基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003683

香豆素调控SASP抑制细胞衰老缓解骨关节炎的试验研究

刘恺文，叶元兰，郭凤劲
（重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探究香豆素（coumarin）对骨关节炎（osteoarthritis，OA）疾病的影响及其具体作用机制。**方法：**在Venny2.1.0网站将香豆素与OA的作用靶点交叉后，利用STRING数据库进行蛋白互作PPI分析，并利用Autodock vina1.1.2对筛选到的香豆素和OA疾病的靶点进行分子对接。接下来进行体外实验验证，实验分组设置为对照组、IL-1β组和IL-1β+coumarin组。CCK-8法检测香豆素对C28/I2细胞的细胞毒性，qPCR及免疫荧光检测各组OA相关标志物及SASP因子表达情况，并利用β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老水平。**结果：**共筛选到香豆素作用靶点196个，其中香豆素与OA共同作用靶点127个。PPI分析筛选到了CCND1、EGFR、ERBB2、MAPK14等4个香豆素治疗OA的可能的核心靶点。分子对接结果显示，香豆素与核心靶点CCND1、EGFR、ERBB2、MAPK14能形成较稳定的复合物。CCK-8结果显示，5~15 μmol/L香豆素处理C28/I2细胞促进细胞增殖，而高于20 μmol/L的香豆素处理则会抑制细胞活性（$P<0.05$）；其中10 μmol/L香豆素在24 h、48 h、72 h均会促进细胞增殖（$P<0.05$），且处理48 h增殖最为明显（$P<0.05$）。qPCR结果显示，10 μmol/L的香豆素处理48 h能降低C28/I2细胞中细胞衰老标志基因p16、p21的mRNA水平，β-半乳糖苷酶染色的结果与qPCR的结果一致。香豆素处理后SASP因子IL-1β、IL-6、TNF-α、MMP9、MMP13的mRNA水平降低（$P<0.05$）。同样地，免疫荧光结果也显示香豆素处理后部分SASP因子表达水平降低。**结论：**香豆素可能通过作用于p38/MAPK14通路，抑制SASP导致的细胞衰老及软骨分解，从而治疗骨关节炎。

【关键词】细胞衰老；衰老相关分泌表型；骨关节炎；香豆素；衰老相关分泌表型因子
【中图分类号】R285 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2023-12-29

Coumarin alleviates osteoarthritis by regulating senescence-associated secretory phenotype and inhibiting cell senescence: an experimental study

Liu Kaiwen, *Ye Yuanlan*, *Guo Fengjin*
(*Department of Cell Biology and Genetics*, *School of Basic Medicine*, *Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of coumarin on osteoarthritis (OA) and its specific mechanism of action. ***Methods*:** Venny2.1.0 website was used to obtain the intersecting targets of coumarin and OA, STRING database was used to perform a protein-protein interaction (PPI) analysis, and Autodock vina1.1.2 was used to perform molecular docking between the targets of coumarin and the disease targets of OA. An *in vitro* experiment was conducted, and the cells were divided into control group, IL-1β group, and IL-1β+coumarin group. CCK-8 assay was used to observe the cytotoxicity of coumarin on C28/I2 cells, qPCR and immunofluorescence assay were used to measure the expression of OA-related markers and SASP factors in each group, and β-galactosidase staining was used to measure the level of cell senescence. ***Results*:** A total of 196 action targets were obtained for coumarin, including 127 intersecting targets of coumarin and OA. PPI analysis obtained four possible core targets of coumarin in treating OA, i.e., CCND1, EGFR, ERBB2, and MAPK14. Molecular docking showed that coumarin could form a relatively stable complex with the core targets *CCND1*, *EGFR*, ERBB2, and MAPK14. CCK-8 assay showed that treatment of C28/I2 cells with 5-15 μmol/L coumarin promoted cell proliferation, while treatment with coumarin at a concentration of >20 μmol/L inhibited viability ($P<0.05$); in addition, 10 μmol/L coumarin promoted cell proliferation at 24, 48, and 72 hours ($P<0.05$), with the most significant proliferation at 48 hours ($P<0.05$). The results of qPCR showed that treatment with 10 μmol/L coumarin for 48 hours could reduce the mRNA levels of the cell senescence marker genes p16 and p21 in C28/I2 cells, and β-galactosidase staining obtained consistent results with qPCR. There were significant reductions in the mRNA levels of the SASP factors IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP9, and MMP13 after coumarin treatment ($P<0.05$). Similarly, immunofluorescence assay also showed reductions in the expression levels of some SASP factors after coumarin treatment. ***Conclusion*:** Coumarin may exert a therapeutic effect on OA by acting on the p38/MAPK14 pathway and inhibiting cell aging and cartilage decomposi-

作者介绍：刘恺文，Email：353194212@qq.com，
研究方向：骨关节炎的进展与机制。
通信作者：郭凤劲，Email：guo.fengjin@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82272550）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241226.1627.034（2024-12-27）

tion caused by SASP.

【Key words】cell senescence; senescence-associated secretory phenotype; osteoarthritis; coumarin; senescence-associated secretory phenotypic factors

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是一种退行性关节疾病，主要是由关节软骨和软骨下骨的破坏引起。骨关节炎是最常见的关节炎形式，也是世界上导致残疾的主要原因之一，截至2015年，全球约有2.37亿人受到影响。研究显示衰老是导致骨关节炎的主要原因之一，在60岁以上的人群中，约有10%的男性和18%的女性被骨关节炎疾病困扰。骨关节炎表现症状包括关节疼痛、僵硬、关节肿胀、关节活动范围缩小，手臂和腿部无力或麻木等，通常这些症状会随着年龄增长逐渐加重。

细胞衰老作为一种应激反应，会引起永久性细胞周期停滞并导致衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）。当细胞呈现衰老表型时，会产生分泌蛋白、细胞因子、趋化因子、生长因子以及蛋白酶等多种SASP因子，而SASP因子又会以自分泌方式进一步加剧衰老细胞的进程。

香豆素是一个天然存在的酚类化合物家族，它由α-吡喃酮环与苯环稠合而成[1]。1820年，August Vogel从零陵香豆和茅香中首次分离出了香豆素，香豆素的名称取自法语单词coumarou，代表零陵香豆，在植物学上一度被称为Coumarounaodorata Aubl[2]。如今已在多种植物、细菌和真菌中鉴定出约1 300多种天然香豆素。天然和合成的香豆素化合物，因其多样化的药理和生物学特性而受到药物化学家和药物设计科学家的广泛关注，其中许多具有抗癌[3-6]、抗菌[7-9]、抗病毒[10]、抗炎[11-12]等作用。已有研究报道，香豆素家族成员瑞香素能抑制人永生化角质形成细胞的增殖和炎症反应[13]。但香豆素在骨关节炎疾病中的作用尚不明确，本研究通过网络药理学预测，分子对接辅助验证，探究了香豆素治疗骨关节炎的药效和机理。为后续开发骨关节炎治疗药物提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞系

C28/I2由美国耶鲁大学刘传聚教授馈赠。DMEM培养基购自美国Thermo Fisher公司，青链霉素混合液购于北京索莱宝生物科技公司。C28/I2细胞培养在含有10%胎牛血清和1%抗生素的DMEM培养基中。

1.2 药物及试剂

胎牛血清、香豆素和IL-1β购自Med Chemexpress（货号：HY-T1000、HY-N0709、HY-P73149）；CCK-8试剂盒、细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天（货号：C0038、C0602）；TRIzol购自Invitrogen（货号：15596026）；SYBR green购自诺唯赞（货号：Q311-02/03）；anti-IL6、anti-MAPK14、MMP9、MMP13抗体购于proteintech（货号：21865-1-AP、51115-1-AP、27306-1-AP、18165-1-AP）。

1.3 仪器

定量PCR仪购于上海伯乐生命医学产品有限公司，倒置显微镜购自上海徕卡显微系统贸易有限公司。

1.4 引物

定量PCR引物序列见表1。

1.5 香豆素治疗骨关节炎的机制预测

1.5.1 香豆素靶点预测 在Drugbank数据库中以“coumarin”为关键词搜索，得到香豆素可能的靶点。在PubChem数据库中以“coumarin”为关键词搜索，得到香豆素的Smile号、Inchi号以及3D结构；通过Smile号在Swiss target prediction、Super Pred数据库中获得香豆素可能的靶点。通过Inchi号在Batman数据库获得香豆素可能的靶点。通过3D结构在Pharmmapper

表1 PCR引物设计

基因名称	正向引物序列（5’~3’）	反向引物序列（5’~3’）
GAPDH(H)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL-6(H)	GAGACTTCACAGAGGATACCAC	TCTCATTTCCACGATTTCCCAG
MAPK14(H)	CCCGAGCGTTACCAGAACC	TCGCATGAATGATGGAACTGAAAT
MMP9(H)	TGTACCGCTATGGTTACACTCG	GGCAGGGACAGTTGCTTCT
MMP13(H)	ACTGAGAGGCTCCGAGAAAATG	GAACCCCGCATCTTGGCTT
IL-1β(H)	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
P16(H)	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	GTAACTATTCGGTGCGTTGGG
P21(H)	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC

数据库中获得香豆素可能的靶点。将所有数据库中获得的预测靶点汇总。在软件Cytoscape3.7.2中绘制香豆素结合预测靶点的网络图。

1.5.2 骨关节炎治疗靶点预测 在Drugbank、OMIM、GeneCards、TTD、Disgenet数据库中以“osteoarthritis”为关键词搜索，删除重复项后得到骨关节炎疾病相关基因。

1.5.3 香豆素及骨关节炎共有靶点筛选 将香豆素及骨关节炎相关靶点去重复值汇总后上传至Venny2.1.0软件，得到二者共有靶点后，绘制Venn图。

1.5.4 构建蛋白互作网络图 将香豆素及骨关节炎共有靶点上传至STRING数据库，绘制香豆素靶点与骨关节炎靶点的蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）和香豆素靶向骨关节炎共有靶点网络。

1.5.5 GO、KEGG富集分析 将香豆素-骨关节炎的共有靶点上传至DAVID数据库进行GO分析得到GO结果表格，手动筛选P值小于0.05的结果后，利用Sangerbox 3.0网站的KEGG富集分析功能，绘制KEGG富集分析图。

1.5.6 分子对接 用PyMOL软件打开从PubChem数据库得到的香豆素的3D结构文件，另存为PDB格式。在PDB数据库中下载PPI网络中与其余蛋白关联最紧密的核心蛋白的3D结构文件。在PyMOL软件中完成对接前准备。利用AutoDock Vina进行分子对接，依照结合能（Affinity，kcal/mol）来预测香豆素与靶点受体之间的结合强度，通过PyMOL可视化结合能最低的构象。

1.6 CCK-8实验

将C28/I2细胞接种至96孔板，细胞密度为5×10^3/孔，每孔加100 μL培养基。细胞分为阴性对照组、control组和实验组。阴性对照组仅加入培养基，Control组正常培养细胞，实验组使用不同浓度的香豆素处理。向所有组别加入含有10%体积比CCK-8的完全培养基孵育2 h，孵育结束后，酶标仪450 nm波长处检测各组吸光度（absorbance，A）值（$A_{450\ nm}$）。细胞活性=（$A_{450\ nm实验组}-A_{450\ nm阴性对照组}$）/（$A_{450\ nm\ control组}-A_{450\ nm阴性对照组}$）。

1.7 实验及细胞分组

将C28/I2细胞分为正常培养的Control组、IL-1β组及IL-1β+coumarin组。将细胞接种于6孔板，待细胞贴壁后，Control组继续正常培养，向IL-1β组及IL-1β+coumarin组加入20 ng/mL的IL-1β。IL-1β处理48 h后，将Control组、IL-1β组培养基换为正常完全培养基，向IL-1β+coumarin组加入含有10 μmol/L香豆素的完全培养基，继续培养48 h后收集细胞进行后续实验。

1.8 RT-qPCR检测

向每孔6孔板培养的C28/I2细胞中加入500 μL Trizol试剂，室温放置10 min。将Trizol试剂连同细胞沉淀一起转移至新的1.5 mL Rnase-Free离心管中，加入100 μL氯仿溶液。混匀后，4 ℃ 10 600×g离心10 min。将上清液转移至新的1.5 mL Rnase-Free离心管并加入500 μL异丙醇溶液。混匀后4 ℃ 10 600×g离心5 min。弃上清，加入500 μL 75%乙醇溶液4 ℃ 10 600×g离心2 min，弃上清。重复此步骤。自然风干沉淀后加入30 μL DEPC水溶解RNA。使用ABScript Ⅲ RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover试剂盒进行逆转录反应得到cDNA。然后，使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix进行RT-qPCR。GAPDH作为内参，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量。

1.9 细胞免疫荧光

细胞分组及IL-1β/coumarin处理同1.8。处理结束后加入PBS溶液重复洗3次，每次5 min。加入新鲜配制的4%多聚甲醛溶液室温15 min，弃多聚甲醛溶液，加入0.5%Triton溶液（PBS）室温20 min。PBS溶液重复洗3次，每次5 min。加入1%的BSA封闭液30 min后，加入一抗4 ℃过夜。PBS溶液重复洗3次，每次5 min。后续步骤需避光，加入荧光二抗，37 ℃孵育4 h后用PBS溶液重复洗4次，加入DAPI染液染色10 min，PBS溶液重复洗3次，加入20 μL的50%甘油封片，荧光显微镜观察拍片。

1.10 细胞衰老β-半乳糖苷酶染色

细胞分组及IL-1β/coumarin处理同1.8。处理结束后加入PBS清洗1次，加入1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液，室温固定15 min。弃固定液用PBS清洗3次。加入1 mL配置好的染色工作液，37 ℃孵育过夜，普通光学显微镜下观察并计数。

1.11 统计学方法

使用Graphpad Prism 9.0软件进行统计学分析，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）来呈现。多组间比较采用单因素方差分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 香豆素治疗骨关节炎的靶点预测

2.1.1 香豆素靶点预测 在PubChem数据库中搜索“coumarin”，最匹配项即为香豆素，通过搜索结果得到香豆素药物的3D结构、Smile号以及InchI号。在Drugbank数据库中搜索“coumarin”，在左侧状态栏中选择“Targets”选项后得到香豆素的部分靶点。将香豆素的InchI号粘贴进Batman数据库中，设置检索参数中默认评分>20，P值<0.05，点击“start”进行检索并得到香豆素的部分靶点。将香豆素的Smile号粘贴进Swiss target prediction数据库，选择物种“Homo sapiens”，点击“predict targets”，检索得到香豆素的部分靶点。将香豆素的3D结构上传至Pharmmapper数据库，填写邮箱用于接收结果文档。将香豆素的Smile号粘贴至SuperPred数据库中，点击“Search”，下方出现香豆素的2D结构，点击“start”，得到香豆素的部分靶点。将所有数据库中得到的香豆素预测靶点汇总，去除重复项后共筛选到香豆素的作用靶点201个（图1A）。

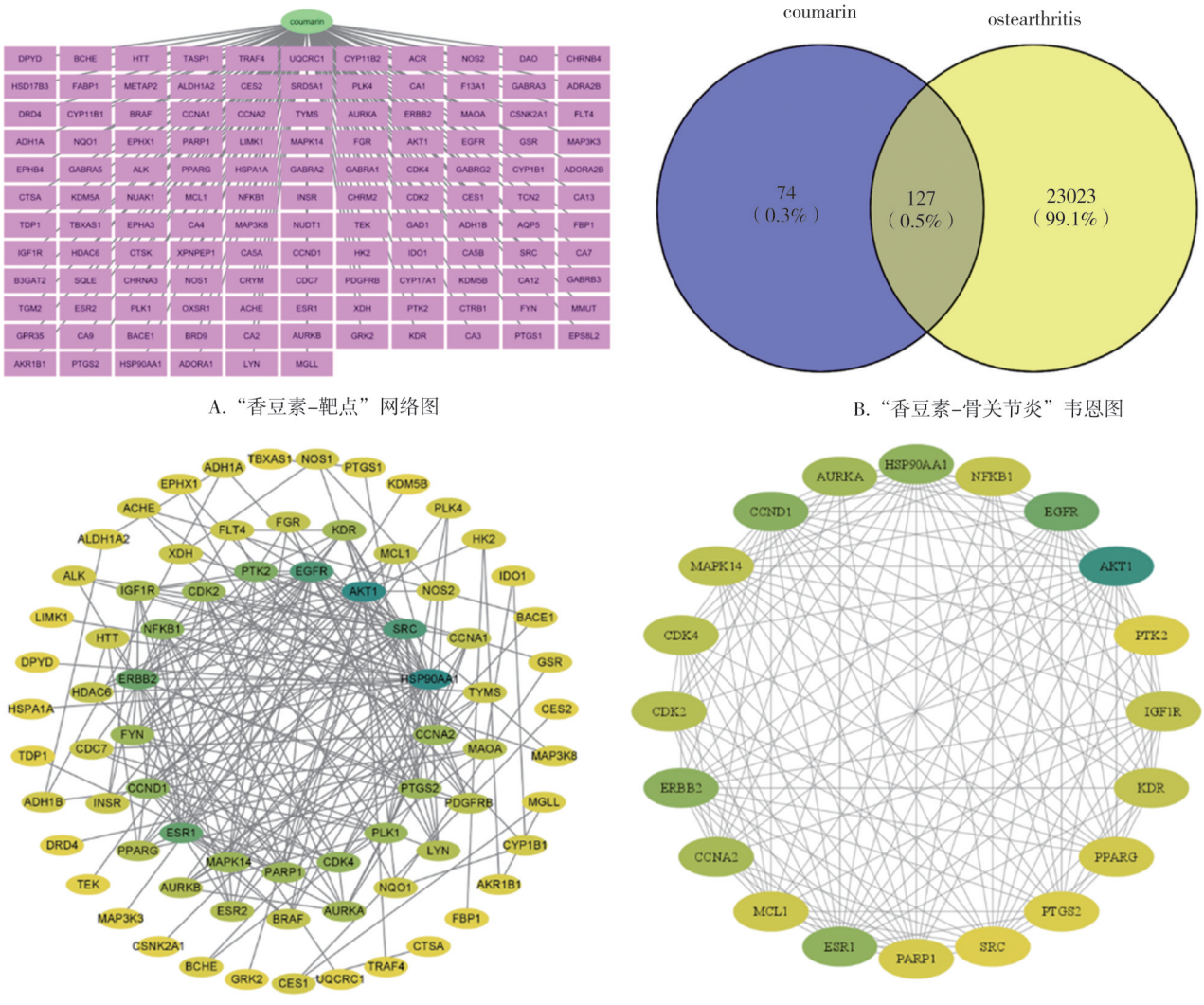
2.1.2 骨关节炎潜在治疗靶点的预测 在Drugbank、OMIM、Genecards、MalaCards、TTD、Disgenet、Pharmgkb、CTD、HERB数据库中以“Osteoarthritis”为关键词检索，得到骨关节炎的潜在治疗靶点，在去除重复项后，共得到OA的潜在靶点23 150个。

2.1.3　香豆素治疗骨关节炎的靶点筛选　将香豆素的靶点预测结果及OA疾病的治疗靶点预测结果上传至Venny2.1.0网站，通过网站的在线工具将香豆素的靶点及OA的靶点进行映射并绘制Venny图（图1B）。

2.1.4　香豆素治疗骨关节炎靶点蛋白互作网络图构建　将筛选得到的香豆素治疗OA靶点文件上传至String数据库，利用String数据库的在线工具对127个香豆素治疗OA的可能靶点进行分析，将结果导入Cytoscape3.7.2软件完成可视化，隐藏和其余靶点无关联的单个节点后，得到香豆素治疗OA靶点蛋白的PPI网络图（图1C）。靶点的颜色越深说明靶点蛋白与其余靶点蛋白之间的作用联系越深。使用Cytoscape内置的“Cytohubba”插件筛选得到PPI网络中的Hub基因（图1D）。

2.1.5　GO和KEGG富集分析　将香豆素治疗OA的靶点信息上传至DAVID数据库，挑选$P<0.05$的靶点，将结果利用sangerbox3.0网站进行可视化展示。KEGG富集分析结果主要涉及钙信号通路、肌动蛋白细胞骨架的调节、NF-κB信号通路、IL-17信号通路、破骨细胞分化等（图2A）。GO分析结果显示共筛选到条目463条，其中BP条目共293条，BP分析主要涉及炎症反应、抗原刺激炎症反应的负调节、MAPK级联的正向调节、蛋白质的自磷酸化、酶结合、细胞分化等（图2B）；筛选到CC条目共77条，CC分析主要向胞浆、受体复合物、细胞质中的核周区域以及质膜的组分富集（图2C）；筛选到MF条目共96条，MF分析主要包含MAP激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性等（图2D）。

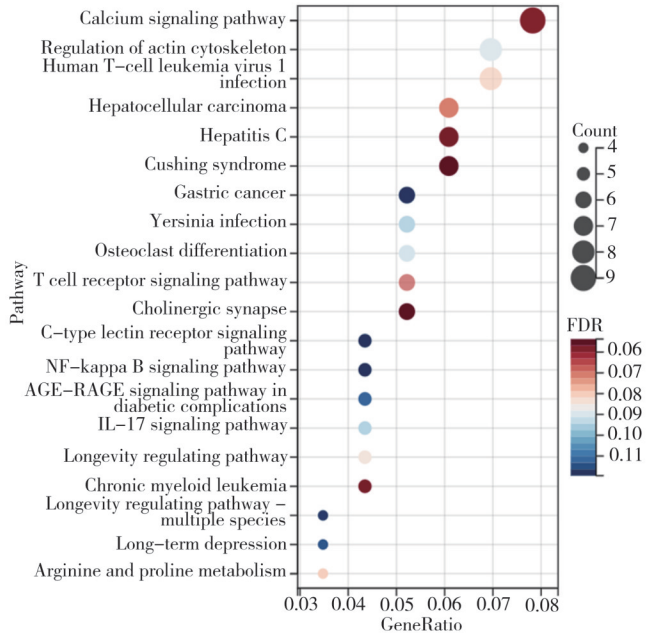
2.1.6　分子对接　为评估香豆素与其关键靶点的结合能力，在AutoDock Vina软件中进行分子对接。以香豆素作为配体，CCND1、EGFR、ERBB2、MAPK14等4个关键靶点作为受体进行分子对接。对接结果显示，香豆素与4个关键靶点的结合能均小于-5.0 kcal/mol，这说明香豆素与4个关键靶点均能较好地结合，证明了其是香豆素的靶点。其中香豆素与MAPK14的结合能最高，其结合能为-5.9 kcal/mol，利用PyMOL v2.2.0对分子对接结果进行可视化展示（图3）。



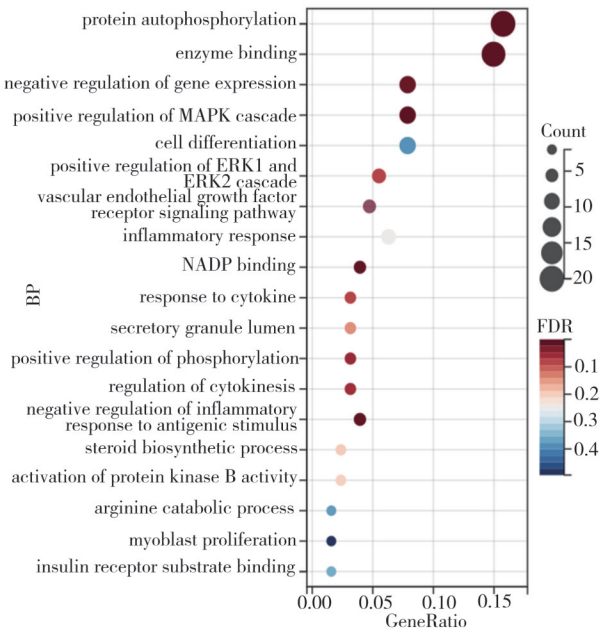
A.“香豆素-靶点”网络图　B.“香豆素-骨关节炎”韦恩图

C. 香豆素治疗骨关节炎的蛋白互作网络图　D. 蛋白互作网络中前20个关键基因

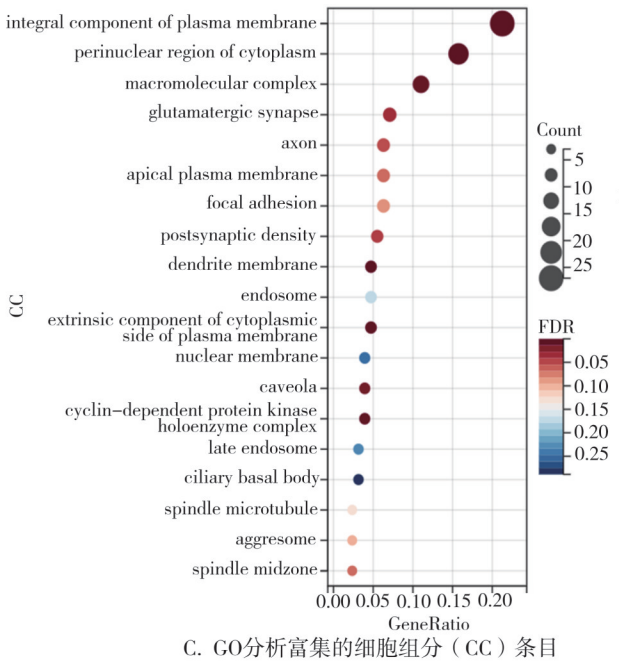
图1　香豆素治疗骨关节炎的网络图



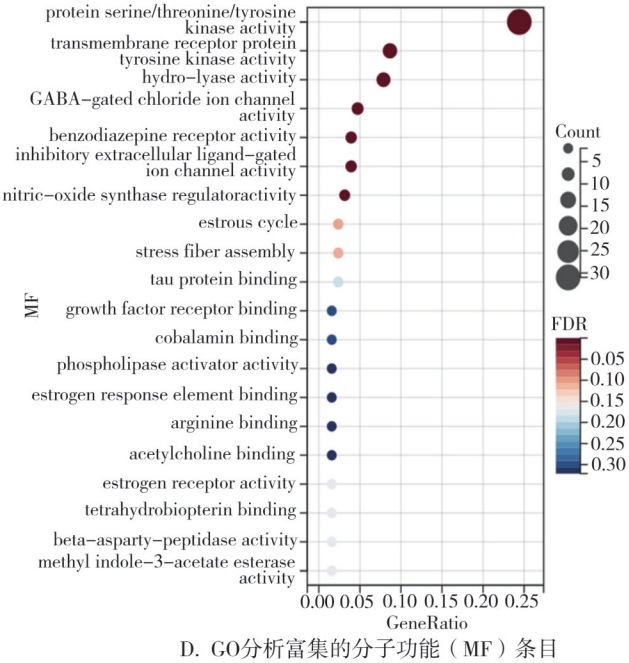
A. KEGG通路富集分析



B. GO分析富集的生物过程（BP）条目



C. GO分析富集的细胞组分（CC）条目



D. GO分析富集的分子功能（MF）条目

图2　GO及KEGG富集分析气泡图

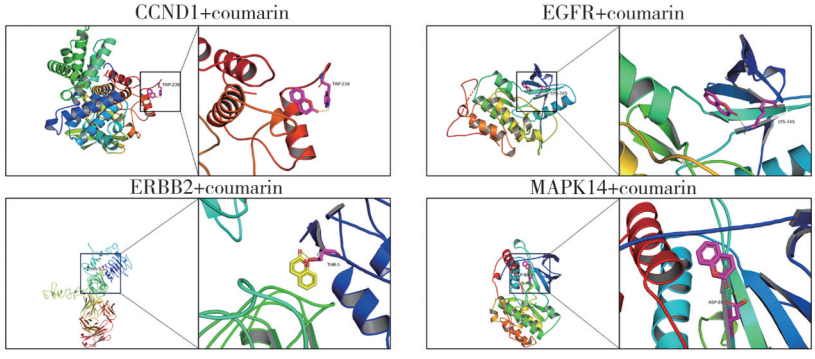
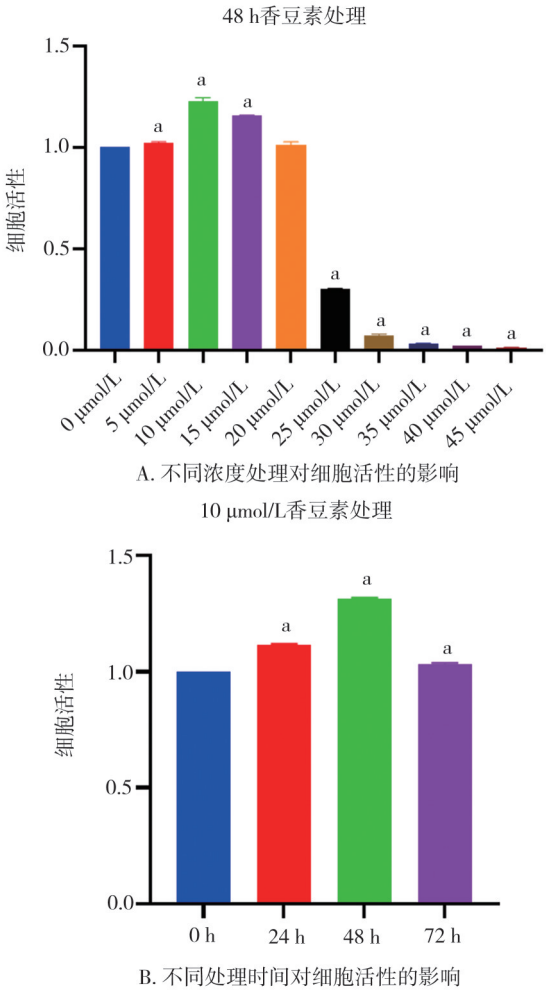


图3　香豆素与4个关键靶点的分子对接图

2.2 香豆素治疗骨关节炎的药理验证

2.2.1 香豆素对C28/I2软骨细胞活性的影响 CCK-8实验结果显示，不同浓度香豆素处理C28/I2细胞，与Control组相比，5、10、15 μmol/L香豆素显著促进了C28/I2细胞的活性（$P<0.05$），其中10 μmol/L香豆素促进C28/I2细胞活性最为明显（图4A）（$P<0.05$）。当使用10 μmol/L香豆素分别处理C28/I2细胞0、24、48、72 h时，结果显示香豆素处理48 h细胞活性促进作用最为明显（图4B）（$P<0.05$）。



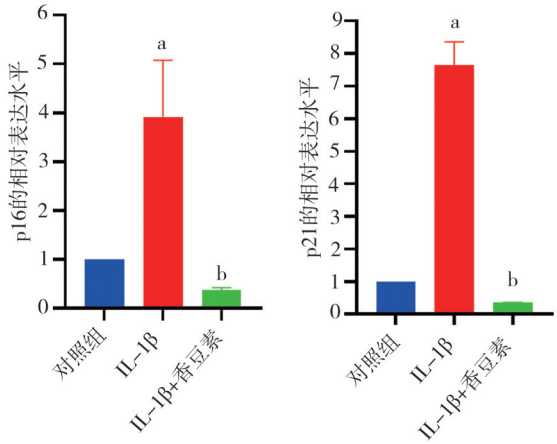
A. 不同浓度处理对细胞活性的影响

B. 不同处理时间对细胞活性的影响

注：a，与0 μmol/L和0 h组比较，$P<0.01$

图4 香豆素对C28/I2细胞活性的影响

2.2.2 香豆素对C28/I2细胞衰老相关标志物mRNA表达水平的影响 文献报道衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）与软骨退化及OA有着密切的关系[14]，IL-6、IL-17、IL-1β、制瘤素M和TNF家族等促炎SASP因子的分泌是SASP的一个标志[15-16]。其中部分SASP因子可诱导OA相关表型，包括炎症、骨生长和细胞外基质（ECM）降解[14]。而IL-1β处理及p38MAPK途径的激活均会导致SASP的产生[17-18]，IL-1β处理细胞后，软骨细胞衰老水平会显著上调。qPCR结果显示，与Control组相比，IL-1β处理组的软骨细胞衰老相关标志基因*p16*、*p21*的mRNA水平上升（$P<0.05$），香豆素处理可显著逆转IL-1β上调的衰老指标mRNA表达水平（$P<0.05$）（图5）。



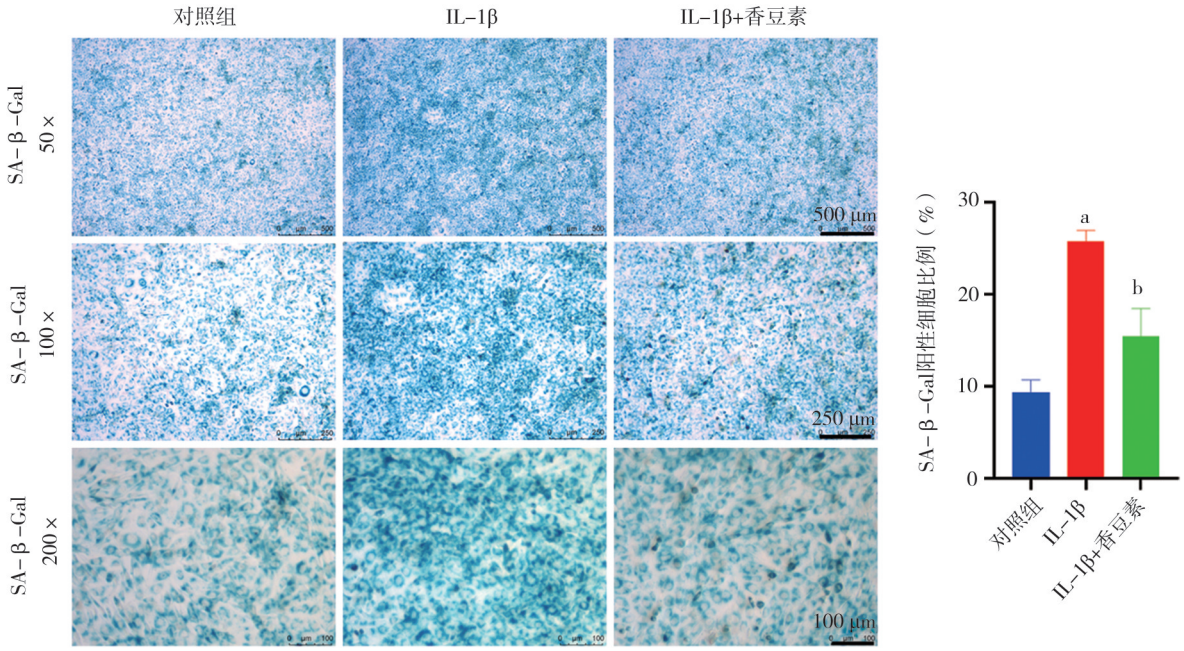
注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与IL-1β组比较，$P<0.05$

图5 QPCR检测香豆素处理时C28/I2细胞衰老指标mRNA的水平

2.2.3 香豆素对C28/I2细胞衰老的影响 β-半乳糖苷酶染色及其量化结果显示，与Control组相比，IL-1β处理组的阳性染色细胞显著增加（$P<0.05$），而香豆素处理可降低由IL-1β引起的β-半乳糖苷酶染色加剧（$P<0.05$）（图6）。这些结果表明香豆素可显著抑制IL-1β诱导的软骨细胞衰老。

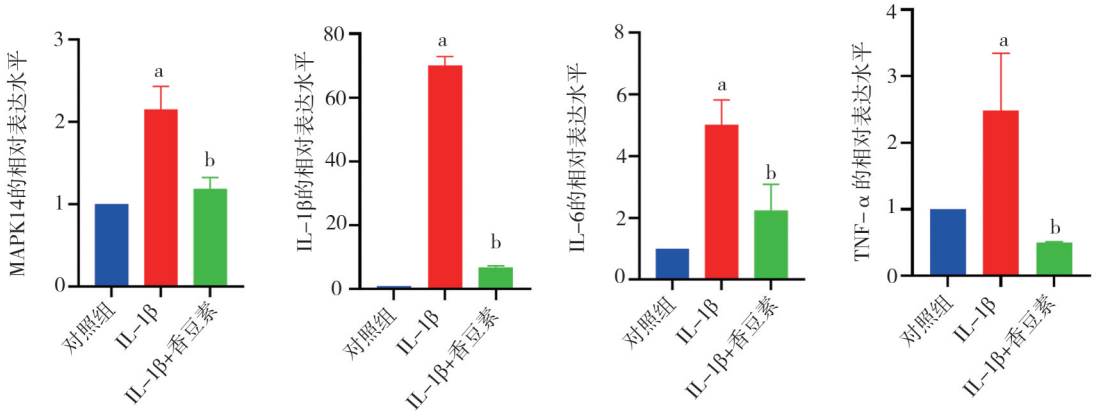
2.2.4 香豆素对C28/I2细胞中p38/MAPK14途径及炎性因子类SASP因子表达水平的影响 qPCR结果显示，相较于Control组，IL-1β处理后IL-1β、IL-6、TNF-α等SASP相关因子及MAPK14的mRNA表达水平明显上调（$P<0.05$）。加入香豆素处理后，IL-1β、IL-6、TNF-α等SASP相关因子及MAPK14的mRNA表达水平显著下调（$P<0.05$）（图7）。免疫荧光及荧光强度量化结果显示，相较于Control组，IL-1β处理后SASP因子及*P*38的荧光强度显著增强（$P<0.05$），这说明IL-1β处理能促进细胞中p38及IL-6的表达（图8）。当使用香豆素处理后，逆转了IL-1β处理引起的P38、IL-6染色荧光强度增强（$P<0.05$），这些结果表明香豆素能够抑制IL-1β诱导的P38、IL-6的表达。

2.2.5 香豆素对C28/I2细胞蛋白酶类SASP因子表达水平的影响 IL-1β处理细胞后，蛋白酶类SASP因子中的MMP家族表达量会显著上调。qPCR结果显示，与Control组相比，IL-1β处理组的SASP相关因子MMP9、MMP13的mRNA表达上升（$P<0.05$），香豆素处理可显著逆转由IL-1β上调的MMP9、MMP13的mRNA表达（$P<0.05$）（图9）。免疫荧光结果与qPCR结果一致（图10），表明香豆素可缓解IL-1β诱导的SASP，抑制对软骨细胞ECM具有降解作用的SASP因子MMP9及MMP13的表达，从而预防骨关节炎。



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

图6　β-半乳糖苷酶染色



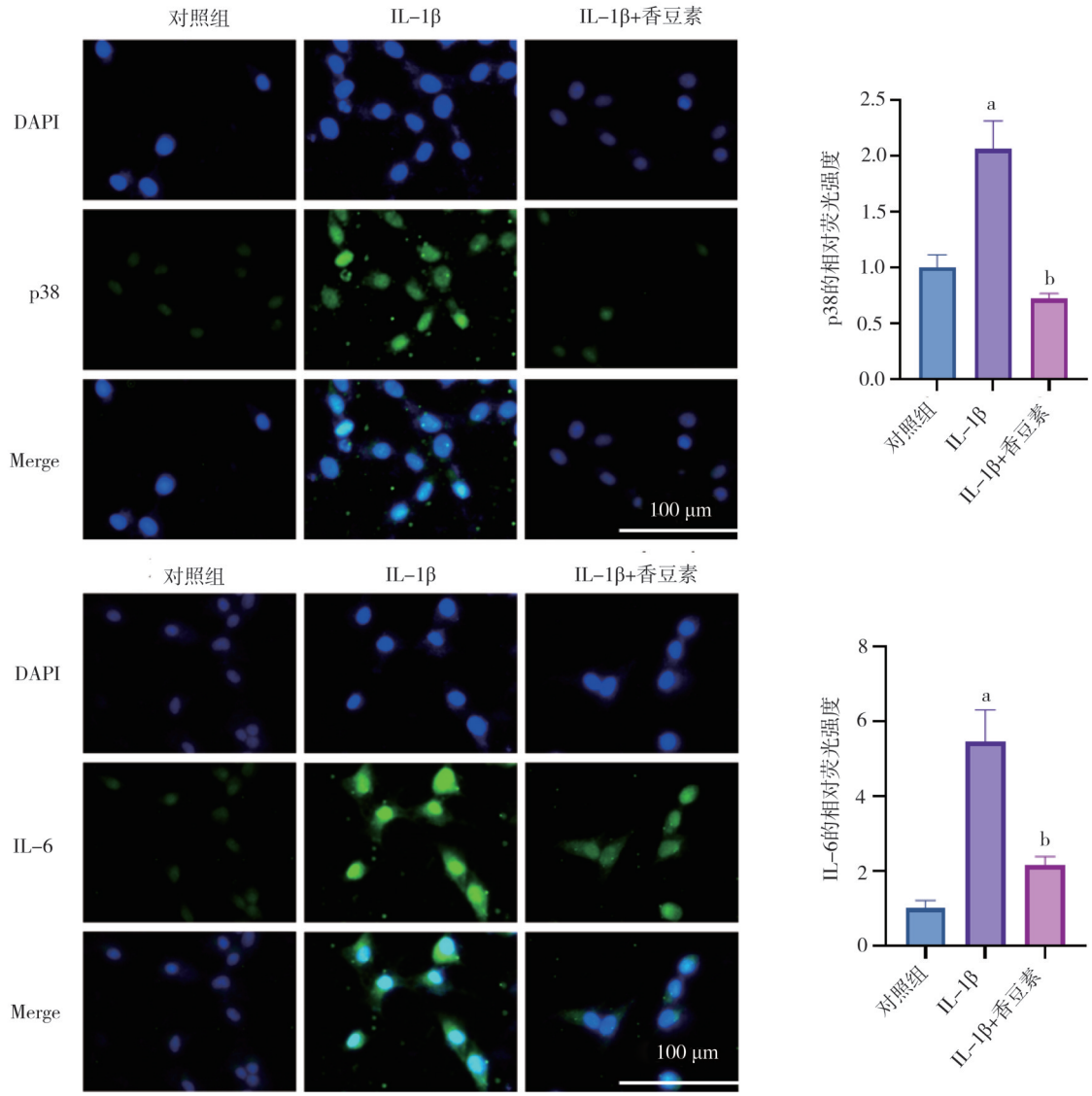
注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与IL-1β组比较，$P<0.05$

图7　QPCR检测香豆素处理时p38/MAPK途径及炎性因子类SASP因子mRNA的表达

3　讨　论

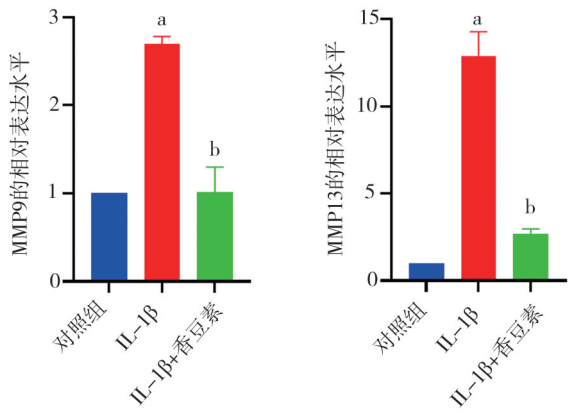
OA是一种常见的退行性疾病，影响因素错综复杂，包括肥胖、关节损伤、遗传及关节组织中的细胞衰老等[14]。骨关节炎的主要特征是关节软骨丢失和软骨下骨硬化。在组织学上，该疾病的特征是软骨表面的早期破碎、软骨细胞的增殖、软骨中出现垂直裂隙、可变晶体沉积、重塑以及血管最终穿越潮线。骨关节炎的退行性疾病过程不仅影响关节软骨，还涉及整个关节，包括软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜和关节周围肌肉。由于纤维软骨变性、软骨骨赘、突出物、滑膜下炎症细胞和滑膜细胞增生，骨重塑和磨损在疾病过程中发生得相对较早。活化的滑膜分泌过多的滑液，导致关节囊肿胀。

衰老是一种细胞命运，其特征是永久性细胞周期停滞和促炎分子释放到周围微环境中，这一特征被称为衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）[19]。衰老相关分泌表型是与衰老细胞相关的表型，SASP细胞会出现炎性细胞因子、免疫调节剂、生长因子和蛋白酶表达增多[20-21]。SASP还可能由含有酶、microRNA、DNA片段、趋化因子和其他生物活性因子的外泌体和胞外体组成[22-23]。可溶性尿激酶纤溶酶原激活剂表面受



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

图 8　免疫荧光检测香豆素处理时 p38/MAPK 途径及 SASP 因子的蛋白表达

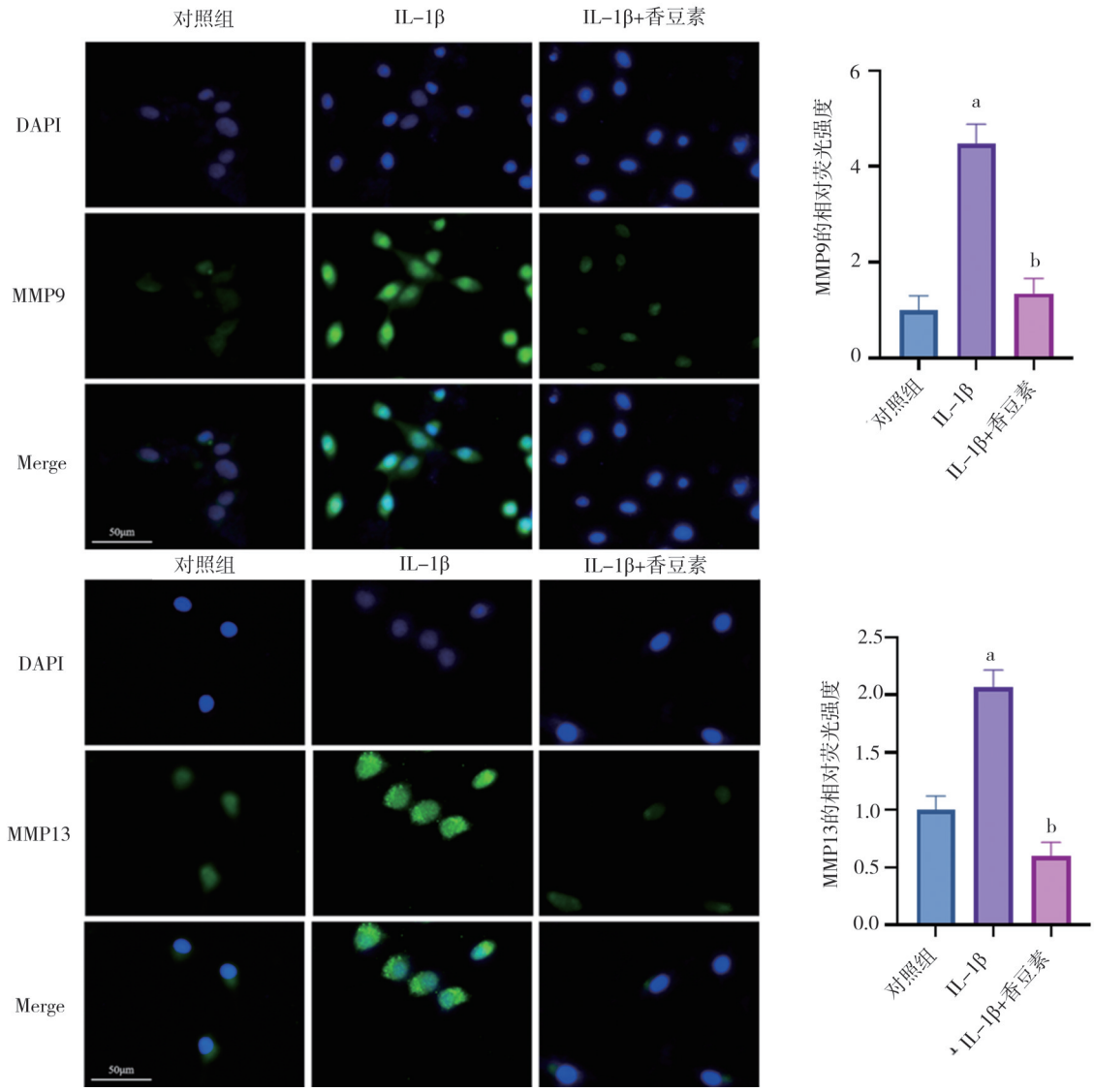


注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与 IL-1β 组比较，$P<0.05$

图 9　QPCR 检测香豆素处理时蛋白酶类 SASP 因子的 mRNA 表达

体是 SASP 的一部分，已用于识别衰老细胞以进行 senolytic 治疗[24]。最初，SASP 具有免疫抑制性（以 TGF-β1 和 TGF-β3 为特征）和促纤维化作用，但逐渐发展为促炎性（以 IL-1β、IL-6 和 IL-8 为特征）和纤维溶解性作用[25-26]。目前已知的软骨分解代谢的标志基因之一的 MMP 家族也属于 SASP 因子[27]。SASP 是衰老细胞造成有害影响的主要原因[23]。衰老细胞随着生物体老化而积累，导致细胞增殖减少、组织再生功能受损[28]。由于这些原因，衰老与包括 OA 在内的多种衰老相关疾病的发病机制和进展相关，但衰老影响 OA 的病理机制仍不清楚。

香豆素属于天然苯丙素类化合物，已有研究报道其具有抗癌、抗菌、抗病毒、抗炎作用。炎症反应



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

图10　免疫荧光检测香豆素处理时蛋白酶类SASP因子的蛋白表达

是SASP中重要的病因及病理表现之一，香豆素的抗炎作用可能成为一种治疗骨关节炎的新方案。本研究通过网络药理学、生物信息学并结合体外实验，探究香豆素对骨关节炎疾病的治疗可行性及作用机制。网络药理学结果显示，香豆素可能通过调控MAPK14、EGFR、CCND1、ERBB2进而影响骨关节炎疾病，针对网络药理学的结果进行GO、KEGG富集分析以及分子对接，结果发现香豆素与MAPK14的结合能最高，说明香豆素最有可能通过调控MAPK14途径来治疗骨关节炎疾病。MAPK14全称为丝裂原激活蛋白激酶14，也被称为p38-α。研究发现p38MAPK14途径的激活会增强NF-κB活性，进而导致促炎SASP的产生，最终会导致细胞衰老[26]。

研究表明，在炎症过程中，机体会产生活性氧（reactive oxygen species，ROS）和活性氮（reactive nitrogen species，RNS）来对抗病原体并刺激组织修复和再生，但这些化学物质也会损伤DNA，进而导致SASP[29-30]。IL-1β被广泛用于诱导骨关节炎疾病模型中的炎症反应，本研究探究香豆素通过抑制软骨细胞SASP，进而预防骨关节炎的效应。qPCR及β-半乳糖苷酶染色显示香豆素通过p38/MAPK14途径抑制软骨细胞衰老。qPCR及免疫荧光结果显示，香豆素能够抑制软骨细胞中IL-1β导致的多聚蛋白聚糖的分解。本研究结果证明香豆素通过抑制IL-1β导致的P16、P21、IL-1β、p38/MAPK14、IL-6、TNF-α、MMP9、MMP13等各类SASP因子的上调，治疗骨关节炎。

综上所述，本研究通过网络药理学及分子对接手段，对香豆素治疗骨关节炎的作用靶点及机制进行了预测，并通过体外试验对预测结果进行验证。结果表明，香豆素可能通过p38/MAPK14途径调控软骨细胞SASP，进一步缓解由于衰老导致的软骨结构破坏，从而达到治疗骨关节炎的目的。

参 考 文 献

[1] Ando T, Nagumo M, Ninomiya M, et al. Synthesis of coumarin derivatives and their cytoprotective effects on t-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28(14): 2422-2425.

[2] Zhu JJ, Jiang JG. Pharmacological and nutritional effects of natural coumarins and their structure-activity relationships[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(14): e1701073.

[3] An R, Hou Z, Li JT, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-substituted coumarin derivatives as antitumor agents[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2281.

[4] Bisi A, Cappadone C, Rampa A, et al. Coumarin derivatives as potential antitumor agents: growth inhibition, apoptosis induction and multidrug resistance reverting activity[J]. Eur J Med Chem, 2017, 127: 577-585.

[5] Kahveci B, Yılmaz F, Menteşe E, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of coumarin-triazole hybrid molecules as potential antitumor and pancreatic lipase agents[J]. Arch Pharm, 2017, 350(8): 625-635.

[6] Guo YL, Wang YJ, Li HH, et al. Novel nitric oxide donors of phenylsulfonylfuroxan and 3-benzyl coumarin derivatives as potent antitumor agents[J]. ACS Med Chem Lett, 2018, 9(5): 502-506.

[7] Hu Y, Shen YF, Wu XH, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents[J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 958-969.

[8] Bhagat K, Bhagat J, Gupta MK, et al. Design, synthesis, antimicrobial evaluation, and molecular modeling studies of novel indolinedione-coumarin molecular hybrids[J]. ACS Omega, 2019, 4(5): 8720-8730.

[9] Chougala BM, Samundeeswari S, Holiyachi M, et al. Green, unexpected synthesis of bis-coumarin derivatives as potent anti-bacterial and anti-inflammatory agents[J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 1744-1756.

[10] Hassan MZ, Osman H, Ali MA, et al. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents[J]. Eur J Med Chem, 2016, 123: 236-255.

[11] Nayeli MB, Maribel HR, Enrique JF, et al. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav[J]. Nat Prod Res, 2020, 34(22): 3244-3248.

[12] Mu CY, Wu MF, Li Z. Anti-inflammatory effect of novel 7-substituted coumarin derivatives through inhibition of NF-κB signaling pathway[J]. Chem Biodivers, 2019, 16(3): e1800559.

[13] Gao JT, Chen FR, Fang HN, et al. Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 48.

[14] Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(1): 47-57.

[15] Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 99-118.

[16] Basisty N, Kale A, Jeon OH, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development[J]. PLoS Biol, 2020, 18(1): e3000599.

[17] Yasuda S, Horinaka M, Iizumi Y, et al. Oridonin inhibits SASP by blocking p38 and NF-κB pathways in senescent cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 590: 55-62.

[18] Philipot D, Guérit D, Platano D, et al. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R58.

[19] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging[J]. Cell, 2013, 153(6): 1194-1217.

[20] Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor[J]. PLoS Biol, 2008, 6(12): 2853-2868.

[21] B. G. Childs, M. Gluscevic, D. J. Baker, R. M. Laberge, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(10): 718-735.

[22] Prata LGPL, Ovsyannikova IG, Tchkonia T, et al. Senescent cell clearance by the immune system: emerging therapeutic opportunities[J]. Semin Immunol, 2018, 40: 101275.

[23] Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues[J]. Genes Dev, 2020, 34(23/24): 1565-1576.

[24] Amor C, Feucht J, Leibold J, et al. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies[J]. Nature, 2020, 583(7814): 127-132.

[25] Ito Y, Hoare M, Narita M. Spatial and temporal control of senescence[J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(11): 820-832.

[26] Nacarelli T, Lau L, Fukumoto T, et al. NAD^+ metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(3): 397-407.

[27] 陈妙洋，胡一帆，熊清芳，等. 超声引导下经皮肝穿刺活组织检查出血并发症危险因素分析[J]. 中华肝脏病杂志，2024，32(10)：923-928.

Chen MY, Hu YF, Xiong QF, et al. Analysis of risk factors for bleeding complications in ultrasound-guided percutaneous liver biopsy[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2024, 32(10): 923-928.

[28] He SH, Sharpless NE. Senescence in health and disease[J]. Cell, 2017, 169(6): 1000-1011.

[29] 欧 丹，蔡 钢，陈佳艺. RAD51AP1基因表达在三阴性乳腺癌脑转移中的生物信息分析[J]. 诊断学理论与实践，2024，23(2)：146-154.

Ou Dan, Cai Gang, Chen Jiayi. Bioinformatics analysis for expression of RAD51AP1 in triple negative breast cancer with brain metastasis[J]. Journal of Diagnostics Concepts & Practice, 2024, 23(2): 146-154.

[30] Kang C, Xu QK, Martin TD, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4[J]. Science, 2015, 349(6255): aaa5612.

（责任编辑：周一青）