

# 黄芪甲苷对炎症损伤软骨细胞的保护作用

廖建钊<sup>1</sup>, 杨楠<sup>1</sup>, 周毅<sup>1</sup>, 许航<sup>1</sup>, 夏天<sup>1</sup>, 宋世雷<sup>1</sup>, 曾麒<sup>1</sup>, 陈跃平<sup>2</sup>

https://doi.org/10.12307/2023.120

投稿日期: 2022-03-07

采用日期: 2022-05-06

修回日期: 2022-06-09

在线日期: 2022-07-12

中图分类号:

R459.9; R364; R274.3

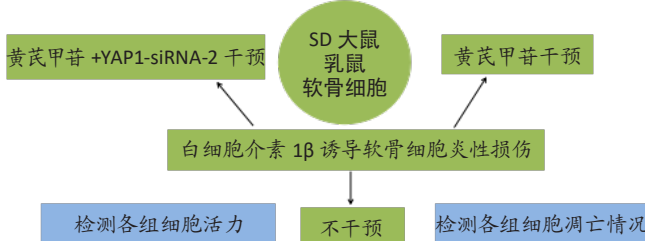
文章编号:

2095-4344(2023)14-02158-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 黄芪甲苷可保护白细胞介素1β诱导炎症损伤的软骨细胞

检测各组细胞金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1、TEAD1、YAP1 mRNA表达, 金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1、II型胶原、TEAD1、p-YAP1、YAP1蛋白表达



文题释义:

骨关节炎: 由多因素引起关节软骨纤维化、破裂等的退行性疾病, 病理表现为关节软骨变性破坏、软骨下骨硬化或囊变等, 可以导致关节疼痛、畸形和活动功能障碍, 进而增加心血管事件的发生率及全因死亡率, 是目前常见且难治的骨科疾病之一。

黄芪甲苷: 是骨科常用中药黄芪的主要有效成分之一。现代药理学研究表明, 黄芪甲苷可用于增强机体免疫力、抗病毒、抗应激、抗炎等作用, 是一种具有较高研究价值的中药单体。

摘要

背景: 在骨关节炎的发生、发展过程中, 软骨病变是其中的关键环节, 探究软骨细胞功能、开发具有软骨细胞保护作用及促软骨细胞分泌II型胶原等的药物, 是当前探索骨关节炎临床治愈的重要手段。

目的: 研究黄芪甲苷对白细胞介素1β诱导的软骨细胞炎症损伤的保护作用, 探讨Hippo-YAP通路是否参与到该作用中及其潜在的作用机制。

方法: 分离培养SD大鼠乳鼠胫骨与股骨软骨细胞。取对数生长期软骨细胞, 分5组: 空白组常规培养, 模型组加入白细胞介素1β诱导软骨细胞炎症损伤, 黄芪甲苷组加入白细胞介素1β+黄芪甲苷, NC-siRNA组转染NC-siRNA+白细胞介素1β+黄芪甲苷, YAP1-siRNA转染组转染YAP1-siRNA+白细胞介素1β+黄芪甲苷。各组细胞培养48 h后, 进行相关检测。

结果与结论: ①模型组细胞活力低于空白组( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组、NC-siRNA组、YAP1-siRNA转染组细胞活力高于模型组( $P < 0.05$ ), YAP1-siRNA转染组细胞活力高于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ); ②模型组细胞相调亡率高于空白组( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组、NC-siRNA组、YAP1-siRNA转染组细胞相调亡率低于模型组( $P < 0.05$ ), YAP1-siRNA转染组细胞相调亡率低于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ); ③RT-qPCR检测显示, 模型组金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1 mRNA表达高于空白组( $P < 0.05$ ), YAP1、TEAD1 mRNA表达低于空白组( $P < 0.05$ ); 黄芪甲苷组YAP1 mRNA表达高于模型组( $P < 0.05$ ); YAP1-siRNA组金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1 mRNA表达高于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ), YAP1、TEAD1 mRNA表达低于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ); ④Western Blot检测显示, 模型组金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1、YAP1蛋白表达高于空白组( $P < 0.05$ ), II型胶原、TEAD1、p-YAP1蛋白表达低于空白组( $P < 0.05$ ); YAP1-siRNA组金属基质蛋白酶1、组织金属蛋白酶抑制物1蛋白表达高于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ), II型胶原、TEAD1、p-YAP1蛋白表达低于NC-siRNA组( $P < 0.05$ ); ⑤结果表明, 黄芪甲苷对白细胞介素1β诱导的软骨细胞炎症损伤存在保护作用, 该作用可能与Hippo-YAP通路有关。

关键词: 骨关节炎; 软骨细胞; 黄芪甲苷; Hippo-YAP; 白细胞介素1β; II型胶原

## Protective effect of astragaloside IV against inflammatory injury in chondrocytes

Liao Jianzhao<sup>1</sup>, Yang Nan<sup>1</sup>, Zhou Yi<sup>1</sup>, Xu Hang<sup>1</sup>, Xia Tian<sup>1</sup>, Song Shilei<sup>1</sup>, Zeng Qi<sup>1</sup>, Chen Yueping<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Department of Traumatology and Hand Surgery, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Liao Jianzhao, Master candidate, Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Chen Yueping, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Traumatology and Hand Surgery, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

<sup>1</sup>广西中医药大学研究生院, 广西壮族自治区南宁市 530000; <sup>2</sup>广西中医药大学附属瑞康医院创伤骨科与手外科, 广西壮族自治区南宁市 530011

第一作者: 廖建钊, 男, 1995年生, 广东省东莞市人, 广西中医药大学在读硕士, 主要从事骨与关节疾病及运动损伤研究。

通讯作者: 陈跃平, 主任医师, 博士生导师, 广西中医药大学附属瑞康医院创伤骨科与手外科, 广西壮族自治区南宁市 530011

https://orcid.org/0000-0001-8499-4724(廖建钊)

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(81960803), 项目负责人: 陈跃平; 广西中医药大学一流学科建设开放课题(2019XK026), 项目负责人: 陈跃平; 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021219), 项目负责人: 廖建钊; 广西研究生教育创新计划项目(YCSY2020080), 项目负责人: 周毅; 广西壮族自治区临床重点专科(创伤外科)建设项目[部门预算社(2021)], 项目负责人: 陈跃平; 广西壮族自治区卫生医疗重点学科(桂卫科教发[2021]8号文件, 急诊医学科), 项目负责人: 陈跃平

引用本文: 廖建钊, 杨楠, 周毅, 许航, 夏天, 宋世雷, 曾麒, 陈跃平. 黄芪甲苷对炎症损伤软骨细胞的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(14):2158-2163.



## Abstract

**BACKGROUND:** Cartilage lesions are the key to the occurrence and development of osteoarthritis. Exploring the function of chondrocytes and developing drugs for chondrocyte protection and pro-secretion of type II collagen are important means to clinically cure osteoarthritis.

**OBJECTIVE:** To explore the protective effect of astragaloside IV (AS-IV) on interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation of chondrocytes and to explore whether the Hippo-YAP pathway is involved in this effect and its potential mechanism.

**METHODS:** Chondrocytes from the tibia and femur of Sprague-Dawley rats were isolated and cultured. Chondrocytes in the logarithmic growth phase were divided into five groups: blank group in which the cells were routinely cultured, model group in which the cells were treated with interleukin-1 $\beta$  to induce inflammatory injury in chondrocytes, astragaloside IV group in which the cells were treated with interleukin-1 $\beta$  + astragaloside IV, NC-siRNA group in which the cells were transfected with NC-siRNA + interleukin-1 $\beta$  + astragaloside IV, YAP1-siRNA group in which the cells were transfected with YAP1-siRNA+interleukin-1 $\beta$ +astragaloside IV. Relevant measurements were performed after 48 hours of culture.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The cell viability was significantly lower in the model group than the blank group ( $P < 0.05$ ), significantly higher in the astragaloside IV, NC-siRNA, and YAP1-siRNA groups than the model group ( $P < 0.05$ ), and significantly higher in the YAP1-siRNA group than the NC-siRNA group ( $P < 0.05$ ). The apoptotic rate was significantly higher in the model group than the blank group ( $P < 0.05$ ), significantly lower in the astragaloside IV, NC-siRNA, and YAP1-siRNA transfection groups than the model group ( $P < 0.05$ ), and significantly lower in the YAP1-siRNA group than the NC-siRNA group ( $P < 0.05$ ). RT-qPCR results showed that compared with the blank group, the mRNA expressions of metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 were significantly higher in the model group ( $P < 0.05$ ), while the mRNA expressions of YAP1 and TEAD1 were significantly lower in the model group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of YAP1 in the astragaloside IV group was significantly higher than that in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the NC-siRNA group, the mRNA expressions of metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 were significantly higher in the YAP1-siRNA group ( $P < 0.05$ ), while the mRNA expressions of YAP1 and TEAD1 were significantly lower in the YAP1-siRNA group ( $P < 0.05$ ). Western blot results revealed that compared with the blank group, the protein expressions of metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 were significantly higher in the model group ( $P < 0.05$ ), while the protein expressions of type II collagen, TEAD1, and p-YAP1 were significantly lower in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the NC-siRNA group, the protein expressions of metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 were significantly higher in the YAP1-siRNA group ( $P < 0.05$ ), while the protein expressions of type II collagen, TEAD1, and p-YAP1 were significantly lower in the YAP1-siRNA group ( $P < 0.05$ ). To conclude, astragaloside IV has a protective effect on interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation of chondrocytes, which may be related to the Hippo-YAP pathway.

**Key words:** osteoarthritis; chondrocyte; astragaloside IV; Hippo-YAP; interleukin-1 $\beta$ ; type II collagen

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81960803 (to CYP); First-class Discipline Construction Open Topic of Guangxi University of Chinese Medicine, No. 2019XK026 (to CYP); Guangxi Postgraduate Education Innovation Program, Nos. YCSW2021219 (to LJZ) and YCSY2020080 (to ZY); Guangxi Zhuang Autonomous Region Clinical Key Specialty (Trauma Surgery) Construction Project, No. 2021 (to CYP); Guangxi Zhuang Autonomous Region Key Health Care Discipline (Emergency Medicine), No. [2021]8 (to CYP)

**How to cite this article:** LIAO JZ, YANG N, ZHOU Y, XU H, XIA T, SONG SL, ZENG Q, CHEN YP. Protective effect of astragaloside IV against inflammatory injury in chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(14):2158-2163.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是由多种因素引起关节软骨纤维化、皴裂等导致的以关节疼痛为主要症状的关节退行性疾病<sup>[1]</sup>。流行病学资料显示,目前中国40岁以上的骨关节炎患病率高达46.3%,并且这种趋势随着人口老龄化进程的发展还在逐渐加剧<sup>[2]</sup>;而放眼全球,截至2017年,骨关节炎患者已经超过3亿人,严重影响着人们的生活质量<sup>[3]</sup>。骨关节炎的发生与年龄、肥胖、炎症、创伤及遗传等因素相关<sup>[4]</sup>,病理特点主要表现为关节软骨变性破坏、软骨下骨硬化或囊变、关节边缘骨质增生、滑膜病变等<sup>[5]</sup>,其中关节软骨的病变是骨关节炎的重要环节。关节软骨主要由水、软骨细胞及胶原纤维等组成,而与软骨形成密切相关的II型胶原主要由软骨细胞分泌<sup>[6]</sup>。近年来还有证据表明,骨关节炎不仅影响患者的生活质量,还会增加并发症的发生率、死亡率及家庭经济负担<sup>[7]</sup>,同时也是老年人致残主要原因。因此,探究软骨细胞功能、开发具有软骨细胞保护作用及促软骨细胞分泌II型胶原等的药物,是当前探索骨关节炎临床治愈的重要手段。

Hippo-YAP通路是进化上高度保守的通路,不同物种间的关键组成分子在结构、功能上高度相似,目前已被广泛应用于细胞增殖、凋亡、代谢、组织器官再生等研究中<sup>[8-11]</sup>。YAP的生物学功能与能否向核内转位密切相关,Hippo-YAP通路的核心蛋白通过磷酸化的级联反应促进YAP的磷酸化,p-YAP滞留在细胞质中,无法发挥YAP入核后的促转录功能<sup>[12]</sup>。研究表明YAP高表达状况下可缓解关节软骨损伤,并抑制炎症因子白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等诱导的骨关节炎相关基因金属基质蛋白酶1和金属基质蛋白酶3等的表达<sup>[13]</sup>。

由此,Hippo-YAP通路可作为治疗骨关节炎的潜在靶点。

黄芪甲苷是目前骨科常用药物黄芪的主要有效成分<sup>[14-17]</sup>,多项研究已经证实了黄芪甲苷对关节软骨及软骨细胞存在保护作用:黄芪甲苷可以减轻关节不稳诱导的小鼠膝骨关节炎病理改变<sup>[18]</sup>;通过抑制NLRP3炎性小体活化减少白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的产生<sup>[19]</sup>;通过介导自噬以减少软骨细胞凋亡<sup>[20]</sup>。但目前黄芪甲苷对软骨细胞的保护作用及潜在保护机制相关的研究仍在探索阶段。由此,此次实验通过白细胞介素1 $\beta$ 进行体外诱导软骨细胞产生炎症损伤,经黄芪甲苷干预损伤细胞、YAP1-siRNA敲降靶基因,探索黄芪甲苷对白细胞介素1 $\beta$ 体外诱导的炎症损伤软骨细胞的保护作用,为靶向治疗骨关节炎提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年11月至2021年11月在广西中医药大学科学实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 二三天龄SD大鼠乳鼠,由广西中医药大学科学实验中心提供。实验中对大鼠的处置符合广西中医药大学科学实验中心动物伦理学规范。

1.3.2 主要试剂 黄芪甲苷(相对分子质量784.97,纯度>98.7%,上海源叶);白细胞介素1 $\beta$ (碧云天);无水乙醇(常熟鸿盛);胎牛血清、DMEM培养基(Hyclone);0.25%胰蛋白酶(Thermo Fisher);II型胶原酶(Gibco);PBS(索莱宝);YAP1-siRNA(北京欧林格);Trizo(invitrogen);SYBR Green PCR

试剂盒 (Thermo); 10% 过硫酸铵、DMSO、TEMED(Sigma); 反转录试剂盒 (Thermo Fisher); MTT、RIPA 裂解液 (碧云天); Annexin V-FITC/PI 试剂盒、BCA 试剂盒 (凯基生物); 30% 丙烯酰胺 (上海国药); 1.0 mol/L Tris-HCl 电泳缓冲液、10%SDS (上海国药); 4× 蛋白上样缓冲液 (TAKARA); 5% 的 BSA(BIOSHARP); Tween-20(Amresco); ECL 发光液 (北京鼎国); YAP1(FineTest, FNab09559); TEAD1(FineTest, FNab08581); II 型胶原 (FineTest, FNab01837); 金属基质蛋白酶 1 (FineTest, FNab05233); 组织金属蛋白酶抑制物 1(Bioss, bsm-10895M); p-YAP1(Bioss, bs-3476R); GAPDH(proteintech); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (碧云天, A0208); 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (碧云天, A0216); CY3 标记山羊抗兔 IgG(proteintech, SA00009-2)。

1.3.3 主要仪器 倒置显微镜 (OLYMPUS); 细胞培养箱 (Thermo); 离心机 (Eppendorf); Real-time 检测仪 (ABI); 超净工作台 (苏州安泰); 低温冷冻离心机 (sigma); 酶标仪 (Thermo); 低速离心机 (上海卢湘仪); 移液器 (Thermo); 流式细胞仪 (BD); 电泳仪 (BIO - RAD); 水浴锅 (莱卡); 化学发光成像仪 (上海勤翔)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞分离与培养 取 SD 大鼠乳鼠 1 只, 体积分数 75% 乙醇充分浸泡后取膝关节内股骨和胫骨, 剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小, PBS 润洗 3 遍, 1 000 r/min 离心 1 min, 弃上清获得软骨沉淀; 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 下恒温培养消化; 加入含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 吹打悬液; 静置 2 min, 吸出上层液体, 加入 PBS 润洗, 静置 2 min 后吸出上层液体; 加入胶原酶, 吹打混匀后消化; 同上终止消化后吹打混匀后过滤, 获得含软骨细胞的悬浊液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入 PBS, 吹打混匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 2 次; 将细胞悬液转移至培养瓶中, 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 下培养, 隔天换液。贴壁细胞生长至 80%–90% 进行传代。

1.4.2 软骨细胞鉴定 采用免疫荧光染色法检测软骨细胞 II 型胶原表达。①将细胞铺板, 过夜贴壁后, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min; ② PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次; ③ 0.1% Triton 通透 10 min; ④ PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次; ⑤ 内源过氧化物酶灭活; 体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS 室温孵育 15 min; ⑥ PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次; ⑦ 5% FBS 封闭, 37 °C 30 min; ⑧ 一抗 II 型胶原 4 °C 孵育过夜; ⑨ PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次; ⑩ 二抗 CY3 标记山羊抗兔 IgG 37 °C 孵育 1 h; ⑪ PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次; ⑫ Hoechst 室温孵育 15 min; ⑬ PBS 漂洗 5 min; ⑭ 封固, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.3 YAP1-siRNA 的转染 取对数期软骨细胞, 接种于 6 孔培养板中, 每孔接种细胞浓度为 2×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 每孔 1 mL, 分 5 组, 分别为空白组、siRNA NC 组、YAP1 siRNA1 组、YAP1 siRNA2 组、YAP1 siRNA3 组, 空白组细胞常规培养, 其余 4 组转染对应的 siRNA。

转染方法: 转染 siRNA 敲降序列, 配制 A 液和 B 液, A 液: 用不含血清的空 DMEM 高糖培养基 150 μL 与 9 μL 的 Lipofectamine® RNAi MAX Reagent 混匀, 室温下孵育 5 min; B 液: 用不含血清的 DMEM 高糖培养基 150 μL 与 30 pmol siRNA NC 或 YAP1-siRNA 于室温下混匀, 孵育 5 min; 将 A、B 两液混匀加入到 6 孔板中, 37 °C 下培养 4–6 h; 补液, 继续培养 48 h, 行 RT-qPCR 检测 YAP1 mRNA 表达以筛选最佳靶序列。YAP1-siRNA 由北京欧林格设计并合成, 见表 1。

表 1 | YAP1-siRNA 靶序列  
Table 1 | Target sequences of YAP1-siRNAs

基因		序列 (5'-3')
YAP1-siRNA1	正义链	CCA CCA AGU UAG AUA AAG ATT
	反义链	UCU UUA UCU AAC UUG GUG GTT
YAP1-siRNA2	正义链	GGU CAG AGA UAC UUC UUA ATT
	反义链	UUA AGA AGU AUC UCU GAC CTT
YAP1-siRNA3	正义链	GGA GAA GUU UAC UAC AUA ATT
	反义链	UUA UGU AGU AAA CUU CUC CTT

1.4.4 软骨细胞分组干预 取对数生长期的软骨细胞, 调整细胞浓度为 3×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 过夜贴壁培养后, 分 5 组处理: 空白组常规培养, 模型组加入 100 μg/L 白细胞介素 1β 诱导软骨细胞炎性损伤, 黄芪甲苷组加入 100 μg/L 白细胞介素 1β+200 μmol/L 黄芪甲苷, NC-siRNA 组转染 NC-siRNA+100 μg/L 白细胞介素 1β+200 μmol/L 黄芪甲苷, YAP1-siRNA 转染组转染 YAP1-siRNA+100 μg/L 白细胞介素 1β+200 μmol/L 黄芪甲苷。后 2 组均是先进行 siRNA 转染, 然后同时再加入 2 种药物。转染 48 h 后进行后续检测。

#### 1.5 主要观察指标

1.5.1 MTT 检测细胞活力情况 48 h 后, 镜下观察细胞状态; 每孔加入 15 μL MTT, 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 下避光孵育 4 h; 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 轻微振荡 10 min; 酶标仪 492 nm 波长测出吸光度值并进行分析。细胞相对活力 = 实验组吸光度值 / 空白组吸光度值 × 100%。

1.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况 48 h 后, 收集细胞, PBS 清洗 3 次, 胰蛋白酶消化后收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞; 用预冷 1×PBS 重悬细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤细胞; 加入 300 μL 的 1×Binding Buffer, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 标记, 避光, 室温下孵育 10 min; 上流式细胞仪检测并进行分析。

1.5.3 RT-qPCR 检测 细胞培养 48 h 后, 利用 RT-qPCR 检测金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1、TEAD1、YAP1 mRNA 表达。

采用 Trizol 法提取各组总 mRNA, 应用反转录试剂盒合成 cDNA, 加入 PCR 引物对样本中特定基因序列进行扩增。RT-qPCR 所使用的的引物由上海生工合成, GAPDH 为内参。扩增条件: 94 °C 10 min, 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析目的基因在空白组和各实验组之间的表达差异。引物序列见表 2。

表 2 | RT-qPCR 检测所用引物

Table 2 | Primers used for RT-qPCR

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
金属基质蛋白酶 1 正义链	CGC CTT CTA CAG AGG AGA CCA TA	77
金属基质蛋白酶 1 反义链	GTG GGA ATG TGT GAG CAA GTC	
组织金属蛋白酶抑制物 1 正义链	GGA GTT TCT CAT CGC	229
组织金属蛋白酶抑制物 1 反义链	CTT CTC AGA GCC CAT	
YAP1 正义链	CCA TAA GAA CAA GAC CAC ATC CT	202
YAP1 反义链	CCT CTC CTT CTC CAT CTG TAG C	
TEAD1 正义链	GAT TGA CAA CGA CGC	219
TEAD1 反义链	CTG GCA AGA ACC TGA	
GAPDH 正义链	ACG ACC CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA	185
GAPDH 反义链	GAC ATA CTC AGC ACC AGC ATC ACC CCA	

**1.5.4 Western Blot 检测** 48 h 后, 采用 Western Blot 检测金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1、II 型胶原、TEAD1、p-YAP1、YAP1 蛋白的表达。细胞样本中加入预冷的含有 PMSF 的 RIPA 裂解液充分裂解; 使用 SDS-PAGE 法分离蛋白质并转移至 PVDF 膜; 5% 的脱脂奶粉封闭后进行一抗、二抗孵育; 加入适量的 ECL 发光液后摄片。采用 ImageJ 测定条带灰度值, 以目的蛋白和内参 GAPDH 比值表示蛋白相对表达量。一抗及稀释比例: 金属基质蛋白酶 1(1 : 1 000); 组织金属蛋白酶抑制物 1(1 : 1 000); II 型胶原 (1 : 1 000); TEAD1(1 : 1 000); p-YAP1(1 : 1 000); YAP1(1 : 1 000); GAPDH(1 : 5 000)。二抗及稀释比例: 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1 : 1 000), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(1 : 1 000)。

**1.6 统计学分析** 数据采用 GraphPad Prism 9 进行分析。各组数据进行方差齐性检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。统计学方法已经广西中医药大学附属瑞康医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 软骨细胞鉴定结果** 免疫荧光染色结果显示, hocheist 染色后, 荧光显微镜下观测可见细胞核呈蓝色, 见图 1A; 软骨细胞分泌的 II 型胶原蛋白呈红色, 见图 1B, 合成后可见典型软骨细胞形态, 见图 1C, 可确定所分离、培养的细胞为软骨细胞。

**2.2 YAP1-siRNA 靶序列筛选** RT-qPCR 实验结果显示, 相比转染 siRNA-NC 组, 当各组软骨细胞分别转染 YAP1-siRNA1、2、3 后, YAP1 mRNA 表达均呈一定程度降低, 其中 YAP1-siRNA2 敲降靶基因效果最为显著, 见图 2, 由此选择 YAP1-siRNA2 序列用于后续实验。

**2.3 各组软骨细胞活力** 5 组细胞形态见图 3A。MTT 检测结果显示, 模型组细胞活力低于空白组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组细胞活力高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组与 siRNA-NC 组细胞活力比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), YAP1-siRNA 组细胞活力高于 siRNA-NC 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。

**2.4 各组软骨细胞凋亡情况** 流式细胞术结果显示, 模型组细胞凋亡率高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组细胞凋亡率低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪甲苷组与 siRNA-NC 组细胞凋亡率比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), YAP1-siRNA 组细胞凋亡率

低于 siRNA-NC 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

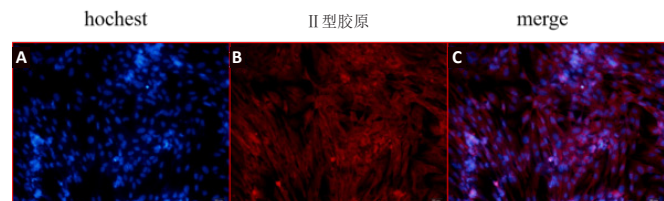
**2.5 各组软骨细胞相关基因表达情况** RT-qPCR 检测结果显示, 模型组金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 mRNA 表达高于空白组 ( $P < 0.05$ ), YAP1、TEAD1 mRNA 表达低于空白组 ( $P < 0.05$ ); 黄芪甲苷组 YAP1 mRNA 表达高于模型组 ( $P < 0.05$ ); YAP1-siRNA 组金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 mRNA 表达高于 NC-siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), YAP1、TEAD1 mRNA 表达低于 NC-siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

**2.6 各组软骨细胞相关蛋白表达情况** 模型组金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1、YAP1 蛋白表达高于空白组 ( $P < 0.05$ ), II 型胶原、TEAD1、p-YAP1 蛋白表达低于空白组 ( $P < 0.05$ ); YAP1-siRNA 组金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 蛋白表达高于 NC-siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), II 型胶原、TEAD1、p-YAP1 蛋白表达低于 NC-siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

## 3 讨论 Discussion

软骨细胞具有合成、分泌基质和 II 型胶原纤维等的作用, 保护软骨细胞的细胞正常功能是软骨修复的关键环节<sup>[21-23]</sup>。多项研究表明黄芪甲苷能减轻骨关节炎的病理改变, 恢复关节不稳诱导的小鼠膝关节骨关节炎的软骨厚度<sup>[18]</sup>, 提高早期骨关节炎软骨细胞存活率等<sup>[24]</sup>。此次实验通过 MTT 法和流式细胞术分别检测经分组处理后的软骨细胞的活力及凋亡情况, 发现经白细胞介素 1 $\beta$  处理后的软骨细胞凋亡率显著提高、细胞活力显著降低。对相关基因和蛋白的表达做进一步分析发现, 与白细胞介素 1 $\beta$  诱导后的炎性损伤软骨细胞相比, 加入黄芪甲苷后, 金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 呈下降趋势, 金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 主要反映细胞外基质的蛋白降解和组织重塑情况<sup>[25-27]</sup>; II 型胶原表达呈上升趋势。上述研究均表明, 黄芪甲苷对白细胞介素 1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎性损伤存在保护作用, 并且具有促 II 型胶原分泌、抑制软骨细胞外基质降解等功能, 表现出促软骨修复的潜力。

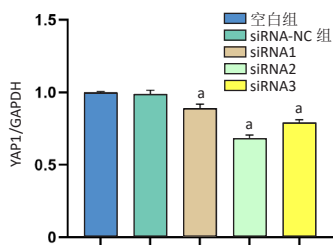
Hippo-YAP 通路在调节器官体积、组织再生、干细胞功能和肿瘤发生等具有重要作用<sup>[28-32]</sup>。在哺乳动物中, 该通路上游的膜蛋白还可以通过感受细胞外基质环境的变化, 通过级联反应促进下游因子 YAP 磷酸化 (p-YAP); p-YAP 与细胞骨架相互作用, 无法进入细胞核与 TEAD 结合, 进而影响其调节细胞成长、凋亡的功能<sup>[33]</sup>。此外, 一项基于液相色谱-质谱分析的定量蛋白质组学研究发现, 黄芪甲苷对白细胞介素 1 $\beta$  诱导的 SW1353 软骨肉瘤细胞炎性损伤的保护作用, 可能是由 Hippo-YAP 通路介导的<sup>[34]</sup>。而白细胞介素 1 $\beta$  可促进 YAP/TAZ 蛋白酶体途径的降解, 进而抑制 YAP 的转录活性<sup>[35]</sup>。此次实验发现, 与模型组相比, 加入黄芪甲苷后, 软骨细胞 YAP1 mRNA 及其蛋白表达显著上调, 且这种表达的上调伴随着细胞活力的增强、II 型胶原表达的上调及细胞凋亡率、金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 表达的下调, 表明 Hippo-YAP 通路可能参与到黄芪甲苷对炎性损伤软骨细



图注: hocheist 染色后可见细胞核呈蓝色 (A), 软骨细胞分泌的 II 型胶原蛋白呈红色 (B), 合成后可见典型软骨细胞形态 (C)。标尺 =20 μm

图 1 | 软骨细胞鉴定结果 (免疫荧光染色)

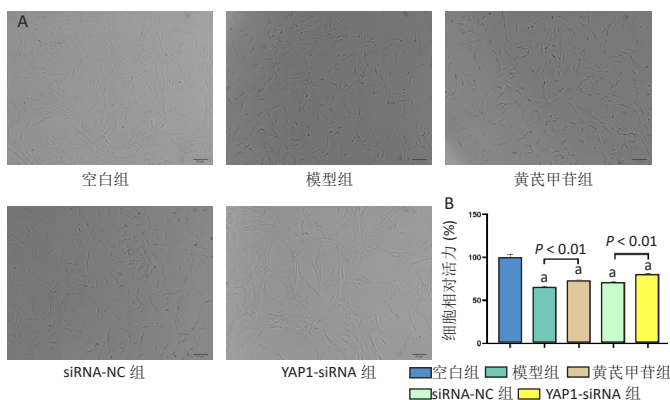
Figure 1 | Chondrocyte identification (immunofluorescent staining)



图注: 与 siRNA-NC 组比较,  $^aP \leq 0.01$

图 2 | YAP1-siRNA 靶序列的筛选

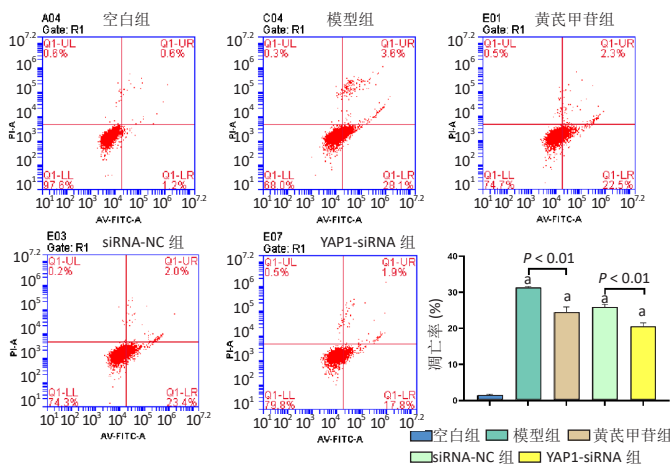
Figure 2 | Screening of YAP1-siRNA target sequences



图注: A 为细胞形态; B 为细胞活力, 与空白组比较,  $^aP \leq 0.01$

图 3 | 各组软骨细胞形态与活力

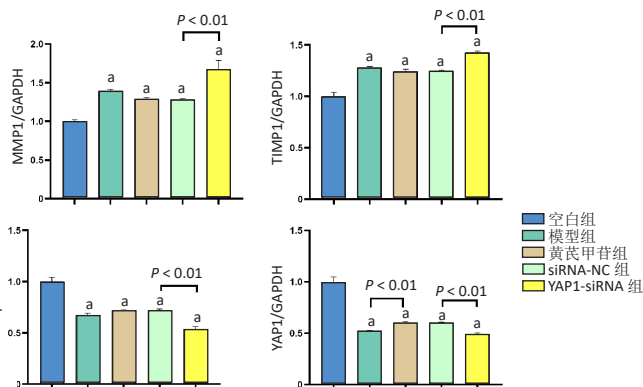
Figure 3 | Chondrocyte morphology and viability



图注: 与空白组比较,  $^aP \leq 0.01$

图 4 | 各组软骨细胞凋亡检测结果

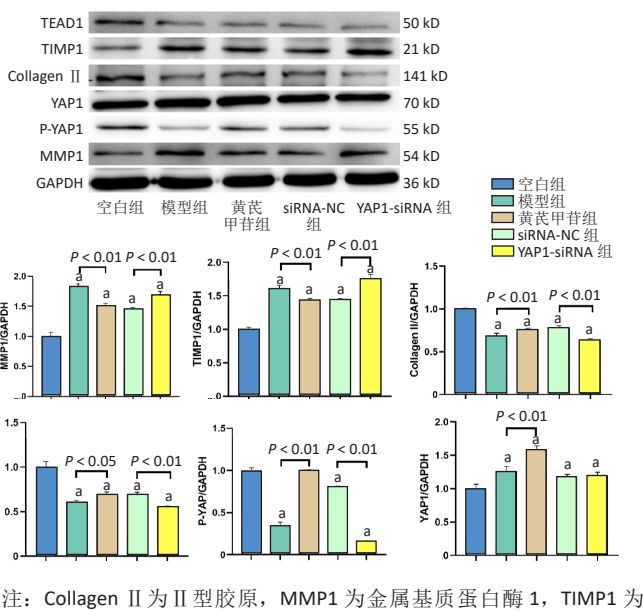
Figure 4 | Apoptosis of chondrocytes



图注: MMP1 为金属基质蛋白酶 1, TIMP1 为组织金属蛋白酶抑制物 1。与空白组比较,  $^aP \leq 0.01$

图 5 | 各组软骨细胞相关基因检测结果

Figure 5 | Relative gene detection in chondrocytes



图注: Collagen II 为 II 型胶原, MMP1 为金属基质蛋白酶 1, TIMP1 为组织金属蛋白酶抑制物 1。与空白组比较,  $^aP \leq 0.01$

图 6 | 各组软骨细胞相关蛋白检测结果

Figure 6 | Relative protein detection in chondrocytes

胞的保护中。值得注意的是,在黄芪甲苷作用下,软骨细胞 YAP1 蛋白及其磷酸化水平均显著提高,可以明确黄芪甲苷作用于 Hippo-YAP 通路后对其下游的 YAP1 有显著的调节作用,但 p-YAP1 变化更显著,表明黄芪甲苷的调控作用并不在于单纯改变 YAP1 的磷酸化水平,具体作用机制仍需做更深入研究。此外,此次实验还发现,白细胞介素 1 $\beta$  诱导后软骨细胞 YAP1 mRNA 表达显著下调,而 YAP1 蛋白表达上调、其磷酸化产物 p-YAP1 蛋白表达显著下调,最终表现为 p-YAP1/YAP1 水平的降低,这可能是细胞抵抗外界损伤的一种自我保护机制,受损的软骨细胞倾向于通过维持 YAP1 的非磷酸化、降低 YAP1 的磷酸化水平,进而发挥保护软骨细胞的作用。这需要进一步对 p-YAP1、YAP1 作定量分析以进行更深入讨论。

此次实验还对 YAP1 进行敲降,与 siRNA NC 组相比, YAP1-siRNA 组软骨细胞的细胞活力显著提高,金属基质蛋白酶 1、组织金属蛋白酶抑制物 1 水平上调,细胞凋亡率显著



降低, YAP1、TEAD mRNA 及 YAP1、p-YAP1、TEAD 蛋白表达下调, 特别是 p-YAP1/YAP1 水平显著降低, 这表明在 YAP1 低表达的情况下, 更倾向于维持非磷酸化 YAP1 的稳定而促进 p-YAP1 的去磷酸化。至于细胞活力提高而凋亡率降低, 作者考虑黄芪甲苷促进了 YAP1 mRNA 的表达, 同时提高了 YAP1 及其磷酸化产物的水平, 使得 siRNA NC 组 p-YAP1 水平高于 YAP1-siRNA 组, p-YAP1 除无法入核与 TEAD 结合外, 还可能与低水平的去磷酸化 YAP1 无法拮抗 NF- $\kappa$ B 等涉及多通路的因素相关, 这需要开展更多研究以确定其具体机制。

此次实验初步验证黄芪甲苷对白细胞介素 1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎性损伤存在保护作用, 且这种作用可能与 Hippo-YAP 通路相关, 为进一步探讨黄芪甲苷干预骨关节炎软骨损伤病理过程提供了实验依据, 同时也对相关作用机制的研究作出展望, 以期为未来靶向研究中医药治疗骨关节炎等疾病提供研究基础。

**作者贡献:** 廖建钊、杨楠进行实验设计, 实验实施为廖建钊、周毅、许航, 实验评估为夏天, 资料收集及数据处理为宋世雷、曾麒, 廖建钊成文, 陈跃平审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南 [J]. 中华骨科杂志, 2018,38(12):705-715.
- [2] SAFIRI S, KOLAHI AA, SMITH E, et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):819-828.
- [3] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心 (湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18):1291-1314.
- [4] ZHANG JF, SONG LH, WEI JN, et al. Prevalence of and risk factors for the occurrence of symptomatic osteoarthritis in rural regions of Shanxi Province, China. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(8):781-789.
- [5] ABRAMOFF B, CALDERA FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020;104(2):293-311.
- [6] LUO Y, SINKEVICIUTE D, HE Y, et al. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell.* 2017;8(8):560-572.
- [7] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019; 393(10182):1745-1759.
- [8] MOYA IM, HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):211-226.
- [9] WANG S, ZHOU L, LING L, et al. The Crosstalk Between Hippo-YAP Pathway and Innate Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:323.
- [10] IBAR C, IRVINE KD. Integration of Hippo-YAP Signaling with Metabolism. *Dev Cell.* 2020;54(2):256-267.
- [11] CHUANG LSH, ITO Y. The Multiple Interactions of RUNX with the Hippo-YAP Pathway. *Cells.* 2021;10(11):2925.
- [12] 袁永刚. Yes 相关蛋白 (YAP) 通过细胞外基质力学调节非小细胞肺癌生长的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.

- [13] DENG Y, LU J, LI W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- $\kappa$ B regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4564.
- [14] WANG F, QIAN H, KONG L, et al. Accelerated Bone Regeneration by Astragaloside IV through Stimulating the Coupling of Osteogenesis and Angiogenesis. *Int J Biol Sci.* 2021;17(7):1821-1836.
- [15] JIANG C, ZHOU Z, LIN Y, et al. Astragaloside IV ameliorates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by repolarizing the phenotype of pro-inflammatory macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2021;93:107345.
- [16] LI M, WANG W, GENG L, et al. Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of the ERK signaling pathway by astragaloside IV and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *Int J Mol Med.* 2015;36(5):1335-1344.
- [17] HAN J, SHEN X, ZHANG Y, et al. Astragaloside IV suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in glioma U251 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(7):1345-1352.
- [18] 赵永见, 薛纯纯, 王利波, 等. 黄芪甲苷对关节不稳诱导型小鼠膝骨关节炎的保护作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015,21(6):668-670.
- [19] 余素姣, 谭慧. 黄芪甲苷通过炎症小体活化影响软骨细胞炎性因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2019,23(11):1652-1656.
- [20] LIU J, MENG Q, JING H, et al. Astragaloside IV protects against apoptosis in human degenerative chondrocytes through autophagy activation. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):3269-3275.
- [21] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, et al. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res Rev.* 2017;40:20-30.
- [22] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol.* 2019;165:49-65.
- [23] YANG Y, LIN H, SHEN H, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* 2018;69:71-82.
- [24] 刘建红, 孟庆刚, 胡佳卉, 等. 黄芪甲苷对早期骨关节炎软骨细胞基质金属蛋白酶-1 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017,37(3):532-534.
- [25] CUI N, HU M, KHALIL RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.
- [26] TOMASZEWSKA E, RUDYK H, ŚWIETLIĆKA I, et al. Trabecular Bone Parameters, TIMP-2, MMP-8, MMP-13, VEGF Expression and Immunolocalization in Bone and Cartilage in Newborn Offspring Prenatally Exposed to Fumonisin. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12528.
- [27] SAW S, AIKEN A, FANG H, et al. Metalloprotease inhibitor TIMP proteins control FGF-2 bioavailability and regulate skeletal growth. *J Cell Biol.* 2019;218(9):3134-3152.
- [28] AHARONOV A, SHAKKED A, UMANSKY KB, et al. ERBB2 drives YAP activation and EMT-like processes during cardiac regeneration. *Nat Cell Biol.* 2020;22(11):1346-1356.
- [29] WANG J, LIU S, HEALLEN T, et al. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(11):672-684.
- [30] SUN X, REN Z, CUN Y, et al. Hippo-YAP signaling controls lineage differentiation of mouse embryonic stem cells through modulating the formation of super-enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(13):7182-7196.
- [31] LI C, JIN Y, WEI S, et al. Hippo Signaling Controls NLR Family Pyrin Domain Containing 3 Activation and Governs Immunoregulation of Mesenchymal Stem Cells in Mouse Liver Injury. *Hepatology.* 2019;70(5):1714-1731.
- [32] ZHOU X, LI Y, WANG W, et al. Regulation of Hippo/YAP signaling and Esophageal Squamous Carcinoma progression by an E3 ubiquitin ligase PARK2. *Theranostics.* 2020;10(21):9443-9457.
- [33] LIU H, DU S, LEI T, et al. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review). *Oncol Rep.* 2018;40(1):16-28.
- [34] LUO H, YAO L, ZHANG Y, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics analysis reveals chondroprotective effects of astragaloside IV in interleukin-1 $\beta$ -induced SW1353 chondrocyte-like cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:796-802.
- [35] WANG L, WANG S, SHI Y, et al. YAP and TAZ protect against white adipocyte cell death during obesity. *Nat Commun.* 2020;11(1):5455.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)