

• 基础研究 •

鼠尾草酚调节 AMPK/NLRP3 信号通路对 H_2O_2 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应的影响杨轶¹ 许治国¹ 王亮¹

[摘要] 目的:探究鼠尾草酚(CAR)对 H_2O_2 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应的影响,分析是否与单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)通路有关。方法:培养并分离小鼠原代软骨细胞,分为对照组(CK 组)、CAR 组、 H_2O_2 组、低/中/高剂量 CAR 组(L/M/H-CAR 组)、H-CAR+AMPK 抑制剂 Compound C 组(H-CAR+Compound C 组)、CK+Compound C 组。软骨细胞增殖、凋亡、活性氧(ROS)荧光强度检测分别用 Calcein-AM、Hoechst 33342 染色、DCFH-DA 荧光探针法;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-8 检测用 ELISA;软骨特异性蛋白及 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白检测用 Western Blot 法。结果:成功实现原代软骨细胞分离及培养。CAR 组、CK+Compound C 组较 CK 组细胞增殖率、SOD、Col2a1、p-AMPK/AMPK、细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8、NLRP3 差异无统计学意义($P>0.05$); H_2O_2 组较 CK 组细胞增殖率、SOD、Col2a1、p-AMPK/AMPK 降低,细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8、NLRP3 升高,差异有统计学意义($P<0.05$);L/M/H-CAR 组较 H_2O_2 组上述指标呈反向改变;与 H_2O_2 组相比,H-CAR 组细胞增殖率、SOD、Col2a1、p-AMPK/AMPK 从 $38.64\% \pm 4.12\%$ 、 $(28.16 \pm 3.02)U/mL$ 、 0.30 ± 0.04 、 0.31 ± 0.04 相应升至 $91.34\% \pm 8.37\%$ 、 $(62.78 \pm 6.46)U/mL$ 、 1.07 ± 0.12 、 0.79 ± 0.08 ,细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8、NLRP3 从 $31.57\% \pm 3.35\%$ 、 68.15 ± 7.02 、 $(4.78 \pm 0.49)nmol/mL$ 、 $(51.69 \pm 0.54)pg/mL$ 、 $(32.09 \pm 3.37)pg/mL$ 、 $(67.38 \pm 0.69)pg/mL$ 、 1.28 ± 0.14 相应降至 $6.78\% \pm 0.71\%$ 、 12.34 ± 1.38 、 $(2.11 \pm 0.25)nmol/mL$ 、 $(22.03 \pm 0.26)pg/mL$ 、 $(10.07 \pm 1.10)pg/mL$ 、 $(34.70 \pm 0.38)pg/mL$ 、 0.51 ± 0.06 ;H-CAR+Compound C 组较 H-CAR 组细胞增殖率、SOD、Col2a1、p-AMPK/AMPK 降低,细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8、NLRP3 升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:鼠尾草酚可能通过调控 AMPK/NLRP3 通路,减轻 H_2O_2 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应,保护软骨细胞。

[关键词] 鼠尾草酚;AMPK/NLRP3 信号通路;骨关节炎;软骨细胞;凋亡;氧化损伤;炎症反应

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)08-0065-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260809

The Effects of Carnosol on H_2O_2 -Induced Apoptosis, Oxidative Damage, and Inflammatory Response of Chondrocytes in Osteoarthritis by Regulating the AMPK/NLRP3 Signaling PathwayYANG Yi¹ XU Zhiguo¹ WANG Liang¹

¹ Tangshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan 063099, Hebei China.

Abstract Objective: To explore the effects of carnosol (CAR) on apoptosis, oxidative damage, and inflammatory response of chondrocytes induced by H_2O_2 in osteoarthritis (OA), and to analyze whether they are related to the adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)/Nod like receptor protein 3 (NLRP3) pathway. **Methods:** Mouse primary chondrocytes were cultured isolated and isolated, cultured, and assigned into control group (CK group), CAR group, H_2O_2 group, low, medium, and high-dose CAR groups (L, M, H-CAR groups), and H-CAR+AMPK inhibitor Compound C group (H-CAR+Compound C group), CK+Compound C group. The prolifer-

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2024425)

¹ 唐山市中医医院(河北 唐山, 063099)

ation, apoptosis of chondrocytes, and ROS fluorescence intensity were detected using Calcein-AM, Hoechst 33342 staining, and DCFH-DA fluorescence probe method, respectively. The levels of SOD, MDA, TNF- α , IL-6, and IL-8 were measured using ELISA. In addition, Western Blot was used to measure cartilage specific proteins and AMPK/NLRP3 pathway related proteins. **Results:** The isolation and culture of primary chondrocytes were successfully achieved. There were no significant differences in cell proliferation rate, SOD, Col2 α 1 expression, p-AMPK/AMPK, cell apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, MDA, TNF- α , IL-6, IL-8 levels, and NLRP3 expression between the CAR group, CK+Compound C group and the CK group ($P>0.05$). The H₂O₂ group showed decreased cell proliferation rate, SOD level, Col2 α 1 expression, and p-AMPK/AMPK, while increased apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, MDA, TNF- α , IL-6, IL-8 levels, and NLRP3 protein expression than the CK group ($P<0.05$). Compared with the H₂O₂ group, the aforementioned indicators in the L-, M-, and H-CAR groups exhibited opposite changes. Compared with the H₂O₂ group, the cell proliferation rate, SOD, Col2 α 1 expression, and p-AMPK/AMPK in the H-CAR group increased from $38.64\% \pm 4.12\%$, (28.16 ± 3.02) U/mL, 0.30 ± 0.04 , and 0.31 ± 0.04 to $91.34\% \pm 8.37\%$, (62.78 ± 6.46) U/mL, 1.07 ± 0.12 , and 0.79 ± 0.08 , respectively; the cell apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, levels of MDA, TNF- α , IL-6, and IL-8, and NLRP3 expression decreased from $31.57\% \pm 3.35\%$, 68.15 ± 7.02 , (4.78 ± 0.49) nmol/mL, (51.69 ± 0.54) pg/mL, (32.09 ± 3.37) pg/mL, (67.38 ± 0.69) pg/mL, and 1.28 ± 0.14 to $6.78\% \pm 0.71\%$, 12.34 ± 1.38 , (2.11 ± 0.25) nmol/mL, (22.03 ± 0.26) pg/mL, (10.07 ± 1.10) pg/mL, (34.70 ± 0.38) pg/mL, and 0.51 ± 0.06 , respectively. The H-CAR+Compound C group showed decreased cell proliferation rate, SOD, Col2 α 1 expression, and p-AMPK/AMPK, while increased apoptosis rate, ROS fluorescence intensity, MDA, TNF- α , IL-6, IL-8 levels, and NLRP3 expression than the H-CAR group ($P<0.05$). **Conclusion:** CAR may alleviate H₂O₂ induced apoptosis, oxidative damage, and inflammatory response in OA chondrocytes by regulating the AMPK/NLRP3 pathway, thereby exerting a protective effect on chondrocytes.

Keywords: carnosol; AMPK/NLRP3 signaling pathway; osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis; oxidative damage; inflammatory response

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是常见退行性关节疾病,以关节软骨损伤为核心病理特征,表现为软骨缺损、降解,伴关节疼痛、活动受限甚至致残^[1]。骨关节炎全球发病率约为15%,但临床上缺乏高效干预手段^[2]。其发病涉及多途径,软骨细胞异常凋亡、炎症反应及氧化应激为关键环节,H₂O₂诱导的氧化应激可打破关节内稳态,加速软骨退化^[3],故抗氧化干预具有重要价值。鼠尾草酚(Carnosol, CAR)是迷迭香来源的天然二萜酚,有强效抗氧化活性,可清除自由基、缓解氧化应激损伤,还能调控氧化应激通路、改善骨代谢^[4],但对骨关节炎软骨细胞损伤的作用及机制不明。已知单磷酸腺苷活化蛋白激酶(Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase, AMPK)/Nod样受体蛋白3(Nod Like Receptor Protein 3, NLRP3)通路调控骨关节炎炎症及基质降解^[5],而鼠尾草酚是否通过调节该通路来减轻H₂O₂诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应并不清晰。本研究旨在探究鼠尾草酚对H₂O₂诱导的骨关节炎软骨细胞损伤的影响,及其与AMPK/NLRP3通路的联系,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究经唐山市中医医院动物伦理委员会批准(批准号为TSZYYY-2023-008),所有实验操作严格遵

循《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)。无特定病原体(SPF)级3周龄C57BL/6J小鼠体重为7~12 g,生产许可证号为SCXK(粤)2022-0096,购于广东莱迪生物医药研究院。

1.2 主要试剂与仪器

鼠尾草酚,货号为E94370,纯度 $\geq 98\%$,吉至生化;AMPK抑制剂Compound C,货号为orb1909567,博欧特生物;Calcein-AM染色液,货号为C1367,碧云天生物;Hoechst 33342染色液,货号为XY-L0130U,烜雅生物;DCFH-DA活性氧荧光探针,货号为Y1125S,优利科生命科学;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-8 ELISA试剂盒,货号分别为XK-E12032、XK-E12031、XK-E11904、XK-SJH-2621、XK-E12143,烜科生物;Col2 α 1、p-AMPK、AMPK、NLRP3、GAPDH一抗和IgG二抗,货号分别为ab34712、ab133448、ab3759、ab270449、ab9485、ab6881,英国Abcam;荧光显微镜,型号为GFM-550,上海光密仪器;凝胶成像分析系统,型号为4200SF,上海天能公司。

1.3 方法

1.3.1 原代软骨细胞分离 取C57BL/6J小鼠麻醉处死后,解剖获取双侧股骨头及膝关节软骨,剔除周边组织并剪为0.5 mm³小块。经胰蛋白酶处理15 min

后,用 0.02%Ⅱ型胶原酶消化 4 h,RPMI-1640 终止。离心取沉淀,以含 10%FBS 及双抗的 RPMI-1640 重悬接种,37℃下 5%CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 换液,取第 3 代细胞实验。

1.3.2 原代软骨细胞鉴定 1)甲苯胺蓝染色:初代软骨细胞涂片,PBS 洗涤,甲苯胺蓝染色 20 min,经 95%乙醇及 100%乙醇梯度脱水褪色,二甲苯清洗后封片,显微镜下观察与分析。

2)COLⅡ免疫荧光染色:软骨细胞爬片固定、通透、封闭后,加 COLⅡ一抗 4℃下孵育过夜,荧光二抗室温避光孵育 1 h;DAPI 染核,荧光显微镜下观察与分析。

1.3.3 细胞培养与分组 原代软骨细胞用 RPMI-1640 培养基(10%FBS+100 U/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素),于 37℃下 5%CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁 24 h 后分组干预。

对照组(CK 组)换培养基培养 48 h。CAR 组换含 10 μmol/L 鼠尾草酚培养基培养 48 h。H₂O₂ 组换含 0.8 μmol/L H₂O₂^[6] 培养基,作用 2 h 诱导损伤,弃液洗后换培养基培养 48 h。低/中/高剂量 CAR 组(L/M/H-CAR 组)换含 0.8 μmol/L H₂O₂ 培养基,作用 2 h,弃液洗后换含 2.5、5.0、10.0 μmol/L 鼠尾草酚^[7] 培养基培养 48 h。H-CAR+Compound C 组换含 0.8 μmol/L H₂O₂ 培养基,作用 2 h,弃液洗后换同时含 10 μmol/L 鼠尾草酚和 10 μmol/L Compound C^[8] 培养基培养 48 h。CK+Compound C 组换含 10 μmol/L Compound C 培养基培养 48 h。

药物配制:鼠尾草酚用 DMSO 配成 50 mmol/L 储存液;Compound C 用无水乙醇配成 20 mmol/L 储存液。各组 DMSO、无水乙醇终浓度分别≤0.1%和≤0.05%,预实验证实此浓度对细胞活力增殖无显著影响。

1.3.4 Calcein-AM 染色检测细胞活性 收集各组细胞,PBS 洗 2 次,重悬,加 Calcein-AM(0.03%)和 EthD-I(0.15%),7℃下 5%CO₂ 培养箱暗处反应 5 min,PBS 洗 3 或 4 次,荧光显微镜下观察拍照并计算增殖率。实验独立重复 3 次(3 复孔/次), $n=6$ 时检测效能>85%($\alpha=0.05$)。

1.3.5 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡 收集各组软骨细胞,接种至 24 孔板(1×10^4 个/孔),弃培养基后 PBS 洗涤,加 Hoechst 33342 试剂孵育 10 min,荧光显微镜多视野观察并计算凋亡率。实验独立重复 3 次(3 复孔/次), $n=6$ 时检测效能>80%($\alpha=0.05$)。

1.3.6 DCFH-DA 荧光探针检测细胞活性氧荧光强度 收集各组软骨细胞,接种至 24 孔板(1×10^4 个/孔),待培养相应时间,PBS 清洗,加 10 μmol/L

DCFH-DA 染液孵育 20 min,荧光显微镜观察并计算活性氧荧光强度。实验独立重复 3 次(3 复孔/次), $n=6$ 时检测效能>80%($\alpha=0.05$)。

1.3.7 ELISA 检测细胞 SOD、MDA 和 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平 收集各组软骨细胞,离心(1 200 r/min,15 min,4℃)取上清,-80℃下冻存待测。样本室温解冻后,按 ELISA 试剂盒说明书检测 SOD、MDA 及 TNF- α (1:100 稀释)、IL-6、IL-8(均 1:50 稀释)水平。实验独立重复 3 次(3 复孔/次),批内变异系数(CV)<15%、批间变异系数<20%, $n=6$ 时检测效能>85%($\alpha=0.05$)。

1.3.8 Western Blot 法检测特异性蛋白及 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达 取各组软骨细胞,冰上用 RIPA 裂解液(含 1% PMSF 及 1% 磷酸酶抑制剂 Cocktail)提取总蛋白,BCA 法定量。每孔上样 30 μg 变性蛋白,电泳后转 PVDF 膜,封闭,加 Col2 α 1、p-AMPK、AMPK、NLRP3、GAPDH 一抗,4℃下过夜孵育,加二抗室温反应 2 h,ECL 显色,ImageJ 软件分析灰度值。实验独立重复 3 次,代表性条带为一致性最佳结果, $n=6$ 时检测效能>80%($\alpha=0.05$)。

1.4 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,SPSS 25.0 统计软件分析,样本量 $n=6$ 。基于预实验凋亡率效应量 $d=1.2$,以 $\alpha=0.05$,检验效能 80%,通过 G*Power 3.1 软件计算得出,符合规范。计量数据经 Shapiro-Wilk 检验正态性,Levene 检验方差齐性;符合条件者多组比较用方差分析,组间两两比较用 SNK- q 检验;不符合者多组比较则用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较用 Dunn 检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代软骨细胞鉴定结果

小鼠原代软骨细胞接种后黏附融合,3 d 内融合率达 95%,随后呈现典型旋涡状纤维团形态,见图 1(a)。甲苯胺蓝染色显示细胞同时表达 COLⅠ与 COLⅡ,且 COLⅡ表达量更高,见图 1(b,c)。COLⅡ免疫荧光染色胞质见特异性绿色荧光,阳性率≥90%;COLⅠ荧光微弱,表明培养细胞以软骨特异性 COLⅡ表达为主,符合软骨细胞特性,见图 1(d,e)。

2.2 鼠尾草酚对细胞增殖的影响

CAR 组、CK+Compound C 组与 CK 组细胞增殖率差异无统计学意义($P>0.05$);H₂O₂ 组较 CK 组细胞增殖率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);L/M/H-CAR 组较 H₂O₂ 组细胞增殖率升高,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H₂O₂ 组相比,H-CAR 组细胞增殖率从 38.64%±4.12%升至 91.34%±8.37%;H-CAR+Compound C 组较 H-

CAR 组细胞增殖率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2 和表 1。

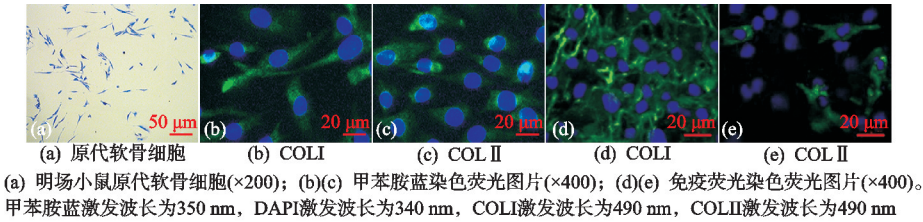


图 1 原代软骨细胞鉴定结果

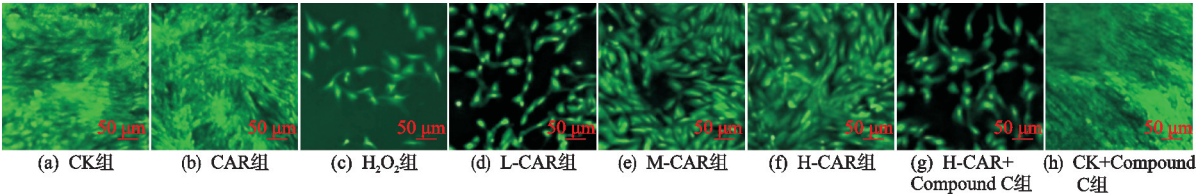


图 2 Calcein-AM 染色检测软骨细胞活性(×200, 激发波长为 490 nm)

表 1 鼠尾草酚对软骨细胞增殖和凋亡的影响($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞增殖率	细胞凋亡率
CK 组	123.14±12.50	5.34±0.56
CAR 组	121.69±12.43	5.41±0.59
H ₂ O ₂ 组	38.64±4.12 ¹⁾	31.57±3.35 ¹⁾
L-CAR 组	53.67±5.61 ²⁾	25.66±2.79 ²⁾
M-CAR 组	72.51±7.78 ²⁾³⁾	17.59±1.93 ²⁾³⁾
H-CAR 组	91.34±8.37 ²⁾³⁾⁴⁾	6.78±0.71 ²⁾³⁾⁴⁾
H-CAR+Compound C 组	47.33±5.06 ⁵⁾	28.79±3.02 ⁵⁾
CK+Compound C 组	123.08±12.46	5.39±0.58

注:1)与 CK 组相比, $P < 0.05$; 2)与 H₂O₂ 组相比, $P < 0.01$; 3)与 L-CAR 组相比, $P < 0.05$; 4)与 M-CAR 组相比, $P < 0.05$; 5)与 H-CAR 组相比, $P < 0.01$ 。

2.3 鼠尾草酚对细胞凋亡的影响

CAR 组、CK+Compound C 组与 CK 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); H₂O₂ 组较 CK 组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); L/M/H-CAR 组较 H₂O₂ 组细胞凋亡率降低, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 组相比, H-CAR 组细胞凋亡率从 31.57%±3.35%降至 6.78%±0.71%; H-CAR+Compound C 组较 H-CAR 组细胞凋亡率升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3 及表 1。

2.4 鼠尾草酚对细胞活性氧荧光强度的影响

CAR 组、CK+Compound C 组与 CK 组活性氧荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); H₂O₂ 组较 CK

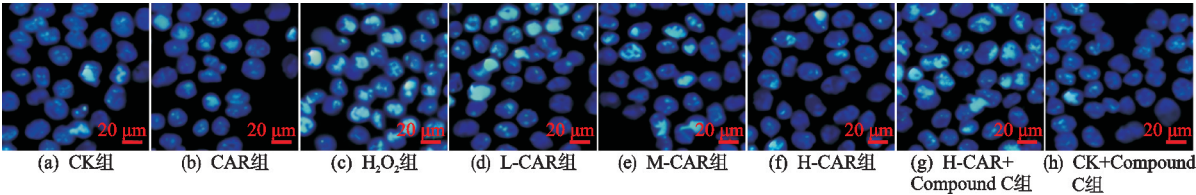


图 3 Hoechst 33342 染色检测软骨细胞凋亡(×400, 激发波长为 350 nm)

组活性氧荧光强度增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); L/M/H-CAR 组较 H₂O₂ 组活性氧荧光强度减弱, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 组相比, H-CAR 组活性氧荧光强度从 68.15±7.02 降至 12.34±1.38; H-CAR+Compound

C 组较 H-CAR 组活性氧荧光强度增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4-图 6。

2.5 鼠尾草酚对细胞 SOD、MDA 和 TNF-α、IL-6、IL-8 水平的影响

CAR 组、CK + Compound C 组与 CK 组 SOD、

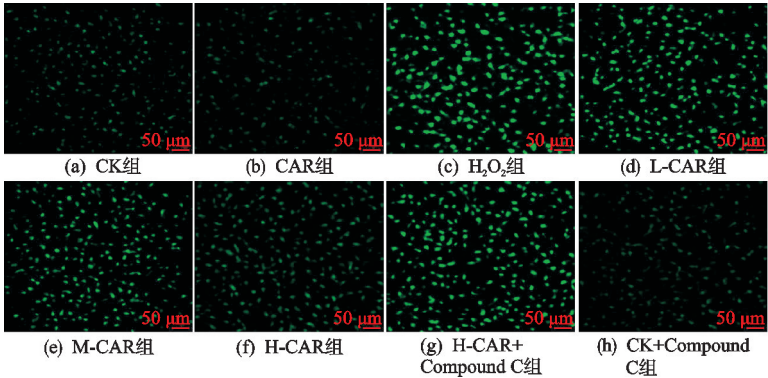
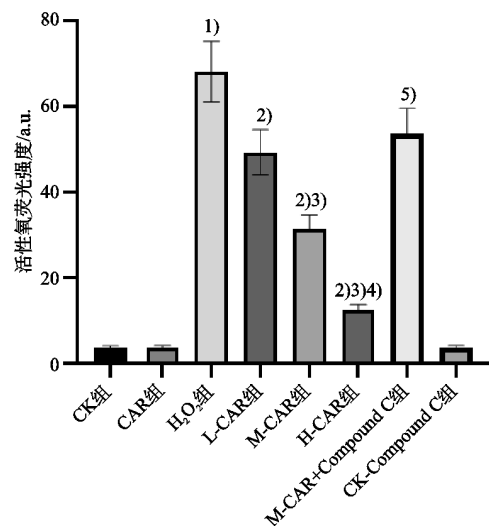


图 4 DCFH-DA 荧光探针检测软骨细胞活性氧荧光强度(×200, 激发波长为 488 nm)



注: 1)与CK组相比, $P<0.05$; 2)与 H_2O_2 组相比, $P<0.01$; 3)与L-CAR组相比, $P<0.05$; 4)与M-CAR组相比, $P<0.05$; 5)与H-CAR组相比, $P<0.01$ 。

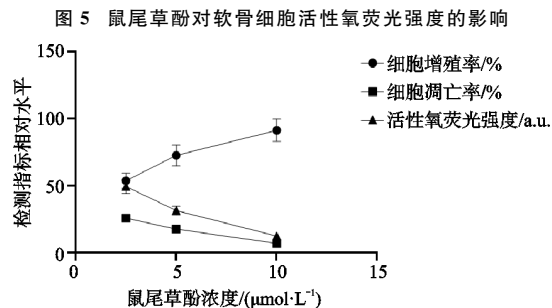


图 6 鼠尾草酚浓度对软骨细胞增殖率、凋亡率及活性氧荧光强度的影响

表 2 鼠尾草酚对软骨细胞 SOD、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD/ ($U \cdot mL^{-1}$)	MDA/ ($nmol \cdot mL^{-1}$)	TNF- α / ($pg \cdot mL^{-1}$)	IL-6/ ($pg \cdot mL^{-1}$)	IL-8/ ($pg \cdot mL^{-1}$)
CK 组	63.21 ± 6.51	2.03 ± 0.23	20.36 ± 0.23	9.33 ± 1.02	32.55 ± 0.36
CAR 组	62.19 ± 6.47	2.08 ± 0.24	20.61 ± 0.25	9.42 ± 1.05	32.71 ± 0.39
H_2O_2 组	$28.16 \pm 3.02^{1)}$	$4.78 \pm 0.49^{1)}$	$51.69 \pm 0.54^{1)}$	$32.09 \pm 3.37^{1)}$	$67.38 \pm 0.69^{1)}$
L-CAR 组	$39.27 \pm 4.11^{2)}$	$3.92 \pm 0.42^{2)}$	$40.68 \pm 0.43^{2)}$	$25.71 \pm 2.69^{2)}$	$56.14 \pm 0.58^{2)}$
M-CAR 组	$50.33 \pm 5.29^{2)3)}$	$3.04 \pm 0.32^{2)3)}$	$32.57 \pm 0.35^{2)3)}$	$18.32 \pm 1.93^{2)3)}$	$45.32 \pm 0.49^{2)3)}$
H-CAR 组	$62.78 \pm 6.46^{2)3)4)}$	$2.11 \pm 0.25^{2)3)4)}$	$22.03 \pm 0.26^{2)3)4)}$	$10.07 \pm 1.10^{2)3)4)}$	$34.70 \pm 0.38^{2)3)4)}$
H-CAR+Compound C 组	$34.29 \pm 3.67^{5)}$	$4.25 \pm 0.44^{5)}$	$46.99 \pm 0.49^{5)}$	$28.53 \pm 3.05^{5)}$	$61.34 \pm 0.63^{5)}$
CK+Compound C 组	63.23 ± 6.52	2.07 ± 0.24	20.47 ± 0.24	9.41 ± 1.04	32.61 ± 0.38

注: 1)与CK组相比, $P<0.05$; 2)与 H_2O_2 组相比, $P<0.01$; 3)与L-CAR组相比, $P<0.05$; 4)与M-CAR组相比, $P<0.05$; 5)与H-CAR组相比, $P<0.01$ 。

NLRP3、p-AMPK/AMPK 差异无统计学意义 ($P>0.05$); H_2O_2 组较 CK 组 Col2 α 1、p-AMPK/AMPK 降低, NLRP3 升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); L/M/H-CAR 组较 H_2O_2 组 Col2 α 1、p-AMPK/AMPK 升高, NLRP3 降低, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 H_2O_2 组相比, H-CAR 组 Col2 α 1、p-AMPK/AMPK 从 0.30 ± 0.04 , 0.31 ± 0.04 升至 1.07 ± 0.12 , 0.79 ± 0.08 , NLRP3 从 1.28 ± 0.14 降至 0.51 ± 0.06 ; H-CAR+Compound C 组较 H-CAR 组 Col2 α 1、p-AMPK/AMPK 降低, NLRP3 升高, 差异

MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 差异无统计学意义 ($P>0.05$); H_2O_2 组较 CK 组 SOD 降低, MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); L/M/H-CAR 组较 H_2O_2 组 SOD 升高, MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 降低, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 H_2O_2 组相比, H-CAR 组 SOD 从 $(28.16 \pm 3.02)U/mL$ 升至 $(62.78 \pm 6.46)U/mL$, MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 分别从 $(4.78 \pm 0.49)nmol/mL$ 、 $(51.69 \pm 0.54)pg/mL$ 、 $(32.09 \pm 3.37)pg/mL$ 、 $(67.38 \pm 0.69)pg/mL$ 降至 $(2.11 \pm 0.25)nmol/mL$ 、 $(22.03 \pm 0.26)pg/mL$ 、 $(10.07 \pm 1.10)pg/mL$ 、 $(34.70 \pm 0.38)pg/mL$; H-CAR+Compound C 组较 H-CAR 组 SOD 降低, MDA、TNF- α 、IL-6、IL-8 升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 7 及表 2。

2.6 鼠尾草酚对细胞特异性蛋白及 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白的影响

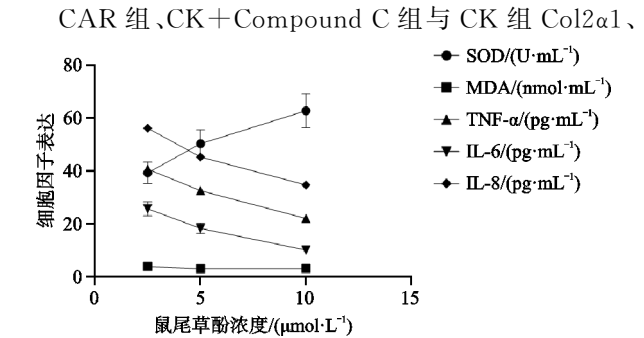


图 7 鼠尾草酚浓度对软骨细胞因子表达的影响

图 8 鼠尾草酚浓度对软骨细胞 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

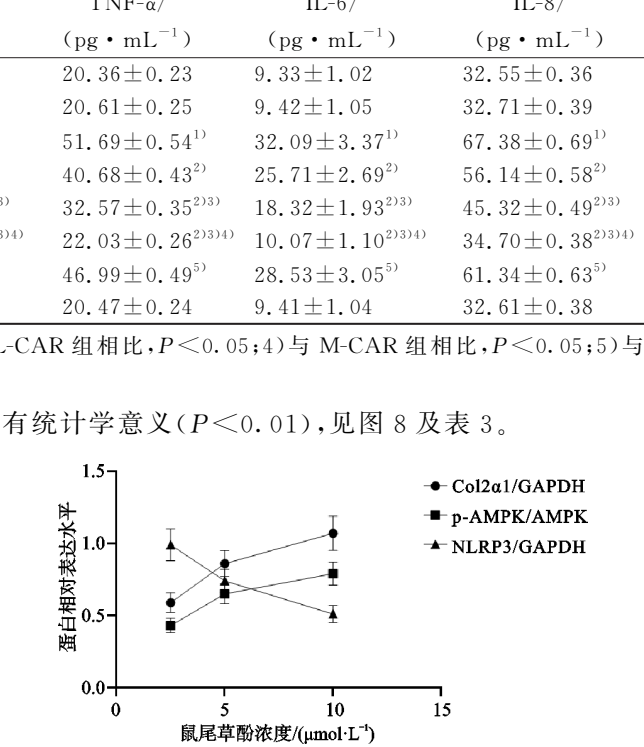


图 8 鼠尾草酚浓度对软骨细胞 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 8 及表 3。

表3 鼠尾草酚对软骨细胞 Col2 α 1、p-AMPK/AMPK、NLRP3 蛋白表达的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Col2 α 1/GAPDH	p-AMPK/AMPK	NLRP3/GAPDH
CK 组	1.18 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.05
CAR 组	1.15 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.06
H ₂ O ₂ 组	0.30 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.31 $\pm$ 0.04 ¹⁾	1.28 $\pm$ 0.14 ¹⁾
L-CAR 组	0.59 $\pm$ 0.07 ²⁾	0.43 $\pm$ 0.05 ²⁾	0.99 $\pm$ 0.11 ²⁾
M-CAR 组	0.86 $\pm$ 0.09 ²⁾³⁾	0.65 $\pm$ 0.07 ²⁾³⁾	0.74 $\pm$ 0.08 ²⁾³⁾
H-CAR 组	1.07 $\pm$ 0.12 ²⁾³⁾⁴⁾	0.79 $\pm$ 0.08 ²⁾³⁾⁴⁾	0.51 $\pm$ 0.06 ²⁾³⁾⁴⁾
H-CAR+Compound C 组	0.46 $\pm$ 0.05 ⁵⁾	0.36 $\pm$ 0.05 ⁵⁾	1.11 $\pm$ 0.13 ⁵⁾
CK+Compound C 组	1.17 $\pm$ 0.13	0.84 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.06

注:1)与 CK 组相比, $P<0.05$;2)与 H₂O₂ 组相比, $P<0.01$;3)与 L-CAR 组相比, $P<0.05$;4)与 M-CAR 组相比, $P<0.05$;5)与 H-CAR 组相比, $P<0.01$ 。

3 讨论

骨关节炎以关节软骨退变为核心病理,疼痛与活动障碍严重影响生活^[9]。临床药物仅能缓解症状,无法逆转退变且有副作用,研发高效低毒干预药物至关重要。鼠尾草酚作为迷迭香主要植物多酚成分,具有抗炎、抗氧化活性^[10]。已有研究表明,鼠尾草酚可抑制脂多糖(LPS)诱导的骨质流失及破骨细胞生成,且可通过 HO-1 抑制软骨下破骨细胞活化、改善骨关节炎^[7,11]。本研究首次发现鼠尾草酚可直接作用于软骨细胞,通过 AMPK/NLRP3 通路调控细胞凋亡、氧化应激和炎症反应,补充了鼠尾草酚在骨关节炎干预中的细胞自主性保护机制;同时明确 10 μ mol/L 为最佳干预浓度,为体内实验剂量选择提供依据。氧化应激是骨关节炎病变关键环节,过量活性氧会干扰细胞信号转导,降低软骨细胞存活时间,减弱软骨基质代谢能力并诱发细胞功能障碍及滑膜炎^[12];还会导致丙二醛水平上升,超氧化物歧化酶活性降低,进而加剧炎症反应,推动骨关节炎进展^[13]。炎症亦是骨关节炎发展的重要驱动因素,软骨细胞损伤后, TNF- α 、IL-6、IL-8 等促炎因子表达上调,加速细胞凋亡,加重软骨损伤^[14]。Col2 α 1 作为软骨特异性基因,编码 II 型胶原蛋白,对维持软骨结构与功能至关重要,骨关节炎进展中其表达因氧化应激和炎症因子作用显著降低,加速软骨基质降解^[15]。本研究显示, CAR 组较 CK 组数据表达均无差异,表明鼠尾草酚及溶剂本身对软骨细胞生理功能无明显影响, H₂O₂ 诱导后, 软骨细胞增殖率、超氧化物歧化酶、Col2 α 1 降低, 细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8 升高, 而鼠尾草酚干预后, 上述指标均呈现相反变化趋势, 表明 H₂O₂ 会加剧软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应, 鼠尾草酚则通过抗氧化、抑制凋亡、减少炎症反应及维持软骨基质合成, 对 H₂O₂ 诱导的原代软骨细胞损伤发挥保护作用。

AMPK 作为广泛存在于哺乳动物组织细胞中的核心能量感知激酶, 不仅调控能量和物质代谢, 还通过磷酸化修饰参与炎症反应等生物学过程。骨关节炎病

理中, NLRP3 炎症小体激活可促进促炎因子释放, 上调 MMP-13、ADAMTS-5 等软骨基质降解酶表达, 而 AMPK 磷酸化激活后可靶向 NLRP3 的 Ser555 位点, 抑制其与凋亡相关斑点样蛋白(ASC)结合及多聚体组装, 阻断下游炎症级联反应^[16-17]。已有研究证实, AMPK/NLRP3 通路可介导天然药物对骨关节炎的抗炎保护作用^[8]。本研究以 H₂O₂ 诱导的氧化应激骨关节炎模型为靶点, 进一步拓展了该通路的应用场景。本研究显示 H₂O₂ 诱导可使 p-AMPK/AMPK 降低, NLRP3 升高, 同时软骨基质标志性蛋白 Col2 α 1 表达下调, 提示 H₂O₂ 可抑制 AMPK/NLRP3 通路, 加剧软骨细胞损伤及基质代谢紊乱。鼠尾草酚处理后, p-AMPK/AMPK 升高, NLRP3 降低, Col2 α 1 上调, 提示鼠尾草酚可激活 AMPK/NLRP3 通路发挥抗炎作用, 还可减少基质降解酶的产生, 进而维持软骨基质完整性。进一步加入 AMPK 抑制剂 Compound C 后, 与 H-CAR 组相比, 细胞增殖率、超氧化物歧化酶、Col2 α 1、p-AMPK/AMPK 降低, 细胞凋亡率、活性氧荧光强度、丙二醛、TNF- α 、IL-6、IL-8、NLRP3 升高; CK+Compound C 组较 CK 组数据表达均无差异, 表明 Compound C 仅通过抑制 AMPK 通路影响鼠尾草酚的作用, 而非直接损伤细胞, 进而说明鼠尾草酚对 H₂O₂ 诱导软骨细胞损伤的保护作用可能依赖于 AMPK/NLRP3 通路的激活。

综上所述, 鼠尾草酚可能通过激活 AMPK/NLRP3 通路, 减轻 H₂O₂ 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应, 进而发挥保护作用。但本研究也存在局限性, 单一细胞模型难模拟骨关节炎复杂微环境且未验证通路分子互作。后续需构建动物模型验证效果, 结合生物标志物研究探索早期干预价值, 助力临床转化。

参考文献

- [1] REN P J, ZHENG C, PANG Y D, et al. Single-cell analysis of the somatic mutational landscape in human chondrocytes during aging and in osteoarthritis [J]. Nature

- Aging, 2025, 5(12): 2417-2431.
- [2] CHENG F, YAN F F, LIU Y P, et al. Dexmedetomidine inhibits the NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome to attenuate papain-induced osteoarthritis in rats[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2019, 57(1): 649-659.
- [3] HUANG K K, FU W H, WANG A Q, et al. MSRB2 ameliorates H₂O₂-induced chondrocyte oxidative stress and suppresses apoptosis in osteoarthritis[J]. *Immunological Investigations*, 2024, 53(5): 813-829.
- [4] LU S S, LI Y W, SHEN Q, et al. Carnosol and its analogues attenuate muscle atrophy and fat lipolysis induced by cancer cachexia[J]. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2021, 12(3): 779-795.
- [5] 魏超, 于江, 盛关云, 等. 棕矢车菊素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对骨关节炎大鼠炎性损伤的影响[J]. *中国药房*, 2025, 36(4): 421-426.
- [6] 程瑛, 陈慧娟, 杨婷. 二氢杨梅素通过 ROS/p38-MAPK 信号通路对 H₂O₂ 诱导骨关节炎软骨细胞增生、凋亡的影响[J]. *中国骨伤*, 2025, 38(4): 396-402.
- [7] 易艳梓, 来孟琪, 陈秀天, 等. 鼠尾草酚调控 Nrf2/HO-1 信号通路介导成骨分化治疗骨质疏松症的研究[J]. *中国医药导报*, 2024, 21(22): 40-45.
- [8] 李均, 徐艺, 冉阳, 等. 汉黄芩素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(17): 3211-3216.
- [9] AN X Y, WANG J, XU K, et al. Perspectives on osteoarthritis treatment with mesenchymal stem cells and radix achyranthis bidentatae[J]. *Aging and Disease*, 2024, 15(3): 1029-1045.
- [10] HABTEMARIAM S. Anti-inflammatory therapeutic mechanisms of natural products; insight from rosemary diterpenes, carnosic acid and carnosol[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2): 545-558.
- [11] CHU M, CHEN G D, CHEN K, et al. Heme oxygenase 1 linked to inactivation of subchondral osteoclasts in osteoarthritis[J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2024, 25(6): 513-528.
- [12] GEYER M, SCHÖNFELD C. Novel insights into the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Current Rheumatology Reviews*, 2018, 14(2): 98-107.
- [13] YANG Y T, SHEN P Y, YAO T, et al. Novel role of circRSU1 in the progression of osteoarthritis by adjusting oxidative stress[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1877-1900.
- [14] DING Y J, WANG L F, ZHAO Q, et al. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(2): 779-790.
- [15] 王勇麟, 王哲纬, 杨渊. 金雀异黄酮对脂多糖诱导的软骨细胞氧化应激和炎症因子的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(5): 787-791.
- [16] LIU X, ZHAO J, JIANG H H, et al. ALPK1 accelerates the pathogenesis of osteoarthritis by activating NLRP3 signaling[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2022, 37(10): 1973-1985.
- [17] ZHANG J, HUANG L L, SHI X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(23): 24270-24287.

(收稿日期: 2025-10-29)