [62] HUA X, XIANG D, GUO M, et al. Induction of RAC1 protein translation and MKK7/JNK-dependent autophagy through dicer/miR-145/SOX2/miR-365a axis contributes to isorhapontigenin (ISO) inhibition of human bladder cancer invasion. *Cell Death Dis*. 2022;13(8):753.
- [63] LI S, LI J, ZHAO Z, et al. Delavatine A Attenuates OGD/R-Caused PC12 Cell Injury and Apoptosis through Suppressing the MKK7/JNK Signaling Pathway. *Biol Pharm Bull*. 2022;45(12):1743-1753.
- [64] GE HX, ZOU FM, LI Y, et al. JNK pathway in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects. *J Recept Signal Transduct Res*. 2017;37(5):431-436.
- [65] LI Z, MENG D, LI G, et al. Celecoxib Combined with Diacerein Effectively Alleviates Osteoarthritis in Rats via Regulating JNK and p38MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*. 2015;38(4):1563-1572.
- [66] CUI X, QIAN DW, JIANG S, et al. Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma Improve Glucose and Lipid Metabolism in T2DM Rats via Regulation of the Metabolic Profiling and MAPK/PI3K/Akt Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3634.
- [67] HE X, GAO F, HOU J, et al. Metformin inhibits MAPK signaling and rescues pancreatic aquaporin 7 expression to induce insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 2021;297(2):101002.
- [68] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289.
- [69] HAEUSGEN W, HERDEGEN T, WAETZIG V. The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6-7):536-544.
- [70] CALIZ AD, YOO HJ, VERTII A, et al. Mitogen Kinase Kinase (MKK7) Controls Cytokine Production In Vitro and In Vivo in Mice. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9364.
- [71] ZHANG Z, LI M, MA X, et al. GADD45B-1 attenuates oxidative stress and apoptosis via Sirt3-mediated inhibition of ER stress in osteoarthritis chondrocytes. *Chem Biol Interact*. 2018;296:76-82.
- [72] YOON HJ, CHO SY, KIM HG, et al. Protective Effects of Changbudodam-tang on Cell Death Signals on the Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells via Regulation of MKK7/JNK/c-Jun Signaling Pathway. *J Pharmacopuncture*. 2024;27(2):131-141.
- [73] 夏帅. 基于 P38/JNK MAPK 信号通路探讨针灸疗法抗 KOA 兔软骨细胞凋亡的作用机制 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [74] ZHANG H, SHAO Y, YAO Z, et al. Mechanical overloading promotes chondrocyte senescence and osteoarthritis development through downregulating FBXW7. *Ann Rheum Dis*. 2022;81(5):676-686.
- [75] 曾麒, 宋世雷, 陈跃平. DUSP1/MAPK 信号通路影响巨噬细胞极化促进骨愈合的研究进展 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2024,39(7):721-724.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)