DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251015004
引用格式: 夏玉, 杨晓惠, 王雅馨, 等. 黑麦花粉对软骨细胞炎症因子表达的调控及大鼠膝骨关节炎的干预效果[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 350–358.
XIA Y, YANG XH, WANG YX, *et al*. Regulation of *Secale cereale* pollen on inflammatory cytokine expression in chondrogenic cells and its intervention effects on knee osteoarthritis in rats [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 350–358. (in Chinese with English abstract).

黑麦花粉对软骨细胞炎症因子表达的调控及大鼠膝骨关节炎的干预效果

夏 玉[1], 杨晓惠[1*], 王雅馨[2], 殷光玲[1], 赵海山[3]

(1. 汤臣倍健股份有限公司, 广州 510000; 2. 广州山海生物科技有限公司, 广州 510000;
3. 广东省人民医院医学研究所, 广州 510000)

摘 要: 目的 探讨黑麦花粉对软骨细胞炎症及大鼠膝骨关节炎的干预保护作用。**方法** 体外实验以 10 μg/mL 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠软骨细胞 ATDC5 构建炎症模型, 设 0、0.25、0.50、1.00 μg/mL 黑麦花粉处理组, 将实验分为 3 组, 即空白对照组、模型组(LPS)和实验组(LPS+黑麦花粉), 采用优化后的逆转录-实时荧光定量聚合酶链式反应技术, 检测白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2, PGE_2)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)炎症因子及软骨降解相关基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases-1/-2/-3, MMP-1、MMP-2、MMP-3)的相对表达水平; 体内实验以II型胶原酶诱导建立 SD 大鼠膝骨关节炎模型, 设空白对照组、模型组、18 mg/(kg·d)塞来昔布阳性对照组及 0.167 g/(kg·d)黑麦花粉组, 灌胃给药 4 周。通过测量关节周长评估关节肿胀, 组织学染色观察关节病变, 用酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定大鼠滑膜组织中 IL-2、TNF-α、COX 的水平和免疫组化检测II型胶原 α1 链(collagen type II alpha 1 chain, *COL2A1*)及基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13)的表达。**结果** 体外结果显示: 0.2500~1.0000 μg/mL 黑麦花粉可促进软骨细胞增殖, 且呈质量浓度依赖性降低 LPS 诱导的促炎因子(IL-1β、IL-6、TNF-α、PGE_2)及基质金属蛋白酶(MMP-1/2/3)基因表达, 1 μg/mL 时上述基因表达可恢复至阴性对照水平; 而 COX-2 基因表达无显著变化(P>0.05)。体内结果表明: 黑麦花粉组大鼠相对关节周长差从模型组(5.84±0.60) mm 降至(3.12±0.46) mm (P<0.001), 能够改善关节肿胀度; 膝关节病理切片显示软骨表面粗糙与褶皱改善、滑膜增生面积降低、炎性浸润呈散在分布, Mankin 评分显著低于模型组(P<0.05); 血清 COX 水平从 1.30±0.01 至 1.19±0.01 (P<0.05), IL-2、TNF-α 水平略有下降, 但是无显著性差异(P>0.05); 免疫组化显示软骨基质合成相关蛋白 *COL2A1* 阳性染色面积增加, 降解相关蛋白 *MMP13* 阳性染色面积减少, 实现软骨基质代谢“促合成-抑降解”双向调节。**结论** 黑麦花粉可抑制 LPS 诱导的软骨细胞炎症反应与基质降解, 减轻大鼠膝骨关节炎的病变程度, 调节软骨基质代谢平衡, 发挥对骨关节炎的干预保护作用。

关键词: 黑麦花粉; 骨关节炎; 软骨细胞; 抗炎; 软骨基质代谢

收稿日期: 2025-10-15

第一作者: 夏玉(1988—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品功能与营养。E-mail: 179830331@qq.com
***通信作者:** 杨晓惠(1986—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养。E-mail: yangxh@by-health.com

Regulation of *Secale cereale* pollen on inflammatory cytokine expression in chondrogenic cells and its intervention effects on knee osteoarthritis in rats

XIA Yu[1], YANG Xiao-Hui[1*], WANG Ya-Xin[2], YIN Guang-Ling[1], ZHAO Hai-Shan[3]

(1. *Byhealth Co*., *Ltd*., *Guangzhou* 510000, *China*; 2. *Guangzhou Sun-Hi Biotechnology Co*., *Ltd*., *Guangzhou* 510000, *China*; 3. *Medical Research Institute*, *Guangdong Provincial People's Hospital*, *Guangzhou* 510000, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the interventional and protective effects of *Secale cereale* pollen on chondrocyte inflammation and knee osteoarthritis in rats. **Methods** *In vitro* experiment, a chondrocyte inflammation model was established by inducing mouse chondrocyte line ATDC5 with 10 μg/mL lipopolysaccharide (LPS). The experiment was divided into 3 groups: Blank control group, model group (LPS-induced) and experimental groups (LPS+*Secale cereale* pollen at concentrations of 0, 0.25, 0.50 and 1.00 μg/mL). Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction was performed to detect the gene expressions of inflammatory factors including interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), nerve growth factor (NGF), prostaglandin E_2 (PGE_2), cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as cartilage matrix metalloproteinases-1/-2/-3 (MMP-1, MMP-2 and MMP-3). *In vivo* experiment, a knee osteoarthritis model was constructed in SD rats via intra-articular injection of type II collagenase. The rats were randomly assigned to 4 groups: Blank control group, model group, positive control group treated with celecoxib at 18 mg/(kg • d), and *Secale cereale* pollen group treated with 0.167 g/(kg • d). All treatments were administered via gavage for 4 consecutive weeks. Joint swelling was evaluated by measuring the joint circumference. Histopathological changes of the knee joint were observed using histological staining. The levels of IL-2, TNF-α and COX in the synovial tissue of rats were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of collagen type II alpha 1 chain (*COL2A1*) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) were detected by immunohistochemistry. **Results** The *in vitro* results showed that *Secale cereale* pollen at mass concentrations ranging from 0.2500 to 1.0000 μg/mL promoted chondrocyte proliferation, and dose-dependently down-regulated the gene expressions of LPS-induced pro-inflammatory factors (IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE_2) and matrix metalloproteinases (MMP-1/2/3). At the mass concentration of 1 μg/mL, the expressions of the aforementioned genes were restored to the level of the negative control group, while the COX-2 gene expression showed no significant change (P>0.05). The *in vivo* results demonstrated that the relative difference in joint circumference of rats in the *Secale cereale* pollen group decreased significantly from (5.84±0.60) mm in the model group to (3.12±0.46) mm (P<0.001), indicating an obvious improvement in joint swelling. Pathological sections of the knee joint revealed ameliorated roughness and folds of the cartilage surface, reduced synovial hyperplasia area, and scattered inflammatory cell infiltration. The Mankin score of the *Secale cereale* pollen group was significantly lower than that of the model group (P<0.05). The serum COX level decreased from 1.30±0.01 to 1.19±0.01 (P<0.05), whereas the levels of IL-2 and TNF-α showed a slight downward trend without statistical significance (P>0.05). Immunohistochemical results indicated that the positive staining area of *COL2A1*, a protein related to cartilage matrix synthesis, was increased, while that of *MMP13*, a protein associated with cartilage matrix degradation, was reduced, thus achieving a bidirectional regulation of cartilage matrix metabolism characterized by "promoting synthesis and inhibiting degradation". **Conclusion** *Secale cereale* pollen can inhibit LPS-induced chondrocyte inflammation and matrix degradation, alleviate the pathological severity of knee osteoarthritis in rats, and regulate the metabolic balance of cartilage matrix, thereby exerting interventional and protective effects against osteoarthritis.

KEY WORDS: *Secale cereale* pollen; osteoarthritis; chondrogenic cells; anti-inflammatory; cartilage matrix metabolism

0　引　言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一类常见于中老年人群, 以关节软骨慢性退变为主、软骨下骨改变和滑膜慢性炎症为特征的不可逆的退行性关节疾病, 临床表现为关节疼痛、僵硬和畸形, 病理表现为软骨的磨损以及周围骨赘

的形成[1−2]。软骨细胞作为软骨组织中细胞类型, 在软骨组织稳态维持及软骨细胞外基质代谢有着重要作用, 软骨细胞中的炎症介质, 如活性氧(reactive oxygen species, ROS)、白细胞介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)能够通过激活单核细胞和巨噬细胞的分解代谢程序, 进而产生一氧化氮、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等物质诱导软骨细胞凋亡, 造成软骨组织破坏, 促进 OA 发生[3−4]。口服非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是目前指南推荐和临床上最常用于治疗 OA 的药物, 虽能通过抑制环氧化酶(cyclooxygenase, COX)活性缓解疼痛, 但长期使用易引发胃肠道损伤、心血管风险等不良反应[5]。天然植物源成分因安全性高、通过抗炎抗氧化等多靶点调控优势, 成为 OA 防治领域的研究热点。

黑麦(*Secale cereale*)作为禾本科黑麦属作物, 其花粉经提取工艺处理后富含植物甾醇、多不饱和脂肪酸及氨基酸复合物, 黑麦花粉已于 2023 年通过国家卫生健康委员会新食品原料审批(2023 年第 3 号公告), 作为普通食品每日推荐摄入量不超过 1.5 g, 不适宜人群包括婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女, 以及花粉过敏者。现有研究表明, 黑麦花粉可通过剂量依赖性抑制花生四烯酸代谢途径中的 COX 与 5-脂氧合酶活性, 减少前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2, PGE_2)、白三烯合成, 在慢性盆腔疼痛综合症、慢性前列腺炎治疗中展现出明确抗炎效果[6−7]; 同时, 其抗氧化活性可通过降低脂质过氧化产物丙二醛水平、提升超氧化物歧化酶活性, 保护细胞免受氧化应激损伤[8]。然而, 黑麦花粉在 OA 领域的研究较少, 其是否能通过调控 OA 相关病理环节(如软骨细胞增殖、炎症因子释放、软骨基质代谢)发挥干预作用, 以及具体分子机制如何, 均有待系统验证。本研究创新性地将黑麦花粉引入 OA 研究领域, 通过体内外实验联合验证其干预效果: 体外以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠软骨细胞建立炎症模型, 明确黑麦花粉对炎症因子及软骨降解相关 MMPs 表达的调控作用; 体内采用II型胶原酶诱导 SD 大鼠膝 OA 模型, 结合病理形态学、血清炎症因子检测及免疫组化技术, 探究其对关节组织损伤的修复效应及软骨基质代谢的调节机制。本研究不仅可拓宽黑麦花粉这一新食品原料的应用边界, 更有望为 OA 防治提供“抗炎-软骨保护”双效的功能活性成分提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠[6~8 周龄, 体重 200~300 g, SPF 级, 南方医科大学动物研究中心, SYXK(粤)2022-0273]。

1.1.2 细胞株

小鼠软骨细胞系 ATDC5(广州源井生物科技有限公司)。

1.1.3 试 剂

黑麦花粉(生产批号 BL1116-24-00, 广州能靓生物技术有限公司); 胶原酶II型(货号 2275MG100, 广州赛国生物科技有限公司); *MMP13* 抗体(1:1000, 货号 AF5355)、*COL2A1* 抗体(1:1000, 货号 AF0135)(常州市祥泰生物技术有限公司); 大鼠 IL-2 酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)科研试剂盒(货号 MM-0192R1)、TNF-α ELISA 科研试剂盒(生产批号 MM-0180R1)、COX ELISA 科研试剂盒(货号 MM-0864R1)(江苏酶免实业有限公司); LPS(纯度≥99%, 美国 Sigma 公司); 塞来昔布(纯度≥98%, 上海麦克林生化科技有限公司); 磁珠法总 RNA 提取试剂盒(货号 TZRM-64, 广州湾区生物科技有限公司); StarScript Pro One-Step RT-PCR Mix(货号 A240-10, 北京康润诚业生物科技有限公司); PowerUp™ SYBR™ Green Master MIX(货号 A25742, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMEM/F12 培养基(L310KJ, 上海源培生物科技股份有限公司); CCK-8 试剂盒(货号 CA1210-500T, 北京索莱宝科技有限公司); 水合氯醛(纯度≥99%, 国药集团化学试剂有限公司); 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(货号 C0105S, 上海碧云天生物技术股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

3111 CO_2 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Synergy H1 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); T100 PCR 仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司); QuantStudio 5 (Q5)实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); RM2235 病理切片机(德国 Leica 公司); BX53 光学显微镜(配备 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统, 日本 Olympus 公司); S102-101-118 电子游标卡尺(精度 0.01 mm, 上海量具刃具厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 软骨细胞活力检测

取对数生长期 P2 代 ATDC5 细胞, 接种于 96 孔板, 37 ℃、5% CO_2 培养 24 h 至细胞完全贴壁。弃旧培养基后, 分别加入含 0、0.0078、0.0156、0.0313、0.0625、0.1250、0.2500、0.5000、1.0000 μg/mL 黑麦花粉的培养基(每组设 6 个复孔), 继续培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 孵育 2 h 后, 酶标仪检测 450 nm 处 OD 值, 计算细胞活力[细胞活力=(实验组 OD 值/空白对照组 OD 值)×100%][9]。

1.3.2 软骨细胞炎症模型建立与基因检测

将 ATDC5 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 除阴性对照组外, 其余组加入 10 μg/mL LPS 诱导 12 h 建立炎症模型。随后, 模型组分别加入含 0、0.25、0.50、1.00 μg/mL 黑麦花粉提取物的培养基, 继续培养 24 h。

采用三氯甲烷-酚抽提法提取细胞总 RNA, 检测 RNA 纯度(A_{260}/A_{280}=1.8~2.0)与完整性(琼脂糖凝胶电泳显示清晰 28S、18S 条带), 通过逆转录试剂盒合成互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA)。以 *GAPDH* 为内参基因, 采用荧光定量 PCR 检测 IL-1β、IL-6、TNF-α、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、PGE_2、COX-2、MMP-1、MMP-2、MMP-3 因子表达。采用 $2^{-}\Delta\Delta$Ct 法计算基因相对表达量[9–10]。

1.3.3　大鼠 OA 模型的建立和实验设计

适应性喂养 1 周后, 除空白对照组外, 其余大鼠采用 II型胶原酶诱导法建立膝 OA 模型: 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉, 右后肢膝关节剃毛消毒, 于膝关节韧带内侧分别在第 1 d、4 d 注射 4 mg/mL II型胶原酶溶液 0.1 mL; 空白对照组同期注射 0.1 mL 生理盐水。造模成功后(造模后 7 d, 模型组大鼠关节肿胀度评分≥3 分), 将大鼠随机分为 3 组(每组 8 只): 空白对照组(灌胃 0.9%生理盐水, 10 mL/kg)、阳性对照组[灌胃 18 mg/(kg·d)塞来昔布, 10 mL/kg]、黑麦花粉组[灌胃 0.167 g/(kg·d)黑麦花粉(按人体 60 kg 体重日服推荐剂量 1 g 的 10 倍), 10 mL/kg], 连续给药 4 周, 每日 1 次, 期间记录大鼠体重、饮食及活动情况[11]。

1.3.4　大鼠检测指标与方法

关节周长测量: 给药前及给药后每周, 用游标卡尺测量大鼠右后肢膝关节周长, 计算相对关节周长差(相对关节周长差=给药后周长–给药前周长)。

病理切片与 HE 染色: 给药 4 周后, 大鼠过量麻醉处死后, 取右后肢膝关节, 4%多聚甲醛固定 48 h, 乙二胺四乙酸脱钙(脱钙液每 3 d 更换 1 次, 2 周后通过针刺法判断脱钙完全), 石蜡包埋, 连续切片(厚度 5 μm), HE 染色, 参照表 1 滑膜 HE 染色 Mankin 评分标准进行病理评分, 并通过 Image-Pro Plus 6.0 软件分析滑膜增生面积与炎性浸润程度[12]。

表 1　改良 Mankin 评分标准

Table 1　Scoring criteria of modified Mankin

评分标准/分	炎细胞浸润	纤维组织增生	滑膜细胞增生(层数)	血管增生
0	无浸润	无增生	无增生(1~2 层)	无增生
1	稀疏散在	少量增生	少量增生(3~4 层)	少量增生
2	较密集	中等增生	中等增生(5~7 层)	中等增生
3	大量弥漫	大量增生	大量增生(≥8 层)	大量增生

血清炎症因子检测: 处死后腹主动脉取血, 3000 r/min 离心 15 min (4 ℃), 分离血清, 采用 ELISA 法检测 IL-2、TNF-α、COX 水平, 严格按照试剂盒说明书操作。

免疫组化检测: 膝关节石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复(柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0), 封闭后加入II型胶原 α1 链(collagen type II alpha 1 chain, *COL2A1*)抗体(稀释比例 1:200)、*MMP13* 抗体(稀释比例 1:200), 4 ℃孵育过夜, 后用 3,3'-二氨基联苯胺显色, 苏木素复染, 脱水透明封片。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件定量分析阳性染色面积占比, 反映 *COL2A1*、*MMP13* 蛋白表达水平[12–13]。

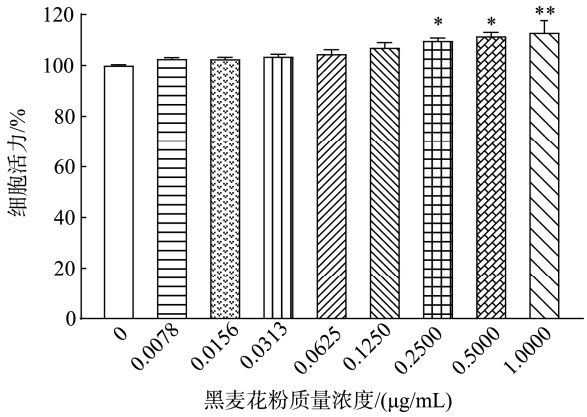
1.4　数据处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 计量资料以平均值±标准偏差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验; 计数资料以频数表示, 采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制图表。

2　结果与分析

2.1　细胞增殖实验结果

ATDC5 细胞是常用的软骨细胞模型, 其增殖能力反映软骨细胞的活性, 是软骨修复的基础。由图 1 可知, 黑麦花质量浓度在 0~1.0000 μg/mL 范围内, 对 ATDC5 细胞增殖的影响呈浓度依赖性, 质量浓度<0.2500 μg/mL 时, 细胞增殖率与空白对照组(0 μg/mL)相比无显著差异(P>0.05), 表明低浓度黑麦花对软骨细胞增殖无明显影响; 质量浓度为 0.2500、0.5000、1.0000 μg/mL 时, 细胞增殖率分别为 108.68%、109.97%、113.50%, 显著高于空白对照组(P<0.05 或 P<0.01), 且无明显细胞毒性(增殖率未超过 120%, 无过度增殖现象); 选择黑麦花粉质量浓度 0.2500、0.5000、1.0000 μg/mL 作为后续实验的浓度。



注: 样品与空白对照组(0 μg/mL)比较, **表示有极显著性差异(P<0.01); *表示有显著性差异(P<0.05)。

图 1　ATDC5 细胞增长率情况图

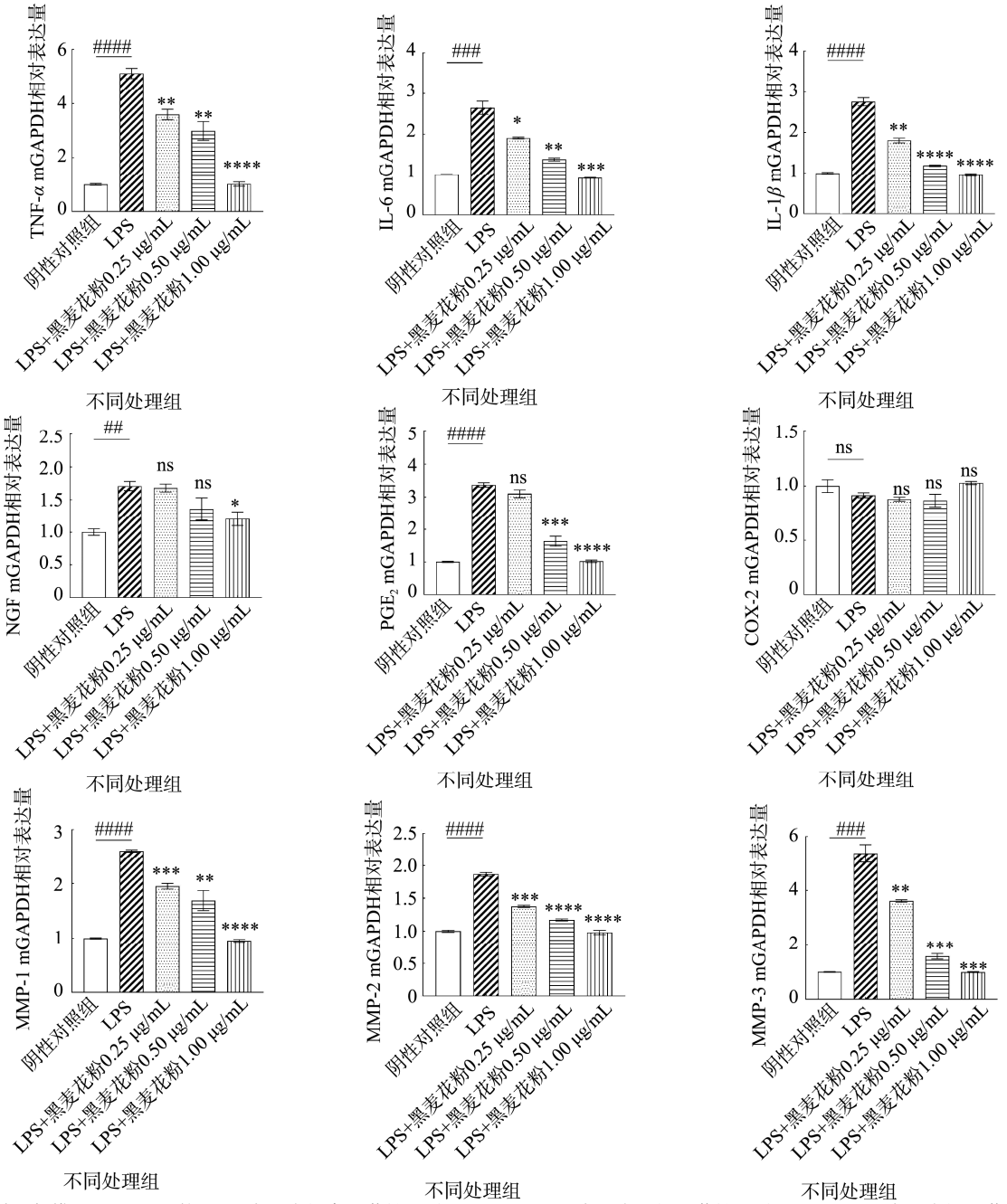
Fig.1　Figure of cell viability in ATDC5 cells

2.2　黑麦花粉对软骨细胞炎症因子及 MMPs 的作用

LPS 是常用的炎症诱导剂, 可通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) (JNK、p38 亚型)/核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB)信号通路, 显著诱导炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8)的 mRNA 及蛋白表达, 同时抑制细胞活力、促进细胞凋亡, 进而模拟软骨细胞炎症损伤模型[14]; 由图 2 可知, 与阴性对照组相比, LPS 处理组 ATDC5 细胞中 IL-1β、IL-6、TNF-α、NGF、PGE_2、MMP-1、MMP-2、MMP-3 的基因相对表达量显著升高

(P<0.01 或 P<0.001 或 P<0.0001), COX-2 的基因表达无显著变化(P>0.05), 表明 LPS 成功诱导 ATDC5 细胞产生炎症反应, 体外炎症模型建立。

经不同浓度黑麦花粉处理后, ATDC5 细胞中升高的炎症因子及 MMPs 的基因表达量呈浓度依赖性降低: 炎症因子基因: 1.00 μg/mL 黑麦花粉可使 TNF-α (5.12→1.01)、IL-6 (2.65→0.92)、IL-1β (2.76→0.96)、PGE_2 (3.37→1.02)的基因表达恢复至阴性对照组水平左右; NGF 的基因表达降至 1.21, 虽未完全恢复至阴性对照组(1.00), 但显著低于 LPS 处理组(1.71, P<0.05); COX-2 基因表达在各浓度均无显著变化(P>0.05)。MMPs 基因: 1.00 μg/mL 黑麦花可使 MMP-1 (2.60→0.96)、MMP-2 (1.87→0.98)、MMP-3 (5.38→1.00)基因表达恢复至阴性对照组水平, 0.25 μg/mL、0.50 μg/mL 黑麦花粉也可显著降低上述基因表达(P<0.05 或 P<0.01 或 P<0.001)。



注: 样品与模型组(LPS)比较, ****表示有极高显著性差异(P<0.0001); ***表示有强极显著性差异(P<0.001); **表示有极显著性差异(P<0.01); *表示有显著性差异(P<0.05); 空白与模型组比较, ####表示有极高显著性差异(P<0.0001); ###表示有强极显著性差异(P<0.001); ##表示有极显著性差异(P<0.01); ns 表示无显著性差异(P>0.05)。图 3、5~6 同。小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, mGAPDH)。

图 2 相对基因表达量情况图

Fig.2 Figures of relative gene expression levels

2.3　大鼠相对关节周长差值的结果

关节肿胀是 OA 的典型临床表现，关节周长变化可直观反映关节炎症程度。给药 4 周后，如图 3 所示，模型组大鼠相对关节周长差为(5.84±0.60) mm，极高显著高于空白对照组[(1.00±0.24) mm]，差异具有统计学意义(P<0.0001)，表明II型胶原酶诱导的 OA 模型成功，大鼠关节存在明显炎症肿胀。与模型组相比，阳性对照组(塞来昔布)相对关节周长差为(1.08±0.20) mm，与模型组相比差异极高显著(P<0.0001)，黑麦花组相对关节周长差降至(3.12±0.46) mm，差异具有统计学意义(P<0.001)，表明黑麦花粉缓解实验大鼠的炎症具有很好的效果。

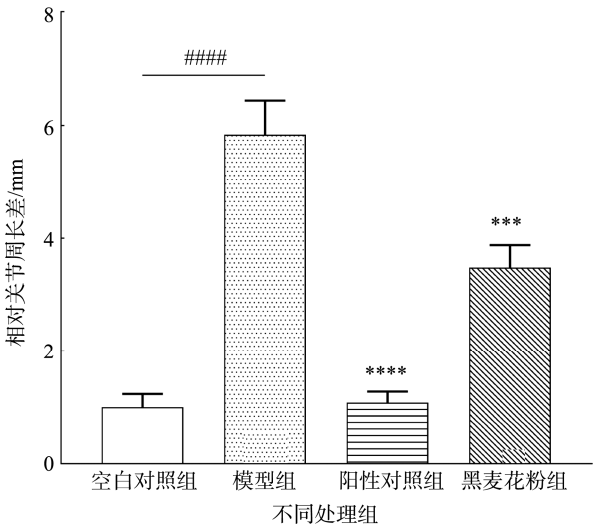


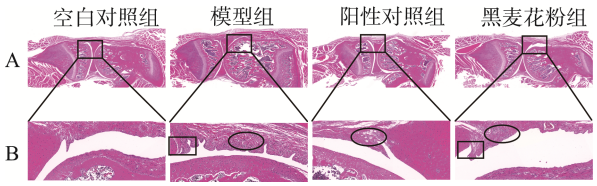
图 3　黑麦花粉对大鼠相对关节周长差影响

Fig.3　Effects of *Secale cereale* pollen on relative joint circumference difference in rats

2.4　膝关节病理学观察结果

膝关节软骨与滑膜的病理改变是OA诊断与疗效评价的金标准，HE 染色可清晰显示组织形态学变化。由图 4 可知，空白对照组大鼠膝关节软骨表面光滑完整，软骨细胞排列整齐、分布均匀，滑膜层薄(1~2 层细胞)，无炎细胞浸润、纤维组织增生及血管增生，组织结构正常。模型组大鼠膝关节出现典型的 OA 病理改变：软骨表面粗糙、褶皱明显，局部出现缺损，软骨细胞大量凋亡、分布紊乱，部分区域出现失染现象；大量炎细胞弥漫浸润，纤维组织增生面积超过 50%，并形成血管翳(新生血管组织)，表明关节组织损伤严重。

与模型组相比，黑麦花粉组膝关节病理损伤明显改善：软骨表面粗糙与褶皱程度减轻，无明显缺损，软骨细胞分布相对均匀，局部失染现象减少；滑膜层厚度降低，炎细胞浸润程度减轻(以散在分布为主)，纤维组织增生面积降至 20%~50%，血管翳形成减少；阳性对照组病理改变接近空白对照组，软骨表面基本完整，滑膜层薄，仅少量炎细胞散在浸润。黑麦花粉组病理损伤改善，这一结果与 Mankin 评分(图 5)一致，模型组 Mankin 评分极高显著高于空白对照组(P<0.0001)，黑麦花粉组评分显著低于模型组(P<0.05)，表明黑麦花粉对软骨表面结构、软骨基质染色及病理评分等均有改善作用，这一结果与姜黄等功效成分对 OA 的病理组织干预效果相当[15]。



注：A. 黑麦花组的大鼠膝关节 HE 染色切片在 2 倍镜下观察结果，比例尺=500 μm；B. 黑麦花组的大鼠膝关节 HE 染色切片在 20 倍镜下观察结果，比例尺=50 μm。长方形方框表示该区域出现滑膜增生；椭圆表示该区域细胞炎性浸润。

图 4　大鼠膝关节 HE 染色结果图

Fig.4　HE staining results of the rat knee joint

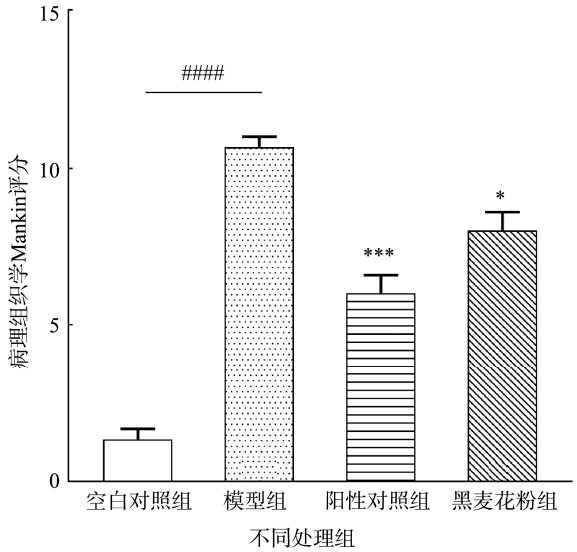


图 5　大鼠膝关节 HE 染色 Mankin 评分结果图

Fig.5　Mankin score results of HE staining in the rat knee joint

2.5　相关炎症因子表达结果

炎症因子是 OA 炎症反应的核心调控分子，其血清水平可反映全身及局部炎症程度，TNF-α、IL-2、COX 是导致膝 OA 发生的主要炎性细胞因子，炎症因子会通过激活软骨细胞内的促炎信号通路，加速软骨基质降解并抑制其合成，同时诱导软骨细胞凋亡，最终破坏软骨结构稳定性[16]。

由图 6 可知，模型组大鼠血清 IL-2、TNF-α、COX 水平强极显著高于空白对照组(P<0.001)，其中 TNF-α 升高最为明显(模型组 2.22±0.03 和空白对照组 1.00±0.02)，表明II型胶原酶诱导成功激活了大鼠的炎症反应通路。给药 4 周后，黑麦

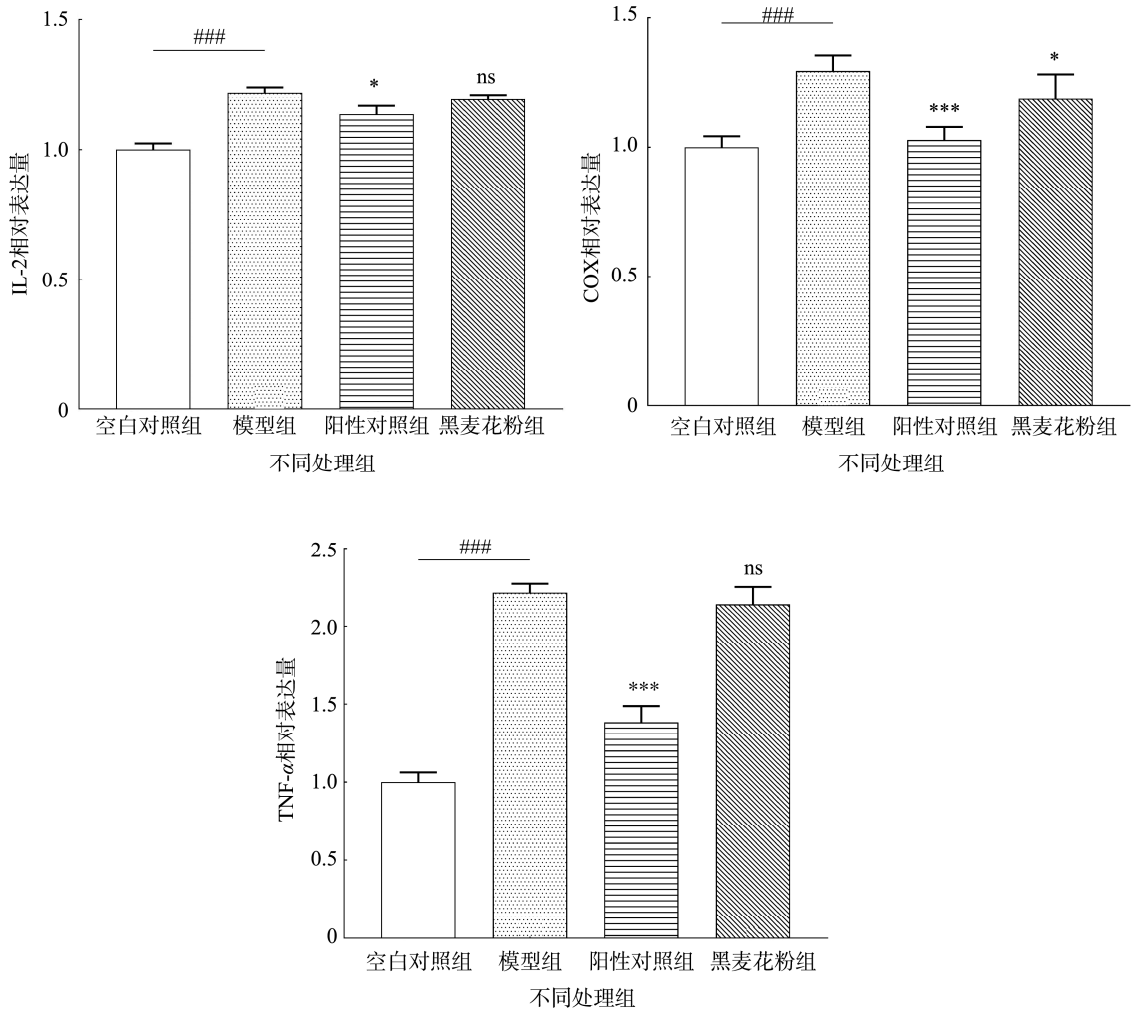


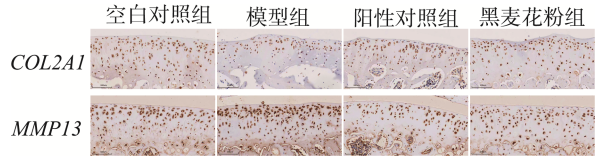
图 6 炎症因子 IL-2、TNF-α 和 COX 相对表达量效果图

Fig.6 Effect diagrams of relative expression level of inflammatory cytokine IL-2, TNF-α and COX

花组血清 COX 水平降至 1.19±0.01，显著低于模型组 1.30±0.01，差异具有统计学意义(P<0.05)；IL-2 水平为 1.19±0.01，TNF-α 水平为 2.14±0.02，虽较模型组有所下降，但差异无统计学意义(P>0.05)。阳性对照组血清 IL-2、TNF-α、COX 水平均显著低于模型组(P<0.05 或 P<0.001)，其中 COX 水平接近空白对照组(1.03±0.01)。

2.6 大鼠膝关节切片免疫组化结果

COL2A1 是软骨基质中II型胶原的编码蛋白，是软骨结构与功能的关键成分，*MMP13* 是软骨基质降解的关键酶，主要降解II型胶原，二者的平衡直接决定软骨基质的代谢状态，是评价软骨损伤与修复的核心指标[17]。由图 7 可知，空白对照组大鼠膝关节软骨组织中，*COL2A1* 蛋白阳性染色面积占比高(棕色区域广泛分布)，*MMP13* 蛋白阳性染色面积占比低，表明软骨基质合成旺盛，降解水平低，软骨结构完整。模型组大鼠膝关节软骨组织中，*COL2A1* 蛋白阳性染色面积显著减少，棕色区域稀疏；*MMP13* 蛋白阳性染色面积显著增加，棕色区域密集分布，表明模型组软骨基质合成受阻，降解加剧，软骨结构破坏，符合OA软骨降解的病理特征。



注：棕色区域代表相应蛋白表达，比例尺=100 μm。

图 7 大鼠膝关节免疫组化结果图

Fig.7 Immunohistochemical results of the rat knee joint

与模型组相比，阳性对照组 *COL2A1* 与 *MMP13* 蛋白表达水平接近空白对照组，软骨基质代谢状态良好。黑麦花粉组膝关节软骨组织中 *COL2A1* 蛋白阳性染色面积明显增加，*MMP13* 蛋白阳性染色面积明显减少，表明黑麦花粉可促进软骨基质合成，抑制软骨基质降解，改善软骨基质代谢失衡。

3　讨论与结论

黑麦花粉通过水提取和超临界 CO_2 提取工艺处理后, 含有脂溶性和水溶性营养成分, 组分包括植物甾醇、氨基酸、维生素和矿物质, 临床研究主要针对治疗良性前列腺增生症和前列腺炎[18–19]。实验证实, 黑麦花粉主要通过抑制前列腺素和白三烯合成途径表现强抗炎作用[20], 在患有非细菌性前列腺炎的大鼠中, 观察到了剂量依赖性的抗炎作用, 导致炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平降低[21]。

基于黑麦花粉已有研究, 本研究重点放在与炎症密切相关 OA 上, OA 是一种多因素引起的关节退行性病变, 受年龄、肥胖、炎性反应、关节损伤和疾病等因素影响[22]。软骨细胞是关节软骨中唯一存在的细胞, 研究表明, 软骨细胞的异常代谢、炎症和细胞基质降解在 OA 发展中至关重要[23]。LPS 可通过激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF-κB 通路, 上调 IL-1β、TNF-α、IL-6 等核心促炎因子表达, 其中 IL-1β 可直接作用于神经元 IL-1β 受体引发疼痛, TNF-α 则通过 NF-κB、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)等途径进一步促进 IL-6、PGE_2 等炎症介质生成, 而这些炎症因子又会诱导 MMPs 等基质降解酶表达, 加速软骨细胞外基质降解[24–25]。本研究中观察到, 在 LPS 诱导下软骨细胞炎症因子的表达明显升高, 而加入黑麦花粉后不仅使 IL-1β、TNF-α、IL-6、PGE_2 基因表达恢复至阴性对照水平, 还能显著抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-3 表达 (P<0.05), 提示黑麦花粉对软骨细胞炎症模型表现出靶向抗炎同步抑软骨基质降解的协同效应。NGF 是介导膝 OA 外周疼痛敏化的核心因子, 其通过与酪氨酸激酶受体结合, 可诱导 P 物质、降钙素基因相关肽等神经肽的合成与释放, 进而敏化感觉神经末梢, 并调控关节局部炎症因子的产生[26], 黑麦花粉对 NGF 基因表达也有抑制作用, 对 NGF 的调控可同时实现“抗炎”与“镇痛”双重效果, 更全面匹配 OA 临床治疗需求。

II型胶原酶诱导的大鼠膝 OA 模型可模拟人类 OA 软骨退变、滑膜炎症及软骨下骨重构的病理特征, 是验证干预措施体内效果的关键模型[27]。本研究中, 模型组大鼠表现完全契合 OA“炎症激活-基质失衡-组织损伤”的病理特征。在 OA 中, NF-κB 蛋白家族在患者的多种细胞中广泛存在, 并在滑膜组织、软骨、关节液中呈现高水平表达, NF-κB 路径通过激活诱导 IL-1β、MMP、TNF-α、PEG_2 等物质的合成, 一方面刺激成纤维细胞增生、促进软骨细胞凋亡, 另一方面降解破坏软骨细胞外基质, 促进组织炎症, 加剧关节损伤[28]。本研究显示, 0.167 g/(kg • d)黑麦花粉干预 4 周可显著缓解大鼠 OA 模型的关节肿胀, 改善关节病理损伤, 同时使血清 COX 水平降至 1.19±0.01 (P<0.05), 并上调软骨组织 *COL2A1* 阳性染色面积、下调 *MMP13* 阳性染色面积, 证实黑麦花粉对大鼠 OA 关节损伤具有保护作用。但黑麦花粉对 IL-2、TNF-α 的表达水平无显著调控作用(P>0.05)。这一差异可能与体内外炎症微环境的异质性密切相关: 体外实验中 LPS 靶向作用于软骨细胞, 炎症反应具有极强特异性; 而体内实验中II型胶原酶诱导的炎症反应, 涉及软骨损伤介导的自身免疫应答, 其炎症调控通路更为复杂, 这也与 OA 炎症进程涉及免疫细胞浸润、多因子调控的研究结论相符[29]。黑麦花粉可显著抑制血清 COX 活性, 并调控软骨组织中 *COL2A1* 与 *MMP13* 的表达, 提示其可能通过“抗炎-促进基质合成-抑制基质降解”的多途径协同作用, 修复 OA 状态下软骨基质的代谢失衡, 其潜在作用机制或与 NF-κB 信号通路调控密切相关。

目前, 姜黄提取物、乳香提取物等植物提取物在 OA 领域拥有较为系统的临床研究基础[30], 但在我国暂无法应用于普通食品领域, 限制了其在 OA 日常干预中的推广应用。本研究结果表明, 黑麦花粉可显著抑制软骨细胞内炎症因子的表达, 有效减轻软骨细胞外基质的降解; 同时, 黑麦花粉能够改善大鼠关节炎的病理损伤及相关症状, 表面黑麦花粉有望成为治疗 OA 的潜在候选药物, 且食品应用属性为 OA 的多元化干预提供了新方向。

然而, 本研究仍存在一定局限性: (1)尚未深入探索黑麦花粉在 OA 软骨细胞保护与修复过程中涉及的关键信号通路及核心分子机制; (2)动物实验中黑麦花粉的剂量组设置较为单一, 未能全面覆盖活性成分的量效关系。后续研究可进一步优化实验方案, 重点明确黑麦花粉发挥 OA 改善作用的活性成分、最佳有效剂量及特异性作用靶点, 系统阐明其作用机制, 为黑麦花粉的临床转化应用及相关产品开发奠定坚实的理论与实验基础。

参考文献

[1] 李港, 欧阳湘竹, 郑礼强, 等. 骨关节炎炎症发病机制研究进展[J]. 交通医学, 2025, 39(4): 349–351, 356.
LI G, OUYANG XZ, ZHENG LQ, *et al*. Research progress on the pathogenesis of osteoarthritis inflammation [J]. Medical Journal of Communications, 2025, 39(4): 349–351, 356.

[2] KATZ JN, ARANT KR, LOESER RF. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: A review [J]. The Journal of the American Medical Association, 2021, 325(6): 568–578.

[3] RAHMATI M, MOBASHERI A, MOZAFARI M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the art, prospects, and future challenges [J]. Bone, 2016, 85: 81–90.

[4] HWANG HS, KIM HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16 (11): 26035–26054.

[5] 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.

The Joint Surgery Branch of the Chinese Orthopaedic Association, The Subspecialty Group of Osteoarthritis, Chinese Association of Orthopaedic Surgeons, The National Clinical Research Center for Geriatric Disorders (Xiangya Hospital), *et al.* Chinese guideline for diagnosis and treatment of osteoarthritis (2021 edition) [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2021, 41(18): 1291–1314.

[6] MACCHIONE N, BERNARDINI P, PIACENTINI I, *et al*. Flower pollen extract in association with vitamins (deprox 500) versus serenoa repens in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: A comparative analysis of two different treatments [J]. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2019, 18(2): 151–161.

[7] CAI T, VERZE P, ROCCA RL, *et al.* The role of flower pollen extract in managing patients affected by chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: A comprehensive analysis of all published clinical trials [J]. BMC urology, 2017, 17(1): 32.

[8] HONG JC, ZHI PW, YI RC, *et al*. Effects of pollen extract EA-10, P5 on chronic prostatitis or infertility with chronic prostatitis [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2002, 23(11): 1035–1039.

[9] ZHUANG H, REN X, JIANG F, *et al*. Indole-3-propionic acid alleviates chondrocytes inflammation and osteoarthritis via the AhR/NF-*κ*B axis [J]. Molecular Medicine, 2023, 29(1): 17.

[10] 袁昊, 曾晖, 肖德明, 等. 白藜芦醇通过NF-*κ*B信号通路抑制软骨细胞炎症因子的表达[J]. 中国骨与关节外科, 2016, 9(1): 75–79.
YUAN H, ZENG H, XIAO DM, *et al*. Resveratrol inhibits the expression of inflammatory cytokines in cartilage cells through NF-*κ*B signaling pathway [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Surgery, 2016, 9(1): 75–79.

[11] 张斌斌, 赵英杰, 杨雪枝, 等. 新鲜和冷冻人脐带来源间充质干细胞对大鼠骨关节炎的治疗作用比较[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(10): 1092–1100.
ZHANG BB, ZHAO YJ, YANG XZ, *et al*. Comparison of therapeutic effects between fresh and cryopreserved human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on rat osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2019, 24(10): 1092–1100.

[12] MOQBEL SAA, HE Y, XU L, *et al*. Rat chondrocyte inflammation and osteoarthritis are ameliorated by madecassoside [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020: 7540197. DOI: 10.1155/2020/7540197. eCollection2020

[13] GIGOUT A, HARAZIN D, TOPPING LM, *et al*. Early detection of osteoarthritis in the rat with an antibody specific to type II collagen modified by reactive oxygen species [J]. Arthritis Research & Therapy, 2021, 23(1): 113.

[14] ZHU X, WANG L, TENG X, *et al*. N-methyl pyrrolidone (NMP) alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury in articular chondrocytes [J]. Medical Science Monitor, 2018, 24: 6480–6488.

[15] 刘刚, 周铭涛, 朱卓, 等. 含姜黄和益生菌的蛋白固体饮料对大鼠膝骨关节炎症状改善作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(23): 296–302.
LIU G, ZHOU MT, ZHU Z, *et al*. Study on the improvement of knee osteoarthritis symptoms in rats by a protein solid beverage containing curcumin and probiotics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(23): 296–302.

[16] 康乾, 晋春阳, 王若秦, 等. 膝骨关节炎病因学及发病机制的研究进展[J]. 临床骨科杂志, 2025, 28(6): 899–903.
KANG Q, JIN CY, WANG RT, *et al*. Research progress on etiology and pathogenesis of knee osteoarthritis [J]. Journal of Clinical Orthopaedics, 2025, 28(6): 899–903.

[17] HE L, HE T, XING J, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1): 276.

[18] WAGENLEHNER FM, SCHNEIDER H, LUDWIG M, *et al.* A pollen extract (Cernilton) in patients with inflammatory chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: A multicentre, randomised, prospective, double-blind, placebo-controlled phase 3 study [J]. European Association of Urology, 2009, 56(3): 544–551.

[19] IVNU M, PUIA D, CUMPNA AA, *et al*. Clinical evaluation of a pollen-extract-based phytotherapy compared to conventional therapies in chronic prostatitis and chronic pelvic pain syndrome [J]. Medical Sciences, 2025, 13(3): 186.

[20] LOSCHEN G, EBELING L. Inhibition of arachidonic acid cascade by extract of rye pollen [J]. Arzneimittelforschung, 1991, 41(2): 162–167.

[21] ASAKAWA K, NANDACHI N, SATOH S, *et al*. Effects of cernitin pollen-extract (Cernilton) on inflammatory cytokines in sex-hormone-induced nonbacterial prostatitis rats [J]. Hinyokika Kiyo Acta Urologica Japonica, 2001, 47(7): 459–465.

[22] ZHENG L, ZHANG Z, SHENG P, *et al*. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis [J]. Ageing Research Reviews, 2021, 66: 101249.

[23] GUO Q, CHEN X, CHEN J, *et al*. STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF-*κ*B signaling pathway [J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(1): 13.

[24] 赵宇, 李洺, 赵江, 等. G 蛋白信号转导调节因子通过抑制 MAPK 和 NF-*κ*B 通路缓解脂多糖诱导的人膝骨关节软骨细胞炎症反应实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(11): 1387–1391.
ZHAO Y, LI M, ZHAO J, *et al*. Regulatory factors of G protein signaling alleviate lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human knee osteoarthritic chondrocytes by inhibiting MAPK and NF-*κ*B pathways [J]. Shaanxi Medical Journal, 2020, 49(11): 1387–1391.

[25] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2018, 44: 38–50.

[26] LEE AS, ELLMAN MB, YAN D, *et al*. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain [J]. Gene, 2013, 527(2): 440–447.

[27] 张文进, 孙志华, 李永吉, 等. 丹参注射液对膝骨性关节炎关节液及炎症血清细胞因子水平的影响[J]. 西部中医药, 2019, 32(2): 21–24.
ZHANG WJ, SUN ZH, LI YJ, *et al*. Influence of danshen injection on the level of serum cytokines and joint fluid of knee osteoarthritis [J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 32(2): 21–24.

[28] YAO Q, WU X, TAO C, *et al*. Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 56.

[29] LUP P, YUAN Q, WAN X, *et al*. Effects of immune cells and cytokines on different cells in OA [J]. Journal of Inflammation Research, 2023, 16: 2329–2343.

[30] ZHANG Y, GUI Y, ADAMS R, *et al*. Comparative effectiveness of nutritional supplements in the treatment of knee osteoarthritis: A network meta-analysis [J]. Nutrients, 2025, 17(15): 2547.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)