

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003818

毛蕊异黄酮减轻 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞炎症损伤和纤维化王 枫, 李智斌, 孙智平, 李文雄, 肖 振  
(陕西中医药大学附属医院创伤二病区, 西安 712000)

**【摘要】目的:**探究毛蕊异黄酮在软骨细胞炎症损伤和软骨分化进程中的作用, 以为软骨损伤相关疾病的治疗提供理论基础和可用药物证据。**方法:**碘乙酸用于骨关节炎(osteoarthritis, OA)小鼠模型的制备并从构建的 OA 模型小鼠中分离骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs); 白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )用于诱导 ATDC5 软骨细胞炎症损伤; 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞中炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的水平; 商业试剂盒检测细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 流式细胞术检测细胞凋亡水平; 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞活力; 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和 Western blot 检测细胞中成软骨标志物、肥大型软骨标志物、纤维化软骨标志物和成骨标志物的表达。**结果:**与对照组相比, 毛蕊异黄酮干预组细胞活力和细胞凋亡水平无显著差异( $P>0.05$ )。IL-1 $\beta$  处理后细胞活力显著降低( $P<0.05$ ), IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量显著上调( $P<0.05$ ), ROS 水平显著升高( $P<0.05$ )。经毛蕊异黄酮处理后, 细胞活力显著升高( $P<0.05$ ), IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量显著降低( $P<0.05$ ), ROS 水平显著降低, 且呈浓度依赖性( $P<0.05$ )。IL-1 $\beta$  处理后 Collagen II、SOX9 和 Aggrecan 的表达降低( $P<0.05$ ), Collagen X 和 MMP-13 和 Collagen I 和 Collagen III 表达升高( $P<0.05$ )。毛蕊异黄酮进一步处理后, Collagen II、SOX9 和 Aggrecan 的表达显著升高( $P<0.05$ ), Collagen X 和 MMP-13 和 Collagen I 和 Collagen III 表达显著降低。与对照组相比, OA 组小鼠 BMSCs 中 ALP 和 RUNX2 表达显著下调( $P<0.05$ ), 肥大型软骨标志物表达显著升高( $P<0.05$ )。毛蕊异黄酮处理后, 病理学改变有所缓解, 且 BMSCs 中成软骨化标志物和成骨标志物表达显著上调( $P<0.05$ ), 肥大型软骨标志物表达显著降低( $P<0.05$ )。**结论:**毛蕊异黄酮减轻了 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞炎症反应, 降低了纤维化表型的表达, 并促进 BMSCs 的成软骨分化, 抑制成骨分化。

**【关键词】**毛蕊异黄酮; 骨关节炎; 软骨分化; 软骨细胞; 骨髓间充质干细胞

**【中图分类号】**R364.5

**【文献标志码】**A

Calycosin alleviates IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte inflammatory injury and fibrosis

Wang Feng, Li Zhibin, Sun Zhiping, Li Wenxiong, Xiao Zhen

(Trauma Ward 2 of The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine)

**【Abstract】Objective:** To investigate the role of calycosin in chondrocyte inflammatory injury and cartilage differentiation, and to provide a theoretical basis and available drugs for the treatment of cartilage injury-related diseases. **Methods:** Iodoacetic acid was used to establish a mouse model of osteoarthritis (OA), and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated from OA model mice. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was used to induce inflammatory injury of ATDC5 chondrocytes; ELISA was used to measure the levels of the inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in cells, and commercial kits were used to measure the level of reactive oxygen species (ROS) in cells; flow cytometry was used to measure the level of cell apoptosis; CCK-8 assay was used to measure cell viability; qRT-PCR and Western blot were used to measure the expression levels of chondrogenic markers, hypertrophic cartilage markers, fibrous cartilage markers, and osteogenic markers in cells. **Results:** There were no significant differences in cell viability and apoptosis level between the control group and the calycosin intervention group ( $P>0.05$ ). After IL-1 $\beta$  treatment, there was a significant reduction in cell viability ( $P<0.05$ ) and significant increases in the content of IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ) and the level of ROS ( $P<0.05$ ). After calycosin treatment, there was a significant increase in cell viability ( $P<0.05$ ) and significant reductions in the content of IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ) and the level of ROS ( $P<0.05$ ) in a concentration-dependent manner. After IL-1 $\beta$  treatment, there were significant reductions in the expression levels of Collagen II, SOX9, and Aggrecan ( $P<0.05$ ) and significant increases in the expression levels of Collagen X, MMP-13, Collagen I, and Collagen III ( $P<0.05$ ). After further treatment with calycosin, there were significant increases in the expression levels of Collagen II,

作者简介: 王 枫, Email: fengkingf@126.com,

研究方向: 中医骨伤科。

通信作者: 李智斌, Email: lizhibin2012@yeah.net。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250320.1628.010>

(2025-03-21)

SOX9, and Aggrecan ( $P < 0.05$ ) and significant reductions in the expression levels of Collagen X, MMP-13, Collagen I, and Collagen III. Compared with the control group, the OA group had significant reductions in the expression levels of ALP and RUNX2 in BMSCs ( $P < 0.05$ ) and significant increases in the expression levels of hypertrophic cartilage markers ( $P < 0.05$ ). The alleviation of pathological changes was observed after calycosin treatment, with significant increases in the expression levels of chondrogenic markers and osteogenic markers and significant reductions in the expression levels of hypertrophic cartilage markers in BMSCs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Calycosin alleviates inflammatory response of chondrocytes induced by IL-1 $\beta$ , reduces the expression of fibrotic phenotype, promotes the chondrogenic differentiation of BMSCs, and inhibits the osteogenic differentiation of BMSCs.

**[Key words]** calycosin; osteoarthritis; cartilage differentiation; chondrocyte; bone marrow mesenchymal stem cell

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是全球最常见的关节疾病之一, 其显著特征包括关节软骨的逐步退化、继发性滑膜炎和骨重建<sup>[1]</sup>。炎症相关分子, 尤其是白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), 在 OA 的病理生理学中起到了关键的作用<sup>[2]</sup>。目前, 临床上 OA 的治疗以手术和药物治疗为主。其中, 手术治疗主要针对重度关节炎患者, 而对于轻度及中度的 OA 患者, 主要采用药物治疗从而达到抗炎、消肿、止痛以及恢复关节功能的效果<sup>[3]</sup>。研究表明, 长期使用一些 OA 治疗药物会导致患者机体产生不良反应<sup>[4]</sup>, 因此, 全球对于补充和替代药物的接受度正在逐渐上升, 同时随着中药在 OA 中的应用不断增加, 从而使 OA 的中药治疗日益受到临床的关注。

毛蕊异黄酮主要来源于豆科植物, 特别是蒙古黄芪的干燥根。此外, 毛蕊异黄酮还存在于其他豆科植物中, 如黄芩和甘草等<sup>[5-6]</sup>。多项研究报道, 毛蕊异黄酮具有多种药理作用, 包括抗氧化、抗肿瘤、抗细胞凋亡、抗炎以及促进血管生成的特性<sup>[7-9]</sup>。研究表明, 毛蕊异黄酮对软骨炎性和损伤具有抑制作用<sup>[10-12]</sup>, 但毛蕊异黄酮在软骨分化过程中的作用研究却鲜有报道。因此本研究旨在探究毛蕊异黄酮在关节软骨分化进程中的作用, 以期能为软骨损伤相关疾病的治疗提供理论基础和可用药物证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 30 只 C57BL/6 雄性小鼠, 12 周龄, 24~26 g, 购于中国医学科学院医学实验动物研究所, 动物饲养于温度为 (22 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C, 相对湿度约 (39 $\pm$ 3)%, 12 h/12 h 昼夜交替的清洁环境中。本实验按伦理委员会关于实验动物饲养和使用的原则进行, 并审核通过。

1.1.2 细胞 ATDC5 小鼠成软骨细胞系由东北农业大学兽医外科教研室提供, 培养基为 DMEM/F12, 于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。

1.1.3 主要试剂 毛蕊异黄酮 (纯度: 98%, 上海户实医药科技有限公司); 1% 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠培养基补充剂 (ITS) (美国 Sigma, 货号: 11074547001); 10% 胎牛血清 (以色列 BI, 货号: 04-010-1A); DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco, 货号: SH3002302); 胰蛋白酶-EDTA (美国 Thermo Fisher, 货号: 25200114); PBS (中国索莱宝, 货号: P1020); ECL 化学发光试剂盒 (中国 Vazyme, 货号: E423-01/02); trizol 试剂 (Invitrogen 公司, 批号: 15596026); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, 批号: K1621); 1% 青霉素-链霉素-CCK8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、脱脂奶粉和 SDS-PAGE 凝胶超快速配制试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: ST448S、C0038、P0013C、P0011、P0216 和 P0690); Collagen I 抗体、Collagen II 抗体、Collagen III 抗体、Collagen X 抗体和  $\beta$ -actin 抗体 (北京博奥森生物科技有限公司, 货号: bsm-52478R、bs-10589R、bsm-33129M、bs-0554R 和 bsm-33036M); Aggrecan 抗体、SOX9 抗体、MMP-13 抗体和 RUNX2 抗体 (Abcam, 英国, 货号: ab3778、ab185966、ab39012 和 ab236639); ALP 抗体 (上海康朗生物科技有限公司, 货号: kl472Mu01); 山羊抗小鼠-IgG 抗体 (北京 Lablead 公司, 货号: S0100); ROS 检测试剂盒 (上海翌圣生物科技股份有限公司, 货号: 50101ES01); ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号: E-EL-M0044c、E-EL-M3063)。

1.1.4 主要仪器 双目正置荧光显微镜 (BX-51, 日本奥林巴斯); 蛋白电泳装置 (Mini-PROTEAN Tetra 型, 美国 Bio-Rad 公司); 全波长酶标仪 (EPOCH 型, 美国 BioTek 公司); 化学发光凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS, 美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 BD 公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台 (苏净安泰公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及处理 将小鼠随机分为对照组、模型 (OA) 组和药物处理 (OA+毛蕊异黄酮) 组, 每组 10 只。给药方式参考钟宇辰等<sup>[13]</sup>方法进行小鼠 OA 模型制备及药物处理: 模型组和 (OA+毛蕊异黄酮) 组小鼠给予戊巴比妥钠麻醉后剔除右侧膝关节处毛发, 将 0.2 mg 碘乙酸溶于 10  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液中注入膝关节腔; 随后, 模型组小鼠给予 1 mL/d 生理盐水灌胃, (OA+毛蕊异黄酮) 组灌胃毛蕊异黄酮 200 mg/(kg $\cdot$ d), 均持续 4 周; 对照组小鼠制备 OA 假模型: 给予戊巴比妥钠麻醉后剔除右侧膝关节处毛发, 膝关节腔注入 10  $\mu$ L 磷酸盐缓

冲液,并给予 1 mL/d 生理盐水灌胃,持续 4 周。4 周后小鼠脱颈处死,浸入 75% 乙醇 5 min、转置无菌培养皿中,以便后续实验。

1.2.2 BMSCs 的获取及处理 从经药物和手术处理的小鼠双侧髌白处离断双下肢,待分离后先后在 75% 乙醇、无菌 PBS 中充分漂洗 3 次,每次 5 min;剔除股骨、胫骨上肌肉及结缔组织。用无菌剪分离股骨及胫骨、剪去骨髓并暴露骨髓腔。用 1 mL 无菌针头插入骨髓腔中,用骨髓间充质干细胞培养基缓慢冲洗,将含有红色骨髓细胞的骨髓冲洗液置于培养皿中,此部分方法参考前人研究<sup>[14]</sup>。将收集的细胞悬液用 70  $\mu$ m 孔径滤网过滤后置于加入 1 mL 骨髓间充质干细胞培养基的 6 孔培养板中,放入 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。24 h 后更换培养基去除未贴壁细胞;每 48~96 h 更换 1 次培养基。试验分为对照组、OA 组、OA+毛蕊异黄酮组。

1.2.3 ATDC5 细胞培养及分组 将 ATDC5 细胞置于 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养,并配制含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 1% ITS 的 DMEM/F12 培养基。在细胞达到 80% 融合时,用胰蛋白酶-EDTA 消化细胞传代。添加 ITS 诱导 ATDC5 细胞分化为软骨细胞<sup>[15]</sup>。试验分为对照组、IL-1 $\beta$  组 (10 ng/mL)、IL-1 $\beta$ +毛蕊异黄酮组。

1.2.4 细胞凋亡的检测 选取处理后的对数生长期细胞,采用预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 500  $\mu$ L PBS 重悬,加入 5  $\mu$ L 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和 5  $\mu$ L 碘化丙啶,室温孵育 10 min,然后采用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 细胞活力的检测 将对数期的细胞接种于 96 孔板 (1 $\times$ 10<sup>7</sup> 个/L),24 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,2 h 后用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。每个样本 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.6 qRT-PCR 采使用 Trizol 试剂提取细胞中的总 RNA 并测量其纯度和浓度。随后,根据说明书使用逆转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。以  $\beta$ -actin 为内参,2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.7 ELISA 空白孔加入细胞培养基,样本孔加检测缓冲液和待测细胞样本,每组 3 个重复检测样本。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在 30 min 内采用酶标仪测定 450 nm 波长。

1.2.8 ROS 含量检测 取生长状态良好的细胞铺于 6 孔板中,待细胞密度为 60%~70% 时,按照分组处理。

将 DCFH-DA 探针用 PBS 稀释至 10  $\mu$ mol/L,然后加入细胞悬液中,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。再次用 PBS 洗涤细胞,以去除未进入细胞的探针。将处理好的细胞悬液上机进行流式细胞术检测。

1.2.9 Western blot 将细胞接种于 96 孔板中,使用胰蛋白酶裂解,离心收集上清液。根据说明书使用 BCA 试剂盒检测蛋白质的浓度。随后,进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳,完成后,将蛋白质转移到 PVDF 膜上。转膜完成后,将 PVDF 膜放入含有 5% 脱脂牛奶中,室温封闭 2 h。将封闭好的膜放入稀释好的一抗溶液中,4  $^{\circ}$ C 过夜孵育。随后,将膜放入稀释好的二抗溶液中,室温下孵育 2 h。结束后,将发光液均匀的涂抹在 PVDF 膜表面,进行发光显影。

1.2.10 HE 染色 依次将切片放入二甲苯 I 10 min,二甲苯

II 10 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,95% 乙醇 I 5 min,95% 乙醇 II 5 min,蒸馏水洗。切片入苏木精染 3~8 min,自来水洗,1% 的盐酸乙醇分化数秒,自来水冲洗,0.6% 氨水返蓝,流水冲洗。切片入伊红染液中染色 1~3 min。将切片依次放入 95% 乙醇 II 5 min,95% 乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,无水乙醇 I 5 min,二甲苯 II 5 min,二甲苯 I 5 min 中脱水透明,将切片从二甲苯中取出并晾干,中性树脂胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

引物	序列 (5'-3')
Collagen I	上游 AGACCTGTGTGTTCCCTACT
	下游 GAATCCATCGGTCATGCTCTC
Collagen II	上游 ACGCTACACTCAAGTCZCTGAACAAC
	下游 TCAATCCAGTAGTCTCCGCTCTTC
Collagen III	上游 GGATCTGTCTTTGCGATGA
	下游 GTAGAAGCTGTGGGCATATT
Collagen X	上游 CCCTGGTTCATGGGATGTTT
	下游 TGGCGTATGGGATGAAGTATTG
Aggrecan	上游 ATCTACCGCTGTGAAGTGATG
	下游 GGGTGTAGCGTGTGGAATA
Alp	上游 GCACCTGCCTTACCAACTCT
	下游 GGACCTGAGCGTTGGTGTTA
MMP-13	上游 CTATCCCTTGATGCCATTACCAG
	下游 TAAGGTCACGGGATGGATGTTT
Sox9	上游 GAACGCACATCAAGACGGAG
	下游 TCTCGTTGATTTCCGCTGCTC
Runx2	上游 TGGTTACTGTCATGGCGGGTA
	下游 TCTCAGATCCTTGAACCTTGCTA
$\beta$ -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAGA
	下游 GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC

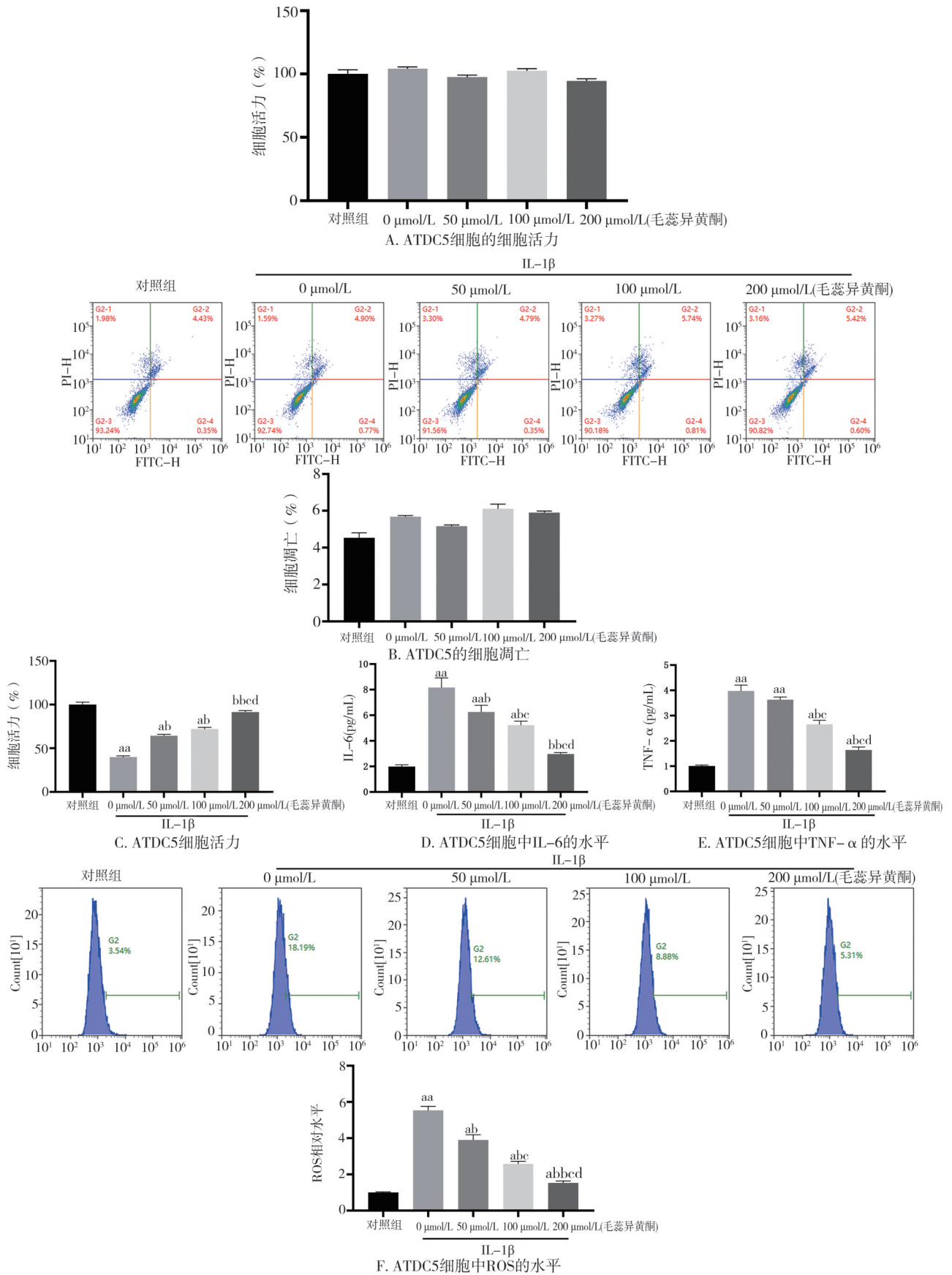
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行数据分析,试验数据 ( $n \geq 3$ ) 均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间采用单因素方差分析,2 组间采用  $t$  检验。柱状图作图软件为 GraphPad Prism 9。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 毛蕊异黄酮对 OA 软骨细胞的细胞活力、炎症因子及 ROS 水平的影响

与对照组相比,不同浓度的毛蕊异黄酮处理对 ATDC5 细胞活力和细胞凋亡水平差异无统计学意义 (图 1A、B,  $P > 0.05$ )。IL-1 $\beta$  处理的 ATDC5 细胞中,细胞活力显著降低,炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量显著上调,ROS 水平显著升高。经毛蕊异黄酮干预后,与模型组相比,毛蕊异黄酮各剂量组的 ATDC5 细胞中细胞活力显著升高,炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量显著下调,ROS 水平显著降低,且呈一定的剂量依赖性 (图 1C-F,  $P < 0.05$ )。



注:  $n=3$ , a, 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P<0.05$ ; c, 与 50  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P<0.05$ ; d, 与 100  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P<0.05$

图1 毛蕊异黄酮提高 OA 软骨细胞的细胞活力、降低炎症因子及 ROS 的水平

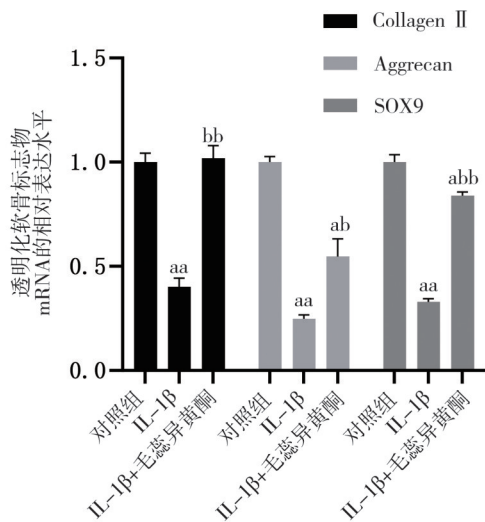
2.2 毛蕊异黄酮抑制 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞肥大及纤维化表型

与对照组相比, IL-1 $\beta$  组 ATDC5 细胞中成软骨化标志物 Collagen II、SOX9 和 Aggrecan 的 mRNA 表达水平显著降低, 经毛蕊异黄酮干预后, Collagen II、SOX9 和 Aggrecan 的 mRNA 表达水平显著上调(图 2A,  $P < 0.05$ )。与对照组相比, IL-1 $\beta$  组 ATDC5 细胞中肥大型软骨标志物 Collagen X、MMP13 mRNA 表达水平明显升高, 经毛蕊异黄酮干预后, Collagen X、MMP13 mRNA 表达水平明显下调(图 2B,  $P < 0.05$ )。此外, IL-1 $\beta$  处理显著提高 ATDC5 细胞中纤维化软骨标志物 Collagen I、Collagen III 的 mRNA 的表达水平; 毛蕊异黄酮进一步处理降低了 Collagen I、Collagen III 的 mRNA 的表达水平(图 2C,  $P < 0.05$ ), WB 的结果进一步证实了该结论(图 2D,  $P < 0.05$ )。

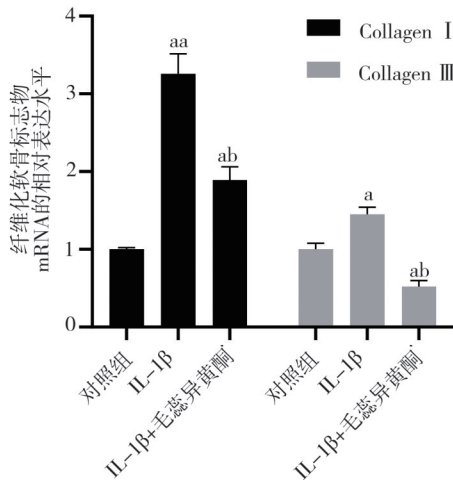
2.3 毛蕊异黄酮促进 OA 大鼠 BMSCs 的成软骨分化

通过对 3 组(对照组、OA 组、OA+毛蕊异黄酮组)大鼠膝

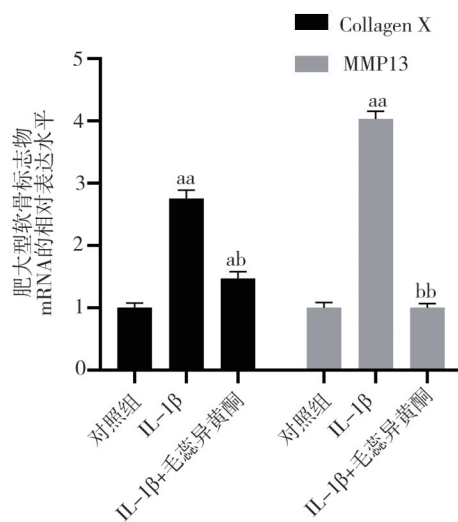
关节软骨进行 HE 和番红固绿染色分析发现, 与对照组相比, OA 组大鼠的膝关节软骨表面完整性破坏, 部分区域缺失, 关节软骨浅表糜烂、细胞减少, 表现为中度病理性变化, 而经毛蕊异黄酮处理后, 病理学改变有所缓解, 骨关节软骨表现出较少的破坏, 软骨表面更完整, 显著地减弱了软骨的降解(图 3A、B)。与对照组相比, OA 组大鼠 BMSCs 的成软骨化标志物 Collagen II、SOX9、Aggrecan 的 mRNA 表达水平显著降低, 经毛蕊异黄酮干预后, 大鼠 BMSCs 的 Collagen II、SOX9、Aggrecan 的 mRNA 表达水平显著上调(图 3C,  $P < 0.05$ ); 与对照组相比, OA 组大鼠 BMSCs 中肥大型软骨标志物 Collagen X、MMP13 表达水平明显升高, 经毛蕊异黄酮干预后, 大鼠 BMSCs 中的 Collagen X、MMP13 mRNA 表达水平明显降低(图 3D,  $P < 0.05$ ); 与对照组相比, OA 组大鼠 BMSCs 中成骨标志物 ALP 和 RUNX2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高, 毛蕊异黄酮进一步处理后, 大鼠 BMSCs 中成骨标志物 ALP、RUNX2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低(图 3E、F,  $P < 0.05$ )。



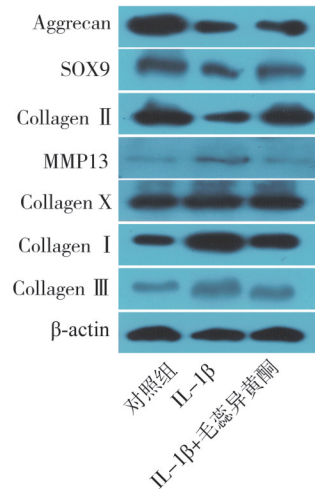
A. Collagen II、SOX9 和 Aggrecan mRNA 的表达



C. Collagen I 和 Collagen III 的 mRNA 的表达



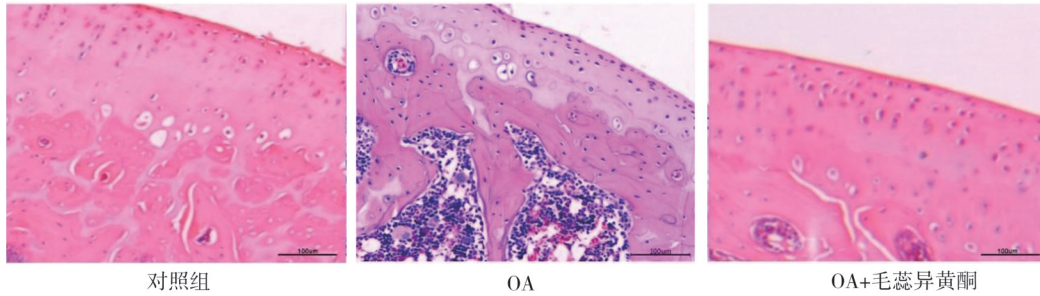
B. Collagen X、MMP13 mRNA 的表达



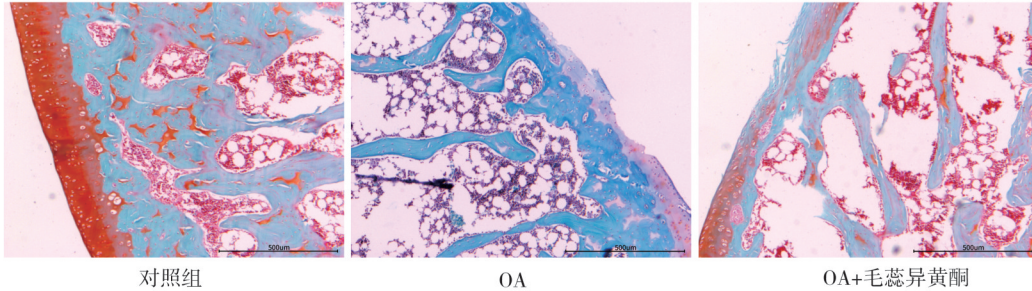
D. 成软骨化、肥大型软骨和纤维化软骨标志物的蛋白表达

注:  $n=3$ , a, 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与 IL-1 $\beta$  组比较,  $P < 0.05$

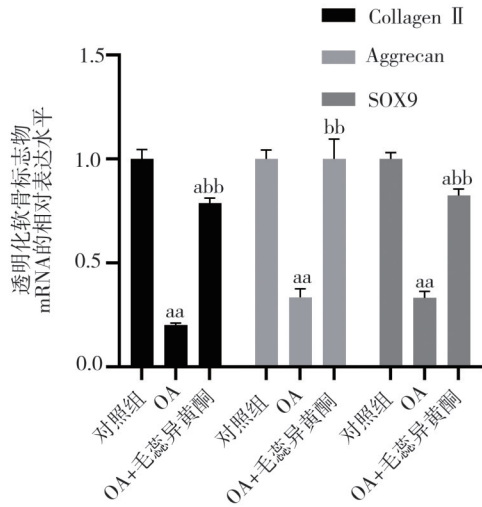
图 2 毛蕊异黄酮抑制 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞肥大及纤维化表型



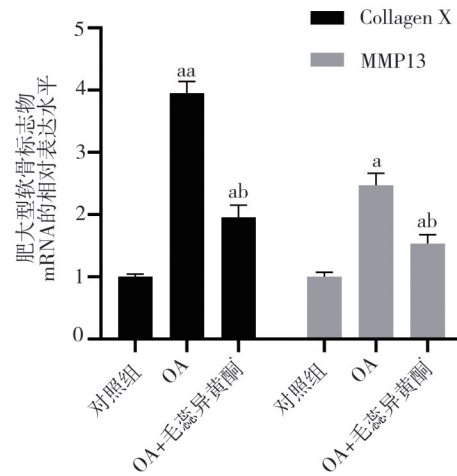
A. HE染色检测OA大鼠的病理学特征



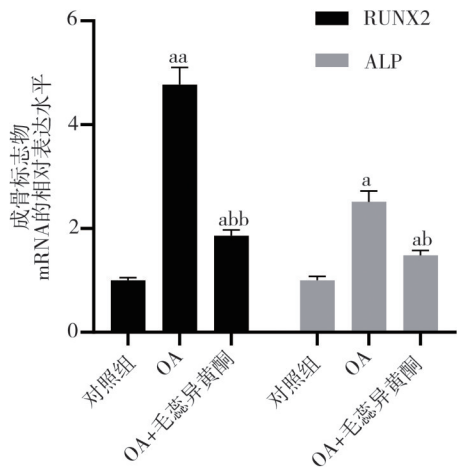
B. 番红固绿染色检测OA大鼠的病理学特征



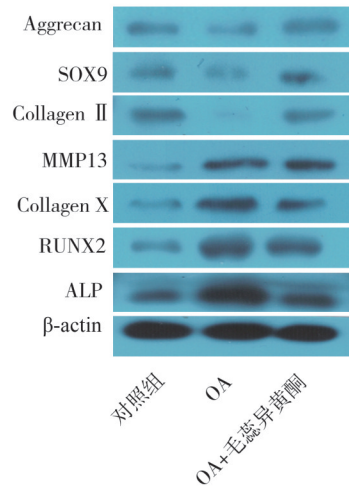
C. Collagen II, SOX9和Aggrecan的mRNA表达



D. Collagen X和MMP13的mRNA表达



E. ALP和RUNX2的mRNA表达



F. 成软骨化、肥大软骨和成骨标志物蛋白表达

注: n=3, a, 与对照组比较, P<0.05; b, 与IL-1β组比较, P<0.05

图3 毛蕊异黄酮促进OA大鼠BMSCs的成软骨分化

### 3 讨论

天然产物因其来源自然和较低的毒副作用等优势而受到青睐。越来越多的天然产物对 OA 具有抗炎、抗氧化或缓解 OA 的活性,已经成为治疗软骨损伤相关疾病的重要研究方向。据报道,齐墩果酸通过调节 miR-148-3p/FGF2 信号通路,减轻 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞功能障碍<sup>[16]</sup>。槲皮素可抑制 IL-1 $\beta$  诱导的细胞凋亡,并通过 TSC2-RHEB-mTOR 通路调节 OA 软骨细胞自噬发挥软骨保护作用<sup>[17]</sup>。本研究表明,毛蕊异黄酮呈剂量依赖性抑制促炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达,降低氧化因子 ROS 的水平,表明毛蕊异黄酮有可能在 OA 的治疗中发挥一定作用。在 OA 的疾病发展过程中,骨关节软骨细胞的肥大表型和纤维化表型以及成软骨标志物是疾病发展的重要特征。据报道,NF- $\kappa$ B 信号通路的激活促进软骨细胞外基质的降解和纤维化<sup>[18]</sup>。同时,有证据表明毛蕊异黄酮能够调控 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。比如,有研究发现毛蕊异黄酮可以降低脑组织 NF- $\kappa$ B 蛋白水平,减轻炎性损伤,在脑缺血再灌注损伤中发挥保护作用<sup>[19]</sup>。因此,本研究通过建立 OA 小鼠和细胞模型,探究毛蕊异黄酮对软骨肥大表型和纤维化表型维持的影响及对 BMSCs 的成软骨分化的影响,探讨毛蕊异黄酮在软骨细胞损伤和软骨分化过程中的调控作用。

OA 是一种慢性退行性关节疾病,是导致残疾的主要原因,其特征细胞外基质降解、软骨损伤、蛋白多糖以及胶原的减少和破坏。在健康状态下,关节软骨中的成熟软骨细胞保持静止,再生潜力有限,并维持细胞外基质成分<sup>[20]</sup>。当软骨的损伤超过机体自我修复能力时,损伤区域会被纤维软骨所取代,其在生物化学组成和生物力学性质方面与透明软骨不同,无法满足运动的需求,导致软骨组织学和生物学等环境的紊乱,从而扩大病变范围并引发炎症。本研究表明毛蕊异黄酮可抑制 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞肥大及纤维化表型标志物的增加,同时促进其透明化维持。

干细胞作为体内具有自我更新能力的多潜能细胞,在特定条件下,它可以分化为多种功能的细胞。间充质干细胞作为干细胞的重要一员,由于其具有良好的体外增殖、分化能力和较高的自我更新

能力以及向软骨分化的潜力,因此成为最具有临床应用前景的多潜能干细胞。自上世纪 70 年代年 Friedenstein 首次描述并分离得到 BMSCs 以来,大量研究报道了 BMSCs 的多能性。尽管 BMSCs 只占有骨髓细胞总数的 0.2%,但其具有很强的分裂潜力,可以通过体外扩增获得高数量的细胞,用于填补软骨缺损<sup>[21,22]</sup>。据报道,桑橙素通过调控 miR-203a-3p/Smad1 促进 BMSCs 成软骨细胞分化<sup>[23]</sup>。棕榈酸通过上调 SOX9 基因表达促进 BMSCs 成软骨分化<sup>[24]</sup>。众所周知,ALP 和 Runx2 是关键成骨标志物。其中,ALP 是成骨细胞的表型标志物之一,可以直接反映成骨细胞的活性和功能状况。Runx2 表达于成骨细胞的前体细胞中,其失活可防止成骨细胞分化,是成骨细胞分化和软骨细胞成熟必需的转录因子<sup>[25]</sup>。研究报道,在 Runx2 缺陷的突变小鼠中,成骨细胞分化被阻滞;此外,在软骨细胞进程中,Runx2 在增殖性软骨细胞中表达较少,但随着软骨细胞退出细胞周期,Runx2 表达明显上调,形成前肥大和肥大软骨细胞<sup>[25]</sup>,这表明 Runx2 在调节软骨和骨发育方面具有关键的调节作用<sup>[26]</sup>。本研究发现,毛蕊异黄酮对小鼠 BMSCs 干预后,肥大型软骨标志物和成骨标志物表达显著降低,而成软骨化标志物表达显著升高,说明毛蕊异黄酮治疗可促进 BMSCs 的成软骨分化,并抑制成骨分化。

综上所述,本研究通过建立 OA 小鼠和细胞模型,发现毛蕊异黄酮能抑制 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞肥大及纤维化表型,同时促进其透明化维持,并促进 BMSCs 的成软骨分化,并抑制成骨分化,为软骨损伤相关疾病的治疗提供了一定的理论基础。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王枫:研究方案设计、论文撰写;李智斌:实施研究、分析数据;孙智平:数据收集;李文雄:实验技术指导;肖振:研究方案设计、论文修改

### 参 考 文 献

- [1] Sacitharan PK. Ageing and osteoarthritis[J]. Subcell Biochem, 2019,91:123-159.
- [2] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011,7(1):33-42.
- [3] Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options[J]. Med Clin North Am, 2020,104(2):293-311.
- [4] Jin T, Cheng ZX. Current status and thoughts of non-surgical treat-

- ment of knee osteoarthritis[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2021, 101(43): 3525-3527.
- [5] Li M, Han B, Zhao H, et al. Biological active ingredients of *Asragali Radix* and its mechanisms in treating cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153918.
- [6] Deng M, Chen HJ, Long JY, et al. Calycosin: a review of its pharmacological effects and application prospects[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(7): 911-925.
- [7] Duan XP, Meng Q, Wang CY, et al. Calycosin attenuates triglyceride accumulation and hepatic fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis *via* activating farnesoid X receptor[J]. *Phytomedicine*, 2017, 25: 83-92.
- [8] Ma R, Yuan F, Wang SX, et al. Calycosin alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the inflammatory response and oxidative stress *via* the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signal pathways in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 599-605.
- [9] Tan JC, Qin X, Liu B, et al. Integrative findings indicate anti-tumor biotargets and molecular mechanisms of calycosin against osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110096.
- [10] Pan L, Zhang XF, Wei WS, et al. The cardiovascular protective effect and mechanism of calycosin and its derivatives[J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(12): 907-915.
- [11] Lu CY, Day CH, Kuo CH, et al. Calycosin alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced astrocyte injury by restricting oxidative stress through the Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(4): 858-867.
- [12] Shi XQ, Jie LS, Wu P, et al. Calycosin mitigates chondrocyte inflammation and apoptosis by inhibiting the PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297: 115536.
- [13] 钟宇辰, 王诗淳, 赵峰, 等. 关节腔内注射碘乙酸快速建立小鼠骨关节炎模型[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(5): 61-65, 70.
- Zhong YC, Wang SC, Zhao F, et al. The method of establishing mouse osteoarthritis model by intraarticular injection of MIA[J]. *Lab Anim Sci*, 2020, 37(5): 61-65, 70.
- [14] 杨琦. BM-MSCs 通过 Notch3 通路修复急性肺损伤的效能及分子调控机制研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2020.
- Yang Q. Efficacy and Molecular Regulatory Mechanisms of BM-MSCs in Repairing Acute Lung Injury *via* the Notch3 Pathway[D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2020.
- [15] Huitema LFA, van Weeren PR, Barneveld A, et al. Iron ions derived from the nitric oxide donor sodium nitroprusside inhibit mineralization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1/2/3): 48-53.
- [16] Li YL, Nie JL, Jiang P. Oleanolic acid mitigates interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocyte dysfunction by regulating miR-148-3p-modulated FGF2 expression[J]. *J Gene Med*, 2020, 22(5): e3169.
- [17] Lv SJ, Wang XJ, Jin SJ, et al. Quercetin mediates TSC2-RHEB-mTOR pathway to regulate chondrocytes autophagy in knee osteoarthritis[J]. *Gene*, 2022, 820: 146209.
- [18] Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification[J]. *J Endocrinol*, 2011, 211(2): 109-121.
- [19] 王文波, 谭洁, 彭志柱, 等. 毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响[J]. *心理医生*, 2018, 24(35): 32-34.
- Wang WB, Tan J, Peng ZZ, et al. Neuroprotective effects of calycosin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its influence on NF- $\kappa$ B expression[J]. *Psychol Dr*, 2018, 24(35): 32-34.
- [20] Tang SA, Cao YM, Cai ZP, et al. The lncRNA *PILA* promotes NF- $\kappa$ B signaling in osteoarthritis by stimulating the activity of the protein arginine methyltransferase PRMT1[J]. *Sci Signal*, 2022, 15(735): eabm6265.
- [21] English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation?[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 431-442.
- [22] Norambuena GA, Khoury M, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update[J]. *Pediatr Res*, 2012, 71(4 Pt 2): 452-458.
- [23] 吴玉琼. 桑橙素调控 miR-203a-3p/Smad1 促进 BMSCs 成软骨细胞分化[D]. 广东: 广州中医药大学, 2019.
- Wu YQ. Regulation of Maclurin on miR-203a-3p/Smad1 Promotes the Chondrogenic Differentiation of BMSCs[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019.
- [24] 陈鸿泰. 棕榈酸促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及成骨、成软骨分化的基础实验研究[D]. 广东: 广州中医药大学, 2019.
- Chen HT. Basic Experimental Study on the Effects of Palmitic Acid on the Migration and Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *In Vitro*[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019.
- [25] Barger A, Baker K, Driskell E, et al. The use of alkaline phosphatase and runx2 to distinguish osteosarcoma from other common malignant primary bone tumors in dogs[J]. *Vet Pathol*, 2022, 59(3): 427-432.
- [26] Hojo H, Saito T, He XJ, et al. Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages[J]. *Cell Rep*, 2022, 40(10): 111315.

(收稿: 2024-09-26; 修回: 2025-02-12; 录用: 2025-02-20)

(责任编辑: 李青颖)

本文引用格式:

王枫, 李智斌, 孙智平, 等. 毛蕊异黄酮减轻 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞炎症损伤和纤维化[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(2): 263-270.