



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：金雀异黄酮对依托泊苷诱导软骨细胞衰老的保护作用及其机制
作者：王金虹，陈天宇，毛丽芳，赵英杰，周仁鹏，胡伟，鲁超
网络首发日期：2026-02-09
引用格式：王金虹，陈天宇，毛丽芳，赵英杰，周仁鹏，胡伟，鲁超. 金雀异黄酮对依托泊苷诱导软骨细胞衰老的保护作用及其机制[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260209.1506.012>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

金雀异黄酮对依托泊苷诱导软骨细胞衰老的保护作用及其机制

王金虹^{1,2}, 陈天宇^{1,2}, 毛丽芳^{1,2}, 赵英杰^{1,2}, 周仁鹏^{1,2}, 胡伟^{1,2}, 鲁超^{1,3}

(¹安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ²安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心, 合肥 230601; ³安徽理工大学第一附属医院药物临床试验研究中心, 淮南 232007)

摘要 **目的** 探究金雀异黄酮 (Gen) 对依托泊苷 (etoposide) 诱导的软骨细胞衰老的保护作用及其机制。**方法** 采用不同浓度的 Gen 和 etoposide 处理 C28/I2 细胞系, CCK-8 法检测细胞活力。用 etoposide 诱导 C28/I2 软骨细胞衰老模型, Gen 进行干预。采用衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色法检测软骨细胞的衰老阳性率及染色特征。采用蛋白质印迹法 (Western blot)、逆转录-定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和免疫荧光染色法检测过氧化物还原酶 6 (Prdx6)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 A (p21)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A (p16) 表达。使用谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性。通过分子对接验证 Gen 与 Prdx6 的直接结合。最后采用 Prdx6-siRNA 沉默实验明确 Prdx6 的功能必要性。**结果** 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组 C28/I2 软骨细胞活性升高 ($P < 0.01$)、软骨细胞衰老相关蛋白 p21、p16 表达降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)、软骨细胞衰老相关基因 *p21*、*p16* 的表达降低 (均 $P < 0.01$)、软骨细胞衰老相关蛋白 p21、p16 的荧光强度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SA- β -gal 阳性细胞比例降低 ($P < 0.01$)。与 Control 组相比, etoposide 组 Prdx6 表达降低 ($P < 0.05$); 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组 Prdx6 表达升高 ($P < 0.01$)。与 Control 组相比, si-Prdx6 组 GPx 活性降低 ($P < 0.01$); 与 si-Prdx6 组相比, si-Prdx6+Gen 组 GPx 活性升高 ($P < 0.05$)。分子对接结果显示, Gen 与 Prdx6 活性位点存在氢键相互作用。Prdx6 敲低后 Gen+etoposide+si-Prdx6 组软骨细胞衰老相关基因 *p21*、*p16* 的表达和软骨细胞衰老相关蛋白 p21、p16 的荧光强度升高 (均 $P < 0.01$)。**结论** Gen 可通过上调 Prdx6 表达, 抑制 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞衰老。研究为软骨细胞衰老相关疾病的预防与治疗提供了潜在药物。

关键词 金雀异黄酮; Prdx6; 软骨细胞; 衰老; 分子对接; 依托泊苷

基金项目: 安徽省卫生健康科研项目 (编号: AHWJ2024Aa40016); 合肥综合性国家科学中心大健康研究院职业医学与健康联合研究中心开放基金项目 (编号: OMH-2023-03); 安徽自然科学基金项目 (编号: 2208085MH215); 安徽省中医药传承创新科研项目 (编号: 2020cczd05)

作者简介: 王金虹, 男, 硕士研究生;

鲁超, 男, 硕士, 研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: chaolu@aust.edu.cn

中图分类号 R 996

文献标志码 A

Protective effect and mechanism of genistein on etoposide-induced chondrocyte senescence

Wang Jinhong^{1,2}, Chen Tianyu^{1,2}, Mao Lifang^{1,2}, Zhao Yingjie^{1,2}, Zhou Renpeng^{1,2}, Hu Wei^{1,2},
Lu Chao^{1,3}

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Drug Clinical Trial Research Center, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ³Drug Clinical Trial Research Center, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232007)

Abstract **Objective** To investigate the protective effect of genistein (Gen) on etoposide-induced chondrocyte senescence and its underlying mechanism. **Methods** The C28/I2 cell line was treated with different concentrations of Gen and etoposide, and the cell viability was detected by the CCK-8 assay. The senescence model of C28/I2 chondrocytes was induced by etoposide, with Gen intervention. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining was performed to detect the senescence-positive rate and staining characteristics of chondrocytes. The expressions of peroxiredoxin 6 (Prdx6), cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), and cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16) were detected by Western blot, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and immunofluorescence staining. The activity of glutathione peroxidase (GPx) was determined using a glutathione peroxidase assay kit. The direct binding between Gen and Prdx6 was verified by molecular docking. Finally, Prdx6-siRNA silencing experiment was performed to clarify the functional necessity of Prdx6. **Results** Compared with the etoposide group, the C28/I2 chondrocyte viability significantly increased ($P < 0.01$), the expression of senescence-associated proteins p21 and p16 decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the expression of senescence-associated genes *p21* and *p16* reduced (both $P < 0.01$), the fluorescence intensity of senescence-associated proteins p21 and p16 was diminished ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the proportion of SA- β -gal-positive cells decreased ($P < 0.01$) in the Gen+etoposide group. Compared with the Control group, the expression of Prdx6 was downregulated in the etoposide group ($P < 0.05$). Compared with the etoposide group, the expression of Prdx6 was upregulated in the Gen+etoposide group ($P < 0.01$).

Compared with the Control group, the GPx activity significantly decreased in the si-Prdx6 group ($P<0.01$). Furthermore, compared with the si-Prdx6 group, the GPx activity increased in the si-Prdx6+Gen group ($P<0.05$). Molecular docking results revealed that Gen formed hydrogen bond interactions with the active site of Prdx6. After Prdx6 knockdown, the expression of senescence-associated genes *p21* and *p16* and the fluorescence intensity of senescence-associated proteins p21 and p16 both increased in the Gen+etoposide+si-Prdx6 group (both $P<0.01$). **Conclusion** Gen can inhibit etoposide-induced senescence of C28/I2 chondrocytes by upregulating the expression of Prdx6. This study provides potential drug targets and experimental basis for the prevention and treatment of chondrocyte senescence-related diseases.

Keywords genistein; Prdx6; chondrocytes; senescence; molecular docking; etoposide

Fund programs Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2024Aa40016); Occupational Medicine and Health Joint Research Project from Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center (No. OMH-2023-03); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH215); Scientific Research Project of Inheritance and Innovation of Traditional Chinese Medicine in Anhui Province.(No. 2020cczd05)

Corresponding author Lu Chao, E-mail: chaolu@aust.edu.cn

软骨细胞是关节软骨组织内唯一细胞类型,对细胞外基质合成更新及软骨组织稳态维系至关重要^[1]。软骨细胞衰老是软骨退行性疾病的核心驱动因素,可破坏细胞代谢与关节微环境平衡、抑制组织修复能力^[2]。靶向干预衰老软骨细胞信号通路可延缓病变进程^[3]。氧化应激通过活性氧损伤细胞结构,激活衰老信号通路,加速软骨衰老^[4]。过氧化物还原酶 6 (peroxiredoxin 6, Prdx6) 作为过氧化物还原蛋白家族的多功能酶,在抗氧化防御中作用关键^[5]。研究^[6-7]表明 Prdx6 调控衰老与代谢性肌少症的交互作用,还可介导细胞外囊泡对骨关节炎软骨细胞的保护作用。金雀异黄酮 (genistein, Gen) 是异黄酮类的非甾体植物雌激素^[8]。Gen 具有抗炎、抗氧化和免疫调节等功能^[9-10]。不同剂量 Gen 可抑制骨关节炎模型大鼠关节疼痛与炎症,减轻软骨细胞凋亡及软骨破坏^[11-12]。但 Gen 是否通过调控 Prdx6 发挥抗软骨细胞衰老作用尚未明确。该文拟探究 Gen 对依托泊苷 (etoposide) 诱导的软骨细胞衰老的保护作用及机制,为软骨退行性疾病防治提供潜在靶点与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 软骨细胞系 (C28/I2) 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 试剂 Gen (CAS 编号: 446-72-0, 纯度 $\geq 98\%$) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; etoposide (CAS 号: 33419-42-0, 纯度: 99.62%) 购自美国 MedChemExpress 公司; 胎牛血清 (No. 086-450) 购自南京维森特生物技术有限公司; RIAP 裂解液、 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, SA- β -gal) 检测试剂盒及胰酶 (货号: P0013B、C0602、C0201) 购自上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒 (货号: C0005) 购自美国 Target MOL 公司; 抗 Prdx6 抗体 (anti-peroxiredoxin 6 antibody)、抗细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A 抗体 (anti-cyclin-dependent kinase inhibitor 1A antibody)、抗细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A 抗体 (anti-cyclin-dependent kinase inhibitor 2A antibody) (货号: ab73350、ab288213、ab270058) 购自美国 Abcam 公司; β -actin 内参抗体、Western blot 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (货号: TA-09、ZB-2301、ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱 (型号: 371Steri-Cycle) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 酶标仪 (型号: 800TS) 购自美国 BioTek 公司; 荧光倒置显微镜 (型号: AxioVert.A1) 购自德国 ZEISS 公司; 电泳仪 (型号: EpS 300) 购自上海天能科技有限公司; 高速冷冻离心机 (型号: 5424 R) 购自德国 Eppendorf 公司; 超净工作台 (型号: SW-CJ-1FD) 购自苏州净化设备有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: CFX Connect) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 软骨细胞培养采用含 10%胎牛血清和 1%双抗 (青霉素-链霉素混合液) 的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行。待细胞贴壁生长至培养瓶底铺满时, 使用胰蛋白酶消化液进行传代处理, 获得的细胞用于后续实验研究。

1.3.2 药物处理 将 1.69 mg Gen 和 11.77 mg etoposide 分别溶于 1 mL DMSO 得 6.25 mmol/L 和 20 mmol/L 储备液 (-20 °C避光); 用时取 1 μ L 或 0.25 μ L 储备液直接加至 1 mL 完全培养基, 混匀即得 6.25 μ mol/L Gen 或 5 μ mol/L etoposide 工作液, 联合组则两个储备液按 1 μ L+0.25 μ L 同管稀释至 1 mL; 弃原培养基后 12 孔板每孔加 1 mL 工作液, 37 °C、5% CO₂ 孵育 24 h, 全程避光。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 首先在 96 孔板中接种适量细胞悬液, 每孔 100 μ L, 加入相应药物处理 24 h, 待细胞贴壁生长。检测前, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 轻轻振荡使试剂与培养基充分混匀, 避免产生气泡。将培养板置于培养箱中避光孵育 1~4 h, 待溶液显色反应达到稳定状态后, 采用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度。

1.3.4 细胞衰老 SA-β-gal 检测 将加药处理好的 24 孔板细胞吸弃培养液,用 PBS 润洗 3 次后,加 1 mL 含 2%多聚甲醛的固定液室温固定 15 min,再用 PBS 漂洗 3 次。吸净后加现配染色工作液,封口膜密封,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱避光孵育 12~16 h。染色完成后若不立即观察,可移除染色液,加 PBS 于 4 °C 保存。观察时用普通光学显微镜计数蓝色颗粒沉积的衰老阳性细胞,计算其占总细胞数的百分比来量化细胞衰老水平。

1.3.5 实时定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 将加药处理好的 6 孔板软骨细胞,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定 RNA 浓度并评估纯度。通过逆转录反应将 RNA 成 cDNA。在 mRNA 表达水平检测中,采用两步式 PCR 扩增策略对目标基因进行特异性扩增。经扩增完成后,运用相对定量算法,精准测算 mRNA 的相对表达丰度。RT-qPCR 合成的基因序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab.1 Sequences of primers for RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Revers primer (5'-3')
<i>Gapdh</i>	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT
<i>Prdx6</i>	GACTCATGGGGCATTCTCTTC	CAAGCTCCCGATTCTATCATC
<i>p16</i>	GGAAGGTCCCTCAGACATC	GCGCTACCTGATTCCAATTC
<i>p21</i>	GACATCTCAGGGCCGAAAAC	GAATGAAGGCTAAGGCCAGAAGA

1.3.6 Western blot 定量分析 将加药处理的 6 孔板软骨细胞,用蛋白裂解液提取蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完成后,再转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上用 5%脱脂牛奶封闭。然后使用 TBST 洗膜,加特异性一抗于 4 °C 湿盒过夜,次日加入对应种属的二抗 (如山羊抗兔/鼠 IgG) 进行孵育。最后采用增强化学发光 (ECL) 或显色底物可视化免疫复合物,利用 ImageJ 软件量化条带灰度值,获取目标蛋白相对表达量。

1.3.7 免疫荧光染色 将加药处理好的 24 孔板软骨细胞,用 PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min。以含 0.2% Triton X-100 溶液通透细胞膜,1% BSA 封闭液孵育 1 h。加特异性一抗于 4 °C 湿盒过夜,次日避光用 Alexa Fluor 488 二抗孵育 1 h, DAPI 复染细胞核 10 min,滴抗荧光淬灭剂封片后,立即用荧光显微镜观察采集图像。

1.3.8 Prdx6-siRNA 转染 当接种达到 70% ~80%细胞密度的 C28/I2 软骨细胞 6 孔板,吸弃培养液,用 PBS 洗涤细胞。配制转染体系:取 Opti-MEM 培养基分别稀释 Lipofectamine™

3000 试剂和 Prdx6-siRNA 或阴性对照 siRNA，将二者混匀，继续孵育 15~20 min 形成复合物。把复合物逐滴加入含无血清培养基的细胞孔中，轻轻晃动培养板。放置培养箱转染 6 h 后更换为完全培养基，加入药物后继续培养即可开展后续实验。

1.3.9 Gen 分子与 Prdx6 蛋白的对接 利用 Autodock 进行分子对接实验，并利用 Pymol 和 Ligplus 进行结果可视化，展示 Gen 分子与 Prdx6 蛋白相互作用。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad prism 8.0 软件分析数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间差异比较采用单因素方差分析，两组间差异的比较采用 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gen 对 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞活力的影响 CCK-8 法分析结果显示，使用不同浓度的 etoposide (1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 C28/I2 软骨细胞 24 h 后，与 Control 组相比，5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度组细胞活性降低，故确定 5 $\mu\text{mol/L}$ 为造模浓度 ($t = 5.39, P < 0.01$)，见图 1A。用不同浓度 Gen 处理 C28/I2 软骨细胞 24 h 后，与 Control 组相比，Gen 的浓度在 25 $\mu\text{mol/L}$ 以下，不影响细胞活性，当 Gen 的浓度 $\geq 50 \mu\text{mol/L}$ 则细胞活性下降，提示 25 $\mu\text{mol/L}$ 为 Gen 的安全浓度上限 ($t = 12.07, P < 0.01$)，见图 1B。通过使用 5 $\mu\text{mol/L}$ etoposide 与不同浓度 Gen (6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 共处理 C28/I2 软骨细胞 24 h 后，与 etoposide 组相比，Gen + etoposide 组当 Gen 的浓度达到 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞活性提高。因此，取 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度用于后续研究 ($t = 18.60, P < 0.01$)，见图 1C。

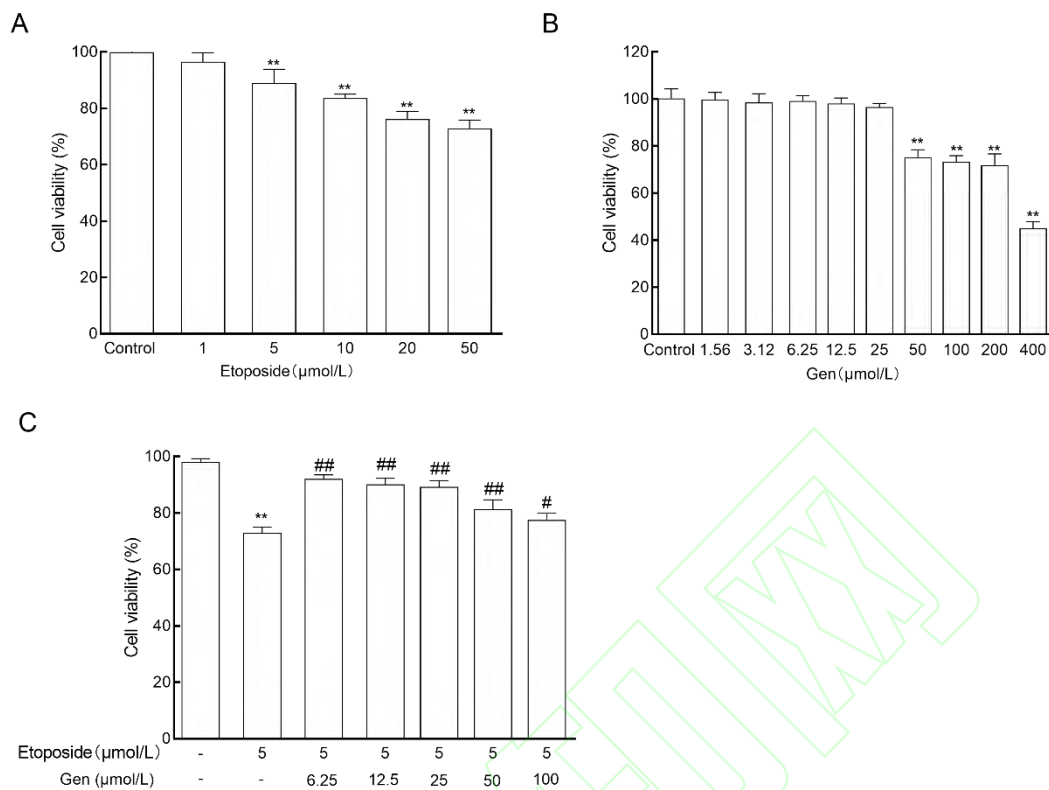


图 1 Gen 对 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞活力的影响

Fig. 1 The effects of Gen on the viability of etoposide-induced C28/I2 chondrocytes

A: The effects of different concentrations of etoposide on the viability of C28/I2 chondrocytes detected by CCK-8 assay; B: Cytotoxicity of different concentrations of Gen on C28/I2 chondrocytes detected by CCK-8 assay; C: Viability of C28/I2 chondrocytes treated with Gen combined with etoposide detected by CCK-8 assay; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs etoposide group.

2.2 Gen 对 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞衰老的影响 为明确 Gen 对 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞衰老的影响，采用 etoposide 诱导建立 C28/I2 软骨细胞衰老，通过多种方法检测衰老相关指标。Western blot 检测结果显示：与 Control 组相比，etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的蛋白表达升高 ($t=8.89$, $P<0.01$; $t=2.45$, $P<0.05$)；与 Etoposide 组相比，Gen+etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的蛋白降低 ($t=4.70$, $P<0.01$; $t=7.24$, $P<0.05$)，见图 2A-2C。RT-qPCR 法结果显示：与 Control 组相比，etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的基因表达升高 ($t=8.85$ 、 7.93 , 均 $P<0.01$)；与 etoposide 组相比，Gen+etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的基因表达降低 ($t=3.94$ 、 6.05 , 均 $P<0.01$)，见图 2D、2E。免疫荧光法结果显示：与 Control 组相比，etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的荧

光强度升高 ($t=5.61$ 、 30.38 , 均 $P<0.01$) ; 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组衰老标志物 p21、p16 的荧光强度降低 ($t=2.78$ 、 $P<0.05$; $t=13.25$, $P<0.01$) , 见图 2F、2G。SA- β -gal 染色结果显示: 与 Control 组相比, etoposide 组衰老细胞阳性率升高 ($t=14.61$, $P<0.01$) ; 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组衰老细胞阳性率降低 ($t=5.90$, $P<0.01$) , 见图 2H。以上结果提示 Gen 能有效抑制 etoposide 诱导的软骨细胞衰老。



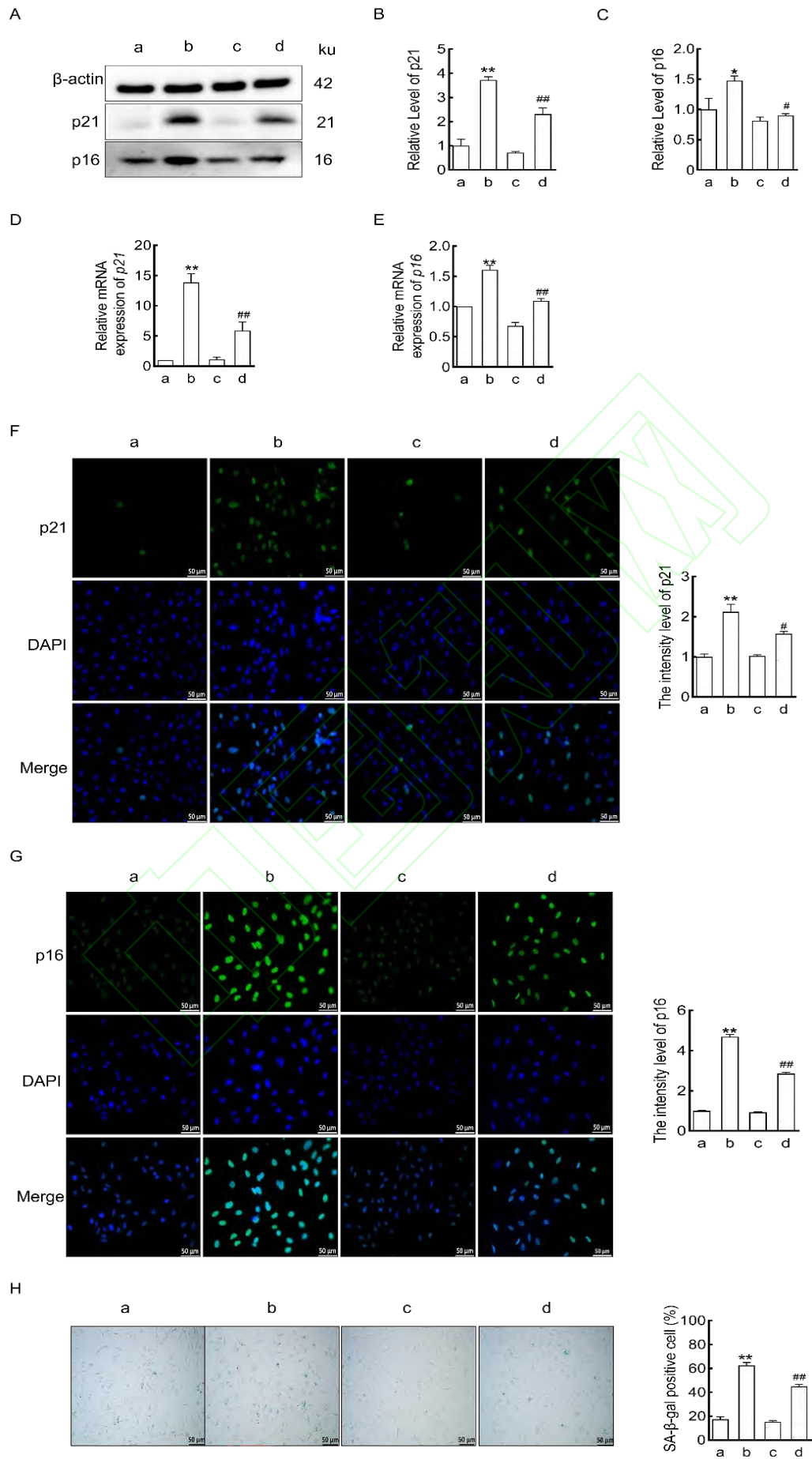


图 2 Gen 对 etoposide 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞衰老的影响

Fig.2 The effects of Gen on etoposide-induced senescence of C28/I2 chondrocytes

A-C: Western blot analysis of p21 and p16 protein expression in C28/I2 cells in each group; D,E: RT-qPCR detection of *p21* and *p16* mRNA levels; F,G: Immunofluorescence staining showing the fluorescence intensity of p21 and p16 $\times 200$; H: Statistical analysis of the positive rate of senescent cells by SA- β -gal staining $\times 200$; a: Control group; b: etoposide group; c: Gen group; d: Gen + etoposide group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs etoposide group.

2.3 Gen 对衰老软骨细胞中 Prdx6 表达的影响 Western blot 检测 C28/I2 软骨细胞衰老相关蛋白 Prdx6 的表达水平, 结果显示, 与 Control 组相比, etoposide 组 Prdx6 的蛋白表达降低 ($t=4.36$, $P < 0.05$); 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组 Prdx6 的蛋白升高 ($t=5.50$, $P < 0.01$), 见图 3A。RT-qPCR 结果显示: 与 Control 组相比, etoposide 组 *Prdx6* 的基因表达降低 ($t=13.77$, $P < 0.01$); 与 etoposide 组相比, Gen+etoposide 组 *Prdx6* 的基因表达升高 ($t=4.58$, $P < 0.01$), 见图 3B。谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性实验结果显示: 与 Control 组相比, si-Prdx6 组 GPx 活性降低 ($t=5.04$, $P < 0.01$); 与 si-Prdx6 组相比, Gen+si-Prdx6 组 Prdx6 的 GPx 活性提升 ($t=3.55$, $P < 0.05$), 见图 3C。分子对接实验结果显示, Gen (PubChem CID:5280961)与 Prdx6(UniProt ID:P30041)蛋白对接有氢键, 结合能 -25.104 kJ/mol, 证实 Gen 可能结合 Prdx6。见图 3D-3G。综上, Gen 可升高 Prdx6 表达和恢复过氧化物酶活力, 从而抑制 etoposide 诱导的软骨细胞衰老。

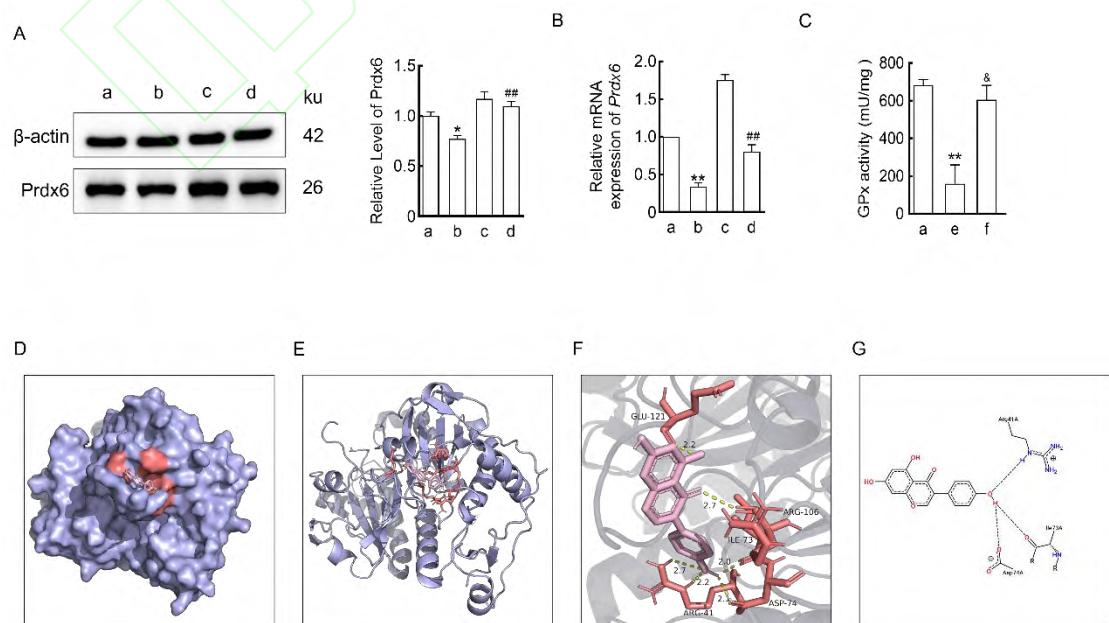


图 3 Gen 对衰老软骨细胞中 Prdx6 表达的影响

Fig.3 The effects of Gen on Prdx6 expression in senescent chondrocytes

A: Western blot analysis of prdx6 protein expression in C28/I2 cells in each group; B: RT-qPCR detection of *prdx6* mRNA levels; C: Determination of GPx activity using a GPx assay kit; D: Overall view of molecular docking between Gen and Prdx6; E: Gen embedded in the active binding region of prdx6 protein; F: The Genistein-Prdx6 complex maintained conformational stability through multiple hydrogen bond interactions; G: 2D interaction diagram showing that Gen bound to prdx6; a: Control group; b: etoposide group; c: Gen group; d: Gen + etoposide group; e: si-Prdx6 group; f: si-Prdx6+ Gen group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group; ## $P<0.01$ vs etoposide group; & $P<0.05$ vs si-Prdx6 group.

2.4 敲低 Prdx6 后 Gen 对软骨细胞衰老的影响 通过转染 Prdx6-siRNA 敲低 Prdx6。RT-qPCR 实验结果显示：与 si-NC 对照组相比，si-Prdx6 转染组 *Prdx6* mRNA 水平降低，证实敲低模型构建成功 ($t=5.59$, $P<0.01$)，见图 4A。采用 RT-qPCR 检测各组细胞 *p21* 和 *p16* 的表达，结果显示：与 Control 组相比，etoposide 组 *p21*、*p16* 表达量均升高 ($t=15.73$ 、 6.62 ，均 $P<0.01$)；与 etoposide 组相比，Gen+etoposide+si-NC 组 *p21*、*p16* 表达量均降低 ($t=3.51$ 、 7.11 均 $P<0.01$)；与 Gen+etoposide+si-NC 组相比，Gen+etoposide+si-Prdx6 组中 *p21*、*p16* 的 mRNA 表达均升高 ($t=4.33$ 、 7.12 ，均 $P<0.01$)，见图 4B、4C。免疫荧光染色法检测各组细胞 p21 和 p16 的表达，结果显示：与 Control 组相比，etoposide 组 p21、p16 表达量均升高 ($t=10.75$ 、 29.96 ，均 $P<0.01$)；与 etoposide 组相比，Gen+etoposide+si-NC 组 p21、p16 表达量均降低 ($t=7.01$ 、 15.48 ，均 $P<0.01$)；与 Gen+etoposide+si-NC 组相比，Gen+etoposide+si-Prdx6 组中衰老标志物 p21、p16 的荧光强度上升 ($t=4.05$ 、 $t=7.35$ ，均 $P<0.01$)，见图 4D、4E。提示敲低 Prdx6 可以逆转 Gen 抑制软骨细胞衰老的作用，加剧软骨细胞衰老。

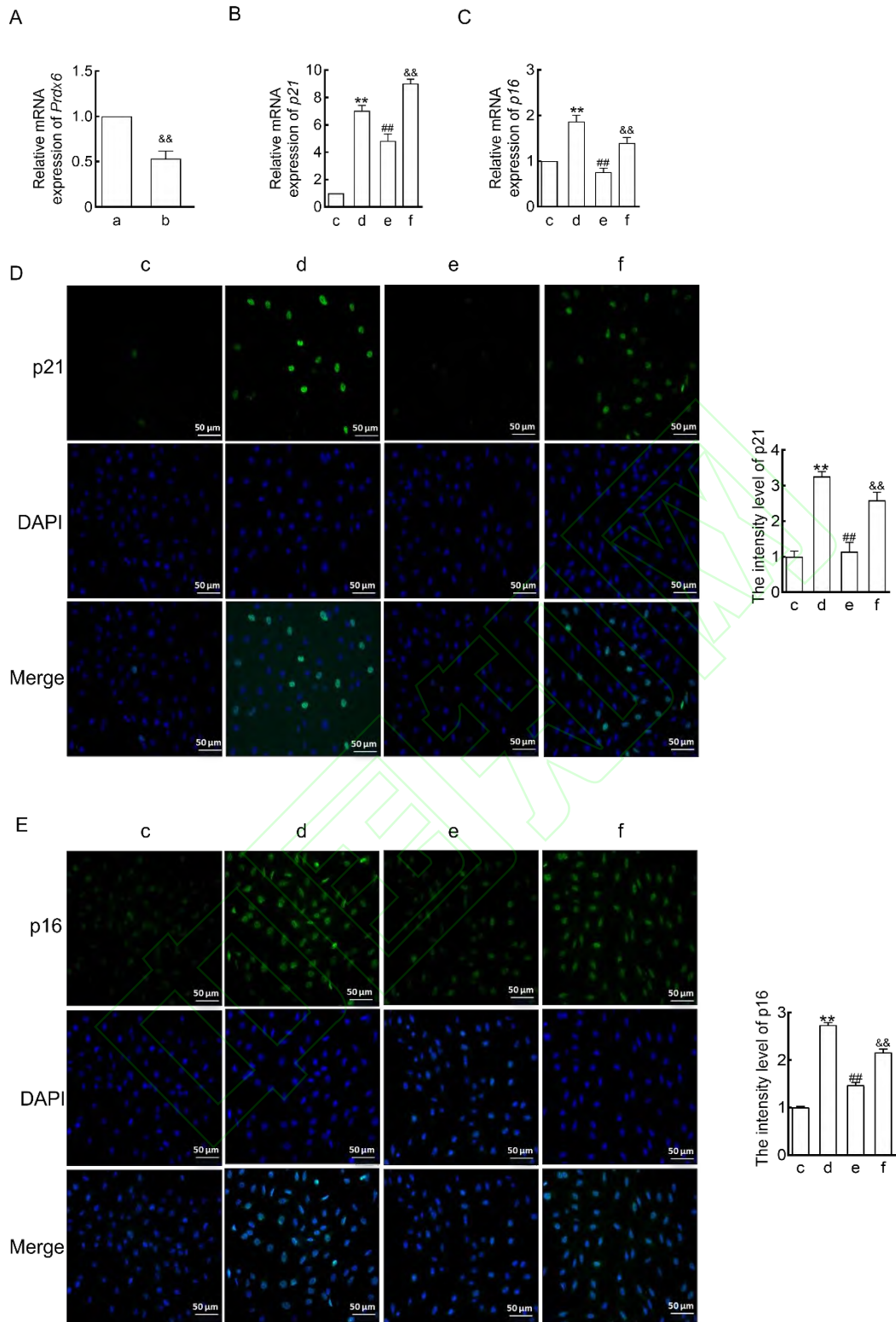


图 4 敲低 Prdx6 后 Gen 对软骨细胞衰老的影响

Fig.4 Impact of genistein on chondrocyte senescence after Prdx6 knockdown

A: RT-qPCR detection of *prdx6* mRNA levels; B,C: RT-qPCR detection of *p21* and *p16* mRNA

levels; D,E: Immunofluorescence staining showing the fluorescence expression intensity of p21 and p16 $\times 200$; a: NC group; b: si-Prdx6 group; $^{**}P < 0.01$ vs NC group. c: Control group; d: etoposide group; e: Gen + etoposide + si-NC group; f: Gen + etoposide + si-Prdx6 group; $^{**}P < 0.01$ vs Control group; $^{##}P < 0.01$ vs etoposide group; $^{**}P < 0.01$ vs Gen + etoposide + si-NC group.

3 讨论

衰老是一个复杂的、多方面的过程，靶向 DNA 损伤及其与衰老的机制联系，将为开发统一的干预措施以抵消与年龄相关的功能障碍和疾病提供合乎逻辑的理论依据^[13]。etoposide 作为 DNA 损伤的拓扑异构酶 II 抑制剂，能够抑制蛋白酶体相关基因的表达，致使泛素-蛋白酶体系统功能受损，蛋白酶体活性降低会引发错误蛋白的积累，进而导致氧化应激增强以及细胞稳态失衡，会加速细胞衰老进程^[14]。目前有研究^[15]已证实，软骨细胞衰老已被确定为细胞外基质代谢失调的关键事件。当衰老软骨细胞在骨关节组织中积累时，增加骨关节炎等退行性疾病的发生风险。通过靶向调控衰老相关关键信号通路，抑制氧化应激增强并纠正细胞稳态失衡，有助于治疗骨关节退行性疾病。

氧化应激状态下，过量活性氧可诱导软骨细胞脂质过氧化水平升高，进而加速软骨基质降解、促进软骨细胞衰老^[16]。研究^[9]表明，Gen 可通过抑制氧化应激信号通路，减少软骨细胞内脂质过氧化反应的发生。本研究中，为深入探究 Gen 的抗软骨细胞衰老机制，研究采用 etoposide 诱导 C28/I2 软骨细胞构建衰老模型。经鉴定，模型构建成功后，衰老标志物 p21 和 p16 表达显著上调；而 Gen 处理后衰老标志物 p21 和 p16 表达显著下降，证实 Gen 有效抑制软骨细胞衰老。

Prdx6 作为过氧化物还原蛋白家族中具有双重酶活性的独特成员，在调控细胞氧化还原稳态、线粒体能量代谢及抗凋亡信号通路中发挥关键作用^[17]。本研究中，etoposide 诱导 C28/I2 软骨细胞衰老中 Prdx6 表达下降，加入 Gen 干预后，Prdx6 表达上升。通过 GPx 试剂盒检测结果显示，敲低 Prdx6 后 GPx 活性降低；加 Gen 处理后，GPx 活性提升。结合分子对接实验呈现的 Gen 与 Prdx6 催化结构域特异性结合现象，证明 Gen 可靶向 Prdx6。然后进一步探究 Prdx6 在 Gen 抗软骨细胞衰老过程中的作用，研究采用 Prdx6-siRNA 介导的基因敲低实验。结果显示，Prdx6 敲低后衰老标志物 p21、p16 的表达量分别升高，表明敲低 prdx6 可以逆转 Gen 对软骨细胞衰老的抑制作用。因此推测 Gen 可能是通过上调 Prdx6 和 GPx 活性，维持软骨细胞氧化还原稳态抑制软骨细胞衰老。

综上所述，Gen 可以抑制 etoposide 诱导 C28/I2 软骨细胞衰老，其作用机制在于能够靶向 Prdx6 并上调 Prdx6 表达，提升 GPx 活性，维持软骨细胞氧化还原稳态，最终显著下调衰

老标志物 p21 与 p16 的表达水平;而 Prdx6 作为介导 Gen 抗软骨细胞衰老效应的关键靶点, Prdx6 基因沉默会显著削弱 Gen 的保护作用。这些结果初步阐明了 Gen 通过靶向调控 Prdx6 抑制软骨细胞衰老的作用机制。后续研究中一方面完成定点突变或热位移实验以完善分子机制证据链,另一方面构建动物疾病模型,在体内验证 Gen 的软骨保护作用。

参考文献

- [1] Salhotra A, Shah H N, Levi B, et al. Mechanisms of bone development and repair[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 696-711. doi:10.1038/s41580-020-00279-w.
- [2] Lin Y, Zhang L, Ji M, et al. miR-653-5p drives osteoarthritis pathogenesis by modulating chondrocyte senescence[J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1): 111. doi:10.1186/s13075-024-03334-5.
- [3] Geng N, Fan M, Kuang B, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid prevents osteoarthritis by targeting aspartyl β hydroxylase and inhibiting chondrocyte senescence in male mice preclinically[J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 7712. doi:10.1038/s41467-024-51746-3.
- [4] Bolduc J A, Collins J A, Loeser R F. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 73-82. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.038.
- [5] 陈凡, 周富丽, 陈勇, 等. 姜黄素可能通过上调 Prdx6 蛋白表达抑制软骨细胞铁死亡[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2106-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.018.
- [5] Chen F, Zhou F L, Chen Y, et al. Curcumin may inhibit chondrocytes ferroptosis by upregulating the Prdx6 expression level[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(12): 2106-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.018.
- [6] Pacifici F, Della-Morte D, Piermarini F, et al. Prdx6 plays a main role in the crosstalk between aging and metabolic sarcopenia[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(4): 329. doi:10.3390/antiox9040329.
- [7] Guillén M I, Tofiño-Vian M, Silvestre A, et al. Role of peroxiredoxin 6 in the chondroprotective effects of microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 30: 61-9. doi:10.1016/j.jot.2021.08.003.
- [8] Paramanik V, Kurrey K, Singh P, et al. Roles of genistein in learning and memory during aging

- and neurological disorders[J]. *Biogerontology*, 2023, 24(3): 329-46. doi:10.1007/s10522-023-10020-7.
- [9] Cheng W X, Huang H, Chen J H, et al. Genistein inhibits angiogenesis developed during rheumatoid arthritis through the IL-6/JAK2/STAT3/VEGF signalling pathway[J]. *J Orthop Translat*, 2020, 22: 92-100. doi:10.1016/j.jot.2019.07.007.
- [10] 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): 787-91. doi:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.05.017.
- [10] Wang Y L, Wang Z W, Yang Y. Effects of genistein on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory factors in chondrocytes[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2022, 39(5): 787-91. doi:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.05.017.
- [11] Zou Y, Liu Q, Guo P, et al. Anti-chondrocyte apoptosis effect of genistein in treating inflammation-induced osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2032-42. doi:10.3892/mmr.2020.11254.
- [12] 曾小云, 张丽容. 不同剂量金雀异黄酮对骨关节炎模型大鼠关节疼痛、炎症的抑制作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35): 5607-12.
- [12] Zeng X Y, Zhang L R. Inhibitory effects of different doses of genistein on joint pain and inflammation in osteoarthritis model rats[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(35): 5607-12.
- [13] Schumacher B, Pothof J, Vijg J, et al. The central role of DNA damage in the ageing process[J]. *Nature*, 2021, 592(7856): 695-703. doi:10.1038/s41586-021-03307-7.
- [14] Georget M, Defois A, Guiho R, et al. Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes[J]. *Aging*, 2023, 15(17): 8576-93. doi:10.18632/aging.204881.
- [15] Hao W, Chang M, Shi D, et al. Therapeutic targets in aging-related osteoarthritis: a focus on the extracellular matrix homeostasis[J]. *Life Sci*, 2025, 368: 123487. doi:10.1016/j.lfs.2025.123487.
- [16] Zahan O M, Serban O, Gherman C, et al. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis[J]. *Med Pharm Rep*, 2020, 93(1): 12-22. doi:10.15386/mpr-1422.
- [17] Paluchova V, Cajka T, Durand T, et al. The role of peroxiredoxin 6 in biosynthesis of FAHFs[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 2): 787-94.