透骨消痛胶囊抑制软骨细胞赖氨酸巴豆酰化促进软骨损伤修复*

陈爽[1,2]，徐诗淇[3]，宋沁潼[4]，张芷龙[1]，黄艳峰[1,2]✉

1. 福建中医药大学中西医结合学院/中西医结合研究院，福建 福州 350122；2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室，福建 福州 350122；3. 福建中医药大学中医骨伤学院，福建 福州 350122；4. 福建中医药大学中医学院，福建 福州 350122

摘要：目的：探讨透骨消痛胶囊（Tougu Xiaotong Capsule，TXC）通过调节软骨细胞赖氨酸巴豆酰化水平促进软骨损伤修复的分子机制。方法：将 30 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为假手术组（Sham 组，$n=10$）和实验组（$n=20$）。实验组小鼠采用软骨下环形钻孔法建立软骨损伤模型，随机分为模型组（Model 组）和 TXC 组（368 mg·kg^{-1}），每组 10 只，以生理盐水或药物灌胃 6 周。采用番红 O－固绿染色与 HE 染色评估小鼠软骨组织形态学改变；采用 LC－MS/MS 技术进行蛋白质组学与巴豆酰化修饰组学分析，筛选差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）和差异修饰位点；采用 Western blot 检测软骨组织葡萄糖－6－磷酸脱氢酶（glucose－6－phosphate dehydrogenase，G6PD）、转酮醇酶（transketolase，TKT）、磷酸葡萄糖变位酶 2（phosphoglucomutase 2，PGM2）蛋白表达水平。结果：与 Sham 组比较，Model 组小鼠关节软骨 4 层结构破坏，软骨细胞数量减少，潮线不完整，软骨层番红 O 染色减弱，HE 染色亦呈现相同退变趋势；与 Model 组比较，TXC 组小鼠软骨细胞数量增加，缺损面积减少，番红 O 染色增强。蛋白质组学分析显示，Sham 组与 Model 组有 813 个 DEGs，Model 组与 TXC 组有 887 个 DEGs，取交集得到 339 个共同 DEGs。巴豆酰化修饰组学分析显示，Sham 组与 Model 组有 1 525 个 DEGs 和 2 720 个差异修饰位点，Model 组与 TXC 组有 1 680 个 DEGs 和 3 495 个差异修饰位点，取交集得到 1 137 个共同 DEGs。两组学交叉分析得到 74 个 DEGs 和 138 个差异修饰位点。与 Sham 组比较，Model 组 S100A8－K88、Aldoa－K42、G6pdx－K119、Pfkm－K744、Pgm1－K349 等位点显著上调；与 Model 组比较，TXC 组 G6pdx－K119、Pfkm－K744、S100A8－K88、Pgm1－K349、Rab5b－116K 等位点显著下调。KEGG 与 WikiPathways 富集分析显示，磷酸戊糖途径在 Model 组显著激活、在 TXC 组显著抑制。Western blot 显示，与 Sham 组比较，Model 组小鼠软骨组织 G6PD、TKT、PGM2 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；与 Model 组比较，TXC 组小鼠软骨组织 G6PD、TKT、PGM2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。结论：TXC 可能通过抑制软骨细胞赖氨酸巴豆酰化修饰，下调磷酸戊糖途径关键蛋白 G6PD、TKT、PGM2 表达，从而发挥软骨保护与损伤修复作用。

关键词：软骨损伤修复；透骨消痛胶囊；赖氨酸巴豆酰化；软骨细胞；磷酸戊糖途径；表观遗传修饰；小鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.09.307
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)09－2012－10

Tougu Xiaotong Capsule Inhibiting Lysine Crotonylation in Chondrocytes and Promoting Cartilage Injury Repair

CHEN Shuang[1,2]，XU Shiqi[3]，SONG Qintong[4]，ZHANG Zhilong[1]，HUANG Yanfeng[1,2]

1. College of Integratiive Medicine / Institute of Integratiive Medicine，Fujian University of Traditional Chinese Medicine，Fuzhou Fujian China 350122；2. Key Laboratory of Geriatric Diseases of Integratiive Medicine，Fujian Fuzhou China 350122；3. School of Orthopedics，Fujian University of Traditional Chinese Medicine，Fuzhou，Fujian 350122；4. School of Traditional Chinese Medicine，Fujian University of Traditional Chinese Medicine，Fuzhou Fujian China 350122

＊**基金项目**：福建省自然科学基金项目（2024J01138）；福建省卫生健康委员会科技计划项目（2023GGA070）；福建省中青年教师教育科研项目（JAT231042）；福建中医药大学校管课题项目（X2023024）

作者简介：陈爽（1987－），男，福建福州人，硕士研究生，主治医师，研究方向：中西医结合治疗骨关节炎。
✉**通信作者**：黄艳峰，医学博士，副教授，研究方向：中西医结合治疗骨关节炎。E－mail：banglongnet@126.com

Abstract: Objective: This study aimed to explore the molecular mechanism by which Tougu Xiaotong Capsule (TXC) promote cartilage injury repair by regulating lysine crotonylation levels in chondrocytes. Methods: Thirty male C57BL/6 mice were randomly divided into a sham operation group (Sham group, $n = 10$) and an experimental group ($n = 20$). Cartilage injury models in the experimental group mice were established using the subchondral ring drilling method, and then randomly divided into the model group (Model group) and TXC group (368 mg · kg^{-1}), with 10 mice in each group, receiving either saline or drug gavage for six weeks. Safranin O – Fast Green staining and HE staining were used to evaluate morphological changes in mouse cartilage tissue. LC – MS/MS technology was employed for proteomics and crotonylation modification analysis to screen for differentially expressed genes (DEGs) and differential modification sites. Western blot was used to detect protein expression levels of glucose – 6 – phosphate dehydrogenase (G6PD), transketolase (TKT), and phosphoglucomutase 2 (PGM2) in cartilage tissue. Results: Compared with the Sham group, mice in the Model group showed destruction of the four – layer structure of articular cartilage, reduced chondrocyte numbers, incomplete tide lines, weakened Safranin O staining of cartilage, and similar degenerative trends in HE staining. Compared with the Model group, mice in the TXC group had increased chondrocyte numbers, reduced defect areas, and enhanced Safranin O staining. Proteomics analysis showed 813 DEGs between the Sham and Model groups and 887 DEGs between the Model and TXC groups, with 339 common DEGs identified at the intersection. Butyrylation modification analysis showed 1 525 DEGs and 2 720 differential modification sites between the Sham and Model groups and 1 680 DEGs and 3 495 differential modification sites between the Model and TXC groups, with 1 137 common DEGs at the intersection. Cross – analysis of the two omics revealed 74 DEGs and 138 differential modification sites. Compared with the Sham group, Model group sites S100A8 – K88, Aldoa – K42, G6pdx – K119, Pfkm – K744, and Pgm1 – K349 were significantly upregulated; compared with the Model group, TXC group sites G6pdx – K119, Pfkm – K744, S100A8 – K88, Pgm1 – K349, and Rab5b – 116K were significantly downregulated. KEGG and WikiPathways enrichment analyses showed the pentose phosphate pathway was significantly activated in the Model group and significantly inhibited in the TXC group. Western blot showed that compared with the Sham group, protein expression levels of G6PD, TKT, and PGM2 in the cartilage of Model group mice were significantly increased ($P < 0.01$); compared with the Model group, protein expression levels of G6PD, TKT, and PGM2 in TXC group mice were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion: TXC may protect and repair cartilage by inhibiting lysine butyrylation in chondrocytes and downregulating the expression of key pentose phosphate pathway proteins G6PD, TKT, and PGM2.

Key words: cartilage injury repair; Tougu Xiaotong Capsule; lysine butyrylation; chondrocyte; pentose phosphate pathway; epigenetic modification; mouse

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的退行性关节疾病,其核心病理特征是关节软骨的进行性破坏,给患者生活质量带来严重影响,也对社会造成了沉重的经济和医疗负担[1-2]。目前,OA 的临床治疗包括非甾体抗炎药、关节腔注射及外科手术等,但均难以实现软骨组织的实质性修复[3-4]。因此,深入探索软骨损伤的分子机制,寻找能够有效促进软骨修复的干预策略,已成为 OA 研究领域亟待解决的关键科学问题。

关节软骨由软骨细胞及细胞外基质构成,软骨细胞作为其中唯一的细胞类型,其代谢稳态对维持软骨结构与功能至关重要[5]。在 OA 的病理进程中,炎症因子、机械应力过载等因素持续刺激软骨细胞,导致细胞代谢异常、合成与分解失衡,进而引起细胞外基质的过度降解和软骨结构的破坏[6]。大量研究表明,表观遗传修饰在调控软骨细胞功能和 OA 发病中发挥重要作用,特别是组蛋白修饰作为表观遗传调控的重要形式,能够通过改变染色质结构和基因转录活性,广泛参与软骨细胞分化、炎症反应和基质代谢等过程[7-9]。

赖氨酸巴豆酰化修饰是近年来新发现的一种进化上高度保守的酰化修饰类型,其在结构、功能与调控机制上与经典的乙酰化修饰存在显著差异[10]。研究表明,赖氨酸巴豆酰化修饰能更强烈地激活基因转录,并广泛参与细胞周期调控、代谢重编程及多种疾病的发生发展过程[11]。在 OA 研究领域,已有研究初步揭示了巴豆酰化修饰的相关调控因子及其潜在作用。例如,巴豆酰辅酶 A 合成酶短链家族成员 2(acyl – CoA synthetase short – chain family member 2, ACSS2)被证明可显著提升组蛋白巴豆酰化水平,且该修饰与白细胞介素 – 1β(interleukin – 1β, IL – 1β)诱导的软骨细胞纤维化密切相关,而软骨纤维化正是 OA 软骨退变的重要特征之一[12]。另有学者指出,谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GCDH)蛋白的巴豆酰化修饰可能是 OA 发病的潜在风险因子[13]。然而,目前关于巴豆酰化修饰在软骨损伤修复过程中的系统性研究仍较为有限。

OA 可归属于中医“痿证”“痹证”范畴,其根本病机为本虚标实,肝肾亏虚为本,风寒湿邪入侵、瘀血阻滞经络为标[14]。本课题组前期基于“本痿标痹”

的治疗理念，研制出福建中医药大学附属第二人民医院的院内制剂透骨消痛胶囊（Tougu Xiaotong Capsule，TXC；批准文号：闽药制备字 Z20190010000）。该药具有补肾柔肝、活血祛风的功效，含有丰富的活性成分，可通过多靶点协同作用保护关节软骨[15-18]，长期用于 OA 治疗，临床疗效显著[14]。然而，TXC 能否通过调控赖氨酸巴豆酰化途径促进软骨损伤修复，目前尚不清楚。

因此，本研究拟采用软骨下环形钻孔法建立小鼠软骨损伤模型，通过形态学评估、蛋白质组学联合巴豆酰化修饰组学分析以及 Western blot 验证，系统探讨 TXC 调控软骨细胞巴豆酰化修饰的分子网络，旨在从表观遗传修饰的新视角揭示 TXC 促进软骨损伤修复的作用机制，为 TXC 临床应用提供实验依据。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 30 只，8 周龄，体质量（20 ± 5）g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，动物生产许可证号：SCXK（沪）2022 - 0004。实验在福建中医药大学实验动物中心进行，实验动物使用许可证号：SYXK（闽）2023 - 0004。小鼠饲养于温度 21 ~ 22 ℃、12 h 光照/12 h 黑暗交替的环境，每笼 5 只。实验方案经福建中医药大学动物伦理委员会审核批准，伦理审批号：FJTCM IACUC - 2024270，实验操作符合《实验动物护理与使用指南》要求。

1.2　药物与试剂　透骨消痛胶囊（福建中医药大学附属第二人民医院，院内制剂号：Z20190010000）；异氟烷（深圳瑞沃德生命科技有限公司，货号：R510 - 22）；HE 染色试剂盒、改良番红 O - 固绿染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：G1120 - 10、G1371）；蛋白提取试剂盒（SAB 公司，货号：pe001）；BCA 蛋白定量试剂盒（Biomiga 公司，货号：pw0104）；去乙酰化酶抑制剂（MedChemExpress 公司，货号：HY - 15144）；尿素、烟酰胺、β - 巯基乙醇、丙烯酰胺、四甲基乙二胺、碘乙酰胺、二硫苏糖醇、三氟乙酸（Sigma - Aldrich 公司，货号：V900119、N0636、M6250、A2792、T9281、V900335、D9163、302031）；蛋白酶抑制剂Ⅲ（Merck Millipore 公司，货号：539134）；乙腈（ThermoFisher Scientific 公司，货号：204433）；固相萃取小柱（Phenomenex 公司，货号：8B - S100 - EBJ）；葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶（glucose - 6 - phosphate dehydrogenase，G6PD）、转酮醇酶（transketolase，TKT）、磷酸葡萄糖变位酶 2（phosphoglucomutase 2，PGM2）抗体（Cohesion Biosciences 公司，货号：CQA1969、CQA2273、CQA5458）。

1.3　仪器　细胞破碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司，型号：JY92 - IIN）；微量定量仪（IMPLEN 公司，型号：NP80Touch）；自动化固相萃取仪（TECAN 公司，型号：Resolvex A100）；电泳仪（BioRad 公司，型号：1645050）；发射扫描电子显微镜（蔡司公司，型号：FE - SEM）。

2　方法

2.1　造模、分组及给药　将 30 只 C57BL/6 雄性小鼠按随机数字表法分为假手术组（Sham 组，$n = 10$）和实验组（$n = 20$）。实验组小鼠吸入 2% 异氟烷麻醉，参照文献[19 - 20]方法采用软骨下环形钻孔法建立软骨损伤模型，并随机分为模型组（Model 组）和 TXC 组，每组 10 只。参照本课题组前期研究，TXC 灌胃剂量为 368 mg · kg^{-1}[21-23]，Sham 组与 Model 组小鼠灌胃等体积生理盐水，连续 6 周。

2.2　软骨组织形态学观察　番红 O - 固绿染色通过电荷特异性结合直观反映软骨中蛋白多糖和胶原的分布变化，是研究软骨退变与修复的经典方法。番红 O 染色变浅或缺失代表蛋白多糖丢失；固绿染色增加代表软骨减少，而纤维化组织、钙化软骨或骨组织增多。具体步骤如下：样本经 EDTA - 2Na 脱钙 4 周，梯度乙醇脱水，石蜡包埋，制备 4 μm 切片。切片经 Weigert A、B 混合液（1∶1）染色 5 min，酸性分化 10 s，固绿染液浸染 5 min，弱酸液漂洗 10 s，番红 O 染液染色 5 min，蒸馏水冲洗后脱水封片。

HE 染色步骤如下：切片经二甲苯脱蜡 10 min，梯度乙醇复水 15 min，苏木精染色 1 min，分化 10 s，返蓝 10 min，伊红染色 30 s，乙醇脱水后封片。于光学显微镜下观察软骨组织病理形态学变化。

2.3　软骨蛋白提取　取各组小鼠关节软骨组织，加入液氮充分研磨至粉末。加入粉末 4 倍体积裂解缓冲液（8 mol · L^{-1}尿素、1% 蛋白酶抑制剂、3 μmol · L^{-1}去乙酰化酶抑制剂、50 mmol · L^{-1}烟酰胺），超声裂解。4 ℃、12 000 × g 离心 10 min，收集上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定。

2.4　胰酶酶解　各组样品取等量蛋白，用裂解液调整至相同体积。加入二硫苏糖醇至终浓度 5 mmol · L^{-1}，56 ℃ 还原 30 min；加入碘乙酰胺至终浓度 11 mmol · L^{-1}，室温避光孵育 15 min；加入四乙基溴化铵稀释尿素至浓度低于 2 mol · L^{-1}。以 1∶50

比例加入胰蛋白酶，酶解过夜；再按 1∶100 比例加入胰蛋白酶继续酶解 4 h。

2.5　肽段制备　将肽段溶解于 IP 缓冲溶液（100 mmol·L^{-1} NaCl、1 mmol·L^{-1} EDTA、50 mmol·L^{-1} Tris－HCl、0.5% NP－40，pH 8.0）中，转移上清液至预先洗涤好的树脂中，置于 4 ℃旋转摇床上温和摇晃并孵育过夜。孵育结束后依次用 IP 缓冲液洗涤树脂 4 次，去离子水洗涤 2 次；用 0.1% 三氟乙酸洗脱液洗脱结合肽段 3 次，收集洗脱液并真空冷冻抽干。抽干样品按 C18 ZipTips 说明书除盐后，真空冷冻抽干，备 LC－MS/MS 分析。

2.6　液相色谱－质谱联用分析　肽段用液相色谱流动相 A 相（含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液）溶解后，使用 Easy－nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈－水溶液。液相梯度设置：0—18 min，9% ～24% B；18—22 min，24% ～35% B；22—26 min，35% ～90% B；26—30 min，90% B。流速维持在 450 nL·min^{-1}。分离后的肽段经毛细管离子源电离（离子源电压 1.6 kV）后进入 timsTOF Pro 质谱仪进行数据采集。数据采集模式为 dia－PASEF，一级质谱扫描范围 100～1 700 m/z，一张一级谱采集后进行 8 次 PASEF 模式采集，二级质谱扫描区间为 425～1 025 m/z，每 25 m/z 为 1 个窗口。

2.7　生物信息学分析　利用京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG，http://www.kegg.jp/kegg/mapper.html）数据库对鉴定蛋白进行通路注释，使用 KEGG 在线工具 KAAS 对注释的蛋白质进行 KEGG 数据库描述，并使用 KEGG mapper 将注释结果映射到 KEGG 通路数据库。同时使用 Reactome 数据库（https://reactome.org）与 WikiPathways 数据库进行差异表达修饰蛋白的通路富集分析。所有数据使用 *Fisher* 精确检验分析差异表达修饰蛋白在以鉴定蛋白为背景下的富集显著性，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.8　蛋白功能富集聚类分析　基于不同分组的差异表达修饰蛋白功能富集结果，进行层次聚类分析（欧氏距离，平均连接聚类）。首先收集所有蛋白分组富集到的功能分类信息和对应的 P 值，筛选至少在一个蛋白分组中显著富集（$P<0.05$）的功能分类；将筛选得到的 P 值数据矩阵经－lg 对数变换后，使用 R 语言 ComplexHeatmap 包的 Heatmap 函数绘制热图进行可视化。

2.9　Western blot 检测　取各组小鼠关节软骨组织，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。随后，配制分离胶和浓缩胶，加样，电泳，400 mA 条件下转膜。室温封闭 2 h，加入稀释的一抗（GAPDH 1∶5 000、G6PD 1∶1 000、TKT 1∶1 000、PGM2 1∶1 000），4 ℃摇床孵育过夜。加入 IgG（H＋L）HRP 二抗（1∶5 000），室温孵育 1 h。最后，滴加 ECL 化学发光液，于凝胶成像系统中曝光显影。

2.10　统计学方法　采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理。若数据服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者两两比较采用 *LSD－t* 检验，方差不齐者采用 *Games－Howell* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　软骨组织形态学改变　番红 O－固绿染色与 HE 染色显示，与 Sham 组比较，Model 组小鼠软骨的 4 层结构破坏，中间可见明显缺损，局部软骨细胞数量减少，潮线不完整，软骨层番红 O 染色减弱；与 Model 组比较，TXC 组小鼠软骨结构缺损减小，番红 O 染色增强；在 HE 染色中也观察到相同变化趋势，见图 1。

3.2　蛋白质组学与巴豆酰化修饰组学数据质控　蛋白质组学与巴豆酰化修饰组学测序分别针对总肽段序列、蛋白及修饰位点数量、肽段长度分布进行质谱分析，结果显示：两组学肽段分布在 7～20 个氨基酸，各组学样本的修饰位点强度均值在同一水平线。表明符合基于酶解和质谱碎裂方式的一般规律，肽段长度的分布均符合质控要求，样本质量良好，见图 2。

3.3　蛋白质组学差异基因分析　蛋白质组学分析显示，Sham 组与 Model 组共筛选出 813 个差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），其中上调基因 451 个、下调基因 362 个；Model 组与 TXC 组共筛选出 887 个 DEGs，其中上调基因 606 个、下调基因 281 个；取交集得到 339 个共同 DEGs，见图 3。

3.4　巴豆酰化修饰组学差异基因分析　巴豆酰化修饰组学分析显示，Sham 组与 Model 组共筛选出 1 525 个 DEGs，其中 541 个上调基因、984 个下调基因，2 720 个差异修饰位点，其中 943 个上调位点，1 777 个下调位点；Model 组与 TXC 组共筛选出 1 680 个 DEGs，其中 1 042 个上调基因、638 个下调基因，3 495 个差异修饰位点，其中 2 272 个上调位点、1 223 个下调位点；取交集得到 1 137 个共同 DEGs，见图 4。

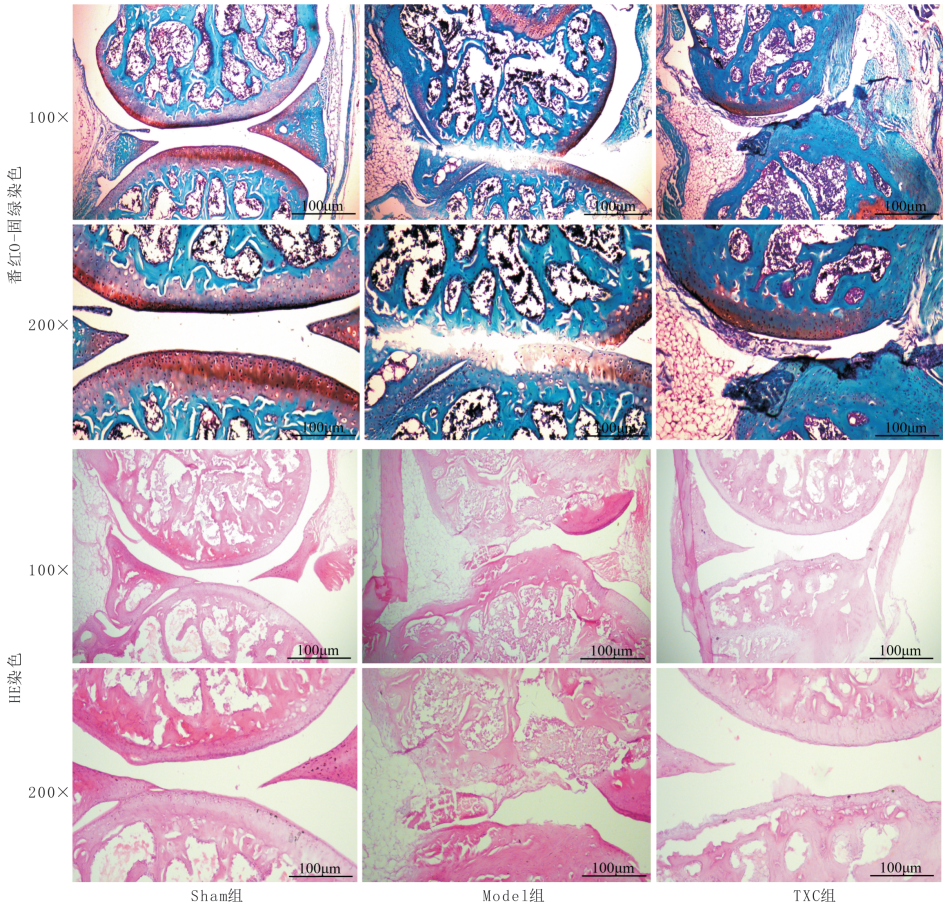
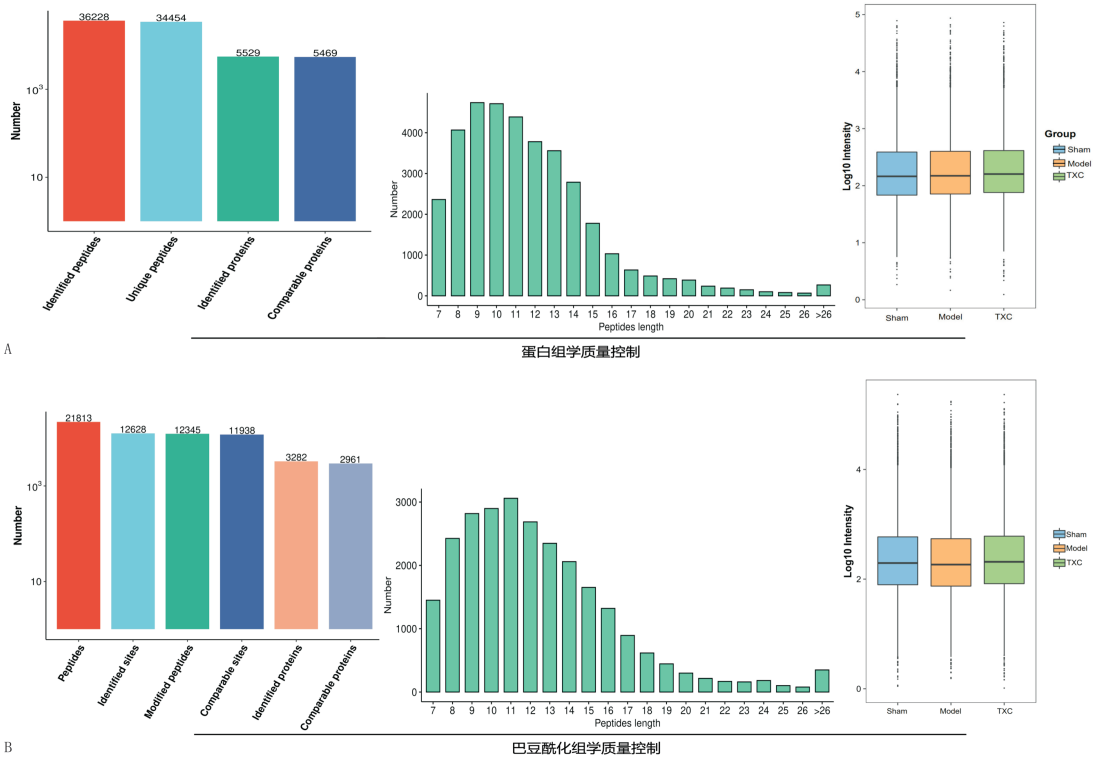
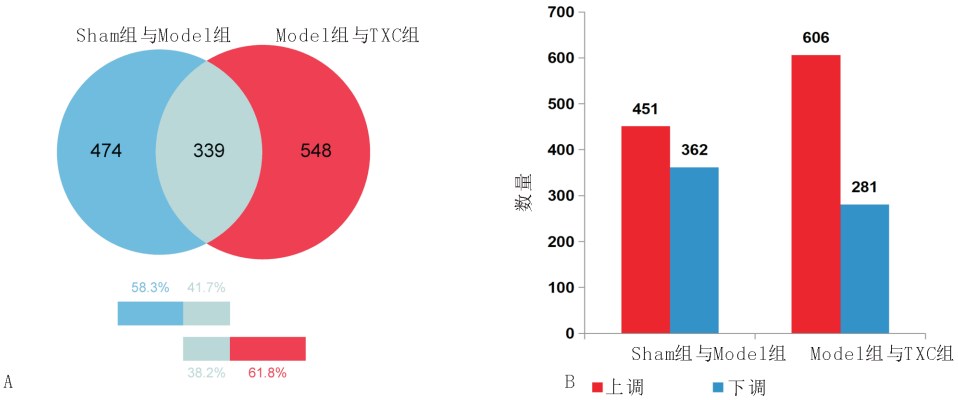


图 1　各组小鼠软骨组织番红 O－固绿与 HE 染色图



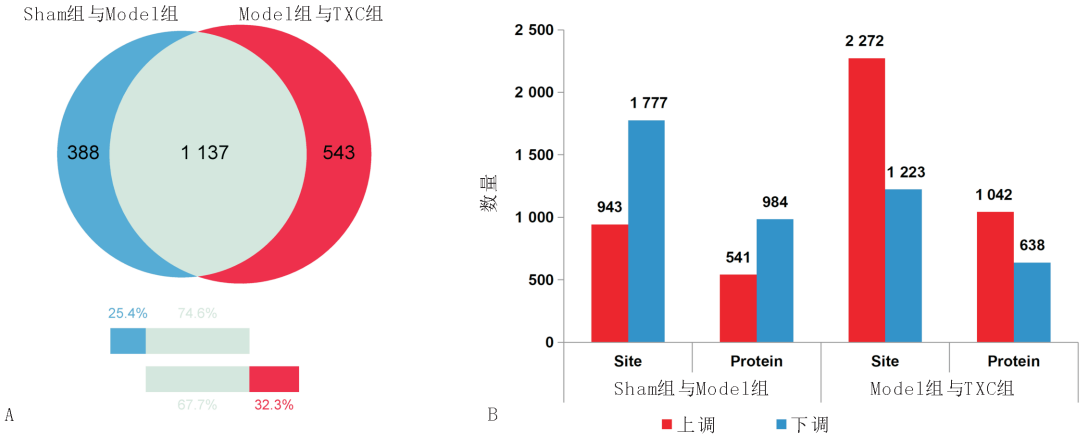
注：A：修饰位点鉴定；B：肽段长度分布。

图 2　蛋白质组学与巴豆酰化修饰组学数据质控



注：A：差异表达基因韦恩图；B：差异表达基因柱状图。

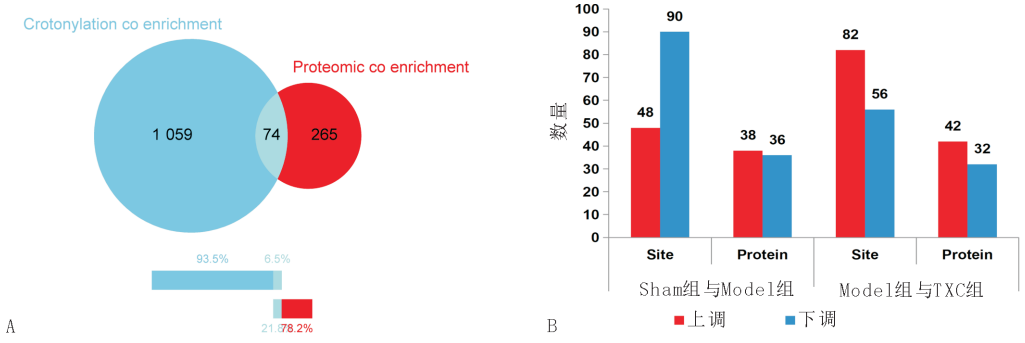
图 3　蛋白质组学差异表达基因分析



注：A：差异表达基因韦恩图；B：差异表达基因柱状图。

图 4　巴豆酰化修饰组学差异表达基因分析

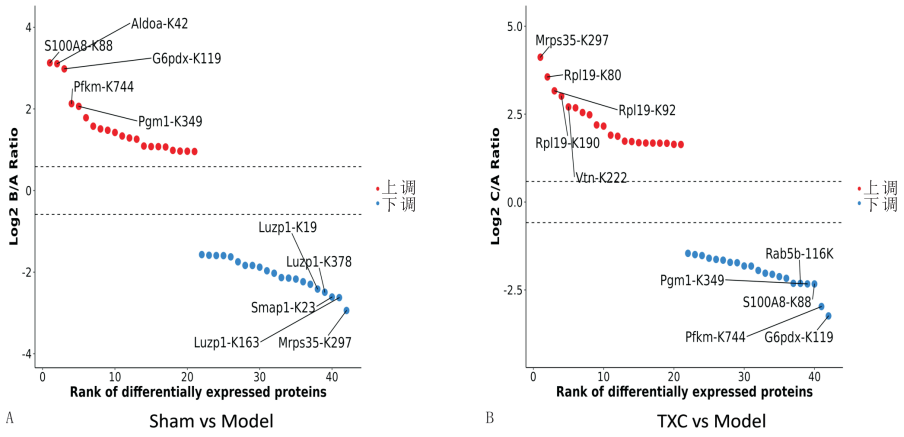
3.5　两组学共同富集基因分析　将蛋白质组学组间富集的 339 个交集 DEGs 与巴豆酰化修饰组学富集的 1 137 个 DEGs 进行交叉分析，共筛选出 74 个共同 DEGs；Sham 组与 Model 组比较中有 38 个上调基因、36 个下调基因；共同富集位点有 138 个，其中 48 个上调位点、90 个下调位点。Model 组与 TXC 组比较中有 42 个上调基因、32 个下调基因；共同富集位点有 138 个，其中 82 个上调位点、56 个下调位点，见图 5。



注：A：差异表达基因韦恩图；B：差异表达基因柱状图。

图 5　两组学共同富集基因分析

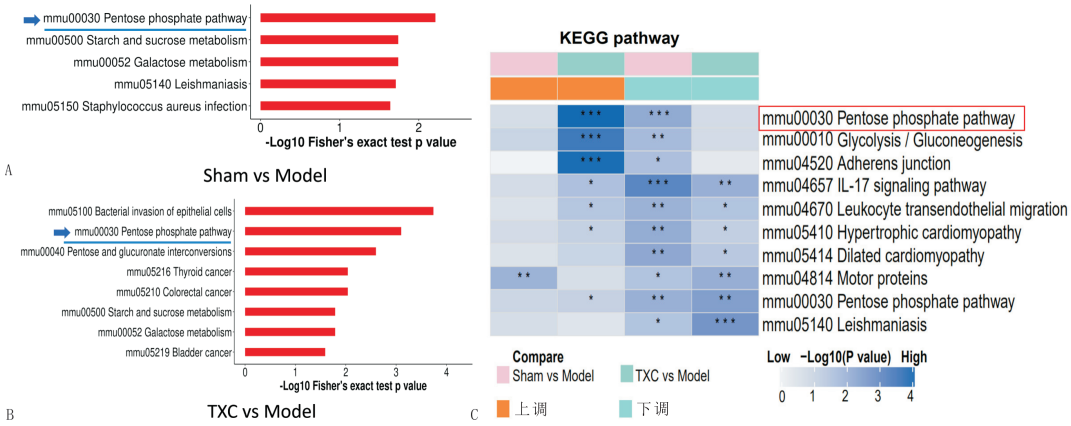
3.6　两组学共同富集巴豆酰化差异位点分析　针对 74 个共同富集基因按比值大小筛选前 20 位上调与下调位点，与 Sham 组比较，Model 组 S100A8 – K88、Aldoa – K42、G6pdx – K119、Pfkm – K744、Pgm1 – K349 等位点显著上调；与 Model 组比较，TXC 组 G6pdx – K119、Pfkm – K744、S100A8 – K88、Pgm1 – K349、Rab5b – 116K 等位点显著下调，见图 6。



注：A：Model 组排名前 20 位基因位点；B：TXC 组排名前 20 位基因位点。

图 6　共同富集巴豆酰化差异位点调控情况

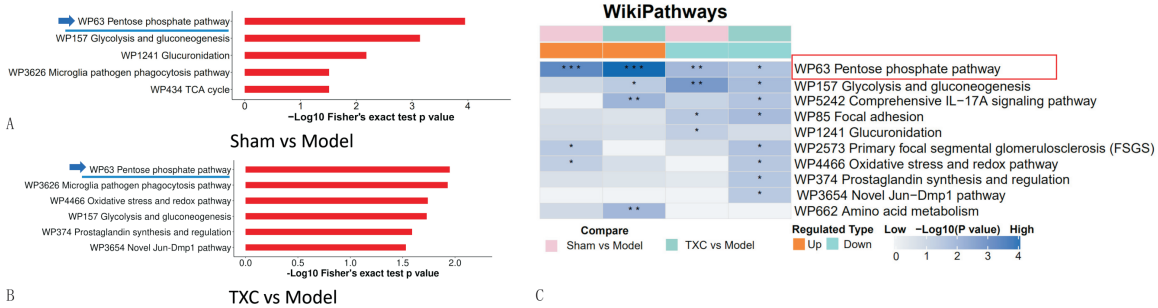
3.7　KEGG 通路富集分析　KEGG 富集分析显示，巴豆酰化差异位点调控的信号通路主要富集在磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）等信号通路。聚类分析显示，与 Sham 组比较，Model 组磷酸戊糖途径显著激活（$P<0.05$）；与 Model 组比较，TXC 组磷酸戊糖途径显著抑制（$P<0.05$），见图 7。



注：A：Sham 组与 Model 组 KEGG 通路富集情况；B：TXC 组与 Model 组 KEGG 通路富集情况；C：KEGG 聚类分析；$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$。

图 7　巴豆酰化差异位点 KEGG 富集分析

3.8　WikiPathways 通路富集分析　WikiPathways 富集分析显示，巴豆酰化差异位点调控的信号通路主要富集在磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）等信号通路。聚类分析显示，与 Sham 组比较，Model 组磷酸戊糖途径显著激活（$P<0.05$）；与 Model 组比较，TXC 组磷酸戊糖途径显著抑制（$P<0.05$），见图 8。

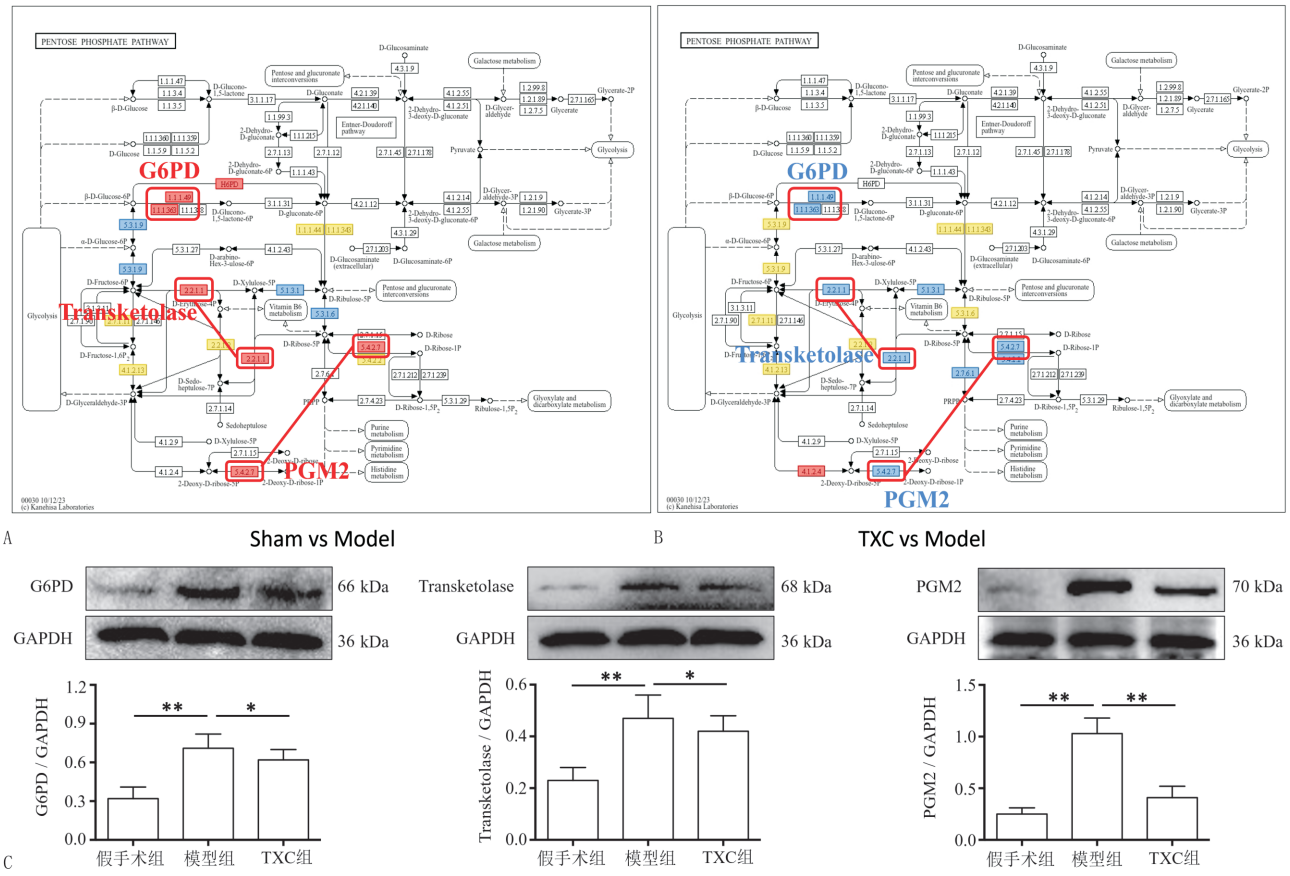


注：A：Sham 组与 Model 组 WikiPathways 富集情况；B：TXC 组与 Model 组 WikiPathways 富集情况；C：WikiPathways 聚类分析，$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$。

图 8　巴豆酰化差异位点 WikiPathways 富集分析

3.9　TXC 通过巴豆酰化调控磷酸戊糖途径

Western blot 显示，与 Sham 组比较，Model 组小鼠软骨组织中磷酸戊糖途径相关蛋白 G6PD、TKT、PGM2 表达水平显著升高；与 Model 组比较，TXC 组小鼠软骨组织中 G6PD、TKT、PGM2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），见图 9。



注：A：Sham 组与 Model 组比较；B：TXC 组与 Model 组比较；红色为上调，蓝色为下调；C：G6PD、TKT、PGM2 蛋白表达水平；$*P<0.05$，$**P<0.01$。

图 9　各组小鼠软骨组织 G6PD、TKT、PGM2 蛋白表达水平比较

4　讨论

TXC 是本课题组基于“肾主骨”“肝主筋”等中医理论，以补肾壮骨为根本治则研制的中药复方制剂，由巴戟天、杭白芍、肿节风等药物组成。前期研究已证实，TXC 具有良好的临床有效性和安全性。本研究中番红 O－固绿染色与 HE 染色结果显示，TXC 干预后小鼠关节软骨缺损面积减小、软骨细胞数量增多、番红 O 染色明显增强，表明 TXC 对关节软骨具有保护作用。

本研究首次将蛋白质组学与巴豆酰化修饰组学联合分析，从表观遗传修饰的全新视角探讨 TXC 治疗 OA 的作用机制。结果显示，两组学的共同富集基因交叉分析后获得 74 个重叠基因，提示 TXC 对软骨细胞的调控作用可能发生在翻译后修饰水平，而非转录或翻译水平。对 74 个共同富集基因的位点分析发现，与假手术组比较，模型组中 S100A8－K88、Aldoa－K42、G6pdx－K119、Pfkm－K744、Pgm1－K349 等多个糖代谢关键酶位点的巴豆酰化水平显著上调[24]；TXC 干预后，上述位点的巴豆酰化水平均显著下调。KEGG 和 WikiPathways 富集分析进一步显示，这些差异修饰位点显著富集于磷酸戊糖途径。

磷酸戊糖途径是葡萄糖分解代谢的重要分支通路，主要功能包括产生还原型辅酶Ⅱ（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）和提供核糖－5－磷酸。NADPH 对于维持细胞内谷胱甘肽的还原状态、抵抗氧化应激损伤具有关键作用，而核糖－5－磷酸则是核酸合成的重要原料[25]。在正常生理条件下，软骨细胞处于低氧微环境，主要依赖糖酵解提供能量，磷酸戊糖途径活性较低；但在 OA 病理状态下，炎症因子和机械应力过载等因素

导致软骨细胞内活性氧水平升高，为抵抗氧化应激，细胞可能通过激活磷酸戊糖途径增强 NADPH 的生成[26]。本研究中，Western blot 结果显示，模型组软骨组织中 G6PD、TKT、PGM2 等磷酸戊糖途径关键蛋白表达显著增强，提示磷酸戊糖途径在软骨损伤后被异常激活。

G6PD 作为磷酸戊糖途径的限速酶，其活性受到多种翻译后修饰的精密调控。已有研究表明，G6PD 的乙酰化修饰能够影响其酶活性与稳定性[27]，而巴豆酰化作为一种与乙酰化结构相似但功能迥异的酰化修饰，其对 G6PD 的调控作用尚未见报道。本研究中，模型组 G6pdx－K119 位点的巴豆酰化水平显著上调，TXC 干预后该位点修饰水平下调，伴随 G6PD 蛋白表达降低，提示 TXC 可能通过抑制 G6pdx－K119 位点的巴豆酰化修饰，降低 G6PD 的稳定性或促进其降解，从而抑制过度激活的磷酸戊糖途径，恢复软骨细胞的代谢稳态。K119 位点位于 G6PD 的 NADP＋结合结构域附近，该位点的巴豆酰化修饰可能通过改变酶的空间构象影响其与底物的结合能力，进而调控酶活性。除 G6PD 外，TKT 和 PGM2 蛋白表达在 TXC 干预后也显著下调。TKT 是磷酸戊糖途径非氧化阶段的关键酶，参与碳骨架的重新排布；PGM2 则连接糖酵解与磷酸戊糖途径，调节代谢流的分配[28－29]。这两种酶的表达变化进一步证实了 TXC 对磷酸戊糖途径的整体抑制作用。

综上所述，TXC 可能通过抑制软骨细胞赖氨酸巴豆酰化修饰，下调磷酸戊糖途径关键蛋白 G6PD、TKT、PGM2 表达，从而发挥软骨保护与损伤修复作用。但本研究尚存在一定局限：（1）巴豆酰化修饰对 G6PD 等酶活性的直接调控作用有待通过体外定点突变、酶活性检测等技术进一步验证；（2）TXC 作为复方制剂，其调控巴豆酰化修饰的具体活性成分及作用靶点尚需深入筛选；（3）巴豆酰化修饰的上游调控酶（如巴豆酰转移酶、去巴豆酰化酶）在 TXC 干预过程中的动态变化与作用机制仍不清楚。后续研究将围绕上述问题深入探讨，以期为 TXC 的临床应用提供更坚实的科学依据。

参考文献：

[1] Deng R H, Zhao R F, Zhang Z N, et al. Chondrocyte membrane－coated nanoparticles promote drug retention and halt cartilage damage in rat and canine osteoarthritis[J]. Sci Transl Med, 2024, 16(735): eadh9751.

[2] Luo P, Lu L, Xu R, et al. Gaining insight into updated MR imaging for quantitative assessment of cartilage injury in knee osteoarthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2024, 26(9): 311－320.

[3] Bai L, Zhang X Y, Han Z Y, et al. Injectable porous microspheres for articular cartilage regeneration through in situ stem cell recruitment and macrophage polarization[J]. Acta Biomater, 2024, 185: 429－440.

[4] Kloppenburg M, Namane M, Cicuttini F. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2025, 405(10472): 71－85.

[5] Shen J, Hong T, Li X. CircRNA HIPK2－mediated metabolic reprogramming restores mitochondrial homeostasis in chondrocytes through the miR－206/Sirt3 signaling axis attenuating osteoarthritis－induced nociception[J]. Inflammopharmacology, 2026, 34(2): 1139－1158.

[6] Guan S Q, Mei Y F. Biomechanics and obesity in osteoarthritis: from mechanism to precision medicine[J]. Int J Rheum Dis, 2026, 29(1): e70539.

[7] Lu F, Yu Y Y, Yin G R, et al. FSTL1 orchestrates metabolic－epigenetic crosstalk: glycolysis－dependent H3K18 lactylation drives cartilage fibrosis in osteoarthritis[J]. Adv Sci (Weinh), 2026, 13(8): e12002.

[8] Gao X, Liu H, Guo J M, et al. OGT regulates histone demethylation and alleviates osteoarthritis progression by O－GlcNAcylation of KDM6B[J]. J Adv Res, 2026: S2090－S1232(26)00003－2.

[9] Xu X, Xie J L, Li E L, et al. Lactylome－based investigation of osteoarthritic subchondral bone reveals cell－specific differential expression of histone H4K12 lactylation: an experimental study[J]. Int J Surg, 2026.

[10] Wei P J, Zhao Z Z, Xu R Q, et al. Blocking lysine crotonylation and aerobic glycolysis as targeting strategy against mpox virus replication[J]. Adv Sci (Weinh), 2026, 13(4): e09148.

[11] Liu Y, Song F, Guo Y L, et al. Crotonylation of STXBP1 exacerbates seizure susceptibility by impairing GABAergic synaptic transmission[J]. Cell Death Differ, 2026.

[12] Li L Z, Xiang T, Guo J J, et al. Inhibition of ACSS2－mediated histone crotonylation alleviates kidney fibrosis via IL－1β－dependent macrophage activation and tubular cell senescence[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3200.

[13] Di J K, Guo Z J, Di Y J, et al. Crotonylation - related gene GCDH promotes osteoarthritis pathogenesis through flavin adenine dinucleotide signaling: mechanism exploration and experimental validation [J]. Front Nutr, 2025, 12: 1646005.

[14] 李西海，刘献祥. 骨关节炎的核心病机：本痿标痹[J]. 中医杂志，2014，55(14)：1248 - 1249，1252.

[15] 刘献祥，郑春松，叶蕨芝，等. 透骨消痛胶囊防治骨性关节炎的化学空间分析[J]. 福建中医学院学报，2010，20(2)：16 - 18，27.

[16] 郑春松，林珠灿，许惠风，等. 透骨消痛胶囊治疗骨性关节炎的多向药理学研究[J]. 福建中医药大学学报，2011，21(1)：43 - 47.

[17] 郑春松，曾建伟，朱晓勤，等. 透骨消痛胶囊中 4 味中药水提物的红外光谱研究[J]. 福建中医药，2012，43(2)：46 - 47，52.

[18] 郑春松，叶蕨芝，李西海，等. 透骨消痛胶囊中补肾柔肝药和活血祛风药治疗骨关节炎作用方式的计算机模拟比较[J]. 中医正骨，2015，27(7)：6 - 10.

[19] Seedhom B B, Luo Z J, Goldsmith A J, et al. In - situ engineering of cartilage repair: a pre - clinical in - vivo exploration of a novel system[J]. Proc Inst Mech Eng H, 2007, 221(5): 475 - 488.

[20] 董苑，李彩霞，赵娴，等. 小鼠股骨缺损模型的构建及 SDF - 1 表达的检测[J]. 昆明医科大学学报，2020，41(5)：29 - 32.

[21] 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.

[22] 付长龙，罗雁，许佳佳，等. 透骨消痛胶囊调控 circFOXO3 缓解骨关节炎软骨细胞糖酵解代谢紊乱的作用机制[J]. 中国中药杂志，2025，50(16)：4641 - 4648.

[23] 付长龙，林艳铭，兰书洁，等. 透骨消痛胶囊调控 Malat1 与 miR - 16 - 5p 的 ceRNA 减轻骨关节炎软骨细胞“胆固醇 - 铁”代谢紊乱的机制[J]. 中国中药杂志，2025，50(15)：4363 - 4371.

[24] Kiepura A, Suski M, Stachyra K, et al. The influence of the FFAR4 agonist TUG - 891 on liver steatosis in ApoE - knockout mice[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2024, 38(4): 667 - 678.

[25] Song Y Y, Luengo - Gutierrez L, Sagi - Kiss V, et al. A glycolytic shunt via the pentose phosphate pathway is a metabolic checkpoint for nervous system sensory homeostasis and axonal regeneration[J]. Cell, 2026, 189(4): 1211 - 1227.

[26] Zhen J Z, Wan T H, Sun G X, et al. A ROS - responsive microsphere capsule encapsulated with NADPH oxidase 4 inhibitor ameliorates macrophage inflammation and ferroptosis[J]. Heliyon, 2024, 10(1): e23589.

[27] Lin H Y, He K X, Zhang S H, et al. Targeting G6PD to mitigate cartilage inflammation in TMJOA: The NOX4 - ROS - MAPK axis as a therapeutic avenue [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 139: 112688.

[28] Liu Q, Zhu F M, Liu X N, et al. Non - oxidative pentose phosphate pathway controls regulatory T cell function by integrating metabolism and epigenetics[J]. Nat Metab, 2022, 4(5): 559 - 574.

[29] Chen H, Wang J J, Niu C T, et al. Genetic strategies and mechanisms for improving ribonucleic acid levels of Saccharomyces pastorianus[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(33): 18552 - 18560.

收稿日期：2026 - 04 - 12
编辑：刘凯歌