

# 橙皮素抑制氧化应激影响软骨细胞的炎性退变

罗善超<sup>1,2</sup>, 唐继仁<sup>2</sup>

<https://doi.org/10.12307/2024.460>

投稿日期: 2023-07-24

采用日期: 2023-09-04

修回日期: 2023-09-16

在线日期: 2023-09-25

中图分类号:

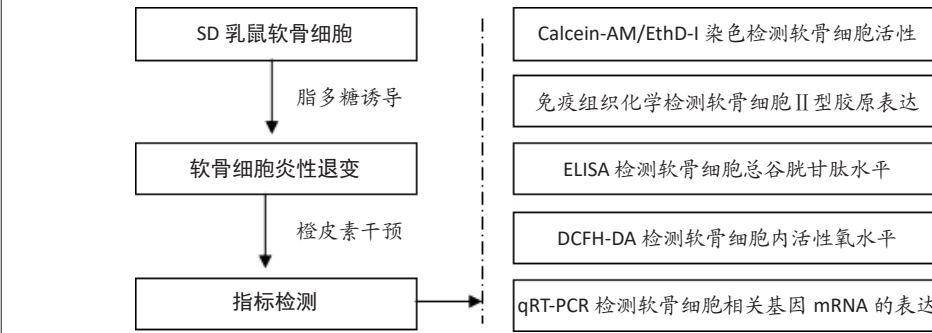
R459.9; R318; R684.3

文章编号:

2095-4344(2024)26-04184-05

文献标识码: A

文章快速阅读: 橙皮素抑制氧化应激保护脂多糖诱导的软骨细胞炎性退变



文题释义:

骨关节炎: 是由多因素导致的骨科常见的关节疾病, 关节软骨的退行性改变是主要的病理特点, 经常累及负重和活动多的膝关节、髋关节等部位。全球65岁以上人群超过一半为骨关节炎患者, 严重危害中老年人健康。

橙皮素: 是一类天然黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和心血管保护作用等一系列重要功能, 具有极高的药用价值及研究价值。

摘要

背景: 研究表明, 橙皮素可以通过多种机制或者信号通路对软骨细胞产生保护作用, 但其保护机制尚未完全阐明。

目的: 探讨橙皮素对脂多糖诱导的软骨细胞炎性退变的影响。

方法: 体外提取、培养SD乳鼠关节软骨细胞, 采用番红O染色鉴定。通过MTT法检测细胞毒性确定最佳橙皮素干预浓度。将软骨细胞随机分为3组: 对照组、模型组和实验组, 后2组采用脂多糖诱导软骨细胞建立骨关节炎细胞模型, 实验组造模后给予橙皮素干预24 h。采用Calcein-AM/EthD-I染色检测细胞活性, 免疫组化染色检测软骨特异性II型胶原的表达, 活性氧检测试剂盒检测软骨细胞内活性氧水平, ELISA检测软骨细胞内抗氧化剂总谷胱甘肽水平, qRT-PCR检测炎症基因白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和软骨特异性基因II型胶原基因的表达。

结果与结论: ①番红O染色结果表明, 提取的细胞为软骨细胞; ②细胞毒性实验表明0.5  $\mu$ mol/L橙皮素干预软骨细胞活力最明显; ③与对照组比较, 模型组软骨细胞增殖能力降低, 活性氧水平升高, 总谷胱甘肽水平下降, II型胶原降解增加, 白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因表达水平升高, 软骨特异性II型胶原基因表达水平下降, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ); ④与模型组比较, 实验组软骨细胞增殖能力上升, 活性氧水平下降, 总谷胱甘肽水平上升, II型胶原降解减少, 白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因表达水平下降, 软骨特异性II型胶原基因表达水平升高( $P < 0.05$ )。结果表明: 橙皮素对脂多糖诱导的骨关节炎软骨细胞炎性退变具有保护作用, 其机制可能与橙皮素抑制活性氧诱导的氧化应激有关。

关键词: 软骨细胞; 橙皮素; 活性氧; 氧化应激; 炎症; 软骨退变

## Effect of hesperetin on inflammatory degeneration of chondrocytes by inhibiting oxidative stress

Luo Shanchao<sup>1,2</sup>, Tang Jiren<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Yulin Orthopedic Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yulin 537000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Luo Shanchao, MD, Chief physician, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; Yulin Orthopedic Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yulin 537000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Tang Jiren, Chief physician, Yulin Orthopedic Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yulin 537000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that hesperetin exerts protective effects on chondrocytes through a variety of mechanisms or signaling pathways, but the protective mechanisms have not been fully elucidated.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of hesperetin on lipopolysaccharide-induced inflammatory degeneration of chondrocytes.

<sup>1</sup>广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市 530011; <sup>2</sup>玉林市中西医结合骨科医院, 广西壮族自治区玉林市 537000

第一作者: 罗善超, 男, 1980年生, 广西壮族自治区玉林市人, 汉族, 2017年广西医科大学毕业, 博士, 主任医师, 主要从事关节外科和创伤骨科的基础与临床研究。

通讯作者: 唐继仁, 主任医师, 玉林市中西医结合骨科医院, 广西壮族自治区玉林市 537000

<https://orcid.org/0000-0001-5980-0035> (罗善超)

基金资助: 广西自然科学基金资助项目 (2019GXNSFAA185060), 项目参与人: 罗善超

引用本文: 罗善超, 唐继仁. 橙皮素抑制氧化应激影响软骨细胞的炎性退变 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26):4184-4188.



**METHODS:** Knee joint chondrocytes from suckling Sprague-Dawley rats were isolated and cultured *in vitro*, and identified by Safranin O staining. The cytotoxicity of hesperetin on chondrocytes was determined by the MTT assay to ensure the optimal concentration of hesperetin. Chondrocytes were randomly divided into three groups, including the control group, model group, and experimental group. The cellular model of osteoarthritis was established in the latter two groups by simulating chondrocytes with lipopolysaccharide. Chondrocytes in the experimental group was then intervened with hesperetin for 24 hours. Calcein-AM/EthD-I staining was used to detect cell viability. Immunohistochemical staining was performed to determine the expression of type II collagen in chondrocytes. Intracellular reactive oxygen species level was detected by a reactive oxygen species detection kit. Total glutathione level was detected by ELISA. Real-time fluorescent PCR was employed to detect the expression of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and type II collagen.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Safranin O staining results showed that the cells extracted were chondrocytes. Cytotoxicity test results showed 0.5  $\mu\text{mol/L}$  hesperetin had the most significant effect on chondrocyte vitality. Compared with the control group, the model group showed a decrease in chondrocyte proliferation ability, an increase in reactive oxygen species levels, a decrease in total glutathione levels, an increase in type II collagen degradation, an increase in the levels of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, and tumor necrosis factor  $\alpha$ , and a decrease in the expression of type II collagen ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, in the experimental group, the proliferation ability of chondrocytes increased, reactive oxygen species levels decreased, total glutathione levels increased, and type II collagen degradation decreased, levels of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  downregulated, and the expression of type II collagen upregulated ( $P < 0.05$ ). To conclude, hesperetin has a protective effect on lipopolysaccharide-induced inflammatory degeneration of osteoarthritic chondrocytes, and the mechanism may be associated with inhibition of reactive oxygen species-mediated oxidative stress.

**Key words:** chondrocyte; hesperetin; reactive oxygen species; oxidative stress; inflammation; cartilage degeneration

**Funding:** Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2019GXNSFAA185060 (to LSC [project participant])

**How to cite this article:** LUO SC, TANG JR. Effect of hesperetin on inflammatory degeneration of chondrocytes by inhibiting oxidative stress. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(26):4184-4188.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎的重要特征是进行性软骨退变和炎症反应<sup>[1-2]</sup>。炎症递质过度表达及氧化应激等是导致骨关节炎发展的主要原因。活性氧是一类具有高氧化活性物质的统称,包括过氧化氢、羟基自由基、单线态氧和超氧阴离子等,参与多种生理和病理过程<sup>[3-4]</sup>。在病理状态下,活性氧的产生超过细胞抗氧化作用的调节范围时可以导致细胞氧化应激,从而促进多种病理进程的发生发展<sup>[5-8]</sup>。研究发现,活性氧引起的氧化应激是导致软骨细胞炎症损伤的主要原因<sup>[9-11]</sup>。作为中药化学成分的黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗癌等药理作用。橙皮素是一类天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎症反应、抗衰老等一系列重要功能<sup>[12-14]</sup>。但是,橙皮素是通过哪些机制保护骨关节炎软骨细胞损伤尚未完全阐明。因此,该实验旨在探索橙皮素是否可以通过抑制活性氧介导的氧化应激减轻骨关节炎模型软骨细胞炎症反应和软骨退变。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞学实验,两组间的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2019 年 10 月至 2020 年 10 月在广西医科大学完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠乳鼠, SPF 级, 3 d 龄, 体质量 10–12 g, 购自广西医科大学实验动物中心, 许可证号: SYXK 桂 2020-0004。该研究已通过玉林市中西医结合骨科医院伦理委员会审批, 批准号: 20200315。

**1.3.2 化学品和试剂** 橙皮素 (纯度  $\geq 95\%$ ) (上海源叶生物, 中国); 脂多糖、II 型胶原酶 (Sigma, 美国); 钙黄绿素 / 乙锭均二聚物 (Calcein-AM/EthD-I) 试剂 (百奥莱博, 中国); 胎牛血清、青霉素 / 链霉素、DMEM 培养基 (Gibco, 美国); 胰蛋白酶 (Solarbio, 中国); 蛋白酶 K (Boster, 中国); II 型胶原一抗、FITC 免疫荧光抗体 (博士德, 美国); 总 RNA 提取试剂盒、番红 O 染色试剂盒 (Solarbio, 中国); 免疫组织

化学试剂 (中山市金桥生物科技有限公司, 中国); MTT (98%, Reagent grade)、活性氧检测试剂盒、总谷胱甘肽检测试剂盒 (碧云天, 中国); 反转录试剂盒 (Fermentas Company, 美国); 引物 (金开瑞, 中国); 所有其他化学品均为试剂级。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 关节软骨细胞的分离、培养和鉴定** 用过量戊巴比妥钠处死 3 d 龄 SD 乳鼠, 用体积分数 75% 乙醇消毒。收获膝关节软骨, 将软骨剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 首先用 0.25% 胰蛋白酶处理 30 min, 然后用 II 型胶原酶 (2 mg/mL) 处理 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min 收集软骨细胞, 用含 1% 青霉素 / 链霉素和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 每两三天更换 1 次培养液, 细胞融合度约为 80% 时进行传代, 第 3 代细胞用于后续研究。番红 O 染色鉴定软骨细胞。

**1.4.2 MTT 法检测细胞毒性** 收集对数生长期的第 3 代软骨细胞, 按照 5 000 个 / 孔接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后, 将培养液替换为含不同浓度 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{mol/L}$ ) 橙皮素的新鲜培养液, 继续培养 24 h, 弃去旧培养液, 更换为新的培养液, 添加 MTT 试剂 (10  $\mu\text{L}$  / 孔) 并放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内, 4 h 后弃去培养液, 加入二甲亚砜 (100  $\mu\text{L}$  / 孔) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下避光反应 15 min, 用酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度值。细胞增殖率 = [(实验组吸光度值 - 空白调零孔吸光度值) / (对照组吸光度值 - 空白调零孔吸光度值)]  $\times 100\%$ 。根据细胞毒性实验结果选择后续实验橙皮素的浓度。

**1.4.3 软骨细胞分组及处理** 软骨细胞培养至第 3 代, 随机分组如下: ①对照组: 用 DMEM 培养液培养细胞; ②模型组: 用含 10  $\mu\text{g/mL}$  脂多糖的 DMEM 完全培养液诱导软骨细胞损伤; ③实验组: 用含 10  $\mu\text{g/mL}$  脂多糖的 DMEM 完全培养液诱导软骨细胞损伤, 1 h 后更换含 0.5  $\mu\text{mol/L}$  橙皮素的 DMEM 培养液培养 24 h。

**1.4.4 Calcein-AM/EthD-I 染色检测软骨细胞活性** 将第 3 代软骨细胞接种到 24 孔板中 (2  $\times 10^4$  个 / 孔), 细胞融合至 80%–90% 时, 按上述 1.4.3 软骨细胞分组和处理后, PBS 洗涤 3 次, 加入 0.05% Calcein-AM 和 0.2% EthD-I 染色试剂,

37 °C 下避光处理 5 min, PBS 清洗去除染色试剂, 荧光显微镜观察、拍照, 用 Image J 软件统计活细胞和死细胞数目, 计算细胞增殖率。

**1.4.5 免疫组织化学检测软骨细胞 II 型胶原的表达** 根据说明书采用免疫组化染色检测软骨特异性 II 型胶原的表达。将第 3 代软骨细胞接种到 6 孔板中 ( $2 \times 10^5$  个 / 孔), 待细胞融合度达到 80%–90% 时, 按上述 1.4.3 软骨细胞分组和处理后, 用体积分数 4% 甲醛溶液固定 30 min, 用 0.3% Triton X-100 渗透 10 min, 在 25 °C 下用 5% BSA 阻断 15 min, 添加 II 型胶原一抗 (1 : 200 稀释), 在 4 °C 下孵育过夜, 在室温下依次添加二抗 (羊抗兔 1 : 200) 和生物素标记的辣根过氧化物酶避光孵育 1 h, 然后加入二氨基苯胺显色, 苏木精复染, 乙醇逐级脱水, 中性胶封固, 荧光显微镜观察。

**1.4.6 DCFH-DA 检测软骨细胞内活性氧水平** 使用活性氧测定试剂盒分析软骨细胞内活性氧水平。将第 3 代软骨细胞接种到 6 孔板中 ( $2 \times 10^5$  个 / 孔), 待细胞融合度达到 80%–90% 时, 按上述 1.4.3 软骨细胞分组和处理后, 将样品与 DCFH-DA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 探针共同培养 30 min, PBS 洗涤 3 次, 使用酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测量 488 nm 激发和 525 nm 发射的荧光强度来检测细胞内活性氧水平。

**1.4.7 ELISA 试剂盒检测软骨细胞总谷胱甘肽水平** 通过总谷胱甘肽检测试剂盒检测软骨细胞中抗氧化剂总谷胱甘肽水平。将第 3 代软骨细胞接种到 6 孔板中 ( $2 \times 10^5$  个 / 孔), 待细胞融合度达到 80%–90% 时, 按上述 1.4.3 软骨细胞分组和处理后, PBS 洗涤 3 次, 离心和收集细胞, 弃去上清, 加入蛋白去除试剂 S, 液氮和 37 °C 水浴快速冻融样品 2 次, 在 4 °C 下低温离心 (10 000 $\times g$ ) 10 min, 收集上清用于 ELISA 检测总谷胱甘肽水平。

**1.4.8 qRT-PCR 检测软骨细胞相关基因 mRNA 的表达水平** 将第 3 代软骨细胞接种到 6 孔板中 ( $2 \times 10^5$  个 / 孔), 待细胞融合度达 80%–90% 时, 按上述 1.4.3 软骨细胞分组和处理后, 提取各组细胞 RNA, 反转录为 cDNA, LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 进行 qPCR 反应, 以 GAPDH 为内参, 检测基因白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和 II 型胶原的表达。引物序列见表 1。通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量。

表 1 | RT-PCR 引物序列  
Table 1 | Primers sequence for RT-PCR

基因	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')
GAPDH	CAC GAC ATA CTC AGC ACC AG	TCC AGT ATG ACT CTA CCC ACG
白细胞介素 1 $\beta$	GCA CAG TTC CCC AAC TGG TA	GGA GAC TGC CCA TTC TCG AC
白细胞介素 6	ACA AGT CCG GAG GAG ACT	ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC
肿瘤坏死因子 $\alpha$	GAC CAC GTA GCC GTG TTC AG	GGG CTC CAC ATT GCA GAG AA
II 型胶原	GTC CTA CAA TGT CAG GGC CA	ACC CCT CTC TCC CTT GTC AC

**1.5 主要观察指标** ①软骨细胞培养及鉴定结果; ②软骨细胞活性; ③软骨细胞内 II 型胶原的表达; ④软骨细胞内活性氧和总谷胱甘肽水平; ⑤软骨细胞相关基因 mRNA 的表达水平。

**1.6 统计学分析** 采用 Graphpad prism 6.0 统计分析软件对实验数据进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 组间重比较采用 Tukey's 法,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。统计学方法已经通过广西医科大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 软骨细胞的鉴定结果** 番红 O 染色后碱性染料与细胞蛋白多糖结合, 使细胞变为红色, 细胞具有分泌蛋白多糖的功能, 表明是软骨细胞, 见图 1。

**2.2 橙皮素对软骨细胞的细胞毒性作用** 用梯度浓度的橙皮素 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理对数生长期的软骨细胞 24 h, 通过 MTT 法检测橙皮素对软骨细胞的细胞毒性。由图 2 可见, 与对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$ ) 相比, 橙皮素在 0.125–2.0  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内对软骨细胞没有显著的细胞毒性。当浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞活力最佳。然而, 当橙皮素浓度为 2.0–8.0  $\mu\text{mol/L}$  时, 软骨细胞的活力呈下降趋势。因此, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  被认为是干预骨关节炎软骨细胞的橙皮素最佳浓度, 并选择此浓度为橙皮素的工作浓度。

**2.3 橙皮素促进骨关节炎软骨细胞的增殖** 通过 Calcein-AM/EthD- I 染色检测橙皮素对细胞活力的影响。由图 3 可见, 与对照组相比, 模型组死细胞增多、活细胞减少 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 实验组活细胞增多、死细胞减少 ( $P < 0.05$ )。说明橙皮素对体外培养的骨关节炎软骨细胞生长有促进作用。

**2.4 橙皮素抑制骨关节炎软骨细胞 II 型胶原降解** 采用免疫组织化学方法检测骨关节炎大鼠软骨细胞中 II 型胶原的沉积情况。软骨细胞经过 II 型胶原免疫组织化学染色后, 胞浆区染色为棕黄色, 由图 4 可见, 与对照组相比, 模型组软骨细胞的 II 型胶原阳性染色明显减少 ( $P < 0.05$ ); 然而橙皮素干预的实验组软骨细胞的 II 型胶原阳性染色较模型组增加 ( $P < 0.05$ )。

**2.5 橙皮素抑制骨关节炎软骨细胞内活性氧水平** 使用活性氧测定试剂盒分析各组软骨细胞内活性氧水平。由图 5 可见, 与对照组相比, 模型组软骨细胞的活性氧水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 而橙皮素干预的实验组软骨细胞的活性氧水平较模型组降低 ( $P < 0.05$ )。

**2.6 橙皮素增加骨关节炎软骨细胞的总谷胱甘肽水平** 由图 6 可见, 与对照组相比, 模型组软骨细胞的总谷胱甘肽水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而实验组软骨细胞的总谷胱甘肽水平较模型组升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 橙皮素抑制了脂多糖诱导骨关节炎软骨细胞的氧化应激。

**2.7 软骨细胞特异性基因及炎症相关基因的表达** 由图 7 可见, 与对照组相比, 模型组软骨细胞的白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因表达均显著升高, II 型胶原基因表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 实验组软骨细胞的白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因表达均明显降低, II 型胶原基因表达升高 ( $P < 0.05$ )。

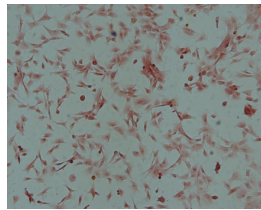


图1 | SD大鼠软骨细胞的鉴定(番红O染色, ×100)  
Figure 1 | Identification of Sprague-Dawley rat chondrocytes (Safranin O staining, ×100)

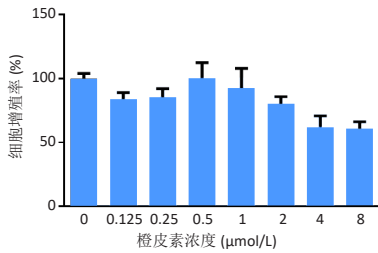
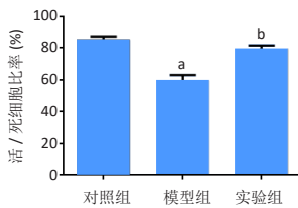
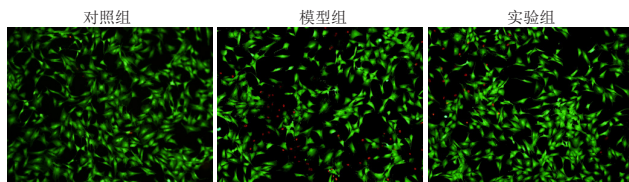
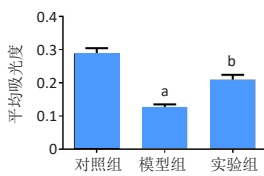
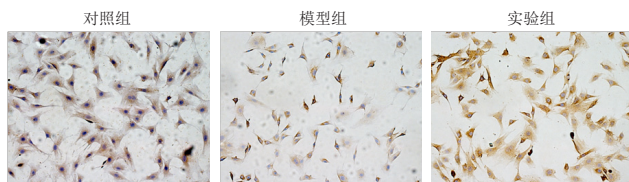


图2 | MTT检测橙皮素对软骨细胞的毒性作用  
Figure 2 | Cytotoxic effect of hesperetin on chondrocytes detected by MTT assay



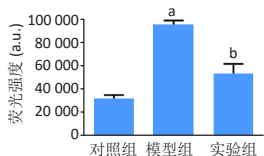
图注: 荧光染色图放大100倍。与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

图3 | Calcein-AM/EthD-I染色检测橙皮素对软骨细胞活力的影响  
Figure 3 | Effect of hesperetin on the cell viability of chondrocytes detected by Calcein-AM/EthD-I staining



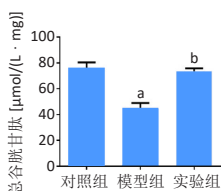
图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

图4 | 软骨细胞II型胶原免疫组化染色(×100)  
Figure 4 | Immunohistochemical staining of type II collagen in chondrocytes (×100)



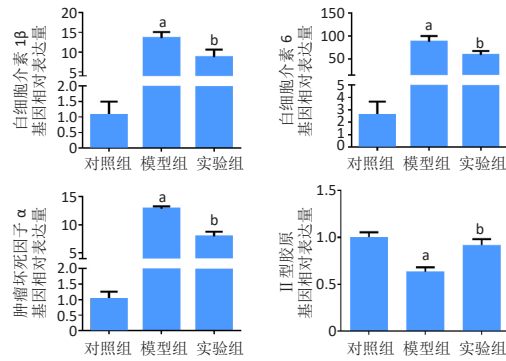
图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

图5 | DCFH-DA检测软骨细胞内活性氧水平  
Figure 5 | Levels of intracellular reactive oxygen species in chondrocytes detected by DCFH-DA



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

图6 | ELISA试剂盒检测软骨细胞内总谷胱甘肽水平  
Figure 6 | Levels of total glutathione in chondrocytes detected by ELISA



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

图7 | 软骨细胞相关基因 mRNA 的表达  
Figure 7 | mRNA expression of related genes in chondrocytes

### 3 讨论 Discussion

目前, 骨关节炎的药物治疗主要包括镇痛和抗炎药物、关节内注射透明质酸等。然而, 这些药物的作用是暂时的, 并不能缓解或阻止骨关节炎的发展, 疾病晚期需要进行关节置换手术治疗。因此, 迫切需要寻找新的潜在的药物来缓解、延缓或逆转骨关节炎的发展。橙皮素是一种天然黄酮类物质, 具有多种药理作用, 如抗肿瘤作用<sup>[15-16]</sup>、抗炎作用<sup>[17]</sup>、抗糖尿病<sup>[18-19]</sup>、抗氧化作用<sup>[20]</sup>。白细胞介素1β、白细胞介素6和肿瘤坏死因子α在骨关节炎软骨损伤中具有重要作用, 可以导致软骨分解。该研究显示, 橙皮素可以抑制骨关节炎软骨细胞炎症基因白细胞介素1β、白细胞介素6和肿瘤坏死因子α的表达, 也缓解了脂多糖对软骨细胞增殖的抑制作用。这些结果表明, 橙皮素对脂多糖诱导的骨关节炎软骨细胞具有显著的保护和抗炎作用。

活性氧的产生对于正常的细胞信号通路至关重要, 但是过量产生的活性氧可以激活氧化应激并超越细胞抗氧化防御机制, 从而导致细胞损伤。研究发现, 香叶木素可激活YAP信号通路, 进而抑制活性氧水平而减轻高糖诱导的血管内皮细胞损伤<sup>[21]</sup>; 具有过氧化氢酶和超氧化物歧化酶样活性的纳米酶(PtCuSe纳米酶)可以通过级联清除活性氧减轻帕金森病动物模型神经细胞损伤<sup>[22]</sup>。骨关节炎患者表现出相对较高的活性氧水平和较低的抗氧化活性, 抑制活性氧过量产生和增加抗氧化活性可能是缓解骨关节炎的有效策略。王旭东等<sup>[23]</sup>研究发现, 脂多糖可以诱导软骨细胞活性氧增加、超氧化物歧化酶活性下降、II型胶原mRNA和蛋白表达减少和细胞凋亡, 二甲双胍干预后活性氧降低、超氧化物歧化酶活性增加、II型胶原mRNA和蛋白表达增加和细胞凋亡减少。该研究使用脂多糖诱导软骨细胞也可以导致活性氧增加, 并且降低了总谷胱甘肽水平, 橙皮素干预后活性氧降低、总谷胱甘肽水平升高、II型胶原mRNA和蛋白表达增加, 表明橙皮素可以通过抗氧化作用保护脂多糖诱导的软骨细胞损伤。

橙皮素具有强大的抗氧化活性和抗炎活性, 已被证明能够通过抗氧化作用降低氧化应激水平而对多种疾病如钙化性主动脉瓣疾病、心肌损伤、高尿酸血症、创伤性脊髓损伤、急性肾损伤等发挥保护作用<sup>[24-27]</sup>。郭玲等<sup>[28]</sup>研究发现,

橙皮素可能通过调控 circ\_0039411/miR-296-5p 抑制白细胞介素 1 $\beta$  诱导的白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、干扰素  $\gamma$ 、cleaved-caspase 3 和 cleaved-caspase 9 水平而改善软骨细胞损伤。另外有研究表明,橙皮素能够抑制白细胞介素 1 $\beta$  诱导的肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 的表达,同时促进 II 型胶原和蛋白聚糖的产生,从而保护软骨细胞<sup>[29]</sup>。然而,橙皮素在骨关节炎中发挥保护作用的机制尚不完全清楚。在这项研究中发现了橙皮素能够保护软骨细胞,与对照组相比,模型组软骨细胞增殖能力降低,活性氧水平升高,总谷胱甘肽水平下降和 II 型胶原降解增加,炎症基因白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平上调和 II 型胶原表达水平下调;经橙皮素干预后,软骨细胞的增殖能力上升,活性氧水平下降,总谷胱甘肽水平上升,II 型胶原降解减少,炎症基因白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达下调和软骨特异性基因 II 型胶原表达上调。这些研究结果表明,橙皮素可以通过抗炎作用保护骨关节炎软骨细胞,可能机制是橙皮素通过抑制活性氧介导的氧化应激缓解脂多糖诱导的骨关节炎软骨细胞损伤。该研究的不足之处:①未能完全阐述橙皮素对骨关节炎软骨细胞炎症退变的机制及作用靶点;②未在蛋白质表达方面检测炎症因子相关蛋白的表达;③未开展动物实验进一步探索。

**作者贡献:** 罗善超负责实验实施、实验数据分析处理、论文撰写,罗善超和唐继仁负责实验设计。

**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:** 该文章撰写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] COURTIES A, BERENBAUM F, SELLEM J. The Phenotypic Approach to Osteoarthritis: A Look at Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(6):725-730.

[2] ZHANG X, CAI D, ZHOU F, et al. Targeting downstream subcellular YAP activity as a function of matrix stiffness with Verteporfin-encapsulated chitosan microsphere attenuates osteoarthritis. *Biomaterials*. 2020; 232:119724.

[3] JOSHI A, IYENGAR R, JOO JH, et al. Nuclear ULK1 promotes cell death in response to oxidative stress through PARP1. *Cell Death Differ*. 2016; 23(2):216-230.

[4] 郭琴, 吴敏敏, 陶莹. 氧化修饰高密度脂蛋白激活活性氧启动 p38 信号促使大鼠卵巢颗粒细胞凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(19):3055-3060.

[5] SCHLÜTER KD, WOLF A, WEBER M, et al. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(6):63.

[6] SEBASTIAN S, ZHU YX, BRAGGIO E, et al. Multiple myeloma cells' capacity to decompose H2O2 determines lenalidomide sensitivity. *Blood*. 2017;129(8):991-1007.

[7] 谢婷, 刘婷婷, 曾雪慧, 等. 维生素 D3 减轻高糖暴露诱导氧化应激促进人脐带间充质干细胞的成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(19):2981-2987.

[8] 章家皓, 刘予豪, 周驰, 等. 氧化应激促进成骨细胞铁死亡介导激素性股骨头坏死的病理过程 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(20): 3202-3208.

[9] SHIN HJ, PARK H, SHIN N, et al. p47phox siRNA-Loaded PLGA Nanoparticles Suppress ROS/Oxidative Stress-Induced Chondrocyte Damage in Osteoarthritis. *Polymers (Basel)*. 2020;12(2):443.

[10] YAO J, LONG H, ZHAO J, et al. Nifedipine inhibits oxidative stress and ameliorates osteoarthritis by activating the nuclear factor erythroid-2-related factor 2 pathway. *Life Sci*. 2020;253:117292.

[11] QU ZA, MA XJ, HUANG SB, et al. SIRT2 inhibits oxidative stress and inflammatory response in diabetic osteoarthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(6):2855-2864.

[12] 来利红, 汪晓东, 杨兰, 等. 橙皮素调控 Nrf2/ARE 通路改善载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的实验研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023,21(5):821-827.

[13] 罗娟, 楼迪栋, 肖巧巧, 等. 橙皮素通过 Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝病体外模型氧化应激的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022,32(6):1-6.

[14] RUAN H, LV Z, LIU S, et al. Anlotinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis via the TGF- $\beta$ 1 signalling pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2020;72(1):44-55.

[15] 李岩溪, 张昊, 国星奇, 等. 橙皮素对结肠癌 HCT116 细胞凋亡、迁移与侵袭的影响及机制研究 [J]. *解剖科学进展*, 2020,26(2):196-200.

[16] HASSAN AK, EL-KALAAWY AM, ABD EL-TWAB SM, et al. Hesperetin and Capecitabine Abate 1,2 Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Wistar Rats via Suppressing Oxidative Stress and Enhancing Antioxidant, Anti-inflammatory and Apoptotic Actions. *Life (Basel)*. 2023;13(4):984.

[17] LIU Z, TU K, ZOU P, et al. Hesperetin ameliorates spinal cord injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling. *Int Immunopharmacol*. 2023;118:110103.

[18] LEE A, GU H, GWON MH, et al. Hesperetin suppresses LPS/high glucose-induced inflammatory responses via TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathways in THP-1 cells. *Nutr Res Pract*. 2021;15(5):591-603.

[19] WANG SW, SHENG H, BAI YF, et al. Inhibition of histone acetyltransferase by naringenin and hesperetin suppresses Txnip expression and protects pancreatic  $\beta$  cells in diabetic mice. *Phytomedicine*. 2021;88:153454.

[20] 刘蕊, 李晓丹. 柑橘属黄酮类化合物橙皮苷和橙皮素的抗氧化和抗炎特性分子机制综述 [J]. *中国医药导刊*, 2019,21(12):749-752.

[21] 雷静文, 郭小莉, 宋丽华, 等. 香叶木素对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022,38(22):2679-2683.

[22] XU H, DING X, LI L, et al. Tri-element nanozyme PtCuSe as an ingenious cascade catalytic machine for the amelioration of Parkinson's disease-like symptoms. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1208693.

[23] 王旭东, 韩俊柱, 王文锐, 等. 二甲双胍激活核因子 E2 及相关通路保护脂多糖诱导的软骨细胞损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(26):4147-4153.

[24] AN MF, SHEN C, ZHANG SS, et al. Anti-hyperuricemia effect of hesperetin is mediated by inhibiting the activity of xanthine oxidase and promoting excretion of uric acid. *Front Pharmacol*. 2023;14:1128699.

[25] YANG AY, CHOI HJ, KIM K, et al. Antioxidant, Antiapoptotic, and Anti-inflammatory Effects of Hesperetin in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury. *Molecules*. 2023; 28(6):2759.

[26] LIU P, CHEN J, QI J, et al. Hesperetin ameliorates ischemia/hypoxia-induced myocardium injury via inhibition of oxidative stress, apoptosis, and regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Phytother Res*. 2023;37(5):1787-1805.

[27] ZHAO H, XIAN G, ZENG J, et al. Hesperetin, a Promising Dietary Supplement for Preventing the Development of Calcific Aortic Valve Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(11):2093.

[28] 郭玲, 王兆领, 黄振. 橙皮素通过 circ-0039411/miR-296-5p 影响 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡 [J]. *免疫学杂志*, 2022,38(2):151-156+163.

[29] LIN Z, FU C, YAN Z, et al. The protective effect of hesperetin in osteoarthritis: an in vitro and in vivo study. *Food Funct*. 2020;11(3): 2654-2666.

(责任编辑: YJ, MZH, ZN, WL)