

# 骨碎补总黄酮调控 Notch1/Hes1 信号轴促进软骨细胞自噬并抑制凋亡的机制研究<sup>Δ</sup>

鲁林<sup>1\*</sup>, 方虹<sup>2#</sup>[1. 武汉市中医医院(湖北中医药大学附属国医医院)骨伤科, 武汉 430006; 2. 湖北省中医院(湖北中医药大学附属医院)妇科, 武汉 430006]

中图分类号 R684.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)08-1027-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.08.10



**摘要** 目的 探究骨碎补总黄酮(TFRD)调控Notch1/发状分裂相关增强子1(Hes1)信号轴对脂多糖(LPS)诱导的软骨细胞自噬及凋亡的影响。方法 采用5 μg/mL LPS处理人软骨细胞系C28/I2细胞构建体外炎症损伤模型,将细胞分为正常对照组、模型组、TFRD组(200 μg/mL)、TFRD+过氧化氢氧化物还原酶1(Prdx1)小干扰RNA(si-Prdx1)组和TFRD+si-Prdx1阴性对照(si-NC)组,每组设6个复孔。细胞以si-Prdx1或si-NC转染24 h、TFRD预处理2 h,再以LPS处理,总计培养48 h。检测细胞凋亡率、凋亡细胞占比、单丹磺酰尸胺(MDC)荧光强度和基质金属蛋白酶13(MMP-13)、含I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(ADAMTS5)、软骨寡聚基质蛋白(COMP)含量以及X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、多腺苷二磷酸核糖聚合1(PARP1)、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3 II/I(LC3-II/I)、PTEN诱导激酶1(PINK1)、Notch1、Hes1、Prdx1蛋白表达情况。结果 与模型组比较,TFRD组细胞凋亡率、凋亡细胞占比和MMP-13、ADAMTS5含量以及PARP1蛋白表达水平均显著降低,MDC荧光强度、COMP含量和XIAP、Beclin-1、LC3-II/I、PINK1、Notch1、Hes1、Prdx1蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ )。与TFRD+si-NC组比较,TFRD+si-Prdx1组细胞中除Notch1、Hes1以外上述指标的变化均被显著逆转( $P < 0.05$ )。结论 TFRD可能通过激活Notch1/Hes1信号轴上调下游靶分子Prdx1的表达,进而抑制LPS诱导的软骨细胞凋亡、促进其保护性自噬,从而改善软骨代谢稳态。

**关键词** 骨碎补总黄酮;软骨细胞;Notch受体1/Hes1信号轴;自噬;凋亡

## Regulation of Notch1/Hes1 signaling axis by total flavonoids of *Drynariae Rhizoma* for promoting chondrocyte autophagy and inhibiting apoptosis: a mechanistic study

LU Lin<sup>1</sup>, FANG Hong<sup>2</sup>[1. Dept. of Orthopedics and Traumatology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine (Guoyi Hospital Affiliated to Hubei University of Chinese Medicine), Wuhan 430006, China; 2. Dept. of Gynaecology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine), Wuhan 430006, China]

**ABSTRACT OBJECTIVE** To investigate the effects of total flavonoids of *Drynariae Rhizoma* (TFRD) on autophagy and apoptosis in LPS-induced chondrocytes via the regulation of the Notch1/hairy and enhancer of split 1 (Notch1/Hes1) signaling axis. **METHODS** Human chondrocyte cell line C28/I2 cells were cultured with 5 μg/mL LPS to establish *in vitro* inflammatory injury model. The cells were separated into normal control group, model group, TFRD group (200 μg/mL), TFRD+peroxiredoxin 1 (Prdx1) small interfering RNA (si-Prdx1) group and TFRD+si-Prdx1 negative control (si-NC) group, with 6 replicate wells in each group. Cells were transfected with si-Prdx1 or si-NC for 24 hours, pretreated with TFRD for 2 hours, and then exposed to LPS, with a total culture duration of 48 hours. Apoptotic rate, the proportion of apoptotic cells, monodansylcadaverine (MDC) fluorescence intensity, as well as the contents of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5), and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) were measured. Additionally, the protein expression levels of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I (LC3-II/I), PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), Notch1, Hes1, and Prdx1 were assessed. **RESULTS** Compared with model group, the apoptotic rate, the proportion of apoptotic cells, the contents of MMP-13 and ADAMTS5 as well as protein expressions of PARP1 were significantly decreased, while MDC fluorescence intensity, COMP content, protein expressions of XIAP, Beclin-1, LC3-II/I, PINK1, Notch1, Hes1 and Prdx1 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with TFRD+si-

<sup>Δ</sup> 基金项目 湖北省中医药管理局中医药科研项目(No. ZY2025L063)

\* 第一作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 运动医学、骨关节疾病与骨质疏松。E-mail: timhm@163.com

# 通信作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 妇产科学、骨质疏松。E-mail: f0huxa@163.com

NC group, the changes in the aforementioned indicators (except for Notch1 and Hes1) in the cells of the TFRD+si-Prdx1 group were significantly reversed ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** TFRD may activate the Notch1/Hes1 signaling axis, and up-regulate the expression of the downstream target molecule Prdx1, thereby inhibiting LPS-induced chondrocyte apoptosis, promoting protective autophagy, and consequently improving cartilage metabolic homeostasis.

**KEYWORDS** total flavonoids of *Drynariae Rhizoma*; chondrocyte; Notch1/Hes1 signaling axis; autophagy; apoptosis

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性退行性疾病,全球约有3.5亿人受OA病痛折磨,严重影响患者生活质量<sup>[1]</sup>。研究发现,软骨细胞退变是OA的核心病理环节,其过程中的自噬与凋亡的平衡失调是导致软骨基质降解和细胞功能丧失的关键<sup>[2-3]</sup>。因此,恢复自噬-凋亡平衡已成为OA治疗的重要策略。

骨碎补总黄酮(total flavonoids of *Drynariae Rhizoma*, TFRD)是从传统中药骨碎补中获取的活性成分,现代药理研究证实,其具有抗炎、抗氧化以及调控骨代谢等多种生理活性<sup>[4]</sup>。TFRD可通过促进成骨细胞生成和抑制脂肪细胞生成,进而在原发性骨质疏松症的治疗中发挥显著潜力<sup>[5]</sup>。Notch1信号参与了软骨细胞增殖与分化的平衡调控,其下游效应分子发状分裂相关增强子1(hairy and enhancer of split 1, Hes1)可抑制SRY-box转录因子9(SRY-box transcription factor 9, *Sox9*)等成软骨相关基因表达<sup>[6]</sup>。过氧化物氧化还原酶1(peroxiredoxin 1, Prdx1)作为抗氧化蛋白,可通过改善氧化应激缓解OA进展和疼痛反应,其表达受Notch1/Hes1信号轴调控<sup>[7]</sup>。鉴于TFRD具有抗氧化和调控骨代谢的活性,推测其可能通过调控Notch1/Hes1信号轴,影响下游抗氧化蛋白Prdx1的表达,进而调节软骨细胞自噬与凋亡的平衡,缓解OA进展。基于此,本研究通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导人软骨细胞C28/I2建立OA细胞模型,探讨TFRD通过调控Notch1/Hes1信号轴对软骨细胞自噬与凋亡平衡的影响,旨在为OA的治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Synergy H1型酶标仪(美国BioTek公司)、iBright CL1500型成像系统和Sorvall™ MTX 150型微量超高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、DMi8型荧光显微镜(德国Leica公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

TFRD[国药准字Z20133051,含量70%(以柚皮苷计)]购自北京岐黄制药有限公司;Prdx1小干扰RNA(si-Prdx1)及其阴性对照(si-NC)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;LPS、CCK-8试剂盒、Annexin FITC/PI凋亡试剂盒、吖啶橙/溴化乙锭(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB)双染试剂盒、单丹磺酰尸胺

(monodansylcadaverine, MDC)染色试剂盒、人基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、人软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)ELISA试剂盒(批号分别为ST1470、C0041、APOAF、T3203、C3018S、RAB0364、KOA0550)均购自上海碧云天生物技术有限公司;人含I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)ELISA试剂盒(批号ml038180)购自上海酶联科技生物有限公司;兔源X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、多腺苷二磷酸核糖聚合1[poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3 II/I(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I, LC3-II/I)、PTEN诱导激酶1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)、Notch1、Hes1、Prdx1、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G、Lipofectamine 3000转染试剂(批号分别为PA5-29253、PA5-34803、PA1-16857、PA5-22731、PA5-86941、MA5-32080、PA5-28802、MA5-53228、PA5-21396、31460、L3000015)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

### 1.3 实验细胞

人软骨细胞系C28/I2(批号HTX2308C)购自深圳市华拓科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将C28/I2细胞接种于DMEM培养基中,培养至融合度达80%以上后,用胰蛋白酶消化细胞进行传代培养。实验中所用细胞均为传代3~5代且生长状态良好的对数生长期细胞。

### 2.2 TFRD给药浓度的筛选

取C28/I2细胞接种于96孔板( $5 \times 10^3$ 个/孔)中,待细胞贴壁后,分别在无或有LPS( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[8]</sup>)的系统各孔中加入含0、50、100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD<sup>[8]</sup>的培养基,每个浓度设6个复孔。培养24 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂,孵育2 h,最后使用酶标仪在450 nm波长处检测各孔光密度(optical density, OD)值。选择对C28/I2细胞无毒性且对LPS诱导的C28/I2细胞活性促进最强的TFRD质量浓度进行后续实验。

### 2.3 细胞分组、造模与给药

取C28/I2细胞,分为正常对照组、模型组、TFRD组、TFRD+si-NC组和TFRD+si-Prdx1组,每组设6个复孔。正常对照组细胞加入完全培养基;模型组细胞加入含5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS的培养基;TFRD组细胞先加入含200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD(根据“2.2”项下结果确定)预处理2 h,再加入5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS处理;TFRD+si-NC组细胞转染si-NC 24 h后用200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD预处理2 h,再加入5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS处理;TFRD+si-Prdx1组细胞转染si-Prdx1 24 h后用200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD预处理2 h,再加入5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS处理。细胞转染采用Lipofectimine 3000转染试剂,转染时融合度为60%左右,所有细胞均培养总计48 h。

### 2.4 细胞凋亡检测

#### 2.4.1 Annexin FITC/PI法

取C28/I2细胞,按照“2.3”项下方法处理后,再按照Annexin FITC/PI试剂盒说明书操作,使用流式细胞仪检测荧光信号,使用FlowJo软件分析细胞凋亡率。

#### 2.4.2 AO/EB双染法

取C28/I2细胞,按照“2.3”项下方法处理后,再按照AO/EB双染试剂盒说明书操作,使用荧光显微镜观察并拍照,并计算凋亡细胞占比:凋亡细胞占比=凋亡细胞(橘红色荧光)占总细胞(绿色荧光)比例。

### 2.5 细胞自噬体检测

取C28/I2细胞,按照“2.3”项下方法处理后,再按照MDC染色试剂盒说明书操作,使用荧光显微镜观察并拍照,使用Image J软件分析自噬体的MDC荧光强度。

### 2.6 细胞软骨基质代谢相关因子水平检测

取C28/I2细胞,按照“2.3”项下方法处理后,再按照ELISA试剂盒说明书操作,检测细胞中MMP-13、ADAMTS5、COMP的含量。

### 2.7 细胞凋亡、自噬及Notch1/Hes1信号轴相关蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取C28/I2细胞,按照“2.3”项下方法处理后,收集细胞,提取总蛋白,经变性、电泳、转膜、封闭等操作后,加入XIAP、PARP1、Beclin-1、LC3-II/I、PINK1、Notch1、Hes1、Prdx1、 $\beta$ -actin

一抗(稀释比例均为1:1 000)在4  $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜;次日,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),室温下孵育1.5 h;对蛋白条带进行显影后,通过Image J软件分析目的蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值,评价目的蛋白的表达水平。

### 2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- $q$ 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度TFRD对C28/I2细胞活性的影响

如表1所示,在LPS未处理的条件下,与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD比较,200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD可显著提升C28/I2细胞活性( $P<0.05$ )。在LPS处理的条件下,与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD比较,50~800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD均能显著提升C28/I2细胞活性( $P<0.05$ ),其中200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD的促进效果最强。因此,以200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为后续TFRD的干预浓度。

表1 不同浓度TFRD对LPS处理与未处理C28/I2细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

TFRD( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LPS未处理	LPS处理
0	0.70 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.04
50	0.73 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
100	0.79 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
200	0.85 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
400	0.98 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
800	0.76 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

a: 与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFRD比较,  $P<0.05$ 。

### 3.2 TFRD对LPS处理后C28/I2细胞凋亡及其相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组C28/I2细胞凋亡率、凋亡细胞占比和PARP1蛋白表达水平均显著升高, XIAP蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较, TFRD组C28/I2细胞凋亡率、凋亡细胞占比和PARP1蛋白表达水平均显著降低, XIAP蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与TFRD+si-NC组比较, TFRD+si-Prdx1组C28/I2细胞凋亡率、凋亡细胞占比和PARP1蛋白表达水平均显著升高, XIAP蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。结果见图1、图2、表2。

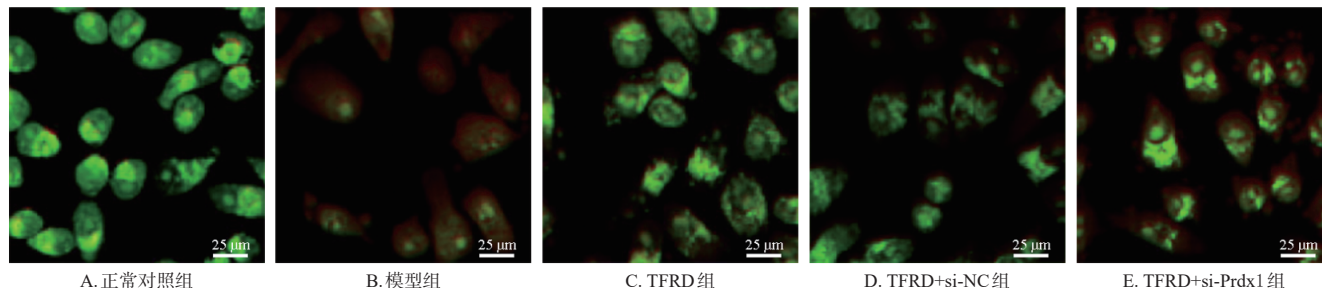
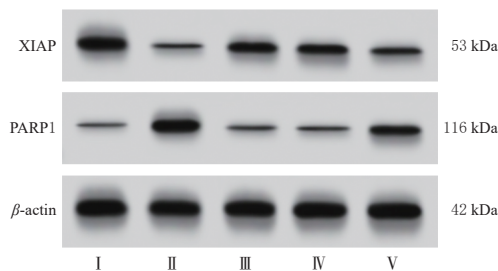


图1 各组细胞凋亡的AO/EB双染显微图



I: 正常对照组; II: 模型组; III: TFRD组; IV: TFRD+si-NC组; V: TFRD+si-Prdx1组。

图2 各组细胞中 XIAP 和 PARP1 蛋白表达的电泳图

表2 各组细胞凋亡率、凋亡细胞占比和 XIAP、PARP1 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	细胞凋亡率%	凋亡细胞占比/%	XIAP/ $\beta$ -actin	PARP1/ $\beta$ -actin
正常对照组	5.12 $\pm$ 0.45	7.65 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.02
模型组	33.19 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	40.12 $\pm$ 4.06 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
TFRD组	11.26 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	15.82 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
TFRD+si-NC组	12.09 $\pm$ 2.03	17.04 $\pm$ 1.30	0.57 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.02
TFRD+si-Prdx1组	20.16 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>	28.67 $\pm$ 2.45 <sup>c</sup>	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 TFRD+si-NC组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3 TFRD对LPS处理后C28/I2细胞自噬及其相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组 C28/I2 细胞 MDC 荧光强度和 Beclin-1、LC3- II/I、PINK1 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较, TFRD 组 C28/I2 细胞 MDC 荧光强度和 Beclin-1、LC3- II/I、PINK1 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与 TFRD+si-NC 组比较, TFRD+si-Prdx1 组 C28/I2 细胞 MDC 荧光强度和 Beclin-1、LC3- II/I、PINK1 蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图3、图4、表3。

### 3.4 TFRD对LPS处理后C28/I2细胞软骨基质代谢相关因子水平的影响

与正常对照组比较,模型组 C28/I2 细胞中 MMP-13、ADAMTS5 含量均显著升高,COMP 含量显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较, TFRD 组 C28/I2 细胞中 MMP-13、ADAMTS5 含量均显著降低,COMP 含量显著升高( $P<0.05$ )。与 TFRD+si-NC 组比较, TFRD+si-Prdx1 组 C28/I2 细胞中 MMP-13、ADAMTS5 含量均显著升高,COMP 含量显著降低( $P<0.05$ )。结果见表4。

### 3.5 TFRD对LPS处理后C28/I2细胞中Notch1/Hes1信号轴相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组 C28/I2 细胞中 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较, TFRD 组 C28/I2 细胞中 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与 TFRD+si-NC 组比较, TFRD+si-Prdx1 组 C28/I2 细胞中 Prdx1 蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ),表明 Prdx 敲低成功。结果见图5、表5。

## 4 讨论

OA 的主要病理特征是关节软骨的持续性降解,其发病机制涉及炎症反应、细胞外基质代谢失调以及软骨细胞功能异常等多个环节<sup>[9]</sup>。本研究以 LPS 诱导 C28/I2 细胞构建体外炎症损伤模型,模拟 OA 的临床发病过程,该模型已被广泛应用于软骨保护的多个药物筛选和研究中<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, LPS 诱导后,软骨细胞凋亡率和凋亡细胞占比均显著升高,自噬标志物(如 MDC 荧光强度、Beclin-1 及 LC3- II/I 蛋白表达)显著增加,同时软骨基质分解代谢酶(MMP-13、ADAMTS5)水平亦显著升高而合成代谢标志物(COMP)水平显著降低。这些变化提示 OA 细胞模型构建成功,同时也提示在 LPS 诱导的病理环境下,细胞自噬不足以完全清除损伤,进而触发凋亡程序以维持组织稳态,二者的动态平衡失衡可能是软骨细胞损伤的关键病理基础。

TFRD 是骨碎补的主要活性成分,可减轻 OA 软骨退变和细胞凋亡<sup>[10]</sup>,以及促进骨形成并抑制骨吸收,从而改善骨质疏松<sup>[11]</sup>。本研究结果显示, TFRD 处理可降低 LPS 诱导的 C28/I2 细胞凋亡率,同时增强细胞自噬水平,其中凋亡被抑制的直观表现是 C28/I2 细胞凋亡率、凋亡细胞占比均显著降低,其次是 DNA 损伤修复调控蛋白 PARP1 表达水平显著降低, XIAP 表达水平显著升高。TFRD 可通过上调 MDC 荧光强度以及 Beclin-1、LC3- II/I、PINK1 自噬蛋白表达水平,有效增强软骨细胞的自噬水平。这一结果与研究中的  $\beta$ -羟基丁酸酯通过增强软骨细胞自噬抑制凋亡发挥 OA 保护作用相似<sup>[12]</sup>。值得注意的是,本研究结果显示, TFRD 干预后细胞自噬增强伴随凋亡抑制,提示 TFRD 诱导的自噬可能并非导

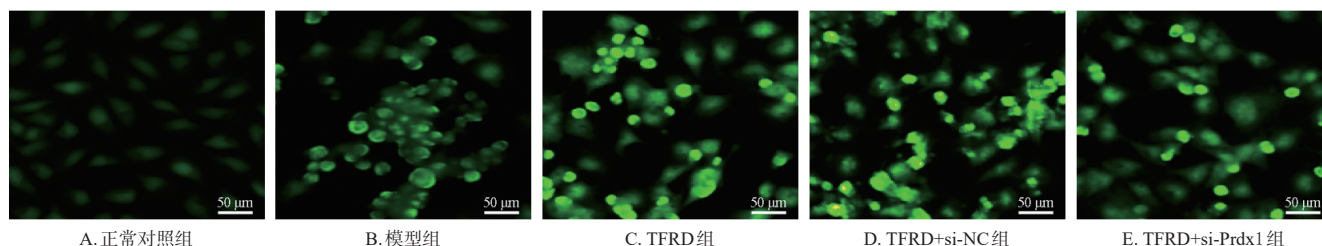
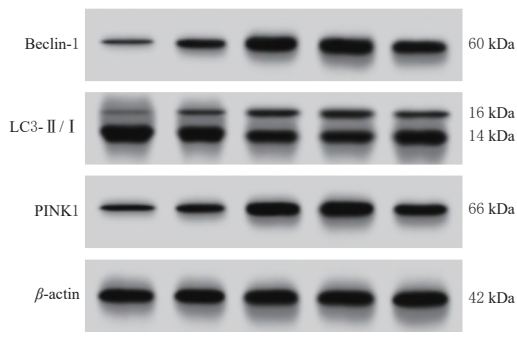


图3 各组细胞自噬体 MDC 染色的荧光图



I: 正常对照组; II: 模型组; III: TFRD组; IV: TFRD+si-NC组; V: TFRD+si-Prdx1组。

图4 各组细胞 Beclin-1、LC3- II / I 和 PINK1 蛋白表达的电泳图

表3 各组细胞 MDC 荧光强度和 Beclin-1、LC3- II / I、PINK1 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

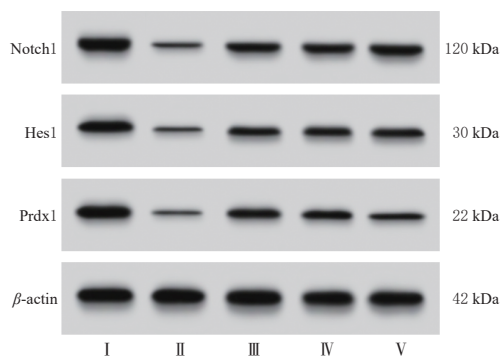
组别	MDC 荧光强度	Beclin-1/ $\beta$ -actin	LC3- II / I $\beta$ -actin	PINK1/ $\beta$ -actin
正常对照组	87.16 ± 15.23	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.35 ± 0.04
模型组	225.33 ± 25.16 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>a</sup>
TFRD组	387.36 ± 25.39 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>b</sup>
TFRD+si-NC组	405.78 ± 27.69	0.91 ± 0.05	0.65 ± 0.06	0.94 ± 0.06
TFRD+si-Prdx1组	305.26 ± 21.45 <sup>c</sup>	0.71 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.74 ± 0.05 <sup>c</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 TFRD+si-NC组比较,  $P < 0.05$ 。

表4 各组细胞中 MMP-13、ADAMTS5、COMP 含量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MMP-13/(pg/mL)	ADAMTS5/(pg/mL)	COMP/(ng/mL)
正常对照组	50.32 ± 5.12	38.65 ± 3.15	168.39 ± 11.39
模型组	204.36 ± 18.45 <sup>a</sup>	157.69 ± 11.36 <sup>a</sup>	45.36 ± 5.12 <sup>a</sup>
TFRD组	95.36 ± 8.62 <sup>b</sup>	70.36 ± 5.12 <sup>b</sup>	120.36 ± 10.12 <sup>b</sup>
TFRD+si-NC组	99.64 ± 7.39	74.28 ± 6.19	115.69 ± 8.12
TFRD+si-Prdx1组	158.61 ± 12.16 <sup>c</sup>	110.39 ± 9.67 <sup>c</sup>	78.19 ± 6.15 <sup>c</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 TFRD+si-NC组比较,  $P < 0.05$ 。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: TFRD组; IV: TFRD+si-NC组; V: TFRD+si-Prdx1组。

图5 各组细胞中 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达的电泳图

致细胞死亡的类型,而是发挥了保护作用。结合文献报道,自噬在细胞过程中具有双重作用,适度的保护性自噬可通过清除受损的细胞器和错误折叠的蛋白质来维持细胞稳态,而过度或失调的自噬则可能引发自噬性细

表5 各组细胞中 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	Notch1/ $\beta$ -actin	Hes1/ $\beta$ -actin	Prdx1/ $\beta$ -actin
正常对照组	0.82 ± 0.07	0.78 ± 0.06	0.88 ± 0.07
模型组	0.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
TFRD组	0.56 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>b</sup>
TFRD+si-NC组	0.52 ± 0.05	0.59 ± 0.05	0.51 ± 0.05
TFRD+si-Prdx1组	0.54 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.33 ± 0.04 <sup>c</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 TFRD+si-NC组比较,  $P < 0.05$ 。

胞死亡<sup>[13-14]</sup>。故而笔者推测 TFRD 可能通过特异性调控 Beclin-1、LC3- II / I 等自噬关键节点,将 LPS 诱导的异常自噬引导或转化为一种促生存型的保护性自噬流,从而有效清除细胞内毒性物质,进而抑制凋亡进程。此外,本研究结果进一步表明, TFRD 通过下调软骨代谢中关键分解代谢酶 MMP-13 和 ADAMTS5,上调软骨细胞合成蛋白 COMP 抑制软骨破坏、促进软骨合成修复,进而改善软骨代谢稳态。另外,本研究的剂量筛选实验表明,所选用的 200  $\mu$ g/mL TFRD 对正常软骨细胞活性无负面影响,排除了其非特异性作用对实验结果解读的干扰,从而证实 TFRD 对自噬与凋亡的调控作用主要是在 LPS 诱导的病理状态下特异性触发的。

研究证实,Notch1/Hes1 信号轴影响骨髓间充质干细胞的成骨分化,从而对骨质疏松症等骨代谢相关疾病发挥调控作用<sup>[6-7]</sup>。该信号轴下游分子 Prdx 是细胞内重要的氧化还原信号调控通路,作为重要的抗氧化蛋白,Prdx1 可通过清除过氧化氢等活性氧,维持线粒体膜电位稳定,减少氧化应激损伤,在上游 Notch1/Hes1 信号与下游自噬/凋亡之间起到了关键的桥梁作用<sup>[15-16]</sup>。本研究以 Notch1/Hes1 信号轴及其下游分子 Prdx1 作为探讨 TFRD 发挥 OA 治疗潜力的主要研究方向,结果显示, LPS 处理后 C28/I2 细胞中 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达水平均显著降低,提示在 OA 发展过程中,Notch1/Hes1 信号轴及其下游分子 Prdx1 活性被抑制。值得注意的是,这一抑制作用与文献报道中 Notch1/Hes1 信号轴在骨髓间充质干细胞中促进成骨分化的作用<sup>[6-7]</sup>及 Prdx1 依赖 BMP 信号影响软骨细胞肥大的作用<sup>[17]</sup>有所不同。这种差异提示,Notch1/Hes1/Prdx1 信号轴的功能可能具有细胞类型特异性,其在软骨退变中的作用值得深入探讨。本研究中, TFRD 干预显著逆转了 LPS 引起的 Notch1、Hes1 和 Prdx1 蛋白表达下调,证明 TFRD 能够在软骨细胞中激活 Notch1/Hes1 信号轴及其下游分子 Prdx1,这可能是其发挥软骨保护作用的关键机制。为了进一步证实该机制,本研究设计了 Prdx 基因敲除实验,结果显示, Prdx1 敲除后, TFRD 的保护作用明显被削弱,并未影响 Notch1 和 Hes1 表达,表明 Prdx1 位

于该信号轴下游,受 Notch1/Hes1 调控而非反馈调节上游。这一回复实验充分证实了 Prdx1 在 TFRD 调控通路中的关键作用,也证实了 TFRD 对 Notch1/Hes1 信号轴的直接调控作用。

综上所述,TFRD 可能通过激活 Notch1/Hes1 信号轴上调 Prdx1 表达,进而抑制 LPS 诱导的软骨细胞凋亡、促进其保护性自噬,从而改善软骨代谢稳态。然而,C28/I2 细胞系在基质合成能力等方面与原代软骨细胞存在差异,且目前结论仅基于细胞实验,尚未在动物体内验证其效果。后续研究将在原代软骨细胞及 OA 动物模型中进行深入验证,以全面阐明 TFRD 的作用机制,为其临床转化提供更可靠的实验参考。

### 参考文献

- [1] CHEN H W, ZHANG L, SHI X R, et al. Evaluation of osteoarthritis disease burden in China during 1990-2019 and forecasting its trend over the future 25 years[J]. *Arthritis Care Res*, 2024, 76(7):1006-1017.
- [2] LI J, SUN F R, ZHANG Y J, et al. MiR-103-3p regulates chondrocyte autophagy, apoptosis, and ECM degradation through the PI3K/Akt/mTOR pathway by targeting CPEB3 [J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1):324.
- [3] LU Y F, ZHOU J, WANG H, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and autophagy in osteoarthritis: from molecular mechanisms to therapeutic applications[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2024, 29(6):805-830.
- [4] LI W, ZHANG Z C, LI Y Y, et al. Effects of total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* on biochemical indicators of bone metabolism: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1443235.
- [5] SU H, LIU L Y, YAN Z C, et al. Therapeutic potential of total flavonoids of *Rhizoma Drynariae*: inhibiting adipogenesis and promoting osteogenesis via MAPK/HIF-1 $\alpha$  pathway in primary osteoporosis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1):260.
- [6] MENG P L, LIU H, LIU L, et al. Activation of notch signaling pathway is involved in extracellular matrix degradation in human induced pluripotent stem cells chondrocytes induced by HT-2 toxin[J]. *Food Chem Toxicol*, 2024, 189:114724.
- [7] LI J W, WANG R L, XU J, et al. Methylene blue prevents osteoarthritis progression and relieves pain in rats via up-regulation of Nrf2/PRDX1[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(2):417-428.
- [8] DING H Z, CHEN H J, DOU L R, et al. CircRELL1 promotes osteoarthritis progression by regulating miR-200c-3p[J]. *Heliyon*, 2024, 10(14):e34251.
- [9] MA F, WANG L X, CHI H, et al. Exploring the therapeutic potential of MIR-140-3p in osteoarthritis: targeting CILP and ferroptosis for novel treatment strategies[J]. *Cell Prolif*, 2025, 58(11):e70018.
- [10] CHEN G Y, LIU X Y, YAN X E, et al. Total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* treat osteoarthritis by inhibiting arachidonic acid metabolites through AMPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16:4123-4140.
- [11] JIANG N N, JIN H, YANG K, et al. The mechanism of metformin combined with total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* on ovariectomy-induced osteoporotic rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165:115181.
- [12] ZHUANG H M, REN X S, ZHANG Y L, et al.  $\beta$ -Hydroxybutyrate enhances chondrocyte mitophagy and reduces cartilage degeneration in osteoarthritis via the HCAR2/AMPK/PINK1/Parkin pathway[J]. *Aging Cell*, 2024, 23(11):e14294.
- [13] WANG H, ZHOU J, LU Y, et al. The interplay between autophagy and programmed cell death in osteoarthritis: insights into mechanisms and therapeutic targets[J]. *Mol Cell Biochem*, 2025, 480(8):4627-4646.
- [14] WANG L W, ZHANG W, WANG Z F, et al. *Astragalus polysaccharide* alleviated septic associated acute kidney injury through dual mechanisms of RIPK1-dependent necroptosis and autophagy in macrophage[J]. *Phytother Res*, 2026. DOI:10.1002/ptr.70309.
- [15] GE X, YANG G M, ZHANG X L, et al. Isoliensinine inhibits mitophagy and sensitizes T cell malignancies for STING-mediated NK clearance[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2026, 47(1):242-254.
- [16] SUN H H, LI Y L, JIANG H, et al. PRDX1 influences the occurrence and progression of liver cancer by inhibiting mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Cell J*, 2022, 24(11):657-664.
- [17] KUMAR Y, BISWAS T, THACKER G, et al. BMP signaling-driven osteogenesis is critically dependent on Prdx-1 expression-mediated maintenance of chondrocyte prehypertrophy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 118:1-12.

(收稿日期:2025-09-15 修回日期:2026-03-26)

(编辑:邹丽娟)