

木犀草素在炎症微环境下调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨髓间充质 干细胞成软骨分化的机制

赵灿斌¹, 邵将², 管东辉², 秦英³, 丁强¹, 郭良¹, 王伟伟¹, 陈威¹, 闫小龙⁴, 曾平⁵

(1.广西中医药大学第一临床医学院,广西 南宁 530200; 2.山东中医药大学附属医院骨科,山东 济南 250014;
3.济南市长清区中医医院骨科,山东 济南 250300; 4.济南市长清区人民医院/山东中医药大学附属医院大学城医院,
山东 济南 250030; 5.广西中医药大学第一附属医院骨二科,广西 南宁 530200)

摘要:目的 探讨炎症微环境作用下木犀草素对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成软骨分化以及对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。方法 通过网络药理学手段筛选木犀草素调控成软骨分化的基因集,并绘制蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图,随后进行基因本体论(gene ontology, GO)及京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,筛选成软骨分化相关靶基因与木犀草素进行分子对接处理。采用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK8)及细胞增殖试验检测木犀草素对 BMSCs 的细胞毒性。将大鼠 BMSCs 分为对照组(使用 2 mL 成软骨分化诱导培养基培养)、模型组[使用 2 mL 含 10 ng/mL 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)的成软骨分化诱导培养基构建炎症微环境]、低剂量组(在模型组的基础上加入 5 μ mol 木犀草素干预)及高剂量组(在模型组的基础上加入 10 μ mol 木犀草素干预),诱导各组细胞成软骨分化,构建微团软骨细胞球。对微团软骨细胞球包埋切片后进行组织学(番红-固绿、甲苯胺蓝、阿利新蓝)染色,采用 RT-qPCR 法检测各组软骨细胞球成软骨基因 II 型胶原蛋白(collagen type II, COL2)、Sry 相关 HMG 框转录因子 9(sry-box transcription factor 9, SOX9)、聚集蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)表达量及 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CBP)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)、 β -连环蛋白(beta-catenin, β -CATENIN)、细胞髓细胞瘤病毒癌基因同源物(cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-MYC)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)表达量,采用 Western blotting 法检测 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白 PKA、CBP、GSK3 β 、 β -CATENIN、c-MYC、Cyclin D1 表达量。结果 共筛选出木犀草素调控成软骨分化靶基因 54 个,其中 53 个参与 PPI 网络图的构建。靶基因涉及 Wnt/ β -catenin 信号通路正向调控及负向调控等生物过程,木犀草素与 II 型胶原 α 1 蛋白(collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)、SOX9、ACAN 均可良好对接。5 μ mol、10 μ mol 木犀草素无明显细胞毒性。组织学染色显示,模型组软骨细胞球染色比对照组稀疏而且无序,加入木犀草素干预后被明显逆转。与对照组相比,模型组软骨细胞球中 COL2、SOX9、ACAN、PKA、CBP、GSK3 β 、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 的 mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$),GSK3 β 表达量明显升高($P < 0.05$),Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白 PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 表达量明显降低($P < 0.05$),GSK3 β 表达量明显升高($P < 0.05$),加入木犀草素干预后被显著逆转。结论 在炎症微环境下,木犀草素可促进 BMSCs 成软骨分化,可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词:木犀草素;骨髓间充质干细胞;成软骨分化;炎症微环境;Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号:R274

文献标志码:A

Mechanism of luteolin regulating Wnt/ β -catenin signal pathway in inflammatory microenvironment to promote chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

ZHAO Canbin¹, SHAO Jiang², GUAN Donghui², QIN Ying³, DING Qiang¹, GUO Liang¹,
WANG Weiwei¹, CHEN Wei¹, YAN Xiaolong⁴, ZENG Ping⁵

(1. First Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China; 3. Department of Orthopedics, Jinan Changqing District Traditional Chinese Medicine Hospital, Jinan 250300, Shandong, China; 4. Orthopedics Department, Jinan Changqing District People's Hospital/University Town Hospital, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, Shandong, China;

5. Department of Orthopedics 2, First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of luteolin on chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in an inflammatory microenvironment. **Methods** Network pharmacology was used to screen gene sets regulated by luteolin for chondrogenic differentiation, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses were performed to screen chondrogenic differentiation-related target genes, which were then subjected to molecular docking with luteolin. The cytotoxicity of luteolin on BMSCs was determined using the cell counting kit-8 (CCK8) and cell proliferation assay. Rat BMSCs were divided into control group (cultured with 2 mL chondrogenic differentiation induction medium), model group [using 2 mL of chondrogenic differentiation induction medium containing 10 ng/mL tumor necrosis factor- α (TNF- α) to construct an inflammatory microenvironment], low-dose group (5 μ mol luteolin intervention based on the model group), and high-dose group (10 μ mol luteolin intervention based on the model group). Chondrogenic differentiation was induced in each group to construct micromass cartilage pellets. After embedding and sectioning, histologic staining (Safranin-O/Fast Green, Toluidine Blue, Alcian Blue) was performed. RT-qPCR was used to detect the expression of chondrogenic genes collagen type II (COL2), Sry-box transcription factor 9 (SOX9), and aggrecan (ACAN), as well as the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway proteins including protein kinase A (PKA), cAMP response element-binding protein (CBP), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), β -catenin (β -CATENIN), cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC), and Cyclin D1. Western blotting was used to determine the protein expression levels of these signaling molecules. **Results** A total of 54 target genes regulated by luteolin for chondrogenic differentiation were screened, 53 of which were involved in the construction of the PPI network. The target genes were associated with biological processes, including positive and negative regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Luteolin showed good docking with collagen type II alpha 1 chain (COL2A1), SOX9 and ACAN. Luteolin at 5 μ mol and 10 μ mol showed no significant cytotoxicity. Histological staining revealed that the model group had sparser and more disorganized staining in cartilage pellets compared to the control group, which was significantly reversed by luteolin intervention. Compared with the control group, the model group had significantly lower mRNA expression of COL2, SOX9, ACAN, PKA, CBP, β -CATENIN, c-MYC, and Cyclin D1 ($P < 0.05$), while GSK3 β expression was significantly higher ($P < 0.05$). Protein expression levels of PKA, CBP, β -CATENIN, c-MYC, and Cyclin D1 in the Wnt/ β -catenin pathway were significantly decreased ($P < 0.05$), and GSK3 β was increased ($P < 0.05$) in the model group, all of which were significantly reversed by luteolin intervention. **Conclusion** Luteolin promotes chondrogenic differentiation of BMSCs in an inflammatory microenvironment, possibly by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Luteolin; Bone marrow mesenchymal stem cells; Chondrogenic differentiation; Inflammatory microenvironment; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨关节炎以关节软骨退行性病变为主要特征,是常见的骨科疾病,膝关节骨性关节炎是其常见的

类型之一^[1-2]。膝关节骨性关节炎病理学特点主要是软骨关节面破坏、软骨下骨硬化等^[3]。在临床诊

疗中,膝关节骨性关节炎患者往往伴有疼痛、肿胀、活动障碍,给患者的日常生活带来了一定的负担。膝关节骨性关节炎的发病因素较多,如年龄增长、创伤、过度肥胖等^[4]。有研究发现,我国膝关节骨性关节炎发病率与患者年龄密切相关,随着人口老龄化的不断加重,膝关节骨性关节炎发病率逐年上升^[5]。

研究发现,诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成软骨分化,修复软骨缺损区治疗膝关节骨性关节炎展现出巨大的潜在价值与发展可能性^[6]。目前,有研究证实了BMSCs成软骨分化治疗膝关节骨性关节炎的可行性^[7-8]。此外,Wnt/ β -catenin 信号通路在干细胞成软骨细胞过程中发挥着重要作用^[9-10]。另有研究发现,在炎症微环境下,Wnt/ β -catenin 信号通路被明显抑制^[11],可能与BMSCs在炎症环境下成软骨分化受到抑制有关^[12]。

有研究报道,许多天然的中草药产品可以促进BMSCs成软骨分化过程^[13]。作为黄酮类化合物,木犀草素存在于骨碎补、淫羊藿等多种天然中草药中,具有抗菌、抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多种功效^[14-15]。木犀草素在诸多生物过程中对Wnt/ β -catenin 信号通路有显著调控作用^[16-17]。目前有关木犀草素是否可以在炎症微环境下调控Wnt/ β -catenin 信号通路并促进BMSCs成软骨分化的报道

较少。本研究采用大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)作为研究对象,在体外环境下研究木犀草素在炎症微环境下促进rBMSCs成软骨分化的相关机制,为天然中药提取物促进BMSCs成软骨分化,治疗膝关节骨性关节炎提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器

rBMSCs(商品号:RASMIX-01001)及大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒(商品号:RAX-MX-90041)购自中国广州赛业生物科技有限公司(已通过出厂鉴定)。木犀草素(商品号:S31366)购自上海源叶生物科技有限公司。TRNzol Universal 总RNA提取试剂(商品号:DP424)购自北京天根生化科技有限公司。番红固绿(骨组织)染液套装(商品号:G1053)、甲苯胺蓝染液(商品号:G1032)、阿利新蓝染液(商品号:G1027)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。酶标仪(型号:MOLECULAR DEVICES)生产于美国CMax Plus公司。荧光定量PCR仪(型号:LightCycler96)生产于瑞士Roche公司。RT-qPCR引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成,具体序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列信息

Table 1 Primers for RT-qPCR examination

名称	序列(5'-3')	名称	序列(5'-3')	长度/bp
COL2-F	TGTGAAGACCCAGACTGCCT	COL2-R	TTCGCCACGAGAACCTTGAG	-978
ACAN-F	GCAGACCAGGAGCAATGTGA	ACAN-R	GTTGGTTTGGACGCCACTTC	-274
SOX9-F	ACAACGCAAGCTTCTGCAAG	SOX9-R	GTGGGGCGAACAAACAAGAC	-347
β -CATENIN-F	GCCGTTGCGCTTCATTATGG	β -CATENIN-R	GGTGTCTGATGTGCTCGTA	-192
GSK3 β -F	GACACACCTGCCCTCTTCAA	GSK3 β -R	AGAAGCGGCGTTATTGGTCT	-177
PKA-F	TTAGCAAGCCACAATGCTCAG	PKA-R	CCACATAGCTCGGAAACCCAT	-113
CBP-F	TGTGGAGGGCTTGTAGCATT	CBP-R	AAAAGAGCCCAAATGTCTGGA	-282
c-MYC-F	CTATCACCAGCAACAGCAGAG	c-MYC-R	AACATAGGACGGAGAGCAGAG	-133
CYCLIN D1-F	CCAGAGGCGATGAGAACA	CYCLIN D1-R	CGGTAGCAGGAGAGGAAGTT	-179
β -ACTIN-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	β -ACTIN-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	-154

1.1.2 网络药理学部分所使用数据库名称和对应网址

数据库相关信息以及运营国家的相关信息见表2。

表2 文中所用数据库及其网址

Table 2 The databases and their URLs used in the article

数据库	网址(运营国家)	数据库	网址(运营国家)
Pub Chem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (美国)	String	https://www.string-db.org/ (瑞士)
Swiss Target Prediction	www.swisstargetprediction.ch/ (瑞士)	Omicshare	https://www.omicshare.com/ (中国)
Pharm Mapper	http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/ (中国)	PDB	https://www.rcsb.org/ (美国)
Genecards	https://www.genecards.org/ (以色列)	g:Profiler	https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost/ (爱沙尼亚)

1.2 方法

1.2.1 网络药理学部分

1.2.1.1 木犀草素、成软骨分化靶点筛选及交集分析

使用 Pubchem 数据库网站获取木犀草素 2D 结构的 SDF 文件,并使用 Swiss Target Prediction 和 Pharm Mapper 工具进行药物靶点预测,运用 Gene Cards 数据库检索 cheng 软骨分化相关靶点。将三者导入 Omicshre Tools 分析工具进行 VENN 分析,得到三者的交集靶点信息。

1.2.1.2 构建蛋白质相互作用关系网络 (protein-protein interactions, PPI)

通过 String 数据库将交集靶点基因绘制 PPI 网络图,并使用 Cytoscape 3.8.0 拓扑计算并优化 PPI 网络图。

1.2.1.3 基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析及其分子对接

使用 g:Profiler 工具转化交集靶点基因名称为 ENSG ID,导入 Omicshare 网站进行 GO 富集 (包括生物过程、细胞成分、分子功能) 和 KEGG 通路富集。从 PPI 网络中筛选参与成软骨分化的相关靶点,由 PDB 数据库获取结构文件,并利用 Autodock 4.2.6 软件进行其与木犀草素的分子对接,最后通过 Pymol 2.4.0 软件进行可视化分析。

1.2.2 实验验证部分

1.2.2.1 采用 CCK8 法检测细胞毒性及细胞分组

取对数生长期的 rBMSCs 调配细胞悬液,接种于 96 孔板中,密度约 5×10^3 个细胞/孔。培养至细胞贴壁,分别加入含有 0、5、10、25、50 μmol 木犀草素的成软骨分化诱导培养基 200 μL (为消除实验误差,每组培养基中均含有 0.1% DMSO 助溶)。分别干预 24、48、72 h,弃除原培养基,加入 1:10 现配的新鲜 CCK8 测定工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 后,450 nm 波长的酶标仪下检测各组吸光度,筛选出对 rBMSCs 无明显毒性的木犀草素浓度。将细胞分为对照组 (不做干预)、模型组 [使用含 10 ng/mL 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的完全培养基构建炎症微环境]、低剂量组 (在模型组的基础上使用 5 μmol 木犀草素干预) 和高剂量组 (在模型组的基础上使用 10 μmol 木犀草素干预),实验分组用于后续实验操作。

1.2.2.2 采用克隆形成法检测细胞增殖的表达

取对数生长期的 rBMSCs 调配细胞悬液,接种于 6 cm 培养皿中,密度约 1×10^3 个细胞/孔。各组细胞干预 10 d,弃除原培养基,4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染液染色并拍照,使用 Image J 图像

处理软件计算细胞增殖群落数量。

1.2.2.3 微团软骨细胞球的构建及处理

取对数生长期的 rBMSCs,使用 15 mL 离心管调配细胞悬液,密度约 3×10^5 个细胞/管。采用改良微团培养法诱导 rBMSCs 成软骨分化^[18]。细胞分组同 1.2.2.1。干预 21 d,直至离心管内出现细胞球。将细胞球小心取出,采用 4% 多聚甲醛固定 30 min,脱水处理,进行包埋及切片处理。

1.2.2.4 番红固绿、甲苯胺蓝及阿利新蓝染色

固绿染色:切片加入骨组织固绿染色液 1~5 min,水洗去多余染液,至软骨呈无色,1% 盐酸乙醇浸泡 10 s。番红染色:切片加入骨组织番红染色液 1~5 s,分别使用无水乙醇快速脱水 5、2、10 s,二甲苯透明 5 min,中性树胶封片。显微镜下观察染色情况。

甲苯胺蓝染色:切片入甲苯胺蓝染液 2~5 min,使用 0.1% 的冰醋酸分化,PBS 冲洗,终止反应,显微镜下观察分化程度,加入二甲苯透明 5 min,中性树胶封片。显微镜下观察染色情况。

阿利新蓝染色:切片入阿利新蓝染液中染色 10~15 min,PBS 冲洗。使用核固红染液复染 3 min,PBS 冲洗,加入二甲苯透明 5 min,中性树胶封片。显微镜下观察染色情况。

1.2.2.5 采用 RT-qPCR 法检测成软骨相关基因及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达

取对数生长期的 rBMSCs 调配细胞悬液,构建微团软骨细胞球 (具体方式构建方式及细胞分组方式同 1.2.2.3)。干预完成后采用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂于冰上提取各组软骨细胞球 mRNA,进行反转录及扩增,每个样品 3 个重复,结果相对于 Actin 校正,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析实验数据。

1.2.2.6 采用 Western blotting 法检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达

取对数生长期的 rBMSCs 调配细胞悬液,构建微团软骨细胞球 (具体方式构建方式及细胞分组方式同 1.2.2.3)。干预完成后提取各组细胞球蛋白,采用 BCA 法检测各组蛋白浓度。确定各组蛋白上样量为 25 μg ,SDS-PAGE 电泳,进行转膜、封闭。加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。其中一抗:蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、cAMP response element 结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CBP)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β)、 β -连环蛋白 (beta-catenin, β -CATENIN)、细胞髓细胞瘤病毒癌基因同源物 (cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-MYC)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、 β -肌动蛋白 (beta-actin, β -ACTIN)。孵育完成后室温下二抗

孵育 1 h,进行显影处理。将细胞质内蛋白质表达水平相对于 β -ACTIN 标准化,细胞质核蛋白质表达水平相对于 Histone H3 标准化。Gepol32 4.0 软件对条带进行分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件。计量资料正态性采用 Shapiro-Wilk 检验。符合正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 网络药理学结果

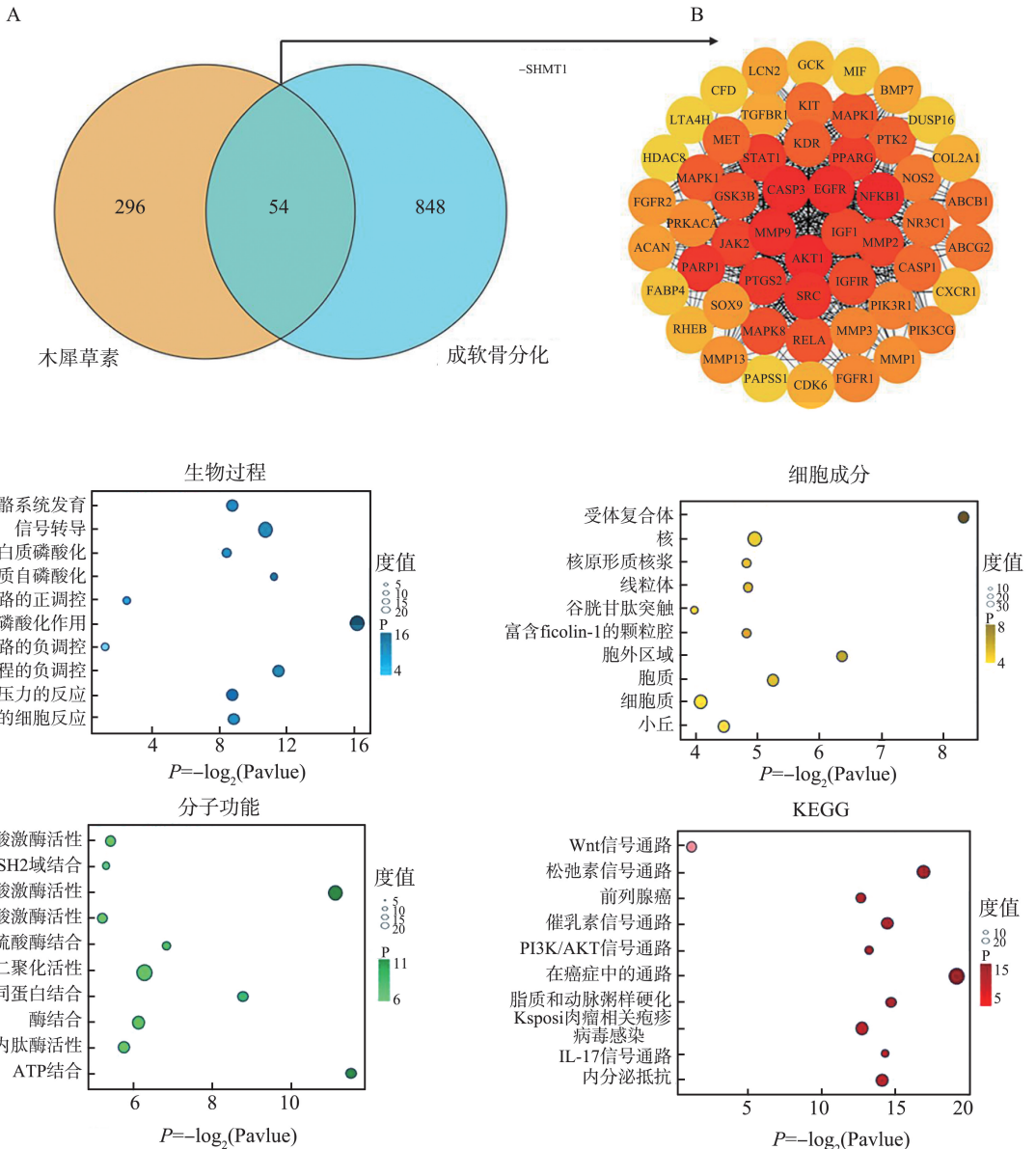
2.1.1 木犀草素、成软骨分化靶点筛选及交集分析

通过 Swiss Target Prediction 和 PharmMapper 靶点预测工具共得到木犀草素作用靶点 350 个,通过

Genecards 数据库得到成软骨分化相关靶点 902 个,两者取交集后最终得到 54 个交集靶点,见图 1A。

2.1.2 蛋白质互相作用 (protrin-protein interaction, PPI) 网络的构建

PPI 网络图显示,在 54 个交集靶点中,除丝氨酸羟甲基转移酶 1 (serine hydroxymethyltransferase 1, SHMT1) 之外,其他 53 个靶点均参与 PPI 网络图的构建。PPI 网络图中包含成软骨相关靶点聚集蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN)、II 型胶原 $\alpha 1$ 蛋白 (collagen type II alpha 1chain, COL2A1)、Sry 相关 HMG 框转录因子 9 (sry-box transcription factor 9, SOX9) 及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关靶点蛋白激酶 A 催化亚基 α (protein Kinase A catalytic subunit alpha, PRKACA)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) 等,见图 1B。



D

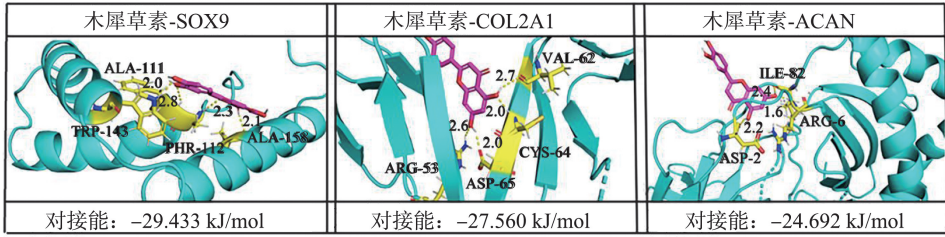


图1 木犀草素调控成软骨分化的网络药理学分析

A: 木犀草素与成软骨分化相关靶点的交集 VENN 图; B: 交集靶点的 PPI 网络图; C: GO 富集分析及 KEGG 信号通路富集分析相关气泡图; D: 木犀草素与成软骨相关蛋白 SOX9、COL2A1、ACAN 分子对接可视化图像。

Figure 1 Network pharmacology analysis of the regulation of chondrogenic differentiation by luteolin

A: Intersection VENN diagram of luteolin and chondrogenic differentiation related targets; B: PPI network diagram of intersecting targets; C: Bubble plots related to GO enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis; D: Visualization images of molecular docking between luteolin and chondrogenic associated proteins SOX9, COL2A1, and ACAN.

2.1.3 GO 与 KEGG 通路富集分析与分子对接

GO 富集分析显示,54 个交集靶点涉及 Wnt/ β -catenin 信号通路正向调控及负向调控等生物过程,受体复合体、细胞核区域等细胞成分,蛋白激酶活性、蛋白质磷酸化结合等生物过程。KEGG 富集分析显示,存在 Wnt/ β -catenin 信号通路富集,见图 1C。分子对接显示,木犀草素可以与 PPI 网络中成软骨相关靶点 (ACAN、COL2A1、SOX9) 良好对接,见图 1D。

2.2 实验验证部分

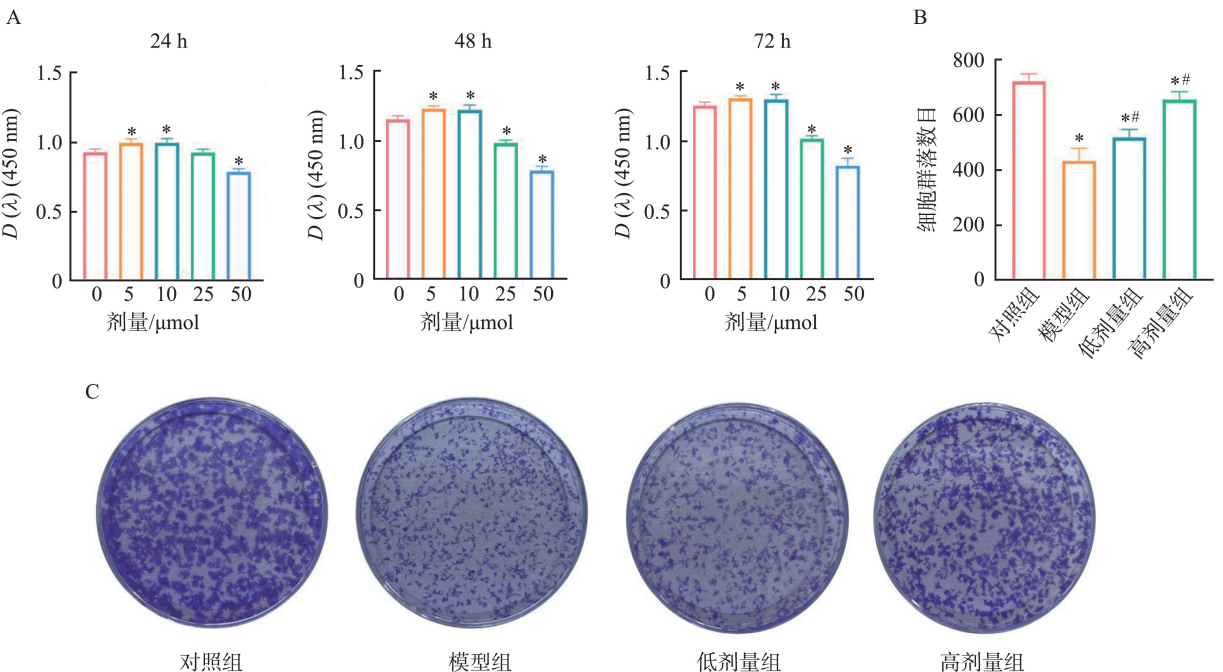
2.2.1 细胞毒性的表达

干预 24 h 后,与木犀草素 0 μmol 相比,木犀草素 5、10 μmol 细胞活性明显上升 ($P < 0.05$),木犀草素

25 μmol 细胞活性未出现明显变化,木犀草素 50 μmol 细胞活性明显下降 ($P < 0.05$)。干预 48、72 h 后,与木犀草素 0 μmol 相比,木犀草素 5、10 μmol 细胞活性明显上升 ($P < 0.05$),木犀草素 25、50 μmol 细胞活性明显下降 ($P < 0.05$)。见图 2A。

2.2.2 各组细胞增殖数量的表达与微团软骨细胞球的构建

与对照组相比,模型组细胞增殖群落数目明显降低 ($P < 0.05$),见图 2B。与模型组相比,低剂量组与高剂量组细胞增殖群落数目明显升高 ($P < 0.05$),见图 2C。在成软骨诱导培育 21 d 后,各组细胞聚集呈现细胞球体形态,见图 2D。



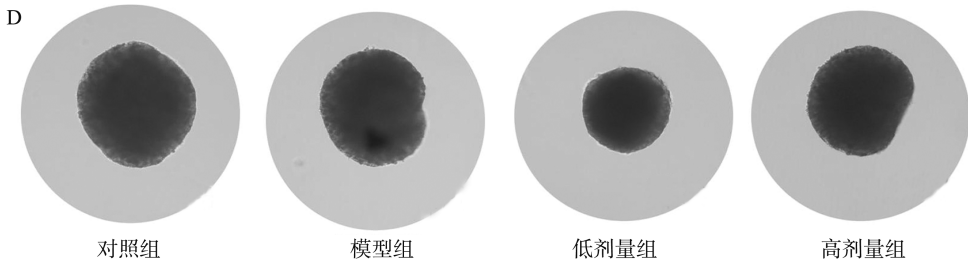


图2 CCK8、细胞增殖的表达及微团软骨细胞球的构建

A: 0、5、10、25、50 μmol 木犀草素干预 BMSCs 24、48、72 h 后细胞的吸光度变化 (* $P < 0.05$ vs. 木犀草素 0 μmol); B: 各组 BMSCs 增殖群落数目变化 (* $P < 0.05$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组); C: 细胞增殖实验细胞群落培养皿外观图; D: 显微镜下的微团软骨细胞球 (100 \times)。

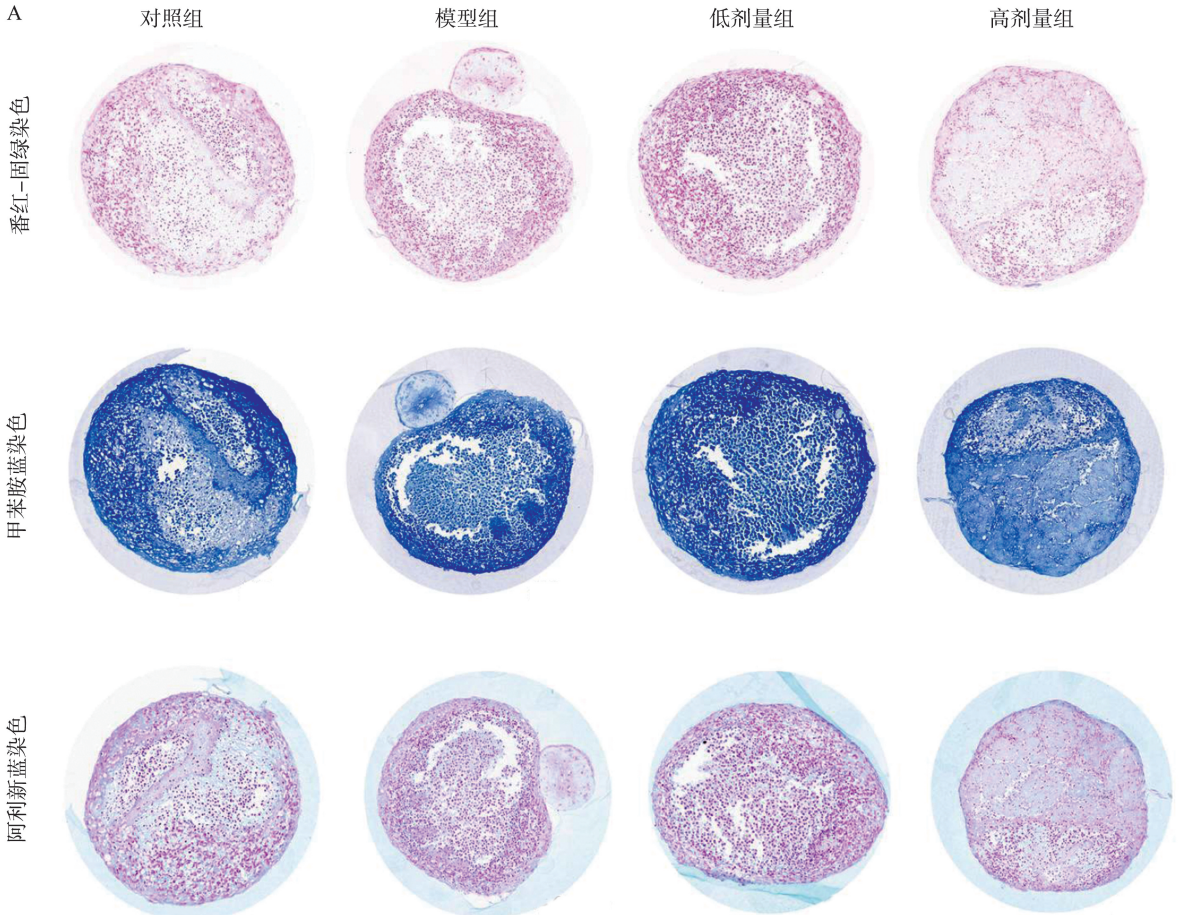
Figure 2 CCK8, Cell proliferation experiment, and construction of micromass chondrocyte sphere

A: Changes in cell absorbance of BMSCs after 24, 48, and 72 hours intervention with 0, 5, 10, 25, 50 μmol of luteolin (* $P < 0.05$ vs. luteolin 0 μmol); B: Changes in the number of BMSC proliferation communities in each group (* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. model group); C: Cell proliferation experiment cell community culture dish appearance image; D: Microscopy image of micromass chondrocyte sphere (100 \times).

2.2.3 微团软骨细胞球组织学染色及成软骨相关基因

番红固绿染色、甲苯胺蓝染色及阿利新蓝染色均可成功着色。与对照组相比,模型组微团软骨细胞球内部细胞排列稀疏且无序。与模型组相比,低剂量组和高剂量组微团软骨细胞球内部细胞排列紧

密有序,见图 3A。与对照组相比,模型组 COL2、SOX9、ACAN mRNA 表达量明显下降($P < 0.05$),与模型组相比,低剂量组和高剂量组 COL2、SOX9、ACAN mRNA 相对表达量明显上升($P < 0.05$),见图 3B。



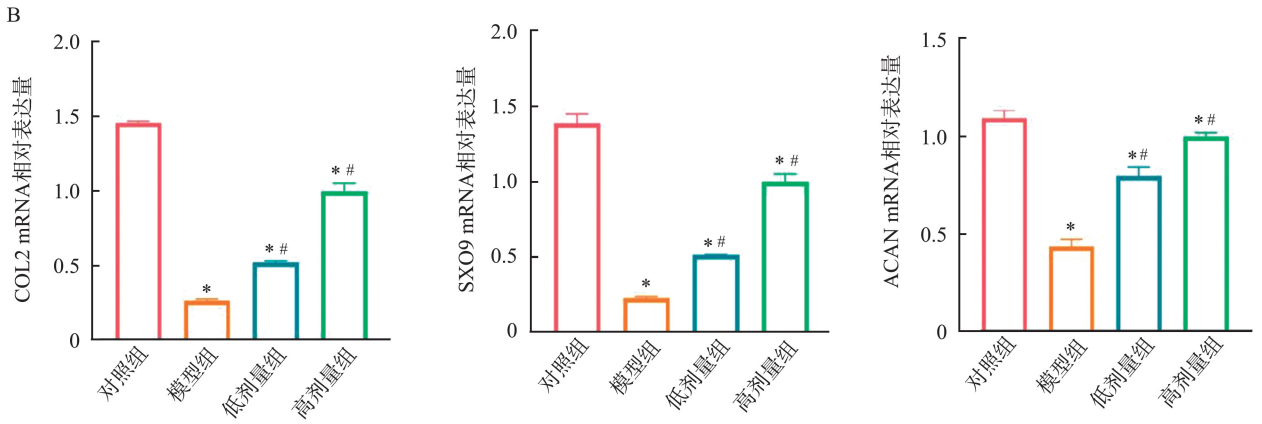


图 3 微团软骨细胞球组织学染色及成软骨相关基因表达

A: 微团软骨细胞球番红固绿、甲苯胺蓝、阿利新蓝染色镜下图像 (200×); B: 各组细胞球成软骨相关基因 COL2、SOX9、ACAN 表达量变化 (* $P < 0.05$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组)。

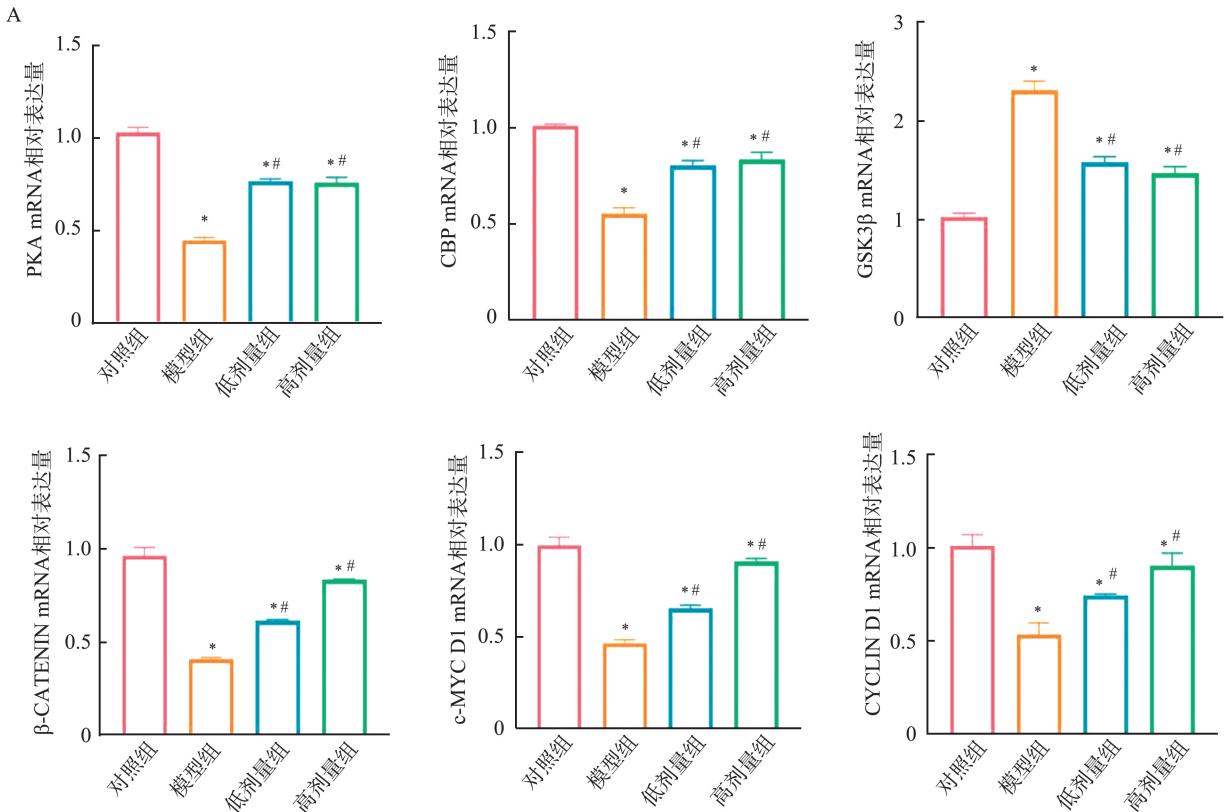
Figure 3 Microscopic staining of chondrocyte spheroids and expression results of chondrogenic related genes

A: Microscopic images of chondrocyte spheroids stained with Safranin-O/Fast green, Toluidine Blue, and Alexin Blue (200×); B: Changes in expression levels of chondrogenic related genes COL2, SOX9, and ACAN in each group of spheroids (* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. model group).

2.2.4 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的 mRNA 及蛋白表达

与对照组相比, 模型组 PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 的 mRNA 及蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$), GSK3 β mRNA 及蛋白表达量

显著上升 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 低剂量组和高剂量组 PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 的 mRNA 及蛋白表达量显著上升 ($P < 0.05$), GSK3 β mRNA 及蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$)。见图 4。



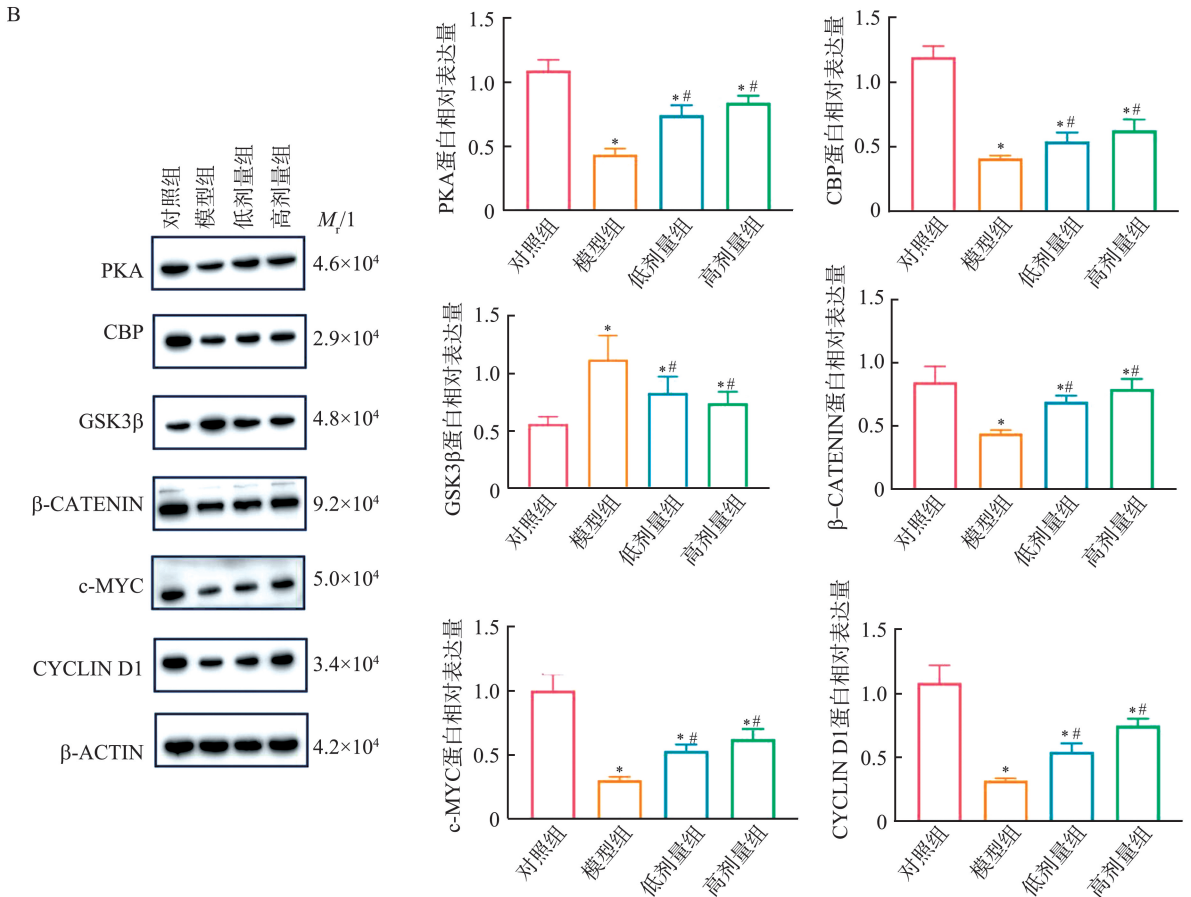


图 4 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的 mRNA 及蛋白的表达

A: PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 及 GSK3 β 的 mRNA 表达量变化差异 (* P <0.05 vs. 对照组; # P <0.05 vs. 模型组); B: PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC、CYCLIN D1 及 GSK3 β 的蛋白表达量条带外观图以及变化差异 (* P <0.05 vs. 对照组; # P <0.05 vs. 模型组)。

Figure 4 Differences in mRNA and proteins expression levels of Wnt/ β -catenin signaling pathway related genes

A: mRNA expression levels of PKA, CBP, β -CATENIN, c-MYC, CYCLIN D1, and GSK3 β (* P <0.05 vs. control group; # P <0.05 vs. model group); B: The appearance of protein expression bands and different protein expression levels of PKA, CBP, β -CATENIN, c-MYC, CYCLIN D1, and GSK3 β (* P <0.05 vs. control group; # P <0.05 vs. model group)。

3 讨论

随着病情的进展,膝关节骨性关节炎患者膝关节疼痛与功能受限不断加重,给患者的日常生活和身心健康造成了一定的影响^[19]。常见的西药类药物治疗膝关节骨性关节炎疗效不稳定且伴有一定的不良反应^[20]。国内外研究表明,天然中药及其活性提取物在治疗膝关节骨性关节炎方面有着显著优势^[21-22]。木犀草素作为天然中药提取的活性成分,在抗炎方面的疗效已被广泛证实^[23]。目前,有关木犀草素是否可以在炎症微环境下通过促进 BMSCs 成软骨分化治疗膝关节骨性关节炎的研究较少。本研究结果显示,5、10 μ mol 木犀草素无明显细胞毒性,且可促进炎症微环境下 BMSCs 的体外增殖。

在正常情况下,软骨组织细胞外基质中含有大量蛋白聚糖,硫酸化糖胺聚糖是其重要的组成部分,番红固绿、甲苯胺蓝、阿利新蓝染液可以与硫酸化糖胺聚糖结合使其着色^[24]。本研究结果显示,微团软骨细胞球均可良好着色,提示 BMSCs 成功地向软骨细胞分化。软骨细胞球组织学染色显示,在炎症微环境下,软骨细胞球内部细胞排列及染色稀疏且无序,表明软骨细胞球中蛋白聚糖减少,加入木犀草素后,这一现象被显著逆转,由此提示,木犀草素可能通过在炎症微环境下促进 BMSCs 成软骨分化增加蛋白聚糖的生成。本研究结果显示,在木犀草素与成软骨分化的 PPI 网络图中存在 COL2A1、SOX9、ACAN 靶点,且三者度值均处于较高位置,靶点可良好对接。此外,在炎症微环境下,微团软骨细胞球中成软骨相关基因 COL2、SOX9、ACAN 显著

下降,而加入木犀草素后三者均显著上升, COL2 在软骨细胞中发挥着重要作用。研究表明, COL2 表达量与软骨细胞的凋亡关系密切,在炎症微环境下,软骨细胞中 COL2 表达量明显下降,软骨细胞凋亡率上升,上调 COL2 的表达可明显降低软骨细胞凋亡率^[25]。COL2 与软骨的发育过程也有密切关系,有研究发现, COL2 突变会导致软骨发育不全^[26]。SOX9 与 ACAN 在 BMSCs 成软骨分化与胶原基质合成的过程中发挥着重要作用^[27-28], SOX9 可上调 COL2 表达,加速 BMSCs 成软骨分化进程^[29], ACAN 对软骨细胞有着重要的保护作用,上调 ACAN 的表达可抑制软骨细胞的炎症改变及凋亡^[30]。本研究结果显示,木犀草素可以上调炎症微环境中 COL2、SOX9 与 ACAN 的表达,提示木犀草素在促进 BMSCs 成软骨分化,抑制软骨细胞其炎症性改变及凋亡的过程中发挥重要作用。

本研究 GO 富集分析发现,存在基因参与 Wnt 信号通路的正向调控和负向调控,在 KEGG 富集分析中发现,存在基因富集于 Wnt/ β -catenin 信号通路。研究表明, Wnt/ β -catenin 信号通路在 BMSCs 分化过程中发挥着重要作用^[31-32]。Wnt 通路激活可促进 BMSCs 的体外增殖,且 β -catenin 可上调 PKA 的表达激活 PKA 位点磷酸化修饰,进而加强 SOX9 磷酸化修饰,促进成软骨分化进程^[33]。PKA、CBP、c-MYC 及 CYCLIN D1 表达量增加及 GSK3 β 表达量降低均提示着 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,在此过程中 β -CATENIN 表达量增加并出现核转位,进而启动下游相关基因的转录^[34]。本研究结果显示,在炎症微环境下, PKA、CBP、 β -CATENIN、c-MYC 及 CYCLIN D1 表达量显著降低, GSK3 β 表达量显著升高,提示在炎症微环境下 Wnt/ β -catenin 信号通路受到抑制,而加入木犀草素后,抑制效果被大幅度减弱,表明木犀草素在炎症微环境下激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路,且此过程可能与 BMSCs 的成骨分化有着密切关系。

综上所述,在炎症微环境下, BMSCs 成软骨分化进程及 Wnt/ β -catenin 信号通路被明显抑制,而木犀草素可以在炎症微环境下激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 BMSCs 成软骨分化,为天然中药提取物木犀草素治疗膝关节骨性关节炎提供一定的理论支持。

参考文献:

- [1] 余皓, 张洙, 李雪萍, 等. 独活寄生汤对膝关节骨性关节炎患者膝关节功能、疼痛及血清炎症因子的影响[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(6): 117-121.
- [2] 王强, 冷燕奎, 钱毓萍, 等. 内服钱氏健膝方联合中药离子导入治疗早期肝肾亏虚型膝关节骨性关节炎的疗效观察[J]. 中国医药科学, 2024, 14(15): 114-117.
- [3] Gong Z, Liu R, Yu W, et al. Acupuncture for knee osteoarthritis relief in the elderly: a systematic review and Meta-analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1868107. doi: 10.1155/2019/1868107
- [4] Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24(1): 15-26.
- [5] 冯晓晴, 蔡道章, 余星磊, 等. 基于 GBD 大数据中国膝关节骨关节炎疾病负担现状与趋势分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(10): 1753-1760. FENG Xiaoqing, CAI Daozhang, YU Xinglei, et al. Analysis of the current status and trends of knee osteoarthritis disease burden in china based on GBD big data [J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(10): 1753-1760.
- [6] 丁文斌, 黄江鸿, 徐伟力, 等. 骨髓间充质干细胞向软骨细胞诱导分化的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(12): 2148-2151. DING Wenbin, HUANG Jianghong, XU Weili, et al. Research progress in induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes [J]. Medical Recapitulate, 2015, 21(12): 2148-2151.
- [7] 孙庆云, 闫振宇. 间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 262-267. SUN Qingyun, YAN Zhenyu. Research progress and applications of mesenchymal stem cells in the repair mechanisms of osteoarthritis [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientiae Sinica, 2021, 29(2): 262-267.
- [8] Chen Y, Chen Y, Zhang S, et al. Parathyroid hormone-induced bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and its repair of articular cartilage injury in rabbits[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2016, 22: 132-145. doi: 10.12659/msmbr.900242
- [9] 程鹏. Wnt 通路在骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化中的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [10] 陈国茜, 申震, 陈柏屹, 等. 消炎散中活血化瘀药含药血清对成软骨诱导下兔骨髓间充质干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路及 SOX9 影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 45-48. CHEN Guoqian, SHEN Zhen, CHEN Boyi, et al. Effects of medicated serum containing blood-activating and stasis-resolving herbs from xiaoyan san on the Wnt/ β -Catenin signaling pathway and SOX9 in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells during chondrogenic in-

- duction [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2020, 31(1): 45-48.
- [11] 陈淇,周淳,齐雪,等.炎症微环境作用下 P38 MAPK 调控 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2024, 21(6): 576-580.
- CHEN Qi, ZHOU Chun, QI Xue, et al. Effect of P38 MAPK regulating the Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under inflammatory microenvironment [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2024, 21(6): 576-580.
- [12] 商岚清.炎症微环境下补正续骨丸对骨髓间充质干细胞成软骨分化的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2024.
- [13] 单鸿哲,齐鹏坤,商岚清,等.中药干预骨髓间充质干细胞成软骨分化治疗膝骨性关节炎研究进展[J/OL]. *实用中医内科杂志*, (2024-03-28) [2025-04-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20240327.1620.005.html>
- SHAN Hongzhe, QI Pengkun, SHANG Lanqing, et al. Research progress in treatment of knee osteoarthritis by chinese medicine intervening chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J/OL]. *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine*, (2024-03-28) [2025-04-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20240327.1620.005.html>
- [14] 杜娟,左非非,魏双艳,等.山楂降脂软胶囊中4种黄酮含量的测定[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(4): 456-459.
- DU Juan, ZUO Feifei, WEI Shuangyan, et al. Determination of content of 4 flavonoids in shanzha jiangzhi soft capsules [J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Science Edition)*, 2017, 52(4): 456-459.
- [15] Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, et al. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 921. doi: 10.3390/ijms17060921
- [16] 周哲人,马训,么焕开,等.柚皮苷和木犀草素联合应用对大鼠 BMSCs 诱导成骨过程中 Wnt/ β -catenin 通路相关基因表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(2): 258-262.
- ZHOU Zheren, MA Xun, YAO Huankai, et al. Effects of combined application of naringin and luteolin on Wnt/ β -Catenin signaling pathway-related gene expression during osteogenic induction of rat BMSCs [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2023, 23(2): 258-262.
- [17] 郭文锦,马金玲,贾斌,等.木犀草素通过 Wnt/ β -catenin 通路抑制 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化[J]. *临床口腔医学杂志*, 2024, 40(10): 579-585.
- GUO Wenjin, MA Jinling, JIA Bin, et al. Luteolin inhibits differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts via the Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2024, 40(10): 579-585.
- [18] Zhang L, Su P, Xu C, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(9): 1339-1346.
- [19] 陈扬,周中.基于中药治疗的膝关节骨性关节炎抗炎机制研究进展[J]. *张江科技评论*, 2024(3): 123-125.
- [20] 韩升龙,孔令俊,李万潭,等.中药单体及复方干预膝关节骨性关节炎疼痛相关信号通路研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(10): 1490-1495.
- HAN Shenglong, KONG Lingjun, LI Wantan, et al. Research progress in intervening pain-related signaling pathways of knee osteoarthritis by chinese medicine monomers and compounds [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2023, 29(10): 1490-1495.
- [21] 邱云开.神金软膏外敷联合股四头肌增强训练治疗轻中度膝关节骨性关节炎的疗效观察[D].南京:南京中医药大学,2024.
- [22] 周宇.加味曲直汤治疗膝关节骨性关节炎的作用机制研究[D].南京:南京中医药大学,2024.
- [23] 顾佳珂.铈-木犀草素纳米复合物通过抗氧化及免疫调节用于炎症相关疾病的治疗研究[D].扬州:扬州大学,2024.
- [24] 胡涂.镁通过调控巨噬细胞极化影响间充质干细胞软骨分化的研究[D].上海:上海交通大学,2018.
- [25] 贺自克,王上增.淫羊藿苷通过 miR-29c/COL2A1 轴改善骨关节炎软骨细胞功能[J/OL]. *重庆医科大学学报*, (2024-12-10) [2025-04-21]. <https://doi.org/10.13406/j.cnki.cyxh.003644>
- HE Zike, WANG Shangzeng. Icaritin improves chondrocyte function in osteoarthritis via the miR-29c/COL2A1 axis [J/OL]. *Journal of Chongqing Medical University*, 1-10 [2025-04-21]. <https://doi.org/10.13406/j.cnki.cyxh.003644>
- [26] 张铂彦.基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 COL2A1 基因突变所致软骨发育不全疾病猪模型[D].长春:吉林大学,2020.
- [27] Haseeb A, Kc R, Angelozzi M, et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(8): e2019152118.
- [28] 朱春晖,刘刚,陈伟,等.虾青素调控 tRF-ValAAC 对骨关节炎软骨细胞生物学功能的影响及其机制[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2024, 17(10): 921-930.
- ZHU Chunhui, LIU Gang, CHEN Wei, et al. Effects and mechanism of astaxanthin regulating tRF-ValAAC on the biological functions of chondrocytes in osteoarthritis

- [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Surgery, 2024, 17(10): 921-930.
- [29] Unguryte A, Bernotiene E, Bagdonas E, et al. Human articular chondrocytes with higher aldehyde dehydrogenase activity have stronger expression of COL2A1 and SOX9 [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(5): 873-882.
- [30] 吴泉, 胡静, 李章华. miR-148a-3p 对软骨细胞炎性和凋亡的影响及其机制[J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(8): 1008-1016.
- WU Xiao, HU Jing, LI Zhanghua. Effects and mechanism of miR-148a-3p on inflammation and apoptosis of chondrocytes [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2024, 55(8): 1008-1016.
- [31] Buchtova M, Oralova V, Aklia A, et al. Fibroblast growth factor and canonical WNT/ β -catenin signaling cooperate in suppression of chondrocyte differentiation in experimental models of FGFR signaling in cartilage[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(5): 839-850.
- [32] 闫小龙, 秦英, 邵将, 等. 姜黄素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控骨形成的机制[J]. 山东大学学报(医学版), 2024, 62(10): 76-86.
- YAN Xiaolong, QIN Ying, SHAO Jiang, et al. Mechanism of curcumin regulating bone formation via the Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. Journal of Shandong University (Medical Science Edition), 2024, 62(10): 76-86.
- [33] Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(1): 80-89.
- [34] Zhao CB, Li JC, Guo C, et al. An investigation of the potential mechanism of curcumin to regulate osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway based on network pharmacology and experimental validation[J]. J Biol Reg Homeos Ag, 2023, 37(9): 4663-4673.

(编辑:徐苗蓁)

(上接第 10 页)

- [13] 鲁端. 左间隔分支传导阻滞的再认识[J]. 心电与循环杂志, 2016, 35(5): 313-319.
- LU Duan. Recognition of left septal branch block [J]. Journal of Electrocardiology and Circulation, 2016, 35(5): 313-319.
- [14] 郭继鸿, 田轶伦. 间隔支的解剖与心电图[J]. 心电学杂志(电子书), 2013, 2(1): 4-9.
- GUO Jihong, TIAN Yilun. Anatomy and electrocardiogram of septal branch [J]. Journal of Electrocardiology (e-book), 2013, 2(1): 4-9.
- [15] 李春山. 心电向量图入门[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2012: 15-27.
- [16] Tomcsanyi J, Paulik R, Fresz T. Acute coronary syndrome with tall R waves and inverted T waves in the precordial leads; an ignored entity [J]. Circulation, 2021, 143(4): 397-400.
- [17] Chou TC, Helm RA, Estes EH. Clinical vectorcardiography[M]. Second Edition. New York: A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1974: 160-168.
- [18] 潘月, 潘登, 潘二明, 等. 左后分支阻滞的心电向量图分析[J]. 实用心电学杂志, 2015, 24(5): 358-368.
- PAN Yue, PAN Deng, PAN Erming, et al. Vectorcardiogram analysis of left posterior branch block [J]. Journal of Practical Electrocardiology, 2015, 24(5): 358-368.
- [19] 牟延光. 心电图精要解析与临床应用[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2021: 300-308.
- [20] 潘月, 潘登, 潘二明, 等. 急性右室心肌梗死的心电向量图观察[J]. 实用心电学杂志, 2015, 24(2): 138-148.
- PAN Yue, PAN Deng, PAN Erming, et al. Electrocardiogram observation of acute right ventricular myocardial infarction [J]. Journal of Practical Electrocardiology, 2015, 24(2): 138-148.
- [21] 张开滋, 郭继鸿, 刘海祥, 等. 临床心电信息学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2002: 1002-1013.
- [22] 苏娜, 魏太星, 张延荣, 等. Frank 导联心向量图对室性异位激动定位的研究[J]. 中华心血管病杂志, 1989, 17(3): 143-145.

(编辑:徐苗蓁)