基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003644

淫羊藿苷通过miR-29c/COL2A1轴改善骨关节炎软骨细胞功能

贺自克，王上增
（河南省中医院关节病科，郑州 450000）

【摘 要】**目的：**探讨淫羊藿苷（icariin，ICA）对骨关节炎（osteoarthritis，OA）软骨细胞功能的影响及其机制。**方法：**用不同浓度（0.1、0.5、1.0、5.0和10.0 μmol/L）ICA处理软骨细胞后，采用噻唑蓝（methylthiazolydiphenyl-tetrazolium，MTT）法检测软骨细胞活力，选择最适浓度的ICA进行后续实验。利用白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β；10 ng/mL）刺激软骨细胞24 h构建OA细胞模型，用最适浓度1 μmol/L ICA处理细胞。采用实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，RT-qPCR）检测微小RNA-29c（microRNA-29c，miR-29c）的表达水平，蛋白免疫印迹（Western blot，WB）检测Ⅱ型胶原α1链（collagen type Ⅱ alpha 1 chain，COL2A1）蛋白的表达水平，酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测细胞培养上清液中基质金属蛋白酶3（matrix metalloproteinase 3，MMP-3）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）水平，流式细胞术检测细胞凋亡水平。生物信息学网站预测miR-29c的靶基因，采用双荧光素酶报告基因实验验证miR-29c与COL2A1之间的靶向结合作用。通过挽救实验阐明ICA对OA炎症反应及细胞凋亡的影响及作用机制。**结果：**与Control组相比，IL-1β组软骨细胞上清液中MMP-3（$P<0.001$）和TNF-α（$P<0.001$）含量明显增加，COL2A1的表达水平明显降低（$P<0.001$），细胞凋亡率明显增加（$P<0.001$）；与IL-1β组相比，ICA处理组中软骨细胞上清液中MMP-3（$P=0.001$、$P<0.001$）和TNF-α（$P<0.001$、$P<0.001$）含量明显减少，COL2A1的表达水平明显升高（$P<0.001$、$P<0.001$），细胞凋亡率明显降低（$P<0.001$、$P<0.001$）。与Control组相比，IL-1β组软骨细胞中miR-29c表达水平明显上调（$P<0.001$），而ICA处理则明显降低miR-29c表达水平（$P<0.001$）。与miR-NC组相比，miR-29c mimic组中软骨细胞上清液中MMP-3（$P<0.001$）和TNF-α（$P<0.001$）含量明显增加，COL2A1的表达水平显著降低（$P=0.001$），细胞凋亡率显著增加（$P<0.001$），而miR-29c inhibitor组则得到相反的结果。TargetScan7.1数据库显示miR-29c与COL2A1存在结合位点。双荧光素酶报告基因实验表明，miR-29c mimic明显抑制了野生型COL2A1载体的荧光素酶活性（$P<0.001$），而突变型的荧光素酶活性不受影响（$P=0.152$）。敲低COL2A1可部分逆转下调miR-29c对软骨细胞中MMP-3（$P<0.001$）和TNF-α（$P<0.001$）分泌量，COL2A1蛋白表达水平（$P<0.001$）以及细胞凋亡率（$P<0.001$）的影响。ICA处理可减轻过表达miR-29c对软骨细胞中MMP-3（$P<0.001$）和TNF-α（$P<0.001$）分泌量、COL2A1蛋白表达水平（$P=0.009$）以及细胞凋亡率（$P<0.001$）的影响。**结论：**ICA能减轻IL-1β诱导的软骨细胞炎症因子的分泌和细胞凋亡的发生，其作用机制可能与miR-29c/COL2A1轴有关。

【关键词】骨关节炎；淫羊藿苷；微小RNA-29c；Ⅱ型胶原α1链；细胞凋亡
【中图分类号】R96 【文献标志码】A

Icariin improves chondrocyte function in osteoarthritis via the miR-29c/COL2A1 axis

He Zike，*Wang Shangzeng*
（*Department of Osteoarthritis*，*Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the effect of icariin（ICA）on chondrocyte function in osteoarthritis（OA）and its mechanism. ***Methods***：After chondrocytes were treated with different concentrations of ICA（0.1，0.5，1.0，5.0，10.0 μmol/L），methylthiazolydiphenyl-tetrazolium（MTT）assay was used to measure the viability of chondrocytes，and then the optimal concentration of ICA was selected for subsequent experiments. Chondrocytes were stimulated by interleukin-1β（IL-1β，10 ng/mL）for 24 hours to establish a cell model of OA，and then the cells were treated with ICA at the optimal concentration of 1 μmol/L. Quantitative real-time polymerase chain reaction（RT-qPCR）was used to measure the expression level of microRNA-29c（miR-29c）；Western blot was used to measure the protein expression level of collagen type Ⅱ alpha 1 chain（COL2A1）；Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）was used to measure the levels of matrix metalloproteinase-3（MMP-3）and tumor necrosis factor-α（TNF-α）in the supernatant of cell culture；flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate. Bioinformatics web-

作者介绍：贺自克，Email：1152631730@qq.com，研究方向：骨关节疾病的相关研究。
通信作者：王上增，Email：pululujo@163.com。
基金项目：河南省中医药科学研究专项课题资助项目（编号：2021JDZX2042）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241210.1128.002（2024-12-10）

sites were used to predict the target genes of miR-29c, and dual-luciferase reporter assay was used to verify the targeted binding between miR-29c and COL2A1. Functional rescue experiments were used to clarify the effect of ICA on inflammatory response and cell apoptosis in OA and its mechanism of action. ***Results***: Compared with the control group, the IL-1β group had significant increases in the content of MMP-3 (P<0.001) and TNF-α (P<0.001) in chondrocyte supernatant, a significant reduction in the expression level of COL2A1 (P<0.001), and a significant increase in cell apoptosis rate (P<0.001). Compared with the IL-1β group, the ICA treatment group had significant reductions in the content of MMP-3 (P=0.001; P<0.001) and TNF-α (P<0.001; P<0.001) in chondrocyte supernatant, a significant increase in the expression level of COL2A1 (P<0.001; P<0.001), and a significant reduction in cell apoptosis rate (P<0.001; P<0.001). Compared with the control group, the IL-1β group had a significant increase in the expression level of miR-29c in chondrocytes (P<0.001), while ICA treatment significantly reduced the expression level of miR-29c (P<0.001). Compared with the control group, the miR-29c mimic group had significant increases in the content of MMP-3 (P<0.001) and TNF-α (P<0.001) in chondrocyte supernatant, a significant reduction in the expression level of COL2A1 (P=0.001), and a significant increase in cell apoptosis rate (P<0.001); however, opposite results were obtained for the miR-29c inhibitor group. TargetScan7.1 database showed the existence of binding sites between miR-29c and COL2A1. Dual-luciferase reporter assay showed that miR-29c mimic significantly inhibited the luciferase activity of wild-type COL2A1 vector (P<0.001), but with no influence on the luciferase activity of mutant COL2A1 vector (P=0.140). Knockdown of COL2A1 could partially reverse the effect of downregulated miR-29c on the secretion of MMP-3 (P<0.001) and TNF-α (P<0.001), the protein expression level of COL2A1 (P<0.001), and cell apoptosis rate (P<0.001) in chondrocytes. ICA treatment could alleviate the influence of miR-29c overexpression on the secretion of MMP-3 (P<0.001) and TNF-α (P<0.001), the protein expression level of COL2A1 (P<0.001), and the apoptosis rate (P<0.001) of chondrocytes. ***Conclusion***: ICA can alleviate the secretion of inflammatory cytokines and the apoptosis of chondrocytes induced by IL-1β, which may be associated with the miR-29c/COL2A1 axis..

【Key words】osteoarthritis; icariin; microRNA-29cmiR-29c; collagen type Ⅱ alpha 1 chain COL2A1; cell apoptosis

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是一种常见的慢性退行性疾病，以关节疼痛和肿胀，以及活动受限为主要临床表现，给患者精神和身体带来沉重的负担。在OA发病过程中，软骨细胞新陈代谢活动增强和细胞外基质合成代谢与分解平衡紊乱可导致软骨基质成分丢失，关节软骨的组成结构和功能发生改变[1]。Ⅱ型胶原α1链（collagen type Ⅱ alpha 1 chain，COL2A1）是关节软骨中胶原的重要成分，COL2A1表达量的异常改变会造成关节软骨丧失正常的生物特性。多种基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）降解关节软骨细胞外基质，导致关节软骨进行性破坏，基质COL2A1的裂解导致OA形成。可见，软骨细胞异常损伤与OA病变密切相关。淫羊藿苷（icariin，ICA）是中药淫羊藿的主要药效成分，具有抗骨质疏松、抗炎、调节免疫、抗肿瘤等作用[2-3]。Shao YD等[4]研究表明，ICA通过激活抗氧化核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）/血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）通路促进parkin介导的线粒体自噬过程，抑制软骨细胞的铁死亡，提高软骨细胞存活率。ICA可抑制白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）诱导的软骨细胞自噬和炎症反应，并诱导细胞增殖，其机制可能与降低核因子-κB通路有关[5]。ICA促进软骨细胞增殖，提高软骨细胞表型基因的表达水平，拮抗IL-1β诱导的软骨细胞退变[6]。孟如丹等[7]研究证实，ICA可抑制过氧化氢诱导的大鼠软骨细胞凋亡和氧化损伤，此外，ICA通过介导磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）/雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路激活软骨细胞自噬来缓解OA[8-9]，证实ICA对软骨细胞损伤有保护作用。然而，关于ICA在OA中保护软骨细胞免受损伤的具体作用机制尚不明确。本研究通过采用IL-1β刺激人软骨细胞24 h构建体外OA细胞模型，探讨ICA对OA软骨细胞凋亡及炎症因子分泌的影响及其潜在的作用机制，为ICA治疗OA的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人软骨细胞C28/I2和人源胚胎肾细胞HEK-293T来自本实验室细胞库。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自美国Gibco公司，Dulbecco's modified eagle's medium（DMEM）购自美国Hyclone公司，Lipofectamine®200转染试剂购自美国Invitrogen公司，Trizol、反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，RT-qPCR）试剂均购自大连宝生物有限公司，放射免疫沉淀法（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液和蛋白上样缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司，二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量试剂盒购自Thermo Scientific公

司，淫羊藿苷和MTT购自美国Sigma公司，膜联蛋白V（annexin V，AV）-碘化丙啶（propyl iodide，PI）细胞凋亡检测试剂盒购自美国DB公司，微小RNA-29c（microRNA-29c，miR-29c）模拟物（miR-29c mimic）、miR-29c抑制物（miR-29c inhibitor）、靶向COL2A1的小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA；si-COL2A1）及其各自阴性对照（miR-NC、inhibitor-NC和si-NC）均由生工生物公司合成，COL2A1抗体（ab307674）以及MMP-3（ab189572）、TNF-α（ab181421）酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自英国Abcam公司，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）小鼠单克隆抗体和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G（immunoglobin G，IgG）抗体购自北京康为生物试剂公司。5% CO_2培养箱、酶标仪和Nano 300微量分光光度计购自美国Thermo公司，荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司，低温高速离心机购于德国Sigma公司，流式细胞仪购于美国Beckman公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 取人软骨细胞C28/I2接种于含10% FBS的DMEM培养基中，并置于37 ℃、5% CO_2、95%湿度培养箱中培养，当细胞达到75%融合时，收集对数生长期细胞，设置：①Control组、IL-1β组、IL-1β+ICA（0.1 μmol/L）组和IL-1β+ICA（1 μmol/L）组，其中IL-1β组加入10 ng/mL IL-1β处理细胞24 h；IL-1β+ICA组预先加入终浓度为0.1 μmol/L或1.0 μmol/L的ICA处理软骨细胞，1 h后再加入IL-1β继续培养。后续实验使用IL-1β刺激所构建的OA细胞模型进行，即IL-1β刺激软骨细胞培养24 h。②采用TurboFect转染试剂将miR-29c-mimic/inhibitor、si-COL2A1及各自阴性对照miR-NC、inhibitor-NC或si-NC转染至OA软骨细胞中，命名为miR-NC组、miR-29c-mimic组、inhibitor-NC组、miR-29c-inhibitor组、miR-29c-inhibitor+si-NC组和miR-29c-inhibitor+si-COL2A1组。③miR-NC组、miR-29c-mimic组、ICA+miR-NC组、ICA+miR-29c-mimic组，其中ICA+miR-NC组、ICA+miR-29c-mimic组中OA软骨细胞先用miR-NC或miR-29c-mimic转染24 h后，加入1 μmol/L ICA处理后收集细胞进行后续检测。

1.2.2 噻唑蓝（methylthiazolydiphenyl-tetrazolium，MTT）法检测细胞活力 将生长良好的人软骨细胞以5×10⁴/孔的密度接种于96孔板内，培养24 h后，分别用0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μmol/L浓度的ICA处理细胞，每个浓度设置3个复孔。待培养24 h、48 h后，在细胞培养板中每孔加入20 μL MTT（5 mg/mL）溶液，在37 ℃的细胞培养箱中继续孵育4 h。随后每孔加入100 μL甲瓒溶解液继续孵育4 h，轻微震荡后，用酶标仪检测在570 nm处的吸光度（absorbance，A）值。

1.2.3 ELISA检测各组细胞上清液中MMP-3和TNF-α水平 收集处理后的各组软骨细胞上清液，3 000 r/min离心10 min后。根据MMP-3（ab189572）和TNF-α（ab181421）ELISA试剂盒说明检测MMP-3和TNF-α的分泌情况，最后用酶标仪读取450 nm波长处的A值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集处理后继续培养24 h的软骨细胞，用胰酶消化，离心收集，PBS洗3次，然后将细胞悬浮于300 μL 1×Binding buffer缓冲液中，同时加入5 μL Annexin V-FITC室温避光孵育10 min后，加10 μL PI孵育5 min，最后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率=（早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数）/细胞总数×100%。

1.2.5 蛋白免疫印迹（Western blot，WB）法检测细胞中COL2A1蛋白表达水平 收集各组软骨细胞，加入RIPA蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂于冰上裂解细胞30 min后，使用总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白，采用BCA法蛋白定量测定蛋白浓度。取25 μg/孔蛋白通过10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分离目的蛋白，并将湿蛋白转移到聚偏二氟乙烯（poly vinylidene fluoride，PVDF）膜上（电压100 V，电流230 mA，时间2 h），随后将膜与5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h后，与一抗[COL2A1（1∶1 000）和GAPDH（1∶1 000）]4 ℃孵育过夜，Tris-HCl缓冲盐溶液+吐温（Tris-HCl buffered salt solution+Tween，TBST）洗涤3次后，与HRP标记的山羊抗鼠IgG室温孵育2 h。TBST漂洗后，采用增强型化学发光试剂（enhanced chemiluminescence，ECL）化学发光剂盒进行染色，并用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与GAPDH条带灰度值比值表示目的蛋白表达水平。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，RT-qPCR）检测细胞中miR-29c和COL2A1 mRNA表达水平 采用TRIzol试剂提取各组软骨细胞中总RNA。为了检测miR-29c的表达水平，采用TaqMan MicroRNA反转录试剂盒合成cDNA，并用SYBR Green PCR Master Mix进行PCR扩增。为了检测COL2A1 mRNA的表达水平，采用TaKaRa反转录试剂盒进行反转录，并采用SYBR Green PCR Master Mix扩增反转录后的产物。RT-qPCR的反应程序如下：95 ℃ 1 min；94 ℃ 15 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s，共35个循环。U6和GAPDH分别作为miRNA和mRNA的内参基因。所得结果经$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行计算。所需引物见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

引物	序列（5'~3'）
COL2A1-F	ATGACAATCTGGCTCCCAAC
COL2A1-R	GCCCTATGTCCACACCGAATT
miR-29c-F	ACACTCCAGCTGGGATTGGCTAA
miR-29c-R	TGGTGTCGTGGAGTCG
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH-F	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH-R	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验验证miR-29c和COL2A1间的靶向调控关系 利用在线生物信息学工具（http://www.targetscan.org/）预测得到miR-29c与COL2A1 3'-非翻译区（untranslation region，UTR）的结合位点。将含有miR-29c结合位点的野生型（wild type，WT）和突变型（mutant，MUT）COL2A1 3'-UTR克隆A到pGL3载体中，构建WT-COL2A1和MUT-COL2A1荧光素酶报告质粒。随后，采用转染试剂将上述质粒与miR-29c-mimic或miR-NC共转染至HEK-293T细胞培养48 h后，检测荧光素酶活性，进一步验证

miR-29c靶向调节COL2A1。

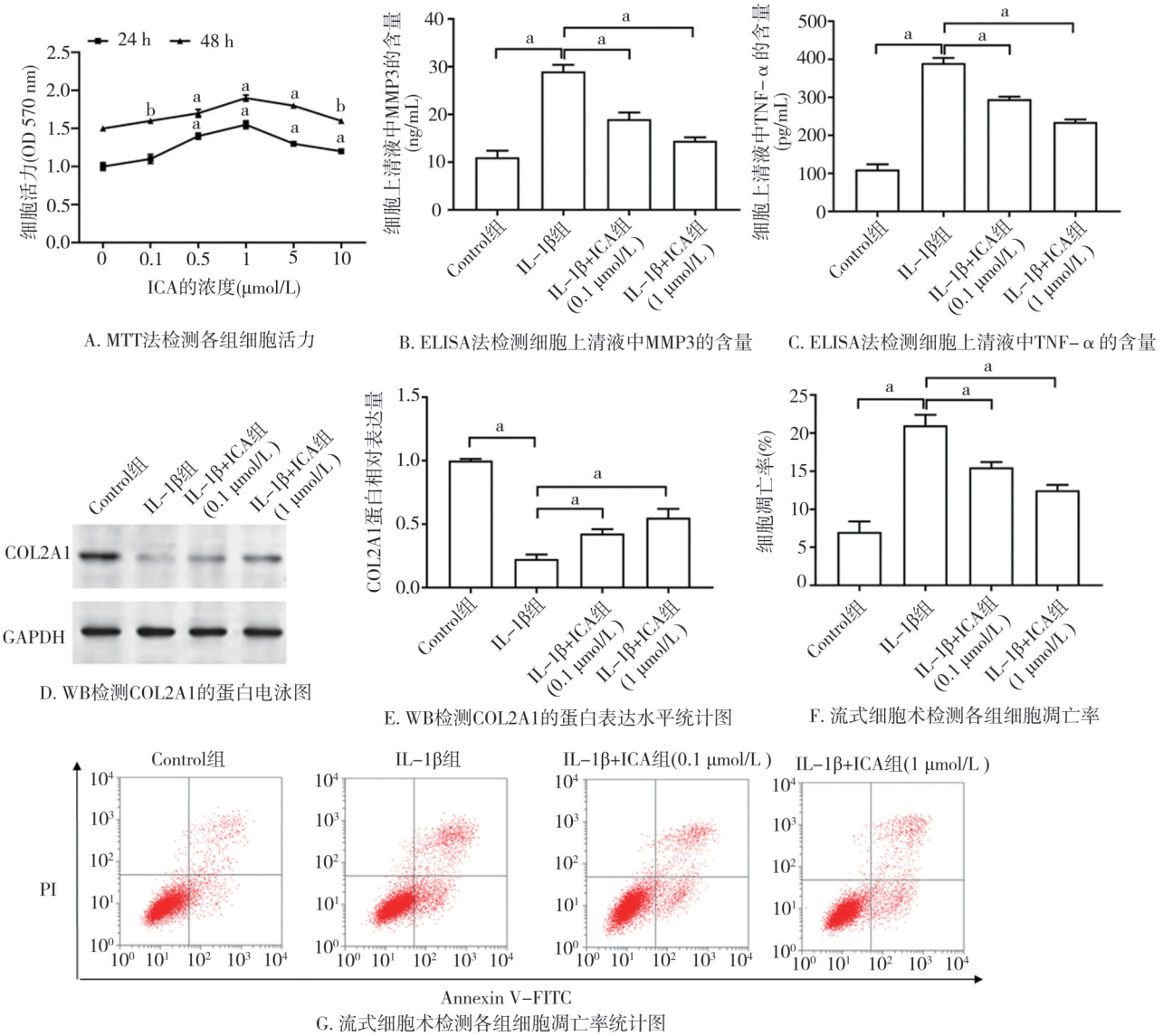
1.3 统计学方法

所有实验数据来自3组独立的重复实验，用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）来表示。GraphPad Prism 8.0软件进行作图，实验数据经SPSS 26.0软件进行统计分析。2组间比较使用t检验；多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用Tukey-HSD法。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 ICA在OA软骨细胞中发挥抗炎、抑制细胞凋亡的功能

采用MTT法检测不同浓度ICA作用不同时间对人软骨细胞活力的影响。结果表明，在一定浓度范围内（0.1~1.0 μmol/L）ICA对软骨细胞无毒性，并且能够促进软骨细胞增殖，而浓度大于1.0 μmol/L时会降低细胞存活率（图1A）。对细胞进行不同分组处理培养24 h后，分别检测细胞上清液中MMP-3、TNF-α的分泌以及细胞内COL2A1的蛋白表达水平，通过流式细胞术检测细胞凋亡率。结果如图1B~G所示，四组间MMP-3（F=97.11，P<0.001）、TNF-α（F=659.6，P<0.001）、COL2A1表达水平（F=336.4，P<0.001）以及细胞凋亡率（F=164.0，P<0.001）的比较差异均具有统计学意义。进一步两两比较结果显示：与Control组相比，IL-1β刺激可明显增加软骨细胞上清液中MMP-3（P<0.001）和TNF-α（P<0.001）的含量（图1B、C），降低COL2A1的表达水平（P<0.001）（图1D、E），同时还提高软骨细胞凋亡率（P<0.001）（图1F、G）。与IL-1β组相比，ICA处理可明显降低IL-1β诱导的软骨细胞上清液中MMP-3（P=0.001；P<0.001）和TNF-α（P<0.001；P<0.001）的含量（图1B、C），升高COL2A1的表达水平（P<0.001；P<0.001）（图1D、E），降低软骨细胞凋亡率（P<0.001；P<0.001）（图1F、G）。



A. MTT法检测各组细胞活力　B. ELISA法检测细胞上清液中MMP3的含量　C. ELISA法检测细胞上清液中TNF-α的含量

D. WB检测COL2A1的蛋白电泳图　E. WB检测COL2A1的蛋白表达水平统计图　F. 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

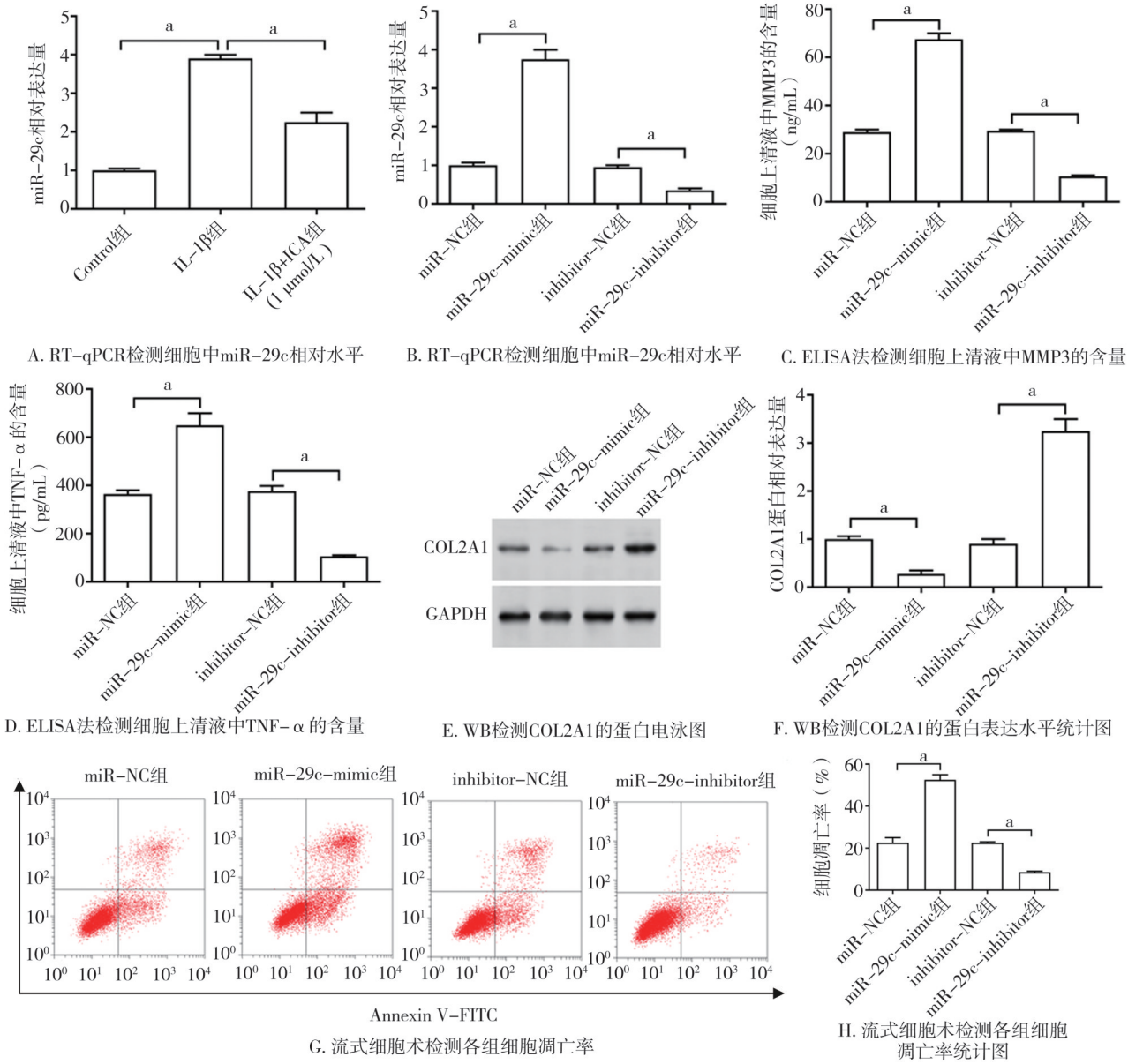
G. 流式细胞术检测各组细胞凋亡率统计图

注：a，P<0.01；b，P<0.05

图1 ICA对OA软骨细胞炎症反应及细胞凋亡的影响

2.2 miR-29c在OA软骨细胞中发挥促炎、促进细胞凋亡的功能

采用RT-qPCR法检测软骨细胞中miR-29c的表达水平结果显示：三组间软骨细胞中miR-29c表达水平的比较差异具有统计学意义（F=253.9，P<0.001）（图2A）。进一步两两比较结果显示：与Control组相比，IL-1β刺激后miR-29c的表达水平明显上调（P<0.001）；与IL-1β组相比，ICA组miR-29c表达水平显著降低（P<0.001）（图2A）。随后向IL-1β刺激软骨细胞所构建的OA细胞模型转染miR-29c-mimic/inhibitor，24 h后检测miR-29c的表达水平。结果显示：四组间miR-29c表达水平的比较差异具有统计学意义（F=383.3，P<0.001）（图2B）。进一步两两比较结果显示：与miR-NC组相比，转染miR-29c-mimic后，细胞中miR-29c的水平明显升高（P<0.001）；与inhibitor-NC组相比，转染miR-29c inhibitor后，细胞中miR-29c的水平明显降低（P=0.003）（图2B）。随后检测各组细胞上清液中MMP-3、TNF-α的含量，细胞中COL2A1的表达水平以及细胞凋亡的变化。结果显示：四组间MMP-3（F=887.6，P<0.001）、TNF-α（F=185.1，P<0.001）的含量、COL2A1表达水平（F=249.2，P<0.001）以及细胞凋亡率（F=317.5，P<0.001）的比较差异具有统计学意义（图2C~H）。进一步两两比较结果显示：与miR-NC组相比，miR-29c mimic组细胞上清液中MMP-3（P<0.001）、TNF-α（P<0.001）的含量明显升高（图2C、D），COL2A1的蛋白表达水平明显降低（P=0.001）（图2E、F），细胞凋亡率明显增加（P<0.001）（图2G、H）；与inhibitor-NC组相比，miR-29c inhibitor组细胞上清液中MMP-3（P<0.001）、TNF-α（P<0.001）的含量明显降低（图2C、D），COL2A1的蛋白表达水平明显升高（P<0.001）（图2E、F），细胞凋亡率明显降低（P<0.001）（图2G、H）。



A. RT-qPCR检测细胞中miR-29c相对水平　B. RT-qPCR检测细胞中miR-29c相对水平　C. ELISA法检测细胞上清液中MMP3的含量

D. ELISA法检测细胞上清液中TNF-α的含量　E. WB检测COL2A1的蛋白电泳图　F. WB检测COL2A1的蛋白表达水平统计图

G. 流式细胞术检测各组细胞凋亡率　H. 流式细胞术检测各组细胞凋亡率统计图

注：a，P<0.01

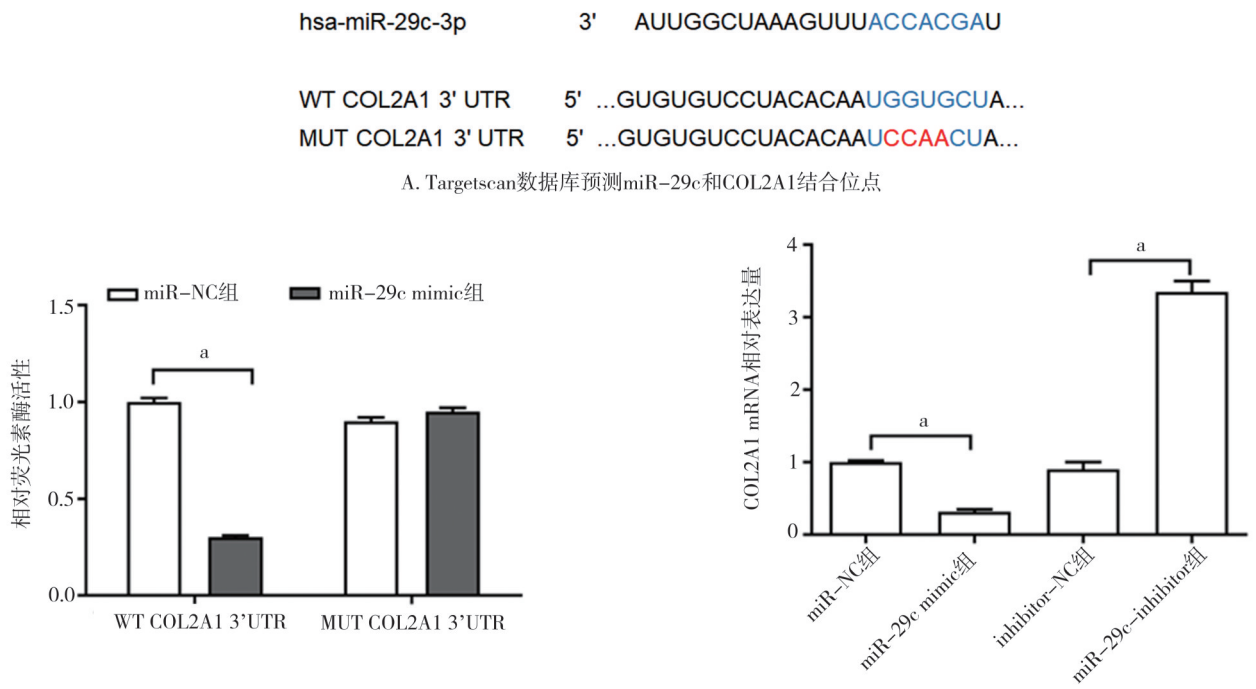
图2　miR-29c对OA软骨细胞炎症反应及细胞凋亡的影响

2.3 miR-29c靶向调节COL2A1

通过TargetScan、StarBase和miRTarBase数据库预测miR-29c可能的靶基因，发现COL2A1是共同靶基因之一，已知COL2A1是关节软骨中胶原的重要成分，其表达量的异常改变会导致关节软骨丧失正常的生物特性。且本研究上述实验结果如图2E所示显示：与对照组相比，miR-29c mimic组COL2A1蛋白表达水平明显降低（P=0.001），而miR-29c inhibitor组COL2A1蛋白表达水平明显升高（P<0.001）。据此推测COL2A1可能是miR-29c下游调控的靶基因。TargetScan数据库生物信息学分析发现miR-29c与COL2A1的3'UTR存在互补结合位点（图3A）。为了进一步验证miR-29c与COL2A1的靶向调控关系，双荧光素酶报告基因实验验证表示，与miR-NC组相比，miR-29c mimic组中含有野生型COL2A1结合位点的荧光素酶活性明显降低（t=31.300，P<0.001），而突变型COL2A1的荧光素酶活性差异无统计学意义（t=1.770，P=0.152），表明miR-29c能够与COL2A1靶向结合（图3B）。此外，四组细胞中COL2A1 mRNA水平的比较差异具有统计学意义（F=185.0，P<0.001）（图3C）。进一步两两比较结果显示：与miR-NC组相比，miR-29c mimic组软骨细胞中COL2A1 mRNA水平明显降低（P=0.008）（图3C）；与inhibitor-NC组比较，miR-29c inhibitor组软骨细胞中COL2A1 mRNA水平明显增加（P<0.001）（图3C）。以上结果证实，COL2A1是miR-29c下游调控的靶基因。

2.4 干扰COL2A1可部分逆转敲低miR-29c对OA炎症发生及细胞凋亡的作用

单独将miR-29c-inhibitor转染或与COL2A1的siRNA共同转染至OA细胞模型后，采用WB检测COL2A1的蛋白表达水平，结果显示：四组细胞中COL2A1蛋白表达水平的比较差异具有统计学意义（F=103.6，P<0.001）（图4A、B）。进一步两两比较结果显示：与inhibitor-NC组相比，miR-29c-inhibitor组中COL2A1的蛋白表达水平明显升高（P<0.001）；与miR-29c-inhibitor+si-NC组相比，miR-29c-inhibitor+COL2A1 siRNA组中COL2A1的蛋白表达水平明显降低（P<0.001）（图4A、B）。随后检测各组细胞上清液中MMP-3、TNF-α的表达水平及细胞凋亡率的变化情况，结果显示：四组间MMP-3（F=85.91，P<0.001）、TNF-α（F=167.7，P<0.001）以及细胞凋亡率（F=557.6，P<0.001）的比较差异具有统计学意义（图4C~F）。进一步两两比较结果显示：与inhibitor-NC组相比，miR-29c-inhibitor组中MMP-3（P<0.001）、TNF-α（P<0.001）含量和细胞凋亡率（P<0.001）明显降低；与miR-29c-inhibitor+si-NC组相比，miR-29c-inhibitor+COL2A1 siRNA组中MMP-3（P<0.001）、TNF-α（P<0.001）含量和细胞凋亡率（P<0.001）明显升高（图4C~F），表明干扰COL2A1逆转敲低miR-29c对OA炎症发生及细胞凋亡的抑制作用。



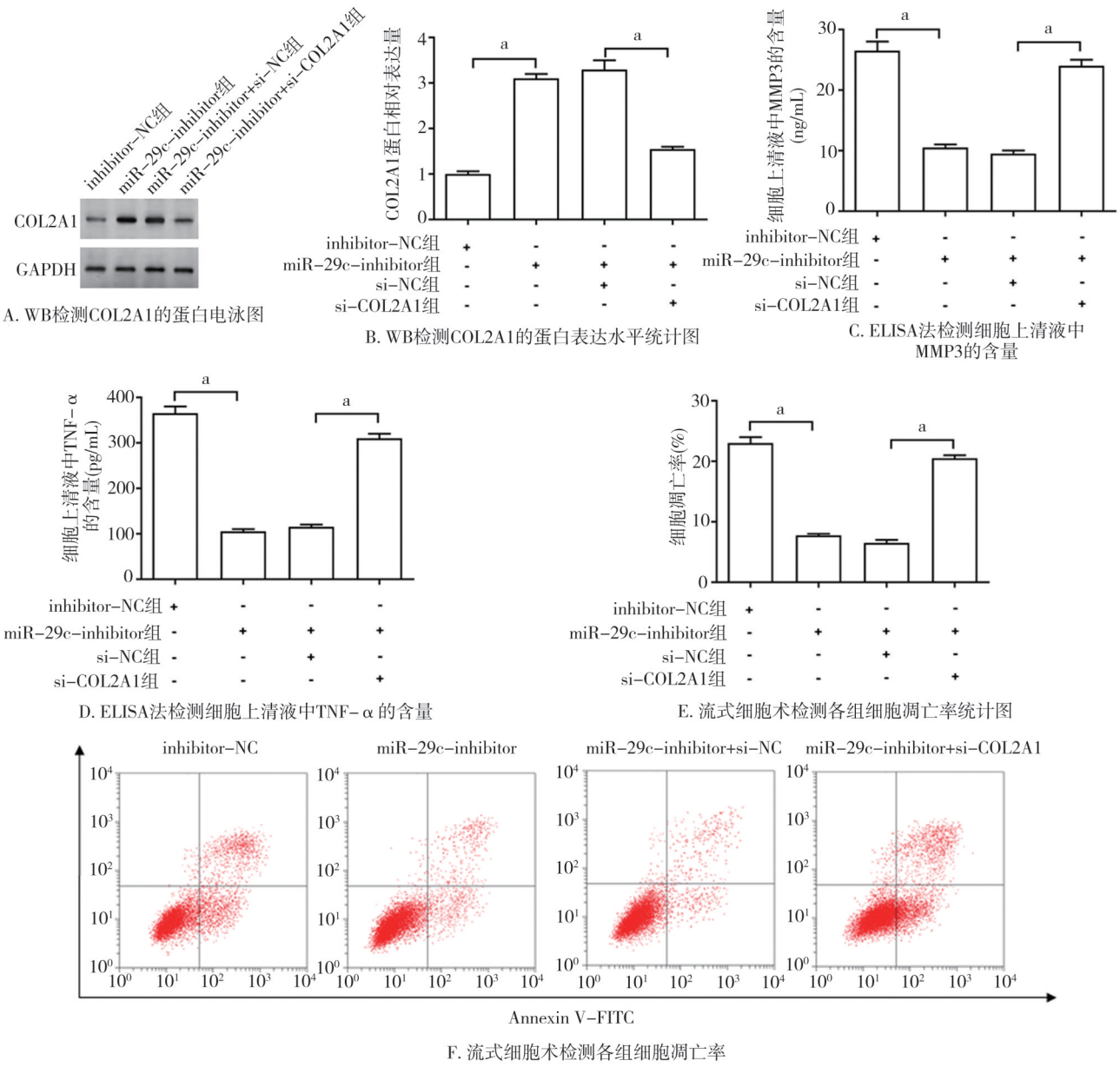
A. Targetscan数据库预测miR-29c和COL2A1结合位点

B.双荧光素酶报告基因实验验证miR-29c和COL2A1的靶向关系

C. RT-qPCR法检测COL2A1 mRNA表达水平

注：a，P<0.01

图3 miR-29c靶向调节COL2A1的表达

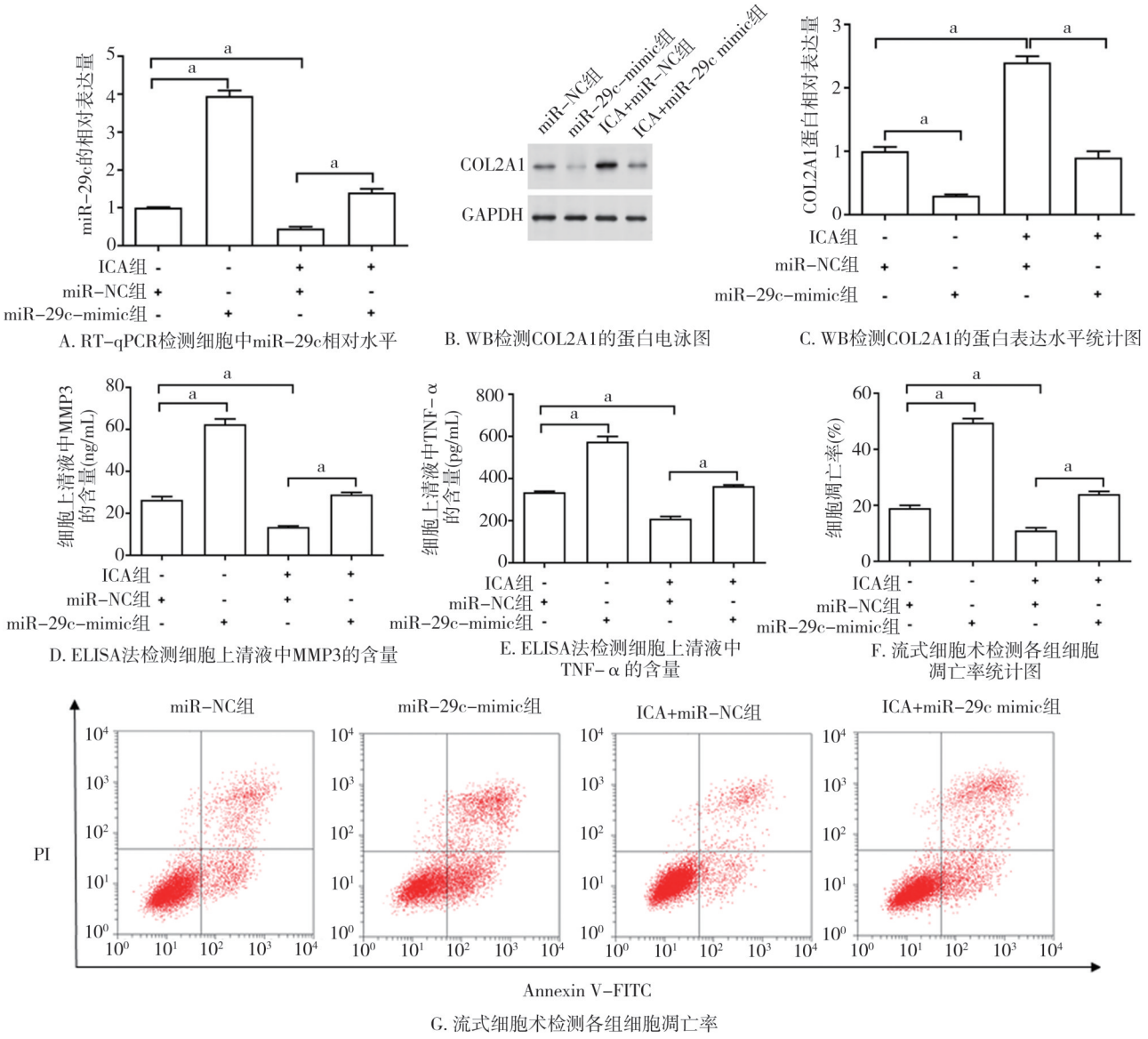


注：a，$P<0.01$

图 4　COL2A1 逆转 miR-29c 对 OA 软骨细胞炎症反应及细胞凋亡的影响

2.5　ICA 通过下调 miR-29c 促进 COL2A1 的表达以减轻 OA 软骨细胞损伤

对 OA 软骨细胞模型进行分组处理后，采用 WB 检测 COL2A1 的蛋白表达水平，ELISA 检测细胞上清液中 MMP-3 和 TNF-α 的含量，流式细胞术检测细胞凋亡率。结果显示：四组间 miR-29c（$F=814.1$，$P<0.001$）和 COL2A1 的表达水平（$F=374.7$，$P<0.001$）、MMP-3（$F=474.5$，$P<0.001$）、TNF-α（$F=355.5$，$P<0.001$）以及细胞凋亡率（$F=554.8$，$P<0.001$）的比较差异均具有统计学意义（图 2A~G）。进一步两两比较结果显示：与 miR-NC 组相比，ICA+miR-NC 组软骨细胞中 miR-29c 的水平明显降低（$P<0.001$）（图 5A），COL2A1 的蛋白表达水平明显升高（$P<0.001$）（图 5B、C），软骨细胞上清液中 MMP-3（$P<0.001$）和 TNF-α（$P<0.001$）的含量以及细胞凋亡率明显降低（$P<0.001$）（图 5D~G）；与 ICA+miR-NC 组相比，ICA+miR-92c mimic 组软骨细胞中 miR-29c 的水平明显升高（$P<0.001$）（图 5A），COL2A1 的蛋白表达水平明显降低（$P<0.001$）（图 5B、C），软骨细胞上清液中 MMP-3（$P<0.001$）和 TNF-α（$P<0.001$）的含量以及细胞凋亡率（$P<0.001$）明显升高（图 5D~G）。这表明，ICA 通过下调 miR-29c 促进 COL2A1 的表达进而减轻 OA 软骨细胞损伤。



注：a，$P<0.01$

图5　ICA下调miR-29c进而上调COL2A1的表达对OA软骨细胞炎症反应及细胞凋亡的影响

3　讨　论

OA常见症状为关节疼痛、僵硬、肿胀、活动受限和畸形等，其发生、进展与炎症和细胞凋亡紧密相关。近年来，中医药在疾病治疗方面的作用受到越来越多的重视，中药有效成分通过抑制炎症相关因子的分泌、改善软骨基质合成及分解代谢失衡、抑制氧自由基损伤及软骨细胞凋亡、促进软骨细胞增殖、上调雌激素水平，在治疗OA疾病方面发挥重要作用[10]。本研究结果表明，ICA通过下调miR-29c明显降低IL-1β诱导的C28/I2细胞中TNF-α和MMP3的分泌，促进COL2A1的表达，抑制软骨细胞凋亡。这表明ICA可以有效改善IL-1β诱导的软骨细胞炎性损伤。

淫羊藿苷是一种黄酮化合物，现代药理学研究证实其对骨骼、心血管及神经等系统具有良好保护作用[3]。已有研究证实，ICA在OA中发挥抗炎、抗凋亡作用。例如，在IL-1β刺激人SW1353软骨肉瘤细胞模拟的骨关节炎微环境中，ICA通过MAPK通路抑制MMP-1、MMP-3和MMP-13的表达发挥软骨保护作用[11]。ICA通过调节TDP-43信号通路抑制大鼠OA模型软骨细胞发生凋亡[12]。ICA通过抑制核转录因子（nuclear transcription factor kappa-

B，NF-κB）信号通路激活自噬，抑制炎症细胞因子的分泌和细胞凋亡，可用于OA的治疗[13]。余绍涌等[14]研究发现，ICA主要从抑制软骨细胞凋亡和外基质降解、减轻炎症因子释放等方面发挥治疗骨性关节炎的作用。本研究发现在浓度为0.1~1.0 μmol/L范围内，ICA对软骨细胞无毒性，并且能够促进软骨细胞增殖，故选择0.1 μmol/L和1.0 μmol/L浓度进行实验。一致地，本研究实验结果显示，ICA处理可明显降低IL-1β诱导的软骨细胞上清液中MMP-3和TNF-α的含量，升高COL2A1的表达水平，降低软骨细胞凋亡率。提示ICA可抑制IL-1β诱导的软骨细胞炎症反应和凋亡水平，减轻OA软骨细胞的损伤，再次证明了ICA在OA中发挥保护作用。

微小核糖核酸（microRNAs，miRNAs）是一类小的非编码RNA，通过与靶mRNA 3'-UTR的特异序列结合调节转录后基因的表达。越来越多的证据表明，由miR-29a、miR-29b-1、miR-29b-2和miR-29c组成的miR-29家族是许多生物过程的关键调节因子，并且异常表达与OA的发病机制有关[15]。既往研究已经证实，与健康软骨样本相比，OA软骨中miR-29a下调，miR-29b上调，其参与可能与促炎细胞因子的作用有关，如IL-1β和TNF-α[16-17]。谢晓婷和郑拥军[18]证实抑制miR-29b可通过激活软骨中LC3和beclin-1增加自噬，缓解大鼠膝骨关节炎引起的软骨退变和股四头肌萎缩。此外，OA患者血浆中miR-29c的表达水平较高[19]，滑膜液中miR-29c的水平与膝关节OA的严重程度呈正相关[20]。一致地，本研究实验结果表明，IL-1β刺激后，软骨细胞中miR-29c的表达水平明显上调，过表达miR-29c可明显升高细胞中细胞因子TNF-α和MMP3水平，促进软骨细胞凋亡；而抑制miR-29c表达则出现相反的结果。这进一步表明miR-29c可能通过调节软骨细胞凋亡和炎症反应促进OA的发生。近年来，miRNAs可作为中药活性成分治疗OA的靶点。有研究表明，黄芩素通过调节miR-29a-3p提高软骨细胞活性，抑制细胞凋亡，降低炎症反应，从而改善OA引起的软骨细胞退化[21]。中草药紫荆花水提物通过上调miRNA-145-5p的表达，抑制TLR4/NF-κB信号通路，缓解细胞外基质代谢失衡，保护软骨细胞免于变性[22]。雷公藤苷通过上调miR-216a-5p保护软骨细胞免受IL-β诱导的炎症和凋亡[23]。此外，既往研究表明ICA通过激活靶向组织蛋白酶K的miR-206对地塞米松诱导的大鼠软骨损伤模型发挥保护作用[24]。ICA通过调控miR-223-3p/NLRP3信号轴，抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖和炎症因子分泌，促进细胞凋亡，缓解类风湿关节炎[25]。类似的，本实验的结果显示ICA干预可明显降低IL-β诱导的软骨细胞中miR-29c的表达水平，并减少TNF-α和MMP3的分泌同时抑制细胞凋亡。此外，实验结果还表明过表达miR-29c可逆转ICA对OA软骨细胞的炎症反应和细胞凋亡的抑制作用。这表明ICA可通过下调miR-29c减轻OA软骨细胞损伤，为ICA治疗OA提供了新的作用靶点。

正常关节软骨由大量细胞外基质（extracellular matrix，ECM）组成，主要包括胶原蛋白、蛋白聚糖等。在OA中，软骨细胞和滑膜释放的促炎细胞因子水平升高导致MMPs水平升高和ECM蛋白（如聚集蛋白和Ⅱ型胶原）的降解[26]。COL2A1是关节软骨中胶原的重要成分，软骨的破坏以COL2A1的减少最为明显[6]。加入ICA干预可明显降低LPS诱导对软骨细胞中Ⅱ型胶原表达的抑制作用以及对胞外基质降解的促进作用[27]。本研究实验结果表明，IL-1β诱导的OA细胞中MMP-3和TNF-α的分泌量明显增加，而COL2A1的表达量明显减少。为了进一步探究COL2A1在OA细胞中的作用机制，本研究通过TargetScan、StarBase和miRTarBase数据库预测发现COL2A1是miR-29c可能靶基因，并对其靶向调节关系进行验证发现miR-29c靶向负调控COL2A1。实验结果表明，干扰miR-29c表达可明显降低MMP-3、TNF-α含量和细胞凋亡率，而干扰COL2A1则可部分逆转干扰miR-29c表达对OA的抑制作用，进一步验证了miR-29c通过靶向调控COL2A1表达促进OA发展，初步阐明了miR-29c在OA发展的的潜在作用机制。

综上所述，本研究发现ICA能抑制IL-1β诱导的人软骨细胞中miR-29c表达，减轻炎症因子的分泌，抑制OA软骨细胞凋亡，从而减轻OA软骨细胞损伤，为治疗OA提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Abramoff B，Caldera FE. Osteoarthritis：pathology，diagnosis，and treatment options[J]. Med Clin North Am，2020，104(2)：293-311.

[2] Chen CW，Wang SQ，Wang N，et al. Icariin inhibits prostate cancer bone metastasis and destruction via suppressing TAM/CCL5-mediated osteoclastogenesis[J]. Phytomedicine，2023，120：155076.

[3] Huang M，Wang Y，Peng R. Icariin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through EphB4/ephrin-B2 axis[J]. Evid Based

Complement Alternat Med，2020，2020：2982480.

[4] Shao YD，Sun L，Yang GH，et al. Icariin protects vertebral endplate chondrocytes against apoptosis and degeneration *via* activating Nrf-2/HO-1 pathway[J]. Front Pharmacol，2022，13：937502.

[5] 颜荣耀，曾志远，王 浩，等. 淫羊藿苷对白细胞介素-1β刺激的软骨细胞增殖、自噬和炎症反应的影响[J]. 中国临床药理学杂志，2023，9(22)：3301-3305.

Yan RY，Zeng ZY，Wang H，et al. Effects of icariin on interleukin-1βstimulated chondrocyte proliferation，autophagy and inflammatory response[J]. Chin J Clin Pharmacol，2023，9(22)：3301-3305.

[6] 刘益杰，陈世宣，赵仙丽，等. 淫羊藿苷对白介素-1β诱导软骨细胞退变的保护作用[J]. 同济大学学报(医学版)，2018，39(2)：56-60.

Liu YJ，Chen SX，Zhao XL，et al. Icariinin protects chondrocytes from IL-1β-induced degeneration[J]. J Tongji Univ Med Sci，2018，39(2)：56-60.

[7] 孟如丹，胡张捷，毛 强. 淫羊藿苷对 H_2O_2 诱导的软骨细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 中国现代应用药学，2021，38(24)：3115-3121.

Meng RD，Hu ZJ，Mao Q. Protective effect of icariin on H_2O_2-induced chondrocyte oxidative damage and its mechanism[J]. Chin J Mod Appl Pharm，2021，38(24)：3115-3121.

[8] Tang YH，Li YF，Xin DW，et al. Icariin alleviates osteoarthritis by regulating autophagy of chondrocytes by mediating PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Bioengineered，2021，12(1)：2984-2999.

[9] Chen Y，Pan XL，Zhao J，et al. Icariin alleviates osteoarthritis through PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. Eur J Med Res，2022，27(1)：204.

[10] 韩 晗，张媛媛，潘 立，等. 中药有效成分防治骨性关节炎的研究进展[J]. 中国药科大学学报，2018，49(3)：279-285.

Han H，Zhang YY，Pan L，et al. Advances of active ingredients of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of osteoarthritis[J]. J China Pharm Univ，2018，49(3)：279-285.

[11] Zeng L，Rong XF，Li RH，et al. Icariin inhibits MMP-1，MMP-3 and MMP-13 expression through MAPK pathways in IL-1β-stimulated SW1353 chondrosarcoma cells[J]. Mol Med Rep，2017，15(5)：2853-2858.

[12] Huang H，Zhang ZF，Qin FW，et al. Icariin inhibits chondrocyte apoptosis and angiogenesis by regulating the TDP-43 signaling pathway[J]. Mol Genet Genomic Med，2019，7(4)：e00586.

[13] Mi BB，Wang JQ，Liu Y，et al. Icariin activates autophagy via down-regulation of the NF-κB signaling-mediated apoptosis in chondrocytes[J]. Front Pharmacol，2018，9：605.

[14] 余绍涌，刘建航，章晓云，等. 淫羊藿苷治疗骨性关节炎过程中对关节软骨、软骨下骨、滑膜等影响的机制[J]. 中国组织工程研究，2020，24(14)：2243-2249.

Yu SY，Liu JH，Zhang XY，et al. Molecular mechanism of icariin effects on articular chondrocytes，subchondral bone and synovium in the treatment of osteoarthritis[J]. Chin J Tissue Eng Res，2020，24(14)：2243-2249.

[15] Horita M，Farquharson C，Stephen LA. The role of miR-29 family in disease[J]. J Cell Biochem，2021，122(7)：696-715.

[16] Chen LQ，Li Q，Wang J，et al. MiR-29b-3p promotes chondrocyte apoptosis and facilitates the occurrence and development of osteoarthritis by targeting PGRN[J]. J Cell Mol Med，2017，21(12)：3347-3359.

[17] Le LT，Swingler TE，Crowe N，et al. The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis[J]. J Mol Med，2016，94(5)：583-596.

[18] 谢晓婷，郑拥军. MiR-29b参与大鼠膝骨关节炎引起的软骨退变和股四头肌萎缩[J]. 中国疼痛医学杂志，2022，28(4)：249-257.

Xie XT，Zheng YJ. Mi R-29b is involvement in cartilage autophagy and muscle atrophy resulting from knee osteoarthritis in rats[J]. Chin J Pain Med，2022，28(4)：249-257.

[19] Borgonio Cuadra VM，González-Huerta NC，Romero-Córdoba S，et al. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways[J]. PLoS One，2014，9(6)：e97690.

[20] Li YH，Tavallaee G，Tokar T，et al. Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis：differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage，2016，24(9)：1577-1586.

[21] 杨 波，龙 慧，王郑钢，等. 黄芩素通过促进miR-29a-3p抑制MAP2K6改善骨性关节炎模型大鼠软骨细胞退化[J]. 中药药理与临床，2019，35(6)：32-37.

Yang B，Long H，Wang ZG，et al. Mechanism of baicalein on improving cartilage degeneration in OA model rats by promoting miR-29a-3p to inhibit on MAP2K6[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med，2019，35(6)：32-37.

[22] Lin JZ，Huang YF，Lin X，et al. *Bauhinia championii* alleviates extracellular matrix degradation in IL-1β induced chondrocytes via miRNA-145-5p/TLR4/NF-κB axis[J]. Heliyon，2023，9(8)：e19138.

[23] Huang Z，Song SL，Zhang D，et al. Protective effects of *Tripterygium* glycoside on IL-1β-induced inflammation and apoptosis of rat chondrocytes *via* microRNA-216a-5p/TLR4/NF-κB axis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，2023，45(1)：61-72.

[24] Liu N，Zhang T，Cao BR，et al. Icariin possesses chondroprotective efficacy in a rat model of dexamethasone-induced cartilage injury through the activation of miR-206 targeting of cathepsin K[J]. Int J Mol Med，2018，41(2)：1039-1047.

[25] Wu ZM，Luo J，Shi XD，et al. Icariin alleviates rheumatoid arthritis via regulating miR-223-3p/NLRP3 signalling axis[J]. Autoimmunity，2020，53(8)：450-458.

[26] Daheshia M，Yao JQ. The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. J Rheumatol，2008，35(12)：2306-2312.

[27] 樊方阳. 淫羊藿苷减轻脂多糖诱导小鼠膝关节软骨炎症的机制研究[D]. 天津：天津中医药大学，2023.

Fan FY. Study on the Mechanism of LPS-induced chondrocytes inflammation in mouse knee joints mitigated by ICA[D]. Tianjin：Tianjin University of Traditional Chinese Medicine，2023.

（收稿：2024-01-24；修回：2024-03-21；录用：2024-05-22）

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

贺自克，王上增. 淫羊藿苷通过miR-29c/COL2A1轴改善骨关节炎软骨细胞功能[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(9)：1271-1280.