

骨关节炎关键基因与治疗药物的生物信息学筛选

丁晓, 史晨辉, 孟德峰, 王海英, 韩飞, 蒲沛东, 王梦雨, 王维山*
(石河子大学医学院第一附属医院骨科中心, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的:**利用生物信息学方法探寻骨关节炎(OA)关键基因及潜在治疗药物。**方法:**利用基因表达大数据(GEO)下载 GSE55235 芯片数据, R 语言 3.5.0 筛选差异表达基因, David 在线数据库对差异表达基因进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析, String 10.5 在线数据库构建分析蛋白质之间的相互作用, Cytoscape v3.6.1 软件进行可视化编辑, MCODE 插件进行子网络模块分析, 筛选出 OA 发生过程中的核心基因。最后根据关联性图谱(CMap)分析具有潜在治疗 OA 的小分子药物。**结果:**筛选出 556 个差异基因, 其中上调 252 个, 下调 304 个, 这些差异基因主要参与细胞外基质组织、炎症反应、细胞黏附、免疫应答以及胶原结合等方面; KEGG 通路分析发现差异基因主要参与细胞外基质受体相互作用, 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路及破骨细胞分化; 蛋白质相互作用发现白细胞介素-6(IL-6), JUN, 血管内皮生长因子 α (VEGFA), FOS, MYC 和早期生长反应蛋白-1(EGR-1), 转录激活因子-3(ATF-3)等关键基因; 筛选出了一些潜在治疗 OA 的小分子药物, 如石蒜碱和茴香霉素等。**结论:**所筛选的关键基因可能成为诊断 OA 的标志物或潜在治疗 OA 的靶点; 筛选出来的小分子药物可作为治疗 OA 的关键药物进行研发。

[关键词] 骨关节炎; 生物信息学; 基因芯片; 关联性图谱; 石蒜碱; 茴香霉素; 差异表达

[中图分类号] R22; R274; R28; C37; R344 + 13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0189-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190304

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0949.013.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:33

Bioinformatics Screening of Key Genes and Candidate Therapeutic Drugs of Osteoarthritis

DING Xiao, SHI Chen-hui, MENG De-feng, WANG Hai-ying, HAN Fei, PU Pei-dong,
WANG Meng-yu, WANG Wei-shan*
(Department of Orthopaedic Center, The First Affiliated Hospital of Medical College,
Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the key genes and potential therapeutic drugs for osteoarthritis (OA) by bioinformatics. **Method:** The microarray data GSE55235 was downloaded from the data platform of gene expression omnibus (GEO) and the differentially expressed genes were screened by R language software (3.5.0). Then, the differentially expressed genes were subjected to gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signaling pathway analysis with David online database. The protein-protein interaction was analyzed by String 10.5 online database and visual editing was analyzed by Cytoscape v3.6.1 software. Subnetwork module analysis was utilized by MCODE plugin to screen the core genes in the process of OA. Finally, small molecule drugs with potential treatment for OA were analyzed by connectivity map (CMap) database. **Result:** A total of 556 differentially expressed genes were screened, among which 252 were up-regulated and 304 were down-regulated. These genes were mainly involved in extracellular matrix (ECM) organization, inflammatory response, cell adhesion, immune response, collagen binding, etc. The analysis of

[收稿日期] 20180913(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660374, 81760404)

[第一作者] 丁晓, 在读硕士, 从事骨关节炎疾病研究, E-mail: 943611477@qq.com

[通信作者] * 王维山, 教授, 主任医师, 从事骨关节炎疾病研究, Tel: 0993-2859427, E-mail: wwsmc2002@sina.com

KEGG pathway showed that differential genes were mainly involved in ECM-receptor interaction, phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway and osteoclast differentiation. Some genes, such as interleukin-6 (IL-6), JUN, vascular endothelial growth factor α (VEGFA), FOS, MYC and early growth response gene-1 (EGR-1), activating transcription factor-3 (ATF-3), playing critical role in the process of OA were identified by protein-protein interaction. Some potential small molecular drugs for the treatment of OA have also been screened, such as lycorine and anisomycin. **Conclusion:** The selected key genes may be targets for the diagnosis of OA or potential targets for the treatment of OA, and the selected small molecular drugs can be developed as the key drugs for the treatment of OA.

[**Key words**] osteoarthritis; bioinformatics; gene chips; connectivity map; lycorine; anisomycin; differential expression

骨关节炎(OA)是一种退行性骨关节病,其特征在于关节软骨的逐渐丧失及关节疼痛,会严重影响患者的生活质量^[1-3]。目前,OA的治疗主要依靠非甾体类抗炎药物和手术治疗,其致病因素包括年龄、性别、肥胖和关节负重增多等^[4],但具体发病机制仍不明确。

随着芯片技术的发展和普及,生物学领域的各大公共数据库中已经公开了疾病相关的基因表达数据,海量差异基因已能轻易获得^[5]。在研究疾病相关基因变化的过程中,筛选出与疾病相关的关键基因是重要的一步。随着生物信息学技术的发展,科研人员可轻易获取多个基因之间的相互联系。为了更深层地研究OA各种基因的变化以及引起OA的关键基因,本研究拟通过检索基因表达大车(GEO)数据库中OA患者相关基因芯片,利用R语言3.5.0筛选OA患者和正常患者差异表达基因,对差异基因进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析,并分析相关分子机制。利用String 10.5在线数据库构建差异基因之间的蛋白质相互作用网络,并通过关联性图谱(CMap)筛选具有潜在治疗作用的小分子药物,为OA的早期诊断及发病机制研究提供重要的依据。

1 材料和方法

1.1 GEO芯片数据的获取与处理 从美国国立生物技术信息中心(NCBI)的GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载GSE55235基因表达谱的原始数据。该芯片为Affymetrix human genome U133A芯片,由Woetzel等在2014年提交,其中包括10例正常滑膜组织样本来自正常膝关节,10例骨性关节炎滑膜组织样本取自关节置换下来的关节滑膜,10例类风湿关节炎滑膜组织样本取自类风湿关节炎患者滑膜切除术取下的滑膜组织。本

研究选取正常滑膜组织和骨关节炎滑膜组织样本进行生物信息学分析。所选取芯片利用R语言3.5.0进行数据标准化。根据平台注释信息将探针转化为基因名。

1.2 差异基因的筛选 芯片进行处理和转化后,利用R语言3.5.0中的limma包^[6]按照调整后P值($\text{adjusted } P < 0.05$, $|\log_2 \text{FC}| > 2$ (FC表示差异表达基因上调或下调倍数)的筛选条件筛选OA和正常滑膜组织的差异表达基因^[7],对差异基因进行聚类分析,利用R语言3.5.0中的gplots包绘制热图。

1.3 差异基因GO功能富集和KEGG通路富集分析 将获得差异基因上传到David在线数据库(<https://david.ncicrf.gov>)进行GO富集分析及KEGG信号通路分析。GO功能分析从分子功能(molecular function, MF),生物学过程(biological process, BP)及细胞组分(cellular component, CC)3个部分进行富集分析^[8]。通过KEGG数据库对差异基因进行通路富集分析,了解疾病状态下显著改变的代谢通路。分别选取GO富集分析及KEGG信号通路分析中差异最显著的10个功能进行分析。

1.4 蛋白质相互作用网络构建和子网络模块分析

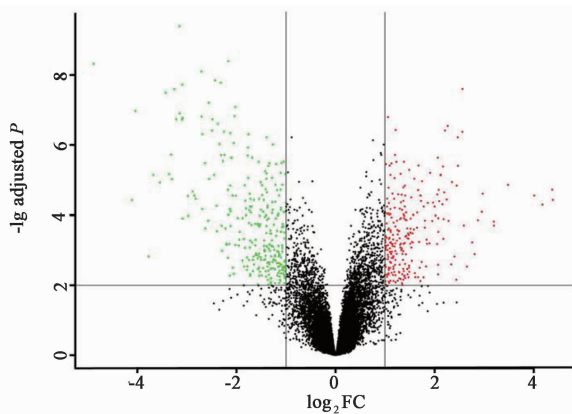
上述筛选出来的差异基因通过String 10.5在线数据库(<http://www.string-db.org>)进行蛋白间的相互作用网络分析。应用Cytoscape v3.6.1软件构建蛋白质相互作用网络并进行网络拓扑学分析,选取度值前10位的差异基因作为蛋白质网络中的关键基因。应用Cytoscape v3.6.1软件的插件MCODE对蛋白质相互作用网络进行模块分析,以MCODE分数 > 3 分作为显著性模块的筛选标准且基因数 > 4 个的子网络^[9]。

1.5 关联图分析 CMap(<http://www.broad.mit.edu/cmap>)是由Lamb等^[10]建立的公共数据库,揭示疾病、基因和药物之间的联系。其数据库收集了

1 309 种化合物,含有 7 000 种药物处理后的基因表达谱作为参照基因表达谱,可用作发掘具有潜在治疗疾病的药物。拓扑后所得差异表达的基因上传到 CMap 数据库上,将结果按照关联系数评分大小筛选出负相关前 10 位的小分子化合物。

2 结果

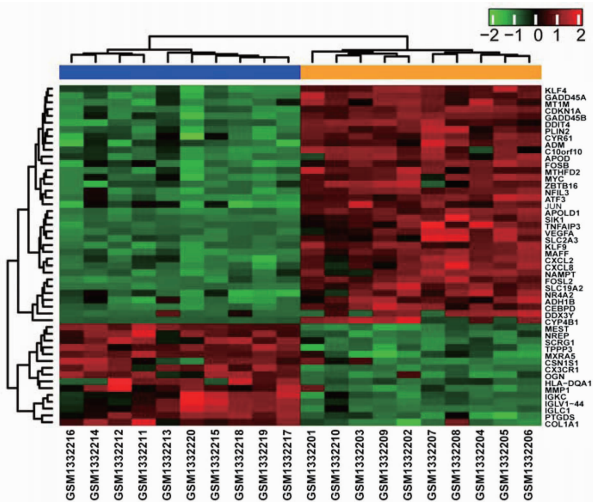
2.1 差异基因的筛选 通过 R 语言 3.5.0 软件将原始芯片归一化处理,利用 limma 包对 OA 和正常滑膜组织归一化的数据进行差异表达分析,最终得到 556 个差异基因。其中上调 252 个,下调 304 个,见图 1。利用 R 语言 3.5.0 中的 gplots 包绘制差异基因热图,见图 2。



红色代表上调基因;绿色代表下调基因;黑色代表无差异基因

图 1 OA 差异表达基因的火山分析

Fig.1 Volcano plot of differentially expressed genes in OA



红色代表上调;绿色代表下调

图 2 OA 差异表达最大的前 50 个基因热分析

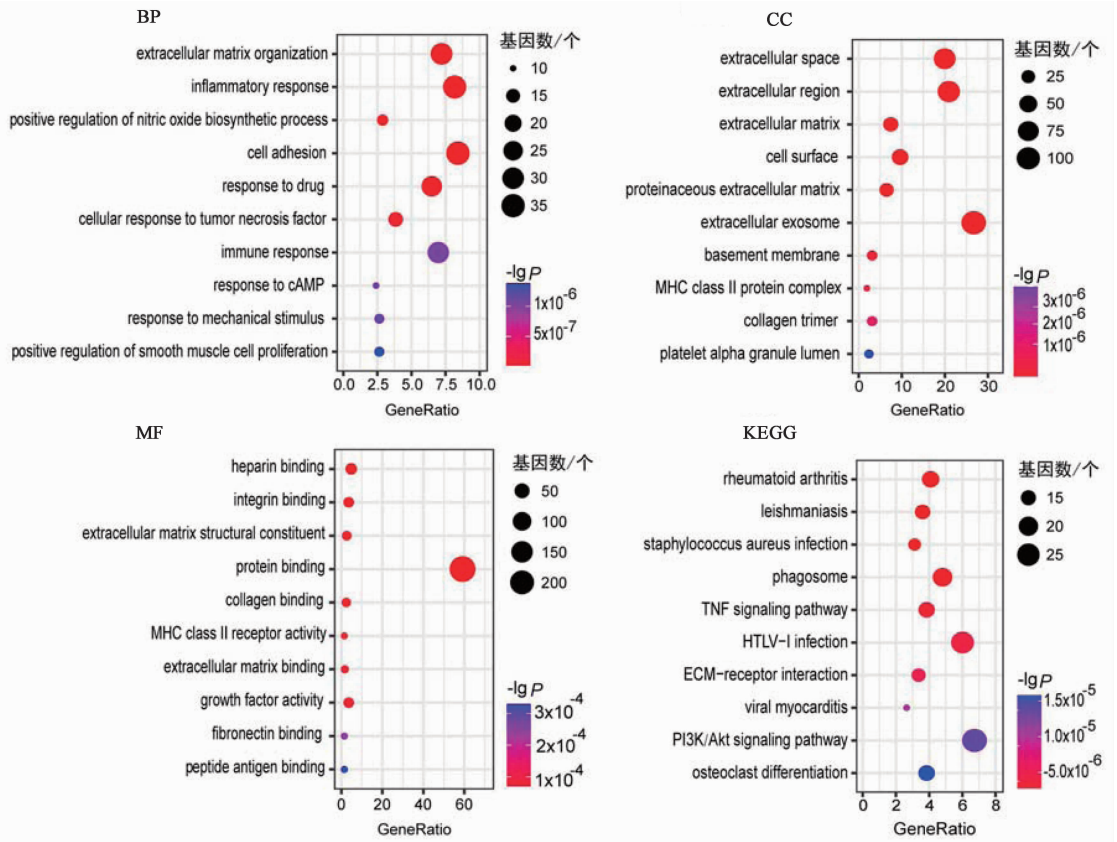
Fig.2 Heat map of top 50 differentially expressed genes in OA

2.2 差异基因 GO 分析和 KEGG 通路分析 为探究差异基因在 OA 发生与发展过程中的作用,将差异基因上传到 David 在线数据库,分别选取 GO

分析最显著的前十的 BP,CC 和 MF。主要包括细胞外基质组织 (extracellular matrix organization),炎症反应 (inflammatory response),细胞黏附 (cell adhesion),免疫应答 (immune response),腺苷-3',5'-环磷酸 (cAMP) 反应 (response to cAMP) 及机械刺激反应 (response to mechanical stimulus) 等生物学进程;并且参与细胞外间隙 (extracellular space),胞外区 (extracellular region),细胞外基质 (extracellular matrix),细胞表面 (cell surface),蛋白质胞外基质 (proteinaceous extracellular matrix),基底膜 (basement membrane),组织相容性复合体 II 类蛋白复合物 (MHC class II protein complex) 和胶原三聚体 (collagen trimer) 的组成;还可以促进细胞外基质结构组分 (extracellular matrix structural constituent),蛋白质结合 (protein binding),胶原结合 (collagen binding),组织相容性复合体 II 类受体活性 (MHC class II receptor activity),细胞外基质结合 (extracellular matrix binding),纤连蛋白结合 (fibronectin binding) 和肽抗原结合 (peptide antigen binding),见图 3。对差异基因进行 KEGG 通路分析发现,差异基因主要集中在细胞外基质受体相互作用 (ECM-receptor interaction),磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway) 及破骨细胞分化 (osteoclast differentiation),见图 3,4。

2.3 差异基因蛋白互作网络 将上述筛选出的差异基因上传到 String 10.5 在线数据库,转换差异基因编码蛋白的相互作用网络,共包含有 340 个节点和 1 804 条边。通过 Cytoscape v3.6.1 软件构建蛋白质之间相互作用网络,见图 5(A);进行拓扑学分析,筛选度值 (度值的大小表示基因在网络中的重要性) 大于平均度值的蛋白分子进行互作网络分析,共包含 99 个节点和 1 021 条边,见图 5(B)。度值前五的基因分别为白细胞介素-6 (IL-6),JUN,血管内皮生长因子 α (VEGFA),FOS,MYC。对于模块进行分析,可发现一些在 OA 局部调控中起重要作用的关键基因,见图 6,为后续研究 OA 的分子机制提供了更多的依据。

2.4 潜在治疗药物的筛选 关联系数评分 (score) 是 CMap 数据库中的重要参数,处于 -1 ~ 1,正值表示具有促进疾病作用,负值表示具有抑制疾病作用,绝对值越大表明相关性越大。拓扑后的差异基因映射到 CMap 数据库筛选出关联强度最大的负相关小分子化合物,score 排名前十的小分子化合物见表 1,



注:圆圈的大小表示参与基因的数量;颜色表示参与该功能的显著性

图 3 OA 差异基因 GO 功能分析和显著参与的 KEGG 信号通路

Fig. 3 GO functional analysis and significantly participated KEGG pathways of differentially expressed genes in OA

这些化合物是对 OA 基因表达具有反方向作用的干预分子。

3 讨论

OA 主要表现为关节滑膜无菌性炎症,其发病与多种因素有关。关节滑膜对关节软骨有一定的营养作用,有报道称滑膜病变是 OA 发生的重要机制之一^[11-12]。生物信息学是一门新兴的学科,已被广泛应用于高通量芯片、转录组测序等大数据分析中,挖掘疾病过程中的关键基因并预测其可能的生物学功能^[13],对探索疾病新的治疗靶点、确定诊断标志物以及新药研发具有重要意义。

本研究通过 GEO 数据库下载关节滑膜 GSE55235 芯片数据,通过生物信息学进行差异基因表达分析,筛选出 556 个差异基因,其中 252 个基因在 OA 中表达上调,304 个基因在 OA 中表达下调。对差异基因进行 GO 功能富集分析,这些差异基因主要参与细胞外基质、基底膜、细胞黏附及胶原结合等作用。关节软骨是透明软骨,由细胞外基质包裹软骨细胞组成,胶原和蛋白多糖构成是细胞外基质的主要成分。正常软骨细胞外基质合成和降解处于

动态平衡,当基因表达紊乱,平衡被打破,就会导致 OA 的发生。KEGG 通路分析发现这些差异基因主要参与 PI3K/Akt 信号通路、破骨细胞分化及细胞外受体相互作用。PI3K/Akt 信号通路对细胞的增殖、凋亡过程具有重要的调节作用,在骨关节炎的发生与发展过程中起着一定的作用,有研究发现 PI3K/Akt 信号通路在髋关节及膝关节炎中表达异常^[14-15]。另外,研究表明 PI3K/Akt 信号通路参与了调节人破骨细胞凋亡^[16];肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6) 可以通过 PI3K/Akt 信号通路来抑制破骨细胞凋亡,调节骨架重塑^[17-18];软骨下骨的硬化与关节软骨的退化相关^[19]。除此之外,大多差异基因被富集到细胞外基质相互作用,如 III 型胶原 α_1 (COL3A1), V 型胶原 α (COL5A) 1, COL5A2, 层粘连蛋白 α (LAMA) -2, LAMA-4, I 型胶原 α (COL1A) 2 和 COL1A1 等,这些基因表达异常提示 OA 发病过程中发生了细胞外基质的主动重构。

为了研究 OA 发生的分子机制,笔者对差异基因进行蛋白间分子网络分析,通过拓扑分析获得度值 > 11 的基因,度值最大的前五的基因分别为

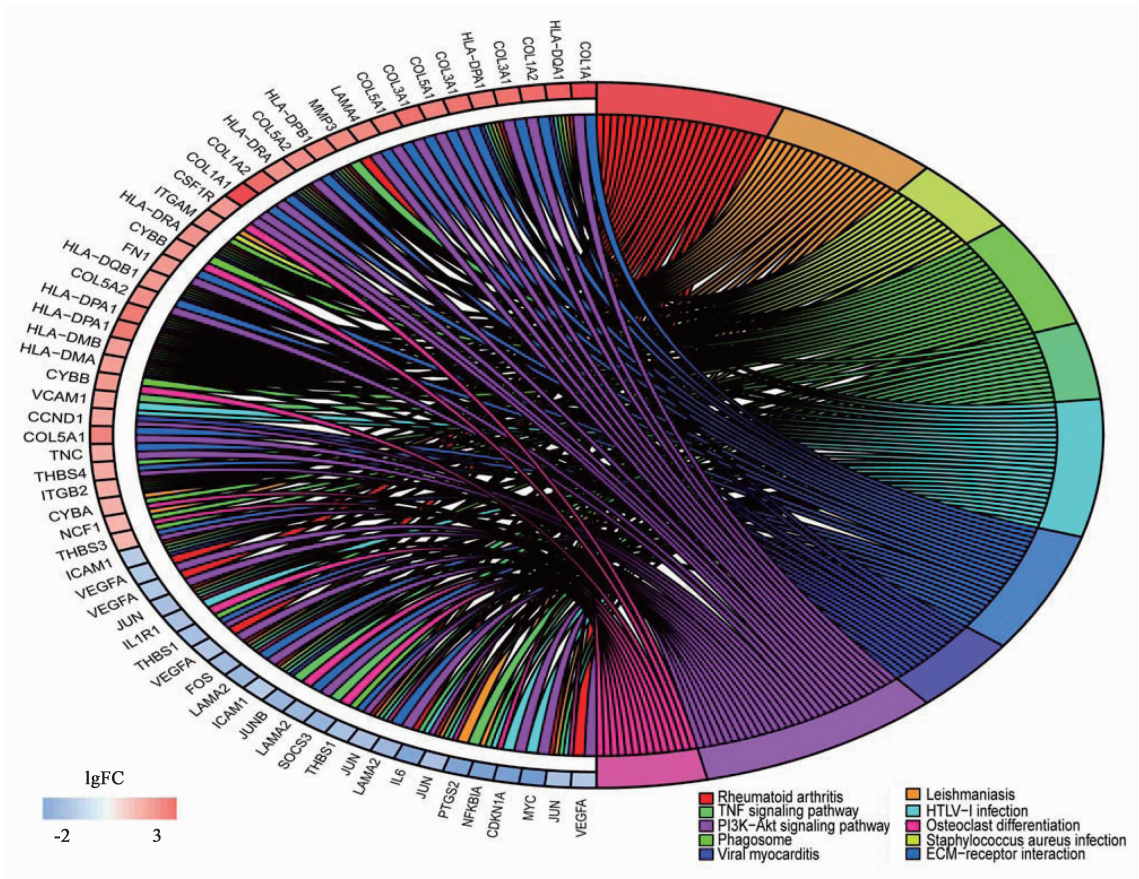
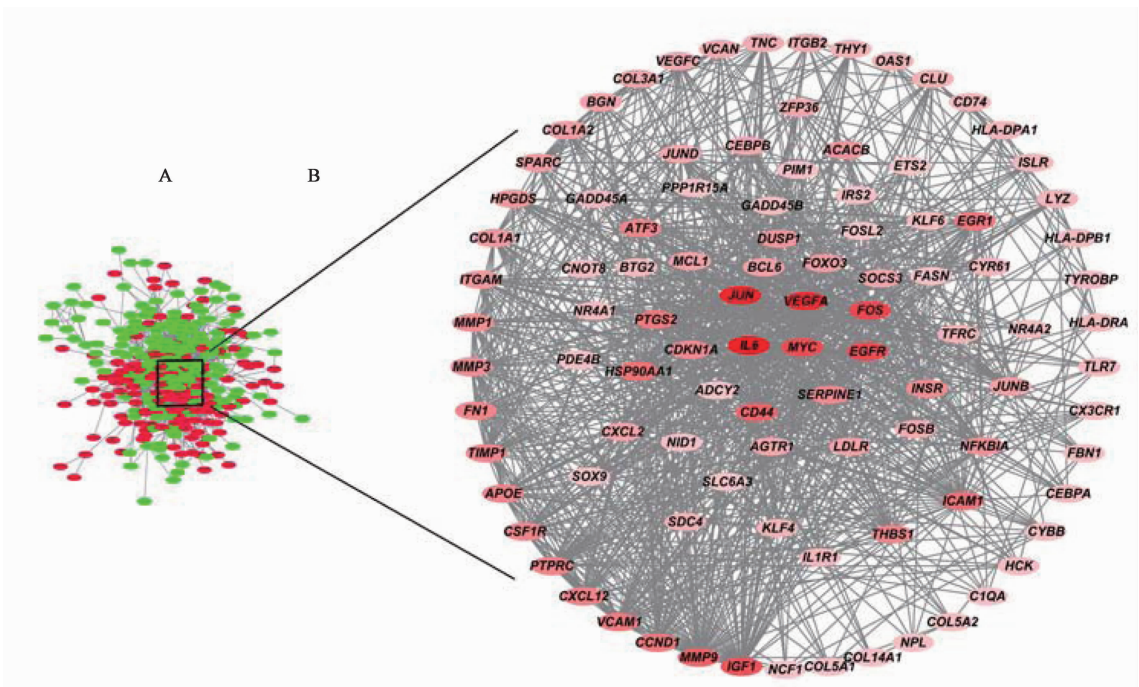


图 4 OA 差异基因 KEGG 通路分析及相应通路上的基因

Fig. 4 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes in OA and genes in corresponding pathways



A. 所有差异基因; B. 度值 ≥ 11 的差异基因; 颜色越深代表度值越大

图 5 OA 差异基因中蛋白质相互作用网络分析

Fig. 5 Protein-protein interaction networks of differentially expressed genes in OA

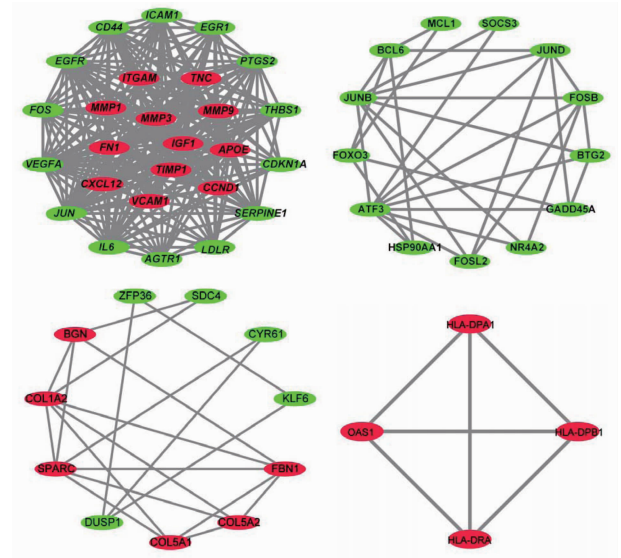


图 6 OA 差异基因蛋白网络的子网络分析 (包含 4 个模块)
Fig. 6 Sub-module analysis of protein-protein interaction networks of differentially expressed genes in OA (including 4 modules)

表 1 前 10 个具有潜在治疗 OA 的小分子药物
Table 1 Top 10 small molecule drugs with potential for treating OA

CMap 名称	score	n	富集分数	P	特异度
毒毛旋花子苷元 strophanthidin	-1.000	4	-0.611	0.058 35	0.078 7
氮杂环醇 azacyclonol	-0.987	5	-0.516	-	-
石蒜碱 lycorine	-0.928	5	-0.814	0.000 54	0.020 0
环吡酮 ciclopirox	-0.916	4	-0.708	0.014 98	0.066 7
茴香霉素 anisomycin	-0.863	4	-0.998	0	0
非洛地平 felodipine	-0.862	7	-0.276	-	-
氯普噻吨 chlorprothixene	-0.856	4	-0.405	-	-
哇巴因 ouabain	-0.844	4	-0.480	0.222 01	0.289 5
七里香苷甲 helveticoside	-0.837	6	-0.523	0.047 75	0.155 8
氯碘羟喹 cloiquinol	-0.837	5	-0.389	-	-

注: n. 数据库中小分子化合物实例验证的例数; P. 评估富集关联系数的显著性。

分支之一,常作为抗炎治疗的靶点^[29],通过调节 JNK 信号通路可以有效缓解骨关节的进展^[30]。VEGFA 是血管生长因子家族的一员,对血管内皮的增殖、存活迁移及血管通透性具有强烈的影响作用^[31]。其在 OA 发展过程中扮演重要的角色,可以上调 MMP-1 和 MMP-3 使软骨基质降解^[32-33]。另外,有研究表明 VEGF 可以抑制蛋白聚糖和 II 型胶原的合成和表达而导致关节软骨的退变^[34]。

本研究通过模块分析发现一些新的与 OA 有关的基因,如早期生长反应蛋白-1 (EGR-1),转录激活因子-3 (ATF-3) 等,可能作为 OA 潜在诊断和治疗的靶点。只有少数研究探讨了 EGR-1 在软骨中的

IL-6, JUN, VEGFA, FOS 和 MYC。度值越大表明其与 OA 的关系越密切,可以作为治疗干预的优先选择。IL-6 既是一种促炎细胞因子,又是一种抗炎性肌因子,可以增加滑膜组织炎症,刺激软骨细胞的增殖,也可以介导 IL-1 促进基质金属蛋白酶的合成^[20],被认为是 OA 发病及发展的重要因素之一^[21]。研究表明在 OA 患者血清和滑膜液中 IL-6 表达增高^[22]。Vignon 等^[23]发现滑膜和 OA 软骨细胞中均有 IL-6 高表达,而正常软骨细胞则不表达。JUN 和 FOS 是编码激活蛋白-1 (AP-1) 的不同亚单位^[24],但 AP-1 在软骨细胞中的作用还需进一步研究。有证据表明,IL-1 通过激活 JUN/FOS 杂二聚体而诱导基质金属蛋白酶 (MMP)-13 的产生^[25-26]。含有 FOS 的 AP-1 杂二聚体被证明是软骨细胞分化所必需的^[27]。另外, JUN 表达的 c-Jun 蛋白对调节软骨细胞的凋亡有重要作用^[28]。c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 是丝裂原活化蛋白酶 (MAPK) 家族的重要

作用^[35-37], EGR-1 主要参与调节软骨细胞的终末分化,并介导促炎细胞因子的分解反应。ATF-3 参与调节细胞增殖和分化的调控, ATF-3 通过调节软骨细胞中炎症细胞因子的分泌,影响 MMP-13 在软骨细胞中的表达,进而影响 OA 的进展^[38-39]。本研究通过 CMap 筛选了 OA 潜在治疗的小分子化合物,石蒜碱是存在石蒜科植物中的一种活性喹啉类生物碱,具有抗炎、抗病毒的作用^[40-42],在适当浓度下,可抑制 IL-1 β 介导的 MMP-3 和 MMP-13 的表达^[43]。茴香霉素是由链霉菌产生的一种蛋白合成抗生素,主要用于各种人类癌症细胞的诱发与凋亡^[44],可以抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2) 的表达^[45],有

可能成为治疗 OA 的小分子药物。

[参考文献]

- [1] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2013, 21(1) : 16-21.
- [2] 田雪秋, 牟开今, 刘丽娟, 等. 骨关节炎相关危险因素研究进展 [J]. *中国社区医师*, 2016, 32(15) : 14-15.
- [3] 匡尧, 李正飞, 孙鹏, 等. 独活寄生汤配合膝四针治疗风寒湿痹型膝关节关节炎的临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18) : 147-152.
- [4] Allen K D, Golightly Y M. State of the evidence [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(3) : 276-283.
- [5] 孙啸, 王晔, 何飞跃, 等. 生物信息学在基因芯片中的应用 [J]. *生物物理学报*, 2001, 17(1) : 27-34.
- [6] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7) : e47.
- [7] GOU Y, BAO Y, MA M, et al. Identification of key candidate genes and pathways in colorectal cancer by integrated bioinformatical analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4) : 722-736.
- [8] Roos D S. Computational biology: bioinformatics-trying to swim in a sea of data [J]. *Science*, 2001, 291(5507) : 1260-1261.
- [9] 罗磊, 龚宝成, 刘福团. GSE74602 芯片数据中直肠癌关键基因与治疗药物的生物信息学筛选 [J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(4) : 457-467.
- [10] Lamb J, Crawford E D, Peck D, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease [J]. *Science*, 2006, 313(5795) : 1929-1935.
- [11] 李跃军, 朱卫国, 方钦正, 等. 骨关节炎滑膜组织中 β -catenin 和基质金属蛋白酶 13 的临床意义 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(16) : 2472-2477.
- [12] Kuryliszyn-Moskal A. Comparison of blood and synovial fluid lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 1995, 4(1) : 43-50.
- [13] Moore J H, Asselbergs F W, Williams S M. Bioinformatics challenges for genome-wide association studies [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(4) : 445-455.
- [14] XU Y, Barter M J, Swan D C, et al. Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritic hip cartilage: commonality and discord between hip and knee OA [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2012, 20(9) : 1029-1038.
- [15] Steinberg J, Ritchie G R S, Roumeliotis T I, et al. Integrative epigenomics, transcriptomics and proteomics of patient chondrocytes reveal genes and pathways involved in osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 8935-8945.
- [16] YUE L, Haroun S, Parent J L, et al. Prostaglandin D₂ induces apoptosis of human osteoclasts through ERK1/2 and Akt signaling pathways [J]. *Bone*, 2014, 60(3) : 112-121.
- [17] 王链链, 郭晓英. 破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(6) : 742-748.
- [18] CHEN L L, HUANG M, TAN J Y, et al. PI3K/AKT pathway involvement in the osteogenic effects of osteoclast culture supernatants on preosteoblast cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(19/20) : 2226-2232.
- [19] Steinmetz M P, Verrees M, Anderson J S, et al. Correlation between subchondral bone plate thickness and cartilage degeneration in osteoarthritis of the ankle [J]. *Foot Ankle Int*, 2014, 35(12) : 1341-1349.
- [20] 罗玉明, 郑维篷, 魏合伟. 骨关节炎与细胞因子 TNF- α , IL-6 关系的研究进展 [J]. *现代诊断与治疗*, 2013, 24(2) : 326-327.
- [21] 王景红, 夏坤, 张志千, 等. 骨关节炎相关细胞因子及生物标志物的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(10) : 225-230.
- [22] Doß F, Menard J, Hauschild M, et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells [J]. *Scand J Rheumatol*, 2007, 36(2) : 136-139.
- [23] Vignon E, Balblanc J C, Mathieu P, et al. Metalloprotease activity, phospholipase A2 activity and cytokine concentration in osteoarthritis synovial fluids [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 1993, 1(2) : 115-120.
- [24] Hess J, Angel P, Schorppkistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt25) : 5965-5973.
- [25] Fahmi H, Battista J A D, Pelletier J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(3) : 595-607.
- [26] Schmucker A C, Wright J B, Cole M D, et al. Distal interleukin-1 β (IL-1 β) response element of human matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) binds activator protein 1 (AP-1) transcription factors and regulates gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2) : 1189-1197.
- [27] Ionescu A M, Schwarz E M, Vinson C, et al. PTHrP modulates chondrocyte differentiation through AP-1 and

- CREB signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (15): 11639-11647.
- [28] YE Z, CHEN Y, ZHANG R, et al. c-Jun N-terminal kinase-c-Jun pathway transactivates Bim to promote osteoarthritis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92 (2): 132-139.
- [29] 孙琪. 高压氧对白细胞介素-1 β 诱导的炎症髌突软骨细胞 JNK/c-Jun 信号通路影响的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [30] LI Z, MENG D, LI G, et al. Celecoxib combined with diacerein effectively alleviates osteoarthritis in rats via regulating JNK and p38MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2015, 38(4): 1563-1572.
- [31] 李晓蕊, 郭青龙, 卢娜. VEGFA/VEGFR2 作用于血管内皮细胞途径及其抑制剂研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2016, 23(3): 274-278.
- [32] Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A, et al. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2014, 38(5): 1099-1104.
- [33] 李俊, 刘日光, 邱波, 等. 血管内皮生长因子对关节软骨细胞 mmP-1 及 mmP-3 表达的影响 [J]. *中国医药导刊*, 2013, 15(3): 519-521.
- [34] CHEN X Y, HAO Y R, WANG Z, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on aggrecan and type II collagen expression in rat articular chondrocytes [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(11): 3359-3364.
- [35] Nebbaki S S, ElMansouri F E, Afif H, et al. Egr-1 contributes to IL-1-mediated down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2): R69.
- [36] Rockel J S, Bernier S M, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNF α -induced MEK/ERK signalling [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(1): 1-14.
- [37] TAN L, PENG H, Osaki M, et al. Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1 β [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 17688-17700.
- [38] Iezaki T, Ozaki K, Fukasawa K, et al. ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development [J]. *J Pathol*, 2016, 239(4): 426-437.
- [39] CHAN C M, Macdonald C D, Litherland G J, et al. Cytokine-induced MMP13 expression in human chondrocytes is dependent on activating transcription factor 3 (ATF3) regulation [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (5): 1625-1636.
- [40] KANG J, ZHANG Y, CAO X, et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264. 7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 249-256.
- [41] Çitöglu G S, Acikara O B, Yilmaz B S, et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 81-87.
- [42] LIU J, YANG Y, XU Y, et al. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication [J]. *Virology*, 2011, 8(1): 483-492.
- [43] CHEN S, FANG X Q, ZHANG J F, et al. Lycorine protects cartilage through suppressing the expression of matrix metalloproteinases in rat chondrocytes and in a mouse osteoarthritis model [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (4): 3389-3396.
- [44] Czech D P, Lee J, Correia J, et al. Transient neuroprotection by SRY upregulation in dopamine cells following injury in males [J]. *Endocrinology*, 2014, 155 (7): 2602-2612.
- [45] 陆锡俭. JNK 信号在茴香霉素诱导 Jurkat T 细胞凋亡中的作用 [D]. 广州: 暨南大学, 2011.

[责任编辑 刘德文]