

引用:张阔,张镭潇,郑泽炜,徐金凡,张庆文.淫羊藿苷调控Nrf2/HO-1信号通路对软骨细胞铁死亡的影响[J].中医导报,2025,31(9):17-23.

淫羊藿苷调控Nrf2/HO-1信号通路 对软骨细胞铁死亡的影响*

张阔¹,张镭潇¹,郑泽炜¹,徐金凡¹,张庆文²

(1.广州中医药大学第三临床医学院,广东 广州 510006;

2.广州中医药大学第三附属医院,广东 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨淫羊藿苷对Atdc5软骨细胞铁死亡状态的影响及作用机制。方法:体外培养软骨细胞,运用CCK-8法检测0.0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷对Atdc5软骨细胞增殖的影响,以确定最佳干预浓度。将Atdc5软骨细胞分为空白对照组、模型组、淫羊藿苷低浓度组和淫羊藿苷高浓度组,空白对照组软骨细胞未进行药物干预,模型组软骨细胞采用白细胞介素-1 β (IL-1 β)(10 ng/mL)干预,淫羊藿苷低浓度组软骨细胞采用IL-1 β (10 ng/mL)及低浓度淫羊藿苷(8.0 $\mu\text{mol/L}$)干预,淫羊藿苷高浓度组软骨细胞采用IL-1 β (10 ng/mL)及高浓度淫羊藿苷(16.0 $\mu\text{mol/L}$)干预,各组均干预24 h。采用荧光显微镜检测细胞荧光强度,分析细胞活性氧(ROS)含量,采用试剂盒检测细胞丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量。采用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检查细胞II型胶原 α 1链(COL2A1) mRNA、聚集蛋白聚糖(ACAN) mRNA、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4) mRNA、溶质载体家族7成员11抗体(SLC7A11) mRNA、核因子E₂相关因子2(Nrf2) mRNA、血红素氧合酶1(HO-1) mRNA表达水平,采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11蛋白表达水平。结果:8.0 $\mu\text{mol/L}$ 和16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿苷对Atdc5软骨细胞无细胞毒性,且能显著促进其增殖($P<0.01$)。8.0 $\mu\text{mol/L}$ 和16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿苷在促进细胞增殖方面效果相近($P>0.05$)。模型组细胞ROS、MDA含量高于空白对照组($P<0.01$),GSH-Px含量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞ROS、MDA含量低于模型组($P<0.01$),GSH-Px含量高于模型组($P<0.01$)。模型组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA、GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA、Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA相对表达量低于空白对照组($P<0.01$)。淫羊藿苷低、高浓度组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA、GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA、Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$)。模型组细胞Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11蛋白相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11蛋白相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞Nrf2、HO-1蛋白相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.01$)。结论:淫羊藿苷可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路,抑制软骨细胞铁死亡,改善软骨细胞功能状态。

[关键词] 膝骨关节炎;淫羊藿苷;软骨细胞;铁死亡;Nrf2/HO-1信号通路

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)09-0017-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.09.003

Icariin Regulates Nrf2/HO-1 Signaling Pathway Mediated Chondrocyte Ferroptosis in the Treatment of Knee Osteoarthritis

ZHANG Kuo¹, ZHANG Leixiao¹, ZHENG Zewei¹, XU Jinfan¹, ZHANG Qingwen²

(1.The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China; 2.Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of icariin on the ferroptosis status of Atdc5 chondrocytes and

*基金项目:广州市科技计划项目(2024A04J5057);广州中医药大学第三附属医院科研创新基金课题(Sy2022002);广东省中医药局项目(20223012)

通信作者:张庆文,男,主任医师,研究方向为中西医治疗骨与关节疾病

its underlying mechanisms. Methods: In vitro culture of chondrocytes was performed to assess the effect of icariin at concentrations of 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 and 64.0 $\mu\text{mol/L}$ on the proliferation of Atdc5 chondrocytes using the CCK-8 method, in order to determine the optimal intervention concentration. The Atdc5 chondrocytes were divided into blank control group, model group, low concentration icariin group, and high concentration icariin group. The blank control group did not receive any drug intervention, while the model group was treated with IL-1 β (10 ng/mL). The low concentration icariin group was treated with IL-1 β (10 ng/mL) and icariin (8.0 $\mu\text{mol/L}$), and the high concentration icariin group received IL-1 β (10 ng/mL) and icariin (16.0 $\mu\text{mol/L}$). All groups were treated for 24 hours. Fluorescence microscopy was used to detect the fluorescence intensity of the cells, and analyze the content of reactive oxygen species (ROS). A kit was utilized to measure the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to investigate the expression levels of type II collagen $\alpha 1$ chain (COL2A1) mRNA, aggrecan (ACAN) mRNA, glutathione peroxidase 4 (GPX4) mRNA, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) mRNA, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) mRNA, and heme oxygenase 1 (HO-1) mRNA. Additionally, protein expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and SLC7A11 in the cells were assessed using Western blotting. Results: The concentrations of 8.0 $\mu\text{mol/L}$ and 16.0 $\mu\text{mol/L}$ of icariin demonstrated no cytotoxicity to Atdc5 chondrocytes and significantly promoted their proliferation ($P < 0.01$), with similar effects on cell proliferation between the 8.0 $\mu\text{mol/L}$ and 16.0 $\mu\text{mol/L}$ groups ($P > 0.05$). The model group showed higher levels of ROS and MDA than blank control group ($P < 0.01$), while lower levels of GSH-Px than blank control group ($P < 0.01$). The low and high concentration icariin groups showed lower levels of ROS and MDA than model group ($P < 0.01$), while higher levels of GSH-Px than model group ($P < 0.01$). The model group showed lower relative expression levels of COL2A1 mRNA, ACAN mRNA, GPX4 mRNA, SLC7A11 mRNA, Nrf2 mRNA, and HO-1 mRNA than blank control group ($P < 0.01$). In contrast, the low and high concentration icariin groups showed higher relative expression levels of COL2A1 mRNA, ACAN mRNA, GPX4 mRNA, SLC7A11 mRNA, Nrf2 mRNA, and HO-1 mRNA than model group ($P < 0.01$). Additionally, the high concentration icariin group showed higher relative expression levels of COL2A1 mRNA and ACAN mRNA than low concentration icariin group ($P < 0.05$). The model group showed lower relative expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and SLC7A11 proteins than blank control group ($P < 0.01$). The low and high concentration icariin groups showed higher relative expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and SLC7A11 proteins than model group ($P < 0.01$). The high concentration icariin group showed higher relative expression levels of Nrf2 and HO-1 protein than low concentration icariin group ($P < 0.01$). Conclusion: Icariin may inhibit ferroptosis in chondrocytes and improve their functional status by activating the Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway.

[Keywords] knee osteoarthritis; Icariin; chondrocyte; ferroptosis; Nrf2/HO-1 signaling pathway

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)作为一种常见的慢性关节疾病,其发病率随着人口老龄化的加剧而逐年上升^[1]。KOA主要病理特征为关节软骨退变、软骨下骨重塑、滑膜炎反应等,可导致关节疼痛、肿胀、畸形及功能障碍。目前,尽管针对KOA已有多种治疗手段,如药物治疗、物理治疗、手术治疗等,但仍难以从根本上阻止疾病的进展,因此,深入探究KOA的发病机制,寻找新的治疗靶点迫在眉睫^[2-3]。

近年来,铁死亡这一新型程序性细胞死亡方式逐渐受到关注。研究表明,铁死亡在KOA的发病过程中是一个重要步骤^[4-5]。软骨细胞的铁死亡会导致细胞内铁离子超载、脂质过氧化增加,进而破坏软骨细胞的正常结构和功能,加速关节软骨的退变。KOA患者关节软骨组织中与铁死亡相关的指标发生了显著变化,如谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)活性降低、脂质过氧化产物堆积等^[6-7]。因此,调控软骨细胞铁死亡有望成为治疗KOA的新策略。

淫羊藿苷是从淫羊藿属植物中提取的黄酮类物质^[8],具有抗氧化、抗炎及细胞保护等多种生物学活性^[9-10]。研究^[11-12]表明,淫羊藿苷能够激活核因子E₂相关因子2(nuclear factor erythroid-derived 2-like 2, Nrf2)/血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路,抑制氧化应激反应。然而,淫羊藿苷在膝骨关节炎中的作用及机制尚未完全明确,尤其是其对软骨细胞铁死亡的调控作用,目前尚缺乏深入研究。鉴于此,本研究通过构建体外实验模型,深入探究淫羊藿苷对软骨细胞铁死亡状态的影响,以及其通过Nrf2/HO-1信号通路调控软骨细胞铁死亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 淫羊藿苷(Icariin, LCA)(成都乐美天医药科技有限公司,批号: DY0091BD);青霉素/链霉素[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号: 15070063];胎牛血清[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号: A5669701];细胞计数试剂

盒-8(CCK-8)(GlpBio公司,批号:GK10001);SYBRGreen-qPCR预混液(MedChemExpress公司,批号:HY-K0501);谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)检测试剂盒(碧云天生物公司,批号:S0059S);丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(GlpBio公司,批号:S0131S);胰蛋白酶[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:25200056];活性氧(reactive oxygen Species,ROS)检测试剂盒(白鲨生物公司,批号:BL714A);ECL化学发光底物试剂盒(白鲨生物公司,批号:BL520A);磷酸盐缓冲溶液(赛维尔生物科技有限公司,批号:G4202);DMEM/F12细胞培养基(赛维尔生物科技有限公司,批号:G4610);SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:P0903);TRIzol核酸提取试剂[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:15596018CN];溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11 Gene,SLC7A11)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:DF12509);GPX4抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:DF6701);Nrf2抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,批号:T55136];HO-1抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,批号:T55113];微管蛋白(β -tubulin)抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,批号:M20005];白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:100947]。

1.2 主要仪器 流式细胞仪[碧迪医疗器械(上海)有限公司,型号:FACSCanto II];全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:Multiskan GO 1510];凝胶成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:GelDoc Go/ChemiDoc MP]。

1.3 细胞培养 Atdc5软骨细胞系(批号:FH037820240110)由[澳睿赛生物技术(上海)有限公司]提供。细胞在含有10%胎牛血清、100.0 U/mL青霉素及100.0 μ g/mL链霉素的改良型DMEM/F12培养基中进行培养。将细胞置于5%CO₂、37℃的恒温培养箱内常规培养,每2 d更换一次培养液。当细胞生长至覆盖培养瓶底部面积约90%时,使用0.25%胰蛋白酶进行消化,并在1 000 r/min(离心半径12cm)、20℃的条件下离心5 min,以获取细胞。获取的细胞经改良型DMEM/F12培养基稀释至合适浓度后,重新接种至新的细胞培养皿中。

1.4 细胞活力 在96孔板内,按照每孔 5×10^3 个的密度接种Atdc5细胞。培养24 h后将培养基替换为含有不同浓度(0.0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 μ mol/L)淫羊藿苷的改良型DMEM/F12培养基,每种药物浓度均设置3个复孔,培养24 h后,每孔加入100 μ L改良型DMEM/F12培养基及10 μ L CCK-8溶液,继续培养2 h。采用赛默飞 Multiskan GO全波长酶标仪,在450 nm波长条件下测定各孔吸光度,评估细胞活力。细胞活力=实验组吸光度/对照组吸光度平均值。

1.5 软骨细胞损伤模型构建及分组 参考“1.4”中细胞活力与增殖测定实验结果,确定8.0 μ mol/L和16.0 μ mol/L的淫羊藿苷作为后续实验的干预浓度。采用IL-1 β (10 ng/mL)刺激Atdc5软骨细胞,模拟体外膝关节关节炎相关软骨细胞损伤微环境。将Atdc5软骨细胞分为空白对照组、模型组、淫羊藿苷低浓度组、淫羊藿苷高浓度组,每组3个复孔。空白对照组细胞不施加任何处理,仅进行常规细胞培养;模型组细胞加入质量浓

度为10 ng/mL的IL-1 β 处理;淫羊藿苷低浓度组细胞加入IL-1 β (10 ng/mL)及低浓度淫羊藿苷(8.0 μ mol/L)处理;淫羊藿苷高浓度组细胞加入IL-1 β (10 ng/mL)及高浓度淫羊藿苷(16.0 μ mol/L)处理。各组均干预24 h后进行后续指标检测。

1.6 观察指标 以下实验独立重复3次,每次实验对照组设3个复孔。

1.6.1 细胞内ROS含量 干预结束后收集各组细胞,采用胰蛋白酶消化处理,随后用磷酸盐缓冲溶液清除细胞表面未结合的物质。配制浓度为5.0 μ mol/L的二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针工作液检测细胞内ROS水平。将细胞与DCFH-DA荧光探针在37℃、5%CO₂的培养箱环境中孵育30 min。在此过程中,DCFH-DA会被细胞摄取并转化为DCFH,在细胞内逐渐积累。当细胞内存在ROS时,DCFH会被氧化为具有强荧光的DCF,其荧光强度与细胞内ROS水平呈正相关。孵育结束后,再次洗涤细胞以去除未反应的多余探针,将细胞转移至流式管中,并用胎牛血清重悬细胞,最后借助流式细胞仪(BD FACSCanto™ II)测定细胞的荧光强度,以此评估细胞内ROS活性水平。

1.6.2 细胞内MDA、GSH-Px含量 干预结束后,使用细胞裂解液提取细胞。采用MDA检测试剂盒、GSH-Px检测试剂盒检测细胞内MDA、GSH-Px含量。严格按照试剂盒说明书的操作流程,使用赛默飞Multiskan GO全波长酶标仪测定各样本的相关参数。

1.6.3 细胞II型胶原 α 1链(collagen type II alpha 1 chain gene, COL2A1)mRNA、聚集蛋白聚糖(aggrecan gene,ACAN)mRNA、GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA、Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA表达水平 采用定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测各组细胞COL2A1 mRNA、ACANmRNA、GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA、Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA表达水平。干预结束后运用TRIzol试剂提取各组细胞的总RNA,并进行定量检测。引物信息见表1。PCR反应体系设定为50 μ L,具体成分如下:2 \times Phanta Max超保真预混液缓冲液(2 \times Phanta Buffer)占25 μ L,上下游引物(浓度均为5 μ mol/L)各添加2 μ L,DNA模板为1 μ L,Phanta®MaxDNA聚合酶1 μ L,脱氧核苷三磷酸混合物(dNTPMixture)1 μ L,剩余18 μ L为双蒸水(ddH₂O)。选用内参基因18s(18srRNA)作为内参基因,ABI 7500型实时荧光定量PCR仪设定反应条件为:首先在95℃下预变性5 min,接着进入循环反应,每个循环包括95℃变性5 s、60℃退火及延伸31 s,共进行40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算目标基因的相对表达量。

表1 引物序列

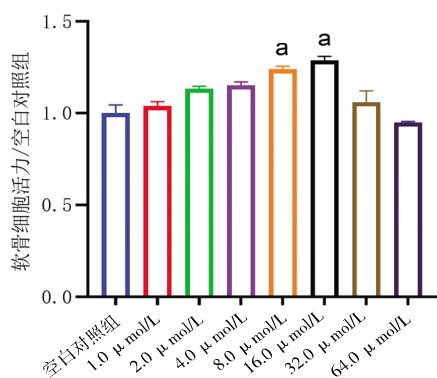
目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
COL2A1	CCAGATTGAGAGCATCCGCA	TGCATTGGGCTAGACGCAAG	193
ACAN	ACTCTGGGTTTTCGTGACTCT	ACAACCTACGGAGTGTGTCATGG	201
GPX4	TGTGCATCCCGCGATGATT	CCCTGTACTTATCCAGGCAGA	97
SLC7A11	GGCACCCTCATCGGATCAG	CTCCACAGGCAGACAGAAAA	160
Nrf2	CTTTAGTTCAGCAGACAGAGGAC	AGGCATCTTGTTGGGAATGTG	140
HO-1	AAGAGGCCAAGACTGCGTTC	GCTGTCTGCGTTCAGCAGC	118
18srRNA	TGCTTGCAAAAGCTGAACTTAAAG	AGTCAAAATTAAGCCGACAGGC	194

1.6.4 细胞Nr2、HO-1、GPX4、SLC7A11蛋白表达水平 采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)实验检测各组细胞Nr2、HO-1、GPX4、SLC7A11蛋白表达水平。干预结束后采用放射免疫沉淀法裂解缓冲液处理各组软骨细胞,以促使细胞裂解并释放其中的蛋白质。运用BCA蛋白浓度检测法测定提取的蛋白质浓度后,从每组样本中准确取出10 μg 蛋白样品,用于10% SDS-PAGE电泳分离操作。电泳结束后,通过湿转印技术将分离后的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)上。PVDF膜依次经过封闭处理以及TBST清洗后,与针对目标蛋白(Nr2、HO-1、GPX4、SLC7A11、 β -tubulin)的一抗按照1:1 000的稀释比例进行孵育,孵育完成后再次清洗,随后以相同稀释度的二抗进行孵育。最后借助化学发光技术,在凝胶成像系统获取图像,并运用ImageJ软件对图像进行分析处理,从而得到各目标蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法 运用SPSS 27.0软件统计数据,借助Graph-Pad Prism10.1软件进行数据可视化绘图。计量资料符合正态分布,以“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示。若计量资料符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,两两比较运用Bonferroni法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 淫羊藿苷对Atdc5软骨细胞活力的影响 当淫羊藿苷浓度处于8.0 $\mu\text{mol/L}$ 与16.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,对Atdc5软骨细胞未呈现出细胞毒性,反而显著增强了细胞活力($P<0.01$)。这两个浓度在提高细胞活力方面效果相近,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图1)基于此,后续实验选用8.0 $\mu\text{mol/L}$ 和16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿苷进行干预。



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$ 。

图 1 各组 Atdc5 软骨细胞活力比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.2 各组Atdc5软骨细胞中ROS含量比较 模型组细胞ROS含量高于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞ROS含量均低于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞ROS含与淫羊藿苷低浓度组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图2~3)

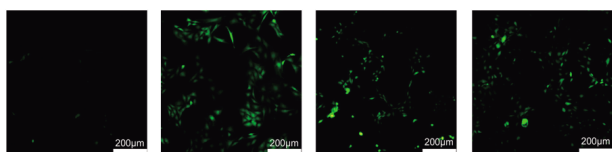
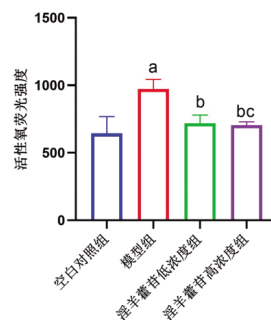


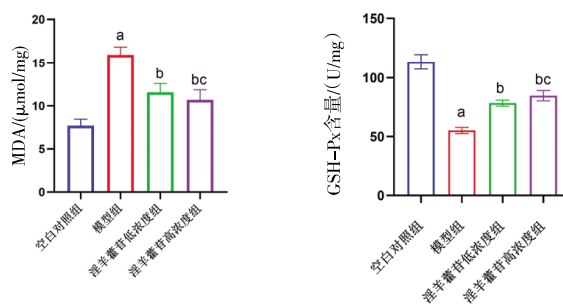
图 2 Atdc5 软骨细胞 ROS 平均荧光水平代表图



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P>0.05$ 。

图 3 各组 Atdc5 软骨细胞 ROS 含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

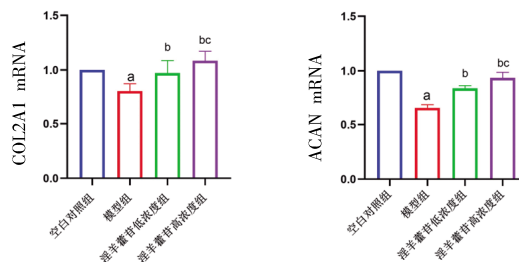
2.3 各组Atdc5软骨细胞MDA、GSH-Px含量比较 模型组细胞MDA含量高于空白对照组($P<0.01$),GSH-Px含量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞MDA含量低于模型组($P<0.01$),GSH-Px含量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞MDA、GSH-Px含量与淫羊藿苷低浓度组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),表明在这两个浓度下,淫羊藿苷对MDA、GSH-Px的影响效果相近。(见图4)



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P>0.05$ 。

图 4 各组 Atdc5 软骨细胞 MDA、GSH-Px 含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.4 各组Atdc5软骨细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA相对表达量比较 模型组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞COL2A1 mRNA、ACAN mRNA相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$)。(见图5)

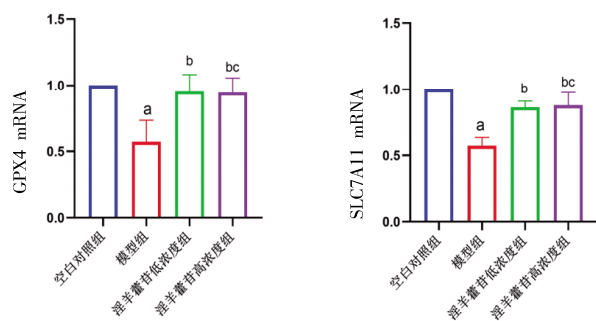


注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P<0.05$ 。

图 5 各组 Atdc5 软骨细胞 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.5 各组Atdc5软骨细胞GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA相对

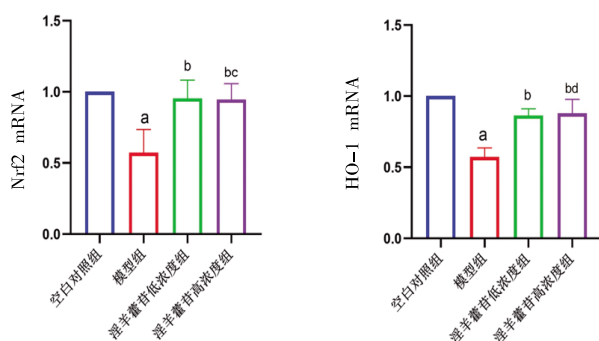
表达量比较 模型组细胞GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA相对表达量与淫羊藿苷低浓度组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图6)



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P>0.05$ 。

图6 各组 Atdc5 软骨细胞 GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.6 各组 Atdc5 软骨细胞 Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA 相对表达量比较 模型组细胞 Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA 相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞 Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA 相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞 Nrf2 mRNA 相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$);淫羊藿苷高浓度组细胞 HO-1 mRNA 相对表达量与淫羊藿苷低浓度组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图7)



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P<0.05$,^d $P>0.05$ 。

图7 各组 Atdc5 软骨细胞 Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.7 各组 Atdc5 软骨细胞 GPX4、SLC7A11 蛋白相对表达量比较 模型组细胞 GPX4、SLC7A11 蛋白相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞 GPX4、SLC7A11 蛋白相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞 GPX4、SLC7A11 蛋白相对表达量与淫羊藿苷低浓度组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图8~9)

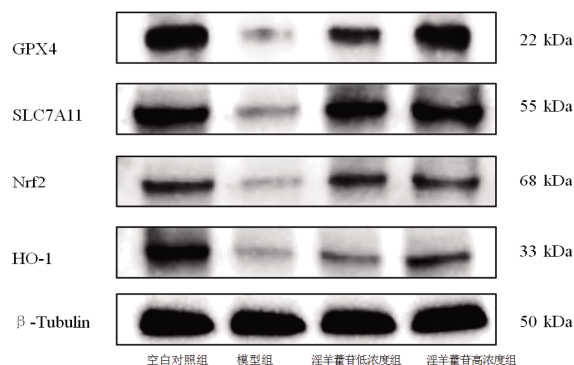
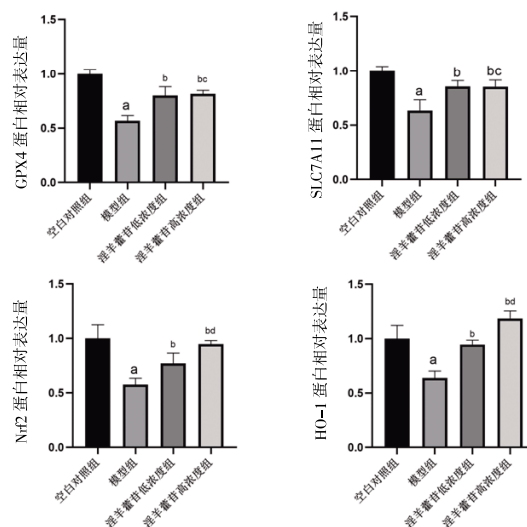


图8 各组 Atdc5 软骨细胞 GPX4、SLC7A11、Nrf2、HO-1 蛋白表达 Western blotting 图



注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与淫羊藿苷低浓度组比较,^c $P>0.05$,^d $P<0.05$ 。

图9 各组 Atdc5 软骨细胞 GPX4、SLC7A11、Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.8 各组 Atdc5 软骨细胞 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量比较 模型组细胞 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量低于空白对照组($P<0.01$);淫羊藿苷低、高浓度组细胞 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量高于模型组($P<0.01$);淫羊藿苷高浓度组细胞 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$)。(见图8~9)

3 讨论

膝骨关节炎是一种退行性疾病,严重影响患者的生活质量^[13-14]。近期研究揭示了铁死亡在KOA病理过程中的关键作用。铁死亡是一种程序性细胞死亡形式,其过程由铁依赖性脂质过氧化驱动,与ROS积累密切相关^[15-16]。软骨细胞内ROS水平升高导致氧化应激加剧,触发铁死亡机制,进而引发软骨基质破坏和关节功能障碍^[17-18]。

淫羊藿苷具有多种生物活性,涵盖抗氧化、抗炎等关键特性。其中,抗氧化特性可通过调节细胞内氧化还原平衡,抑制自由基的过度产生,从而减轻氧化应激对细胞造成的损伤;抗炎特性则能够作用于炎症信号通路,减少炎症介质的释放,有效缓解炎症反应^[19]。本研究采用IL-1 β 诱导KOA相关损伤模型。结果表明,软骨细胞内的ROS和MDA水平呈现显著上升趋势。ROS作为细胞内氧化应激的重要标志物,其过度

积累会攻击细胞内的生物大分子,如脂质、蛋白质和核酸等^[20];MDA是脂质过氧化的终产物,其水平升高反映了细胞内脂质过氧化程度加剧。与此同时,软骨细胞内GSH-Px活性下降。GSH-Px是细胞内重要的抗氧化酶,其活性降低表明细胞抗氧化防御系统功能受损^[21]。软骨细胞COL2A1 mRNA和ACAN mRNA表达下调。COL2A1和ACAN是软骨细胞外基质的关键组成成分,COL2A1 mRNA和ACAN mRNA表达下调意味着软骨细胞外基质合成减少。这一系列变化表明软骨细胞经历了显著的铁死亡过程,并伴随功能损害^[22]。淫羊藿苷低、高浓度组细胞ROS和MDA含量均低于模型组($P<0.01$),表明细胞内氧化应激水平和脂质过氧化程度得到有效缓解;淫羊藿苷低、高浓度组细胞GSH-Px高于模型组($P<0.01$),说明细胞抗氧化防御系统功能有所恢复;淫羊藿苷低、高浓度组细胞COL2A1 mRNA和ACAN mRNA相对表达量高于模型组($P<0.01$),且淫羊藿苷高浓度组COL2A1 mRNA和ACAN mRNA相对表达量高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$)。这一系列实验结果提示,淫羊藿苷能够有效抑制软骨细胞铁死亡,并改善细胞功能状态,呈现出显著的剂量依赖性效应。

在细胞内稳态维持过程中,Nrf2/HO-1信号通路对于抵御细胞氧化应激起着至关重要的作用。正常生理状态下,Nrf2与Kelch样环氧丙烷相关蛋白1(Keap1)紧密结合,从而处于失活状态。Keap1作为关键的负性调节因子,将Nrf2锚定于细胞质中,并促使其发生泛素化修饰,进而被蛋白酶体降解,以此阻碍Nrf2发挥转录调控功能^[23]。当细胞遭遇氧化应激时,即细胞内ROS的产生与抗氧化防御机制间出现失衡,一系列复杂的分子事件随即被触发。氧化应激诱导Keap1发生特定修饰,使得Nrf2与Keap1解离。脱离Keap1束缚的Nrf2迅速向细胞核内转移。在细胞核中,Nrf2特异性地结合到靶基因启动子区域的抗氧化反应元件(AREs)上。这种结合激活了一系列抗氧化酶基因的转录过程,其中HO-1是Nrf2最为重要的下游靶标之一^[24]。HO-1作为Nrf2/HO-1信号通路中的关键效应分子,深度参与了细胞抗氧化反应的调节。HO-1催化反应的产物不仅能够直接清除细胞内过多的ROS,还能通过调节多种细胞内信号通路,全面提升细胞的抗氧化能力^[25]。HO-1能保护细胞免受氧化应激引发的损伤,如脂质过氧化、蛋白质氧化及DNA损伤^[26-27]。

本研究结果表明,模型组细胞Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA相对表达量及Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均低于空白对照组($P<0.01$),淫羊藿苷低、高浓度组细胞Nrf2 mRNA、HO-1 mRNA相对表达量及Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.01$),淫羊藿苷高浓度组细胞Nrf2 mRNA相对表达量及Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均高于淫羊藿苷低浓度组($P<0.05$)。这表明淫羊藿苷可增强细胞抗氧化能力,其机制可能是通过激活Nrf2/HO-1信号通路从而抑制软骨细胞铁死亡。此外,淫羊藿苷低、高浓度组细胞GPX4 mRNA、SLC7A11 mRNA相对表达量及GPX4、SLC7A11蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.01$),说明淫羊藿苷对软骨细胞铁死亡的抑制作用部分可能是通过调节这些关键基因实现的。

综上所述,淫羊藿苷能通过激活Nrf2/HO-1信号通路对

抗铁死亡,可能机制为清除ROS,恢复细胞内氧化还原平衡,防止脂质过氧化产物的累积,从而中断铁死亡进程^[28-29]。淫羊藿苷能通过减轻软骨细胞内的氧化应激来预防或逆转铁死亡,进而维护软骨结构和功能的完整性^[30-31]。尽管本研究揭示了淫羊藿苷通过激活Nrf2/HO-1信号通路抑制软骨细胞铁死亡的潜在机制,但本研究仅为体外实验,限制了对其体内疗效的理解。未来研究需进一步开展动物实验以验证淫羊藿苷在体内环境下的治疗效果,深入探索其作用靶点和机制。

参考文献

- [1] MACAULEY D. Managing osteoarthritis of the knee[J]. B M J, 2004, 329(7478): 1300-1301.
- [2] 郭孝静,秦欢,项栋良,等.铁死亡在骨关节炎中的作用及中医药干预研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(19): 263-272.
- [3] GLYN-JONES S, PALMER A J R, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991): 376-387.
- [4] 常家乐,贾燕飞,郝廷,等.骨关节炎软骨细胞死亡与调控机制研究进展[J].中国骨与关节杂志,2025,14(1): 89-95.
- [5] GUO J X, SU K, WANG L Y, et al. Poly (p-coumaric acid) nanoparticles alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis [J]. Bioact Mater, 2024, 40: 212-226.
- [6] ZOU Z, HU W H, KANG F, et al. Interplay between lipid dysregulation and ferroptosis in chondrocytes and the targeted therapy effect of metformin on osteoarthritis[J]. J Adv Res, 2025, 69: 515-529.
- [7] WANG S Y, LI W W, ZHANG P F, et al. Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis via Piezo1 channel facilitated calcium influx[J]. J Adv Res, 2022, 41: 63-75.
- [8] EL-SHITANY N A, EID B G. Icarin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF- κ B signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109567.
- [9] 戴宗辉.基于网络药理学探讨“骨碎补-淫羊藿”治疗骨关节炎作用及机制[D].荆州:长江大学,2022.
- [10] LI X A, KHAN I, XIA W R, et al. Icarin enhances youth-like features by attenuating the declined gut microbiota in the aged mice[J]. Pharmacol Res, 2021, 168: 105587.
- [11] SI Y H, LI Y, GU K, et al. Icarin ameliorates osteoporosis in ovariectomized rats by targeting Cullin 3/Nrf2/OH pathway for osteoclast inhibition[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 173: 116422.
- [12] WANG M, GAO H Y, LI W H, et al. Icarin and its metabolites regulate lipid metabolism: From effects to molecular mechanisms[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110675.

- [13] 廖太阳,马振源,刘德仁,等.敲低核蛋白1通过抑制软骨细胞铁死亡延缓骨关节炎病理进展[J].浙江大学学报(医学版),2024,53(6):669-679.
- [14] ALLEN K D, THOMA L M, GOLIGHTLY Y M. Epidemiology of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022,30(2):184-195.
- [15] HE Q, LIN Y W, CHEN B H, et al. Vitamin K2 ameliorates osteoarthritis by suppressing ferroptosis and extracellular matrix degradation through activation GPX4's dual functions[J]. *Biomed Pharmacother*,2024, 175:116697.
- [16] HE R, WEI Y C, PENG Z Y, et al. α -Ketoglutarate alleviates osteoarthritis by inhibiting ferroptosis via the ETV4/SLC7A11/GPX4 signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol Lett*,2024, 29(1):88.
- [17] HE Q, YANG J Z, PAN Z F, et al. Biochanin A protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc-/ GPX4 axis[J]. *Biomed Pharmacother*,2023, 157:113915.
- [18] SUN K, HOU L C, GUO Z, et al. JNK-JUN-NCOA4 axis contributes to chondrocyte ferroptosis and aggravates osteoarthritis via ferritinophagy[J]. *Free Radic Biol Med*,2023, 200:87-101.
- [19] JIANG W, DING K X, YUE R S, et al. Therapeutic effects of icariin and icariside II on diabetes mellitus and its complications[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,2024, 64(17):5852-5877.
- [20] D'AUTRÉAUX B, TOLEDANO M B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2007, 8(10):813-824.
- [21] SHEN Q, CHADA S, WHITNEY C, et al. Regulation of the human cellular glutathione peroxidase gene during in vitro myeloid and monocytic differentiation[J]. *Blood*, 1994,84(11):3902-3908.
- [22] MAGALON J, FREY A, KAUX J F. Intra-articular platelet-rich plasma vs placebo injection and pain and medial tibial cartilage volume in patients with knee osteoarthritis[J]. *JAMA*,2022,327(12):1185-1186.
- [23] SUN Y X, XU A H, YANG Y, et al. Role of Nrf2 in bone metabolism[J]. *J Biomed Sci*,2015, 22:101.
- [24] KANNAN S, IRWIN M E, HERBRICH S M, et al. Targeting the NRF2/HO-1 antioxidant pathway in FLT3-ITD-positive AML enhances therapy efficacy[J]. *Antioxidants (Basel)*,2022, 11(4):717.
- [25] FUNES S C, RIOS M, FERNÁNDEZ-FIERRO A, et al. Naturally derived heme-oxygenase 1 inducers and their therapeutic application to immune-mediated diseases[J]. *Front Immunol*,2020, 11:1467.
- [26] SUN Y Y, ZHU H J, ZHAO R Y, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice[J]. *Redox Biol*,2023, 66:102852.
- [27] YANG C C, HSIAO L D, WANG C Y, et al. HO-1 upregulation by kaempferol via ROS-dependent Nrf2-ARE cascade attenuates lipopolysaccharide-mediated intercellular cell adhesion molecule-1 expression in human pulmonary alveolar epithelial cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(4):782.
- [28] SHENG W, LI B N, SUN T S, et al. Icaritin-curcumin promotes ferroptosis in prostate cancer cells through Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Exp Ther Med*,2024, 27(5):232.
- [29] WANG H Y, SUN K X, SHAN T W, et al. Icaritin promoted ferroptosis by activating mitochondrial dysfunction to inhibit colorectal cancer and synergistically enhanced the efficacy of PD-1 inhibitors[J]. *Phytomedicine*,2025, 136:156224.
- [30] SHAO Y D, SUN L, YANG G H, et al. Icaritin protects vertebral endplate chondrocytes against apoptosis and degeneration via activating Nrf-2/HO-1 pathway [J]. *Front Pharmacol*,2022, 13:937502.
- [31] XIAO J, LUO C G, LI A M, et al. Icaritin inhibits chondrocyte ferroptosis and alleviates osteoarthritis by enhancing the SLC7A11/GPX4 signaling[J]. *Int Immunopharmacol*,2024, 133:112010.

(收稿日期:2025-03-18 编辑:蒋凯彪)

(上接第8页)peripheral nerve injury and pain[J]. *Int Immunopharmacol*,2022, 110:109026.

- [30] 王伟,郭召,杨利新,等.miR-199及TNF- α 在人退变椎间盘髓核组织中的表达及生物学作用[J].*河北医药*,2025, 47(2):212-217.
- [31] LU S X, LI M, CHENG Z Y, et al. HMGB1-mediated

macrophage regulation of NF- κ B activation and MMP3 upregulation in nucleus pulposus cells: A critical mechanism in the vicious cycle of intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Signal*,2025, 127:111628.

(收稿日期:2025-04-02 编辑:蒋凯彪)