

# 木犀草素调控Nrf2/HO-1通路对LPS诱导的 软骨细胞损伤的影响

潘永利<sup>1</sup> 热合木江·木合塔尔<sup>1</sup> 塔依尔·帕拉提<sup>1</sup> 刘丽琼<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>巴音郭楞蒙古自治州人民医院关节外科, 新疆 841000; <sup>2</sup>宝石花库勒医院中医康复科, 新疆 841000)

**摘要** 该研究探究木犀草素(Luteolin)调控核红细胞相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)通路对脂多糖(LPS)诱导的软骨细胞损伤的影响。将人软骨细胞系C28/I2细胞分为空白组、LPS组(10  $\mu\text{g/mL}$ )、Luteolin低、中和高剂量(25、50和100  $\mu\text{mol/L}$ )组和Luteolin(100  $\mu\text{mol/L}$ )+Nrf2抑制剂(5  $\mu\text{mol/L}$  ML385)组,除空白组外,其余组细胞均使用LPS诱导细胞损伤。采用乳酸脱氢酶(LDH)法检测细胞毒性;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞活力;TUNEL染色检测细胞凋亡情况;酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和白细胞介素-6(IL-6)浓度;比色法检测氧化应激因子总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平;探针DCFH-DA检测活性氧(ROS)生成水平;Western blot检测细胞中Nrf2、HO-1、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶5(ADAMTS-5)蛋白表达情况。与空白组相比,LPS组细胞LDH含量、TUNEL阳性率、TNF- $\alpha$ 浓度、iNOS浓度、IL-6浓度、ROS水平、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平均升高( $P<0.05$ ),  $D_{450}$ 值、CAT和T-SOD活性以及Nrf2和HO-1蛋白表达水平均降低( $P<0.05$ );与LPS组相比,25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组细胞LDH、TUNEL阳性率、TNF- $\alpha$ 浓度、iNOS浓度、IL-6浓度、ROS水平、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ),  $D_{450}$ 值、CAT和T-SOD活性以及Nrf2和HO-1蛋白表达水平升高( $P<0.05$ );与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组相比,Luteolin+ML385组细胞LDH含量、TUNEL阳性率、TNF- $\alpha$ 浓度、iNOS浓度、IL-6浓度、ROS水平、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),  $D_{450}$ 值、CAT和T-SOD活性以及Nrf2和HO-1蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。Luteolin通过激活Nrf2/HO-1通路可以减弱LPS诱导的软骨细胞损伤作用。

**关键词** 木犀草素;核红细胞相关因子2;血红素加氧酶-1;脂多糖;软骨细胞损伤

## Effect of Luteolin on LPS Induced Chondrocyte Injury by Regulating Nrf2/HO-1 Pathway

PAN Yongli<sup>1</sup>, Rehemujiang muhetaer<sup>1</sup>, Tayier palati<sup>1</sup>, LIU Liqiong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Joint Surgery, Bayingolin Mongolian Autonomous Prefecture People's Hospital, Xinjiang 841000, China;

<sup>2</sup>Department of Rehabilitation of Traditional Chinese Medicine, Baoshihua Korla Hospital, Xinjiang 841000, China)

**Abstract** This study investigated the protective effect of LPS (Luteolin) on lipopolysaccharide-induced chondrocyte injury by regulating the Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)/HO-1 (heme oxygenase-1) pathway. Human chondrocyte line C28/I2 cells were assigned into blank group, LPS group (10  $\mu\text{g/mL}$ ), low dose

收稿日期: 2024-12-20 接受日期: 2025-04-27

\*通信作者。Tel: 13201137893, E-mail: 466096544@qq.com

Received: December 20, 2024

Accepted: April 27, 2025

\*Corresponding author. Tel: +86-13201137893, E-mail: 466096544@qq.com

Luteolin (25  $\mu\text{mol/L}$ ) group, medium dose Luteolin (50  $\mu\text{mol/L}$ ) group, high dose Luteolin (100  $\mu\text{mol/L}$ ) group, and Luteolin (100  $\mu\text{mol/L}$ )+Nrf2 inhibitor (5  $\mu\text{mol/L}$  ML385) group. Except for the blank group, all other groups were induced cell injury with LPS. The LDH (lactate dehydrogenase) method was used to detect cytotoxicity. CCK-8 (cell counting kit-8) method was used to detect cell viability. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kits were used to detect the concentrations of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), iNOS (inducible nitric oxide synthase), and IL-6 (interleukin-6). The colorimetric method was used to detect oxidative stress factors T-SOD (total superoxide dismutase) and CAT (catalase). The probe DCFH-DA was used to detect the generation of ROS (reactive oxygen species). Western blot was used to detect the protein expression of Nrf2, HO-1, MMP-13 (matrix metalloproteinase-13), and a disintegrin and metalloproteinase with ADAMTS-5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 5) in cells. Compared with the blank group, the cell LDH content, TUNEL positivity rate, TNF- $\alpha$ , iNOS and IL-6 concentrations, ROS level, MMP-13 and ADAMTS-5 protein expression levels increased in LPS group ( $P<0.05$ ), while the  $D_{450}$  value, CAT and T-SOD activities, Nrf2 and HO-1 protein expression levels reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the LPS group, the cell LDH content, TUNEL positivity rate, TNF- $\alpha$ , iNOS and IL-6 concentrations, ROS level, MMP-13 and ADAMTS-5 protein expression levels reduced in 25, 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin groups ( $P<0.05$ ), while the  $D_{450}$  value, CAT and T-SOD activities, Nrf2 and HO-1 protein expression levels increased ( $P<0.05$ ). Compared with the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group, the cell LDH content, TUNEL positivity rate, TNF- $\alpha$ , iNOS and IL-6 concentrations, ROS level, MMP-13 and ADAMTS-5 protein expression levels increased in Luteolin+ML385 group ( $P<0.05$ ), while the  $D_{450}$  value, CAT and T-SOD activities, Nrf2 and HO-1 protein expression levels reduced ( $P<0.05$ ). Luteolin inhibits LPS-induced chondrocyte injury by activating Nrf2/HO-1 pathway.

**Keywords** Luteolin; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1; lipopolysaccharide; chondrocyte injury

骨关节炎是一种慢性关节退行性疾病,目前无法完全治愈,软骨细胞持续性凋亡和细胞外基质降解是骨关节炎的主要特征<sup>[1]</sup>。越来越多的证据表明,一些感染性刺激物质[如内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)]会诱导软骨细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)和炎症细胞因子的表达,破坏软骨稳态平衡,激活炎症反应,导致软骨细胞凋亡<sup>[2]</sup>。因此,在治疗骨关节炎方面,发现新型有效抗炎抗氧化剂以保护软骨细胞免受氧化损伤和炎症反应的研究日益受到关注。众所周知,核红细胞相关因子2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)在调节包括软骨细胞在内的各种细胞的抗氧化过程中起着关键作用,其介导抗氧化信号[如血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)]以消除细胞内ROS积累,进而抵抗氧化应激损伤<sup>[3]</sup>。研究表明, Nrf2/HO-1通路参与骨关节炎的抗炎和抗氧化作用,目前已有多种药物上调Nrf2表达以改善骨关节炎, Nrf2的激活有助于抑制促炎细胞因子的分泌和细胞外基质的降解<sup>[4-5]</sup>。过去几十年,大多数研究集中于发掘治疗

骨关节炎的天然产物,作为类黄酮家族的重要成员,木犀草素(Luteolin)广泛存在于许多植物中,研究表明,其具有一系列治疗特性,如抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用, Luteolin可通过激活Nrf2信号通路改善高尿酸血症肾病及减弱弓形虫感染诱导的肝损伤<sup>[6-7]</sup>。最新报道称Luteolin可以调节骨关节炎软骨细胞的合成和分解代谢<sup>[8]</sup>,网络药理学和KEGG富集分析证明Luteolin在治疗骨关节炎中发挥至关重要的作用<sup>[9]</sup>。然而, Luteolin对软骨细胞的潜在生物学效应和机制尚不清晰,因此,本研究基于Nrf2/HO-1通路探讨了Luteolin对LPS诱导的软骨细胞损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人软骨细胞系C28/I2细胞和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号: SCC043、F8687)购于Sigma公司; DMEM高糖培养基(货号: 11965118)购于ThermoFisher Scientific公司; 0.25%的胰酶(含EDTA)和青/链霉素双抗(货号: PB180220、PB180120)购于

普诺赛生物科技有限公司; Nrf2抑制剂ML385(货号: S8790)购于Selleck公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(货号: CSB-E09315h、CSB-E08148h、CSB-E04638h)购于武汉华美生物有限公司; 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(货号: 40203ES60)购于上海翌圣生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒、一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)和DAPI溶液(货号: C0016、C1088、C1002)购于上海碧云天生物技术有限公司; 活性氧(ROS)荧光法测试盒、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)比色法测试盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)比色法测试盒(货号: E-BC-K138-F、E-BC-K019-M、E-BC-K031-M)购于伊莱瑞特生物科技有限公司; Nrf2、HO-1、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶5(ADAMTS-5)和GAPDH一抗(货号: ab62352、ab305290、ab315267、ab182795、ab9485)、二抗(山羊抗兔/抗鼠)购于Abcam公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将C28/I2细胞放入5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱静置4 h使细胞适应稳定, 加800  $\mu$ L 0.25%的胰酶, 再放入37 °C培养箱消化2 min, 将溶液吸入无菌离心管内37 °C、1 000 r/min离心5 min。弃上清, 视细胞数量分瓶(一般一传二), 用DMEM高糖培养基+10% FBS+1%双抗的细胞完全培养基培养。

**1.2.2 LPS诱导与分组** 将C28/I2细胞分为空白组, LPS组, Luteolin低、中和高剂量组以及Luteolin+ML385组, 空白组用完全培养基培养; LPS组细胞用含10  $\mu$ g/mL LPS的完全培养基培养; Luteolin低、中和高剂量组细胞分别用含25、50和100  $\mu$ mol/L Luteolin的完全培养基培养, 同时均加入10  $\mu$ g/mL LPS; Luteolin+ML385组细胞用含10  $\mu$ g/mL LPS、100  $\mu$ mol/L Luteolin和5  $\mu$ mol/L ML385的完全培养基培养。

**1.2.3 LDH法检测细胞毒性** 将C28/I2细胞根据1.2.2分组处理24 h, 吸除上清, 每孔加入150  $\mu$ L LDH试剂(用PBS稀释10倍)适当摇晃培养板混匀, 继续在37 °C细胞培养箱中孵育1 h。随后分别取各孔的上清液120  $\mu$ L, 加入到新的相应孔(96孔板)中, 随即在

波长为490 nm处进行测定吸光度(*D*)值。

**1.2.4 CCK-8法检测细胞活力** 将C28/I2细胞(每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞)接种在96孔板中, 相应分组给药处理24 h后, 每孔加入15  $\mu$ L CCK-8溶液, 在37 °C细胞培养箱中孵育2 h, 使用酶标仪检测波长为450 nm处的吸光度(*D*)值。

**1.2.5 TUNEL染色检测细胞凋亡** 将各组C28/I2细胞接种在12孔板( $1 \times 10^5$ 个细胞/mL)中处理24 h, 免疫固定液室温固定30 min, PBS洗涤2次; 每孔加100  $\mu$ L TUNEL(5 mmol/L)检测液, 37 °C避光孵育1 h, PBS洗涤2次; 正常细胞用DAPI(2  $\mu$ g/mL)染色, PBS洗涤3次, 在荧光显微镜下观察, TUNEL的激发波长为550 nm, 发射波长为570 nm(红色荧光), DAPI的激发波长为364 nm, 发射波长为454 nm(蓝色荧光), TUNEL阳性率=(红色荧光细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

**1.2.6 ELISA检测炎症因子浓度** 将C28/I2细胞以 $3 \times 10^5$ 个/mL的密度接种在6孔板, 各组于37 °C孵育24 h, 重悬细胞37 °C、800 r/min离心6 min, 收集上清液, 用ELISA试剂盒说明书步骤操作, 测定细胞TNF- $\alpha$ 、iNOS和IL-6浓度。

**1.2.7 比色法检测氧化应激因子水平** 各组约取 $1 \times 10^6$ 个细胞加入300  $\mu$ L PBS匀浆。匀浆后, 4 °C下10 000 r/min离心10 min, 取上清液根据说明书步骤操作检测。CAT: 用酶标仪在波长为405 nm处测定*D*值。T-SOD: 用酶标仪在波长为450 nm处测定*D*值。

**1.2.8 DCFH-DA探针检测ROS水平** 将C28/I2细胞按分组培养24 h, 无血清培养基稀释的DCFH-DA探针(10  $\mu$ mol/L)充分覆盖各组细胞。37 °C培养箱孵育30 min, 吸去培养基, PBS重悬3次, 37 °C、1 000 r/min离心5 min, 去除上清, 再次加入PBS悬浮细胞, 流式细胞仪测定ROS水平。

**1.2.9 Western blot检测细胞蛋白表达** 提取各组C28/I2细胞总蛋白, 并使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质并将其转移至硝酸纤维素膜上。在室温下用5%脱脂奶粉封闭膜2 h, 然后在含有Tween-20的Tris缓冲液中洗涤3次, 每次5 min。将膜与抗Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、MMP-13(1:1 000)、ADAMTS-5(1:1 200)和GAPDH(1:2 500)的一抗在4 °C下孵育过夜。洗涤3次, 将膜与相应的稀释2 500倍的二抗(山羊抗兔/抗鼠)在室温下孵育2 h。最后, 使用增强的化学发光剂对膜进行

可视化, 并成像系统上捕获, Image J软件通过光密度测定法定量免疫反应条带。

### 1.3 统计分析

数据表示为平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ), 采用 SPSS 22.0进行单因素方差分析(ANOVA)评估多组间差异, 再使用SNK-*q*检验比较任意两组之间的差异。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

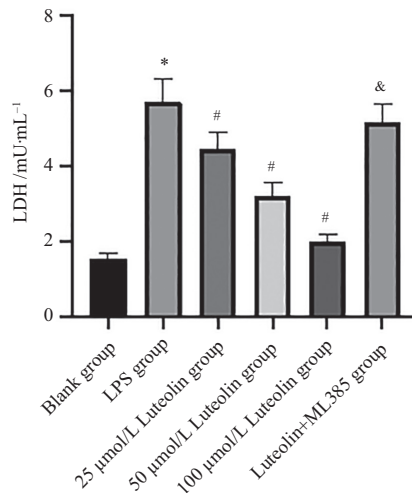
### 2.1 Luteolin可减弱LPS对C28/I2细胞的毒性

LDH法检测各组 C28/I2细胞毒性, LDH含量越

高, 细胞毒性越大(图1)。与空白组相比, LPS组细胞LDH含量升高( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组细胞LDH含量降低( $P<0.05$ ); 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞LDH含量升高( $P<0.05$ )。

### 2.2 Luteolin可增强LPS诱导的C28/I2细胞活性

CKK-8法检测各组C28/I2细胞活性,  $D_{450}$ 值越大, 细胞活性越高(图2)。与空白组相比, LPS组细胞 $D_{450}$ 值降低( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组细胞 $D_{450}$ 值升高( $P<0.05$ ); 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞 $D_{450}$ 值降低

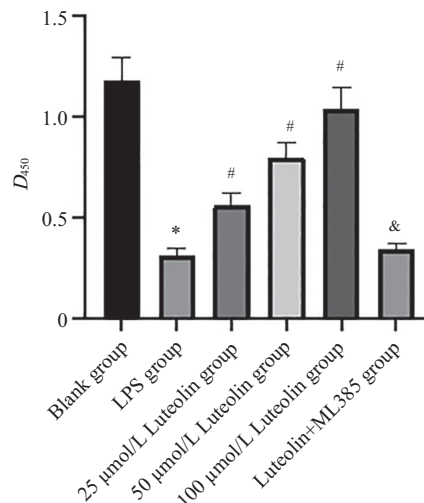


\* $P<0.05$ , 与空白组比; # $P<0.05$ , 与LPS组比; & $P<0.05$ , 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组比。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ 。

\* $P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the LPS group; & $P<0.05$  compared with the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ 。

图1 各组C28/I2细胞LDH含量

Fig.1 The LDH content of C28/I2 cells in each group



\* $P<0.05$ , 与空白组比; # $P<0.05$ , 与LPS组比; & $P<0.05$ , 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组比。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ 。

\* $P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the LPS group; & $P<0.05$  compared with the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ 。

图2 各组C28/I2细胞 $D_{450}$ 值

Fig.2  $D_{450}$  values of C28/I2 cells in each group

( $P<0.05$ )。

### 2.3 Luteolin抑制LPS诱导的C28/I2细胞凋亡

TUNEL染色检测各组C28/I2细胞凋亡情况(图3和图4)。与空白组相比, LPS组细胞TUNEL阳性率增大( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组细胞TUNEL阳性率减小( $P<0.05$ ); 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞TUNEL阳性率增大( $P<0.05$ )。

### 2.4 Luteolin降低LPS诱导的C28/I2细胞炎症因子浓度

ELISA试剂盒检测各组C28/I2细胞促炎因子浓度, 结果如图5。与空白组相比, LPS组细胞TNF- $\alpha$ 、iNOS和IL-6浓度升高( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组细胞TNF- $\alpha$ 、iNOS和IL-6浓度降低( $P<0.05$ ); 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞TNF- $\alpha$ 、iNOS和IL-6浓度升

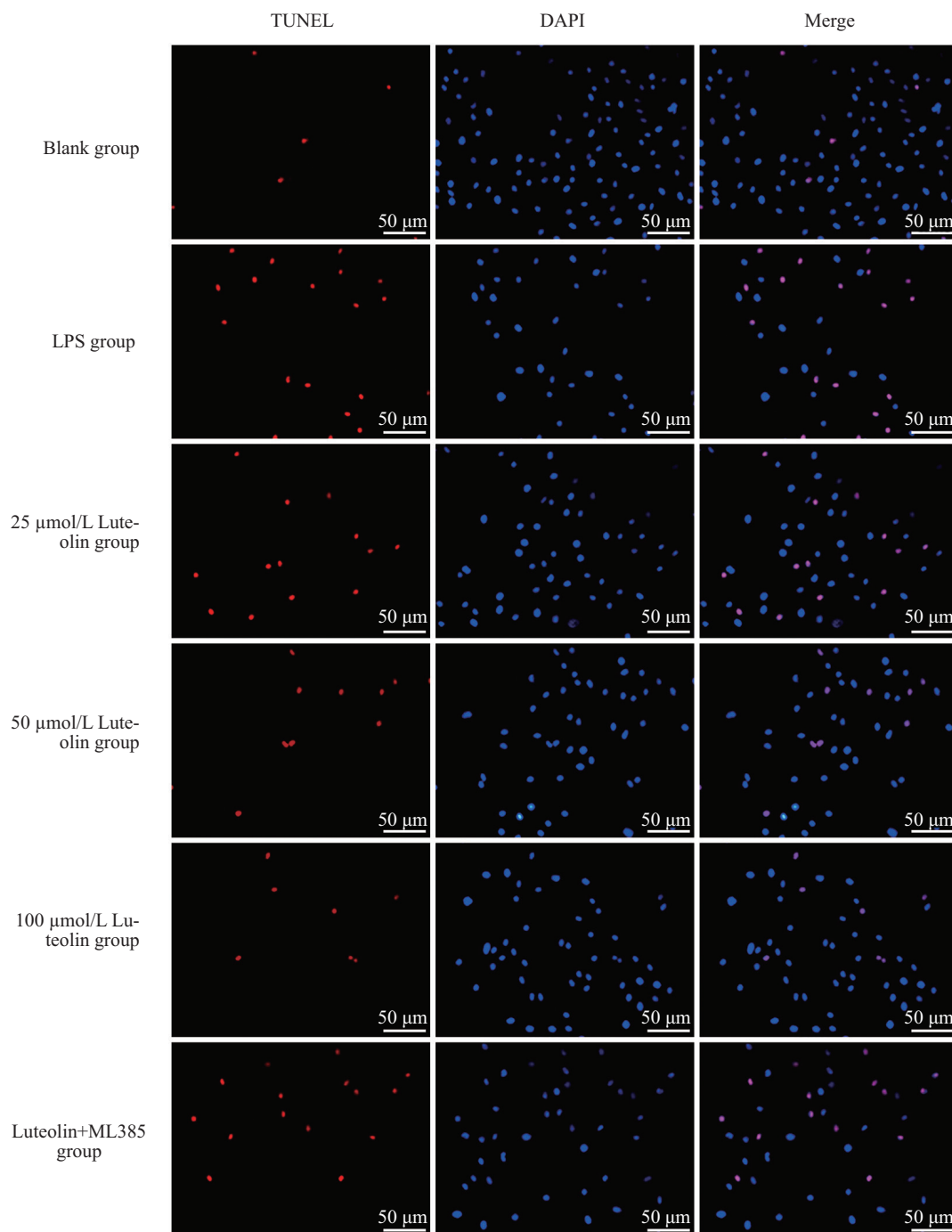
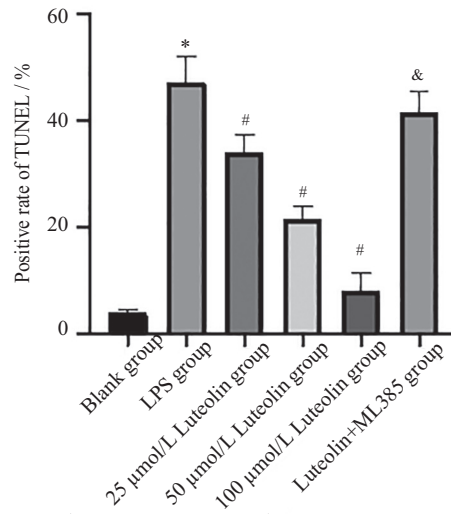


图3 各组C28/I2细胞TUNEL染色图

Fig.3 TUNEL staining plots of C28/I2 cells in each group

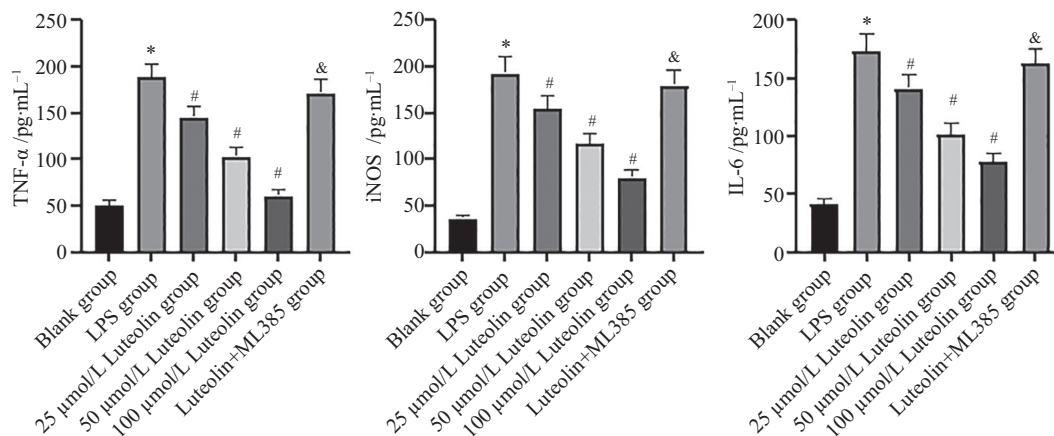


\* $P < 0.05$ , 与空白组比; # $P < 0.05$ , 与LPS组比; & $P < 0.05$ , 与100 μmol/L Luteolin组比。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the blank group; # $P < 0.05$  compared with the LPS group; & $P < 0.05$  compared with the 100 μmol/L Luteolin group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ 。

图4 各组C28/I2细胞TUNEL阳性率

Fig.4 The positive rate of TUNEL in C28/I2 cells of each group



\* $P < 0.05$ , 与空白组比; # $P < 0.05$ , 与LPS组比; & $P < 0.05$ , 与100 μmol/L Luteolin组比。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the blank group; # $P < 0.05$  compared with the LPS group; & $P < 0.05$  compared with the 100 μmol/L Luteolin group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ 。

图5 各组C28/I2细胞TNF-α、iNOS和IL-6浓度

Fig.5 The concentrations of TNF-α, iNOS and IL-6 in C28/I2 cells of each group

高( $P < 0.05$ )。

## 2.5 Luteolin抑制LPS诱导的C28/I2细胞氧化应激

各组C28/I2细胞氧化应激情况, 结果如图6和图7。与空白组相比, LPS组细胞CAT和T-SOD活性降低, ROS水平升高( $P < 0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100 μmol/L Luteolin组细胞CAT和T-SOD活性升高, ROS水平降低( $P < 0.05$ ); 与100 μmol/L Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞CAT和T-SOD活性降低, ROS水平升高( $P < 0.05$ )。

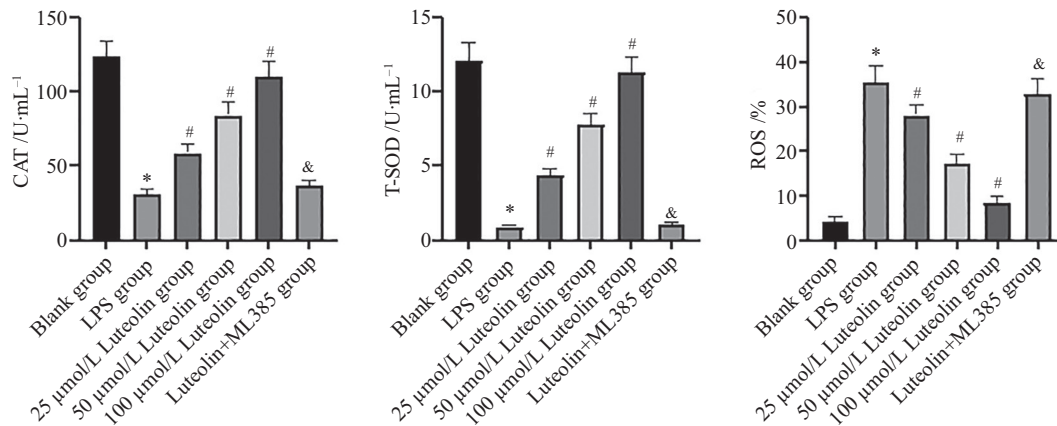
## 2.6 Luteolin对LPS诱导的C28/I2细胞蛋白表达的影响

Western blot检测各组C28/I2细胞蛋白表达水

平, 结果如图8和图9。与空白组相比, LPS组细胞Nrf2和HO-1蛋白表达水平降低, MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与LPS组相比, 25、50和100 μmol/L Luteolin组细胞Nrf2和HO-1蛋白表达水平升高, MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ); 与100 μmol/L Luteolin组相比, Luteolin+ML385组细胞Nrf2和HO-1蛋白表达水平降低, MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

随着总人口年龄的增长, 越来越多的老年人患



\* $P < 0.05$ , 与空白组比; # $P < 0.05$ , 与LPS组比; & $P < 0.05$ , 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组比。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the blank group; # $P < 0.05$  compared with the LPS group; & $P < 0.05$  compared with the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ .

图6 各组C28/I2细胞CAT和T-SOD活性及ROS水平

Fig.6 The activities of CAT and T-SOD and the levels of ROS in C28/I2 cells of each group

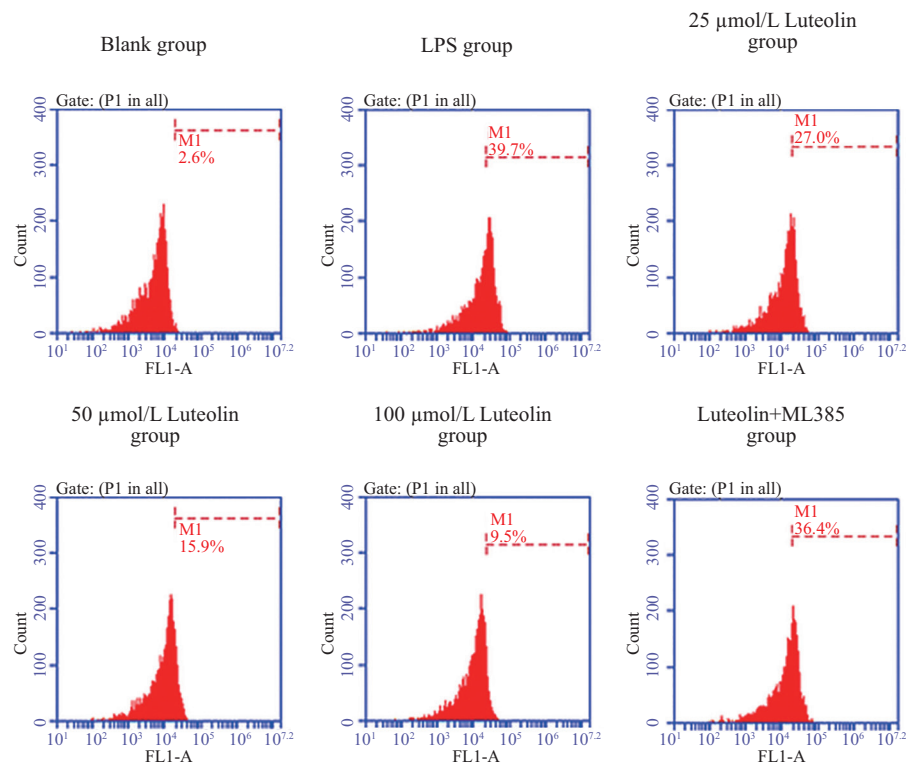
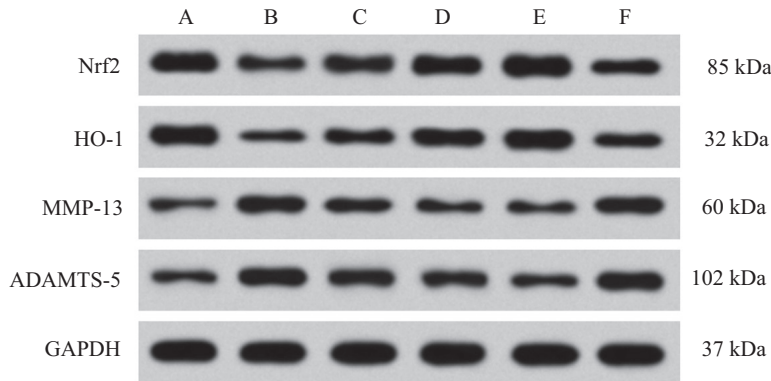


图7 流式细胞仪检测ROS水平

Fig.7 The ROS level was detected by flow cytometry

有骨关节炎,这严重影响了其生活质量,大多数患者忽视早期症状,治疗不当,导致病情持续恶化<sup>[10]</sup>。目前药物治疗主要包括口服氨基葡萄糖和关节内注射透明质酸钠,并不能从根本上抑制软骨破坏和炎症恶化的过程<sup>[11]</sup>。植物萃取的化合物具有抗炎活性,且副作用较小,是治疗骨关节炎的理想药物,近来受到越来越多的关注,流行病学研究表明,食用含

Luteolin的食物能够降低患慢性病的风险<sup>[12]</sup>。已有报道显示,Luteolin能抑制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的原代小鼠软骨细胞死亡及氧化应激、炎症介质的产生,从而减缓骨关节炎进展<sup>[13]</sup>。LPS是常用的炎症诱导剂,致使脂质过氧化和DNA损伤,导致细胞外基质降解和细胞凋亡<sup>[14]</sup>。因此,本研究利用LPS诱导软骨细胞损伤以模拟体外骨关节炎,并探究Luteolin对LPS诱导

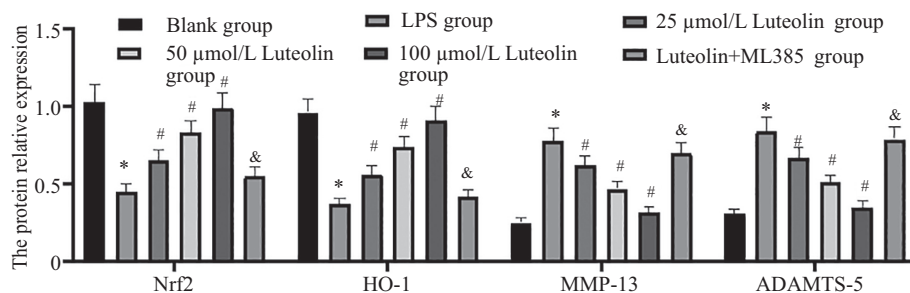


A: 空白组; B: LPS组; C: 25  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组; D: 50  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组; E: 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组; F: Luteolin+ML385组。

A: the blank group; B: the LPS group; C: the 25  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group; D: the 50  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group; E: the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group; F: the Luteolin+ML385 group.

图8 各组C28/I2细胞Nrf2、HO-1、MMP-13和ADAMTS-5蛋白条带

Fig.8 Protein bands of Nrf2, HO-1, MMP-13 and ADAMTS-5 in C28/I2 cells of each group



\* $P < 0.05$ , 与空白组比; # $P < 0.05$ , 与LPS组比; & $P < 0.05$ , 与100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin组比。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the blank group; # $P < 0.05$  compared with the LPS group; & $P < 0.05$  compared with the 100  $\mu\text{mol/L}$  Luteolin group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .

图9 各组C28/I2细胞Nrf2、HO-1、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平

Fig.9 The protein expression levels of Nrf2, HO-1, MMP-13 and ADAMTS-5 in C28/I2 cells of each group

的软骨细胞的作用,结果显示,LPS诱导的C28/I2细胞中LDH含量和TUNEL阳性率升高, $D_{450}$ 值降低,而Luteolin降低LPS诱导对软骨细胞的毒性,并抑制细胞凋亡,促进LPS损伤的软骨细胞增殖,表明Luteolin能够增强LPS诱导的软骨细胞活性。

研究表明,炎症和氧化应激是导致骨关节炎进展的主要病理原因<sup>[15]</sup>。炎症反应导致ROS的生成量增加,诱发氧化应激和组织损伤,如细胞外基质降解;反之,过量的ROS可破坏生物大分子,刺激部分转录因子和促炎基因(如*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和*IL-6*)表达,激活信号级联,导致炎症的发生和发展<sup>[16]</sup>。过度ROS会导致DNA损伤,ROS在细胞中的积累触发金属蛋白酶和聚集蛋白聚合酶的激活以及糖胺聚糖和胶原蛋白的降解,从而加速软骨降解,诱导软骨细胞凋亡,同时伴随慢性炎症反应,最终导致软骨损伤<sup>[17]</sup>。因此,炎症和氧化应激密不可分,形成恶性循环,引发包括骨关节炎在内的一系列疾病的发生

和发展。在炎症条件下,基质降解酶MMP-13和ADAMTS5水平增加促进细胞外基质降解,因此,可以通过抑制炎症介质的表达延缓关节软骨退化进程<sup>[18]</sup>。过量ROS导致的氧化应激促进脂质过氧化、蛋白质损伤和DNA断裂,最终导致软骨细胞凋亡和关节软骨降解的发生,抑制ROS的产生和氧化应激可以有效保护软骨细胞<sup>[19]</sup>。在本研究中,Luteolin治疗显著抑制了LPS诱导的软骨细胞中炎症因子和ROS的产生,降低了MMP-13和ADAMTS5蛋白水平,缓解了软骨细胞凋亡,促进了抗氧化酶T-SOD和CAT的生成。结果表明,Luteolin有效减缓LPS诱导的软骨细胞炎症反应和细胞外基质降解,改善软骨细胞的氧化损伤和抑制细胞凋亡。

Nrf2是一种公认的转录因子,通过调节参与细胞氧化还原平衡的基因表达抑制氧化应激和炎症<sup>[20]</sup>。在静止情况下,Nrf2与胞质中的Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)结合,

一旦被ROS或其他氧化应激激活, Nrf2将从Keap1中解离并进入细胞核, 与基因启动子中的抗氧化反应元件结合, 从而促进多种抗氧化酶的转录和表达<sup>[21]</sup>。研究表明, Nrf2通过调节软骨细胞中的氧化还原平衡, 保护软骨细胞免受氧化损伤和炎症, 维持关节软骨的稳态, 防止软骨退化, 减缓骨关节炎的进展<sup>[22]</sup>。在本研究中, Luteolin处理促进了LPS诱导的软骨细胞中Nrf2及其依赖性抗氧化基因*HO-1*表达上调, 表明Luteolin可以有效激活软骨细胞中的Nrf2/HO-1信号通路。另外, Nrf2的特异性抑制剂ML-385的加入成功破坏了Luteolin可以减缓LPS诱导的软骨细胞损伤的作用, 提示了Nrf2/HO-1通路可能参与Luteolin对软骨细胞的保护。

综上所述, Luteolin通过激活Nrf2/HO-1通路对LPS诱导的软骨细胞损伤具有减缓作用。本研究结果表明, 具有抗炎和抗氧化活性的Luteolin可能是一种新型有效的骨关节炎治疗方法, 并为临床骨关节炎疗法提供了新的研究方向。本研究存在一些限制, 需要体内实验进一步研究以揭示确切的体内机制, 此外, 未来的研究还将确定理想的剂量、持续治疗时间和长期效果, 从而更好地了解其治疗价值。

### 参考文献 (References)

- [1] XU J, WANG G, HOU Y, et al. RICTOR-mediated activation of AKT/mTOR signaling and autophagy inhibition promote osteoarthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 144(1): 113681.
- [2] LI M, XIAO J, CHEN B, et al. Loganin inhibits the ROS-NLRP3-IL-1 $\beta$  axis by activating the NRF2/HO-1 pathway against osteoarthritis [J]. *Chin J Nat Med*, 2024, 22(11): 977-90.
- [3] CHEN S, MENG C, HE Y, et al. An *in vitro* and *in vivo* study: valencene protects cartilage and alleviates the progression of osteoarthritis by anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123(1): 110726.
- [4] WU J, LI H, HU F, et al. Stevioside attenuates osteoarthritis via regulating Nrf2/HO-1/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 38(1): 190-202.
- [5] YU H, LOU J, NI L, et al. Isoquercetin ameliorates osteoarthritis via Nrf2/NF- $\kappa$ B axis: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 104(3): e14620.
- [6] YU H, HUANG L, GUI L, et al. Luteolin ameliorates hyperuricemic nephropathy by activating urate excretion and Nrf2/HO-1/NQO1 antioxidant pathways in mice [J]. *Food Sci Nutr*, 2024, 12(10): 8053-66.
- [7] HAN C, GUAN L, XU L. Protective effect of luteoloside against *Toxoplasma gondii*-induced liver injury through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B and P2X7R/NLRP3 and enhancing Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Parasitol Res*, 2023, 122(6): 1333-42.
- [8] LI Y, DING Z, LIU F, et al. Luteolin regulating synthesis and catabolism of osteoarthritis chondrocytes via activating autophagy [J]. *Heliyon*, 2024, 10(11): e31028.
- [9] CHEN G Y, LIU X Y, CHEN J Q, et al. Prediction of rhizoma drynariae targets in the treatment of osteoarthritis based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021(1): 5233462.
- [10] LIANG J, WANG Y, YU F, et al. Evaluation of the osteoarthritis disease burden in China from 1990 to 2021: based on the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Front Public Health*, 2024, 12(1): 1478710.
- [11] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.
- [12] HUANG L, KIM M Y, CHO J Y. Immunopharmacological activities of luteolin in chronic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2136.
- [13] ZHOU Z, ZHANG L, LIU Y, et al. Luteolin protects chondrocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury and attenuates osteoarthritis progression by activating AMPK-Nrf2 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5635797.
- [14] MENG M, HUO R, WANG Y, et al. Lentinan inhibits oxidative stress and alleviates LPS-induced inflammation and apoptosis of BMECs by activating the Nrf2 signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222(1): 2375-91.
- [15] ANSARI M Y, AHMAD N, HAQQI T M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: role of polyphenols [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129(1): 110452.
- [16] ZHENG L, ZHANG Z, SHENG P, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 66(1): 101249.
- [17] ZHOU M, LIU B, YE H M, et al. ROS-induced imbalance of the miR-34a-5p/SIRT1/p53 axis triggers chronic chondrocyte injury and inflammation [J]. *Heliyon*, 2024, 10(11): e31654.
- [18] WEI S, CHENG R J, LI S, et al. MSC-microvesicles protect cartilage from degradation in early rheumatoid arthritis via immunoregulation [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 673.
- [19] JING Q, ZHOU C, ZHANG J, et al. Role of reactive oxygen species in myelodysplastic syndromes [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 53.
- [20] HE F, RU X, WEN T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4777.
- [21] ULASOV A V, ROSENKRANZ A A, GEORGIEV G P, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: towards specific regulation [J]. *Life Sci*, 2022, 291(1): 120111.
- [22] SAHA S, REBOUH N Y. Anti-osteoarthritis mechanism of the Nrf2 signaling pathway [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3176.