·论著·

人乳铁蛋白通过HMGB1/TLR4信号通路减轻内质网应激介导的骨关节炎损伤

崔静，曹启辉，李丽莉，吉杰，覃裕
（北京积水潭医院贵州医院骨科，贵阳 550005）

摘要 目的 探究人乳铁蛋白（HLF）对人关节软骨细胞（HCC）的影响及HLF在大鼠关节炎中的作用机制。**方法** 采用CCK-8法检测不同浓度HLF（1~30 μg/mL）和白细胞介素-1β（IL-1β）（5~40 ng/mL）对HCC的毒性以确定后续实验浓度。细胞分为对照组（未处理）、模型组（IL-1β处理）和实验组（不同浓度HLF处理）。Western blotting检测HLF干预下HCC蛋白表达情况，并用内质网应激抑制剂（4-PBA）与高迁移率族蛋白B1（HMGB1）抑制剂（EP）验证HLF调节机制。采用实时定量PCR检测相关基因表达；EdU染色观察各组细胞增殖情况；用DCFH-DA荧光探针检测各组细胞内活性氧（ROS）水平。Lewis大鼠分为对照组（膝关节注射生理盐水）、模型组（膝关节注射IL-1β并PBS灌胃）和实验组（膝关节注射IL-1β并HLF灌胃）。通过甲苯胺蓝、番红-O-固绿及苏木素-伊红染色评估大鼠关节组织炎症变化；免疫组织化学分析各组大鼠关节组织中蛋白表达情况。**结果** HLF促进HCC增殖且呈剂量依赖性；低浓度（5、10 ng/mL）IL-1β不影响细胞活力，高浓度（20、30、40 ng/mL）IL-1β则抑制细胞增殖。选定5、10、20 μg/mL HLF和10 ng/mL IL-1β用于后续实验。细胞实验结果显示，与对照组相比，模型组细胞中HMGB1、Toll样受体4（TLR4）、前列腺相关基因蛋白（PAGE）、基质金属蛋白酶3（MMP3）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）及C/EBP同源蛋白（CHOP）的蛋白和mRNA表达均显著上调；同时细胞增殖抑制、ROS水平升高（均$P<0.05$）。经不同浓度HLF处理后，上述蛋白和基因的表达呈浓度依赖性下调，细胞增殖能力逐渐恢复，ROS水平明显降低（均$P<0.05$）。此外，加入4-PBA或EP亦可显著下调相关蛋白表达（均$P<0.05$）。动物实验结果显示，HLF改善关节炎大鼠关节组织病理状态并降低HMGB1、TLR4、MMP3和CHOP蛋白表达。**结论** HLF显著促进HCC增殖、抑制相关基因与蛋白表达、增强抗氧化能力；HLF对大鼠关节炎具有改善作用，其作用机制可能与抑制HMGB1/TLR4信号通路、减轻内质网应激及炎症反应有关。

关键词 人乳铁蛋白；HMGB1/TLR4信号通路；内质网应激；人关节软骨细胞；骨关节炎
中图分类号 R364 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646（2026）08-0734-08
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260716.1730.018
DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2026.08.010

Human lactoferrin alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated osteoarthritis injury via HMGB1/TLR4 signaling pathway

CUI Jing，CAO Qihui，LI Lili，JI Jie，QIN Yu
（Department of Orthopedics，Guizhou Hospital，Beijing Jishuitan Hospital，Guiyang 550005，China）

Abstract Objective To investigate the impact of human lactoferrin（HLF）on human articular chondrocytes（HCC）and elucidate the underlying mechanisms by which HLF exerts its effects on rat models for arthritis. **Methods** The CCK-8 assay was performed to assess the cytotoxicity of various concentrations of HLF，ranging from 1 to 30 μg/mL，and interleukin（IL）-1β，from 5 to 40 ng/mL，on chondrocytes，thereby establishing appropriate concentrations for subsequent experimental procedures. The cells were divided into the control group（without HLF and IL-1β），model group（with IL-1β alone），and experimental group（with IL-1β and different concentrations of HLF）. Western blotting was used to examine protein expression in HCC after HLF treatment. The regulatory mechanism of HLF was validated using the endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-PBA and high mobility group box 1（HMGB1）inhibitor EP. Real-time quantitative PCR was performed to quantify the expression levels of related genes. Cell proliferation was visualized using EdU staining. Intracellular reactive oxygen species（ROS）levels were measured using the DCFH-DA fluorescent probe. The rats were divided into the control group（knee joint injection with normal saline），model group（injection of IL-1β and PBS gavage），and experimental group（injection of IL-1β and gavage of HLF）. To evaluate articular tissue alterations in rat models for arthritis，histological staining methods，such as toluidine blue，saffron-O-fast green，and hematoxylin-eosin staining，were used. Immunohistochemistry was used to assess protein expression in the rat

基金项目：贵州省中医药科学技术项目（QZYY-2021-173）
作者简介：崔静（1984-），女，副主任医师，本科.
通信作者：覃裕，E-mail：69173077@qq.com
收稿日期：2025-04-25
网络出版时间：2026-07-17 13:11:46

joint tissues. **Results**　HLF promoted chondrocyte proliferation in a concentration-dependent manner. Specifically, low concentrations of IL-1β (5 and 10 ng/mL) had no significant impact on cell viability, whereas higher concentrations (20, 30, and 40 ng/mL) inhibited cell proliferation. Based on these findings, concentrations of 5, 10, and 20 μg/mL HLF, along with 10 ng/mL IL-1β, were selected for further investigation. According to the cell experiment results, compared with the control group, the protein and mRNA expression levels of HMGB1, Toll-like receptor 4 (TLR4), prostate-associated gene protein (PAGE), matrix metalloproteinase 3 (MMP3), tumor necrosis factor (TNF)-α, and C/EBP homologous protein (CHOP) were significantly upregulated in the model group (all $P < 0.05$). Cell proliferation was inhibited, and ROS levels increased. After treatment with different concentrations of HLF, the expression of the above-mentioned proteins and mRNA was downregulated in a concentration-dependent manner, cell proliferation gradually recovered, and ROS levels significantly decreased (all $P < 0.05$). In addition, treatment with 4-PBA or EP significantly downregulated the expression of related proteins (all $P < 0.05$). The animal experiments showed that HLF improved the histopathological status of the knee joint and reduced the protein expression of HMGB1, TLR4, MMP3, and CHOP in the rats with osteoarthritis. **Conclusion**　HLF significantly promoted the proliferation of HCC, inhibited the expression of related genes and proteins, and enhanced the antioxidant capacity. HLF ameliorated arthritis in the rats. Its mechanism may be related to inhibition of the HMGB1/TLR4 signaling pathway and alleviation of endoplasmic reticulum stress and inflammatory responses.

Keywords　human lactoferrin; HMGB1/TLR4 signaling pathway; endoplasmic reticulum stress; human articular chondrocyte; osteoarthritis

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是常见的慢性关节疾病，其主要特征为关节软骨退化、滑膜炎症以及关节边缘骨赘形成，严重影响患者的生活质量。目前，OA的治疗手段包括药物治疗、物理疗法、手术干预等，但治疗效果往往有限，且存在不良反应和复发风险[1]。因此，深入探究OA的发病机制，寻找新的治疗靶点具有重要意义[2]。

内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）是细胞应对内外环境压力的一种重要反应机制，不仅影响细胞的正常生理功能，还通过激活信号通路调控细胞的生存、凋亡和炎症反应[3]。研究[4-5]显示，OA中ERS水平升高，且与软骨退变程度密切相关。高迁移率族蛋白B1（high mobility group box 1，HMGB1）正常情况下主要定位于细胞核内，参与DNA的稳定与修复[6]。然而，在OA等病理状态下，HMGB1可被释放至细胞外，通过与晚期糖基化终末产物受体（receptor for advanced glycation end products，RAGE）、Toll样受体（Toll-like receptors，TLR）等受体结合，激活核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）等信号通路，促进炎症因子释放和细胞凋亡，加剧OA的炎症反应和软骨破坏[7]。人乳铁蛋白（human lactoferrin，HLF）具有显著的抗菌、抗病毒、抗氧化和免疫调节活性[8-10]。研究[11]表明，HMGB1与TLR4结合后激活NF-κB信号通路导致OA软骨退化和滑膜炎等免疫炎症反应。本研究探讨HLF对人关节软骨细胞（human articular chondrocyte，HCC）的影响及HLF在大鼠关节炎中的作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验细胞与动物

HCC购自武汉普诺赛生命科技有限公司，于37 ℃、5%CO_2细胞培养箱，使用RPMI 1640培养基（含10% 胎牛血清，1%青霉素-链霉素双抗）培养。24只6~8周龄，体重200~250 g的Lewis大鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK（沪）2022-0004]。大鼠于25 ℃，50%湿度，饲料和水充足的动物房中饲养。所有动物实验操作经我院实验动物伦理委员会批准[（2024）伦审第（48）号]。

1.2　主要材料与仪器

HLF（S-L4894）购自美国Sigma-Aldrich公司；重组人白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β；GS4361，纯度>97%）和重组鼠IL-1β（JN0342，纯度>95%），4-PBA（HY-A0281）和EP（HY-Y1362）购自美国MedChem Express生物科技公司；CCK-8试剂（C0037）、RNA提取试剂盒（R0017S）、EdU-555细胞增殖检测试剂盒（C0075S）和活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（S0033S）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；甲苯胺蓝（toluidine blue，TB；G1032）、番红-O-固绿（safranin O-fast green，SOFG；G1053）复合染色和苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE；G1005）染料购自武汉赛维尔生物科技有限公司；HMGB1

(10829-1-AP)、TLR4(19811-1-AP)、前列腺相关基因蛋白(prostate-associated gene protein,PAGE;11961-1-AP)、基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3,MMP3;17873-1-AP)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α,TNF-α;17590-1-AP)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein,CHOP;15204-1-AP)、β-actin(66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司。酶标仪、荧光显微镜、抗原修复仪和切片机购至美国ThermoFisher Scientific公司;垂直电泳仪、显影仪和qPCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.3　方法

1.3.1　CCK-8法检测细胞活力:将处于对数生长期的细胞悬液按照5×10^4/mL接种于96孔板,每孔加入适量细胞,在培养箱中培养至细胞贴壁。设置实验组与对照组,实验组加入不同浓度(1、5、10、20、30 μg/mL) HLF或不同浓度(5、10、20、30、40 ng/mL) IL-1β溶液,对照组加入等体积培养基,继续培养48 h加入CCK-8试剂。孵育结束后使用酶标仪测定各孔在450 nm波长下的吸光度(optical density,OD)值,根据OD值计算细胞存活率。细胞存活率(%) = [($OD_{实验组}-OD_{对照组}$)/($OD_{对照组}-OD_{空白组}$)]×100。

1.3.2　Western blotting检测:将细胞按照5×10^5/mL接种于6孔板,细胞贴壁后加入IL-1β(10 ng/mL)诱导24 h,构建OA软骨细胞模型,之后加入不同浓度HLF作用于软骨细胞48 h,收集总蛋白,进行SDS-PAGE电泳分离蛋白,转膜至PVDF膜。封闭后加入一抗孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育。最后用ECL显色或化学发光成像系统检测蛋白条带。抑制剂验证实验中,提前加入4-PBA或EP预处理4 h,再加入IL-1β(10 ng/mL)诱导24 h,之后加入不同浓度HLF作用于软骨细胞48 h,收集总蛋白进行检测。

1.3.3　实时定量PCR检测:按照1.3.1方法处理细胞,提取细胞RNA并检测浓度与纯度,保证A_{260}/A_{280}为1.8~2.0。然后RNA反转录为cDNA,灭活反转录酶后配制含cDNA模板、引物、荧光试剂等的反应体系,进行预变性(95 ℃,2 min)、变性(95 ℃,20 s)、退火(55 ℃,20 s)与延伸(70 ℃,20 s),45个循环。最后依据扩增曲线与熔解曲线,以*β-actin*为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

1.3.4　EdU染色检测细胞增殖:按照1.3.1方法处理细胞,向每孔加入EdU溶液,继续孵育2 h。弃去培养基,用4%多聚甲醛固定细胞30 min,PBS洗涤,以0.3% Triton X-100通透处理10 min。PBS洗涤后,每孔加入Click反应液,室温避光孵育30 min。PBS洗涤,Hoechst 33342染核10 min。增殖细胞呈现红色荧光,荧光显微镜下观察并拍照。

表1　引物序列

Tab.1　Primer sequence

Gene	Primer sequence(5'-3')	Length(bp)
HMGB1	Forward:TCAAAGGAGAACATCCTGGCCTGT	24
	Reverse:CTGCTTGTCATCTGCAGCAGTGTT	24
TLR4	Forward:AGCATTTACCTCTGATAACAAGAAC	25
	Reverse:AGTTGGTAGCCAAGATAAATGAC	23
TNF-α	Forward:ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA	20
	Reverse:TGGAAGACTCCCTCCCAGGTA	21
CHOP	Forward:GGAGCTGGAAGCCTGGTATG	20
	Reverse:GCAGGGTCAAGAGTGGTGAA	20
β-actin	Forward:CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	20
	Reverse:GCTGTCACCTTCACCGTTCC	20

1.3.5　DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS水平:按照1.3.1方法处理细胞,以无血清培养液按1 ∶ 1 000稀释DCFH-DA,每孔加入100 μL稀释液,37 ℃孵育20 min。PBS洗涤后,每孔加入100 μL无血清培养液,加入阳性对照Rosup刺激细胞30 min。在荧光显微镜下观察并拍照,检测激发波长488 nm、发射波长525 nm处的荧光强度来表示细胞内ROS水平。

1.3.6　关节炎大鼠模型建立和分组:腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠。将重组大鼠IL-1β(0.5 μg/μL,50 μL)从膝关节一侧缓慢注入关节腔内,避

免损伤关节软骨和周围组织，持续1周，大鼠出现活动受限、跛行、关节肿胀等症状，表明关节炎大鼠模型成功建立。24只大鼠随机均分为4组：对照组（注射等体积生理盐水）、模型组（注射IL-1β并灌胃2 mL PBS）、低剂量组（注射IL-1β并灌胃5 mg/mL HLF）和高剂量组（注射IL-1β并灌胃10 mg/mL HLF），灌胃1次/d，连续7 d。处死大鼠后取关节组织，固定、石蜡包埋后切片备用。

1.3.7　组织染色：（1）HE染色，切片入苏木素染液10 min，分化返蓝后入伊红染液3 min，常规脱水透明，中性树胶封片。（2）TB染色，切片入甲苯胺蓝染液10 min，水洗、脱水透明后封片。（3）SOFG染色，切片入苏木素染液5 min，水洗分化；入固绿染液5 min，快速水洗；入番红-O染液10 min，快速脱水透明后封片。在光学显微镜下采集染色图像，采用ImageJ软件测量软骨厚度。

1.3.8　免疫组织化学检测：取各组大鼠关节组织切片，依次滴加HMGB1、TLR4、MMP3和CHOP蛋白一抗，4 ℃孵育过夜，洗片后加二抗，室温孵育，再经显色剂显色。显微镜下每张切片随机选取3个高倍视野（400倍），采用ImageJ进行半定量分析。

1.4　统计学分析

使用SPSS.27.0软件进行数据分析，符合正态分布的数据以$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较使用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD检验。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　不同浓度HLF和IL-1β对HCC的影响

CCK-8法检测结果显示，HLF可促进细胞增殖，并呈浓度依赖性；低浓度IL-1β（5、10 ng/mL）不影响细胞活力，高浓度IL-1β（20、30、40 ng/mL）则抑制细胞增殖。见图1。因此，选定5、10、20 μg/mL HLF和10 ng/mL IL-1β用于后续实验。

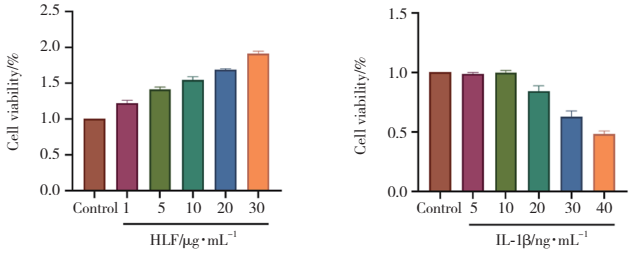


图1　不同浓度HLF和IL-1β对HCC的作用

Fig.1　Effect of different concentrations of HLF and IL-1β on HCC cells

2.2　HLF对HCC中HMGB1/TLR4信号通路、炎症和ERS相关蛋白表达的影响

结果显示，与对照组比较，模型组细胞中HMGB1、TLR4、PAGE、MMP3、TNF-α及CHOP蛋白表达均显著上调（$P < 0.000\ 1$）；经不同浓度（5、10、20 μg/mL）HLF干预后，上述蛋白表达水平随HLF浓度增加呈显著下调趋势。此外，分别加入ERS抑制剂4-PBA与HMGB1抑制剂EP处理后，HMGB1、TLR4、PAGE、MMP3、TNF-α及CHOP蛋白表达水平相较于模型组显著降低（$P < 0.05$）。见图2。

2.3　HLF对HCC中HMGB1/TLR4信号通路、炎症和ERS相关基因表达的影响

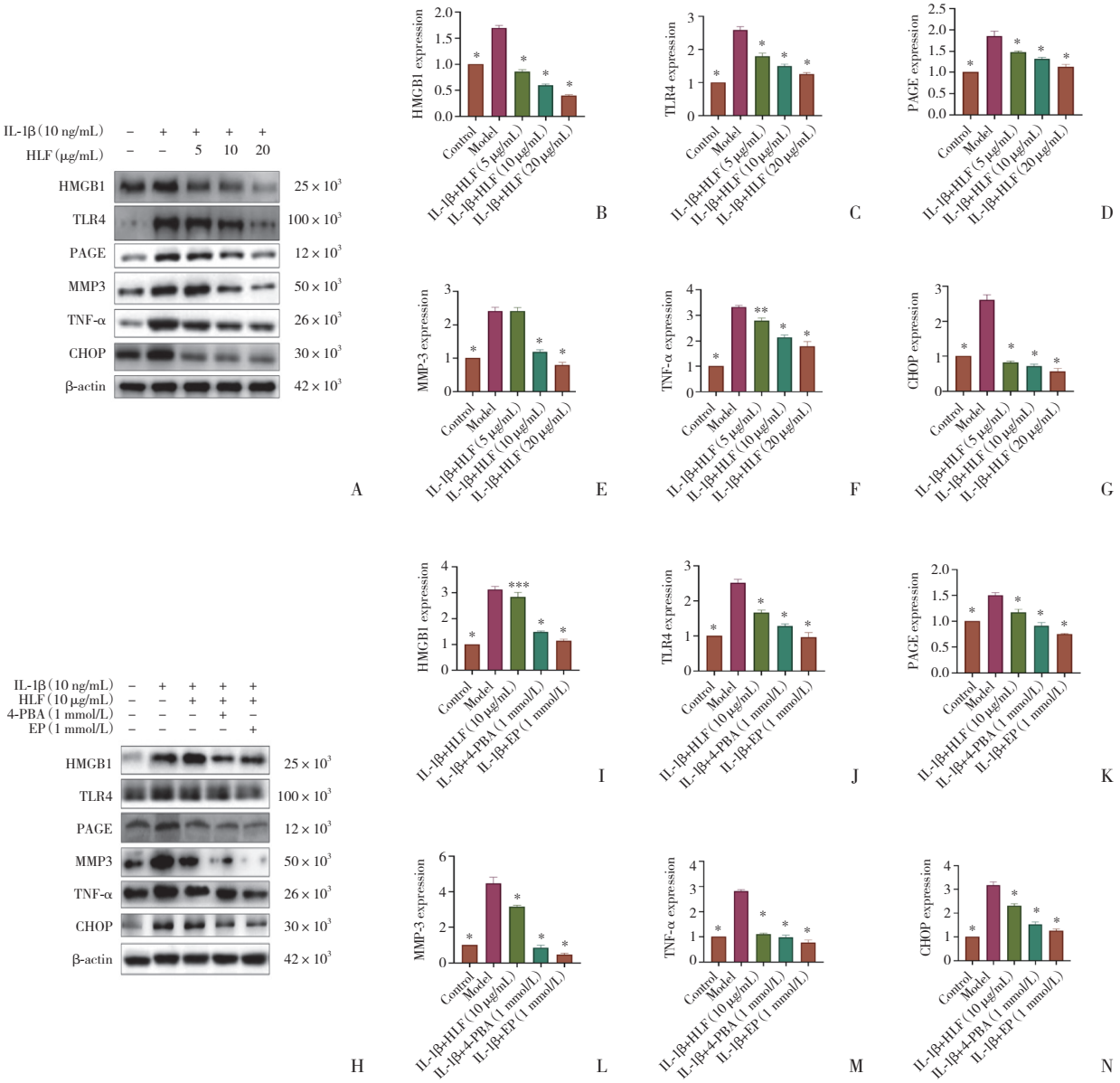
结果显示，与对照组比较，模型组*HMGB1*、*TLR4*、*TNF-α*、*CHOP* mRNA表达上调（均$P < 0.05$），表明模型组相关通路及应激反应处于激活状态。而经过HLF处理后，*HMGB1*、*TLR4*、*TNF-α*、*CHOP* mRNA表达水平呈现浓度依赖性下调趋势，与模型组比较，差异均有统计学意义（均$P < 0.05$）。见图3。

2.4　HLF对HCC增殖的影响

结果显示，在IL-1β的作用下，模型组HCC增殖受到了抑制。HLF处理后HCC增殖能力逐渐恢复，且随着HLF浓度升高，增殖能力呈现递增趋势。见图4。

2.5　HLF对HCC抗氧化能力的影响

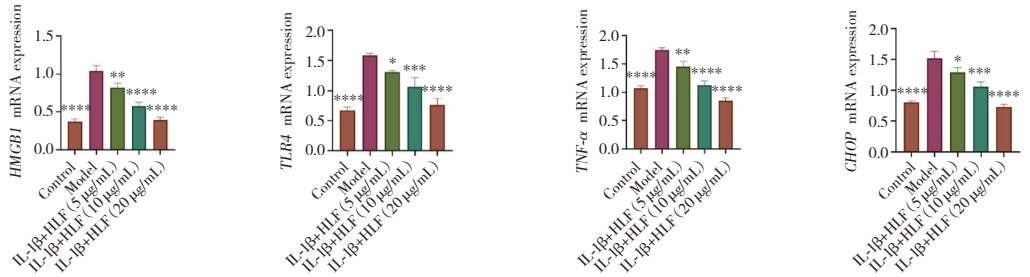
结果显示，与对照组比较，模型组HCC细胞内ROS水平显著升高（$P < 0.05$），表明细胞氧化应激增强。而HLF处理后HCC细胞内ROS水平明显下降，并且呈现出浓度依赖性，与模型组比较，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。见图5。



A, effects of different concentrations of HLF on HMGB1, TLR4, PAGE, MMP3, TNF-α, and CHOP protein expression; B–G, quantitative analysis of protein expressions; H, EP and 4-PBA were added to verify the mechanism of HLF effect on protein expressions. I–N, quantitative analysis of protein expressions. *$P < 0.000\,1$, **$P < 0.001$, *** $P < 0.05$ vs. model group.

图2　HLF对HCC中HMGB1/TLR4信号通路、炎症和ERS相关蛋白的影响

Fig.2　Effects of HLF on HMGB1/TLR4 signaling pathway, inflammation, and ERS-related proteins in HCC



*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.000\,1$ vs. model group.

图3　HLF对HCC中HMGB1/TLR4信号通路、炎症和ERS相关基因的影响

Fig.3　Effects of HLF on HMGB1/TLR4 signaling pathway, inflammation, and ERS-related genes in HCC

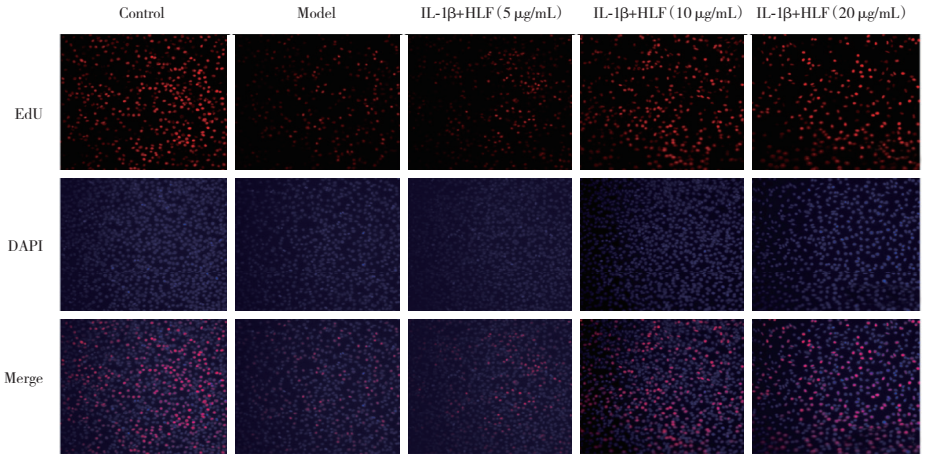
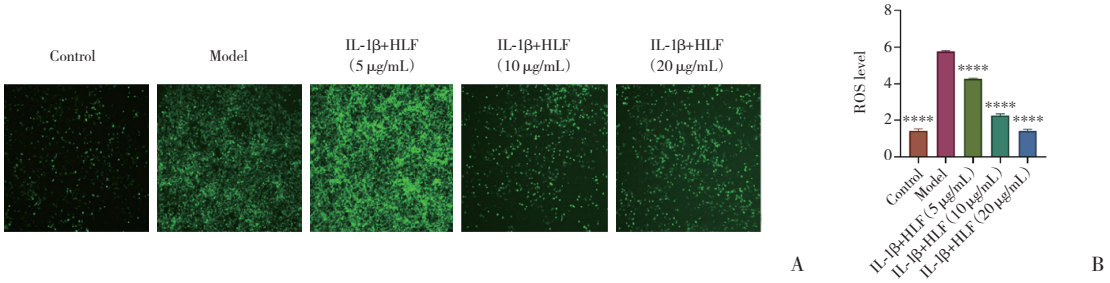


图4　EdU染色检测HLF对HCC增殖的影响 ×200

Fig.4　Effect of HLF on HCC proliferation by EdU staining ×200



A, ROS level in cells of different groups (×200); B, quantitative analysis of ROS level. ****$P < 0.000\ 1$ vs. model group.

图5　HLF对HCC细胞内ROS水平的影响

Fig.5　Effect of HLF on the ROS levels in HCC

2.6　组织染色检测HLF对大鼠膝关节炎症的影响

结果显示，对照组，模型组、低剂量组和高剂量组大鼠软骨厚度分别为(120.5 ± 10.2)μm、(48.3 ± 8.7)μm、(72.1 ± 9.5)μm和(103.6 ± 10.8)μm。与对照组相比，模型组骨组织中酸性糖胺聚糖含量显著降低、细胞排列严重紊乱，炎症细胞浸润明显，骨厚度明显减少($P < 0.05$)。经HLF治疗后，大鼠骨组织中酸性糖胺聚糖含量显著增加且分布趋于均匀，细胞排列整齐有序，炎症细胞浸润减少，软骨厚度增加，与模型组比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图6。

2.7　HLF对大鼠膝关节组织中蛋白表达的影响

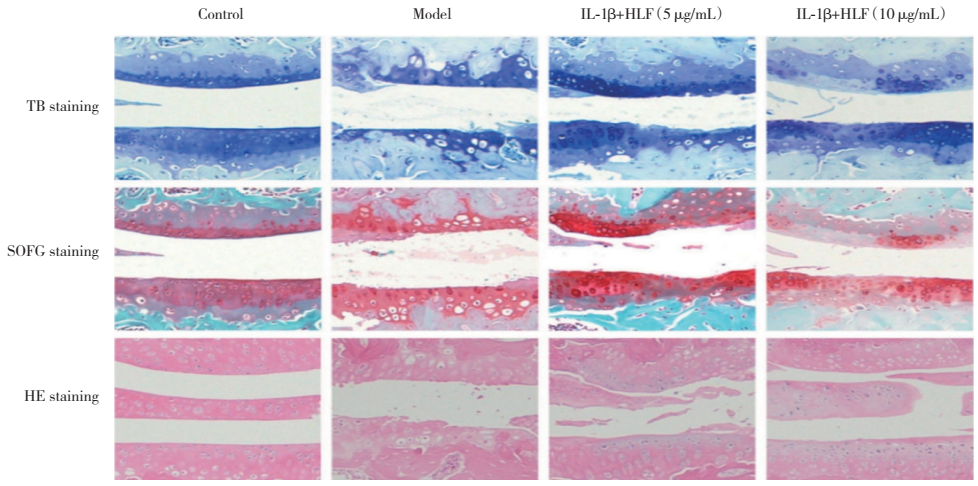
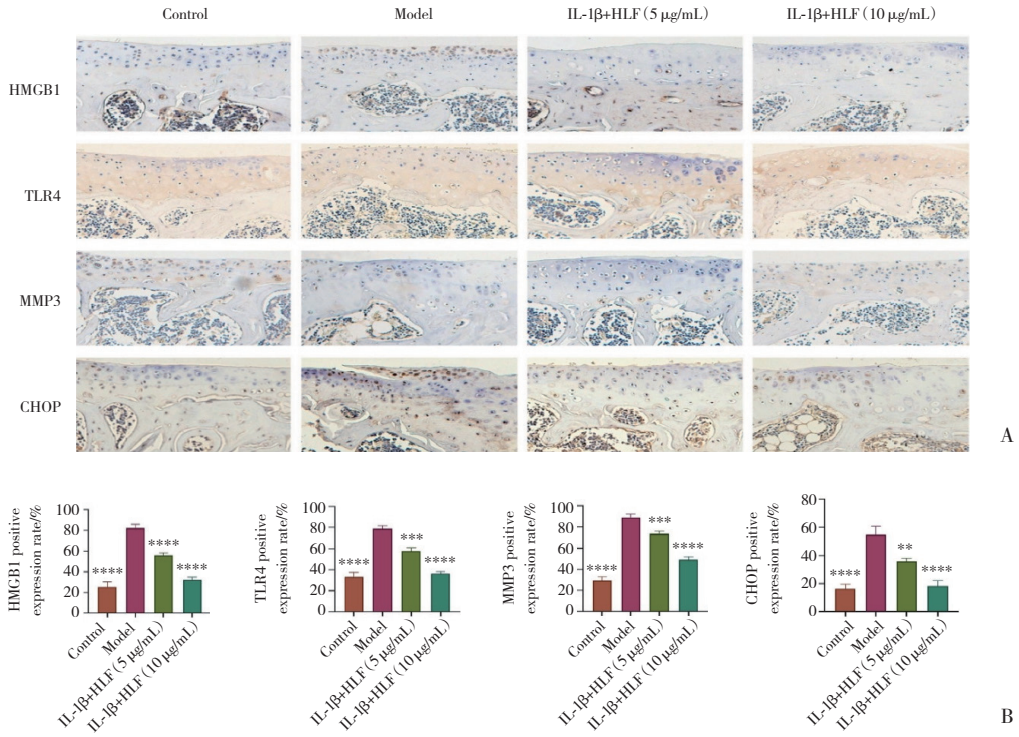


图6　HLF对大鼠膝关节炎症的影响 ×200

Fig.6　Effect of HLF on inflammation in knee joint of rats ×200

免疫组织化学检测结果显示，与对照组比较，模型组大鼠膝关节组织中HMGB1、TLR4、MMP3以及CHOP阳性表达显著升高（$P < 0.05$）。表明关节炎发病过程中相关信号通路及细胞应激处于异常激活状态。经过不同浓度HLF处理后，HMGB1、TLR4、MMP3和CHOP阳性率表达均显著下调，与模型组比较，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。见图7。



A，immunohistochemistry results of HMGB1，TLR4，MMP3 and CHOP in rat joint tissues（×200）；B，quantification results of proteins. $^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.000\ 1$ vs. model group.

图7　各组大鼠膝关节组织中HMGB1、TLR4、MMP3和CHOP蛋白表达

Fig.7　Expression of HMGB1，TLR4，MMP3，and CHOP proteins in knee joint tissues of each group

3　讨论

本研究探讨了HLF与IL-1β对HCC和大鼠膝关节炎症的影响及作用机制。结果显示，HLF促进细胞增殖且呈浓度依赖性。这表明HLF在一定浓度范围内可作为HCC增殖的促进因子，可能在关节炎相关的软骨细胞生理或病理过程中发挥着重要的调节作用，对维持软骨细胞数量或功能有着潜在的影响[12]。低浓度IL-1β（5、10 ng/mL）不影响细胞活力，高浓度（20、30、40 ng/mL）抑制细胞增殖[13]。据此选定5、10、20 μg/mL HLF和10 ng/mL IL-1β进行后续研究。

本研究结果显示，模型组中HMGB1/TLR4信号通路相关蛋白MMP3、TNF-α以及CHOP在蛋白和基因水平均显著上调。表明这些蛋白所涉及的通路及反应处于活跃状态，可能与关节炎软骨细胞的炎症反应、细胞外基质代谢紊乱以及细胞应激损伤等病理过程密切相关[14-15]。经不同浓度HLF处理后，上述蛋白均显著降低且呈浓度依赖性。使用ERS抑制剂4-PBA与HMGB1抑制剂EP进行验证，发现处理后相关蛋白表达同样下调。这证实了HLF对HCC的调控与HMGB1/TLR4信号通路、ERS以及炎症反应紧密相关，提示HLF可能通过干预这些关键通路和反应来减轻关节炎导致的软骨损伤。此外，HLF处理后软骨细胞增殖能力恢复，呈浓度依赖性，说明HLF具有促进增殖的作用，且其促增殖效应随浓度增加而增强。已有研究[16]显示HLF可能在关节炎损伤情况下有助于促进软骨细胞的再生与修复，恢复关节软骨的正常结构与功能，与本研究结果一致。

本研究结果显示，IL-1β诱导HCC内ROS水平显著升高。这表明IL-1β可引发HCC的氧化应激反应[17]。HLF处理后ROS水平明显下降且呈浓度依赖性，说

明HLF具备抗氧化能力，能够有效降低HCC细胞内氧化应激水平，从而减轻氧化损伤[18]。组织染色结果显示，与对照组相比，模型组关节组织中酸性糖胺聚糖含量显著降低、细胞排列严重紊乱、炎症细胞浸润明显且软骨厚度减少，说明关节组织发生了严重的病理改变。经HLF治疗后大鼠膝关节组织中酸性糖胺聚糖含量显著增加且分布均匀、细胞排列整齐、炎症反应轻微，软骨厚度增加，表明HLF对大鼠关节炎具有明显的修复和改善作用，与以往研究[19]一致。

免疫组织化学检测结果显示，与对照组比较，模型组大鼠关节组织中HMGB1、TLR4、MMP3和CHOP阳性表达显著增加，说明在关节炎发病过程中，相关信号通路及细胞应激处于异常激活状态，这些蛋白高表达可能通过促进炎症反应、细胞外基质降解和细胞应激损伤等机制导致关节炎症和组织损伤加重；经不同浓度HLF处理后，大鼠关节组织中这些蛋白阳性表达均显著下调（$P < 0.05$），说明HLF对关节炎相关的关键信号通路和蛋白表达具有抑制性调控作用，与以往研究[20-21]结果一致。

综上所述，HLF可浓度依赖性促进HCC增殖，降低ROS水平；改善关节炎大鼠关节组织病理状态，其作用可能与抑制HMGB1/TLR4信号通路、ERS及炎症反应激活有关。本研究为基于HLF的关节炎治疗策略开发提供了依据。然而本研究仅就一种细胞和大鼠进行实验，样本选择局限，且未对HLF长期作用效果及潜在不良反应进行评估，今后需进一步论证。

参考文献：

[1] WANG XJ，HE WT，HUANG H，et al. Recent advances in hydrogel technology in delivering mesenchymal stem cell for osteoarthritis therapy [J]. Biomolecules，2024，14 (7)：858. DOI：10.3390/biom14070858.

[2] 邓刚，朱立新，郭家松，等. 中药小分子治疗骨关节炎的研究进展 [J]. 实用医学杂志，2024，40 (23)：3389-3393. DOI：10.3969/j.issn.1006-5725.2024.23.018.

[3] 温海玲，孟祥熙，杨景哲，等. 马钱苷通过内质网应激途径抑制烧伤大鼠肠上皮细胞凋亡发挥肠黏膜结构保护作用的机制 [J]. 实用医学杂志，2022，38 (11)：1353-1358. DOI：10.3969/j.issn.1006-5725.2022.11.010.

[4] YU CB，ZHANG ZX，XIAO L，et al. IRE1α pathway：a potential bone metabolism mediator [J]. Cell Prolif，2024，57 (10)：e13654. DOI：10.1111/cpr.13654.

[5] LI RZ，SUN K. Regulation of chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Stress Chaperones，2024，29 (6)：750-763. DOI：10.1016/j.cstres.2024.11.001.

[6] 孙兴翔，孔令俊，邓叶龙，等. HMGB1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 (9)：1372-1376，1399.

[7] 齐鑫，张晓刚，于海洋，等. HMGB1在调节骨关节炎软骨细胞功能中的作用机制 [J]. 协和医学杂志，2024，15 (1)：141-146. DOI：10.12290/xhyxzz.2023-0269.

[8] ZHANG YQ，LU C，ZHANG J. Lactoferrin and its detection methods：a review [J]. Nutrients，2021，13 (8)：2492. DOI：10.3390/nu13082492.

[9] 徐俊峰，徐婉君，董艳蓉，等. 乳铁蛋白治疗牙周炎的炎症免疫机制研究 [J]. 中国现代应用药学，2023，40 (15)：2086-2092. DOI：10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223405.

[10] KAPLAN M，BAKTıROĞLU M，KALKAN AE，et al. Lactoferrin：a promising therapeutic molecule against human papillomavirus [J]. Nutrients，2024，16 (18)：3073. DOI：10.3390/nu16183073.

[11] 谢兴文，陈欣，刘建军，等. HMGB1介导TLR4/NF-κB信号通路干预骨关节炎研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志，2023，29 (10)：1519-1522，1527.

[12] 皮冰冰，赵晓，吕萍萍，等. 不同来源乳铁蛋白及乳铁蛋白素对小鼠脾淋巴细胞增殖影响的比较 [J]. 食品科学，2018，39 (13)：184-189. DOI：10.7506/spkx1002-6630-201813027.

[13] WANG XX，ZHANG J，JI J. IL-1β-induced pentraxin 3 inhibits the proliferation，invasion and cell cycle of trophoblasts in preeclampsia and is suppressed by IL-1β antagonists [J]. Mol Med Rep，2022，25 (4)：115. DOI：10.3892/mmr.2022.12631.

[14] 李烨，汤洁，胡勇，等. 单体化合物富马酸二甲酯通过JAK2/STAT3信号通路抑制骨关节炎软骨细胞的炎症反应 [J]. 现代免疫学，2023，43 (4)：312-317.

[15] ZHOU RP，DAI BB，XIE YY，et al. Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α augment acidosis-induced rat articular chondrocyte apoptosis via nuclear factor-kappaB-dependent upregulation of ASIC1a channel [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864 (1)：162-177. DOI：10.1016/j.bbadis.2017.10.004.

[16] NOPIA H，KURIMOTO D，SATO A. Albumin fusion with human lactoferrin shows enhanced inhibition of cancer cell migration [J]. Biometals，2023，36 (3)：629-638. DOI：10.1007/s10534-022-00447-9.

[17] 李宁博，骆晓飞，尹夏，等. 杜仲多糖通过抑制NF-κB通路减轻IL-1β诱导的软骨细胞损伤 [J]. 中国骨伤，2022，35 (7)：661-668. DOI：10.12200/j.issn.1003-0034.2022.07.013.

[18] 江彬，高梓珊，余芝，等. 基于ROS-NLRP3通路探讨麦粒灸治疗佐剂性关节炎大鼠的作用及机制 [J]. 南京中医药大学学报，2023，39 (6)：548-556. DOI：10.14148/j.issn.1672-0482.2023.0548.

[19] 舒克钢，劳方毅，黄祖权，等. 芦荟苷体内外对大鼠骨关节炎模型的炎症抑制效应 [J]. 免疫学杂志，2021，37 (5)：425-432. DOI：10.13431/j.cnki.immunol.j.20210059.

[20] 王远兴，张飞，王涛，等. 含WW结构域的转录因子1对软骨细胞合成和分解代谢的调控作用 [J]. 中华实验外科杂志，2024，41 (7)：1409-1412. DOI：10.3760/cma.j.cn421213-20230818-00081.

[21] 赵琳，云振宇，吴希，等. 硫酸软骨素钠的制备及抗骨关节炎活性研究进展 [J]. 医药导报，2024，43 (6)：916-925. DOI：10.3870/j.issn.1004-0781.2024.06.012.

（编辑　武玉欣）