

# 巴戟天多糖通过靶向 lncRNA XIST 调控糖酵解-焦亡延缓小鼠骨关节炎软骨细胞退变

付长龙<sup>1,2</sup>, 陈若岚<sup>1</sup>, 徐诗淇<sup>3</sup>, 游锦欣<sup>1</sup>, 林 晴<sup>3</sup>, 黄艳峰<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122; <sup>3</sup>福建中医药大学中医骨伤学院, 福建 福州 350122

**摘要:**目的 探讨巴戟天多糖(MOP)延缓骨关节炎(OA)软骨细胞退变的作用机制。方法 提取4周龄C57BL/6小鼠软骨细胞,经纯化培养、鉴定后,采用白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导软骨细胞退变模型,随机将细胞分为对照组、IL-1 $\beta$ 、MOP-L(1、2、4、6、8、10 mg/mL)组,通过CCK-8法筛选MOP最佳干预条件;Western blotting检测MOP不同剂量对丙酮酸激酶M2(PKM2)、半胱天冬酶1(caspase-1)和消皮素D(GSDMD)的蛋白表达;采用荧光原位杂交技术(FISH)法观察各组软骨细胞中lncRNA XIST的表达;对lncRNA XIST进行过表达与敲减,随机将细胞分为Control、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ +MOP、IL-1 $\beta$ +oe/sh-XIST、IL-1 $\beta$ +oe/sh-XIST+MOP组,采用real-time PCR检测各组软骨细胞糖酵解调控因子葡萄糖转运体1(GLUT1)、己糖激酶2(HK2)、PKM2、乳酸脱氢酶A(LDHA)、6磷酸果糖2-脱氢酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3)、焦亡调控因子核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3(NLRP3)、caspase-1、GSDMD的mRNA水平;流式细胞术观察各组软骨细胞的凋亡率;甲苯胺蓝染色观察各组软骨细胞糖胺聚糖表达情况;Western blotting检测各组软骨细胞糖酵解和焦亡调控因子蛋白表达。结果 镜下结果显示,第2代软骨细胞状态良好,II型胶原蛋白染色呈阳性表达,IL-1 $\beta$ 诱导后,细胞数量稍减,触角增多并皱缩,II型胶原蛋白着色减少,PKM2、caspase-1和GSDMD蛋白表达增加;当MOP不同剂量干预退变软骨细胞后,其活力值增加,以MOP-M(4 mg/mL)干预24 h最明显,且PKM2、caspase-1和GSDMD蛋白表达降低( $P<0.05$ )。lncRNA XIST主要分布在软骨细胞核中,与对照组相比较,IL-1 $\beta$ 组的软骨细胞lncRNA XIST荧光表达增加;与IL-1 $\beta$ 组相比较,IL-1 $\beta$ +MOP组和MOP组软骨细胞lncRNA XIST荧光表达减少;与IL-1 $\beta$ +MOP组相比较,MOP组软骨细胞lncRNA XIST荧光表达减少( $P<0.05$ )。lncRNA XIST过表达后促进糖酵解和焦亡相关因子的mRNA及蛋白表达( $P<0.05$ ),且与IL-1 $\beta$ 刺激具有协同效应。MOP干预可逆转IL-1 $\beta$ 或IL-1 $\beta$ +oe-XIST诱导的上述因子表达上调( $P<0.05$ )。当lncRNA XIST敲减后能抑制软骨细胞凋亡和软骨细胞糖胺聚糖的表达,降低糖酵解(HK2、PKM2、PFKFB3)和焦亡(caspase-1、NLRP3、GSDMD)蛋白表达( $P<0.05$ ),MOP干预显示出与XIST敲减相似的保护效果,当两者联合使用时效果更明显( $P<0.05$ )。结论 本研究表明MOP通过靶向lncRNA XIST调控糖酵解-焦亡,显著抑制IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞退变,为OA治疗提供新策略。

**关键词:**巴戟天多糖;骨关节炎;退变软骨细胞;细胞焦亡;糖酵解;lncRNA XIST

## *Morinda officinalis* polysaccharide delays osteoarthritis mouse chondrocyte degeneration by modulating the glycolysis-pyroptosis axis via targeting the lncRNA XIST

FU Changlong<sup>1,2</sup>, CHEN Ruolan<sup>1</sup>, XU Shiqi<sup>3</sup>, YOU Jinxin<sup>1</sup>, LIN Qing<sup>3</sup>, HUANG Yanfeng<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Integrative Medicine, School of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; <sup>2</sup>Fujian Provincial Key Laboratory of Integrative Medicine for Geriatric Diseases, Fuzhou 350122, China; <sup>3</sup>College of Traditional Chinese Medicine Orthopedics, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which *Morinda officinalis* polysaccharide (MOP) delays osteoarthritis chondrocyte degeneration. **Methods** In primary cultures of chondrocytes from 4-week-old C57BL/6 mice, the effects of IL-1 $\beta$  and MOP treatment at different concentrations on cell viability were assessed with CCK-8 assay. The treated cells were examined for protein expressions of PKM2, caspase-1, and GSDMD using Western blotting and for XIST expression using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In IL-1 $\beta$ -induced mouse chondrocytes, the effects of MOP, transfection for XIST overexpression or knockdown, and MOP treatment after the transfection were tested by detecting mRNA levels of GluT1, HK2, PKM2, LDHA, PFKFB3, NLRP3, caspase-1, and GSDMD; flow cytometry, Western blotting, and toluidine blue staining were used to analyze chondrocyte apoptosis, expressions of glycolysis and pyroptosis regulators, and glycosaminoglycan expression. **Results** The second-passage chondrocytes showed good viability and positive collagen II staining. IL-1 $\beta$  induction caused degenerative morphological changes of the cells, decreased collagen II expression, and upregulated cellular expressions of PKM2, caspase-1, and GSDMD proteins. MOP treatment (especially at 4 mg/mL) significantly enhanced cell viability and reduced HK2, PKM2, caspase-1 and GSDMD expressions in IL-1 $\beta$ -induced mouse chondrocytes. XIST was localized predominantly in the nuclei of the chondrocytes, and its expression increased significantly in IL-1 $\beta$ -treated cells, and was

attenuated by MOP treatment. XIST overexpression synergized with IL-1 $\beta$  to upregulate mRNA and protein expressions of glycolysis- and pyroptosis-related factors in the chondrocytes, and such effects were obviously attenuated by MOP. Conversely, XIST knockdown significantly inhibited chondrocyte apoptosis and glycosaminoglycan expression, and down-regulated glycolysis- and pyroptosis-related proteins. MOP treatment exhibited similar protective effects to XIST

收稿日期:2025-06-17

基金项目:国家自然科学基金(82474532);福建省中青年骨干教师教育科研项目(JAT231042);福建省自然科学基金(2024J01138);福建中医药大学校管课题(X2023024)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82474532).

作者简介:付长龙,副研究员,E-mail: 993001232@qq.com

通信作者:黄艳峰,博士,副教授,E-mail: banglongnet@126.com

knockdown, and their combination significantly augmented these protective effects. **Conclusions** MOP mitigates IL-1 $\beta$ -induced mouse chondrocyte degeneration by modulating glycolysis and pyroptosis via targeting XIST.

**Keywords:** *Morinda officinalis* polysaccharide; osteoarthritis; degenerated chondrocytes; pyroptosis; glycolysis; lncRNA XIST

骨关节炎(OA)是一种常见的退行性关节疾病,以关节软骨进行性破坏、滑膜炎症和骨赘形成为主要病理特征<sup>[1,2]</sup>。随着全球人口老龄化加剧,OA发病率逐年攀升,已成为导致中老年人残疾的首要病因之一<sup>[3]</sup>。然而,目前仍缺乏有效阻止或逆转软骨退变的靶向药物<sup>[4]</sup>。因此,深入探索OA发病机制、寻找新型治疗靶点具有重要的临床意义。

近年来,软骨细胞代谢紊乱和程序性死亡在OA发病中的作用日益受到关注,其中糖酵解和焦亡的异常激活被认为是导致软骨退变的关键环节<sup>[5-9]</sup>。糖酵解是软骨细胞能量代谢的主要途径,其异常激活与OA进展密切相关<sup>[5-7]</sup>。研究表明<sup>[10,11]</sup>,在OA病理环境下,软骨细胞表现为糖酵解激活状态,关键限速酶如己糖激酶2(HK2)、丙酮酸激酶M2型(PKM2)和乳酸脱氢酶A(LDHA)表达显著上调,导致大量乳酸堆积和细胞外基质降解。与此同时,焦亡作为一种新型的程序性细胞死亡方式,通过核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体激活半胱天冬酶1(caspase-1),进而切割消蛋白D(GSDMD)形成质膜孔道,促进白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等促炎因子的释放,加剧软骨退变<sup>[12]</sup>。本课题组前期已证明糖酵解和焦亡分别参与OA病程<sup>[13-15]</sup>。但值得注意的是,糖酵解与焦亡之间存在复杂的交互调控关系,糖酵解中间代谢产物可直接激活NLRP3炎症小体,而焦亡引发的炎症反应又可进一步促进糖酵解,形成恶性循环<sup>[16]</sup>。

长链非编码RNA(lncRNA)作为表观遗传调控的重要参与者,在多种疾病中发挥关键作用,X染色体失活特异转录本(XIST)是最早发现的lncRNA之一,其在代谢性疾病和炎症反应中具有重要调控功能<sup>[17]</sup>。我们的前期研究表明,XIST在OA软骨组织中显著高表达,且与疾病严重程度呈正相关<sup>[18]</sup>。而在癌症、心肌炎等疾病中,XIST分别参与了糖酵解和焦亡机制过程<sup>[19,20]</sup>,但其在OA软骨细胞糖酵解-焦亡中的具体作用机制尚未见报道。巴戟天具有补肾阳、强筋骨、祛风湿功效,是用于治疗OA软骨退变的高频次用药,其活性成分巴戟天多糖(MOP)已被证实具有抗炎、抗氧化和软骨保护作用<sup>[21-23]</sup>。最新研究表明,MOP能够通过激活SIRT6来抑制NF- $\kappa$ B信号通路,从而有效减轻IL-1 $\beta$ 诱导炎症反应,从而抑制细胞外基质(ECM)的降解,最终延缓OA的疾病进展<sup>[24]</sup>。但MOP是否能通过调控XIST介导的糖酵解-焦亡发挥软骨保护作用,仍需进一步阐明。

因此,本研究拟采用IL-1 $\beta$ 诱导小鼠软骨细胞退变

模型,通过real-time PCR、Western blotting、慢病毒过表达/敲减等明确MOP对退变软骨细胞的最佳干预浓度;揭示XIST在IL-1 $\beta$ 诱导的糖酵解-焦亡中的调控作用;验证MOP通过靶向XIST调控糖酵解-焦亡通路的分子机制。本研究旨在阐明OA发病机制提供新的理论依据,为MOP临床靶向治疗OA提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本研究选用30只4周龄SPF级C57BL/6雄性小鼠[上海斯莱克实验动物有限公司,SCXK(沪)2022-0004]提取原代软骨细胞。所有实验动物在福建中医药大学实验动物中心[SYXK(闽)2019-0007]标准化饲养,环境条件严格控制在12h光照/黑暗循环、21~22℃恒温,每笼饲养5只。本实验方案已通过福建中医药大学动物伦理委员会审批(伦理批号:FJTCM IACUC 1N2024113)。

### 1.2 试剂

MOP(上海融禾医药公司);异氟烷(瑞沃德);IL-1 $\beta$ (Sigma);CCK8试剂盒(Abbkine);RNA提取试剂盒(天根生化);逆转录试剂盒(Vazyme);4%多聚甲醛(博士德);蛋白提取试剂盒(艾德莱);免疫组化试剂盒(凯基);Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒(Thermo Fisher);HK2、PKM2、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD、GAPDH抗体(Proteintech);IgG(H+L)HRP(wanleibio);ECL化学发光液(lablead);空白培养基(赛业生物)。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub>恒温培养箱(上海一恒科技);流式细胞仪(Biolegend);实时荧光定量PCR仪、成像系统、电泳仪(Bio-RAD);激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss);全自动酶标仪(BIO-TEK)。

### 1.4 方法

1.4.1 原代软骨细胞提取与鉴定 选取4周龄SPF级C57BL雄性小鼠30只,10只/批次,分3批次提取原代软骨细胞:小鼠在5%异氟烷持续麻醉状态下脱颈处死,截取膝关节在超净台逐层分离膝关节皮肤、肌肉,离断内外副侧韧带暴露膝关节,无菌刀片剥离股骨、胫骨平台处透明软骨,加入0.5% II型胶原酶进行分3次消化裂解。软骨细胞经差数贴壁纯化培养后,选取状态良好的细胞进行II型胶原蛋白免疫细胞化学染色鉴定:细胞经4%多聚甲醛固定,0.1%曲拉通透膜,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10 min,滴加5% BSA室温封闭30 min,滴加1:200稀释的II型胶原蛋白一抗4℃过夜孵育,二抗室温孵育后加

入DAB显色封片处理。

1.4.2 退变软骨细胞模型诱导 参照前期研究<sup>[25]</sup>,采用IL-1 $\beta$  10 ng/mL干预24 h诱导成退变软骨细胞模型。

1.4.3 CCK-8法筛选MOP干预条件 将诱导后的软骨细胞随机分为对照组(空白培养基)、IL-1 $\beta$ 组(空白培养基+IL-1 $\beta$  10ng/mL)、MOP组(空白培养基+IL-1 $\beta$  10 ng/mL+MOP-1、2、4、6、8、10 mg/mL),时间设为12、24、36、48 h,干预结束每孔加入CCK-8试剂10  $\mu$ L,培养箱内反应4 h后使用酶标仪检测吸光度 $A_{450nm}$ 值。

1.4.4 Western blotting法检测MOP不同剂量对糖酵解蛋白PKM2和焦亡蛋白caspase-1、GSDMD的影响 诱导后的软骨细胞经MOP不同剂量干预后,提取总蛋白并使用BCA法测定浓度。取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳并转至PVDF膜,经5%脱脂牛奶封闭后,于4  $^{\circ}$ C孵育一抗(GAPDH 1:5000;PKM2、caspase-1、GSDMD 1:1000)过夜。随后室温孵育HRP标记的二抗(1:5000)1 h,ECL化学发光显影。采用凝胶成像系统采集图像,并通过Image J软件对条带进行灰度值分析。

1.4.5 FISH法检测MOP对IL-1 $\beta$ 诱导后软骨细胞lncRNA XIST表达的影响 选择DIG标记的lncRNA XIST探针并通过北京百奥莱博科技有限公司(www.generalbiol.com)合成。将软骨细胞固定于载玻片,4%多聚甲醛固定1 h后用蛋白酶K消化2 h;随后进行预杂交和探针杂交(含500 nmol/L DIG-XIST探针,42  $^{\circ}$ C过夜);依次用2 $\times$ 、1 $\times$ 和0.5 $\times$ SSC缓冲液梯度洗涤;接着用抗DIG-HRP抗体(室温30 min)和CY3-TSA(避光5 min)进行信号放大;最后用DAPI染核,封片后在荧光显微镜下观察。

1.4.6 构建lncRNA XIST过表达/敲减的小鼠软骨细胞模型 本研究中的慢病毒由Zolgene Biotechnology包装,使用oe/sh-XIST感染小鼠软骨细胞。将软骨细胞以5 $\times$ 10<sup>4</sup>/孔的密度接种于6孔板,待细胞汇合度达70%~80%时,设置感染复数(MOI)梯度(2、4、8、16、32),分别加入相应滴度的慢病毒颗粒和终浓度8  $\mu$ g/mL的聚凝胺,用无血清DMEM补足至1 mL,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下感染6 h后更换为含10% FBS的完全DMEM培养基继续培养过夜;转染50 h后,确认转染条件。

1.4.7 分组与干预 诱导后的软骨细胞随机分为对照组(空白血清)、IL-1 $\beta$ 组(空白血清+IL-1 $\beta$  10 ng/mL)、MOP组(空白血清+IL-1 $\beta$  10 ng/mL+MOP最佳药效剂量)、oe/sh-XIST组(空白血清+IL-1 $\beta$  10 ng/mL+oe/sh-XIST)、oe/sh-XIST+MOP组(空白血清+IL-1 $\beta$  10 ng/mL+oe/sh-XIST+MOP最佳药效剂量),干预24 h。

1.4.8 流式细胞术检测各组软骨细胞凋亡情况 软骨细胞经胰蛋白酶消化后离心收集,用PBS洗涤并重悬至1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL,取100  $\mu$ L细胞悬液加入Annexin V-FITC和

PI混合染料避光孵育10 min,随后加入400  $\mu$ L 1 $\times$ 结合缓冲液终止染色,采用流式细胞仪上机检测。

1.4.9 甲苯胺蓝染色观察各组软骨细胞糖胺聚糖的表达情况 软骨细胞爬片经PBS漂洗后,4%多聚甲醛固定30 min;滴加0.1%甲苯胺蓝染液(pH 2.5)覆盖细胞,室温染色5 min;随后加入等体积蒸馏水混匀(终浓度降至0.05%),继续染色15 min;双蒸水快速冲洗终止反应,100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察软骨基质蓝紫色异染现象。

1.4.10 实时荧光定量PCR检测各组软骨细胞GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD的mRNA水平变化 采用Trizol法提取软骨细胞总RNA后,参照PrimeScript RT试剂盒说明书进行cDNA合成。使用SYBR Green qPCR预混试剂,在实时荧光定量PCR仪上按以下程序进行扩增:预变性94  $^{\circ}$ C 5 min;随后进行32个循环的扩增(94  $^{\circ}$ C 10 s,55  $^{\circ}$ C 15 s,72  $^{\circ}$ C 10 s);最后72  $^{\circ}$ C延伸5 min。所有基因引物序列(表1)均由福州沃森生物技术有限公司合成,以GAPDH作为内参基因,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算目的基因的相对表达量。

表1 PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primer sequences	Product length (bp)
GLUT1	F:5'-ACCATCTTGGAGCTGTTCCG-3' R:5'-GCCTTCTCGAAGATGCTCGT-3'	131
HK2	F:5'-CCAGAGCATCCTCCTCAAGT-3' R:5'-GGTCTTCATAGCCACAAGTCATC-3'	173
PKM2	F:5'-AGGCTGCCATCTACCACTTG-3' R:5'-CCAGACTTGGTGAGCACGAT-3'	148
LDHA	F:5'-CAGACTTGGCTGAGAGCATAATG-3' R:5'-CCTTCACAACATCCGAGATTCC-3'	147
PFKFB3	F:5'-CAGGATCTTGTCCAACGCCT-3' R:5'-AGGCTAGTAGGCAGCGTAGA-3'	103
NLRP3	F:5'-TCCCAGACACTCATGTTGCC-3' R:5'-GTCCAGTTCAGTGAGGCTCC-3'	116
Caspase-1	F:5'-ACTGACTGGGACCCTCAAGT-3' R:5'-GCAAGACGTGTACGAGTGGT-3'	111
GSDMD	F:5'-TTAATTGAGGCGGCAGACTTC-3' R:5'-CGATGTTACCAGTATCTGTTGT-3'	109
GAPDH	F:5'-TGGAAAGCTGTGGCGTGATG-3' R:5'-TACTTGGCAGTTTCTCCAGG-3'	189

1.4.11 Western blotting检测各组软骨细胞HK2、PKM2、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD的蛋白表达情况 实验步骤除孵育一抗外,其余步骤均同方法1.4.4:取20  $\mu$ g蛋白样品进行SDS-PAGE电泳并转膜,封闭后分别加入针对目标蛋白(HK2、PKM2、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD)与内参

(GAPDH)的一抗于4℃孵育过夜,随后按常规流程进行。

### 1.5 统计学分析

本研究使用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料根据正态性检验结果分别采用不同的描述方式:符合正态分布的数据以均数±标准差呈现,非正态分布数据则采用中位数表示。组间比较采用单因素方差分析,对于方差分析结果有统计学意义的指标,根据方差齐性检验结果选择LSD-*t*检验(方差齐时)或Games-Howell检验(方差不齐时)进行事后多重比较。所有统计检验均采用双侧检验,当 $P<0.05$ 认为

差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 软骨细胞培养、造模与鉴定

原代软骨细胞培养8 d后,细胞贴壁生长,聚集重叠,以梭形和椭圆形多见,大小不等;传代培养后,第2代软骨细胞状态较好,表现为细胞形态较规则,边界清楚,胞浆丰富,呈“铺路石”状;II型胶原蛋白免疫细胞化学染色后胞浆呈棕黄色,阴性对照组胞浆不着色;IL-1 $\beta$ 诱导24 h后,软骨细胞数量稍减,触角增多并皱缩,II型胶原蛋白着色减少(图1)。

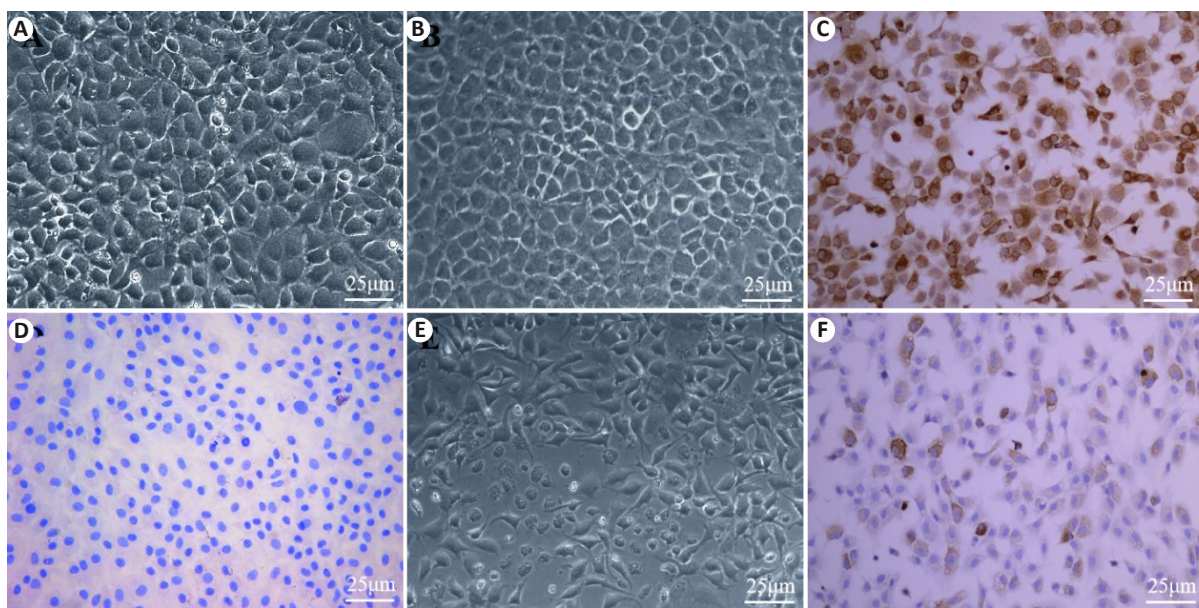


图1 软骨细胞培养、诱导与鉴定

Fig. 1 Primary culture, induction, and identification of mouse chondrocytes. A: Morphology of primary chondrocytes. B: Morphology of the second-passage chondrocytes. C: Positive expression of collagen II protein. D: Negative expression of collagen II protein. E: Morphology of chondrocytes induced by IL-1 $\beta$ . F: IL-1 $\beta$  induces positive expression of collagen II protein.

### 2.2 MOP最佳干预条件

**2.2.1 MOP时效量效筛选** CCK-8结果显示:在时效关系方面,对照组软骨细胞活力随培养时间延长呈小幅上升趋势;12 h内,各实验组间细胞活力差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与对照组相比,经IL-1 $\beta$ 诱导24、36及48 h后,软骨细胞活力均出现下降( $P<0.05$ ),其中24 h下降幅度最为明显,此后趋于稳定。在量效关系方面,与IL-1 $\beta$ 组相比,不同浓度MOP(4、6、8 mg/mL)处理24、36 h均能提升细胞活力,48 h后其活力值减小( $P<0.05$ ),4 mg/mL MOP干预24 h的效果最为明显(图2)。

**2.2.2 MOP不同剂量对糖酵解相关蛋白PKM2和焦亡蛋白caspase-1、GSDMD的表达影响** Western blotting结果显示:与对照组相比较,IL-1 $\beta$ 组糖酵解相关蛋白PKM2和焦亡相关蛋白caspase-1、GSDMD蛋白表达增加( $P<0.05$ );与IL-1 $\beta$ 组相比较,MOP-2、4、6、8组

PKM2、caspase-1和GSDMD蛋白表达降低,以MOP-4组尤为明显,因此,后续实验将以MOP(4 mg/mL)作为干预条件( $P<0.05$ )(图3)。

### 2.3 MOP对IL-1 $\beta$ 诱导后的软骨细胞中lncRNA XIST的表达影响

FISH结果显示:lncRNA XIST主要分布在软骨细胞核中,与对照组相比较,IL-1 $\beta$ 组的软骨细胞lncRNA XIST荧光表达增加( $P<0.05$ );与IL-1 $\beta$ 组相比较,IL-1 $\beta$ +MOP组和MOP组软骨细胞lncRNA XIST荧光表达减少( $P<0.05$ );IL-1 $\beta$ +MOP组相比较,MOP组软骨细胞lncRNA XIST荧光表达减少( $P<0.05$ ,图4)。

**2.4 MOP对IL-1 $\beta$ 诱导后lncRNA XIST过表达软骨细胞中糖酵解调控因子GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3和焦亡调控因子NLRP3、caspase-1、GSDMD的mRNA水平影响**

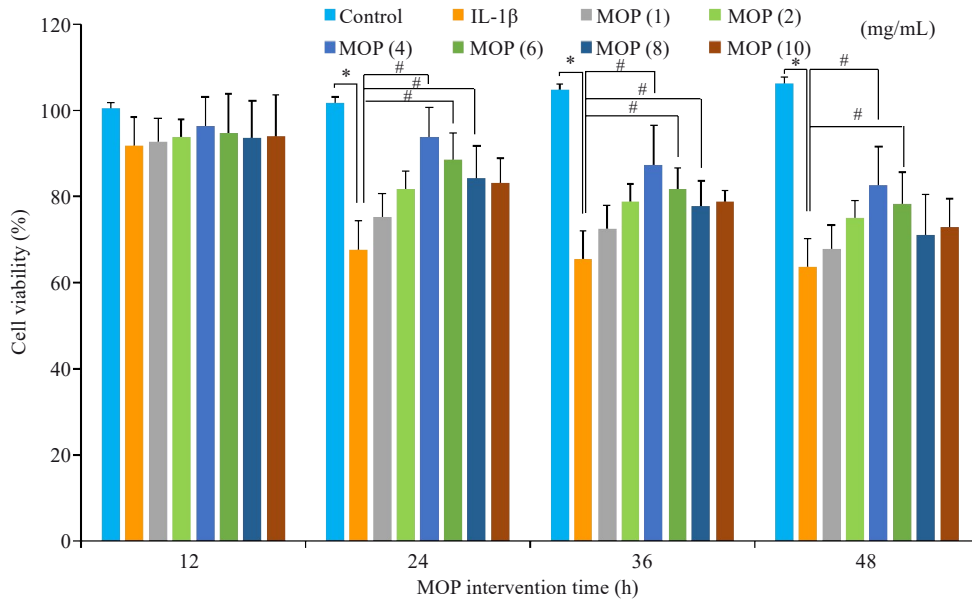


图2 MOP时效量效的筛选

Fig. 2 Screening for the optimal MOP concentration and treatment time in mouse chondrocytes. All experiments were repeated at least 3 times if not specified otherwise. Data are presented as Mean±SD (n=6). \*P<0.05, #P<0.05.

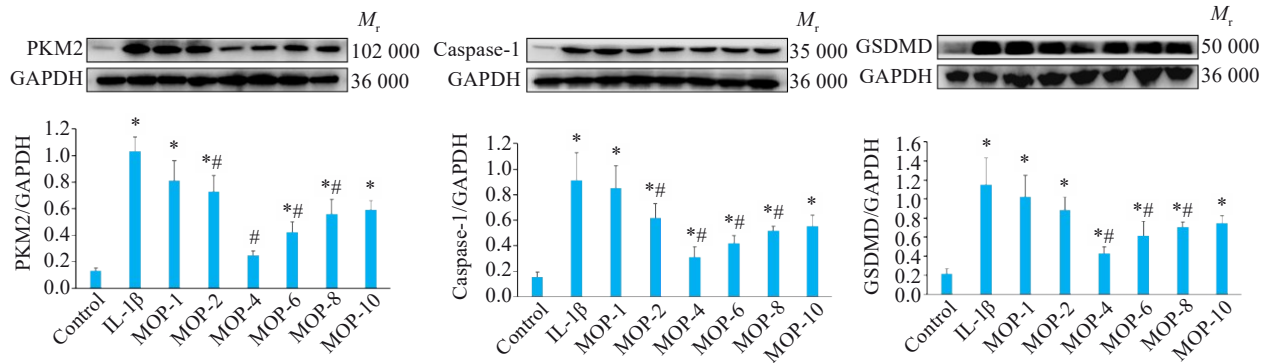


图3 MOP不同剂量对PKM2、caspase-1和GSDMD的蛋白表达影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of MOP on protein expressions of PKM2, caspase-1 and GSDMD in mouse chondrocytes. Data are presented as Mean±SD (n=3). \*P<0.05 vs Control group, #P<0.05 vs IL-1β group.

real-time PCR 结果显示:与对照组相比较,IL-1β组和IL-1β+oe-XIST组糖酵解相关调控因子 GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3 和焦亡相关调控因子 NLRP3、caspase-1、GSDMD 的 mRNA 水平升高 ( $P<0.05$ );与IL-1β组相比较,IL-1β+MOP组 GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的 mRNA 水平降低 ( $P<0.05$ );与IL-1β+oe-XIST组相比较,IL-1β+oe-XIST+MOP组 GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的 mRNA 水平降低 ( $P<0.05$ ,图5)。

### 2.5 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST过表达软骨细胞中HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达影响

Western blotting结果显示:与对照组相比较,IL-1β组和IL-1β+oe-XIST组HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD 的蛋白表达升高 ( $P<0.05$ );与IL-1β组相比较,IL-1β+MOP组 HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD 的蛋白表达降低 ( $P<0.05$ );

与IL-1β+oe-XIST组相比较,IL-1β+oe-XIST+MOP组 HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD 的蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,图6)。

### 2.6 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞凋亡影响

Annexin V-FITC/PI 双染流式结果显示:与对照组相比较,IL-1β组软骨细胞凋亡率升高 ( $P<0.05$ );与IL-1β组相比较,IL-1β+MOP和IL-1β+sh-XIST组软骨细胞凋亡率降低 ( $P<0.05$ );与IL-1β+sh-XIST组相比较,IL-1β+sh-XIST+MOP组软骨细胞凋亡率降低 ( $P<0.05$ ,图7)。

### 2.7 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞糖胺聚糖的影响

染色结果显示:与对照组相比较,IL-1β组软骨细胞糖胺聚糖表达降低;与IL-1β组相比较,IL-1β+MOP和IL-1β+sh-XIST组软骨细胞糖胺聚糖表达增强;与IL-1β+sh-XIST组相比较,IL-1β+sh-XIST+MOP组软骨细胞糖胺聚糖表达增强(图8)。

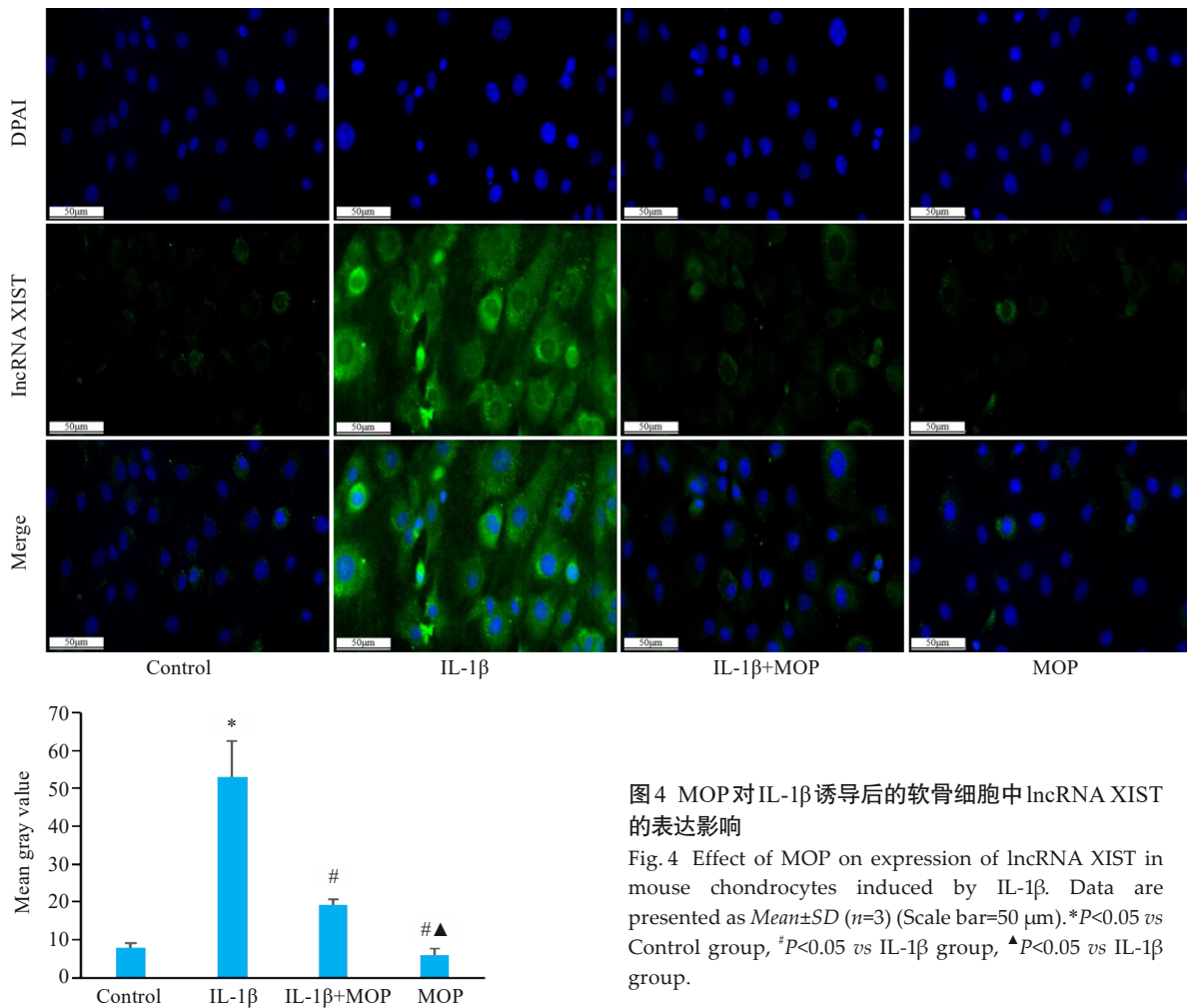


图4 MOP对IL-1β诱导后的软骨细胞中lncRNA XIST的表达影响

Fig. 4 Effect of MOP on expression of lncRNA XIST in mouse chondrocytes induced by IL-1β. Data are presented as Mean±SD (n=3) (Scale bar=50 μm). \*P<0.05 vs Control group, #P<0.05 vs IL-1β group, ▲P<0.05 vs IL-1β group.

### 2.8 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞中HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达影响

Western blotting结果显示:与对照组相比较,IL-1β组HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达升高(P<0.05);与IL-1β组相比较,IL-1β+MOP和IL-1β+sh-XIST组HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达降低(P<0.05);与IL-1β+sh-XIST组相比较,IL-1β+sh-XIST+MOP组HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达降低(P<0.05,图9)。

### 3 讨论

OA属于中医学“痹证”“痿证”范畴,其病机根本在于本虚标实,以肝肾亏虚为本,风寒湿邪侵袭、瘀血阻滞经络为标<sup>[26,27]</sup>。基于“本痿标痹”的病机特点,本课题组研发了透骨消痛胶囊(批准文号:闽药制备字Z20190010000),该胶囊为福建中医药大学附属第二人民医院院内制剂,具有补肾柔肝、活血祛风之功效,长期应用于OA临床治疗并取得显著疗效<sup>[28-33]</sup>。《黄帝内经·上古天真论》有云:“丈夫八岁,肾气实,……六八,阳气

衰竭于上,……身体重,行步不正……”<sup>[34]</sup>,提示肾阳不足可致筋骨失养,进而导致步履蹒跚。透骨消痛胶囊的君药巴戟天,功擅补肾阳、强筋骨、祛风湿<sup>[13,21,22]</sup>,契合“祛瘀除痹”之治疗理念,在OA软骨退变治疗中应用广泛<sup>[29-33]</sup>。MOP作为其主要活性成分,已被证实具有抗炎、抗氧化及软骨保护作用<sup>[21-23]</sup>。

为深入探讨MOP对软骨细胞的保护效应,本研究首先建立了原代软骨细胞培养体系,并采用10 ng/mL IL-1β干预24 h成功构建退变软骨细胞模型。传代培养后,第二代软骨细胞状态良好,呈现典型的“铺路石”形态。鉴于II型胶原蛋白是软骨细胞功能的核心标志物,我们采用免疫细胞化学染色进行鉴定,结果显示,正常软骨细胞胞浆内II型胶原呈棕黄色阳性表达;而在退变软骨细胞中,其表达显著减少,与前期研究结果一致<sup>[25]</sup>。接着,本研究剂量设置了(1、2、4、6、8、10 mg/mL)6个MOP浓度组,分别干预12、24、36、48 h,结果表明,不同浓度MOP(4、6、8 mg/mL)处理组在24、36 h均能显著提升细胞活力,且以MOP(4 mg/mL)干预24 h效果最为显著;并且通过检测PKM2、caspase-1和GSDMD蛋白表达,明确了MOP时效量效的机制与调控软骨细胞糖酵解和焦亡密切相关。

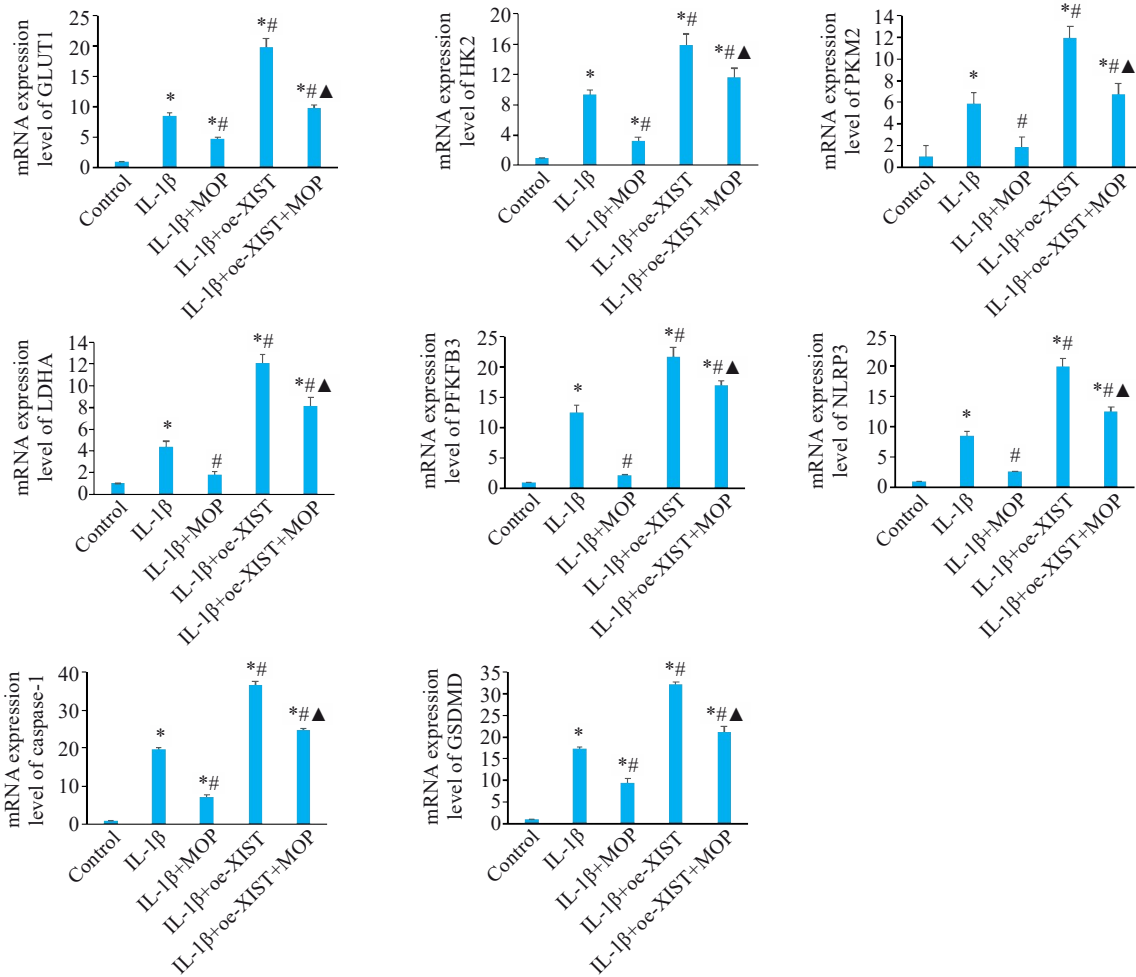


图5 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST过表达软骨细胞中 GLUT1、HK2、PKM2、LDHA、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD的mRNA水平影响

Fig.5 Effect of MOP on mRNA levels of GLUT1, HK2, PKM2, LDHA, PFKFB3, NLRP3, caspase-1, and GSDMD in mouse chondrocytes overexpressing XIST with IL-1β treatment. Data are presented as Mean±SD (n=3). \*P<0.05 vs Control group; #P<0.05 vs IL-1β group; ▲P<0.05 vs IL-1β+oe-XIST group.

基于课题组前期研究发现<sup>[22]</sup>, lncRNA XIST在OA软骨组织中表达显著上调,且其表达水平与OA病理进展呈正相关。并且XIST可同时调控糖酵解代谢与细胞焦亡过程<sup>[23]</sup>,此二者在OA软骨退变中均扮演关键角色:具体而言,软骨细胞糖酵解紊乱(表现为HK2、PKM2、LDHA等关键酶表达上调)以及细胞焦亡途径的异常激活(NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路)已被证实是促进软骨退变的重要机制<sup>[24,25]</sup>。然而,MOP是否通过靶向XIST调控糖酵解-焦亡通路以延缓软骨细胞退变,尚不清楚。为此,本研究通过XIST过表达与敲减实验,检测其对糖酵解(HK2,PKM2,PFKFB3)和焦亡(NLRP3,caspase-1,GSDMD)相关蛋白表达的调控作用,结果进一步阐明:MOP可通过抑制XIST,下调HK2、PKM2、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD相关蛋白的表达。鉴于NLRP3、caspase-1、GSDMD亦参与凋亡调控通路,我们通过Annexin V-FITC/PI双染法评估了MOP对软骨细胞凋亡的影响。结果显示,尽管IL-1β联合

XIST过表达可诱导一定程度的软骨细胞凋亡,但其凋亡率显著低于文献报道的软骨细胞凋亡水平,提示在此模型中XIST主要调控细胞焦亡而非凋亡。最后,为验证MOP通过抑制XIST调控糖酵解-焦亡通路以延缓软骨退变,我们采用甲苯胺蓝染色观察各组软骨细胞糖胺聚糖的表达情况。结果表明,MOP能够通过抑制XIST,有效增强软骨细胞糖胺聚糖的表达。

综上,本研究首次揭示了MOP通过靶向lncRNA XIST调控糖酵解-焦亡延缓软骨细胞退变的分子机制。这些发现不仅为阐明OA发病机制提供新的理论依据,也为MOP临床治疗OA提供实验基础。但仍存在一定局限性:首先,研究基于体外细胞模型,未能模拟体内关节复杂微环境,且缺乏动物实验验证MOP在整体关节中的保护效应及对XIST通路的调控。其次,未涉及临床研究,MOP在OA患者中的有效性、安全性及药代动力学特征尚未评估。再者,对MOP潜在的系统毒性(如肝肾毒性)未进行系统评价。最后,虽设置了剂量梯度

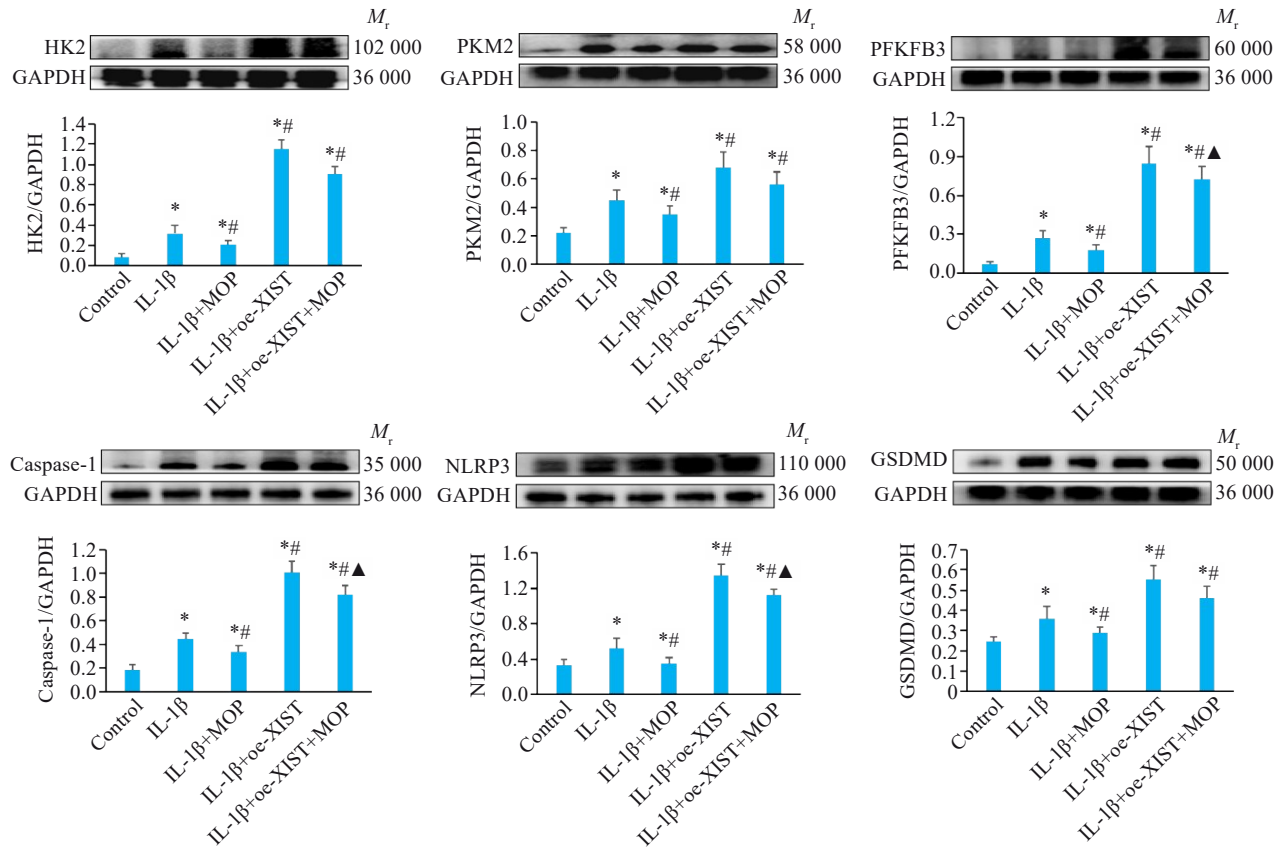


图6 MOP对IL-1 $\beta$ 诱导后lncRNA XIST过表达软骨细胞中HK2、PKM2、PFKFB3、NLRP3、caspase-1、GSDMD的蛋白表达影响

Fig. 6 Effect of MOP on protein expressions of HK2, PKM2, PFKFB3, NLRP3, caspase-1, and GSDMD in mouse chondrocytes overexpressing XIST with IL-1 $\beta$  treatment. Data are presented as Mean $\pm$ SD ( $n=3$ ). \* $P<0.05$  vs Control group; # $P<0.05$  vs IL-1 $\beta$  group;  $\Delta P<0.05$  vs IL-1 $\beta$ +oe-XIST group.

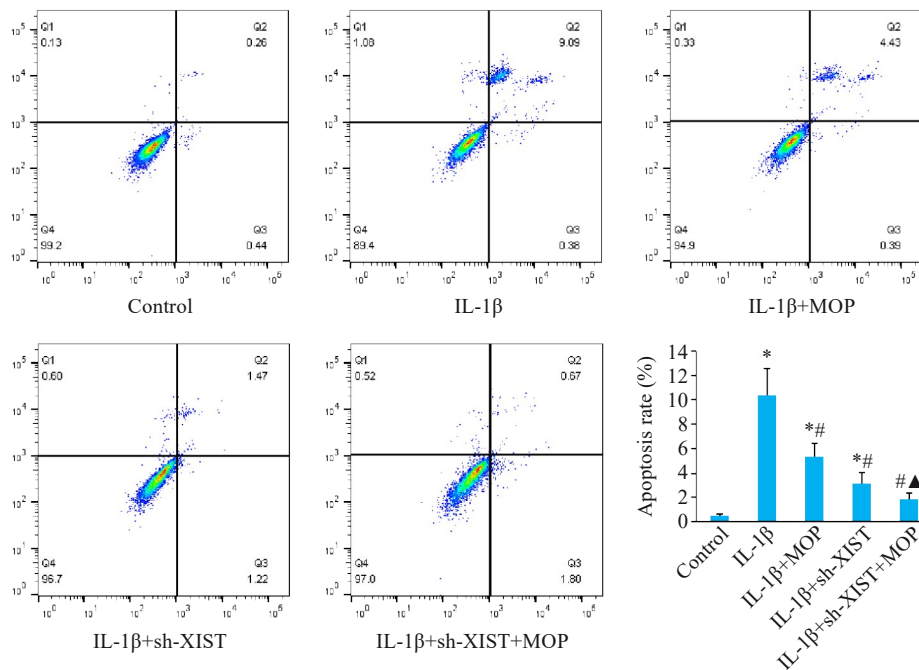


图7 MOP对IL-1 $\beta$ 诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞凋亡影响

Fig. 7 Effect of MOP on apoptosis in mouse chondrocytes with XIST knockout and IL-1 $\beta$  treatment. Data are presented as Mean $\pm$ SD ( $n=3$ ). \* $P<0.05$  vs Control group; # $P<0.05$  vs IL-1 $\beta$  group;  $\Delta P<0.05$  vs IL-1 $\beta$ +sh-XIST group.

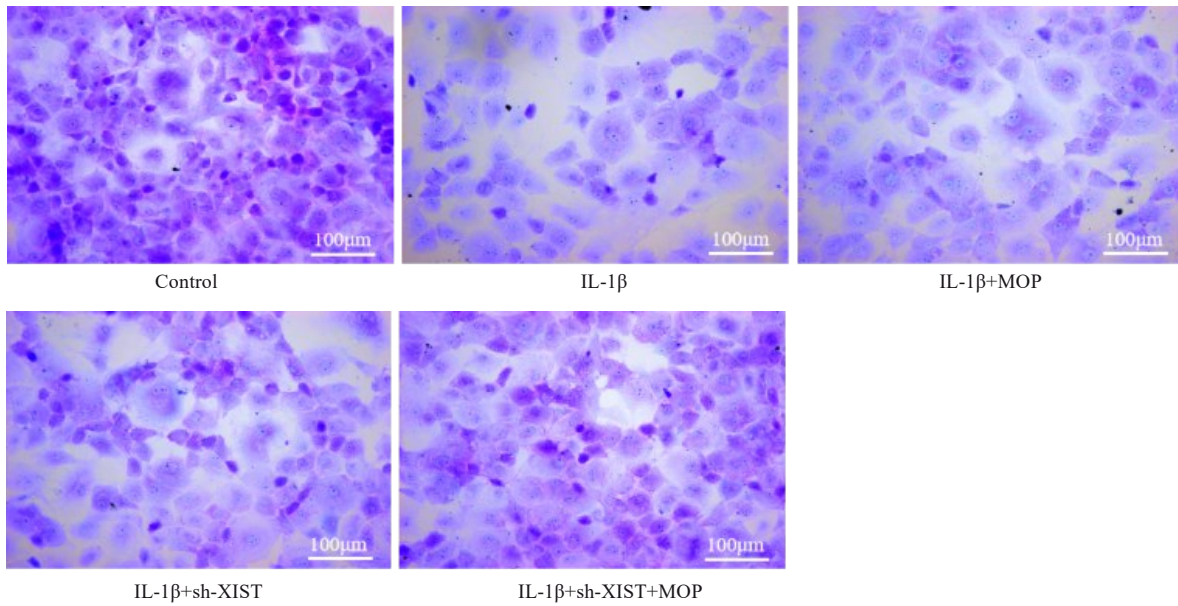


图8 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞糖胺聚糖的影响

Fig.8 Effect of MOP on glycosaminoglycan expression in mouse chondrocytes with XIST knockout and IL-1β treatment (Scale bar=100 μm).

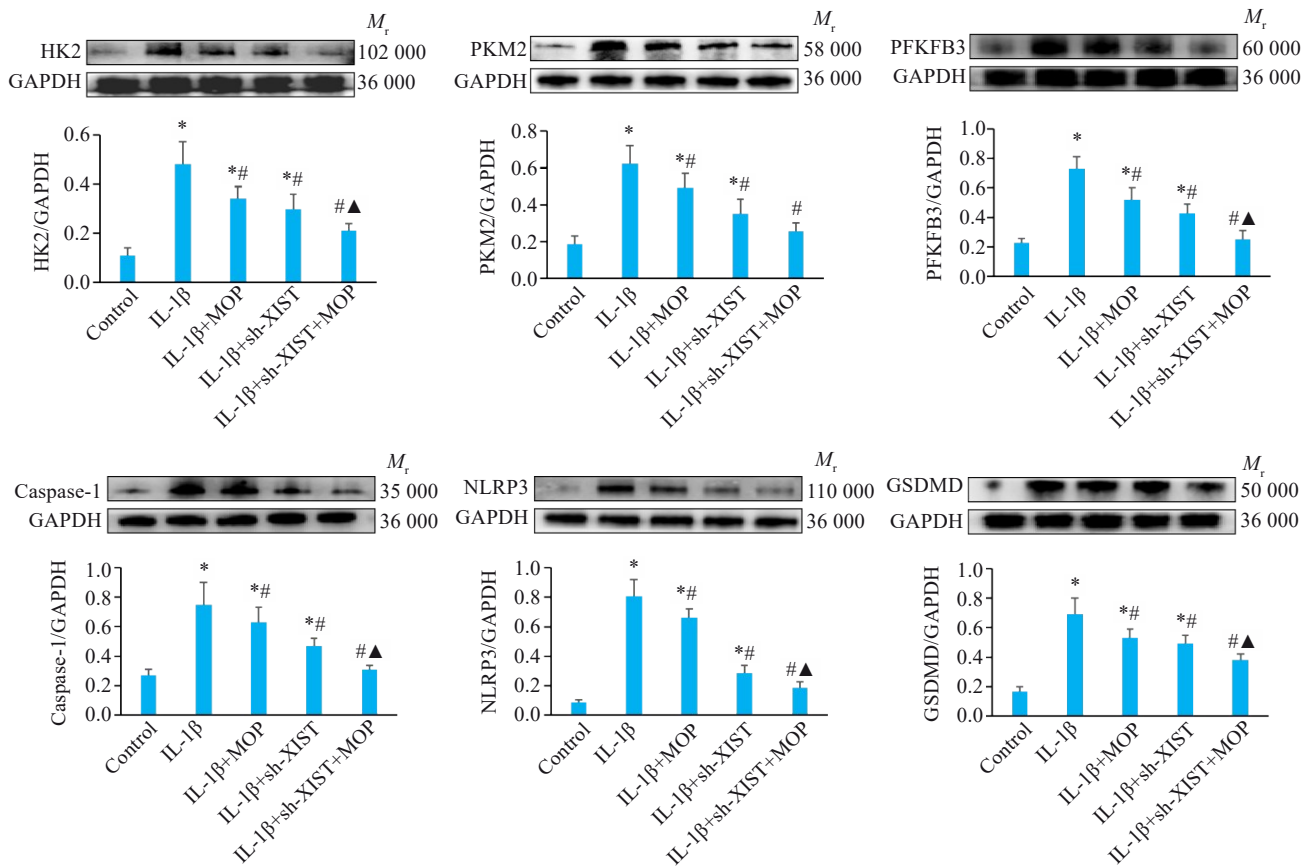


图9 MOP对IL-1β诱导后lncRNA XIST敲减软骨细胞中HK2、PKM2、PFKFB3、caspase-1、NLRP3、GSDMD的蛋白表达影响

Fig.9 Effect of MOP on protein expressions of HK2, PKM2, PFKFB3, NLRP3, caspase-1, and GSDMD in mouse chondrocytes with XIST knockout and IL-1β treatment. Data are presented as Mean±SD (n=3). \*P<0.05 vs Control group; #P<0.05 vs IL-1β group; ▲P<0.05 vs IL-1β+sh-XIST group.

并观察到中剂量效果最佳,但剂量点覆盖和体内剂量-效应关系仍需更深入探索。未来需在动物模型和临床

研究中进一步验证本发现,并全面评估MOP的安全性,以推进其临床应用。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

### 参考文献:

- [1] Wu YT, Hu HF, Wang T, et al. Characterizing mitochondrial features in osteoarthritis through integrative multi-omics and machine learning analysis[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1414301.
- [2] Couch JL, King MG, De Oliveira Silva D, et al. Noisy knees-knee crepitus prevalence and association with structural pathology: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Sports Med*, 2025, 59(2): 126-32.
- [3] Tang S-A, Zhang CQ, Oo WM, et al. Osteoarthritis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2025, 11: 10.
- [4] Fuggle N, Laslop A, Rizzoli R, et al. Treatment of osteoporosis and osteoarthritis in the oldest old[J]. *Drugs*, 2025, 85(3): 343-60.
- [5] Lan WR, Chen XM, Yu H, et al. UGDH lactylation aggravates osteoarthritis by suppressing glycosaminoglycan synthesis and orchestrating nucleocytoplasmic transport to activate MAPK signaling[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(20): e2413709.
- [6] Zhou YK, Li MZ, Lin S, et al. Mechanical sensing protein PIEZO1 controls osteoarthritis via glycolysis mediated mesenchymal stem cells-Th17 cells crosstalk[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 231.
- [7] Dong YH, Zhou XM, Zhang ZZ, et al. cGAS-STING aggravates cartilage degradation by promoting glycolysis in temporomandibular joint osteoarthritis[J]. *J Bone Miner Res*, 2025, 40(5): 699-709.
- [8] Meng JZ, Lu JF, Jiang CC, et al. Collagen hydrogel-driven pyroptosis suppression and combined microfracture technique delay osteoarthritis progression[J]. *Biomaterials*, 2025, 314: 122817.
- [9] Ma J, Yang P, Zhou ZB, et al. GYY4137-induced p65 sulfhydration protects synovial macrophages against pyroptosis by improving mitochondrial function in osteoarthritis development[J]. *J Adv Res*, 2025, 71: 173-88.
- [10] Bao CC, Zhu SY, Song KP, et al. HK2: a potential regulator of osteoarthritis via glycolytic and non-glycolytic pathways[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 132.
- [11] Bao CC, Zhu SY, Pang DJ, et al. Hexokinase 2 suppression alleviates the catabolic properties in osteoarthritis via HMGA2 and contributes to pulsed electromagnetic field-mediated cartilage protection[J]. *Int J Biol Sci*, 2025, 21(4): 1459-77.
- [12] Liu JB, Jia SS, Yang Y, et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114118.
- [13] 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): 4641-8.
- [14] 金灵璐, 付长龙, 涂海水, 等. 乌头汤对膝骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡相关基因表达的影响[J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(3): 1-4, 12.
- [15] 林晴, 潘丹虹, 李路, 等. 荣筋拈痛方调控软骨细胞NLRP3/caspase-1/GSDMD通路改善骨关节炎炎性病变的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5653-8.
- [16] You XJ, Xie YJ, Tan QY, et al. Glycolytic reprogramming governs crystalline silica-induced pyroptosis and inflammation through promoting lactylation modification[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 283: 116952.
- [17] Liu RX, Xiao Y, Huang SH, et al. LncRNA XIST inhibits mitophagy and increases mitochondrial dysfunction by promoting BNIP3 promoter methylation to facilitate the progression of KBD[J]. *Mol Immunol*, 2025, 182: 62-75.
- [18] Fu CL, Lin YM, Lin Q, et al. Protective mechanism of prim-O-glucosylcimifugin in the treatment of osteoarthritis: based on lncRNA XIST regulation of Nav1.7[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 181: 117597.
- [19] Yang F, Zhang J, Zhao ZJ, et al. Artemisinin suppresses aerobic glycolysis in thyroid cancer cells by downregulating HIF-1 $\alpha$ , which is increased by the XIST/miR-93/HIF-1 $\alpha$  pathway[J]. *PLoS One*, 2023, 18(4): e0284242.
- [20] Zhang Y, Yang L, Mu HT, et al. CVB3 regulates Treg cell pyroptosis through the lncRNA XIST/miR-195-5p/caspase-1 molecular axis[J]. *Immunobiology*, 2025, 230(2): 152882.
- [21] 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): 4363-71.
- [22] 付长龙, 林艳铭, 兰书洁, 等. 透骨消痛胶囊调控Nav1.7减轻膝骨关节炎小鼠软骨细胞退变[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(11): 2074-81.
- [23] Liu MY, Wang C, Zhang HW, et al. A systematic review on polysaccharides from *Morinda officinalis* How: Advances in the preparation, structural characterization and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328: 118090.
- [24] Zhao DF, Xing SQ, Qi J, et al. Alleviating the IL-1 $\beta$ -stimulated extracellular matrix degradation in osteoarthritis, and chondrocyte inflammation by *Morinda officinalis* polysaccharide via the SIRT6/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biomol Biomed*, 2025, 25(7): 1610-20.
- [25] 黄艳峰, 陈俊, 林洁, 等. 荣筋拈痛方对白细胞介素-1 $\beta$ 诱导大鼠退变软骨细胞增殖的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 2077-82.
- [26] 王群, 熊益亮, 赵希睿, 等. 先秦两汉简帛医书中的“痹”与“痿”探析[J]. *中医杂志*, 2019, 60(9): 730-3.
- [27] 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): 1248-9, 1252.
- [28] 刘献祥. 基于陈可冀学术思想之骨性关节炎研究[J]. *康复学报*, 2016, 26(1): 2-5.
- [29] 刘献祥, 郑春松, 叶蕪芝, 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): 16-8, 27.
- [30] 朱海波, 何忠斌. 透骨消痛胶囊治疗骨质疏松性骨关节炎的临床疗效[J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(8): 25-6.
- [31] 洪昆达, 万甜, 李俐, 等. 温针合透骨消痛胶囊内服治疗疼痛性膝骨性关节炎30例[J]. *中医药通报*, 2010, 9(3): 55-6.
- [32] 陈鸿, 洪昆达. 透骨消痛胶囊治疗疼痛性膝骨性关节炎30例[J]. *福建中医药*, 2015, 46(2): 21-2.
- [33] 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(1): 43-7.
- [34] 杨绍春, 瞿广城, 帅焱. 《黄帝内经》“精神内守”探究[J]. *云南中医药杂志*, 2025, 46(6): 27-9.

(编辑: 经媛)