

## 基于 p38 MAPK 信号通路分析槲皮素保护骨性关节炎 关节软骨的机制

王象鹏<sup>1</sup>, 谢文鹏<sup>2</sup>, 毕亦飞<sup>3</sup>, 王宝安<sup>4</sup>, 毕荣修<sup>1,2\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;  
3. 山东中医药大学附属眼科医院, 济南 250002; 4. 山东商业职业技术学院, 济南 250103)

**[摘要]** 目的:探讨槲皮素通过靶向干预 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路保护膝关节骨性关节炎关节软骨的作用机制。方法:笔者通过网络药理学技术,科学的对槲皮素保护骨性关节炎患者关节软骨的靶点因子、信号通路进行预测,并对其进行分析。选择一条与骨性关节炎相关密切的预测通路对其采用体外细胞实验进行验证,通过细胞计数试剂-8 (CCK-8)方法筛选出药物最佳干预浓度,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)对骨性关节炎及密切相关炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )进行检测,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测槲皮素干预后 p38 MAPK 信号通路下的相关 mRNA,蛋白的表达。结果:通过网络药理学预测 MAPK 信号通路与骨性关节炎患者(OA)存在十分密切的相关性,并选取该通路中最为密切的 p38 MAPK 信号通路进行研究,通过药物浓度筛查发现在 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的槲皮素干预后相关炎症因子降低最为明显,并且,在该浓度的槲皮素干预下抑制 p38 MAPK 信号通路中 p38,磷酸化(p)-p38,基质金属蛋白酶-13(MMP-13),解聚蛋白样金属蛋白酶-4(ADAMTS-4)等关键相关因子表达,促进 II 型骨胶原蛋白(Collagen II)的表达。结论:槲皮素在骨性关节炎疾病防治中具有降低软骨炎症因子表达的作用,可通过抑制 p38 MAPK 通路相关因子表达而向好发展,所有结果显示,槲皮素具有降低 OA 炎症因子表达,保护 OA 患者关节软骨的作用。

**[关键词]** 槲皮素; 网络药理学; p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路; 骨性关节炎; 保护机制

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0169-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192084

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200911.1120.003.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-11 16:01

### Mechanism of Quercetin in Protecting Articular Cartilage from Osteoarthritis Based on p38 MAPK Pathway

WANG Xiang-peng<sup>1</sup>, XIE Wen-peng<sup>2</sup>, BI Yi-fei<sup>3</sup>, WANG Bao-an<sup>4</sup>, BI Rong-xiu<sup>1,2\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China;

3. Medical College of Optometry and Ophthalmology of Shandong University of TCM, Ji'nan 250002,

China; 4. Shandong Institute of Commerce and Technology, Ji'nan 250103, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of quercetin (Qu) on articular cartilage of knee osteoarthritis and its mechanism by inhibiting p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Method:** Through the network pharmacology technology, we scientifically predicted and analyzed the target factors and signal pathways of Qu in the protection of articular cartilage in patients with osteoarthritis. We selected a prediction pathway closely related to osteoarthritis and validated it by cell experiment *in vitro*. The best

**[收稿日期]** 20200313(007)

**[基金项目]** 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH099);济南市科技发展计划项目(201805044)

**[第一作者]** 王象鹏,博士,从事骨伤科学研究,E-mail:doctorwangxp@163.com

**[通信作者]** \* 毕荣修,教授,博士生导师,从事骨伤科学研究,E-mail:birongxiu@163.com

intervention concentration of the drug was selected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The osteoarthritis and its closely related inflammatory factors interleukin(IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of related mRNA and protein in p38 signal pathway after Qu intervention were detected by quantitative real time polymerase chain reaction(Real-time PCR) and Western blot. **Result:** It was predicted that MAPK signal pathway was closely related to osteoarthritis by network pharmacology, and p38 MAPK pathway, which was most closely related to osteoarthritis, was selected for study. The results showed that 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Qu had the most obvious effect in decreasing the expression of related inflammatory factors, inhibited the expression of p38, phosphorylated(p)-p38, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs-4 (ADAMTS-4) in the pathway, and promoted the expression of Collagen II. **Conclusion:** Qu could decrease the expression of cartilage inflammatory factors in the prevention and treatment of osteoarthritis, and the effect can be well developed by intervening and inhibiting p38 MAPK pathway related factor expression level. All the results show that Qu can decrease osteoarthritis inflammatory factors and protect articular cartilage in patients with osteoarthritis.

[Key words] quercetin; network pharmacology; p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; osteoarthritis; protective mechanism

骨性关节炎(OA)是一种关节退行性改变的骨性疾病,其主要由关节软骨、软骨下骨、滑膜、韧带等结构改变而产生症状,可以引发疼痛和关节僵硬,属于中医学“痹证”“骨痹”“鹤膝风”的范畴,OA患者平素阳气不足,抵御外邪之力较弱,风、寒、湿等外邪易于趁虚而入,痹阻经脉、肌肉、骨节,导致经络不通而感疼痛、肿胀、酸楚或肢体关节活动不利。因此,肝肾亏虚是OA病变的根本,风、寒、湿三邪外侵为主要诱因。其证型主要为肝肾亏虚、寒湿痹阻、气血瘀滞及痰瘀阻络。病理特征主要包括关节软骨的退行性变、关节内炎症症状和软骨下骨的改变等<sup>[1]</sup>。在全球范围内,OA的发病率约占世界人口的13%,世界卫生组织(WHO)将其称为“第一致残疾病”,发病率高达53%,对于患者的生活质量严重威胁<sup>[2]</sup>。由于OA在老年人群中发病率更高,未来此疾病的影响或将成指数增长<sup>[3]</sup>。目前,多数研究认为针对此类疾病诊疗指南推荐的药物主要包括口服止痛药、非甾体抗炎药和注射皮质类固醇等。然而,这些治疗只能暂时缓解症状,并具有不良反应,如刺激胃肠道和增加心血管疾病的风险等<sup>[4]</sup>。所以,研究OA的有效治疗方法一直是骨伤科领域的热点。OA的发病机制尚不明确,多数学者认为其与促炎性细胞因子增多、炎症相关信号通路激活、细胞外基质降解等有关<sup>[5-7]</sup>。

槲皮素属于黄酮类化合物,大量存在于蔬菜、水果及中草药中,作为自由基清除物效果十分明显,具有抗氧化、抗应激、抗炎等作用,可以有效地减少与氧化应激相关的骨性关节炎、类风湿性关节

炎等疾病的发病几率<sup>[8]</sup>。KANZAKI等<sup>[9]</sup>报道口服槲皮素(45  $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ )并联合使用氨基葡萄糖及软骨素,OA疼痛症状明显得到改善。现有研究表明槲皮素可显著降低巨噬细胞炎性介质的形成,显著降低白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),IL-6等细胞因子的表达<sup>[10]</sup>,下调基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达等<sup>[11]</sup>,具有潜在药用价值。

本研究旨在深入探究OA的发病机制及槲皮素对骨性关节炎的药用价值,为预防和治疗OA提供理论依据和实验基础。笔者总结前期文献认为槲皮素保护关节软骨细胞的机制可能是通过靶向阻断预测的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中p38 MAPK信号通路来实现的。本文以生物信息学为基础,采用网络药理学技术挖掘预测槲皮素保护骨性关节炎关节软骨作用靶点及通路,分析该药物作用机制,对于槲皮素在骨性关节炎领域的应用及推广具有十分重要的意义。并通过体外细胞实验研究,检测预测细胞信号通路MAPK信号通路中p38 MAPK信号通路相关因子的表达水平情况,进一步观察槲皮素对关节软骨细胞的作用,继而达到证明槲皮素保护OA患者关节软骨的用。

## 1 材料

DMEM完全培养基[中科迈晨(北京)科技有限公司,批号CM15019],胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号10100147),槲皮素(MedChemExpress公司,批号HY-18085,纯度>98.0%);大鼠IL-1 $\beta$ 细胞因子冻干粉(美国R&D Systems公司,批号501-RL-010);MMP-13,p38 MAPK,II型胶原蛋白(Collagen

II),磷酸化(p)-p38 MAPK, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(武汉赛维生物科技有限公司,批号分别为ab51072, ab47363, ab34712, AF4001, TA-09);解聚蛋白样金属蛋白酶-4(ADAMTS-4,美国Abcam公司,批号ab185722);信号通路阻断剂SB203580(MedChemExpress公司,批号HY-10256);逆转录试剂盒(Roche,批号04379012001);辣根过氧化物酶(HRP)结合山羊抗兔抗体,甲苯胺蓝染色液,细胞计数试剂(CCK-8);IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(联科生物科技有限公司,批号GB23303, G3660, cck805, EK301B/3-96, EK382/3-96)。trizol试剂(Invitrogen公司,批号15596026);Stepone plus型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(ABI公司);SW-CJ-1FD型超净工作台(苏净安泰公司);NanoDrop2000型超微量分光光度计(Thermo公司);DYCZ-24DN型电泳仪(北京六一仪器厂);Trans Blot Turbo型转膜仪(美国Bio Rad公司);Axiovert 40型显微镜(德国Zeiss公司)。引物设计由武汉赛维生物科技有限公司(中国)设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 List of primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
p38 MAPK	上游 GTGCCCGAACGATACCAGAAC	287
	下游 TGAATTCCTCCAGTGACCTTGC	
MMP-13	上游 CTATCCCTTGATGCCATTACCAG	212
	下游 TAAGGTCACGGGATGGATGTTCC	
ADAMTS-4	上游 ACCGTCAAGGCTCCTTCTGG	241
	下游 ACCAAGTTGACAGGGTTTCGG	
Collagen II	上游 ACGCTACACTCAAGTCACTGAACAAC	175
	下游 TCAATCCAGTAGTCTCCGCTCTTC	
$\beta$ -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	136
	下游 GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	

本项目体外实验采用1周龄SPF级健康雄性SD大鼠,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产合格证号SCXK(鲁)20140007,体质量30~50g,实验经山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(批件号AWE-2019-044),实验过程符合实验动物伦理要求相关规定。

## 2 方法

**2.1 槲皮素对OA的网络药理学研究** 通过SwissTargetPrediction数据库检索预测槲皮素相关

靶点<sup>[12]</sup>,将槲皮素及其对应的作用靶点基因导入到Cytoscape 3.6.1软件(加拿大Genome公司),通过此软件构建槲皮素与基因靶点的信息网络。通过Online Mendelian Inheritance in Man数据库(OMIM), Therapeutic Target Database数据库(TTD),遗传药理学与药物基因组学数据库(PharmGKB)对与骨性关节炎相关的靶点进行检索筛选,然后将筛选结果导入到Cytoscape软件中,采用Bisogenet生物信息学插件构建骨性关节炎-靶点基因的网络。通过STRING将上述的化学成分、骨性关节炎及相关靶点基因网络合并,进行筛选,寻找共同靶点基因之间关系,并对寻找到的共同基因分别采用基因本体(GO)分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析,更深一层地发现及阐明槲皮素与骨性关节炎之间的药用关系。

**2.2 软骨细胞提取** 选用1周龄SD雄性大鼠将其处死,清理毛发后采用75%乙醇进行浸泡。提取股骨髁部及胫骨平台部位的关节软骨,含有1%双抗的磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗,将组织剪成约1 mm<sup>3</sup>碎块,通过0.25%胰蛋白酶进行消化,消化时间30 min,再采用二型胶原酶溶液消化4 h。软骨细胞密度为2 $\times$ 10<sup>5</sup>个/mL,将其接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,置于5% CO<sub>2</sub>,37℃恒温培养箱,培养后通过分离获取原代细胞。当软骨细胞生长铺满瓶底(达到瓶底面积80%时)进行细胞传代,比例1:3,当传到第二代细胞进入对数生长期时进行实验。

**2.3 甲苯胺蓝染色法检测软骨细胞** 取大鼠膝关节软骨细胞,按5 $\times$ 10<sup>4</sup>个/孔接种于6孔板内。当细胞量达到培养瓶一半以上面积后,采用多聚甲醛固定。然后冲洗5 min后均匀加入甲苯胺蓝染液,染色15 min后冲洗,至深蓝色消失。最后,加入无水乙醇漂洗至无色进行观察。

**2.4 CCK-8法筛选槲皮素最佳干预浓度** 接种密度均按2 000个/孔,每组5个复孔,细胞贴壁后换液,调零组和空白组用正常完全培养液换液,药物组均采用10  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup> IL-1 $\beta$ 处理,培养箱中培养24 h后,弃培养基,调零组和空白组均加入正常培养基100  $\mu$ L,药物组分别加入含0, 50, 100, 150, 200, 400, 600  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>不同浓度的槲皮素培养基,干预24 h后,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,37℃孵育2 h,以450 nm波长检测各孔的吸光度A。

**2.5 实验分组及干预** 实验共分为6组(W1~W6),除W1组其余各组均用含10  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup> IL-1 $\beta$ 进行处理,37℃,5% CO<sub>2</sub>培养24 h。干预成功后,W1组,W2

组加入正常的完全培养基, W3组加入含0.1% DMSO的完全培养基, W4组加入含100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  槲皮素的完全培养基, W5组加入含10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SB203580的完全培养基; W6组加入含有100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  槲皮素和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SB203580的完全培养基, 处理24 h。收集上清液,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。

**2.6 ELISA法检测相关炎性因子IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量** 按照ELISA试剂盒说明书进行操作, 空白孔加入细胞培养基, 样本孔加检测缓冲液和W1~W6样本, 每组3个重复检测样本。将处理后的检测抗体每孔逐一加入, 封板, 震荡孵育2 h。清洗后将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素加入每孔, 孵育45 min, 洗板。最后加入底物显色液(TMB), 避光, 20 min后孵育终止, 在30 min内采用酶标仪测定450 nm波长A。

**2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测p38信号通路中p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4, Collagen II mRNA表达水平** 各组细胞干预完成之后, 弃掉培养基后PBS缓冲液冲洗3遍。每瓶细胞加入RNA抽提液(trizol), 运用trizol法提取总RNA, 提取完成后, 使用Nanodrop 2000检测各组RNA浓度。按照Thermo反转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)将mRNA反转录得cDNA, 使用LightCycler 480 Real-time PCR仪进行扩增和检测, 使用25  $\mu\text{L}$  反应体系(12.5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq II, 2.5  $\mu\text{L}$  cDNA, 2.0  $\mu\text{L}$  基因引物及8.0  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O), 反应条件为95  $^{\circ}\text{C}$  预变性10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸15 s, 共40个循环; 溶解曲线95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  60 s; 冷却, 每个反应重复3次。定量的数据计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测p38 MAPK信号通路中相关蛋白p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, Collagen II及ADAMTS-4的表达水平** 各组细胞干预完成后, 弃掉培养基, 冲洗, 蛋白裂解液冰上裂解30 min, 转移至离心管管, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 离心10 min, 提取总蛋白溶液, 采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。电泳, 转膜, 稀释一抗(1:1 000 5%脱脂牛奶, 磷酸化采用5%BSA), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育一夜。再用TBST缓冲液在室温下脱色, 清洗, 每次5 min。然后将二抗用TBST缓冲液稀释3 000倍, 室温下孵育30 min后, 再用TBST缓冲液在室温下脱色, 清洗, 每次5 min。

使用化学发光检测试剂盒(GE Healthcare Life Sciences)进行显影, Image-lab系统进行成像及灰度值分析。目标蛋白的相对表达量=目标蛋白电泳条灰度值/内参 $\beta$ -actin蛋白的电泳条带灰度值。

**2.9 统计学分析** 实验数据统一用SPSS 20.0统计软件分析, 所得数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有数据均采用正态分布检验其正态性, 对于符合正态分布的多组间数据资料, 采用单因素方差分析进行组间比较, 方差齐则采用最小显著性差异法(LSD)检验, 方差不齐则采用Games-Howell检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 槲皮素治疗OA的网络药理学研究** 槲皮素对应靶点共89个, 通过Uniprot在线数据库寻找蛋白名称, 同时, 通过采用Cytoscape 3.6.1软件, 构建槲皮素靶点网络, 并且对其进行分析。各节点表示靶点基因或化合物, 各边表示节点之间的关系。网络有90个节点(1个化学成分, 89个靶点基因), 89个边, 体现了一药多靶的复杂网络关系, 也进一步验证了槲皮素多靶点、多路径的协同防治作用。通过OMIM, TTD, PharmGKB 3个数据库进行筛选, 得到与骨性关节炎相关的靶点基因, 将重复基因剔除, 剩余相关基因共2 976个。采用Bisogenet插件, 构建骨关节炎-靶点基因的网络, 其中所构建的相关网络共有436 451个边, 14 141个节点, 通过分析说明骨性关节炎的发病因素与发病机制存在复杂的关系。将化学成分-靶点基因和骨关节炎-靶点基因的网络合并, 筛选出共同作用靶点基因66个, 见图1。

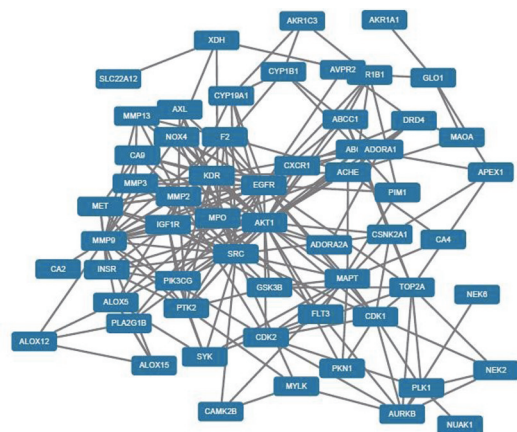
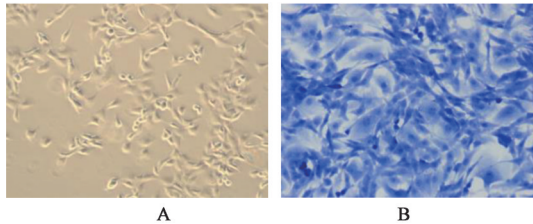


图1 槲皮素预测靶点与OA靶点筛选、对接

Fig. 1 Screening and docking of quercetin prediction target and OA target

**3.2 大鼠关节软骨细胞提取鉴定** 采用甲苯胺蓝染色手段对从SD大鼠关节软骨组织中分离得到的

关节软骨细胞进行鉴定。软骨细胞贴壁生长,呈多边形或梭形,形态大小基本一致、胞浆丰富、胞核清晰、生长状态良好;经甲苯胺蓝染色后,细胞核被染成颜色较深的蓝色,外形呈现圆球状,细胞间质及胞浆则显示成淡蓝色样。见图2。



A. 正常软骨细胞;B. 甲苯胺蓝染色鉴定

图2 大鼠软骨细胞的提取与鉴定(甲苯胺蓝,×100)

Fig. 2 Extraction and identification of rat chondrocytes (toluidine blue, ×100)

**3.3 槲皮素干预 IL-1 $\beta$  诱导退变关节软骨的最佳浓度** 本研究在槲皮素对大鼠关节软骨细胞干预最佳浓度采用 CCK-8 法进行筛选。10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  IL-1 $\beta$  的完全培养基培养 24 h 造模后的 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞活力明显低于未造模的空白组,且差异有统计学意义,说明质量浓度为 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  作用 24 h 可使大鼠软骨细胞明显发生退变,造模成功。同时,与正常完全培养基培养的退变关节软骨细胞的细胞活力相比,100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的槲皮素干预组的细胞活力增高是最明显的,且两者统计学有明显差异 ( $P<0.05$ ),说明槲皮素最佳作用浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究后续均用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的槲皮素进行干预。见表 2。

表2 不同浓度槲皮素对于采用 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  IL-1 $\beta$  干预退变关节软骨细胞活力 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of quercetin on activity of degenerative articular chondrocytes treated with 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  IL-1 $\beta$  ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力
空白		0.93 $\pm$ 0.12
槲皮素	0	0.44 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
	50	0.87 $\pm$ 0.20
	100	0.91 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>
	200	0.72 $\pm$ 0.31
	400	0.66 $\pm$ 0.14
	600	0.50 $\pm$ 0.08

注:空白组未加入 IL-1 $\beta$ 。与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,与 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

**3.4 槲皮素对 p38 MAPK 信号通路上游炎症因子表达水平的影响** 收集细胞培养上清液作为标本,

利用 ELISA 检测上清液中 p38 MAPK 信号通路上游炎症因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  的表达水平。利用 ELISA 试剂盒检测时,空白组 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  表达水平最低,模型组最高,且二者有显著性差异,说明 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  可以引起软骨细胞退变;同时,与模型组炎症因子表达水平相比 DMSO 组与其表达水平大致相同,二者无明显差异,说明 0.1% DMSO 对软骨细胞炎症因子的表达没有影响,在浓度不超过 0.1% 时可以应用 DMSO 作为溶剂来溶解阻断剂 SB203580,与模型组炎症因子表达水平相比,槲皮素组, p38 MAPK 信号通路阻断剂组和槲皮素加 p38 MAPK 信号通路阻断剂组均可以有效降低退变软骨细胞炎症因子的表达,但槲皮素与阻断剂联合应用时,炎症因子表达水平最低,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),说明槲皮素和 SB203580 均具有降低软骨细胞炎症因子表达的作用,作用相似,但槲皮素的作用弱于 SB203580。见表 3。

表3 槲皮素对 p38 MAPK 信号通路上游炎症因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  表达水平 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of quercetin on expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in upstream of p38 MAPK signaling pathway ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
W1	45.43 $\pm$ 0.52	30.53 $\pm$ 1.12
W2	80.03 $\pm$ 2.52 <sup>1)</sup>	47.03 $\pm$ 0.83 <sup>1)</sup>
W3	78.33 $\pm$ 1.97	45.47 $\pm$ 2.13
W4	66.53 $\pm$ 0.87 <sup>2,3)</sup>	38.07 $\pm$ 0.43 <sup>2,3)</sup>
W5	56.07 $\pm$ 1.36 <sup>2,3)</sup>	34.36 $\pm$ 1.61 <sup>2,3)</sup>
W6	49.70 $\pm$ 0.55 <sup>2)</sup>	28.81 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>

注:与 W1 组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与 W2 组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与 W6 组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ (表 4, 5 同)。

**3.5 Western blot 检测各组细胞 p38 MAPK 信号通路中相关蛋白 p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, Collagen II 及 ADAMTS-4 的表达水平** 结果显示, W1 组 Collagen II 的表达水平最高, W2 组最低, W1 组 MMP-13, p38 MAPK, p-p38 MAPK, ADAMTS-4 表达水平最低, W2 组表达水平最高,且二者有显著性差异,说明 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  可刺激软骨细胞 MMP-13, p38 MAPK, p-p38 MAPK 及 ADAMTS-4 的表达,并抑制 Collagen II 的表达,引起软骨细胞退变;与 W2 组蛋白表达水平相比 W3 组与其表达水平大致相同,二者无明显差异,说明 0.1% DMSO 对软骨细胞蛋白的表达没有影响,0.1% DMSO 溶液可作为溶剂来溶解 SB203580,与 W2 组相比,槲皮素组, p38 MAPK 信号通路阻断剂组以及槲皮素加阻断剂

组均可以有效降低退变软骨细胞 MMP-13, p38 MAPK, p-p38 MAPK, ADAMTS-4 的表达, 同时 Collagen II 的表达明显上升, 其中联合应用蛋白表达水平改变最明显, 差异有统计学意义, 说明槲皮

素和阻断剂 SB203580 均具有改变软骨细胞 p38 MAPK 信号通路中相关蛋白表达水平的作用, 但槲皮素作用效果要弱于 SB203580 阻断剂。见表 4, 图 3。

表 4 槲皮素干预后 OA 软骨细胞中 p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4, Collagen II 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Expression of p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4 and Collagen II in OA chondrocytes after quercetin intervention ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	p38 MAPK	p-p38 MAPK	MMP-13	ADAMTS-4	Collagen II
W1	0.032±0.024	0.061±0.003	0.056±0.008	0.097±0.073	0.990±0.011
W2	1.167±0.052 <sup>1)</sup>	1.023±0.043 <sup>1)</sup>	1.259±0.033 <sup>1)</sup>	1.240±0.013 <sup>1)</sup>	0.452±0.025 <sup>1)</sup>
W3	1.051±0.008	0.963±0.031	0.944±0.017	0.989±0.002	0.184±0.063
W4	0.927±0.071 <sup>2,3)</sup>	1.127±0.013 <sup>2,3)</sup>	0.639±0.002 <sup>2,3)</sup>	0.689±0.043 <sup>2,3)</sup>	0.528±0.013 <sup>2,3)</sup>
W5	0.650±0.022 <sup>2,3)</sup>	0.623±0.007 <sup>2,3)</sup>	0.568±0.053 <sup>2,3)</sup>	0.499±0.023 <sup>2,3)</sup>	0.718±0.006 <sup>2,3)</sup>
W6	0.185±0.012 <sup>2)</sup>	0.285±0.013 <sup>2)</sup>	0.209±0.093 <sup>2)</sup>	0.218±0.081 <sup>2)</sup>	0.876±0.031 <sup>2)</sup>

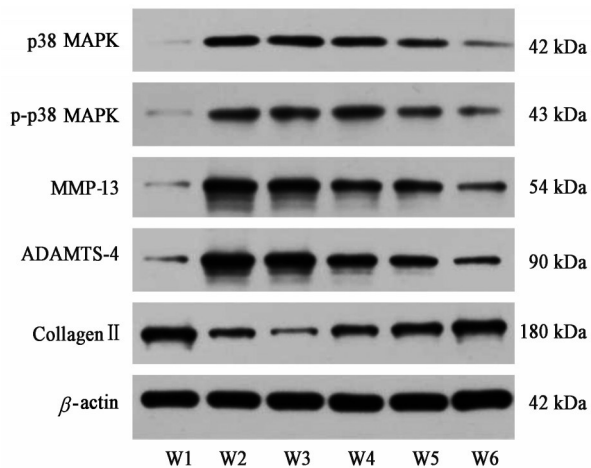


图 3 槲皮素干预后 OA 软骨细胞中 p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4, Collagen II 蛋白表达

Fig. 3 Expression of p38 MAPK, p-p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4 and Collagen II in OA chondrocytes after quercetin intervention

素和阻断剂 SB203580 均具有改变软骨细胞 p38 MAPK 信号通路中相关蛋白表达水平的作用, 但槲皮素作用效果要弱于 SB203580 阻断剂。见表 4, 图 3。

ADAMTS-4, Collagen II mRNA 的表达水平 结果显示, W1 组 Collagen II mRNA 的表达水平最高, W2 组表达水平最低, W1 组 MMP-13 mRNA, p38 MAPK mRNA 的表达水平最低, W2 组表达水平最高, 且二者有显著性差异, 说明  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  可以刺激软骨细胞 MMP-13, p38 MAPK, ADAMTS-4 的表达, 并抑制 Collagen II 的表达, 引起软骨细胞退变; 同时与 W2 组相比, DMSO 组与其表达水平大致相同, 二者无明显差异, 说明 0.1% 的 DMSO 对软骨细胞基因的表达没有影响。与模型组表达水平相比, 槲皮素组、阻断剂组及槲皮素加阻断剂组均可有效降低退变软骨细胞 MMP-13, p38 MAPK, ADAMTS-4 mRNA 的表达, 同时升高 Collagen II mRNA 的表达, 但是组合应用时, 基因表达水平改变更明显, 差异有统计学意义, 说明槲皮素和阻断剂 SB203580 均具有相同作用, 改变软骨细胞 p38 MAPK 信号通路中相关基因表达水平, 但槲皮素作用弱于阻断剂。见表 5。

### 3.6 Real-time PCR 法检测各组细胞 p38 MAPK 信号通路中相关基因 p38 MAPK, MMP-13,

表 5 槲皮素干预后 OA 软骨细胞中 p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4, Collagen II mRNA 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Expression levels of p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4 and Collagen II mRNA in OA chondrocytes after quercetin intervention ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	p38 MAPK	ADAMTS-4	Collagen II	MMP-13
W1	0.493±0.014	0.461±0.003	1.024±0.015	0.542±0.075
W2	1.254±0.032 <sup>1)</sup>	1.663±0.022 <sup>1)</sup>	0.462±0.072 <sup>1)</sup>	1.010±0.102 <sup>1)</sup>
W3	1.131±0.008	1.211±0.016	0.413±0.016	0.956±0.019
W4	0.998±0.121 <sup>2,3)</sup>	0.901±0.071 <sup>2,3)</sup>	0.464±0.001 <sup>2,3)</sup>	0.891±0.021 <sup>2,3)</sup>
W5	0.592±0.032 <sup>2,3)</sup>	0.714±0.012 <sup>2,3)</sup>	0.631±0.012 <sup>2,3)</sup>	0.832±0.047 <sup>2,3)</sup>
W6	0.499±0.018 <sup>2)</sup>	0.619±0.088 <sup>2)</sup>	1.011±0.003 <sup>2)</sup>	0.788±0.015 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

槲皮素广泛存在于水果、蔬菜及中药材中,具有抗炎、抗氧化应激等作用,根据现有研究得知,可能具有保护骨性关节炎关节软骨的作用,故笔者采用网络药理学技术挖掘槲皮素的作用靶点及通路,分析该药物在骨性关节炎疾病领域的作用机制,并通过细胞实验验证阻断 p38 MAPK 信号通路槲皮素对上述预测靶点的干预作用,对于槲皮素在该领域的科学推广具有十分重要的意义,同时具有推动作用。

通过网络药理学技术对疾病靶点的预测,笔者得到作用靶点基因 66 个,包括 MMP 家族, ALOX 家族, CA 家族及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 等,这些极有可能是槲皮素保护关节软骨的潜在靶点。采用 GO 分析处理相关数据,发现预测靶点涉及多项机体调节,例如活性氧代谢,受伤反应的调节,维生素代谢,NO 代谢过程,机体老化,细胞运动调节,镉的反应等过程。机体老化使关节软骨的耐受力降低,出现磨损继而引发骨性关节炎疼痛;研究表明,活性氧与各类疾病均存在一定关联,包括癌症、身体各部炎症、心血管疾病等<sup>[13]</sup>。NO 对于骨软骨的修复有着重要的作用,研究发现,一氧化氮合酶 (NOS) 抑制剂对于抑制软骨修复组织 NO 的释放作用十分明显,将 NOS 活性降低时, NOS 抑制剂软骨修复组织质量的提高具有明显作用<sup>[14-15]</sup>。维生素代谢过程与骨性疾病存在密不可分的关系,维生素 D 对于成骨细胞和破骨细胞的细胞活性具有调节作用;维生素 A 具有抑制成骨细胞功能;维生素 K 通过抑制骨吸收激活因子 (IL-1, IL-6), 降低破骨细胞活性,减少骨流失,降低骨性关节炎的患病风险,同时,低浓度 B 族维生素也可能是骨质量降低的一个引发因素<sup>[16-18]</sup>。镉的反应过程可增强破骨细胞的活性,同时镉损害的重要靶器官名单中含有骨骼,而破骨细胞可能是镉的变化引发骨病的靶细胞<sup>[19-21]</sup>,镉对于骨骼的代谢具有干扰作用,其作用机制与对骨骼形成和吸收过程的影响有关。

信号通路能够在众多疾病中起着重要的调节作用,对信号通路采用 KEGG 通路富集分析,槲皮素与多条信号通路存在相关性,其中能参与调控骨性关节炎的信号通路多条。根据预测结果显示, MAPK 信号通路,分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白 (Wnt/ $\beta$ -catenin) 信号通路,核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路,低氧诱导因子 (HIF)-1 信号通路, Hedgehog 信号通路, Notch 信号通路等相关通路分别与骨性关节炎存在不同程度的相关性。研究时间久远的 Wnt/

$\beta$ -catenin 信号通路具有分化成骨和破骨细胞的作用<sup>[22]</sup>, MAPK 信号通路则是介导调控骨性关节炎软骨病变的信号转导系统, MAPK 相关信号通路的激活可改变基质金属蛋白酶的表达式,可调控软骨细胞的细胞凋亡及骨破坏等一系列反应<sup>[23]</sup>, NF- $\kappa$ B 信号通路病理性的激活可参与多种机体炎性反应,并且影响骨性关节炎的疾病的发生与发展,其作用为调节细胞的炎性反应<sup>[24]</sup>, Notch 信号通路作用为保证软骨细胞的不同环境下的表型,调控软骨细胞的分化并影响软骨基质的代谢,其活化可影响 MMP-13 和 VEGFA 的表达式,最终导致关节软骨的破坏<sup>[25]</sup>。

此次实验验证的 p38 MAPK 信号通路在 OA 关节软骨细胞中被高度激活,是介导 OA 病理进展的重要信号通路。并且,这条信号通路是通过网络药理学技术预测的 MAPK 信号通路。FAN 等<sup>[26]</sup>研究表明, OA 关节软骨内的磷酸化的 p38 含量明显高于正常关节软骨组织相比,与 ERK 趋势一致。RASHEED 等<sup>[27]</sup>通过 Real-time PCR, Western blot 等实验方法在 OA 软骨细胞内发现了 p38 MAPK  $\alpha$ , p38 MAPK  $\gamma$  和 p38 MAPK  $\delta$  的表达式,但 p38 MAPK  $\beta$  的表达式未检测到,同时,研究表明 IL-1 $\beta$  可以显著提高 p38 MAPK  $\alpha$ , p38 MAPK  $\gamma$  的磷酸化水平,但对 p38 MAPK  $\delta$  没有明显作用,与通路的激活有密切的关系。XU 等<sup>[28]</sup>应用 Western blot 等方法阐明了 p38 MAPK 信号通路在 OA 软骨细胞凋亡中作用巨大,关系密切。同时,在炎症软骨基质中, p38 MAPK 信号通路的激活可以诱导炎症因子 [TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, 超氧化物歧化酶 (SOD)] 的分泌、基质金属蛋白酶 (MMP-3, MMP-9, MMP-13) 和带有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚素及金属蛋白 ADAMTS-4, ADAMTS-5 等的表达式,因此 Collagen II 降解,引发机体软骨细胞的凋亡。根据预测和上述已有研究,槲皮素对 OA 关节软骨高度激活的 p38 MAPK 信号通路的干预可达到保护骨性关节炎关节软骨的防治效果。

查阅相关文献发现,建立体外退变关节软骨细胞模型的方法十分繁多。QIN 等<sup>[29]</sup>通过  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的脂多糖 (LPS) 干预正常软骨细胞 8 h 成功得到退变关节软骨细胞, LPS 可诱导 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达式,但是此方法作用于 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[30]</sup>,而本次实验研究的信号通路靶点是 p38 MAPK 通路。还有较多研究采用  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  干预健康软骨细胞 24 h,继而得到退变软骨细胞<sup>[31]</sup>,此方法应用炎症因子直接与细胞发生炎性反应,发病机制与骨性

关节炎十分近似,成功率较高,在实验研究中是广泛运用于造模方法之一。此外,也有应用 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 反式维甲酸(TRA)干预<sup>[32]</sup>以及NO干预正常软骨细胞等建模方法,但是这些方法的使用仍处于初步研究阶段,没有大范围推广。综合分析,笔者认为最值得推荐的是使用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 $\beta$ 诱导24 h。结合本研究的目的是验证槲皮素通过靶向调控p38 MAPK信号通路来保护关节软骨,而IL-1 $\beta$ 诱导更直接快速,最接近OA的发病机制,而且在文献记载中使用频次最多,成功率更高。

研究结果显示IL-1 $\beta$ 诱导退变软骨细胞中,炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 的表达水平显著升高,同时p38 MAPK的表达量也显著上升,并且发生磷酸化,生成p-p38 MAPK,继而软骨细胞中Collagen II表达下降,MMP-13的表达量上升。TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 作为炎症信号通路p38 MAPK信号通路上游启动因子,其在退变关节软骨细胞中高表达,进而激活p38 MAPK信号通路,并导致其磷酸化,使得p38 MAPK信号通路激活后磷酸化水平提高,反过来又会加剧炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 的分泌,进一步抑制下游分子Collagen II表达和激活MMP-13的表达,导致关节软骨细胞发生进一步退变。在软骨的退行性改变过程中,II型胶原纤维的降解起主要作用。而MMP-13对II型胶原纤维的降解能力是其他MMPs的10~30倍,况且其他胶原纤维酶发挥降解作用也需要MMP-13的参与。MMPs是一种锌依赖的家族,特点为促进各种细胞外基质的转化,其是NO诱导的,是参与OA软骨损害的主要作用酶,对II型胶原蛋白具有水解作用,所以抑制其表达会阻碍II型胶原蛋白的降解,而通过GO分析预测的槲皮素保护关节软骨靶点基因涉及到NO的代谢,这也说明槲皮素应具有保护关节软骨的作用。上述信号通路的相关因子,应用槲皮素,p38 MAPK信号通路阻断剂SB203580及二者混合干预后,炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 的表达水平显著降低,Collagen II表达上升,p38 MAPK, MMP-13, ADAMTS-4表达水平下降。由此可以看出p38 MAPK信号通路在OA病理进展中的发挥着重要的调节作用,是OA防治的重要靶点,同时槲皮素与阻断剂SB203580具有相同的作用,可通过抑制炎症因子MMP, TNF, IL-1 $\beta$ 等表达,提高Collagen II表达来加速退变软骨细胞的修复,保护关节软骨细胞。但根据实验结果发现,其作用弱于阻断剂SB203580,具有靶向阻断p38 MAPK信号通路的作用但非完全阻断,其特异性有

待进一步探索。

根据网络药理学数据挖掘及体外实验表明,槲皮素在骨性关节炎疾病防治中具有降低软骨炎症因子表达的作用,可通过阻断p38 MAPK信号通路使相关因子表达水平向好改变,继而达到保护骨性关节炎关节软骨的目的,起到防治作用。

#### [参考文献]

- [1] LANE N E, SHIDARA K, WISE B L. Osteoarthritis year in review 2016: clinical [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(2):209-215.
- [2] FRANK M, BWEMERO J, KALUNGA D, et al. OA60 Public health and palliative care mix; a ccmedicine approach to reverse the overgrowing burden of non-communicable diseases in Tanzania [J]. BMJ Support Palliat Care, 2015, 5(Suppl 1):A19.
- [3] KIM H, KANG D, CHO Y, et al. Epigenetic regulation of chondrocyte catabolism and anabolism in osteoarthritis [J]. Mol Cells, 2015, 38(8):677-684.
- [4] MC ALINDON T E, BANNURU R R, SULLIVAN M C, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(3):363-388.
- [5] 任红革, 崔逢德. 细胞因子在骨性关节炎中的表达与应用 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(52):9828-9835.
- [6] XIANG X, ZHOU Y, SUN H, et al. Ivabradine abrogates TNF-alpha-induced degradation of articular cartilage matrix [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 66:347-353.
- [7] FAVERO M, BELLUZZI E, TRISOLINO G, et al. Inflammatory molecules produced by meniscus and synovium in early and end-stage osteoarthritis: a coculture study [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7):11176-11187.
- [8] BASU A, SCHELL J, SCOFIELO R H. Dietary fruits and arthritis [J]. Food Funct, 2018, 9(1):70-77.
- [9] KANZAKI N, SAITO K, MAEDA A, et al. Effect of a dietary supplement containing glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and quercetin glycosides on symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(4):862-869.
- [10] LEYVA-LOPEZ N, GUTIEERREZ-GRIJALVA E P, et al. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6):E921.
- [11] AHMAD R, SYLVESTER J, AHMAD M, et al.

- Involvement of H-Ras and reactive oxygen species in proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507(2):350-355.
- [12] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. Swiss target prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1):357-364.
- [13] DI M S, REED T T, VENDITTI P, et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, doi: 10.1155/2016/1245049.
- [14] KANZAKI H, SHINOHA RAF, KAJIYA M, et al. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling [J]. *J Biological Chem*, 2013, 288(32):23009-23020.
- [15] LEE S W, SONG Y S, SHIN S H, et al. Cilostazol protects rat chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis *in vitro* and prevents cartilage destruction in a rat model of osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(3):790-800.
- [16] 陈功. 维生素D与膝骨性关节炎中医证候分型 [J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(10):140-142.
- [17] 陈功, 彭强, 陈飞, 等. 维生素D与骨性关节炎中医辨证分型相关性分析 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(36):80-83.
- [18] MC L R R, JACQUES P F, SELHUB J, et al. Plasma B vitamins, homo-cysteine, and their relation with bone loss and hip fracture in elderly men and women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(6):2206-2212.
- [19] AOUR W H, MANCIAI A, HE Q W, et al. T-cell-derived interleukin-17 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through restricted activation of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade: role of distal sequences in the 3'-untranslated region of COX-2 mRNA [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29):26897-26907.
- [20] 王声雨, 陶树清, 荣杰生, 等. 骨性关节炎滑膜组织中16种元素的分析 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2013, 2(7):375-378.
- [21] BRZOSKA M M, MONIUSZKO-JAKONIUK J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 82(2):468-477.
- [22] BRZOSKA M M, MAJEWSKA K, MONIUSZKO J J. Mineral status and mechanical properties of lumbar spine of female rats chronically exposed to various levels of cadmium [J]. *Bone*, 2003, 34(3):517-526.
- [23] 廖建钊, 章晓云, 张璇. 骨性关节炎发生发展中的分子信号通路 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(21):3394-3400.
- [24] BINIECKA M, CONNOLLY M, GAO W, et al. Redox-mediated angiogenesis in the hypoxic joint of inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(12):3300-3310.
- [25] 曹俊杰, 李爱芳, 卫亚琳, 等. Notch信号参与BMP4诱导的间充质干细胞成骨分化及其机制的初步探讨 [J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(4):48-55.
- [26] FAN Z, SODER S, OEHLER S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(3):938-946.
- [27] RASHEED Z, AKHTAR N, HAQQI T M. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced activation of MKK-3, p38 $\alpha$ -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Arthritis Res Therapy*, 2010, 12(5):R195.
- [28] XU L, ZHAI L, GE Q, et al. Vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) regulates apoptosis of chondrocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in osteoarthritis [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6):1924-1932.
- [29] QIN Y, CHEN Y, WANG W, et al. HMGB1-LPS complex promotes transformation of osteoarthritis synovial fibroblasts to a rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like phenotype [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1077.
- [30] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1):1-12.
- [31] HOSAKA Y, SAITO T, SUGITA S, et al. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(5):1875-1880.
- [32] CHEN C, ZHU Z, HU N, et al. Leonurine hydrochloride suppresses inflammatory responses and ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis via NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1):146-154.

[责任编辑 顾雪竹]